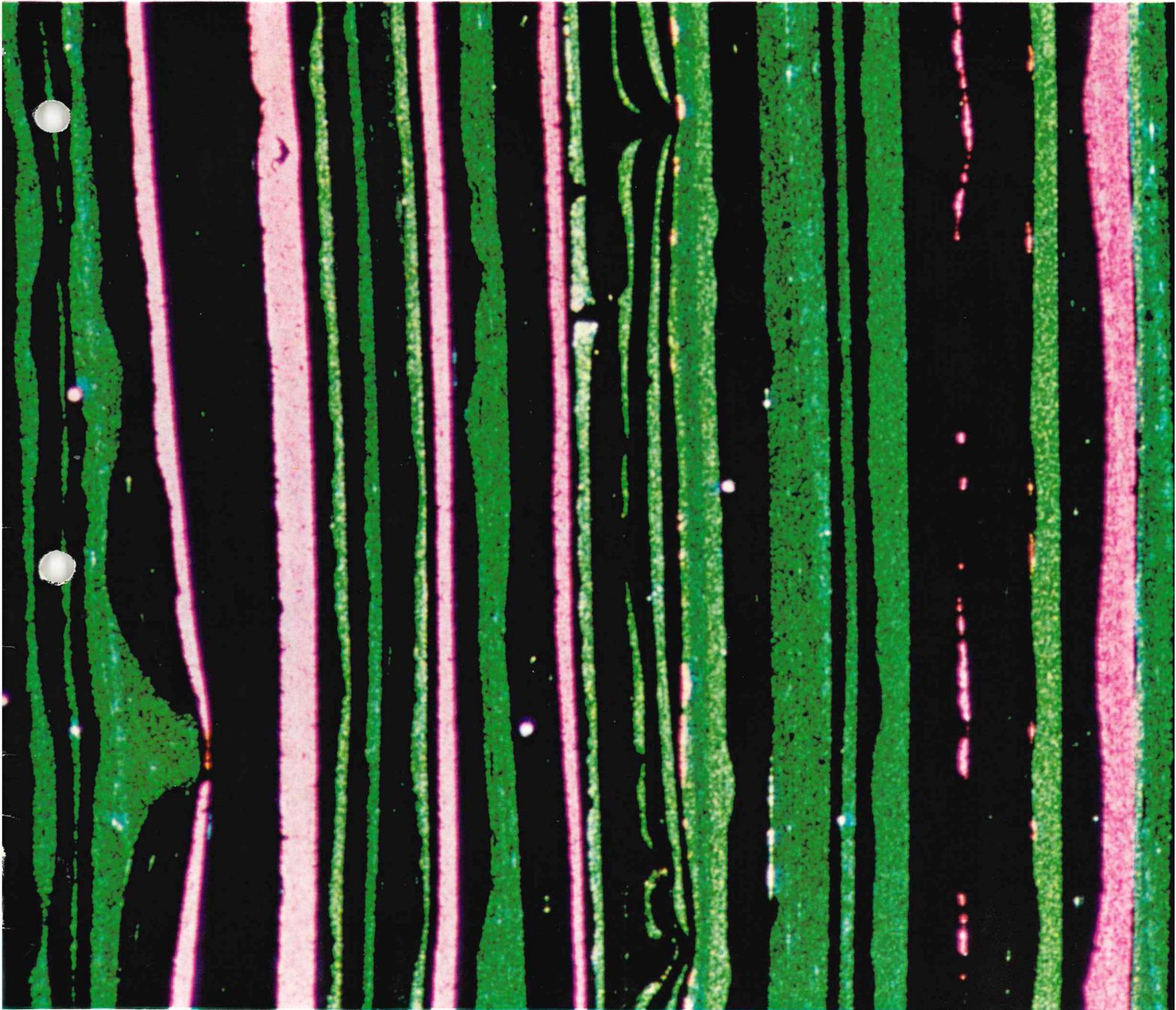




Mitteilungen

für Wissenschaft und Technik



Bd. V/Nr. 2



Originalbeiträge

- 33 Friedrich Walter
Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin
- 41 Winfried Kraft
Ein neues FITC-Erregerfilter für die Routinefluoreszenz
- 45 Friedrich Walter
Mikrotomtechnik im Industrie-Laboratorium
- 57 H.-R. Stützer
Eine Technik zur lichtmikroskopischen Darstellung der Struktur menschlicher Chromosomen
- 60 Monir Naguib
Eine Technik zur Isolierung von Bakterien-Reinkulturen mit Hilfe des Mikromanipulators
- 63 Literaturnotizen

Herausgeber:
ERNST LEITZ GmbH, WETZLAR

Schriftleitung:
Dr. G. Wangorsch, 633 Wetzlar, Tulpenweg 48

Zuschriften an:
ERNST LEITZ GmbH, WETZLAR
Red. LEITZ-Mitteilungen, Postfach 210, Tel. 06441 - 29 24 23
Diese Mitteilungen erscheinen in zwangloser Folge. Ein Band umfaßt jeweils 8 Hefte. Verfasser von Originalbeiträgen erhalten zusätzlich zum Honorar 100 Sonderdrucke. Nachdruck und Übersetzung nur mit Genehmigung der Schriftleitung.

Satz und Druck:
Brönners Druckerei Breidenstein KG, 6 Frankfurt/Main 1, Stuttgarter Straße 18-24

Einbanddecken und Sammelmappen:
Wenn Sie Ihre LEITZ-Mitteilungen geordnet sammeln, bleiben sie griffbereit auf Jahre hinaus. Übersichtlich angelegt, ermöglicht Ihnen Ihre Heftsammlung, jeden gewünschten Bericht oder Artikel sofort und mühelos herauszufinden. Sauber, unbeschädigt und lückenlos werden Ihnen die LEITZ-Mitteilungen für unbegrenzte Zeit von Nutzen sein.

Sammelmappen für den laufenden Jahrgang – aus grauer Plastikfolie mit Aufdruck und Einbanddecken – für abgeschlossene Bände – in Ganzleinen mit Goldprägung sind zu beziehen durch: UMSCHAU VERLAG, 6 Frankfurt/Main 1, Stuttgarter Straße 18-24.

Adressenänderung:
Im Interesse eines reibungslosen Versanddienstes bitten wir unsere Leser, Adressenänderungen rechtzeitig mitzuteilen und sowohl die neue als auch die alte Anschrift anzugeben. Für Angabe der Versandnummer (siehe Umschlag) wären wir ebenfalls dankbar.

LEITZ-Mitteilungen
für Wissenschaft und
Technik

Bd. V / Nr. 2
Seite 33-64
Wetzlar, Mai 1970

Titelphoto:

Querschnitt durch eine Mehrfach-Lackschicht. Darstellung der einzelnen Schichten. Direkter Trokenschnitt, 10 µm dick, Tesafilmmethode. LEITZ-Grundschlittenmikrotom Grundschlitten - Mikrotom 1300, Keilmesser. Einschluß des Schnittes in Rizinusöl. Mikroskopieverfahren: Durchlicht-Hellfeld.

Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin

von Friedrich Walter, Wetzlar*)

DK 535.822.5:57:61

Die Fluoreszenzmikroskopie in ihrer heutigen Anwendung auf dem Gebiet biologischer und medizinischer Forschung ist auf zwei Hauptziele gerichtet. Einmal geht es darum, in der Zelle und im Gewebe nach spezifischer Fluorochromierung bestimmte Substanzen oder Strukturelemente durch ihre charakteristische Fluoreszenz qualitativ nachzuweisen. Die andere Arbeitsrichtung ist quantitativ und als Fluorometrie, also Messung der Intensität einer Fluoreszenzstrahlung, bekannt.

Betrachten wir zunächst die qualitativen Methoden. Hier sind vor allem die immunologischen Verfahren zu nennen, welche Fluoreszenztracer wie z. B. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) benutzen. Es folgen die zytochemischen und histochemischen Fluoreszenzfärbungen. Hier gebraucht man Farbstoffe wie z. B. Auramin, Acridinorange, basisches Fuchsin, Pararosanilin oder als Fluorochrome Verbindungen wie das Tetrazyklin, um Zellstrukturen distinkt und mit hoher Nachweisempfindlichkeit darzustellen. Bei der histochemischen Färbung werden durch Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials mit chemischen Agenzien fluoreszierende Reaktionsprodukte erhalten. Das bekannteste, oft als Falk-Methode bezeichnete Verfahren dieser Art, stellt die Kondensation biogener Amine (Katecholamine, Hydrotryptamine) mit Formaldehyd dar.

Die Fluorometrie als quantitative Methode stützt sich auf die Tatsache, daß unter der Voraussetzung einer stöchiometrischen Fluoreszenzfärbereaktion die Intensität der Fluoreszenzstrahlung proportional der Stoffmenge ist und letztere dadurch meßbar wird. Die fluorometrische Bestimmung von DNA ist z. Z. das Hauptanwendungsgebiet der Methode. Die Fluorochromierung kann hier mit verschiedenen

Farbstoffen auf der Basis der Feulgen-Reaktion erfolgen, wodurch die erforderliche stöchiometrische Bedingung erfüllt werden kann. Bei der Anwendung anderer Färbetechniken ist dies bis heute leider noch nicht möglich.

Diese Entwicklungstendenzen der modernen Fluoreszenzmikroskopie prägen natürlich auch das Bild des mikroskopischen Instrumentariums neu. Der frühere Begriff des Fluoreszenzmikroskops schlechthin ist heute zu eng. Je nach dem Anwendungscharakter sind 3 Klassen von Fluoreszenzmikroskopen zu unterscheiden:

1. Das einfache Mikroskop für Routineuntersuchungen in der Diagnostik, vorzugsweise für Durchlicht-Dunkelfeld-Fluoreszenz.
2. Das qualifizierte Forschungsmikroskop für die Fluoreszenzmikroskopie im durchfallenden Licht und die moderne Aufricht-Fluoreszenzmikroskopie.
3. Das Mikroskop-Fluorometer, bestehend aus Forschungsmikroskop und Mikroskop-Photometer als Basisinstrumente sowie einem dem Untersuchungsziel entsprechenden Aufwand an Registrier- und Auswerte-Einrichtungen.

Um unter dem Aspekt dieser Klassifizierung die Beziehungen zwischen Anwendung der Fluoreszenzmethode und Technologie des Fluoreszenzmikroskops aufzuzeigen, sind Betrachtungen zur Frage des Beleuchtungsverfahrens, der Lichtquelle und der Lichtfilter notwendig.

Beleuchtungsverfahren

Zur Fluoreszenzanregung im durchfallenden Licht wird heute praktisch nur noch Dunkelfeldbeleuchtung angewandt. Entsprechend den hierfür bekannten Regeln über die Aperturbeziehung zwischen Kondensator und Mikroskopobjektiv kommen also der LEITZ-Dunkelfeldkondensator D 0.80 und der LEITZ-

*) Aus dem Laboratorium für Angewandte Mikroskopie der Ernst Leitz GmbH.

Immersionsdunkelfeldkondensator D 1.20 Ol zum Einsatz. Fluoreszenzanregung im auffallenden Licht erfolgt grundsätzlich nur mit dem LEITZ-Auflicht-Fluoreszenzilluminator nach Ploem. Über den Fortschritt, den die Einführung dieser Auflichtfluoreszenzanregung erbracht hat, wurde von PLOEM (1969) in den LEITZ-Mitteilungen für Wissenschaft und Technik, Bd. IV, Heft 8 ausführlich berichtet. Die Technologie des LEITZ-Fluoreszenzopak hat W. KRAFT im gleichen Heft dieser Zeitschrift beschrieben.

Es stellt sich nunmehr die Frage: Wo wird in der Praxis die eine und wo die andere Beleuchtungsart angewendet? Die Antwort hierauf ist abhängig davon, unter welchem Aspekt der Fluoreszenzmikroskopiker seine Untersuchungen im Einzelfalle betreibt, d. h. welche Aussagen er erwartet und welche weiteren Anwendungsmöglichkeiten der Methode er verfolgt. Nach unserer Kenntnis und Erfahrung kann man im allgemeinen folgendes feststellen:

Durchlicht-Dunkelfeld-Fluoreszenz ist für die Routine-Diagnostik in sehr vielen Fällen die Methode der Wahl. Das gilt sowohl für herkömmliche Verfahren, wie z. B. den TBC-Nachweis am mit Auramin fluorochromierten Präparat (HAGEMANN 1938) als auch für die mannigfachen Diagnostiktechniken auf der Basis der FITC-Antikörper-Fluoreszenz (CHERRY 1960, NAIRN 1962 und 1969). — Da man häufig für die mehr oder minder standardisierte Arbeit im klinischen Laboratorium einfache Fluoreszenzmikroskope der Klasse SM oder LABORLUX anschafft, ergibt sich die Entscheidung für das Durchlichtverfahren allein schon vom Instrument her.

Wird dagegen ein Forschungsmikroskop vom Typ ORTHOLUX oder ORTHOPLAN auch für die Routinearbeit eingesetzt, dann kann man heute schon in vielen Fällen den Trend zum leistungsfähigeren Auflichtverfahren erkennen; vorausgesetzt, daß die Notwendigkeit der Verwendung von Objektiven mittlerer (etwa ab 22fach) bis starker Vergrößerung besteht. Hier ist der LEITZ-Fluoreszenzopak allen anderen Illuminatoren deutlich überlegen in bezug auf Fluoreszenzausbeute, Selektionsmöglichkeiten spezifischer Anregungswellenlängen und Bedienungsmodus (vgl. z. B. WALTER 1964, LEITZ-Mitteilg. Wiss. u. Techn., Bd. II, Heft 7).

Der Grund, warum in der Fluoreszenzmikroskopischen Routinediagnostik schlechthin nicht nur das Auflichtverfahren zur Anwendung gelangt, liegt vor allem in den vergleichsweise höheren Anschaffungskosten eines Auflichtfluoreszenzmikroskops gegenüber einem Instrument für die Durchlichtmikroskopie.

Die Fluoreszenzmikroskopie in der Forschung und die Fluorometrie bedienen sich aufgrund des ausschließlichen Einsatzes der ausbaufähigen Forschungsmikroskope ORTHOLUX bzw. ORTHOPLAN bevorzugt der Fluoreszenzanregung durch auffallendes Licht — also Fluoreszenzopak nach Ploem. Aber auch das Durchlicht-Dunkelfeldverfahren kommt zusätzlich überall da zur Anwendung, wo es methodische Vorteile bietet. Dies ist besonders bei Beobach-

tungen im Bereich schwacher bis mittlerer Vergrößerungen der Fall. So wird man z. B. mit dem Objektiv 10/0.25 bei Dunkelfeld-Durchlicht mit Kondensator D 0.80 aufgrund der größeren Einstrahlungsenergie an Anregungsenergie ein helleres Fluoreszenzbild erhalten als mit dem Fluoreszenzopak, da das Objektiv hier ja gleichzeitig als Kondensator wirkt und seine Apertur eben um 0.55 geringer ist als die des Durchlicht-Dunkelfeldkondensators.

Die Fluoreszenzmikroskopie in der Forschung und die Fluorometrie werden demnach beide Beleuchtungsverfahren so einsetzen, daß zwischen den Vor- und Nachteilen ein Ausgleich angestrebt wird. Nicht zuletzt bestehen hier auch eine ganze Reihe von Möglichkeiten der Kombination beider Beleuchtungsarten — sei es Auflichtfluoreszenz mit Durchlicht-Phasenkontrast bzw. Polarisierung (GREHN und KORNMANN 1965) oder sei es Auflicht- und Durchlichtfluoreszenz gemeinsam (EICHLER und WALTER 1967).

An dieser Stelle noch ein paar Worte zur Frage der für Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Objektive und Okulare. Hier läßt sich keine Norm aufstellen. Man kann nur ganz allgemein auf das schon Bekannte hinweisen, also möglichst solche Objektive zu verwenden, die geringe bis keine Eigenfluoreszenz aufweisen! Dies ist bei fast allen modernen Mikroskopobjektiven der Fall. Objektive, bei denen eine fluoreszierende Glassorte notwendigerweise benutzt werden mußte, um ihnen bestimmte optische Eigenschaften zu verleihen, werden ohnehin nicht für fluoreszenzmikroskopische Zwecke angeboten. Wichtig im Falle der Auflichtfluoreszenz ist es, hochaperturige Systeme zu benutzen. Dies werden meist Immersionsobjektive sein, wobei Wasser- und Ölimmersionen gebräuchlich sind (vgl. PLOEM 1969). Die Okulare haben auf die Helligkeit des Fluoreszenzbildes auch einen wesentlichen Einfluß. Je geringer die Okularvergrößerung ist, um so brillanter wird das mikroskopische Bild erscheinen. Wir empfehlen daher, vorzugsweise Okulare mit 6,3facher Vergrößerung zu verwenden. Dieser Einfluß des Okulars ist auch im Rahmen der Fluoreszenz-Mikrophotographie zu beachten!

Lichtquellen

Gasentladungslampen vom Typ der Quecksilber- und Xenon-Hochdrucklampen stehen nach wie vor an der Spitze aller für die Fluoreszenzmikroskopie und die Fluorometrie infrage kommenden Lichtquellen. Die Xenon-Hochdrucklampen (z. B. XBO 150, XBO 75) besitzen ein nahezu kontinuierliches Spektrum. Sie eignen sich daher besonders für die Fluoreszenzanregung vom UV an über den gesamten sichtbaren Spektralbereich, d. h. man kann mit Hilfe von Interferenz- bzw. Interferenzverlauffiltern oder eines Monochromators alle erforderlichen Wellenlängen mit einer befriedigenden Intensität selektieren. Dies ist besonders in der Fluorometrie von Bedeutung.

Die Quecksilberhochdrucklampen (z. B. HBO 200, HBO 100) mit ihren charakteristischen Linienspektren besitzen gegenüber den Xenonlampen eine höhere Intensität in den Linien, fallen aber in den Wellenlängenabschnitten dazwischen stark ab. Sie werden jedoch gerade wegen ihrer hohen Intensitäten im UV, Violett, Blau und Grün für die qualitative Fluoreszenzmikroskopie allgemein bevorzugt und sind — wenn sie gleichstrombetrieben stabilisiert brennen — auch für die Fluorometrie von Interesse.

Die Ausrüstung eines Fluoreszenzmikroskops mit Gasentladungslampen erfordert immer einen gewissen Kostenaufwand. Für die Zwecke der Forschung und der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie ist dies aufgrund des Leistungsumfanges solcher Lichtquellen in jedem Fall vertretbar. Eine wesentlich gewichtigere Rolle spielt die Kostenfrage bei den einfachen Fluoreszenzmikroskopen für die Routine-Diagnose. Hier wird die teure Quecksilberlampe mehr und mehr durch die erstmals von YOUNG und ARMSTRONG (1967) für die Routinefluoreszenzmikroskopie vorgeschlagene Halogen-Glühlampe ersetzt werden. Diese Tendenz tritt heute wieder in verstärktem Maße hervor durch die in letzter Zeit von RYGAARD und OLSEN (1969) durchgeführten Versuche der Entwicklung eines speziellen Fluoreszenz-Erregerfilters, das z. B. in Verbindung mit einer Halogen-Glühlampe verwendbar ist. Die Halogen-Glühlampe imponiert durch die Vorteile preiswert zu sein, ein kontinuierliches Spektrum zu besitzen und für die Photometrie bei Blauanregung (PLOEM 1969) und bei Grünanregung (= Rotfluoreszenz) sehr gut stabilisiert werden zu können. Ihre Nachteile sind aber die gegenüber den Gasentladungslampen um eine Größenordnung (1:10) tiefer liegende Intensität der Gesamtstrahlung (also geringere Anregungsenergie) und ihr fehlender bzw. zu schwacher Strahlungsanteil im UV und Violett. Somit ist die Halogen-Glühlampe wohl doch in erster Linie als Lichtquelle für die einfachen Routine-Fluoreszenzmikroskope zu empfehlen. Für das Fluoreszenz-Forschungsmikroskop kommt sie, wenn überhaupt, nur als sekundäre Lichtquelle in Frage — ebenso in der Fluorometrie.

In der Abbildung 1 sind die Ergebnisse eines von uns durchgeführten Intensitätsvergleichs der verschiedenen, für die Fluoreszenzmikroskopie zur Verfügung stehenden Lichtquellen graphisch dargestellt. Als Bezugsbasis für die Messungen diente die stabilisierte 30-W-Niedervoltlampe. Zunächst fällt der schon beschriebene Unterschied zwischen Gasentladungslampen und Halogen-Glühlampe ins Auge. Es wird aber auch überraschen, daß die Gasentladungslampen mit geringerer Leistungsaufnahme, z. B. XBO 75, gegenüber Lampen ähnlichen Typs mit höherer Leistungsaufnahme, z. B. XBO 150, eine bessere Lichtausbeute zeigen.

Hierzu sei bemerkt, daß die Leistungsaufnahme der Lampe allein für den mikroskopischen Gebrauch keine Beurteilung erlaubt: Bei Köhler'scher Beleuchtung wird die Lichtquelle (Entladungsbogen) in

die Eintrittspupille der Beleuchtungsoptik (Kondensator) abgebildet. Entscheidend für die jeweilige Beleuchtungsintensität im Mikroskop ist daher nicht nur die Leuchtdichte der benutzten Lichtquelle, sondern auch das Größenverhältnis von Eintrittspupille zum darin abgebildeten Lichtquellenbild. Ist also in der Ebene der Eintrittspupille des Kondensators das projizierte Bild der Lichtquelle z. B. wesentlich größer als die Eintrittspupille, dann wird nur ein Bruchteil der zur Verfügung stehenden Intensität ausgenutzt.

Die Messungen wurden am Mikroskop-Photometer MPV unter Verwendung des Pol-Opak vorgenommen. Die in Abb. 1 gezeigten Kurven gelten aber auch in etwa für den Fluoreszenzopak nach Ploem. In diesem Fall ist die Eintrittspupille des Beleuchtungssystems relativ klein. Deshalb wird von den relativ großen Lichtbogen der XBO 150 und HBO 200 nur ein Teil herausgeschnitten.

Werden für das gleiche Beleuchtungssystem die XBO 75 bzw. die HBO 100 mit den kleineren Lichtbogen und der höheren Leuchtdichte benutzt, dann ist der Wirkungsgrad wesentlich größer, so daß beim Intensitätsvergleich diese Lampen gegenüber XBO 150 bzw. HBO 200 besser abschneiden. Wiederholten wir den Lampenvergleich mit einem Durchlichtkondensator (z. B. D 1.20), der ja eine größere Eintrittspupille besitzt, dann würden aufgrund der besseren Ausnutzung der Leuchtfläche XBO 150 bzw. HBO 200 gegenüber XBO 75 bzw. HBO 100 die höheren Intensitäten zeigen.

Für unsere Messungen haben wir mit einer Halbwertsbreite von ca. 2 nm (Monochromator) gearbeitet.

Bei der Fluoreszenzanregung werden aber nicht solche schmalen Halbwertsbreiten verwendet, sondern es werden in der Regel solche von 20 nm, häufig sogar mehr, benutzt. Für einen Vergleich müßten wir daher die Flächen unter den Kurven, die der benutzten Bandbreite entsprechen, heranziehen. Dies ergibt natürlich bei dem hier verwendeten logarithmischen Maßstab ein schwer interpretierbares Bild. Wenn man zur besseren Veranschaulichung die Intensitätsvergleiche mit einer Halbwertsbreite von 20 nm wiederholt, läßt es sich zeigen, daß die Quecksilberlampen im Bereich ihrer Maxima immer noch eine ca. 5- bis 8fache Intensität gegenüber den entsprechenden Xenonlampen aufweisen.

Die Intensität der Halogen-Glühlampe dagegen liegt, wie bereits oben gesagt, um eine Größenordnung tiefer. — Die 30-W-Niedervoltlampe ist für die Fluoreszenzanregung nicht brauchbar.

Noch ein paar Worte zur Frage der Stabilität dieser Lichtquellen:

Als Richtwerte für Intensitätsschwankungen in einer Stunde können aufgeführt werden

- Halogen-Glühlampen (12 V/100 W) $\pm 0,1\%$
- Gleichstrom-Gasentladungslampen (XBO 75, XBO 150, HBO 100) $\pm 1\%$
- Wechselstrom-Gasentladungslampen (HBO 200) $\pm 10\%$

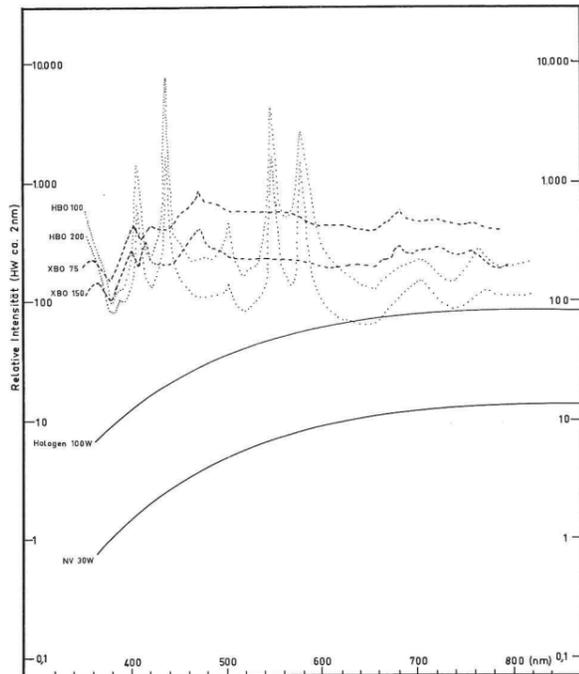


Abb. 1: Spektrale Intensitätskurven der für die Fluoreszenzmikroskopie benutzten Lichtquellen. Bezugsbasis: Niedervoltleuchte 6 V 30 W.

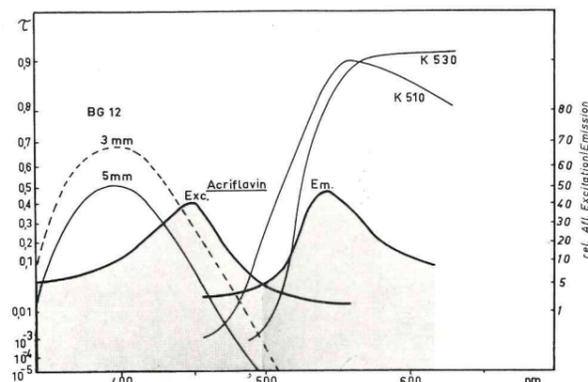


Abb. 2: Acriflavin-Fluoreszenz; Breitbandanregung mit durchfallendem Licht (Näheres im Text).

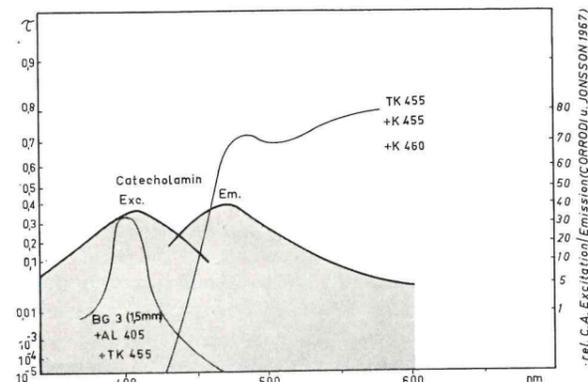


Abb. 3: Katecholamin-Fluoreszenz; Schmalbandanregung mit LEITZ-Auflicht-Fluoreszenzilluminator nach Ploem (Näheres im Text).

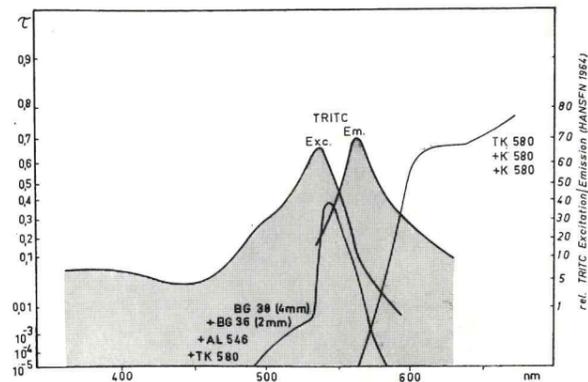


Abb. 4: TRITC-(Tetramethylrhodaminisothiocyanat-)Fluoreszenz; Schmalbandanregung mit LEITZ-Auflicht-Fluoreszenzilluminator nach Ploem (Näheres im Text).

Die Stabilität von Gasentladungslampen hängt erheblich von der Einbrennzeit ab. Unbedingt empfehlenswert ist es, die Lampe während der ersten 30 Brennstunden nicht auszuschalten! Durch sehr sorgfältiges Einbrennen gelang es uns bei einer XBO 150, eine Stabilität von $\pm 0,2\%$ zu erreichen.

Filter

Der Trend der Fluoreszenzmikroskopie zum spezifischen Nachweisverfahren und zur quantitativen Methode hat die Frage der Beziehung Lichtquelle/Filter und die der optimalen Kombination von Erregerfilter und Sperrfilter in den Mittelpunkt der Diskussion gerückt. Während früher das Präparat mehr oder weniger unkritisch bei einer vorgegebenen Lichtquelle und Filterkombination untersucht und interpretiert wurde, beschreitet man heute den umgekehrten Weg: Man geht vom Präparat, d. h. vom Fluorophor oder Fluorochrom aus und legt nach Ermittlung der spektralen Werte für Excitation (= Anregung) und Emission (= Fluoreszenz) die notwendige Filterzusammenstellung in Verbindung mit der Lichtquelle fest.

Unter den Filtersystemen unterscheiden wir mit PLOEM (1969)

1. Kombinationen von Erregerfiltern mit Sperrfiltern für Fluoreszenz mit Breitbandanregung und
2. Kombinationen von sog. Primärfiltern (lampenseitig) mit sog. Sekundärfiltern (beobachtungsseitig) für Fluoreszenz mit Schmalbandanregung.

Wir wollen im Folgenden die Termini „Breitbandfluoreszenz“ und „Schmalbandfluoreszenz“ verwenden.

Breitbandfluoreszenz ist die klassische Methode der Ausfilterung von Erregerlicht mit Hilfe von gefärbten Glasfiltern (UG-Filter, BG-Filter u. ä.) und der Öffnung eines Durchlaßbereiches für Fluoreszenzlicht ab einer bestimmten Wellenlänge durch die üblichen Kantensperrfilter. Sie wird im Durchlicht wie im Auflicht überall da angewendet, wo Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms

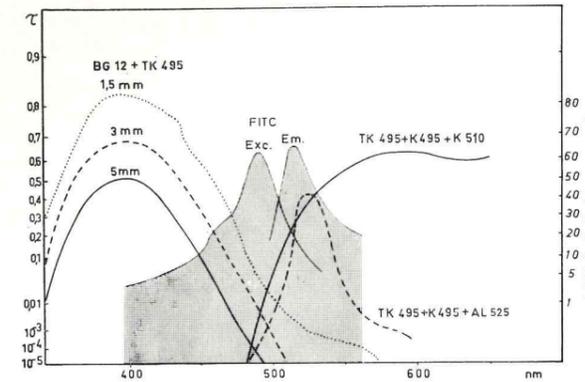


Abb. 5a: FITC-(Fluoresceinisothiocyanat-)Fluoreszenz; Breitbandanregung mit LEITZ-Auflicht-Fluoreszenzilluminator nach Ploem (Näheres im Text).

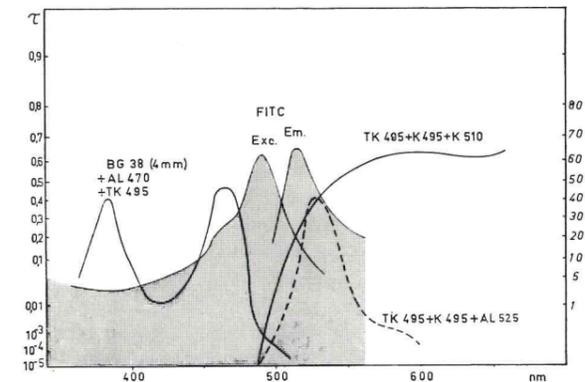


Abb. 6a: FITC-(Fluoresceinisothiocyanat-)Fluoreszenz; Schmalbandanregung mit Interferenzbandfilter, LEITZ-Auflicht-Fluoreszenzilluminator nach Ploem (Näheres im Text).

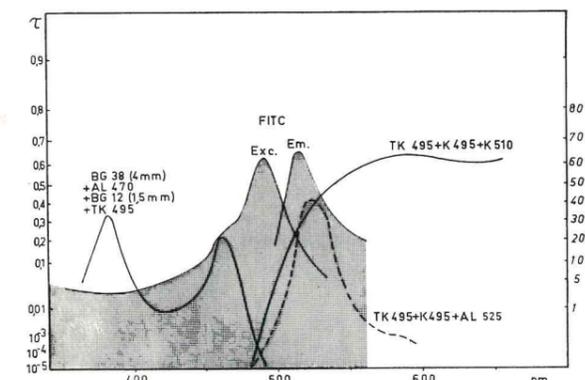


Abb. 7a: FITC-(Fluoresceinisothiocyanat-)Fluoreszenz; Schmalbandanregung mit Interferenzbandfilter und Farbglasfilter, LEITZ-Auflicht-Fluoreszenzilluminator nach Ploem (Näheres im Text).

weit auseinanderliegen. Mit Hilfe der breiten Durchlaßbereiche der Erregerfilter kann daher die Fluoreszenz im oder in der Nähe des Maximums mit hin-

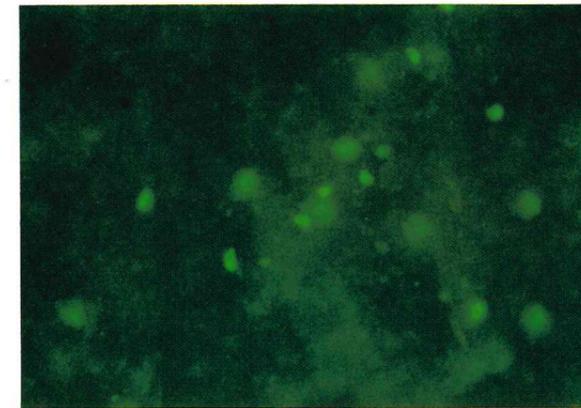


Abb. 5b: FITC-Fluoreszenzbild (Toxoplasmen) im Mikroskop bei Anregung gemäß Abb. 5a.

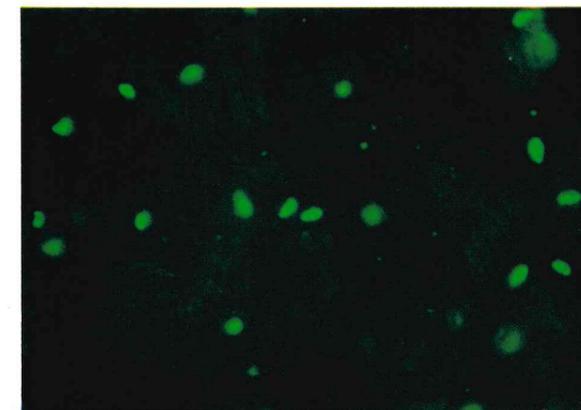


Abb. 6b: FITC-Fluoreszenzbild (Toxoplasmen) im Mikroskop bei Anregung gemäß Abb. 6a.

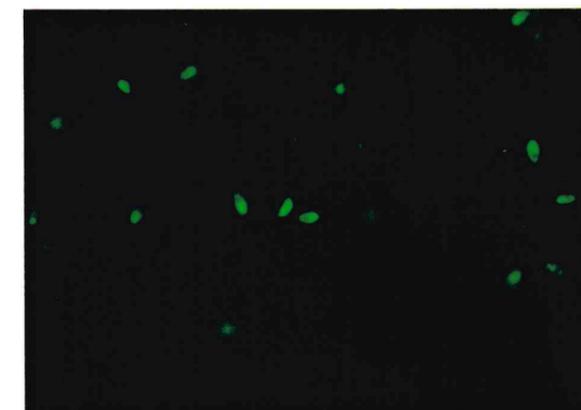


Abb. 7b: FITC-Fluoreszenzbild (Toxoplasmen) im Mikroskop bei Anregung gemäß Abb. 7a.

reichender Energie angeregt werden, ohne daß eine Beeinflussung des emittierten Fluoreszenzlichtes durch die Erregerstrahlung erfolgt. Das bedeutet, be-

obachtungsseitig kann also ein Sperrfilter gewählt werden, das auf Grund seiner Kantenlage die Erregerstrahlung praktisch völlig sperrt, jedoch das Maximum der Fluoreszenzstrahlung und somit die „echte“ Farbe des Fluoreszenzlichts voll erfaßt. Abbildung 2 zeigt hierzu einen typischen Fall am Beispiel der Fluoreszenz von Acriflavin, einem dem Acridinorange-Farbstoff chemisch verwandten Fluorochrom. Die beiden Maxima von Anregung und Emission liegen ca. 100 nm weit auseinander. Somit können ein Erregerfilter BG 12 (3 mm) und ein Sperrfilter K 510 oder K 530 als effektvolle Breitbandfluoreszenz-Kombination gewählt werden.

Abbildung 3 ist geeignet, die Notwendigkeit des Übergangs von Breitbandfluoreszenz auf Schmalbandfluoreszenz zu demonstrieren. In unserem Beispiel handelt es sich um die von FALK u. a. (1962) entwickelte Nachweismethode des Katecholamins durch seine Fluoreszenz. Anregungs- und Emissionsmaximum von Katecholamin liegen wesentlich näher zusammen als die Maxima des Acriflavins in unserem ersten Beispiel. Mit anderen Worten, die Fluoreszenzanregung muß mit violettem Licht etwa bei 410 nm erfolgen, und die Fluoreszenz selbst wird im Bereich des Maximums um 470 nm als blaue Strahlung zu beobachten sein (vgl. PLOEM 1969). Würde man Breitbandanregung mit einem Filter BG 12 betreiben, etwa wie im Acriflavin-Beispiel, dann wäre die blaue Fluoreszenz des Katecholamins durch das vom Erregerfilter noch mit durchschlagende Blaulicht völlig unterdrückt. Man müßte, um überhaupt noch etwas an Fluoreszenz beobachten zu können, durch die Wahl eines das Erregerlicht absorbierenden Sperrfilters K 510 bzw. L 530 in den grünen bzw. gelben Bereich des Spektrums ausweichen. Die dann erfaßte Fluoreszenz des Katecholamins in diesem Spektralbereich ist aber nicht mehr als Kriterium voll anwendbar. Geht man dagegen zur Schmalbandfluoreszenz über, die sich durch Verwendung der Kombination eines Interferenzbandfilters von definiertem Transmissionsmaximum (Halbwertsbreite von 20 bis 25 nm) mit einem Glasfilter als sog. Primär-Erregerfilter auszeichnet, so ergeben sich die in Abbildung 3 dargestellten Verhältnisse. Hierbei ist zu beachten, daß Schmalbandfluoreszenz unter Verwendung von Interferenzfiltern — die ja eine geringere Transmission als normale Glasfilter besitzen — neben dem Betrieb von Lichtquellen mit hoher Intensität, vor allem den Übergang zur Auflicht-Fluoreszenzanregung, also zum LEITZ-Fluoreszenzopak nach Ploem, als vorteilhaft postuliert. Damit erreicht man den bestmöglichen Nutzeffekt in bezug auf den dem Präparat zuzuführenden Betrag an Anregungsenergie. So haben wir in Abbildung 3 die Kurven für die Primärfilter BG 3 + AL 405 und das Sekundärfilter K 460 unter Berücksichtigung der Wirkungsweise von Interferenzteilerplättchen TK 455 und Sperrfilter K 455 des Fluoreszenzopaks gezeichnet. Das Diagramm zeigt die selektive Anregung der Katecholaminfluoreszenz im Bereich des Maximums und das ungestörte Erfassen des Fluoreszenzmaximums im Blaubereich durch ein geeignetes Sekun-

där-Sperrfilter. Die grüne und gelbe Komponente der Fluoreszenzemission wird dabei auch durchgelassen, jedoch von der intensiveren Blaufluoreszenz überlagert.

Sehr instruktiv zeigen zum Beispiel die in Band IV, Heft 8 der LEITZ-Mitteilungen für Wissenschaft und Technik auf den Seiten 236 und 248 bis 249 veröffentlichten Mikrophotos von Katecholaminfluoreszenzen den Unterschied zwischen Schmalband- und Breitbandanregung.

Ein weiteres typisches Beispiel für Schmalbandfluoreszenz zeigt Abbildung 4. Hier handelt es sich um die Anregung der Rotfluoreszenz von Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) — einem Antikörper-Fluoreszenztracer — durch grünes Licht bei 546 nm. Die TRITC-Maxima liegen hier so dicht, daß die primärfilterseitige Kombination des Interferenzbandfilters Al 546 mit den Glasfiltern BG 38 und BG 36 nötig wird, um die Anregungsstrahlung im Bereich des Emissionsmaximums von TRITC abzuschneiden. Wie aus dem Diagramm weiterhin ersichtlich ist, kann als Fluoreszenz wegen der Lage der Maxima und den Gegebenheiten der Primärfilter-Kombination zwar nicht das gelbe Emissionsmaximum, aber eine kräftige rotorange oder rote Fluoreszenzfarbe (PLOEM 1969) beobachtet werden, da man über einem Sperrfilter K 590 bzw. K 610 beobachten muß.

Schließlich wollen wir uns noch speziell der Filterkombination für die Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Fluoreszenz zuwenden. Diese Untersuchungstechnik besitzt von allen Methoden der Immunofluoreszenz z. Z. die größte Anwendungsbreite. Insbesondere in der Diagnostik der Infektionskrankheiten hat sie sich einen imponierenden Platz erobert (siehe z. B. CHERRY 1960, NAIRN 1969, WALTER 1968, PLOEM 1969).

Die Maxima der Anregung und der Emission liegen bei FITC sehr dicht beieinander. Würde man für die Fluoreszenzanregung übliche Farbglasfilter oder Interferenzbandfilter benutzen, deren Transmissionsmaximum mit dem FITC-Anregungsmaximum etwa zusammenfällt, dann entstünden erhebliche Schwierigkeiten auf der Sperrfilterseite. Die Erregerfilter störtten aufgrund ihrer symmetrischen Transmissionscharakteristik die FITC-Fluoreszenzstrahlung empfindlich, und ein Sperrfilter, das ja im oder in der Nähe des Emissionsmaximums des Fluorochroms hohe Durchlässigkeit erfordert, würde wirkungslos. Daher muß man bei Verwendung von Erregerfiltern mit symmetrischer Durchlaßkurve den Schwerpunkt der Anregung nicht in das FITC-Hauptmaximum bei ca. 490 nm legen, sondern in das Nebenmaximum bei etwa 470 nm. Die von dem Farbstoff bei dieser Wellenlänge absorbierte Anregungsenergie reicht völlig aus, um eine entsprechende, helle FITC-Fluoreszenz zu erzielen und vor allem letztere mit Hilfe geeigneter Sperrfilter (z. B. K 510, K 530 oder Interferenzfilter AL 525 bzw. 530) im Bereich des Emissionsmaximums zu selektieren. Die Verhältnisse sind in den Abbildungen 5 bis 7 für den Fall der FITC-Auflichtfluoreszenz mit Fluoreszenzopak nach PLOEM dar-

gestellt. In den Kurvendarstellungen sind wiederum die Durchlässigkeitswerte für Primär- und Sekundärfilter unter Berücksichtigung des Interferenzteilerplättchens und des Sperrfilters im Ploem-Opak gezeichnet. Abbildung 5a zeigt die früher übliche Verwendung von Blauglasfiltern (BG 12) zur Breitbandanregung des Fluoresceinisothiocyanats. Zweckmäßigerweise benutzt man ein BG-12-Filter von 3 oder 5 mm Dicke, um die Transmission bei etwa 500 nm abzuschneiden. Diese Filter haben den Nachteil, aufgrund ihres relativ hohen Durchlässigkeitsmaximums bei ca. 400 nm dort eine unspezifische Fluoreszenz neben der FITC-Hauptfluoreszenz anzuregen, die sich als Störung des Untergrunds im mikroskopischen Bild auswirkt und durch Verwendung einer Sperrfilterkombination TK 495/K 495 (Opak) + K 510 (Mikroskoptubus) voll sichtbar wird (Abb. 5b). Wird anstelle des Sperrfilters K 510 ein Interferenzbandfilter (z. B. Al 525) benutzt, so führt das zu einer wesentlichen Verbesserung des Bildes, da diese Filterkombination ab 540 nm recht gut sperrt. Dennoch läßt sich im Mikroskop aufgrund des starken Maximums des BG-Filters noch immer ein Teil der unspezifischen Fluoreszenz beobachten.

Um zu einer entscheidenden Verbesserung des Bilduntergrundes durch Schmalband-Anregung zu gelangen, benutzt man heute speziell in der Auflichtfluoreszenz anstelle der Farbglasfilter primär ein Interferenzbandfilter AL 470 in Kombination mit den Farbglasfiltern BG 38 (4 mm) und BG 12 (1,5 mm). Dadurch gelingt es, die Kontrastverhältnisse im Präparat um ein Vielfaches zu verbessern, d. h. einen praktisch schwarzen Präparathintergrund zu erzeugen und nur die apfelgrüne FITC-Hauptfluoreszenz zu selektieren. Dies ist in Abbildung 7a und 7b dargestellt. Benutzt man nur das Interferenzbandfilter allein als Primärfilter, so wird man gemäß Abbildung 6a wegen der Überlappung des rechten Schenkels der Durchlässigkeitskurve AL 470 + TK 495 und der Sperrfilterkurven (TK 495 + K 495 + K 510 bzw. AL 525) eine Aufhellung des Bilduntergrundes erhalten, die in Abbildung 6b gezeigt ist.

Zusammenfassend läßt sich für den Fall der FITC-Fluoreszenz feststellen, daß auch hier die Schmalbandanregung, wie sie PLOEM (1969) vorschlägt, und die Selektion der spezifischen Fluoreszenzstrahlung durch ein Interferenzsperrfilter klar definierte mikroskopische Bilder liefert.

Es ist klar, daß die beschriebenen Filterkombinationen auf der Anregungsseite den Einsatz einer Hochleistungslichtquelle, also einer Gasentladungslampe erfordern. Im Rahmen der Anwendung des Fluoreszenzmikroskops in der FITC-Routine-Diagnostik besteht jedoch, wie bereits gesagt, teilweise der verständliche Wunsch, ein einfacheres Mikroskop mit einer Halogen-Glühlampe einzusetzen. Hierbei ergeben sich auf der Filterseite insofern Schwierigkeiten, als die Intensität der Halogen-Glühlampe im Blau nicht ausreicht, um mit einem Blauglasfilter oder einem Interferenzbandfilter bei 470 nm genügend Anregungsenergie auf das Präparat zu bringen. Es ist daher notwendig, direkt im FITC-Anregungs-

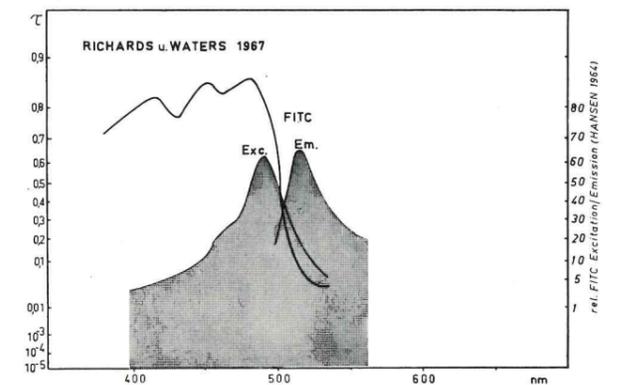


Abb. 8: FITC-Fluoreszenz; Anregung mit Spezialfilter nach Richards u. Waters 1967 (Näheres im Text).

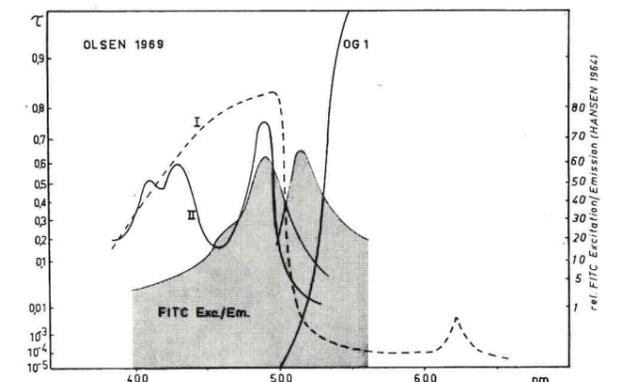


Abb. 9: FITC-Fluoreszenz; Anregung mit Interferenzfilter nach Rygaard und Olsen 1969. Kurve I: Nach Angaben der Autoren (s. Lit.), Kurve II: Transmissionsmessung an einem gelieferten Filter (weitere Erläuterungen im Text).

maximum um 480 bis 490 nm zu arbeiten. So hat es nicht an Versuchen gefehlt, Filter mit hoher Transmission in diesem oder bis zu diesem Wellenlängenbereich zu entwickeln, deren Kurven jedoch dann in den folgenden Bereichen ab 500 nm möglichst steil in der Durchlässigkeit abfallen. RICHARDS und WATERS (1967) haben ein solches speziell für die FITC-Fluoreszenz entwickeltes asymmetrisches Filter erstmals beschrieben (Abb. 8). RYGAARD und OLSEN (1969) stellen ein Interferenzfilter mit ähnlicher Charakteristik vor (Abb. 9). Dieses Filter besitzt im Rot noch eine Transmission (s. Abb. 9), die als besonders vorteilhaft für den farbigen Bildkontrast hervorgehoben wird.

LEITZ wird in Kürze ebenfalls ein solches „Filter für FITC-Fluoreszenz“ liefern (vgl. Arbeit von W. KRAFT im vorliegenden Heft). Dabei ist allerdings dann keine so hohe Transmission mehr im Rot vorhanden, da wir diese nicht als Kriterium für ein zur FITC-Fluoreszenz geeignetes Filter ansehen. Entscheidend ist die hohe Transmission bei 490 nm und der steile Abfall der Durchlässigkeit ab 500 nm. Mit einem solchen asymmetrischen Interferenzfilter kann dann ein geeignetes Sperrfilter, also in unserem Falle K 510 oder AL 525 + K 495, kombiniert werden. Das von RYGAARD und OLSEN (1969) an-

gegebene Farbglas OG 1 mit einer Kantenlage τ 45°/0 bei 530 nm (vergl. Abb. 9) ist als Sperrfilter nicht so gut geeignet, da es im Bereich des Emissionsmaximums von FITC eine geringere Durchlässigkeit besitzt. Insgesamt gesehen, sind also für die FITC-Routinefluoreszenzmikroskopie und im Prinzip dann auch für andere Fluorochromierungen wie z. B. TBC Auramin ebenfalls Möglichkeiten gegeben, mittels einer Halogen-Glühlampe und geeigneten Filtern mit entsprechender asymmetrischer Durchlaßcharakteristik helle, kontrastreiche und vor allem klar zu interpretierende fluoreszenzmikroskopische Bilder zu erhalten.

Zum Abschluß sei das Ergebnis unserer Betrachtungen noch einmal in einer Übersichtstabelle zusammengefaßt.

Anschrift des Verfassers: Dr. Friedrich Walter, Ernst Leitz GmbH Wetzlar, Labor ANWENDUNG MIKRO.
Meinen Mitarbeitern danke ich für die Hilfe bei der Aufstellung der Lichtquellen- und Filterkurven.

Literatur:

- Cherry, W. B., M. Goldmann and T. R. Carski:** Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of Communicable Diseases; US Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service Publication No. 729 (1960).
Corrodi, H. and J. Jonsson: The Formaldehyde Fluorescence Method for the Histochemical Demonstration of Biogene Monoamines. *Journ. Histochem. and Cytochem.* **15** (1967), 65.

- Eichler, J. und F. Walter:** Ein Beitrag zur Fluoreszenzmikroskopie des Knochengewebes. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn.* **4** (1967), 110.
Falck, B. N. A. Hillarp, G. Thieme and A. Torp: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *Journ. Histochem. and Cytochem.* **10** (1962), 348.
Grehn, J. und H. Kornmann: Kontrastfluoreszenz mit Opak-Illuminator. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn.* **3** (1965), 108.
Hagemann, P. K. H.: Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. *Münchener Medizin. Wochenschr.* **85** (1938), 1066.
Hansen, P. A.: Fluorescent Compounds used in Protein Tracing Absorption and Emission Data. Arbeitsbericht des Dept. of Microbiology, University of Maryland. Sept. 1964 (nicht im Handel erhältlich).
Young, M. R. and J. A. Armstrong: Fluorescence Microscopy with the Quartz-Jodine-Lamp. *Nature* **213** (1967), 649.
Kraif, W.: Die Technologie des Leitz-Fluoreszenzopak. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn.* **4** (1969), 239.
Nairn, R. C.: Fluorescent Protein Tracing. E. & S. Livingstone Ltd.; Edinburgh and London. 1. Aufl. 1962; 3. Aufl. 1969.
Rygaard, J. and W. Olsen: Interference Filters for improved Immunofluorescence Microscopy. *Acta path. microbiol. scand.* **76** (1969), 146.
Ploem, J. S.: A new microscopic method for the visualisation of blue formaldehyde-induced catecholamine Fluorescence. *Arch. int. Pharmacodyn.* **182/2** (1969), 421.
Ploem, J. S.: Ein neuer Illuminator-Typ für die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn.* **4** (1969), 225.
Richards, O. W. and P. Waters: A New Interference Exciter Filter for Fluorescence Microscopy of Fluorescein-Tagged Substances. *Stain Technology* **42** (1967), 320.
Walter, F.: Über die Fluoreszenzmikroskopie mit markierten Proteinen. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn.* **2** (1964), 207.
Walter, F.: Eine Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung für die Routinediagnose. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn.* **4** (1968), 186.

	Beleuchtungsverfahren	Mikroskop	Lampenhaut	Lichtquelle/ Anregungsstrahlung	Filter
Routine-Diagnostik	Durchlicht-Dunkelfeld mit D 0.80/D 1.20	LABORLUX DIALUX	250, (100)	Hg 200 W/UV-Violett-Blau (Halogen 100 W/Blau)	Durchlicht-Dunkelfeld (Auramin-TBC, FITC-Tests): Breitbandfluoreszenz gemäß LEITZ-Liste 52-20b und PLOEM 1969, bzw. Spezialfilter für FITC
	Auflichtanregung mit Fluoreszenzilluminator nach Ploem	ORTHOLUX ORTHOPLAN	250, 100 500, 250, 100	Hg 200 W, Hg 100 W/UV-Violett-Blau-Grün (Halogen 100 W/Blau)	Auflichtanregung mit Fluoreszenzilluminator nach Ploem: Breitbandfluoreszenz gemäß PLOEM 1969 Schmalbandfluoreszenz (FITC) gemäß PLOEM 1969
Forschung	Durchlicht-Dunkelfeld mit D 0.80/D 1.20 und/oder Auflichtanregung mit Fluoreszenzilluminator nach Ploem	ORTHOLUX	250, 100	Hg 200 W /UV-Violett-Hg 100 W/ Blau-Grün (Halogen 100 W/Grün)	Breitbandfluoreszenz gemäß LEITZ-Liste 52-20b und PLOEM 1969 Schmalbandfluoreszenz gemäß PLOEM 1969
		ORTHOPLAN	500, 250, 100		
Fluorometrie	Auflichtanregung mit Fluoreszenzilluminator nach Ploem	ORTHOLUX-MPV ORTHOPLAN-MPV	250, 100	Xenon 150 W, Xenon 75 W/von UV bis Rot Hg 100 W/UV-Violett-Blau-Grün (Halogen 100 W/Grün)	Schmalbandfluoreszenz gemäß PLOEM 1969 oder Monochromator bzw. Interferenzverlauffilter

Ein neues FITC-Erregerfilter für die Routinefluoreszenz

Von Winfried Kraif, Wetzlar¹⁾

DK 535.822.5:535.371:535.345.6

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (5) ist heute in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der Immunfluoreszenz, der am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff. Die Anwendung dieses Fluoreszenzfarbstoffs brachte bisher noch technische Probleme, denn wegen fehlender optimaler Exzitationsfilter mußte man entweder auf eine ausreichende Fluoreszenzintensität oder auf einen dunklen Hintergrund verzichten.

Auf Grund steigender technischer Anforderungen durch Verwendung neuer Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, Tetramethylrhodamin, Rosamin B, Lissamin-Rhodamin B 200) reichen Farbgläser, d. h. in der Schmelze gefärbte Gläser, als Exzitationsfilter nicht mehr aus.

Bei diesen Fluorochromen liegt das Exzitations- und das Emissionsmaximum in der Wellenlängenskala zu dicht beisammen, als daß sie von normalen Farbglasexzitationsfiltern, die meist zwischen dem jeweiligen Exzitations- und Emissionsmaximum keine geeignete Kante aufweisen, getrennt werden könnten. Wir sehen schon hieraus, daß in der Fluoreszenzmikroskopie immer das Zusammenspiel von Lichtquelle, Fluorochrom und Filterkombination (Exzitations- und Sperrfilter) beachtet werden muß.

Durch die Verwendung von Interferenzfiltern in der Fluoreszenzmikroskopie ist dieses Problem, das bei Farbglasfiltern fast immer auftritt, erheblich geringer geworden, da es jetzt möglich ist, mit Hilfe eines speziell für FITC entwickelten Interferenzexzitationsfilters außerordentlich brillante, kontrastreiche FITC-Fluoreszenzen zu erzeugen.

Bisher war eine anspruchsvolle Fluoreszenzmikroskopie lediglich mit den großen Forschungsmikroskopen ORTHOLUX und ORTHOPLAN in Verbindung mit dem LEITZ-Fluoreszenzopak nach Ploem

¹⁾ Aus der Wiss. Abt., Entwicklungslabor Mikrophotometrie, der Ernst LEITZ GmbH.

(1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13) bzw. LABORLUX mit Fluoreszenzeinrichtung möglich. Der LEITZ-Fluoreszenzopak mit dichromatischen Teilerspiegeln, in Verbindung mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 100/HBO 200xB075/xB0150 und z. T. mit Interferenzfiltern als Exzitationsfilter, erzielt die qualitativ und quantitativ beste FITC-Fluoreszenz, die mit Objektiven hoher und höchster Aperturen derzeit erreichbar ist. Außerdem bietet er bei Verwendung dieser Objektive für alle anderen bekannten Fluoreszenzanwendungen die denkbar günstigsten Voraussetzungen bezüglich Fluoreszenzhelligkeit, spezifischer Fluoreszenz und Kontrast.

Jetzt kann man in der Routinediagnose auf einfachste Weise auch mit Laboratoriums-, Kurs- und Arbeitsmikroskopen eine brillante, intensitätsstarke und spezifische FITC-Fluoreszenz erzielen, sofern man einen Dunkelfeldkondensator und eine entsprechende Lampe adaptieren kann.

Als Exzitationslichtquelle für diese moderne FITC-Fluoreszenzmethode benötigt man nicht mehr unbedingt eine Quecksilber- oder Xenonhöchstdrucklampe. Einfache Glühwendellampen, an erster Stelle die Halogenglühlampe 12 V 100 W, mit geringen Intensitätsverlusten auch die in ihrer Abstrahlenergie etwas schwächere Glühlampe 12 V 60 W, ergeben bei den meisten Präparaten eine hervorragende Fluoreszenzqualität, da die Abstrahlenergie, insbesondere bei der Halogenglühlampe (Abb. 1), im Gegensatz zu früheren Erkenntnissen (11), im Wellenlängenbereich des Absorptionsmaximums von FITC — gleichzeitig Anregungsmaximum — vollkommen ausreichend ist (Abb. 2), d. h. im Wellenlängenbereich von 470 bis 500 nm ist das Energieverhältnis Halogenglühlampe 12 V 100 W — Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 100 fast wie 1:1, da nur noch das fast kontinuierliche Untergrundspektrum der HBO 100 wirksam ist. Ganz anders liegen die Verhältnisse natürlich in anderen Wellenlängenbereichen, insbesondere bei den Hg-Linien im violetten