



(10) **DE 10 2012 100 098 B4** 2021.09.16

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2012 100 098.0**  
 (22) Anmeldetag: **06.01.2012**  
 (43) Offenlegungstag: **11.07.2013**  
 (45) Veröffentlichungstag  
 der Patenterteilung: **16.09.2021**

(51) Int Cl.: **G01N 21/64 (2006.01)**

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**Becker & Hickl GmbH, 12277 Berlin, DE**

(74) Vertreter:  
**Gulde & Partner Patent- und  
Rechtsanwaltskanzlei mbB, 10179 Berlin, DE**

(72) Erfinder:  
**Becker, Wolfgang, Dr., 15831 Mahlow, DE**

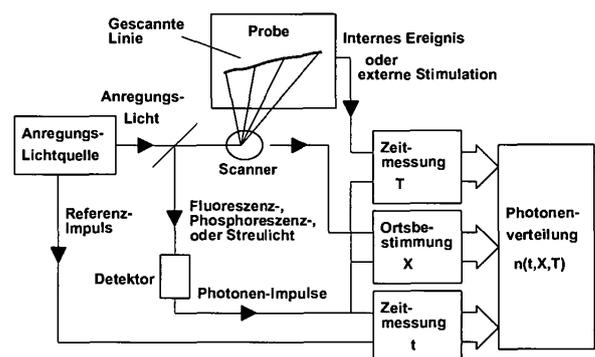
(56) Ermittelte Stand der Technik:

|    |                 |    |
|----|-----------------|----|
| DE | 44 45 214       | C2 |
| DE | 10 2006 029 809 | B3 |
| DE | 100 54 426      | A1 |
| DE | 103 39 312      | A1 |

|    |                 |    |
|----|-----------------|----|
| DE | 199 20 158      | A1 |
| DE | 10 2004 006 960 | A1 |
| DE | 10 2008 018 475 | A1 |
| DE | 10 2008 059 788 | A1 |
| DE | 10 2009 013 147 | A1 |
| DE | 10 2010 016 395 | A1 |
| DE | 600 01 731      | T2 |
| DE | 691 12 493      | T2 |
| DE | 698 24 174      | T2 |
| DE | 12 74 384       | A  |
| DD | 2 05 522        | A1 |
| EP | 0 418 588       | B1 |

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Aufzeichnung von zeitlichen Änderungen der Zeitfunktion eines optischen Signals mit räumlicher Auflösung entlang einer Linie im Raum**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Aufzeichnung von zeitlichen Änderungen der Fluoreszenzabklingfunktion entlang einer Linie innerhalb einer räumlich ausgedehnten Probe, gekennzeichnet dadurch, dass die Probe mit dem Strahl einer hochfrequent gepulsten Lichtquelle entlang besagter Linie repetierend gescannt wird, einzelne Photonen der durch die Lichtquelle angeregten Fluoreszenz-, Phosphoreszenz- oder diffusen Streusignale detektiert werden, für jedes Photon die Distanz entlang der Linie, die Zeit innerhalb der Laser-Pulsperiode und die Zeit nach einem beliebigen Ereignis innerhalb oder außerhalb der Probe bestimmt sowie die Verteilung der Photonenzahl über diesen Parametern aufgebaut wird.



**Beschreibung**

## Thema

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufzeichnung von zeitlichen Änderungen der Zeitfunktion von Fluoreszenz-, Phosphoreszenz- oder diffusen Streu-Signalen einer Probe mit räumlicher Auflösung entlang einer Linie im Raum. Das Verfahren ist insbesondere zur Anwendung in der Mikroskopie biologischer Objekte geeignet, kann aber ebenso an größeren lebenden Organismen eingesetzt werden.

## Stand der Technik

**[0002]** Fluoreszenztechniken haben breite Anwendungen in der biologischen Forschung, da sie direkte Information über biochemische Vorgänge auf der molekularen Skala liefern. Die Entwicklung von Fluoreszenz-Methoden hat besonders von der Einführung von multi-dimensionalen Mikroskopie-Techniken profitiert, die Fluoreszenzdaten über drei räumlichen Koordinaten, sowie der Anregungs- und Emissionswellenlänge, und der Polarisationsrichtung des Lichts liefern. Es ist weiterhin möglich, die Abklingfunktionen von Fluoreszenz-, Phosphoreszenz- oder Streusignalen innerhalb der Volumenelemente der Probe zu bestimmen. Dazu wird die Probe mit kurzen Laserimpulsen angeregt und die Zeitfunktion der Emission nach den Impulsen gemessen [1]. Unter allen erwähnten Parametern liefert diese Abklingfunktion den direktesten Einblick in die molekularen Wechselwirkungen der angeregten Moleküle mit ihrer biologischen Umgebung.

**[0003]** Zur räumlich aufgelösten Bestimmung, insbesondere von Fluoreszenz-Abklingfunktionen oder ihrer Parameter, sind eine Reihe verschiedener Verfahren bekannt. Die Verfahren können danach unterschieden werden, ob sie im Frequenzbereich [2, 4] oder im Zeitbereich [1, 6] arbeiten. Eine weitere Unterscheidung betrifft das optische Verfahren: Die Probe kann zur Anregung der Fluoreszenz mit einem Laserstrahl gescannt oder gleichzeitig in ihrer ganzen Fläche beleuchtet werden. Eine weitere Unterscheidung betrifft das Detektionsverfahren: Das Messsignal kann als Analogsignal [6] oder als Folge von einzeln detektierten Photonen betrachtet werden [1]. Die unterschiedlichen Verfahren und ihre Kombinationen unterscheiden sich im Wesentlichen in der Effizienz, d.h. der Anzahl von Photonen, die zur Erreichung einer bestimmten Genauigkeit der Fluoreszenzlebensdauer notwendig sind, und der Fähigkeit, die Probe räumlich dreidimensional aufzulösen. Beide Merkmale sind für die Untersuchung biologischer Objekte von essentieller Bedeutung. Das einzige bekannte Verfahren, das eine nahezu ideale Effizienz bei Auflösung in drei räumlichen Dimensionen und zusätzlich in der Wellenlänge ermöglicht, ist die Kombination von Scanning und zeitkorrelierter Photonenzählung

[1]. Eine solche Kombination wurde erstmals in [3] beschrieben. Dabei wurde die Probe mit einem fokussierten Laserstrahl gescannt und sequentiell an jedem Punkt eine Fluoreszenz-Abklingfunktion gemessen. Der Nachteil des beschriebenen Verfahrens besteht in der Notwendigkeit, an jedem Punkt eine volle Abklingfunktion zu messen, bevor der Scanner auf den nächsten Punkt übergehen kann. Dadurch können nur sehr langsame Scan-Geschwindigkeiten benutzt werden.

**[0004]** Ein moderneres Verfahren besteht darin, dass für jedes detektierte Photon die Zeit nach dem letzten Laserimpuls, die x-y-Position des Laser-Fokus in der Probe und (bei Bedarf) die Wellenlänge des Photons bestimmt werden. Über diesen Parametern wird eine mehrdimensionale Photonenverteilung aufgebaut. Die Scan-Geschwindigkeit ist dabei nur durch den Scanner begrenzt. Entsprechende Verfahren sind z. B. in [1] und [7] beschrieben. Nachfolgend sollen ausschließlich Verfahren betrachtet werden, die auf dem Aufbau mehrdimensionaler Photonenverteilungen beruhen.

**[0005]** Ein Problem entsteht, wenn die zu bestimmende Zeitfunktion selbst zeitlichen Änderungen unterworfen ist und diese Änderungen verfolgt werden sollen. Solche Änderungen können z.B. durch neuronale Aktivität, durch Stoffwechsel-Aktivität, oder durch den Herzschlag eines Versuchstieres oder Patienten entstehen. Die betreffenden Variationen können im Zeitbereich von Millisekunden bis zu mehreren Sekunden ablaufen. Will man die dadurch induzierten Änderungen in den Abklingfunktionen von Fluoreszenz-, Phosphoreszenz- oder Streusignalen räumlich aufgelöst aufzeichnen, benötigt man eine Messfolge, die wenigstens um eine Größenordnung schneller als diese Änderung ist. Bekannte, auf zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung und Raster-Scanning beruhende Verfahren und Anordnungen ermöglichen Messfolgen von einigen Sekunden bis herab zu einigen 100 ms pro Schritt [11].

**[0006]** Für schnellere Messfolgen entstehen zwei Probleme: Für jeden Schritt der Folge ist wenigstens ein kompletter x-y-Scan notwendig. Die bekannten Scanner benötigen dazu 100 ms bis etwa 1 s. Das begrenzt die Geschwindigkeit der Messfolge. Das zweite Problem besteht darin, dass der Photonenfluss von der Probe nicht beliebig erhöht werden kann, ohne diese zu zerstören. Es ist deshalb nicht möglich, in ausreichend kurzer Zeit alle Pixel des Scans mit einer zur Bestimmung der Abklingfunktion ausreichenden Anzahl von Photonen zu füllen.

**[0007]** Ein bekannter Weg zur Verringerung der Scan-Zeiten bei Erhaltung der dreidimensionalen räumlichen Auflösung ist das Scannen mit einem fokussierten Strahl entlang einer definierten Linie innerhalb einer x-y-Ebene oder innerhalb eines x-y-z-Rau-

mes [9]. Mit den bekannten Scanner-Prinzipien werden in diesem Falle Scan-Zeiten im Bereich von 1 ms und darunter erreicht. Das Problem der begrenzten Photonenzahl wird damit jedoch nicht gelöst, und Anwendungen in Verbindung mit Fluoreszenz-Lebensdauer-Detektion oder zeitkorrelierter Photonenzählung sind bisher nicht bekannt.

**[0008]** Ein weiterer bekannter Weg zu schnellen Aufzeichnung von Fluoreszenzbildern besteht darin, dass der Fokus des Anregungsstrahles mit optischen Mitteln zu einer Linie deformiert wird. Die Probe wird mit dieser Linie senkrecht zu deren Ausdehnung gescannt. Das von der Probe emittierte Licht wird auf einen Multi-Element-Detektor projiziert, dessen Elemente entlang der projizierten Linie angeordnet sind. Damit werden räumlich zweidimensionale Bilder mit einem eindimensionalen Scan aufgezeichnet [5, 8]. Der Nachteil besteht darin, dass die erzeugte Linie nicht beliebig geformt und im Raum angeordnet werden kann. Darüber hinaus ist ein Multi-Element-Detektor mit einer großen Anzahl von Elementen notwendig. Anwendungen des Verfahrens zur Detektion der Fluoreszenz-Lebensdauer oder deren zeitlicher Änderung sind nicht bekannt.

**[0009]** Ein Verfahren zum Aufbau von Photonverteilungen über räumlichen Koordinaten und zwei verschiedenen Zeitkoordinaten ist in [10] beschrieben. Hierbei werden den Photonen gleichzeitig die Zeit innerhalb einer hochfrequenten Pulsperiode der Anregungsstrahlung und die Zeit innerhalb der Periode einer zusätzlichen langsameren Modulation zugeordnet. Aus diesen Daten werden zwei unabhängige Photonverteilungen aufgebaut mit dem Ziel, gleichzeitig Lumineszenzabklingvorgänge auf verschiedenen Zeitskalen, z.B. Fluoreszenz und Phosphoreszenz, aufzuzeichnen. Dynamische Variationen der Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzlebensdauer werden damit nicht erfasst.

**[0010]** Die Offenlegungsschrift DE 199 20 158 A1 beschreibt ein Verfahren zur Aufzeichnung von Fluoreszenz-Lifetime-Bildern. Das Verfahren beruht auf einem Raster-Scan in Verbindung mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) und einem gepulsten Laser. Zeitliche Änderungen der Fluoreszenzabklingfunktionen sind bei diesem Verfahren nur durch wiederholte Messung und Vergleich der erhaltenen Daten zu ermitteln. Die schnellsten Änderungen, die man auf diese Weise verfolgen kann, liegen in der Größenordnung der Messzeit für einen einzelnen Datensatz. Diese ist bei dem angewendeten Verfahren im Bereich von Sekunden oder Minuten, mindestens jedoch so lang wie ein einzelner Frame des Raster-Scans. Ein Frame dauert mit der zur Zeit verfügbaren Scanner-Technik zwischen 100 ms und einigen Sekunden. Schnellere Änderungen werden nicht erfasst, weiterhin ergibt sich das Problem, dass in ei-

nem einzelnen Frame des Raster-Scans keine ausreichende Anzahl von Photonen aufgesammelt werden kann, um die Fluoreszenz-Lifetime in den einzelnen Pixeln zu ermitteln.

**[0011]** Die Offenlegungsschrift DE 10 2004 006 960 A1 beschreibt ein Verfahren zur Kompensation von Bewegungs-Artefakten in TCSPC-FLIM Bildern. Dazu wird eine schnelle Folge von Bildern aufgezeichnet, und die Bilder werden mit einem unabhängig ermittelten Verschiebungsvektor aufsummiert. Dieses Verfahren dient nicht der Aufzeichnung von schnellen Änderungen von Fluoreszenzlebensdauern und kann auch nicht dazu genutzt werden.

**[0012]** In der Offenlegungsschrift DE 103 39 312 A1 wird ein Verfahren zur spektral aufgelösten Registrierung von Fluoreszenzbildern beschrieben. Die Probe wird bei diesem Verfahren zwar gescannt, aber es wird keine Photonverteilung, insbesondere keine solche über zwei verschiedenen Zeiten aufgezeichnet. Fluoreszenz-Lebensdauern, insbesondere schnelle Änderungen der Fluoreszenz-Lebensdauer, werden nicht detektiert.

**[0013]** In der Offenlegungsschrift DE 10 2008 018 475 A1 wird eine Kamera beschrieben, die durch Vergleich der Phasenlage eines gepulsten oder modulierten Anregungssignals mit der Phasenlage des Lumineszenzsignals die Lebensdauer der Lumineszenz in den einzelnen Pixeln des Bildes bestimmt. Die Kamera soll ein zum TCSPC alternatives Messverfahren zur Ermittlung von Lumineszenz-Lebenszeiten ermöglichen. Es bietet jedoch im Gegensatz zum TCSPC nicht die Möglichkeit, Photonverteilungen aufzubauen, um zeitliche Veränderungen in der Lumineszenz-Lebenszeit im sub-ms Bereich zu registrieren.

**[0014]** Das Patent DE 10 2006 029 809 B3 beschreibt ein Verfahren, bei dem ein Objekt an einem einzelnen Punkt mit einem Laser angeregt wird und das Spektrum des Fluoreszenzsignals gemessen wird. Das Verfahren basiert nicht auf Photonenzählung, misst keine Fluoreszenz-Lifetime, baut keine Photonverteilung über Raum und/oder Zeit auf, und detektiert auch keine schnellen Änderungen der Fluoreszenz-Abklingfunktion.

**[0015]** In der Patentschrift DE 600 01 731 T2 wird ein Verfahren zur Bestimmung von Fluoreszenz-Parametern einzelner Moleküle beschrieben. Die Moleküle diffundieren entweder durch den Anregungs-Fokus oder sind selbst stochastischen Änderungen in ihrem Fluoreszenzverhalten unterworfen. Die Fluoreszenzparameter werden in kurzen Zeitintervallen bestimmt, und Histogramme der Häufigkeit der „Molekül-Zustände“ über mehreren Parametern aufgebaut. Eine Verteilung von Fluoreszenz-Photonen über mehrere

Zeiten (d.h. die Registrierung einer schnellen Änderung in der Fluoreszenzlebenszeit), insbesondere innerhalb einer kurzen Zeit im Bereich von sub-ms, in dem schnelle Veränderungen in der Fluoreszenzlebenszeit durch die schnelle Laserpulsfolge induziert wurde oder nach einem externen Ereignis, wird nicht aufgebaut. Das Verfahren entspricht damit weder in seinem Wirkungsmechanismus noch in seinem Ziel dem erfindungsgemäßen Verfahren.

**[0016]** Die Patentanmeldung DE 10 2009 013 147 A1 beschreibt einen Raster Scan einer Probe mit dem Ziel der Integration über den gesamten Scan, um möglichst schnell ein größeres Probenvolumen zu erfassen. Das Verfahren baut keine Photonenvverteilung über den Ort in der Probe und auch keine Photonenzeiten auf. Das Verfahren beinhaltet nicht die Messung einer Fluoreszenzlebenszeit. Es wird ferner auch keine Möglichkeit vorgeschlagen, die Registrierung einer schnellen Änderung in der Fluoreszenzlebenszeit zu messen.

**[0017]** Das Patent DE 698 24 174 T2 stellt ein automatisches Verfahren zum Analysieren von Zellen vor. Durch Kombination von Zell-Screening-Formaten mit Fluoreszenz-basierten molekularen Reagenzien und einer computergestützten Merkmalsextraktion, Datenanalyse und Automatisierung soll eine schnellere Bewertung von Arzneimittelkandidaten ermöglicht werden. Für das Durchmustern von Verbindungen werden Standard-Mikrotiterplatten (86 bis 129 Millimeter groß mit 96 Vertiefungen) verwendet. Mit Scanner ist dabei das Scannen von Vertiefung zu Vertiefung in circa 5 Sekunden gemeint. Die Datenerfassung pro Vertiefung dauert circa 5 Sekunden, d.h. 10 Sekunden für eine Vertiefung bis zur nächsten.

**[0018]** Die Patentanmeldung DE 10 2008 059 788 A1 betrifft die Analyse von Zeitserien von Lumineszenzbildern. Die Aufzeichnung von zeitlichen Änderungen der Fluoreszenz-Lifetime ist nicht beinhaltet.

**[0019]** Die Patentschrift DD 205 522 A1 beschreibt das generelle, technische Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung. Eine Aufzeichnung über zwei unabhängige Zeiten bzw. die Aufzeichnung von zeitlichen Änderungen der Zeitfunktionen von optischen Signalen wird weder erwähnt noch nahegelegt.

**[0020]** Das Patent EP 0 418 588 B1 beschreibt ein Verfahren zum Auslesen eines Strahlungsdosimeters. Das Glas des Dosimeters wird durch die vorher empfangene energiereiche Strahlung lumineszent. Die Lumineszenz wird durch Anregung mit einem UV-Laser ausgelesen. Während der Bestrahlung klingt die Lumineszenz langsam ab. Diese Abnahme ist nicht verursacht durch die Lumineszenz-Lebensdauer, sondern durch Entleerung der von der energiereichen Strahlung induzierten Farbzentren. Die

Abnahme wird gemessen und zur Bestimmung der empfangenen Dosis ausgewertet. Es wird somit eine zeitliche Änderung einer Lumineszenzintensität gemessen. Das Verfahren beinhaltet nicht die Messung einer Fluoreszenzlebenszeit. Es wird ferner auch keine Möglichkeit vorgeschlagen, die Registrierung einer schnellen Änderung in der Fluoreszenzlebenszeit zu messen.

**[0021]** Die Anmeldung DE 10 2010 016 395 A1 beschreibt ein Verfahren zur gleichzeitigen Aufzeichnung von Phosphoreszenz- und Fluoreszenz-Lifetime-Bildern. Hierbei werden die Zeiten der Photonen auf zwei unabhängigen Zeitskalen ermittelt, nämlich bezogen auf die Zeit innerhalb der Pulsperiode des Lasers und bezogen auf die Zeit innerhalb der Periode einer zusätzlichen Modulation des Lasers. Daraus werden jedoch zwei unabhängige Photonenvverteilungen aufgebaut.

**[0022]** Die Anmeldung DE 100 54 426 A1 betrifft ein Verfahren zur Abtastung von Lumineszenzabklingvorgängen mit einem zeitlich verschiebbaren Gate-Impuls. Das Verfahren erfordert ein Scannen der Gate-Verzögerung. Es beruht nicht auf zeitkorrelierbarer Photonenzählung, baut keine Photonenvverteilung über zwei unabhängigen Zeiten auf, und dient auch nicht der Aufzeichnung von schnellen Änderungen der Abklingfunktion.

**[0023]** Das Patent DE 691 12 493 T2 betrifft eine Anordnung zur Bestimmung von Fluoreszenzmustern, vorzugweise in Verbindung mit einer Elektrophoresevorrichtung und zur Anwendung in der DNA-Analyse. Die Messung erfolgt nicht durch Photonenzählung, sondern mit einem linearen Detektor, dessen Signal verstärkt und von einem A-D-Wandler digitalisiert wird. Das Verfahren baut keine Photonenvverteilungen auf. Über die Bewegung der Moleküle innerhalb der Elektrophoresevorrichtung werden indirekt unterschiedliche Fluoreszenz-Signaturen über der Zeit erfasst. Das betrifft jedoch nicht die Fluoreszenz-Lifetime, insbesondere nicht deren Änderung nach einer Stimulation eines Messobjektes.

**[0024]** Das Patent DE 44 45 214 C2 beschreibt die Messung der räumlichen Verteilung von Fluoreszenz-Intensitäten mit einem optischen Vielkanalanalysator. Durch Messung an verschiedenen Detektor-Positionen wird ein tomographisches Verfahren realisiert. Es erfolgt keine Aufzeichnung von Fluoreszenz-Abklingfunktionen oder deren Änderung.

**[0025]** Die Auslegeschrift DE 1 274 384 A betrifft eine Anordnung zur Prüfung und zum Abgleich von Einrichtungen zum Feststellen Phosphoreszierender Kennzeichen. Bei diesem Verfahren Lumineszenz wird angeregt und gemessen.

**[0026]** Ziel der Erfindung ist ein Verfahren, bei dem entlang einer beliebig im Raum liegenden Linie die Lichtintensität als Funktion sowohl der Zeit nach einem optischen Anregungsimpuls als auch einer weiteren Zeit im Bereich der erwarteten Änderungen dieser Funktion aufgezeichnet wird. Das Verfahren soll auch in solchen Fällen sinnvolle Daten liefern, wenn die mittlere Detektionsrate von der Größenordnung der reziproken Pixel-Zeit des Scans ist oder sogar darunter liegt. Weiterhin soll das Verfahren in der Lage sein, solche Daten gleichzeitig bei verschiedenen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen zu liefern.

**[0027]** Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß folgendermaßen gelöst.

**[0028]** Die Probe wird mit dem fokussierten Strahl einer hochfrequent gepulsten Anregungslichtquelle entlang einer beliebigen Linie im Raum repetierend gescannt. Durch geeignete optische Mittel wird dafür gesorgt, dass Licht (Fluoreszenz, Phosphoreszenz, oder diffus gestreutes Anregungslicht) nur aus dem Bereich des Anregungs-Fokus detektiert wird. Verfahren und Anordnungen für den Scan-Vorgang an sich sind seit langer Zeit bekannt [5] und werden hier nicht beansprucht.

**[0029]** Die aus dem Bereich des Anregungs-Fokus detektierten Photonen werden von einem geeigneten Detektor detektiert. Für jedes einzelne Detektionseignis werden die Zeit innerhalb der Anregungs-Pulsperiode,  $t$ , und die Position des Anregungsstrahls,  $x$ , auf der gescannten Linie bestimmt. Weiterhin wird bestimmt die Zeit,  $T$ , des Detektionseignisses nach einem Referenzimpuls, der mit der erwarteten zeitlichen Änderung der Fluoreszenz-, Phosphoreszenz- oder Streu-Zeitfunktion korreliert ist. Dieser wird entweder aus einer externen Stimulation der Probe oder aus einem proben-internen Ereignis, z.B. dem Herzschlag eines Versuchstieres, abgeleitet. Über diesen Parametern, also  $t$ ,  $x$  und  $T$ , wird eine Verteilung der Photonenzahl,  $n$ , aufgebaut. Diese kann betrachtet werden als ein Array von Zeitfunktionen,  $n(t)$ , in der  $x, T$ -Ebene, also über der Position innerhalb der gescannten Linie und der Zeit nach der Stimulation. Soweit nur eine einmalige Stimulation der Probe betrachtet wird, scheint das Verfahren - außer der Vermeidung von Auslesezeiten für die Daten der einzelnen Scan-Perioden - keine besonderen Vorteile aufzuweisen. Die Auflösung für Änderungen der Zeitfunktion ist die Zeit für das Scannen der Linie. Diese ist zwar kürzer als die Zeit eines  $x-y$ -Scans, aber die Anzahl der Photonen pro Pixel (d.h. Zeitfunktion) innerhalb der  $x-T$ -Ebene ist nach wie vor durch das Verhältnis von mittlerer Photonenrate und Pixelfrequenz bestimmt. Damit verbieten sich schnelle Scans mit entsprechend kurzen Pixel-Zeiten.

**[0030]** Die Situation ist völlig anders, wenn eine repetierende Stimulation der Probe betrachtet wird. Es

ist dann nicht mehr notwendig, dass jedes Pixel in der  $x-T$ -Ebene der Photonenverteilung innerhalb der Pixel-Zeit mit Photonen gefüllt wird. Für einen schnellen Scan wird das Zählen der Photonen vollständig vom Scan-Prozess dekorreliert: Wenn ein Photon detektiert wird, wird es je nach Position des Scanners und nach der Zeit nach der letzten Stimulation in ein Pixel innerhalb der  $x-T$ -Ebene eingetragen. Der Zeitkanal innerhalb dieses Pixels bestimmt sich nach der Zeit nach dem Anregungsimpuls. Um das  $t-x-T$  Array zu füllen, muss man also nur die Messung ausreichend lange fortsetzen.

**[0031]** Das Verfahren kann für die gleichzeitige Messung in mehreren Wellenlängen-Bereichen erweitert werden. Dazu wird z.B. mit einem Vielkanal-Detektor die Wellenlänge,  $\lambda$ , der einzelnen Photonen bestimmt und als weiterer Parameter der Photonenverteilung benutzt. Es entsteht dann eine Verteilung über  $t, x, T$  und  $\lambda$ . Diese kann als eine Anzahl von  $t, x, T$ -Verteilungen für verschiedene Wellenlängen interpretiert werden.

**[0032]** Eine denkbare Modifikation des Verfahrens besteht darin, dass die Wellenlänge der Anregungslichtquelle in schneller Folge, innerhalb eines Pixels der Linie, Linie für Linie, oder von einer Stimulationsperiode zur nächsten geändert wird. Wird die Anregungswellenlänge als Parameter der Photonenverteilung benutzt, entsteht ebenfalls eine  $t, x, T, \lambda$ -Verteilung, aber diesmal nicht für die Emissions-, sondern für die Anregungswellenlänge.

**[0033]** Ebenso ist es möglich, abwechselnd mehrere verschiedene Linien, z.B. in variablem Abstand zueinander, zu scannen. Der Abstand,  $d$ , wird als Parameter der Photonenverteilung benutzt, so dass eine  $t, x, T, d$ -Verteilung entsteht. Als Sonderfall kann auch der Abstand zwischen dem Laser-Focus und dem Punkt der Photonendetektion variiert werden. Ein solches Verfahren ist für die Messung von diffus gestreuten Signalen sinnvoll.

**[0034]** Ein weiterer Vorteil des vorgeschlagenen Verfahrens ist, dass sich sowohl die  $t, x, T$ -Verteilung als auch die  $t, x, T, X$ -Verteilungen mit vorhandenen Programmen für die Analyse von Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-(FLIM)-Daten darstellen und analysieren lassen.

#### Ausführungsbeispiel

**[0035]** Das Verfahren soll anhand von **Fig. 1** an einem Anwendungsbeispiel erläutert werden.

**[0036]** Eine Anregungslichtquelle erzeugt Lichtimpulse mit einer Frequenz im MHz-Bereich. Das Anregungslicht wird über einen Scanner geleitet und über ein geeignetes optisches System auf die Probe fokussiert. Der Scanner wird so gesteuert, dass der fokus-

sierte Anregungsstrahl auf der Oberfläche oder innerhalb der Probe eine Linie der gewünschten Form und Lage beschreibt.

**[0037]** Die Probe wird durch äußeren Einfluss in einer Weise stimuliert, dass sich die optischen Eigenschaften, wie zum Beispiel das Fluoreszenz- oder Phosphoreszenz-Abklingverhalten oder die Streu- und Absorptionseigenschaften ändern.

**[0038]** Das von der Probe abgestrahlte Licht wird in geeigneter Weise einem Detektor zugeführt. Dieser liefert einen elektrischen Impuls für jedes detektierte Photon. In einer Zeitmess-Anordnung geeigneter Art wird die zeitliche Lage,  $t$ , dieser Impulse in der jeweiligen Pulsperiode der Anregungsquelle bestimmt.

**[0039]** Weiterhin wird der Ort,  $x$ , des Anregungsstrahles entlang der gescannten Linie innerhalb der Probe im Moment der Photonen-Detektion bestimmt. Das kann entweder durch Zählen von pixelsynchronen Taktperioden innerhalb der Scan-Periode oder Verarbeitung der digitalen Steuersignale des Scanners erfolgen.

**[0040]** Als dritte Messgröße wird die Zeit des Photons nach dem Stimulations-Ereignis bestimmt. Das kann entweder durch Zählen von Perioden eines unabhängigen Clock-Oszillators oder durch Zählen der Perioden des Scanners erfolgen. Die zweite Methode hat den Vorteil, dass die Zeitmessung automatisch mit den Scan-Perioden synchronisiert ist.

**[0041]** Aus den so ermittelten Werten,  $t$ ,  $x$ , und  $T$ , wird eine Photonenverteilung aufgebaut. Der Aufbau dieser Verteilung kann sowohl durch eine Hardware-Logik als auch durch Software erfolgen. Die Hardware-Lösung besteht aus einem Speicher, der durch die (digitalen) Größen  $t$ ,  $x$ , und  $T$  adressiert wird. Bei jeder Photonen-Detektion wird der Wert der Photonenanzahl,  $n$ , im adressierten Speicherplatz inkrementiert. Die Software-Lösung wird realisiert, indem die digitalen Werte  $t$ ,  $x$ , und  $T$ , für jedes Photon in einen Rechner übertragen werden. Die dort installierte Software adressiert über die Werte  $t$ ,  $x$ , und  $T$  einen Speicherplatz innerhalb eines geeigneten Speicherbereiches und inkrementiert die dort vorhandene Photonenanzahl,  $n$ . Das Resultat nach der Detektion einer großen Anzahl von Photonen ist die gesuchte Photonen-Verteilung  $n(t, x, T)$ . Diese kann als ein Array von Zeitfunktionen  $n(t)$  in einer  $x$ - $T$ -Ebene betrachtet werden, siehe **Fig. 1** rechts.

**[0042]** Durch Verwendung eines Vielkanal-Detektors ist es möglich, der  $n(t, x, T)$ -Verteilung eine weitere Koordinate, nämlich die Wellenlänge des emittierten Photons hinzuzufügen. Das Prinzip ist in **Fig. 2** erläutert. Das emittierte Signal wird dazu in seine spektralen Komponenten aufgespalten. Diese werden in mehreren Detektor-Kanälen detektiert. Die

Ausgangsimpulse der Detektor-Kanäle werden zusammengefasst und der Zeitmessung,  $t$ , zugeführt. Gleichzeitig bestimmt ein Encoder den Detektorkanal, der das entsprechende Photon detektiert hat. Dem Detektorkanal ist die Wellenlänge,  $\lambda$ , des Photons zugeordnet. Sie wird als zusätzliche Koordinate zum Aufbau der Photonenverteilung verwendet. Es entsteht eine Verteilung  $n(t, x, T, \lambda)$ .

**[0043]** Für das beschriebene Verfahren ist es unerheblich, auf welche Weise die Photonen vom angeregten Punkt auf den Detektor übertragen werden. Für Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-Anwendungen mit konventioneller Anregung ist es zweckmäßig, das Emissionssignal über den Scanner zurückzuführen. Der angeregte Punkt kann dann in ein stationäres Pinhole projiziert werden um Photonen aus Bereichen oberhalb und unterhalb des Anregungs-Fokus zu unterdrücken. Für Anwendungen mit Multi-Photonen-Anregung kann das emittierte Licht unter Umgehung des Scanners direkt auf einen Detektor projiziert werden. Da in diesem Falle keine Anregung oberhalb und unterhalb des Anregungsfokus entsteht, brauchen entsprechende Signalanteile auch nicht unterdrückt zu werden.

**[0044]** Für Messungen der diffusen Streuung kann es notwendig sein, den Detektionspunkt gegen den Anregungspunkt definiert räumlich zu versetzen. Das kann durch einen Versatz des Pinholes erfolgen. Eine flexiblere Lösung entsteht, wenn das emittierte Signal durch einen zweiten Scanner geleitet wird, der zeitsynchron mit dem Scanner des Anregungsstrahles arbeitet. Beide Scanner können dann definiert gegeneinander versetzt arbeiten. Es ist auch möglich, diesen Versatz zeitlich schnell zu variieren. Ist die Variation schneller als die untersuchten Änderungen in der Probe, kann der Versatz,  $d$ , als zusätzlicher Parameter der Photonenverteilung verwendet werden. Das Resultat ist eine  $n(t, x, T, d)$ -Verteilung. Diese kann interpretiert werden als eine Anzahl von Photonenverteilungen wie in **Fig. 2** dargestellt. Diese gilt aber nicht für verschiedene Wellenlängen, sondern für verschiedenen Versatz,  $d$ , zwischen Anregungs- und Messpunkt.

**[0045]** Eine ähnliche Erweiterung ergibt sich, indem die Wellenlänge der Anregungslichtquelle in schneller Folge variiert wird. Das Resultat ist dann eine Anzahl von Photonenverteilungen für verschiedene Anregungswellenlängen.

#### Literatur

1. Advanced time-correlated single-photon counting techniques. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2005
2. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1984; 13: 105-24

3. Verfahren zur rastermikroskopischen Bestimmung von Calciumkonzentration in Zellen. DD 292 084 A5

4. Verfahren zur rastermikroskopischen Registrierung der Fluoreszenzabklingzeit. DE 39 41 726 A1

5. Handbook of biological confocal microscopy, 3rd edn., Springer (2006)

6. Apparatus and method for Time-Resolved Spectroscopy. US 5565982

7. Verfahren zur Identifizierung von natürlich vorkommenden oder synthetisch hergestellten Melaninsorten. DE 102 39 028 B4

8. Laser-Scanning-Mikroskop und Laser-Scanning-Mikroskopieverfahren. DE 10 2006 011 277 A1

9. Verfahren zur Erfassung mindestens eines Probenbereiches mit einem Lichtrastermikroskop mit punktförmiger Lichtquellenverteilung. DE 10 2004 034 979 A1

10. Verfahren zur Aufzeichnung von Phosphoreszenz- und Fluoreszenz-Lifetime-Bildern in Laser-Scanning-Systemen. DE 10 2010 016 395 A1

11. Proc. SPIE 6771, 67710B-1 (2007)

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem ein räumlicher Versatz zwischen dem Punkt der Anregung und dem Punkt der Messung besteht, dieser in schneller Folge variiert wird, und eine Verteilung der Photonen über die Distanz entlang der Linie, der Zeit innerhalb der Laser-Pulsperiode, der Zeit nach dem Ereignis und besagtem Versatz zwischen dem Anregungs- und Messpunkt aufgebaut wird

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, bei dem das besagte Ereignis durch Messung einer beliebigen physikalischen oder chemischen Größe aus einem innerhalb der Probe stattfindenden, von der Messung unabhängigen Vorgang abgeleitet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4 oder 5, bei dem das besagte Ereignis im Aufprägen einer Änderung einer beliebigen physikalischen oder chemischen Größe auf die Probe besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem diese physikalische Größe die Intensität oder die Wellenlänge der zur Anregung der Probe verwendeten hochfrequent gepulsten Lichtquelle ist.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Zeiten der Photonen nach dem besagten Ereignis durch Zählen der Scan-Perioden bestimmt werden.

### Patentansprüche

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

1. Verfahren zur Aufzeichnung von zeitlichen Änderungen der Fluoreszenzabklingfunktion entlang einer Linie innerhalb einer räumlich ausgedehnten Probe, gekennzeichnet dadurch, dass die Probe mit dem Strahl einer hochfrequent gepulsten Lichtquelle entlang besagter Linie repetierend gescannt wird, einzelne Photonen der durch die Lichtquelle angeregten Fluoreszenz-, Phosphoreszenz- oder diffusen Streusignale detektiert werden, für jedes Photon die Distanz entlang der Linie, die Zeit innerhalb der Laser-Pulsperiode und die Zeit nach einem beliebigen Ereignis innerhalb oder außerhalb der Probe bestimmt sowie die Verteilung der Photonenzahl über diesen Parametern aufgebaut wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem zusätzlich die Wellenlänge der Photonen des Fluoreszenzlichtes bestimmt und eine Verteilung der Photonen über die Distanz entlang der Linie, der Zeit innerhalb der Laser-Pulsperiode, der Zeit nach dem Ereignis und der Wellenlänge der Photonen aufgebaut wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Wellenlänge der Anregungslichtquelle periodisch variiert und eine Verteilung der Photonen über die Distanz entlang der Linie, der Zeit innerhalb der Laser-Pulsperiode, der Zeit nach dem Ereignis und der Anregungswellenlänge aufgebaut wird.

Anhängende Zeichnungen

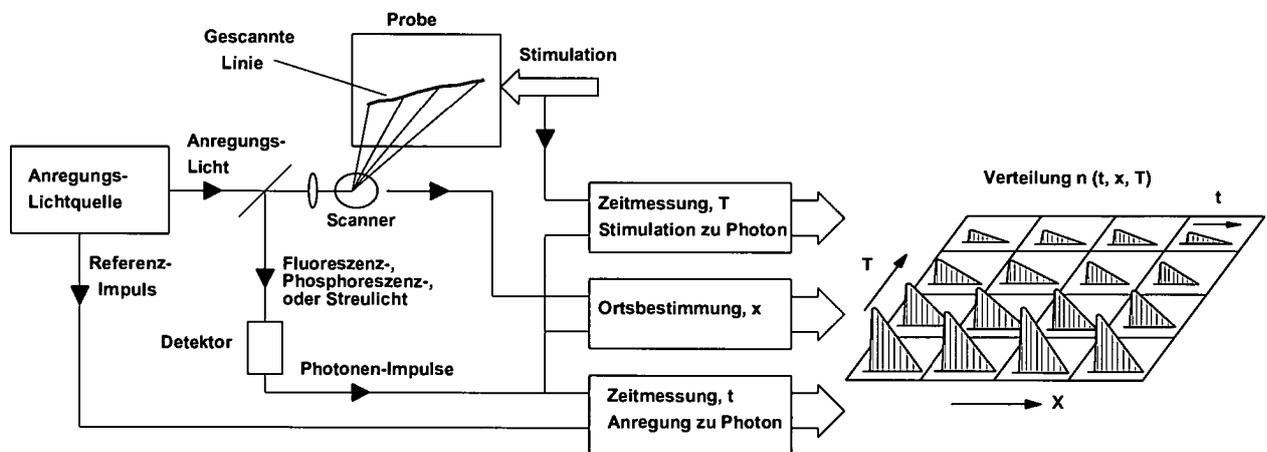


Fig. 1

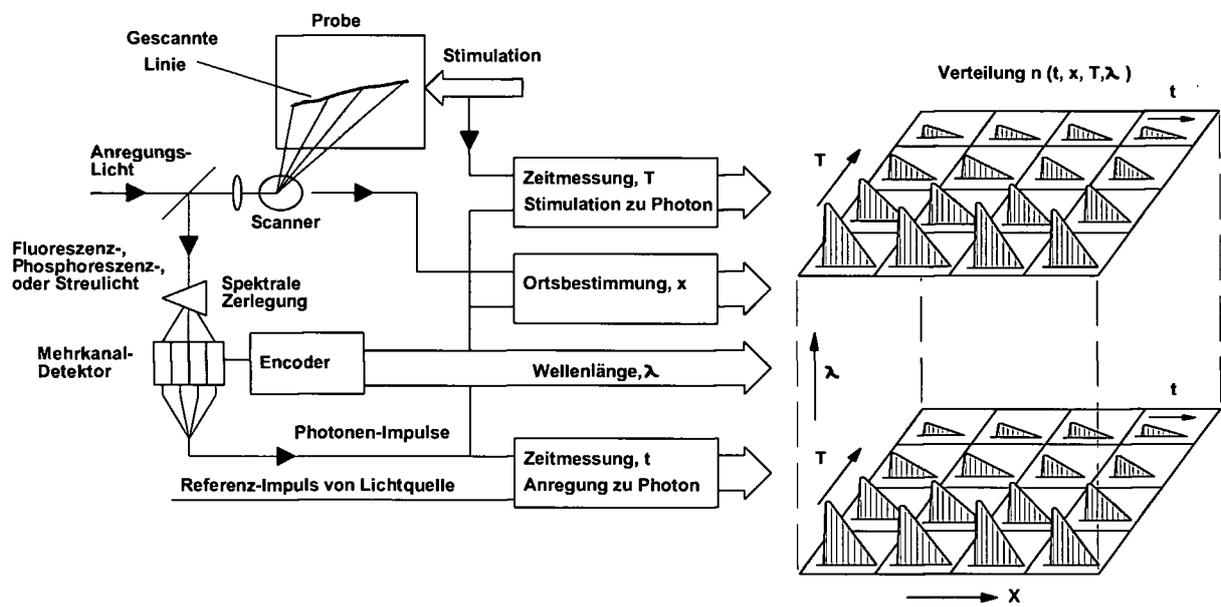


Fig. 2