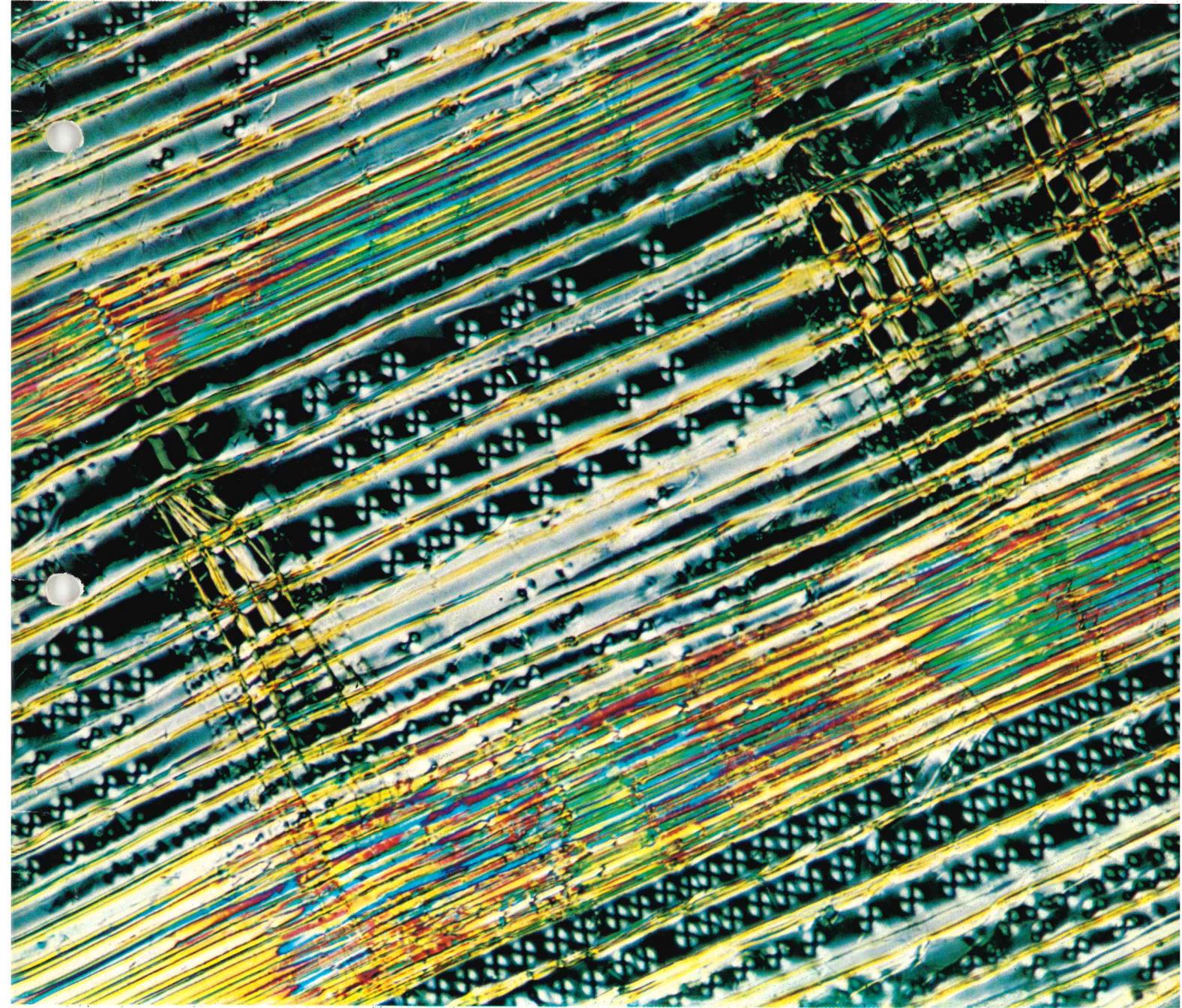




Mitteilungen

für Wissenschaft und Technik



Bd. V, Nr. 7



Originalbeiträge

- 193 WINFRIED KRAFT
Die Fluoreszenzmikroskopie und ihre gerätetechnischen Anforderungen
- 206 KARL-FRIEDRICH KOCH
Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie
- 207 H. LUDWIG, H. J. BRÜCK und H. METZGER
Kombinierte lichtmikroskopische Untersuchungen als Vorbereitung zur Rasterelektronenmikroskopie, unter besonderer Berücksichtigung der Morphologie des Fil
- 213 ROLF BECK
Optische Vergleiche an mikroskopischen und makroskopischen Objekten
- 218 G. ROMHÁNYI
Über topooptische Reaktionen und deren Wert für die submikroskopische Strukturforschung in der Biologie
- 222 J. FRÄNZ, Ch. JUNGE und W. LANGHEINRICH
Interferometrische Dickenmessung dünner durchsichtiger Schichten auf reflektierenden Substraten
- 226 WALTER PATZELT
Kritische Untersuchungen zum Phänomen des Ausbleichens fluoreszierender Objekte
- 229 Dr. phil. Dr. med. vet. h. c. Hugo Freund
1. Juli 1900–30. August 1972
- 230 Kurzmitteilungen
COMBIPHOT AUTOMATIC, DIAVERT, TELE-PROMAR

Herausgeber:

ERNST LEITZ GmbH, WETZLAR

Schriftleitung

Dr. G. Wangorsch, D 633 Wetzlar, Tulpenweg 48
Dr. F. Walter, D 6333 Braunfels, Karl-Broll-Straße 12

Zuschriften an:

ERNST LEITZ GmbH,
Redaktion LEITZ-Mitteilungen, D 633 Wetzlar, Postfach
(Tel. 0 64 41 / 29 24 23 - 29 24 07)

Diese Mitteilungen erscheinen in zwangloser Folge. Es faßt jeweils 8 Hefte. Verfasser von Originalbeiträgen sätzlich zum Honorar 100 Sonderdrucke. Nachdruck zung nur mit Genehmigung der Schriftleitung.

Satz und Druck:

Brönners Druckerei Breidenstein KG, 6 Frankfurt/Mair
Stuttgarter Straße 18-24.

Ich bin an Informationen über folgende Gebiete Ihres Arbeitsprogramms interessiert:

- Fluoreszenzeinrichtung
- Interferenzkontrasteinrichtung T
- Vergleichsmikroskop
- Vergleichsmakroskop
- Polarisationsmikroskope
- Interferenzmikroskope
- Mikroskopphotometer
- Umgekehrtes Durchlicht-Mikroskop DIAVERT
- Systemkamera COMBIPHOT AUTOMATIC
- Mikroprojektor TELEPROMAR
-

und bitte um

- Prospekte
- Angebot
- Unverbindliche Vorführung und fachliche Beratung

Ich bin an Informationen über folgende Gebiete Ihres Arbeitsprogramms interessiert:

- Fluoreszenzeinrichtung
- Interferenzkontrasteinrichtung T
- Vergleichsmikroskop
- Vergleichsmakroskop
- Polarisationsmikroskope
- Interferenzmikroskope
- Mikroskopphotometer
- Umgekehrtes Durchlicht-Mikroskop DIAVERT
- Systemkamera COMBIPHOT AUTOMATIC
- Mikroprojektor TELEPROMAR
-

und bitte um

- Prospekte
- Angebot
- Unverbindliche Vorführung und fachliche Beratung

Die Fluoreszenzmikroskopie und ihre gerätetechnischen Anforderungen

Von WINFRIED KRAFT
Wissenschaftliche Abteilung der Ernst Leitz GmbH, Wetzlar
(Eingegangen am 19. III. 1971)

DK 535.822.5 : 535.372 : 535.345.6

Die in den letzten Jahren stark expandierende Fluoreszenzmikroskopie, die in nahezu allen wissenschaftlichen Gebieten Eingang gefunden hat, stellt erhebliche Anforderungen an die dazu erforderlichen technischen Hilfsmittel wie Mikroskope, Lichtquellen, Filter und Objektive. Die vorliegende Arbeit soll eine Hilfe zur Lösung dieser Problemstellung sein.

Die Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet sich durch die andersgeartete Abbildung von der normalen Lichtmikroskopie. Dies ist bedingt durch das zum sogenannten Selbstleuchter angeregte mikroskopische Objekt. Dazu kommen die speziellen Anforderungen an Lichtquellen, jeweils charakteristische Erreger- und Sperrfilter sowie nicht zuletzt die Mikroskopoptik und da insbesondere Objektive und Okulare. Gewünscht werden weder geebnete Objektbilder, wie das in der Mikrophotographie der Fall ist, noch ist die Verwendung von Objektiven mit höchster chromatischer Korrektur erforderlich, da die Fluoreszenz immer annähernd monochromatisch ist. In der Fluoreszenzmikroskopie spielen die Quantenausbeute, der Kontrast, die Fluoreszenzintensität und die Nachweisgrenze geringster fluoreszierender Quantitäten eine primäre Rolle. Wenn mit Acridinorange gefärbte Zellen dennoch eine teils grüne, teils orange Fluoreszenzfarbe zeigen, so kann doch von einer gewissen, wenn auch nicht streng zu verstehenden monochromatischen Fluoreszenz gesprochen werden. Dies gilt im Verhältnis zum „Weißlicht“ der normalen Mikroskopbeleuchtung.

Lichtquellen

Eine ideale Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie gibt es augenblicklich noch nicht. Man kann sich jedoch unter dem Aspekt der Entwicklung von Lasern (durchstimmbare Farbstofflaser) eine solche vorstellen. Lichtquellen sollten immer in dem jeweils zur Fluoreszenzanregung herangezogenen Spektralbereich eine genügend hohe Strahldichte haben. Primär wäre dabei zu fordern, daß sie im jeweiligen Emissionsbereich der Fluoreszenz keine Energie mehr aussenden. Es müßte somit eine vielleicht mit dem Begriff „Lasermonochromator“ zu bezeichnende Lichtquelle hoher Strahldichte sein. Da es z. Z. wohl Laser mit verschiedenen diskreten Linien, den gesuchten Lasermonochromator jedoch noch nicht gibt, müssen konventionelle Lösungen optimiert werden. Das heißt, die Spektralbereiche von Anregung (Exzitation) und Fluoreszenz (Emission) werden meist mit Filtern, in wenigen Fällen mit Monochromatoren

getrennt. Aus dem gesamten Emissionsspektrum der Lichtquellen wird lediglich der Teil nutzbringend eingesetzt, den man zur Exzitation der Fluoreszenz benötigt. Den restlichen Teil des Lampenspektrums, der meist als Hintergrundaufhellung störend in Erscheinung tritt, muß man vom Objekt möglichst gut fernhalten.

Erste Ansätze zur Verwendung von Lasern in der Fluoreszenz werden z. B. mit der blauen Linie ($\lambda = 476,5 \text{ nm}$) eines Argon-Lasers zur Anregung von NO_2 gemacht, wie dies DEMTRÖDER (1970) beschrieben hat.

Da die vorhandenen Filter den bekannten und neu hinzukommenden Fluoreszenzfarbstoffen zugeordnet werden müssen, wird der jeweils mögliche optimale Kompromiß in der Zuordnung angestrebt. Das bedeutet, daß keineswegs alle Fluorochrom/Filter-Kombinationen so gestaltet werden können, wie es zur Erzielung einer optimalen Fluoreszenz wünschenswert und besser wäre. Als Hemmnisse treten dabei z. B. ungeeignete spektrale Filtercharakteristiken auf. Das ist leicht zu verstehen, wenn man bedenkt, daß ein Filter für den jeweils speziellen Anwendungsfall nur in einem engen Spektralbereich verwendet werden kann. Der Restteil des nicht verwendeten Bereiches wird durch weitere Filter unwirksam gemacht. Dies bringt in den meisten Fällen eine Transmissionsschwächung im interessierenden Spektralbereich mit sich. Das im nicht interessierenden Spektralbereich eines Filters noch transmittierte Licht tritt hauptsächlich als störende Untergrundhelligkeit in Erscheinung. Dies soll am Beispiel eines 1 mm BG 12* (rotabsorbierendes Blau-Violett-Glas) in Verbindung mit einer Quecksilberhochdrucklampe erläutert werden. Das Filter hat bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ einen Reintransmissionsgrad von ca. $\vartheta_{400} = 88\%$, was für einen bestimmten Fluoreszenzanwendungsfall zur Exzitation des Fluorochromes X wichtig ist. Liegt die Emission des Fluorochromes X zufällig bei z. B. $\lambda = 550 \text{ nm}$, so ist das Filter in dieser Form unbrauchbar. Der Grund dafür liegt in dem Reintransmissionsgrad des Filters bei $\lambda = 550 \text{ nm}$, der absolut etwa die gleiche Größe hat, wie die bei einer Fluoreszenzausbeute von ca. 1% der eingestrahlten Energie zu erwartende Fluoreszenzintensität. Infolgedessen muß die Filterdicke z. B. auf 5 mm vergrößert werden. Damit sinkt der Reintransmissionsgrad ϑ_{400} auf $\vartheta = 50\%$ ab. Gleichzeitig sinkt die Fluoreszenzintensität im Verhältnis der eingestrah-

* Fa. Schott & Gen., Mainz

ten Energie ab. Durch die Änderung der Filterdicke von 1 mm auf 5 mm ist im Wellenlängenbereich der hier angenommenen Fluoreszenz bei $\lambda = 550$ nm fast keine meßbare Resttransmission mehr vorhanden. Dies hat zur Folge, daß nur Fluoreszenzlicht und kein ungewünschtes Exzitationslicht sichtbar ist, was auch beabsichtigt war.

In Zukunft werden wegen der stetig steigenden Anforderungen auf der Applikationsseite spezielle Filter zu den jeweils verwendeten Fluorochromen (Fluorophoren) entwickelt werden müssen. Dabei müssen die spektralen Charakteristiken der verwendeten Lichtquellen in die Berechnungen einbezogen werden. Dies ist erforderlich, weil es in der Fluoreszenzmikroskopie letztlich immer auf das Zusammenwirken zwischen Lichtquellen, Filtern (Erreger- und Sperrfilter), dichromatischen Teilerspiegeln und Fluorochromen ankommt. Eine weitere bedeutende Rolle, die zusätzlich zu beachten ist, spielt natürlich das Beleuchtungsverfahren. Von den derzeit handelsüblichen Lichtquellen stehen die Gasentladungslampen, vor allem die Quecksilberdampfhochdrucklampen – meist Quecksilberhochdrucklampen genannt – an erster Stelle in der Fluoreszenzanwendung z. B. HBO 100, CS 100, HBO 200 (TRAPP 1967, KOCH 1971). Die HBO 200, eine mit Wechselstrom betriebene Lichtquelle, wird nur aus Preisgründen und nicht aus Sachgründen bevorzugt. Die mit Gleichstrom betriebenen Xenonhochdrucklampen XBO 75 und XBO 150, deren Vorschaltgeräte erheblich teurer sind, folgen an zweiter Stelle. Hier muß darauf hingewiesen werden, daß eine Xenonhochdrucklampe in bestimmten Fällen (siehe Tabelle) insgesamt bessere Ergebnisse bringt. Seit etwa 1967 werden in Spezialfällen z. B. für FITC auch die Halogenglühlampen verwendet (YOUNG und ARMSTRONG 1967, KRAFT 1970, TOMLINSON 1970, KOCH 1971).

Weitere Glühwendellampen werden derzeit noch nicht mit dem gewünschten Erfolg eingesetzt, da die Energie im blauen und blauvioletten Teil des Lampenspektrums bei den bisher bekannten Lampen zu gering ist. Diesbezügliche Untersuchungen wurden mit 6 V 30 W- und 12 V 60 W-Lampen vor allem in Verbindung mit der FITC-Fluoreszenz durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten waren gegenüber den bei Verwendung der Halogenglühlampe erreichten in allen Versuchen geringer. Für einige Anwendungsfälle, wie z. B. die Immunfluoreszenz, waren diese Lichtquellen jedoch nur mit Einschränkungen bzw. überhaupt nicht geeignet.

Erregerfilter

Erregerfilter, auch Primärfilter genannt, sind Filter, die nur das zur Fluoreszenzanregung erforderliche Licht möglichst gut durchlassen sollen. Bezüglich der jeweiligen Fluoreszenzwellenlänge ist es mehr oder weniger kurzwelligeres Licht. Das längerwellige Licht, welches einen störenden Untergrund oder gar die völlige Überstrahlung der Fluoreszenz bewirken würde, muß gleichzeitig gesperrt werden. Es zeigte

sich dabei, daß bei Auflichtfluoreszenz ein Sperren bis zu Transmissionswerten von $\tau = 10^{-5}/0$ ausreicht. Durch das Beleuchtungsverfahren und die Lichtquelle wird dieser Wert jedoch stark beeinflusst. Ein farbiger Hintergrund, wie er bei einigen handelsüblichen Filtern erzielt wird, kann auch bereits störend in Erscheinung treten. Erregerfilter werden entsprechend ihrer Funktion zwischen Lichtquelle und Objekt angeordnet.

Die hinter dem Objekt befindlichen Filter nennt man Sperrfilter oder Sekundärfilter. Sie haben die Aufgabe, das normalerweise zum Auge gelangende restliche Erregerlicht zu sperren. Das Resterregerlicht ist bei Durchlicht-Hellfeld-Fluoreszenzanregung alles nicht im Objekt absorbierte, bei Durchlicht-Dunkelfeld-Fluoreszenzanregung alles abgebeugte und gestreute Erregerlicht. Bei der Auflichtfluoreszenzanregung, im allgemeinen ein Hellfeldverfahren, besteht das Resterregerlicht aus Streulicht- und Reflexionsanteil. Das Sperren des Resterregerlichtes erfolgt bei Glas- und Glasfolienfiltern durch Absorption und bei Interferenzfiltern je nach der Art durch reine Reflexion bzw. einer Kombination von Absorption und Reflexion. Aus dieser Betrachtung erkennt man, daß Erreger- und Sperrfilter immer nur in einer bestimmten Kombination voll wirksam werden können. Die spektralen Charakteristiken dürfen sich jedoch nicht überschneiden. Die Kantenlagen beider Filtertypen müssen aber eng beieinander liegen, damit bei Fluorochromen wie FITC keine Energieverluste auftreten, zumal gerade in diesem Beispiel Exzitations- und Emissionsmaximum sehr dicht beisammen liegen. Die Art der Filterkombination und der erforderlichen Lichtquelle wird ausschließlich von den Fluoreszenzfarbstoffen und den Reaktionsprodukten einiger histochemischer Methoden, die nicht als Fluorochrome gelten, bestimmt (FEULGEN 1932, ERÄNKÖ 1955, FALCK, HILLARP et al. 1962). Diese Kombinationen sind demzufolge rein spezifische Filter/Lichtquellen-Kombinationen.

In Ermangelung geeigneter Gläser verwendete man in den Anfängen der Fluoreszenzmikroskopie Flüssigkeiten in Küvetten als Filter. Es folgten später Kombinationen von Flüssigkeitsfiltern mit in der Schmelze gefärbten sogenannten Massivgläsern. Flüssigkeitsfilter waren nicht beständig; sie mußten von Zeit zu Zeit erneuert werden.

In den letzten Jahren gelang es, eine Vielzahl verschiedener Glasfilter mit über lange Zeiten konstanten Eigenschaften herzustellen, welche die Flüssigkeitsfilter fast in Vergessenheit geraten ließen. Seit 1967 werden darüber hinaus mehr und mehr symmetrische Interferenzfilter verwendet. Dies gilt für einzelne Interferenzfilter als auch für Kombinationen von Interferenzfiltern mit Farbglasfiltern. In diesem Zusammenhang hat PLOEM (1967) die Vorteile der Exzitation mit langwelligem blauem Licht beschrieben, insbesondere für FITC. Diese Entwicklung setzte sich fort mit der Verwendung spezieller Interferenzfilter (RICHARDS and WATERS 1967, KRAFT 1970, TOMLINSON 1970). Abbildung 1 zeigt als Beispiel

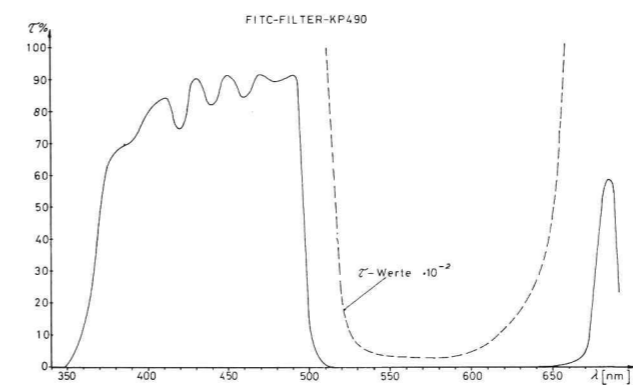


Abb. 1: Transmissionskurve des LEITZ FITC-Erregerfilters KP 490 (Meßkurve eines Musters)

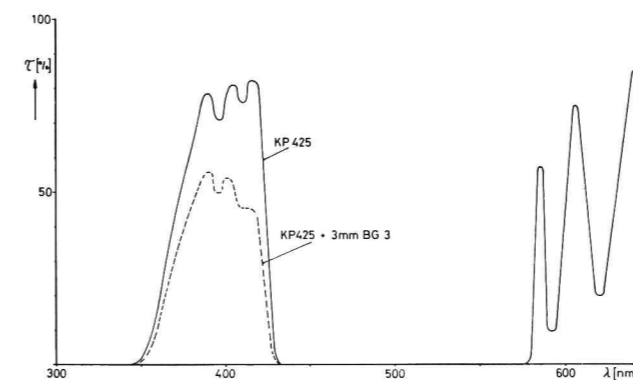
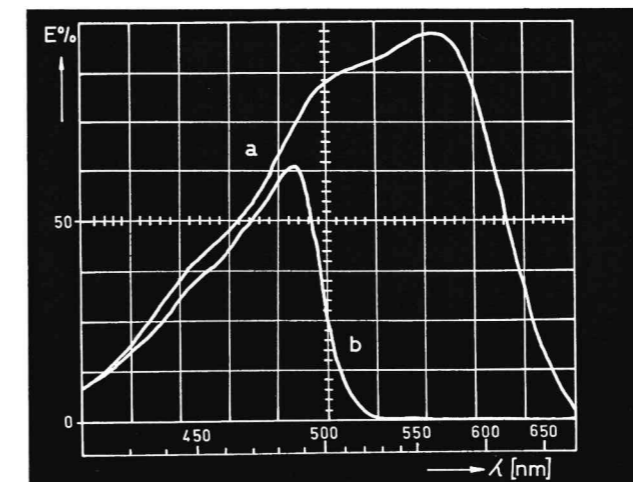


Abb. 2: Transmissionskurve des LEITZ Erregerfilters KP 425 ohne das erforderliche BG 3-Filter und die Kombination KP 425 + 3 mm BG 3 als Funktionseinheit

Abb. 3a: Emissionskurve der Halogenglühlampe 12 V 100 W mit Wärmeschutzfilter 2 mm KG 1 und Rotdämpfungfilter 4 mm BG 38 (a) mit der Transmissionskurve des KP 490-FITC-Erregerfilters in der sogenannten Breitbandanregung (b)



das Kurzendpaßfilter KP 490, welches neben anderen Anwendungen eine besonders intensitätsstarke, kontrastreiche Fluoreszenz in Verbindung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ergibt. Weitere Interferenzfilter dieser Art wurden auch bei LEITZ entwickelt: für die durch Formaldehydbedampfung herbeigeführte Fluoreszenz (Neurotransmitterfluoreszenz) das KP 425 (Abb.: 2), für Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) das KP 560, u. a. – Ein Kurzendpaßfilter dieser Art wird Erreger- und Fluoreszenzspektren eines bestimmten Fluorochroms, wie sie u. a. HANSEN (1964 und 1967), CASPERSSON et al. (1965 u. 1966) und RIGLER jr. (1966) veröffentlichten, in fast idealer Weise angepaßt. Dies ist durch die heutige Technologie des Aufdampfens und unter Einbeziehung von Computern bei der Herstellung von Interferenzfiltern möglich geworden. Einige Anmerkungen sollen in Verbindung mit den neuen Interferenzfiltern zu der Autofluoreszenz von Geweben gemacht werden. Erfahrungsgemäß ist eine Autofluoreszenz bei einer Fluoreszenzanregung vom UV bis zum blauen Licht mit ca. 470–480 nm bei fast allen biologischen Präparaten zu beobachten. Diesem Umstand kann man dadurch begegnen, daß auf der Exzitationsseite bei der Schmalbandanregung (Abb. 3 a u. 3 b) z. B. in Verbindung mit einem KP 490 ein Anlaufglas 2 mm oder 3 mm GG 475 verwendet wird (PLOEM 1969, WALTER 1970). Dieses Anlaufglas ist ein Kantenfilter mit einer Kantenlage bei ca. 475 nm. Durch die Verwendung dieses Filters läßt sich der Anteil der Autofluoreszenz bei einigen Präparaten und die eventuell vorhandene Autofluoreszenz von Objektiv und Immersionsöl ganz wesentlich vermindern. Die Intensität der spezifischen Fluoreszenz sinkt dabei ebenfalls etwas ab.

Abb. 3b: Emissionskurve der Halogenglühlampe 12 V 100 W mit Wärmeschutzfilter 2 mm KG 1 und Rotdämpfungfilter 4 mm BG 38 (a) mit der Transmissionskurve des KP 490-FITC-Erregerfilters in Kombination mit dem Anlaufglas 3 mm GG 475 in der sog. Schmalbandanregung (c) Die Kurven in Abb. 3a u. b wurden mit dem LEITZ Mikrospektrographen mit einem Photomultiplier EMI 9558 A mit S-20 Kathode und dem STORAGE-Speicheroszillographen Typ 564 dargestellt

Die Autofluoreszenz wurde aber bedeutend stärker geschwächt als die spezifische Fluoreszenz, was sich in einem merklich gestiegenen Bildkontrast positiv auswirkte.

Eine weitere Art von Erregerfiltern zur Verbesserung der Hintergrundunterdrückung arbeitet nach dem Prinzip der sogenannten Kaltlichtspiegel und wurde vermutlich auch von diesen abgeleitet. BRUMBERG und KRYLOVA (1953) haben dieses Prinzip für die Anwendung im ultravioletten und violettblauen Spektralbereich beschrieben.

Man lenkt bei diesem Verfahren das mit Erregerfiltern vorselektierte Erregerlicht über einen oder mehrere spezielle Reflexionsspiegel zum Objekt hin (PLOEM 1967). Die aufgedampfte Interferenzschicht des oder der Reflexionsspiegel reflektiert dabei das gewünschte Erregerlicht bis zu einer bestimmten Wellenlänge, während ab dieser Wellenlänge alles Licht durchgelassen und in einer Lichtfalle absorbiert wird. Mit diesem Verfahren läßt sich vor allem der oft störende Anteil des langwelligen roten Lichtes erheblich senken.

Bei dem mit den sogenannten dichromatischen Teilerspiegeln – manchmal auch Interferenzteilerspigel genannt – bestückten LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator (PLOEM 1967 und 1969, WALTER 1969, KRAFT 1969) (Abb. 5c) haben die Interferenzschichten im Sinne des Strahlenganges eine doppelte Funktion: Auf der Beleuchtungsseite wird das mit Hilfe von Erregerfiltern vorselektierte Erregerlicht bis zu der Reflexionskante einer bestimmten Wellenlänge zum Objekt hin reflektiert. Somit hat der dichromatische Teilerspiegel eine Erregerfilterfunktion. Betrachtet man nun den Beobachtungsstrahlengang, so werden durch Reflexion dem Fluoreszenzlicht Erregerlichtanteile überlagert. Die Reflexionen können u. a. im Objektiv, auf dem Deckglas und im Objekt entstehen. Auf Grund der physikalischen Eigenschaften der dichromatischen Teilerspiegel, nur Erregerlicht zu reflektieren, wird das dem Fluoreszenzlicht überlagerte Erregerlicht zur Lichtquelle zurückreflektiert. Das Fluoreszenzlicht hingegen wird nahezu verlustlos durchgelassen. Dies zeigt, daß der dichromatische Teilerspiegel gleichzeitig eine erste Sperrfilterwirkung durch Reflexion zukommt.

Verfolgt man diesen Weg systematisch weiter, so läßt sich auf der Basis von Reflexionserregerfiltern ein Zwei- oder Mehrwellenlängenfluoreszenz-Auflichtilluminator (2λ -Opak) herstellen. Als Basis dafür dient die von PLOEM (1970)* gezeigte Doppelfärbung mit der Zweiwellenlängen-Exzitationsmethode. Die technischen Voraussetzungen sind bei dem vom Autor erstmals auf dem Internationalen Kongreß für Immunfluoreszenz in Stockholm 1970 gezeigten Prinzip eines neuen Fluoreszenzauflichtilluminators (Abb. 4) für steilere Reflexionskanten bei dichromatischen Teilerspiegeln vorhanden (KRAFT 1970). Diese Zwei- oder Mehrwellenlängenauflichtfluoreszenzilluminatoren können komplett, mit Erregerfiltern, dichromatischen Teilerspiegeln und Sperrfiltern jeweils für bestimmte Fluorochrome bestückt werden.

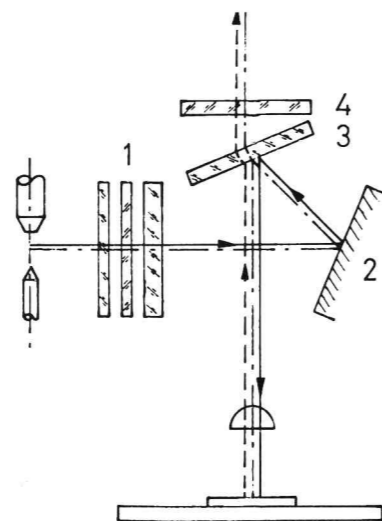


Abb. 4: Schematischer Strahlengang im Steilkantenauflichtfluoreszenzilluminator. 1 Erregerfilter, 2 Reflexionsspiegel, 3 dichromatischer Teilerspiegel (ca. $22,5^\circ$), 4 Sperrfilter

Der Einsatz solcher Geräte bei Doppelfluorochromierung z. B. mit FITC/TRITC oder Methylgrün-Pyronin/SITS in der Routine-Fluoreszenzuntersuchung ist sicher und zeitsparend, da kein Filterwechsel mehr erforderlich ist. Die Notwendigkeit des zeitraubenden Filterwechsels hingegen verleitet den Benutzer oft dazu, nicht immer das erforderliche Filter einzusetzen. Dies war in der Vergangenheit häufig der Grund dafür, daß die Fluoreszenz ungenügend sichtbar blieb. Wird in Zukunft ein Fluoreszenzfarbstoffwechsel erforderlich, was in der Regel selten vorkommt, so kann man an Hand von Tabellen meist die passenden Filterkombinationen sofort ablesen und dem entsprechenden dichromatischen Teilerspiegel zuordnen. Bei dem neuen Illuminatorotyp kann der in Abb. 4 gezeigte Umlenkspiegel 2 durch einen zweiten Interferenz-Reflexionsteilerspiegel ersetzt werden. Er reflektiert dann nur das Erregerlicht, während der restliche Teil des ungewünschten Lampenspektrums frei durchgelassen wird. Dieser Typ des Fluoreszenz-Auflichtilluminators hat gegenüber den bisher bekannten (Abb. 5, 5a, 5b) erhebliche Vorteile bezüglich der Kantensteilheit (Abb. 6). Bei nahezu allen auf dem Markt befindlichen Fluoreszenzauflichtilluminatoren bilden die optische Achse des Mikroskopes und die optische Achse des Erregerlichtes einen Winkel von 90° . Daraus resultiert, daß die dichromatischen Teilerspiegel unter einem Winkel von 45° zur optischen Achse des Mikroskopes und unter dem gleichen Winkel zur Einstrahlrichtung des Erregerlichtes stehen. Damit ist die Steilheit der Kante des dichromatischen Teilerspiegels zwischen Reflexions- und Transmissionsbereich auf einen bestimmten Wert im Rahmen der Fertigungstoleranz festgelegt. Dieser Wert liegt unterhalb des Optimalwertes, der theoretisch dann erreicht werden kann, wenn im Grenzfall Einstrahlungs- und Beobachtungsrichtung parallel verlaufen würden. Dieser praktisch nicht realisierbare, nur theoretische

*) XIII Internationaler Kongreß für Hämatologie, München 1970

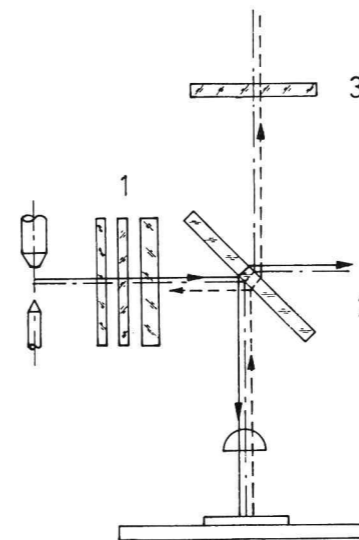


Abb. 5: Schematischer Strahlengang des ersten Fluoreszenz-Auflichtilluminators, 1 Erregerfilter, 2 50%-Teilerspiegel, 3 Sperrfilter

Fall wird unter Berücksichtigung des ausnutzbaren Platzes bei Mikroskopen in dem neuen Fluoreszenz-Auflichtilluminator angenähert. Die Grenzen liegen in den konstruktiven Merkmalen vorhandener Mikroskope.

Beim neuen Illuminatorprinzip bilden die optische Achse des Mikroskopes und die optische Achse des Erregerlichtes bezüglich des dichromatischen Teilerspiegels einen Winkel von maximal 45° . Daraus folgt, daß die dichromatischen Teilerspiegel unter einem Winkel von ca. $22,5^\circ$ (Winkel zwischen der Fläche des dichromatischen Teilerspiegels und der optischen Achse des Mikroskopes) und unter dem gleichen Winkel zur Einstrahlrichtung des Erregerlichtes stehen. Durch die damit gegenüber bekannten Fluoreszenzilluminatoren erheblich steileren Kanten (Abb. 6) sind die Garantien für die als notwendig angesehenen Verbesserungen der exakten Trennung von Exzitation und Emission gegeben.

Ein weiterer Vorteil dieses Auflichtilluminatorotyps liegt darin, daß man z. B. bei Verwendung einer Doppelfluorochromierung in Verbindung mit einem Zweiwellenlängenilluminator jedem Fluoreszenzfarbstoff die für ihn spezifische Kombination der Erregerfilter/dichromatischer Teilerspiegel/Sperrfilter jeweils fest in einer Position des Illuminators zuordnen kann. Beim Mikroskopieren bedeutet dies, daß man lediglich die auf einem Schieber oder Revolver befindlichen zwei Positionen der Filter wechselweise zu schalten (verschieben bzw. drehen) braucht, um die unterschiedlich fluoreszierenden Objektdetails in schneller Folge beobachten zu können. Um das Aufsuchen der Objekte ohne die Belastung durch die Erregerstrahlung und damit ohne Ausbleichung (Photodekompensation, Fading-Effekt) vornehmen zu können, besitzt jeder Illuminator eine dritte Position. Diese freie Stellung ermöglicht nach Wahl des Anwenders das Zuschalten von Phasen- oder Inter-

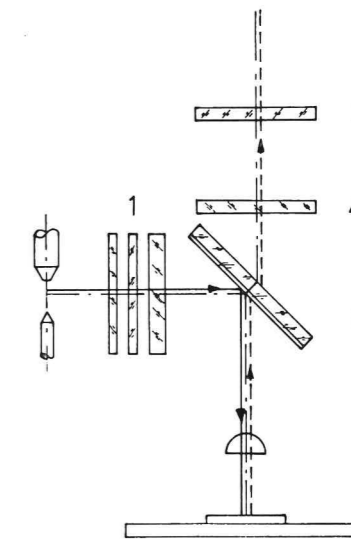


Abb. 5a: Schematischer Strahlengang im LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator nach PLOEM, 1 Erregerfilter, 2 dichromatischer Teilerspiegel ($\alpha = 45^\circ$), 3 Sperrfilter bzw. Selektionsfilter (SiAL-Typ), 4 eingebaute Sperrfilter

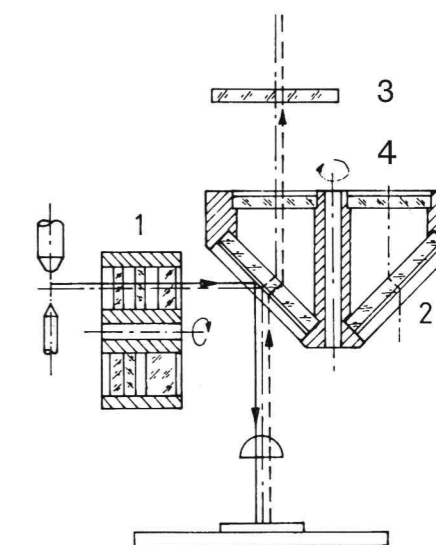
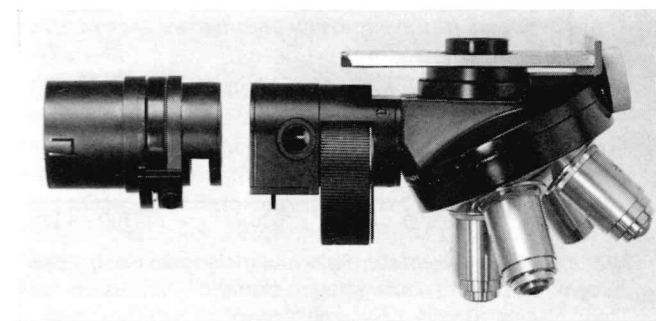


Abb. 5b: Schematischer Strahlengang im LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator mit Erregerfilterrevolver; Teile wie in 5a

Abb. 5c: LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator mit Erregerfilterrevolver und seitlicher Einspiegelung für die Mikroskopphotometrie.



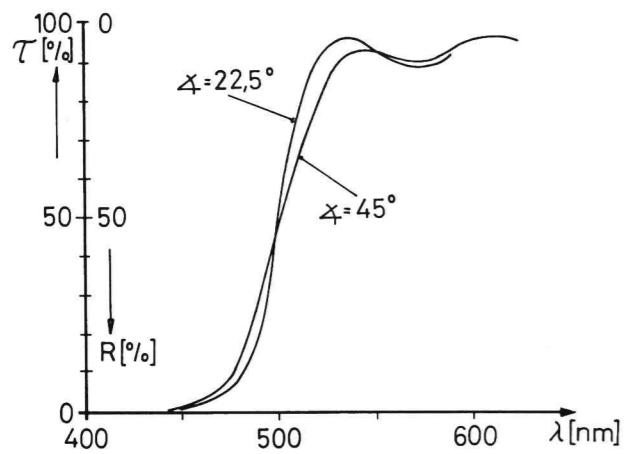


Abb. 6: Vergleich der Kantensteilheit von dichromatischen Teilerspiegeln unter 22,5° und 45° zum Beobachtungsstrahlengang des Mikroskops

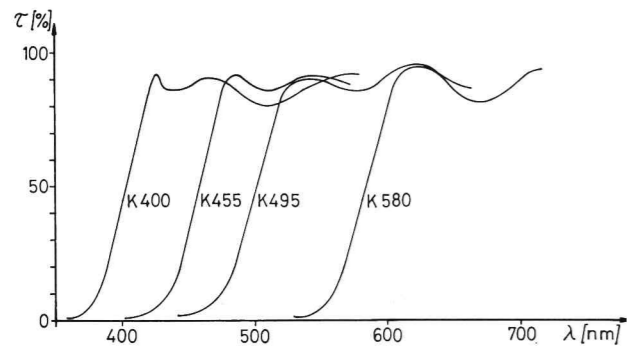


Abb. 7: Meßkurven von dichromatischen Teilerspiegeln (K 495 = jetzt K 510)

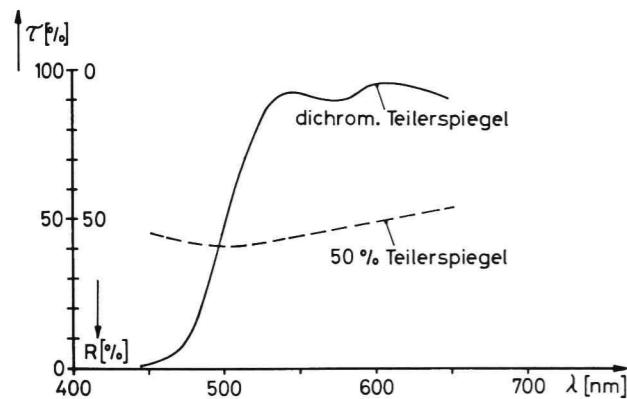


Abb. 8: Leistungsvergleich zwischen dichromatischen Teilerspiegel und 50%-Teilerspiegel bezüglich Reflexion und Transmission

ferenzkontrast bzw. Dunkelfeld im Durchlichtverfahren.

Zum besseren Verständnis soll kurz auf die weiteren Eigenschaften dichromatischer Teilerspiegel eingegangen werden. Bisher wird bei der Fertigung ein solcher Interferenzteilerspiegel entsprechend den Anforderungen in der Praxis nach mehreren Punkten beurteilt: Fußpunkttransmission, Wellenlängenwert der maximalen Transmission, Kantenlage beim 50%-Wert der maximalen Transmission, Kantensteilheit, Maximaltransmission sowie mechanische und chemische Beständigkeit. Diese in erster Linie kennzeichnenden Größen unterliegen einer Gewichtung, d. h. es wird jede Kenngröße entsprechend dem effektiven Wert in der Praxis mit einem Gewichtungsfaktor versehen. Von diesem Faktor wird die Toleranzgrenze entscheidend beeinflusst. So spielt z. B. die kaum zu vermeidende leichte Welligkeit des dichromatischen Teilerspiegels im Transmissionsbereich (Abb. 7) eine untergeordnete Rolle, da man visuell nicht unterscheiden kann zwischen 80 und 90% Transmission. Ganz empfindlich reagiert das Auge jedoch bei einer Restfußpunkttransmission zwischen $\tau = 10^{-4}$ und 10^{-5} im Sperrbereich des Fußpunktes. Für quantitative spektrophotometrische Fluoreszenzuntersuchungen muß man zuvor die Spektralkurve des Gerätes (Leerwertspektralkurve) zur Ermittlung der korrigierten Fluoreszenzspektralkurve in einem Computer speichern. Bei der Auswertung sind auf diesem Wege keine bedeutenden Fehler zu erwarten. Dazu kommt, daß die Technologie des Aufdampfens noch nicht so perfekt ist, um eine exakte Rechteckfunktion mit der Steigung „unendlich“ (∞) aufdampfen zu können. Bei den derzeit auf dem Markt befindlichen dichromatischen Teilerspiegeln wird eine Glättung der Spektralkurve im Transmissionsbereich angestrebt, ist jedoch noch nicht optimal.

Vergleicht man den Gewinn an Fluoreszenzintensität und an Kontrast mit den Leistungen der früher verwendeten 50%-Teilerspiegel (Abb. 8), so wird deutlich, daß sich der Einsatz von dichromatischen Teilerspiegeln in jedem Falle lohnt.

Als besondere Anforderungen stellen wir an Erregerfilter außer den hohen spektralen Forderungen noch die der mechanischen Belastbarkeit und Wärmestabilität. Dies gilt sowohl für Absorptions- als auch für Interferenzfilter. Von der Gruppe der Interferenzfilter sind insbesondere die verkitteten hochwertigen Interferenzfilter sehr gefährdet, da nicht selten über längere Zeit Temperaturen von 100 °C und mehr auf die Erregerfilter einwirken. Durch die entstehenden mechanischen Spannungen führt die Wärmebelastung schließlich zur Zerstörung der Filter, z. B. durch Platzen an den Kittflächen. Dies trifft nicht für die unverkitteten Interferenzfilter mit den dielektrischen Schichten vom Typ KP 425, KP 490, KP 500 und KP 560 zu. Aus diesem Grunde sollte generell vor die eigentlichen Erregerfilter von der Lichtquelle aus gesehen ein Wärmeschutzfilter (KG 1**, CALFLEX*)

*) Fa. Balzers, Liechtenstein **) Fa. Schott & Gen. Mainz

und ein Rotdämpfungsfilter (BG 38**, BG 18**) angeordnet werden. Damit kann man die größte Wärmebelastung von den übrigen Filtern fernhalten. Bei den Interferenzfiltern ist allgemein bei starker Erwärmung eine geringe Transmissionsänderung und Wellenlängenverschiebung zu beobachten. Sie muß auf alle Fälle, vornehmlich in der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie, berücksichtigt werden. Zum Schutze der Glasabsorptionsfilter dürfen Filter nicht fest, sondern nur lose eingebaut werden, damit bei Wärmeausdehnung das einzelne Filter nicht platzt. Wird trotz dieser Gefahren ein gekittetes Interferenzfilter im Strahlengang angeordnet, so sollte es von der Lichtquelle aus gesehen an letzter Stelle in der Reihenfolge der Filter stehen. Mit Hilfe von Verschlüssen kann erreicht werden, daß die Filter nur während der direkten Beobachtungs- und Meßzeit mit Erregerlicht bestrahlt werden. Man muß trotzdem eine verminderte Lebensdauer verkitteter Interferenzfilter einkalkulieren.

In einigen Fällen führten verkittete Interferenzfilter zu Fehlerquellen bezüglich der Kontrastbeurteilung. Der Grund waren Löcher der Interferenzschichten, die ungewünschtes Erregerlicht durchließen. Es zeigte sich im Mikroskopbild als aufhellendes Streulicht im dunklen Hintergrund der nicht fluoreszierenden Objektpartien.

Abschließend soll zu diesem Teil bemerkt werden, daß für die Zukunft außer den bereits bekannten Erregerfiltern noch mit Kunststofferregerfiltern gerechnet werden darf, deren Herstellungspreis unterhalb dem bekannter Filtertypen liegen dürfte.

Für die noch wenig bekannte kurzwellige UV-Fluoreszenz werden heute zur Anregung die Interferenzreflexionsfilter wie UV-R 250** usw. verwendet. Sie arbeiten auf der Basis der Mehrfachreflexion, wobei jede Reflexionsfläche die gleiche Schicht besitzt, die nur jeweils ein begrenztes Wellenlängenband reflektiert. Durch die verschiedenen Flächen erreicht man eine relativ gute spektrale Reinheit bei ca. 70% maximaler Durchlässigkeit und einer Halbwertsbreite von 30–50 nm.

Objektive für die Fluoreszenzmikroskopie

Im allgemeinen werden im normalen Spektralbereich der Fluoreszenzmikroskopie, also von ca. 360 bis 700 nm, alle Objektive brauchbar sein. Im Hinblick auf die gestiegenen Anforderungen jedoch sollten die Objektive etwas genauer betrachtet werden. — Es werden zunächst einmal die Anforderungen der Fluoreszenzmikroskopie aufgezählt, ohne Ursachen bzw. Abhängigkeiten solcher Forderungen zu berücksichtigen. Es sind dies im wesentlichen:

- a) große Intensität der spezifischen Fluoreszenz,
- b) brillante Fluoreszenzbilder,
- c) hoher Kontrast, d. h. geringe Autofluoreszenz.

Die Fluoreszenzintensität ist das Produkt aus der Intensität des absorbierten Lichtes in Quanten und der Quantenausbeute (CASPERSSON et al. 1965).

**) Fa. Schott & Gen., Mainz

Als beeinflussende Faktoren kommen jedoch neben Lichtquellen und Filtern die Durchlässigkeiten der Objektive für die Erregerstrahlung im Auflicht und für das Fluoreszenzlicht allgemein, die Objektivapertur sowie die Vergrößerung der Objektive hinzu. Grundsätzlich ist zu sagen, daß Objektive mit hoher und höchster Apertur bevorzugt werden sollten. Diese Objektive sind immer Ölimmersionssysteme. Für Routinearbeiten bieten sich zusätzlich Wasserimmersionen an. Das Arbeiten mit Wasserimmersionsobjektiven bringt zwar einen geringen Aperturverlust, dafür aber sauberes Arbeiten und keine Gefahr für zerbrechliche Objekte mit sich. Das Reinigen der mit Wasser benetzten Deckgläser ist sehr viel weniger problematisch als z. B. das Entfernen des Immersionsöls von den Deckgläsern, die eventuell noch mit Paraffin o. ä. umrandet werden mußten.

Ein weiterer Grund, der für die Verwendung von Immersionsobjektiven in der Auflichtfluoreszenzmikroskopie spricht, ist die Vermeidung von Reflexionen an der Objektivfrontlinse und an der Deckglasoberseite. Bei Trockenobjektiven können diese Reflexionen ein Grund dafür sein, daß dem Bild ein leichter Grauschleier überlagert wird, der den Bildkontrast negativ beeinflusst.

Die Brillanz der Fluoreszenz wird vom Objekt, dem abbildenden System und vor allem von den Filtern beeinflusst. Es ist hier z. B. keineswegs der Fall, daß ein Planapochromat das beste Ergebnis liefern muß, sondern in vielen Fällen erzielt man mit Fluorit- bzw. den Quasifluoritobjektiven brillantere Bilder. In diesem Punkt der Anforderungen muß völlige Fluoreszenzfreiheit der Sekundärfilter gewährleistet sein.

Um einen guten Kontrast und die gewünschte Brillanz der Fluoreszenz zu garantieren, ist die Verwendung von Objektiven mit geringer Eigenfluoreszenz notwendig. Dieser Punkt wird, soweit es der Aufwand zur Erzielung eines bestimmten Korrektionszustandes (CLAUSSEN 1967) ermöglicht, für neuere Objektive bereits bei der Wahl des Glases für einzelne Linsen berücksichtigt, ist jedoch nicht immer völlig zu beseitigen. Es kann für die Praxis wenig förderlich sein, wenn lediglich ein Satz nur für Durchlicht-Hellfeldmikroskopie vorgesehene Objektive vorhanden ist, der für alle Mikroskopierverfahren einschließlich der Fluoreszenzmikroskopie verwendet wird. An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, daß selbst für eine weniger anspruchsvolle Fluoreszenzqualität auf jeden Fall die von den jeweiligen Mikroskopherstellern empfohlenen Objektive für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden sollten (siehe Objektiv-Tabelle).

Nicht zuletzt soll auf die Verwendung von fluoreszenzfreiem Immersionsöl hingewiesen werden, wodurch ebenfalls eine weitere Verbesserung des Fluoreszenzbildes erzielt werden kann. Auf die Brauchbarkeit in der Fluoreszenzmikroskopie können Objektive bezüglich Eigenfluoreszenz auf einfachem Wege geprüft werden, indem man das Okular aus dem Mikroskopentubus entfernt und in Richtung der Objektivpupille in das Mikroskop hineinschaut. Zei-

gen dann die Linsen des Objektivs, also nicht die ringförmigen Fassungen, eine starke helle Färbung, so hat dieses Objektiv eine Eigenfluoreszenz. Bedingung für diese grobe Prüfung ist, daß ohne Objekt eine Anregung mit UV- oder Blauviolettlicht erfolgt. Dies ist jedoch nur einer der Punkte, welcher zur Beurteilung der Fluoreszenzbrauchbarkeit herangezogen wird. Außerdem sind die Objektivapertur, die Durchlässigkeit des Lichtes im gesamten Wellenlängenbereich von 360–700 nm und der Kontrast ganz entscheidend für die Brauchbarkeit der Objektivs in der Fluoreszenzmikroskopie. Hiermit soll angedeutet werden, welchen Prüfungen ein Objektiv nur für die Fluoreszenzmikroskopie unterzogen wird – ohne die anderen Punkte zu nennen, die zur serienmäßigen Prüfung der Objektivs gehören. Einige, nach diesen Gesichtspunkten ausgewählte LEITZ-Objektivs, die bei der Prüfung in keinem Falle Anlaß zur Beanstandung gegeben haben, sind:

Oel + W	10/0.25/37		
Oel + W	22/0.65/37		
Apo	25/0.65/37		
Apo	40/0.95/37	Achromat	25/0.50/45
FI Oel	54/0.95/37	Achromat	40/0.65/45
Apo	63/0.95/37	Achromat	63/0.85/45
Phaco FI Oel	70/1.15/37	Achromat	Oel 100/1.30/45
Apo Oel	90/1.40/37		
FI Oel	95/1.32/37	In Vorbereitung:	
FI Oel Iris	95/1.10–1.32/37	Oel	10/0.45/45
W	25/0.60/45	Oel	25/0.75/45
W	50/1.00/45	Oel	40/1.30/45
W	100/1.20/45	Oel	63/1.30/45

Die Zahlen 37 bzw. 45 geben die Abgleichlänge des Objektivs an. Abgleichlänge ist der Abstand zwischen den Anlageflächen des Objektivs und der Objektebene bei unbedecktem Objekt in Luft.

Sperrfilter

Sperrfilter sind teils Glasfilter, vorwiegend jedoch Folienfilter bzw. Folien- und Glasfilter zu einer Einheit kombiniert und verkittet. Dazu kommt eine vollkommen neue Sperrfilterart, die sogenannten Glas-Kunststoff-Verbundfilter (KV-Filter**), die jedoch noch nicht genügend getestet werden konnten, da sie vorläufig nur im Spektralbereich von KV 370 bis KV 418 (Zahl = λ in nm) lieferbar sind. Die früher häufiger verwendeten sogenannten Anlaufgläser**, deren Absorptionskante von submikroskopischen Kristallen bestimmt wird, die bei einer speziellen Temperaturbehandlung entstehen und außerdem durch die Art bzw. Dauer der Behandlung in ihrer Größe beeinflußt werden können, erreichen Kantenlagen zwischen ca. 400 und 750 nm. Leider haben diese Filter bei relativ gut brauchbaren steilen Kanten für heutige Maßstäbe in vielen Anwendungsfällen eine zu große Eigenfluoreszenz, was zu kontrastarmen Fluoreszenzbildern führt. Erschwerend kommt hinzu, daß die einzelnen Schmelzen bezüglich der charakteristischen Eigenschaften nicht in gleicher

**) Filterbezeichnung von Schott & Gen., Mainz

Qualität mit kleiner Toleranz herstellbar sind. Die kennzeichnenden Eigenschaften eines Sperrfilters sind:

- die spektrale Kantenlage beim 50%-Wert der maximalen Transmission = λ_H
- Kantensteilheit
- Fußpunktqualität des Filters bezüglich der Sperrwirkung
- Wert der maximalen Transmission
- Eigenfluoreszenz-Freiheit
- die sogenannte Streuung – Tyndalleffekt
- Beständigkeit gegen UV-Bestrahlung, Klima und Feuchtigkeit
- Beständigkeit bei Kurzzeit- und Dauer-Wärmebelastung bei einer oft durch konstruktive Maßnahmen beim Mikroskop maximal zulässigen Dicke eines Filters
- optische Reinheit, da die Sperrfilter sich im Abbildungsstrahlengang befinden und damit die Bildqualität beeinflussen können.

Von diesen neun Charakteristika wird zur Bezeichnung des Sperrfilters leider heute offiziell nur der Wellenlängenwert der Kantenlage beim 50%-Wert der maximalen Transmission des Filters angegeben. Praktisch ist dies meist der 45%-Wert der Skala in Nanometer ($\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$) (Abb. 9). Dieser Wert

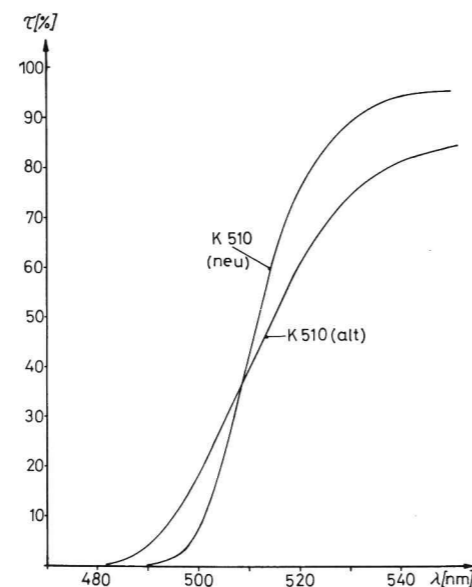


Abb. 9: Vergleich zweier Sperrfilter mit der gleichen Bezeichnung und erheblichen Unterschieden in den optischen Daten als Beweis für die Forderung, Filterdaten genauer zu bezeichnen.

sollte, bedingt durch die notwendigen Fertigungstoleranzen maximal um $\pm 2 \text{ nm}$ schwanken. Die gesamte Bezeichnung eines Sperrfilters lautet demnach z. B.: Sperrfilter K 530, wobei in Gedanken die Maßeinheit (nm) hinzugefügt werden muß.

Abweichende Bezeichnungen sagen insbesondere nichts über die genaue Kantenlage aus, die neben den vorhergehend angeführten Eigenschaften für die Anwendung von entscheidender Bedeutung sind. Entsprechend der Vielzahl der heute bekannten Fluoreszenzfarbstoffe streben die Hersteller eine geschlossene Sperrfilterreihe mit einer Abstufung von jeweils 10 nm an, beginnend bei vorläufig K 430 bis vorläufig K 630. Falls die Fluoreszenzmikroskopie weiterhin einer solch explosionsartigen Entwicklung unterliegt, wird es sich kaum umgehen lassen, die anderen Kenngrößen eines Sperrfilters zusätzlich anzugeben.

Als neue und bislang wenig bekannte Filter kommen zu den üblichen Sperrfiltern die sogenannten Fluoreszenz-Selektionsfilter (PLOEM 1969). Ihre Aufgabe ist es, aus dem gesamten Fluoreszenzspektrum das Fluoreszenzmaximum oder sonst ein schmales spezifisches Wellenlängenband herauszufiltern. Dies ist erforderlich, um bei der visuellen Auswertung einer Fluoreszenz, insbesondere jedoch für alle quantitativen Methoden, eindeutige Werte (Farb- und Intensitätswerte) heranziehen zu können. Hierzu eignen sich vor allem monochromatische Interferenzfilter (vgl. hierzu SCHLÄFER 1958 u. 1966) mit einer symmetrischen Charakteristik rechts und links der Schwerpunktswellenlänge bei schmalen Bandbreiten. Bei ungenügender Vorfiltration des Erregerlichtes, d. h. bei hohem Erregerlichtanteil im Fluoreszenzspektrum sollten die Selektionsfilter nur in Verbindung mit einem Sperrfilter verwendet werden. Es muß jedoch bei neueren Fluoreszenzeinrichtungen wie dem LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator nach PLOEM, bei vielen von uns erprobten Kombinationen (Erregerfilter/dichromatischer Teilerspiegel/Sperrfilter) nicht mehr erforderlich sein, da die Kombinationen nach dem derzeit optimalen Stand ausgewählt wurden. Damit soll gesagt werden, daß für viele Fluoreszenzanwendungen keine zusätzlichen Sperrfilter in Schieber mehr erforderlich sind, da diese bereits im Fluoreszenzilluminator eingebaut werden konnten.

Für die Zukunft seien bereits hier die drehbaren Interferenzsperrfilter genannt. Diese augenblicklich noch im Versuchsstadium befindlichen Sperrfilter werden ähnlich einem Kompensator in der Polarisationsmikroskopie zur optischen Achse des Mikroskops gedreht (Fläche des Filters zur optischen Achse des Mikroskops). Dadurch wird es erstmals möglich, die Sperrkante des Interferenzsperrfilters innerhalb eines begrenzten Wellenlängenbereichs (ca. 10 nm) unter Ausnutzung der Winkelabhängigkeit der optischen Werte von Interferenzfiltern zu verschieben. Dies geschieht bei Neigung eines Interferenzfilters gegen die senkrechte Inzidenz im parallelen Strahlengang in Richtung der kürzeren Wellenlängen.

Nicht zuletzt müssen hier auch die dichromatischen Teilerspiegel als Sperrfilter genannt werden. Sie haben durch die aufgedampften Interferenzschichten die Eigenschaft, fast das gesamte Erregerlicht zu re-

flektieren. Das heißt, daß auch die im Objektiv, an den Fassungsändern der Objektivs, auf dem Deckglas bzw. auch im Objekt reflektierten Erregerlichtanteile, die normalerweise der Fluoreszenz überlagert zum Sperrfilter gelangen, vom dichromatischen Teilerspiegel größtenteils wieder zur Lichtquelle reflektiert werden. Das bedeutet, daß dichromatische Teilerspiegel im Strahlengang des Fluoreszenzmikroskops nicht nur bei der Auflichtfluoreszenzanregung für die idealen Fluoreszenzqualitäten bezüglich Helligkeit, Brillanz und Kontrast verantwortlich sind, sondern auch bei Durchlichtfluoreszenzanregung als Sperrfilter große Vorteile bieten. Das gilt gerade für die oft störende Eigenfluoreszenz der Sperrfilter, die besonders bei Durchlicht-Hellfeld- und in geringerem Umfange auch bei Durchlicht-Dunkelfeld-Anregung zu bemerken ist.

Eine weitere Anwendung von Filtern sind die sogenannten Bandenabsorptionsgläser der Fa. Schott & Gen., Mainz. Diese Filter sind gewissermaßen Erreger- und Sperrfilter zu gleichen Zeit, wie an folgendem Beispiel erläutert werden soll: Zur Exzitation von Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC), Rhodamin RB 200, Rosamin B usw. wird die Quecksilberlinie 546 nm herangezogen. Die Fluoreszenzwellenlängen liegen je nach Fluorochrom zwischen 570 und 590 nm. Als Erregerfilter dient meist ein Interferenzbandfilter 546 nm. Die Halb- bzw. Zehntelwertsbreite (HW bzw. ZW) eines solchen Filters ist jedoch noch so groß, daß z. B. die Quecksilberlinie 578/579, die in ihrer Energie gegenüber dem Fluoreszenzlicht um den Faktor 100–1000 größer ist, die Fluoreszenz vollkommen überstrahlen würde.

Hier hat man beispielsweise mit einem 2 mm BG 36**) Bandenabsorptionsfilter sofort die Lösung dieses Problems dadurch, daß die Quecksilberlinie 546 nm bei einem Reintransmissionsgrad von $\tau_{546} = 95\%$ fast verlustlos durchgelassen, die Quecksilberlinie 578/579 jedoch bei einem Reintransmissionsgrad von $\tau_{579} = 10^{-6}\%$ nahezu vollkommen gesperrt wird (PLOEM 1969). Man sollte in diesem Zusammenhang bei der Erprobung neuer Fluorochrome auch solche Filter beachten, deren spektrale Charakteristik zunächst nicht vollkommen ideal ist, unter Verwendung anderer Filter in Kombination es jedoch schnell werden kann.

Bei der sogenannten Schmalbandanregung (PLOEM 1969, WALTER 1970) werden Kantenfilter (Sperrfilter) auf der Exzitationsseite eingesetzt, um bestimmte Teile des Exzitationsspektrums abzuschneiden. Dies soll am Beispiel des KP 490 von LEITZ erläutert werden. Die Transmissionskurve dieses Filters reicht von ca. 370–490 nm. Im Falle der FITC-Exzitation wird lediglich der Teil des Filters von ca. 480–490 nm benötigt. Im unteren Teil des Filters von 370–480 nm wird Exzitationslicht der Autofluoreszenz durchgelassen, die im Falle der FITC-Fluoreszenz ungewünscht ist, weil sie die gleiche Farbe hat wie die FITC-Fluoreszenz und somit nicht von dieser zu unterscheiden ist. Um die Autofluoreszenz weit-

***) Schott & Gen., Mainz

gehend zu unterdrücken, ordnet man ein GG 475***) in 2 bzw. 3 mm Dicke auf der Exzitationsseite an. Es bleibt zur Exzitation von FITC ein schmales Wellenlängenband (Abb. 3a u. 3b). Während dadurch die hohe Intensität der Fluoreszenz nur unwesentlich beeinflusst wird — die Transmission des Filters bei 490 nm ist sehr groß — kann die Autofluoreszenz unterdrückt werden.

Die unter Berücksichtigung aller bisher in dieser Übersicht aufgezeigten Punkte in der Auflichtfluoreszenz zu verwendenden Lichtquellen/Filter-Kombinationen sind für die wichtigsten Fluorochrome in nachfolgender Tabelle auf S. 203, 204 und 205 aufgeführt: Die in der Tabelle aufgeführten Filter 2 mm KG 1 und 4 mm BG 38 sind zur Anordnung im jeweiligen Lampenhaus bestimmt, da sie bei allen Filterkombinationen vorkommen. Die jeweils zugehörigen Filter, die vom Fluorochrom abhängig sind, können z. B. im Erregerfilterrevolver des LEITZ-Fluoreszenzilluminators nach PLOEM angeordnet werden.

Falls zu einem Fluorochrom zwei unterschiedliche Filterkombinationen angegeben wurden, so unterscheiden sich diese dadurch, daß die Fluoreszenzintensität bei der zuerst angeführten Filterkombination schwächer ist als im zweiten Falle. Bei den Sperrfiltern wurde das Filter, welches nach Auswertung der Meßergebnisse die stärkste Intensität der Fluoreszenz bei höchstem Kontrast ergab, unterstrichen, während die zusätzlich angeführten Sperrfilter für andere Aufgabenstellungen sinnvoll zu verwenden sind (Mikrofluorometrie).

Simultane Anwendung von Durchlicht-Mikroskopierverfahren und Fluoreszenzmikroskopie

Die in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie häufig simultan verwendeten weiteren Mikroskopierverfahren wie Hellfeld, Dunkelfeld und Phasenkontrast oder Polarisation werden vorwiegend zur Lokalisation fluoreszierender Details in sonst nicht fluoreszierenden Geweben verwendet (SCHÖNENBERG 1952, PRICE u. CHRISTENSEN 1957, KUNZ, GABLER u. HERZOG 1961, GREHN u. KORNMANN 1965, PLOEM 1967, MAC INNES u. URETZ 1966, EGER, KÄMMERER u. TRAPP 1967). Eine weitere Anwendung ist die oft erforderliche eindeutige Zuordnung fluoreszierender, feinsten Faserstrukturen zur Grundstruktur des Fluoreszenzpräparates, z. B. bei Knochenschliffen und chemischen Faserprodukten. Dabei zeigt sich vor allem in der Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskopie, daß bei feinstrukturierten Objekten eine exakte Aussage über die Grenzen fluoreszierender Partikel nicht bzw. nur bedingt möglich ist (GEISINGER u. SONSTEGARD 1969). Dies ist der Grund dafür, daß in Verbindung mit der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie, bei welcher jederzeit ein unabhängiges Durchlichtverfahren hinzugefügt werden kann, jetzt der Differential-Interferenzkontrast nach NOMARSKI (1952)*) und nach SMITH (1947)**) verwen-

det werden. Es gilt insbesondere für den neuen LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator, bei welchem für die korrekte Erregerfilterkombination das richtige Sperrfilter im internen Revolver fest eingebaut ist. Da der erforderliche Analysator bei den meisten Mikroskopen in den gleichen Filterschlitz wie für die normalen Sperrfilter eingeschoben werden muß, ist die Anwendung des Interferenzkontrastes möglich. Bei dem optischen Aufbau nach SMITH wirkt sich nachteilig aus, daß die Objektive fest im Revolver einjustiert werden müssen. Es bleibt dann noch eine Objektivanschrauböffnung für weitere wechselbare Objektive frei. Ein weiteres Verfahren, die sogenannte Farbkontrastfluoreszenz (KUNZ, GABLER u. HERZOG 1961) hat nur in wenigen bekannten Fällen Eingang gefunden. Bei diesem Verfahren wird das der Fluoreszenz überlagerte Phasenkontrastbild mit Hilfe von Farbfiltern so abgestimmt, daß ein deutlicher Farbkontrast gegenüber der Fluoreszenz sichtbar wird. Diesen Farbkontrast bei bestimmten Filterherstellungen zu berücksichtigen, d. h. z. B. bei Interferenzfiltern fest in die spektrale Charakteristik einzubeziehen, scheint wenig sinnvoll zu sein, da diese konstruktive Maßnahme die weitere Verwendung von Filtern, auch die von Spezialfiltern, ausschließt. Dies zeigt sich insbesondere bei dem FITC-Erregerfilter KP 490*, welches für eine Reihe weiterer Fluoreszenz-anwendungsfälle, u. a. Quinacrinemustarddihydrochlorid (QM)** ideal geeignet ist.

Für quantitative Fluoreszenzmikroskopie, bei der aufgrund von RUCH (1966) und THAER (1966) beschriebener Probleme ausschließlich Auflichtfluoreszenz betrieben wird, beobachtet man zunächst mit Durchlichtphasenkontrast bei gesperrtem Exzitationslicht. Für die dann folgende Messung ist das Einhalten einer konstanten Meßdauer für alle zu einer Meßreihe erforderlichen Einzelmessungen wichtig, um den immer entstehenden Ausbleichfehler bei der Auswertung eliminieren zu können.

Anschrift des Verfassers: Ing. (grad.) Winfried Kraft, Ernst Leitz GmbH, Entwicklungskonstruktion Mikro, 633 Wetzlar.

Lichtquellen und Filter für die Auflichtfluoreszenz mit dem LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator

Fluorochrom oder Fluorophor	Exzitation in nm	Emission in nm	Empfohl. Lichtquellen**)	Exzitationsfilterkomb. mit Wärmeschutzfilter und Rotdämpfungsfilter; Reihenfolge im Sinne der Lichtrichtung	LEITZ-Fluoreszenz-Auflichtilluminator mit Erregerfilterrevolver Pos.*)	Eingebauter dichromat. Interferenzteilerspigel	Eingebautes Sperrfilter	Zusätzlich empfohlene Sperrfilter
Acridin-Orange	400–500	530–590	HBO CS XBO	2 mm KG 1 4 mm BG 38 3 mm BG 12 oder S 470; weitere mögliche Filterkombinationen: 3 mm + 1.5 mm BG 12 3 mm + 3 mm BG 12 5 mm + 1.5 mm BG 12 5 mm + 3 mm BG 12	3	510	515	K 510 K 530 K 550 K 570 K 580
Auramin O			HBO CS XBO	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2x KP 490 = KP 500	3	510	515	K 510 K 530
Berberin-sulfat			HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm UG 1 oder 2 mm + 1 mm UG 1 2 mm + 2 mm UG 1	3	510	515	K 510 K 530 K 550
Bisamino-phenyl-oxidiazole (CIBA)	ca. 280	480–580	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm UG 1 eventuell 2x2 mm UG 1 oder 2 mm UG 1 + 1 mm UG 1	1	K 400	K 400	K 460 K 470 K 490 K 510 K 530
Catecholamine u. a. Noradrenalin Adrenalin Dopamin	410–415	470–480	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 3 mm BG 3 S 405 (Typ AL) } oder 546 2 mm KG 1 4 mm BG 38 3 mm BG 3 KP 425	2	K 455	K 460	K 460 K 470 K 490
Feulgen-Färbung (Pararosanilin)	ca. 550	ca. 650	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 S 546 (Typ AL) } oder 405 2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 2 mm GG 475 KP 560 } = KP 555	4	K 580	K 580	K 590 K 610
Fluorescein-isothiocyanat-Konjugat (FITC)	490–495	520–530	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 1.5 mm BG 12 S 470 (Typ AL)				
Fluorescein (FDA-Test)			XBO	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2x KP 490 = KP 500; für die Schmalbandexzitation (PLOEM) ist zusätzlich das Filter 2 mm bzw. 3 mm GG 475 erforderlich	3	K 510	K 515	K 510 S 525 (SAL 525)

*) Deutsches Patent vom 13. 5. 53 Nr. 1037 174; franz. Priorität v. 14. 5. 52
**) Britisches Patent v. 5.8.47 (veröffentlicht 21.6.50) Nr. 639 014
***) Fa. Schott & Gen., Mainz

*) E. Leitz, Wetzlar
**) Hersteller: Stirling-Winthrop Research Institute, Reusselaer, N.Y., USA

Lichtquellen und Filter für die Auflichtfluoreszenz mit dem LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminator

Fluorochrom oder Fluorophor	Exzitation in nm	Emission in nm	Empfohl. Lichtquellen**)	Exzitationsfilterkomb. mit Wärmeschutzfilter und Rotdämpfungsfilter; Reihenfolge im Sinne der Lichtrichtung	LEITZ-Fluoreszenz-Auflichtilluminator mit Erregerfilterrevolver	Zusätzlich empfohlene Sperrfilter
					Pos.*) Eingebauter dichromat. Interferenzteilerspiegel	
Lissamin-Rhodamin B 200 Konjugate	568	597	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 } oder S 546 (Typ AL) } 546	4	K 580 K 580 K 590 K 610
				2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 2 mm GG 475 } = KP 535 KP 560		
Pyronin	550	ca. 590	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 } oder S 546 (Typ AL) } 546	4	K 580 K 580 K 590 K 610
				2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 2 mm GG 475 } = KP 555 KP 560		
Quinacrine-mustard-dihydrochlorid (QM)	430-460	ca. 490-530	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2x3 mm BG 3	2	K 455 K 460 K 490
			HBO XBO	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2x KP 490 = KP 500	3	K 510 K 515
Serotonin (5-Hydroxytryptamin = 5 HT)	385-415	520-530	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 3 mm BG 3 } oder S 405 (Typ AL) } 405	2	K 455 K 460 K 460 K 470 K 490 K 510
				2 mm KG 1 4 mm BG 38 3 mm BG 3 } = KP 410 KP 425		
Stilben (SITS)	ca. 366	ca. 460	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm UG 1 2 mm UG 1	1	K 400 K 400 K 430 K 460
Tetracyclin		ca. 560	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 3 mm BG 3 } oder S 405 (Typ AL) } 405	2	K 455 K 460 K 470 K 490 K 510 K 530
				2 mm KG 1 4 mm BG 38 2x KP 490 = KP 500	3	K 510 K 515 K 510 K 530
Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)	550	ca. 580	HBO CS	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 } oder S 546 (Typ AL) } 546	4	K 580 K 580 (K 590) (K 610)
				2 mm KG 1 4 mm BG 38 2 mm BG 36 } = KP 555 KP 560		

*) In Pos. 3 des LEITZ Fluoreszenz-Auflichtilluminators waren bisher ein dichromatisches Teilerplättchen K 495 mit einem Sperrfilter K 495 angeordnet.

** Die Lichtquellenbezeichnungen „HBO“ (Quecksilberhochdrucklampe) und „XBO“ (Xenonhochdrucklampe) bezeichnen Lampen der Fa. Osram, und die Bezeichnung „CS“ (Quecksilberhochdrucklampe) ist die entsprechende Bezeichnung der Fa. Philips.

Durchlicht-Dunkelfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Fluorochrom	Exzitation in nm	Emission in nm	Lichtquellen	Exzitationsfilter	Empfohlene Sperrfilter
Fluorescein-isothiocyanat-Konjugate (FITC)	490-495	520-530	Halogenleuchte 12 V, 100 W	2 mm KG 1 4 mm BG 38 KP 490	K 510 (K 530) S 525
			XBO	2 mm KG 1 4 mm BG 38 2x KP 490 = KP 500	K 510 (K 530) S 525
				Für Schmalbandregung bei FITC muß zusätzlich ein Filter 2 mm GG 475 verwendet werden.	

Literatur:

Brumberg, E. M., und T. N. Krylova: fluoreschentykh mikroskopopak. Zh. obshch. biol. 14 (1953), 461.

Caspersson, T., G. Lomakka und R. Rigler jr.: Registrierender Fluoreszenzmikroskopograph zur Bestimmung der Primär- und Sekundärfluoreszenz verschiedener Zellsbstanzten. Acta Histochem. Suppl. VI (1965), 123-126.

Caspersson, T., N.-A. Hillarp und M. Ritzén: Fluorescence Microspectrophotometry of Cellular Catecholamines and 5-Hydroxytryptamine. Exp. Cell. Res. 42 (1966), 415-428.

Claussen, C. H.: Mikroskop-Objektive mit geebnetem Feld. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. IV/3 (1967), 65-73.

Demtröder, G. W.: Molekülspektroskopie mit Lasern. Umschau, 16 (1970), 315.

Eger, W., H. Kämmerer und L. Trapp: Simultane fluoreszenz- und polarisationsmikroskopische Untersuchung an unentkalkten Dünnschliffen von Knochengewebe. Zeiss-Inf. 64 (1967) 64-68.

Eränkő, O.: Distribution of fluorescing islets, adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla of the hamster. Acta endocrinol., 18 (1955) 174.

Falck, B., N.-A. Hillarp, G. and A. Torp: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 10 (1962), 348.

Feulgen, R.: In „Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden“ Abt. V, Teil 2, II, 1055, Urban u. Schwarzenberg/Berlin (1932).

Grehn, J., und H. Kornmann: Kontrastfluoreszenz mit Opak-Illuminator. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. III (1965), 108.

Geissinger, D., K. Sonstegard und R. Sonstegard: Nomarski-Differential Interference Contrast-Fluorescence Microscopy: a new Technique Designed to Improve Resolution in Fluorescent Specimen. Mikroskopie, 24 (1969), 321-326.

Hansen, P. A.: Fluorescent Compounds used in Protein Tracing. Absorption an Emission Data. Report University of Maryland, USA, Sept. 1964 (nicht im Handel erhältlich).

Hansen, P. A.: Spectral data of fluorescent tracers. Acta Histochemica Suppl. 7 (1967), 167-180.

Haselmann, H., und D. Wittekind: Phasenkontrast-Fluoreszenz-Mikroskopie. Z. Wiss. Mikroskopie 63 (1957), 147-151.

McInnes, J. W., and R. B. Uretz: Organization of DNA in dipteran polytene chromosomes as indicated by polarized fluorescence microscopy. Science 151 (1966), 689-691.

Koch, K. F.: Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie 1. FITC-Fluoreszenz. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. V/5 (1971) 146-148.

Kraft, W.: Die Technologie des Leitz-Fluoreszenzopak. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. IV/8 (1969), 239-242.

Kraft, W.: Ein neues FITC-Erregerfilter für die Routinefluoreszenz. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. V/2 (1970), 41-44.

Kunz, Ch., F. Gabler und F. Herzog: Kontrastfluoreszenz, eine neue Methode der Fluoreszenzmikroskopie. Mikroskopie 16 (1961), 1-7.

Nairn, R. C.: Fluorescent Protein Tracing. E. & S. Livingstone, Ltd. Edinburgh and London. 1. Auflage 1962; 3. Auflage 1969.

Ploem, J. S.: The Use of a Vertical Illuminator with interchangeable dichroic Mirrors for Fluorescence Microscopy with Incident light. Z. Wiss. Mikrosk. 68 (1967), 129-142.

Ploem, J. S.: Ein neuer Illuminator-Typ für die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. IV/8 (1969), 225-238.

Price, G. R. und Christenson Le Roy: Combined Phase- and Fluorescence Microscopy. Mikroskopie 12 (1957), 147-151.

Richards, O. W., and P. Waters: A New Interference Exciter Filter for Fluorescence Microscopy of Fluorescein-Tagged Substance. Stain Technology 42 (1967), 320.

Rigler, R. Jr.: Micro Fluorometric Characterization of Intracellular Nucleic Acids and Nucleoproteins by Acridine Orange. Akademisk Avhandling som med benäget tillstånd av Kanslern for Rikets Universitet för medicine doktorsgrads finnande offentligen försvaras; Bakteriologiska Institutionens föreläsningssal, Karolinska Institute, 25 April 1966, Stockholm.

Ruch, F.: Fluoreszenzphotometrie. Acta Histochemica Suppl. VI (1966) 117-121.

Schläfer, R.: Anwendung monochromatischer Filter in den Naturwissenschaften. Beiträge zur Angewandten Glasforschung (1958) Druckschrift Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Mainz (1966).

Schläfer, R.: Winkelabhängigkeit der optischen Werte von Interferenzfiltern. Druckschrift Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Mainz (1966).

Schönenberg, H.: Untersuchungen über Vitalspeicherungen in Liquorzellen sowie phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen über den Zerfall von Liquorzellen. Z. Kinderheilkunde 72 (1952), 157.

Tomlinson, A. H.: An Interference Filter for Use with the Jodine-Quarz Lamp to Excite Fluorescence. In: Standardization in Immunofluorescence, E. J. Holborow. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1970).

Tomlinson, A. H.: Illumination. In: Standardization in Immunofluorescence, E. J. Holborow. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1970).

Tchan, Y. T.: Phase Fluorescence Microscopy. Nature 179, 1957, 179.

Thaer, A. A.: Instrumentation for microfluorometry. In: Wied, G. L. (ed). Introduction to quantitative Cytochemistry. Acad. Press, New York (1966), 409.

Trapp, L.: Über Lichtquellen und Filter für die Fluoreszenzmikroskopie und über die Auflichtfluoreszenzmethode bei Durchlichtpräparaten. Acta Histochemica Suppl. VII (1967), 327-338.

Walter, F.: Eine Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung für die Routine-diagnose. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. IV/6 (1969), 186-187.

Walter, F.: Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V/2 (1970), 33-40.

Young, M. R., and J. A. Armstrong: Fluorescence Microscopy with the Quartz-Jodine-Lamp. Nature 213 (1967), 649.

Abbildende und beleuchtende Optik des Mikroskops. Druckschrift der Fa. Ernst Leitz, Wetzlar, Nr. 512-99.

Farb- und Filterglas für Wissenschaft und Technik, Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Mainz 365/1-d-1962.

Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie

2. Allgemeine Fluoreszenz

Von KARL-FRIEDRICH KOCH

Laboratorium für Angewandte Mikroskopie der Ernst Leitz GmbH, Wetzlar

DK 535.822.5 : 535.372 : 535.345.6

Die verschiedenen bekannten Fluoreszenztechniken erfordern je nach den verwendeten Fluorochromen oder dem fluoreszierenden Endprodukt unterschiedliche Anregungswellenlängen. Für die FITC-Immunfluoreszenztechnik wurden die Lichtquellen bereits an anderer Stelle beschrieben (KOCH 1971). Daneben werden z. B. Eigenfluoreszenz mit ultraviolettem Licht, die Fluoreszenz biogener Amine mit violettem, Fluoreszenz-Färbungen mit Lissamin-Rhodamin B oder die Feulgenfärbung mit grünem Licht angeregt.

Halogen-Glühlampen

Außer für Routineuntersuchungen in der FITC-Immunfluoreszenztechnik kann die Halogen-Glühlampe 12 V 100 W in Verbindung mit dem Filter KP 490 auch zur Anregung weiterer Fluorochrome verwendet werden. Man erzielt etwa bei der Anregung von Tetracyclin, Acridinorange und Morin brillante und hell fluoreszierende Bilder. Diese Lichtquelle kann sowohl im Durchlicht als auch im Auflicht – auch in der Fluorometrie – Verwendung finden.

Xenon-Hochdrucklampen

Lichtquellen dieses Typs sind für die Anregung mit anderen Wellenlängen als Blau (470-490 nm) nur wenig geeignet. Ihr Kontinuum bei den am meisten benötigten Wellenlängen (366, 405, 546 nm) ergibt eine gerade noch ausreichende Fluoreszenzintensität. Lediglich in der Fluorometrie werden sie aufgrund ihrer ausgezeichneten Stabilisierbarkeit gerne verwendet.

Quecksilber-Höchstdrucklampen

Mit ihren ausgeprägten Linien in den wichtigen Wellenlängenbereichen ergeben die Quecksilber-Höchstdrucklampen bei Anregung im ultravioletten, violetten und grünen Bereich eine hohe Fluoreszenzausbeute. Besonders die Auflichtanregung mit der Hg 100 W, die etwa die doppelte Energie gegenüber der weitverbreiteten Hg 200 W aufweist, erbringt in Routine und Forschung große Vorteile.

Für die Auflichtanregung ist außerdem die Hg 50 W interessant, da sie bei etwa gleicher Energie wie die Hg 200 W wesentlich preisgünstiger ist. Sie macht daher auch die Routine-Auflichtfluoreszenz besonders attraktiv.

In der Fluorometrie ist jedoch von den Hg-Höchstdrucklampen nur die Hg 100 W verwendbar, da sie als

gleichstrombetriebene Lichtquelle gut stabilisierbar ist.

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die wichtigsten technischen Daten der Lichtquellen.

Tabelle I. Lichtquellen für die FITC-Immunfluoreszenz

Die aufgeführten Lichtquellen sind in ihrer Reihenfolge auf die Intensität in Verbindung mit den Filtern 2 x KP 490 und BG 38 abgestimmt.

Lichtquelle	Lebensdauer (Std.)	Leuchtdichte (sb)	Eignung für Durchlicht (D) und Auflicht (A)
Xe 75 W	400	40000	A
Xe 450 W	2000	35000	D, A
Xe 150 W	1200	15000	D, A
Hg 100 W	200	170000	A
Hg 200 W	200	33000	D, A
Hg 50 W	100	30000	D, A
Halogen-Glühlampe 12 V 100 W	50		D, A

Tabelle II. Lichtquellen für die allgemeine Fluoreszenzmikroskopie

Der Intensität nach aufgestellte Reihenfolge der für dieses Gebiet geeigneten Lichtquellen

Hg 100 W
Hg 200 W
Hg 50 W
Xe 75 W
Xe 450 W
Xe 150 W
Halogen-Glühlampe 12 V 100 W

Anschrift des Verfassers: Karl-Friedrich Koch, Ernst Leitz GmbH, Labor Anwendung Mikro, 633 Wetzlar

Literatur:

Koch, K.-F.: Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie. 1. FITC-Immunfluoreszenz. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. V (1971), 146.

LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. · Bd. V · Nr. 7 · S. 206 · Wetzlar, Sept. 1972

Kombinierte lichtmikroskopische Untersuchungen als Vorbereitung zur Rasterelektronenmikroskopie, unter besonderer Berücksichtigung der Morphologie des Fibrins

Von H. LUDWIG, H.-J. BRÜCK und H. METZGER

I. Universitäts-Frauenklinik und Ernst Leitz K. G., München

DK 578.6 : 616-076 : 537.533.35 : 612.115.1

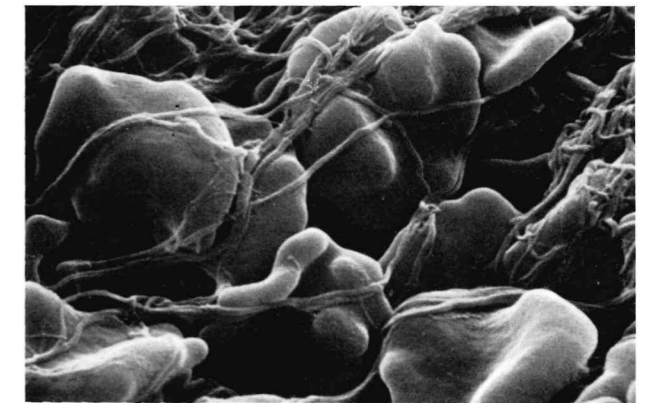
Mit der Rasterelektronenmikroskopie stehen uns heute technische Möglichkeiten zur Verfügung, welche es erlauben, Zell- bzw. Gewebeoberflächen bis zu einer Vergrößerung von 20 000 x in ihrer gegenseitigen Beziehung darzustellen. Unsere Arbeitsgruppe an der I. Universitäts-Frauenklinik München bemüht sich besonders um den Nachweis von Fibrin im Thrombus (Abb. 1), in der Plazenta, im Uterus und in den Tuben. Es hat sich als nützlich erwiesen, die Proben, welche mit dem Rasterelektronenmikroskop studiert werden sollen, vor der Spezialpräparation bzw. parallel zu ihr lichtmikroskopisch zu analysieren. Wir bedienen uns dazu des Großfeld-Forschungsmikroskops LEITZ-ORTHOPLAN mit Fluoreszenzeinrichtung, Phasenkontrast und differentieller Interferenzkontrast zur Darstellung von Fibrin in nativen, trichromgefärbten bzw. immunfluoreszenzpräzipitierten Präparaten.

Lichtmikroskopisch-instrumentelle Technik

Übersichtsaufnahmen (Abb. 2a) der histologischen Präparate erfolgen mit dem LEITZ-ARISTOPHOT mit Makro-Dia-Einrichtung, den neuen Objektiven der PHOTAR-Serie und der vollautomatischen 4 x 5" Kamera mit einer 6 x 9 cm Rollfilmkassette. Gold-Kohlenstoffbedampfte Präparate werden auf Qualität mit Hilfe des LEITZ Stereomikroskops RS überprüft (Abb. 3). Mit diesem Instrument ist eine ausgezeichnete Präparation nativer und fixierter Gewebeproben für die spätere Rasterelektronenmikroskopie möglich.

Der routinemäßige, fluoreszenzmikroskopische Fibrinnachweis an nativen Präparaten nach Vorbehandlung mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Fibrinogen-serum, Inkubation und anschließendem Auswaschen erfolgt in der Regel bei schwacher Vergrößerung mit den Objektiven PL FL 10/0.30 und NPL 16/0.40. Es

Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme aus dem menschlichen Plazentarbett im Uterus, unmittelbar nach der Geburt durch Biopsie (Schnittentbindung) gewonnen. Im Bildausschnitt dargestellt sind Erythrozyten und Fibrinfäden. Die Fibrinfäden deformieren die Erythrozyten. Ausstülpungen der Erythrozytenmembran treten zwischen den das Blutkörperchen zernierenden Fibrinfäden hervor. Schmale Fibrinfäden lagern sich stellenweise zu größeren Bündeln zusammen. Die Wundfläche des Plazentarbettes ist auf diese Weise von einer Fibrin-Erythrozyten-Tapete ausgekleidet. Sie mißt bis 200 µm Dicke. An der Ablösungsfläche der Eihäute ist sie nur wenige µm dick, aber ebenso aufgebaut wie im Plazentarbett (LUDWIG, 1971; LUDWIG und METZGER, 1971), Vorfärbung mit 5%igem Glutaraldehyd, Trocknung in der aufsteigenden Alkoholreihe, Gold-Kohlenstoffbedampfung im Hochvakuum, Aufnahme mit dem Cambridge-REM. Vergrößerung 5000fach.



LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. · Bd. V · Nr. 7 · S. 207-212 · Wetzlar, Sept. 1972