



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHEIN

(19) DD (11) 222 123 A1

4(51) G 01 N 21/64
G 01 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 260 742 4

(22) 09.03.84

(44) 08.05.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Braun, Günter, Dr. rer. nat.; Bley, Thomas, Dr. rer. nat.; Schmidt, Achim, Dr. rer. nat.; Kuchenbecker, Doris, Dr. rer. nat.; Stoll, Peter, Dr., DD

(54) Verfahren und Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs

(57) Verfahren und Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs auf der Grundlage der hydrodynamischen Partikelzuführung in ein von einem Laserstrahl beleuchtetes Volumen, anwendbar in der Medizin und der technischen Mikrobiologie, mit dem Ziel der Erhöhung des Auflösungsvermögens der Messung. Mit der Erfindung wird die Aufgabe gelöst, den Einfluß der Partikelgrenzfläche auf die fluorometrische Messung zu unterdrücken. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur streulichtgestützten Brechzahlanpassung der Suspensionsflüssigkeit sowie eine geeignete geometrische Anordnung der erfindungsgemäßen Vorrichtung gelöst.

ISSN 0433-6461

8 Seiten

Titel der Erfindung

Verfahren und Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs

Anwendungsgebiet der Erfindung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs. Dabei kann es sich um markierte Zellinhaltsstoffe von Gewebezellen aber auch von ein-
- 10 zelligen Mikroorganismen handeln. Als Anwendungsgebiete sind Histochemie und Zytochemie von Zellen aus der Medizin und der technischen Mikrobiologie zu nennen. Sie ist in die IPK G 01 N einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 15 Die bekannten technischen Lösungen zur fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs auf der Basis von schnellen Einzelpartikelmessungen sind dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel in nicht angepaßter Flüssigkeit suspendiert und in dieser Suspension vereinzelt, geführt und positioniert werden. Mit Hilfe
- 20 der Hüllstromtechnik nach CROSLAND-TAYLOR (A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid Through a Tube, Nature 171 (1953), 37) können einige Tausend Partikel pro Sekunde einzeln vermessen werden (HORAN, WHEELLESS, Science 198 (1977), 149). Der fluorometrischen

Bestimmung der Menge eines bestimmten Stoffes liegt die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes zugrunde. Wie KERKER, M. und Mitarbeiter gezeigt haben (siehe z. B. Topics in Current Physics Bd. 16, Aerosol Microphysics I, Ed. Marlow, Springer Verlag 1980), kann für kleine Partikel in nicht angepaßter Flüssigkeit die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes nicht mehr vorausgesetzt werden, da die Grenzbedingungen, die das elektrische Feld an der Partikeloberfläche erfüllen muß, den Zusammenhang zwischen der Menge des fluoreszierenden Stoffs und der emittierten Intensität modifizieren. Dieser Einfluß kann minimiert werden, wenn die Polarisationssebene des anregenden Lichts senkrecht zur Ebene der Fluoreszenzdetektion gewählt wird. Auf dieser Basis arbeiten kommerziell verfügbare Vorrichtungen zur Partikelanalyse (Druckschrift Becton-Dickinson FACS Systems, 1979; Druckschrift Ortho-Diagnostic Systems, Cytofluorograf Systems 30/50; Coulter, EPICS IV). Grundsätzlich wird jedoch dabei der Nachteil der Verfälschung der Fluoreszenzintensität durch die Grenzfläche des Partikels, durch Form und Struktur nicht ausgeschlossen, wie auch sorgfältige Messungen beweisen (KERKER, M. et. al., Cytometry 3 (1982), 71).

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, das Auflösungsvermögen bei der fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs zu verbessern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung anzugeben zur fluorometrischen Bestimmung der Menge in Partikeln eingebetteten Stoffs derart, daß der störende Einfluß der Partikelgrenzfläche

ausgeschlossen wird. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß in einem ersten Verfahrensschritt der mittlere Brechungsindex der Partikel bestimmt und in einem zweiten Verfahrensschritt in brechzahlangepaßter Suspensionsflüssigkeit die fluorometrische Bestimmung durchgeführt wird. Basierend auf der hydrodynamischen Partikelzuführung in ein von einem Laserstrahl beleuchtetes Volumen ist die erfindungsgemäße Vorrichtung, bestehend aus einem Laser, einer Fokussierungsoptik, einer Hüllstromkammer sowie einer Fluoreszenz- und einer Streulichtsammleinrichtung, gekennzeichnet durch eine Anordnung der Streulichtsammleinrichtung S unter einem Winkel zur Ausbreitungsrichtung z des Laserstrahls, bei dem das Verhältnis des Anteils der Lichtbrechung an der Lichtstreuung zu dem Anteil der Beugung wesentlich erhöht ist gegenüber der Vorwärtsstreuung sowie einen nachgeschalteten Streulichtdetektor SD. Ferner gekennzeichnet durch die Anordnung einer Fluoreszenzsammleinrichtung F derart, daß die durch die Reflektion an der zylinderförmigen Grenzfläche des Probenstroms P entstehende störende Lichtstreuung nicht zum Fluoreszenzdetektor FD gelangt. Dies wird erreicht, indem der Strahl des Probenstroms P in der Ebene y-z um einen Winkel i gegen die Senkrechte zum Laserstrahl geneigt wird, der größer ist als der Öffnungswinkel α der Fluoreszenzsammleinrichtung F.

Der erste Verfahrensschritt wird durchgeführt, indem die zu messenden Partikel in Flüssigkeiten suspendierten Partikel wird mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung gemessen und die Suspensionsflüssigkeit mit der geringsten Streulichtintensität der Partikel bestimmt (Brechzahlanpassung).

Der zweite Verfahrensschritt wird durchgeführt, indem die Fluoreszenz der Partikel mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung in der Suspensionsflüssigkeit gemessen wird, in der die niedrigste Streulichtintensität erhalten wurde.

- 5 In den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert.

Beispiel 1

- Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine Bestimmung des DNA-
- 10 Gehaltes von Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* nach Fluorochromierung der Zellen mit Olivomycin durchgeführt. Im ersten Verfahrensschritt wurde mit der Streulicht-
- 15 sammeleinrichtung S, bestehend aus einem Mikroskopobjektiv der numerischen Apertur 0,20 und dem Streulichtdetektor SD, bestehend aus einem Sekundärelektronenvervielfacher durch Messung der Streulichtintensität unter 25
- Grad zur Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls ein mittlerer Brechungsindex der Hefezellen von $n = 1,38$ be-
- 20 stimmt. Im zweiten Verfahrensschritt wurde die Fluoreszenzintensität der Hefezellen, suspendiert in einer 20 %-igen CaCl_2 -Lösung mit $n = 1,38$, mit der Fluoreszenz-
- sammeleinrichtung F, bestehend aus einem Mikroskopobjektiv der numerischen Apertur 0,25 und dem Fluoreszenz-
- 25 detektor FD, bestehend aus einem Sekundärelektronenvervielfacher, in einem um 30 Grad geneigten Probenstrom P gemessen. Das Histogramm der Fluoreszenzintensität der Hefezellen zeigt eine Verbesserung des Auflösungsvermögens, z. B. gemessen durch den Variationskoeffizienten um den Faktor 2.

Beispiel 2

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde mittels der beschriebenen erfindungsgemäßen Vorrichtung eine Bestimmung des DNA-Gehaltes an menschlichem Sperma durchgeführt.

5. Die Fluorochromierung erfolgte mit Ethidiumbromid, die Zellen wurden in einer Flüssigkeit mit dem Brechungsindex $n = 1,52$ suspendiert. Die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten zeigen eine Reduzierung des Formfaktors der Spermien gegenüber den in Wasser suspendierten.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur fluorometrischen Bestimmung der Menge
in Partikeln eingebetteten Stoffs auf der Grundlage
der hydrodynamischen Partikelzuführung in ein von
5 einem Laserstrahl beleuchtetes Volumen (V), dadurch
gekennzeichnet, daß in einem ersten Verfahrensschritt
der Brechungsindex der Partikel mittels Streulicht-
messungen bestimmt und in einem zweiten Verfahrensschritt die fluorometrische Messung in brechzahl-
10 gepaßter Suspensionsflüssigkeit des Probenstroms (P)
durchgeführt wird.
2. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach
Punkt 1, bestehend aus einem Laser, einer Fokussier-
ungsoptik, einer Hüllstromkammer sowie einer Fluores-
15 zenz- und einer Streulichtsammeleinrichtung, gekenn-
zeichnet durch die Anordnung der Hüllstromkammer derart,
daß der Probenstrom (P) um einen Winkel (i), der größer
ist als der Öffnungswinkel () der Fluoreszenzsammel-
einrichtung (F), gegen die Senkrechte zur Ausbreitungsrichtung
20 (z) des Laserstrahls geneigt ist.
3. Vorrichtung nach Punkt 2, gekennzeichnet durch die
Anordnung der Streulichtsammeleinrichtung (S) derart,
daß unter einem Streuwinkel (), der den Lichtbrech-
ungsanteil am Streulicht begünstigt, die Streulicht-
25 intensitäten gemessen werden.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

