

Флуоресцентная (люминесцентная)  
микроскопия становится проще  
с камерой pco.flim

время жизни  
от 100 пс до 100 мкс

разрешение  
1008 x 1008 пикс.

частота кадров  
до 90 к/с

синтезатор частоты  
5 кГц - 40 МГц



## Флуоресцентная микроскопия — это простая задача...

В течение многих лет свойства фотолюминесценции использовались для различных задач в медикобиологической области — от биомаркеров до зондирования. Каждый из применяемых в фотолюминесценции люминофоров имеет свои особенные характеристики, которые могут применяться для решения различных исследовательских задач.

Наиболее важной характеристикой является интенсивность люминесценции или фосфоресценции. Интенсивность измеряется качественно и количественно, причем последний параметр в значительной степени зависит от светового поля и оптических условий вокруг люминофора. Дополнительным характеристическим параметром является время жизни люминесценции, причем этот параметр является наиболее достоверным источником информации (см. рис. 1, 5).

Хотя свойства люминесценции давно известны, на рынке существует всего несколько камер, работающих на ее основе. В частности, существуют системы фиксации изображения на основе фотозлектронной системы усиления для частотной или временной визуализации времени жизни флуоресценции, а также видеосистемы для временной визуализации времени жизни флуоресценции для длительных периодов времени жизни (микросекунды и более). Однако, все эти системы требуют дополнительного оборудования, такого как частотные и тактовые генераторы, которые отличаются, как правило, большой стоимостью и размерами. Технический прогресс в области CMOS-матриц позволил наладить производство матриц, пиксели которых могут

модулировать частоты до 40 МГц, на основе которых реализуется система визуализации времени жизни флуоресценции. Данная система имеет гораздо меньшую стоимость и требует меньших производственных затрат. Принцип работы такой камеры основан на колебании заряда в каждом пикселе, что позволяет очень быстро изменить направление индуцированной люминесценцией носителей заряда. Камера pco.flim позволяет модулировать частоты до 40 МГц.

Если люминофор возбуждается синусоидальным светом, он будет синусоидально излучать свет, но реакция будет иметь задержку, обусловленную временем жизни люминесценции. Эта задержка, называемая фазовым углом между возбуждением и эмиссией, может быть измерена. На рисунке 2 показано колебание пикселя и его синхронизация с интегрированием половины синусоидального сигнала, а также использование этого эффекта для измерения фазового угла эмиссии.

Когда переключатель находится в положении А, все сгенерированные заряды накапливаются в этом положении; это делается для интегрирования в течение половины периода синусоидальной эмиссии, после чего переключатель меняет направление и интеграция в течение половины периода осуществляется в положении В. Первый интеграл соответствует фазовому углу  $0^\circ$  (tap A), а второй — фазовому углу  $180^\circ$  (tap B). Для восстановления синусоидального сигнала и определения фазового угла требуется измерение минимум в течение одной секунды.

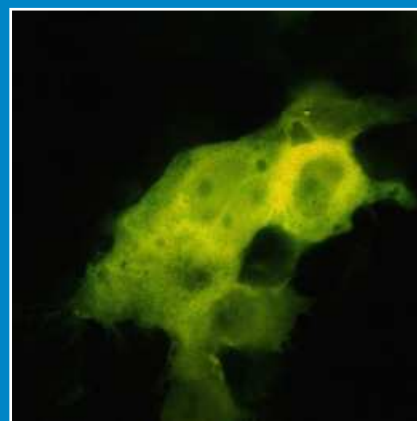
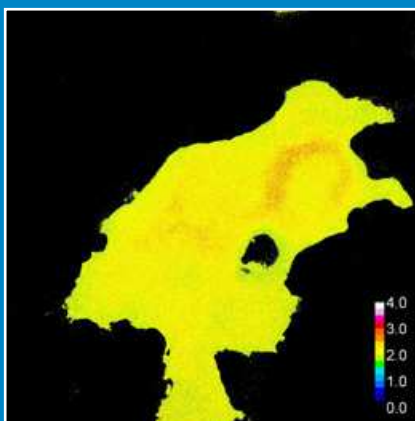
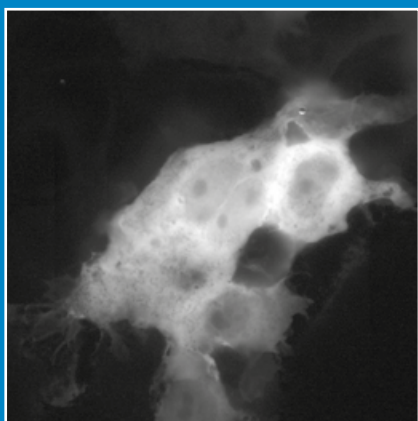


Рисунок 1: На левой фотографии показана интенсивность флуоресценции клеток HEK-293, которая отображает белок CFP / DJ-1 для контроля эксперимента FRET. На среднем изображении показано фазовое распределение жизни флуоресценции в диапазоне от 0 до 4 нс (изображение J LUT 16 цветов, цветовая шкала 0...4 нс) с фильтром интенсивности. Диапазон значений времени жизни около 2 нс был обнаружен во всех 26 клетках, которые были измерены и показали порядка 10% эффективности FRET по сравнению с чистой экспрессией CFP. На правой фотографии показано изображение распределения времени жизни, взвешенное по интенсивности флуоресценции (цветные изображения с использованием псевдоцветов и той же цветовой шкалы, а также LUT без фильтра (предоставлены профессором, доктором Ф.С. Вутерсом и доктором Дж. Бунтом, Университет медицины Геттингена).

## Флуоресцентная микроскопия — это простая задача...

Таким образом вводится фазовый сдвиг  $\Delta\Phi = 90^\circ$  между возбуждением и эмиссией, после чего измерение повторяется (нижний сигнал на рис. 2). Теперь интегралы соответствуют фазовым углам  $90^\circ$  (tap A) и  $270^\circ$  (tap B). С помощью этих значений или изображений можно вычислить три изображения: изображение интенсивности люминесценции, изображение распределения фазового угла и изображение распределения индекса модуляции. Последние два параметра могут быть преобразованы в распределение времени жизни люминесценции. Поскольку в большинстве случаев одного периода интегрирования недостаточно, оно будет проводиться до тех пор, пока не будет накоплен достаточный сигнал, а это означает, что во время выдержки, например, 100 мс, переключатель запускается с частотой модуляции.

### Настройка FLIM (измерение времени жизни)

Измерение времени жизни флуоресценции возможно с применением камеры pco.film с соответствующим источником света, который может использовать сигнал модуляции и сигнал затвора. В принципе, этих условий достаточно для проведения измерений. На рис. 3 структурно отображен процесс настройки для получения изображений люминесценции с помощью камеры pco.film, в которой камера является частотным источником. Камера pco.film посылает сигнал модуляции и сигнал затвора на источник света, который должен быть способен принимать оба этих сигнала.

Сигнал модуляции управляет модуляцией света возбуждения, а сигнал затвора включает/выключает

возбуждение, поскольку оно должно быть выключено в период вычитывания<sup>1</sup>. Сигнал зависит от модулируемого источника света (рис. 3, модулируемый источник света) (необходимый частотный диапазон), в качестве которого может использоваться практически любое устройство — от светодиодов до лазера, модулируемых в нужном частотном диапазоне. Модулированный свет может проходить через оптический фильтр возбуждения (рис. 3, фильтр возбуждения) и возбуждать люминофор в образце.

При этом может потребоваться дополнительная оптика для направления света определенной формы к образцу. Оптика не рассматривается в данном документе. Люминесцентный образец, в данном случае, будет излучать свет люминесценции. Этот свет проходит через оптические фильтры эмиссии (рис. 3, фильтр эмиссии) и направляется оптикой (рис. 3, оптика) на матрицу камеры pco.film.

Неважно, должен ли сигнал сначала проходить через фильтр, а потом через оптику, или наоборот, поэтому на рисунке 3 показан только один вариант реализации. В качестве оптики могут использоваться линзы, микроскопы и пр., в зависимости от решаемых задач. В соответствии с режимами работы и настройками, камера pco.film передает изображения на управляющий компьютер (рис.3, компьютер) через интерфейс USB 3.0. На рисунке 3 приведен типовой вариант реализации, демонстрирующий гибкость системы pco.film. Поскольку камера сама осуществляет генерацию и управление модулирующими сигналами, поэтому настройка системы является достаточно простой.

<sup>1</sup> Матрица QMFLIM2 фиксирует дополнительный шум, если матрица освещена во время вычитывания.

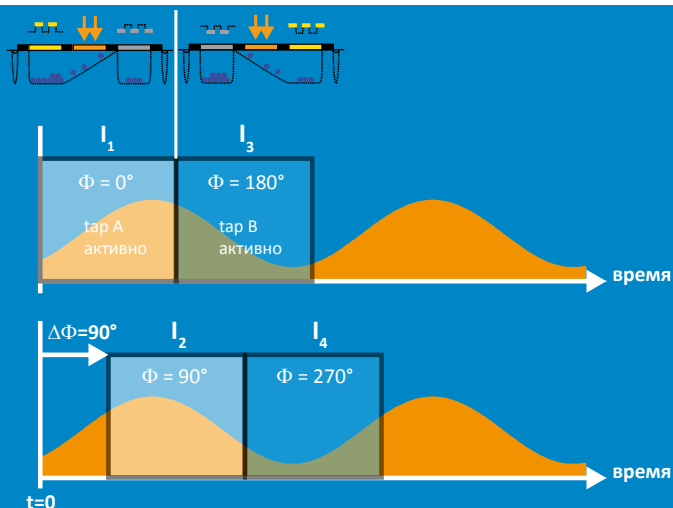


Рисунок 2: Синусоидальный сигнал люминесценции (оранжевый) с окнами интегрирования выборок (серые прямоугольники). Сначала первая половина периода интегрируется для изображения  $I_1$ , которому соответствует активность tap A и  $\Phi = 0^\circ$ . Соответственно, для изображения  $I_3$  осуществляется интегрирование для tap B и  $\Phi = 180^\circ$ . Для следующего отсчета синхронизация сдвигается на  $\Delta\Phi = 90^\circ$ , так что первая половина интегрирования соответствует  $I_2$  с tap A и  $\Phi = 90^\circ$ , а вторая — изображению  $I_4$  с tap B и  $\Phi = 270^\circ$ .

## Флуоресцентная микроскопия — это простая задача...

### Частотный и временной методы флуоресцентной микроскопии

Теоретически, между этими методами нет никакой разницы с информационной точки зрения, поскольку они оба позволяют получить идентичные результаты, несмотря на различные требования к проведению эксперимента.

Частотное измерение требует наличия опорного измерения для уменьшения влияния на результаты искажений в оптическом тракте, в то время как опорное измерение для временного измерения не требуется. С другой стороны, временной метод неприменим для наносекундного диапазона, поскольку даже самая быстрая матрица требует выдержки более 100 наносекунд, а в частотном измерении камерой pco.flim используется частота модуляции 30 МГц, что позволяет фиксировать диапазон вплоть до 100 пикосекунд. К примеру, разница между пылевым зерном (желтый цвет на среднем рис. 5) и листовыми клетками (синие и зеленые на среднем рис. 5) находится в диапазоне 1,2 нс.

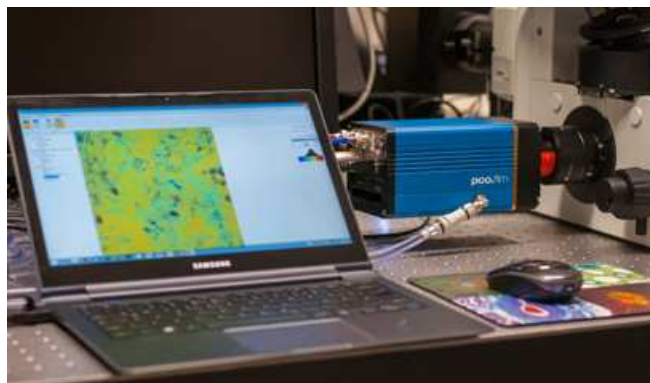


Рисунок 4: Система pco.flim FLIM подключена к порту камеры инвертированного микроскопа и управляется с помощью компьютера.

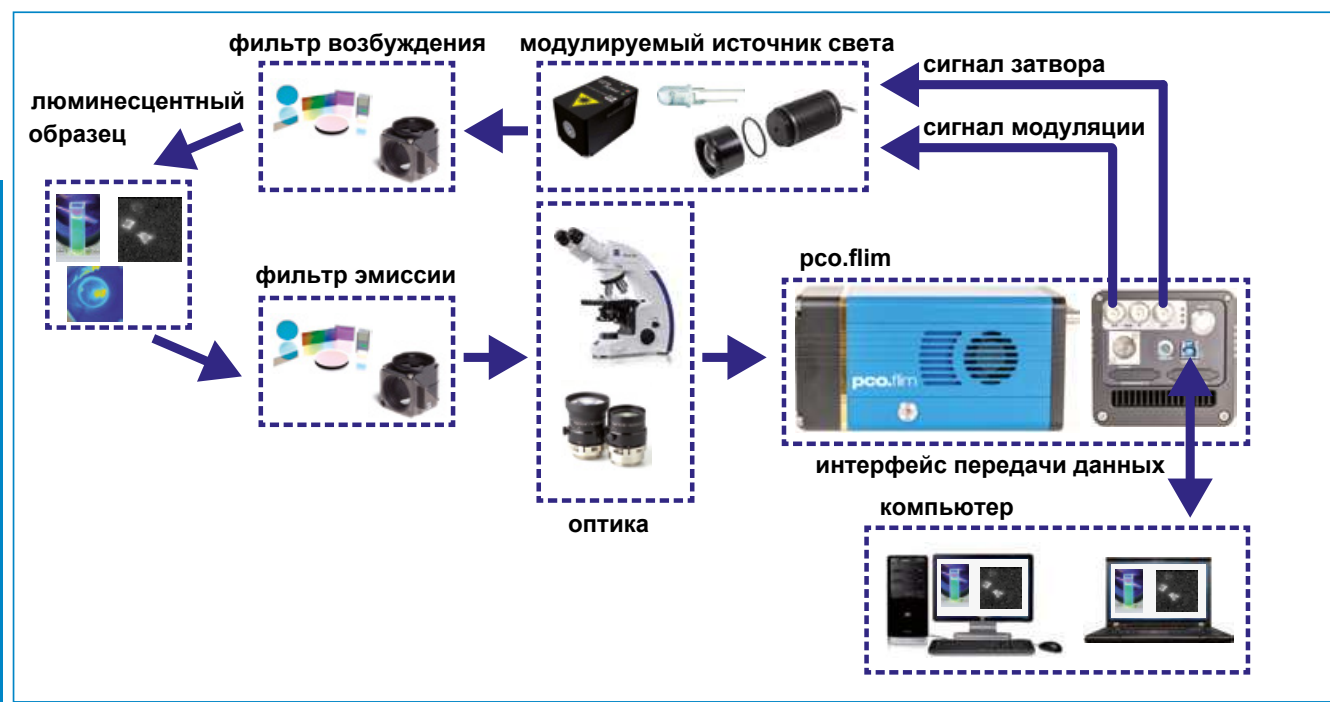


Рисунок 3: Структурный обзор установки для получения флуоресцентных изображений с помощью камеры pco.flim.

## Флуоресцентная микроскопия — это простая задача...

### Система флуоресцентной микроскопии

Система флуоресцентной микроскопии pco.flim оснащена полноценным генератором частот, который генерирует модулирующие сигналы в частотной области. Таким образом, для проведения измерений требуется только одно дополнительное устройство — подходящий источник света возбуждения, который может использовать синусоидальные или прямоугольные сигналы модуляции и сигнал затвора для выключения источника при считывании изображения.

Камера pco.flim имеет разрешение 1008x1008 пикс. с максимальной частотой кадров, равной 90 двойных изображений в секунду. Эффективная частота кадров составляет около 20 к/с, поскольку необходимо вычитывать минимум 2 двойных изображения для правильного размещения синуса, и это нужно сделать дважды для адекватной коррекции асимметрии. Камера может работать на одной или нескольких частотах в диапазоне от 5 кГц до 40 МГц и может выполнять коррекцию асимметрии даже до считывания изображения.

Камера оснащена интерфейсом USB 3.0 и может подключаться к любым компьютерам.

Термоэлектрический элемент охлаждения Пельтье поддерживает температуру матрицы 5°C с помощью системы водяного или воздушного охлаждения. Крепление C-mount позволяет легко подключать любые микроскопы и линзы. Таким образом, камера значительно упрощает исследовательские процессы и снижает затраты на их проведение.

### Простота эксплуатации

Интеграция оптимизированного программного обеспечения значительно упростила процесс проведения измерений 2D-распределения времени жизни флуоресценции. Вместо усиливающей камеры, источника света и тактовых или частотных генераторов требуется только CMOS-камера и источник света. Таким образом, пользователь получает в свое распоряжение исследовательские средства, которые ранее были недоступны из-за повышенных аппаратных требований.

Пользователь может использовать камеру для различных исследований, например, для FRET-исследований (метод резонансного переноса энергии флуоресценции) донорной флуоресценции, измерения времени жизни автофлуоресценции в ткани или измерения времени жизни люминесценции, начиная от оптических химических датчиков на клеточном уровне и заканчивая использованием чувствительной к давлению краски в аэродинамических трубах.

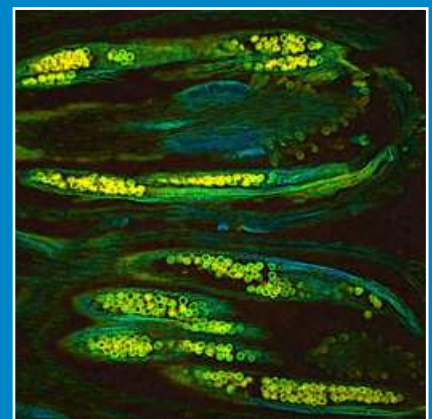
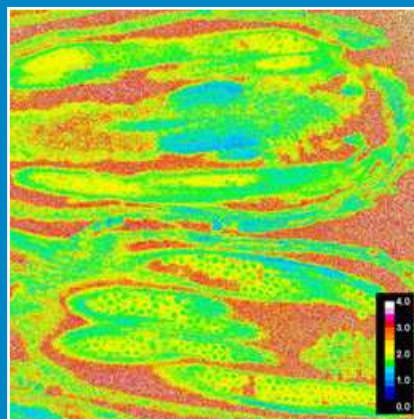
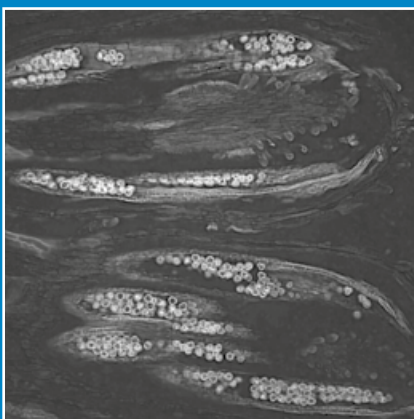
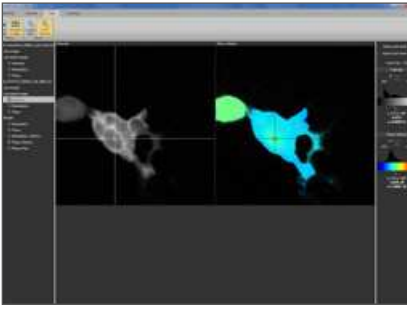


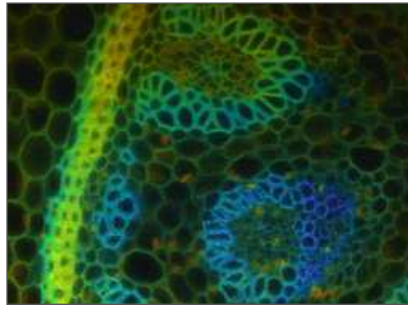
Рисунок 5: На левом рисунке показана интенсивность флуоресценции образца маргаритки (20x). На среднем изображении показано распределение фазового угла времени жизни флуоресценции в диапазоне от 0 до 4 нс (imageJ LUT 16 цветов, цветовая шкала 0...4 нс). Разница во времени жизни флуоресценции позволяет четко различать клетки и пыльцевые зерна. На правом изображении показано взвешенное по интенсивности распределение времени жизни флуоресценции (псевдоцветная кодировка, частота модуляции 30 МГц, изображение предоставлено профессором, доктором Ф.С. Вутерсом и доктором Дж.Бантом, Университет медицины Геттингена).

# Флуоресцентная микроскопия — это простая задача...

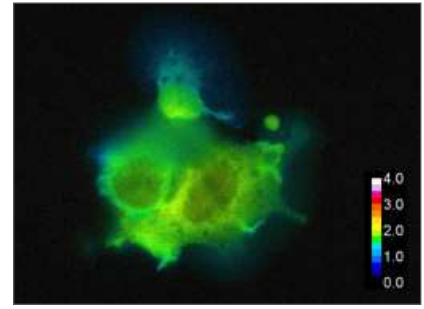
## Применение



Программное обеспечение Look@FLIM предназначено для построения изображения среды в частотной области, снятого камерой pco.flim.

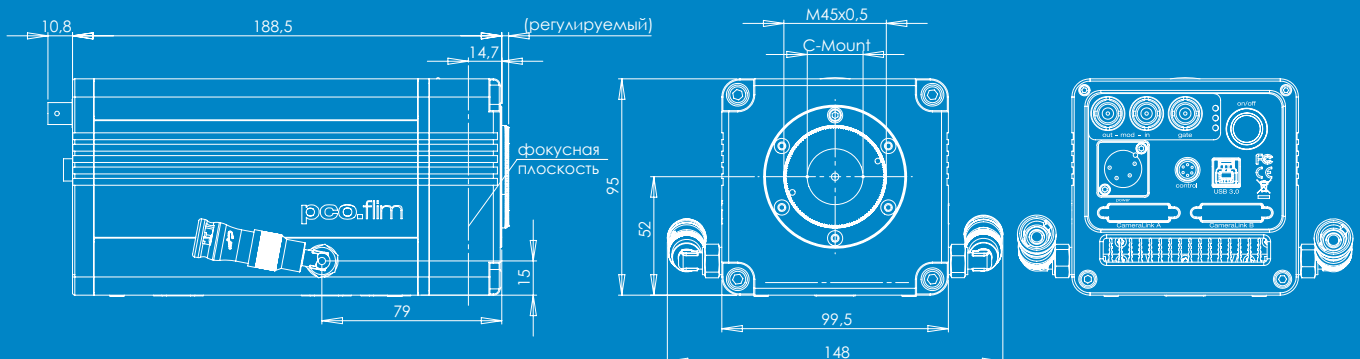


Флуоресцентный микроскопический снимок образца ландыша майского. На изображении показано взвешенное по интенсивности распределение времени жизни флуоресценции на основе измеренного фазового угла с использованием псевдоцветового кодирования. Время жизни варьируется между 0,5 и 4 нс.



Клетки HEK-293 выражают гибридный белок из голубого флуоресцентного белка (CFP) и желтого флуоресцентного белка (YFP). Димеризация этого белка обнаруживается FRET по уменьшению времени жизни CFP. На изображении показано взвешенное по интенсивности распределение времени жизни флуоресценции на основе измеренного фазового угла с использованием псевдоцветового кодирования. Время жизни варьируется между 0,5 и 4 нс (см. цветовую шкалу, снимок предоставлен профессором, доктором Ф.С. Вутерсом и доктором Дж.Бантом, Университет медицины Геттингена).

## Размеры



## Флуоресцентная микроскопия — это простая задача...

### Технические характеристики

Камера pco.flim является первой камерой реального времени для флуоресцентной микроскопии с использованием новой модулируемой CMOS-матрицы. Камера позволяет генерировать необходимые сигналы в диапазоне 5кГц - 40 МГц, а также использовать внешнюю модуляцию в ограниченном диапазоне 500 кГц - 40МГц.

Камера оснащена интерфейсом USB 3.0 для передачи данных изображения и управления режимами работы. Кроме того, она поддерживает триггерные выходные и выходные сигналы, что позволяет применять ее для различных задач. В таблицах приведены технические характеристики камеры:

#### матрица

тип матрицы	CMOS
матрица	собственной разработки
разрешение (г х в)	1008 x 1008 пикс.
размер пикселя (г х в)	5.6 мкм x 5.6 мкм
размер / диагональ	5.7 мм x 5.7 мм / 8.1 мм
режимы затвора	сдвигаемый затвор/общая выдержка
полная емкость	52 000 e- (тип.)
шум считывания	48 e- rms (тип.)
динамический диапазон	> 1 000 : 1 (60 дБ)
квантовая эффективность	прибл. 39 % от пика
спектральный диапазон	370 нм ... 780 нм (FWHM)
темновой ток	1220 e- / (с.пиксел)
DSNU	56 e- rms
PRNU	0.7 %

#### камера

макс.частота кадров (макс.частота и разрешение)	90 к/с (2 вывода)
частота модуляции	внутренняя: 5 кГц ... 40 МГц внешняя: 500 кГц ... 40 МГц
форма сигнала модуляции	синусоидальная / прямоугольная
выдержка	10 нс ... 42 с
динамич. диапазон АЦП	14 бит
коэффициент АЦП	3.4 e-/отсчет
видимая область	шаги 16x1 пикс.
термоэлектрич. охлаждение	+5 °С
нелинейность	< 1 %
входящие триггерные сигналы	запуск излучения (триггер фазовой последовательности)
выходные триг. сигналы	выдержка, занято, затвор (свет вкл.)
вых. модулирующ. сигнал	1 V <sub>peak-peak</sub> В 50 Вт, связ. по перем. току
вход. модулирующ.сигнал	макс.. +/- 5 В > 1 Вт
интерфейс передачи данных	USB 3.0

#### общие характеристики

питание	90 ... 260 В. пер. тока (12 В пост. опция)
потребляемая мощность	40 Вт макс.
масса	2.4 кг
температура эксплуатации	+5...+40 °С
влажность при эксплуатации	10...90 % (без конденсата)
температура хранения	-20...+70 °С
оптический интерфейс	C-mount
сертификаты CE / FCC	есть

#### Внешний вид камеры



# КОНТАКТЫ

## Европа

PCO AG  
Donaupark 11  
93309 Kelheim, Germany (Германия)

+49 9441 2005 50  
info@pco.de  
pco.de

## Америка

PCO-TECH Inc.  
6930 Metroplex Drive  
Romulus, Michigan 48174, USA (США)

+1 248 276 8820  
info@pco-tech.com  
pco-tech.com

## Азия

PCO Imaging Asia Pte.  
3 Temasek Ave  
Centennial Tower, Level 34  
Singapore, 039190 (Сингапур)

+65 6549 7054  
info@pco-imaging.com  
pco-imaging.com

## Китай

Suzhou PCO Imaging Technology Co., Ltd.  
Suzhou (Jiangsu), P. R. China

+86 512 67634643  
info@pco.cn  
pco.cn



Подробная информация  
приведена на сайте [www.pco.de](http://www.pco.de)

