

Bild: PCO AG

Bild: PCO AG

**Bild 1** | GSDIM Nanoskopiebilder (Falschfarbendarstellung) von Vimentin, ein Typ III intermediäres Filament Protein, das mit Alexa 647 angefärbt wurde. Das sCMOS Kamerasystem pco.edge 5.5 nahm mit 1.176fps (850µs Belichtungszeit) auf. Links das Weitfeld-Bild; rechts das hochaufgelöste Bild. Die dargestellte Fläche entspricht 18x18µm<sup>2</sup>. Mit freundlicher Genehmigung Leica Microsystems CMS GmbH.

# Geschwindigkeit ist keine Hexerei

## Wie verarbeite ich 1GB/s Bilddaten bei sCMOS-Kameras?

Seit dem Erscheinen der ersten scientific CMOS (sCMOS) Kameras im Jahr 2010 haben sich viele Ansätze in der Mikroskopie rasend schnell weiterentwickelt. Die neue Bildsensortechnologie, die von einem Konsortium aus BAE Fairchild Imaging, Andor Technology und PCO, entwickelt wurde, ermöglichte zum ersten Mal eine Reihe von Leistungsparametern, die es vorher selbst bei den besten gekühlten CCD-Kameras nicht gab. Die sCMOS-Kameras haben Auflösungen im Bereich von 4 bis 5,5MP, Bildraten bis zu 100fps bei Vollauflösung, ein sehr niedriges Ausleserauschen von 1 bis 1,2 Elektronen und eine hohe Intra-Szenen-Dynamik von 16Bit.

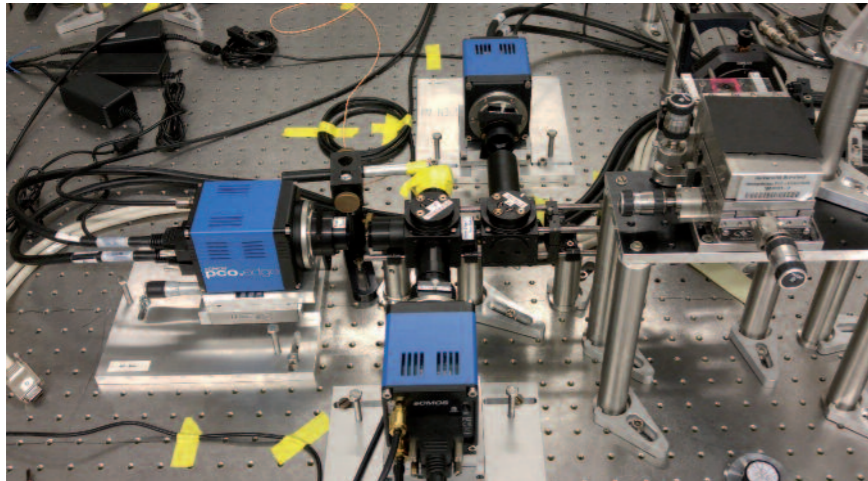
Diese Eigenschaften waren im Bereich der Mikroskopie willkommen, denn hier wurden verschiedene methodische Ansätze verfolgt, die die Auflösungsgrenze der besten Objektive überwinden, was im Jahre 2015 durch die Vergabe der Nobelpreise in Chemie auch honoriert wurde. Als Beispiel mag hierfür die Lokalisierungsmikroskopie dienen, die mit verschiedenen Verfahren erreicht, dass nicht alle fluoreszierenden Markermoleküle gleichzeitig leuchten. Wenn die einzeln leuchtenden Moleküle weit genug voneinander entfernt sind, kann man mit herkömmlichen Mikroskopen unscharfe Lichtpunkte aufnehmen. Indem man das Vorwissen, dass es sich um einzelne Moleküle handelt einsetzt, lassen sich

durch entsprechende Algorithmen die Orte der Moleküle bestimmen und speichern. Um ein solches super aufgelöstes Bild der markierten Zelle zu erstellen, müssen in Folge viele solche Bilder mit unscharfen Lichtpunkten aufgenommen werden. Die Ortsinformationen werden akkumuliert, so dass nach vielen hundert Bildern ein super aufgelöstes Bild der markierten Zelle entsteht, was in erster Näherung eine gewisse Ähnlichkeit mit Bildern des Impressionismus hat. Die mittlerweile kommerziell erhältlichen Mikroskope und unterschiedlichen Verfahren wie PALM, STORM, dSTORM und GSDIM unterscheiden sich ausschließlich in der Art und Weise wie erreicht wird, dass nicht alle Moleküle gleich-

zeitig leuchten, die Bildaufnahme und Auswertung ist bei allen Verfahren nahezu gleich. Zuerst wurden Kameras mit emCCD-Bildsensoren eingesetzt, die selbst mit eingeschränkten Bildfeldern auf Bildraten von 20 bis 100fps kamen. Damit hat es zwischen zehn und 20 Minuten gedauert, bis ein Bild fertig war. Die neuen sCMOS-Kamerasysteme ermöglichen Bildraten mit mehr als 1.000fps bei entsprechend eingeschränktem Bildfeld, so dass die Bildaufnahme im Sekundenbereich liegt. Bild 1 zeigt sowohl eine Weitfeldbild als auch ein hochaufgelöstes Bild eines fadenförmigen Proteins, das mit dem Farbstoff Alexa 647 angefärbt wurde. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica GSD



Bild: PCO AG



**Bild 2** | fairSIM-Aufbau der Arbeitsgruppe von Prof. T. Huser, Universität Bielefeld, bei dem mit Hilfe strukturierter Beleuchtung die Mikroskopauflösung auf 100nm erhöht wird und gleichzeitig spektral getrennt drei verschiedene Farbstoffe erfasst werden. Alle drei sCMOS-Kameras laufen mit 100fps und erzeugen jeweils einen Datenstrom von 1GB/s.

Mikroskop im Rahmen des BMBF Forschungsprojekts GSDIM gemacht. Hierbei liefert die sCMOS Kamera pco.edge 5.5 einen Bilddatenstrom von 1GB/s, der für die zu dem Zeitpunkt zur Verfügung stehende schnellste Bilddatenschnittstelle Camera Link (maximal 850MB/s) zu hoch war. Deshalb wurde bei den ersten sCMOS-Kameras entweder ein Bilddatenspeicher in die Kamera integriert oder eine Datenkompression, die visuell verlustfrei war, eingeführt. Ein weiterer Nachteil von Camera Link sind die sehr steifen und teuren Spezialkabel, deren maximale Länge bei ungefähr 10m liegt. Auch weitere datenhungrige Mikroskop-Methoden wie Strukturierte Beleuchtung (SIM: Structured Illumination Microscopy) oder Lichtblatt-Mikroskopie (SPIM: Selective Plane Illumina-

tion Microscopy) verlangen hohe Bilddatenraten, damit dem Anwender möglichst in Echtzeit die Resultate der zum Teil aufwendigen Bildverarbeitungsketten zur Verfügung gestellt werden. Hinzu kommt die Anforderung mehrere verschieden farbige Marker messen zu können, so dass auch mehrere Kameras gleichzeitig zum Einsatz kommen (Bild 2). Dies hat zur Folge, dass schnell mehrere Gigabyte/s an Bilddaten entstehen, die verarbeitet und/oder gespeichert werden müssen. Zudem gibt es bei den aktuellen Mikroskopie-Methoden den Wunsch, noch schneller aufnehmen zu können, allein es fehlen noch die erforderlichen sCMOS-Bildsensoren. Der Status Quo im Bereich Life Science ist, dass es Kamerasysteme bzw. Bildsensoren gibt, die in der Lage sind 1GB/s Bilddaten zu

erzeugen und den Wunsch höhere Bilddatenmengen zu erreichen, und es gibt den Bedarf diese Bilddaten zu verarbeiten und zu verwenden.

**Schnittstelle Camera Link HS**

Hier rückt das Thema schnelle Bilddatenschnittstellen in den Fokus. Schnelle Schnittstellen wie CoaXPress, Thunderbolt, 10G Ethernet und Camera Link HS sind in den letzten Jahren vorgestellt worden. Wenn man sich aber die Anforderungen an Hardware, Kabel und Einsatz anschaut, auch die Anforderungen an eine mögliche Skalierbarkeit für die Zukunft, erscheint Camera Link HS für die beschriebenen Anwendungen besonders attraktiv. Zum einen basiert es auf 10Gbit-Netzwerktechnik, die vielfach erprobt und zuverlässig eingesetzt wird und zudem preiswert ist. Die optische Übertragungstechnik ermöglicht hierbei sowohl flexible handliche Kabel als auch die Überwindung großer Distanzen und keine Störanfälligkeit bei EMV-kritischer Umgebung. Zudem handelt es sich um ein fehlertolerantes und offenes Protokoll, welches leicht skalierbar ist. In Tabelle 1 sind einige der wichtigsten Eigenschaften von Camera Link HS beschrieben, die erkennen lassen warum diese Schnittstelle für datenhungrige Kameraanwendungen so gut geeignet ist. Auch wenn CoaXPress derzeit noch (bedingt durch eine schnellere Entwicklung) einen gewissen Einführungsvorsprung hat, ist es für viele Anwendungen - wie auch die anfangs beschriebenen - aufgrund der



Bild: PCO AG

**Bild 3** | CLHS Grabber Komodo von Kaya Instruments mit 4x SFP+ und 1x QSFP Anschlüssen verbunden mit einer pco.edge 5.5 CLHS. Ohne Adapterkabel können direkt vier solcher Kameras an einem Framegrabber betrieben werden.

Parameter	Camera Links HS
Übertragungsrate	10.3125Gb/s
Maximale Kabellänge	nahezu unbegrenzt
Kabelart	Lichtleiter: unempfindlich gegenüber elektromagnetischen Störungen, handlich, leicht, kostengünstig
Hardware	Standard Netzwerktechnik, Ethernet
IP Core	IP-Core in FPGA; Committee-IP-Core gewährleistet die Kompatibilität
Datensicherheit	M-Protokoll: Fehlererkennung mittels Cycle Redundancy Check (CRC) und Resend-Mechanismus X-Protokoll: Forward Error Correction (FEC)
Triggerfähigkeit	Framegrabber kann verschiedene Trigger-Events mit niedrigem Jitter auslösen, verschiedene Signallaufzeiten für Trigger-over-Cable kompensierbar (ab V2.0)
ROI (Regions of Interest)	Mehrere und variable ROIs, Bildausschnitte können im Bild on-the-Fly geändert werden (ab V2.0)
Zukunftsfähigkeit	preiswerte Hardware wegen Standard Netzwerktechnik

Tabelle 1 | Technische Eigenschaften von Camera Link HS

bekanntem Nachteile, wie geringere Kabellängen, teurere Spezialkabel, nicht ausreichende Fehlersicherheit u.a. weniger gut geeignet, so dass in Zukunft für anspruchsvolle Anwendungen Camera Link HS die Schnittstelle der Wahl sein wird.

**Framegrabber als Multi-Talent**

Mittlerweile bieten Firmen wie Kaya Instruments, Gidel und Silicon Software entsprechende Camera Link HS Framegrabber an. Hier zeichnet sich der Komodo Grabber von Kaya Instruments durch eine einfache Integration und Leistungsfähigkeit aus, da er sowohl vier SFP+ als auch einen QSFP-Anschluss zur Verfügung stellt. Somit kann man maximal acht Camera Link HS Kanäle verwenden, was bis zu acht pco.edge CLHS Kameras (1GB/s) oder zwei pco.flow Kameras (4GB/s) bedeutet. Er benötigt hierfür einen PCIe Gen3 (x8) Steckplatz mit einer maximalen Streaming-Bandbreite von 6,5GB/s im Computer. Einer der Camera Link HS Kanäle schafft ca.1,2GB/s. In Zukunft ist die in Bild 2 gezeigte Anwendung wesentlich eleganter zu lösen in dem man drei pco.edge CLHS Kameras mit nur einem

Kaya Instruments Framegrabber verwendet, da dieser Grabber den Anschluss von bis zu vier Kameras mit Camera Link HS X-Protokoll (10G) gestattet. Hierdurch gestaltet sich mit den flexiblen Glasfaserkabeln der Anschluss leichter und auch die Anforderungen an die Anzahl der Steckplätze des Computers ist gesunken, da nur noch ein einziger High-End-Framegrabber einen Steckplatz benötigt. So wird zudem erreicht, dass ein PC alle Bilddaten verarbeitet und auswertet, ohne dass die Daten von verschiedenen Computern erst zusammengeführt werden zu müssen. Zudem ist der Komodo Grabber durch sein offenes Inter-

face zu seinem leistungsfähigen FPGA, der durch den Bilddaten-Transfer nur minimal ausgelastet ist, auch in der Lage eine sehr schnelle Bilddatenvorverarbeitung durchzuführen. Auf diese Art und Weise, oder durch Verarbeitung der Daten im RAM des Computers und Ausnutzung der Leistungsfähigkeit der Graphikprozessoren, lassen sich auch komplexen Bilddatenverarbeitungsprozesse durchführen und immer wieder anpassen, was bei sogenannten intelligenten Kameras nur begrenzt möglich ist. Da die CLHS-Schnittstelle schnell genug ist, verliert man hierbei auch keine Zeit.

[www.pco.de](http://www.pco.de)  
[www.kayainstruments.com](http://www.kayainstruments.com)

Autor | Dr. Gerhard Holst, Science & Research, PCO AG



The **Art of M & A** is in bridging the gaps.

Vision Ventures führt Ihren Unternehmensverkauf zum Erfolg. Nach allen Regeln der Kunst.

**VISION VENTURES**

[www.vision-ventures.eu](http://www.vision-ventures.eu) [info@vision-ventures.eu](mailto:info@vision-ventures.eu)