



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.: G 01 N 21/64

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ PATENTSCHRIFT A5

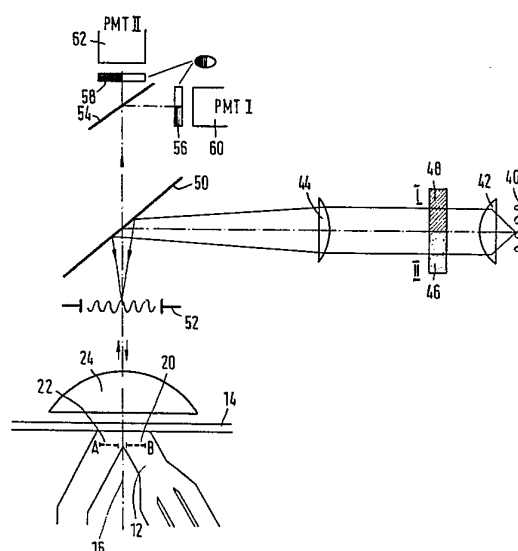
⑪

626 725

②① Gesuchsnummer:	2198/78	⑦③ Inhaber:	Dr. Wolfgang Göhde, Münster (DE)
②② Anmeldungsdatum:	01.03.1978		
③③ Priorität(en):	04.03.1977 DE 2709399	⑦② Erfinder:	Dr. Wolfgang Göhde, Münster (DE)
②④ Patent erteilt:	30.11.1981		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	30.11.1981	⑦④ Vertreter:	Dipl.-Ing. H.R. Werffeli, Zürich

⑤④ Einrichtung zum Messen der Fluoreszenz von Zellen.

⑤⑦ Für die Beobachtung, Messung und Registrierung von Zellen, die aufgrund besonderer Färbung und/oder Fluoreszenz-Anregung Maxima in zwei verschiedenen Wellenlängen zeigen, wird eine Messeinrichtung geschaffen, die eine getrennte Beleuchtung (46, 48) und Beobachtung (50, 60, 62) unter im übrigen praktisch gleichen Bedingungen ermöglicht. Die Messeinrichtung weist eine Beobachtungsebene (A - B) im Knie eines Durchflusskanals (52) auf, wobei die Ebene rechtwinklig zu der Ebene (16) liegt, die von den Achsen des Zufluss- und des Abfluss-Schenkels gebildet wird.



PATENTANSPRÜCHE

1. Einrichtung zum Messen der Fluoreszenz von Zellen, die in einer Flüssigkeit suspendiert sind und mit der Flüssigkeit durch zwei Messstellen hindurchfliessen, die in einem Durchflusskanal einer Durchflusskammer ausgebildet und durch mindestens ein Fenster in der Wandung des Kanals beobachtbar sind, wobei zur Fluoreszenzanregung zwei in der Wellenlänge verschiedene Lichtquellen vorgesehen sind, und zwar je eine für jede Messstelle, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Messstellen (20, 22) an einem Knie des Durchflusskanals (12) ausgebildet sind, wobei der Zufluss- und der Abflussquerschnitt im wesentlichen gleich gross sind und je eine der beiden Messstellen bildet, die durch die vom Knie eingeschlossene Kante (18) getrennt sind.

2. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Beobachtungsfenster (14) die der eingeschlossenen Ecke (16, 18) gegenüberliegende Aussenwand des Knies bildet.

3. Einrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Beobachtungsfenster (14) und die Fläche der Messstellen (20, 22) im wesentlichen rechtwinklig zur Winkelhalbierenden des Kniewinkels liegen.

4. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Hüllstromzuführung (26, 28, 30).

5. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen zwei nebeneinander liegende, in der Durchlässigkeit verschiedene Filter (46, 48) sind, die zwischen einer primären Lichtquelle (40) und den Messstellen (20, 22) angeordnet sind.

6. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jeder Messstelle (20, 22) je ein Photovervielfacher (60, 62) zugeordnet ist.

7. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungseinrichtung (40, 46, 48) und die Beobachtungseinrichtung (60, 62) unter Verwendung von Teilerplatten (50, 54) auf derselben Seite des Beobachtungsfensters (14) liegen.

8. Einrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass vor jedem Photovervielfacher eine halbseitig geschlossene Blende (56, 58) angeordnet ist.

Biologische Zellen, z.B. aus dem menschlichen Körper entnommene Zellen, können dadurch untersucht werden, dass sie mit verschiedenen chemischen Stoffen behandelt und Lichterscheinungen beobachtet und gemessen werden, die nach dieser Behandlung und Bestrahlung der Zellen mit Licht auftritt, z.B. die Fluoreszenz der Zellen. Z.B. werden Zellen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt, von denen der eine für die DNS und der andere für das Protein der Zelle charakteristische Fluoreszenzerscheinungen verursacht.

Dabei werden Farbstoffe verwendet, die bei der Fluoreszenzanregung Maxima bei verschiedenen Wellenlängen zeigen. Unter Verwendung der bisher üblichen Geräte kommt es bei simultanen Messungen dadurch zu Fehlern, dass die Fluoreszenzspektren der verwendeten Farbstoffe verhältnismässig breit sind und einander überlappen. Licht des einen Farbstoffes erreicht bei diesen Geräten immer auch zu einem gewissen Teil den für den anderen Farbstoff bestimmten Photovervielfacher. Eine Vorrichtung für diesen Zweck beschreibt M. Stöhr, «Double Beam Application in Flow Technics and Resent Results», Pulse-Cytophotometry, 1976, p. 39–45. Die Vorrichtung ist mit einem Argon-Ionen-Laser und einem Helium-Cadmium-Laser ausgestattet, die bei 488 nm und 441 nm emittieren. Zusätzlich werden noch besondere Spiegel für 325 nm verwendet. Stöhr erwähnt noch, dass Schwierigkeiten vermieden werden können, falls die Punkte des Zusammenwirkens zwischen einem Teil-

chen und den erleuchtenden Laserstrahlen räumlich getrennt werden. Irgendeine Lösung dieses Problems ist jedoch in dem zitierten Aufsatz nicht dargestellt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Einrichtung mit zwei Messstellen zu schaffen, bei denen trotz räumlicher Trennung der Punkte, an denen die Lichtquellen mit den Teilchen zusammenwirken, im wesentlichen gleiche Durchfluss- und Beobachtungsbedingungen herrschen. Die Erfindung sieht zur Lösung dieser Aufgabe eine Einrichtung zum Messen der Fluoreszenz von Zellen vor, die in einer Flüssigkeit suspendiert sind und mit der Flüssigkeit durch zwei Messstellen hindurchfliessen, die in einem Durchflusskanal einer Durchflusskammer ausgebildet und durch mindestens ein Fenster in der Wandung des Kanals beobachtbar sind, wobei die Zellen zur Fluoreszenz durch zwei in der Wellenlänge verschiedene Lichtquellen angeregt werden, von denen je eine Lichtquelle einer Messstelle zugeordnet ist; die Einrichtung zeichnet sich dadurch aus, dass die Messstellen an einem Knie des Durchflusskanals ausgebildet sind, wobei der Zufluss- und der Abflussquerschnitt im wesentlichen gleich gross sind und je eine der beiden Messstellen bilden, die durch die vom Knie eingeschlossene Ecke getrennt sind. Vorzugsweise ist die der eingeschlossenen Ecke gegenüberliegende Aussenwand des Knies als Beobachtungsfenster ausgebildet. Eine Weiterausbildung der Erfindung sieht ferner vor, dass das Beobachtungsfenster und die Durchtrittsflächen der Messstellen im wesentlichen rechtwinklig zur Winkelhalbierenden des Kniewinkels sich erstrecken.

Bei der erfindungsgemässen Einrichtung zeigen die beiden Messstellen praktisch gleiche Durchflussbedingungen. Sie sind zwar räumlich getrennt, trotzdem so eng benachbart, dass die für die Beleuchtung erforderlichen zwei getrennten Lichtquellen keine teuren Laser zu sein brauchen. Vielmehr können in einer Weiterausbildung der Erfindung die Lichtquellen zwei nebeneinander liegende, in der Durchlässigkeit verschiedene Filter sein, die zwischen einer primären Lichtquelle und der Messstelle angeordnet sind. Unter Verwendung einer üblichen, dichromatischen Teilerplatte wird das Licht von der primären Lichtquelle durch die beiden Filter entsprechend dem «Kühlerischen Beleuchtungsprinzip» nach den beiden Messstellen gesandt, von denen die eine das Licht des einen Filters und die andere das Licht des zweiten Filters empfängt. Hinter der Teilerplatte sind unter Verwendung einer zweiten Teilerplatte zwei Photomultiplier angeordnet, die über halbseitige Blenden in entsprechender Aufteilung die Fluoreszenz von jeweils einer der Messstellen aufnehmen.

Die Gesamtanordnung ist demnach wesentlich einfacher und billiger als die bisher bekannten Einrichtungen. Trotzdem ist mit der neuen Einrichtung eine bezüglich der Anregungslichtwellenlängen einwandfrei getrennte Anregung der Zellen beim Durchtritt durch die beiden Messstellen möglich, ebenso eine bezüglich der Fluoreszenzlichtwellenlängen einwandfrei getrennte Messung dieser Zellen. Besondere Justierungsarbeiten, die eine bisher mögliche Überlappung weitestgehend verhindern sollten, sind nicht erforderlich. Die Zellen können den Messstellen mit einem Hüllstrom zugeführt werden. Damit ergibt sich eine Vereinfachung gegenüber mit Querstrom arbeitenden Durchflusskammern. Die beiden Messstellen liegen symmetrisch zueinander und bilden je einen Abschnitt der einwandfrei festlegbaren Fokusebene des Objektivs. Weiter ist es möglich, ein Objektiv mit grosser Apertur vorzusehen. Durch die Hüllstromanordnung und entsprechende Einstellung der Strömungsbedingungen lässt sich erreichen, dass die Zellen praktisch einzeln durch die beiden Messstellen hindurchtreten.

Weitere Vorzüge ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung und den Zeichnungen, in denen ein Ausführungsbeispiel der Erfindung erläutert und dargestellt ist. Es zeigen:

Fig. 1 vereinfacht eine Durchflusskammer und

Fig. 2 eine Einrichtung, ebenfalls in vereinfachter Darstellung.

Dieses Ausführungsbeispiel der Erfindung (vgl. Fig. 1 und 2) weist eine Durchflusskammer 10 auf, in der ein Durchflusskanal 12 ausgebildet ist, der knieförmig um eine innere Ecke 16 herumführt. Der Scheitel des Kniewinkels ist abgeschnitten und durch ein Deckglas 14 ersetzt, das sich im wesentlichen rechtwinklig zur Mittelhalbierenden der Ecke 16 erstreckt.

Parallel zur Fläche des ebenen Deckglases 14 liegt der über ein Objektiv 24 zu beobachtende Durchflussquerschnitt, der durch die mit A–B gekennzeichnete gestrichelte Linie markiert ist. Dieser Querschnitt liegt einerseits im Zufluss- andererseits im Abflussschenkel des Kanals 12, wobei die beiden Teile durch die Kante 18 der Ecke 16 getrennt sind, dabei sind der Zufluss- und Abflussquerschnitt im wesentlichen gleich gross. Dadurch ergeben sich die beiden voneinander getrennten Messstellen 20 und 22, durch die die zu beobachtenden Teilchen oder Zellen unter im wesentlichen gleichen Bedingungen hindurchgehen.

Die Durchmesser im Bereich der Messstellen 20, 22 richten sich nach den zu untersuchenden Partikeln. Je nach deren Grösse liegen sie in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,5 mm. Für Säugetierzellen sind Durchmesser von 0,2 mm zweckmässig.

Jede der beiden Messstellen kann geringfügige Unterschiede in der Beleuchtungsintensität aufweisen. Um darin begründete Messfehler zu vermeiden, wird eine Hüllstromanordnung verwendet, die dazu führt, dass alle Zellen eine ganz bestimmte Stelle der Fokusebene – Messstelle – passieren, wodurch alle Zellen derselben Lichtenergie ausgesetzt werden. Eine Zellsuspension wird von einem hier durch den Pfeil 28 markierten Vorrat in einen Zuleitungskanal 26 eingespeist, der im Zuflussschenkel 12 mündet. In den Zuflussschenkel 12 wird ausserdem von einer durch den Pfeil 30 markierten Zuführungseinrichtung ein Hüllstrom in den Zuflussschenkel 12 eingeführt. Der Hüllstrom kann aus dem gleichen Medium wie die Flüssigkeit bestehen, in welchen die zu beobachtenden Zellen suspendiert sind.

Der Abflussschenkel des Kanals 12 führt bei 32 in einen Abflussbehälter. An den Abflussschenkel kann aber auch bei 32 ein Sortiersystem für die Zellen angeschlossen werden, wobei eine Sortierung durch die Ergebnisse der Messung an den Messstellen 20, 22 gesteuert werden kann.

Die einwandfreie Trennung der Messstellen 20, 22 durch die Kante 18 der Ecke 16 gestattet ein besonders einfaches Beleuchtungssystem. Eine primäre Lichtquelle 40 ist mit einem Kollektorsystem 42 versehen, das den Strahlengang des von der Quelle 40 ausgesandten Lichtbündels parallelisiert. Mit der Linse 44 wird die Lichtquelle in die «innere Pupille» des Mikroskop-Objektivs abgebildet, das der «Köhlerischen Beleuchtung» der Messstelle entspricht. Im Strahlengang sind zwei Filter 46, 48 nebeneinander derart angeordnet, dass das Lichtbündel der primären Lichtquelle 40 in zwei verschiedene, parallel nebeneinander liegende Lichtbündel aufgeteilt wird. Entsprechend den Filtereigenschaften entstehen dadurch zwei verschiedene, im wesentlichen monochromatische Lichtbündel I und II, so dass die Filter 46, 48 als sekundäre Lichtquellen angesehen werden können. Eine dichromatische Teilerplatte 50 ist unter 45° zur optischen Achse des Objektivs 24 angeordnet. Die optische Achse des Objektivs 24 stimmt mit der Winkelhalbierenden der Ecke 16 überein und steht damit senkrecht zur Fläche der Messstellen 20, 22. Mit Hilfe der Teilerplatte wird durch das Bündel I, das durch das Filter 46 hindurchgegangen ist, die Messstelle 20 und durch das Bündel II, das durch die Filterplatte 48 hindurchgegangen ist, die Messstelle 22 beleuchtet.

Mit Hilfe einer zweiten Teilerplatte 54, die ebenfalls auf der optischen Achse des Objektivs 24 unter einem Winkel von 45° hinter der Teilerplatte 50 angeordnet ist, werden die Fluoreszenzerscheinungen an den Messstellen 20, 22 mittels der Photovervielfacher 60 und 62 aufgenommen. Vor jedem Vervielfacher ist eine halbseitig geschlossene Blende 56 derart in der Zwischenbildebene des Auflichtmikroskops angeordnet, dass das Licht von der Messstelle 20 durch die Blende 56 den Photovervielfacher 60 erreicht, während dieser gegen Licht von der Messstelle 22 abgeschirmt ist. Umgekehrt geht Licht von der Messstelle 22 durch die Teilerplatte 54 und die Blende 58 hindurch in den Photomultiplier 62, während dieser durch die halbseitige Schliessung der Blende 58 gegen Licht von der Messstelle 20 abgeschirmt ist.

Die Anordnung gestattet, mit einer verhältnismässig grossen inneren Pupille 52 und entsprechend grosser Apertur des Objektivs 24 zu arbeiten.

Fig.1

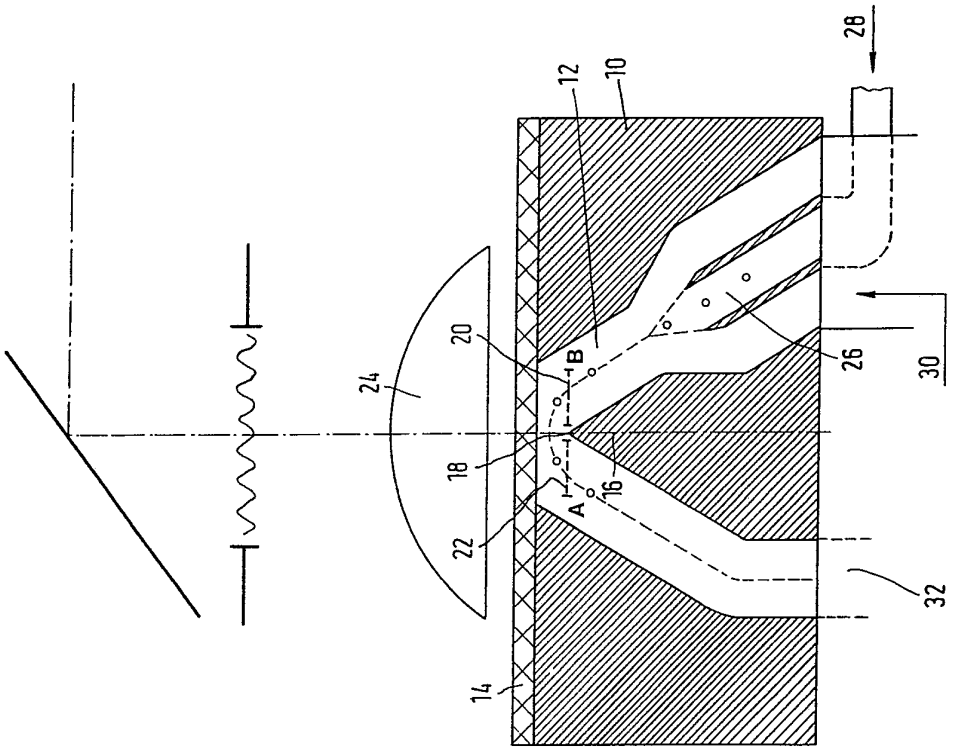


Fig.2

