

Bestimmung der hardwarebedingten Leistungsgrenzen eines LS-FLIM-Systems hinsichtlich der Bildaufnahmegeschwindigkeit bei der Fluoreszenzlebenszeitmessung

Zeyu Zhang, Meike Kristina Hofmann, Stefan Sinzinger
Fachgebiet Technische Optik, Technische Universität Ilmenau
<mailto:zeyu.zhang@tu-ilmenau.de>

Untersucht wird die minimale Photonenzahl zur Einhaltung vorgegebener relativer Abweichungsgrenzen bei der Fluoreszenzlebenszeitbestimmung. Für Abweichungen unter 10 % bzw. 5 % waren mit der pixelweisen Medianwertmethode 130 bzw. 454 Photonen pro Pixel und Aufnahmezeiten von 34 bzw. 120 s erforderlich.

1 Einleitung

Die Fluoreszenzlebenszeit-Mikroskopie (FLIM) nutzt die Fluoreszenzlebenszeit als Kontrastgröße und ermöglicht dadurch Rückschlüsse auf die lokale Mikroumgebung fluoreszierender Strukturen [1]. Durch die Kombination mit der Lichtschicht-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) [2] können diese Informationen in optischen Schnitten räumlich aufgelöst erfasst und zu dreidimensionalen Fluoreszenzlebenszeitdaten zusammengesetzt werden. Die Kombination aus LSFM und FLIM wird im Folgenden als LS-FLIM bezeichnet.

Die Aufnahmezeit von LS-FLIM-Messungen hängt von der erreichbaren Photonenzählrate, den Eigenschaften der Probe und der zulässigen Abweichung bei der Fluoreszenzlebenszeitbestimmung ab. Insbesondere bei dreidimensionalen Aufnahmen mit zahlreichen z-Ebenen führen lange Aufnahmezeiten zu einem hohen Zeit- und Datenverarbeitungsaufwand. Aus der erforderlichen Photonenzahl und der erreichbaren Photonenzählrate lässt sich daher die minimale Aufnahmezeit abschätzen.

2 Versuchsaufbau und Auswertemethoden

Der verwendete Messaufbau kombiniert die LSFM mit einer auf Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) basierenden FLIM, siehe Fig. 1. Zur Detektion wurde eine LINcam (PhotonScore GmbH) eingesetzt. Die Totzeit der verwendeten Detektorkonfiguration beträgt 400 ns. Die Anregung erfolgte mit einem gepulsten Laser bei einer Wellenlänge von 375 nm. Bei einer Pulsbreite von 90 ps betrug die Ausgangsleistung 1 mW; die Wiederholrate wurde auf 10 MHz eingestellt.

Als Probe diente ein mit Acridinorange gefärbtes Maiglöckchenpräparat. Aus der vollständigen Messung mit einer Dauer von 1320 s wurden zunächst Referenzwerte für die Fluoreszenzlebenszeit bestimmt.

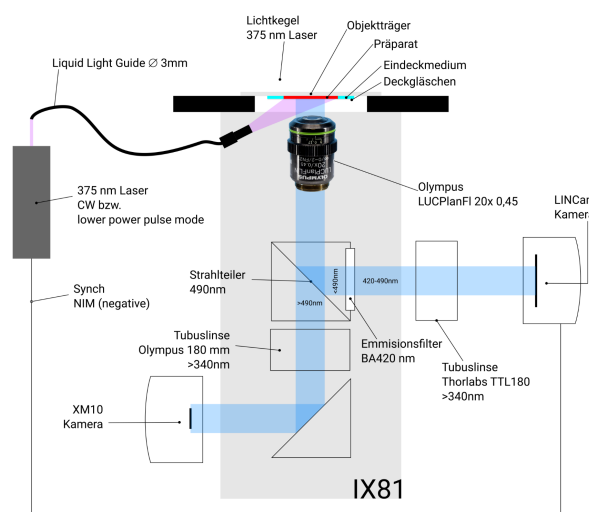


Fig. 1 Prinzipieller Aufbau des verwendeten Lichtschicht-FLIM-Systems.

Anschließend wurden aus demselben Rohdatensatz Auswertintervalle von 1 s bis 180 s gebildet. Durch die schrittweise Verlängerung des Auswertintervalls wurde die verfügbare Photonenzahl kontrolliert erhöht.

Für die Auswertung wurden zwei komplementäre Verfahren eingesetzt. Die pixelweise Medianwertmethode ermöglicht ohne iterative Modellanpassung die schnelle und robuste Erzeugung einer 2D-FLIM-Karte. Für die präzise quantitative Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit wurden die innerhalb ausgewählter ROIs akkumulierten Fluoreszenzzerfallskurven mit einem exponentiellen Fit ausgewertet.

Für jedes Auswertintervall wurde die relative Abweichung vom Referenzwert bestimmt. Als Photonen-grenze galt die kleinste Photonenzahl, bei der eine Abweichungsgrenze von 10 % bzw. 5 % eingehalten wurde. Bei der Medianwertmethode wurde die Photonenzahl pro Pixel ausgewertet, beim exponentiellen Fit dagegen die Gesamtphotonenzahl der akkumulierten ROI-Zerfallskurve.

3 Ergebnisse und Diskussion

Aus der vollständigen Referenzmessung wurde die in Fig. 2 dargestellte 2D-FLIM-Karte erstellt. Für die weitere Auswertung wurden drei ROIs ausgewählt, die unterschiedliche Bereiche der Fluoreszenzlebenszeitverteilung und der lokalen Photonenzahl repräsentieren.

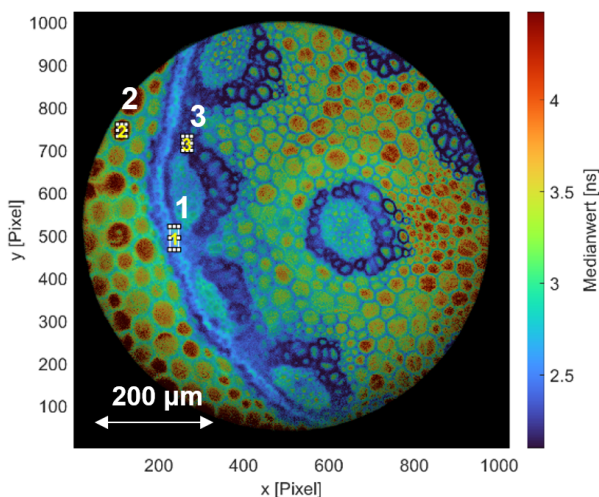


Fig. 2 Mit der Medianwertmethode erstellte 2D-FLIM-Karte des mit Acridinorange gefärbten Maiglöckchenpräparats mit drei ausgewählten ROIs.

Die mit der Medianwertmethode und dem exponentiellen Fit bestimmten Fluoreszenzlebenszeiten sind in Tab. 1 zusammengefasst. Aus den beim exponentiellen Fit ermittelten Exponentialtermen wurde jeweils eine integralgewichtete mittlere Fluoreszenzlebenszeit berechnet.

ROI	$\bar{\tau}_{\text{exp}}$	τ_{median}
1	2,93 ns	2,61 ns
2	4,51 ns	4,54 ns
3	2,24 ns	2,17 ns

Tab. 1 Bestimmte Fluoreszenzlebenszeiten der ausgewählten ROIs

Beim exponentiellen Fit wurde die Fluoreszenzlebenszeit aus der über die jeweilige ROI akkumulierten Zerfallskurve bestimmt und anschließend der Betrag der relativen Abweichung dieser Lebenszeit vom Referenzwert berechnet. Bei der Medianwertmethode wurde dieser Betrag pixelweise bestimmt und anschließend gemittelt.

Die Datenauswertung wurde für alle drei ausgewählten ROIs durchgeführt. Im Folgenden werden exemplarisch die Ergebnisse der 1248 Pixel umfassenden ROI 1 dargestellt.

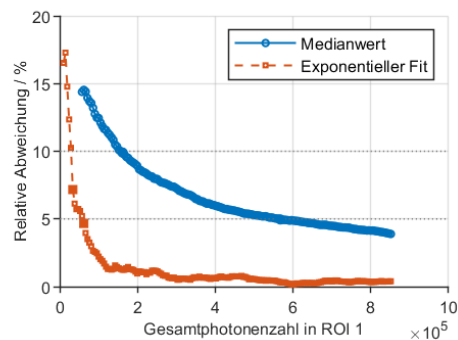


Fig. 3 Relative Abweichung der bestimmten Fluoreszenzlebenszeit vom Referenzwert.

Für Abweichungsgrenzen von 10 % bzw. 5 % betragen die minimalen Aufnahmezeiten 34 s bzw. 120 s bei der Medianwertmethode und 7 s bzw. 13 s beim exponentiellen Fit. Die diesen Aufnahmezeiten zugrunde liegenden Photonengrenzen sind in Tab. 2 zusammengefasst, wobei sich die Angaben bei der Medianwertmethode auf die Photonenzahl pro Pixel und beim exponentiellen Fit auf die Gesamtphotonenzahl in ROI 1 beziehen.

Methode	Grenze	Photonenzahl
Medianwert	< 10 %	130 pro Pixel
Medianwert	< 5 %	454 pro Pixel
Exponentieller Fit	< 10 %	32 448 in ROI 1
Exponentieller Fit	< 5 %	61 152 in ROI 1

Tab. 2 Photonengrenzen der beiden Auswerteverfahren

4 Zusammenfassung und Ausblick

Aus den ermittelten Photonengrenzen und der erreichbaren Photonenzählrate wurden minimale Aufnahmezeiten für FLIM-Einzelbilder abgeleitet. Damit lässt sich auch die Gesamtdauer einer LS-FLIM-Messung abschätzen. Räumliches Binning kann die Aufnahmezeit bei entsprechend reduzierter Ortsauflösung weiter verkürzen.

Weitere Messungen und zusätzliche Auswerteverfahren, etwa die Phasor-Methode und Maximum-Likelihood-Schätzungen (MLE), sollen die Übertragbarkeit der Ergebnisse prüfen und weiteres Potenzial zur Beschleunigung von LS-FLIM-Messungen aufzeigen.

Literatur

- [1] W. Becker, *The bh TCSPC Handbook*, 10th ed. (Becker & Hickl GmbH, Berlin, 2023).
- [2] E. G. Reynaud, *Light sheet fluorescence microscopy*, 1st ed. (Wiley-VCH, Weinheim, 2024).