

Lifetime reloaded

FLUORESZENZABKLINGZEITEN MIT WENIGER AUFWAND BESTIMMEN

Lifetime, Lebensdauer oder Abklingzeit sind Begriffe, die mit dem Phänomen der Fluoreszenz, der spontanen Emission von Licht kurz nach der Anregung des Materials, zu tun haben. Dieser Vorgang, die sogenannte Photolumineszenz, wird heutzutage in vielen Bereichen genutzt, um Zellen oder Zellbestandteile zu markieren, um Stoffwechselprozesse zu visualisieren, um Reaktionsprodukte zu differenzieren oder um mithilfe der Änderung der Lumineszenz andere Parameter wie zum Beispiel den Sauerstoffpartialdruck zu messen.

GERHARD HOLST

Die Bezeichnung Fluoreszenz wird häufig synonym für das Phänomen Photolumineszenz verwendet, aber eigentlich umfasst die Lumineszenz sowohl die Fluoreszenz als auch die Phosphoreszenz, die beide auf der Absorption von energiereichem Licht und der Emission von energieärmerem Licht beruhen (Bild 1). Im Weiteren wird Fluoreszenz als Platzhalter für Photolumineszenz verwendet.

Je nach Farbstoff und dessen Möglichkeit, in irgendeiner Form mit seiner Umgebung zu wechselwirken, ist die Absorption des Lichts nicht unendlich schnell. Es kann eine, wenn auch kurze, Zeit vergehen, bis der Farbstoff die mögliche Lichtenergie aufnimmt. Das Gleiche gilt für die Emission: Nach dem Abschalten des Anregungslichts dauert es eine Weile, bis der Farbstoff zu leuchten aufhört (Bild 2, links). Dies ist eine weitere, sehr wesentliche Eigenschaft, welche die verschiedenen Farbstoffe neben ihrem spektralen Verhalten charakterisiert. Sie wird fachlich als Abklingzeit (»Decay Time«) oder Lebensdauer (»Lifetime«) bezeichnet.

Das Abklingen des Leuchtens lässt sich dabei immer durch zeitlich exponentielles Abklingverhalten beschreiben, wobei es durchaus sein kann, dass sich ein gemessenes Abklingverhalten nur mithilfe mehrerer Abklingzeiten bestmöglich beschreiben lässt. Die Fluoreszenzlebensdauer kann zum einen zusätzliche Informationen über den Farbstoff oder seine Umgebung geben, und sie ist in manchen Sensoranwendungen der stabilere Parameter. Ein Beispiel ist die optische Sauerstoffmessung. Es gibt



1 Fluoreszierende Farbstofflösung in einer Küvette. Im Hintergrund an einem Strahlteiler-aufbau ist das blaue Anregungslicht zu erkennen und davor die grün fluoreszierende Farbstofflösung

Fluoreszenzfarbstoffe, die im angeregten Zustand bei einem Zusammenstoß mit Sauerstoffmolekülen ihre Energie an den Sauerstoff übertragen, ohne Licht zu emittieren. Diese Fluoreszenzlöschung ist proportional zur Menge der Sauerstoffmoleküle und wird in vielen Anwendungen zur Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks verwendet. Soll ein solcher Farbstoff in Form eines Sensors verwendet werden, dann muss er vorher »kalibriert« werden, das heißt, sein Verhalten wird bei verschiedenen kontrolliert erzeugten Sauerstoffpartialdrücken gemessen und abgespeichert, damit beim eigentlichen Einsatz der Wert

bestimmt werden kann. Wenn sich jedoch bei der Messung das Anregungslicht ändert, läuft man Gefahr, dass das Messergebnis verfälscht wird. Die Messung der Lebensdauer bringt hier deutliche Vorteile: Für eine Kalibrierung über die Lebensdauer spielt die Anzahl der leuchtenden Moleküle, welche die gleiche Lebensdauer haben (ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis vorausgesetzt), keine Rolle, nur die Lebensdauer wird gemessen.

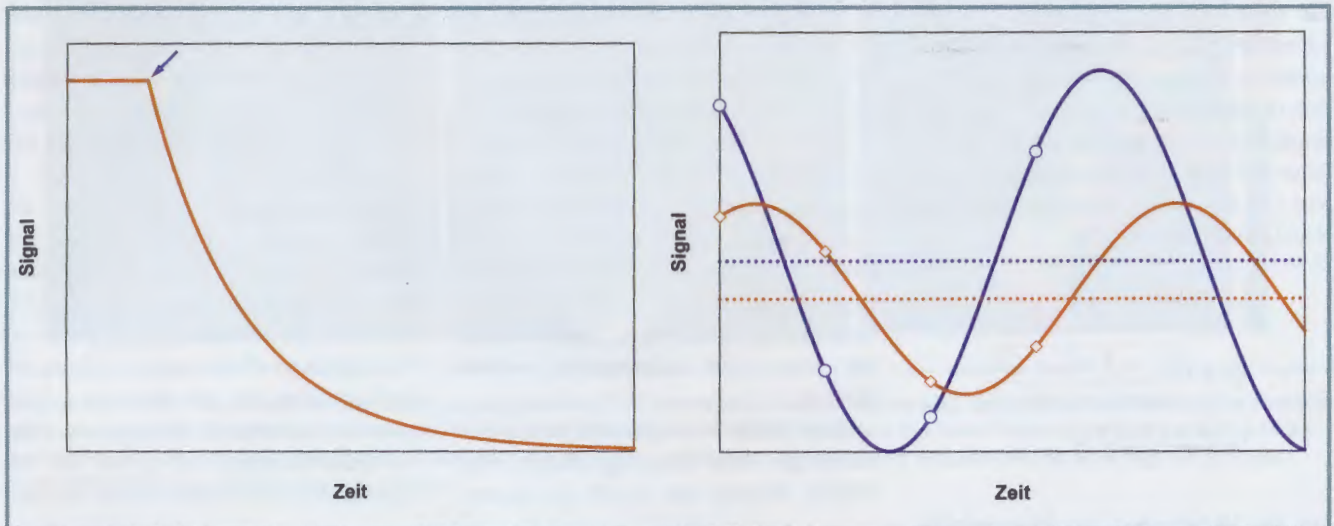
Lebensdauern abbilden

Seit Beginn der 90er-Jahre gibt es Veröffentlichungen, die die Messung der flächenhaften Verteilung von Fluoreszenzabklingzeiten mithilfe von kamerabasierten Systemen beschreiben [1, 2], und im Laufe der Zeit hat sich der Begriff FLIM (für »Fluorescence Lifetime Imaging« oder »Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy«) für die Aufnahme von Lebensdauerbildern etabliert.

Aber wie kann man nun Fluoreszenzlebensdauerbilder aufnehmen? Technisch gesehen ist dies in zwei verschiedenen Bereichen möglich: dem Zeitbereich und dem Frequenzbereich, die beide je nach Lichtdetektor und Aufnahmeverfahren Vor- und Nachteile besitzen.

KONTAKT

PCO AG
93309 Kelheim, Deutschland
Tel. +49 09441 2005-0
info@pco.de
www.pco.de



2 Zeitverhalten der Photolumineszenz bei unterschiedlichen Anregungen. Links: Zeitbereich – die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit, wenn man das Anregungslicht abschaltet (siehe blauer Pfeil). Rechts: Frequenzbereich – Anregungslicht (blau) und Fluoreszenz (orange) in Abhängigkeit der Zeit und der vier Abtastzeitpunkte

Zeitbereich: Bild 2 links zeigt den prinzipiellen Zeitverlauf der Fluoreszenz nach dem Abschalten des Anregungslichts. Hier wird versucht, mit verschiedenen Verfahren diese Abklingkurve zu messen, um dann mithilfe von geeigneten Approximationen die resultierenden Abklingzeiten zu ermitteln. Dabei weiß man entweder, wie viele Lebensdauern zu erwarten sind, oder man wiederholt die jeweiligen Anpassungsrechnungen mehrfach, um den besten Fit zu bestimmen. Für die flächenhafte Bestimmung sind entweder scannende Verfahren im Einsatz, wobei sich für schwach leuchtende Farbstoffe das sogenannte »Time Correlated Single Photon Counting« etabliert hat (ein

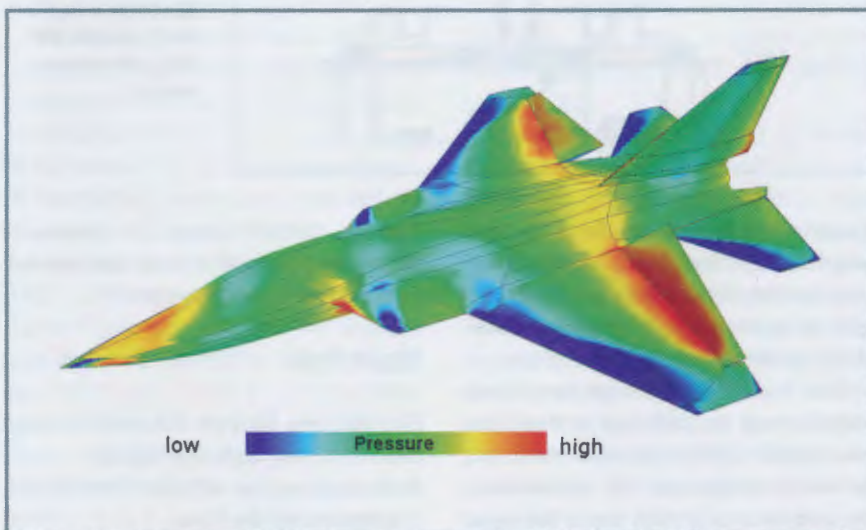
Verfahren, welches das Photonen zählen und deren Zeitbezug verwendet), das von einigen Firmen wie zum Beispiel Picoquant, Becker & Hickl und Horiba angeboten wird. Eine weitere Möglichkeit ist, nach dem Abschalten des Anregungslichts mithilfe einer Kamera über einen Teilbereich der Abklingkurve zu integrieren und ein zweites Bild oder mehrere Bilder über weitere Teilbereiche aufzunehmen. Diese Bilder werden dann entsprechend verrechnet, um die Lebensdauerverteilung zu bestimmen.

Photonenzählen ist eine hochempfindliche Methode und eignet sich somit auch für schwach leuchtende Farbstoffe. Allerdings müssen solche Systeme eine relativ große

Bandbreite besitzen, damit die zum Teil sehr steilen Lichtpulse und auch kurzen Abklingkurven nicht verzerrt werden und unbrauchbare Ergebnisse liefern. Ein Anbieter solcher Systeme ist beispielsweise die Firma Photonic Research Systems.

Eine Anwendung ist zum Beispiel die Messung der Verteilung des Sauerstoffpartialdrucks auf den Tragflächen eines Flugzeugs. Dazu wird ein Modell mit sogenannter druckempfindlicher Farbe (»Pressure Sensitive Paint«, PSP) bemalt. Diese ist ein Sauerstoffindikator, welcher durch Sauerstoff gelöscht wird. Bild 3 zeigt die Sauerstoffverteilung nach vorheriger Korrektur um die Temperaturverteilung.

Frequenzbereich: Im Frequenzbereich wird der Fluoreszenzfarbstoff mit moduliertem Licht angeregt. Nimmt man der Einfachheit halber eine sinusförmige Modulation an, dann reagiert der Farbstoff mit einer entsprechenden Fluoreszenzemission, allerdings, bedingt durch sein Zeitverhalten, welches einem Tiefpass sehr ähnlich ist, verzögert. In Bild 2, rechts ist sowohl das sinusförmige Anregungslicht (blau) als auch die verzögerte sinusförmige Fluoreszenz (orange) gezeigt, und vier beispielhafte Abtastzeitpunkte sind markiert. Die Emission ist verzögert und besitzt ein anderes Verhältnis von Amplitude zu Gleichanteil verglichen mit der Anregung. Die Verzögerung wird technisch gesehen als Phasenwinkel (Φ) bezeichnet und das Verhältnis von Amplitude zu Gleichanteil als Modulationsindex (m). Beide technischen Größen lassen sich über die Abtastung des sinusförmigen Signals bestimmen. ▶



3 Die erste 360°-Messung mit luftdrucksensitiver Farbe (»Pressure Sensitive Paint«, PSP) im DNW/HST-Windtunnel in Amsterdam, mit einer Projektion der Druckverteilung auf ein CFD-Gitter (»Computational Fluid Dynamics«, numerische Strömungsmechanik) nach der Bildverarbeitung. (Bild: mit freundlicher Genehmigung der PSP Gruppe, DLR, Göttingen, Germany)

► Wenn man die Abtastzeitpunkte verschiedenen Aufnahmen gleicher Belichtungszeit, die auch über mehrere Periodendauern gehen können, zuordnet, dann lassen sich im Prinzip aus den vier Bildern die folgenden bildhaften Verteilungen bestimmen (mit Intensität I , Phasenwinkel Φ und Modulationsindex m):

$$\phi = \arctan\left(\frac{I_1 - I_3}{I_0 - I_2}\right)$$

$$m = 2 \frac{\sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_0 - I_2)^2}}{I_0 + I_1 + I_2 + I_3}$$

$$I = \frac{I_0 + I_1 + I_2 + I_3}{4}$$

Aus den Verteilungen des Phasenwinkels und des Modulationsindex lassen sich jeweils Lebensdauerverteilungen direkt berechnen, wenn man die Null-Phasenlage des Systems kennt. Im Unterschied zur Messung im Zeitbereich ist hier für den Zeitpunkt der Messung das Anregungslicht an, das heißt, man muss es optisch möglichst gut wegfiltern. Da es sich um Signale in einem bekannten, eng definierten Frequenzbereich handelt, kann man die Bandbreite entsprechend begrenzen, um das Rauschen zu reduzieren.

Auch für Messungen im Frequenzbereich gibt es Kamerasysteme. Die Herausforderung besteht hier in der Modulation der Bildaufnahme. Bis vor Kurzem war dies ausschließlich über die Modulation der Verstärkung einer Bildverstärker-Röhre möglich, die der eigentlichen Kamera vorgeschaltet ist. Bei Firmen wie Lambert Instruments, LaVision Biotech und in einigen Forschungslaboren gibt es solche Systeme. Diese sind allerdings recht aufwendig, denn zum einen ist die Erzeugung der Modulationssignale mit Amplituden von einigen Hundert Volt, wie sie die Bildverstärker benötigen, nicht ganz trivial, zum anderen braucht man eine externe Frequenzsignalquelle und eine entsprechend modulierbare Lichtquelle, was früher bei Lasern oft nur über akustooptische oder elektrooptische Modulatoren möglich war. Deswegen hat sich die Messung der Fluoreszenzlebensdauern meist nur bei Spezialisten durchgesetzt und nicht so sehr in der Laborroutine oder in der breiten Forschung.

Neue Bildsensoren und Kamerasysteme

In den letzten zehn Jahren sind neue CMOS-Bildsensoren entwickelt worden, die

es möglich machen, die Bildaufnahme zu modulieren. Sowohl an der Universität Siegen (Arbeitsgruppe Prof. R. Schwarte) als auch am Centre Suisse d'Electronique et Microtechnique SA (CSEM) in Zürich wurden ähnliche Pixelstrukturen entwickelt, die es gestatten, über ein externes Spannungssignal die lichterzeugten Ladungsträger in einen von zwei Sammeltöpfen zu transportieren. Über eine rechteckförmige Demodulation können phasensensitiv ein 0° - und ein 180° - Bild aufgenommen werden (Bild 4).

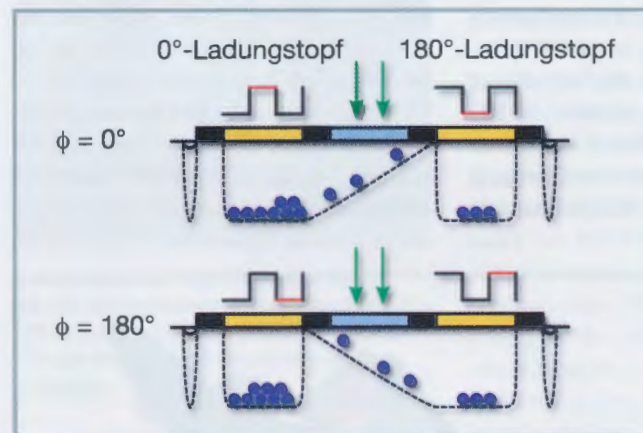
Diese Bildsensoren (erhältlich beispielsweise bei Mesa Imaging, Zürich, und PMDTec, Siegen) sind jedoch für Anwen-

auch Modulationssignalerzeugung und kann so mit den neuen, direkt modulierbaren Laserdioden-Modulen als komplettes FLIM-System eingesetzt werden. Eine Auswahl der technischen Parameter ist in **Tabelle A** beschrieben.

Das Kamerasystem hat mit 1 MPixel die bisher höchste Auflösung solcher TOF (Time of Flight)-Bildsensoren und eine sehr hohe Bildrate. Diese reduziert sich zwar durch die erforderliche Aufnahme von vier Bildpaaren effektiv auf 20 Bilder/s, ist aber schneller als alle bisherigen bildgebenden Lebensdauer-Messsysteme. Der Quantenwirkungsgrad ist größer als der vieler Bildverstärker, jedoch fehlt die Ver-

A Technische Parameter der »pco.flim«

| Parameter | pco.flim |
|---------------------|----------------------------|
| Auflösung | 1024 × 1024 Pixel |
| Pixelgröße | 5,6 × 5,6 µm |
| Bildrate | 80 Doppelbilder/s |
| Modulationsfrequenz | 5 kHz–40 MHz (50 MHz max.) |
| Quantenwirkungsgrad | 39 % |
| Dynamik | > 1:1096 |
| Ausleserauschen | 14 e |
| Belichtungszeiten | 100 ns–10 s |
| Kühltemperatur | Δ 30 °C |
| Leistungsaufnahme | circa 60 W |



4 Schematische Darstellung der Ladungsschaukel im Pixel des »QMFLIM«-CMOS-Bildsensors, über eine rechteckförmige Demodulation können phasensensitiv ein 0° - und ein 180° -Bild aufgenommen werden

dungen unter Tageslichtbedingungen entwickelt worden. Die Unterdrückung des Umgebungslichts für die Fluoreszenzmessung führt zu relativ hohen Störsignalen im Vergleich zu den geringen Messsignalen.

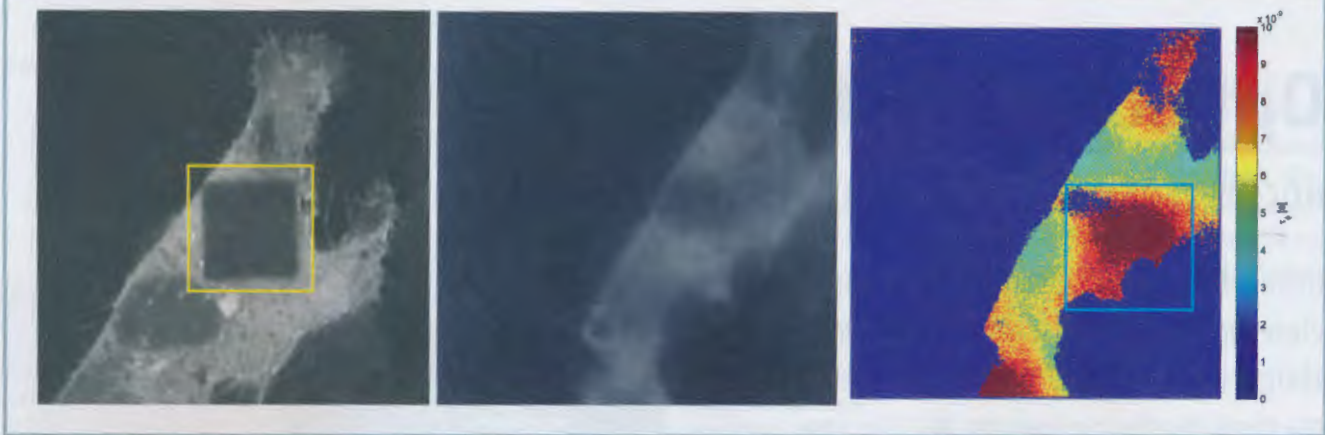
Über ein BMBF-gefördertes Forschungsprojekt wurde im Laufe der letzten Jahre ein spezieller CMOS-Bildsensor entwickelt, der den Anforderungen der Lebensdauer-messung Rechnung trägt. Dieser Bildsensor wurde in ein Kamerasystem integriert, dessen Prototyp nunmehr vorliegt. Das Fluoreszenzlebensdauer-Kamerasystem »pco.flim« vereint dabei sowohl Kamera als

stärkung. Dennoch konnte das Kamerasystem bisher schon bei schwach leuchtenden Farbstoffen eingesetzt werden

Workflow

Eine Messung für eine Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung läuft wie folgt ab:

- Bestimmung der erforderlichen Belichtungszeit für die Probe,
- Aufnahme einer Sequenz Referenzbilder, welche in den Arbeitsspeicher des Computers transferiert werden. Eine Sequenz besteht aus 2 × 2 Doppelbildern, die den



5 Fluoreszenz- und Lebensdauerbilder von Zellen, welche mit einem FRET-Farbstoffpaar markiert worden sind. Links: Fluoreszenz des Akzeptor-Farbstoffs nach einem gezielten Bleichen (rechteckförmiger Bereich, siehe gelbes Rechteck). Mitte: Fluoreszenz des Donor-Farbstoffs nach dem gezielten Akzeptor-Farbstoff Bleichen. Rechts: phasenwinkelbasierte Lebensdauerverteilung des Donor-Farbstoffs nach dem gezielten Akzeptor-Farbstoff Bleichen (siehe den gebleichten Bereich, blaues Rechteck)



6 Prototyp der >pco.flim< an einem inversen Mikroskop

eignete Lichtquellen in unterschiedlichen Leistungsbereichen im Angebot. Die beiden Camera-Link-Datenkabel übermitteln die Bilddaten an den Computer zur Speicherung und Weiterverarbeitung.

Fazit

Die ersten Resultate mit dem neuen FLIM-Kamerasystem zeigen, dass es jetzt auch mit einem verhältnismäßig einfachen Messsystem möglich ist, mit guter Auflösung und einer bisher nicht erreichten Bildrate bildhaft Fluoreszenzlebensdauern zu messen. Somit wird es nunmehr möglich, diese Art der Messtechnik nicht nur Spezialisten, sondern auch für Routineuntersuchungen zur Verfügung zu stellen. Vielleicht wird dies die Verwendung des Parameters Fluoreszenzlebensdauer wiederbeleben, sozusagen >Lifetime reloaded<.

DANKSAGUNG

Diese Entwicklung wurde freundlicherweise vom Bundesministerium für Bildung und Forschung mithilfe der Projekte 13N9242 und 13N11177 möglich gemacht.

LITERATUR

1. G. Mariott, R. Clegg, D.J. Arndt-Jovin: >Time resolved imaging microscopy – phosphorescence and delayed fluorescence imaging<, Jovin, Biophysical J, 1991
2. J.R. Lakowicz, K.W. Berndt: >Lifetime-Selective fluorescence imaging using an RF phase-sensitive camera<, Review Scientific Instrumentation, 1990

AUTOR

Dr. GERHARD HOLST ist Forschungsabteilungsleiter bei PCO.

■ www.laser-photonik.de/LP110236

folgenden Phasenlagen entsprechen: $0^\circ - 180^\circ$ und $90^\circ - 270^\circ$ sowie $180^\circ - 0^\circ$ und $270^\circ - 90^\circ$. Die Wiederholung der Bildpaare mit umgekehrten Phasenlagen ist erforderlich, da es in jedem Pixel eine minimale Asymmetrie gibt, die auf diese einfache Weise eliminiert wird, mit dem Nebeneffekt, dass sich durch die Mittelung das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.

- Aufnahme einer Bildsequenz der Probe,
- Verarbeitung beider Sequenzen im Computer.

Beispielhaft wurden Messungen an einem FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-Farbstoffpaar durchgeführt. Das Ergebnis sind drei Bilder: ein Bild der Fluoreszenzintensität (Bild 5, links), ein Bild der Modulationsindexverteilung und ein Bild der Phasenwinkelverteilung, wobei die beiden letzteren entweder in Lebensdauerverteilungen (Bild 5, rechts) umgerechnet werden können oder zusammen in einer Ortskurve (Phasor-Plot) dargestellt werden. Das linke Bild zeigt in einem geringfügig kleineren Bildausschnitt die Fluoreszenz

des FRET-Akzeptor-Farbstoffs, welche gezielt in dem quadratischen dunklen Bereich gebleicht wurde. Das mittlere Bild gibt die Donor-Fluoreszenz wieder, welche keinerlei Hinweis auf das Bleichen liefert, allerdings zeigt die Lebensdauerverteilung des Donor-Farbstoffs über den charakteristischen Lebensdaueranstieg deutlich den gebleichten Bereich.

Da die Modulationsfrequenz im Bereich 5 kHz bis 50 MHz frei wählbar ist, sind auch Mehrfrequenzmessungen möglich. Allerdings wird für jede Messung eine brauchbare Referenz mit bekannter Abklingzeit oder deutlich kürzerer Abklingzeit benötigt. Technologiebedingt muss während des Auslesens der aufgenommenen Doppelbilder das Anregungslicht ausgeschaltet werden, was durch ein zusätzliches Dunkelstastsignal, welches von der Kamera erzeugt wird, geschieht. In Bild 6 ist ein >pco.flim<-Prototyp an einem Mikroskop zu sehen. Die beiden Koaxialkabel übermitteln das Modulationssignal und das Dunkelstastsignal an die Laserdiodenlichtquelle. Firmen wie RGB Lasersysteme und Fisba haben bereits ge-