



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2006 033 294 A1** 2008.01.31

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2006 033 294.6**

(22) Anmeldetag: **17.07.2006**

(43) Offenlegungstag: **31.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/00 (2006.01)**

(71) Anmelder:
Evotec Technologies GmbH, 22525 Hamburg, DE

(72) Erfinder:
Kottig, Karsten, Dr., 22589 Hamburg, DE

(74) Vertreter:
**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
EP 16 72 353 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Analyseverfahren für chemische und/oder biologische Proben**

(57) Zusammenfassung: Ein Analyseverfahren für chemische und/oder biologische Proben, das insbesondere zur Analyse von zellulären Proben geeignet ist, weist folgende Schritte auf:

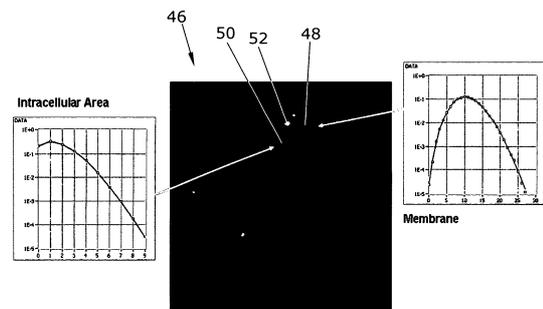
Aufnehmen eines Probenbildes (46), wobei das Probenbild (46) eine Vielzahl von Pixeln aufweist,

Erzeugen von Analysedaten je Pixel,

Bestimmen von für die Analyse interessierenden Pixeln und

Auswerten der erzeugten Analysedaten je interessierendem Pixel vorzugsweise durch Fluktuationsanalyseverfahren,

dadurch gekennzeichnet, dass die Analysedaten während der Bildaufnahme erzeugt werden und in Zeitreihen aufgelöste Pixelinformationen umfassen, welche zur vorzugsweise auf Fluktuationsanalyseverfahren beruhenden Auswertung genutzt werden.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Analyseverfahren für chemische und/oder biologische Proben.

[0002] Derartige Proben weisen zu analysierende Partikel, insbesondere Zellen auf. Die Analyse erfolgt beispielsweise mittels Screeningverfahren, insbesondere Hochdurchsatz-Screening Verfahren, mit denen insbesondere die Wirkstoffforschung unterstützt wird. Bei derartigen Verfahren werden eine Vielzahl von Proben, die sich beispielsweise in einzelnen Wells einer Titerplatte befinden, mit bildgebenden Verfahren untersucht. Hierbei wird je Well ein Probenbild insbesondere durch Screening erzeugt. Das Probenbild wird beispielsweise mit Hilfe einer CCD Kamera oder einer Photodiode aufgenommen, wobei die Probe beispielsweise zeilenweise abgetastet wird. Hierzu wird beispielsweise von einem Laser ein entsprechender Beleuchtungs- bzw. Anregungsstrahl erzeugt und in der Probe zeilenweise bewegt. Die von der Probe abgegebene Strahlung wird mittels einer Detektoreinrichtung, die mehrere Detektoren umfassen kann, bei denen es sich insbesondere um CCD-Kameras oder Photodioden handelt, aufgenommen.

[0003] Beispielsweise wird im Bereich einer Zellmembran in einem ersten Schritt ein Probenbild erzeugt. Die von der Probe abgegebene Strahlung (z.B. Fluoreszenzemission) wird hierbei registriert und ein korrespondierendes Probenbild wird gespeichert. Im nächsten Schritt wird, beispielsweise durch Schwellwertverfahren, die Lage der Zellmembran, oder eines anderen interessierenden Bereichs der Zelle, ermittelt. Nach der Ermittlung einer interessierenden Position im Probenbild wird die korrespondierende Position in der Probe zur Aufnahme von Analysedaten wie Fluktuationsdaten beobachtet. Dies erfolgt dadurch, dass die Probe im Bereich dieser Position nochmals über einen längeren Zeitraum beleuchtet bzw. angeregt wird und die von der Probe an der interessierenden Position abgegebene Strahlung gemessen wird. Die hierdurch erhaltenen Analysedaten werden sodann analysiert, wobei es sich beispielsweise um Fluoreszenz-Fluktuationsanalysen handelt. Insbesondere bei hohen Anforderungen an die Auslesegeschwindigkeit, wie beispielsweise bei lebenden Zellen und beim Wirkstoff-Screening weist dieses Verfahren jedoch insbesondere den Nachteil auf, dass die Zeitspanne zwischen der Erzeugung des Probenbildes und der Bestimmung einer interessierenden Position relativ groß ist, so dass die Zelle sich bereits derart bewegt hat, dass die anschließend aufgenommenen Analysedaten verfälscht werden oder nicht mehr aussagekräftig sind.

[0004] Dieses Verfahren, das insbesondere zur Bestimmung von molekularen Eigenschaften in heterogenen Umgebungen wie zellulären Systemen dient,

weist somit mehrere, aufeinander folgenden Schritte auf. Insbesondere erfolgt nach der Bildaufnahme eine Untersuchung des Bildes zur Orientierung in der Probe, wobei häufig manuell die interessierenden Bereiche bzw. Positionen ausgewählt werden müssen. Anschließend erfolgt eine weitere Datenaufnahme für die interessierenden Positionen, d.h. eine erneute Datenaufnahme in den interessierenden Bereichen. In einem weiteren Schritt werden sodann die erhaltenen Analysedaten zur molekularen Informationsgewinnung analysiert.

[0005] Aufgabe der Erfindung ist es ein Analyseverfahren für chemische und/oder biologische Proben, die insbesondere Zellen aufweisen, dahingehend weiter zu bilden, dass die Qualität der einzelnen Analysedaten verbessert ist.

[0006] Die Lösung der Aufgabe erfolgt durch die Merkmale des Anspruchs 1.

[0007] Das erfindungsgemäße Analyseverfahren für chemische und/oder biologische Proben ist insbesondere für zelluläre Systeme, d.h. Proben, in denen Zellen enthalten sind, geeignet. Insbesondere bei zellulären Systemen liefern lokale Eigenschaften einzelner Bereiche, wie der Zellmembran, des Zytoplasma und des Nukleus, wichtige Informationen über das Gesamtsystem. Durch die Möglichkeit die molekularen Daten und Attribute einzelner Bereiche miteinander zu verknüpfen, zu vergleichen und in Beziehung zu setzen, können zelluläre Vorgänge quantitativ bereits auf molekularer Ebene beschrieben und Veränderungen beobachtet werden. Dies ist insbesondere zur Wirkstoffforschung erforderlich; hierbei ist es wichtig, dass die Analysedaten verlässlich sind und nicht durch Artefakte verfälscht werden. Das erfindungsgemäße Analyseverfahren wird insbesondere mittels Hochdurchsatz-Screening durchgeführt, bei dem eine Vielzahl von Proben, die insbesondere in Wells einer Titerplatte angeordnet sind, untersucht werden.

[0008] In einem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens wird ein Probenbild aufgenommen. Die Aufnahme des Probenbildes erfolgt insbesondere über digitale Aufnahmeverfahren. Hierzu wird die Probe vorzugsweise zeilenweise gescannt. Das Probenbild, das eine Vielzahl einzelner Pixel aufweist, wird vorzugsweise über CCD-Kameras aufgenommen. Beim Abscannen der Probe wird die Probe zeilenweise beleuchtet bzw. durch Strahlung angeregt. Die hierdurch von der Probe abgegebene Strahlung wird insbesondere pixelweise erfasst. Hierzu wird der Bereich der Probe, der einem Pixel entspricht, über einen bestimmten Zeitraum bestrahlt und die von der Probe abgegebene Strahlung von dem entsprechendem Pixel erfasst. Erfindungsgemäß werden bereits während der Bildaufnahme, d.h. während des Erzeugens des Probenbildes für je-

des einzelne Pixel Analysedaten erzeugt. Erfindungsgemäß erfolgt somit das Erzeugen des Probenbildes sowie das Erzeugen bzw. Speichern der Analysedaten gleichzeitig. Erfindungsgemäß umfassen die Analysedaten in Zeitreihen aufgelöste Pixelinformationen, welche später bevorzugt durch Fluktuationsanalysemethoden ausgewertet werden. Die in Zeitreihen aufgelöste Pixelinformation umfasst insbesondere Informationen über das Eintreffen von Photonen bzw. die zeitliche Abfolge von Photonen auf einem Detektor. Anschließend erfolgt ein Bestimmen der für die Analyse interessierenden Pixel. Dies erfolgt über bekannte Methoden, wie beispielsweise Schwellwertverfahren, im Probenbild. Sodann werden die interessierenden Pixel, zu denen die Analysedaten, welche in Zeitreihen aufgelöste Pixelinformationen umfassen, bereits vorliegen, ausgewertet. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die für die Datenaufnahme erforderliche Zeit somit erheblich reduziert werden. Dies hat insbesondere den Vorteil, dass ein zeitlicher Abstand zwischen der Erzeugung des Probenbildes und des Beobachtens einzelner interessierender Pixel, wie im Stand der Technik beschrieben, nicht gegeben ist. Die Gefahr, dass durch Verschiebungen in der Probe auf Grund der Zeitdiskrepanz ein falscher Bereich beobachtet wird, ist somit vermieden. Ebenso können Verfälschungen der Analysedaten, die durch sonstige Veränderungen mit der Zeit, wie sie in lebenden Zellen unweigerlich auftreten, hervorgerufen werden, vermieden werden. Hierdurch kann die Qualität der Analysedaten erheblich verbessert werden.

[0009] Vorzugsweise wird die Zeitreihe je Pixel in einzelne Zeitabschnitte unterteilt. In den einzelnen Zeitabschnitten werden die Analysedaten erfasst. Beispielsweise wird über die gesamte Zeitreihe die Helligkeit des einzelnen Probenbereichs, der vorzugsweise einem Pixel entspricht, erfasst. Gleichzeitig werden in den einzelnen Zeitabschnitten Fluktuationsmessungen durchgeführt. Die einzelnen, bei dieser Analyse erhaltenen Analysedaten werden vorzugsweise abgespeichert. Hierbei werden insbesondere zur Helligkeitsmessung sowie zur Fluktuationsbestimmung die auf das Pixel auftreffenden Photonen innerhalb kurzer Zeitabschnitte gezählt.

[0010] Die je Zeitabschnitt für jedes einzelne Pixel aufgenommenen Einzeldaten, wie beispielsweise die Photonenanzahl je Zeitabschnitt werden insbesondere abgespeichert. Zur Detektion der Photonen wird vorzugsweise eine CCD-Kamera oder eine Photodiode verwendet, mit der ein äußerst schnelles Auslesen der gemessenen Daten je Pixel möglich ist. Als entsprechender Detektor ist beispielsweise die iXON-Kamera des Herstellers Andor oder die SPCM-Photodioden des Herstellers PerkinElmer geeignet.

[0011] Vorzugsweise umfassen die Analysedaten

die Einzeldaten, insbesondere alle Einzeldaten, je Pixel. Wie vorstehend beschrieben, kann beispielsweise durch Zählen der Photonen einerseits die Helligkeit über die gesamte Zeitreihe, und andererseits zur Fluktuationsbestimmung die Zahl der Photonen je Zeitabschnitt bestimmt werden, um diese einer Fluktuationsanalyse zu unterziehen.

[0012] Die Zeitabschnitte je Pixel innerhalb derer die einzelnen Analysedaten erzeugt bzw. aufgenommen werden, liegen vorzugsweise im Bereich von 100 ns bis 10 ms, bevorzugt 1 bis 1000 µs, besonders bevorzugt im Bereich von 20 bis 200 µs. Die gesamte Aufnahmezeit zur Erfassung einer Zeitreihe je Pixel liegt vorzugsweise im Bereich von 0.1 bis 100 s. Die einzelnen Zeitabschnitte zur Erzeugung von Analysedaten grenzen vorzugsweise zeitlich unmittelbar aneinander. Ggf. ist zwischen den Zeitabschnitten eine geringe Pause, in der die gemessenen Daten ausgelesen werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist es auch möglich, einzelne Zeitabschnitte zu verwerfen und diese nicht einer weiteren Analyse zu unterziehen. Beispielsweise können dies Zeitabschnitte sein, in denen keine oder nur eine sehr geringe Anzahl von Photonen auf dem Detektor eintreffen. Diese bevorzugte Ausführungsform ist insbesondere im Rahmen der sog. Burst Integrated Lifetime Analyse ausführbar. Sie hat ferner den Vorteil, dass sie einer generellen Reduktion der Daten dient.

[0013] Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bestimmung der für die Analyse interessierenden Pixel nach der Datenaufnahme. Dies ist möglich, da erfindungsgemäß zeitlich während der Aufnahme des Probenbildes die Analysedaten, welche bereits in Zeitreihen aufgelöste Pixelinformationen umfassen, erfasst werden. Sämtliche, zur anschließenden Bestimmung der interessierenden Pixel, sowie zur Auswertung der Daten, erforderlichen Daten liegen bereits vor. Dies hat den Vorteil, dass für die Bestimmung der interessierenden Daten ausreichend Zeit verbleibt und dies nicht in einem möglichst kurzen Zeitraum erfolgen muss, um eine möglichst geringe Veränderung der Probe zu haben. Vielmehr ist es möglich, mit zeitlich aufwendigen, dafür sehr genauen Methoden, die interessierenden Pixel, wie beispielsweise die Pixel der Zellmembran, auszuwählen. Auch die anschließende Auswertung der erzeugten Analysedaten je interessierendem Pixel kann über einen längeren Zeitraum erfolgen. In der besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist es somit wesentlich, dass die Bestimmung der interessierenden Pixel zeitlich nach dem Erzeugen der Analysedaten erfolgt.

[0014] Die interessierenden Pixel können beispielsweise durch eine Schwellwertanalyse des Probenbildes bestimmt werden. Zudem können Verfahren zur Identifikation von Pixeln aufgrund ihrer Nachbarschaft, bevorzugt über Faltungsverfahren, modellba-

sierte Algorithmen, Neuronale oder Cluster Analyse herangezogen werden.

[0015] Bei einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt ein Bestimmen von Pixeltypen, welche z.B. bestimmten subzellulären Strukturen zugeordnet sind. Derartige subzelluläre Strukturen sind beispielsweise die Zellmembran, das Zytoplasma oder der Nukleus einer Zelle. Die korrespondierenden Pixel im Probenbild können zu Pixeltypen oder Pixelgruppen zusammengefasst bzw. diesen zugeordnet werden. Dies hat den Vorteil, dass die zu diesen Pixeltypen bzw. Pixelgruppen zugehörigen Analysedaten insbesondere gemeinsam ausgewertet werden können. Beispielsweise kann eine Fluktuationsanalyse über sämtliche Analysedaten I der Zellmembran erfolgen. Dies führt dazu, dass das Analyseergebnis erheblich verbessert wird, da lokal auftretende Schwankungen oder Messungenauigkeiten das Analyseergebnis nur geringfügig verändern.

[0016] Das erfindungsgemäße Verfahren weist insbesondere den Vorteil auf, dass pro Messpunkt, d.h. pro Pixel, eine hohe Zeitauflösung möglich ist, so dass für jedes Pixel statistische Momente, Histogramme und/oder Korrelationen erstellt werden können. Mit Hilfe von statistischen Momenten können Zählraten, sowie CPP-Auswertungen (CPP = counts per particle) erfolgen. Das Erstellen von Histogrammen ist zur Auswertung mit Hilfe der Analysemethoden FIDA und FIDA 2D möglich. Korrelationsdaten werden beispielsweise für FCS-Auswertungen und FCCS-Auswertungen benötigt. Besonders vorteilhaft ist es, dass die durch die Analyse einzelner Zeitreihen unter Zuhilfenahme einer molekularen Interpretation gewonnenen Informationen unmittelbar als Bildattribute (lokale Konzentration, molekulare Helligkeit, Diffusionszeit, Partikelanzahl etc.) definiert werden können. Die zeitaufgelöste Pixelinformation wird in diesen Verfahren also direkt als mathematische Funktion umgerechnet oder durch Optimierungsverfahren werden Parameter entsprechend eines molekularen Modells iterativ angepaßt, so dass z.B. die mittlere Aufenthaltsdauer eines Partikels innerhalb des Beobachtungspixels in eine Diffusionszeit umgerechnet werden kann. Diese pixelabhängigen Parameter können anschließend wieder als Bildinformation aufbereitet werden, so dass statt der allgemein üblichen integrierten Helligkeitsinformation pro Pixel nun die Partikel-Diffusionszeit pro Pixel aufgetragen wird.

[0017] Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass durch die punktweise Interpretation je Pixel mehr Informationen vorliegen, und somit beispielsweise auch eine schärfere Trennung einzelner Bereiche der Probe möglich ist. Beispielsweise kann sich ein Bild mit homogener Intensität (Zählrate je Pixel) durchaus in der molekularen

Helligkeit (Zählrate je Molekül) unterscheiden.

[0018] Insbesondere können mit Hilfe des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens folgende Analysen durchgeführt werden:

Single Trace Imaging (CPP Imaging): Auf Grundlage der zeitaufgelösten Pixelinformation (kanalabhängige Countrate mit z.B. 1 μ s Zeitauflösung) wird für die Ermittlung der ortsabhängigen Counts-Per-Particle (CPP) Information zunächst eine Umsetzung auf eine neue Zeitbasis (typisch 40 μ s) durch Aufsummierung über Zeitabschnitte durchgeführt. Aus diesen Fluktuationstraces oder Zeitreihen werden die Basismomente (speziell das 1. Moment und 2. Zentralmoment) direkt berechnet, um hieraus jedem Pixel einen CPP-Wert zuordnen zu können. Dieses Verfahren ermöglicht es, Aussagen über die ortsabhängige Fluktuationsdetektionseffizienz zu treffen und dient speziell auch zur Charakterisierung und zur Optimierung des optischen Systems.

[0019] Single Trace Imaging (FIDA2D Imaging): Die zeitaufgelösten Pixelinformationen (2-Kanal Countrate mit z.B. 2 μ s Zeitauflösung) werden in diesem Fall zunächst auf eine neue Zeitbasis (typisch 40 μ s) durch Aufsummierung über Zeitabschnitte zusammengefasst. Auf Grundlage dieser Fluktuationstraces oder Zeitreihen kann über die Verknüpfung (z.B. Summe über alle Zeiten t des Verhältnisses $(C1(t)-C2(t))/(C1(t)+C2(t))$) eine Aussage über die molekulare Koinzidenz getroffen werden. Die Fluktuationstraces können zudem entsprechend der FIDA2D Datenverarbeitung in einem 2D-Histogramm zusammengefasst und dann gefittet werden. Dieses Verfahren kann speziell bei FREI und anderen Zwei-Farbstoff-Systemen eingesetzt werden. Ebenso ist über einen Polarisationsfilter eine molekulare, bildgebende Anisotropie bestimmbar.

[0020] Single Trace Imaging (FCS Imaging): Die zeitaufgelösten Pixelinformationen (kanalabhängige Countrate mit z.B. 1 μ s Zeitauflösung) werden in diesem Fall autokorreliert und entsprechend eines FCS-Modells gefittet. Aufgrund der geringen Meßzeit pro Pixel (typisch 1–100 ms) ist die Korrelationsfunktion zumeist nur eingegrenzt fittbar, so dass einfache Vergleiche (z.B. lineare Approximation des Kehrwerts) teilweise stabilere Beweglichkeitsattribute (Diffusionszeiten) ergeben.

[0021] Single Trace Imaging (FIMDA Imaging): Die zeitaufgelösten Pixelinformationen (kanalabhängige Countrate mit z.B. 1 μ s Zeitauflösung) werden in diesem Fall mit unterschiedlichen Integrationszeiten (z.B. 40 μ s, 200 μ s) pro Zeitabschnitt zusammengefasst. Aus diesen verschiedenen Pixeltraces können unterschiedliche Histogramme erzeugt werden, welche über die FIMDA-Theorie lokale Aussagen über die Beweglichkeit von Partikeln und ihre molekulare Helligkeit und Konzentration liefern.

[0022] Mask Combined Traces (Additive 2D Histogramme): Die zeitaufgelösten Pixelinformationen (2-Kanal Countrate mit z.B. 2 μ s Zeitauflösung) werden in diesem Fall zunächst auf eine neue Zeitbasis (typisch 40 μ s) durch Aufsummierung über Zeitabschnitte zusammengefasst. Diese pixelweisen Fluktuationstraces werden zudem entsprechend der FIDA2D Datenverarbeitung in einem 2D-Histogramm pro Pixel zusammengefasst. Über eine Maske (z.B. Zytoplasmaregion einer Zelle) werden diese Histogramme zusammengefasst und mit der entsprechenden Theorie (z.B. FIDA2D) gefittet.

[0023] Mask Combined Traces (Single-Trace FCS Fitting): Die zeitaufgelösten Pixelinformationen (kanalabhängige Countrate mit z.B. 1 μ s Zeitauflösung) werden in diesem Fall über eine Maske (z.B. Maske aller Zellkernpixel) selektiert, als Gesamttrace zusammengefügt und dann mathematisch aufbereitet, üblicherweise autokorreliert, und gefittet.

[0024] Mask Combined Traces (Multi-Trace Fitting): Die zeitaufgelösten Pixelinformationen (kanalabhängige Countrate mit z.B. 1 μ s Zeitauflösung) werden in diesem Fall autokorreliert. Aufgrund der geringen Meßzeit pro Pixel (typisch 1–100 ms) ist die Korrelationsfunktion zumeist nur eingegrenzt fitbar, so dass in einem Combined-Fitting-Ansatz verschiedene Pixeltraces gemeinsam betrachtet werden. Diese Pixeltraces werden zuvor über eine Maskengeneration mit Hilfe von Zell-Erkennungsroutinen erzeugt. D.h. eine Membran-Erkennungsroutine liefert eine für jede Zelle individuelle Maske (Acapella-Objects-Stencil) und diese dient als Selektionshilfe für die Pixeltraces.

[0025] Nachfolgend wird die Erfindung anhand einer bevorzugten Ausführungsform unter Bezugnahme auf die anliegenden Zeichnungen näher erläutert.

[0026] Es zeigen:

[0027] [Fig. 1](#) eine prinzipielle Darstellung einer Vorrichtung, die zur Durchführung des Verfahrens geeignet ist, und

[0028] [Fig. 2](#) ein Beispiel eines Probenbildes sowie der an einzelnen Pixeln erhaltenen Analysedaten, und

[0029] [Fig. 3](#) ein Flussdiagramm einer bevorzugten Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0030] Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist beispielsweise die in [Fig. 1](#) schematisch dargestellte Vorrichtung geeignet. Hierbei wird eine Probe **10** mittels einer Anregungseinrichtung, wie einem Laser, beleuchtet bzw. angeregt. Der Anregungsstrahl **14** wird über einen dichroitischen Spiegel **16** über ein Prisma **18** und einen bewegbaren Spiegel **20** in Richtung eines Objektivs **22** und von

diesem in die Probe **10** geleitet und in dieser fokussiert. Der Fokussierpunkt **24** wird durch Bewegen des Spiegels **20** in der Probe bewegt, so dass ein Abscannen der Probe **10** zum Erzeugen eines Probenbildes erfolgt. Die von der Probe abgegebene Strahlung **26** wird vom Objektiv aufgenommen und über den Spiegel **20**, das Prisma **18** und durch den dichroitischen Spiegel **16** hindurch in Richtung einer Aufnahmeeinrichtung **28** gelenkt. Hierbei wird der Strahl von einer Tubuslinse **30**, der ggf. ein optischer Filter **32** vorgeschaltet ist, gebündelt und ggf. durch eine Lochblende **34** gelenkt. Über einen hinter der Lochblende angeordneten Strahlteiler oder eine Polarisationsvorrichtung erfolgt eine Aufteilen des Strahls **26** in zwei Teile **36**, **38**. Jeder dieser Teilstrahlen **36**, **38** wird von einem Detektor **40** bzw. **42**, bei dem es sich insbesondere um eine Photodiode handelt, pixelweise erfasst. Ggf. ist jeweils ein Farbfilter **44** vorgeschaltet. In einer alternativen, hier in [Fig. 1](#) nicht dargestellten Ausführungsform, ist es bevorzugt, an der Position der Lochblende und anstelle dieser eine CCD-Kamera anzuordnen.

[0031] Die Detektoren **40**, **42** sind zum schnellen Auslesen der einzelnen Pixel mit einer nicht dargestellten Steuereinrichtung verbunden. Die Steuereinrichtung weist insbesondere einen Prozessor zur Analyse der Daten sowie einen Großdatenspeicher auf.

[0032] Ein Probenbild **46** einer zellulären Probe ist als Beispiel in [Fig. 2](#) dargestellt. Es handelt sich hierbei um ein Helligkeitsbild einer Probe, wobei für jedes einzelne Pixel zeilenweise die Helligkeit ermittelt wurde. Gut erkennbar ist in dem Bild eine Zellmembran **48** sowie das Zytoplasma **50** und auch der Zellkern **52**.

[0033] Wie vorstehend beschrieben wurden erfindungsgemäß gleichzeitig mit der Datenaufnahme zur Erzeugung des Probenbildes **46** Analysedaten je Pixel erzeugt und gespeichert. Beispielsweise wurden die Analysedaten eines Pixels der Zellmembran **48** gespeichert. Die einzelnen Analysedaten können aus dem in [Fig. 2](#) rechten Histogramm entnommen werden.

[0034] Die Analysedaten eines intrazellulären Pixels, die ebenfalls während der Erzeugung des Probenbildes erzeugt wurden, können dem in [Fig. 2](#) linken Histogramm entnommen werden.

[0035] Bei der in [Fig. 3](#) dargestellten, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden insbesondere Pixeltypen bestimmt, die beispielsweise der Zellmembran, dem Zytoplasma oder dem Nukleus zuzuordnen sind. In einem ersten Schritt **54** werden die Bildinformationen einschließlich der zeitaufgelösten Pixelinformationen gespeichert. Im Schritt **56** folgt die Berechnung der Bildhel-

lichkeit, d.h. der Intensität der einzelnen Pixel des aufgenommenen Bildes. Anschließend werden im Schritt **58** insbesondere mit Hilfe von Masken spezifische Bildbereiche bestimmt. Bei diesen Bildbereichen handelt es sich beispielsweise um die Zellmembran, das Zytoplasma, den Zellkern oder den Hintergrund. Die Bildbereiche entsprechen Pixeltypen. Durch eine Verknüpfung der Bildinformationen aus Schritt **54** mit den Bildbereichen aus Schritt **58** werden im Schritt **60** Bildbereiche ausgewählt und als Gruppe zusammengefasst. Die Information der einzelnen Pixel dieser Gruppen, die Gruppenanalysedaten, werden in dem anschließenden Schritt **62** beispielsweise durch Integration ermittelt. Dies erfolgt zum Beispiel durch eine Korrelation der ausgewählten Gruppenanalysedaten. Das hieraus erhaltene Ergebnis führt über einen weiteren Auswerteschritt, beispielsweise über das Fitten gemäß eines FCS Modells, zu molekularen Erkenntnissen (Schritt **64**).

[0036] In der in [Fig. 3](#) angegebenen Gleichung sind die Parameter x und y die Bild-Pixelpositionen, d eine zusätzliche Dimension, wie z.B. die z -Koordinate der Pixel, und t die Fluktuationszeit.

Patentansprüche

1. Analyseverfahren für chemische und/oder biologische Proben, die insbesondere Zellen aufweisen, mit den Schritten:

Aufnehmen eines Probenbildes (**46**), wobei das Probenbild (**46**) eine Vielzahl von Pixeln aufweist, Erzeugen von Analysedaten je Pixel, Bestimmen von für die Analyse interessierenden Pixeln, und Auswerten der erzeugten Analysedaten je interessierendem Pixel vorzugsweise durch Fluktuationsanalyseverfahren,

dadurch gekennzeichnet, dass die Analysedaten während der Bildaufnahme erzeugt werden und in Zeitreihen aufgelöste Pixelinformationen umfassen, welche zur vorzugsweise auf Fluktuationsanalyseverfahren beruhenden Auswertung genutzt werden.

2. Analyseverfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Zeitreihe in einzelne Zeitabschnitte unterteilt wird, und in den einzelnen Zeitabschnitten vorzugsweise das Eintreffen von Photonen beobachtet wird.

3. Analyseverfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei welchem die Analysedaten eines Pixels Einzeldaten umfassen, welche vorzugsweise je Zeitabschnitt aufgenommen werden und insbesondere abgespeichert werden.

4. Analyseverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welchem als Einzeldaten die Anzahl eingetreffener Photonen je Zeitabschnitt ermittelt wer-

den.

5. Analyseverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welchem als Einzeldaten die zeitlichen Abstände zwischen eingetroffenen Photonen ermittelt werden, wobei vorzugsweise die Ermittlung innerhalb von Zeitabschnitten erfolgt.

6. Analyseverfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, bei welchem die Zeitabschnitte 100 ns bis 10 ms, vorzugsweise 1 bis 1000 μ s, insbesondere 20 bis 200 μ s lang sind.

7. Analyseverfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, bei welchem die Aufnahmezeit 0.1 bis 100 s beträgt.

8. Analyseverfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, bei welchem das Fluktuationsanalyseverfahren Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS, FCCS), insbesondere Auto- oder Kreuzkorrelationsspektroskopie, ein- oder mehrdimensionale Fluorescence Intensity Distribution Analysis (FIDA, 2D- oder höherdimensionale FIDA), Fluorescence Intensity Multiple Distribution Analysis (FIMDA), Fluorescence Intensity Lifetime Distribution Analysis (FILDA), ein- oder mehrdimensionale Photon Counting Histogram Analyse (PCH), Photon Arrival-Time Interval Distribution Analyse (PAID), und/oder Burst-Integrated Fluorescence Lifetime Analysis (BIFL) umfasst.

9. Analyseverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei welchem das Bestimmen der interessierenden Pixel zeitlich nach dem Erzeugen der Analysedaten erfolgt.

10. Analyseverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei welchem die interessierenden Pixel unter zu Hilfenahme einer Schwellwertanalyse bestimmt werden.

11. Analyseverfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, bei welchem die Analysedaten mehrerer interessierender Pixel in einer Gruppe zu Gruppenanalysedaten zusammengefasst werden, welche gemeinsam ausgewertet werden.

12. Analyseverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, bei welchem in einer Zellen umfassenden Probe Pixeltypen in Abhängigkeit von subzellulären Strukturen bestimmt werden.

13. Analyseverfahren nach Anspruch 12, bei welchem die Analysedaten von Pixeltypen in einer Gruppe zu Gruppenanalysedaten zusammengefasst werden, welche gemeinsam ausgewertet werden.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

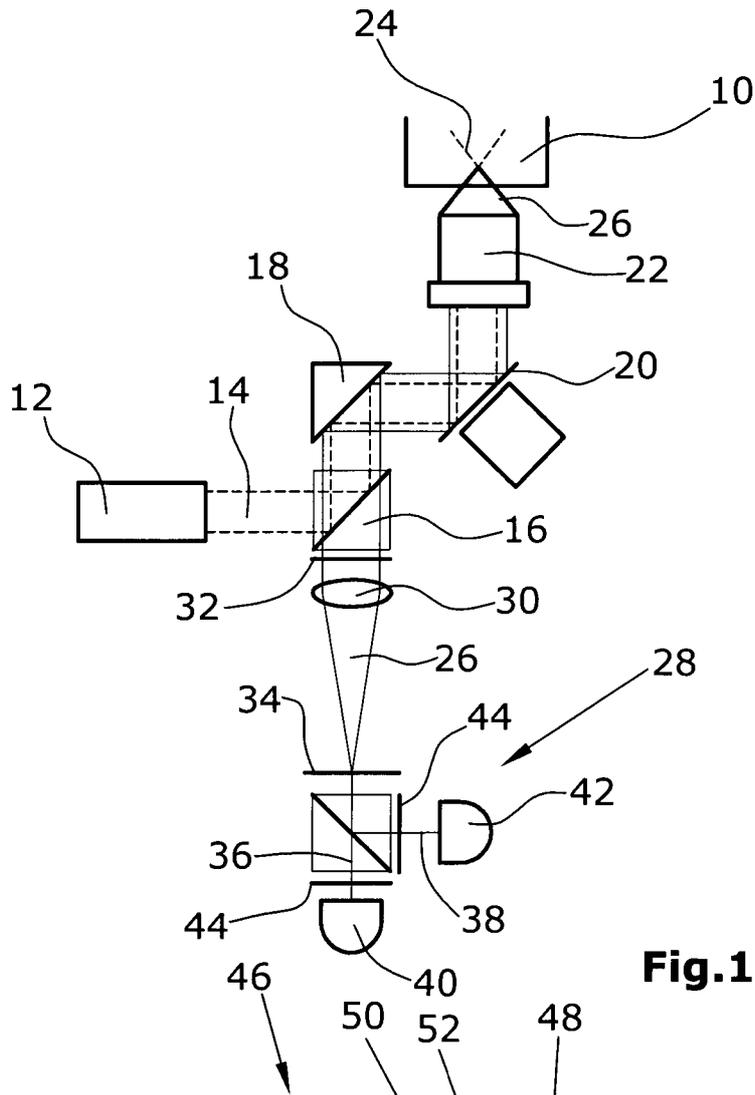
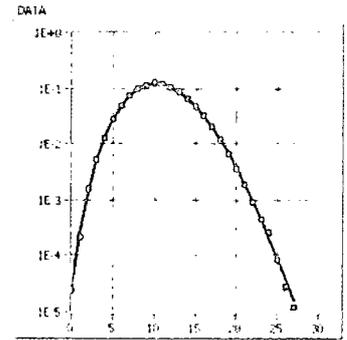
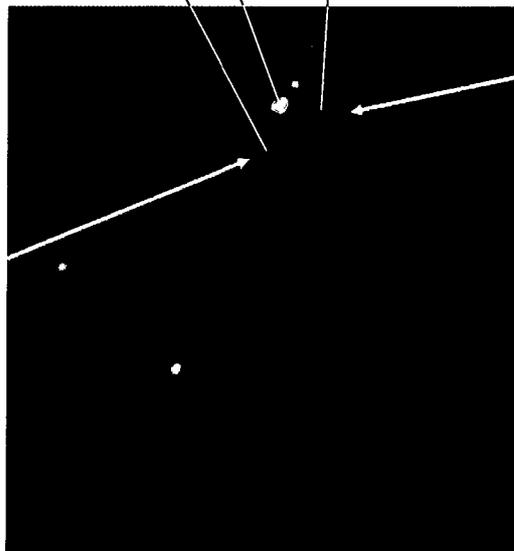
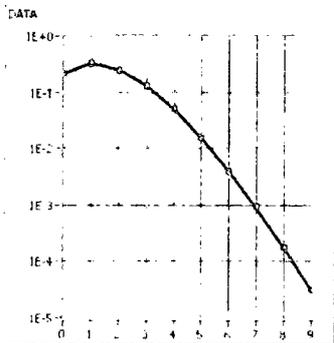


Fig.1

Intracellular Area



Membrane

Fig.2

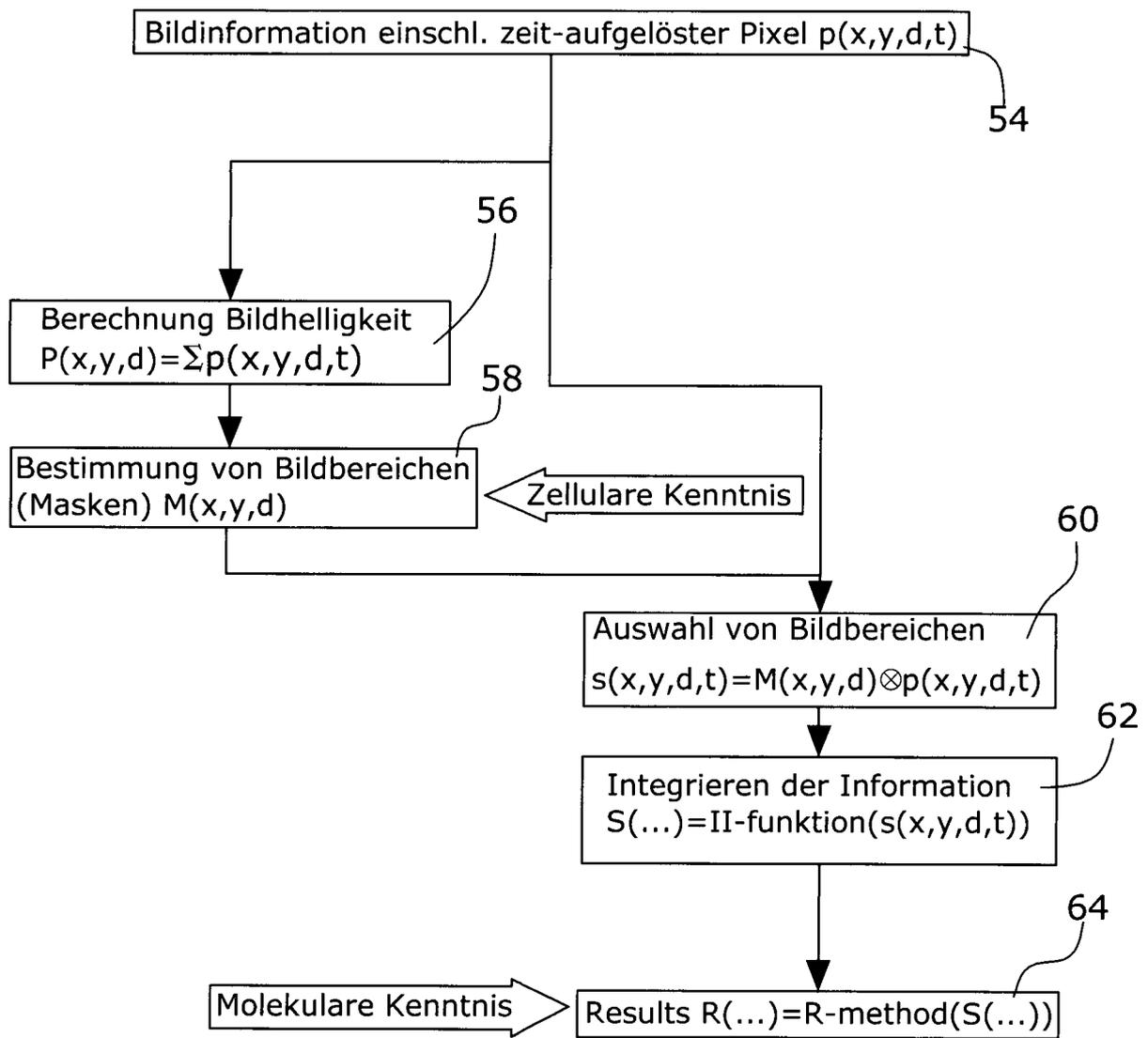


Fig.3