



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **280 606 A1**

4(51) G 01 N 21/00

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 326 466 7 (22) 10.03.89 (44) 11.07.90

(71) Friedrich-Schiller-Universität Jena, August-Bebel-Straße 4, Jena, 6900, DD
(72) Wabnitz, Heidrun, Dr., DD

(54) **Verfahren zur rastermikroskopischen Registrierung der Fluoreszenzabklingzeit**

(55) Fluoreszenzabklingzeit; Registrierung; Laserstrahlung zur Anregung; Amplitude des Gleichanteils aus dem Fluoreszenzsignal; modulierter Anteil; Quotientenbildung

(57) Verfahren zur rastermikroskopischen Registrierung der Fluoreszenzabklingzeit. Das Abklingverhalten der Fluoreszenz kann mit einer Anordnung zur zeitaufgelösten Laserrastermikroskopie schnell untersucht werden. Die Erfindung besteht darin, daß das Objekt mittels einer mit mindestens einer Frequenz hochfrequent modulierten kontinuierlichen Laserstrahlung angeregt wird, daß aus dem Fluoreszenzsignal die Amplituden des Gleichanteils und mindestens eines modulierten Anteils ermittelt werden und daß diese Amplituden jeweils getrennt oder nach Quotientenbildung und ggf. Ausführung weiterer mathematischer Operationen digitalisiert in einem Bildspeicher abgelegt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur rastermikroskopischen Registrierung der Fluoreszenzabklingzeit eines fluoreszierenden Objektes, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Objekt mittels einer mit mindestens einer Frequenz hochfrequent modulierten kontinuierlichen Laserstrahlung angeregt wird, daß aus dem Fluoreszenzsignal die Amplituden des Gleichanteils und mindestens eines modulierten Anteils ermittelt werden und daß diese Amplituden jeweils getrennt oder nach Quotientenbildung und ggf. Ausführung weiterer mathematischer Operationen digitalisiert in einem Bildspeicher abgelegt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zusätzlich zur Auswertung des Fluoreszenzsignals für das gesamte Bildfeld oder Teile davon der Modulationsgrad des Anregungslichtes bestimmt und in die Auswertung zur Gewinnung von Absolutwerten der Abklingzeit einbezogen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Modulation der Laserstrahlung durch aktive oder passive Modensynchronisation bewirkt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die schmalbandige Erfassung der Modulationsamplituden mit einstellbarer Bandbreite erfolgt, so daß die Integrationszeitkonstante und damit Genauigkeit und Meßzeit pro Bildpunkt wählbar sind.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die schnelle Gewinnung eines Bildes der Fluoreszenzabklingzeit in mikroskopischen Objekten. Sie kann vorteilhaft bei allen Untersuchungen eingesetzt werden, wo mikroskopische Objekte zur Fluoreszenzstrahlung angeregt werden und aus dem Abklingverhalten der Fluoreszenz Rückschlüsse auf Eigenschaften von Bestandteilen der Objekte möglich sind. Das ist von Interesse auf biologisch-medizinischem Gebiet bei der Untersuchung der Eigenfluoreszenz oder der ggf. umgebungssensitiven Fluoreszenz von Markerfarbstoffen in Zellen und Geweben, aber auch in der Festkörperphysik und Halbleiterelektronik.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Laserrastermikroskopie (T. Wilson, C. Sheppard: Theory and practice of scanning optical microscopy, London 1984) beruht darauf, daß ein Objekt mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert und ein Bild punktweise aus dem für jede einzelne Strahlposition registrierten Meßsignal zusammengesetzt wird. Ein wesentlicher Vorteil dieser Mikroskopiemethode besteht darin, daß nicht nur Lichtintensitäten, sondern auch andere Meßgrößen von Prozessen, die durch die punktweise Lasereinstrahlung ausgelöst oder beeinflusst werden, zur Bilddarstellung herangezogen werden können. Auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie wird es damit möglich, außer der Fluoreszenzintensität auch Parameter des Fluoreszenzabklingprozesses, insbesondere die Abklingzeit τ (typisch im Bereich weniger Nanosekunden und darunter), zum Bildaufbau zu nutzen (DD 254988; Exp. Techn. Phys. 36 [1988], 443–451). Daraus können z. B. Informationen über die Ortsabhängigkeit (im sub- μm -Bereich) der Mikroumgebung von Fluorophormolekülen (z. B. Viskosität, pH-Wert, Wasserstoffbrückenbindungen) bzw. deren Konformation, Aggregation u. ä. gewonnen werden, die bei alleiniger Registrierung der Fluoreszenzintensität nicht verfügbar sind.

Es sind verschiedene Anordnungen bekannt, bei denen das Fluoreszenzabklingverhalten in strukturierten Objekten an einzelnen Positionen mittels impulsfluorometrischer Methoden untersucht wird (J. Micr. 134 [1984] Pt. 2, 151–160; Opt. Engin. 24 [1985], 1042–1044; Photochem. Photobiol. 42 [1985], 613–616; J. Luminescence 35 [1986], 247–253), wobei die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung wegen ihrer hohen Empfindlichkeit bevorzugt eingesetzt wird. Gegenüber der Untersuchung an einzelnen Objektpunkten ist jedoch die systematische Abrasterung eines größeren Objektfeldes vorteilhaft, da sich die Relaxationsparameter z. B. in biologischen Objekten durchaus in räumlichen Bereichen von Bruchteilen von Mikrometern sprunghaft ändern können. Damit ist die Forderung einer möglichst kurzen Meßzeit pro Bildpunkt (um Größenordnungen unter 1 s) verbunden. Impulsfluorometrische Verfahren belasten entweder das Untersuchungsobjekt durch hohe erforderliche Lichtintensitäten zu stark und sind apparativ sehr aufwendig (Streakkamera; GB 2197499 A) bzw. arbeiten zu langsam (Samplingverfahren der zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung).

Bekannt sind weiterhin Verfahren zur Ermittlung der Fluoreszenzabklingzeit aus den Charakteristika der Fluoreszenz einer Probe bei periodisch modulierter Anregung (Phasen- bzw. Modulationsgradfluorometrie).

Die Phasenfluorometrie erfordert die Phasenmessung bei Frequenzen im 100-MHz-Bereich. Die Verwendung eines Vektorvoltmeters ist aufwendig; Phasenmessung mit Hilfe verstellbarer optischer Verzögerungsstrecken (DD 136302; DD 242485) ist nach den bekannten Verfahren nicht in den angestrebten kurzen Meßzeiten realisierbar.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, eine Anordnung zur zeitaufgelösten Fluoreszenz-Laserrastermikroskopie anzugeben, mit der in einer kurzen Registrierzeit und mit geringem apparativem Aufwand ein Bild des Abklingverhaltens der Fluoreszenz in einem mikroskopischen Objekt gewonnen werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem mikroskopische Bilder des Abklingverhaltens der Fluoreszenz, speziell der Fluoreszenzabklingzeit τ , gewonnen werden können, die eine schnelle Orientierung über die in einem Objekt zu erwartende räumliche Variation der Größe τ erlauben. Daran kann sich ggf. eine detailliertere Untersuchung in einzelnen Objektpunkten mittels anderer Methoden anschließen.

Die Lösung dieser Aufgabe gelingt mit einem Verfahren zur rastermikroskopischen Registrierung der Fluoreszenzabklingzeit eines fluoreszierenden Objektes erfindungsgemäß dadurch, daß das Objekt mittels einer mit mindestens einer Frequenz hochfrequent modulierten kontinuierlichen Laserstrahlung angeregt wird, daß aus dem Fluoreszenzsignal die Amplituden des Gleichanteils und mindestens eines modulierten Anteils ermittelt werden und daß diese Amplituden jeweils getrennt oder nach Quotientenbildung und ggf. Ausführung weiterer mathematischer Operationen digitalisiert in einem Bildspeicher abgelegt werden.

Vorteilhafterweise wird zusätzlich zur Auswertung des Fluoreszenzsignals für das gesamte Bildfeld oder Teile davon der Modulationsgrad des Anregungslichtes bestimmt und in die Auswertung zur Gewinnung von Absolutwerten der Abklingzeit einbezogen.

Die Modulation der Laserstrahlung kann durch aktive oder passive Modensynchronisation bewirkt werden. Weiterhin ist es von Vorteil, daß die schmalbandige Erfassung der Modulationsamplituden mit einstellbarer Bandbreite erfolgt, so daß die Integrationszeitkonstante und damit Genauigkeit und Meßzeit pro Bildpunkt wählbar sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren geht von dem bekannten Verfahren der Modulationsgradfluorometrie aus, bei dem der Rückgang des Modulationsgrades des Fluoreszenzlichtes gegenüber dem des Anregungslichtes auf Grund der endlichen Abklingzeit τ (vereinfachend wird hier der Fall eines einfachexponentiellen Abklinggesetzes angenommen) gemessen und daraus nach der folgenden Beziehung τ ermittelt wird:

$$m_F/m_A = (1 + \omega^2 \tau^2)^{-1/2} \quad (1)$$

$$\tau = \frac{1}{\omega} \sqrt{(m_A/m_F)^2 - 1} \quad (2)$$

$\omega = 2\pi f$, f – Modulationsfrequenz;

$m_{A,F}$ – Modulationsgrad der Anregungs- bzw. Fluoreszenzstrahlung.

Der Modulationsgrad wird durch Zerlegung des Ausgangssignals des verwendeten Photodetektors in einen Gleichanteil und einen Wechselanteil und entsprechende frequenzselektive Registrierung der jeweiligen Amplituden $a(0)$ und $a(\omega)$ nach

$$m = a(\omega)/a(0)$$

gebildet, so daß zur Auswertung von (1) die Ermittlung der vier Meßwerte $a_A(\omega)$, $a_A(0)$, $a_F(\omega)$, $a_F(0)$ erforderlich ist. Die Untersuchung der Fluoreszenzstrahlung wird deshalb üblicherweise durch Referenzmessungen (insbesondere an gestreutem Anregungslicht) ergänzt. Diese müssen mit demselben Photodetektor erfolgen, um dem Einfluß unterschiedlicher Frequenzcharakteristik verschiedener Detektoren zu entgehen.

Die Aufgabe der Erfindung wird also dadurch gelöst, daß für die schnell aufeinanderfolgende Messung an vielen Bildpunkten entweder

- a) auf die Ermittlung von m_A und damit auf die Umschaltung zwischen verschiedenen Strahlengängen gänzlich verzichtet wird oder
- b) diese nicht für jeden Bildpunkt, sondern nur gelegentlich (z. B. am Anfang/Ende der Erfassung einer ganzen Bildzeile oder eines vollständigen Rasterbildes) ausgeführt wird, wobei zugrunde gelegt wird, daß der Modulationsgrad der Anregungslichtquelle in den dazwischenliegenden Zeitabschnitten hinreichend konstant ist.

Im Fall a) wird auf die Absolutangabe der Abklingzeit τ verzichtet zugunsten einer einfacheren, schnelleren und genaueren Gewinnung von Relativaussagen über das Verhalten von τ beim Vergleich verschiedener Objektpunkte. Es ist dann von der gegenüber (1) modifizierten Beziehung

$$1/m_F^2(x, y) \sim [1 + \omega^2 \tau^2(x, y)] \quad (3)$$

auszugehen, wobei der mit m_A zusammenhängende Proportionalitätsfaktor als über das ganze Bild konstant anzusehen ist. Damit ist in kurzer Zeit aus

$$1/m_F^2 = [a_F(0; x, y)/a_F(\omega; x, y)]^2$$

(x, y – Koordinaten der Position des Laserflecks auf dem Objekt) ein Übersichtsbild zu gewinnen, das für je zwei beliebige Objektpunkte (x_1, y_1) und (x_2, y_2) zu entscheiden gestattet, welcher der beiden Werte $\tau(x_1, y_1)$ und $\tau(x_2, y_2)$ der größere ist, so daß insbesondere lokale und globale Extrema aufgefunden werden können.

Der Fall b) führt auf die für die Modulationsgradfluorometrie übliche Absolutangabe von r gemäß (2) zurück, wobei die schnelle Aufeinanderfolge von Messungen in Zusammenhang mit hinreichend stabiler Modulation den Verzicht auf die Ermittlung von m_A für die größte Zahl von Bildpunkten ermöglicht.

m_A kann an einer oder weniger Stellen des Bildes nach Umschaltung des Strahlenganges von Fluoreszenz- auf Anregungslicht ermittelt und zu einem für das ganze Bild gültigen Wert zusammengefaßt werden, so daß aus einem „ $1/m_F$ -Bild“ ein „ r -Bild“ gemäß

$$r(x, y) = \frac{1}{\omega} \sqrt{[m_A/m_F(x, y)]^2 - 1}$$

errechnet werden kann.

Die Messung erlangt maximale Genauigkeit, wenn $\omega r \approx 1$. Deshalb ist es zweckmäßig, mehrere Modulationsfrequenzen zur Verfügung zu haben und jene auszuwählen, die dieser Bedingung für die im Objekt vorkommenden r -Werte möglichst nahekommen.

Ausführungsbeispiel

Das Wesen der Erfindung soll an einem Ausführungsbeispiel erläutert werden, das in Fig. 1 schematisch dargestellt ist. Die Anregung der Fluoreszenz eines mikroskopischen Objekts 1 erfolgt durch einen mittels des Mikroskopobjektivs 2 fokussierten Laserstrahl 3, der in einem modensynchronisierten kontinuierlichen Laser 4 erzeugt wird und demzufolge aus einem Zug von Picosekundenimpulsen besteht, die untereinander einen konstanten Abstand in der Größenordnung von $T = 10\text{ ns}$ haben, so daß die Strahlung mit den Vielfachen der Frequenz $\omega_0 = 2\pi/T$ moduliert ist. Die Positionierung des Laserfokus auf dem Objekt 1 erfolgt mittels eines Strahlablesystems 5. Der dichroitische Teilerspiegel 6 läßt die Laserstrahlung nahezu vollständig durch und besitzt für die Fluoreszenzstrahlung einen hohen Reflexionsgrad. Die vom Objekt ausgehende Fluoreszenzstrahlung wird in Rückwärtsrichtung vom Mikroskopobjektiv 2 erfaßt, am Teilerspiegel 6 reflektiert und gelangt auf den SEV 7. Dessen Ausgangsstrom wird sowohl einem Gleichstrommeßgerät 8 als auch einem Wechselstrommeßgerät 9, das auf ω_0 oder eine andere im Anregungslicht enthaltene Modulationsfrequenz selektiv abgestimmt werden kann, zugeführt. Die gemessenen Amplituden gelangen nach A/D-Wandlung mittels 10 bzw. 11 in den Computer 12, wo der Wert $1/m_F$ gebildet und für jeden Bildpunkt im Bildspeicher 13 abgelegt wird. Der Computer 12 steuert die Bewegung des Strahlablesystems 5 zum nächsten Punkt. Das Strahlablesystem 5 ist mit einer Einrichtung 4 zur Kontrolle der Position des Strahls gekoppelt, von der aus dem Computer 12 die aktuelle Position des Strahls 3 auf dem Objekt 1 übermittelt wird. Dies dient der Zuordnung der Speicherzellen des Bildspeichers 13 zu den Objektpunkten.

Fig. 2 zeigt schematisch ein auf diese Weise gewonnenes Bild, wobei A und B die Positionen bedeuten, bei denen im betrachteten Gebiet der maximale bzw. minimale Wert der Abklingzeit r vorliegt.

Wird die Absolutangabe der Abklingzeit r (gemäß Variante b) angestrebt, ist die Ermittlung des Modulationsgrades des Anregungslichtes m_A durch folgende Maßnahme möglich: Anstelle des Teilerspiegels 6 wird eine Einheit 15 verwendet, bei deren vom Computer 12 steuerbaren Bewegung (senkrecht zur Zeichenebene) alternativ zum Teilerspiegel 6 ein Spiegel 16 und ein Abschwächungsfilter 17 in den Strahlengang gebracht wird, so daß der Laserstrahl stark abgeschwächt unmittelbar auf den SEV 7 trifft.

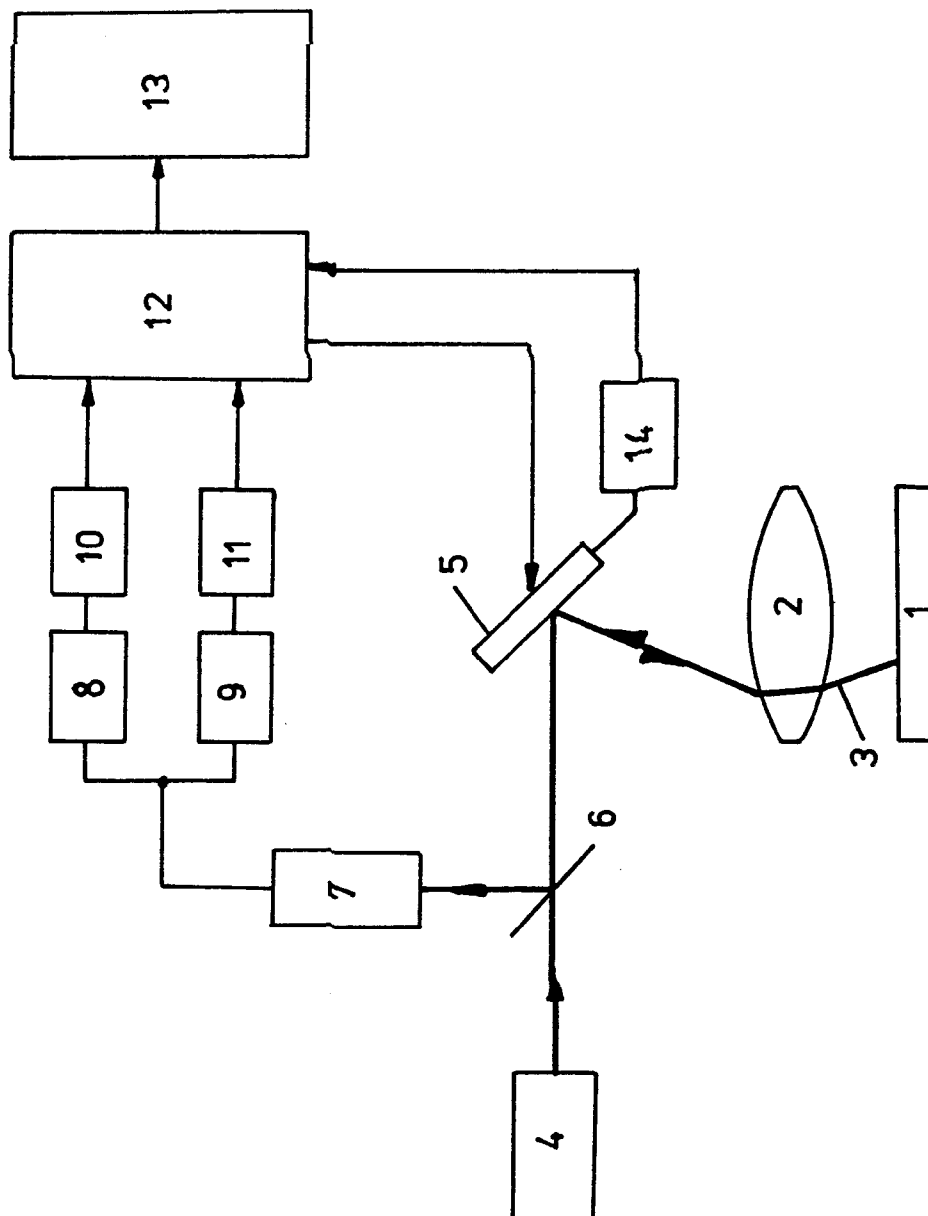


Fig.1

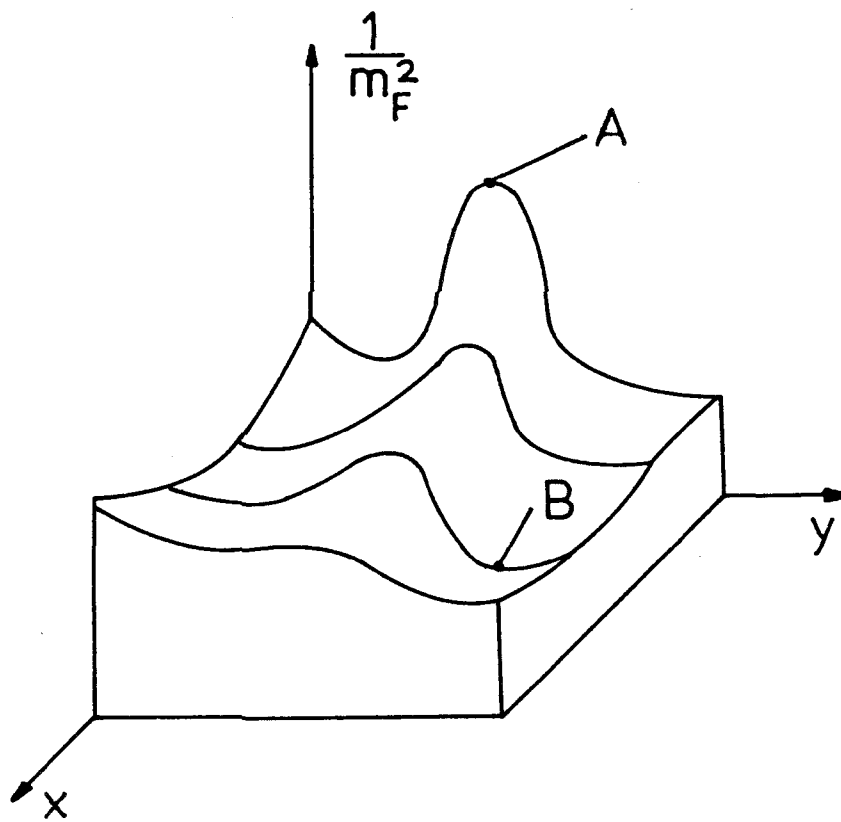


Fig. 2

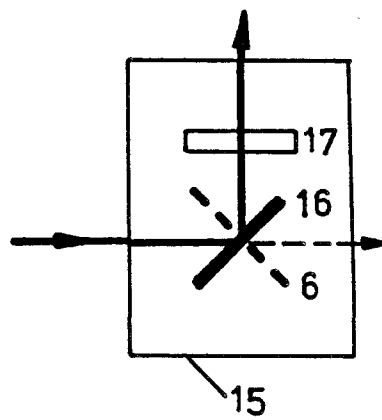


Fig. 3