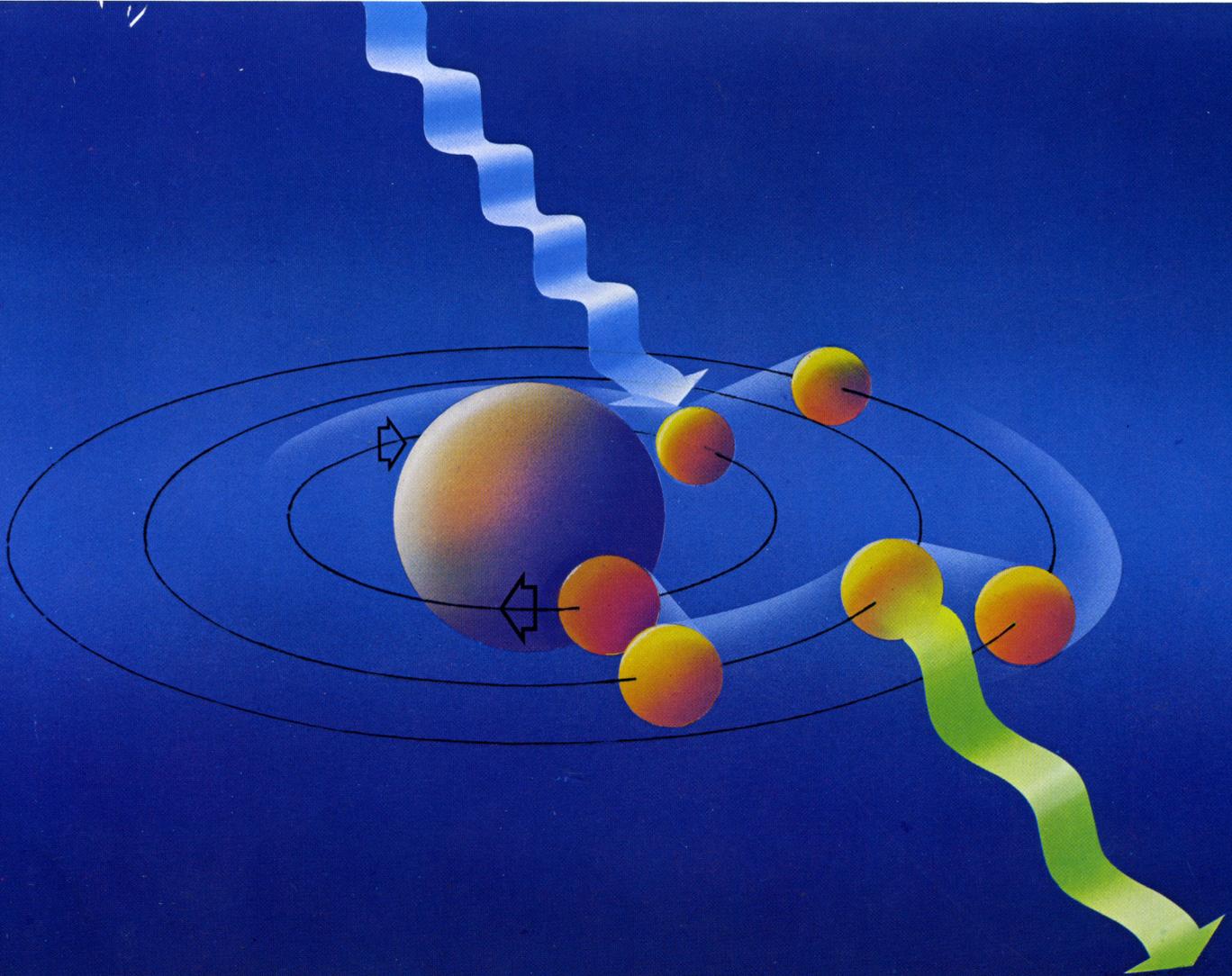


# Fluoreszenzmikroskopie



E. Becker



# Vorwort

Nachdem zum Anfang dieses Jahrhunderts die ersten Instrumente zur Beobachtung von Fluoreszenz-Erscheinungen in mikroskopischen Präparaten zur Verfügung standen, konnte sich die Anwendung fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungstechniken entwickeln. Dies vollzog sich verständlicherweise zunächst nur sehr langsam. Die Arbeiten von HALTINGER, HAGEMANN und STRUGGER Ende der 30er und Anfang der 40er Jahre erbrachten eine gewisse Belebung dieser bis dahin häufig stagnierenden Entwicklung. Der Impuls für einen entscheidenden Durchbruch, für eine breitere Anwendungsmöglichkeit dieses Verfahrens erfolgte erst in den 50er Jahren durch die Arbeiten von COONS und KAPLAN, die unter dem Begriff Immunfluoreszenz bekannt wurden.

Methodisch und instrumentell vollzog sich in den folgenden Jahren eine Entwicklung, die aus der Sicht lichtmikroskopischer Verfahren fast ohne Beispiel ist. Die von LEITZ in Zusammenarbeit mit PLOEM entwickelten Auflicht-Illuminatoren setzten Anfang der 70er Jahre neue Maßstäbe in der Fluoreszenzmikroskopie. Neben vielen anderen Vorteilen ist es vor allem dem hohen Bedienungskomfort dieses mikroskopischen Verfahrens zu danken, daß die Fluoreszenzmikroskopie seit dieser Zeit so schnell und umfassend Eingang in die medizinische Diagnostik gefunden hat. Die außerordentliche Bedeutung der Fluoreszenzmikroskopie für Forschung und Routine auf den verschiedenen Anwendungsgebieten, insbesondere denen der Medizin und Biologie, ist unbestritten. Die Zahl derer, die dieses moderne mikroskopische Verfahren anwenden, wird immer größer.

Die vorliegende Broschüre soll und kann weder die Bedienungsanleitungen zu den verschiedenen Fluoreszenzmikroskopen und ihrem spezifischen Zubehör, noch die von den Chemikalienherstellern und anderen Autoren gegebenen Verfahrensvorschriften ersetzen. Sie soll in erster Linie die theoretischen, instrumentellen und anwendungstechnischen Grundlagen vermitteln, die zum Verstehen und Beherrschen dieses modernen mikroskopischen Verfahrens und seiner Möglichkeiten erforderlich sind. Literaturhinweise ergänzen die technischen Darstellungen.

Allen, die mir bei meiner Arbeit geholfen und mich beraten haben, danke ich sehr. Mein Dank gilt insbesondere den Herren Dr. H. Ahrberg, Dr. H. Determann, Dipl. Phys. R. Mayer, Dipl. Phys. K.-H. Schade, H.-W. Stankewitz und H. Stützer.

Eberhard Becker

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Grundlagen</b>	
Lumineszenz _____	5
Phosphoreszenz _____	5
Fluoreszenz _____	5
Primär-Fluoreszenz _____	6
Sekundär-Fluoreszenz _____	6
Immunfluoreszenz, direkter und indirekter Immunfluoreszenztest _____	6
<b>II. Instrumente</b>	
Fluoreszenzmikroskopie _____	9
Fluoreszenzmikroskope für Durchlichtanregung _____	9
Fluoreszenzmikroskope für Auflichtanregung _____	12
<b>III. Mikroskop-Optik</b>	
Objektive _____	15
Okulare _____	18
<b>IV. Lichtquellen</b>	
Generelle Hinweise _____	19
Technische Daten _____	20
Anwendung der Lichtquellen _____	21
Lampeneinbau und Lampenwechsel _____	22
Zündung, Stromversorgungsgeräte, Einbrennvorgang _____	22
Lebensdauer der Lampen _____	22
<b>V. Filter</b>	
Filterwirkung _____	23
Glasfilter _____	23
Interferenzfilter _____	24
Folienfilter _____	24
Bandpaßfilter _____	24
Kurzpaßfilter _____	26
Langpaßfilter _____	26
Reflexions-Kurzpaßfilter _____	27
Rotdämpfungsfilter _____	27
Wärmeschutzfilter _____	28
Richtige Filterung am Beispiel des FITC _____	28
Filterblocks zu den Fluoreszenz-Auflichtilluminatoren LEITZ PLOEMOPAK _____	32
Filterblocks und Sperrfilter für die Fluoreszenz-Durchlichtmikroskopie _____	38
Spektrale Werte einiger Fluorochrome _____	40
Zuordnung von Fluorochromen und Filterblocks _____	41
Fluoreszenztechnische Verfahren in Medizin und Biologie _____	42
<b>VI. Präparation und Mikroskopie</b>	
Generelle Hinweise _____	43
Herstellung der Präparate _____	43
Herstellung der Fluorochromlösungen _____	43
Fluorochromieren _____	43
Fluorochrome und ihre Verwendung _____	44
Standardisierte Immunfluoreszenztests _____	46
Fluorochrome zur Markierung von Antikörpern _____	48
Gegenfärbungen _____	48
Mehrwellenlängen-Fluoreszenz _____	48
Membranimmunfluoreszenz _____	48
Histochemische und cytochemische Fluoreszenzfärbungen _____	48
Anwendungsgebiete der Immunfluoreszenz _____	49
Simultan- und Alternativverfahren _____	49
<b>VII. Fluoreszenz-Mikrophotographie</b>	
Generelle Hinweise _____	54
Das Präparat _____	54
Das Mikroskop _____	55
Die Kamera _____	55
Das photographische Aufnahmematerial _____	55
Spezielle Aufnahmehinweise _____	56
<b>VIII. Abbildungsmängel, wie man sie erkennt und Hinweise zu ihrer Behebung</b>	
Fehler, Fehlerquellen, Abhilfe, Zusätzliche Erläuterungen _____	58
<b>IX. Literatur</b> _____	65
<b>X. Stichwortverzeichnis</b> _____	71

# I. Grundlagen

## Lumineszenz

Unter dem Begriff Lumineszenz sind alle Leuchterscheinungen zu verstehen, bei denen die Lichtemission nicht auf hoher Temperatur der leuchtenden Substanzen beruht, sondern durch eine vorausgegangene Bestrahlung mit Licht verursacht wird.

Aber auch durch chemische Vorgänge, durch Einwirkung elektrischer Felder oder durch elektrische Entladungsvorgänge können Lumineszenzerscheinungen ausgelöst werden. Alle diese Einwirkungen führen zu einer direkten Anregung der Atome oder Moleküle des die Lumineszenz zeigenden Stoffes, des Luminophors.

Gemäß dem Gesetz von der Erhaltung der Energie ist nach der Stokeschen-Regel die Frequenz des bei der Lumineszenz emittierten Lichtes kleiner oder gleich der Frequenz des zuvor absorbierten Lichtes. Das emittierte Licht ist also langwelliger als das absorbierte.

## Phosphoreszenz

Den Anteil der Lumineszenz, der nicht sofort, sondern erst eine gewisse Zeit nach der Anregung ausgesandt wird, nennt man Phosphoreszenz. Das für die Phosphoreszenz charakteristische Nachleuchten kann von Bruchteilen einer Sekunde bis zu mehreren Monaten dauern.

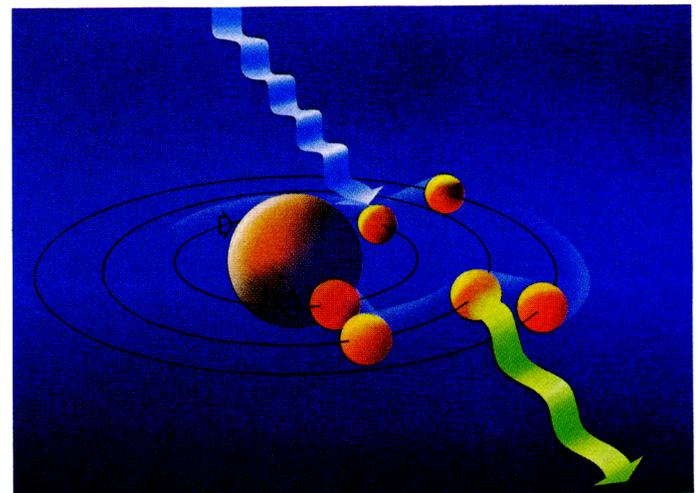
Auf der Phosphoreszenz beruht z. B. die Wirkungsweise von Leuchtschirmen, bei denen zur Darstellung eines zusammenhängenden Bildes durch den abtastenden Elektronenstrahl ein gewisses Nachleuchten erforderlich ist.

Abb. links:  
Aujeszky-Virus  
Objektiv NPL FLUOTAR 40/1.30, FITC, Filter I2/3

## Fluoreszenz

Den Anteil der Lumineszenz, der im Gegensatz zur Phosphoreszenz kein Nachleuchten zeigt, nennt man Fluoreszenz. Das Fluoreszenzlicht erlischt gleichzeitig oder ganz kurze Zeit nach der Bestrahlung. Die Elektronen der angeregten Atome oder Moleküle des Fluoreszenzstoffes springen spontan unter Emission des charakteristischen Fluoreszenzlichtes wieder in ihren Grundzustand zurück. Je größer der Sprung ist, desto größer wird die Energiedifferenz.

Abb. 1:  
Entstehung der Fluoreszenz aus Elektronensprüngen



## Primär-Fluoreszenz

Eine Reihe von Substanzen, z.B. Chlorophyll, Öle, optische Aufheller, aber auch manche Nativ-Präparate haben von sich aus die Eigenschaft, bei Anregung mit kurzwelliger Strahlung Fluoreszenzlicht zu emittieren. Diese Art der Fluoreszenz bezeichnet man als Eigen-, Auto- oder Primär-Fluoreszenz.

## Sekundär-Fluoreszenz

Die Mehrzahl aller mikroskopisch zu untersuchenden Objekte, wie Zellen, Gewebe, Bakterien usw., verfügen nicht von sich aus über die Eigenschaft zu fluoreszieren. Da es in der Fluoreszenzmikroskopie darauf ankommt, ganz bestimmte Objektstrukturen sichtbar zu machen, d.h. nur die Objektdetails herauszuheben, die mit den jeweiligen Verfah-

ren spezifisch analysiert werden sollen, müssen diese Präparate mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt werden. Diese durch Fluorochrome bewirkte Lichtemission bezeichnet man als Sekundär-Fluoreszenz.

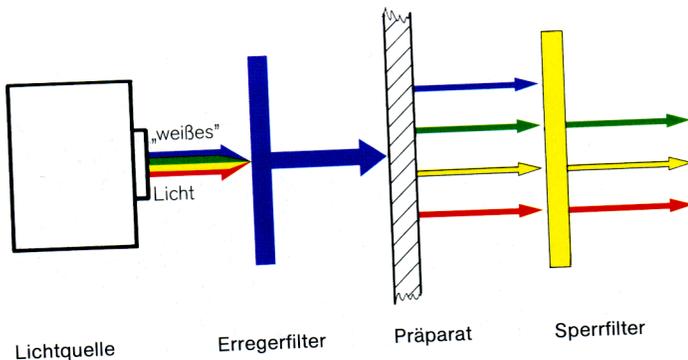
## Fluorochrome (Fluorophore)

Fluorochrome sind Farbstoffe, die ein nicht fluoreszierendes Objekt fluoreszieren lassen. Fluorophore sind die Träger der Fluoreszenz organischer Verbindungen.

Bei organischen Farbstoffen ist das Fluoreszenzvermögen, das Verhältnis von emittierter zu absorbiertem Lichtmenge, von der Konzentration der dafür verantwortlichen Atome oder Moleküle bzw. auch von dem Vorhandensein etwaiger Fremd- atome oder Verunreinigen stark abhängig. Eine Zugabe von Fremdstoffen kann sogar zum völligen Verschwinden der Fluoreszenz führen.

Fluorochrome sind z.B. Acridinorange, Acriflavin, Auramin, Berberinsulfate, Calcein, Phosphin, usw. Auch Verbindungen, wie das Antibiotikum Tetracyclin, welches von bestimmten Geweben des Organismus (Knochen, Zähne) gespeichert wird und die Eigenschaft besitzt zu fluoreszieren, zählen im weiteren Sinne zu den Fluorochromen.

Abb. 2:  
Abhängigkeit der Farbe des Fluoreszenzlichtes von der des Erregerlichtes:  
das Fluoreszenzlicht ist langwelliger oder gleich dem des Erregerlichtes.



## Immunfluoreszenz, direkter und indirekter Immunfluoreszenztest

Immunfluoreszenz ist eine hochempfindliche Methode zum topographischen Nachweis von Antigenen in Zellen und Geweben, sowie zum Nachweis und zur Differenzierung von Viren, Bakterien und Pilzen mittels Antikörpern, die durch Fluorochrome markiert sind.

Über eine feste chemische Bindung werden Antikörper (Abwehrstoffe gegen artfremde Eiweiße) mit fluoreszierenden Farbstoffen verbunden. Ein so markiertes Antikörper-Präparat ist ein Konjugat. Wird z.B. ein Bakterien- oder Schnittpräparat, das ein spezifisches Antigen (artfremder Eiweißstoff)

enthält, mit dem Konjugat in Verbindung gebracht, kommt es zur Bindung der fluoreszierenden Antikörpermoleküle an das Antigen. Diese Bindung ist so fest, daß anschließende Waschvorgänge zwar andere markierte Proteine, z. B. Antikörper anderer Spezifität, aus dem Präparat entfernen, die Bindung markierter Antikörper an das homologe Antigen aber nicht zu lösen vermögen.

Die Stellen des Präparates, an die Antikörpermoleküle gebunden werden, leuchten bei Bestrahlung mit einem geeigneten Erregerlicht auf, während der nicht fluoreszierende Hintergrund dunkel bleibt.

In der Immunfluoreszenz-Technik sind die beiden folgenden Modifikationen gebräuchlich:

#### Direkter Immunfluoreszenztest

Das gesuchte Antigen wird durch Bindung des spezifischen markierten Antikörpers direkt nachgewiesen (Abb. 3). Dabei kann es sich um Antigene von Bakterien, Viren usw. handeln.

#### Indirekter Immunfluoreszenztest

In der 1. Phase (Abb. 4 a) wird das Antigen mit dem zu untersuchenden Patientenserum inkubiert. An den so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex wird in der 2. Phase (Abb. 4 b) ein markiertes Anti-Human-Globulin angelagert. Der indirekte Test ermöglicht den Nachweis von Antikörpern, die gegen Zellen, subzelluläre Bestandteile und Gewebe gerichtet sind.

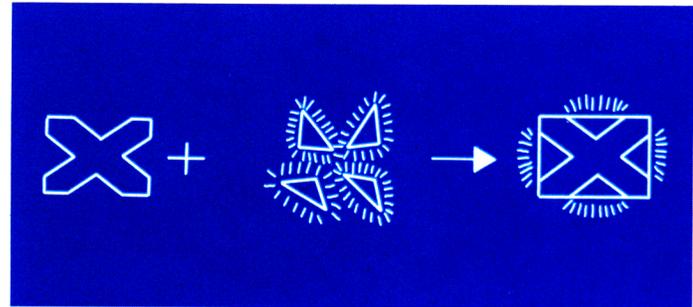


Abb. 3

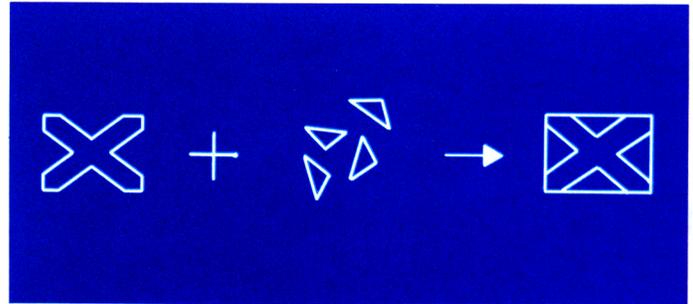


Abb. 4a

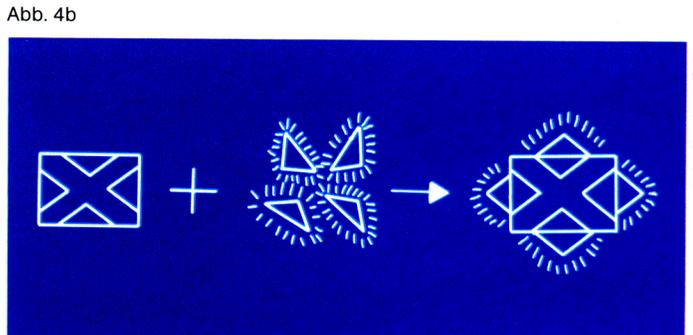


Abb. 4b

Abb. 3:  
Schematische Darstellung des Reaktionsablaufes bei Durchführung der Fluoreszenz-Antikörper-Technik: Direkter Immunfluoreszenztest

Abb. 4:  
Schematische Darstellung des Reaktionsablaufes bei Durchführung der Fluoreszenz-Antikörper-Technik: Indirekter Immunfluoreszenztest

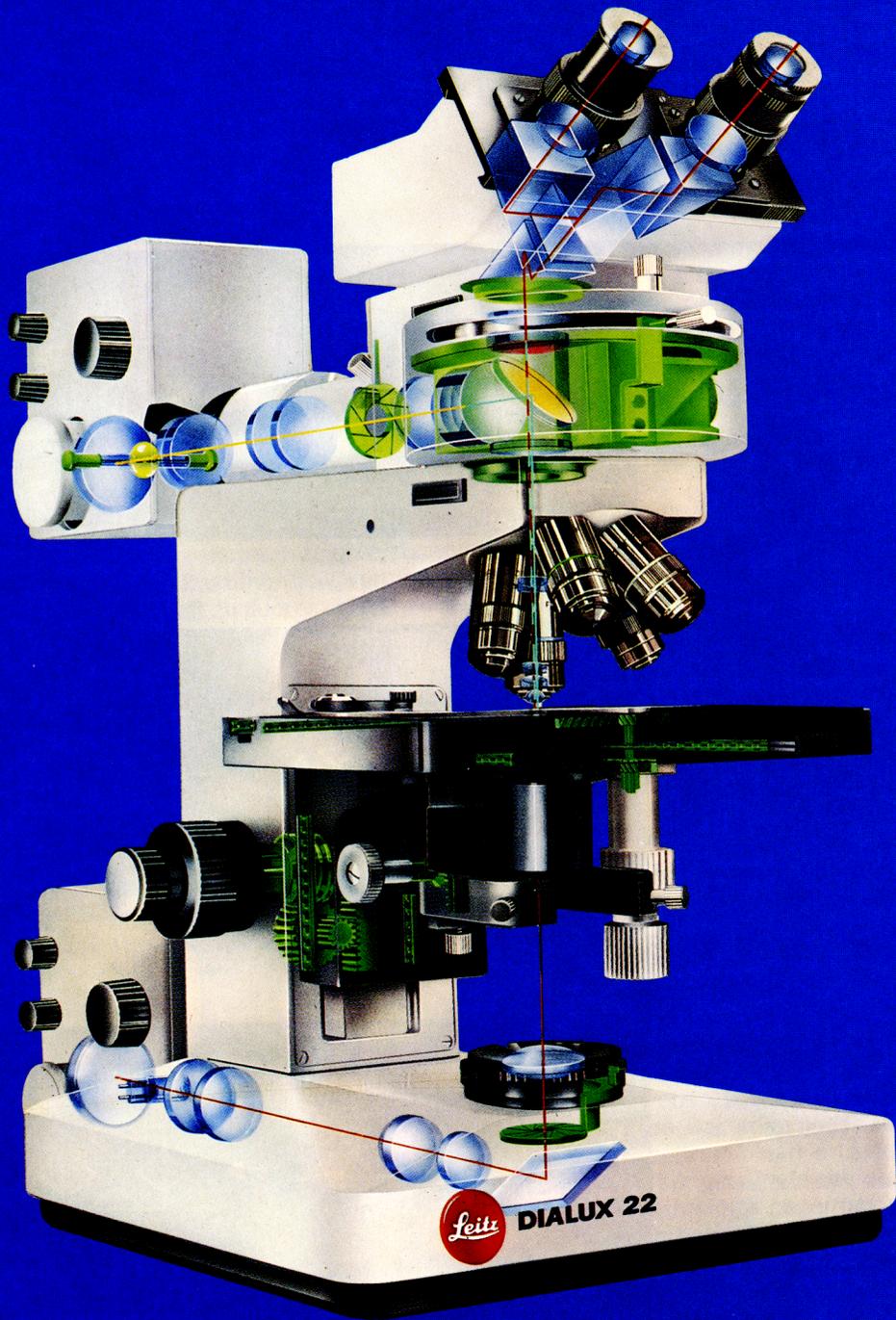


Abb. 5: Schematisierte Strahlengänge bei Durchlicht- und Auflichtbeleuchtung am Beispiel des Labor- und Forschungsmikroskops LEITZ DIALUX 22

## II. Instrumente

### Fluoreszenzmikroskopie

Während die normale Hellfeld-Mikroskopie durch Lichtabsorption und Lichtbeugung die Strukturen von Zellen und Geweben für das Auge sichtbar macht, arbeitet das Fluoreszenzmikroskop nach einem grundsätzlich anderen Prinzip. Wird im Fluoreszenzmikroskop ein nicht fluoreszierendes Präparat beobachtet, erscheint das Gesichtsfeld mehr oder weniger dunkel. Befinden sich im Gesichtsfeld aber fluoreszierende Substanzen, so werden durch Bestrahlung mit ultravioletter, violetter, blauem oder grünem Erregerlicht die fluoreszenzfähigen Stellen des Präparates zu selbstständigen Leuchtern, während die nicht fluoreszierende Umgebung dunkel bleibt. Die Konstruktion eines Fluoreszenzmikroskopes ist also in erster Linie dahin orientiert, unter Verwendung eines physikalisch zweckmäßigen Erregerlichtes, das man durch geeignete Lichtquellen und Erregerfilter erhält, eine möglichst starke Fluoreszenzstrahlung im mikroskopischen Bild zu erzeugen. Zur Beobachtung der vom Präparat emittierten Fluoreszenzstrahlung muß ein auf die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes abgestimmtes Sperrfilter in den Strahlengang gebracht werden. Es absorbiert oder reflektiert die für das Auge schädliche Anregungsstrahlung und erzeugt einen dunklen Bilduntergrund. Für eine optimale Fluoreszenzausbeute ist die auf das Präparat abgestimmte Kombination von Erreger- und Sperrfiltern wesentlich.

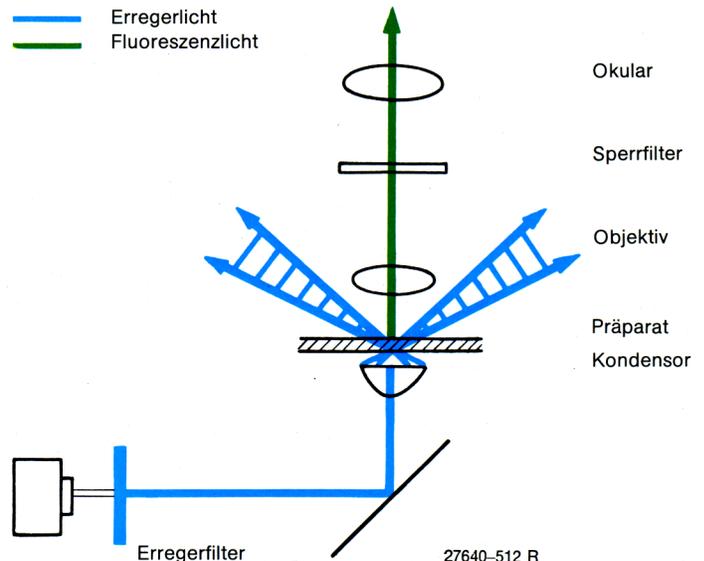
### Fluoreszenzmikroskope für Durchlichtanregung

Bei der Anschaffung eines Fluoreszenzmikroskopes stellt sich zunächst die prinzipielle Frage, ob der Durchlicht- oder der Aufsicht-Anregung der Vorzug zu geben ist. Noch vor wenigen Jahren gab es eine solche Alternative nicht: Fluoreszenzmikroskopie wurde ausschließlich im Durchlicht betrieben. Die zunächst praktizierte Hellfeld-Durchlichtanregung wurde schon sehr bald von der Dunkelfeld-Durchlichtanregung ver-

drängt, weil bei Verwendung eines Hellfeld-Kondensors Erregerlicht in das Objektiv gelangt, der Präparathintergrund dadurch stark aufgehellt wird und der Bildkontrast entsprechend gering ist.

Ein Dunkelfeld-Kondensor dagegen läßt die Anregungsstrahlen so flach in das Präparat eintreten, daß sie das Mikroskopobjektiv gar nicht erreichen. Nur das an den Objektstrukturen gestreute Licht wird vom Objektiv aufgenommen: Exzitations- und Emissionsstrahlung wird getrennt, der Präparatuntergrund ist dunkel, der Bildkontrast optimal.

Abb. 6:  
Schematische Darstellung der Fluoreszenz-Durchlichtanregung



27640-512 R

Da aber die Objektivapertur nicht höher als die innere Grenz-apertur des Dunkelfeld-Kondensors sein darf, ist bei Dunkel-feld-Durchlichtanregung im Bereich der hohen Vergrößerun-gen eine Reduzierung der Objektivapertur erforderlich. Es müssen also Objektive mit eingebauter Irisblende oder Objek-tive mit Einhängenblenden benutzt werden.

Die Durchlicht-Fluoreszenzeinrichtung besteht aus einem Er-regerfilterrevolver und einem Sperrfilterschieber. Der Er-regerfilterrevolver wird anstelle des Staubschutzglases in den Stativfuß des Mikroskops gesteckt und dient zur Aufnahme von drei frei zu wählenden Erregerfiltern, die wechselweise in den Strahlengang gebracht werden können. Eine vierte Revol-verposition erlaubt die Anwendung aller anderen Durchlicht-Verfahren, ohne die Erregerfilter zuvor entfernen zu müssen. Es ist also jederzeit möglich, auch Untersuchungen im Hell-feld, Dunkelfeld usw. alternativ durchzuführen.

In dem Sperrfilterschieber, der zwischen Obektivrevolver und Okular in den Tubus geschoben wird, sind vier Sperrfilter für UV-, Violett-, Blau- und Grün-Anregung eingebaut. Durchlicht-Fluoreszenz ist in vollem Umfang nur mit Mikro-skopen möglich, die mit angesetzten, d. h. wechselbaren Lam-penhäusern ausgerüstet sind. Nur in diese speziellen Lam-penhäuser können die für alle Fluoreszenzverfahren generell zu empfehlenden Gasentladungslampen eingesetzt werden. Mikroskope mit Einbaubeleuchtung sind immer mit Halogen-lampen ausgerüstet, deren Strahlungsintensität für diese Zwecke meist nicht ausreicht.

Geräte- und bedienungstechnische Nachteile haben der Durchlicht-Fluoreszenzanregung viel von ihrer früheren Be-deutung genommen.

Abb. 7:  
Schematische Darstellung des Strahlenganges in einem Durchlicht-Filter-block und dem dazugehörigen Sperrfilter

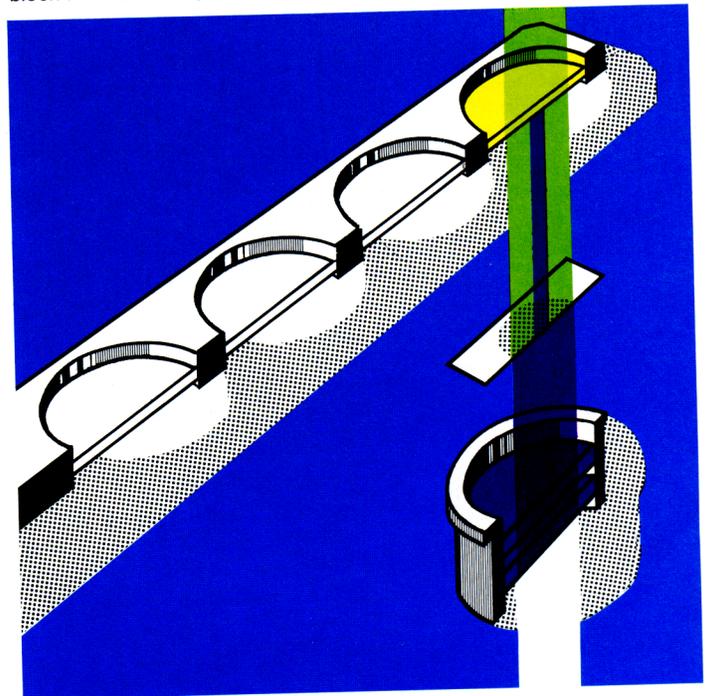


Abb. 8:  
Schematischer Vergleich zwischen Hellfeld- (8a) und Dunkelfeld-Fluoreszenz (8b)

Abb. 8a

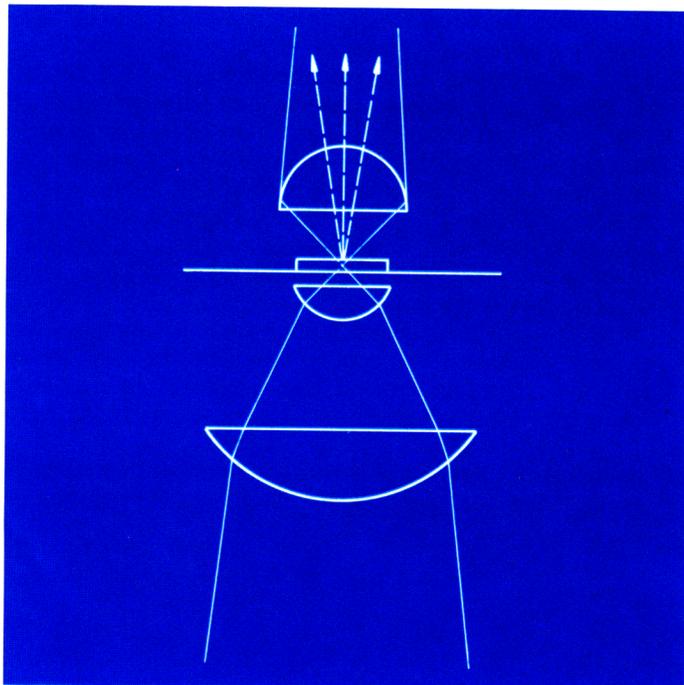
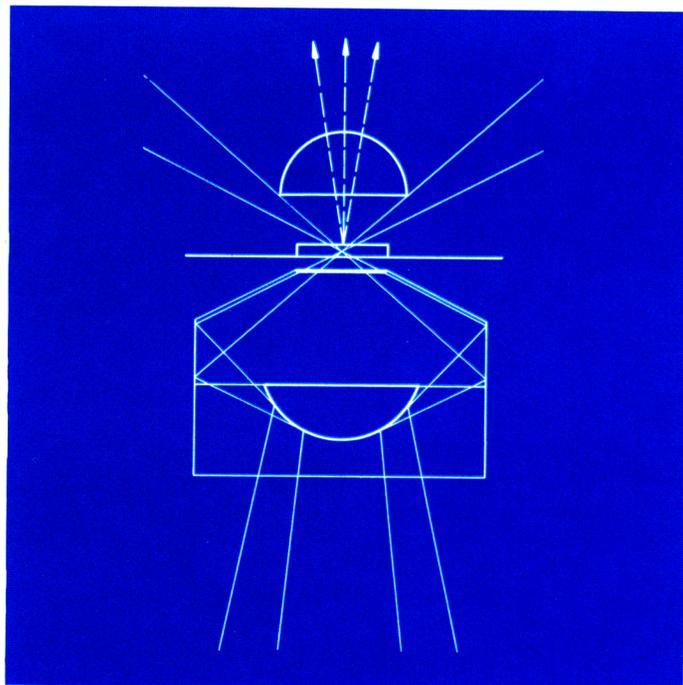


Abb. 8b

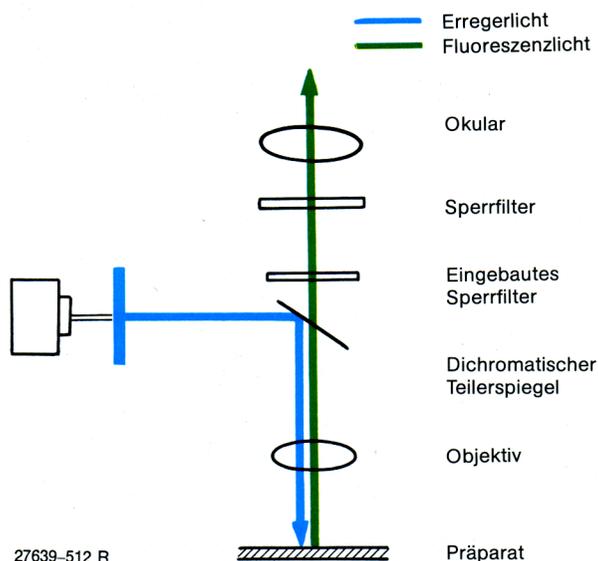


## Fluoreszenzmikroskope für Auflichtanregung

Die Technik der Fluoreszenz-Auflichtilluminatoren beruht auf entsprechender Anpassung des in der Reflexionsmikroskopie gebräuchlichen Opak-Illuminators und wurde in enger Zusammenarbeit mit J. S. PLOEM zu dem heutigen gerätetechnischen Stand entwickelt.

Die von der Lichtquelle ausgehende Strahlung passiert hierbei zunächst die Anregungsfilter, trifft dann auf ein Reflexions-Kurzpaßfilter und wird von diesem zum Objektiv, das die Funktion des Kondensators mitübernimmt, abgelenkt. Das Objektiv konzentriert also die Erregerstrahlung im Objektfeld. Das von dort emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv gesammelt und trifft in umgekehrter Richtung wieder auf das Reflexions-Kurzpaßfilter und wird über das Sperrfilter zum Okular geleitet.

Abb. 9  
Schematische Darstellung der Fluoreszenz-Auflichtanregung



Die Auflicht-Filterblocks beinhalten neben den Anregungs- und Sperrfiltern auch die Reflexions-Kurzpaßfilter (dichromatische Teiler). Für die verschiedenen fluoreszenztechnischen Verfahren in Medizin und Biologie steht ein umfangreiches Angebot von Filterblocks zur Verfügung, bei denen alle Komponenten exakt aufeinander abgestimmt sind.

Die Auflicht-Fluoreszenzeinrichtungen PLOEMOPAK® können bis zu vier Filterblocks gleichzeitig aufnehmen. Damit ist auch die Voraussetzung für die Anwendung der Mehrwellenlängen-Fluoreszenz geschaffen, die mehr und mehr an Bedeutung gewinnt.

Die Auflicht-Anregung hat gegenüber der Durchlicht-Anregung folgende wesentliche Vorteile:

- Sehr hoher Bedienungskomfort durch Kombination aufeinander abgestimmter Erregerfilter, Reflexions-Kurzpaßfilter und Sperrfilter zu einem geschlossenen und leicht austauschbaren Filterblock.
  - Schnellschaltmöglichkeit zwischen mehreren Filterblocks zur Anwendung der Mehrwellenlängen-Fluoreszenz.
  - Sehr helle Fluoreszenzbilder durch Verwendung hochaperturiger Immersionsobjektive. Dabei volle Nutzung der Objektivapertur auch bei stärksten Vergrößerungen.
  - Anwendung von Simultan- und Alternativ-Verfahren, wie Durchlicht-Hellfeld, Durchlicht-Dunkelfeld, Durchlicht-Phasenkontrast, Durchlicht-Interferenzkontrast und Durchlicht-Polarisation.
- Damit ist auch die für die Messungen der Fluoreszenzintensität mit Mikroskop-Photometern unerlässliche Auswahl bestimmter Objektstellen und ihre exakte Einstellung ohne vorherige Belastung durch die Anregungsstrahlung möglich.
- Uneingeschränkte Verwendung von fluoreszenzmikroskopischen Verfahren auch an umgekehrten Mikroskopen.

Die Auflicht-Anregung wird immer dann bevorzugt, wenn mikroskopische Immunfluoreszenz-Reaktionen standardisiert, routinemäßig, also zum Zwecke der Diagnosestellung eingesetzt werden. Ein hierfür wesentliches Kriterium ist der Bedienungskomfort, der bei einem Fluoreszenzmikroskop grundsätzlich ein sehr hoher sein sollte. In medizinischen und biologischen Forschungslaboratorien

sind Fluoreszenz-Mikroskope für Auflicht-Anregung unentbehrlich, da nur sie die Voraussetzungen für die gleichzeitige Anwendung der Mehrwellenlängen-Fluoreszenz und der Simultan- und Alternativ-Verfahren schaffen. Alle diese Forderungen werden gerätetechnisch bestmöglich durch die Auflicht-Fluoreszenzeinrichtungen PLOEMOPAK erfüllt.

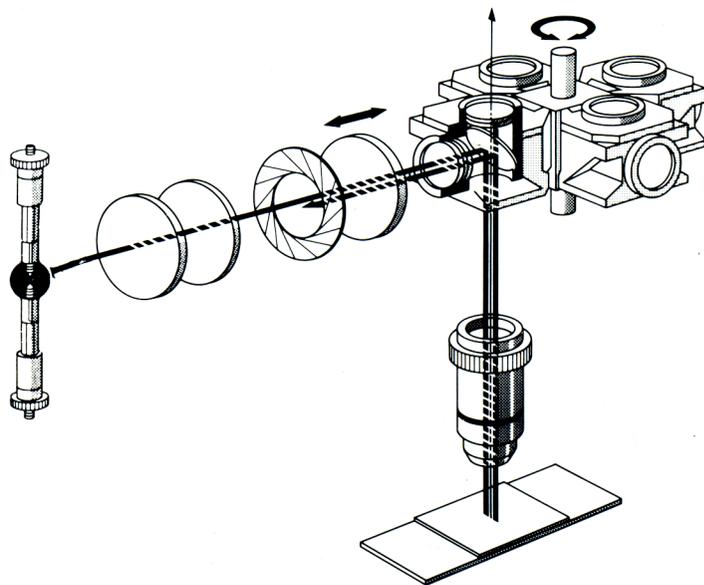


Abb. 10  
Schematische Darstellung des Strahlenganges im PLOEMOPAK

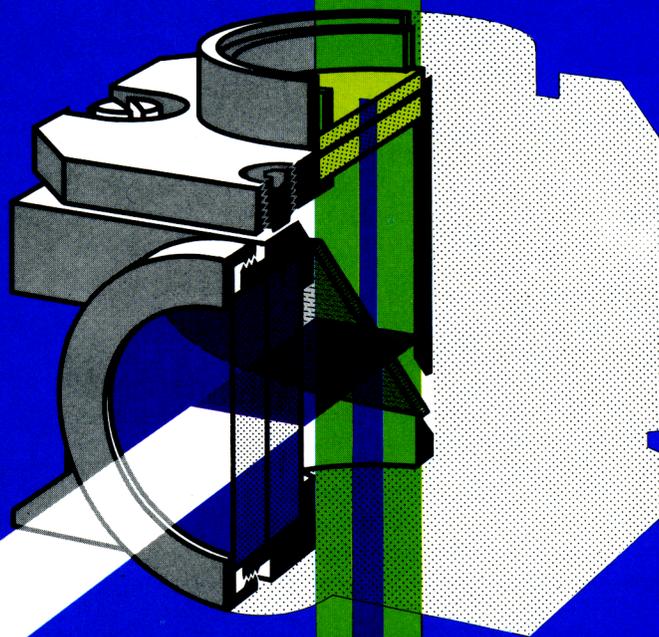


Abb. 11:  
Schematischer Strahlengang  
in einem Fluoreszenzfilterblock  
für Auflicht

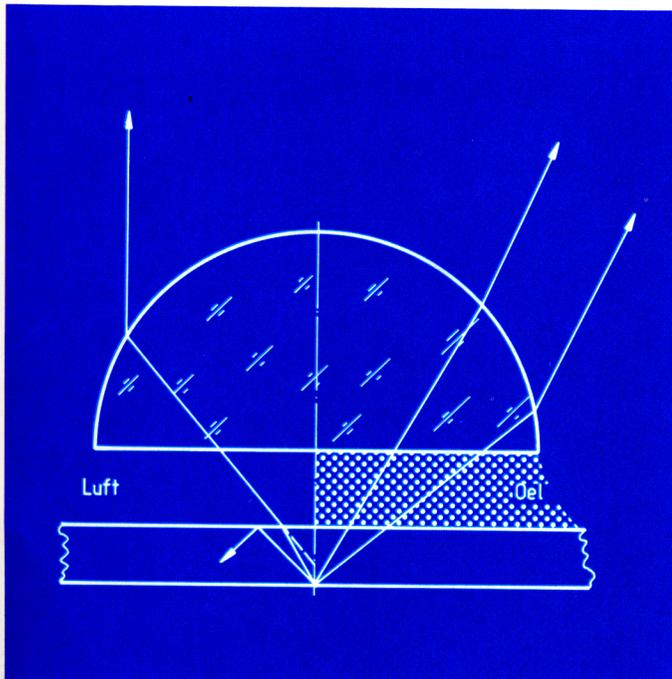
# III. Mikroskop-Optik

## Objektive

Die größtmögliche Leistung eines Mikroskop-Objektivs wird durch einen hohen Korrektionszustand der auftretenden Abbildungsfehler (sphärische und chromatische Aberration, Astigmatismus, Koma und Bildfeldwölbung) erreicht. Die Mikroskop-Objektive werden daher nach ihrem Korrektionszustand klassifiziert und in Achromate, Fluotare und Apochromate eingeteilt.

Abb. 12:

Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Ölimmersionen: keine Brechung der Strahlen beim Austritt aus dem Deckglas; bei größerem Öffnungswinkel auch keine Totalreflexion an der Deckglasoberfläche



Ein weiteres wesentliches Qualitätsmerkmal ist das Auflösungsvermögen, das von der Apertur des Objektivs abhängig ist. Mit Immersionsobjektiven erreicht man höhere Aperturen und damit den Vorteil höherer optischer Auflösung.

Bei dem allgemeinen Streben nach hellen Fluoreszenzbildern ist ein anderer Vorteil der hohen Aperturen für die Fluoreszenzmikroskopie besonders wichtig: Hohe Aperturen konzentrieren viel Erregerlicht auf das Präparat und ergeben lichtstärkere mikroskopische Bilder als Trockenobjektive mit relativ niedrigen Aperturen.

Die Vorteile hochaperturiger Objektive sind aber nur bei Auflicht-Anregung voll wirksam, da nicht allein die Lichtstärke, sondern auch die Anregungsstärke und damit die Helligkeit der Objektfluoreszenz proportional zum Quadrat der Objektivapertur sind. Daraus ergibt sich, daß die Helligkeit des Fluoreszenzbildes proportional zur vierten Potenz der Objektivapertur ist. Schwächere Vergrößerungen ergeben ebenfalls hellere Bilder.

Sehr helle Fluoreszenzbilder erzielt man also mit Objektiven relativ schwacher Vergrößerung und möglichst hoher Apertur:

Beispiel 1: Mit dem Objektiv 25/0.75 OEL erhält man ein helleres Fluoreszenzbild als mit dem Objektiv EF 40/0.75.

Beispiel 2: Mit dem Objektiv 40/1.30 OEL erhält man ein helleres Fluoreszenzbild als mit dem Objektiv EF 40/075.

Da Objektive mit schwacher Vergrößerung und niedriger Apertur kein sehr helles Fluoreszenzbild ergeben, sollten sie nur für gelegentliche Übersichtsbeobachtungen benutzt werden.

Bei Auflicht-Anregung wird das Erregerlicht auf einen dichromatischen Teilerspiegel (Reflexions-Kurzpaßfilter) gelenkt,

der für das sichtbare Fluoreszenzlicht des Abbildungsstrahlenganges weitgehend durchlässig ist und zugleich die kürzerwellige Anregungsstrahlung zum Objektiv hin spiegelt. Das Objektiv hat hier neben der üblichen abbildenden Funktion die Aufgabe, die Anregungsstrahlung auf das Objekt zu konzentrieren.

Objektive für Auflicht-Anregung müssen daher ausschließlich aus solchen Linsengläsern aufgebaut sein, die Anregungsstrahlen durchlassen und dabei weitgehend frei von Eigenfluoreszenz sind. Diese eigens für die Auflichtfluoreszenz

entwickelten Objektive sind mit der Gravierung „FLUORESZENZ“ gekennzeichnet. Aber auch bei anderen Objektiven wird Fluoreszenztauglichkeit angestrebt, indem möglichst fluoreszenzarme und UV-durchlässige Linsengläser bevorzugt werden. Deshalb können außer den FLUORESZENZ-Objektiven auch bestimmte andere Objektive für die Fluoreszenzmikroskopie mit Auflicht-Anregung empfohlen werden (siehe Tabelle Seite 17).

Bei Immersionsoptik ist der Arbeitsabstand klein, damit das Immersionsmittel nicht abfließt. Beim Mikroskopieren befin-

Abb. 13:  
Schematische Darstellung der Aperturwerte von Trockensystemen, Wasser- und Ölimmersionen (13a, 13b, 13c)

Abb. 13a

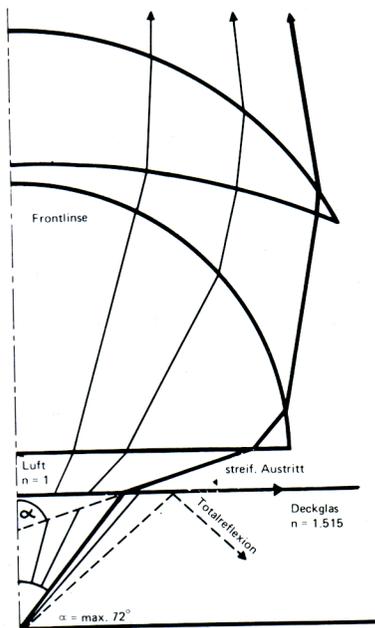


Abb. 13b

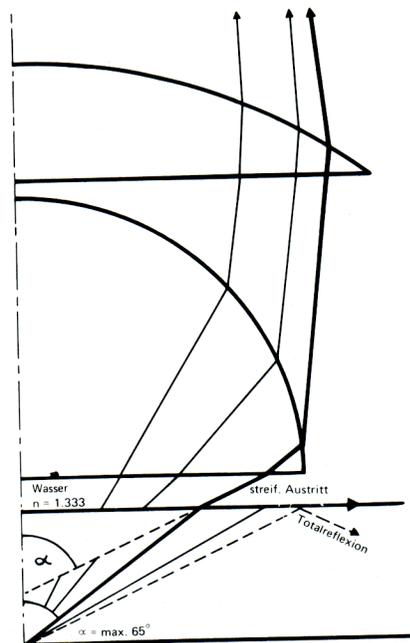
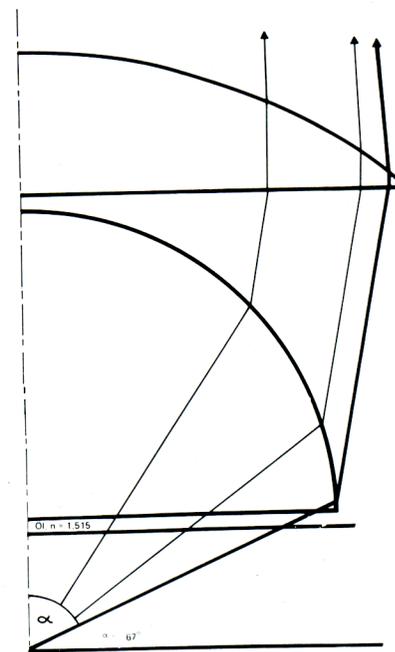


Abb. 13c



den sich nur eine dünne Schicht Immersionsmittel im Strahlengang. Immersionsöl mit geringer Eigenfluoreszenz wird daher den Untergrund des Fluoreszenzbildes auch dann nicht merklich aufhellen, wenn eine gewisse Eigenfluoreszenz an einem Öltropfen festgestellt wird.

Bei hochaperturigen Wasser-Immersionen muß auf eine korrekte Objektdeckung geachtet werden, da schon kleine Abweichungen von der vorgeschriebenen Deckglasdicke 0,17 oder Deckschichten höherbrechender Einschlußmedien die sphärische Korrektur des abbildenden Systems stören und damit den Bildkontrast herabsetzen. Bei Öl-Immersionen dagegen kann man, falls erforderlich, auf die Verwendung eines Deckglases verzichten.

Verunreinigungen der Immersionsobjektive können besonders bei Dunkelfeld-Anregung den Präparatuntergrund störend aufhellen, weil die Fremdpartikel im Anregungslicht aufleuchten. Erhebliche Bildstörungen können bei Immersionen auch durch Luftblasen im Immersionsmittel verursacht werden.

Für Simultan-Verfahren müssen die entsprechenden Phasenkontrast-, Interferenzkontrast- und Polarisations-Objektive verwendet werden.

---

Besonders empfohlene  
Spezial-Objektive für die Fluoreszenz-Mikroskopie

---

NPL FLUOTAR	10/0.45 OEL	FLUORESZENZ
NPL FLUOTAR	25/0.75 OEL	FLUORESZENZ
NPL FLUOTAR	40/1.30 OEL	FLUORESZENZ
	63/1.30 OEL	FLUORESZENZ
	25/0.60 W	FLUORESZENZ
	50/1.00 W	FLUORESZENZ
	100/1.20 W	FLUORESZENZ
EF	40/0.75	FLUORESZENZ
NPL FLUOTAR	25/0.75 OEL	PHACO 2 FLUORESZENZ
NPL FLUOTAR	40/1.30 OEL	PHACO 3 FLUORESZENZ
	63/1.30 OEL	PHACO 3 FLUORESZENZ

---

Plan Apochromate		Plan Apochromate PHACO	
PL Apo	40/0.75	PL Apo	40/0.75 PHACO 2
PL Apo	40/1.00 OEL	PL Apo	40/1.00 OEL PHACO 3
PL Apo	63/1.40 OEL	PL Apo	63/1.40 OEL PHACO 4
PL Apo	100/1.32 OEL	PL Apo	100/1.32 OEL PHACO 3
PL Apo	100/1.32-0.60 OEL		

---

Planobjektive NPL FLUOTAR®

---

NPL FLUOTAR	40/0.70
NPL FLUOTAR	50/1.00 OEL
NPL FLUOTAR	63/0.90 o. D.
NPL FLUOTAR	100/1.32 OEL
NPL FLUOTAR	100/1.32-0.60 OEL

---

Planobjektive NPL FLUOTAR PHACO

---

NPL FLUOTAR	40/0.70	PHACO 2
NPL FLUOTAR	50/1.00 OEL	PHACO 3
NPL FLUOTAR	63/0.90 KORR	PHACO 4
NPL FLUOTAR	100/1.32 OEL	PHACO 3

---

Planfeld-Objektive EF

---

(Achromat) EF	4/0.12
EF	10/0.25
EF	40/0.65
EF	40/0.75 FLUORESZENZ
EF	100/1.25 OEL
EF	100/1.25-0.60 OEL

---

Planfeld-Objektive EF PHACO

---

(Achromat) EF	10/0.25 PHACO 1
EF	40/0.65 PHACO 2
EF	100/1.25 OEL PHACO 3

---

Objektive mit langem Arbeitsabstand

---

NPL FLUOTAR	25/0.35
NPL FLUOTAR	40/0.60

---

## Okulare

Die Helligkeit des Fluoreszenzbildes ist neben anderen Faktoren (Lichtquelle, Filtersystem, Objektiv) auch von der Gesamtvergrößerung des Mikroskops, somit also auch von der Okularvergrößerung abhängig. Hier gilt dasselbe Gesetz wie bei der Projektion: Die Lichtstärke nimmt mit zunehmender Vergrößerung ab. Für die visuelle Beobachtung von Fluoreszenzpräparaten sollten deshalb immer Okulare niedriger Eigenvergrößerung verwendet werden!

Aus dem gleichen Grund muß auch auf die Verwendung von Pankratiken (Vergrößerungswechsler) verzichtet, gegebenenfalls eine Pankratik auf die unterste Vergrößerungsstufe eingestellt werden!

In Abhängigkeit von konstruktiven und abbildungstechnischen Erfordernisse muß u. U. von der vorgeschriebenen, mechanischen Tubuslänge des Mikroskops (Entfernung der Anschraubfläche Objektiv zum oberen Tubusrand) abgewichen werden. Der Faktor der dann erforderlichen Zwischenoptik ist bei Errechnung der mikroskopischen Gesamtvergrößerung zu berücksichtigen. Ist dieser Faktor größer als 1, so entspricht dies einer Steigerung der mikroskopischen Gesamtvergrößerung (z. B. Faktor 1.25 = Gesamtvergrößerung + 25%).

Um Übervergrößerungen und Intensitätsverluste zu vermeiden, muß in diesen Fällen die Okularvergrößerung zusätzlich reduziert werden: Anstelle eines Okulars 10x verwende man ein Okular 8x oder 6.3x.