Confocale Fluoreszenzmikroskopie mit CCD-Sensoren

Geschwindigkeit durch Parallelisierung
Low Cost über mehr Elektronik

Rudolf E. Großkopf

Eschenweg 11, D 89551 Königsbronn
Email: re_grosskopf@t-online.de

Zusammenfassung. Mit CCD-Sensoren gelingt es, einige Megapixel in einem Frame confocal aufzunehmen. Das Bild wird elektronisch im Halbleiterchip gescannt (statt mechanisch-optisch mit Spiegeln, Nipkow-Discs oder acusto-optischen Deflektoren). Das neuartige Prinzip, das bereits praktisch erprobt ist, nutzt CCD-Sensoren zusammen mit je einem Pinholearray auf der Beleuchtungs- und der Beobachtungsseite. Es ermöglicht durch Parallelisierung Meßgeschwindigkeiten, die bisher nicht erreichbar waren. Routineanwendungen bei denen es auf Geschwindigkeit und Ökonomie ankommt, werden davon profitieren. So geht die Technologie der confocalen Bildgebung einen ähnlichen Weg, wie zuvor die des Fernsehens: von mechanischen Scanverfahren zum weitestmöglichen Einsatz von Elektronik.

Schlüsselwörter: Confocale Mikroskopie, Screening, molekulare Tumorzytogenetik, FISH

1 Prinzip der confocalen Abbildung

Confocale Mikroskope haben im Gegensatz zu konventionellen den wichtigen Vorteil der Tiefenauflösung. So können 3D-Bilder von reflektierenden, halbtransparenten und fluoreszierenden Objekten aufgenommen werden. Abb. 1 zeigt das Prinzip.

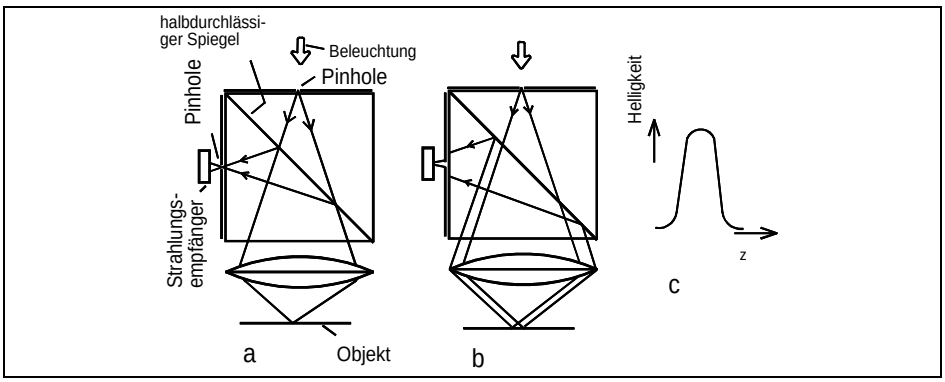


Abb. 1 Prinzip der confocalen Abbildung, a Objekt im Focus, b Objekt defocussiert, c Helligkeitsabfall beim Defocussieren

Ein Pinhole auf der Beleuchtungsseite und eines auf der Beobachtungsseite werden verwendet. Wenn das Objekt im Focus ist (Abb. 1a), wird das Pinhole der Beleuchtungsseite auf dem Objekt scharf und das vom Objekt reflektierte Licht wird scharf auf dem Pinhole der Beobachtungsseite abgebildet. Die beiden Pinholes befinden sich also in confocaler Position. So gelangt alles am Abbildungsvorgang beteiligte Licht zum Strahlungsempfänger.

Außerhalb des Focus (Abb. 1 b) entsteht auf dem Objekt ein unscharfes Bild des Beleuchtungspinhole und dieses wird noch unschärfer in der Ebene des Beobachtungspinhole abgebildet. Außerhalb des Focus gelangt also nur ein geringer Teil des Lichtes zum Strahlungsempfänger. Das bewirkt einen raschen Abfall der Bildhelligkeit, wenn sich das Objekt aus der Focuslage herausbewegt (Abb. 1 c).

Damit ein Bild entsteht, muß das Objekt abgescannt werden. Dazu verwenden die meisten Geräte nach dem Stande der Technik Anordnungen mit zwei Spiegeln, je einen für die x- und die y-Richtung (Laserscan)[1], oder sie verwenden eine Nipkowscheibe mit vielen (z.B. einigen 1000) spiralförmig angeordneten Löchern auf einer rotierenden Scheibe[2].

2 Parallelisierung mit CCD-Sensoren

Im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsprojektes hat sich gezeigt, daß mit Vorteil eine Anordnung eingesetzt werden kann, die CCD-Sensoren nutzt [3]. Dazu wird auf der Beleuchtungsseite eine Pinholematrix mit so vielen Pinholes verwendet, wie der Strahlungsempfänger lichtempfindliche Pixel hat. Abb. 2 zeigt das.

Vor dem Empfänger befindet sich eine zweite, gleichartige Pinholematrix. Alle Pinholes beider Matrices und die Empfängerdioden des CCD befinden sich in confocaler Position. Jedem Pixel des Strahlungsempfängers sind also ein beleuchtungsseitiges und ein empfängerseitiges Pinhole zugeordnet. Wird zum Beispiel ein CCD-Empfänger mit 512*512 Pixeln verwendet, können mit dieser Anordnung 262 144 Meßpunkte gleichzeitig confocal aufgenommen werden.

Gegenüber den bekannten Anordnungen hat das den Vorteil, confocale Bilder rasch aufnehmen zu können, weil der CCD-Empfänger das Licht sehr vieler Pixel gleichzeitig in Elektronen umwandelt und weil er ohne bewegte Teile mit seiner Ladungsverschiebetechnik im Halbleiter ein Videosignal liefert.

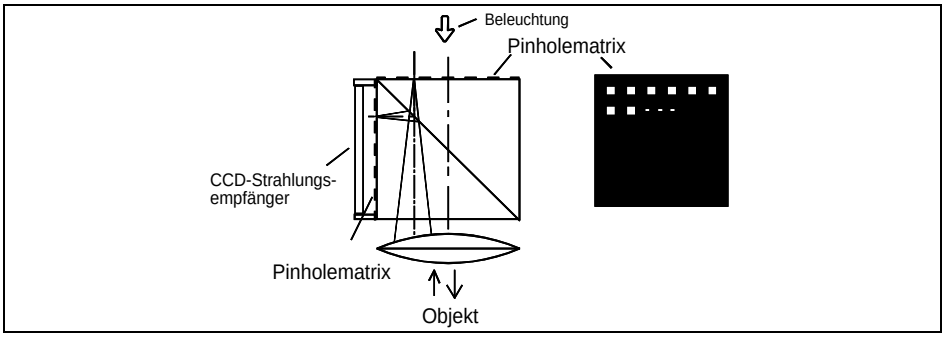


Abb. 2 Confocale Abbildung mit zwei Pinholematrices und CCD-Empfänger

Der Vorteil wird mit einem Nachteil erkauft. Während bei der confocalen Abbildung von nur einem Pixel gleichzeitig (Laserscan) das Signal auf dem Strahlungsempfänger nahe Null geht, wenn das Objekt weit von der Focuslage wegbewegt wird, sinkt es bei einer Anordnung, die viele confocale Lichtwege parallel enthält, z. B. nur auf 30 % seines Höchstwertes ab. Für den Restpegel des Lichtes, der sich außerhalb des Focus einstellt, ist das Verhältnis aus der Summe der Fläche der Löcher in der Pinholematrix zur Gesamtfläche der Pinholematrix maßgebend. Hinzukommt eine geringere Streulichtunterdrückung.

Der Nachteil fällt für Anwendungen ins Gewicht, bei denen es auf hohe Dynamik bei der Detektion von Fluoreszenzsignalen ankommt. Es zeigt sich jedoch, daß dies nicht die Mehrzahl der Anwendungen der confocalen Fluoreszenzmikroskopie ist.

Für ein nichtmedizinisches Anwendungsfeld, die 3D-Vermessung mechanischer Teile (Metrologie), ist das Prinzip schon ausgiebig erprobt worden. Anfängliche Befürchtungen, es könne Schwierigkeiten bei der Justierung der beiden Pinholearrays und der Empfängermatrix geben, haben sich als unbegründet erwiesen. In wenigen Monaten wird ein Meßgerät am Markt vorgestellt werden, das hohe Meßgeschwindigkeit und Meßgenauigkeit in bisher nicht verfügbarer Weise miteinander verbindet. Es arbeitet mit grünem Licht von einer Halogenlampe.

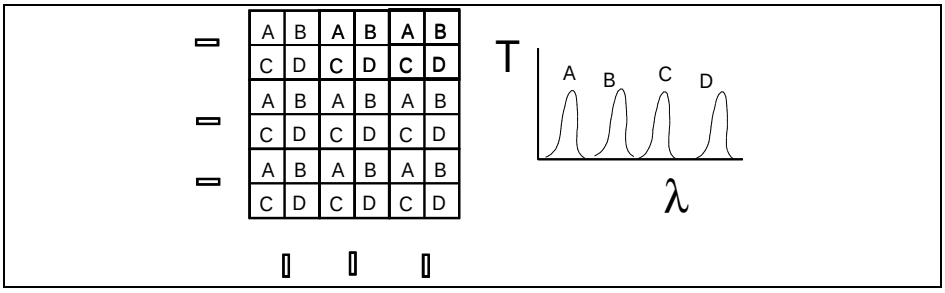
3 Fluoreszenzbildaufnahme für mehrere Wellenlängen gleichzeitig

3.1 Anforderungen für medizinische Anwendungen

Für medizinische Anwendungen ist die Aufnahme mehrerer Wellenlängen gleichzeitig (Farbbildaufnahme) erforderlich. Zum Beispiel wird zur Identifizierung von Krebsgenen in Präparaten zur Früherkennung dieser Krankheit mit ultraviolettem Licht beleuchtet und die krebsspezifischen Marker an den Chromosomen leuchten in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen auf: grün, rot und infrarot [4]. Es ist deshalb wünschenswert, ein Instrument zu schaffen, das auf der Empfängerseite diese drei Wellenlängenbereiche gleichzeitig erfassen kann. Dem kommt entgegen, daß für die Fernsehtechnik und für elektronische, nicht auf fotografischem Film basierende Standbildaufnahme CCD-Sensoren entwickelt worden sind, die diese Forderung erfüllen. Sie werden zudem in hohen Stückzahlen und damit kostengünstig hergestellt.

Damit gelingt es, den Anforderungen medizinischer Anwendungen gerecht zu werden. So wird - vorausgesetzt, daß auch die tumorgenetische Forschung noch bestehende präparative Probleme lösen wird - eine so frühe und sichere Krebsfrüherkennung möglich werden, daß die Behandlungskosten der Erkrankten sinken und ihre Überlebenschancen kräftig steigen werden. Außer dieser Zukunftsperspektive für die medizinische Diagnostik bieten Anordnungen nach dem nachfolgend im Einzelnen geschilderten Prinzip auch eine kostengünstige und schnelle Alternative für viele der Anwendungen, für die derzeit noch teurere und langsamere Instrumente eingesetzt werden.

Abb. 3 Strahlungsempfängermatrix mit spektralen Empfindlichkeitskurven



3.2 Geeignete CCD-Sensoren

Ein geeigneter CCD-Sensor, der die zu fordernden Leistungsdaten erfüllt, ist von Bosier et. al. beschrieben worden [5]. Er hat 1280*1600 aktive Pixel mit je 5,1*5,1 µm² Fläche. Sechs Bilder/s mit je 2 048 000 Pixel können mit diesem Sensor aufgenommen werden. Andere Hersteller bieten CCDs mit ähnlichen Leistungsdaten.

Je vier Pixel bilden eine Farbzelle. Abb. 3 zeigt das schematisch. Vor jeder Vierergruppe von CCD-Dioden befindet sich eine Matrix von vier Lichtfiltern mit verschiedenen spektralen Lichtdurchlässigkeitskurven A, B, C und D.

3.3 Confocale Farbbildaufnahme mit CCD-Matrixsensoren

Der Strahlengang einer Anordnung zur confocalen Farbbildaufnahme mit CCDs ist in Abb. 4 dargestellt. Der Strahlungsempfänger ist so zur empfängerseitigen Pinholematrix justiert, daß das Licht eines jeden Pinholes sich auf die vier Lichtfilter, die eine Farbzelle bilden, gleichmäßig verteilt.

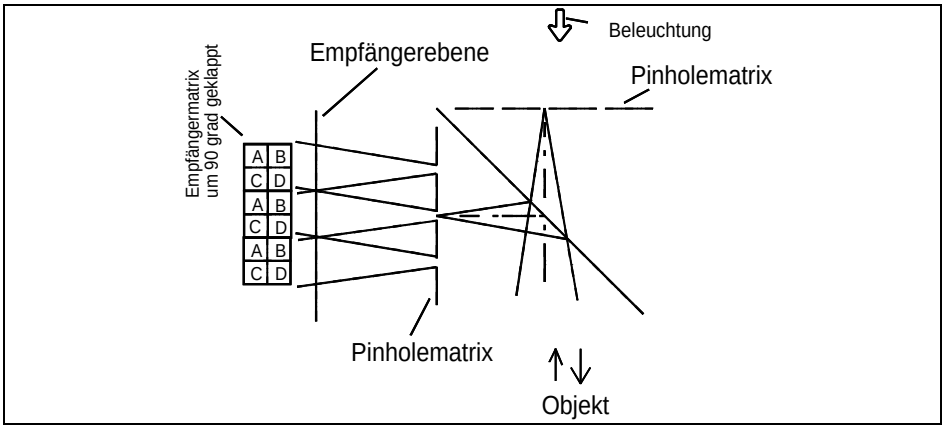
1280*1600/4 = 512 000 Meßpunkte, jeder mit vier voneinander verschiedenen Wellenlängenbereichen, werden gleichzeitig aufgenommen, wenn der oben als Beispiel angeführte Empfänger zum Einsatz kommt. Daß vier statt der vorstehend geforderten drei Wellenlängenbereiche erfaßt werden, ergibt sich aus der zur Verfügung stehenden Empfängergeometrie und mag für künftige Anwendungen eine willkommene Reserve enthalten.

4 Geschwindigkeitsvorteil

Die geschilderte Parallelisierung bringt aus drei wesentlichen Gründen eine beträchtliche Steigerung der Meßgeschwindigkeit, die sich insbesondere dann auswirkt, wenn das Objekt nur schwache Fluoreszenzsignale aussendet. Die Gründe sind:

- es werden sehr viele Voxel gleichzeitig erfaßt (Multiplexvorteil),
- für die Messung eines jeden Volumenelementes steht erheblich mehr Zeit zur Verfügung,

Abb. 4 Die Empfängermatrix ist hinter dem empfängerseitigen Pinholearray so angeordnet, daß sich das Licht jedes Pinhole auf je eine Farbzelle verteilt



- es kann auf höchste Beleuchtungsdichte verzichtet werden. Sättigungseffekte der Fluorophore spielen eine geringere Rolle oder keine mehr. Siehe dazu auch [6].

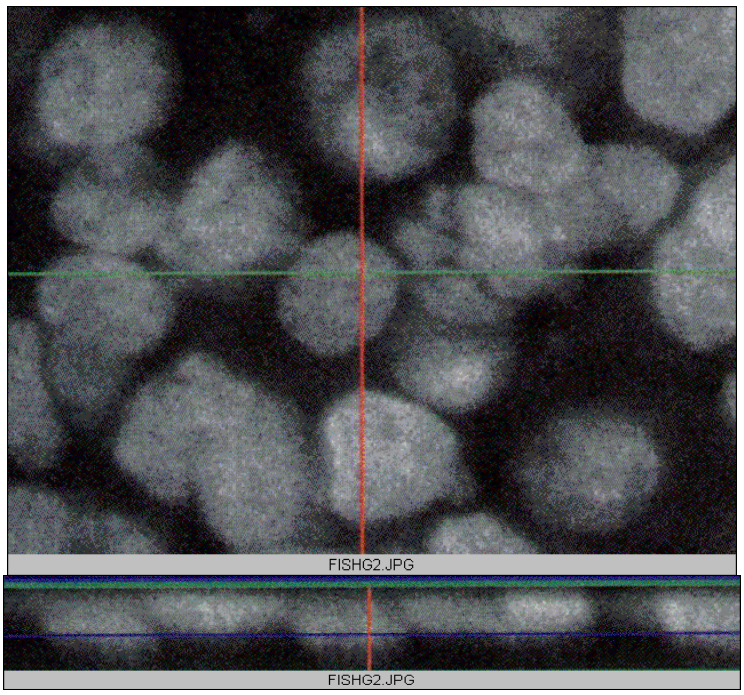
Eine Abschätzung, die hier aus Platzgründen nicht im Einzelnen wiedergegeben wird, ergibt, daß ein Videodatenstrom von 3 MVoxel/s erreicht wird. Bei 8-bit Digitalisierung sind das bis zu 12 MByte/s. Zur Auswertung wird ein Algorithmus zu schaffen sein, der die 3D-Datenmatrix auf Maxima in z-Richtung absucht und dabei eine Deconvolution durchführt, die den Einfluß störender Überstrahlung von Nachbarpixeln herausrechnet. Das kann mit geeigneten Prozessoren videoschnell erfolgen.

Die erforderlichen Meßzeiten für viele Präparate werden so um den Faktor 10, in manchen Fällen sogar um das 100 oder 1000-fache gesenkt werden können. Da zur Beleuchtung Metalldampflampen ausreichen und da nur wenige bewegte Teile benötigt werden, ist zudem eine kräftige Kostenreduzierung im Instrumentenbau für die confocale Bildaufnahme zu erwarten.

5 Anwendungsbeispiel

Abb. 5 zeigt Ausschnitte eines FISH-Zellpräparates, das mit einem Zeiss-Laserscan confocal gescannt wurde [7].
In der x-z-Ebene ist deutlich zu erkennen, daß die FISH-präparierten Zellen flach sind wie „Spiegeleier„. Zellen, die im x-y-Bild gut voneinander getrennt erscheinen, liegen wie das x-z-Bild zeigt, so eng aneinander, daß es mit automatischer Bildauswertung kaum möglich sein dürfte, die Grenzen benachbarter Zellen zu detektieren. Das erschwert die Zuordnung von Fluoreszenzmarkern (in den hier wiedergegebenen Bildern nicht erkennbar) zu den einzelnen Zellen. Für das angestrebte effektive Screening künftiger Routinediagnoseverfahren (Zytodiagnostik) wird deshalb eine Präparation benötigt, die die ursprüngliche Form der Zellen besser bewahrt. Daran wird in einigen Forschungsstellen gearbeitet [8].

Abb. 5 FISH-präparierte Zellen confocal aufgenommen. oben: x-y-Ebene, unten: x-z-Ebene



6 Literatur

1. V. Wilke, Optical Scanning Microscopy, Scanning 1985, 7:88-96
2. James B. Pawley, Handbook of Biological Confocal Microscopy, Second Edition, Plenum Press, New York and London
3. K. Knupfer, E. Derndinger, R. Großkopf, Vorrichtung zur dreidimensionalen Untersuchung eines Objektes, Deutsche Patentschrift DE 40 35 799 (1995)
4. Evelin Schröck, Spektrale Kariotypisierung und vergleichende genomische Hybridisierung - neue Methoden zur umfassenden Analyse chromosomaler Aberrationen in der klinisch-genetischen Diagnostik und der Tumorgenetik, Habilitationsschrift, Humboldt-Universität zu Berlin, 1998
5. J.T. Bosiers, A.C. Kleinman, A. v.d. Sijde, L. Korthout, D.W. Verbugt, H.L. Peck, E. Rocks, A. Heringa, F.F. Vledder, and P. Opmeer, A 2/3,, 2-M pixel progressive scan FT-CCD for still camera applications, IEDM Techn. Dig., pp 37-40, San Fancisco, Dec. 1998
6. R.Y. Tsien and A. Waggoner, Fluorophores for Confocal Microscopy, in [2]
7. Für die Zurverfügungstellung des Präparates und für anregende Gespräche zur hier aufgezeigten Forschungsrichtung danke ich E. Schröck, imb, Jena, für die Anfertigung der Aufnahmen und den Hinweis auf die Probleme bei der Diskriminierung benachbarter Zellen danke ich P. Hutzler, GSF-Forschungszentrum, Neuherrberg.
8. u.a. im Institut für Pathologie der TU-München, (priv. Kommunikation mit E. Bink)