

IV. Lichtquellen

Generelle Hinweise

Lichtquellen, die über eine ausreichende Strahlungsintensität zur Anregung der Fluoreszenz verfügen, sind wesentliche Voraussetzung für die Fluoreszenzmikroskopie. Diese Forderung wird im besonderen Maße von Quecksilber-Höchstdrucklampen und Xenon-Hochdrucklampen erfüllt. Hierbei handelt es sich um Gasentladungslampen. Die beim Durchgang des elektrischen Stromes durch ein Gas (Quecksilberdampf oder Xenon) entstehende Strahlung wird als Erregerlicht benutzt. Setzt man die Leistungsaufnahme der Gasentladungslampen = 100%, entfallen auf die gesamte Strahlungsleistung bei den Quecksilberlampen ca. 70% bei den Xenon-Lampen ca. 62%; der Rest auf Konvektion- und Wärmeleistung. Die Strahlungsleistung wiederum teilt sich in Prozent der Leistungsaufnahme wie folgt auf (Angaben der Fa. Philips):

Spektralbereich		Hg-Lampen	Xe-Lampen
Ultraviolett	380 nm	ca. 20 %	ca. 3 %
Sichtbarer			
Bereich	380–760 nm	ca. 20 %	ca. 15 %
Infrarot	780 nm	ca. 30 %	ca. 44 %

Das Spektrum der Quecksilber-Höchstdrucklampe besteht aus einem Grundkontinuum, das sich in etwa gleicher Stärke über das ultraviolette, sichtbare und infrarote Gebiet erstreckt und den charakteristischen Hg-Linien mit hoher Intensität. Der sichtbare Anteil der Strahlung erzeugt ein bläulich-weißes Licht.

Das kontinuierliche Spektrum der Xenon-Hochdrucklampe ergibt im sichtbaren Bereich eine Lichtfarbe, die dem aus direktem Sonnen- und Himmelslicht gemischten Tageslicht sehr nahe kommt.

Die technischen Angaben zu den Gasentladungslampen können der Tabelle auf der folgenden Seite entnommen werden.

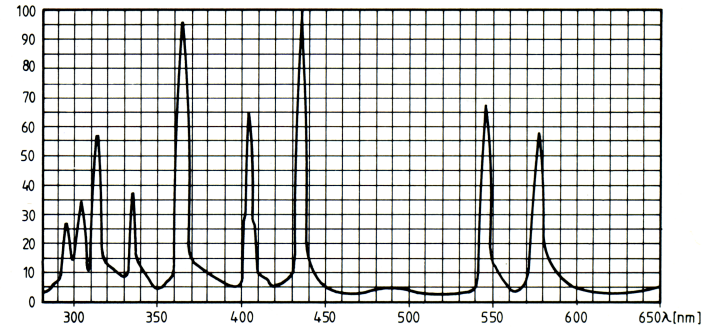


Abb. 14

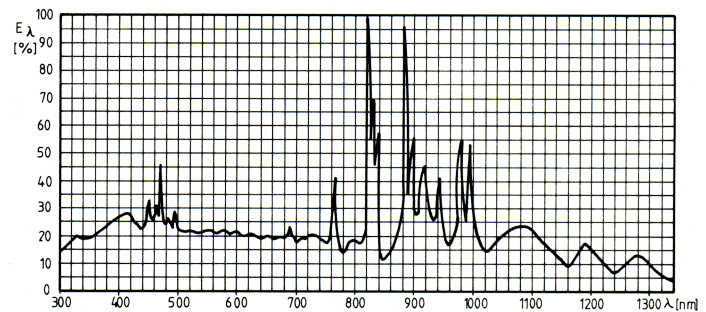


Abb. 15

Abb. 14:
Relative spektrale Strahlungsverteilung von Quecksilber-Höchstdrucklampen (Firma Philips)

Abb. 15:
Relative spektrale Strahlungsverteilung von Xenon-Hochdrucklampen (Firma Philips)

IV. Lichtquellen

Generelle Hinweise

Lichtquellen, die über eine ausreichende Strahlungsintensität zur Anregung der Fluoreszenz verfügen, sind wesentliche Voraussetzung für die Fluoreszenzmikroskopie. Diese Forderung wird im besonderen Maße von Quecksilber-Höchstdrucklampen und Xenon-Hochdrucklampen erfüllt. Hierbei handelt es sich um Gasentladungslampen. Die beim Durchgang des elektrischen Stromes durch ein Gas (Quecksilberdampf oder Xenon) entstehende Strahlung wird als Erregerlicht benutzt. Setzt man die Leistungsaufnahme der Gasentladungslampen = 100%, entfallen auf die gesamte Strahlungsleistung bei den Quecksilberlampen ca. 70% bei den Xenon-Lampen ca. 62%; der Rest auf Konvektion- und Wärmeleistung. Die Strahlungsleistung wiederum teilt sich in Prozent der Leistungsaufnahme wie folgt auf (Angaben der Fa. Philips):

Spektralbereich		Hg-Lampen	Xe-Lampen
Ultraviolett	380 nm	ca. 20 %	ca. 3 %
Sichtbarer			
Bereich	380–760 nm	ca. 20 %	ca. 15 %
Infrarot	780 nm	ca. 30 %	ca. 44 %

Das Spektrum der Quecksilber-Höchstdrucklampe besteht aus einem Grundkontinuum, das sich in etwa gleicher Stärke über das ultraviolette, sichtbare und infrarote Gebiet erstreckt und den charakteristischen Hg-Linien mit hoher Intensität. Der sichtbare Anteil der Strahlung erzeugt ein bläulich-weißes Licht.

Das kontinuierliche Spektrum der Xenon-Hochdrucklampe ergibt im sichtbaren Bereich eine Lichtfarbe, die dem aus direktem Sonnen- und Himmelslicht gemischten Tageslicht sehr nahe kommt.

Die technischen Angaben zu den Gasentladungslampen können der Tabelle auf der folgenden Seite entnommen werden.

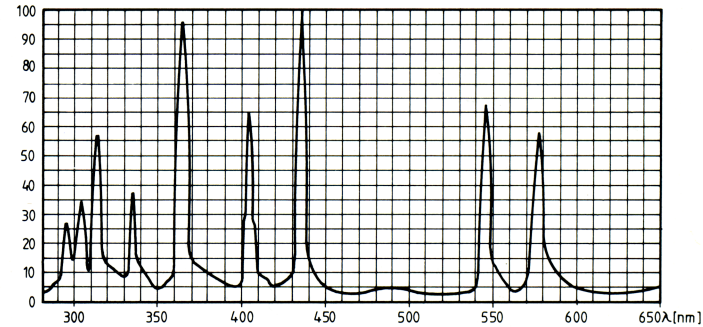


Abb. 14

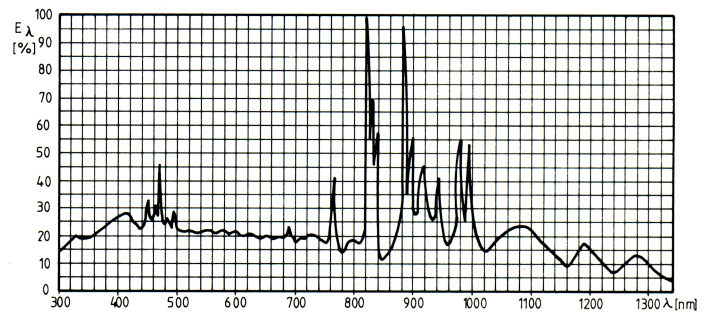


Abb. 15

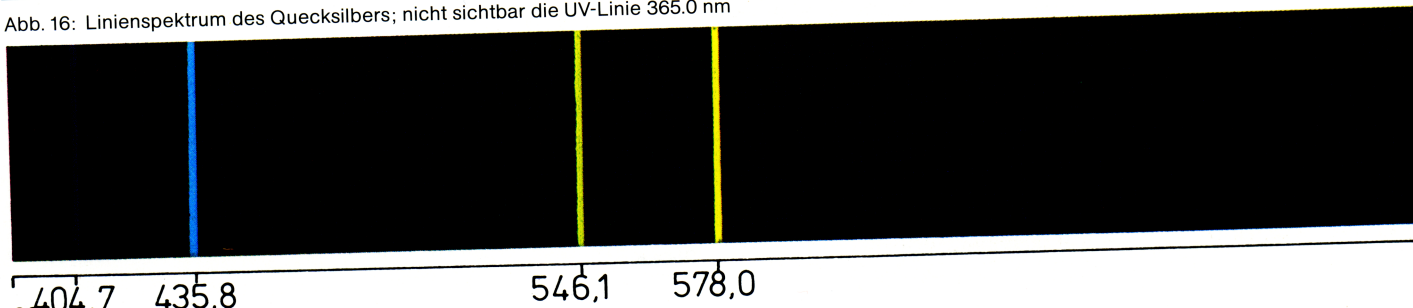
Abb. 14:
Relative spektrale Strahlungsverteilung von Quecksilber-Höchstdrucklampen (Firma Philips)

Abb. 15:
Relative spektrale Strahlungsverteilung von Xenon-Hochdrucklampen (Firma Philips)

Technische Daten

Lampe	elektr. Leistung (W)	Brenn- spannung (V)	Lampen- strom (A)	Licht- strom (lm)	mittlere Leuchtdichte (sb)	Leuchtfeld- abmessung (mm LxB)	Farb- temperatur (°K)	Mittlere Lebensdauer (Std.)
Hg-Höchst- drucklampe 50 W	50~	L1 39..45 L2 34..39	L1 1,3 L2 1,45	2.000	30.000	0,3 x1,0		ca. 100
Hg-Höchst- drucklampe 100 W	100 –	20	5	2.200	170.000	0,25x0,25		ca. 200
Hg-Höchst- drucklampe 200 W	200~	61±6	3,6	9.500	33.000	0,6 x2,2		ca. 200
Xenon-Hoch- drucklampe 75 W	75 –	14	5,4	1.000	40.000	0,25x0,5	6.100	ca. 400
Xenon-Hoch- drucklampe 150 W	150 –	20	7,5	3.000	15.000	0,5 x2,2	6.100	ca. 1.200
Xenon-Hoch- drucklampe 450 W	450 –	18	25	13.000	35.000	0,9 x2,7	6.300	ca. 200
Halogen- Glühlampe 12 V, 100 W	100~	12	8	2.800			3.100 bei 7,4 A	ca. 50

Abb. 16: Linienspektrum des Quecksilbers; nicht sichtbar die UV-Linie 365,0 nm



Anwendung der Lichtquellen

Lampe	Anwendung in der Auflichtfluoreszenz	Anwendung in der Durchlichtfluoreszenz	Anwendung in der Fluorometrie
Quecksilber- Höchstdrucklampe 50 W	X	X	—**
Quecksilber- Höchstdrucklampe 100 W	X	—*	X
Quecksilber- Höchstdrucklampe 200 W	X	X	—**
Xenon Hochdrucklampe 75 W	X	—*	X
Xenon- Hochdrucklampe 150 W	X	X	X
Xenon- Hochdrucklampe 450 W	X	X	—

* Für die Durchlichtfluoreszenz sind diese Lampen nicht geeignet, da sie die Eintrittspupille der Dunkelfeldkondensoren nicht ausleuchten.

** Für die Fluorometrie sind diese Lampen nicht geeignet, da die Stabilität des Entladungsbogens für diesen Anwendungsbereich nicht ausreicht.

Die größere Strahlungsleistung im ultravioletten, violetten und grünen Spektralbereich prädestiniert die Quecksilberlampen als „Universal-Lichtquellen“ für die Fluoreszenzmikroskopie. Aber auch für die Anregung mit blauem Licht liefert sie die erforderliche Energie. Die Xenon-Lampen dagegen sind nur bei Blau- und Grünanregung sowie bei Anregung im fernen UV-Bereich (315 nm) optimal.

Die für die Fluoreszenzanregung gebräuchlichsten Gasentladungslampen Hg 50 W und Hg 200 W sind Wechselstromlampen, die Hg 100 W und Xe 75 W Gleichstromlampen. Gegenüber Wechselstrombetrieb hat Gleichstrombetrieb den Vorteil, daß die Lampen sehr ruhig brennen. Sie werden deshalb bevorzugt in der Fluorometrie eingesetzt. Außerdem verfügen sie über eine nahezu doppelt so große Lebensdauer. Gleichstromlampen erfordern eigene Vorschaltgeräte.

Anwendung der Lichtquellen

Lampe	Anwendung in der Auflichtfluoreszenz	Anwendung in der Durchlichtfluoreszenz	Anwendung in der Fluorometrie
Quecksilber- Höchstdrucklampe 50 W	X	X	—**
Quecksilber- Höchstdrucklampe 100 W	X	—*	X
Quecksilber- Höchstdrucklampe 200 W	X	X	—**
Xenon Hochdrucklampe 75 W	X	—*	X
Xenon- Hochdrucklampe 150 W	X	X	X
Xenon- Hochdrucklampe 450 W	X	X	—

* Für die Durchlichtfluoreszenz sind diese Lampen nicht geeignet, da sie die Eintrittspupille der Dunkelfeldkondensoren nicht ausleuchten.

** Für die Fluorometrie sind diese Lampen nicht geeignet, da die Stabilität des Entladungsbogens für diesen Anwendungsbereich nicht ausreicht.

Die größere Strahlungsleistung im ultravioletten, violetten und grünen Spektralbereich prädestiniert die Quecksilberlampen als „Universal-Lichtquellen“ für die Fluoreszenzmikroskopie. Aber auch für die Anregung mit blauem Licht liefert sie die erforderliche Energie. Die Xenon-Lampen dagegen sind nur bei Blau- und Grünanregung sowie bei Anregung im fernen UV-Bereich (315 nm) optimal.

Die für die Fluoreszenzanregung gebräuchlichsten Gasentladungslampen Hg 50 W und Hg 200 W sind Wechselstromlampen, die Hg 100 W und Xe 75 W Gleichstromlampen. Gegenüber Wechselstrombetrieb hat Gleichstrombetrieb den Vorteil, daß die Lampen sehr ruhig brennen. Sie werden deshalb bevorzugt in der Fluorometrie eingesetzt. Außerdem verfügen sie über eine nahezu doppelt so große Lebensdauer. Gleichstromlampen erfordern eigene Vorschaltgeräte.

Lampeneinbau und Lampenwechsel

Blendungsgefahr, UV-Strahlung und der im Betrieb hohe Druck erfordern die Unterbringung von Gasentladungslampen in speziellen, mit Lüftungsöffnungen versehenen Lampenhäusern. Vor der ersten Inbetriebnahme sollten, sofern erforderlich, die Gasentladungslampen zunächst mit Alkohol und anschließend mit destilliertem Wasser gereinigt werden; so kann das Einbrennen von Fingerabdrücken o. ä. in den Kolben vermieden werden.

Gasentladungslampen dürfen wegen der unterschiedlichen Ausdehnung von Lampen- und Metallteilen nur einseitig gehalten werden, damit bei Erwärmung im Quarzkörper keine Spannungen auftreten. Beim Einsetzen der Lampen muß zunächst die flexible Zuleitung angeschlossen und dann erst die Lampe in der Halterung befestigt werden. Die Anweisungen der Lampenhersteller sind hierbei sorgfältig zu beachten! Beim Ein- und Ausbau von Gasentladungslampen sind die gesetzlichen Schutzvorschriften genauestens zu befolgen.

Zündung, Stromversorgungsgeräte, Einbrennvorgang

Zur Zündung ist sowohl bei Hg- als auch bei Xe-Lampen eine Spannung erforderlich, die weit über der Versorgungsspannung liegt. Es dürfen nur die zu dem jeweiligen Lampentyp gelieferten Zündgeräte benutzt werden.

Bei Quecksilberlampen tritt mit der Zündung zunächst eine Bogenentladung im Grundgas auf. Durch die Wärmewirkung der Entladung verdampft das genau dosierte Quecksilber innerhalb von einigen Minuten vollständig. Die Stromstärke sinkt dann von einem höheren Anfangswert auf die Betriebsstromstärke. Dieser sogenannte Einbrennvorgang ist nach ca. 15 Minuten Mindestbrennzeit je Einschaltung abgeschlossen. Während die gleichstrombetriebenen Xenon-Lampen und die ebenfalls gleichstrombetriebene Quecksilberlampe 100W

sofort, d. h. auch im heißen Zustand wieder gezündet werden können, müssen Quecksilberlampen für Wechselstrom-Ausführung wegen der hierbei verwendeten Zündgeräte vor Wiederezündung auf Zimmertemperatur abkühlen.

Lebensdauer

Die in der Tabelle angegebenen Werte für die mittlere Lebensdauer sind bei Quecksilber-Höchst- und Xenon-Hochdrucklampen auf ca. 2 Stunden je Einschaltung, bei Xenon-Hochdrucklampen bei mindestens 20 Minuten je Einschaltung bezogen. Bei größerer Schalthäufigkeit wird die Lebensdauer der Lampen verkürzt. Bei Hg-Lampen ist außerdem die Mindestbrennzeit von 15 Minuten zu beachten. Mit zunehmender Brenndauer bildet sich durch verdampftes Elektrodenmaterial auf der Innenseite des Lampenkolbens ein dünner Belag, der einen Rückgang der nutzbaren Strahlungsleistung verursacht. Dieser allmähliche Vorgang vollzieht sich desto langsamer, je geringer die Schalthäufigkeit ist.

Gegen Ende der mittleren Lebensdauer ist es ratsam, die Brenner gegen neue auszuwechseln. Das am Quarzglas niedergeschlagene Elektrodenmaterial, das zur Schwärzung des Kolbens führt, absorbiert Strahlung und führt somit zur Rekristallisation und Verminderung der Festigkeit des Quarzglases. Dies erhöht die Explosionsgefahr!

Ein vorzeitiger Wechsel ist insbesondere auch dann zu empfehlen, wenn mikrophotographische Aufnahmen hergestellt werden sollen. Bei wechselstrombetriebenen Lampen verstärkt sich mit zunehmender Lebensdauer das Flackern, das nicht nur bei visueller Beobachtung stört, sondern auch zu einer ungleichmäßigen Ausleuchtung der Aufnahme führt. Halogen-Lampen werden in der Fluoreszenz-Mikroskopie, insbesondere der Immunfluoreszenz, heute nur noch selten benutzt. Die spektrale Energieverteilung ist ungünstig, da der Hauptteil der Strahlung im nahen Infrarot liegt. Wenn überhaupt, dann sind Halogen-Lampen nur bei Blau- und Grünanregung zu gebrauchen.

V. Filter

Filterwirkung

Fällt weißes Licht durch ein Glasprisma, wird es in Licht unterschiedlicher Wellenlänge zerlegt, von dem das Auge den Bereich von ca. 380 nm bis ca. 780 nm als Farbfolge von Violett, Blau über Grün zu Gelb und Rot sieht. Unter 380 nm liegt das unsichtbare Ultraviolett, über 780 nm das ebenfalls unsichtbare Infrarot.

Ein farbloses Filter läßt alle Spektralfarben gleichmäßig und mit nahezu ungeschwächter Intensität passieren. Neutralfilter schwächen alle Spektralfarben gleichmäßig. Beim Durchtritt des Lichtes durch ein Farbglas wird ein Teil der Lichtenergie selektiv absorbiert, ein anderer Teil wird an den beiden Grenzflächen (Glas/Luft) reflektiert; der Rest der Lichtenergie wird

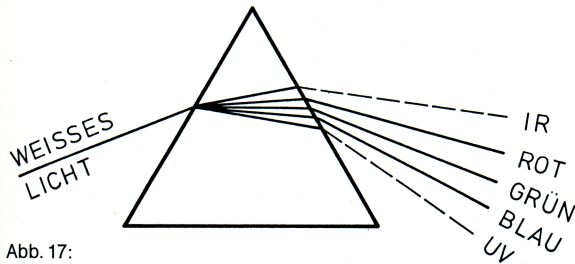
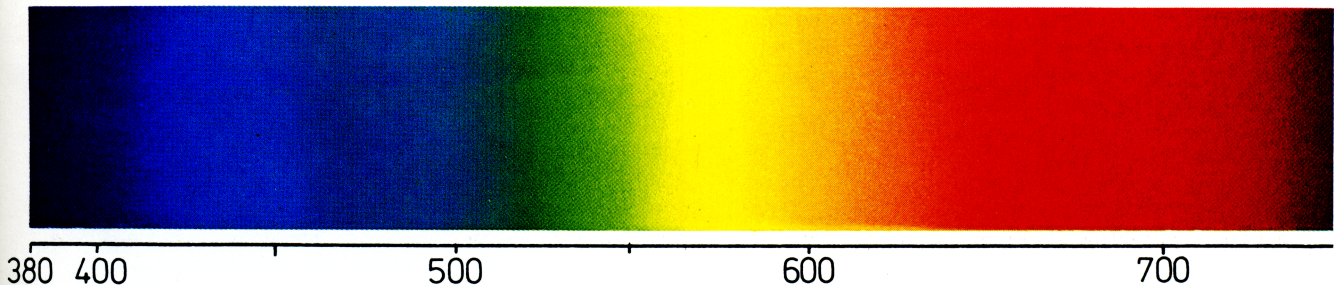


Abb. 17:
Zerlegung des weißen Lichtes durch ein Prisma

Abb. 18:
Kontinuierliches Spektrum; sichtbarer Bereich ca. 380–780 nm



vom Filter durchgelassen. Farbfilter lassen also vorzugsweise nur Strahlungen bestimmter Wellenlängenbereiche passieren. In der Fluoreszenzmikroskopie kommt es entscheidend auf die Auswahl geeigneter Filter an. Es werden unterschiedliche Typen und unterschiedliche Filterarten verwendet.

Glasfilter

Hierbei handelt es sich um Klargläser, die durch individuelle Absorptionseigenschaften für bestimmte Spektralbereiche mehr oder weniger durchlässig sind. Grundsätzlich lassen sich Farbgläser in zwei Klassen einteilen:

1. Der Glasschmelze werden färbende Oxyde von Schwermetallen (Kupfer, Kobalt, Nickel, Eisen, Chrom, Mangan) zugesetzt, diese werden in der Schmelze als Metallionen gelöst. Dadurch wird das Glas in seiner gesamten Masse homogen gefärbt.
2. Die Farbe wird durch kolloidale Teilchen von Sulfiden und Seleniden (Kadmium-Sulfid, Kadmium-Selenid) oder von Metallen (Kupfer, Silber, Gold, Selen) erzeugt. Die optische Wirkung wird meist nicht nur von ihrer Zusammensetzung, sondern auch von ihrer Größe entscheidend beeinflusst. Da diese Teilchen ihre wirksame Größe meist erst durch eine nachträglich vorgenommene Temperaturbehandlung der zunächst farblosen Gläser erreichen, werden diese Farbgläser als Anlaufgläser bezeichnet.

V. Filter

Filterwirkung

Fällt weißes Licht durch ein Glasprisma, wird es in Licht unterschiedlicher Wellenlänge zerlegt, von dem das Auge den Bereich von ca. 380 nm bis ca. 780 nm als Farbfolge von Violett, Blau über Grün zu Gelb und Rot sieht. Unter 380 nm liegt das unsichtbare Ultraviolett, über 780 nm das ebenfalls unsichtbare Infrarot.

Ein farbloses Filter läßt alle Spektralfarben gleichmäßig und mit nahezu ungeschwächter Intensität passieren. Neutralfilter schwächen alle Spektralfarben gleichmäßig. Beim Durchtritt des Lichtes durch ein Farbglas wird ein Teil der Lichtenergie selektiv absorbiert, ein anderer Teil wird an den beiden Grenzflächen (Glas/Luft) reflektiert; der Rest der Lichtenergie wird

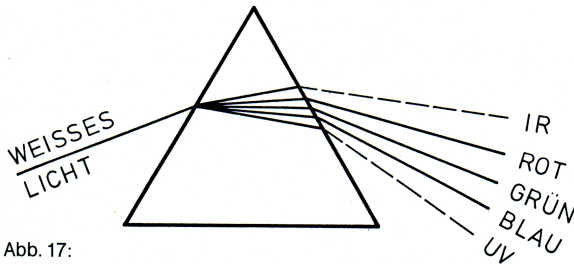


Abb. 17:
Zerlegung des weißen Lichtes durch ein Prisma

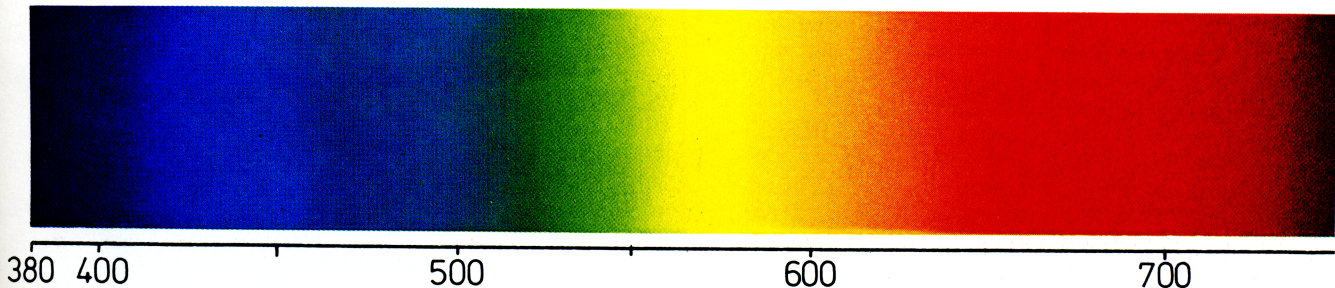
vom Filter durchgelassen. FarbfILTER lassen also vorzugsweise nur Strahlungen bestimmter Wellenlängenbereiche passieren. In der Fluoreszenzmikroskopie kommt es entscheidend auf die Auswahl geeigneter Filter an. Es werden unterschiedliche Typen und unterschiedliche Filterarten verwendet.

Glasfilter

Hierbei handelt es sich um Klargläser, die durch individuelle Absorptionseigenschaften für bestimmte Spektralbereiche mehr oder weniger durchlässig sind. Grundsätzlich lassen sich Farbgläser in zwei Klassen einteilen:

1. Der Glasschmelze werden färbende Oxyde von Schwermetallen (Kupfer, Kobalt, Nickel, Eisen, Chrom, Mangan) zugesetzt, diese werden in der Schmelze als Metallionen gelöst. Dadurch wird das Glas in seiner gesamten Masse homogen gefärbt.
2. Die Farbe wird durch kolloidale Teilchen von Sulfiden und Seleniden (Kadmium-Sulfid, Kadmium-Selenid) oder von Metallen (Kupfer, Silber, Gold, Selen) erzeugt. Die optische Wirkung wird meist nicht nur von ihrer Zusammensetzung, sondern auch von ihrer Größe entscheidend beeinflusst. Da diese Teilchen ihre wirksame Größe meist erst durch eine nachträglich vorgenommene Temperaturbehandlung der zunächst farblosen Gläser erreichen, werden diese Farbgläser als Anlaufgläser bezeichnet.

Abb. 18:
Kontinuierliches Spektrum; sichtbarer Bereich ca. 380–780 nm



Interferenzfilter

Interferenzfilter bestehen überwiegend aus Aufdampfschichten, deren Filterwirkung nicht überwiegend auf Absorption oder Dispersion, sondern auf der Erscheinung der Interferenz des Lichtes beruhen.

Bei Aufdampfschichten wird im Hochvakuum ein Dielektrikum oder ein Metall zum Verdampfen gebracht; das entstehende Kondensat (dünne Schicht) läßt man auf Glas- oder Quarzträger niederschlagen. Werden Schichten mit hohem und niedrigem Brechungsindex abwechselnd aufeinander aufgedampft, erhält man Mehrfach- oder Vielfach-Interferenzfilter.

In Abhängigkeit von der gewünschten Durchlässigkeitscharakteristik müssen die Schichten, deren Dicke, die Anzahl der Schichten und deren Reihenfolge exakt definiert werden. Die zur Interferenz gelangenden Strahlen entstehen durch Reflexion an den Grenzflächen von Medien mit unterschiedlicher Brechzahl. Interferenzfilter können für das ultraviolette,

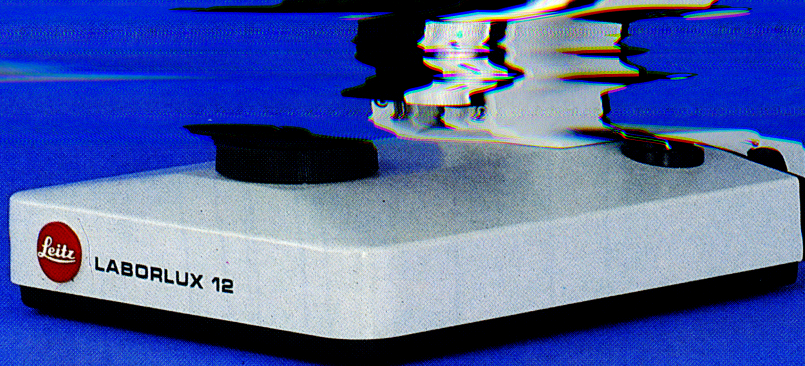
Bandpaßfilter

Bandpaßfilter sind Filter mit zwei steilen Kanten. Hierbei kann es sich um Farbgläser, Interferenzfilter oder Kombinationen beider handeln. In der Fluoreszenzmikroskopie werden sehr hochwertige Filter, teils als Anregungs- teils als Sperrfilter verwendet.

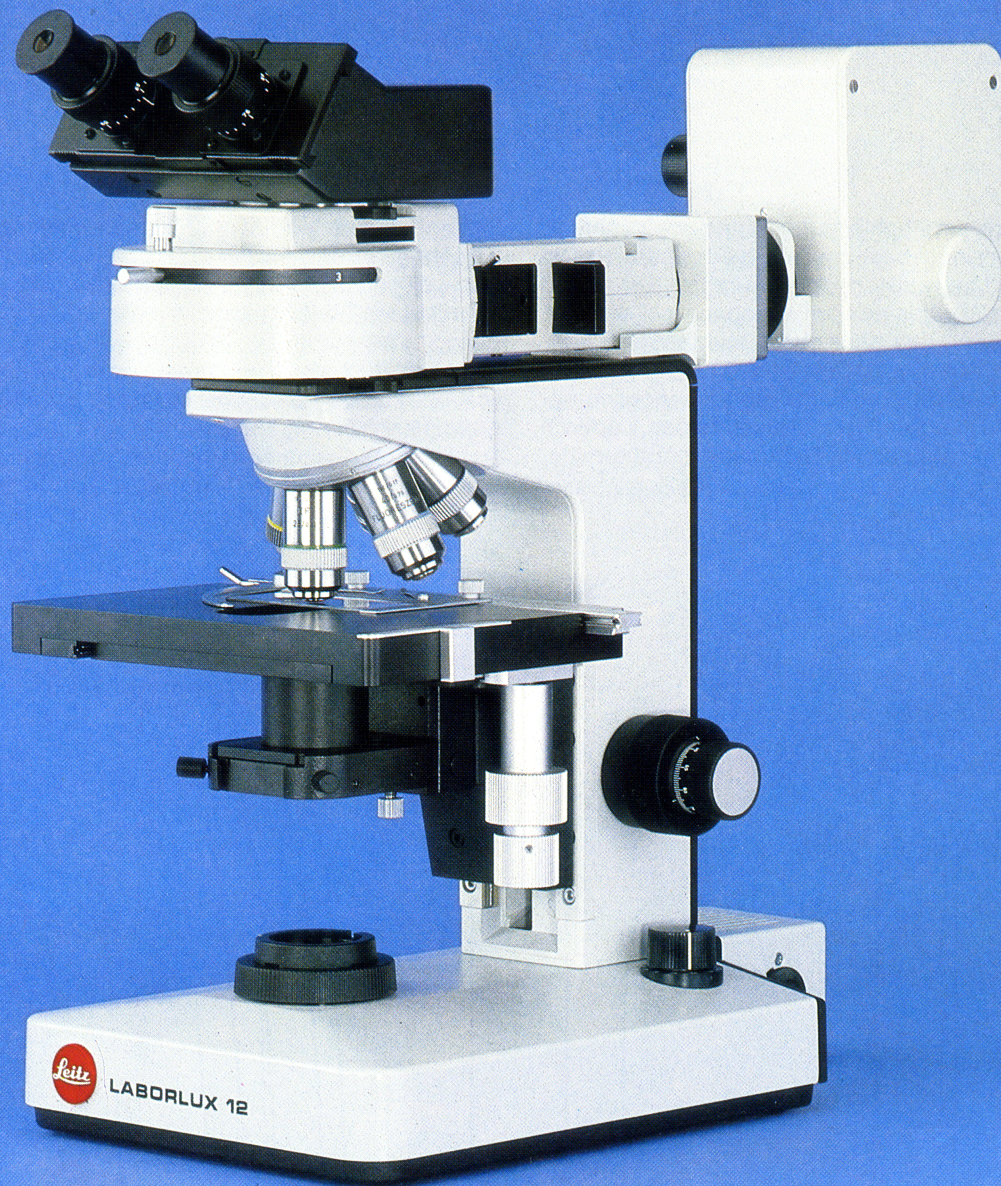
Bandpaßfilter werden durch die Kennbuchstaben BP mit Zahlenangaben, die die Wellenlänge in Nanometer ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) angeben, gekennzeichnet. Zur Charakterisierung dienen entweder die Filterschwerpunkte (Centre Wavelength) und die Halbwertsbreite (Half Power Bandwidth) oder die kurz- und

langwellige Halbwertsbreite (Half Power Bandwidth). Im ersten Fall werden die Zahlen durch Schrägstrich, im zweiten Fall durch Bindestrich getrennt.

Abb. 19:
Durchlässigkeitskurven von Bandpaßfiltern



Mikroskop LEITZ LABORLUX® 12D
Ausrüstung für Auflicht-Fluoreszenz

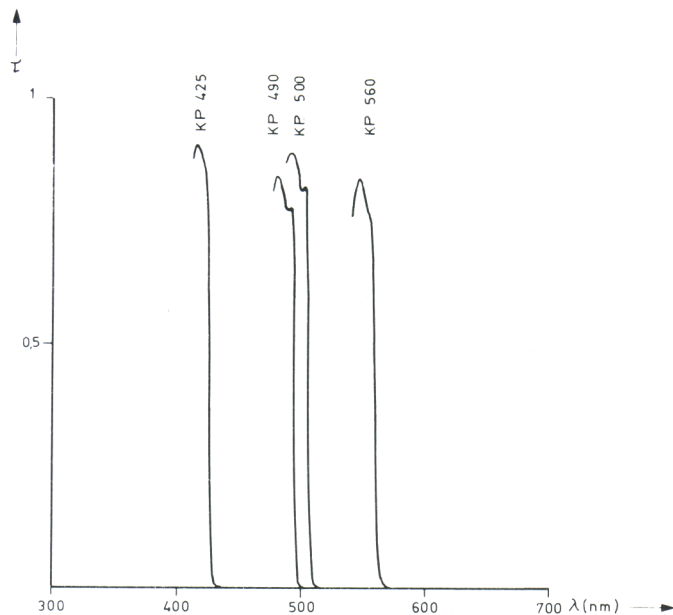


Mikroskop LEITZ LABORLUX® 12D
Ausrüstung für Auflicht-Fluoreszenz

Kurzpaßfilter

Hierbei handelt es sich um Hochleistungs-Interferenzfilter mit einer steilen Kante in einem bestimmten Spektralbereich. Die Sperrung erfolgt im langwelligen Licht. Kurzpaßfilter haben die Kennbuchstaben KP mit einer Zahlenangabe, die die Kantenwellenlänge in Nanometer bezeichnet. Kurzpaßfilter werden als Anregungsfilter benutzt. Sie können auch mit Langpaßfiltern kombiniert werden, um damit breitere oder schmalere Banden aus dem Spektrum herauszuschneiden. Dadurch erhält man Filterkombinationen mit Bandpaß-Charakteristik.

Abb. 20:
Durchlässigkeitskurven von Kurzpaßfiltern

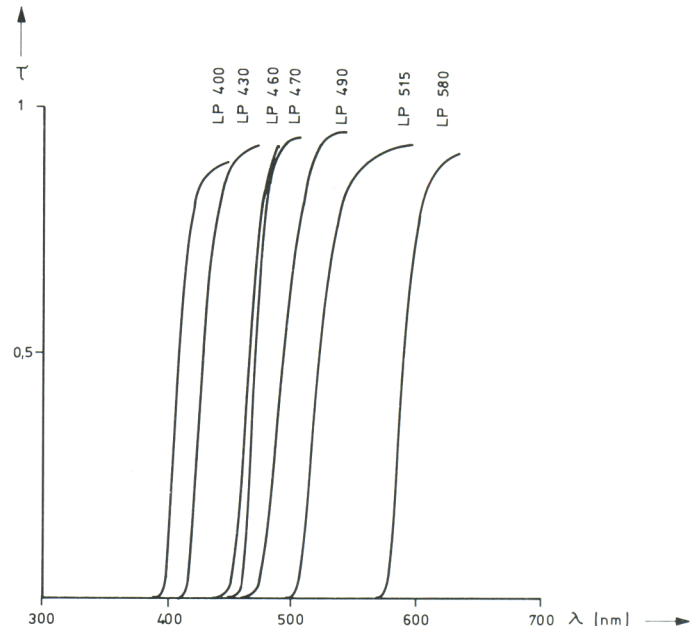


Langpaßfilter

Es handelt sich hierbei um Filter mit einer steilen Kante in einem bestimmten Spektralbereich. Die Sperrung erfolgt im kurzwelligigen Licht. Langpaßfilter haben die Kennbuchstaben LP mit einer Zahlenangabe, die die Kantenwellenlänge in Nanometer bezeichnet.

Langpaßfilter werden vorzugsweise als Sperrfilter, gelegentlich aber auch in Kombination mit Kurpaßfiltern als Anregungsfilter benutzt.

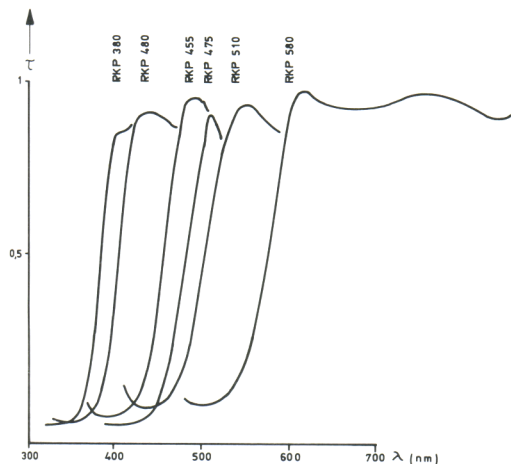
Abb. 21:
Durchlässigkeitskurven von Langpaßfiltern



Reflexions-Kurzpaßfilter

Reflexions-Kurzpaßfilter sind dielektrische Interferenzfilter (Vielschicht-Kantenfilter). Sie besitzen ein hohes Reflexionsvermögen in einem definierten Spektralbereich. Man bezeichnet sie auch als dichromatische Teilerspiegel, Farbteiler oder Reflektoren. Bestimmte Bereiche des Spektrums werden voll reflektiert, andere voll durchgelassen. Bei den Filterblocks werden sie im Anregungslicht als Spiegel (das Licht wird unter 45°-Einfall in Richtung Präparat gelenkt), bei Beobachtungen der Fluoreszenz als Durchlaßfilter (ebenfalls unter 45°-Neigung) verwendet. Aus praktischen Gründen werden dichromatische Teiler stets in Transmission gemessen. Im Anregungsbereich – der Teiler wird in der Praxis als Spiegel benutzt – ist wegen des hohen Reflexionsvermögens die Durchlässigkeit entsprechend niedrig. Im Fluoreszenzbereich soll die Durchlässigkeit aber möglichst groß sein. Mit Hilfe der Reflexions-Kurzpaßfilter ist eine exakte Trennung der kurzwelligen Excitations- und der langwelligen Emissions-Strahlung möglich.

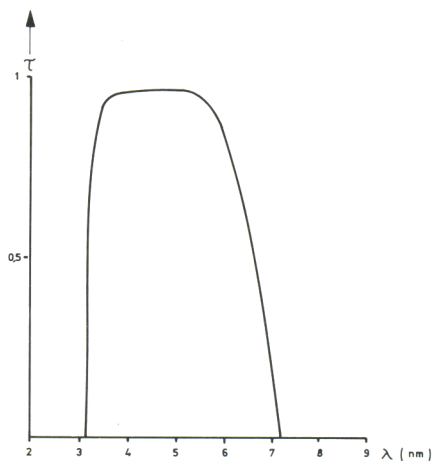
Abb. 22:
Durchlässigkeitskurven von Reflexionskurzpaßfiltern



Rot-Absorptionsfilter

Zur Unterdrückung von Nebendurchlässigkeit der Erregerfilter im roten Spektralbereich, die zur Aufhellung des Bilduntergrundes führt, wird das Farbglassfilter BG 38 verwendet. Es ist in allen Fluoreszenz-Auflichtilluminatoren eingebaut. In Verbindung mit dem Filterblock A 2 bewirkt das BG 38 eine Energieeinbuße. Es sollte deshalb aus dem Strahlengang entfernt werden.

Abb. 23:
Durchlässigkeitskurve des Rot-Absorptionsfilters BG 38, 4 mm



Wärmeschutzfilter

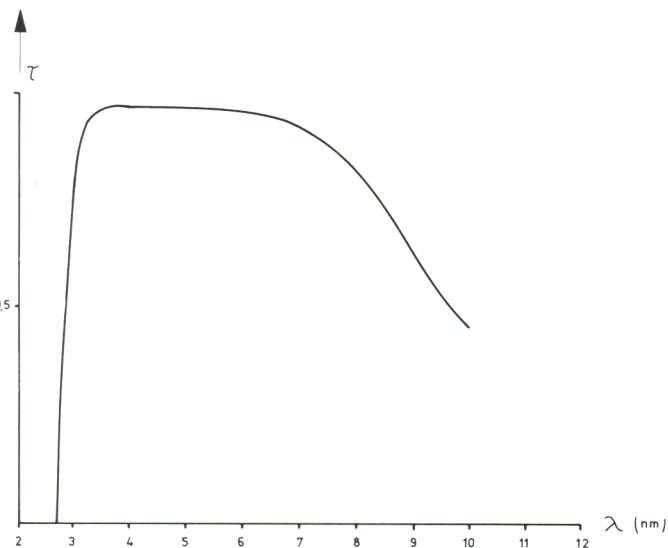
Zur Schonung von Präparat und Filtern werden in die Lampen- häuser Wärmeschutzfilter eingebaut: In Verbindung mit Quecksilber-Höchstdrucklampen ein KG 1, in Verbindung mit Xenon-Hochdrucklampen ein Calflex-Filter.

Die UV-Absorption des KG 1 beeinträchtigt die Ergiebigkeit der Anregungsintensität. Bei Verwendung des Filterblock A 2 soll- te das Wärmeschutzfilter KG1 entfernt werden, wenn die Fluoreszenzintensität schwach ist.

Calflex-Wärmeschutzfilter sollten zur UV-Anregung grund- sätzlich nicht verwendet werden, weil die aufgedampften Schichten zusätzlich UV-Strahlung absorbieren.

Abb. 24:

Durchlässigkeitskurve des Wärmeschutzfilters KG 1,2 mm



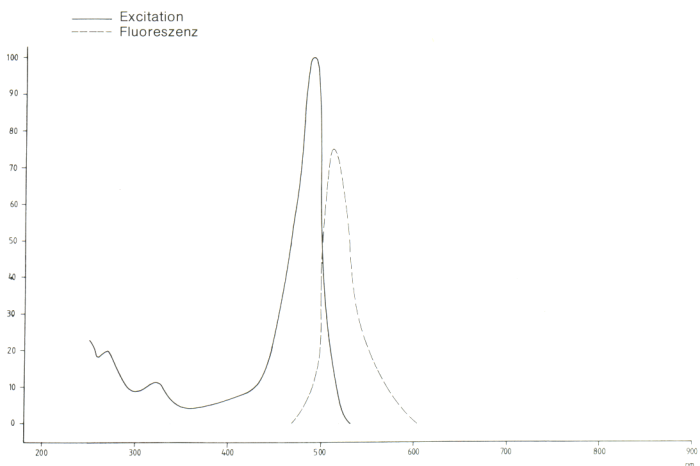
Richtige Filterung am Beispiel des FITC

Neben der Verwendung einer geeigneten Lichtquelle ist vor allem die Wahl der richtigen Filterkombination wichtig. Beides muß auf die jeweils applizierte Fluoreszenzfärbung abge- stimmt sein. Dazu ist die Kenntnis der spektralen Werte für die Excitation und Emission erforderlich.

Das Excitations-Maximum des FITC liegt bei 490 nm, die Emis- sion zwischen 500 nm und 550 nm. Die Anregungs- und Fluo- reszenzspektren haben breite Maxima, die Kurven überlap- pen sich teilweise.

Abb. 25:

Excitations- und Fluoreszenzspektrum von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)



Würde man für die erforderliche Blauanregung das Glasfilter BG 12 benutzen, erhielte man wegen der geringen Durchlässigkeit dieses Filters im Anregungsbereich des FITC nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität. Die Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht ist nur mit extrem steilflankigen Vielschicht-Interferenzfiltern und zusätzlicher dielektrischer Interferenzfilter (Farbteiler) möglich. Die Verwendung eines speziell für die FITC-Anregung entwickelten Hochleistungs-Interferenz-Kurzpaßfilters KP 490 ist daher zwingend. Für die optimale Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht ist eine genau definierte Durchlässigkeitsgrenze (Kantenlage) der Filter erforderlich. Für FITC liegt sie etwa bei 490 nm. Der für die Anregung ausgesuchte Spektralbereich liegt unterhalb der Kantenlage, und das Filter soll dort möglichst verlustfrei durchlässig sein, während oberhalb der Kante das Filter praktisch vollkommen sperren muß, damit das Fluoreszenzlicht nicht durch Spuren von Anregungslicht gestört wird (Hg-Linie 546 nm). Dies ist die Wirkungsweise eines typischen Kurzpaßfilters. Bei ihm interessiert im allgemeinen die kurzwellige Durchlässigkeitsgrenze nicht.

Ein solches Kurzpaßfilter (KP 490) enthält z. B. der Filterblock H 3. Der Durchlaßbereich des Filters erstreckt sich von 420 bis 490 nm. Der für die FITC-Anregung besonders wirksame Bereich liegt oberhalb von 470 nm mit einem Maximum bei ca. 490 nm. Der Filterblock H 3 ist also besonders geeignet, wenn es auf größtmögliche Helligkeit des Fluoreszenzbildes ankommt.

Die breitbandige Anregung ist aber nicht in allen Fällen erwünscht, weil sie u. a. eine Aufhellung des Hintergrundes, Bildüberstrahlung oder schlechten Kontrast bewirken kann. Abhilfe schaffen hier Anregungsfilter, die eine kleinere Durchlaßbreite haben – BP 450–490 (Filterblock I 2/3), BP 470–490 (Filterblock K 3).

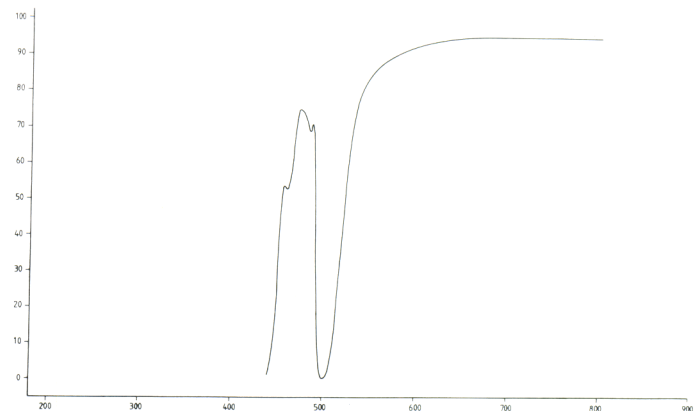
Die Bandbreite einer Filterkombination gibt Aufschluß über Helligkeit und Kontrast des Fluoreszenzbildes:

Breitere Durchlässigkeit = helleres, kontrastärmeres und weniger spezifisches Fluoreszenzbild.

Schmalere Durchlässigkeit = Etwas dunkleres, dafür aber kontrastreicheres und spezifischeres Fluoreszenzbild.

Ob die Filterkombination H 3, I 2/3 oder K 3 für die FITC-Anregung als optimal anzusprechen sind, ist allein von der spezifischen Fluorochromierung und von der Helligkeit des Raumes, in dem mikroskopiert wird, abhängig. Unter der Voraussetzung, daß die Präparationstechnik beherrscht wird und die benutzten Reagenzien einwandfrei sind, ist der Filterblock I 2/3 für die FITC-Anregung optimal.

Abb. 26:
Hochleistungs-Interferenzbandpaßfilterblock I 2/3 für optimale FITC-Filterung



Würde man für die erforderliche Blauanregung das Glasfilter BG12 benutzen, erhielte man wegen der geringen Durchlässigkeit dieses Filters im Anregungsbereich des FITC nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität. Die Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht ist nur mit extrem steiflankigen Vielschicht-Interferenzfiltern und zusätzlicher dielektrischer Interferenzfilter (Farbteiler) möglich. Die Verwendung eines speziell für die FITC-Anregung entwickelten Hochleistungs-Interferenz-Kurzpaßfilters KP490 ist daher zwingend. Für die optimale Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht ist eine genau definierte Durchlässigkeitsgrenze (Kantenlage) der Filter erforderlich. Für FITC liegt sie etwa bei 490 nm. Der für die Anregung ausgesuchte Spektralbereich liegt unterhalb der Kantenlage, und das Filter soll dort möglichst verlustfrei durchlässig sein, während oberhalb der Kante das Filter praktisch vollkommen sperren muß, damit das Fluoreszenzlicht nicht durch Spuren von Anregungslicht gestört wird (Hg-Linie 546 nm). Dies ist die Wirkungsweise eines typischen Kurzpaßfilters. Bei ihm interessiert im allgemeinen die kurzwellige Durchlässigkeitsgrenze nicht.

Ein solches Kurzpaßfilter (KP490) enthält z. B. der Filterblock H3. Der Durchlaßbereich des Filters erstreckt sich von 420 bis 490 nm. Der für die FITC-Anregung besonders wirksame Bereich liegt oberhalb von 470 nm mit einem Maximum bei ca. 490 nm. Der Filterblock H3 ist also besonders geeignet, wenn es auf größtmögliche Helligkeit des Fluoreszenzbildes ankommt.

Die breitbandige Anregung ist aber nicht in allen Fällen erwünscht, weil sie u. a. eine Aufhellung des Hintergrundes, Bildüberstrahlung oder schlechten Kontrast bewirken kann. Abhilfe schaffen hier Anregungsfilter, die eine kleinere Durchlaßbreite haben – BP450–490 (Filterblock I2/3), BP470–490 (Filterblock K3).

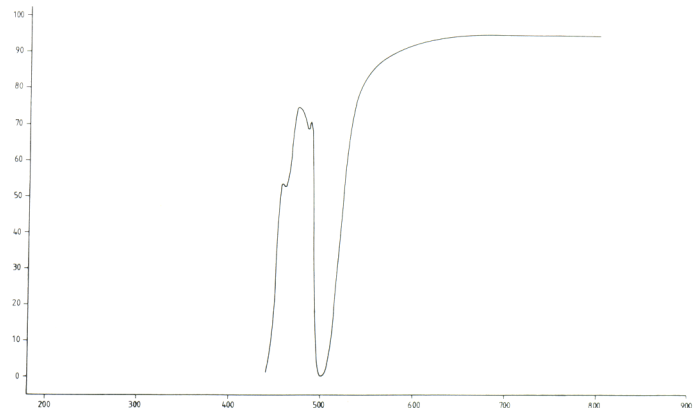
Die Bandbreite einer Filterkombination gibt Aufschluß über Helligkeit und Kontrast des Fluoreszenzbildes:

Breitere Durchlässigkeit = helleres, kontrastärmeres und weniger spezifisches Fluoreszenzbild.

Schmalere Durchlässigkeit = Etwas dunkleres, dafür aber kontrastreicheres und spezifischeres Fluoreszenzbild.

Ob die Filterkombination H3, I2/3 oder K3 für die FITC-Anregung als optimal anzusprechen sind, ist allein von der spezifischen Fluorochromierung und von der Helligkeit des Raumes, in dem mikroskopiert wird, abhängig. Unter der Voraussetzung, daß die Präparationstechnik beherrscht wird und die benutzten Reagenzien einwandfrei sind, ist der Filterblock I2/3 für die FITC-Anregung optimal.

Abb. 26:
Hochleistungs-Interferenzbandpaßfilterblock I2/3 für optimale FITC-Filterung

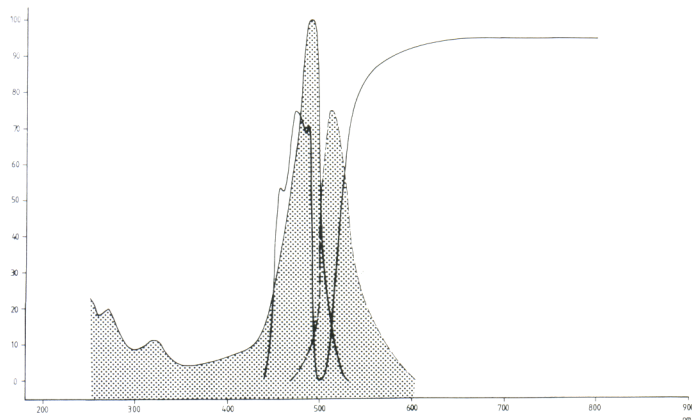


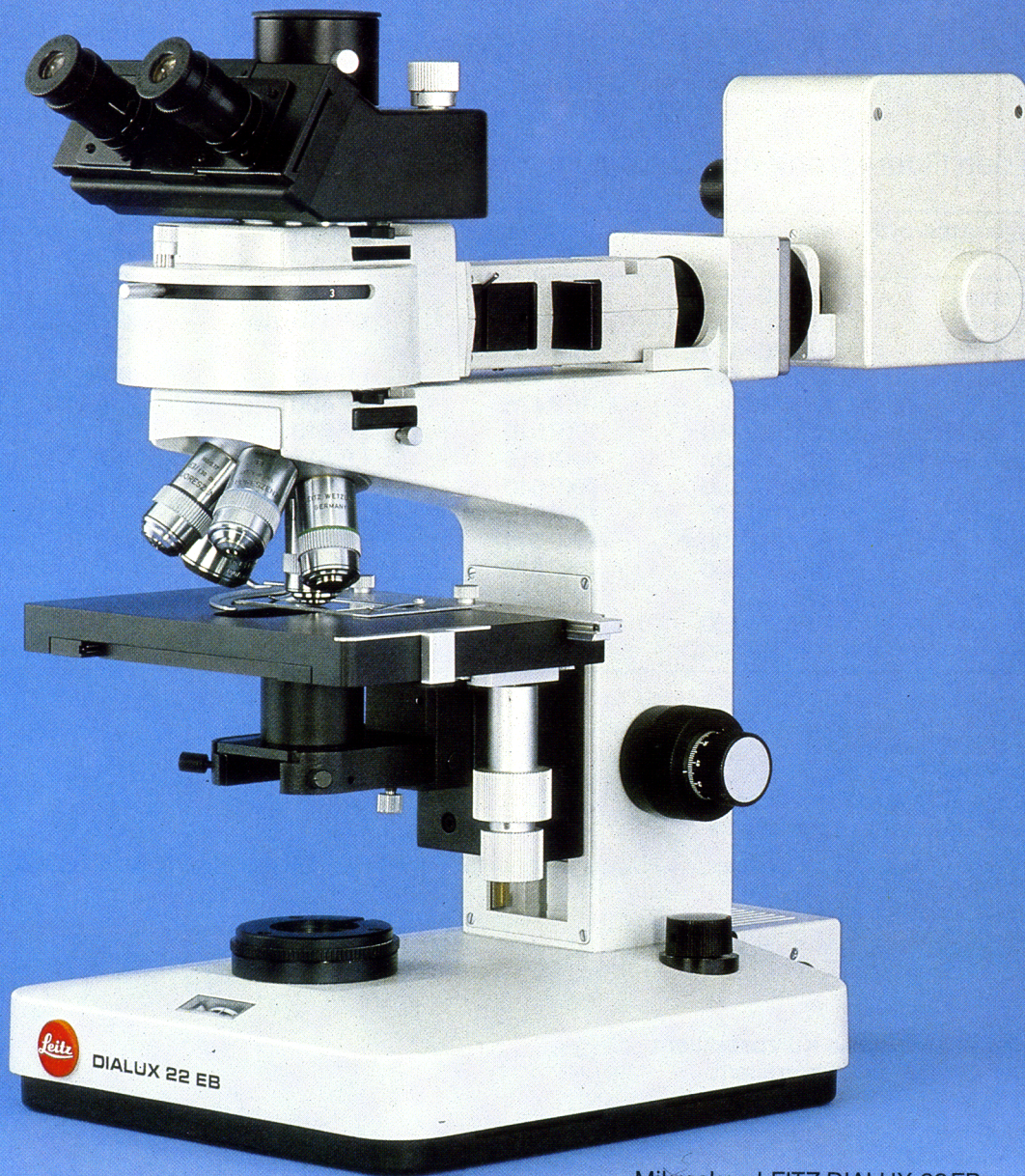
Zur Beachtung der vom Präparat emittierten Fluoreszenzstrahlung muß ein auf die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes abgestimmtes Sperrfilter in den Strahlengang gebracht werden, um so die unerwünschte durchgelassene Anregungsstrahlung zu unterdrücken. Die Filterblocks H 3, I 2/3 und K 3 sind daher zusätzlich mit Langpaßfiltern LP 515, deren Sperrung also im Kurzwelligen liegt, ausgerüstet.

Es gibt bestimmte Verfahren, wo neben FITC noch ein anderes Fluorochrom verwendet wird; hierbei handelt es sich um sogenannte Doppelfluorochromierungen. Hierzu gehören TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) oder Ethidiumbromid, die beide im roten Spektralbereich fluoreszieren,

während die FITC-markierten Stellen grün fluoreszieren. Beobachtet man in solcher Weise doppelt fluorochromierte Präparate mit einem Langpaßfilter LP 515, so sieht man gleichzeitig grüne und rote Bilddetails. Für die getrennte Beobachtung FITC-markierter Details sind spezielle Bandpaßfilter erforderlich. Von den für diesen Zweck vorgesehenen, ist das Filter BP 525/20 für FITC/TRITC im Filterblock L 3 und das Filter BP 515-560 für FITC/Ethidiumbromid im Filterblock L 3.1 enthalten. Beide Filter sperren den unerwünschten roten Spektralbereich. Nur durch die Verwendung der Filterblocks L 3 und L 3.1 ist bei dieser Art der Doppelfluorochromierung eine einwandfreie selektive FITC-Beobachtung möglich.

Abb. 27:
Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des FITC sowie Filterung mit Filterblock I 2/3 (Abb. 25 und 26 übereinandergelegt)





Mikroskop LEITZ DIALUX 22EB
Ausrüstung für Auflicht-Fluoreszenz