

Fluoreszierende sub-Mikrometer-Strukturen für die Kalibrierung und Justage von Mikroskopen

Arnaud Royon, Gautier Papon, Argolight SA, Talence, Frankreich

Wir präsentieren dreidimensionale fluoreszierende sub- μm -Strukturen, die nicht photobleichen und in Glas eingebettet sind, um Weitfeld-, Konfokal- und Multiphotonen-Mikroskope zu kalibrieren. Dieses neuartige und robuste Werkzeug ermöglicht vielfältige Messungen, z.B. zur Objektisch-Neupositionierung, Detektor-Dynamik, Feldhomogenität, lateralen und axialen Auflösung, spektralen Form und Intensität sowie zur Lebensdauerdynamik des Systems

1 Kontext

Fluoreszenzmikroskope werden in vielen biologischen, medizinischen und materialwissenschaftlichen Labors eingesetzt, die mit hohem Qualitätsanspruch bestimmte Leistungen garantieren. Allerdings werden diese Geräte meist als Bildgebungs- und nicht als Messinstrumente angeschafft, weil sich ihre verschiedenen Komponenten nicht gemeinsam kalibrieren lassen.

Tatsächlich sind Fluoreszenzmikroskope – besonders in konfokaler Ausführung – sehr komplexe Instrumente. Sie bestehen aus Objektiven, Positioniereinrichtungen, optischen Elementen, Detektoren, Anregungsquellen, Abtastsystemen etc., die im Orts-, Spektral- und Zeitbereich jeweils unterschiedliches Ansprechverhalten zeigen. Die Gesamtreaktion des Mikroskops ist eine Faltung der einzelnen Reaktionen seiner Elemente.

Bestehende Konzepte für die (provisorische) Kalibrierung von Fluoreszenzmikroskopen verwenden fluoreszierende Kügelchen (beads) zur Erfassung der lateralen Auflösung, außerdem Pikrinsäure für die Fluoreszenzlebensdauer, breitbandige Emittoren für die spektrale Empfindlichkeit, oberflächengravierte Objektträger für die Repositioniergenauigkeit, und so weiter. Allerdings besitzen die meisten dieser Hilfsmittel wesentliche Nachteile, manche

müssen z.B. bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt werden (4–6°C) und sind nur kurz lagerfähig (<12 Monate), oder es sind Einweg-Produkte anstatt haltbar zu sein. Außerdem unterliegen sie dem Effekt des Photobleichens (photo-bleaching), der als permanente Zerstörung der fluoreszierenden Zustände definiert ist. Insgesamt sind dies also keine anwenderfreundlichen Werkzeuge, sondern

eher Einzelmaßnahmen, weil damit jeweils nur ein individueller Aspekt des Mikroskops kalibriert werden kann. Beispielsweise werden fluoreszierende Polystyrol-Mikrokugeln oft eingesetzt, um die Auflösung konfokaler Mikroskope zu bestimmen, allerdings eben nur bei definierter Anregung um 488 nm und Emission um 530 nm [1]. Was ist aber mit dem spektralen und zeitlichen Antwortverhalten? Zudem erfordert die korrekte Vorbereitung dieser Proben mehr als 14 Stunden [1].

Aus all diesen Gründen, und insbesondere wegen des Fehlens eines Referenzmaterials, wird die Qualität von Fluoreszenzmikroskopen nicht so regelmäßig überwacht, wie es ihre Verwendung erfordern würde. Dies wird selbst von Mikroskop-Herstellern wie Carl Zeiss Microscopy betont [2]: „In den gut 20 Jahren seit Einführung konfokaler Laser-Scanning-Mikroskope war keine Festlegung möglich, wie sich diese Systeme vergleichen lassen. Niemand kann mit Sicherheit sagen, ob ein 1990 eingesetztes Gerät A eine bessere oder schlechtere Empfindlichkeit hat, als ein Gerät B aus dem Jahr 2006. Daher besteht ein vorrangiger Bedarf an standardisierten Testproben und Verfahren für ihren Einsatz.“ Das ideale Referenzmaterial für die Fluoreszenzmikroskopie hätte diese Eigenschaften:

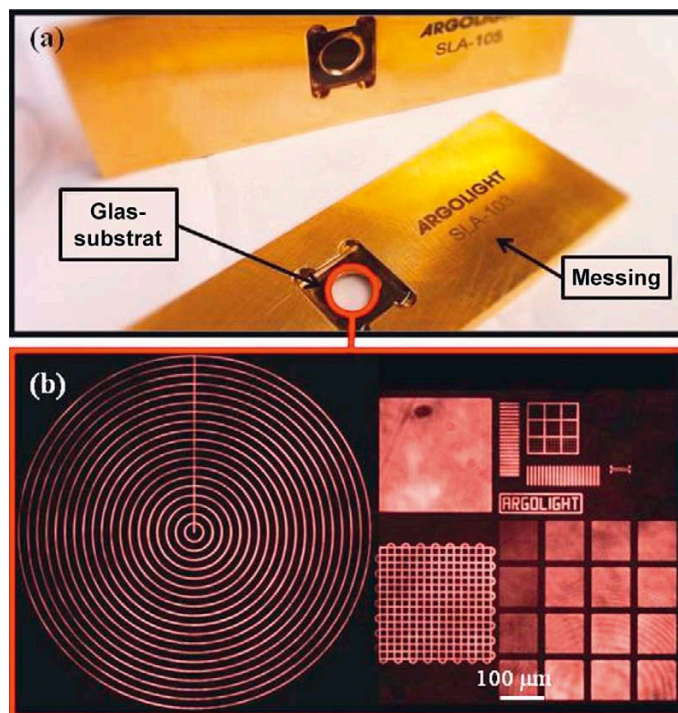


Bild 1: (a) Typische Kalibrations-Objektträger mit eingravierten fluoreszierenden Strukturen im Glas, (b) Übersichtsaufnahme dieser fluoreszierenden Strukturen ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = \text{von } 495 \text{ nm bis NIR}$)

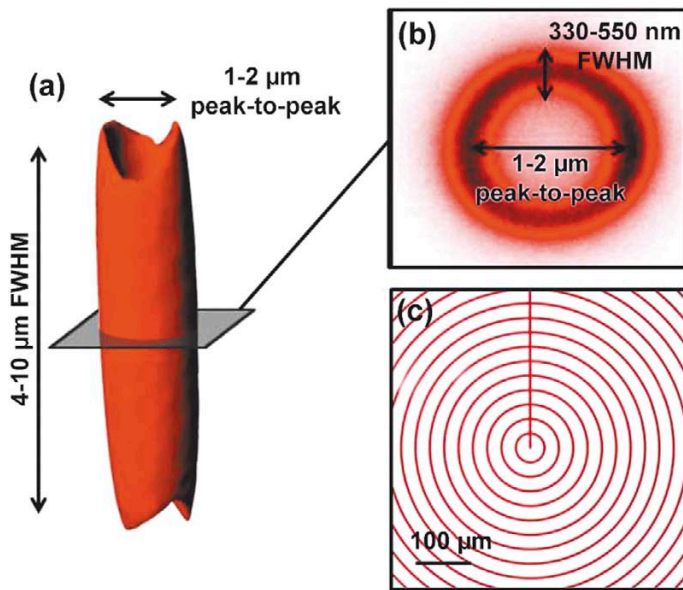


Bild 2: (a) Rekonstruierte konfokale Fluoreszenzaufnahme ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 420\text{--}700 \text{ nm}$, $40\times/1,25$) der röhrenförmigen Elementarstruktur, (b) Querschnitt der Röhre

- Strukturgrößen unterhalb des Auflösungsvermögens,
 - exakt positionierte und ausgerichtete Strukturen,
 - ein breites Anregungsspektrum,
 - ein breites Emissionsspektrum,
 - eine kurze Fluoreszenz-Lebensdauer,
 - kein Photobleichen,
 - Zuverlässigkeit und Langlebigkeit,
 - einfache Verwendung und Handhabung.
- Argolight, eine Ausgründung der Universität Bordeaux, ist spezialisiert auf ein Verfahren zum multi-skaligen (sub- μm bis cm) Markieren und Gravieren stabiler fluoreszierender 3D-Objekte in transparenten Materialien. Solche nicht-photobleichbaren Strukturen in Glas sind ideal für die Kalibrierung von Fluoreszenzmikroskopen geeignet. In diesem Beitrag beschreiben wir die Herstellung und einige Eigenschaften fluoreszierender multi-dimensionaler (Raum, Intensität, Spektrum, Lebensdauer) Lineale für die Kalibrierung und Justage von Weitfeld-, Konfokal- und Multiphotonen-Mikroskopen oder von deren Komponenten.

2 Kalibrations-Objektträger

Bild 1 zeigt einen typischen Kalibrations-Objektträger. Er besteht aus einem Glassubstrat, das in eine Messingplatte mit den Abmessungen eines Standard-Objektträgers eingelassen ist. In das Glas sind verschiedene Fluoreszenzmuster eingraviert, von denen jedes für eine bestimmte Kalibrationsaufgabe vorgesehen und ausgelegt ist. Im Grunde ähnelt die Gravur dieser fluoreszierenden Strukturen einem photographischen Prozess: Ein lichtempfindliches Glas wird einem

sowie mit einem Durchmesser von 1 bis 2 μm (Peak-zu-Peak) und einer FWHM-Wandstärke von 330 bis 550 nm, vgl. **Bild 2a** & **2b**. Aus dieser elementaren Struktur können komplexere lineare oder runde 3D-Geometrien aufgebaut werden; ein Beispiel zeigt **Bild 2c**. Die Positionsgenauigkeit der Strukturen liegt bei 50 nm.

3 Spektrale Eigenschaften

3.1 Spektrum

Ein unbestreitbarer Vorteil dieser Objektträger liegt in seinem extrem breiten Anregungs- und Emissionsspektrum. Das Anregungsspektrum reicht vom UV (Ultraviolett) bis 650 nm (vgl. **Bild 3a**), während sich die Emissionswellenlängen vom sichtbaren bis ins NIR (nahes Infrarot) erstrecken, wenn die Anregung durch Strahlung vom UV bis ins blaue Licht erfolgt (vgl. **Bild 3b**). Vor allem aber ist es ein Kontinuum, was jegliche spektrale Kalibrierung von Fluoreszenzmikroskopen erlaubt,

ionisierenden Laserstrahl ausgesetzt. Die Wechselwirkung dieses Strahls mit den lichtempfindlichen Substanzen im Material führt zur Erzeugung fluoreszierender Spezies, deren Fluoreszenzeigenschaften (Spektrum, Intensität und Lebensdauer) sich nach der Dosis richtend, die das Material empfangen hat. Die elementare Struktur ist ein röhrenförmiger Hohlzylinder mit einer FWHM-Länge (Full Width at Half Maximum), die von 4 bis 10 μm variiert werden kann,

sowie insbesondere die Untersuchung chromatischer Aberrationen.

3.2 Lebensdauer

Es wurden Lebensdauermessungen durchgeführt, auf die wir hier aber nicht näher eingehen. Sie zeigten eine schnell abklingende Komponente mit ca. 1,5 ns Lebensdauer, was mit FLIM-Studien (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) kompatibel ist.

3.3 Intensität

Bild 4a zeigt 16 Quadrate, die mit verschiedenen hohen Dosen elektromagnetischer Strahlung eingraviert wurden. In **Bild 4b** ist über der jeweiligen Positionnummer die für jede Fläche gemessene globale Fluoreszenzintensität dargestellt. Sie folgt innerhalb der horizontalen Reihen von je vier Quadraten vier linearen Trends mit unterschiedlichen Steigungen. Die Fluoreszenzintensität der eingravierten Strukturen ist über die Bestrahlungsdosis leicht einzustellen. Dies ist besonders nützlich für die Untersuchung der Dynamik und der Detektor-Linearität, zudem könnte damit ein Ansatz für die quantitative Fluoreszenzmikroskopie eröffnet werden.

4 Fluoreszenz-Stabilität und Langlebigkeit der Strukturen

4.1 Stabilität

Wir haben die Fluoreszenz-Stabilität der Strukturen mit quantitativen Experimenten untersucht, wobei zwei Fälle unterschieden

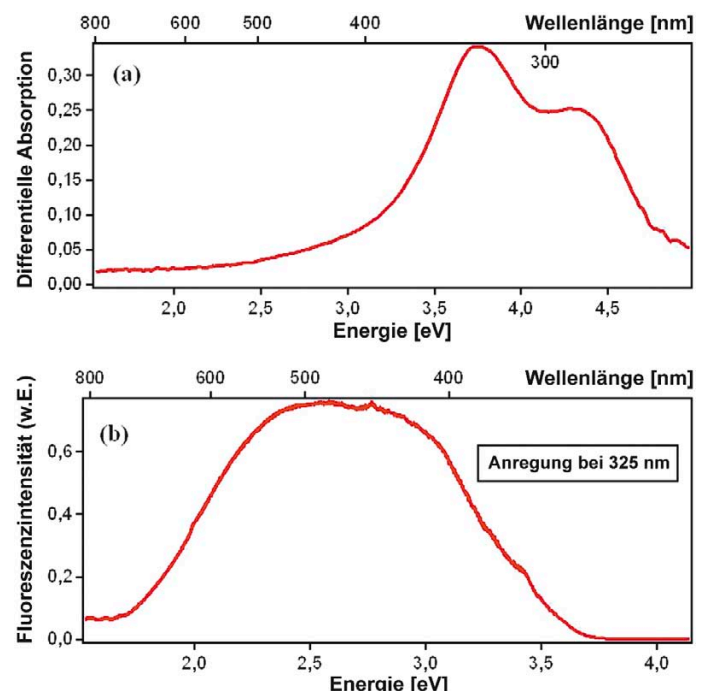


Bild 3: (a) Typisches Absorptionsspektrum und (b) tatsächliches Emissionsspektrum ($\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$) der eingravierten Strukturen

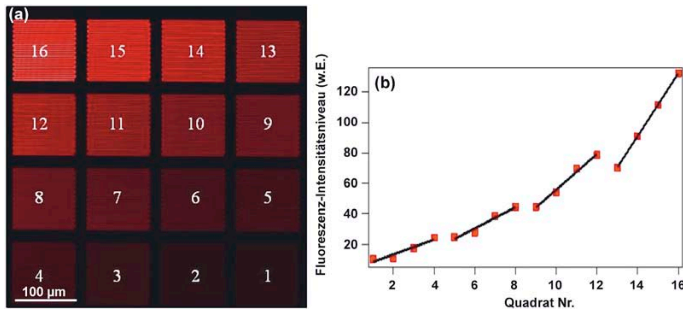


Bild 4: (a) Konfokale Fluoreszenzaufnahme ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 420\text{--}700 \text{ nm}$, $10\times/0,3$) von 16 quadratischen Strukturen, die mit verschiedenen hohen Dosen elektromagnetischer Strahlung eingraviert wurden, (b) Fluoreszenz-Intensitätsniveaus dieser Quadrate

werden müssen: Bei Weitfeld-Mikroskopen mit niedrigen Leistungsdichten bleibt die Fluoreszenzintensität zeitlich konstant, während in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie die Leistungsdichte höher ist und je nach Abbildungsparametern ein Abklingen der Fluoreszenz auftritt.

Bild 5 zeigt für ein konfokales Mikroskop die Entwicklung der Fluoreszenzintensität über der Aufnahmezeit anhand von 6000 Bildern, die innerhalb von 5 Minuten erfasst wurden. Der Anregungs-Laserstrahl bei 405 nm wurde mit einem Mikroskopobjektiv fokussiert (numerische Apertur $NA = 1,4$), die mittlere Leistung auf der Probe betrug $250 \mu\text{W}$. Sowohl die Bildfassungsdauer als auch die Leistungsdichte lagen somit deutlich über typischen Abbildungsbedingungen für biologische Proben.

Innerhalb der ersten zehn Sekunden ist eine drastische Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, dann aber tendiert sie bei etwa 85% des anfänglichen Fluoreszenzniveaus in Richtung einer horizontalen Asymptote. Eine dreifach exponentielle Abklingkurve mit drei verschiedenen Zeitkonstanten ergibt die genaueste

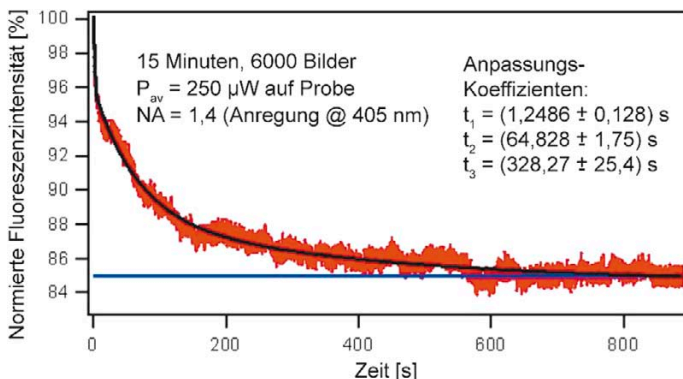


Bild 5: Entwicklung der Fluoreszenzintensität (normiert) über der Aufnahmezeit bei konfokaler Abbildung einer Struktur mit übertrieben hoher Anregungsintensität. Die 15%ige Fluoreszenzminderung erholt sich innerhalb von ca. fünf Minuten

Kurvenanpassung. Sobald die Anregung beendet wird, erholt sich die Fluoreszenz bis zu ihrem Ausgangswert. Dies geschieht innerhalb einer charakteristischen Zeit und dauert je nach Aufnahmebedingungen einige Sekunden bis einige Stunden.

Der Ursprung dieses Fluoreszenz-Abklingens ist noch nicht identifiziert. Da sich

die Fluoreszenz wieder erholt, handelt es sich nicht um Photobleichen, sondern wohl eher um eine Reorganisation der elektronischen Anordnung der fluoreszierenden Spezies. Um Messungen innerhalb eines stabilen Bereichs durchzuführen, muss die Leistungsdichte der Anregungsstrahlung hinreichend gering gehalten werden. Die Leistungsdichte-Schwelle, unterhalb der eine Anregungs-Sättigung vermieden wird, richtet sich nach der durchschnittlichen Leistung auf der Probe, der NA des Mikroskopobjektivs und der Anregungswellenlänge. Aktuell wird an verschiedenen Lösungsansätzen gearbeitet, um dieses störende Abkling-Phänomen zu verringern; dabei muss aber betont werden, dass es unseres Wissens keine sub-Mikrometer-Fluorophore mit vergleichbaren spektralen Eigenschaften gibt, die nicht photobleichen oder photoblinken.

4.2 Langlebigkeit

Um diese Art der Kalibrations-Objektträger zu einem Referenz-Werkzeug für die Fluoreszenzmikroskopie zu machen, wurden Anstrengungen unternommen, um ihre Langlebigkeit nachzuweisen. Tatsächlich ist der erste, 2006 hergestellte Prototyp noch immer einsetzbar, seine Fluoreszenzstrukturen scheinen unverändert zu sein. Zur quantitativen Analyse wurden beschleunigte Alterungstests durchgeführt: Objektträger wurden vier Monate lang in einem Laborofen bei einer erhöhten Temperatur von 100°C gehalten, und die Emissionsspektren

wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Studie überwacht. Die Messungen zeigten bisher keine Veränderung, weder in der Form noch in der Intensität der Fluoreszenz-Emissionsspektren.

5 Fazit und Ausblick

Nicht-photobleichende fluoreszierende sub- μm -Strukturen sind geeignet, die Anforderungen an ein Referenz-Werkzeug zur Kalibrierung und Justage von Fluoreszenzmikroskopen zu erfüllen. Sie bieten Unterauflösungs-Strukturgrößen von 330 nm in xy - und $4 \mu\text{m}$ in z -Richtung, so dass sie für Mikroskopobjektive mit $NA < 1$ einsetzbar sind. Um diese Werte für größere numerische Aperturen zu verbessern, werden neue Verfahren und Bildanalyse-Algorithmen entwickelt. Die Strukturen ermöglichen eine hochauflösende Messung der Verschiebung von Elementen, der Feld- und Beleuchtungs-Homogenität, der lateralen und axialen Auflösung des Mikroskop-Objektivs, der Detektor-Dynamik, des spektralen Antwortverhaltens des Systems und anderer Eigenschaften.

Danksagung

Wir danken Philippe Legros vom Bordeaux Imaging Centre für die ursprüngliche Idee, diese Technik zur Kalibrierung von Fluoreszenzmikroskopen einzusetzen. Auch bedanken wir uns bei Prof. Lionel Canioni und Dr. Thierry Cardinal von der Universität Bordeaux für ihre Grundlagenforschung.

Übersetzung: J. Kuppe

Literaturhinweise:

- [1] R.W. Cole, T. Jinadasa, C.M. Brown, *Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control*, Nature Protocols 12, 1929-1941 (2011)
- [2] A. Dixon, T. Heinlein, R. Wolleschensky, *Need for Standardization of Fluorescence Measurements from the Instrument Manufacturer's View*, in: Springer Series on Fluorescence (2008)

Ansprechpartner:

Dr. Arnaud Royon
Technischer Leiter & Mitbegründer
Argolight SA
Esplanade Arts et Métiers
33400 Talence
Frankreich
Tel. (mobil) +33/631642667
eMail: a.royon@argolight.com
Internet: www.argolight.com

