



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 100 35 190 C5 2009.07.16

(12)

Geänderte Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **100 35 190.5**
 (22) Anmeldetag: **20.07.2000**
 (43) Offenlegungstag: –
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **15.04.2004**
 (45) Veröffentlichungstag
 des geänderten Patents: **16.07.2009**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/64** (2006.01)
G01J 3/457 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

Patent nach Einspruchsverfahren beschränkt aufrechterhalten

(73) Patentinhaber:
**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
 Wissenschaften e.V., 80539 München, DE**

(74) Vertreter:
v. Bezold & Partner, 80799 München

(72) Erfinder:
**Heinze, Katrin, 37073 Göttingen, DE; Schwille,
 Petra, Dr., 37073 Göttingen, DE; Koltermann,
 Andre, Dr., 37083 Göttingen, DE; Kettling, Ulrich,
 Dr., 37077 Göttingen, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:

DE	195 33 092	A1
WO	99/34 195	A1
WO	97/11 355	A1
EP	06 79 251	B1
US	50 34 613	A
DE	197 57 740	A1

**Analytical Chemistry News & Features, Sept. 1999,
 S. 598A-605A**

Science, 248, 1990, S. 73-76

**Soeller C., Cannell M.B.: Construction of a
 two-photon microscope and optimisation of
 illumination pulse duration. In: Eur. J. Physiol.,
 Vol. 432, 1996, S. 555-561**

**Keith M. et al.: Two-photon fluorescence
 correlation spectroscopy: method and
 application to the intracellular environment. In:
 Biophys. J., Vol. 68, Feb. 1995, S. 694-701**

**Schwille P., Meyer-Almes F.J., Rigler R.: Dualcolor
 fluorescence cross-correlation spectroscopy
 for multicomponent diffusional analysis in
 solution. In: Biophys. J., Vol. 72, No. 4, Apr.
 1997, S. 1878-1886**

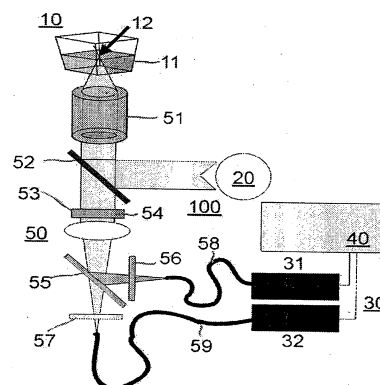
(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Fluoreszenzmessung**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Fluoreszenzmessung
 an einzelnen Analytmolekülen in einer Probe, wobei die
 Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenz-
 markern markierte Analytmoleküle und/oder mindestens
 ein mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenz-
 markern markiertes Analytmolekül enthält, wobei die Fluoreszenzmarker spektral verschiedene Fluoreszenzemissionen besitzen, mit den Schritten:

- Beleuchtung der Probe in einem Messvolumen mit einer einzelnen Laserlinie zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarker,
- Detektion der Fluoreszenzemission mit mindestens zwei Detektoreinrichtungen, die zur Lichtdetektion in verschiedenen Spektralbereichen entsprechend den spektralen Fluoreszenzeigenschaften der unterschiedlichen Fluoreszenzmarker ausgelegt sind, und
- Durchführung einer Kreuzkorrelations- und/oder eine Koinzidenzanalyse von Detektorsignalen der Detektoreinrichtungen,

dadurch gekennzeichnet, dass

- die Beleuchtung der Probe mit einer derart hohen Anregungsintensität erfolgt, dass die unterschiedlichen Fluoreszenzmarker gemeinsam durch 2-Photonen-Absorptionen angeregt werden, und
- eine Erfassung eines Kreuzkorrelations- und/oder Koinzidenzsignals erfolgt, das dafür charakteristisch ist, ob die Probe das mindestens eine mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte...



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren und Vorrichtungen zur Fluoreszenzmessung, insbesondere zur Koinzidenz- oder Kreuzkorrelationsanalyse an mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierten Analyten in einer Probe.

[0002] Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) ist als höchstempfindliches optisches Verfahren zum Nachweis von dynamischen Eigenschaften einzelner Moleküle oder Molekülverbindungen oder von geringsten Konzentrationen fluoreszierender Substanzen allgemein bekannt. Bei einem herkömmlichen Fluoreszenz-Korrelationsspektrometer wird mit einem Mikroskop ein Laserstrahl in die Probe eingekoppelt und auf ein Messvolumen von ca. 10^{-15} l (1 fl) fokussiert. Das Messvolumen ist so klein, dass sich im zeitlichen Mittel weniger als ein fluoreszierendes Molekül darin befindet. Die Fluoreszenz der interessierenden Probenmoleküle wird durch eine Korrelationsanalyse der Detektorsignale erfasst. Das Mikroskop ist zur dreidimensionalen Positionierung des Messvolumens ausgelegt, wie dies z. B. mit einem Konfokalmikroskop möglich ist.

[0003] Bei der Konfokalspektroskopie wird ein Laserstrahl zur Fluoreszenzanregung auf einen beugungsbegrenzten Punkt in der Probe fokussiert. Eine Punktblende (sog. „Pinhole“) in der Bildebene, in der der Anregungspunkt abgebildet ist, dient als Feldblende, mit der Fluoreszenz und Streulicht, das von Orten außerhalb des Fokus ausgeht, ausgeblendet wird. Die Beobachtung einzelner Moleküle im Messvolumen wird durch die dynamischen Moleküleigenschaften (Diffusionskoeffizient) in der Probe bestimmt. Um in der zur Verfügung stehenden kurzen Messzeit für ein annehmbares Signal-Rausch-Verhältnis genügend Photonen zu detektieren, müssen bei der herkömmlichen Konfokalspektroskopie relativ hohe Anregungsintensitäten (im Bereich von ca. 100 kW/cm^2) verwendet werden. Dies ist jedoch problematisch, da die Stabilität der üblicherweise verwendeten Markierungsfarbstoffe (z. B. Fluorescein-, Rhodamin- und Cyanin-Derivate) beschränkt ist.

[0004] Eine Weiterentwicklung des FCS-Verfahrens für heterogene Systeme, in denen molekulare Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Analyten beobachtet werden sollen, wird in WO 99/34195 A1 mit der Zweifarben-Kreuzkorrelationsanalyse beschrieben. Bei diesem Verfahren werden mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe an einen oder mehrere Analyten als Marker gebunden. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind so gewählt, dass sie spektral verschiedene Fluoreszenzmaxima besitzen. In einem Messaufbau, der schematisch in [Fig. 9](#) illustriert ist, werden die Farbstoffe mit zwei Lasern **21'**, **22'**, die auf die jeweiligen Farbstoffabsorptionen abgestimmt sind, angeregt. Mit zwei spektral auf die verschiedenen Fluores-

zenzmaxima abgestimmten Detektoren **31'**, **32'** wird die Fluoreszenzemission aus der Probenkammer **10'** erfasst. Die Detektorsignale werden einer Kreuzkorrelations- oder Koinzidenzanalyse unterzogen. Die Konzentration der Probe und die Größe des Messvolumens sind so gewählt, dass zu einem Messzeitpunkt im Messvolumen höchstens ein Molekül vorhanden ist. Durch Auswertung von zeitlichen Korrelationen oder Koinzidenzen in den Detektorsignalen kann erfasst werden, ob sich zum Messzeitpunkt ein Analyt mit dem einen oder anderen oder beiden Markierungsfarbstoffen im Messvolumen befunden hat. Mit der Zweifarben-Korrelationsanalyse können molekulare Assoziations- oder Dissoziationsvorgänge, wie z. B. die Bildung oder das Aufbrechen von chemischen Bindungen, in Echtzeit gemessen werden.

Stand der Technik

[0005] Die Zweifarben-Technik gemäß WO 99/34195 A1 besitzt aber auch Nachteile, die die Anwendbarkeit und die Genauigkeit des Verfahrens einschränken. Zur Anregung der Fluoreszenzemissionen der Markierungsfarbstoffe sind gewöhnlich verschiedene Laser **21'**, **22'** erforderlich, deren Foci zeitlich stabil und mit einer Genauigkeit von Bruchteilen eines Femtoliters an einem Messpunkt gebildet werden müssen. Es ist ein erheblicher experimenteller Aufwand zur Justierung und Stabilisierung der Anregungslaser erforderlich. Des Weiteren muss das Abbildungssystem zur Erzielung einer genügenden Ortsauflösung in Bestrahlungsrichtung (z-Richtung) abbildungsseitig ein Pinhole vorgesehen sein, auf das das Messvolumen abgebildet wird. Eine weitere Beschränkung betrifft die verfügbaren Farbstoffsysteme. Die Markierungsfarbstoffe müssen bei allen Anregungswellenlängen eine hohe Lichtstabilität besitzen. Außerdem müssen die verwendeten Markierungsfarbstoffe hohe Quantenausbeuten aufweisen.

[0006] Von W. Denk et al. wird in „Science“, 1990, Band 248, Seiten 73–76, ein Verfahren zur Scanning-Fluoreszenzmikroskopie mit 2-Photonen-Laseranregung beschrieben. Es wurde festgestellt, dass bei 2-Photonen-Anregung Lichtschäden an den Markierungsfarbstoffen und auch lichtinduzierte Zerstörungen der Zellumgebung in biologischen Proben vermieden werden. Allerdings erfordert die 2-Photonen-Anregung extrem hohe Photonen-Flussdichten der Größenordnung von 10^{31} Photonen/ cm^2 , um die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen innerhalb des Wirkungsquerschnittes der Farbstoffmoleküle zu bewirken. Die 2-Photonen-Anregung war bisher auf die Scanning-Mikroskopie beschränkt.

[0007] In der Publikation von J. B. Shear in "Analytical Chemistry News & Features", September 1999, Seiten 598A–605A wird die Anwendung von Fluoreszenzmessungen nach Mehrphotonen-Anregungen in der bioanalytischen Chemie beschrieben und darauf

hingewiesen, dass bei diesen Messungen wegen der Empfindlichkeit der Detektion möglichst viele Moleküle in den Anregungsprozess einzubeziehen sind. Weitere Hinweise zur Mehrphotonen-Anregung biologischer Proben werden in DE 195 33 092 A1 und WO 97/11355 A1 gegeben.

Aufgabenstellung

[0008] Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Fluoreszenzmessung auf der Basis einer Kreuzkorrelations und/oder Koinzidenzanalyse anzugeben, mit dem die Nachteile insbesondere der herkömmlichen Zweifarben-Technik vermieden werden. Das erfindungsgemäße Verfahren soll mit einem vereinfachten Messaufbau realisiert werden, ohne dass Einschränkungen in Bezug auf die Genauigkeit und Stabilität hingenommen werden müssen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, verbesserte Korrelations- und/oder Koinzidenzmessvorrichtungen zur Fluoreszenzmessung mit einem vereinfachten Aufbau anzugeben.

[0009] Diese Aufgaben werden mit einem Verfahren und einer Vorrichtung zur Fluoreszenzmessung mit den Merkmalen gemäß dem Patentansprüchen 1 bzw. 8 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

[0010] Die Grundidee der Erfindung ist es insbesondere, zur Korrelations-Fluoreszenzmessung an Analyten mit mindestens zwei Fluoreszenzmarkern auf einem oder mehreren zu analysierenden Stoffen die Probe mit einer derart hohen Anregungsintensität (Photonenflussdichte) zu beleuchten, dass die Fluoreszenzanregung der Fluoreszenzmarker durch 2-Photonen-Absorptionen erfolgt. Die Probe wird mit einer einzigen Laserlinie beleuchtet. Der Laserstrahl wird in die Probe an dem gewünschten Ort des Messvolumens fokussiert. Die Fluoreszenzmarker werden simultan bei einer gemeinsamen Anregungswellenlänge angeregt, besitzen aber spektral getrennte Fluoreszenzemissionen, die mit verschiedenen Detektoren erfasst werden. Die Signale der Detektoren werden einer Korrelationsanalyse (Koinzidenz- oder Kreuzkorrelationsanalyse) unterzogen. Die 2-Photonen-Anregung von Fluoreszenzmarkern besitzt den Vorteil, dass Fluoreszenzmarker verwendet werden können, die ähnliche Maxima in den Anregungsspektren der 2-Photonen-Anregung besitzen, sich jedoch durch verschieden starke Stokes-Verschiebungen der Emission auszeichnen.

[0011] Die Fluoreszenzmessung ist auf eine einzelmolekülbasierende Analyse gerichtet, bei der das Mess- oder Beobachtungsvolumen so klein ist, dass Fluoreszenzfluktuationen von einzelnen Molekülen detektiert und ausgewertet werden können.

[0012] Erfindungsgemäß ergibt sich eine erhebliche Vereinfachung des Messaufbaus. Die Vereinfachung besteht erstens darin, dass nur ein Laser zur Anregung benutzt werden muss. Eine weitere Vereinfachung des experimentellen Aufbaus ist gegeben, da das Anregungsvolumen der 2-Photonen-Anregung in Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls (z-Richtung) gegenüber dem Anregungsvolumen bei 1-Photon-Anregung verkleinert wird. Die Wahrscheinlichkeit der 2-Photonen-Absorption ist vom Quadrat der Anregungsintensität abhängig. Der Absorptionsquerschnitt verringert sich deshalb für 2-Photonen-Absorptionsprozesse außerhalb der Fokalebene in z-Richtung proportional zu z^{-4} . Es ergibt sich eine inhärente Konzentration der Anregung auf die Fokalebene. Es ist nicht zwingend erforderlich, das Messvolumen auf ein Pinhole abzubilden, da außerhalb der Fokalebene ohnehin kein Fluoreszenzlicht in den interessierenden Spektralbereichen emittiert wird.

[0013] Ein weiterer wichtiger Vorteil der 2-Photonen-Anregung gemäß der Erfindung besteht in der hohen Toleranz biologischer Materialien (Zellen, Zellbestandteile oder Zellverbunde) gegenüber Infrarotstrahlung. Zur Anregung einer Fluoreszenzemission im sichtbaren Spektralbereich durch 2-Photonen-Absorption ist es ausreichend, wenn mit Laserlicht im roten oder nahen infraroten Spektralbereich angeregt wird. Aufgrund der langwelligen Anregung ergibt sich ein weiterer Vorteil für das Signal-Rausch-Verhältnis, da Anregungs- und Emissionslicht spektral weit voneinander getrennt sind, so dass störendes Streulicht weitestgehend durch optische Filter unterdrückt werden kann, ohne einen Teil des zu detektierenden Emissionslichts einzubüßen. Ein weiterer Vorteil hierbei ist die Reduktion von Falschlicht, was hauptsächlich die Fluoreszenz von Verunreinigungen ("Schmutz") betrifft. Diese Fluoreszenz ist im wesentlichen im kurzwelligen sichtbaren Bereich, also im Fall von 1-Photonen-Anregung kritisch. Bei einer langwelligen 2-Photonen-Anregung werden solche Verunreinigungen mit deutlich geringerer Effizienz angeregt, so dass hierdurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis – verglichen zur 1-Photonen-Anregung – deutlich höher liegt.

[0014] Gegenstand der Erfindung ist auch eine Messvorrichtung zur Fluoreszenzmessung an Analyten mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern, bei der die Beleuchtungseinrichtung durch eine einzelne Laserlinie gebildet wird, die zur Anregung von 2-Photonen-Absorptionen der Fluoreszenzmarker ausgelegt ist. Ein weiteres wichtiges Merkmal der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht in der Bereitstellung von zwei Detektoreinrichtungen, die zur Detektion der Fluoreszenzemission in verschiedenen Spektralbereichen eingerichtet sind und auf die das gesamte, von der Probe (insbesondere vom Anregungsvolumen und auch aus der Umgebung des Anregungsvolumens) ausgehende Fluoreszenzlicht einfallen kann.

reszenzlicht abgebildet wird. Die Detektion erfolgt blendenfrei, eine Pinhole-Blende ist nicht vorgesehen. Es ist eine nicht-konfokale Abbildung des Anregungsvolumens auf die Detektoren vorgesehen.

[0015] Durch die 2-Photonen-Anregung mit einem einzelnen Laser wird nicht nur der Geräteaufwand reduziert. Es ergeben sich auch Vorteile für die optische Justierung. Das Problem von Größe und Überlappung von Anregungsvolumen ist ausgeschlossen. Zusätzliche Detektionsblenden sind nicht erforderlich. Werden Fluoreszenzfarbstoffe als Marker verwendet, so ergibt sich als weiterer Vorteil die Tatsache, dass nach der 2-Photonen-Anregung praktisch keine Triplet-Zustände eingenommen werden, so dass keine Signalverluste über die Triplet-Bildung erfolgen.

[0016] Das Anregungsvolumen ist beim erfindungsgemäßen Messverfahren kleiner als bei der herkömmlichen 1-Photon-Anregung. Dies ermöglicht, Messungen bei höheren Probenkonzentrationen von ungefähr 100 nM durchzuführen, was Vorteile für die weitere Bewertung der Ergebnisse besitzt. Es können aber auch Konzentrationen im nM-Bereich ermittelt werden. Es werden kurze Analysezeiten im Bereich von einer oder wenigen Sekunden ermöglicht. Es werden Messungen in lebenden Zellen ermöglicht, die die genaue Bestimmung von Kinetiken und Konzentrationen doppelt markierter Moleküle oder Komplexe erlaubt.

[0017] Wichtige Merkmale der Erfindung bestehen darin, dass nur ein Anregungsvolumenelement gegeben ist, da zwei verschiedene Fluorophore monochromatisch mittels 2-Photonenanregung auf Einzelmolekülbasis angeregt werden. Die 2-Photonenanregung bietet insbesondere die folgenden Vorteile: es ist ein physikalisch perfektes Überlappen der Anregungsvolumenelemente für beide Fluorophore gegeben. Das Anregungsvolumenelement kann gegenüber herkömmlichen Verfahren verkleinert werden, d. h. es ist eine Messung von höheren Konzentrationen (100 nM und höher) möglich. Es erfolgt eine Detektion ohne Pinhole (Anregungsvolumenelement ist durch 2-Photonenanregung klein genug). Es wird eine Multi-Color-Detektion von drei oder mehr Fluorophoren auf Einzelmolekülbasis möglich, d. h. es kann eine monochromatische Anregung über 2-Photonen bei z. B. > 800 nm und eine Detektion von verschiedenen Fluorophoren von 300 bis < 800 nm erfolgen, ohne dass in diesem Bereich störende Anregungswellenlängen liegen, wie es bei der CW-Anregung notwendig ist. Es werden Messungen von Molekülen, insbesondere von Molekülkomplexen mit drei oder mehr Komponenten, ermöglicht.

Ausführungsbeispiel

[0018] Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung

werden aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

[0019] [Fig. 1](#) eine schematische Übersichtsdarstellung einer Messvorrichtung,

[0020] [Fig. 2](#) eine Illustration von molekularen Vorgängen, die mit Vorteil mit der Korrelationsmessung erfassbar sind,

[0021] [Fig. 3](#) Kurvendarstellungen der spektralen Eigenschaften von Markierungsfarbstoffen,

[0022] [Fig. 4](#), [Fig. 5](#) Messergebnisse zur Illustration der Quantenausbeute von Markierungsfarbstoffen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und der Anregungsleistung,

[0023] [Fig. 6](#), [Fig. 7](#) Kurvendarstellungen zur Illustration der Genauigkeit und Selektivität der Korrelationsmessung,

[0024] [Fig. 8](#) Kurvendarstellungen eines beobachteten enzymatischen Abbaus einer Substanz, und

[0025] [Fig. 9](#) eine schematische Übersichtsdarstellung einer herkömmlichen Messvorrichtung zur Zweifarben-Korrelationsmessung (Stand der Technik)

[0026] Die Erfindung wird im Folgenden unter Bezug auf 2-Photonen-Anregungen in Testsystemen mit zwei Fluoreszenzmarkern beschrieben. Entsprechende Umsetzungen der Erfindung ergeben sich bei Mehr-Farben-Anwendungen. Es können drei oder mehr geeignete Fluorophore mit einer einfarbigen 2-Photonen-Anregung zur Emission angeregt werden. Dies erlaubt die Vermessung komplexer molekularer und zellulärer Prozesse, an denen mehr als zwei Analyte beteiligt sind.

[0027] Der optische Aufbau eines 2-Photonen-Fluoreszenzkorrelationsspektrometers ist schematisch in [Fig. 1](#) illustriert. Das Spektrometer **100** umfasst eine Probenkammer **10**, eine Beleuchtungseinrichtung **20**, eine Detektoreinrichtung **30**, einen Korrelator **40** und ein Abbildungssystem **50**. Das Abbildungssystem **50** wird vorzugsweise durch einen invertierten Mikroskopaufbau (z. B. mit einem Olympus IX70-Mikroskop) gebildet. Die Probenkammer **10** ist ein anwendungsabhängig gewähltes Behältnis, in dem die Probe **11** ruhend oder strömend angeordnet ist. Die Probe **11** ist eine Lösung oder Suspension der zu untersuchenden Substanzen oder Partikel. Es kann vorgesehen sein, dass die Probenkammer **10** in einer oder mehreren Raumrichtungen beweglich angeordnet ist. Die Beweglichkeit der Probenkammer kann sich erstens auf eine Scan-Bewegung relativ zum Abbildungssystem **50** zur Rufnahme dreidimensionaler Abbildungen, z. B. dreidimensionaler Konzentrationsverteilungen in der Probe, beziehen. Fer-

ner ist es möglich, der Probenkammer **10** eine periodische Modulationsbewegung aufzuprägen, wie es in WO 99/34195 A1 beschrieben ist. Die zum Abbildungssystem **50** weisende Wand der Probenkammer **10** besitzt eine derart geringe Dicke, dass der Fokus **12** des Anregungslichts mit einem geringen Abstand von ca. 400 bis 500 μm vom Objektiv **51** gebildet werden kann. Die entsprechende Wand besitzt vorzugsweise die Dicke eines Deckglases, wie es in der Mikroskopie verwendet wird. Die Dicke beträgt bspw. ca. 150 bis 190 μm .

[0028] Die Beleuchtungseinrichtung **20** ist ein einzelner Laser, der für die 2-Photonen-Anregung der jeweils verwendeten Fluoreszenzmarker ausgelegt ist. Bei der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen wird vorzugsweise ein durchstimmbarer Pulslaser verwendet, wie z. B. ein modengekoppelter Tsunami Ti: Saphier-Laser (Hersteller: Spectra Physics, Mountain View, CA, Pulsfrequenz 80 MHz, Pulsbreite 100 fs, Durchstimbarkeit zwischen 700 und 1000 nm). Das parallele Laserlicht wird über den dichroitischen Spiegel **52** (z. B. vom Typ 710 DCSPXR, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) in das Objektiv **51** gelenkt (z. B. 60 \times 1.2-Objektiv UplanApo Olympus) und in der Probenkammer **10** fokussiert. Aus Kalibrierungsmessungen sind die Dimensionen des Anregungsvolumens r_0 und z_0 in der Fokalebene bekannt. Der Durchmesser des Fokus in der Fokalebene beträgt z. B. $r_0 = 0.48 \mu\text{m}$. Mit einem Verhältnis $r_0/z_0 = 2.8$ ergibt sich ein wirksames Anregungsvolumenelement von ungefähr 0.4 fl.

[0029] In diesem Anregungsvolumen wird je nach Anwesenheit von Fluoreszenzmarkern eine Fluoreszenzemission angeregt, die über das Objektiv **51**, den dichroitischen Spiegel **52**, einen Emissionsfilter **53** (z. B. vom Typ 600 DF 200, AHF Analysetechnik) zur Unterdrückung des Anregungslichts und eine Optik **54** auf einen zweiten dichroitischen Spiegel **55** (z. B. vom Typ 595 DCLP, AHF Analysetechnik) gerichtet wird. Am zweiten dichroitischen Spiegel **55** wird der kurzwellige Teil des Fluoreszenzlichtes reflektiert und durch einen Bandpassfilter **56** auf den Detektor **31** der Detektoreinrichtung gerichtet. Das am dichroitischen Spiegel durchgelassene Fluoreszenzlicht wird ebenfalls gefiltert (Kantenfilter **57**) und auf den Detektor **32** gerichtet. Die Einkopplung in die Detektoren erfolgt mit Lichtleitfasern **58** bzw. **59**. Die Detektoren sind bspw. Avalanche-Photodioden (Typ: SPCM-200, EG & G Optoelectronics, Kanada). Die optischen Einkopffasern besitzen einen Durchmesser von 100 μm und sind einzelnen in allen drei Raumrichtungen justierbar. Die Detektoren **31**, **32** sind mit einem Korrelator **40** verbunden. Als Korrelator wird bspw. eine Korrelatorkarte (Typ: ALV-5000, Hersteller LAV Langen, Deutschland) verwendet. Abweichend vom in [Fig. 1](#) gezeigten Aufbau kann auch auf die Einkopffasern verzichtet und das Fluoreszenzlicht direkt auf die Detektoren abgebildet wer-

den. Der optische Aufbau kann zusätzlich zur Aufnahme von konfokalen Spektren mit einem fasergekoppelten Spektrometer (Hersteller Ocean Optics, USA) ausgestattet sein.

[0030] Die Probe **11** in der Probenkammer **10** enthält mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analyte und/oder mindestens einen mit mindestens zwei Fluoreszenzmarkern markierten Analyten. Gegenstand der Fluoreszenzmessung ist bspw. eine Koinzidenzanalyse der mit den Detektoren **31**, **32** erfassten Fluoreszenzemissionen der verschiedenen Fluoreszenzmarker. Dies ist schematisch in [Fig. 2](#) illustriert. In der Probe sind bspw. die Analyten A1 und A2 enthalten, die jeweils mit Fluoreszenzmarkern M1 und M2 markiert sind. Die Analyten sind bspw. Paare von Antikörpern und Antigenen, deren Bindungsverhalten untersucht werden soll. Solange die Analyten A1 und A2 nicht aneinander gebunden sind, passieren sie getrennt zu verschiedenen Zeiten das Anregungsvolumen. Die Detektoren **31**, **32** liefern zeitlich getrennt Fluoreszenzsignale, die in [Fig. 2](#) (links, Mitte) schematisch durch Pfeile P1, P2 symbolisiert werden. Die Fluoreszenzsignale werden unkorreliert zu beliebigen Zeiten gemessen, ein Korrelations- oder Koinzidenzsignal G ist nicht ableitbar. Nachdem die Bindung zu einem Analyten A3 erfolgt ist, der die Fluoreszenzmarker M1 und M2 gemeinsam trägt, wird an beiden Detektoren **31**, **32** gleichzeitig die Fluoreszenzemission erfasst. Entsprechend ist ein Korrelations- oder Koinzidenzsignal ableitbar ([Fig. 2](#), rechts unten).

[0031] Umgekehrt kann auch die Zerlegung des Analyten A3 in Teilkomponenten detektiert werden, wie dies bspw. bei der Beobachtung des enzymatischen Abbaus eines zweifach mit Fluoreszenzmarkern gelabelten Substrats von Interesse ist. Allgemein werden mit dem beschriebenen Messverfahren vorzugsweise alle chemischen Reaktionen oder physikalischen Abläufe erfasst, bei denen eine chemische Bindung zwischen getrennten Analyten hergestellt oder eine vorhandene Bindung aufgeschnitten oder entsprechend eine physikalische Assoziation oder Dissoziation durchgeführt wird. Dem Messverfahren sind alle Analyten (Substanzen) zugänglich, die auf den verschiedenen Seiten der jeweils herzustellenden oder zu trennenden Verbindung mit Fluoreszenzmarkern markierbar sind.

[0032] Die Signalerfassung mit den Detektoren und die Korrelationsanalyse erfolgen in an sich von den FCS-Techniken bekannter Weise. Mit den Detektoren erfolgt eine Fluoreszenzmessung in vorbestimmten Zeitfenstern. Die Breite der Zeitfenster wird anwendungsabhängig gewählt. Sie wird vorzugsweise auf die mittlere Aufenthaltsdauer der Analyten im Messvolumen eingestellt. Die Aufenthaltsdauer ist insbesondere von der Molekül oder Teilchengröße und -beweglichkeit abhängig und kann gemessen oder

theoretisch abgeschätzt werden. Die in den Zeitfenstern erfassten Photonenzahlen werden in den beiden Detektionskanälen verglichen. Zur Koinzidenzanalyse erfolgt der Vergleich gleichzeitiger Zeitverläufe. Die Kreuzkorrelationsanalyse ist auf den Vergleich zeitlich versetzter Abläufe gerichtet. Die Korrelationsanalysen werden mit an sich bekannten Algorithmen zur Verarbeitung der Signale der verschiedenen Detektionskanäle durchgeführt.

[0033] Auf der Grundlage der Koinzidenzanalyse ist eine Konzentrationsmessung möglich. Aus der Stärke der erfassten Koinzidenzen (Amplitude von Koinzidenzsignalen) wird ein Maß für die Zahl der doppelt markierten Moleküle oder Teilchen in der Probe abgeleitet.

[0034] Die mit dem Korrelator **40** durchgeführte Kreuzkorrelations oder Koinzidenzanalyse der Detektorsignale erfolgt vorzugsweise in bekannter Weise, wie es in WO 99/34195 A1 beschrieben ist. Die dort offenbarten Einzelheiten zur Signalanalyse werden vollständig durch Bezugnahme in die vorliegende Beschreibung einbezogen.

[0035] Es kann insbesondere analog zu dem in WO 99/34195 A1 beschriebenen Verfahren vorgesehen sein, dass während der Fluoreszenzanalyse mittels eines Strahlscanners und/oder eines Probensantriebs zwischen der Probe und der Beleuchtungseinrichtung eine Relativbewegung eingestellt wird. Es erfolgt eine Erhöhung der Fluktuationsbewegungen, die Diffusionszeiten werden niedriger. Das Messvolumenelement kann durch die Probe gescannt werden. Bei Einstellung dieser Relativbewegung ist gegebenenfalls das Zeitfenster der Koinzidenzanalyse anzupassen.

[0036] Als Fluoreszenzmarker M1, M2 werden vorzugsweise Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, wie sie bspw. aus der Fluoreszenzmikroskopie bekannt sind. Es werden Farbstoffpaare ausgewählt, die bei einer ausgewählten Wellenlänge ähnliche Absorptionsquerschnitte aufweisen und spektral separierbare Fluoreszenzspektren bei hoher Photostabilität besitzen. Als Markerpaare werden bspw. die Farbstoffe Rhodamin Grün/Texas Rot, Fluoreszein-Derivate (z. B. Alexa 488/Alexa 594) oder molekularbiologische Farbstoffe wie grün fluoreszierende Proteine (GFP)/rot fluoreszierende Proteine (RFP) verwendet. Anstelle von Farbstoffen oder fluoreszierenden Proteinen können auch andere fluoreszierende Substanzen oder Partikel, z. B. sog. Quantum Dots, als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden. Es können auch autofluoreszierende Proteine, wie z. B. GFP, dsRED, autofluoreszierende Biomolekülen, z. B. Tryptophan, Tyrosin, oder Flavine, oder autofluoreszierende organische Molekülen verwendet werden. Das beschriebene Verfahren kann auch zur Erfassung von Ramanstreuung oder oberflächenverstärkter Ra-

manstreuung (surface enhanced raman scattering, SERS) ausgelegt sein.

[0037] **Fig. 3** zeigt die spektralen Eigenschaften des Markersystems Rhodamin Grün/Texas Rot. Beide Farbstoffe zeigen eine ähnlich hohe Fluoreszenzquantenausbeute und eine genügende Lichtstabilität, um die verwendeten Anregungsintensitäten zu tolerieren. Die Spektren (1) und (2) zeigen die Fluoreszenzemissionen von Rhodamin Grün bzw. Texas Rot (μM -Lösungen) bei einer Anregungswellenlänge von 830 nm. Die Kurve (3) zeigt den Transmissionsverlauf des dichroitischen Spiegels **55**. Im Bereich der kürzerwelligen Fluoreszenz (1) erfolgt die Reflexion zum Detektor **31**. Die Kurven (4) und (5) zeigen die Transmissionscharakteristik der Filter **56** bzw. **57**, die zur weiteren Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses vorgesehen sein können.

[0038] Die **Fig. 4** und **Fig. 5** illustrieren weitere spektrale Eigenschaften des Markerpaars Rhodamin Grün/Texas Rot. Zur Ermittlung der optimalen Anregungswellenlänge zur 2-Photonen-Anregung wird für jeden Farbstoff ein Anregungsspektrum im Bereich 740 nm bis 900 nm aufgenommen. Die Kurvenverläufe in **Fig. 4** zeigen ein Anregungsmaximum bei 780 nm für Texas Rot (Kreuze) und bei 850 nm für Rhodamin Grün (Dreiecke). Für die Fluoreszenzmessungen wird eine Anregungswellenlänge gewählt, bei der beide Farbstoffe mit nahezu gleicher Effizienz anregbar sind und/oder bei der beide Farbstoffe vergleichbar starke Fluoreszenzemissionen zeigen. Die Anregungswellenlänge beträgt beim dargestellten Beispiel 830 nm. **Fig. 5** zeigt, dass die Anregung bei 830 nm tatsächlich eine 2-Photonen-Absorption bewirkt. Für beide Farbstoffe wurde getrennt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungsleistung gemessen. Für beide Farbstoffe ergibt sich unterhalb der Sättigungsgrenze die für 2-Photonen-Prozesse zu erwartende quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der eingestrahlten Leistung. Die doppelt logarithmische Darstellung liefert die entsprechende linearisierte Form mit Steigung 2.

[0039] **Fig. 6** zeigt den Verlauf von Autokorrelationskurven, die mit einer Testlösung von Rhodamin Grün in den beiden Detektionkanälen aufgenommen wurden und eine entsprechende Kreuzkorrelationskurve zwischen beiden Detektionskanälen. Alle drei Kurven verlaufen im Wesentlichen gleich. Dies zeigt, dass die Detektionsvolumen identisch bzw. die Detektionsstrahlengänge genau auf das Anregungsvolumen justiert sind. Kreuzkorrelationsmessungen an doppelt markierten (obere Kurve) und einfach markierten (untere Kurve) DNA-Proben sind in **Fig. 7** illustriert. Als Vorteil des Messverfahrens zeigt sich, dass sich für die nicht-korrelierten Proben Kreuzkorrelationssignale G ergeben, die weniger als 10% der entsprechenden korrelierten Signale betragen. Damit

ist der beschriebene Aufbau den herkömmlichen 1-Photon-Messungen überlegen.

[0040] **Fig. 8** illustriert eine bevorzugte Anwendung des Messverfahrens zur Ermittlung von Konzentrationen in der Probe. Es wird die Echtzeitmessung von Enzymkinetiken dargestellt. Ein zweifach markiertes Substrat (DNA-Probe) wird enzymatisch in einzeln markierte Produkte zerlegt. Dementsprechend sinkt die Zahl der erfassten doppelt markierten Moleküle im Zeitverlauf. Mit zunehmender Konzentration des zugesetzten Enzyms (Endonuklease EcoRI) wird der Abfall der Substratkonzentration beschleunigt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Fluoreszenzmessung an einzelnen Analytmolekülen in einer Probe, wobei die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analytmoleküle und/oder mindestens ein mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markiertes Analytmolekül enthält, wobei die Fluoreszenzmarker spektral verschiedene Fluoreszenzemissionen besitzen, mit den Schritten:

- Beleuchtung der Probe in einem Messvolumen mit einer einzelnen Laserlinie zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarker,
- Detektion der Fluoreszenzemission mit mindestens zwei Detektoreinrichtungen, die zur Lichtdetektion in verschiedenen Spektralbereichen entsprechend den spektralen Fluoreszenzeigenschaften der unterschiedlichen Fluoreszenzmarker ausgelegt sind, und
- Durchführung einer Kreuzkorrelations- und/oder eine Koinzidenzanalyse von Detektorsignalen der Detektoreinrichtungen,

dadurch gekennzeichnet, dass

- die Beleuchtung der Probe mit einer derart hohen Anregungsintensität erfolgt, dass die unterschiedlichen Fluoreszenzmarker gemeinsam durch 2-Photonen-Absorptionen angeregt werden, und
- eine Erfassung eines Kreuzkorrelations- und/oder Koinzidenzsignals erfolgt, das dafür charakteristisch ist, ob die Probe das mindestens eine mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analytmolekül enthält, an dem beide Fluoreszenzmarker gleichzeitig angeregt werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zur Detektion der Fluoreszenzemission eine blendenfreie Abbildung des Lichtes, das vom Messvolumen und von der Umgebung des Messvolumens ausgeht, auf die Detektoreinrichtungen erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem als Fluoreszenzmarker Fluoreszenzfarbstoffe, fluoreszierende Proteine, Biomoleküle, organische Moleküle, Quantum Dots oder Marker, die zur Erfassung von Ramenstreuung ausgelegt sind, verwendet werden.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem als Fluoreszenzmarker Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die sich überlappende 2-Photonen-Anregungsspektren und unterschiedliche Fluoreszenzemissionsspektren besitzen.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem eine Koinzidenzanalyse der Detektorsignale erfolgt und aus dem Ergebnis der Koinzidenzanalyse die Konzentration von mehrfach markierten Analyten in der Probe abgeleitet wird

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem mittels eines Strahlscanners und/oder eines Probenantriebs zwischen der Probe und der Beleuchtungseinrichtung eine Relativbewegung eingestellt wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, bei dem die Koinzidenzanalyse durch Vergleich der in bestimmten Zeitfenstern erfassten Fluoreszenzsignale der verschiedenen Detektoreinrichtungen (**31**, **32**) erfolgt, wobei die Breite des Zeitfensters im Bereich der mittleren Aufenthaltsdauer der Analyten im Messvolumen eingestellt ist.

8. Vorrichtung zur Fluoreszenzmessung an einzelnen Analytmolekülen in einer Probe, wobei die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analytmoleküle und/oder mindestens ein mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markiertes Analytmolekül enthält, die umfasst:

- eine Probenkammer, in der die Probe angeordnet ist,
- eine Beleuchtungseinrichtung mit einem Laser, der zur Anregung von Fluoreszenzemission der mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarker mit einer einzigen Laserlinie eingerichtet ist,
- mindestens zwei Detektoreinrichtungen, die zur Detektion der Fluoreszenzemission in verschiedenen Spektralbereichen ausgelegt sind, und
- einen Korrelator zur Kreuzkorrelations- und/oder Koinzidenzanalyse von Detektorsignalen der Detektoreinrichtungen,

dadurch gekennzeichnet, dass

der Laser zur Beleuchtung der Probe mit einer derart hohen Anregungsintensität ausgelegt ist, dass die Fluoreszenzmarker, gemeinsam durch 2-Photonen-Absorptionen angeregt werden, und

- der Korrelator (**40**) zur Abgabe eines Kreuzkorrelations- und/oder Koinzidenzsignals ausgelegt ist, das dafür charakteristisch ist, ob die Probe (**11**) das mindestens eine, mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Analytmolekül enthält an dem beide unterschiedlichen Fluoreszenzmarker gebunden sind.

9. Vorrichtung gemäß Anspruch 8, bei dem der Laser bei einer Anregungslinie emittiert, die im roten oder nahinfraroten Spektralbereich liegt.

10. Vorrichtung gemäß Anspruch 8 oder 9, bei der ein Abbildungssystem (50) mit Pinhole-freiem Aufbau vorgesehen ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

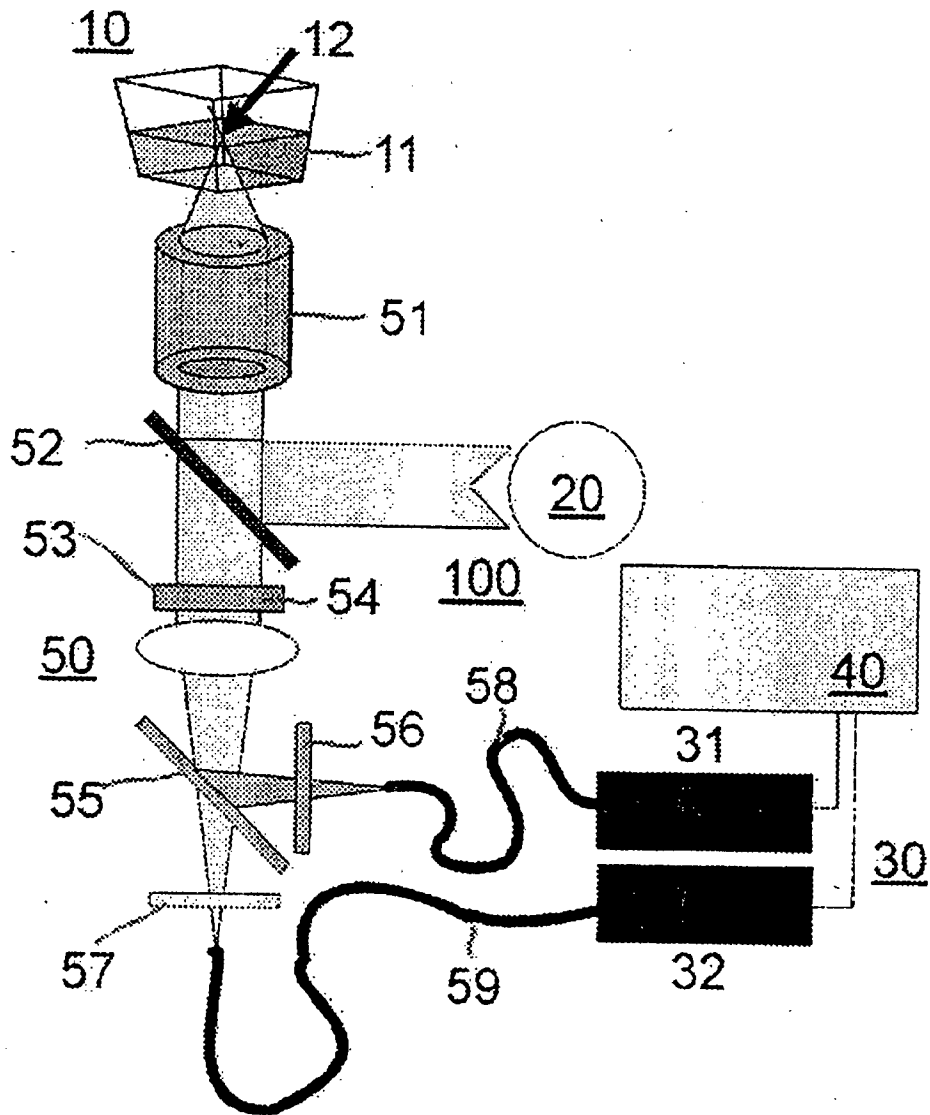


Fig. 1

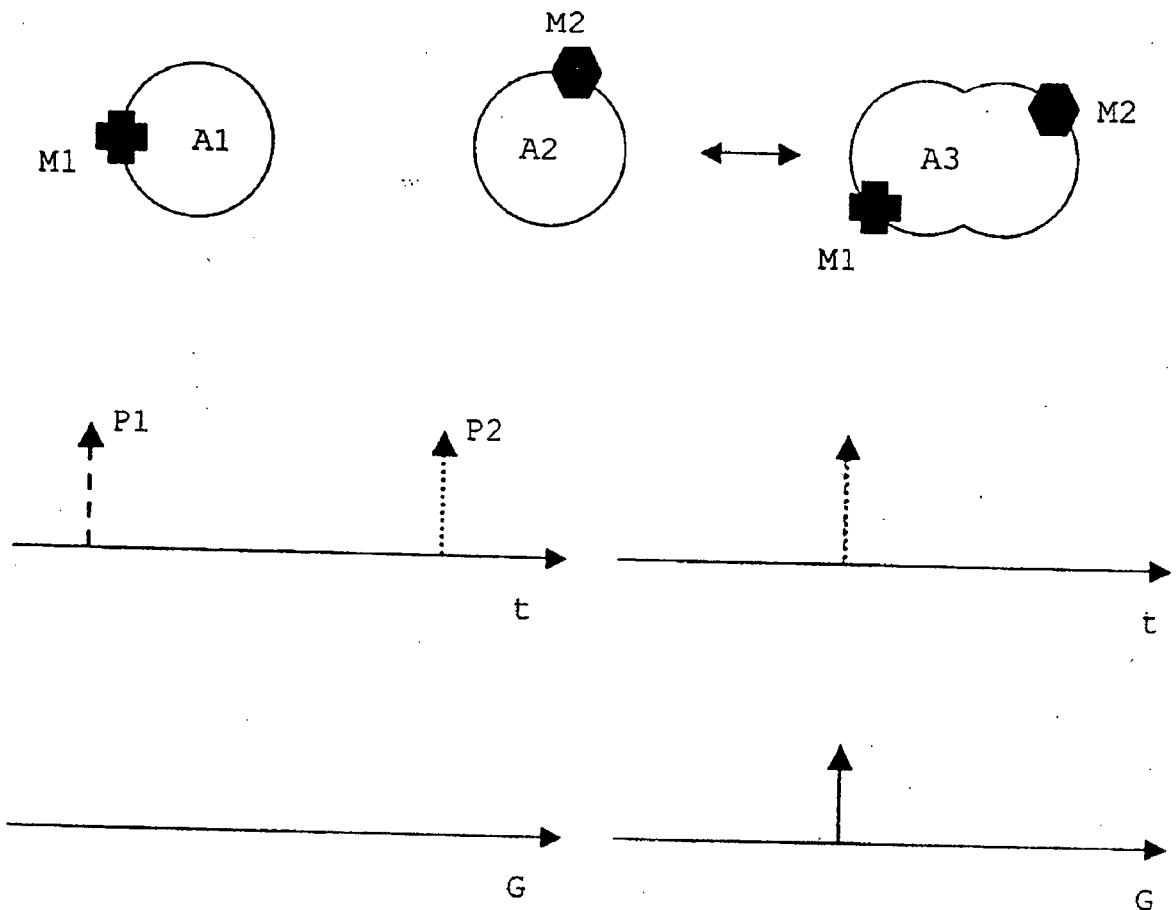


Fig. 2

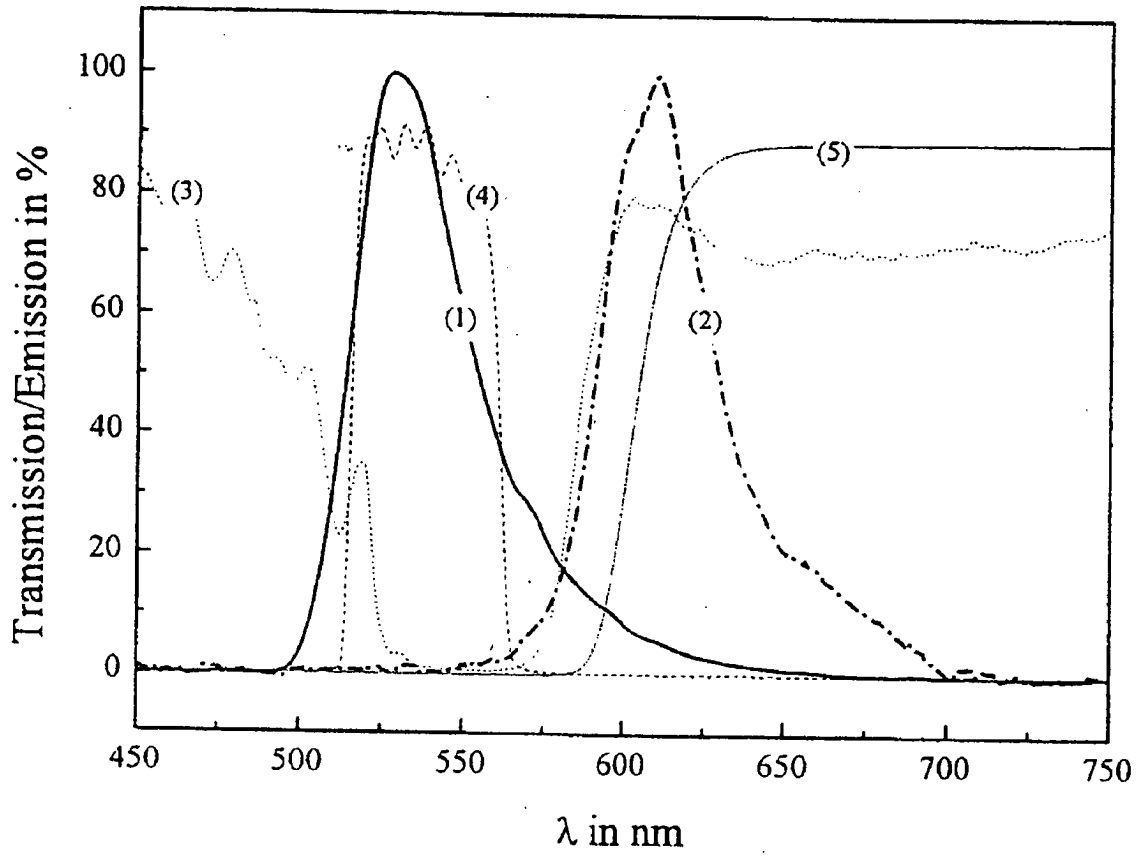


Fig. 3

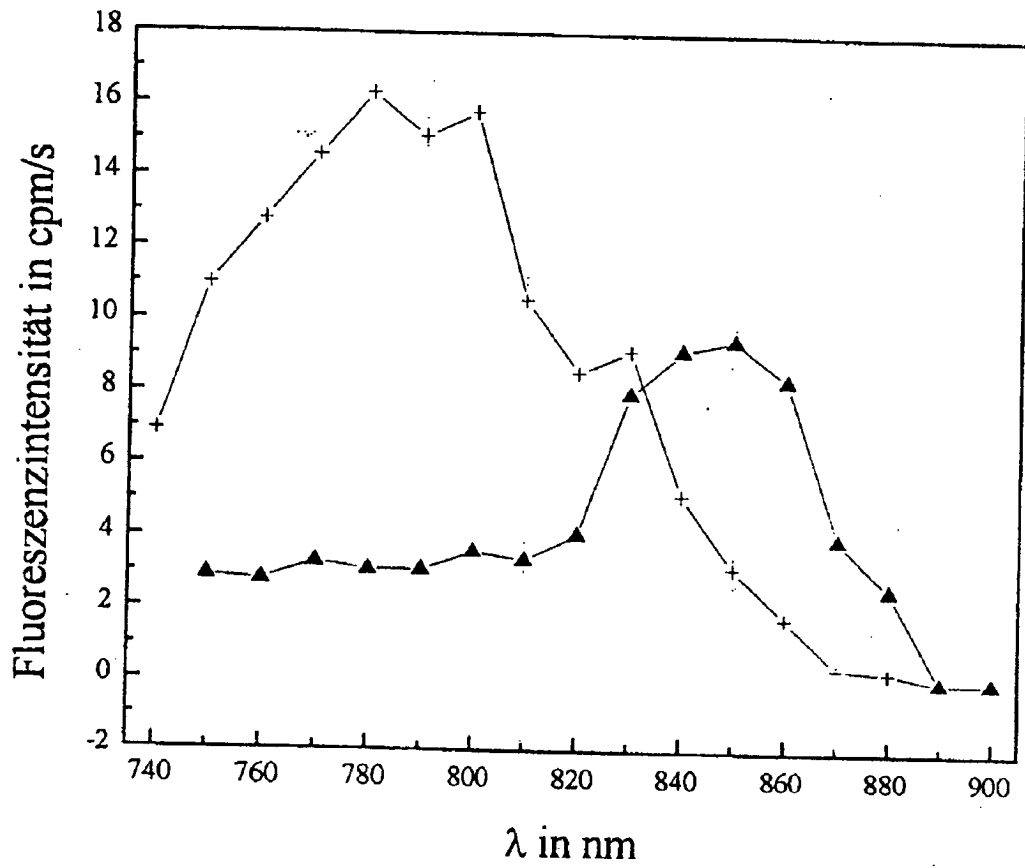


Fig. 4

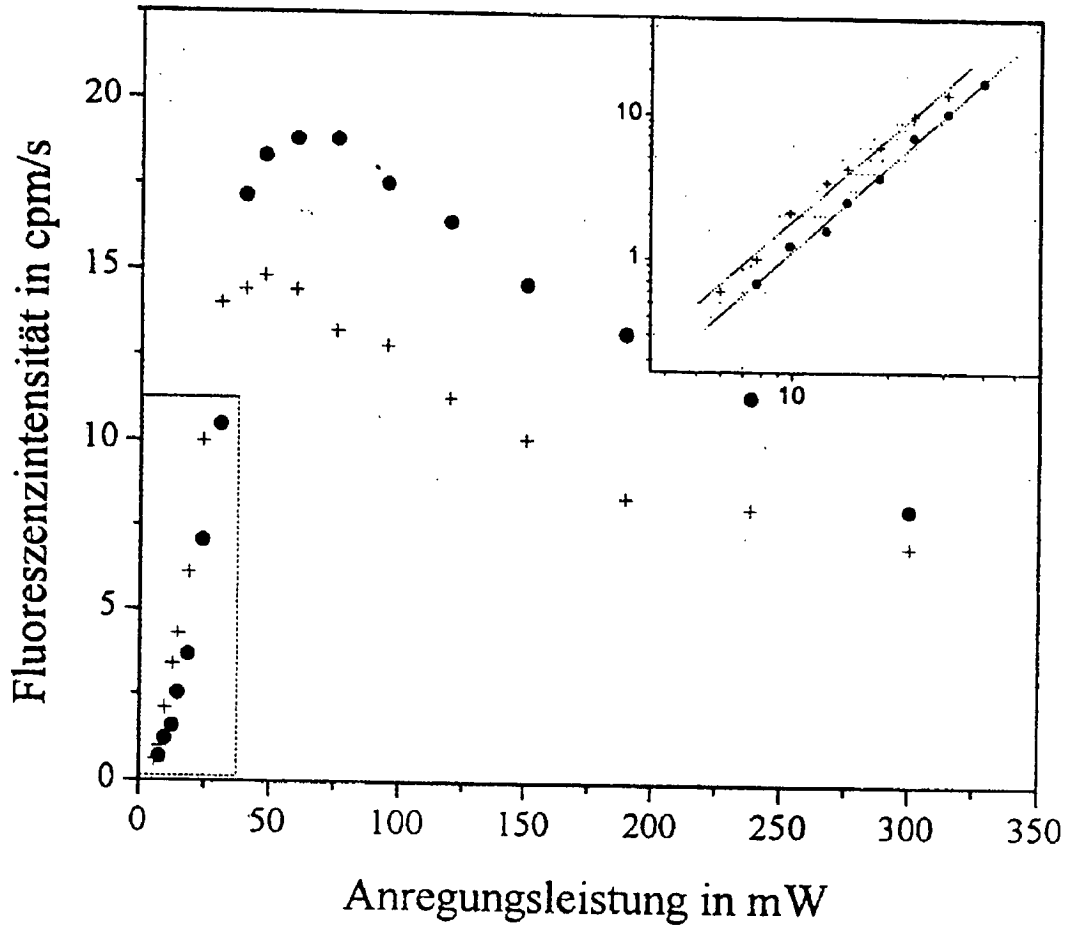


Fig. 5

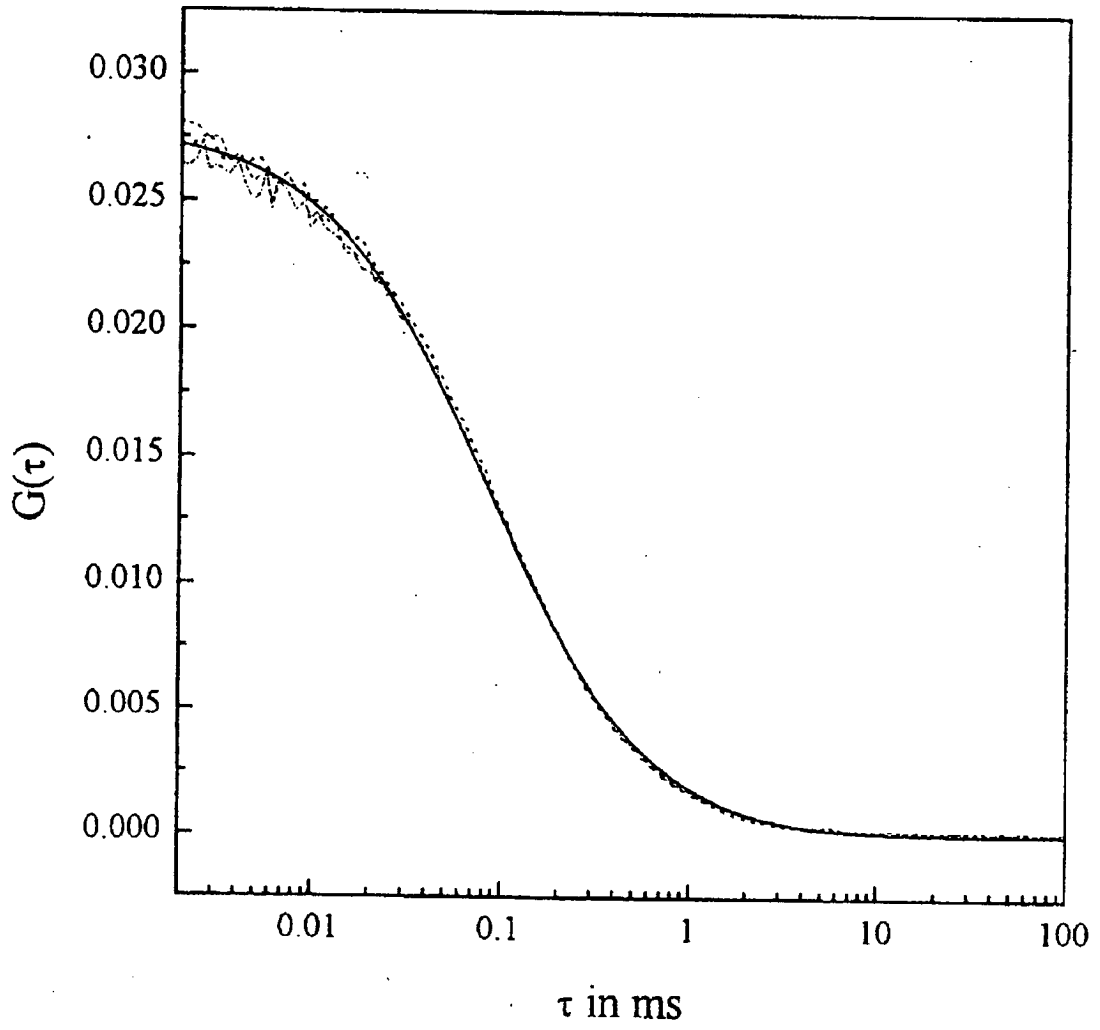


Fig. 6

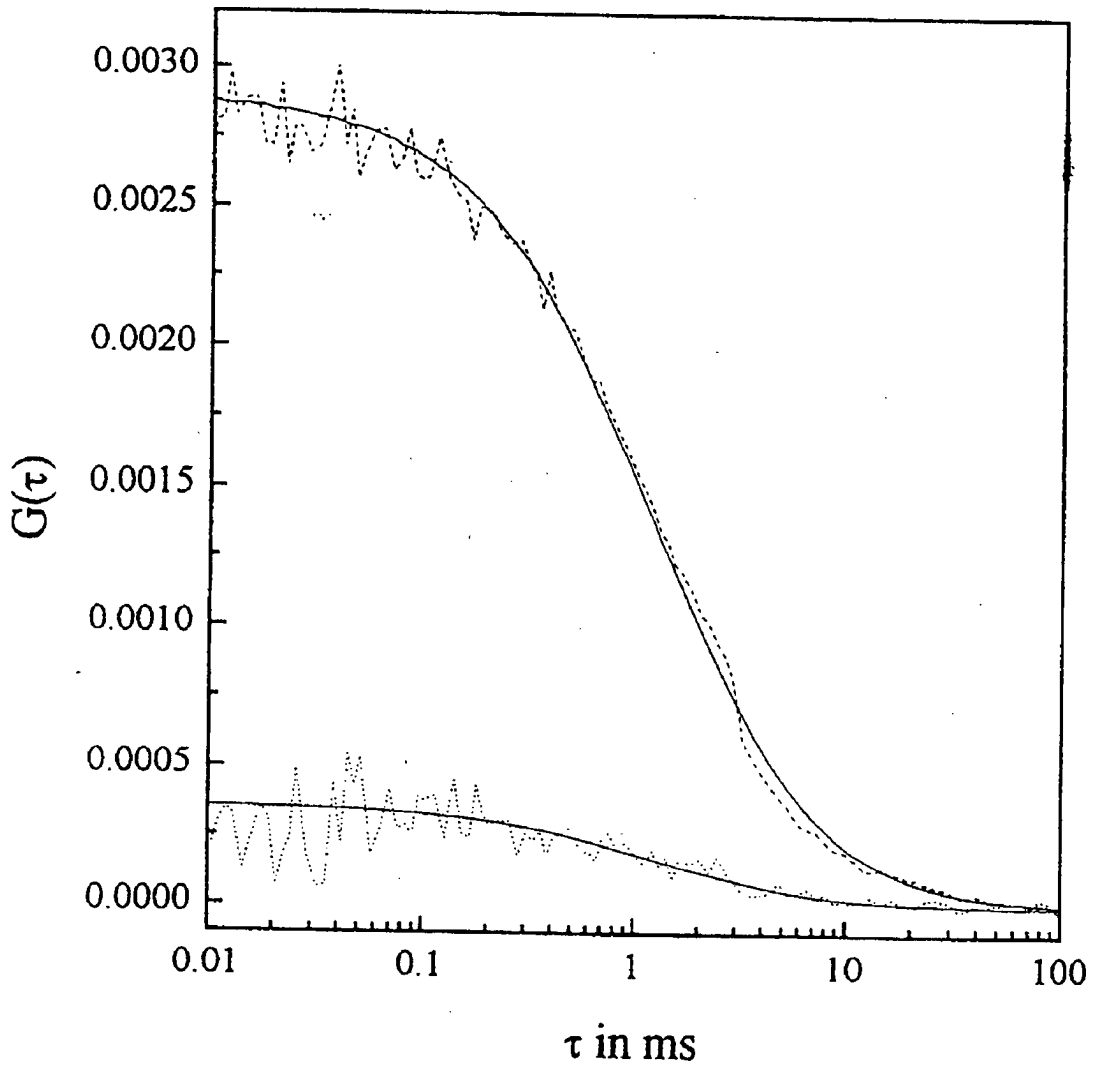


Fig. 7

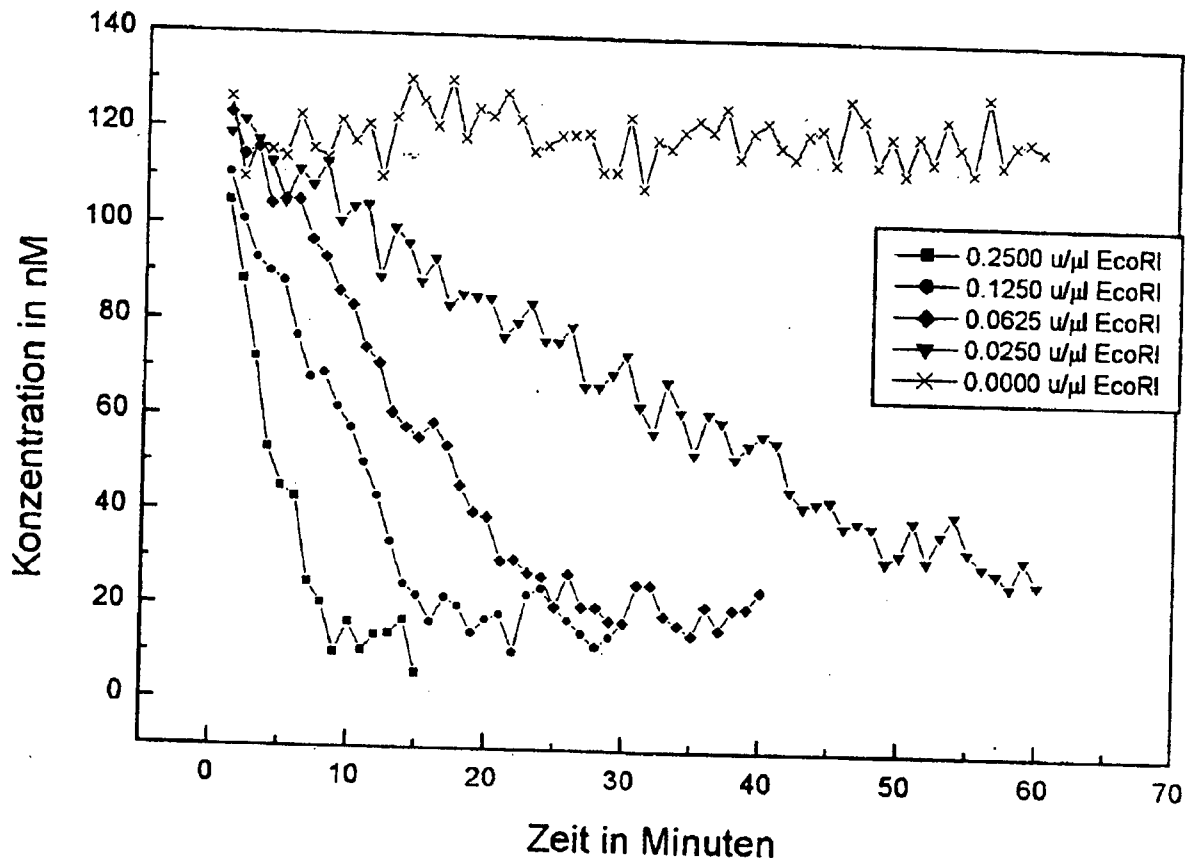


Fig. 8

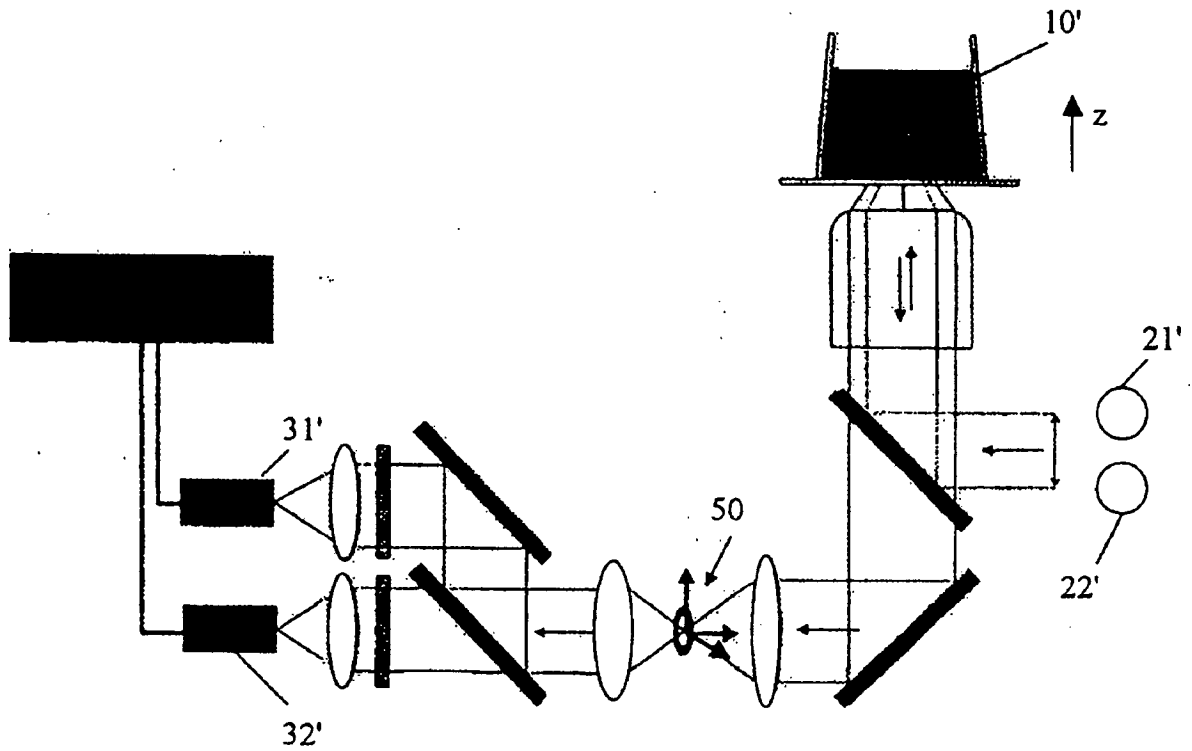


Fig. 9
(Stand der Technik)