

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506191

(P2004-506191A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl.⁷GO 1 N 21/64
GO 1 J 3/443

F I

GO 1 N 21/64
GO 1 J 3/443

テーマコード (参考)

2 GO 2 O
2 GO 4 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁)

(21) 出願番号 特願2002-517497 (P2002-517497)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月4日 (2001.8.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年4月2日 (2002.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/009048
 (87) 国際公開番号 WO2002/012863
 (87) 国際公開日 平成14年2月14日 (2002.2.14)
 (31) 優先権主張番号 100 38 526.5
 (32) 優先日 平成12年8月8日 (2000.8.8)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), JP

(71) 出願人 396000455
 カール ツァイス イエナ ゲゼルシャフト
 ミット ベシュレンクテル ハフツング
 ドイツ D-07745 イエナ カール
 ツァイス プロムナーデ 10
 (74) 代理人 100071098
 弁理士 松田 省躬
 (72) 発明者 ラルフ ヴォレシェンスキー
 ドイツ国 99510 シェッテン プロ
 ムナーデ 3
 (72) 発明者 グンター メーラー
 ドイツ国 07745 イエナ オルチデ
 ィーンヴェーグ 3
 Fターム(参考) 2G020 CA01 CC04 CD24

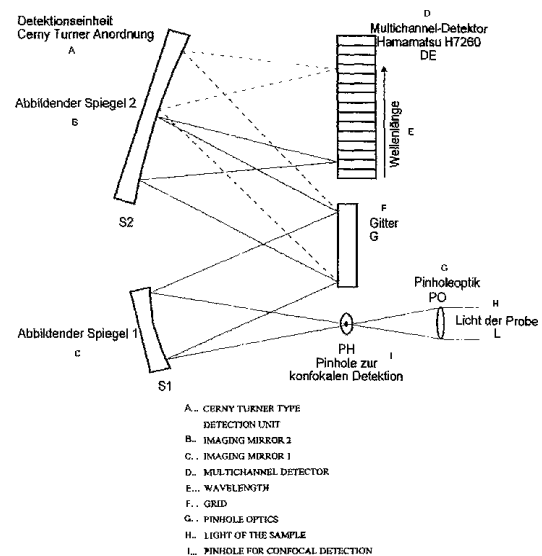
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 照明された試料の波長依存特性把握のための方法および装置

(57) 【要約】

【解決手段】 照射試料が持つ波長依存性の特徴的な特性量、主として蛍光および／またはルミネセンスおよび／またはりん光および／または酵素で活性化した光線放射および／または酵素で活性化した蛍光についての、特に放射および／または吸収に関する特性量の把握用画像形成光学システムを作動させるための方法および装置、特に、試料の画像点情報を検出側での位置分解に基づきスペクトル成分へ波長別に分割する場合に、異なったスペクトル成分に対して少なくとも1回の総和計算を行なう、レーザ走査型顕微鏡作動のための方法および装置。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

照射試料が持つ波長依存性の特徴的な特性量、主として蛍光および／またはルミネセンスおよび／またはりん光および／または酵素で活性化した光線放射および／または酵素で活性化した蛍光についての、特に放射および／または吸収に関する特性量の把握用画像形成光学システムを作動させるための方法であって、
特に、試料の画像点情報を検出側での位置分解に基づき波長別にスペクトル成分へ分割する場合に、それぞれのスペクトル成分毎に少なくとも 1 回の合算を行なう、レーザ走査型顕微鏡作動のための方法。

【請求項 2】

異なった試料領域間での走査過程内で少なくとも 1 つの照射波長および／または照射強度の切替が行なわれ、また、異なった各試料領域および／または異なった各照射波長、照射強度毎にスペクトル成分の少なくとも 1 部について合算が行なわれる、請求項 1 に記載の走査システム作動のための方法。

【請求項 3】

合算された領域の画像表示を伴う、上記請求項の 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

複数の部分合計を出して加算する、上記請求項の 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

様々な蛍光成分についてのオーバーラップ信号を含むスペクトル成分においてオーバーラップの部分合計がなされる、上記請求項の 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

複数のスペクトル成分を検査対象として、スペクトルの重心構成法と組み合わせられることを特徴とする、上記請求項の 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

部分合計または個別成分の商または差などの数学的関係およびその関係の画像表示を伴う、上記請求項の 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

照射試料が持つ波長依存性の特徴的な特性量、主として蛍光および／またはルミネセンスおよび／またはりん光および／または酵素で活性化した光線放射および／または酵素で活性化した蛍光についての、特に放射および／または吸収に関する特性量の光学的把握のための上記請求項の 1 項に記載の方法において、
放射光線を分散素子でスペクトル分割し、放射光線および／または吸収光線の少なくとも 1 つの総合信号を位置分解によって検出し、電子的に測定する、放射および／または吸収に関する特性量の光学的把握のための方法。

【請求項 9】

様々な色素の検査のために、および／または複数色素の同時使用における画像局部の色素組成の測定のために、および／または色素の結合している局部周辺の条件に依存する放射スペクトル局部シフトの測定のために、および／またはイオン濃度測定用放射色素の測定のために、
スペクトル分割された放射光線の総合信号の測定を行なう、
上記請求項の 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

様々な色素の検査のために、および／または複数色素の同時使用における画像局部の色素組成の測定のために、および／または色素の結合している局部周辺の条件に依存する吸収スペクトル局部シフトの測定のために、および／またはイオン濃度測定用放射色素の測定のために、
スペクトル拡大反射、後方散乱したおよび／または透過したフルオロクローム励起光線の総合信号の測定を行なう、上記請求項の 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

励起パラメータに依存して、走査過程で総合信号の組成変更（マルチトラッキング）ができる、上記請求項の少なくとも1項に記載の方法。

【請求項12】

それぞれの走査位置に依存して、走査過程で総合信号の組成変更（ROIトラッキング）ができる、上記請求項の少なくとも1項に記載の方法。

【請求項13】

試料の放射光線を分散素子で分割し、少なくとも1方向において位置分割により検出を行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載の方法。

【請求項14】

蛍光光線の分割を行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載の方法。

10

【請求項15】

吸収測定のため、試料で反射、後方散乱した光線および／または試料を透過した光線を分散素子で分割し、少なくとも1方向において位置分割により検出を行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載の方法。

【請求項16】

検出チャンネルの信号を変換してデジタルで読み出しさせ、総和計算をコンピュータによりデジタルで行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項17】

アナログデータの加工による総和計算を、加算増幅器と組み合わせたデマルチプレクサにより行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

20

【請求項18】

検出チャンネルの信号が入力信号の非直線性歪みによって影響される、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項19】

積分パラメータに影響を与える、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項20】

増幅器の特性線に影響を与える、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項21】

総合信号を画像形成のために使用する、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項22】

カラーコード化された蛍光画像を形成する、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

30

【請求項23】

別な画像によりオーバーラップを行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項24】

総合信号をルックアップ・データと組み合わせる、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項25】

ルックアップ・データによって様々な色素の表示および／または形成画像の展開表示を行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

40

【請求項26】

検出チャンネル内の比較器を通じて測定信号と基準信号との比較を行ない、基準信号以下および／または基準信号超過の場合には検出チャンネルの作動内容を変更する、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項27】

それぞれの検出チャンネルの遮断および／または無応答化を行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された方法。

【請求項28】

それによってスペクトル領域の分析対象幅を狭隘化させる、上記請求項の少なくとも1項

50

に記載された方法。

【請求項 29】

検出チャンネルの信号をそれぞれ少なくとも 1 つの積分器の接続によって発生させる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 30】

検出チャンネルの信号を光子計数および続いてのデジタル／アナログ変換によって発生させる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 31】

光子計数を時間の関数で行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 32】

単一および／または複数の光子蛍光を、および／または錯綜光子によって励起された蛍光を把握するための、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 33】

試料が、好ましくは微量滴定プレートであって、特に作用物質の検査において照射と検出が平行になされる、顕微鏡内における、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 34】

走査型近接場顕微鏡での検出のための、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 35】

蛍光と相関させた分光器における単一光子および／または多光子の色素蛍光検出のための、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 36】

共焦点型検出による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 37】

走査装置による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 38】

照射において X／Y スキャナを用いる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 39】

X／Y 走査テーブルによる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 40】

非共焦点型検出による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 41】

走査装置による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 42】

デスキャン検出による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 43】

ブライトフィールド結像による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 44】

点結像による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 45】

ノンデスキャン検出による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 46】

ブライトフィールド結像による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 47】

非走査、共焦点または非共焦点での検出および点結像またはブライトフィールド結像による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 48】

X／Y 走査テーブルによる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法。

【請求項 49】

照射試料が持つ波長依存性の特徴的な特性量、主として蛍光および／またはルミネセンスおよび／またはりん光および／または酵素で活性化した光線放射および／または酵素で活

10

20

30

40

50

性化した蛍光についての、特に放射および／または吸収に関する特性量の光学的把握のための装置において、放射光線が分散素子によりスペクトル分割、位置分解検出され、放射光線および／または吸収光線の少なくとも1つの総合信号が電子的に測定される、照射試料が持つ波長依存性の特徴的な特性量の光学的把握のための装置。

【請求項50】

様々な色素の検査のために、および／または複数色素の同時使用における画像局部の色素組成の測定のために、および／または色素の結合している局部周辺の条件に依存する放射スペクトル局部シフトの測定のために、および／またはイオン濃度測定用放射色素の測定のために、

スペクトル分割された放射光線の総合信号の測定が行われる、請求項49に記載の装置。 10

【請求項51】

様々な色素の検査のために、および／または複数色素の同時使用における画像局部の色素組成の測定のために、および／または色素の結合している局部周辺の条件に依存する吸収スペクトル局部シフトの測定のために、および／またはイオン濃度測定用放射色素の測定のために、

スペクトル拡大反射したまたは透過したフルオロクローム励起光線の総合信号の測定を行なう、請求項49または50に記載の装置。

【請求項52】

走査過程で総合信号の組成変更（マルチトラッキング）ができる、上記請求項の少なくとも1項に記載の装置。 20

【請求項53】

走査過程で総合信号の組成変更（ROIトラッキング）ができる、上記請求項の少なくとも1項に記載の装置。

【請求項54】

試料の放射光線を分散素子で分割し、少なくとも1方向において位置分割により検出を行なう、蛍光光線の分割を行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載の装置。

【請求項55】

吸収測定のため、試料で反射した光線または試料を透過した光線を分散素子で分割し、少なくとも1方向において位置分割により検出を行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載の装置。 30

【請求項56】

検出チャンネルの信号を変換してデジタルで読み出しさせ、総和計算をコンピュータによりデジタルで行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置。

【請求項57】

アナログデータの加工による総和計算を、加算増幅器と組合せたデマルチプレクサにより行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置。

【請求項58】

検出チャンネルの信号が入力信号の非直線性歪みによって影響される、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置。

【請求項59】

積分パラメータに影響を与える、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置。 40

【請求項60】

増幅器の特性線に影響を与える、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置。

【請求項61】

総合信号を画像形成のために使用する、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置。

【請求項62】

カラーコード化された蛍光画像を形成する、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置。

【請求項63】

別な画像によりオーバーラップを行なう、上記請求項の少なくとも1項に記載された装置 50

。

【請求項 6 4】

総合信号をルックアップ・データと組み合わせる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 6 5】

ルックアップ・データによって様々な色素の表示および／または形成画像の展開表示を行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 6 6】

検出チャンネル内の比較器を通じて測定信号と基準信号との比較を行ない、基準信号以下および／または基準信号超過の場合には検出チャンネルの作動内容を変更する、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。 10

【請求項 6 7】

それぞれの検出チャンネルの遮断および／または無応答化を行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 6 8】

それによってスペクトル領域の分析対象幅を狭隘化させる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 6 9】

検出チャンネルの信号をそれぞれ少なくとも 1 つの積分器の接続によって発生させる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。 20

【請求項 7 0】

検出チャンネルの信号を光子計数および続いてのデジタル／アナログ変換によって発生させる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 7 1】

光子計数を時間の関数で行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 7 2】

単一および／または複数の光子蛍光を、および／または錯綜光子によって励起された蛍光を把握するための、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 7 3】

試料が、好ましくは微量滴定プレートであって、特に作用物質の検査において照射と検出が平行になされる、顕微鏡内における、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された方法 30

【請求項 7 4】

走査型近接場顕微鏡での検出のための、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 7 5】

蛍光と相関させた分光器における単一光子および／または多光子の色素蛍光検出のための、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 7 6】

共焦点型検出による、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 7 7】

1 基の走査装置を持つ、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。 40

【請求項 7 8】

照射において X／Y スキャナを用いる、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 7 9】

1 基の X／Y 走査テーブルを持つ、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 8 0】

非共焦点型検出器を持つ、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 8 1】

1 基の走査装置を持つ、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 8 2】

デスキャン検出を行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。 50

【請求項 8 3】

ブライトフィールド結像を行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 8 4】

点結像を行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 8 5】

ノンデスキャン検出を行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 8 6】

ブライトフィールド結像を行なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【請求項 8 7】

非走査、共焦点または非共焦点での検出および点結像またはブライトフィールド結像を行
なう、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。 10

【請求項 8 8】

1 基の X/Y 走査テーブルを持つ、上記請求項の少なくとも 1 項に記載された装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、蛍光顕微鏡法、特にレーザ走査型顕微鏡法、蛍光相関分光法および走査型近視
野顕微鏡法における、主として生物学上の試料、プレパラートおよび付属する構成成分を
検査するための方法および装置に関するものである。

それと共に、作用物質を検査するための蛍光検出に基づく方法（ハイ・スループット・ス
クリーニング）も含まれる。 20

【0002】

少数の広域スペクトル色素帯の検出から完全なスペクトルの同時記録へと移行することに
より、空間的部分構造または動力学的過程に関連して殆どが分析面または機能面からなさ
れる試料特性の確認、分離、分類において新たな可能性が開けてくる。それにより、オー
バーラップ部分を持つ蛍光スペクトルの場合では多重蛍光団を含む試料の同時検査が、厚
い試料の空間構造においても可能となる。本装置によってデータ記録率が低下するという
ことはない。

【0003】

【従来の技術】

生物プレパラートを検査するための光学顕微鏡の古典的利用分野の 1 つに蛍光顕微鏡法（
文献：P a w l e y「生物共焦点顕微鏡法ハンドブック」、プレーナム・プレス 1 9 5 5
年）がある。この場合では特定の色素が細胞部分への特殊標識付けのために使用される。

【0004】

色素分子は、入射した一定エネルギーを持つ光子 1 個の吸収により光子基底状態から励起
状態へ励起される。この励起は一般に 1 光子吸収と称される（図 1 a）。色素分子は、こ
のように励起された状態からさまざまな方法で基底状態に戻ることができる。蛍光顕微鏡
法では蛍光光子の放射下での移行が最も重要である。放射される光子の波長はストークス
変位のため励起放射に比較して原則的に赤側にずれる。すなわち長波長側である。スト
ークス変位が蛍光光線の励起光線からの分離を可能にする。 40

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

蛍光は、ブロックフィルタと組合せた適当なダイクロイック・ビームスプリッタによって
励起放射から分離して別途観察する。そうすることによって、さまざまな色素で着色され
た個々の細胞部分の描写が可能である。しかし原則的には、プレパラートのいくつかの部
分を、独特な堆積の仕方をするさまざまな色素で同時に着色することもできる（多重蛍光
）。個々の色素から送出される蛍光信号を区別するために、ここでも特殊なダイクロイッ
ク・ビームスプリッタを使用する。

【0006】

高いエネルギーを持つ 1 光子による色素分子の励起（1 光子吸収）のほかに、より小さい 50

エネルギーを持つ複数の光子による励起も可能である（図1b）。この場合、個々の光子のエネルギー総和は高エネルギー光子の何倍にも相当する。この種の色素励起は多光子吸収と称される（文献：Corle、Kino「共焦点走査型光学顕微鏡法と関連画像システム」；アカデミック・プレス1996年）。

しかし、色素放射はこの種の励起によっては影響されない。すなわち、多光子吸収の場合、放射スペクトルは負のストークス・シフトを起すため、励起放射に比較するとその波長は短い。励起光線を放射光線から分離するのは1光子吸収の場合と同じ方法で行う。

【0007】

以下に現状技術を共焦点レーザ走査型顕微鏡（LSM）の例で説明する（図2）。

LSMは大きく分けて次の4モジュールから成っている：光源、走査モジュール、検出ユニット、顕微鏡。これらのモジュールは以下により詳しく説明する。それに加え、DE19702753A1も参考になる。

【0008】

プレパレート中にあるさまざまな色素の個別励起には、さまざまな波長のレーザをLSM内で使用する。励起波長の選択は検査対象色素の吸収特性に従って行う。励起光線は光源モジュール内で生成される。この場合さまざまなレーザ（アルゴン、アルゴン・クリプトン、Ti:Sレーザ）が使用の対象になる。そのほか、光源モジュールでは波長の選択および必要な励起波長の強度調整を、たとえば音響光学結晶の使用により行う。それに続き、レーザビームはファイバまたは適当なミラー装置を通じて走査モジュール内に導かれる。

【0009】

光源で生成されたレーザビームは対物レンズを通り、回折の抑制下でスキャナ、走査レンズ系、円筒レンズを経由してプレパレート内へ集束される。試料に焦点を当ててx-y方向にドット走査する。試料走査における画素上滞留時間は多くの場合マイクロ秒未満ないし数秒の範囲とする。

【0010】

蛍光の共焦点検出（デスキャン検出）の場合、焦平面（試料）からおよびその上・下にある平面から放射された光は、スキャナを通じてダイクロイック・ビームスプリッタ（MDB）に達する。MDBは蛍光を励起光から分離する。続いて蛍光は、正確に焦平面と共役な平面内にある絞り（共焦点絞り／ピンホール）で焦点を結ぶ。これによって焦点外の蛍光成分が遮断される。

【0011】

絞りの寸法をさまざまに変化させることによって、顕微鏡の光学解像度を調節することが可能である。絞りの後ろに別のダイクロイック・ブロックフィルタ（EF）があり、これが再度励起ビームを差し止める。蛍光は、ブロックフィルタを通過した後、点像検出器（PMT）によって測定される。

【0012】

多光子吸収を利用した場合、色素蛍光の励起は励起強度が特に強い小ボリューム部分に起こる。この領域は、共焦点装置を使用した場合の検出領域より極僅かに大きいだけである。したがって共焦点絞りの使用は省くことができ、検出は対物レンズの直後で行うことができる（ノンデスキャン検出）。

多光子吸収によって励起される色素蛍光を検出するための別の装置では、さらに1つのデスキャン検出が行われるが、しかしこの場合では対物レンズのひとみは検出ユニット内へ結像する（非共焦点デスキャン検出）。

【0013】

3次元照明による像のうち、対応の1光子吸収もしくは多光子吸収と接続している2検出器の装置によって、対物レンズの焦平面内に存在する平面（光学的断面）のみが再現される。それに続いて、試料のさまざまな深さzにおけるx-y平面内のいくつかの光学的断面の描画により、コンピュータでサポートされた試料3次元像が生み出される。

【0014】

10

20

30

40

50

したがって、LSMは厚いプレパラートを検査するのに適している。励起波長は使用色素の固有吸収特性で決定される。色素の放射特性に合わせたダイクロイックフィルタにより、それぞれの色素から送出される蛍光のみが確実に点像検出器で測定されることになる。

【0015】

生医学応用においては、目下のところいくつかのさまざまな細胞領域がさまざまな色素で同時に標識付けされている（多重蛍光）。現状技術では、個々の色素はさまざまな吸収特性に基づき、または放射特性（スペクトル）に基づき別々に検出されている（図3a）。図3aは各種典型的な色素の放射スペクトルを示している。放射信号は波長別に表わされている。ナンバー1～4の色素にはそれぞれ放射スペクトルの位置および形態に差のあるのが認められる。

10

【0016】

それぞれ別個の検出には、複数色素の蛍光に対する追加分割を副ビームスプリッタ（DBS）で行ない、個々の色素放射検出を別々の点像検出器（PMTx）内で行なう。当装置では、検出および励起の際、新たな色素特性に対してフレキシブルに適応することは利用者にとって可能ではない。従って、それぞれの（新しい）色素について、新しいダイクロイック・ビームスプリッタおよびブロックフィルタが用意されなければならない。

【0017】

WO95/07447に基づく装置では、蛍光は1基のプリズムによってスペクトル分割される。本方法はダイクロイック・フィルタを有する前記装置とは、使用フィルタの特性曲線を調節できる点が異なるだけであるが、しかしそのほか、点像検出器当たり1色素の放射帯域が記録されるというのも好ましいことである。

20

両装置とも検出領域の迅速な切替は限定的にしか可能でない。それは、放射領域の設定がダイクロイックフィルタおよび絞りの機械的作動に依拠しているからである。

【0018】

迅速な切替は、例えば、放射スペクトルが図3bに描かれているようにオーバーラップしてはいるが吸収特性が異なる場合に必要になる。図3bは、色素CFP、黄玉、CFRおよびシアンFPの放射信号を波長の関数で表わしたものである。この方法（マルチトラッキング）はDE19829981A1に記載されている。

【0019】

これらの色素は、検査試料への毒性作用がなく、生体プレパラートの検査には特に適している。両色素CFP、CFRをできる限り効果的に検出するため、1走査方向においてCFPを波長458nmで励起して460～550nmの蛍光を検出し、スキヤナの復路ではCFRに対して波長488nmで選択的励起を行なって、波長領域490～650nmで検出する。

30

【0020】

使用色素の放射スペクトル位置が未知である場合、あるいは周辺条件に依存して放射スペクトルに位置移動が起きる場合では（図3c）、色素蛍光を効果的に検出するにも限界がある。図3cも同様に放射信号を波長の関数で描いたものである。波長シフトは数10nmに到ることもある。

【0021】

試料内の放射スペクトルの測定には、今日ではLSMとの組み合わせの場合も含めて分光計が使用される。この目的には点像検出器の代わりに、ほとんどの場合高分解能を持つ従来型分光計が使用される（Dixon他の特許US5,192,980）。しかしこれらは放射スペクトルを点単位でのみ、あるいはある領域について平均的に記録するだけである。つまり、一種のスペクトル分析である。

40

【0022】

蛍光顕微鏡法のまた別な適用例では、特に生物プレパラート中のイオン濃度（たとえば Ca^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^+ …）の測定に用いられている。それには、特別な色素や、またはイオン濃度に依存してスペクトルのずれる色素配合（たとえばフラ、インド、フルオ；モレキュラー・プローブズ社）が使用される。

50

【0023】

図4a)はカルシウムイオンの濃度に依存するインドー1の放射スペクトルを示している。図4b)はフルオー3とフラ赤色素との組み合わせの場合で、カルシウムイオン濃度に依存する放射スペクトルの例を示している。これらの特殊色素は放射率識別色素と称される。図4a)に示した2つの蛍光領域を検出して、両強度の比率を出すと、対応のイオン濃度を導き出すことができる。多くの場合この測定によっ生命プレパラート中のイオン濃度の動的变化が分析されるが、それには1ミリ秒以内の時間分割が要求される。

【0024】

【課題を解決するための手段】

以上より、本発明の課題は、フレキシブルでプログラミング自由な新しい検出方法ということになる。これらの方法は、解析的顕微鏡法システムと同様に像作成システムでも使用できなければならない。それゆえ、これらの方法を使用する際にはデータ採用率が悪化してはならない。

【0025】

顕微鏡システムとしては、生物プレパラートを200nmまでの光学解像度で3次元検査するためのレーザ走査型顕微鏡や、表面を解像度10nmまでの高解像度で検査するための走査型近視野顕微鏡のような像作成システムがある。分子濃度の定量測定用、および分子拡散測定用の蛍光相関顕微鏡もある。さらに、蛍光検出に基づく色素検査の方法も含まれる。

【0026】

【発明の実施の形態】

上記システムではいずれも、プレパラートに特殊な標識付けをするために蛍光色素が使用される。上記課題は独立特許請求項に基づく方法および装置により解決される。その他の主要態様は従属請求項の対象とする。

【0027】

本発明に基づく方法の背景には、スペクトル分割された蛍光検出がある。その場合では放射光が、走査モジュール内または顕微鏡内(多光子吸収の場合)でメインカラー・スプリッタ(MDB)、あるいは7346DEまたは7323DEに基づくAOTF(音響光学フィルタ)など励起光線を被検出光線から分離するための素子によって、励起光から分割される。透過光装置の場合ではこの種の素子は完全に省くこともできる。

【0028】

それに続いて配置されている検出器ユニットの構成図を図5に示してある。試料から出た光Lは、共焦点検出の場合では結像レンズ系PO、さらには絞り(ピンホール)PHを通して焦点を結び、それによって焦点外に生じる蛍光が遮断される。ノンデスキャン検出の場合には絞りは不要である。この場合では光は角分散素子DIによってそのスペクトル成分へ分解される。

【0029】

角分散素子としてはプリズム、格子および音響光学素子が使用される。分散素子によってそのスペクトル成分へ分割された光は、続いてライン検出器DE上へ結像される。つまり、このライン検出器DEは波長に依存する放射信号Sを測定し、これを電気信号へ変換する。加えて、検出ユニットには励起波長を抑制するための線型フィルタを直列接続することもできる。

【0030】

図5にブロック接続図で示した検出器ユニットを光学的ビーム光路として用いた場合の考え得る実施態様を図6に示している。本構造は本質的にはサーニー・ターナー構造に基づくものである。共焦点検出の場合、試料からの光Lはピンホールレンズ系POにより共焦点絞りPHを通され集束する。

ノンデスキャン検出で多光子吸収の場合には、この絞りは不要である。第1の結像鏡S1は蛍光を視準する。続いて光は線形格子G、たとえばミリ当たり線数651本を有する格子上に当たる。格子は光をその波長に応じてさまざまな方向に偏向させる。

10

20

30

40

50

【0031】

第2の結像鏡S2はスペクトル分割された個々の波長成分を、対応ライン検出器のチャンネルDE上へ集束させる。浜松製作所のH7260ライン2次電子増倍管を使用するのが特に好ましい。当検出器は32チャンネル型で高感度を有する。上記実施態様の自由なスペクトル領域は約350nmである。自由なスペクトル領域はこの装置ではライン検出器の32チャンネルに均等に配分されるので、光学的解像度は約10nmとなる。

したがって、この装置は分光測定には限定的にしか適さない。しかし、これを結像システムに使用するの是有利である。これは、検出スペクトル帯域が相対的に広く、検出チャンネルごとの信号がなお比較的大きいからである。自由なスペクトル領域の移動は、加えて、たとえば格子をねじることによっても行なえる。

10

【0032】

また別な実施態様として、マトリクス検出器（たとえばソニー、コダックなどのCCD＝電荷結合素子）の使用を伴う例もある。この場合、ある座標において分散素子によりさまざまな波長成分へ分割が行われる。マトリクス検出器上に留まっている方向に、走査像の完全なライン（または隙間）が結像さる。

この実施態様は、ライン・スキャナ（文献：Corle、Kino「共焦点光学顕微鏡法と関連画像システム」；アカデミック・プレス1996年）の構成時には特に有利である。

【0033】

構造原理は本質的には図2記載のLSMに準じている。但し、焦点でなくて1本の線に焦点に結像させ、検査試料を1方向にのみ走査する。ラインはスキャナの前に円筒レンズZL（図2の波線表示）を設置することにより生成する。

20

このような構造の場合、共焦点絞りとしては、孔絞りの代わりにスリット絞りをを用いる。特に、多光子吸収を利用するノンデスキャン検出は図2に描かれているようにこの装置によって行うこともできる。多光子吸収の場合では、さらに、スリット絞りを省くことができる。

【0034】

上記の実施態様では、各個別チャンネルが検出する放射スペクトル幅は約10nmの帯域である。しかし、蛍光顕微鏡検査法にとって重要な色素の放射帯域は、数100nmの波長領域に亘っている。それ故、本発明に基づく装置では使用色素の蛍光帯域に相応して個別チャンネルの合算が行なわれる。それには第1ステップとして、例えば画像情報としての個別チャンネル情報の読出しを行なう、いわゆるスペクトルスキャンが行なわれる。その場合、好ましくは使用色素に相応した複数励起波長で試料を照射する。それにより、測定対象の各画像点毎に、当該画像点に存在する個別色素のスペクトル成分総和が記録される。

30

【0035】

続いて、個別チャンネルを任意にまとめて、つまり合算して検出帯域（放射帯域）とすることができる。合算領域の選択は、例えば個別チャンネルの画像点毎に信号をヒストグラムで表示して行なうことができる。ヒストグラムは試料内で使用した色素の全放射スペクトルの合計を表わしている。この合計は励起された色素の放射スペクトルに対して行なうのが好ましく、その場合それぞれの励起波長はフェードアウトさせて、それぞれの検出帯域内にあるそれぞれの色素の信号を合計する。

40

【0036】

本発明に基づく装置によって、マルチトラッキング操作のために、即ち走査過程において照射波長および／または照射強度を切り替えるために、DE19829981A1に記載されているように、検出帯域を迅速に切り替えることが可能である。この切替は画素単位で、即ち数μ秒間隔で行なうことができる。それにより例えば、検査試料の特定領域を異なった検出帯域で観察（ROIトラッキング）することも可能である。

【0037】

図7aは例えば、様々に着色された細胞領域を表わす、LSM画像内におけるそれぞれの観察対象特定領域（ROI1～4）の分布状態を図示したものである。図7bには放射ス

50

ペクトル 1～4 の典型例がそれぞれ対応の励起波長（L 1～L 4）と共に描かれている。個別色素の放射スペクトルは強力に重なり合っている上に、それぞれの吸収特性間には大きな差があるので、個別色素の検出にはマルチトラッキング法 C Z 7 3 0 2 が提供されている。現状技術レベルで当方法を従来通り適用した場合個別色素が選択的に励起されて、本例では 4 つの完全画像が順次走査されることになる。

【0038】

検出器構成要素の作動面から、現状技術の検出ユニットには個別 R O I 間に関して再構築が必要であり、従って例えば急速に退色したり、動いたりする試料または迅速経過過程の様々な領域における幾つかの動力学的プロセスの迅速比較の際に望まれるような数 μ 秒単位の速度は達成不可能である。

10

しかし、本発明に基づく装置によれば、オペレータまたはコンピュータにより個別 R O I 間における合算帯域の迅速な組替が可能である。強力に重なり合っている R O I を記録するには試料を再走査するだけでよい。この点は、特に退色性の強いプレパラートには好都合である。

【0039】

そのほか、個別領域（R O I）間の迅速経過変化／コントラストを明らかにすることができ。この点は、例えば生物環境の中で分散特性を検査する場合には有利になる。その場合では試料の特定箇所色素を脱色し、続いて新たな色素の流入を検査する。

また別な方法ではいわゆるケージド・コンパウンドが使用される。この色素を照準励起することによって、例えばニューロンのカルシウムイオンを遊離させることができる。続いて、このイオン濃度変化を試料の他の領域における変化と相関させることができる。

20

【0040】

R O I に対する調整について、オペレータは、例えば次のように行なうことができる：個別 R O I 内の色素励起に要するすべての、または殆どの励起光線を使用してスペクトル走査を実行および記録し、それに基づき個別励起レーザ光線の間にそれぞれの総合チャンネル枠を設けることが可能である（図 7 b に表示されている通り、L 1～L 2、L 2～L 3、L 3～L 4 および L 4～最大放射波長）。これらの総合チャンネルは個別色素の蛍光帯域部分に相当する。また、同一総合チャンネル内で様々な色素が強力に重なり合っているため、それらの信号の同時合算も行なわれる。

【0041】

30

これらの総合チャンネルは、続いて、カラーコード化により様々な画像チャンネルに分解され、相互に重畳表示される。画像チャンネルにおける様々な局部的色素混合により、オペレータまたは自動パターン識別器はそれぞれの R O I の位置設定が可能になり、例えば個別 R O I において最も強く現われる色素に基づいて、それぞれの加算調整に対する定義付けができる。

様々な R O I に対する第 2 調整法では蛍光重心の測定が行われる。その場合、検出器内では励起レーザ光線で照射されるすべての個別チャンネルのスイッチが遮断される。

【0042】

各 R O I は、使用されるそれぞれの色素の放射特性に変化が現われるため特徴的な蛍光重心を有している。従って、それぞれの R O I は特徴的な色素重心の位置によって区別し、明確に分離することができる。

40

続いて、個別 R O I 毎に、特に色素特性面での適合化による総合チャンネルの調整が行われる。

その他の優位点として、オペレータが任意の個別チャンネルをスイッチオフにすることもできる。このことは、特に複数励起レーザ光線の 1 つを遮断するという場合には有意である。

【0043】

図 4 に基づくイオン濃度の測定では、総合信号を個別成分に分離し、それによってイオン濃度のレベル基準を求めることができる。

蛍光相関分光法において当方法を適用した場合、単一総合チャンネルの自動相関関係および

50

／または複数総合チャンネル間の相互相関関係を求めることができる。
放射帯域の計算はデジタルまたはアナログのいずれによっても行なえる。

【0044】

両方の装置を以下に詳細に記述する。総合信号および位置信号をデジタルで計算するための装置が図8に示されている。この場合、多チャンネルPMTの陽極に流れる電流は、それぞれ第1増幅器A（電流／電圧変換器として接続されている）によって電圧に変換され、増幅される。電圧は積分器Iに導かれ、そこで当該時間（たとえば画素上滞留時間）だけ信号が積分される。

【0045】

迅速に値を求めるため、積分器Iの後に、単純な比較器として次のようなスイッチング閾値を有す比較器Kを、即ち閾値を超えたときにデジタル出力信号を発するか、またはウィンドウ比較器として形成されていて、入力信号がスイッチング閾値の上限と下限との間にあるか、または入力信号がスイッチング閾値の外（下または上）にあれば、デジタル出力信号を発するという比較器Kを配置させることができる。比較器もしくはウィンドウ比較器の装置は、積分器の前にも後にすることもできる。積分器なしの接続装置（いわゆる増幅モード）も同様に考え得る。

【0046】

増幅器モードでの装置の場合、比較器Kは然るべき基準に適合させて装置する。比較器Kの出力は直接アクティブなチャンネルに接続する（オンライン）スイッチ・レジスタRegの制御信号として用いられるか、またはアクティブなチャンネルを個別選択するために（オフライン）、その時の状態が付属連結器Vを通じてコンピュータに伝えられる。積分器Iの出力信号は後続のA/D変換のため、レベル適合用の別な増幅器A1へ直接導かれる。

【0047】

A/D変換された値は適当なデータ伝送装置を通じて、図7および図9に従って、位置信号および総合信号の計算を実行するコンピュータ（PCまたはデジタル信号プロセッサDSP）へ伝送される。

図9には、図8の装置と等価のアナログデータ処理に基づく装置が描かれている。この場合、個々のチャンネルの信号は増幅器によって電圧信号に変換される。続いて、個々の電圧信号は積分器I内で画素上滞留時間だけ積分される。

積分器の後に、積分された信号と基準信号との比較を行なう比較器Kが設置されている。

【0048】

積分された信号が比較器閾値より小さい場合、当該個別チャンネル内では蛍光信号は測定されていないか、または測定された信号があまりにも小さくなりすぎる。このような場合は、個別チャンネルの信号加工は続行すべきでない。なぜなら、当チャンネルが総信号に関与してのは雑音成分だけとなるからである。比較器はこのような場合、Regを通じてスイッチSを操作し、個別チャンネルは実測されている画素に対して遮断される。すなわち比較器とスイッチとの組み合わせによって、実測像ポイントにとって重要なスペクトル領域が自動的に選択される。

【0049】

続いて、スイッチ・レジスタSRと連結するデマルチプレクサMPXを擁す個別チャンネルの積分電圧信号をレジスタReg1により様々な加算ポイントに接続させることができる。図9には8種の加算ポイントSPが描かれている。レジスタ1の制御はコンピュータの制御線V1によって行なわれる。各加算ポイントはそれぞれ、選択した個別チャンネルの加算を行う加算増幅器SVの1部を形成している。図8では全部で8つの加算増幅器SVが描かれている。

【0050】

引き続き、総合信号はそれぞれ、アナログ／デジタル変換器によってデジタル信号に変換され、コンピュータまたはDSP（デジタルシグナルプロセッサ）によりさらに加工される。加算増幅器SVは変動する非直線性特性線に従って作動させることもできる。

別な装置（デジタル検出（図8に示す）およびアナログ検出（図9に示す））では、個別

検出チャンネルの入力信号は、以下によって操作し、もしくは歪ませる：

それは、（Ａ）における増幅の変更、（Ｉ）における積分時間の変更、積分器の前の付加オフセット入力および・または光子計数装置によって計数される光子によるデジタルな影響の付与である。３方法はすべて任意相互に組み合わせることもできる。

【００５１】

人為的原因を避けるため、蛍光測定の際には、試料から後方散乱する励起光を抑制するか、または少なくとも、放射の最大より小さいかまたは同じ系列量になるように弱める必要がある。それには、上記の付加線形フィルタまたは然るべく最適化したメインカラー・スプリッタ（ＭＤＢ）を、光学的減衰用として使用することができる。

【００５２】

励起レーザビームのスペクトル帯域は個別チャンネルによって検出される帯域幅よりはるかに狭いから、後方散乱した、もしくは反射した励起ビームも、対応の個別チャンネルを図９のＭＰＸによって所期設定どおり遮断することができる。励起波長が２つの検出チャンネルに到達した場合、格子を回転させるかライン検出器を移動させるかによって、あるいは図６のＳ１またはＳ２を傾倒させることによって、励起光線が１検出チャンネルにのみ達するように当光線をシフトさせることができる。

【００５３】

図９の装置は図８の装置に対していくつかの長所を持つ。最も目立つ長所は、単に総合チャンネル（つまり、使用色素の検出帯域）をデジタルデータに変換してコンピュータに送り込むだけでよいことである。これにより、コンピュータによって処理すべきデータ率は最小化される。このことは、極めて迅速に経過する動力学的過程が記録できるように、たとえば５０画像以上を５１２×５１２画素および１２ビット画素階調で検出する実時間顕微鏡法に本方法を適用した場合に特に重要である。

【００５４】

また、この方法を利用すれば、使用されるライン検出器（マトリクス検出器）の個別チャンネル数、従ってまた、検出可能なスペクトル領域の広さおよび／またはスペクトルセンサの分光分解能に関しては制限がない。

さらに、図８に示された装置では、変換可能な信号レベルは遥かに低い。それにより、信号対雑音比の想定値は小さくなる。

【００５５】

上記の両装置では、個別チャンネル信号の検出には主として積分器スイッチングが使用された。また、光子計数も個別チャンネル内で制限を受けることなく行うことができる。しかし、図８に示された装置は、画像追加加工のために、総合信号のほかに完全なスペクトル情報さえ提供できるという長所を持っている。本発明はそれゆえ両装置の組合せをも含んでいる。

【図面の簡単な説明】

【図１】 a) １光子吸収、b) 多光子吸収

【図２】 共焦点レーザ走査型顕微鏡

【図３】 各種色素の放射スペクトル

【図４】 カルシウムイオンの濃度に依存する放射スペクトル、a) インドー１の場合、b) フルオー３とフラ赤色素との組合せの場合

【図５】 検出器ユニットの構成図

【図６】 検出器ユニットの実施例

【図７】 a) L S M画像内における観察対象特定領域の分布状態、b) 放射スペクトルの典型例の励起波長

【図８】 総合信号および位置信号をデジタルで計算するための装置

【図９】 総合信号および位置信号の計算を実行するコンピュータ

【符号の説明】

L 光

P O 結像レンズ系

10

20

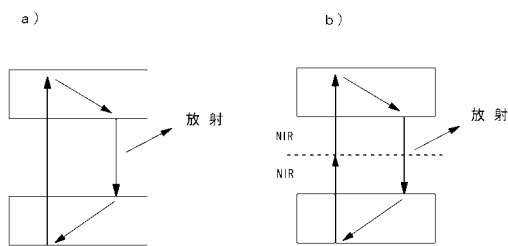
30

40

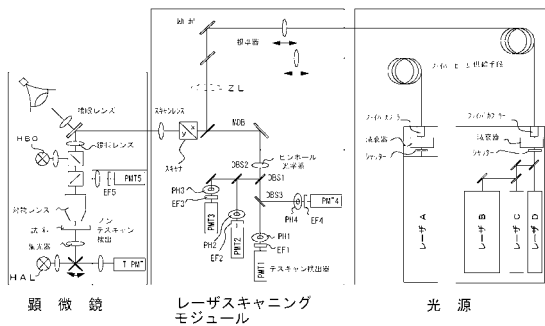
50

P H	絞り (ピンホール)
D I	角分散素子
D E	ライン検出器
S	放射信号
S 1, S 2	結像鏡
G	線形格子
I	積分器
A	増幅器
K	比較器
S V	加算増幅器
V	コンピュータの制御線
S R	スイッチ・レジスタ
M P X	デマルチプレクサ

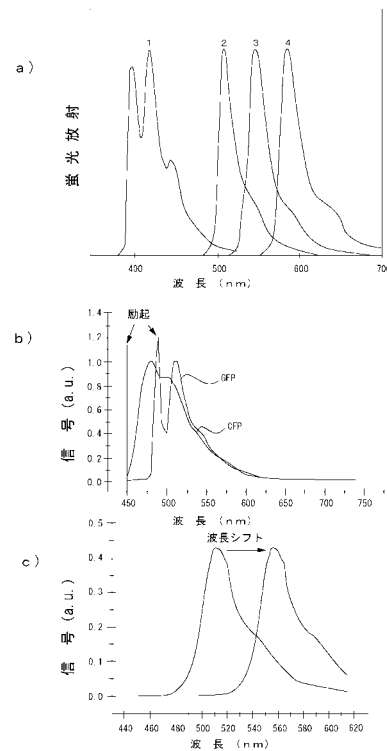
【図 1】



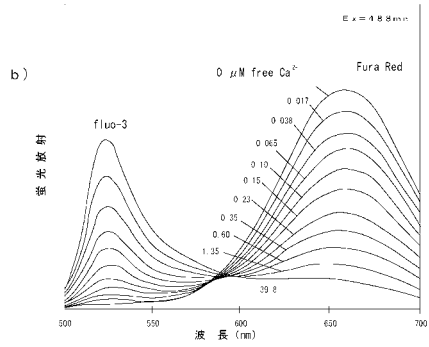
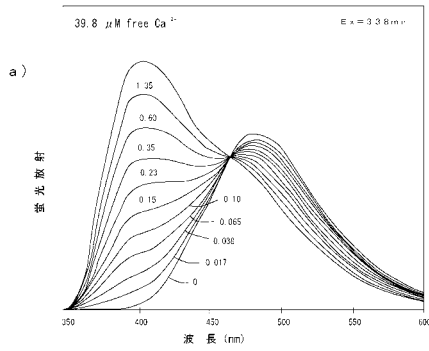
【図 2】



【図 3】



【図 4】



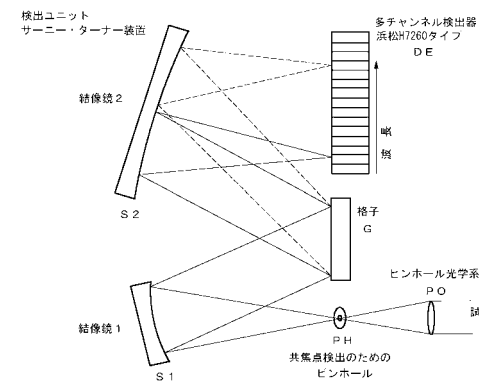
【図 5】



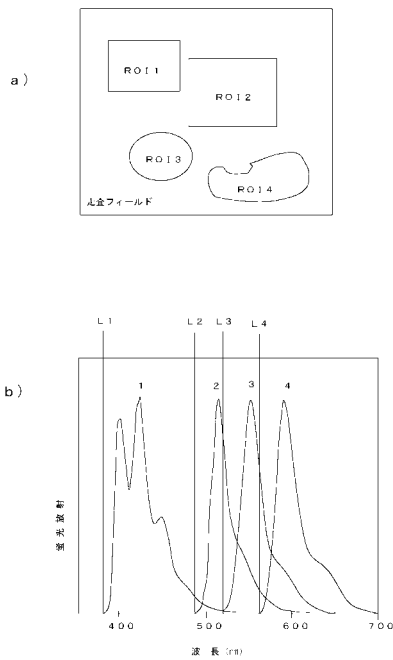
ノンデスキャン検出用部品



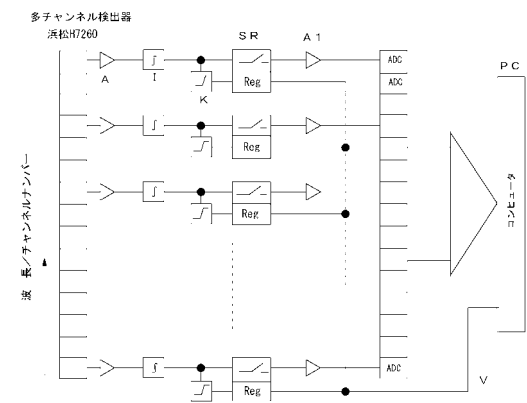
【図 6】



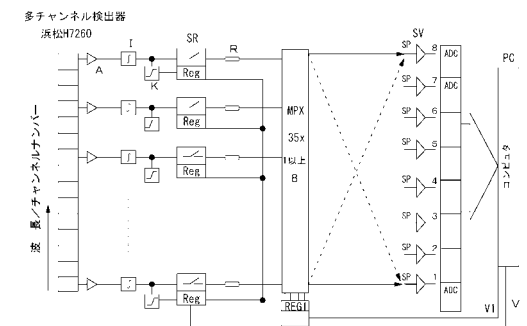
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Februar 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/12863 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 21/64,
G02B 21/00, G01J 3/28

(71) Anmelder: CARL ZEISS JENA GMBH [DE/DE]; Carl-
Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09048

(72) Erfinder: WOLLESCHENSKY, Ralf, An der Prom-
nade 3, 99510 Schölen (DE); MÖHLER, Gunter; Or-
chideenweg 3, 07745 Jena (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. August 2001 (04.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: CARL ZEISS JENA GMBH, Carl-Zeiss-Prom-
enade 10, 07745 Jena (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

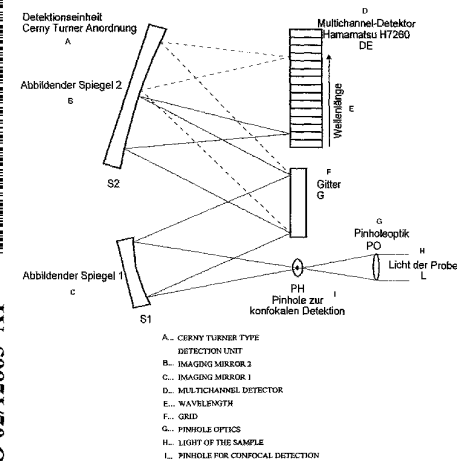
(30) Angaben zur Priorität:
100 38 526.5 8. August 2000 (08.08.2000) DE

(81) Bestimmungsstaat (national): JP.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND ASSEMBLY FOR DETECTING THE WAVELENGTH-DEPENDENT BEHAVIOR OF AN ILLUMI-
NATED SPECIMEN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND ANORDNUNG ZUR ERFASSUNG DES WELLENLÄNGENABHÄNGIGEN
VERHALTENS EINER BELEUCHTETEN PROBE



(57) Abstract: The invention relates to a method and to an assembly for operating an optical imaging system for detecting the characteristic values of the wavelength-dependent behavior of an illuminated specimen, especially of the emission and/or absorption behavior, preferably of the fluorescence and/or luminescence and/or phosphorescence and/or enzyme-activated light emission and/or enzyme-activated fluorescence, preferably for the purpose of operating a laser scanning microscope. According to the inventive method, the image spot information of the specimen is broken down into its spectral components in a spatially resolved and wavelength-independent manner on the detector end, and for different spectral components at least one summation is made.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/12863 A1

WO 02/12863 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(57) **Zusammenfassung:** Verfahren und Anordnung zum Betrieb eines bildgebenden optischen Systems zur Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions- und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/oder Lumineszenz und/oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, vorzugsweise zum Betrieb eines Laserscannmikroskopes, mit detektionsseitig ortsangeförderter wellenlängenabhängiger Zerlegung der Bildpunktinformation der Probe in Spektralkomponenten, wobei für unterschiedliche Spektralkomponenten mindestens eine Summierung erfolgt.

Verfahren und Anordnung zur Erfassung des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Anordnung in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der Laser Scanning Mikroskopie, der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie und der Scanning Nahfeld-mikroskopie, zur Untersuchung von vorwiegend biologischen Proben, Präparaten und zugehörigen Komponenten. Mit eingeschlossen sind auf Fluoreszenzdetektion basierenden Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen (High Throughput Screening). Durch den Übergang von der Detektion von wenigen breiten spektralen Farbstoffbändern zur simultanen Aufnahme kompletter Spektren eröffnen sich neue Möglichkeiten bei der Identifikation, Separation und Zuordnung der meist analytischen oder funktionalen Probeneigenschaften zu räumlichen Teilstrukturen oder dynamischen Prozessen. Simultan-Untersuchungen von Proben mit Mehrfachfluorophoren werden damit bei überlappenden Fluoreszenzspektren auch in räumlichen Strukturen von dicken Proben möglich. Die Datenaufnahmerate wird durch die Anordnung nicht verringert.

Stand der Technik

Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie (Lit.: Pawley, „Handbook of biological confocal Microscopy“, Plenum Press 1995). Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Zellteilen verwendet.

Die eingestrahlten Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand an. Diese Anregung wird meist als Einphotonen-Absorption bezeichnet (Abb. 1a). Die so angeregten Farbstoffmoleküle können auf verschiedene Weise in den Grundzustand zurück gelangen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist der Übergang unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons am wichtigsten. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist aufgrund der Stokesverschiebung im Vergleich zur

Anregungsstrahlung generell rot verschoben, besitzt also eine größere Wellenlänge. Die Stokesverschiebung ermöglicht die Trennung der Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung.

Das Fluoreszenzlicht wird mit geeigneten dichroitischen Strahlteilern in Kombination mit Blockfiltern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt beobachtet. Dadurch ist die Darstellung einzelner, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteilen, möglich. Grundsätzlich können jedoch auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen sich spezifisch anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden (Mehrfachfluoreszenz). Zur Unterscheidung, der von den einzelnen Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzsignale, werden wiederum spezielle dichroitischen Strahlteiler verwendet.

Neben der Anregung der Farbstoffmoleküle mit einem hochenergetischen Photon (Einphotonen-Absorption) ist auch eine Anregung mit mehreren Photonen geringerer Energie möglich (Abb. 1b). Die Summe der Energien der Einzelphotonen entspricht hierbei ungefähr einem Vielfachen des hochenergetischen Photons. Diese Art der Anregung der Farbstoffe wird als Mehrphotonen-Absorption bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Die Farbstoffemission wird durch diese Art der Anregung jedoch nicht beeinflusst, d.h. das Emissionsspektrum erfährt bei der Mehrphotonen-Absorption einen negativen Stokesshift, besitzt also eine geringere Wellenlänge im Vergleich zur Anregungsstrahlung. Die Trennung der Anregungs- von der Emissionsstrahlung erfolgt in der gleichen Art und Weise wie bei der Einphotonen-Absorption.

Der Stand der Technik soll im folgenden beispielhaft anhand eines konfokalen Laser-Scanning- Mikroskopes (LSM) erläutert werden (Abb. 2).

Ein LSM gliedert sich im wesentlichen in 4 Module: Lichtquelle, Scanmodul, Detektionseinheit und Mikroskop. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE19702753A1 verwiesen.

Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Die Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z.B. durch den Einsatz eines akusto optischen Kristalls. Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul.

Die in der Lichtquelle erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scanoptik und die Tubuslinse in das Präparat fokussiert. Der Fokus rastert punktförmig die Probe in x-y-Richtung ab. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden.

Bei einer konfokalen Detektion (descanned Detection) des Fluoreszenzlichtes, gelangt das Licht, das aus der Fokusebene (Specimen) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MDB). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende (konfokale Blende / Pinhole) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punktdetektors (PMT) gemessen.

Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen in dem die Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokalen Blende kann somit entfallen und die Detektion kann direkt nach dem Objektiv erfolgen (non descanned Detektion).

In einer weiteren Anordnung zur Detektion einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descannte Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektivs in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descannte Detektion).

Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch beide Detektionsanordnungen in Verbindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wiedergegeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden.

Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissionseigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, daß nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

In biomedizinischen Applikationen werden zur Zeit mehrere verschiedene Zellregionen mit verschiedenen Farbstoffen gleichzeitig markiert (Multifluoreszenz). Die einzelnen Farbstoffe können mit den Stand der Technik entweder aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften oder Emissionseigenschaften (Spektren) getrennt nachgewiesen werden (Abb 3a).

Abb.3a zeigt die Emissionsspektren von verschiedenen typischen Farbstoffen. Aufgetragen ist das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zu erkennen ist, daß sich die mit 1 bis 4 bezeichneten Farbstoffe in der Lage und Form ihrer Emissionsspektren unterscheiden.

Zum getrennten Nachweis erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung des Fluoreszenzlichts von mehreren Farbstoffen mit den Nebenstrahlteilern (DBS) und eine getrennte Detektion der einzelnen Farbstoffemissionen in verschiedenen Punktdetektoren (PMT x). Eine flexible Anpassung der Detektion und der Anregung an entsprechende neue Farbstoffeigenschaften

durch den Anwender ist mit der oben beschriebenen Anordnung nicht möglich. Statt dessen müssen für jeden (neuen) Farbstoff neue dichroitische Strahlteiler und Blockfilter kreiert werden.

In einer Anordnung gemäß WO95/07447 wird das Fluoreszenzlicht mit Hilfe eines Prismas spektral aufgespalten. Das Verfahren unterscheidet sich von der oben beschriebenen Anordnung mit dichroitischen Filtern nur dadurch, dass der verwendete Filter in seiner Charakteristik einstellbar ist. Es werden jedoch weiterhin pro Punktdetektor vorzugsweise das Emissionsband eines Farbstoffs aufgezeichnet.

Ein schneller Wechsel der Detektionsbereiche ist mit beiden Anordnungen nur bedingt möglich, da die Einstellung des Emissionsbereiches auf mechanischen Bewegungen des dichroitischen Filters bzw. von Blenden beruht. Ein schneller Wechsel wird z.B. dann benötigt wenn sich die Emissionsspektren wie in Abb. 3b dargestellt überlagern jedoch die Absorptionseigenschaften verschieden sind. Abb.3b zeigt die Emissionssignale in Abhängigkeit von der Wellenlänge für die Farbstoffe CFP, Topas, CFT und Cyan-FP. Dieses Verfahren (Multitracking) ist in DE 19829981A1 beschrieben. Diese Farbstoffe sind zur Untersuchung von Lebendpräparaten besonders geeignet da sie keine toxischen Wirkungen auf die zu untersuchenden Proben ausüben. Um beide Farbstoffe CFP,CFT möglichst effizient detektieren zu können wird in einer Scanrichtung CFP mit einer Wellenlänge von 458nm angeregt und die Fluoreszenz von 460-550 nm detektiert. Auf dem Rückweg des Scanners erfolgt die selektive Anregung von GFP mit 488nm und eine Detektion des Wellenlängenbereiches von 490 – 650 nm.

Ist die Lage des Emissionsspektrums der verwendeten Farbstoffe unbekannt oder tritt eine von der Umgebung abhängige Verschiebung des Emissionsspektrums (Abb. 3c) auf so ist eine effiziente Detektion der Farbstofffluoreszenzen nur bedingt möglich. In Abb.3c ist wiederum das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt. Die Wellenlängenverschiebung kann bis zu mehreren 10 nm betragen. Zur Vermessung des Emissionsspektrums in der Probe werden heutzutage

Spektrometer auch in Verbindung mit einem LSM eingesetzt. Hierbei wird statt eines Punktdetektors ein herkömmliches meist hochauflösendes Spektrometer verwendet (Patent Dixon, et al. US 5,192,980). Diese können jedoch nur punktuell oder gemittelt über ein Gebiet ein Emissionsspektrum aufzeichnen. Es handelt sich also um eine Art der Spektroskopie.

In einer weiteren Applikation der Fluoreszenzmikroskopie wird die Ionenkonzentration (z.B.: Ca^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , ...) insbesondere in biologischen Präparaten bestimmt. Hierzu werden spezielle Farbstoffe oder Farbstoffkombinationen (z.B. Fura, Indo, Fluo; Molecular Probes, Inc.) verwendet, die eine spektrale Verschiebung in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration besitzen. Abb. 4a) zeigt die Emissionsspektren von Indo-1 in Abhängigkeit von der Konzentration der Kalziumionen. Abb. 4b) zeigt ein Beispiel für die Emissionsspektren in Abhängigkeit von der Kalzium Ionenkonzentration bei Verwendung der Kombination von FLuo-3 und Fura Red-Farbstoffen. Diese speziellen Farbstoffe werden als Emissionsratiofarbstoffe bezeichnet. Summiert man die beiden in Abb. 4a dargestellten Fluoreszenzbereiche und bildet das Verhältnis (Ratio) beider Intensitäten, so kann auf die entsprechende Ionenkonzentration rückgeschlossen werden. Meist werden bei diesen Messungen dynamische Änderung der Ionenkonzentration in Lebendpräparaten untersucht, die eine Zeitauflösung von weniger als einer Millisekunde erfordern.

Aufgabe der Erfindung sind daher neue Methoden zur flexiblen und frei programmierbaren Detektion. Diese Methoden sollen in bildgebenden wie in analytischen Mikroskopiersystemen eingesetzt werden können. Die Mikroskopiersysteme sind bildgebende Systeme wie Laser-Scanning-Mikroskope zur dreidimensionalen Untersuchung von biologischen Präparaten mit einer optischen Auflösung bis zu 200 nm, Scanning-Nahfeld-Mikroskope zur hochaufgelösten Untersuchung von Oberflächen mit einer Auflösung von bis zu 10 nm, Fluoreszenzkorrelations-Mikroskope zur quantitativen Bestimmung von Molekülkonzentrationen und zur Vermessung von Molekül-Diffusionen. Weiterhin sind auf Fluoreszenzdetektion basierende Verfahren zum Screenen von Farbstoffen eingeschlossen.

WO 02/12863

7

PCT/EP01/09048

In all den o.g. Systemen werden Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Markierung der Präparate eingesetzt. Die o.g. Aufgabe wird durch Verfahren und Anordnungen gemäß den unabhängigen Patentansprüchen gelöst. Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

Beschreibung der Erfindung

Hintergrund des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine spektral aufgespaltete Detektion der Fluoreszenz. Dazu wird das Emissionslicht im Scanmodul oder im Mikroskop (bei Mehrphotonen-Absorption) mit Hilfe eines Elementes zur Trennung der Anregungsstrahlung von der detektierten Strahlung wie dem Hauptfarbteiler (MDB) oder einem AOTF gemäß 7346DE oder gemäß 7323DE vom Anregungslicht abgespalten. Bei Durchlichtanordnungen kann ein derartiges Element auch völlig entfallen. Ein Blockschaltbild der nun folgenden Detektoreinheit ist in Abb. 5 dargestellt. Das Licht L der Probe wird nun mit Hilfe von einer abbildenden Optik PO bei konfokaler Detektion durch eine Blende (Pinhole) PH fokussiert, wodurch Fluoreszenz, die außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannten Detektion entfällt die Blende. Das Licht wird nun mit Hilfe eines winkeldispersiven Elements DI in seine Spektralanteile zerlegt. Als winkeldispersive Elemente kommen Prismen, Gitter und beispielsweise akusto optische Elemente in Frage. Das vom dispersiven Element in seine spektralen Komponenten aufgespaltete Licht wird im Anschluß auf einen Zeilendetektor DE abgebildet. Dieser Zeilendetektor DE mißt also das Emissionssignal S in Abhängigkeit von der Wellenlänge und wandelt dies in elektrische Signale um. Zusätzlich kann der Detektionseinheit noch ein Linienfilter zur Unterdrückung der Anregungswellenlängen vorgeschaltet werden.

Eine mögliche Ausführungsform des optischen Strahlenganges der in Abb. 5 im Blockschaltbild gezeigten Detektoreinheit ist in Abb. 6 dargestellt. Der Aufbau beschreibt im wesentlichen einen Cerny Turner Aufbau. Bei einer konfokalen Detektion wird das Licht L der Probe mit der Pinholeoptik PO durch die konfokale Blende PH fokussiert. Bei einer nichtdescannten Detektion im Falle einer Mehrphotonen-Absorption kann diese Blende entfallen. Der erste abbildende Spiegel S1 kollimiert das Fluoreszenzlicht. Anschließend trifft das Licht auf ein Liniengitter G, beispielsweise ein Gitter mit einer Linienzahl von 651 Linien pro mm. Das Gitter beugt das Licht entsprechend seiner Wellenlänge in verschiedene Richtungen. Der zweite abbildende

Spiegel S2 fokussiert die einzelnen spektral aufgespaltenen Wellenlängenanteile auf die entsprechenden Kanäle des Zeilendetektors DE. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines Zeilen-Sekundärelektronenvervielfachers der Firma Hamamatsu H7260. Der Detektor besitzt dann 32 Kanäle und eine hohe Empfindlichkeit. Der freie Spektralbereich der oben beschriebenen Ausführungsform beträgt etwa 350 nm. Der freie Spektralbereich wird in dieser Anordnung gleichmäßig auf die 32 Kanäle des Zeilendetektors verteilt, wodurch sich eine optische Auflösung von etwa 10 nm ergibt. Somit ist diese Anordnung nur bedingt zur Spektroskopie geeignet. Jedoch ist ihr Einsatz in einem bildgebenden System vorteilhaft, da das Signal pro Detektionskanal aufgrund des relativ breiten detektierten Spektralbandes noch relativ groß ist. Eine Verschiebung des freien Spektralbereiches kann zusätzlich durch eine Verdrehung beispielsweise des Gitters erfolgen.

Eine weitere mögliche Ausführungsform könnte die Verwendung eines Matrixdetektors (z.B. eine CCD, Hersteller Sony, Kodak...) beinhalten. Hierbei wird in einer Koordinate durch das dispersive Element eine Aufspaltung in verschiedene Wellenlängenanteile vorgenommen. In der verbleibenden Richtung auf dem Matrixdetektor wird eine komplette Zeile (oder Spalte) des gescannten Bildes abgebildet. Diese Ausführungsform ist besonders vorteilhaft beim Aufbau eines Linienscanners (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach Abb. 2. Jedoch wird statt eines Punktfokus eine Linie in den Fokus abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung gescannt. Die Linie wird durch das Einschalten einer Zylinderlinse ZL (in Abb. 2 gestrichelt dargestellt) vordem Scanner erzeugt. Als konfokale Blende dient in einem solchen Aufbau statt einer Lochblende eine Schlitzblende. Eine nichtdescannte Detektion insbesondere bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung wie in Fig. 2 dargestellt, erfolgen. Weiterhin kann die Schlitzblende bei Mehrphotonenabsorption entfallen.

In den oben beschriebenen Ausführungsform(en) detektiert jeder Einzelkanal ein Spektralband des Emissionsspektrums mit einer spektralen Breite von ca. 10 nm. Die Emission der für die Fluoreszenzmikroskopie relevanten Farbstoffe erstreckt sich jedoch über einen Wellenlängenbereich von mehreren 100 nm. Deshalb erfolgt in der erfindungsgemäßen Anordnung eine Summation der Einzelkanäle entsprechend der Fluoreszenzbänder der verwendeten Farbstoffe. Hierzu wird im ersten Schritt ein so genannter Spektralscan durchgeführt, der die Informationen der Einzelkanäle z.B. als Bildinformation ausliest. Hierbei wird die Probe vorteilhaft mit mehreren Anregungswellenlängen entsprechend der verwendeten Farbstoffe bestrahlt. Für jeden Bildpunkt wird also die Summe der Spektralkomponenten der einzelnen Farbstoffe, die sich an dem gerade gemessenen Bildpunkt befinden, aufgezeichnet.

Im Anschluß kann der Nutzer beliebig die einzelnen Kanäle zu Detektionsbändern (Emissionsbändern) zusammenfassen also aufsummieren. Die Auswahl der Summationsbereiche kann beispielsweise durch die Darstellung der Signale je Bildpunkt in den Einzelkanälen in einem Histogramm erfolgen. Das Histogramm repräsentiert die Summe aller Emissionsspektren der in der Probe verwendeten Farbstoffe. Diese Summation erfolgt vorteilhaft entsprechend den Emissionsspektren der angeregten Farbstoffe, wobei die jeweiligen Anregungswellenlängen ausgeblendet und Signale verschiedener Farbstoffe in verschiedenen Detektionsbändern summiert werden.

Mit der erfindungsgemäßen Anordnung ist ein schneller Wechsel der Detektionsbänder für Multitracking – Anwendungen, d.h. für einen Wechsel der Bestrahlungswellenlänge und/ oder Intensität während des Scanvorganges, wie in DE19829981A1 beschrieben, möglich. Der Wechsel kann pixelgenau erfolgen, d.h. in einem Zeitraum von einigen µs. Dadurch ist beispielsweise auch die Betrachtung von bestimmten Regionen der zu untersuchenden Probe mit unterschiedlichen Detektionsbändern (ROI-Tracking) möglich. Abb. 7a zeigt schematisch eine Verteilung von verschiedenen Regionen besonderen Interesses (ROI 1-4) in einem LSM-

Bild, die beispielsweise verschieden angefärbte Regionen einer Zelle repräsentieren. In Abb. 7b sind typische zugehörige Emissionsspektren 1-4 mit ihren Anregungswellenlängen (L1-L4) dargestellt. Aufgrund der starken spektralen Überlagerung der Emissionsspektren der Einzelfarbstoffe bietet sich zur Detektion der Einzelfarbstoffe das Multitracking Verfahren CZ7302 an, da sich die Absorptionseigenschaften der Einzelfarbstoffe stark unterscheiden. Bei diesem Verfahren nach dem Stand der Technik werden die einzelnen Farbstoffe selektiv angeregt und bisher nacheinander in diesem Falle 4 komplette Bilder gescannt. Eine Umkonfiguration der Detektionseinheiten nach dem Stand der Technik zwischen den einzelnen ROIs erfordert die Bewegung von mechanischen Detektionskomponenten und ist daher nicht mit einer Geschwindigkeit von einigen Mikrosekunden möglich, wie es für schnelle Vergleiche mehrerer dynamisch Prozesse in verschiedenen Regionen, z.B. bei stark bleichenden oder sich bewegenden Proben und schnell ablaufenden Prozessen wünschenswert ist. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist jedoch eine schnelle Umgruppierung der Summationsbänder zwischen den einzelnen ROIs durch den Nutzer oder Computer möglich. Die Probe muß nur noch einmal zur Aufnahme sich stark überlappenden ROIs gescannt werden. Dies ist besonders vorteilhaft bei stark bleichenden Präparaten. Weiterhin können schnell ablaufende Veränderungen / Kontraste zwischen einzelnen Regionen (ROIs) sichtbar gemacht werden. Dies ist beispielsweise dann sinnvoll, wenn z.B. das Diffusionsverhalten in biologischen Umgebungen untersucht werden soll. Hierzu werden an bestimmten Stellen der Probe Farbstoffe gebleicht und im Anschluß der Zufluß von neuem Farbstoff untersucht. In einem weiteren Verfahren werden so genannte Caged Compounds verwendet. Durch ein gezieltes Anregen dieser Farbstoffe können beispielsweise Kalziumionen in Neuronen freigesetzt werden. Diese Ionenkonzentrationsänderungen können im Anschluß mit Änderungen in anderen Regionen der Probe korreliert werden.

Die Einstellung der ROIs durch den Nutzer kann beispielsweise wie folgt geschehen: Nach der Aufnahme eines Spektralscans unter Verwendung aller oder der meisten zum Anregen der Farbstoffe in den einzelnen ROI-s notwendigen Anregungslinien können Summenkanäle zwischen den

einzelnen Anregungslaserlinien gebildet werden (L1 bis L2, L2 bis L3, L3 bis L4 und L4 gemäß Fig.7b bis zur maximalen Emissionswellenlänge). Diese Summenkanäle entsprechen Teilen der Fluoreszenzbänder der einzelnen Farbstoffe. Weiterhin erfolgt eine gleichzeitige Summation der Signale verschiedener Farbstoffe in gleichen Summenkanälen aufgrund der starken Überlagerung. Diese Summenkanäle werden im Anschluß farbkodiert in verschiedenen Bildkanälen abgelegt und miteinander überlagert dargestellt. Aufgrund der verschiedenen lokalen Farbmischungen in den Bildkanälen können die verschiedenen ROIs durch den Nutzer oder durch automatische Mustererkennung lokalisiert und spezielle Summationseinstellungen beispielsweise gemäß der am stärksten auftretenden Farbe für die einzelnen ROIs definiert werden.

In einem 2. Verfahren zur Einstellung der verschiedenen ROIs erfolgt eine Vermessung des Fluoreszenzschwerpunktes. Hierzu werden im Detektor alle Einzelkanäle, die mit Anregungslaserlinien bestrahlt werden abgeschaltet. Jede ROI besitzt aufgrund der veränderten Emissionseigenschaften der jeweils verwendeten Farbstoffe einen charakteristischen Fluoreszenzschwerpunkt.

Somit können die verschiedenen ROIs durch die Lage des charakteristischen Farbschwerpunktes unterschieden und getrennt sichtbar gemacht werden.

Im Anschluß erfolgt wiederum eine spezifisch den Farbstoffeigenschaften angepaßte Einstellung der Summenkanäle für die einzelnen ROIs.

Zusätzlich sind beliebige Einzelkanäle auch durch den Nutzer abschaltbar. Dies ist besonders zur Unterdrückung einer oder mehrerer Anregungslaserlinien sinnvoll.

Bei der Bestimmung von Ionenkonzentrationen nach Abb. 4 werden die Summensignale durcheinander geteilt und man erhält dadurch ein Maß für die Höhe der Ionenkonzentration.

Bei der Verwendung des Verfahren in der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie kann eine Autokorrelation eines Summenkanals und /oder eine Kreuzkorrelation zwischen mehreren Summenkanälen erfolgen.

Die Berechnung der Emissionsbänder kann digital oder auch analog erfolgen. Beide Anordnungen werden im folgenden näher beschrieben. Eine Anordnung zur digitalen Berechnung des Summensignals ist in Abb. 8 schematisch dargestellt. Hierbei wird der an den Anoden eines Mehrkanal-PMT fließende Strom, jeweils durch den ersten Amplifier A (als Strom-Spannungswandler geschaltet) in eine Spannung gewandelt und verstärkt. Die Spannung wird einem Integrator I zugeführt der über eine entsprechende Zeit (z.B. Pixelverweilzeit) das Signal integriert.

Zur schnelleren Auswertung kann dem Integrator I ein Komparator K nachgeschaltet werden, der als einfacher Komparator eine Schaltschwelle hat, die bei Überschreitung ein digitales Ausgangssignal erzeugt oder der als Fensterkomparator ausgebildet ist und dann ein digitales Ausgangssignal bildet, wenn sich das Eingangssignal zwischen der oberen und unteren Schaltschwelle befindet oder wenn das Eingangssignal außerhalb (unter oder über) den Schaltschwellen liegt. Die Anordnung des Komparators bzw. des Fensterkomparators kann sowohl vor dem Integrator als auch danach erfolgen. Schaltungsanordnungen ohne Integrator (so genannte Verstärkermode) sind ebenfalls denkbar. Bei der Anordnung im Verstärkermode ist weiterhin der Komparator K auch nach entsprechender Pegelanpassung vorhanden. Der Ausgang des Komparators K dient als Steuersignal für ein Switch-Register SR, das direkt die aktiven Kanäle schaltet (online) oder der Zustand wird dem Computer über eine zusätzliche Verbindung V mitgeteilt, um eine individuelle Auswahl der aktiven Kanäle zu treffen (off-line). Das Ausgangssignal des switch-Registers SR wird direkt einem weiteren Verstärker A1 zur Pegelanpassung, für die nachfolgende A/D-Wandlung AD zugeführt. Die AD gewandelten Werte werden über geeignete Datenübertragung an einen Rechner (PC oder Digital-Signal-Prozessor DSP) übertragen, der die Berechnung des /der Summensignale(s) durchführt.

Ein auf analoger Datenverarbeitung basierendes Äquivalent der Anordnung in Abb. 8 ist in Abb. 9 dargestellt. Die Signale der Einzelkanäle werden hierbei wiederum mit einem Verstärker A in Spannungssignale transformiert.

Anschließend werden die einzelnen Spannungssignale in einem Integrator I während der Pixelverweilzeit aufintegriert.

Dem Integrator nachgeschaltet ist ein Komparator K, der einen Vergleich des aufintegrierten Signals mit einem Referenzsignal durchführt.

Falls das aufintegrierte Signal kleiner als die Komparatorschwelle ist, so würde in dem entsprechenden Einzelkanal kein oder ein zu kleines Fluoreszenzsignal gemessen. In einem solchen Falle soll das Signal des Einzelkanals nicht weiter verarbeitet werden, da dieser Kanal nur einen Rauschanteil zum Gesamtsignal beiträgt. Der Komparator betätigt in einem solchen Falle über SR einen Schalter und der Einzelkanal wird für den gerade gemessenen Pixel ausgeschaltet. Mit Hilfe der Komparatoren in Kombination mit den Schaltern wird also automatisch der für den gerade gemessenen Bildpunkt relevante Spektralbereich ausgewählt.

Im Anschluß kann das integrierte Spannungssignal der Einzelkanäle mit einem mit dem Switch-Register SR verbundenen Demultiplexer MPX auf verschiedene Summenpunkte durch das Register Reg1 geschaltet werden. In Abb. 9 sind 8 verschiedene Summenpunkte SP eingezeichnet. Die Steuerung des Registers Reg1 erfolgt durch eine Steuerleitung V1 vom Rechner. Jeweils ein Summenpunkt SP bildet jeweils einen Teil des Summationsverstärkers SV, der die Summation der ausgewählten Einzelkanäle durchführt. Insgesamt sind in Abb. 8 8 Summenverstärker SV dargestellt. Die Summensignale werden im Anschluß mit jeweils einem Analog-Digital-Wandler in digitale Signale umgewandelt und vom Computer oder DSP weiterverarbeitet. Die Summenverstärker SV können auch mit einer veränderlichen nichtlinearen Kennlinie betrieben. In einer weiteren Anordnung (digitale (nach Abb. 8) und analoge Detektion (nach Abb. 9)) erfolgt eine Manipulation bzw. Verzerrung der Eingangssignale der Einzeldetektionskanäle durch: eine Veränderung der Verstärkung von (A), eine Veränderung der Integrationszeiten von (I), durch ein Einspeisen eines zusätzlichen Offsets vor dem Integrator und/oder durch eine digitale Beeinflussung der gezählten Photonen bei einer Photonenanzahlordnung. Beide Methoden können auch beliebig miteinander kombiniert werden.

Für die Vermeidung von Artefakten ist es bei einer Fluoreszenzmessung notwendig das von der Probe rückgestreute Anregungslicht zu unterdrücken oder zumindest so stark abzuschwächen, dass es kleiner als oder in der gleichen Größenordnung wie das Emissionsmaximum ist. Hierzu kann der oben beschriebene zusätzliche Linienfilter oder ein entsprechend optimierter Hauptfarbteiler (MDB) zur optischen Abschwächung verwendet werden. Da die spektrale Breite der Anregungslaserstrahlung sehr viel kleiner als die vom Einzelkanal detektierte Bandbreite ist, kann die rückgestreute bzw. reflektierte Anregungsstrahlung auch durch ein gezieltes Ausschalten des entsprechenden Einzelkanals mit dem in Abb. 9 dargestellten MPX erfolgen. Tiff die Anregungswellenlänge auf zwei Detektionskanäle so kann durch eine Verdrehung des Gitters, eine Verschiebung des Zeilendetektor oder eine Verkipfung von S1 oder S2 in Abb. 6 die Anregungslinie so verschoben werden, dass sie nur auf einen Detektionskanal fällt.

Die Anordnung nach Abb. 9 hat gegenüber Anordnung nach Abb. 8 mehrere Vorteile. Der auffälligste Vorteil ist, dass lediglich die Summenkanäle (also die Detektionsbänder der verwendeten Farbstoffe) in digitale Daten gewandelt und an den Computer gesendet werden müssen. Dadurch werden die vom Computer zu verarbeitenden Datenraten minimiert. Dies ist besonders wichtig bei der Anwendung des Verfahrens in der Echtzeitmikroskopie bei der beispielsweise mehr als 50 Bilder mit 512x512 Pixeln und 12 bit Pixeltiefe detektiert werden müssen, um die extrem schnell ablaufenden dynamischen Prozesse registrieren zu können. Beim Einsatz dieses Verfahrens sind weiterhin keine Grenzen an die Anzahl der Einzelkanäle des verwendeten Zeilendetektor (Matrixdetektors) und damit an die Größe des detektierbaren Spektralbereiches und/oder die spektrale Auflösung des Spektralsensors gesetzt.

Weiterhin sind bei der in Abb. 8 dargestellten Vorrichtung die zu wandelnden Signalpegel wesentlich kleiner. Dadurch ist das zu erwartende Signal zu Rauschverhältnis geringer.

In den beide oben beschriebenen Anordnungen wurde vorzugsweise eine Integratorschaltung zur Detektion der Einzelkanalsignale verwendet. Uneingeschränkt kann jedoch auch eine Photonenzählung in den

WO 02/12863

16

PCT/EP01/09048

Einzelkanälen erfolgen und die Photonenzahlen addiert werden. Die in Abb. 8 dargestellte Anordnung hat jedoch den Vorteil, dass sie neben dem Summensignalen auch noch die komplette Spektralinformation zur nachträglichen Bildverarbeitung zur Verfügung stellt. Die Erfindung schließt deshalb auch eine Kombination beider Anordnungen ein.

WO 02/12863

17

PCT/EP01/09048

Patentansprüche

1.

Verfahren zum Betrieb eines bildgebenden optischen Systems zur Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions - und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/ oder Lumineszenz und/ oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, vorzugsweise zum Betrieb eines Laserscanmikroskopes, mit detektionsseitig orts aufgelöster wellenlängenabhängiger Zerlegung der Bildpunktinformation der Probe in Spektralkomponenten, wobei für unterschiedliche Spektralkomponenten mindestens eine Summierung erfolgt

2.

Verfahren nach Anspruch 1 zum Betrieb eines scannenden Systems, wobei innerhalb eines Scanvorgangs zwischen verschiedenen Probenbereichen ein Wechsel mindestens einer Bestrahlungswellenlänge und / oder Bestrahlungsintensität erfolgt und für unterschiedliche Probenbereiche und/oder Bestrahlungswellenlängen/-Intensitäten eine Summierung mindestens eines Teiles der jeweiligen Spektralkomponenten erfolgt.

3.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer bildlichen Darstellung der summierten Bereiche.

4.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Teilsummen gebildet und dann addiert werden.

5.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer Überlagerung von Teilsummen von Spektralkomponenten, die überlagerte Signale verschiedener Fluoreszenzkomponenten enthalten.

6.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch die Kombination mit spektraler Schwerpunktbildung für mehrere Spektralkomponenten.

7.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
mit mathematischer Verknüpfung wie Quotienten- oder Differenzbildung von
Teilsummen oder Einzelkomponenten und bildlicher Darstellung der
Verknüpfung

8.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des
wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere
des Emissions - und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der
Fluoreszenz und/ oder Lumineszenz und/ oder Phosphoreszenz und/oder
enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz,
wobei die Emissionsstrahlung mit einem dispersiven Element spektral
aufgespalten wird, orts aufgelöst detektiert und elektronisch mindestens ein
Summensignal der Emissionsstrahlung und/oder der absorbierten Strahlung
bestimmt wird.

9.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgespaltenen
Emissionsstrahlung zur:
Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder
zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes
bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder
zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Emissionsspektrums in
Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden
sind und/oder
zur Vermessung von Emissionsratiofarbstoffen zur Bestimmung von
Ionenkonzentrationen erfolgt .

10.

WO 02/12863

19

PCT/EP01/09048

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgeweiteten reflektierten, rückgestreuten und/oder transmittierten Anregungsstrahlung von Fluorochromen zur:

Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder

zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines

Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder

zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Absorptionsspektrums in

Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder

zur Vermessung der Absorptionsratio zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt .

11.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens in Abhängigkeit von den Anregungsparametern variiert werden kann (Multitracking).

12.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens in Abhängigkeit von der jeweiligen Scanposition variiert werden kann (ROI-Tracking).

13.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

14.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Aufspaltung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt

15.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Absorptionsmessung die von der Probe reflektierte, rückgestreute und / oder transmittierte Strahlung mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

WO 02/12863

20

PCT/EP01/09048

16.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen werden und die Summation digital in einem Rechner erfolgt.

17.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summation mit analoger Datenverarbeitung mittels eines Demultiplexers in Kombination mit einem Summationsverstärkers erfolgt

18.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektorkanäle durch eine nichtlineare Verzerrung der Eingangssignale beeinflusst werden

19.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Integrationsparameter erfolgt

20.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Kennlinie eines Verstärkers erfolgt

21.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summensignale zur Generierung eines Bildes verwendet wird.

22.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird

23.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt

24.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summensignale mit einer lookup Tabelle kombiniert werden

25.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels der lookup-Tabelle eine Darstellung verschiedener Farbstoffe und / oder der Spreizung des generierten Bildes erfolgt

WO 02/12863

21

PCT/EP01/09048

26.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer Unterschreitung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine Veränderung der Betriebsweise des Detektionskanals erfolgt

27.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen Detektionskanals erfolgt

28.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs erfolgt

29.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer Integratorschaltung generiert werden

30.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonen-zählung und anschließender Digital/ Analogwandlung generiert werden

31.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Photonen-zählung zeitkorreliert erfolgt

32.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Erfassung von Ein- und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/ oder durch entangled photon angeregter Fluoreszenz

33.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im Wirkstoffscreening, wobei die Probe vorzugsweise eine Mikrotiterplatte ist

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

in einem Mikroskop

22

34.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

35.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in
einem Fluoreszenzkorrelierten Spektroskop.

36.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mittels konfokaler Detektion

37.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einer scannenden Anordnung

38.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung

39.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem X/Y Scantisch

40.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mittels nichtkonfokaler Detektion

41.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einer scannenden Anordnung

42.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit descannter Detektion

43.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit Hellfeldabbildung

44.

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit Punktabbildung

45.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit nicht descannter Detektion

46.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit Hellfeldabbildung

47.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt-
oder Hellfeldabbildung

48.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem X/Y Scantisch

49.

Anordnung zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions - und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/ oder Lumineszenz und/ oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, wobei die Emissionsstrahlung mit einem dispersiven Element spektral aufgespalten wird, orts aufgelöst detektiert und elektronisch mindestens ein Summensignal der Emissionsstrahlung und/oder der absorbierten Strahlung bestimmt wird.

50.

Anordnung nach Anspruch 49, wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgespaltenen Emissionsstrahlung zur:

Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder

zur Vermessung von Emissionsratifarbstoffen zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt .

51.

Anordnung nach Anspruch 49 oder 50, wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgeweiteten reflektierten oder transmittierten Anregungsstrahlung von Fluorochromen zur:

Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder

zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Absorptionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

zur Vermessung der Absorptionsratio²⁵ zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt.

52.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens variiert werden kann (Multitracking).

53.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens variiert werden kann (ROI-Tracking).

54.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Aufspaltung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt

55.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Absorptionsmessung die von der Probe reflektierte oder transmittierte Strahlung mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

56.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen werden und die Summation digital in einem Rechner erfolgt.

57.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summation mit analoger Datenverarbeitung mittels eines Demultiplexers in Kombination mit einem Summationsverstärkers erfolgt

58.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektorkanäle durch eine nichtlineare Verzerrung der Eingangssignale beeinflußt werden

59.

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

26

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei eine Beeinflussung der Integrationsparameter erfolgt
60.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei eine Beeinflussung der Kennlinie eines Verstärkers erfolgt
61.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei die Summensignale zur Generierung eines Bildes verwendet wird.
62.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird
63.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt
64.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei die Summensignale mit einer lookup Tabelle kombiniert werden
65.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei mittels der lookup-Tabelle eine Darstellung verschiedener Farbstoffe
und / oder der Spreizung des generierten Bildes erfolgt
66.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des
gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer
Unterschreitung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine
Veränderung der Betriebsweise des Detektionskanals erfolgt
67.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen
Detektionskanals erfolgt.
68.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

27
wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs erfolgt

69.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer Integratorschaltung generiert werden

70.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonenzählung und anschließender Digital/ Analogwandlung generiert werden

71.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Photonenzählung zeitkorreliert erfolgt

72.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Erfassung von Ein- und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/ oder durch entangled photon angeregter Fluoreszenz

73.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im Wirkstoffscreening, wobei die Probe vorzugsweise eine Mikrotiterplatte ist

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, in einem Mikroskop

74.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

75.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in einem Fluoreszenzkorrelierten Spektroskop.

76.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mittels konfokaler Detektion

77.

WO 02/12863

28

PCT/EP01/09048

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einer scannenden Anordnung

78.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung

79.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem X/Y Scantisch

80.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mittels nichtkonfokaler Detektion

81.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einer scannenden Anordnung

82.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit descannter Detektion

83.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit Hellfeldabbildung

84.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit Punktabbildung

85.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit nicht descannter Detektion

86.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit Hellfeldabbildung

87.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt-
oder Hellfeldabbildung

WO 02/12863

29

PCT/EP01/09048

88.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem X/Y Scantisch

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

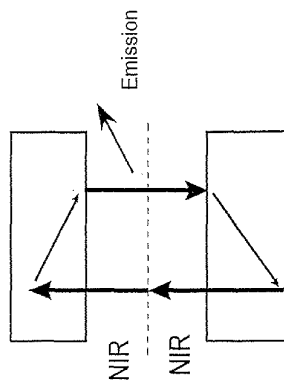


Fig.1b

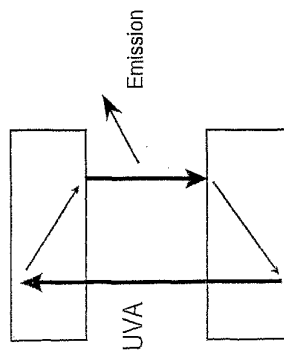


Fig.1a

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

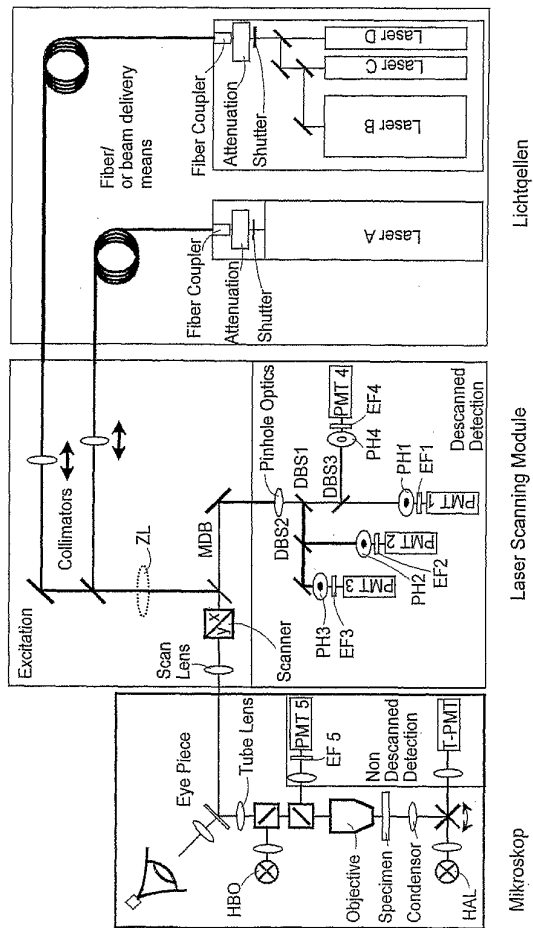


Fig. 2

2/12

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

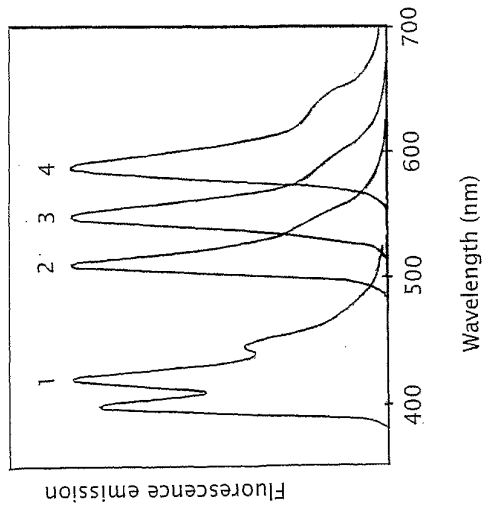


Fig.3a

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

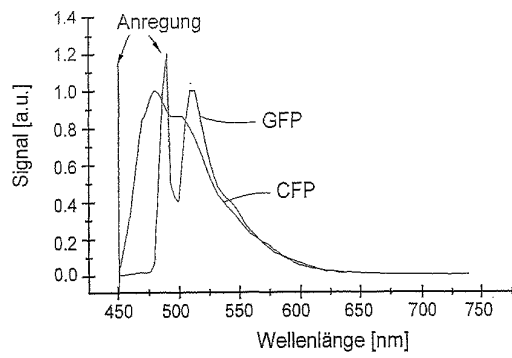


Fig.3b

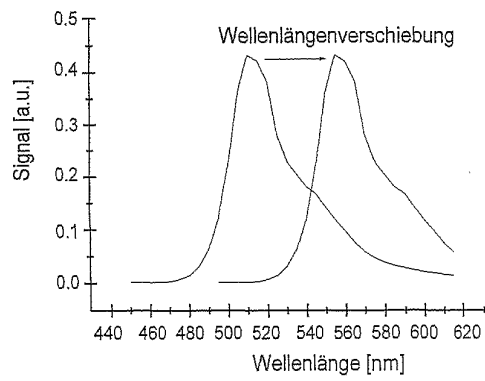


Fig.3c

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

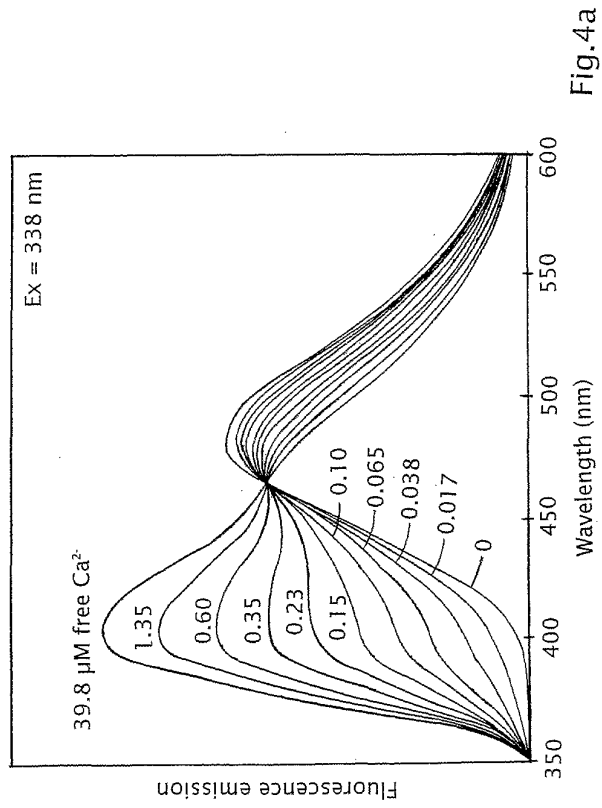


Fig.4a

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

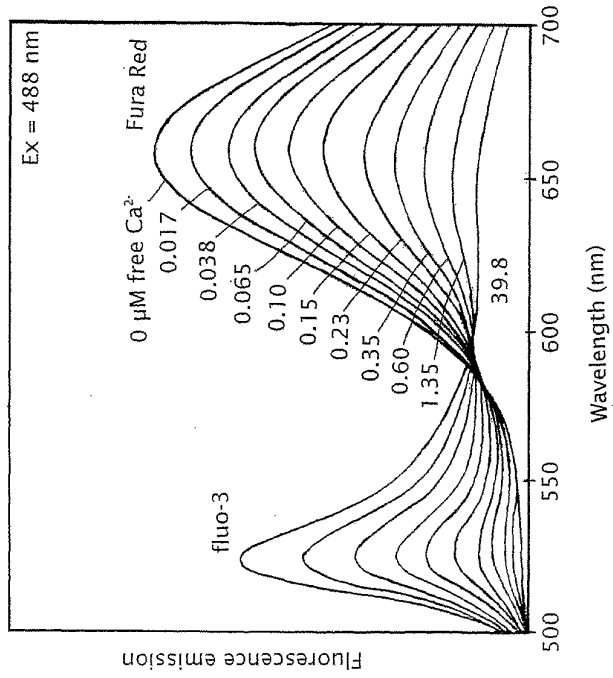


Fig.4b

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

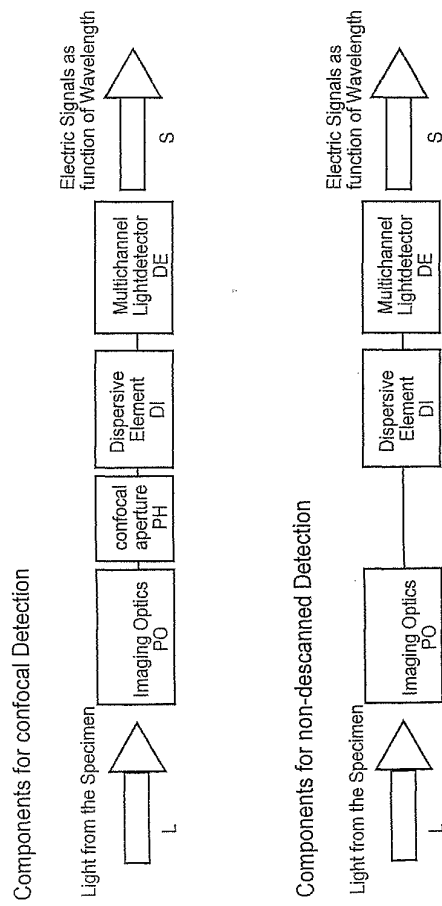


Fig.5

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

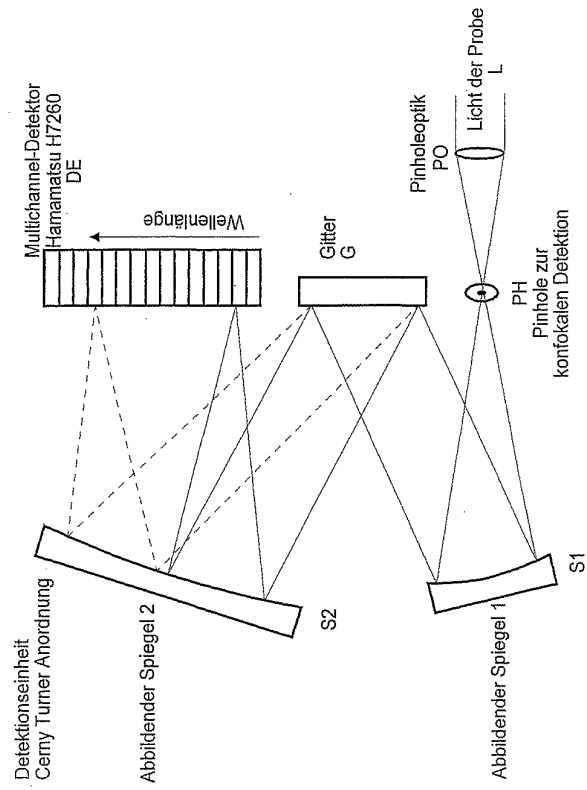


Fig. 6

8/12

ERSATZBLATT (REGEL 26)

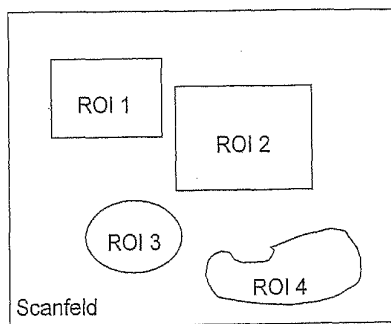


Fig.7a

WO 02/12863

PCT/EP01/09048

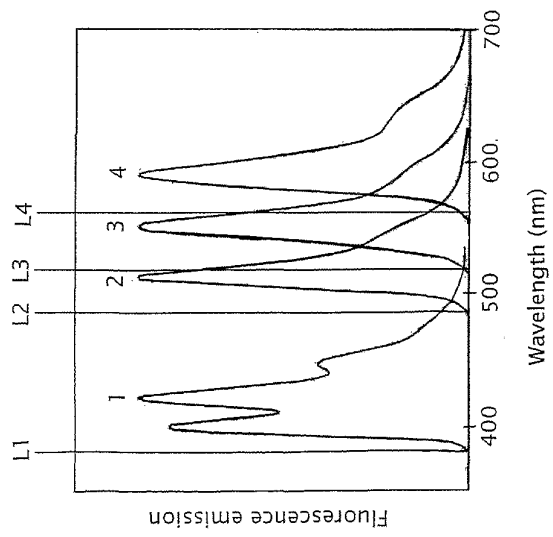
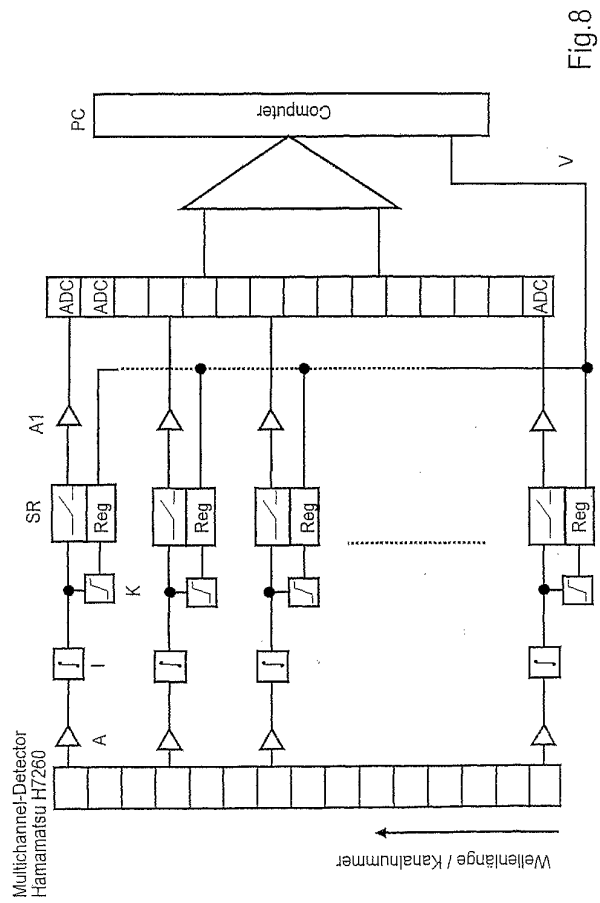


Fig.7b





【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/EP 01/09048
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N21/64 G02B21/00 G01J3/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N G02B G01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 198 01 139 A (UHL RAINER DR) 15 July 1999 (1999-07-15)	49
Y	column 3, line 13 -column 4, line 5	1
A	column 9, line 5 - line 41; figure 5	2-9, 14-16, 32, 36-39, 41,44, 45,47, 48,54, 55,72, 76-79, 81,88
Y	EP 0 647 838 A (UNICAM LTD) 12 April 1995 (1995-04-12)	1
A	column 1, line 1 -column 5, line 42	2-6, 49-51
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 January 2002		Date of mailing of the international search report 16/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stuebner, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor Application No. PCT/EP 01/09048
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 669 880 A (NELSON MICHAEL R ET AL) 2 June 1987 (1987-06-02)	1
A	column 3, line 47 -column 6, line 68; figures 1-3	2-6, 49-51
A	DE 198 29 944 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 5 January 2000 (2000-01-05)	1,49
	column 1, line 3 -column 3, line 49; figure 6	
A	US 5 192 980 A (DIXON ARTHUR E ET AL) 9 March 1993 (1993-03-09)	1,49
	cited in the application column 6, line 63 -column 7, line 49; figure 6	

Form PCT/ISA/2210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/EP 01/09048

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19801139	A	15-07-1999	DE 19801139 A1 US 6088097 A	15-07-1999 11-07-2000
EP 0647838	A	12-04-1995	AU 673287 B2 AU 7427894 A DE 69406888 D1 DE 69406888 T2 EP 0647838 A1 US 5473427 A	31-10-1996 13-04-1995 02-01-1998 12-03-1998 12-04-1995 05-12-1995
US 4669880	A	02-06-1987	NONE	
DE 19829944	A	05-01-2000	DE 19829944 A1 JP 2000039563 A US 6300639 B1	05-01-2000 08-02-2000 09-10-2001
US 5192980	A	09-03-1993	NONE	

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Int. Aktenzeichen PCT/EP 01/09048
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 4 669 880 A (NELSON MICHAEL R ET AL) 2. Juni 1987 (1987-06-02)	1
A	Spalte 3, Zeile 47 -Spalte 6, Zeile 68; Abbildungen 1-3	2-6, 49-51
A	DE 198 29 944 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 5. Januar 2000 (2000-01-05)	1,49
	Spalte 1, Zeile 3 -Spalte 3, Zeile 49; Abbildung 6	
A	US 5 192 980 A (DIXON ARTHUR E ET AL) 9. März 1993 (1993-03-09)	1,49
	in der Anmeldung erwähnt Spalte 6, Zeile 63 -Spalte 7, Zeile 49; Abbildung 6	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Info s. Aktenzeichen PCT/EP 01/09048	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19801139	A	15-07-1999	DE 19801139 A1		15-07-1999
			US 6088097 A		11-07-2000
EP 0647838	A	12-04-1995	AU 673287 B2		31-10-1996
			AU 7427894 A		13-04-1995
			DE 69406888 D1		02-01-1998
			DE 69406888 T2		12-03-1998
			EP 0647838 A1		12-04-1995
			US 5473427 A		05-12-1995
US 4669880	A	02-06-1987	KEINE		
DE 19829944	A	05-01-2000	DE 19829944 A1		05-01-2000
			JP 2000039563 A		08-02-2000
			US 6300639 B1		09-10-2001
US 5192980	A	09-03-1993	KEINE		

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 EA01 EA02 FA01 FA02 FA06 GA01
GB01 HA01 HA02 HA05 HA09 HA11 JA03 JA04 JA05 KA02
KA05 KA09 LA02