

Methoden der Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie

Gerhard Göke

2. Praktische Anwendung

Im ersten Teil dieses Beitrages (Juni 84) wurden die apparativen und physikalisch-chemischen Voraussetzungen für das Zustandekommen brillanter Fluoreszenzbilder sowie die Zusammenhänge zwischen Lichtabsorption und Lichtemission von Fluorochromen beschrieben. Die praktische Anwendung der Durchlichtfluoreszenz und die vielfältigen Möglichkeiten der spezifischen Fluorochromierung behandelt Gerhard Göke in diesem zweiten Teil.

Der in der histochemischen Literatur häufig gebrauchte Ausdruck „spezifisch“ oder „selektiv“ kann in der Fluoreszenzmikroskopie nicht in seinem streng chemischen Sinne gebraucht werden. Es ist zwar die Zielsetzung der Fluoreszenzmikroskopie, einen spezifisch fluoreszierenden Farbstoff aufzufinden, der in ebenso spezifischer Weise nur ein genau definiertes Substrat zum Leuchten bringt, doch ist dieses Ziel praktisch in keinem Falle von sekundärer Fluoreszenz erreicht worden.

Die theoretische Deutung eines Färbevorganges ist schwierig. Man muß einerseits die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Fluorochroms, andererseits die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Substrats untersuchen. Dabei sind die Eigenschaften des Substrats am schwierigsten zu überblicken, weil ein Gewebe, speziell eine Zelle, ein sehr komplexes Gebilde ist. Jeder einzelne Bestandteil einer Zelle ist kein einheitliches Substrat, sondern besteht aus einer Vielzahl von Molekülen, die sich in einem dauernden Wechsel und Umbau befinden, den wir als Zellstoffwechsel bezeichnen. Bei fixiertem Material ist ein Stillstand dieser Vorgänge eingetreten. Hier befinden sich die Zellen nicht mehr in ihrem ursprünglichen Zustand. Jede Fixierung, mag sie noch so schonend durchgeführt werden, ist stets eine Denaturierung der lebenden Zelle.

Es würde zu weit führen, alle Anwendungsgebiete der Fluoreszenzmikroskopie im einzelnen zu beschreiben. Die wichtigsten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt worden, ausgenommen die zahlreichen Anwendungsgebiete im anorganischen Bereich. Die Tabelle kann nur einen Überblick über die vielfältigen Möglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie vermitteln und eine Orientierungshilfe bei der Auswahl von Erreger- und Sperrfiltern sein.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die mit einer Reihe von Fluorochromen zu erwartenden Ergebnisse, wobei die Beschreibung der auftretenden Fluoreszenzfarben rein subjektiv ist. Die Farbnuancierung ist von sehr vielen Faktoren abhängig. Auch diese Tabelle kann nur eine Orientierungshilfe bei der Suche nach Fluorochromen mit möglichst vielen, für den Anwendungsfall günstigen Eigenschaften sein.

Vitalfluorochromierung mit Akridinorange

Die Anfärbung der lebenden Zelle ohne tiefgreifende Störung der Lebensfunktionen war seit der Einführung der Vitalfärbetechnik durch PFEIFFER VON WELLHEIM (1886) ein erstrebtes Ziel der biologischen Forschung. Mit Diachromen ist eine Vitalfärbung ohne Schädigung der lebenden Zelle technisch unmöglich, weil Farbstofflösungen in einer Konzentration von 1:100 bis 1:(000 erforderlich sind, deren Toxizität beträchtlich ist. Hingegen werden die Fluorochrome in so extremen Verdünnungen angewendet, daß eine Schädigung

gung der Lebensfunktionen, wenn überhaupt, nur ganz allmählich erfolgt, und auch dann handelt es sich meistens nur um die Folge eines photodynamischen Effektes oder einer Photosensibilisierung. Die Vitalfluorochromierung wurde bereits 1919 von METZNER, später von ELLNER, HIRT, SCHUMACHER, STRUGGER, HÖFLER u.a. an den verschiedensten Objekten durchgeführt. Der Mikroskopiker findet hier ein sehr vielseitiges Arbeitsgebiet, das ihm reichlich Spielraum für eigene Versuche läßt. Bakterien, Hefen, Pilze, Protozoen aller Art, Rotatorien, Würmer und Algen, aber auch frische Pflanzenschnitte, um nur einige Objekte zu nennen, sind für die Vitalfluorochromierung besonders gut geeignet. Die nachfolgend beschriebenen Methoden lassen sich mit einem Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop bei Blauviolettanregung durchführen, aber auch bei Verwendung eines Quecksilber- oder Xenon-Höchstdruckbrenners anstelle der Halogenlampe sollte man das Blauviolett Erregerfilter BG 12/4 mm bzw. das FITC-Filter in Kombination mit den zugehörigen Sperrfiltern benutzen.

Das Akridinorange hat zu den lebenden Eiweißkörpern der Protoplasten eine stark ausgeprägte Affinität. Mit diesem Fluorochrom ist eine sehr rasche und schonende Vitalfärbung aller wichtigen zytologischen Strukturelemente möglich. Lebendes und totes Protoplasma erscheint in verschiedener Fluoreszenzfarbe: Lebende Zellen werden grün, tote kupferrot gefärbt. Akridinorange wurde erstmals von BUKATSCH, HEITINGER und STRUGGER (1940) für die Vitallärbung verwendet. Beispielsweise konnte STRUGGER die Chromosomen in der lebenden Zelle ohne Störungen des Ablaufs der Mitose fluorochromieren und auch einen Protophyten im zytologisch völlig durchgefärbtem Zustand kultivieren. 1944 gelang STRUGGER und ROSENBERGER die vitale Fluorochromierung der Spermatozoen des Ziegenbockes. Die damit durchgeführten künstlichen Besamungsversuche führten zu einem vollen Erfolg.

Das Akridin ist der Grundkörper aller Akridinfarbstoffe, zu denen auch Trypaflavin, Atebrin und Rivanol gehören. Akridinorange ist ein wasserlöslicher, basischer Farbstoff von oranger bis braungelber Eigenfarbe, die aber für seine Verwendung als Diachrom zu schwach ist. Seine Eigenschaften als Fluorochrom sind von der Konzentration und vom pH-Wert der Lösung abhängig. In stark verdünnten Lösungen (1:100 000 bis 1:10 000) fluoresziert es laubgrün. Mit zunehmender Konzentration geht die grüne Fluoreszenzfarbe über Gelbgrün in Gelb über, bis schließlich bei einer Konzentration von 1:500 bis 1:100 über Gelborange ein tiefes Kupferrot erreicht wird. Diese Farbveränderung hat STRUGGER als Konzentrationseffekt bezeichnet. Wenn man rot fluoreszierende Akridinorange-Lösungen verdünnt, so durchlaufen sie unter der Quarzlampe von Kupferrot bis Grün alle Farbnuancen. Der Einfluß des pH-Wertes tritt nicht so deutlich in Erscheinung wie der Konzentrationseffekt. Erst oberhalb von pH 8 wird die Fluoreszenzintensität stärker, während in den für biologische Untersuchungen in Betracht kommenden pH-Bereichen keine Änderung der Fluoreszenz zu beobachten ist. Auch die Lipidlöslichkeit des Farbstoffes ist hier nur gering. Erst im stark alkalischen Bereich ist Akridinorange deutlich lipophil.

Für die Vitalfluorochromierung stellt man sich am besten Lösungen von 1:1000 bis 1:10 000 her, wobei man als Lösungsmittel immer das Medium wählt, in dem sich auch die Untersuchungsobjekte befinden (Leitungswasser, Tümpelwasser, Nährlösung, physiologische Kochsalzlösung usw.). Einem Tropfen einer wäßrigen Suspension von Mikroorganismen setzt man auf dem Objektträger einen Tropfen Akridinorange-Lösung zu. Dabei ist zu beachten, daß unmittelbar nach der Zugabe des Farbstoffes auch das Medium fluoresziert und das mikroskopische Bild überstrahlt. Bereits nach kurzer Zeit haben Mikroorganismen und Detritus den Farbstoffüberschuß absorbiert. Diese Objekte leuchten jetzt farbig auf dunklem Grund. Der Farbstoff wurde überdosiert, wenn die Fluoreszenz des Medi-

ums bestehen bleibt und die mikroskopische Beobachtung hierdurch gestört wird. Nach einigen Versuchen hat man die richtige Farbstoffkonzentration gefunden.

Die Mikroorganismen des Süßwassers sind sehr dankbare Objekte für Versuche mit Fluorochromen. In den lebenden Zellen leuchten die Kerne hellgrün bis gelbgrün. Tote Organismen und organischer Detritus fluoreszieren kupferrot. Bei sehr kräftiger Blauviolett-Anregung zeigen alle chlorophyllhaltigen Objekte eine tiefrote Primärfluoreszenz. Die hier beschriebene Vitalfluorochromierung mit Akridinorange sollte auch einmal mit Akridingelb, Coriphosphin, Euchrysin, Auramin und Rhodamin B durchgeführt werden. Obgleich diese Stoffe teilweise toxischer sind als das bewährte Akridinorange, kann man damit unter den gleichen Bedingungen sehr schöne Fluoreszenzbilder erzielen. Auch Kulturen von Protozoen und Algen sind für solche Untersuchungen geeignet. Man kann diese Organismen im durchfluorochromierten Zustand zur Vermehrung bringen, was besonders gut mit einem zum Blaulicht-Fluoreszenzmikroskop umgebauten Planktonmikroskop zu beobachten ist.

Vitalfluorochromierung von Bakteriensuspensionen

Für sehr viele Bakterienkulturen ist ein von STRUGGER (1949) beschriebenes Schnellverfahren geeignet. Mehrere Objektträger werden mit je einem Tropfen Akridinorange-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung beschickt. Die Farbstoffkonzentration soll 1:5000 bis 1:10000 betragen. Mit einer Platinöse werden unterschiedlich große Mengen Untersuchungsmaterial in den Tropfen verrührt. Nach dem Auflegen von Deckgläsern wird mikroskopiert. Meistens ist ein Präparat dabei, in dem das Bakterienmaterial den Farbstoff völlig absorbiert hat, der Untergrund also vollkommen schwarz ist. Solche Fluoreszenzbilder sind sehr klar. Die Bakterien leuchten in grüner, gelblicher oder gleißend kupferroter Fluoreszenzfarbe. Vorhandene Einschlüsse, Vakuolen oder Sporen sind deutlich differenziert.

Vitalfluorochromierung von Hefezellen und Pilzmycelien

In 1 ml Akridinorange-Lösung 1:10 000 (hergestellt mit abgestandenem, chlorfreiem Leitungswasser) wird eine Öse voll Hefematerial so verteilt, daß eine leichte Trübung zu bemerken ist. Einen Tropfen dieser Suspension überträgt man auf einen Objektträger und legt ein Deckglas auf. Das Zytoplasma der toten Hefezellen fluoresziert kupferrot, das der lebenden Zellen leuchtend grün. Die Feinstruktur der Protoplasten ist sehr gut zu erkennen. Pilzmycelien werden auf dem Objektträger mit einem Tropfen Akridinorange-Lösung 1:50000 verrührt und nach dem Auflegen des Deckglases mikroskopiert. Ergebnis: Sporenmembran kupferrot, Zytoplasma grün, Kerne leuchtend grün, Vakuolen ungefärbt.

Vitalfluorochromierung von Blut

Ein Tropfen Blut wird mit einem gleichgroßen Tropfen Akridinorange-Lösung 1:10 000 (in physiologischer Kochsalzlösung) verrührt und mit einem Deckglas bedeckt. Die roten Blutkörperchen färben sich kaum an. Hingegen leuchten die weißen Blutkörperchen grell grün oder kupferrot. Diese Methode hat eine besondere Bedeutung für den schnellen Nachweis von Blutparasiten, deren Feinbau gut zu erkennen ist. Bei Anwesenheit von Trypanosomen leuchtet deren Zytoplasma schwach grün, die Kerne sind hellgrün und die Volutinkörper kupferrot.

Diese kleine Auswahl von Anwendungsmöglichkeiten der Vitalfluorochromierung soll den Mikroskopiker zu eigenen Versuchen anregen. Die im Literaturverzeichnis aufgeführten Arbeiten können dabei sehr hilfreich sein. Wie eingangs gezeigt wurde, läßt sich die Fluoreszenzmikroskopie vielfältig modifizieren und mit anderen lichtmikroskopischen Verfahren kombinieren. Es gibt heute eine große Palette von Fluorochromen, die allein angewendet bereits polychrome Bilder liefern, miteinander gemischt oder bei gleichzeitiger Verwendung von Diachromen jedoch brillante Mehrfachfärbungen ermöglichen.

Spezielle Methoden der Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie

Es werden einige Methoden beschrieben, die leicht durchführbar sind und in kürzester Zeit brillant fluoreszierende Bilder liefern. Damit sind die Anwendungsmöglichkeiten des Verfahrens jedoch keineswegs erschöpft. Zahllose organische und anorganische Substanzen haben die Eigenschaft, bei Anregung mit energiereichem Licht zu fluoreszieren. Es gibt kaum ein zweites Gebiet der Mikroskopie, das ein so großes Experimentierfeld bietet, wie die Fluoreszenzmikroskopie.

Die meisten Fluorochrome werden in wässrigen, stark verdünnten Lösungen angewendet. Man wiegt eine entsprechende Menge des Farbstoffes ab und löst sie unter wiederholtem Schütteln in 100 ml bzw. 1 Liter destilliertem Wasser restlos auf. Zur Konservierung kann man einige Tropfen verflüssigtes Phenol (Karbolsäure) zusetzen. Wenn die Fluorochrome bei einem bestimmten pH-Wert verwendet werden sollen oder für die Vitalfluorochromierung bestimmt sind, entfällt dieser Zusatz. Einige Fluorochrome müssen in Alkohol (Äthanol) gelöst werden. 0.1 g Farbstoff in 100 ml Lösungsmittel entspricht einer Konzentration von 1:1000, in einem Liter von 1:10 000. Pflanzenextrakte, zum Beispiel Chelidonium-Extrakt, werden unverdünnt als Fluorochrome verwendet.

Bei einigen Fluorochromierungen müssen bestimmte pH-Werte eingehalten werden, die man mit geeigneten Pufferlösungen einstellt. Gebräuchlich sind zwei Methoden, von denen die zuerst beschriebene in den meisten Fällen ausreicht. Erforderlich sind nur zwei Stammlösungen:

Stammlösung 1

9,078 g Kaliuindihydrogenphosphat KH_2P_0 und
8,404 g Oxalsäure

werden in 1 Liter dest. Wasser gelöst.

Stammlösung 2

25,480 g Borax (Dinatriumtetraborat $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)
werden in 1 Liter dest. Wasser gelöst.

Beide Lösungen sind unbegrenzt haltbar. Vor Gebrauch der erforderlichen Pufferlösung werden sie miteinander gemischt:

pH-Wert	ml Stamml. 1	ml Stamml. 2
4,0	57,8	42,2
5,0	51,8	48,2
6,0	46,6	53,4
7,0	41,2	58,8
8,0	32,2	67,8
9,0	24,6	75,4

Ein größerer pH-Bereich wird mit der zweiten Methode abgedeckt. Allerdings sind hierfür vier Stammlösungen erforderlich:

Stammlösung 1

n/10 Salzsäure

Stammlösung 2

9,025g Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 , in 1 Liter dest. Wasser

Stammlösung 3

23,89 g Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 in 1 Liter dest. Wasser

Stammlösung 4

25,35 g Trikaliumphosphat K_3PO_4 in 1 Liter dest. Wasser

Gut verschlossen sind diese Lösungen praktisch unbegrenzt haltbar. Kurz vor Gebrauch werden sie miteinander gemischt:

pH-Wert	ml 1	ml 2	ml 3	ml 4
2,09	95	5	-	-
3,51	5	95	-	-
4,84	-	100	-	-
5,81	-	90	10	-
6,36	-	80	20	-
7,11	-	40	60	-
7,63	-	60	-	40
8,22	-	55	-	45
10,15	-	50	-	50
11,14	-	40	-	60

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ist unfixiertes oder kurz fixiertes Material am besten geeignet, weil nach langer Fixierung Änderungen der Primär- und Sekundärfluoreszenz auftreten. Alle quecksilber-, eisen- und jodhaltigen Fixierungsmittel sind unbrauchbar. Formaldehydlösung (10 ml 35%-iges Formol +90 ml Wasser) oder gasförmiges, aus Paraformaldehydtabletten hergestelltes Formaldehyd und Carnoysches Gemisch (60 ml Äthanol +30 ml Chloroform + 10 ml Eisessig) sind geeignete Fixierungsmittel.

Als Einschlußmittel sind je nach Art des Materials und der Färbung folgende Medien verwendbar: Fluoreszenzfreies Paraffinöl, Glycerin, Wasser, Entellan, Plexigum und UV-Inert (Serva, Heidelberg). Die drei zuletzt aufgeführten Mittel sind in Toluol gelöste Kunstharze, bei deren Verwendung das einzuschließende Objekt vorher in der steigenden Alkoholreihe entwässert werden muß, bevor es über Xylol oder Toluol in das Einschlußmittel gebracht wird. Da manche Fluorochrome alkohollöslich sind, muß diese Entwässerung rasch erfolgen.

Bei Blauviolett- und Blauanregung können auch halbweiße Objektträger verwendet werden. Bei UV-Anregung sind hingegen unbedingt reinweiße, fluoreszenzfreie Objektträger erforderlich. Fluorochromiert wird auf dem Objektträger. Der Überschuss des zuletzt verwendeten Waschwassers wird mit Filtrierpapier abgesaugt. Mit Hilfe eines Tropfröhrchens bringt man die Fluorochromlösung auf den Schnitt oder den Ausstrich und läßt sie der Vorschrift entsprechend lange einwirken. Danach wird sie mit Filtrierpapier abgesaugt und durch die Waschflüssigkeit ersetzt, die solange erneuert und wieder abgesaugt wird, bis das Filtrierpapier vollkommen farblos bleibt. Danach kann man das Präparat in Glycerin einschließen, an der Luft trocknen lassen und mit Paraffinöl abdecken oder über die steigende Alkoholreihe und Xylol in einem der genannten Kunstharze einbetten.

Primärfluoreszenz von Vogelfedern

Die roten und gelben Federn der Papageien, Tukane, Prachtfinken, Webervögel und vieler anderer Arten zeigen bei Blauviolett- und Blauanregung eine prächtige Primärfluoreszenz. Von einer Deckfeder schneidet man das dicke Ende des Kiels ab, legt sie kurze Zeit in Xylol oder Toluol und überträgt sie tropfnaß in UV-Inert. Nach dem Auflegen des Deckglases muß je nach der Dicke des verbliebenen Kiels noch UV-Inert nachgefüllt werden.

Primärfluoreszenz von Insektenschuppen

An den pigmentgefärbten rötlichen und gelblichen Flügelschuppen von Schmetterlingen, besonders von den prächtig gefärbten Exoten, aber auch von vielen anderen Insekten, ist bei UV-, Blauviolett- und Blauanregung eine schöne Primärfluoreszenz zu beobachten. Die Schuppen werden auf dem Objektträger mit UV-Inert verrührt und mit einem Deckglas abgedeckt.

Primärfluoreszenz von Pflanzenteilen

Ungefärbte Schnitte von Hölzern zeigen oft eine kräftige Primärfluoreszenz. Aber auch in vielen Stengelquerschnitten sind bei UV-, Blauviolett- und Blauanregung Fluoreszenzen zu beobachten. Ein gutes Beispiel ist das Holz der Berberitze. Die Schnitte können mit UV-Inert zu Dauerpräparaten verarbeitet werden.

Zellkerne und Protoplasma in Pflanzenschnitten

Methode 1 nach HAITINGER

4 Minuten fluorchromieren in einer Mischung von 75 ml wäßriger Coriphosphin-0-Lösung 1:10 000 und 25 ml einer wäßrigen Fuchsin-Lösung 1:10 000.

Farbstoffüberschuß mit Wasser auswaschen.

Einschluß in Glycerin.

Ergebnis: Zellkerne gelbgrün bis gelb, Protoplasma rot, Kernkörperchen orange, Karyotin gelbgrün, Chromosomen gelbgrün.

Methode 2 nach HAITINGER

10 Minuten fluorchromieren in wäßriger Lösung von Akridinorange 1:5000.

Farbstoffüberschuß mit destilliertem Wasser auswaschen.

In Wasser oder Glycerin einschließen.

Ergebnis: Zellkerne grün, Protoplasma rot.

Zellkerne in menschlichem oder tierischem Gewebe nach HAITINGER

Mehrere Fluorochrome sind geeignet.

3 Minuten fluorchromieren in wäßriger Lösung von Akridinorange NO, Coriphosphin 0, Phosphin 3R oder Euchrysin 2GNX 1:10 000.

Farbstoffüberschuß mit Wasser auswaschen.

10 Minuten nachbadern in 4%igem Formol.

Lufttrocknen oder in der Alkoholreihe rasch entwässern und in Xylol bringen.

In Paraffinöl oder UV-Inert einschließen.

Ergebnis: Zellkerne leuchtend gelb.

Fett in menschlichem oder tierischem Gewebe nach HAITINGER

Mehrere lipophile Fluorochrome in wässriger Lösung sind geeignet:

<u>Fluorochrom</u>	<u>Konz.</u>	<u>Einwirkung</u>	<u>Fluoreszenz</u>
Chelidonium-extrakt	unverdünnt	3 Min.	türkisblau
Chlorophyll-extrakt	unverdünnt	3 Min.	feuerrot
Coriphosphin 0	1: 1000	1 Min.	gelbgrün
Neutrulrot B	1: 2000	2 Min.	goldgelb
Rhosphin 3R	1:10000	2 Min.	grün
Primulin 0	1:10000	10 Min.	grün
Thioflavin S	1:10000	10 Min.	dunkelblau

Farbstoffüberschuß auswaschen.

In Glycerin einbetten.

Fluorochromierung von Schleim und Mastzellen nach HAITINGER

Mehrere Fluorochrome in wäßriger Lösung sind geeignet.

5 Minuten fluorochromieren in Akridinorange NO, Brillantphosphin G, Euchrysin 2GNX, Aurophosphin G oder Coriphosphin O 1:20 000. Alle Lösungen auf pH 3 gepuffert.

5 Minuten in destilliertem Wasser, gepuffert auf pH 3, auswaschen.

5 Minuten in 4%-igem Formol, gepuffert auf pH 3, nachbadern.

In steigender Alkoholreihe rasch entwässern und über Xylol in UV-Inert einschließen.

Ergebnis: Schleim gelbgrün bis kupferrot. Mastzellen kupferrot.

Zellwände in Pflanzenschnitten

1 Minute fluorochromieren in wäßriger Lösung von Coriphosphin O 1:1000.

Farbstoffüberschuß mit Wasser auswaschen.

Nachbadern in 4%-igem Formol

An der Luft trocknen lassen oder durch die steigende Alkoholreihe in Xylol übertragen.

Einschließen in Paraffinöl oder UV-Inert.

Ergebnis: Zellwände orange.

Vitalfärbung von Vakuolen (Zellsäfte)

Methode 1

5 bis 10 Minuten fluorochromieren in alkalischer Lösung (pH 8 bis 10) von Akridinorange NO 1:5000.

Waschen mit alkalischer Pufferlösung (pH 8 bis 10)

In der Pufferlösung einschließen und sofort mikroskopieren.

Ergebnis: Speichernde Zellsäfte grün bis gelbgrün, nicht speichernde Zellsäfte ziegelrot.

Methode 2

5 bis 10 Minuten fluorochromieren in wäßriger Lösung von Rhodamin B 1:1000.

Farbstoff mit destilliertem Wasser auswaschen.

In Wasser oder Glycerin einschließen.

Ergebnis: Speichernde Zellsäfte goldbraun, nicht speichernde Zellsäfte fluoreszieren nicht.

Fluorochromierung von Holzchnitten und Stengelquerschnitten

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von verholzten und unverholzten Zellwänden ist mit einer ganzen Reihe von Fluorochromen möglich, die in wäßriger Lösung angewendet werden:

Fluorochrom	Konz.	Einwirkung	verholzt	unverholzt
Coriphosphin 0	1:1000	1 Min.	grüngelb	orange
Euchrysin 2GNX	1:1000	15 Sek.	hellgrün	orangerot
Primulin 0	1: 500	1 Min.	gelb	hellgrün
Rhodamin 6G	1:1000	1 Min.	orange gelb	gelblich
Akridinorange	1:1000	1 Min.	grün	

10 Minuten in 4%-igem Formol nachbaden.

Lufttrocknen oder schnell entwässern (Alkoholreihe-Xylol)

Einschluß in Glycerin, Paraffinöl oder UVInert (Dauerpräparat).

Leukozyten und Lymphozyten

Dünnen Blutaussstrich auf gut gereinigtem Objektträger herstellen.

10 Minuten in Methylalkohol fixieren.

4 Minuten fluorochromieren in einer wäßrigen Lösung von Coriphosphin 0 oder Euchrysin 2GNX 1:1000.

Farbstoffüberschuß mit dest. Wasser auswaschen. Sofort mikroskopieren.

Ergebnis: Lymphozyten und Leukozyten orange bis gelborange.

Nachweis von Bakterien-Sporen nach STRUGGER

Material auf sorgfältig gereinigtem Objektträger ausstreichen und an der Luft trocknen.

In der Flamme fixieren.

Tropfen einer Mischung von 100 ml Brillantsulfoflavin 1:400 und 0,5 ml verflüssigten Phenols (90-prozentig) aufbringen. Objektträger sofort bis zur Dampfbildung in der Flamme erhitzen, dann 2 Minuten einwirken lassen.

Mit destilliertem Wasser auswaschen.

40 Sekunden fluorochromieren mit Coriphosphin 1:1000 in destilliertem Wasser.

Farbstoffüberschuß mit destilliertem Wasser auswaschen.

An der Luft trocknen lassen. Einen Tropfen Paraffinöl aufbringen und mit einem Deckglas bedecken.

Ergebnis: Bakterien kupferrot, Sporen grüngelb.

In diesem Beitrag konnten nur wenige, leicht durchführbare Methoden beschrieben werden, die eindrucksvolle Ergebnisse liefern. Sie sind als Anregung für eigene Versuche gedacht. Die im nachfolgenden Literaturverzeichnis aufgeführten Arbeiten, besonders die der älteren Autoren, enthalten eine Vielzahl von Rezepten, Tabellen und Hinweisen auf Fluorochromierungen, deren Auswertung auch mit blauvioletttem und blauem Durchlicht möglich ist.

Literatur

HAITINGER, M.
Fluoreszenzmikroskopie
Leipzig 1938

HAITINGER, M.
Fluoreszenzmikroskopie
2. erweiterte Auflage
Neu bearbeitet unter besonderer Berücksichtigung der Anwendung in der Medizin und Biologie von J.EISENBRAND und G.WERTH, Leipzig 1959.
(Das Literaturverzeichnis dieses Werkes enthält 413 Literaturstellen)

HASELMANN, H. und D.WITTEKIND
Phasenkontrast-Fluoreszenz-Mikroskopie
Z. Wiss. Mikroskopie 63, 147-151 (1957)

HOLZ, H. M.
Was man von der Fluoreszenzmikroskope wissen sollte
2. Auflage
Carl Zeiss, D-7082 Oberkochen

KUNZ, CH., F.GABLER und F.HERZOG
Kontrastfluoreszenz, eine neue Methode der Fluoreszenzmikroskopie
Mikroskopie 16, 1-7(1961)

STRUGGER, S.
Die Untersuchung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Akridinorangefärbung
MIKROKOSMOS 36, 21-23 (1942/43)

STRUGGER, S.
Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie
Hannover 1949

Farb- und Filterglas für Wissenschaft und Technik
Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Mainz

Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen
Rezepte und Tabellen.
Optische Werke C. Reichert, Wien 1963
(Als Ergänzung zu M. HAITINGERS „Fluoreszenzmikroskopie“).