

Confocale fluorescietelevennsduur-microscopie

Hans Gerritsen

Universiteit Utrecht, vakgroep Moleculaire Biofysica

Postbus 80000, 3508 TA Utrecht

Ondanks het feit dat de lichtmicroscopie een van de oudste wetenschappelijke instrumenten is, zijn er nog steeds nieuwe ontwikkelingen rond dit instrument. Die ontwikkelingen spelen zich af op twee gebieden, enerzijds op het puur technische vlak, zoals het gebruik van nieuwe optische geometriën en lichtbronnen, en anderzijds op het gebied van de toegepaste contrastvormende mechanismen. Wat de technische ontwikkelingen betreft heeft vooral de ontwikkeling van de confocale microscopie voor een doorbraak gezorgd. De kenmerkende eigenschap van deze vorm van microscopie is dat er selectief naar één enkel volume-element in het monster gekeken wordt, zodat het mogelijk is om met behulp van scantechnieken 3-dimensionale beelden op te nemen.

Voor elke beeldvormende techniek is het essentieel dat er een contrastvormend mechanisme aanwezig is. Voorbeelden van contrastvormen die gebruikt worden binnen de microscopie zijn: absorptie (doorvallend licht), reflectie, interferentie, polarisatie, fluorescentie, Raman verstrooiing enz..

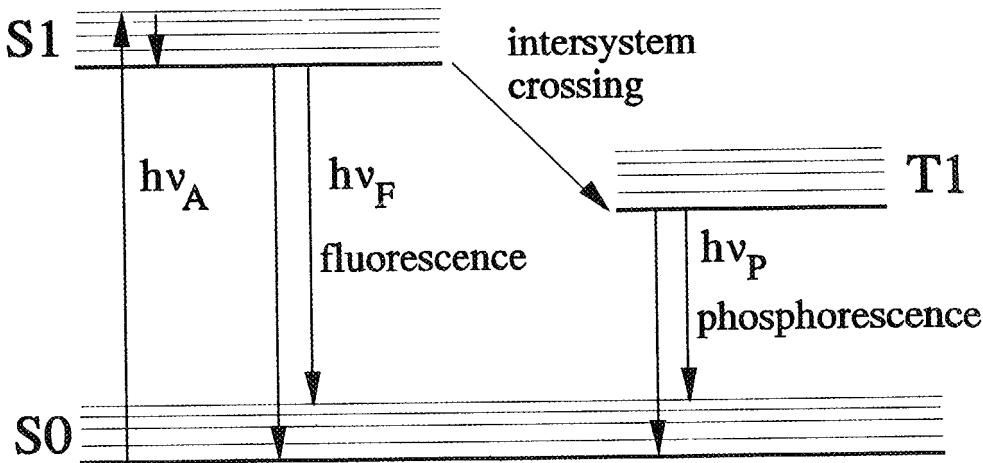
Voor biologische toepassingen speelt met name de fluorescentie-microscopie een belangrijke rol. In fluorescentie-microscopie wordt gebruik gemaakt van moleculen die blauw of UV licht absorberen en vervolgens bij een langere golflengte (roodverschuiving) licht uitzenden. In figuur 1 is schematisch weergegeven hoe dit in zijn werk gaat. Het fluorescerende molecuul bevindt zich aanvankelijk in de grondtoestand S_0 en wordt door absorptie van een foton met energie $h\nu_A$ in de aangesla-

gen toestand S_1 gebracht. Daarna treedt er een zeer snelle interne conversie op naar het laagste energieniveau binnen S_1 . Tenslotte keert het molecuul na enige tijd (ns) terug naar de grondtoestand onder emissie van een "fluorescentie foton" met energie $h\nu_F$.

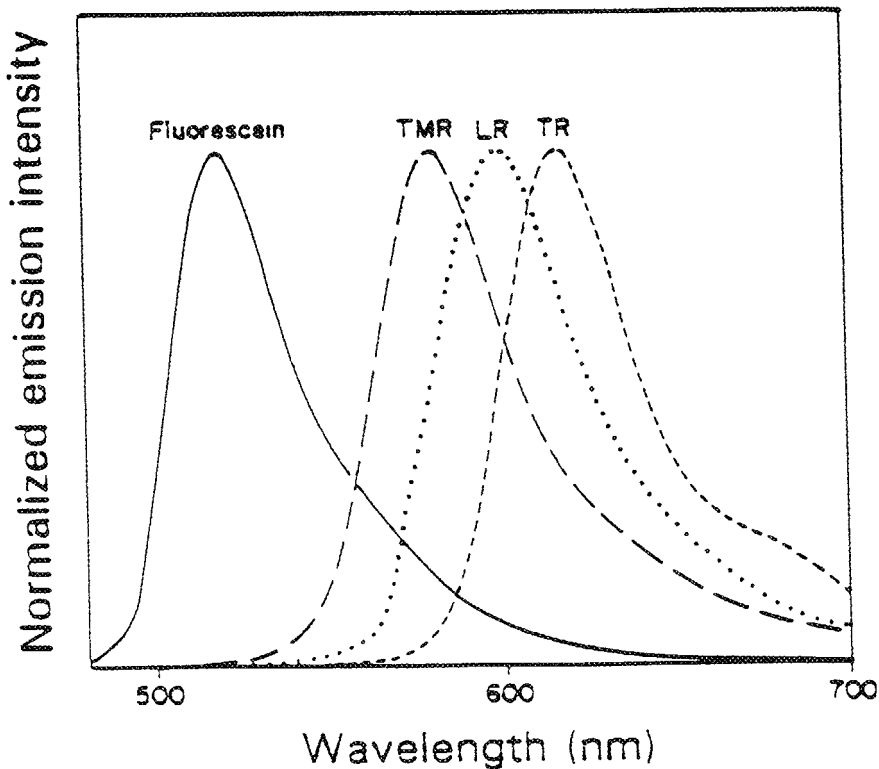
De kracht van het gebruik van fluorescerende moleculen in de microscopie schuilt in de selectiviteit van het kleuringproces. Er kunnen b.v. fluorescerende moleculen gebruikt worden om selectief cel-organellen te labelen, ionen-concentraties te quantificeren of membraanpotentialen te bepalen. Door gebruik te maken van meerdere fluorescerende labels kan ook b.v. naar correlaties tussen processen gekeken worden.

Het gebruik van fluorescerende probes is echter niet geheel zonder problemen. Veel van de complicaties rond het gebruik van fluorescerende probes zijn terug te voeren op het feit dat er gekeken wordt naar de fluorescentieintensiteit. Dit betekent dat factoren die de fluorescentieintensiteit beïnvloeden, zoals absorptie effecten in het monster, intensiteitsvariaties van de lichtbron en het wegbleken van de fluorescerende probe onder invloed van het excitatielicht, fouten kunnen introduceren.

Een probleem dat zich voordoet bij gebruik van meerdere labels is dat het fluorescentielicht uitgezonden wordt in een brede golflengteband. In figuur 2 is een voorbeeld gegeven van een aantal bekende fluorescerende moleculen fluoresceïne, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine B en Texas Red. Het zal duidelijk zijn



Figuur 1
Een schematische weergave van de energieniveaus in een fluorescerend molecuul (Jablonski diagram)



Figuur 2
De emissiespectra van een aantal veel gebruikte fluorescerende moleculen

dat door de overlap van de emissiebanden van de diverse fluorescerende moleculen het moeilijk is om de signalen van de verschillende moleculen goed van elkaar te onderscheiden.

Een ander probleem doet zich voor bij het kwantitatief afbeelden van ionenconcentraties. Hiervoor zijn verschillende typen fluorescerende probe - ionenindicatoren - beschikbaar. Bij een belangrijke klasse van ionenindicatoren gaat men er vanuit dat de fluorescentieintensiteit een maat is voor de ionenconcentratie. Deze aanname is echter alleen correct zolang de probe homogeen verdeeld is over het monster. Dit kan in de praktijk tot dubbelzinnige resultaten leiden.

De laatste jaren worden alternatieve fluorescentie-contrastvormen onderzocht die de hierboven genoemde nadelen niet vertonen. Een van deze contrastvormen is gebaseerd op de fluorescentieervalvtijd. De fluorescentieervalvtijd of fluorescentielevensduur, is een maat voor de tijd die het fluorescerende molecuul in de aangeslagen toestand doorbrengt. Vaak is er sprake van monoexponentieel verval van de fluorescentieintensiteit, zodat deze geschreven kan worden als:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (1)$$

met τ de fluorescentieervalvtijd, I_0 en $I(t)$ de fluorescentieintensiteit op respectievelijk tijdstip 0 en t

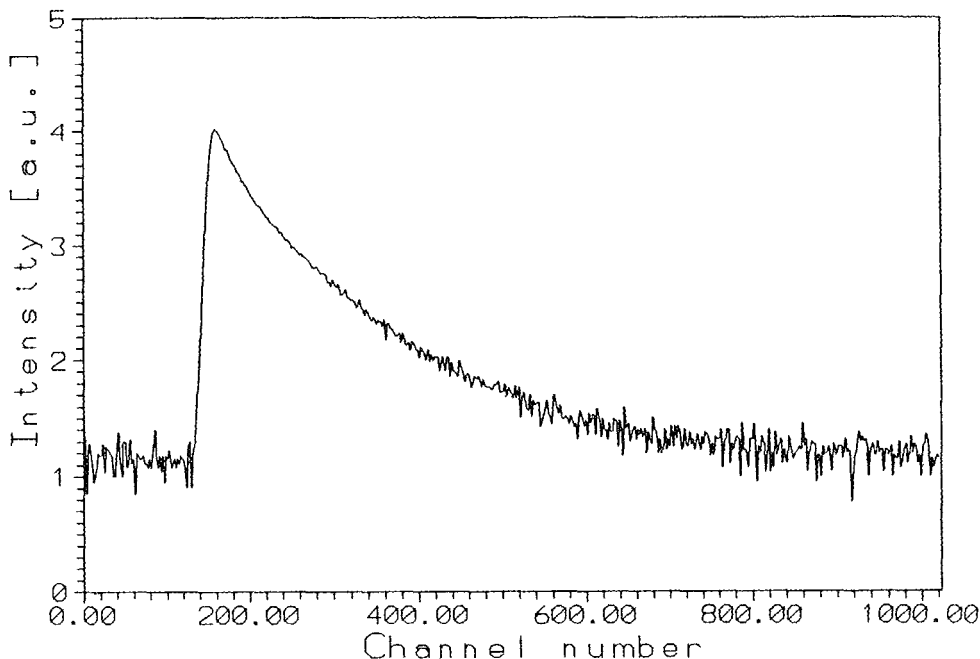
Het gebruik van de fluorescentieervalvtijd als contrastmechanisme in de microscopie biedt een aantal belangrijke voordelen. In de eerste plaats is de fluorescentielevensduur onafhankelijk van bleking, belichtingsintensiteit en de probeconcentratie (zeer hoge concentraties uitgezonderd). Dit maakt deze vorm van contrast zeer geschikt voor gebruik in de kwantitatieve fluorescentie microscopie. In de tweede plaats kunnen verschillende fluorescerende moleculen onderscheiden worden op basis van hun levensduur. Tenslotte kan de fluorescentielevensduur beïnvloed wor-

den door de lokale chemische omgeving van het fluorescerende molecuul. Dit betekent dat de fluorescentielevensduur gebruikt kan worden om kwantitatieve uitspraken te doen over de chemische omgeving van de probe. Concrete voorbeelden hiervan zijn het bepalen van ionenconcentraties (Ca^{2+} , H^+ etc.), CO_2 en O_2 concentraties en het al dan niet gebonden zijn van een probe aan een eiwit

Instrumentatie

Het meten van fluorescentieervalvtijden kan in principe op een aantal verschillende manieren gerealiseerd worden. Een van de meest gebruikte methoden hiervoor is "Time Correlated Single Photon Counting". Bij deze techniek wordt het monster met een korte lichtpuls geëxciteerd waarna de tijd gemeten wordt tussen de excitatiepuls en de detectie van een "fluorescentie foton". Dit wordt vele malen herhaalt zodat een waarschijnlijkheidsverdeling van deze tijden opgebouwd kan worden. Als er voor gezorgd wordt dat er per excitatiepuls niet meer dan één "fluorescentie foton" gedetecteerd wordt, dan komt deze waarschijnlijkheidsverdeling overeen met de fluorescentieervalvcurve. Na analyse (fitten) van de valvcurve kan op nauwkeurige wijze de valvtijd (of valvtijden voor multiexponentieel verval) bepaald worden. Deze methode is zelfs geschikt om valvcurven te meten in zeer kleine monsters. Hiervan is een voorbeeld gegeven in figuur 3. Het gaat hier om een valvcurve van een fluorescerende kleurstof (Calcium-Green) opgenomen in een met een confocale microscoop geselecteerd volumelement van c. a. $3 \mu\text{m}^3$ in de kern van een cel. Aangezien het opnemen van deze curve enkele minuten in beslag nam, zal het duidelijk zijn dat deze methode niet geschikt is voor beeldvorming in een (confocale) microscoop.

In een microscoop zal echter in de regel ook bij lange na niet de nauwkeurigheid vereist zijn die van spectroscopische methoden verlangd wordt. Het ligt dus voor de



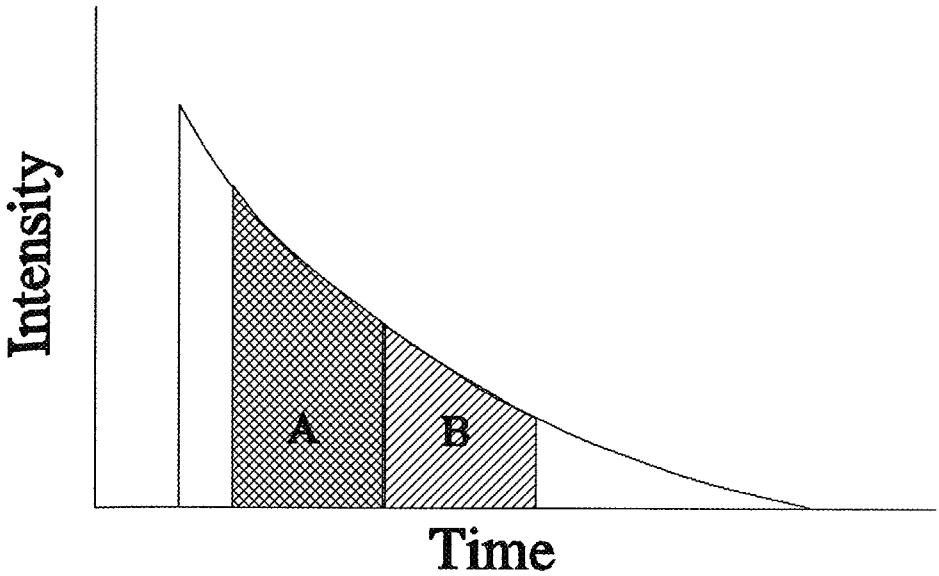
Figuur 3

Een fluorescentievervalcurve van een $3 \mu\text{m}^3$ groot volume-element in een met CalciumGreen gekleurde celkern, opgenomen m.b.v. een confocale microscoop en een standaard spectroscopische techniek.

hand om nauwkeurigheid in te leveren voor snelheid. Dit kan bijvoorbeeld door het aantal kanalen waarin de vervalcurve wordt geregistreerd drastisch te reduceren.

In onze opstelling hebben we gekozen voor een systeem gebaseerd op time-gating met slechts twee kanalen in plaats van de 1024 kanalen in de spectroscopische methode. De werking van het systeem is schematisch weergegeven in figuur 4. Op $t=0$ wordt het monster geëxciteerd met een korte (ns) lichtpuls. Vlak na de excitatiepuls wordt het eerste detectiekanaal geopend en na een aantal ns weer gesloten. Vervolgens wordt het tweede detectiekanaal geopend en weer na een aantal ns gesloten. Deze hele procedure wordt enige honderden malen herhaald om voldoende intensi-

teit in de twee detectiekanaalen te accumuleren. De verhouding van de intensiteit in de twee kanalen is nu een maat voor de fluorescentielevensduur. Voor een mono-exponentieel verval geeft deze methode in principe de correcte vervaltijd, terwijl voor multi-exponentieel verval een soort effectieve vervaltijd bepaald wordt. De nauwkeurigheid van de methode is zeer redelijk. Als we uitgaan van c.a. 250 gedetecteerde "fluorescentie fotonen" dan is de fout in de vervaltijd minder dan 10%. Het grote voordeel is dat we nu in c.a. $40 \mu\text{s}$ een vervaltijd kunnen bepalen. Als we dit vergelijken met de spectroscopische methode die eerder behandeld is, dan zien we dat daar van de orde van 10^6 "fluorescentie fotonen" gemeten worden in een aantal minuten terwijl de nauwkeurigheid c.a. 1% bedraagt.

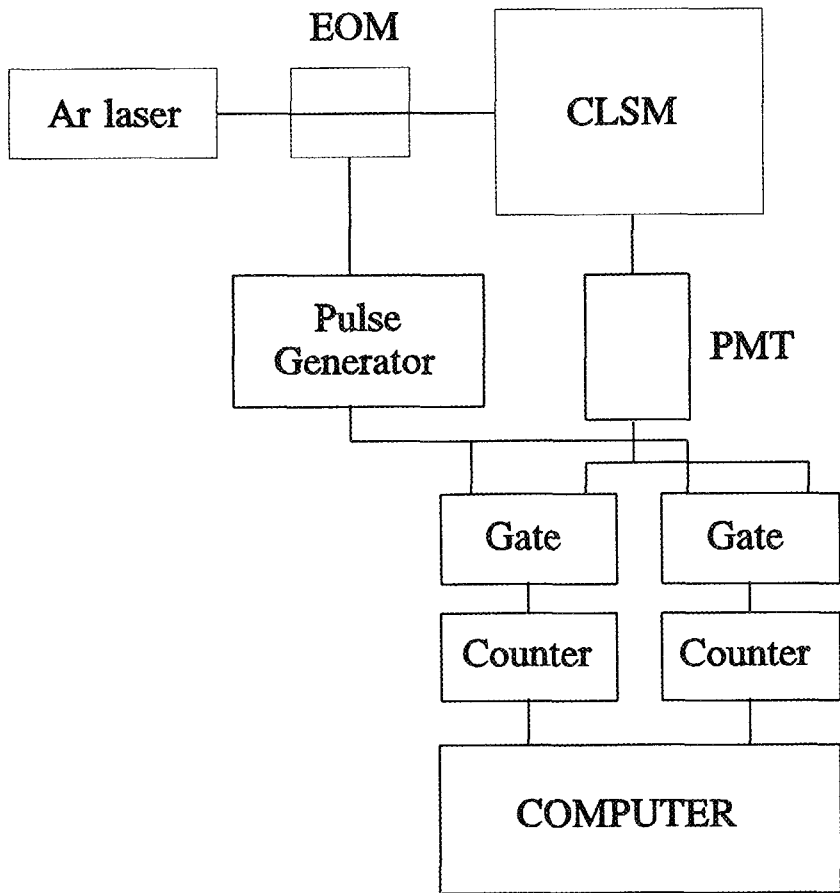


Figuur 4
Het principe van time-gating voor de bepaling van vervaltijden.

Figuur 5 is een schematische weergave van de door ons gebruikte opstelling. In principe wordt gebruik gemaakt van een conventionele Confocale Laser Scan Microscop (CLSM) met een gemodificeerde lichtbron en detectiesysteem. De lichtbron bestaat uit een standaard laag-vermogen CW Ar⁺-laser met daarachter een Electro Optische Modulator (EOM). Deze modulator produceert in combinatie met een pulsgenerator een 25 MHz pulstrein van nanoseconde lichtpulsjes voor excitatie van het monster. De detectie van het fluorescentie signaal verloopt via een snelle fotomultiplier gekoppeld aan een discriminator en twee time-gated counters. De time-gating is hier gerealiseerd met behulp van snelle (1 ns stijgtijd) ECL elektronica. Nadat voldoende signaal geaccumuleerd is worden de twee counters uitgelezen door een computer die, nadat een heel beeld opgebouwd is, een fluorescentielevensduurbeeld weergeeft op het computerscherm.

Toepassingen

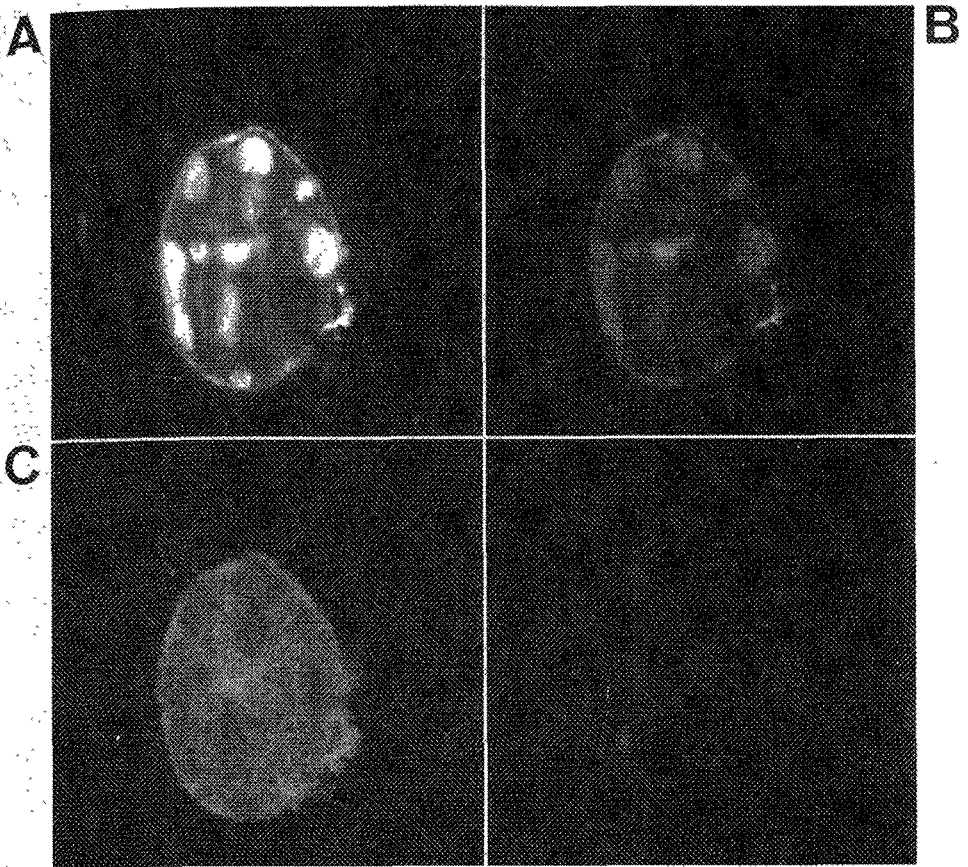
Door gebruik te maken van de verschillen in fluorescentielevensduur van probes is het mogelijk om deze gescheiden waar te nemen zelfs als er sprake is van grote overlap van de emissie spectra. Een (test) voorbeeld van deze toepassing is gegeven in figuur 6. Het monster was in dit geval een alge (gymnodinium nagasakiense) die twee fluorescerende materialen bevat. De alge bevat van nature chlorofyl en is daarnaast gekleurd met een fluorescerend (FITC) antilichaam dat specifiek het buitenmembraan kleurt. Het chlorofyl heeft meerdere vervalcomponenten waarvan de belangrijkste vervaltijden c.a. 0,1 ns en 0,6 ns zijn terwijl het fluorescerende antilichaam een vervaltijd heeft van 1,1 ns. Voor het registreren van levensduurbeelden van dit monster hebben we gebruik gemaakt van twee tijdsvensters (gates) met een gelijke breedte van 1,8 ns. Het eerste tijdsvenster start vlak na de excitatiepuls en het tweede direct daarachter.



Figuur 5
Een schematische voorstelling van de door ons gebruikte confocale fluorescentielevensduur microscoop

In figuur 6 a en b zijn de intensiteitbeelden weergegeven die bij respectievelijk het eerste en het tweede tijdsvenster horen. Zoals verwacht is de intensiteit in het tweede (late) venster lager dan dat in het eerste venster. In figuur 6 c is de verhouding van figuur 6 a en 6 b weergegeven. Lage grijswaarden komen hier overeen met korte fluorescentielevensduren en hoge met lange. Er zijn al duidelijk gebieden te onderscheiden met korte en lange levensduren. Het levensduurbeeld kan nu gebruikt worden om twee beelden te construeren, één

voor de korte levensduren en één voor de lange. Dit is gedaan in figuur 7 a en b, waarbij als grenswaarde voor kort/lang een waarde van 0,9 ns is gekozen. Het beeld met levensduren korter dan 0,9 ns correspondeert met chlorofyl (figuur 7 a) en het beeld met levensduren langer dan 0,9 ns (figuur 7 b) met het fluorescerende antilichaam. In dit specifieke geval kan de fluorescentie van chlorofyl en van het antilichaam ook gescheiden worden op basis van de spectrale eigenschappen. Ter vergelijking met de resultaten op basis van le-



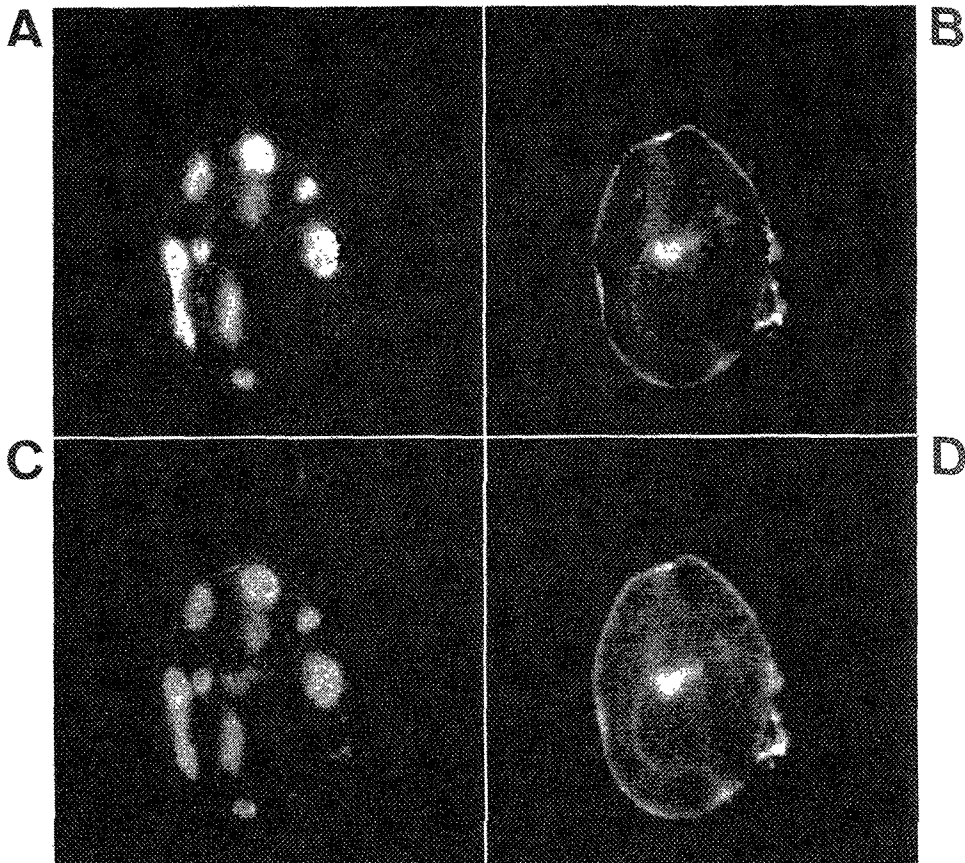
Figuur 6
 Intensiteitsbeeld van een alge behorende bij het eerste a) en bij het tweede b) tijdsvenster. c) Het levensduurbeeld

vensduurcontrast zijn de spectraal gescheiden beelden van de twee fluorescerende componenten weergegeven in figuur 7 c en d. De beelden laten duidelijk zien dat scheiding van fluorescentiesignalen op basis van de fluorescentielevensduur goed mogelijk is. Deze methode is dus zeer geschikt om fluorescentiesignalen van moleculen die sterk overlappende emissiebanden hebben te scheiden.

Om de verdeling van deze ionen in levende cellen te bestuderen wordt gebruik gemaakt van fluorescerende ionenindicatoren. In principe zijn hiervoor twee verschillende typen voor beschikbaar, intensiteitsprobes en ratioprobes. De werking van de intensiteitsprobes zoals b.v. Fluo-3 en CalciumGreen is gebaseerd op het feit dat de probe in twee toestanden voorkomt in het monster, vrij en gebonden aan het ion.

Ionen zoals Ca^{2+} , Na^+ en H^+ spelen een zeer belangrijke rol in levende organismen.





Figuur 7

In a) is de fluorescentie weergegeven met levensduren korter dan 0,9 ns (chlorofyl) en in b) dat met levensduren groter dan 0,9 ns (antilichaam). c) en d) op basis van verschillen in emissiespectra gescheiden beelden van chlorofyl en het antilichaam

De fluorescentieintensiteit van de probe is hoog als deze gebonden is aan het ion en laag in de ongebonden toestand. Als de ionenconcentratie toeneemt, neemt de hoeveelheid gebonden probe toe en dus ook de fluorescentieintensiteit. Het probleem bij dit type probe is dat de intensiteit afhankelijk is van zowel de probe- als de ionenconcentratie. Een inhomogene probe-distributie geeft dus dubbelzinnige informatie over de ionenconcentratie. Verder is het niet mogelijk om absolute concentraties te bepalen.

Bij de ratioprobes wordt gebruik gemaakt van verschillen in spectrale eigenschappen van de vrije en gebonden probe. In het geval van SNAFL, een H^+ probe, treedt er b.v. een verschuiving in het emissiespectrum op. Door de verhouding te meten van de fluorescentieintensiteit bij twee verschillende emissiegolflengten kan in principe de absolute ionenconcentratie bepaald worden. Een complicatie bij het gebruik van deze methode is dat de spectrale eigenschappen vaak gevoelig zijn voor de lokale chemische omgeving van de probe.

In de praktijk is dan ook een in-situ calibratieprocedure nodig voor het quantificeren van ionenconcentraties met dit type probe. Een ander nadeel van dit type probe is dat doorgaans gebruik moet worden gemaakt van UV-excitatie, wat potentieel schadelijk is voor cellen.

Recent onderzoek heeft aangetoond dat het mogelijk is om ionenconcentraties te bepalen op basis van fluorescentielevensduren. Het blijkt dat b.v. bij de Ca^{2+} gevoelige intensiteitsprobe CalciumGreen de vrije en gebonden probe niet alleen verschillende fluorescentieintensiteiten vertonen maar ook dat zij verschillende fluorescentielevensduren hebben. Dit betekent dat het fluorescentieerval twee componenten bevat met amplitudes α_{vrij} en α_{geb} en levensduren τ_{vrij} en τ_{geb}

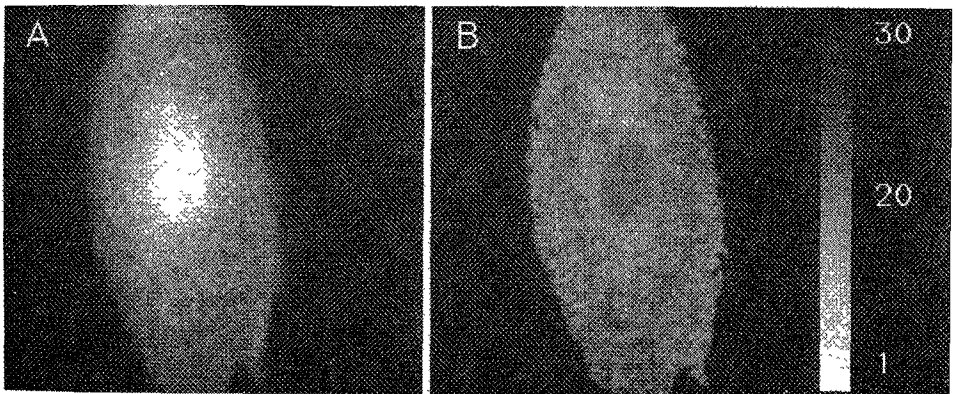
$$I(t)/I_0 = \alpha_{\text{vrij}} e^{-t/\tau_{\text{vrij}}} + \alpha_{\text{geb}} e^{-t/\tau_{\text{geb}}} \quad (3)$$

Aangezien de amplitudes α_{vrij} en α_{geb} evenredig zijn met de concentraties en de (constante) quantumefficiëncies van de vrije en gebonden probe, verandert de gemiddelde levensduur als de ionenconcentratie verandert. M.a.w. de gemiddelde levensduur zoals die gemeten wordt in onze microscoop is een maat voor de ionen-

concentratie. Voor een nauwkeurige concentratiebepaling is wel een vereiste dat de levensduren van de vrije en van de gebonden probe voldoende ver uit elkaar liggen. In het geval van CalciumGreen hebben we de levensduren met Time Correlated Single Photoncounting bepaald. De waarden van de levensduren zijn 0,41 ns (vrij) en 3,37 ns (gebonden).

In figuur 8 a is het fluorescentieintensiteitsbeeld gegeven van een met CalciumGreen gekleurde hartcel van een rat. De hoge intensiteit in de celkern suggereert een relatief hoge Ca^{2+} concentratie. Dit is in tegenspraak met het levensduurbeeld in figuur 8 b waar nauwelijks intensiteit verschillen zichtbaar zijn. Het verschil tussen de twee figuren wordt verklaard door een ophoping van CalciumGreen in de kern van de hartcellen. Na calibratie van de microscoop aan een serie buffer-oplossingen met probe en een variabele hoeveelheid Ca^{2+} (zie grijswaardenbalk) is het mogelijk om de intensiteiten te vertalen in absolute concentraties. Uit de calibratie volgt een Ca^{2+} -concentratie in de kern van c.a. 20 nM \pm 8%.

Een belangrijke vraag is hoe de nauwkeurigheid van de levensduurmethode zich verhoudt tot die van bestaande methoden



Figuur 8

In a) het fluorescentieintensiteitsbeeld van een met CalciumGreen gekleurde hartcel en in b) het bijbehorende fluorescentielevensduurbeeld.

Een eerste quantitative vergelijking met behulp van een probe die zowel geschikt is voor de (emissie) ratiomethode (SNAFL) als de levensduurmethode suggereert dat de levensduurmethode aanzienlijk minder gevoelig is voor variaties in de chemische omgeving. Tenslotte wil ik opmerken dat het optreden van twee verschillende levensduren voor de vrije en de gebonden ionenindicator in de praktijk veel voor blijkt te komen. De levensduurmethode om

ionenconcentraties quantitatief af te beelden lijkt dan ook een goed alternatief te zijn voor bestaande methodes.

Dankwoord

Het in dit artikel beschreven werk was mogelijk door een uitstekende samenwerking tussen TNO-IMW en de UU. Met name wil ik Arie Draaijer (TNO) en Renata Sanders (UU) danken voor hun inspanningen voor het project.