

JOANNEUM

ENG.: 21. FEB. 2007
IPD. Nr.: REM
du
X → NYC
RESEARCH

PATENTANWÄLTE

MIKŠOVSKY & POLLHAMMER OEG
European Patent and Trademark Attorneys

Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH
z.Hd. Dipl.-Ing.(FH) Ch. Konrad
Steyrergasse 17
8010 Graz

Dipl.-Ing. DDr. ALEXANDER MIKŠOVSKY
Dipl.-Ing. Dr. GERDA CUNOW

Währinger Straße 3, Postfach (POB) 145
1096 Wien, Austria

Tel +43 (1) 408 47 34
Fax +43 (1) 408 47 34-9
Mail patmipoll@patent-austria.com
www.patent-austria.com

Wien, 19.02.2007

Unser Zeichen/Our ref.: P03245

Ihr Zeichen/Your ref.: ---

Betr./re.: Österreichisches Patent AT-B 502 194
Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH
"Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe ..."

Sehr geehrter Herr Dipl.-Ing. Konrad!

In der Anlage übersenden wir Ihnen eine Mitteilung des Österreichischen Patentamtes, gemäß welcher auf die Patentanmeldung A 2014/2005 ein Patent unter der Nr. AT-B 502 194 am 15. Februar 2007 erteilt und in das Register eingetragen wurde.

Die Urkunde werden wir Ihnen nach Erhalt übermitteln.

Die nächste Jahresgebühr wird am 31. Dezember 2007 fällig.

In der Anlage übermitteln wir Ihnen weiters eine vollständige Kopie der am 15. Februar 2007 unter der Nummer

AT 502 194 A1

erfolgten Veröffentlichung der Anmeldung, wie mit unserem Schreiben vom 19. Dezember 2006 ausgeführt.

Wir hoffen, Ihnen hiemit gedient zu haben.

Mit vorzüglicher Hochachtung

Patentanwälte
Mikšovsky & Pollhammer OEG

Anlage:
Mitteilung,
Veröffentlichung

Mündliche Mitteilungen sind unverbindlich!

BA CA AG 0142-35501/00, RLB NOE AG 12.080.560, PSK AG 92.023.978
Firmenbuchnr. FN 36955x, HG Wien; DVR: 0817015; VAT-Nr. ATU 13376906

16. Feb. 2007



Ihr Zeichen: 3245

An

JOANNEUM RESEARCH
FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH
zu Händen
PATENTANWÄLTE MIKSOVSKY &
POLLHAMMER OEG
WIEN

Bankverbindung
PSK Konto Nr. 5 160 000
BLZ 60 000

Internationaler Zahlungsverkehr
BIC-Code: OPSKATWW
IBAN-Nr. AT36 6000 0000 0516 0000

Aktenzeichen: **A 2014/2005**
Patent Nr.: **502.194**

Mitteilung

Wien, am 15. Februar 2007

Auf die Patentanmeldung A 2014/2005 vom 16. Dezember 2005 wurde ein Patent erteilt, das unter der Nr. 502.194 am 15. Februar 2007 in das Patentregister eingetragen worden ist. Die Erteilung des Patentbeschlusses wurde im Österreichischen Patentblatt veröffentlicht. Die Patenturkunde wird Ihnen zugesandt werden. Der Schutz des Patentbeschlusses dauert gemäß § 28 des Patentgesetzes höchstens zwanzig Jahre ab dem Anmeldetag, somit bis zum 16. Dezember 2025.

Zur Aufrechterhaltung des Patentbeschlusses sind jährlich am letzten Tag des Anmeldemonats, das ist am 31. Dezember, Jahresgebühren fällig (§ 6 Patentamtsgebührengesetz). **Die erste zu zahlende Jahresgebühr (Jahresgebühr für das 3. Jahr) beträgt 70 € und wird am 31. Dezember 2007 fällig*).** Die Beträge der weiteren Jahresgebühren sind dem Gebühreninformationsblatt zu entnehmen.

Die Jahresgebühren können frühestens drei Monate vor ihrer Fälligkeit gezahlt werden und sind auf das Konto des Österreichischen Patentamts (PSK Kto. 5 160 000, BLZ 60 000) zu überweisen bzw. einzuzahlen. Als Verwendungszweck ist Folgendes anzuführen:

PA 502194 Jahresgebühr

Zahlung nach Fälligkeit:

Bei jeder Zahlung nach Fälligkeit ist zusätzlich eine **Zuschlagsgebühr von 20 %** der Jahresgebühr zu zahlen. Die Jahresgebühren sind bis spätestens sechs Monate nach der Fälligkeit zu zahlen, **sonst erlischt das Patent**. Der Zuschlag entfällt bei der ersten zu zahlenden Jahresgebühr.

Mit freundlichen Grüßen

Österreichisches Patentamt
Patentregister

*) Der ausgewiesene Betrag berücksichtigt nicht allfällige zwischenzeitliche Gebührenänderungen.

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

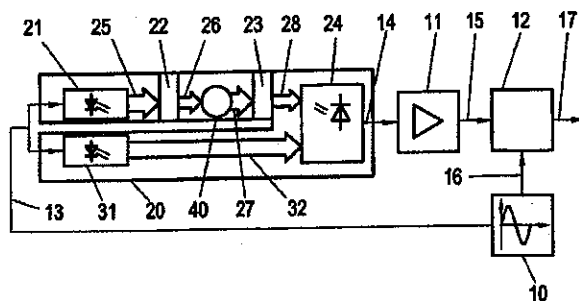
(21) Anmeldenummer: A 2014/2005 (51) Int. Cl.⁸: G01N 21/64 (2006.01)
(22) Anmeldetag: 16.12.2005
(43) Veröffentlicht am: 15.02.2007

(73) Patentanmelder:

JOANNEUM RESEARCH
FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH
A-8010 GRAZ (AT)

(54) **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG DER FLUORESCENZ EINER PROBE SOWIE VERWENDUNG DERSELBEN**

(57) Bei einem Verfahren sowie einer Vorrichtung zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe, wobei die Probe (40) mit einem Licht (25) einer Wellenlänge bestrahlt wird, welche zur Anregung von Fluoreszenzlicht (27, 28) in der Probe geeignet ist, und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht (28) in einem Empfänger (24) empfangen wird und in ein Messsignal umgewandelt wird, wobei dem Empfänger (24) zusätzlich ein Referenzlicht (32) insbesondere zur Kompensierung von Umwelteinflüssen zugeführt und ebenfalls in ein Referenz-Messsignal umgewandelt wird, ist vorgesehen, dass der optische Weg des in die Probe (40) eintretenden Anregungslichts (25) und die Probe (40) verlassenden Fluoreszenzlichts (27, 28) von dem optischen Weg (32) des eine gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht aufweisende Referenzlichts zwischen Lichtquellen (32, 31) und Empfänger (24) getrennt wird, wodurch sich bei vereinfachtem, konstruktivem Aufwand eine präzisere Auswertung des von einer Probe (40) ausgesandten Fluoreszenzlichts erzielen lässt.



Z u s a m m e n f a s s u n g :

Bei einem Verfahren sowie einer Vorrichtung zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe, wobei die Probe (40) mit einem Licht (25) einer Wellenlänge bestrahlt wird, welche zur Anregung von Fluoreszenzlicht (27, 28) in der Probe geeignet ist, und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht (28) in einem Empfänger (24) empfangen wird und in ein Me^{ss}signal umgewandelt wird, wobei dem Empfänger (24) zusätzlich ein Referenzlicht (32) insbesondere zur Kompensierung von Umwelteinflüssen zugeführt und ebenfalls in ein Referenz-Me^{ss}signal umgewandelt wird, ist vorgesehen, daß der optische Weg des in die Probe (40) eintretenden Anregungslichts (25) und die Probe (40) verlassenden Fluoreszenzlichts (27, 28) von dem optischen Weg (32) des eine gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht aufweisende Referenzlichts zwischen Lichtquellen (32, 31) und Empfänger (24) getrennt wird, wodurch sich bei vereinfachtem, konstruktivem Aufwand eine präzisere Auswertung des von einer Probe (40) ausgesandten Fluoreszenzlichts erzielen läßt. (Fig. 2)

014251

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe, wobei die Probe mit einem Licht einer Wellenlänge bestrahlt wird, welche zur Anregung von Fluoreszenzlicht in der Probe geeignet ist, und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht in einem Empfänger empfangen wird und in ein Me^{ss}signal umgewandelt wird, wobei dem Empfänger zusätzlich ein Referenzlicht insbesondere zur Kompensierung von Umgebungseinflüssen zugeführt und ebenfalls in ein Referenz-Me^{ss}signal umgewandelt wird. Die Erfindung bezieht sich weiters auf eine Vorrichtung zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe, umfassend eine Lichtquelle zur Aussendung eines Lichts einer Wellenlänge, welche zur Anregung von Fluoreszenzlicht in der Probe geeignet ist, und einen Empfänger, welcher das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht empfängt und in ein Me^{ss}signal umwandelt, wobei dem Empfänger zusätzlich ein Referenzlicht insbesondere zur Kompensierung von Umgebungseinflüssen zuführbar und von diesem in ein Referenz-Me^{ss}signal umwandelbar ist.

Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung soll unter dem Ausdruck "eine Wellenlänge" auch ein um eine zentrale und definierte Wellenlänge liegender, insbesondere enger Wellenlängenbereich verstanden werden, wie dies beispielsweise bei Verwendung einer Leuchtdiode bzw. LED der Fall ist.

Derartige Verfahren und Vorrichtungen sind beispielsweise der DD-A 229 220, der US-A 5 196 709 oder der DE-C 198 49 585 zu entnehmen.

Die Bestimmung der Fluoreszenz von spezifischen Molekülen wird zunehmend in sensorischen Anwendungen zur Bestimmung diverser Analyten eingesetzt. Dabei werden die Moleküle durch Bestrahlung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge in einen angeregten Zustand versetzt. Die Rückkehr der Moleküle in den Grundzustand erfolgt durch Abstrahlung von Licht, welches eine höhere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist (Stoke's Shift). Zusätzlich ist diese Emission zeitlich versetzt. Informationen über die zu bestimmende Probe können durch Messung der Intensität oder der Ab-

Abklingzeit des Fluoreszenzlichts gewonnen werden. Einsatzmöglichkeiten dieses Phänomens liegen in der Umweltanalytik, in der medizinischen Diagnostik, in der Überwachung von zahlreichen industriellen Prozessen und in einer Analyse im Labor.

Die einfachste Methode zur Bestimmung der Eigenschaften von Analyten mittels Fluoreszenzmessungen liegt in der Detektion der Intensität des vom Fluoreszenzmolekül emittierten Lichts. Für praktische Anwendungen hat diese Methode allerdings einige schwerwiegende Nachteile. So haben Auswaschungen oder ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs, sowie Fluktuationen der Lichtquelle und Nicht-Linearitäten der optischen Detektoren einen direkten Einfluss auf das Messergebnis. Während Änderungen betreffend den Farbstoff nur durch Kalibration mit definierten Konzentrationen des spezifischen Analyten kompensiert werden können, bedarf es bezüglich der Instrumentierung oftmals aufwendiger Temperaturstabilisierungen oder optischen Komponenten, um diese Effekte so gering wie möglich zu halten.

Eine weitaus kompaktere Methode bietet die Bestimmung der Zeitverzögerung mit einer dominierenden Zeitkonstante τ des abgestrahlten Fluoreszenzlichts, welche auch als "Lebensdauer", "Decay Time", oder "Life Time" bezeichnet wird. Die Bestimmung der Zeitkonstante kann durch Messung der Abklingkonstante nach pulsformiger Anregung (im Zeitbereich), oder durch die Messung der Phasenverschiebung bei sinusförmiger Anregung (im Frequenzbereich) erfolgen. Da die Bestimmung der Abklingzeitkonstante bzw. der Phasenverschiebung prinzipiell unabhängig von der emittierten Intensität ist und praktisch nur durch die nachfolgende Instrumentierung limitiert wird, können Effekte des Farbstoffs (z.B. Auswaschung, Ausbleichen) vernachlässigt werden. Die Bestimmung der Phasenverschiebung zur Erfassung der Änderungen von selektiven Farbstoffen hat sich in praktischen Umsetzungen aufgrund des geringeren instrumentellen Aufwands gegenüber einer Abklingzeitmessung durchgesetzt.

014751

In jedem Fall ist es auch bei der Bestimmung der Phasenverschiebung nicht zuletzt aufgrund des Einsatzes in verschiedensten Umgebungen empfehlenswert, eine Referenzierung vorzunehmen, um Temperatureinflüsse, welche die aktiven optischen Komponenten sowie die Auswertelektronik betreffen, zu kompensieren. Als einfachste Variante zur Realisierung einer Referenzierung, welche diese Aufgaben erfüllt, hat sich eine Bestimmung einer Phasenverschiebung des Meßkreises ohne den selektiven Farbstoff erwiesen. Hierbei wird periodisch zwischen einer Signallichtquelle, welche die durch die Probe verursachte Phasenverschiebung bestimmt, und einer Referenzlichtquelle, welche die Phasenverschiebung der Instrumentierung bestimmt, umgeschaltet und die wahre Phasenverschiebung durch Subtraktion der Referenzphasenverschiebung von der Signalphasenverschiebung ermittelt.

Für Anwendungen in der Prozeßtechnik und in der medizinischen Diagnostik stellen Miniaturisierung, Automatisierung und geringe Kosten solcher Meßsysteme eine Voraussetzung für die Akzeptanz durch den Anwender dar. Aufwendige optische Anordnungen, welche insbesondere mit teuren optischen Filtern verbunden sind, stellen hier wesentliche Faktoren bzw. Nachteile dar.

Unabhängig von Referenzierungsmethoden und Stabilisierungstechniken ist das Verhältnis von Fluoreszenzlicht zu Anregungslicht klein und bedarf somit diverser optischer Methoden (optische Anordnung bzw. optische Filter) zur Separation des Lichts dieser beiden Lichtquellen.

Die vorliegende Erfindung zielt darauf ab, ausgehend von einem Verfahren sowie einer Vorrichtung der eingangs genannten Art einfache optische Anordnungen sowie Möglichkeiten zur Referenzierung zu bieten, und insbesondere unter Bereitstellung von konstruktiven, einfachen und somit kostengünstigen Ausbildungen eine genaue Auswertung zu ermöglichen.

Zur Lösung dieser Aufgaben ist ein Verfahren der eingangs genannten Art im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß der optische Weg des in die Probe eintretenden Anregungslichts und die

01421

Probe verlassenden Fluoreszenzlichts von dem optischen Weg des eine gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht aufweisende Referenzlichts zwischen Lichtquellen und Empfänger getrennt wird. Dadurch, daß⁶⁵ erfindungsgemäß der optische Weg des in die Probe eintretenden Anregungslichts und des die Probe verlassenden Fluoreszenzlichts von dem optischen Weg des Bezugs- bzw. Referenzlichts getrennt ist, wird sichergestellt, daß⁶⁵ das Referenzlicht keinerlei Beeinflussung der Probe mit sich bringt und daß⁶⁵ somit tatsächlich nur das Anregungslicht durch die Probe hindurchtritt. Durch die erfindungsgemäß vorgeschlagene Trennung der optischen Wege des Anregungs- sowie des daraus resultierenden Fluoreszenzlichts von dem Referenz- bzw. Bezugslicht kann erfindungsgemäß eine idente Wellenlänge sowohl für das Anregungslicht als auch für das Referenzlicht eingesetzt werden, ergeben sich unmittelbar Vorteile bei der Auswertung, da im Gegensatz zum bekannten Stand der Technik für das Referenzlicht keine unterschiedliche Wellenlänge gegenüber dem Anregungslicht verwendet wird, um eine Beeinflussung der Probe zu vermeiden, so daß⁶⁵ auch entsprechend aufwendige Korrekturen, insbesondere im Hinblick auf Umgebungsparameter, wie beispielsweise Temperatur der Probe, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Wellenlängen entfallen können. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gelingt somit eine vereinfachte Auswertung insbesondere dahingehend, daß⁶⁵ sowohl für das Anregungslicht als auch für das Referenzlicht eine gleiche Wellenlänge verwendet werden kann. Bei den zu kompensierenden Umgebungseinflüssen handelt es sich beispielsweise um Änderungen, welche aufgrund von Temperaturänderungen oder durch Toleranzen der jeweiligen Bauteile entstehen. Erfindungsgemäß können somit baugleiche Lichtquellen für Anregung und Referenzierung verwendet werden, was eine Verbesserung der Referenzierung ermöglicht, da beide identische optische und elektrische Eigenschaften aufweisen.

Für eine konstruktiv einfache Trennung der optischen Wege wird erfindungsgemäß bevorzugt vorgeschlagen, daß⁶⁵ die Trennung der optischen Wege durch ein optisches Filter vorgenommen wird.

01761

Für eine besonders zuverlässige Trennung der optische Wege für das Anregungslicht als auch das Referenzlicht wird gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform vorgeschlagen, daß¹⁵ das Referenzlicht durch einen Lichtwellenleiter dem Empfänger zugeführt wird, wobei durch Einsatz eines derartigen Lichtwellenleiters sichergestellt werden kann, daß¹⁶ auch keinerlei Streulicht des Referenzlichts gegebenenfalls in die Probe eintritt und somit diese beeinflusst¹⁷.

Wie oben bereits angeführt, ist ein wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung, daß¹⁸ sowohl das Anregungslicht als auch das Referenzlicht gleiche Wellenlängen aufweisen, da erfindungsgemäß eine entsprechende Trennung der optischen Wege vorgeschlagen wird. Zur Erzielung einer derartigen gleichen Wellenlänge wird gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäß vorgeschlagen, daß¹⁹ das Referenzlicht von einer zur Bereitstellung des Anregungslichts identen, getrennten Lichtquelle zur Verfügung gestellt wird.

Zur besonders zuverlässigen Ansteuerung und zur Vereinfachung der nachfolgenden Auswertung insbesondere im Hinblick auf eine Phasenverschiebung wird gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform vorgeschlagen, daß²⁰ die Anregungslichtquelle und die Referenzlichtquelle von einem gemeinsamen Modulator angetrieben werden.

Anstelle der Verwendung von zwei im wesentlichen identen Lichtquellen zur Bereitstellung des Anregungslichts als auch des Referenzlichts wird gemäß einer alternativen Ausführungsform erfindungsgemäß bevorzugt vorgeschlagen, daß²¹ das von der Lichtquelle zur Aussendung von Anregungslicht ausgesandte Licht zwischen dem optischen Weg zum Durchtritt durch die Probe und dem getrennten optischen Weg des Referenzlichts umgeschaltet wird. Es kann bei einer derartigen Ausführungsform somit mit einer einzigen Lichtquelle das Auslangen gefunden werden, wobei eine Umschaltung zwischen den optischen Wegen für das Anregungslicht als auch das Referenzlicht vorgenommen wird. Die Auswertung läßt²² sich hierbei da-

durch vereinfachen, daß die Lichtquelle, welche sowohl das Anregungslicht als auch das Referenzlicht zur Verfügung stellt, ident ist, so daß auch der konstruktive Aufwand insbesondere unter Verzicht auf einen beispielsweise gemeinsamen Modulator oder eine aufwendigere Treiberschaltung für die Lichtquelle reduziert werden kann, da ein üblicherweise einfacher Umschalter ausreichend ist.

Wie oben bereits angedeutet, ist das Verhältnis von Fluoreszenzlicht zu Anregungslicht klein und es ist für eine entsprechende Auswertung eine an die Detektion im Empfänger anschließende an sich bekannte Verstärkungs- und Signalverarbeitung erforderlich, wobei in diesem Zusammenhang gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform vorgeschlagen wird, daß in an sich bekannter Weise die vom Empfänger ausgegebenen Meßsignale in einem Verstärker verstärkt und nachfolgend in einer Signalverarbeitungseinheit verarbeitet und gegebenenfalls dargestellt werden.

Zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben ist darüber hinaus eine Vorrichtung der eingangs genannten Art im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß der optische Weg des in die Probe eintretenden Anregungslichts und die Probe verlassenden Fluoreszenzlichts von dem optischen Weg des eine gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht aufweisende Referenzlichts zwischen Lichtquelle und Empfänger getrennt ist. Wie oben bereits ausgeführt, wird es durch Bereitstellung getrennter optischer Wege sowohl für das Anregungslicht als auch das daraus nach Durchtritt durch die Probe resultierende Fluoreszenzlicht und das Referenz- bzw. Bezugslicht möglich, eine gleiche Wellenlänge sowohl für das Anregungslicht als auch das Fluoreszenzlicht einzusetzen, so daß ein entsprechender Auswerteaufwand insbesondere vereinfacht bzw. reduziert werden kann.

Für eine einfache und zuverlässige Trennung wird vorgeschlagen, daß zur Trennung der optischen Wege ein optisches Filter eingesetzt ist, wie dies einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung entspricht.

014701

Zur Bereitstellung von einer gleichen Wellenlänge sowohl für das Referenzlicht als auch das Anregungslicht ist gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, daß zwei idente und getrennte Lichtquellen zur Erzeugung des Lichts zur Bestrahlung der Probe zur Anregung von Fluoreszenz und zur Erzeugung des Referenzlichts vorgesehen sind.

Für eine zuverlässige und einfache Ansteuerung dieser zwei identen Lichtquellen zur Bereitstellung einer jeweils gleichen Wellenlänge sowohl für das Anregungslicht als auch das Fluoreszenzlicht wird darüber hinaus bevorzugt vorgeschlagen, daß ein gemeinsamer Frequenzmodulator für die zwei Lichtquellen vorgesehen ist.

Wie oben ebenfalls bereits ausgeführt, kann anstelle der Bereitstellung von zwei identen Lichtquellen mit einer Lichtquelle und einer Umschalteneinrichtung das Auslangen gefunden werden, wobei sich in diesem Fall die nachfolgende Auswertung weiter vereinfachen bzw. reduzieren läßt, wobei in diesem Zusammenhang gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform vorgeschlagen wird, daß eine Lichtquelle vorgesehen ist, welcher eine Umschalteneinrichtung zur Zufuhr des von der Lichtquelle ausgesandten Lichts zur Probe und alternativ in den optischen Weg des Referenzlichts nachgeschaltet ist, wodurch eine Reduzierung des elektronischen Aufwands möglich ist.

Für eine besonderes zuverlässige räumliche Trennung der optischen Wege von Referenzlicht und Anregungslicht wird gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform vorgeschlagen, daß für die Zufuhr des Referenzlichts zu dem Empfänger ein Lichtleiter, insbesondere ein Faserkabel, vorgesehen ist.

Zur Erzielung entsprechend starker und aussagekräftiger Signale wird darüber hinaus vorgeschlagen, daß in an sich bekannter Weise dem Empfänger ein Verstärker und eine Auswerte- bzw. Verarbeitungseinheit sowie gegebenenfalls eine Anzeigeeinheit nachgeschaltet ist, wie dies einer weiters bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung entspricht.

014751

Zur Bereitstellung von zuverlässigen Lichtquellen, welche auch entsprechend kostengünstig herstellbar und miteinander abgleichbar sind, wird gemäß einer weiters bevorzugten Ausführungsform vorgeschlagen, daß die Lichtquelle bzw. Lichtquellen von einer LED gebildet ist bzw. sind.

Eine bevorzugte Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und/oder der erfindungsgemäßen Vorrichtung erfolgt hiebei in einem Bioreaktor, in der chemischen und/oder biochemischen Analytik oder in der medizinischen Diagnostik.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert. In dieser zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe zur Durchführung eines entsprechenden Verfahrens gemäß dem Stand der Technik;

Fig. 2 in einer zu Fig. 1 ähnlichen Darstellung eine erste Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens;

Fig. 3 einen schematischen, konstruktiven Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung unter Verwendung von zwei getrennten Lichtquellen;

Fig. 4 eine abgewandelte Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung unter Verwendung von zwei getrennten Lichtquellen;

Fig. 5 eine weitere abgewandelte Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung unter Verwendung von zwei getrennten Lichtquellen;

Fig. 6 in einer zu Fig. 2 ähnlichen Darstellung eine abgewandelte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung unter Verwendung einer gemeinsamen Lichtquelle für das Anregungslicht und das Referenzlicht sowie eines Umschalters; und

014701

Fig. 7 eine schematische Darstellung ähnlich den Fig. 4 und 5 einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung unter Verwendung einer gemeinsamen Lichtquellen und eines Umschalters.

Eine Ausführungsform gemäß dem Stand der Technik, wobei sowohl das Anregungslicht als auch das Referenzlicht durch die Probe 40 hindurchgeleitet wird, ist in Fig. 1 dargestellt. Es wird mit einem Frequenzmodulator 10 ein sinusförmiges Modulationssignal mit der Frequenz f_0 generiert, welches entweder eine Anregungslichtquelle 21 oder eine Referenzlichtquelle 31 versorgt. Beide Lichtquellen 21, 31 sind in eine optische Zelle in der Weise integriert, daß durch optische Filter 22, 23 und geeignete geometrische Anordnung das Anregungslicht 25 in hohem Maße daran gehindert wird, zum optischen Empfänger 24 zu gelangen, wobei die Probe 40 möglichst gut mit dem gefilterten Anregungslicht 26 angeregt wird. Des Weiteren ist der optische Filter 23 in einer Weise ausgewählt, daß das Fluoreszenzlicht 27 möglichst ungehindert zum Detektor gelangt. Im Fall einer Referenzmessung gelangt das Referenzlicht 32 durch den optischen Filter 23 zum Detektor, wobei darauf zu achten ist, daß dieses keine Fluoreszenz in der Probe 40 verursacht. Der optische Filter 23 hat somit die Aufgabe, einerseits das Fluoreszenzlicht 27 so gut wie möglich vom Anregungslicht 26 zu trennen und andererseits das eine unterschiedliche Wellenlänge aufweisende Referenzlicht 32 möglichst ungehindert passieren zu lassen. In jedem Fall erfolgt im optischen Empfänger 24 die Umwandlung des eingelangenden Lichts in ein elektrisches Meßsignal 14, welches in einem Verstärker 11 in der Weise verändert wird, daß das verstärkte elektrische Meßsignal 15 zur Verarbeitung in einer elektronischen Signalverarbeitung 12 geeignet ist und daraus gemeinsam mit dem elektrischen Referenzsignal 16 Fluoreszenzdaten 17 generiert werden können.

Eine derartige Referenzierungsmethode basiert zum einen auf der Trennung von optischem Anregungssignal 26 und Fluoreszenzsignal 27 durch den optischen Filter 23 von dem Detektor 24 und zum zweiten auf einer möglichst guten Anpassung der Referenzlichtquel-

le 31 an die Anregungslichtquelle 21 hinsichtlich elektrischer Eigenschaften und Temperaturverhalten, wobei eine geeignete geometrische Anordnung der optischen Komponenten gegeben sein muß^{ss}

In Fig. 1 ist der Teilbereich der Probe, in welchem durch das Anregungslicht eine Anregung erfolgt, so daß^{ss} in weiterer Folge das Fluoreszenzlicht 28 austritt, durch einen schraffierten Bereich 40' angedeutet.

Bei dieser bekannten Ausführungsform gemäß dem Stand der Technik ist insbesondere die Tatsache nachteilig, daß^{ss} Anregungslicht der Lichtquelle 21 als auch das Referenz- bzw. Bezugslicht der Lichtquelle 31 unterschiedliche Wellenlängen aufweisen, so daß^{ss} zusätzliche Kompensationen zur Berücksichtigungen von Umgebungs- bzw. Umwelteinflüssen, beispielsweise Temperatur bei den unterschiedlichen Wellenlängen des Anregungslichts 25 als auch des Referenzlichts 32 erforderlich sind. Hierbei kann beispielsweise eine rote und eine grüne LED als Lichtquelle 21 bzw. 31 eingesetzt werden. Da Signal und Referenz unterschiedliche LEDs 21 bzw. 31 im Sinne der Lichtemission sind, ergeben sich physikalisch auch andere elektrische Eigenschaften, wie beispielsweise Junction Kapazität, Temperaturverhalten, etc., wodurch die Qualität der Referenzierung vermindert wird.

Bei der erfindungsgemäßen Ausführungsform gemäß Fig. 2 sind die Bezugszeichen für gleiche Bauteile der Ausführungsform gemäß Fig. 1 beigehalten worden. Es ist insbesondere ersichtlich, daß^{ss} das durch die Lichtquelle 21 bereitgestellte Anregungslicht 25, ~~welches~~ in weiterer Folge, wie bei der Ausführungsform gemäß Fig. 1, durch den Filter 22 und durch die Probe 40 hindurchtritt, in welcher eine Anregung erfolgt, wonach das Fluoreszenzlicht 27 austritt und in den Filter 23 gelangt, worauf es wiederum als gefiltertes Fluoreszenzlicht 28 dem Detektor bzw. optischen Empfänger 24 zugeführt wird.

Die Trennung zwischen dem Anregungslicht 25 bzw. dem nach Durchtritt durch die Probe resultierenden Fluoreszenzlicht 27 bzw. 28 von dem Referenzlicht 32 erfolgt dadurch, daß^{ss} der Filter 23 zu

einer räumlichen Trennung der Lichtwege 25, 27 und 28 bzw. 32 ausgestaltet ist. Es ist hiebei vorgesehen, daß es zu keinen Reflexionen des Referenzlichts ³² ~~27~~ zur Probe 40 kommen kann, wodurch diese wiederum angeregt und Fluoreszenzlicht 27 emittieren würde. Die Gestaltung des optischen Filters 23 muß eine Transmission von Referenzlicht 32 zur Probe verhindern, eine Transmission des Anregungslichts 26 zum optischen Empfänger 24 verhindern, jedoch eine Transmission des Fluoreszenzlichts 27 zum optischen Empfänger 24 in hohem Maße erlauben.

Die Auswertung der im optischen Empfänger bzw. Detektor 24 aufgenommenen Signale erfolgt wie bei der Ausführung gemäß dem Stand der Technik in Fig. 1 durch den nachgeschalteten Verstärker 11, die elektronische Signalverarbeitungseinheit 12 sowie eine mögliche Anzeige von Daten, welche wiederum mit 17 angedeutet ist.

Der Vorteil der Ausführungsform gemäß Fig. 2 durch Bereitstellung der Trennung der optischen Wege liegt vor allem darin, daß ¹⁸ ~~zwei~~ idente Lichtquellen 21 und 31 verwendet werden können, so daß eine Referenzierung bzw. Auswertung vereinfacht ist oder gegenüber dem Stand der Technik gemäß Fig. 1 genauer bzw. präziser durchgeführt werden kann, da zusätzliche Einflüsse durch die Verwendung ^{von} ~~zwei~~ unterschiedlichen Lichtquellen mit unterschiedlicher Wellenlänge gemäß dem Stand der Technik und die daraus resultierenden, gegebenenfalls zusätzlich erforderlichen Kompensationen vermieden werden können.

Bei der in Fig. 3 dargestellten Ausführungsform, welche auf dem schematischen Diagramm von Fig. 2 basiert, ist ersichtlich, daß ¹⁸ ~~die~~ beispielsweise von einer LED gebildete Lichtquelle 21 ihr Licht auf ein Prisma 41 lenkt, wobei dem Prisma 41 eine nicht näher dargestellte Probe nachgeschaltet ist.

Demgegenüber wird Licht von der Lichtquelle 31 zur Bereitstellung des Referenz- bzw. Bezugslichts über ein Faserkabel 42 einem von einer Glasplatte gebildeten Element 43 zugeführt, welches von dem Prisma 41 durch das wiederum mit 23 bezeichnete Filter zur Trennung der optischen Wege zwischen Signallicht und Refe-

renzlicht zwischengeschaltet ist, wobei das durch das Faserkabel 42 zugeführte Referenzlicht direkt dem Detektor bzw. optischen Empfänger 24 zugeführt wird, wobei ein Vorverstärker, welcher nachgeschaltet ist, wiederum mit 11 angedeutet ist.

Bei einer abgewandelten Ausführungsform gemäß Fig. 4 ist ersichtlich, daß von der wiederum mit 21 bezeichneten Lichtquelle bereitgestelltes Anregungslicht, welches nach Durchtritt durch eine sogenannte Grin-Linse 44 das Anregungsfilter 22 passiert, durch einen dichroitischen Filter 45 hindurchtritt und nach Durchtritt durch eine weitere Grin-Linse 46 einer schematisch mit 47 angedeuteten sensitiven Schicht bzw. zu untersuchenden Probe zugeführt wird. Das von der Probe 47 ausgesandte Fluoreszenzlicht wird über den dichroitischen Filter 45 nach Durchtritt durch ein wiederum mit 23 bezeichnetes Emissionsfilter dem Photodetektor bzw. optischen Empfänger 24 zugeführt.

Im Gegensatz dazu erfolgt die Zufuhr von von der Lichtquelle 31 bereitgestelltem Referenzlicht unmittelbar zu dem Photodetektor 24, wobei zur Trennung der optischen Wege wiederum der Filter 23 verwendet wird.

In Fig. 5 ist eine weitere abgewandelte Ausführungsform unter Verwendung von zwei identen Lichtquellen 21 und 31 angedeutet, wobei die Lichtquelle 31 zur Bereitstellung des Referenzlichts über einen Lichtwellenleiter 48 unmittelbar mit dem wiederum mit 24 bezeichneten optischen Empfänger bzw. Detektor gekoppelt ist.

Demgegenüber wird von der Anregungslichtquelle 21 bereitgestelltes Licht nach Passieren des Filters 22 ebenfalls über einen Lichtwellenleiter 49 und schematisch angedeutete Kopplungen 50 in weiterer Folge über einen weiteren Lichtwellenleiter 51 der zu überprüfenden Probe 52, beispielsweise einer O₂-sensitiven Schicht zugeführt. Über die Lichtwellenleiter 51 sowie 53 erfolgt eine Zufuhr des Fluoreszenzlichts nach einem Passieren des Emissionsfilters 23 wiederum zu dem Detektor bzw. optischen Empfänger 24.

In Fig. 6 ist eine abgewandelte Ausführungsform dargestellt, wobei lediglich eine einzige, wiederum mit 21 bezeichnete Licht-

quelle verwendet wird, von welcher mit 25 bezeichnetes Licht eine Umschaltelinrichtung bzw. einem Umschalter 33 zugeführt wird. In diesem Umschalter erfolgt entweder eine Weiterleitung des von der Lichtquelle 21 bereitgestellten Anregungslichts zu dem Filter 22 und in weiterer Folge in die Probe 40, aus welcher Fluoreszenzlicht 27 austritt, welches nach einem Passieren des Filters 23 als Fluoreszenzlicht 28 dem wiederum mit 24 bezeichneten optischen Empfänger bzw. Fotodetektor zur weiteren Verarbeitung zugeführt wird.

Wie in Fig. 6 durch den Doppelpfeil 55 angedeutet, erfolgt in der Umschaltelinrichtung 33 eine Umschaltung zwischen dem Lichtweg des Anregungslichts 25 durch die Probe 40 und einem wiederum mit 32 bezeichneten Pfad des Referenzlichts, welches direkt dem optischen Empfänger bzw. Fotodetektor 24 zugeführt wird.

Die Kopplung mit einer nicht näher dargestellten Treiberschaltung bzw. einem Frequenzmodulator ist in Fig. 6 wiederum 13 bezeichnet.

Der Vorteil dieser Ausführungsform liegt vor allem darin, daß mit lediglich einer einzigen Lichtquelle 21 das Auslangen gefunden werden kann, so daß auch nur eine Treiberschaltung erforderlich ist. Es ergibt sich somit eine Verringerung des Aufwands durch Entfallen der getrennten Referenzlichtquelle, so daß eine präzisere bzw. genauere Auswertung insbesondere durch eine Eliminierung von gegebenenfalls bestehenden Bauteilunterschieden identer Lichtquellen, wie sie in Fig. 2 beispielsweise mit 21 und 31 bezeichnet sind, erzielbar ist. Diese Erhöhung der Genauigkeit überwiegt in den meisten Fällen den durch Vorsehen der Umschaltelinrichtung bzw. des Umschalters 33 bedingten zusätzlichen Aufwand.

In der Darstellung gemäß Fig. 7 ist ersichtlich, daß nach Passieren eines Anregungsfilters 22 der Lichtstrahl der Umschaltelinrichtung bzw. dem Umschalter 33 zur Verfügung gestellt wird, wobei das Licht auf dem optischen Pfad 32 des Referenzlichts wiederum unmittelbar dem Detektor bzw. optischen Empfänger 24 zugeführt wird.

Demgegenüber erfolgt nach einem Durchtritt durch einen wiederum mit 45 bezeichneten dichroitischen Filter eine Zufuhr des Anregungslichts zu einer ähnlich wie bei der Ausführungsform gemäß Fig. 4 wiederum mit 47 bezeichneten sensitiven Schicht. Das darin gebildete Fluoreszenzlicht wird neuerlich nach Passieren des dichroitischen Filters 45 und des Emissionsfilters 23 ebenfalls dem Photodetektor bzw. optischen Empfänger 24 zugeführt.

Es ist hiebei ersichtlich, daß insbesondere durch Bereitstellung lediglich einer einzigen Lichtquelle 21 der konstruktive Aufwand bei Erzielung einer höheren Auswertegenauigkeit verringert werden kann.

Eine bevorzugte Anwendung der in Fig. 2 bis 7 dargestellten Ausführungsformen erfolgt beispielsweise in einem Bioreaktor, in einer chemischen und/oder biochemischen Analytik oder in der medizinischen Diagnostik.

1. Verfahren zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe, wobei die Probe mit einem Licht einer Wellenlänge bestrahlt wird, welche zur Anregung von Fluoreszenzlicht in der Probe geeignet ist, und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht in einem Empfänger empfangen wird und in ein Meßsignal umgewandelt wird, wobei dem Empfänger zusätzlich ein Referenzlicht insbesondere zur Kompensierung von Umgebungseinflüssen zugeführt und ebenfalls in ein Referenz-Meßsignal umgewandelt wird, dadurch gekennzeichnet, daß der optische Weg des in die Probe eintretenden Anregungslichts und die Probe verlassenden Fluoreszenzlichts von dem optischen Weg des eine gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht aufweisende Referenzlichts zwischen Lichtquellen und Empfänger getrennt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung der optischen Wege durch ein optisches Filter vorgenommen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Referenzlicht durch einen Lichtwellenleiter dem Empfänger zugeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Referenzlicht von einer zur Bereitstellung des Anregungslichts identen, getrennten Lichtquelle zur Verfügung gestellt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungslichtquelle und die Referenzlichtquelle von einem gemeinsamen Modulator angetrieben werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das von der Lichtquelle zur Aussendung von Anregungslicht ausgesandte Licht zwischen dem optischen Weg zum Durchtritt durch die Probe und dem getrennten optischen Weg des Referenzlichts umgeschaltet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in an sich bekannter Weise die vom Empfänger

ausgegebenen Me^{ss}signale in einem Verstärker verstärkt und nachfolgend in einer Signalverarbeitungseinheit verarbeitet und gegebenenfalls dargestellt werden.

8. Vorrichtung zur Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe, umfassend eine Lichtquelle zur Aussendung eines Lichts einer Wellenlänge, welche zur Anregung von Fluoreszenzlicht in der Probe geeignet ist, und einen Empfänger, welcher das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht empfängt und in ein Me^{ss}signal umwandelt, wobei dem Empfänger zusätzlich ein Referenzlicht insbesondere zur Kompensierung von Umgebungseinflüssen zuführbar und von diesem in ein Referenz-Me^{ss}signal umwandelbar ist, dadurch gekennzeichnet, da^ß der optische Weg des in die Probe (40; 47) eintretenden Anregungslichts (25) und die Probe verlassenden Fluoreszenzlichts (27; 28) von dem optischen Weg (32) des eine gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht aufweisende Referenzlichts zwischen Lichtquelle (21, 31) und Empfänger (24) getrennt ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, da^ß zur Trennung der optischen Wege (25, 27, 28; 32) ein optisches Filter (23) eingesetzt ist.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, da^ß zwei idente und getrennte Lichtquellen (21; 31) zur Erzeugung des Lichts zur Bestrahlung der Probe (40) zur Anregung von Fluoreszenz und zur Erzeugung des Referenzlichts vorgesehen sind.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, da^ß ein gemeinsamer Frequenzmodulator (10) für die zwei Lichtquellen (21; 31) vorgesehen ist.

12. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, da^ß eine Lichtquelle (21) vorgesehen ist, welcher eine Umschaltvorrichtung (33) zur Zufuhr des von der Lichtquelle (21) ausgesandten Lichts zur Probe (40) und alternativ in den optischen Weg des Referenzlichts (32) nachgeschaltet ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, da^ß für die Zufuhr des Referenzlichts zu dem Emp-

fänger ein Lichtleiter (42, 48), insbesondere ein Faserkabel, vorgesehen ist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß in an sich bekannter Weise dem Empfänger (24) ein Verstärker (11) und eine Auswerte- bzw. Verarbeitungseinheit (12) sowie gegebenenfalls eine Anzeigeeinheit (17) nachgeschaltet ist.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle bzw. Lichtquellen (21; 31) von einer LED gebildet ist bzw. sind.

16. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 15 in einem Bioreaktor, in der chemischen und/oder biochemischen Analytik oder in der medizinischen Diagnostik.

Wien, 16. Dezember 2005

Joanneum Research
Forschungsgesellschaft mbH
durch:
Patentanwälte
Mikšovsky & Pollhammer OEG

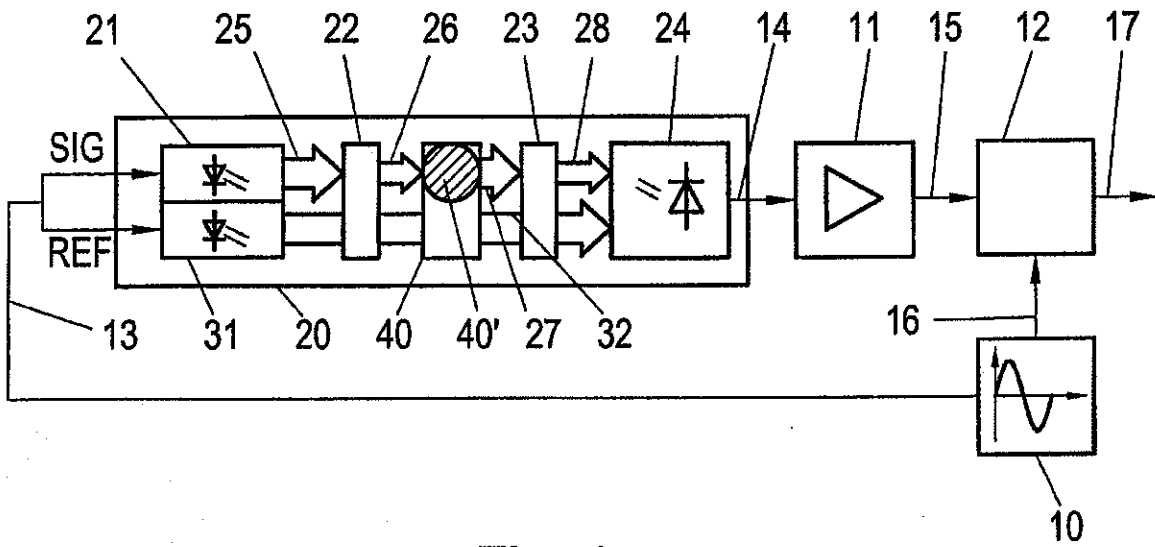


Fig. 1
(STAND DER TECHNIK)

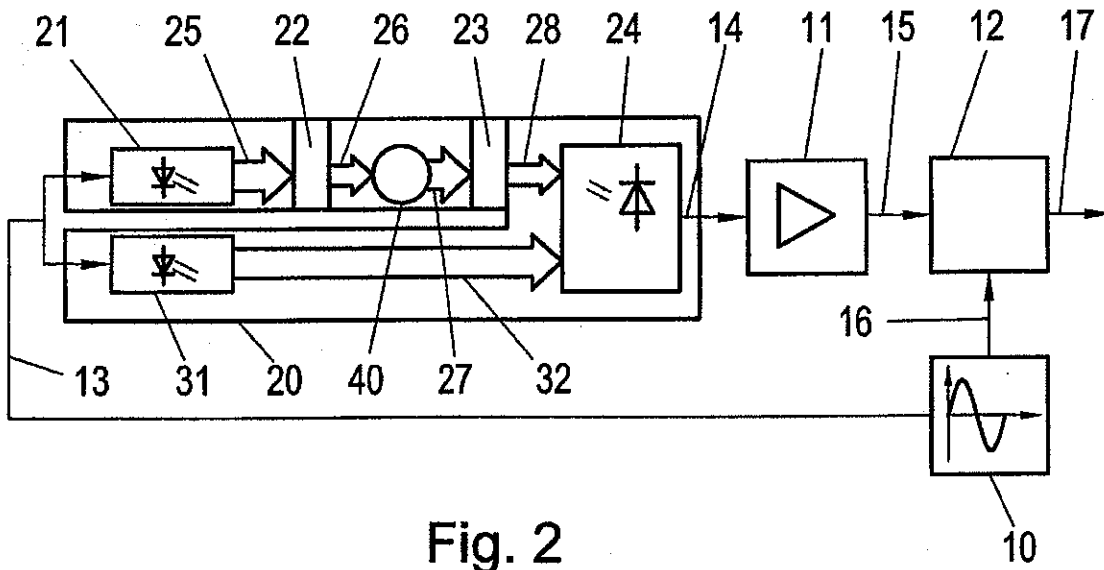


Fig. 2

Fig. 3

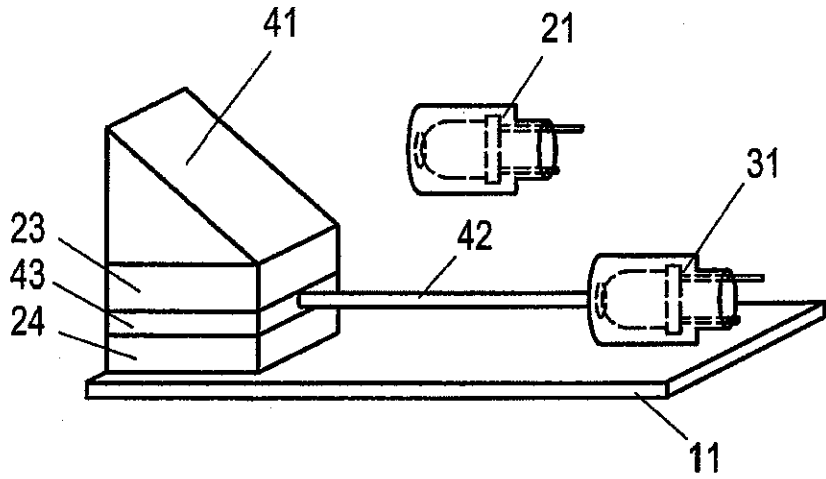


Fig. 4

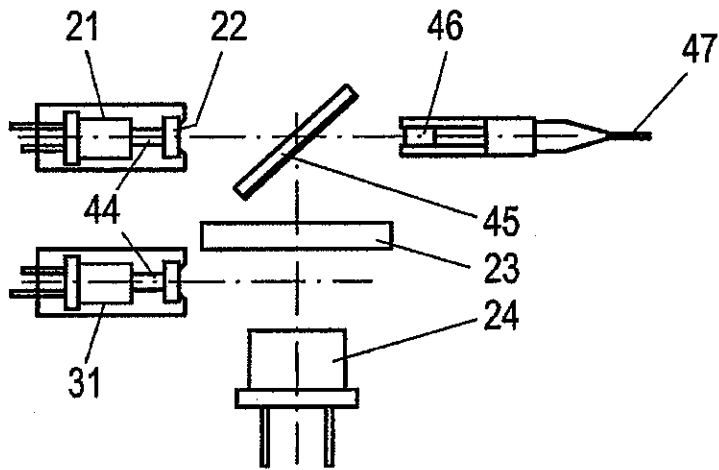
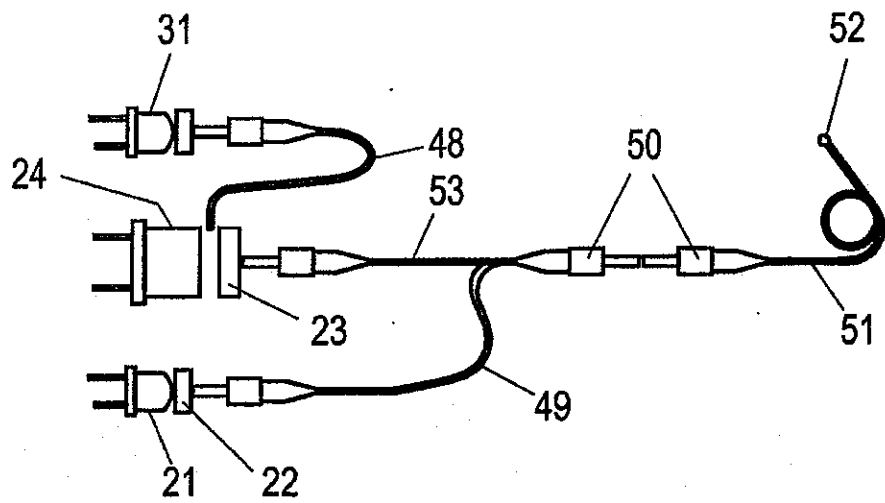


Fig. 5



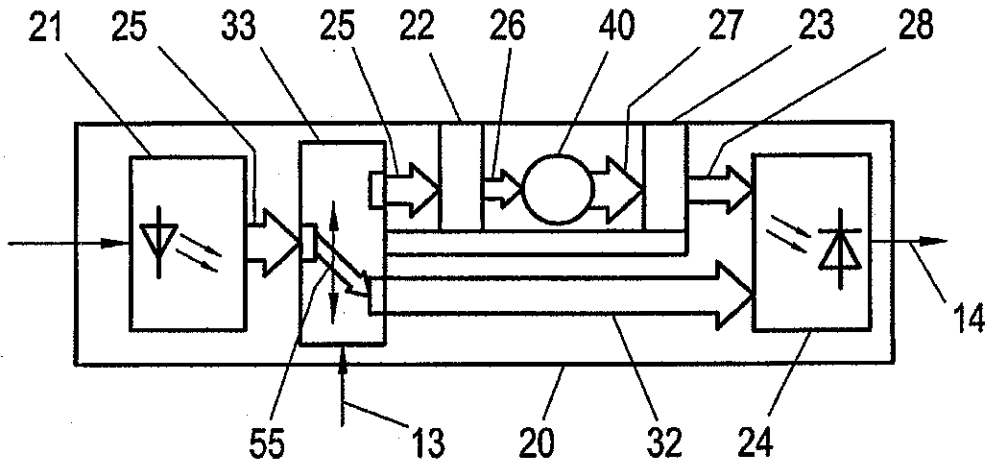


Fig. 6

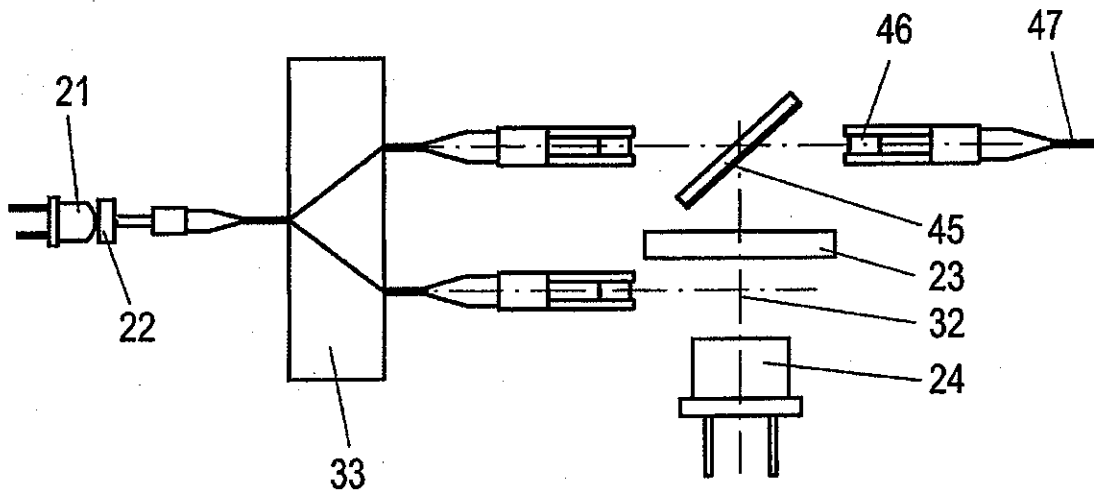


Fig. 7