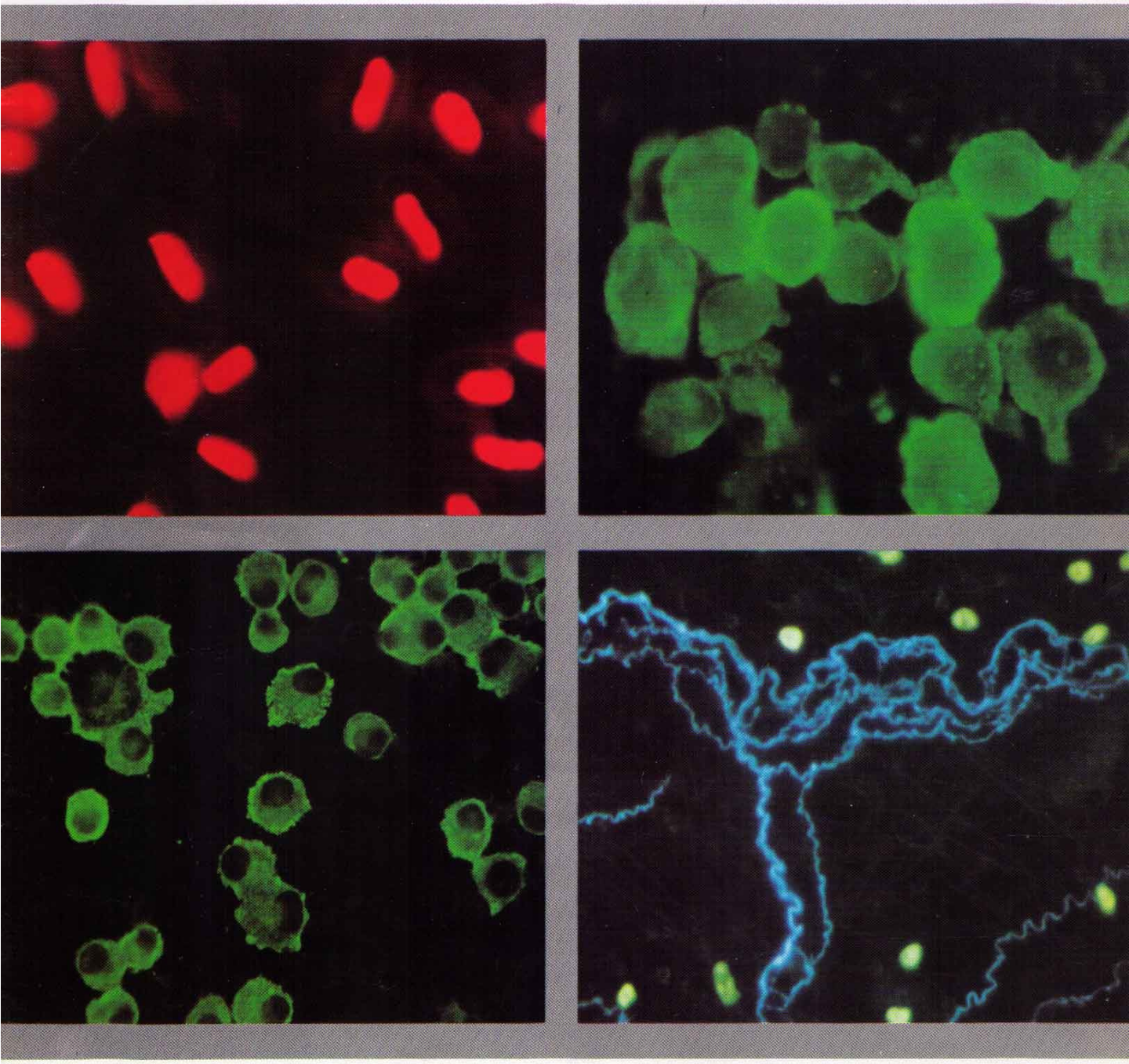
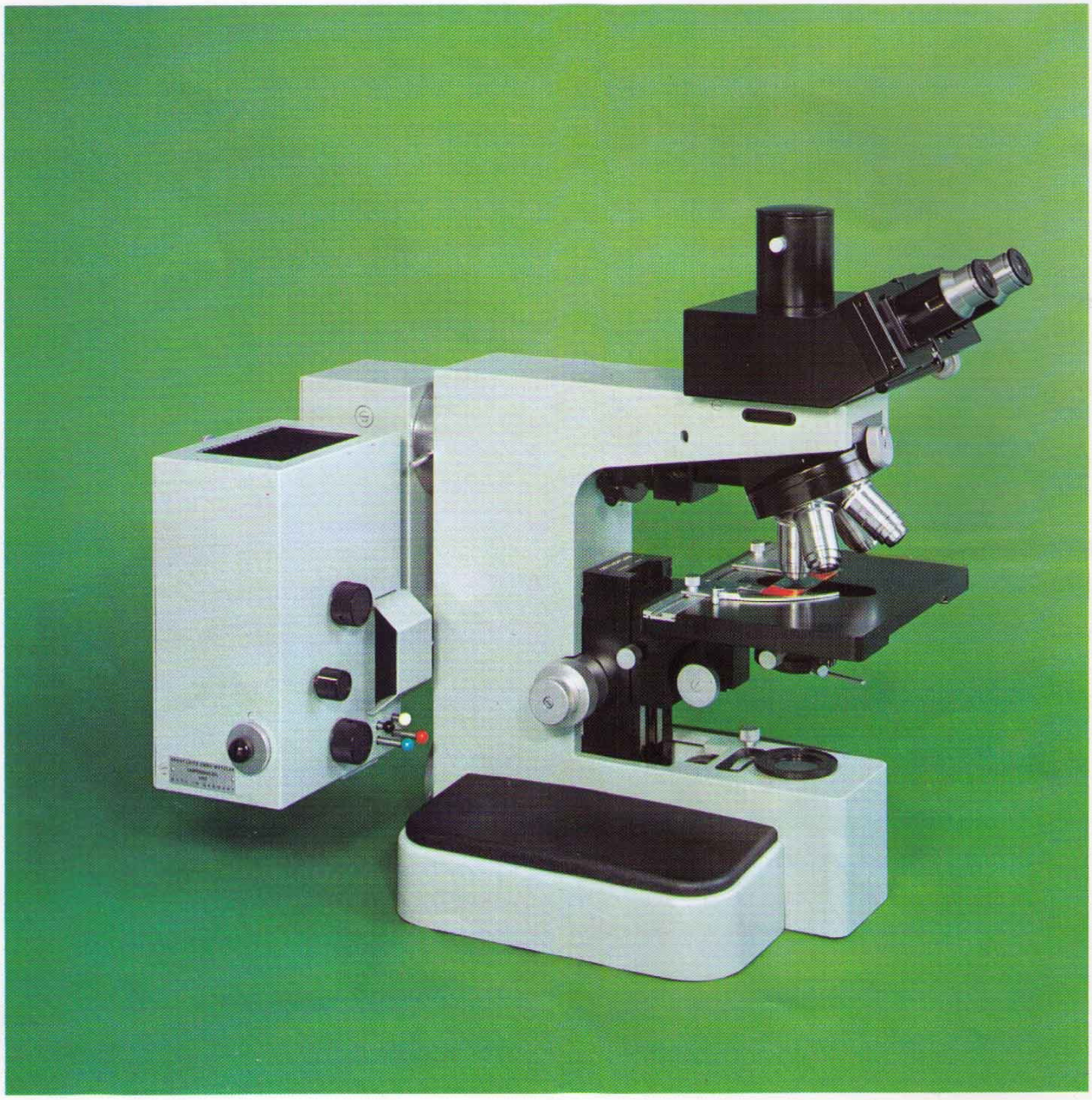
Auflicht-Fluoreszenz

Leitz
WETZLAR



512-105

Großes Fluoreszenzmikroskop ORTHOPLAN in Ausrüstung für Auflicht- und Durchlichtfluoreszenz.



Fluoreszenz-Auflichtilluminator
nach Ploem

Die Bedeutung der Fluoreszenzmikroskopie zeigt sich mit am besten in der Entwicklung des Instrumentariums. Zu den konventionellen Einrichtungen für Hellfeld- und Dunkelfeldfluoreszenz ist das Phasenkontrast-Fluoreszenzmikroskop getreten, das die Vorteile der Phasenkontrastdarstellung mit denen der Fluoreszenztechnik verbindet. Alle diese Fluoreszenzeinrichtungen sind bisher fast ausschließlich für Untersuchungen im Durchlicht verwendet worden. Es ist jedoch nicht zu verkennen, daß eine Auflichtbeleuchtung gerade für die Fluoreszenzmikroskopie bei mittleren und hohen Vergrößerungen besondere Vorteile bieten kann.

Auf Anregung von J. S. Ploem*) haben wir einen speziellen Fluoreszenz-Auflichtilluminator entwickelt, der die Möglichkeiten des Fluoreszenzmikroskopes entscheidend erweitert. Beispielsweise bei der Lokalisation fluoreszierender Antikörper in immunologisch behandelten Präparaten oder sehr schwachen Fluoreszenzen ist er den bisher üblichen Verfahren und optischen Systemen überlegen. Insbesondere entspricht der Fluoreszenz-Auflichtilluminator den Erfordernissen der Mikrofluorometrie.

Spezifische Vorteile

1. Bei Auflichtbestrahlung wird die Fluoreszenz in erster Linie an der Oberfläche des Präparates erregt und daher ungeschwächt vom Objektiv erfaßt. Bei Anregung mit Durchlichtbeleuchtung muß das Fluoreszenzlicht dagegen das Präparat durchdringen und wird dabei, je nach Präparatdicke, teilweise absorbiert.

2. Die Strahlenführung ist zwangsläufig zentriert, da das Objektiv gleichzeitig Kondensor ist. Apertur und Vergrößerung sind somit optimal aufeinander abgestimmt.

3. Die Auflichtmethode läßt sich, wenn gewünscht, auch mit Durchlichtfluoreszenz im Phasenkontrast oder Dunkelfeld kombinieren.

4. Durch die Art der Strahlenführung und Ausfilterung gelangt die Erregerstrahlung nicht direkt in den Beobachtungsstrahlengang.

5. Dichromatische Teilerspiegel und darauf abgestimmte Sperrfilter gewährleisten eine optimale Nutzung der Erregerstrahlung und eine scharfe Selektion von Erreger- und Fluoreszenzstrahlung.

6. Erregerfilter, dichromatische Teilerspiegel und Sperrfilter sind so ausgewählt, daß die in der modernen Fluoreszenzmikroskopie gebräuchlichen Färbemethoden mit optimalem Wirkungsgrad angewendet werden können.

7. Die Auflichtmethode ist wegen der unter 2,3 und 5 genannten Vorteile besonders für die Fluorometrie geeignet.

Abbildungen Titelseite

Oben links:
Froschblut, Feulgenfärbung, Rotfluoreszenz der Zellkerne bei Anregung mit Grünlicht. Aufnahme: H. Rühl, Labor Anwendung Mikro, Leitz-Werke.

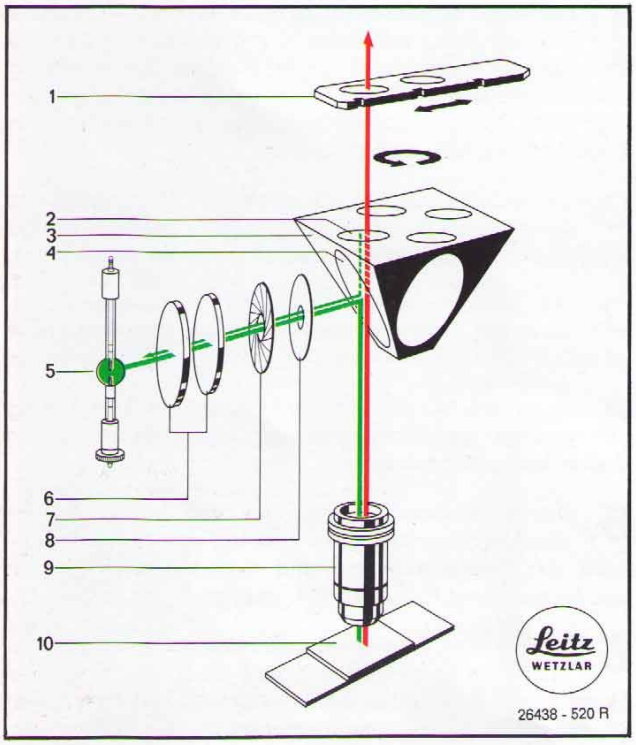
Oben rechts:
Masern, FITC-markiert. Die vom Erreger befallenen Zellen zeigen die typische FITC-Fluoreszenz. Präparat: Medizinisches Landesuntersuchungsamt, Virus-Abteilung, Frau Dr. Enders.

Unten links:
Immunfluoreszenz von Knochenmarkzellen. Benutzt wurde für die Anfärbung des Präparates ein Anti-Kappa-Fluoresceinisothiocyanat-Konjugat. Anregung mit blauem Licht. Präparat und Aufnahme: H. R. E. Schuit und Dr. W. Hijmans, Leiden.

Unten rechts:
Mesenterium der Ratte. Blaue Catecholamin-Fluoreszenz in den Endnerven und gelbe 5-HT-Fluoreszenz in den Mastzellen. Anregung mit ultraviolettem Licht (405 nm). Präparat und Aufnahme: Dr. J. S. Ploem, Leiden.

*) Dr. J. S. Ploem, Pathologisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Leiden.

Aufbau und Funktion



1 Sperrfilterschieber
2 FO-Sperrfilter, eingebaut
3 Revolver für FO-Sperrfilter u. Teilerspiegel
4 Teilerspiegel
5 Hg-Höchstdrucklampe
6 Erregerfilter im Lampenhaus
7 Leuchtfeldblende
8 Streulicht-Schutzblende
9 Objektiv
10 Präparat

Teilerspiegel und zugehörige FO-Sperrfilter tragen die Bezeichnungen:

Teilerspiegel:	FO-Sperrfilter:
TK 400 für UV-Anregung	K 400
TK 455 für Violett-Anregung	K 460
TK 495 für Blau-Anregung	K 495
TK 580 Grün-Anregung	K 580

Der Fluoreszenz-Auflichtilluminator wird für die Mikroskope ORTHOPLAN® und ORTHOLUX® geliefert. Mit dem Illuminatorgehäuse sind Beleuchtungsstutzen mit Optik und Leuchtfeldblende sowie ein Objektivrevolver fest verbunden. Das Gehäuse enthält 4 von außen umschaltbare dichromatische Teilerspiegel und darauf abgestimmte Fluoreszenzopak-Sperrfilter, im folgenden kurz FO-Sperrfilter genannt. Die dichromatischen Teilerspiegel bewirken eine selektive Strahlenteilung: unterhalb einer bestimmten Wellenlänge wird das Licht fast verlustlos reflektiert, oberhalb dieser Wellenlänge aber fast verlustlos durchgelassen.

Das Erregerlicht fällt auf einen der Teilerspiegel, wird von diesem nahezu verlustlos reflektiert und durch das als Kondensor wirkende Beobachtungsobjektiv auf das Präparat konzentriert, wo es die Fluoreszenzstrahlung erregt. Die Fluoreszenzstrahlung hat in der Regel eine größere Wellenlänge als das Erregerlicht und kann daher den Teilerspiegel und das Sperrfilter ungehindert passieren. Der kleine, vom Objekt zurückgestreute Anteil des Erregerlichtes wird dagegen vom Teilerspiegel größtenteils aus der Beobachtungsrichtung abgelenkt, der Rest vom FO-Sperrfilter absorbiert.

Damit kein Licht höherer Wellenlänge, als es der Reflexionskante des Teilerspiegels entspricht, zum dichromatischen Teilerspiegel gelangen kann, müßte für jedes Fluorochrom ein spezielles Erregerfilter benutzt werden. Dies ist natürlich nur bedingt realisierbar. Es kann daher ein zweites Sperrfilter oder Selektionsfilter in den Fluoreszenzopak bzw. den Filterschlitz des Mikroskops eingebracht werden.

Alle in der Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskopie gebräuchlichen Sperrfilter sind anwendbar. Außerdem wurden die Sperrfilter K 570, K 580, K 590 und K 610 neu entwickelt. In diesem Bereich der Fluoreszenzstrahlung ermöglichen sie eine bessere farbige Differenzierung der verschiedenen Objektpartien. Die Filter K 590 und 610 sind besonders für die immer mehr zur Anwendung kommende Fluoreszenzanregung mit Grünlicht (546 nm) bestimmt.

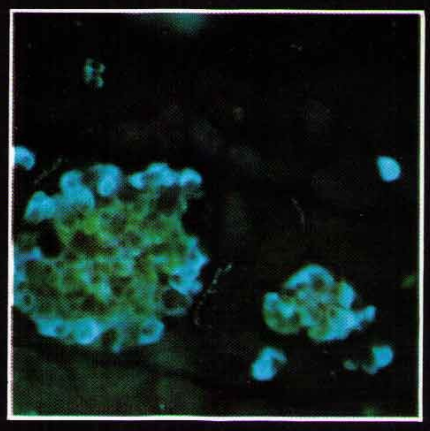


Abb. 1: Gefäßnerven mit Catecholamin-Fluoreszenz und Mastzellen mit 5-HT-Fluoreszenz.

Abb. 2 u. 3: Langerhans'sche Inseln im Pankreas mit Catecholamin und 5-HT-Fluoreszenz. Filter BG 38, 3 mm BG 3 und Al 405. Sperrfilter K 460.

Aufnahmen: Prof. B. Falck, Dr. Lennart Cegrell, Dr. Anders Björklund, Hist. Inst. Universität Lund.

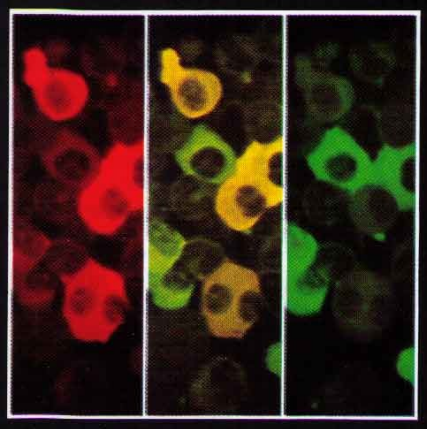


Abb. 4: Immunfluoreszenz von Knochenmarkzellen, Mensch. Benutzt wurde ein Anti-Kappa-Fluoresceinisothiocyanat-Konjugat und ein Anti-Lambda-Tetramethylrhodaminisothiocyanat-Konjugat. Anregung mit ultraviolettem, blauem und grünem Licht. Präparat und Aufnahme: H. R. E. Schuit und Dr. W. Hijmans, Leiden.

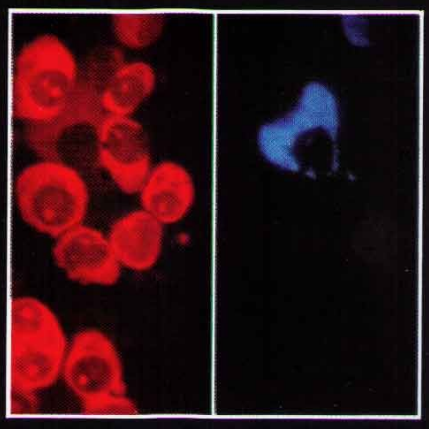


Abb. 5: Knochenmarkausstrich, Mensch. Färbung mit Methylgrün-Pyronin-Stilben. Anregung mit grünem und ultraviolettem Licht. Präparat und Aufnahme: N. Kors und B. Verburg-Verwoest, Amsterdam.

Abb. 6: Toxoplasmen, FITC-markiert. Präparat: Frauenklinik, Gießen. Aufnahme: H. Rühl, Labor Anwendung Mikro, Leitz-Werke.

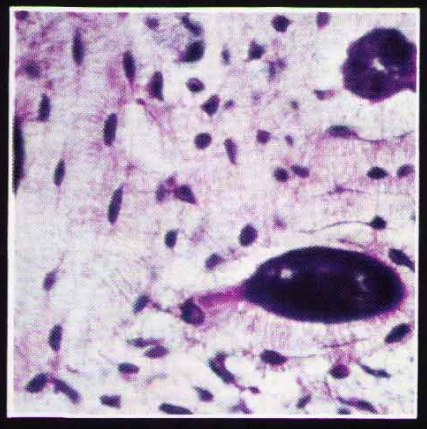


Abb. 7: Hellfeld-Durchlicht.

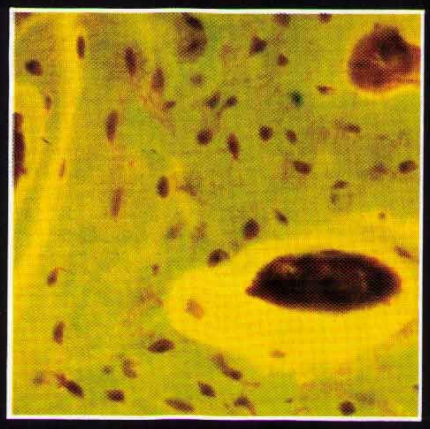


Abb. 8: Tetracyclin-Fluoreszenz bei Blaulichtanregung BG 12 und K 530.

Abb. 9: Fuchsin-Fluoreszenz bei Grünlichtanregung AL 546 und 4 mm BG 38 sowie Sperrfilter K 610.

Bildserie, bestehend aus 3 Bildern. Unentkalkter Knochenschnitt aus dem Femur eines 7jährigen Knaben. Färbung basisches Fuchsin und Tetracyclin-Markierung. Aufnahmen Priv.-Doz. Dr. J. Eichler, Oberarzt, Orthopädische Klinik, Gießen und Dr. F. Walter, Labor Anwendung Mikro, Leitz Werke.

Technische Ausstattung

Beleuchtungseinrichtung

Auflicht: Lampenhaus 100 Z mit Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 100 oder Xenon-Hochdrucklampe 75 W. Auch für quantitative Mikroskopie.

oder Lampenhaus 250 mit Hg-Höchstdrucklampe 200W oder Xenon-Hochdrucklampe 150W, falls ein kontinuierliches Emissionsspektrum gewünscht wird.

Durchlicht: Lampenhaus 250 mit Quecksilber-Höchstdrucklampe 200W oder Xe-Lampe 150W. Das Lampenhaus 250 ist nur erforderlich, wenn schwache Objektive im Durchlicht verwendet werden sollen oder wenn die Auflichtmethode mit Durchlicht kombiniert werden soll.

Das Lampenhaus 100 Z bzw. 250, kann oben direkt mit dem Stativ verbunden werden. Für Durchlicht ist wahlweise die Benutzung eines Spiegelhauses möglich. Einzelheiten siehe Preisliste.

Einige Vorschläge für Filterkombinationen

Erregerlicht	Erregerfilter*	Sperrfilter im Schieber
ultraviolett	2 mm UG 1	K 430
violett	3+3 mm BG 3	K 490
blau	3 mm BG 12	K 510/K 530

Optische Ausstattung

Zum Fluoreszenz-Auflichtilluminator werden zwei Objektivserien zu je 4 Objektiven geliefert: eine achromatische und eine apochromatische.

Beide Objektivserien sind für Auflicht-Fluoreszenz und für Durchlicht-Fluoreszenz geeignet.

Reihe 1
Achromate

170/0.17/45 mm
25/0.50
40/0.65
63/0.85
Öl 100/1.30

Reihe 2
Apochromate bzw.
Plan-Apochromate
170/0.17/37 bzw. 45 mm
Apo 16/0.40
Apo 25/0.65 mit Objektiv-Zwischenstück
Pl Apo 40/0.75
Apo 63/0.95 mit Objektiv-Zwischenstück

Zusätzlich kann zu beiden Reihen das Immersionsobjektiv Fl Öl 54/0.95 mit Objektiv-Zwischenstück Nr. 519164 angeboten werden. Okulare: Großfeld-Okulare GF, vorzugsweise 6,3 x.

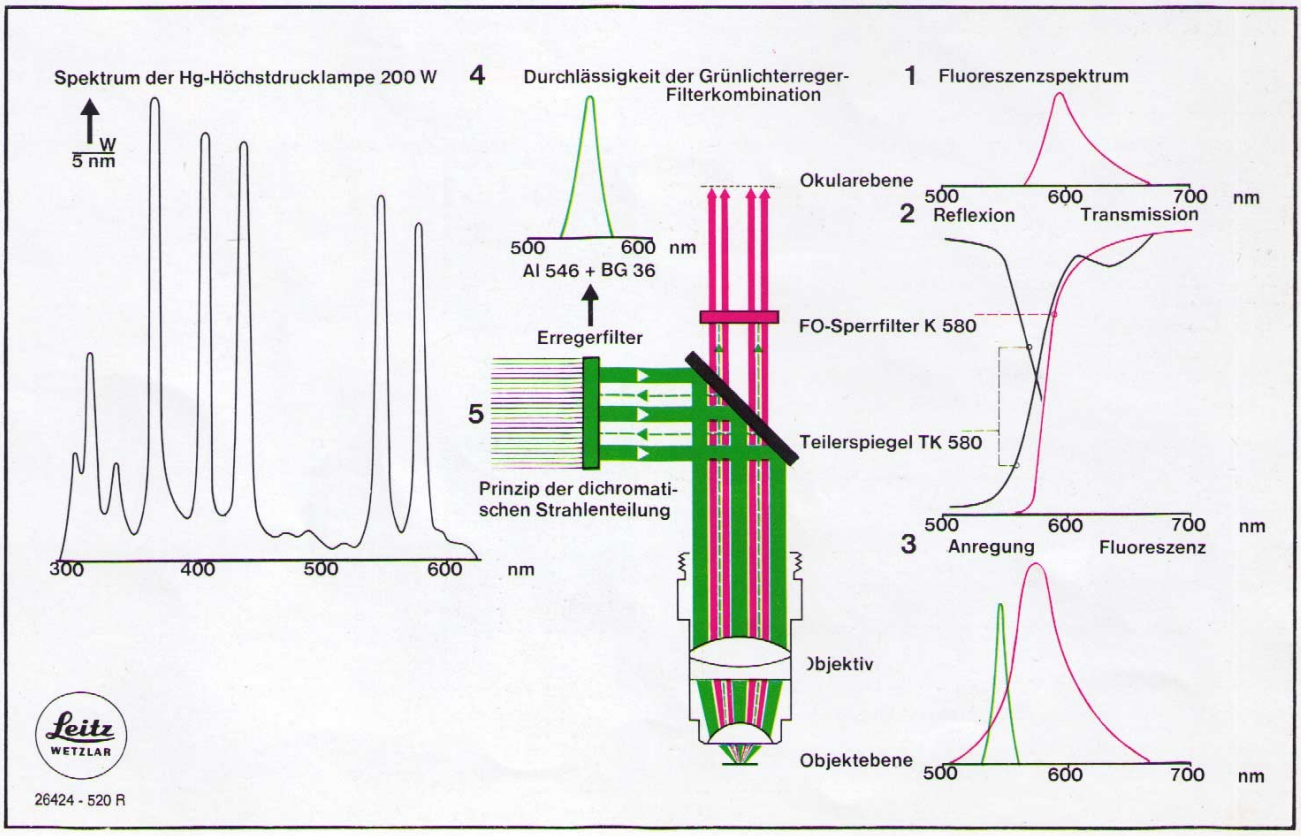
Filterprogramm

Aus den untenstehenden Tabellen kann der Benutzer einige der für seine Zwecke geeignete Erreger- und Sperrfilter ersehen. Die Erregerfilter werden in der Filterwechselvorrichtung des Lampenhauses bzw. direkt im Filterrevolver des Auflichtilluminators, die Sperrfilter im Filterschieber oberhalb der Objektive untergebracht.

Erforderliche Erregerstrahlung	Erregerfilter*	Dichromatischer Teilerspiegel	Eingebaute FO-Sperrfilter	Sperrfilter im Filterschieber
ultraviolett	2 mm UG 1	TK 400	K 400	K 430, 460, 470 490, 510, 530 570, 580, 590 610
violett	3 + 3 mm BG 3	TK 455	K 460	K 470, 490, 510 530, 570, 580 590, 610.
blau	3 mm BG 12 3+3 mm BG 12 oder 3+1.5 mm BG 12 ggf. für FITC 2 x KP 490	TK 495	K 495	K 510, 530, 570 580, 590, 610 K 510 oder AL 525 für FITC
grün	2 mm BG 36** + Interferenz-filter 546 nm	TK 580	K 580	K 590, 610

* Wärmeschutzfilter 2 mm KG 1 + Rotdämpfungsfilter 4 mm BG 38 in jedem Fall im Lampenhaus 100 Z oder 250 unterbringen.
** Zur Unterdrückung der Hg-Linien 577,0 und 579,1 nm.

Wirkungsweise der Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung bei Grünlichtanregung und Rotfluoreszenz.

1. Vom grünen Erregerlicht vollständig isoliertes Fluoreszenzspektrum von Tetramethylrhodaminisothiocyanat (pH 8).
2. Reflexionsvermögen des dichromatischen Teilerspiegels TK 580 (links). Durchlässigkeit des Teilerspiegels TK 580 und des Sperrfilters K 580 (rechts).
3. Die grüne Quecksilberlinie 546 nm wird vom Erregerfilter aus dem Quecksilberspektrum isoliert (grüne Kurve). Das Erregerlicht erzeugt in dem mit Tetramethylrhodamin (pH 8) fluorochromierten Objekt das Fluoreszenzspektrum (rote Kurve). Die Anregungsfunktion des Fluorochroms (nicht gezeichnet) hat ihr Maximum bei 548 nm, das Fluoreszenzspektrum bei 575 nm. Die Maxima liegen – wie bei den meisten Fluorochromen – dicht beieinander. Hier wird ein wesentlicher Vorzug des Fluoreszenz-Auflichtilluminators deutlich:

   Mit der im Auflicht erzielbaren Selektion ist es möglich, die Anregung in der Nähe des Anregungsmaximums durchzuführen und dann das vom Objekt reflektierte Erregerlicht völlig vom Fluoreszenzlicht zu isolieren. Ergebnis: Hohe Quantenausbeute, brillante Helligkeit der fluoreszierenden Objektpartien.
   Außerdem gelangt bei der Auflichtanregung der größte Teil des Erregerlichtes gar nicht erst in den Beobachtungsstrahlengang, sondern er wird nach unten abgelenkt. Ergebnis: Ausgezeichneter Fluoreszenzkontrast.
4. Durchlässigkeit der Erregerfilter AL 546 + 2 mm BG 36.
5. Prinzip der dichromatischen Strahlenteilung.
   Das mit dem Erregerfilter herausgefilterte grüne Quecksilberlicht wird vom dichromatischen Teilerspiegel TK 580 reflektiert, gelangt ins Objektiv und beleuchtet das Objekt senkrecht von oben (Auflichtanregung). Das längerwellige Fluoreszenzlicht passiert das Objektiv und wird jetzt vom dichromatischen Teilerspiegel TK 580 durchgelassen. Das eingebaute FO-Sperrfilter TK 580 hält die vom Teilerspiegel noch durchgelassenen Spuren von diffus reflektiertem Erregerlicht zurück.