

Methoden der Durchlichtfluoreszenzmikroskopie

Gerhard Göke

1. Einführung in die Technik und Problematik

Für eine ganze Reihe von Mikroskopen stehen heute Hochleistungs-Mikroskopierleuchten zur Verfügung, die direkt an das Stativ angeschlossen werden können. Wenn solche Leuchten eine Leistung von mindestens 50 Watt haben, sind sie für die Blaulicht-Fluoreszenz-Anregung geeignet. Die besten Erfahrungen wurden mit der 12 V / 100 W-Halogenleuchte gemacht.

Mit den so ausgerüsteten Mikroskopen ist die Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskopie ohne großen finanziellen Aufwand möglich. Erforderlich sind nur ein paar Filter, deren Preis zwischen 10 und 20 DM pro Stück liegt. Unser Mitarbeiter Gerhard Göke hat im Laufe der Zeit erfahren, daß viele Mikroskopiker mit der an sich einfachen Fluoreszenzmikroskopie nicht zurechtkommen und nach den ersten Mißerfolgen das Interesse daran verlieren. Die Wahl der richtigen Filter in Kombination mit den hierfür geeigneten Fluorochromen bzw. die richtige Auswahl primär fluoreszierender Objekte bietet aber gerade dem Hobby-Mikroskopiker ein weites Experimentierfeld. Er hat deshalb die gängigsten Fluorochrome und die hierzu passenden Filterkombinationen zusammengestellt und erläutert die kompliziert erscheinenden Zusammenhänge zwischen Anregung und Emission. In einem zweiten Teil wird Gerhard Göke die praktische Anwendung beschreiben.

Die Umwandlung von Energie beliebiger Art in Lichtenergie hat E. Wiedemann *Lumineszenz* genannt. Am bekanntesten ist die Temperaturstrahlung, die bei der Umsetzung von Wärme entsteht. Das Licht kann aber auch selbst die Ursache einer sekundären Leuchterscheinung sein, die als *Photolumineszenz* bezeichnet wird. Wenn diese nur so lange dauert, wie das Erregerlicht auf das leuchtende Objekt einwirkt, spricht *man von Fluoreszenz*. Das spätere Nachleuchten, das man nach Abschalten der Lichtquelle beobachten kann, ist die *Phosphoreszenz*.

Für die Photolumineszenz ist charakteristisch, daß durch die Einwirkung von Lichtstrahlen, die zuerst absorbiert werden, neue entstehen, die eine größere Wellenlänge besitzen als das Erregerlicht. Aus rein technischen Gründen verwendet man in der Fluoreszenzmikroskopie meistens nur das Wellenlängengebiet von 300 bis 450 nm (Ultraviolett bis Blau) für die Anregung von Fluoreszenzen, die dann eine blaue bis rote Farbe haben. Man kann aber auch andere Wellenlängen benutzen. So gibt es beispielsweise Fluoreszenzerscheinungen, die mit UV unter 300 nm angeregt werden und noch im unsichtbaren Spektralgebiet liegen und solche, die von sichtbarem Licht angeregt im infraroten Spektralgebiet entstehen. Für ihren Nachweis sind in beiden Fällen elektronenoptische Bildwandler erforderlich. Von großem Interesse sind auch die roten Fluoreszenzen, die von grünem Licht erzeugt werden.

Das Fluoreszenzmikroskop

Im MIKROKOSMOS wurde bereits beschrieben, wie ein normales Durchlichtmikroskop ohne großen technischen Aufwand zum Fluoreszenzmikroskop umgerüstet werden kann [1, 2]. Das Licht eines energiereichen Strahlers wird vom Kollektor konvergent gemacht und über einen Spiegel oder totalreflektierendes Prisma durch den Kondensor zum Präparat geleitet. Nachdem es hier die fluoreszenzfähigen Strukturen zum Leuchten gebracht

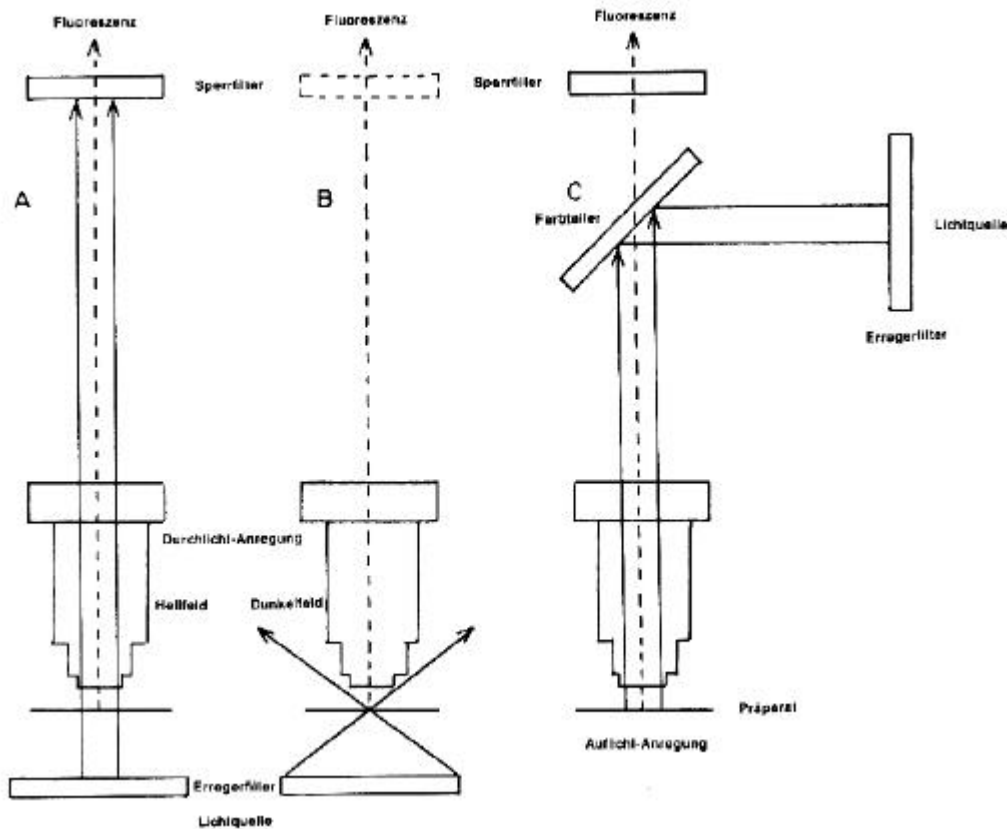


Bild 1 Durchlicht- und Auflichtanregung A: Durchlicht-Hellfeld
B: Durchlicht-Dunkelfeld C: Auflicht-Hellfeld

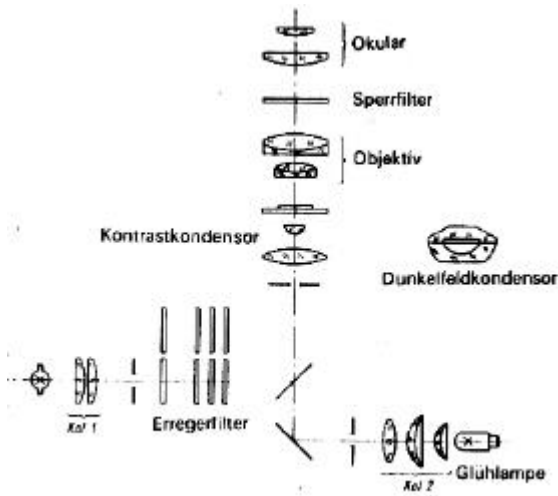
hat, wird es nicht mehr benötigt und deshalb mit einem Sperrfilter oberhalb des Objektivs aus dem Strahlengang entfernt. Nur das Fluoreszenzlicht gelangt zum Auge des Beobachters. Dieses einfache Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich in vielfältiger Weise modifizieren (Bild 1). Im einfachsten Fall wird das Erregerlicht durch einen Hellfeldkondensator von unten zum Präparat geleitet. Das ist die älteste Methode, die als *Durchlicht-Hellfeldanregung* bezeichnet wird.

Beleuchtet man das Präparat mit Hilfe eines Dunkelfeldkondensators, so fällt das Erregerlicht nicht ins Objektiv. Bei dieser *Durchlicht-Dunkelfeldanregung* kann man ein dünneres Sperrfilter verwenden.

Moderne Fluoreszenzmikroskope arbeiten nach dem Prinzip der *Auflicht-Hellfeldanregung*. Das Licht wird mit einem Vertikal-Illuminator zum Präparat geführt, der eine spezielle chromatische Teilerplatte enthält. Bei dieser Anordnung wird das Erregerlicht in Richtung des Präparates reflektiert, wobei das Objektiv als Kondensator dient. In umgekehrte Richtung gelangt überwiegend das Fluoreszenzlicht zum Auge des Beobachters. Auch bei dieser Methode ist ein Sperrfilter erforderlich. Diese Anregungsart wird heute bevorzugt. Sie liefert nicht nur eine höhere Fluoreszenzintensität als die Durchlicht-Anregung, sondern lässt sich auch am besten mit anderen Verfahren, zum Beispiel *Durchlicht-Phasenkontrast* und *-Dunkelfeld*, kombinieren.

Für die simultane Durchlicht-Phasenkontrast-Fluoreszenz ist ein Phasenkontrastkondensator erforderlich, dessen Ringblenden aus UV- bis blaudurchlässigem Filterglas bestehen. Man beleuchtet über eine Teilerplatte oder einen Strahlenteiler mit der eingebauten Köhlerleuchte des Mikroskops und gleichzeitig mit einer seitlich angesetzten UV- oder Blau-

lichtquelle. Auf diese Weise wird dem Fluoreszenzbild ein Phasenkontrastbild überlagert, dessen Intensität mit dem Regeltransformator der Niedervoltleuchte auf die des Fluoreszenzbildes abgestimmt werden kann (Bild 2). Bei Aufsicht-Fluoreszenzanregung würde ein normaler Phasenkontrastkondensator ausreichen.



Die klassische Durchlicht-Hellfeldanregung hat trotz der vielen Vorzüge der Aufsicht-Anregung ihre Bedeutung nicht ganz verloren. Sie ist mit jedem mittleren Mikroskop durchführbar und bietet dem experimentierfreudigen Mikroskopiker ein sehr großes Betätigungsfeld. Aber auch bei vielen Routineuntersuchungen ist die Durchlicht-Anregung wegen ihrer Einfachheit die Methode der Wahl geblieben. In diesem Beitrag werden nur Methoden beschrieben, für die eine Durchlicht-Hellfeld- oder -Dunkelfeldanregung ausreicht. Die Umrüstung eines vorhandenen Mikroskops ist problemlos und kann mit geringem finanziellem Aufwand durchgeführt werden.

Bild 2 Prinzip der simultanen Durchlicht-Phasenkontrastfluoreszenz. Das Präparat wird gleichzeitig mit weißem und blauvioletterm Licht beleuchtet.

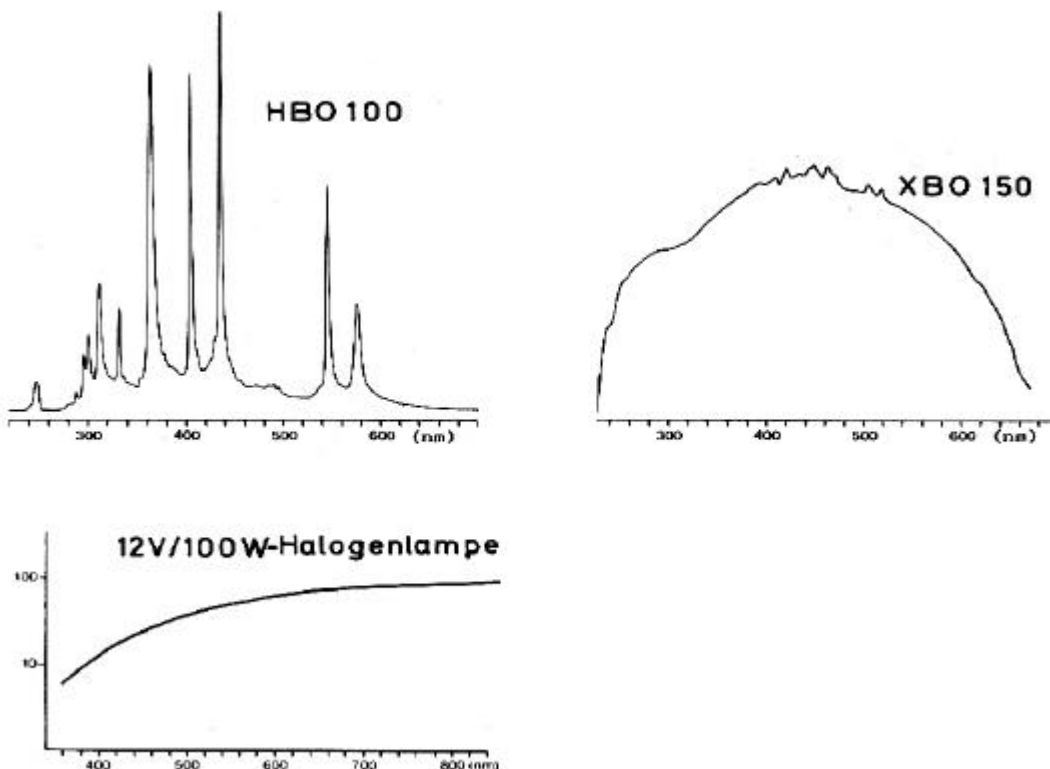


Bild 5 Spektren von Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie: Hg-Hochdruckbrenner HBO 100, Xe-Hochdruckbrenner XBO 150, Halogenlampe 12 V / 100 W

Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für das Zustandekommen brillanter Fluoreszenzbilder ist die spektrale Zusammensetzung und die Strahldichte des Erregerlichtes von größter Bedeutung. Die sehr energiereichen Quecksilberhöchstdruckbrenner erfordern ein spezielles Lampenhaus und ein Vorschaltgerät, die beide recht teuer sind (Bild 3). Für die noch besser geeigneten Xenon-Höchstdruckbrenner gilt das gleiche. Diese idealen Lichtquellen sind für einige Anwendungsgebiete der Fluoreszenzmikroskopie unentbehrlich. Es gibt aber auch Primär- und Sekundärfluoreszenzen, die sich mit sichtbarem grünem bis violetterem Licht anregen lassen. Hierfür genügt eine 12 V / 100 W Halogen-Hochleistungsmikroskopierleuchte, die mit einem gewöhnlichen Transformator betrieben wird und bedeutend preiswerter ist als die Entladungslampen. Wegen der hohen Wärmeabstrahlung darf diese Leuchte nicht im Mikroskopfuß untergebracht werden. Bei vielen Mikroskopstativen ist bereits der Anschluß eines separaten Lampenhauses vorgesehen. Wenn diese Kombination nicht möglich ist, muß man die Leuchte separat aufstellen. In ihrem Strahlengang sollte sich stets ein Wärmeschutzfilter befinden. Bild 5 zeigt die Spektren der beschriebenen Lichtquellen. Der Quecksilber-Höchstdruckbrenner HBO 100 hat ein Linienspektrum. Hingegen erzeugt der Xenon-Höchstdruckbrenner ein spektrales Kontinuum, das von einzelnen Linien überlagert wird. Die Halogen-Glühlampe emittiert ein vollkommen kontinuierliches Spektrum mit einem für viele Anwendungen ausreichenden intensiven blauvioletteren Anteil.

Erregerfilter und Sperrfilter

Bei der Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen muß man den Schwerpunkt des Erregerlichtes in das Maximum der Lichtabsorption dieser Farbstoffe legen. Die Wahl des richtigen Erregerfilters ist von größter Bedeutung für die Qualität des Fluoreszenzbildes. In Tabelle 1 wurden die Anregungswellenlängen bzw. die Maxima der Lichtabsorption und die Breiten der Fluoreszenzbande (Emission) von bekannten Fluorochromen zusammengestellt. Der Tabelle können auch die erforderlichen Erreger- und Sperrfilter entnommen werden. Die Zusammenstellung zeigt, daß viele gebräuchliche Fluorochrome mit sichtbarem violetterem, blauem und sogar grünem Licht zur Fluoreszenz angeregt werden können und nur für wenige ultravioletteres Licht erforderlich ist. Für die Anregung mit sichtbarem Licht genügt in den meisten Fällen eine Halogen-Hochleistungsmikroskopierleuchte 12 V / 100 W. Bild 4 zeigt ein normales Durchlicht-Mikroskop, das mit einer solchen Leuchte, einem Erregerfilter und einem Sperrfilter zum Routine-Fluoreszenzmikroskop umgerüstet wurde. Der Hellfeld-Kondensator hat eine hohe numerische Apertur und wird mit Wasser oder fluoreszenzfreiem Immersionsöl immerniert. Ein Immersions-Dunkelteldkondensator erweitert den Einsatzbereich des Mikroskops.

Nur wenige Erregerfilter sind erforderlich. Die preiswerten Glasfilter BG 12/4 mm (für Blauviolett) und BG 3/3 mm + BG 38/4 mm (für Blauanregung) genügen in vielen Fällen den Anforderungen. Für eine UV-Anregung kommen die Schwarzglasfilter UG 1/2 mm und UG 5/2 mm in Kombination mit dem Rotsperfilter BG 38/2 mm in Frage. Die genannten Filter haben eine annähernd glockentörmige Transmissionskurve (Bild 6).

Bessere Ergebnisse erzielt man mit den sogenannten Kurzpaßfiltern, die eine steile Absorptionskante in Richtung des langwelligen Spektralgebietes haben. Für spezielle Anwendungen (FITC-Fluoreszenz, Chromosomenfluoreszenz, Grünanregung usw.) werden Bandpaßfilter mit zwei steilen Absorptionskanten empfohlen. Sie isolieren ein bestimmtes Wellenlängengebiet aus dem Gesamtspektrum der Leuchte (Bild 6). Moderne Fluores-

zenzmikroskope sind meistens mit einem Satz Kurzpaß- oder Bandpaßfilter ausgerüstet. Da es sich hierbei um Interferenzfilter handelt, sind die Preise entsprechend hoch.

Für die Blauanregung vieler Fluorochrome ist ein mehrschichtiges, etwa 6 mm dickes Interferenzfilter (Bandpaßfilter) geeignet, das in der Literatur [4] als FITC-Filter bezeichnet wird. Es hat im Bereich von 440 bis 490 nm eine sehr hohe Durchlässigkeit und steile Absorptionskanten in Richtung der kürzeren bzw. längeren Lichtwellen (Bild 6).

Auch für die Grünanregung werden Bandpaßfilter mit mehr oder weniger großer Halbwertsbreite hergestellt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Interferenzfilter. Mit Farbglasfiltern ist die Grünanregung sehr unbefriedigend.

Alle Erregerfilter werden im Beleuchtungsstrahlengang angeordnet. Sie können wahlweise in das Filtermagazin der Fluoreszenzleuchte oder in die Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes eingesetzt werden. Der Filterträger des Kondensors kann dann zusätzliche Filter, zum Beispiel ein Rotsperfilter, aufnehmen.

Als Sperrfilter werden sogenannte Langpaßfilter verwendet. Analog den Kurzpaßfiltern haben sie eine steile Absorptionskante in Richtung der kurzen Lichtwellen. Nach der Lage dieser Kante werden sie bezeichnet (OG 530/2 mm = Orangeglas mit einer Kantenlage bei 530 nm und einer Glasdicke von 2 mm). Es handelt sich um in der Masse gefärbte Gläser, neuerdings auch um Kunststoffverbundgläser, die im Gegensatz zu den Interferenzfiltern recht preiswert sind. Wenn jedoch aus dem Fluoreszenzlicht bestimmte Bandbreiten isoliert werden müssen oder extrem steile Absorptionskanten für die Trennung von Erregerlicht und Fluoreszenzlicht erforderlich sind, verwendet man die Interferenzfilter auch als Sperrfilter.

Das Langpaßfilter OG 530/2 mm ist sehr universell verwendbar. Bei UV-, Blauviolett- und Blauanregung läßt es das grüne bis rote Fluoreszenzlicht durch und absorbiert das Erregerlicht. Es ist auch für das FITC-Erregerfilter geeignet. Speziell bei der FITC-Fluoreszenz sollte man jedoch ein Sperrfilter verwenden, dessen Absorptionskante bei 520 nm liegt. Das Sperrfilter GG 10/2 mm ist kein Kantenfilter, sondern ein praktisch fluoreszenzfreies Gelbgrün glas, das sich bei UV-Anregung mit den Schwarzglasfiltern UG 1 und UG 5 bewährt hat. Bei Grünanregung müssen je nach Halbwertsbreite des Erregerfilters die Sperrfilter OG 590/2 mm oder KG 610/2 mm verwendet werden.

Alle Sperrfilter werden im abbildenden Strahlengang angeordnet. Hierbei ist zu bedenken, daß eine Anordnung im endlichen Strahlengang eines Mikroskops nur eine Kompromißlösung sein kann, weil dort jede Parallelplatte eine Änderung der Tubuslänge bewirkt, die besonders bei schwachen Objektiven zu einem Fehler in der Abstimmung führt. Moderne Mikroskope besitzen einen Filterschieber im Unendlich-Strahlengang eines Zwischentubus. Wer dieses Zubehör nicht besitzt, muß andere Lösungen suchen. Ich habe die Sperrfilter, die meistens einen Durchmesser von 19 mm haben, direkt unter die Augenlinse der orthoskopischen Okulare gekittet, wo sie am wenigsten stören. Man kann sie aber auch mittels einer Steckfassung oberhalb der Augenlinse anbringen oder anstelle von Meßplättchen in die hierfür vorgesehene Fassung von Mikrometerokularen legen. Auch die Feldblende der Okulare von Huygens-Typ und die Fassung der Tubuslinse bieten sich als Sitz des Sperrfilters an.

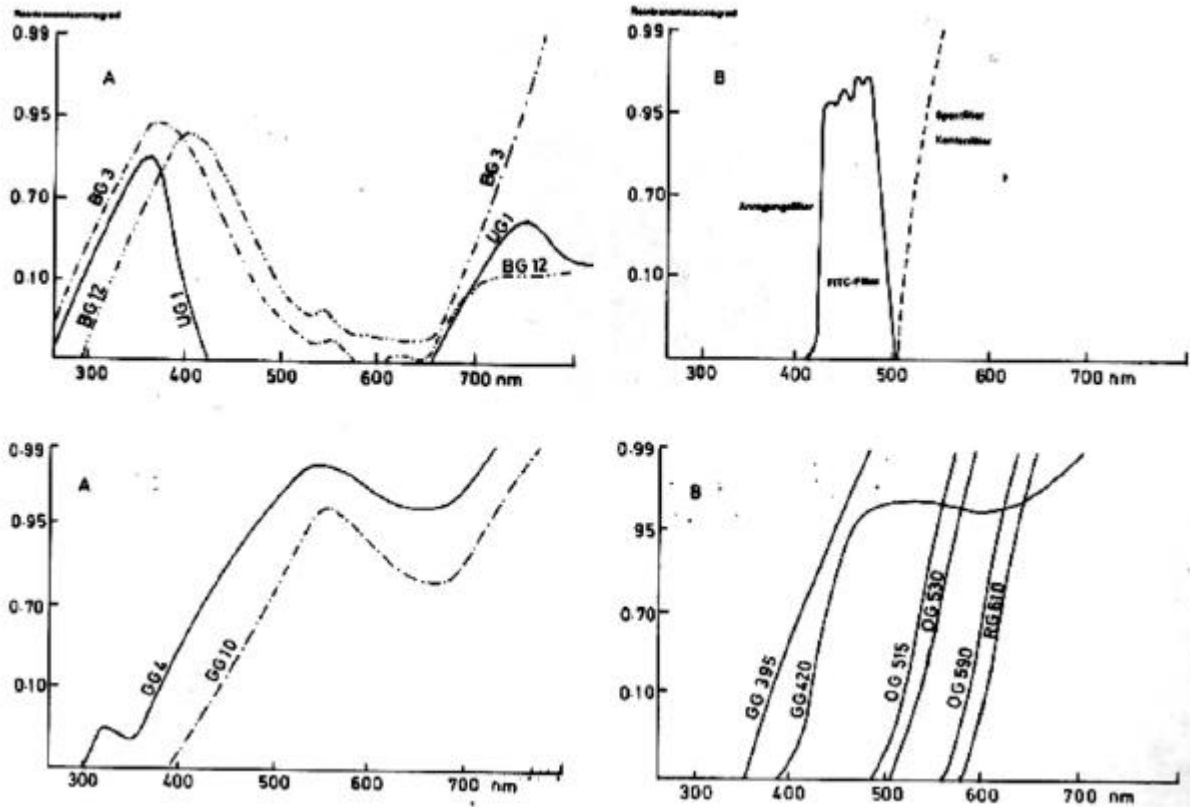


Bild 6 oben: Transmissionskurven wichtiger Erregerfilter.

A: Schwarzglasfilter UG 1 für UV. BG 12 für Blauviolett und BG 3 für Blau. Die hohe Rotdurchlässigkeit von UG 1 und BG 3 muß mit dem Filter BG 38 unterdrückt werden.
 B: FITC-Filter und Sperrfilter OG 38

Bild 6 unten: Transmissionskurven wichtiger Sperrfilter.

A: Fluoreszenzfreie Gelbgrünläser als Sperrfilter für die Erregerfilter UG 1 und UG 5.
 B: Gebräuchliche Langpaßfilter mit steilen Absorptionskanten in Richtung kürzerer Wellenlängen

Problematik in der Fluoreszenzmikroskopie

Zum besseren Verständnis der Problematik in der Fluoreszenzmikroskopie sollen hier einige grundsätzliche Tatsachen behandelt werden. Es gibt fluoreszierende Stoffe, die das erregende Licht fast verlustlos in Fluoreszenzlicht umsetzen können (z.B. Rhodamin in Äthanol, Fluorescein in Wasser). Andere haben nur eine Ausbeute von wenigen Prozent (Erythrosin, Akridinfarbstoffe u.a.). Trotzdem muß in jedem Falle eine starke Lichtquelle verwendet werden, um eine ausreichend kräftige Fluoreszenz zu erzielen. Die fluoreszierenden Objekte sind selbstleuchtend. Sie strahlen das Licht nach allen Seiten ab. Nur ein Teil dieser Strahlung gelangt ins Objektiv. Da nur absorbiertes Licht in Fluoreszenzlicht umgewandelt werden kann, ist die Fluoreszenz um so schwächer, je geringer die Lichtabsorption ist.

Das mikroskopische Präparat hat eine maximale Dicke von 10 μm und eine entsprechend geringe Lichtabsorption. Am Beispiel des Fluorochroms Thioflavin soll diese einmal zahlenmäßig dargestellt werden. Eine Lösung von Thioflavin 1:1000 (0,1 g in 100 ml) hat bei 366 nm und einer Schichtdicke von 10 μm eine Lichtabsorption von $E = 0,054$. Da E (Ex-

tinktion) gleich $I_g (J_0/J)$ ist, wobei J_0 das zu 100% eingestrahlte Erregerlicht und J das die Lösung ungenutzt verlassende Licht ist, ergibt sich für E der Wert $I_g (100/99)$. Es wird also nur 1% , des eingestrahltten Lichtes absorbiert und in Fluoreszenzlicht verwandelt. Wenn das mikroskopische Objekt statt 10 μm nur 1 μm dick ist, was ja meistens der Fall ist, so wird statt 1% nur 0,1% des eingestrahltten Lichtes in Fluoreszenz umgewandelt. Daß diese winzigen Lichtmengen überhaupt noch wahrnehmbar sind, hängt mit der enormen Lichtempfindlichkeit des menschlichen Auges zusammen. Im dunkeladaptierten Zustand vermag es noch 0,0002% der eingestrahltten, in Fluoreszenz umgewandelten Energie wahrzunehmen. In diesem Falle verlassen 99,9998% des Erregerlichtes ungenutzt das Präparat. An dieser Stelle muß noch bedacht werden, daß die Vergrößerung des Bildes Licht kostet. Bei einer 1000-fachen Vergrößerung wird viermal so viel Licht benötigt, wie bei einer 100-fachen.

Diese Ausführungen sollten zeigen, daß die Lichtabsorption der Fluorochrome für das Zustandekommen guter Fluoreszenzbilder von größter Bedeutung ist und daß man unbedingt versuchen muß, den Schwerpunkt des Erregerlichtes in das Maximum ihrer Lichtabsorption zu legen. Gleichzeitig wird verständlich, warum auch brillante Fluoreszenzbilder bei der Mikrofotografie sehr lange Belichtungszeiten trotz Verwendung höchstempfindlicher Filme erfordern.

Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie

Der größte Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie ist die Möglichkeit, lebendes Gewebe und lebende Mikroorganismen zu untersuchen, wobei eine spezifische Fluorochromierung auch chemisch-physikalische und histochemische Fragen beantwortet. Bei Verwendung kleinster Farbstoffkonzentrationen von 1:1 000 000 bis 1:1000 ist die Toxizität vieler Fluorochrome so gering, daß die Objekte in fast unverändertem Zustand über einen großen Zeitraum hinweg beobachtet werden können. Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie ist darin zu sehen, daß man auch bei Verwendung eines einzigen Farbstoffes immer polychrome Bilder erhält. Die zeitaufwendige Vorbereitung der Präparate, zum Beispiel das Fixieren, kann in vielen Fällen eingespart werden.

Bei einer Fluoreszenzanregung mit ultraviolettem Licht würden lebende Objekte bereits nach kurzer Zeit durch die energiereiche Strahlung geschädigt. Diese Gefahr besteht bei der Blauviolett-, Blau- und Grünanregung in viel geringerem Maße. Vitalfluorochromierte Objekte können hier über einen großen Zeitraum hinweg beobachtet werden. Allerdings bewirkt die Anlagerung bestimmter, für die Fluoreszenz verantwortlicher chemischer Gruppen an die Zellinhaltsstoffe eine Sensibilisierung der Objekte gegen das Erregerlicht, was zu ihrer ganz allmählichen Schädigung führt.

Literaturhinweise

[1] GERLACH D.

Fluoreszenzmikroskopie

Teil 1: MIKROKOSMOS 68, 107 - 110, 1979

Teil 2: MIKROKOSMOS 68, 213 - 220, 1979

Teil 3: MIKROKOSMOS 69, 3-9, 1980

[1] GÖKE, G.

Methoden der Fluoreszenzmikroskopie

Teil 1: MIKROKOSMOS 65, 382 - 386, 1976

Teil 2: MIKROKOSMOS 66, 24 - 29, 1977

Teil 3: MIKROKOSMOS 66, 148 - 152, 1977 (Hier weitere Literaturstellen)

[2] KRAFT, W.

Die Fluoreszenzmikroskopie und ihre gerätetechnischen Anforderungen

LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V, Nr. 7, 193 - 206, 1972

[3] KRAFT, W.

Ein neues FITC-Filter für die Routinefluoreszenz

LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V, Nr. 2, 41 - 44, 1970

[4] KRIEG, A.

Eine neue Einrichtung für die Fluoreszenzmikroskopie im durch- und auffallenden Licht
Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie und mikr. Technik 62, 256 - 264, 1955

[5] WALTER, F.

Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin

LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V, Nr. 2, 33-40, 1970.