

Methode:

Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie

Literatur:

MIKROKOSMOS 73, 167 - 174 (1984)

MIKROKOSMOS 73, 325 - 334 (1984)

Anwendungsbereich:

Mikroskope mit Halogen-Hochleistungsleuchte 12 V/ 100 W oder Quecksilber- bzw. Xenon-Höchstleistungsbrenner.

Die Umwandlung von Energie beliebiger Art in Lichtenergie hat E. WIEDEMANN *Lumineszenz* genannt. Am bekanntesten ist die Temperaturstrahlung, die bei der Umsetzung von Wärme entsteht. Das Licht kann aber auch selbst die Ursache einer sekundären Leuchterscheinung sein, die als *Photolumineszenz* bezeichnet wird. Wenn diese nur so lange dauert, wie das Erregerlicht auf das leuchtende Objekt einwirkt, spricht man von *Fluoreszenz*. Das spätere Nachleuchten, das man nach Abschalten der Lichtquelle beobachten kann, ist die *Phosphoreszenz*. Für die Photolumineszenz ist charakteristisch, daß durch die Einwirkung von Lichtstrahlen, die zuerst absorbiert werden, neue entstehen, die eine größere Wellenlänge besitzen als das Erregerlicht. Aus rein technischen Gründen verwendet man in der Fluoreszenzmikroskopie meistens nur das Wellenlängengebiet von 300 bis 450 nm (Ultraviolett bis Blau) für die Anregung von Fluoreszenzen, die dann eine blaue bis rote Farbe haben. Man kann aber auch andere Wellenlängen benutzen. So gibt es beispielsweise Fluoreszenzerscheinungen, die mit UV unter 300 nm angeregt werden und noch im unsichtbaren Spektralgebiet

liegen und solche, die von sichtbarem Licht angeregt im infraroten Spektralgebiet entstehen. Für ihren Nachweis sind in beiden Fällen elektronenoptische Bildwandler erforderlich. Von großem Interesse sind auch die roten Fluoreszenzen, die von grünem Licht erzeugt werden.

Das Fluoreszenzmikroskop

Im MIKROKOSMOS wurde bereits beschrieben, wie ein normales Durchlichtmikroskop ohne großen technischen Aufwand zum Fluoreszenzmikroskop umgerüstet werden kann (1, 2). Das Licht eines energiereichen Strahlers wird vom Kollektor konvergent gemacht und über einen Spiegel oder totalreflektierendes Prisma durch den Kondensor zum Präparat geleitet. Nachdem es hier die fluoreszenzfähigen Strukturen zum Leuchten gebracht hat, wird es nicht mehr benötigt und deshalb mit einem Sperrfilter oberhalb des Objektivs aus dem Strahlengang entfernt. Nur das Fluoreszenzlicht gelangt zum Auge des Beobachters.

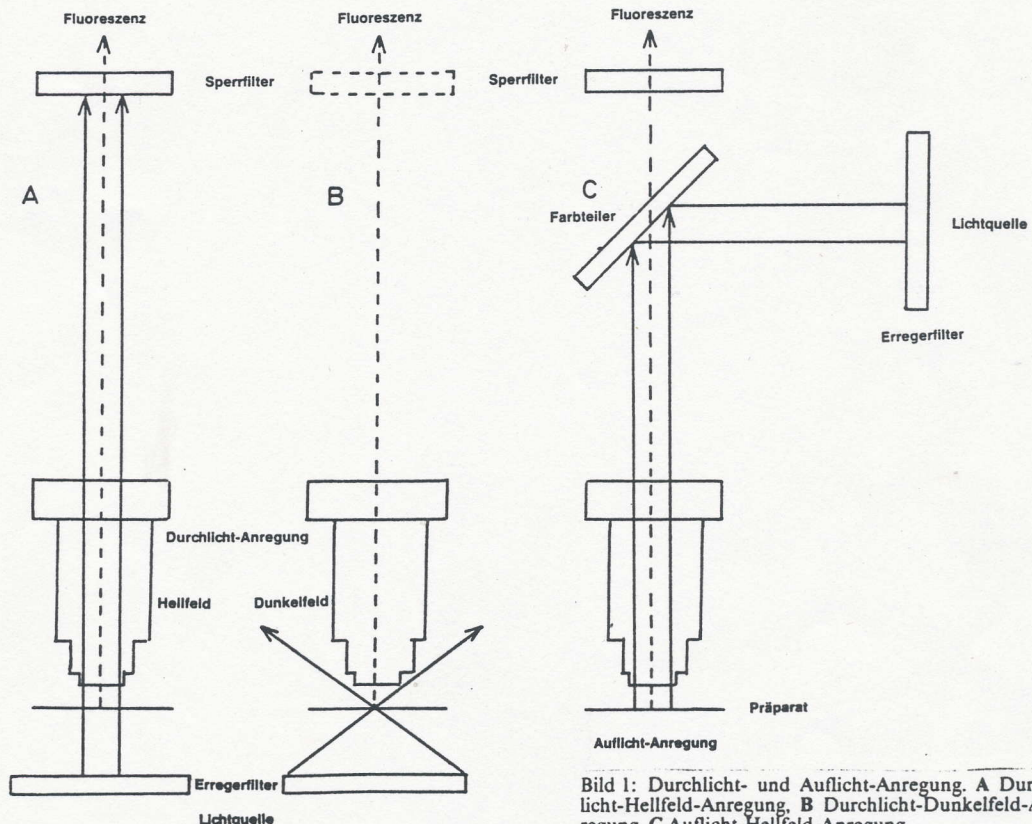


Bild 1: Durchlicht- und Aufsicht-Anregung. A Durchlicht-Hellfeld-Anregung, B Durchlicht-Dunkelfeld-Anregung, C Aufsicht-Hellfeld-Anregung.

Dieses einfache Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie läßt sich in vielfältiger Weise modifizieren (Bild 1). Im einfachsten Fall wird das Erregerlicht durch einen Hellfeldkondensator von unten zum Präparat geleitet. Das ist die älteste Methode, die als *Durchlicht-Hellfeldanregung* bezeichnet wird. Beleuchtet man das Präparat mit Hilfe eines Dunkelfeldkondensators, so fällt das Erregerlicht nicht ins Objektiv. Bei dieser *Durchlicht-Dunkelfeldanregung* kann man ein dünneres Sperrfilter verwenden. Moderne Fluoreszenzmikroskope arbeiten nach dem Prinzip der *Auflicht-Hellfeldanregung*. Das Licht wird mit einem Vertikal-Illuminator zum Präparat geführt, der eine spezielle chromatische Teilerplatte enthält. Bei dieser Anordnung wird das Erregerlicht in Richtung des Präparates reflektiert, wobei das Objektiv als Kondensator dient. In umgekehrte Richtung gelangt überwiegend das Fluoreszenzlicht zum Auge des Beobachters. Auch bei dieser Methode ist ein Sperrfilter erforderlich. Diese Anregungsart wird heute bevorzugt. Sie liefert nicht nur eine höhere Fluoreszenzintensität als die Durchlicht-Anregung, sondern läßt sich auch am besten mit anderen Verfahren, zum Beispiel Durchlicht-Phasenkontrast und -Dunkelfeld, kombinieren.

Für die simultane Durchlicht-Phasenkontrast-Fluoreszenz ist ein Phasenkontrastkondensator erforderlich, dessen Ringblenden aus UV- bis blau-durchlässigem Filterglas bestehen. Man beleuchtet über eine Teilerplatte oder einen Strahlenteiler mit der eingebauten Köhlerleuchte des Mikroskops und *gleichzeitig* mit einer seitlich angelegten UV- oder Blaulichtquelle. Auf diese Weise wird dem Fluoreszenzbild ein Phasenkontrastbild überlagert, dessen Intensität mit dem Regeltransformator der Niedervoltleuchte auf die des Fluoreszenzbildes abgestimmt werden kann (Bild 2). Bei Auflicht-Fluoreszenzanregung würde ein normaler Phasenkontrastkondensator ausreichen.

Die klassische Durchlicht-Hellfeldanregung hat trotz der vielen Vorzüge der Auflicht-Anregung ihre Bedeutung nicht ganz verloren. Sie ist mit jedem mittleren Mikroskop durchführbar und bietet dem experimentierfreudigen Mikroskopiker ein sehr großes Betätigungsfeld. Aber auch bei vielen Routineuntersuchungen ist die Durch-

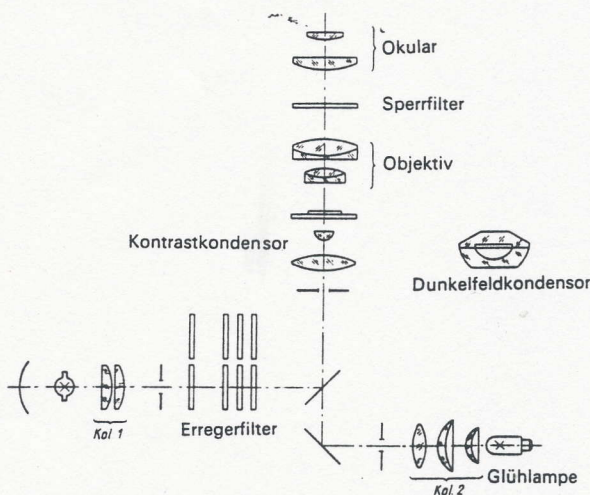


Bild 2: Prinzip der simultanen Durchlicht-Phasenkontrastfluoreszenz. Das Präparat wird gleichzeitig mit weißem und blauvioletttem Licht beleuchtet. Anstelle des Kontrastkondensators kann auch ein Dunkelfeldkondensator verwendet werden (simultane Durchlicht-Dunkelfeldfluoreszenz).

licht-Anregung wegen ihrer Einfachheit die Methode der Wahl geblieben. In diesem Beitrag werden nur Methoden beschrieben, für die eine Durchlicht-Hellfeld- oder -Dunkelfeldanregung ausreicht. Die Umrüstung eines vorhandenen Mikroskops ist problemlos und kann mit geringem finanziellem Aufwand durchgeführt werden.

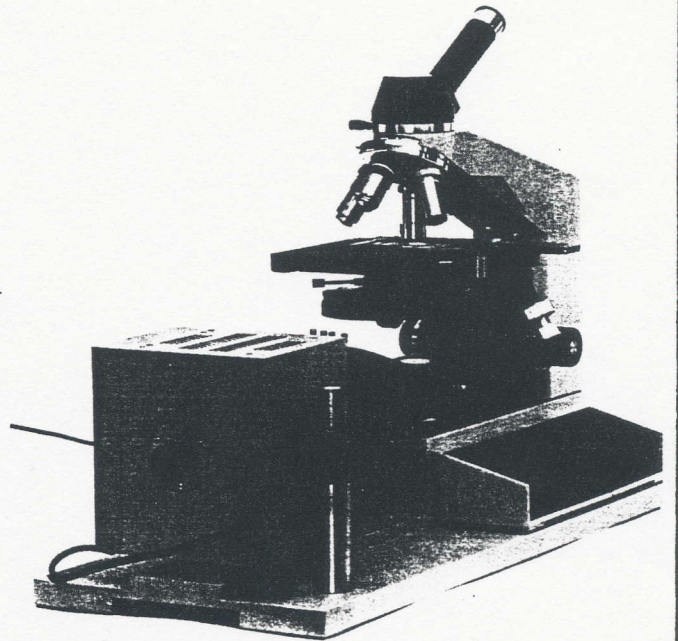


Bild 3: Einrichtung für Durchlicht-Fluoreszenz und simultane Phasenkontrastfluoreszenz. Das Lampenhaus ist für einen HBO 50-Brenner ausgelegt und besitzt ein Filtermagazin. Schwache Fluoreszenzen werden mit dem monokularen anstelle des binokularen Schrägtubus beobachtet.

Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für das Zustandekommen brillanter Fluoreszenzbilder ist die spektrale Zusammensetzung und die Strahlendichte des Erregerlichtes von größter Bedeutung. Die sehr energiereichen Quecksilber-Höchstdruckbrenner erfordern ein spezielles Lampenhaus und ein Vorschaltgerät, die beide recht teuer sind (Bild 3). Für die noch besser geeigneten Xenon-Höchstdruckbrenner gilt das gleiche. Diese idealen Lichtquellen sind für einige Anwendungsgebiete der Fluoreszenzmikroskopie unentbehrlich. Es gibt aber auch Primär- und Sekundärfluoreszenzen, die sich mit sichtbarem grünem bis violetttem Licht anregen lassen. Hierfür genügt eine 12 V/100 W-Halogen-Hochleistungsmikroskopierleuchte, die mit einem gewöhnlichen Transformator betrieben wird und bedeutend preiswerter ist als die Entladungslampen. Wegen der hohen Wärmeabstrahlung darf diese Leuchte nicht im Mikroskopfuß untergebracht werden. Bei vielen Mikroskopstativen ist bereits der Anschluß eines separaten Lampenhauses vorgesehen. Wenn diese Kombination nicht möglich ist, muß man die Leuchte separat aufstellen. In ihrem Strahlengang sollte sich stets ein Wärmeschutzfilter befinden. Bild 5 zeigt die Spektren der beschriebenen Lichtquellen. Der Quecksilber-Höchstdruckbrenner HBO 100 hat ein Linienspektrum. Hingegen erzeugt der Xenon-Höchstdruckbrenner ein spektrales Kontinuum, das von einzelnen Linien überlagert wird. Die Halogen-Glühlampe emittiert ein vollkom-

men kontinuierliches Spektrum mit einem für viele Anwendungen ausreichend intensiven blauviolettten Anteil.

Erregerfilter und Sperrfilter

Bei der Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen muß man den Schwerpunkt des Erregerlichtes in das Maximum der Lichtabsorption dieser Farbstoffe legen. Die Wahl des richtigen Erregerfilters ist von größter Bedeutung für die Qualität des Fluoreszenzbildes. In Tabelle 1 wurden die Anregungswellenlängen bzw. die Maxima der Lichtabsorption und die Breiten der Fluoreszenzbande (Emission) von bekannten Fluorochromen zusammengestellt. Der Tabelle können auch die erforderlichen Erreger- und Sperrfilter entnommen werden. Die Zusammenstellung zeigt, daß viele gebräuchliche Fluorochrome mit sichtbarem violettem, blauem und sogar grünem Licht zur Fluoreszenz angeregt werden können und nur für wenige ultraviolettes Licht erforderlich ist. Für die Anregung mit sichtbarem Licht genügt in den meisten Fällen eine Halogen-Hochleistungsmikroskopierleuchte 12 V/100 W. Bild 4 zeigt ein normales Durchlicht-Mikroskop, das mit einer solchen Leuchte, einem Erregerfilter und einem Sperrfilter zum Routine-Fluoreszenzmikroskop umgerüstet wurde. Der Hellfeld-Kondensator hat eine hohe numerische Apertur und wird mit Wasser oder fluoreszenzfreiem Immersionsöl immmergiert. Ein Immersions-Dunkelfeldkondensator erweitert den Einsatzbereich des Mikroskops.

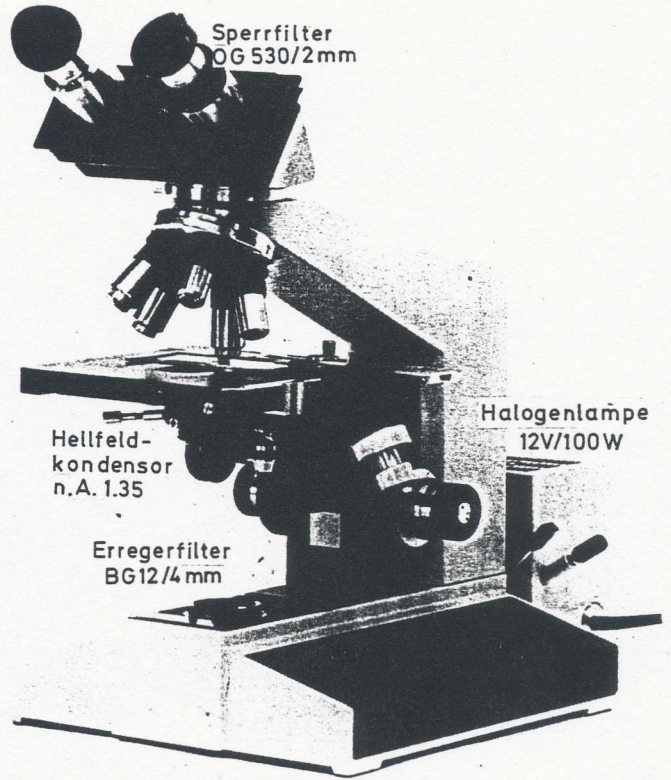
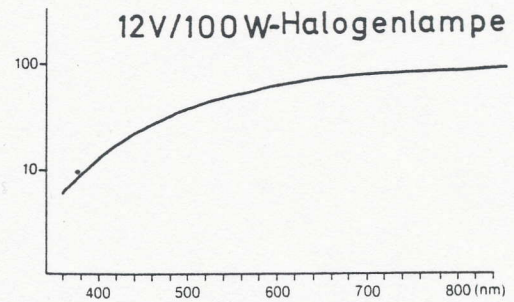
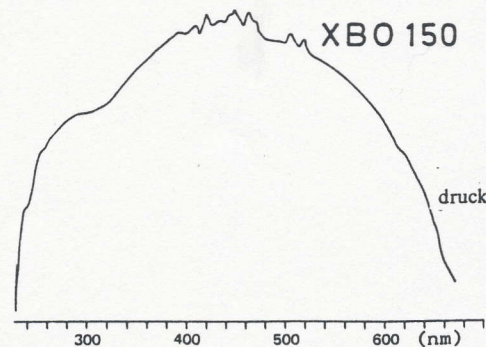
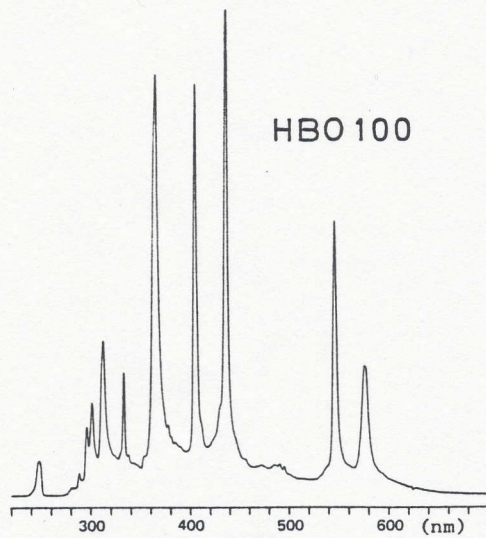


Bild 4: Normales Durchlicht-Mikroskop, das mit einer 12 V/100 W-Halogenleuchte, einem Erregerfilter und einem Sperrfilter zum Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop (Blauviolettanregung) umgerüstet wurde.



Spektrales Kontinuum einer Niedervolt-Halogenlampe.

Spektrales Kontinuum eines Xenon-Höchst-druckbrenners, das von einigen Linien überlagert wird.

Bild 5: Spektren von Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie. Oben: Linienspektrum eines Quecksilber-Höchst-druckbrenners.

Nur wenige Erregerfilter sind erforderlich. Die preiswerten Glasfilter BG 12/4 mm (für Blauviolett) und BG 3/3 mm + BG 38/4 mm (für Blauanregung) genügen in vielen Fällen den Anforderungen. Für eine UV-Anregung kommen die Schwarzglasfilter UG 1/2 mm und UG 5/2 mm in Kombination mit dem Rotsperfilter BG 38/2 mm in Frage. Die genannten Filter haben eine annähernd glockenförmige Transmissionskurve (Bild 6).

Bessere Ergebnisse erzielt man mit den sogenannten Kurzpaßfiltern, die eine steile Absorptionskante in Richtung des langwelligen Spektralgebietes haben. Für spezielle Anwendungen (FITC-Fluoreszenz, Chromosomenfluoreszenz, Grünanregung usw.) werden Bandpaßfilter mit zwei steilen Absorptionskanten empfohlen. Sie isolieren ein bestimmtes Wellenlängengebiet aus dem Gesamtspektrum der Leuchte (Bild 6). Moderne Fluoreszenzmikroskope sind meistens mit einem Satz Kurzpaß- oder Bandpaßfilter ausgerüstet. Da es sich hierbei um Interferenzfilter handelt, sind die Preise entsprechend hoch.

Für die Blauanregung vieler Fluorochrome ist ein mehrschichtiges, etwa 6 mm dickes Interferenzfilter (Bandpaßfilter) geeignet, das in der Literatur (4) als FITC-Filter bezeichnet wird. Es hat im Bereich von 440 bis 490 nm eine sehr hohe Durchlässigkeit und steile Absorptionskanten in Richtung der kürzeren bzw. längeren Lichtwellen (Bild 6).

Auch für die Grünanregung werden Bandpaßfilter mit mehr oder weniger großer Halbwertsbreite hergestellt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Interferenzfilter. Mit Farbglasfiltern ist die Grünanregung sehr unbefriedigend.

Alle Erregerfilter werden im Beleuchtungsstrahlengang angeordnet. Sie können wahlweise in das Filtermagazin der Fluoreszenzleuchte oder in die Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes eingesetzt werden. Der Filterträger des Kondensors kann dann zusätzliche Filter, zum Beispiel ein Rotsperfilter, aufnehmen.

Als Sperrfilter werden sogenannte Langpaßfilter verwendet. Analog den Kurzpaßfiltern haben sie eine steile Absorptionskante in Richtung der kurzen Lichtwellen. Nach der Lage dieser Kante werden sie bezeichnet (OG 530/2 mm = Orangelas mit einer Kantenlage bei 530 nm und einer Glasdicke von 2 mm). Es handelt sich um in der Masse gefärbte Gläser, neuerdings auch um Kunststoffverbundgläser, die im Gegensatz zu den Interferenzfiltern recht preiswert sind. Wenn jedoch aus dem Fluoreszenzlicht bestimmte Bandbreiten isoliert werden müssen oder extrem steile Absorptionskanten für die Trennung von Erregerlicht und Fluoreszenzlicht erforderlich sind, verwendet man die Interferenzfilter auch als Sperrfilter.

Das Langpaßfilter OG 530/2 mm ist sehr universell verwendbar. Bei UV-, Blauviolett- und Blauanregung läßt es das grüne bis rote Fluoreszenzlicht durch und absorbiert das Erregerlicht. Es ist auch für das FITC-Erregerfilter geeignet. Speziell bei der FITC-Fluoreszenz sollte man jedoch ein Sperrfilter verwenden, dessen Absorptionskante bei 520 nm liegt. Das Sperrfilter GG 10/2 mm ist kein Kantenfilter, sondern ein praktisch fluoreszenzfreies Gelbgrünlas, das sich bei UV-Anregung mit den Schwarzglasfiltern UG 1 und UG 5 bewährt hat. Bei Grünanregung müssen je nach Halbwertsbreite des Erregerfilters die Sperrfilter OG 590/2 mm oder RG 610/2 mm verwendet werden.

Alle Sperrfilter werden im abbildenden Strahlengang angeordnet. Hierbei ist zu bedenken, daß eine Anordnung im *endlichen* Strahlengang eines Mikroskops nur eine Kompromißlösung sein kann, weil dort jede Parallelplatte eine Änderung der Tubuslänge bewirkt, die besonders bei schwachen Objektiven zu einem Fehler in der Abstimmung führt. Moderne Mikroskope besitzen einen Filterschieber im Unendlich-Strahlengang eines Zwischentubus. Wer dieses Zubehör nicht besitzt, muß andere Lösungen suchen. Ich habe die Sperrfilter, die meistens einen Durchmesser von 19 mm haben, direkt unter die Augenlinse der orthoskopischen Okulare gekittet, wo sie am wenigsten stören. Man kann sie aber auch mittels einer Steckfassung oberhalb der Augenlinse anbringen oder anstelle von Meßplättchen in die hierfür vorgesehene Fassung von Mikrometerokularen legen. Auch die Feldblende der Okulare von Huygens-Typ und die Fassung der Tubuslinse bieten sich als Sitz des Sperrfilters an.

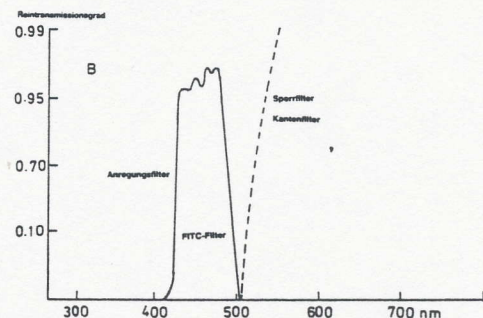
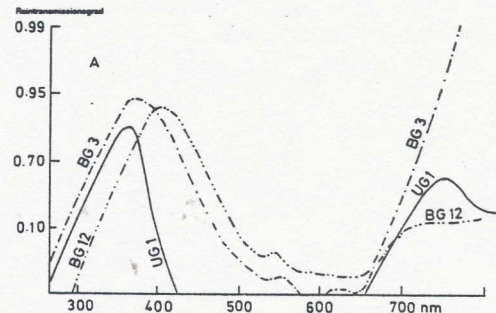


Bild 6: Transmissionskurven von wichtigen Erregerfiltern. A Schwarzglasfilter UG 1 für UV, BG 12 für Blauviolett und BG 3 für Blau. Der hohe Rotanteil von UG 1 und BG 3 muß mit BG 38 unterdrückt werden. B FITC-Filter (= Bandpaßfilter) und Sperrfilter (Langpaßfilter) OG 530.

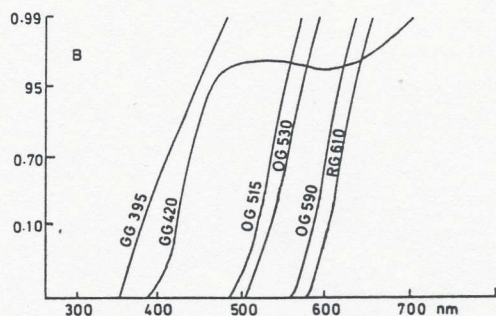


Bild 7: Transmissionskurven von wichtigen Sperrfiltern. A

Problematik in der Fluoreszenzmikroskopie

Zum besseren Verständnis der Problematik in der Fluoreszenzmikroskopie sollen hier einige grundsätzliche Tatsachen behandelt werden. Es gibt fluoreszierende Stoffe, die das erregende Licht fast verlustlos in Fluoreszenzlicht umsetzen können (z. B. Rhodamin in Äthanol, Fluorescein in Wasser). Andere haben nur eine Ausbeute von wenigen Prozent (Erythrosin, Akridinfarbstoffe u. a.). Trotzdem muß in jedem Falle eine starke Lichtquelle verwendet werden, um eine ausreichend kräftige Fluoreszenz zu erzielen. Die fluoreszierenden Objekte sind selbstleuchtend. Sie strahlen das Licht nach *allen* Seiten ab. Nur ein Teil dieser Strahlung gelangt ins Objektiv. Da nur *absorbiertes* Licht in Fluoreszenzlicht umgewandelt werden kann, ist die Fluoreszenz um so schwächer, je geringer die Lichtabsorption ist.

Das mikroskopische Präparat hat eine maximale Dicke von 10 µm und eine entsprechend geringe Lichtabsorption. Am Beispiel des Fluorochroms Thioflavin soll diese einmal zahlenmäßig dargestellt werden. Eine Lösung von Thioflavin 1:1000 (0,1 g in 100 ml) hat bei 366 nm und einer Schichtdicke von 10 µm eine Lichtabsorption von $E=0,054$. Da E (=Extinktion) gleich $\lg I_0/I$ ist, wobei I_0 das zu 100% eingestrahlte Erregerlicht und I das die Lösung ungenutzt verlassende Licht ist, ergibt sich für E der Wert $\lg 100/99$. Es wird also nur 1% des eingestrahlten Lichtes absorbiert und in Fluoreszenzlicht verwandelt. Wenn das mikroskopische Objekt statt 10 µm nur 1 µm dick ist, was ja meistens der Fall ist, so wird statt 1% nur 0,1% des eingestrahlten Lichtes in Fluoreszenz umgewandelt. Daß diese winzigen Lichtmengen überhaupt noch wahrnehmbar sind, hängt mit der enormen Lichtempfindlichkeit des menschlichen Auges zusammen. Im dunkeladaptierten Zustand vermag es noch 0,0002% der eingestrahlten, in Fluoreszenz umgewandelten Energie wahrzunehmen. In diesem Falle verlassen 99,9998% des Erregerlichtes ungenutzt das Präparat. An dieser Stelle muß noch bedacht werden, daß die Vergrößerung des Bildes Licht kostet. Bei einer 1000fachen Vergrößerung wird viermal so viel Licht benötigt, wie bei einer 100fachen.

Diese Ausführungen sollten zeigen, daß die Lichtabsorption der Fluorochrome für das Zustandekommen guter Fluoreszenzbilder von größter Bedeutung ist und daß man unbedingt versuchen muß, den Schwerpunkt des Erregerlichtes in das Maximum ihrer Lichtabsorption zu legen. Gleichzeitig wird verständlich, warum auch brillante Fluoreszenzbilder bei der Mikrofotografie sehr lange Belichtungszeiten trotz Verwendung höchstempfindlicher Filme erfordern.

Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie

Der größte Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie ist die Möglichkeit, lebendes Gewebe und lebende Mikroorganismen zu untersuchen, wobei eine spezifische Fluorochromierung auch chemisch-physikalische und histochemische Fragen beantwortet. Bei Verwendung kleinster Farbstoffkonzentrationen von 1:1 000 000 bis 1:1000 ist die Toxizität vieler Fluorochrome so gering, daß die Objekte in fast unverändertem Zustand über einen großen Zeitraum hinweg beobachtet werden können. Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie ist darin zu sehen, daß man auch bei Verwendung eines einzigen Farbstoffes immer polychrome Bilder erhält. Die zeitaufwendige Vorbereitung der Präparate, zum Beispiel das Fixieren, kann in vielen Fällen eingespart werden.

Bei einer Fluoreszenzanregung mit ultraviolettem Licht würden lebende Objekte bereits nach kurzer Zeit durch die energiereiche Strahlung geschädigt. Diese Gefahr besteht bei der Blauviolet-, Blau- und Grünanregung in viel geringerem Maße. Vitalfluorochromierte Objekte können hier über einen großen Zeitraum hinweg beobachtet werden. Allerdings bewirkt die Anlagerung bestimmter, für die Fluoreszenz verantwortlicher chemischer Gruppen an die Zellinhaltsstoffe eine Sensibilisierung der Objekte gegen das Erregerlicht, was zu ihrer ganz allmählichen Schädigung führt.

Literaturhinweise:

- GERLACH, D.: Fluoreszenzmikroskopie. 1. Teil: MIKROKOSMOS 68, 107-110, 1979. 2. Teil: MIKROKOSMOS 68, 213-220, 1979. 3. Teil: MIKROKOSMOS 69, 3-9, 1980.
- GÖKE, G.: Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. 1. Teil: MIKROKOSMOS 65, 382-386, 1976. 2. Teil: MIKROKOSMOS 66, 24-29, 1977. 3. Teil: MIKROKOSMOS 66, 148-152, 1977. (Hier weitere Literaturstellen)
- KRAFT, W.: Die Fluoreszenzmikroskopie und ihre gerätetechnischen Anforderungen. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V, Nr. 7, 193-206, 1972.
- KRAFT, W.: Ein neues FITC-Filter für die Routinefluoreszenz. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V, Nr. 2, 41-44, 1970.
- KRIEG, A.: Eine neue Einrichtung für die Fluoreszenzmikroskopie im durch- und auffallenden Licht. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie und mikr. Technik 62, 256-264, 1955.
- WALTER, F.: Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin. LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V, Nr. 2, 33-40, 1970.

Hinweise auf Bezugsquellen:

Mikroskope mit Halogen-Hochleistungsleuchten, die extern adaptiert sind, bauen Zeiss, Leitz, Wild, Will, American Optics (Reichert), Swift, Wickers, Hertel & Reuss, PZO und Olympus.

Die Filter stammen von Schott & Gen. in Mainz. Interferenzfilter stellt aber auch die Balzers AG in Lichtenstein her. Man kann die Filter auch von den Mikroskopherstellern nach Liste und durch den Fachhandel beziehen.

Die HBO- und XBO-Brenner und die zugehörigen Vorschaltgeräte beschaffen die Werksvertretungen bzw. Verkaufsstellen von Osram und Phillips in allen größeren Städten. Halogen-Glühlampen 12 V/100 W kann man in Fotogeschäften kaufen, die Projektoren anbieten, oder bei den Mikroskop-Herstellern bzw. -Anbietern. Eine solche Lampe kostet um DM 20,-.

Die Fluorochrome bezieht man am besten von der Chroma-Gesellschaft in Stuttgart-Untertürkheim, die selteneren von SERVA-Feinbiochemica in 6900 Heidelberg 1, ebenso das UV-Inert. Fluoreszenzfreies Glycerin, Paraffinöl, Immersionsöl, Entellan usw. kann man ebenfalls bei Chroma oder im Labor-Fachhandel (in allen größeren Städten) bekommen. SERVA besorgt auch die nicht lagermäßig geführten Fluorochrome im Ausland.

Tabelle 1: Anregungswellenlängen und Emission bekannter Fluorochrome

Fluorochrom	Anregung (nm)	Emission (nm)	Erregerfilter	Sperrfilter
Akridingelb	400–500 Blau	530–590 Gelbgrün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm
Akridinorange	400–550 Blau	530–590 Gelbgrün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm
Acridflavin	410–450 Blau	500–590 Gelbgrün	BG 12/4 mm Interferenzfilter 436/20	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Auramin	400–500 Blau	490–590 Grün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Atebrin	400–450 Blau	500–590 Gelbgrün	Interferenzfilter 436/20	OG 515/2 mm
Berberinsulfat (sauer)	350–420 Violett	420–570 Gelbgrün	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm	GG 10/2 mm
BAO (Bis-amino-phenyloxidiazol)	ca. 280 Ultraviolett	480–580 Grün	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm	GG 10/2 mm
Brillantsulfoflavin	400–420 Violett	490–530 Grün	BG 12/4 mm	OG 515/2 mm OG 530/2 mm
Catecholamine (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin)	410–415 Violett	470–480 Blau	Interferenzfilter	Interferenzfilter
Chininsulfat (sauer)	ca. 340 Ultraviolett	420–500 Hellblau	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm	GG 10/2 mm
Feulgenfärbung (Pararosanilin)	ca. 550 Grün	ca. 650 Rot	Interferenzfilter 546/20	RG 610/2 mm
Coriphosphin O	400–500 Blau	470–660 Grün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Diamantphosphin	400–500 Blau	470–660 Grün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Euchrysin	420–480 Blau	470–660 Grün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Fluorescein-Na	380–420 UV-Violett	500–600 Gelbgrün	BG 3/3 mm + BG 38/4 mm	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Fluorescein (sauer)	350–450 UV-Violett	450–560 Blaugrün	BG 3/3 mm + BG 38/4 mm	OG 515/3 mm
Fluorescein-isothiocyanat FITC	490–495 Blau	520–530 Grün	BG 12/2 mm + BG 38/4 mm FITC-Filter BG 12/4 mm	OG 515/2 mm OG 530/2 mm
Eosin	490–550 Blaugrün	560–620 Gelb	Interferenzfilter	OG 530/2 mm
Pyronin	ca. 550 Grün	ca. 590 Orangerot	Interferenzfilter 546/20	OG 590/2 mm
Quinacrine-Mustard-dihydrochlorid	430–460 Blau	490–530 Blaugrün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 515/2 mm
Rhodamin B Lissamin-Rhodamin B	530–570 Grün	550–700 Rot	Interferenzfilter 546/20	OG 590/3 mm RG 610/2 mm
Rivanol	360–420 UV-Violett	450–640 Grün	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm	GG 10/2–3 mm
Serotonin	385–415 Violett	520–530 Blaugrün	BG 3/3 mm + BG 38/4 mm	OG 515/2 mm
Sülben	ca. 360 Ultraviolett	ca. 460 Blau	UG 1/2 mm + BG 38/2 mm	GG 10/2 mm
Tetracyclin	400–420 Violett	ca. 560 Grün	BG 12/4 mm BG 3/3 mm + BG 38/4 mm BG 12/4 mm	OG 530/2 mm
Thiazolgelb	400–420 Violett	440–650 Grün	UG 1/2 mm + BG 38/2 mm	OG 515/2 mm GG 10/2 mm
Calceinblau	ca. 375 Ultraviolett	420–450 Blau	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm	GG 13/2 mm GG 10/2 mm
Calcein	ca. 495 Blau	500–550 Blaugrün	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm
Alizarinkomplexon	ca. 580 Grün	600–650 Rot	Grünes Interferenzfilter	RG 610/2 mm
Xylenorange	ca. 380 Ultraviolett	580–640 Orangerot	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm BG 12/4 mm	OG 530/2 mm OG 515/2 mm

Die praktische Anwendung

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

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

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

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die mit einer Reihe von Fluorochromen zu erwartenden Ergebnisse, wobei die Beschreibung der auftretenden Fluoreszenzfarben rein subjektiv ist. Die Farbnuancierung ist von sehr vielen Faktoren abhängig. Auch diese Tabelle kann nur eine Orientierungshilfe bei der Suche nach Fluorochromen mit möglichst vielen, für den Anwendungsfall günstigen Eigenschaften sein (S. 331).

Vitalfluorochromierung mit Akridinorange

Die Anfärbung der lebenden Zelle ohne tiefgreifende Störung der Lebensfunktionen war seit der Einführung der Vitalfärbetechnik durch PFEIFER VON WELLHEIM (1886) ein erstrebtes Ziel der biologischen Forschung. Mit Diachromen ist eine Vitalfärbung ohne Schädigung der lebenden Zelle technisch unmöglich, weil Farbstofflösungen in einer Konzentration von 1:100 bis 1:1000 erforderlich sind, deren Toxizität beträchtlich ist. Hingegen werden die Fluorochrome in so extremen Verdünnungen angewendet, daß eine Schädigung der Lebensfunktionen, wenn überhaupt, nur ganz allmählich erfolgt, und auch dann handelt es sich meistens nur um die Folge eines photodynamischen Effektes oder einer Photosensibilisierung. Die Vitalfluorochromierung wurde bereits 1919 von METZNER, später von ELLINGER, HIRT, SCHUMACHER, STRUGGER, HÖFLER u. a. an den verschiedensten Objekten durchgeführt. Der Mikroskopiker findet

hier ein sehr vielseitiges Arbeitsgebiet, das ihm reichlich Spielraum für eigene Versuche läßt. Bakterien, Hefen, Pilze, Protozoen aller Art, Rotatorien, Würmer und Algen, aber auch frische Pflanzenschnitte, um nur einige Objekte zu nennen, sind für die Vitalfluorochromierung besonders gut geeignet. Die nachfolgend beschriebenen Methoden lassen sich mit einem Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop bei Blauviolettanregung durchführen, aber auch bei Verwendung eines Quecksilber- oder Xenon-Höchstdruckbrenners anstelle der Halogenlampe sollte man das Blauviolett Erregerfilter BG 12/4 mm bzw. das FITC-Filter in Kombination mit den zugehörigen Sperrfiltern benützen.

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

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

Für die Vitalfluorochromierung stellt man sich am besten Lösungen von 1:1000 bis 1:10 000 her, wobei man als Lösungsmittel immer das Medium wählt, in dem sich auch die Untersuchungsobjekte befinden (Leitungswasser, Tümpelwasser, Nährlösung, physiologische Kochsalzlösung usw.). Einem Tropfen einer wäßrigen Sus-

pension von Mikroorganismen setzt man auf dem Objektträger einen Tropfen Akridinorange-Lösung zu. Dabei ist zu beachten, daß unmittelbar nach der Zugabe des Farbstoffes auch das Medium fluoresziert und das mikroskopische Bild überstrahlt. Bereits nach kurzer Zeit haben Mikroorganismen und Detritus den Farbstoffüberschuß absorbiert. Diese Objekte leuchten jetzt farbig auf dunklem Grund. Der Farbstoff wurde überdosiert, wenn die Fluoreszenz des Mediums bestehen bleibt und die mikroskopische Beobachtung hierdurch gestört wird. Nach einigen Versuchen hat man die richtige Farbstoffkonzentration gefunden.

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

Fluorochromierung von Schleim und Mastzellen (nach HAITINGER)

- A. Mehrere Fluorochrome in wäßriger Lösung sind geeignet. 5 Minuten fluorochromieren in Akridinorange NO, Brillantphosphin G, Euchrysin 2 GNX, Aurophosphin G oder Coriphosphin O 1:20 000. Alle Lösungen auf pH 3 gepuffert.

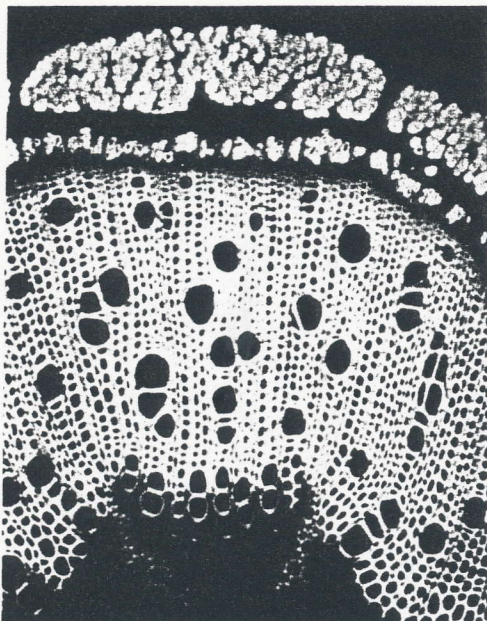


Bild 1: *Cannabis sativa* (Hanf), Stengel quer. Primäre Fluoreszenz. Film: Ektachrome 400 ASA Erregerfilter BG 12/4 mm, Sperrfilter OG 530/2 mm, Achromat 10×/0,24 und Achromat 20×/0,40; Projektiv 8×

- B. 5 Minuten in destilliertem Wasser, gepuffert auf pH 3, auswaschen.
 C. 5 Minuten in 4%igem Formol, gepuffert auf pH 3, nachbaden.
 D. In steigender Alkoholreihe rasch entwässern und über Xylol in UV-Inert einschließen.

Ergebnis: Schleim gelbgrün bis kupferrot. Mastzellen kupferrot.

Zellwände in Pflanzenschnitten

- A. 1 Minute fluorochromieren in wäßriger Lösung von Coriphosphin O 1:1000.
 B. Farbstoffüberschuß mit Wasser auswaschen.
 C. Nachbaden in 4%igem Formol
 D. An der Luft trocknen lassen oder durch die steigende Alkoholreihe in Xylol übertragen.
 E. Einschließen in Paraffinöl oder UV-Inert.

Ergebnis: Zellwände Orange.

Vitalfärbung von Vakuolen (Zellsäfte)

Method 1:

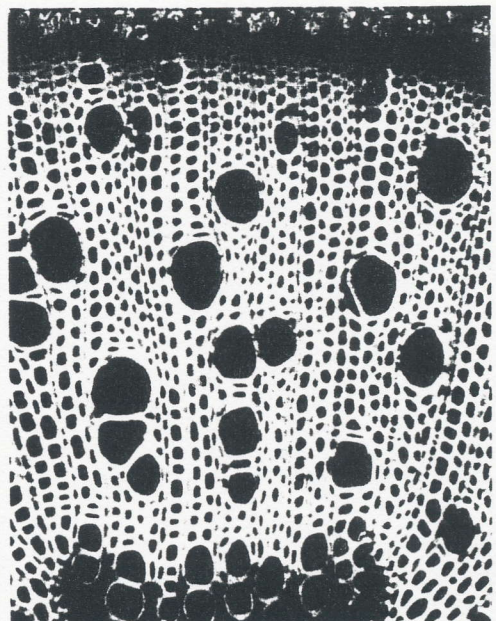
- A. 5 bis 10 Minuten fluorochromieren in alkalischer Lösung (pH 8 bis 10) von Akridinorange NO 1:5000.
 B. Waschen mit alkalischer Pufferlösung (pH 8 bis 10)
 C. In der Pufferlösung einschließen und sofort mikroskopieren.

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

Method 2:

- A. 5 bis 10 Minuten fluorochromieren in wäßriger Lösung von Rhodamin B 1:1000.
 B. Farbstoff mit destilliertem Wasser auswaschen.
 C. In Wasser oder Glycerin einschließen.

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



Vitalfluorochromierung von Bakteriensuspensionen

Für sehr viele Bakterienkulturen ist ein von STRUGGER (1949) beschriebenes Schnellverfahren geeignet. Mehrere Objektträger werden mit je einem Tropfen Akridinorangelösung in physiologischer Kochsalzlösung beschickt. Die Farbstoffkonzentration soll 1:5000 bis 1:10 000 betragen. Mit einer Platinöse werden unterschiedlich große Mengen Untersuchungsmaterial in den Tropfen verrührt. Nach dem Auflegen von Deckgläsern wird mikroskopiert. Meistens ist ein Präparat dabei, in dem das Bakterienmaterial den Farbstoff völlig absorbiert hat, der Untergrund also vollkommen schwarz ist. Solche Fluoreszenzbilder sind sehr klar. Die Bakterien leuchten in grüner, gelblicher oder gleißend kupferroter Fluoreszenzfarbe. Vorhandene Einschlüsse, Vakuolen oder Sporen sind deutlich differenziert.

Vitalfluorochromierung von Hefezellen und Pilzmycelien

In 1 ml Akridinorangelösung 1:10 000 (hergestellt mit abgestandenem, chlorfreiem Leitungswasser) wird eine Öse voll Hefematerial so verteilt, daß eine leichte Trübung zu bemerken ist. Einen Tropfen dieser Suspension überträgt man auf einen Objektträger und legt ein Deckglas



Bild 2: *Melilotus officinalis* (Steinklee). Stengel quer und längs. Primäre Fluoreszenz. Film: Ektachrome 400 ASA Erregerfilter BG 12/4 mm, Sperrfilter OG 530/2 mm Achromat 10×/0,24; Projektiv 8×

auf. Das Zytoplasma der toten Hefezellen fluoresziert kupferrot, das der lebenden Zellen leuchtend grün. Die Feinstruktur der Protoplasten ist sehr gut zu erkennen.

Pilzmycelien werden auf dem Objektträger mit einem Tropfen Akridinorangelösung 1:50 000 verrührt und nach dem Auflegen des Deckglases mikroskopiert. Ergebnis: Sporenmembran kupferrot, Zytoplasma grün, Kerne leuchtend grün, Vakuolen ungefärbt.

Vitalfluorochromierung von Blut

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

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



Fluorochromierung von Holzchnitten und Stengelquerschnitten

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

Fluorochrom	Konzentration	Einwirkungs-dauer	Fluoreszenzfarbe	
			verholzt	unverholzt
Coriphosphin O	1:1000	1 Min.	grüngelb	orange
Euchrysin 2 GNX	1:1000	15 Sek.	hellgrün	orangerot
Primulin O	1: 500	1 Min.	gelb	hellgrün
Rhodamin 6 G	1:1000	1 Min.	orange gelb	gelblich
Akridinorange	1:1000	1 Min.	grün	-

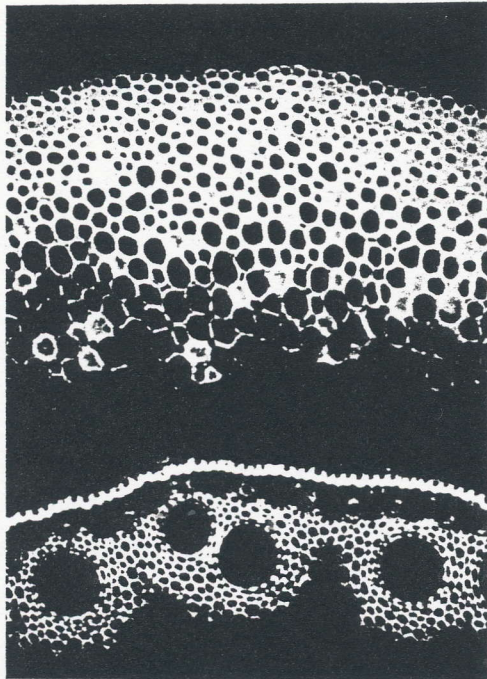


Bild 5: *Zea mays* (Mais), Stelzwurzel quer, Fluorochromiert mit Primulin. Film: Ektachrome 400 ASA Erregerfilter BG 12/4 mm. Sperrfilter OG 530/2 mm Achromat 10x/0,24; Projektiv 8x

- B. 10 Minuten in 4%igem Formol nachbadern.
- C. Lufttrocknen oder schnell entwässern (Alkoholreihe-Xylol)
- D. Einschluß in Glycerin, Paraffinöl oder UV-Inert (Dauerpräparat).

Leukozyten und Lymphozyten

- A. Dünnen Blutausschlag auf gut gereinigtem Objektträger herstellen.
- B. 10 Minuten in Methylalkohol fixieren.
- C. 4 Minuten fluorochromieren in einer wäßrigen Lösung von Coriphosphin O oder Euchrysin 2 GNX 1:1000.
- D. Farbstoffüberschuß mit dest. Wasser auswaschen. Sofort mikroskopieren.

Ergebnis: Lymphozyten und Leukozyten orange bis gelborange.

Nachweis von Bakterien-Sporen (nach STRUGGER)

- A. Material auf sorgfältig gereinigtem Objektträger ausstreichen und an der Luft trocknen.
- B. In der Flamme fixieren.
- C. Tropfen einer Mischung von 100 ml Brillant-sulfoflavin 1:400 und 0,5 ml verflüssigten Phenols (90-prozentig) aufbringen. Objektträger sofort bis zur Dampfbildung in der

Flamme erhitzen, dann 2 Minuten einwirken lassen.

- D. Mit destilliertem Wasser auswaschen.
- E. 40 Sekunden fluorochromieren mit Coriphosphin 1:1000 in destilliertem Wasser.
- F. Farbstoffüberschuß mit destilliertem Wasser auswaschen.
- G. An der Luft trocknen lassen. Einen Tropfen Paraffinöl aufbringen und mit einem Deckglas bedecken.

Ergebnis: Bakterien kupferrot, Sporen grüngelb.

In diesem Beitrag konnten nur wenige, leicht durchführbare Methoden beschrieben werden.

Spezielle Methoden der Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie

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

Die meisten Fluorochrome werden in wässrigen, stark verdünnten Lösungen angewendet. Man wiegt eine entsprechende Menge des Farbstoffes ab und löst sie unter wiederholtem Schütteln in 100 ml bzw. 1 Liter destilliertem Wasser restlos auf. Zur Konservierung kann man einige Tropfen verflüssigtes Phenol (Karbolsäure) zusetzen. Wenn die Fluorochrome bei einem bestimmten pH-Wert verwendet werden sollen oder für die Vitalfluorochromierung bestimmt sind, entfällt dieser Zusatz. Einige Fluorochrome müssen in Alkohol (Äthanol) gelöst werden. 0,1 g Farbstoff in 100 ml Lösungsmittel entspricht einer Konzentration von 1:1000, in einem Liter von 1:10 000. Pflanzenextrakte, zum Beispiel *Chelidonium*-Extrakt, werden unverdünnt als Fluorochrome verwendet.

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

Stammlösung 1: 9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 und 8,404 g Oxalsäure werden in 1 Liter dest. Wasser gelöst.

Stammlösung 2: 25,480 g Borax (= Dinatriumtetraborat $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) werden in 1 Liter dest. Wasser gelöst.

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

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

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

Stammlösung 1:

n/10 Salzsäure (am besten als Ampulle fertig kaufen).

Stammlösung 2:

9,08 g Dikaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4 in 1 Liter dest. Wasser.

Stammlösung 3:

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

Stammlösung 4:

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

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

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

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

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

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

Primärfluoreszenz von Vogelfedern

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

Primärfluoreszenz von Insektenschuppen

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

Primärfluoreszenz von Pflanzenteilen

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

Zellkerne und Protoplasma in Pflanzenschnitten

Methode 1 (nach HAITINGER):

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

B. Farbstoffüberschuß mit Wasser auswaschen.

C. Einschluß in Glycerin.

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

Methode 2 (nach HAITINGER):

A. 10 Minuten fluorochromieren in wäßriger Lösung von Akridinorange 1:5000.

B. Farbstoffüberschuß mit destilliertem Wasser auswaschen.

C. In Wasser oder Glycerin einschließen.

Ergebnis: Zellkerne grün, Protoplasma rot.

Zellkerne in menschlichem oder tierischem Gewebe (nach HAITINGER)

A. Mehrere Fluorochrome sind geeignet. 3 Minuten fluorochromieren in wäßriger Lösung von Akridinorange NO, Coriphosphin O, Phosphin. 3 R oder Euchrysin 2 GNX 1:10 000.

B. Farbstoffüberschuß mit Wasser auswaschen

C. 10 Minuten nachbaden in 4%igem Formol.

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

E. In Paraffinöl oder UV-Inert einschließen.

Ergebnis: Zellkerne leuchtend gelb.

Tabelle 1: Anwendungsgebiete der Fluoreszenzmikroskopie

Anwendungsgebiet	Methode/Fluorochrom	Spezifisch anwendbar für:	Erregerfilter	Sperrfilter
Antigen-Antikörper-Reaktionen	FITC (Fluorescein- isothiocyanat) Evans-Blue	Nachweis von Antigen- Antikörper-Reaktionen Rot-Kontrastierung von FITC-Färbungen	FITC-Filter	OG 515/2 mm
	DANS (Diamino- naphthylsulfonsäure) Rhodamin B 200 (Lis- samin-Rhodamin B 200)	Nachweis von Antigen- Antikörper-Reaktionen Nachweis von Antigen- Antikörper-Reaktionen	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm Interferenzfilter 546/20 Grün	GG 10/2 mm GG 4/2 mm OG 590/3 mm RG 610/2 mm
	TRITC (Tetra- methylrhodamin- isothiocyanat)	Nachweis von Antigen- Antikörper-Reaktionen	Interferenzfilter 546/20 Grün	OG 590/3 mm RG 610/2 mm
Bakteriologie	Akridinorange	Viele Bakterien. Unter- scheidung lebender und toter Bakterien	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm
	Akridingelb Auramin	Tuberkulose Tuberkulose, Lepra	BG 12/4 mm BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 530/2 mm
	Berberinsulfat	Viele Bakterien	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm	GG 10/2 mm
	Coriphosphin	Diphtherie und andere Bakterien	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Chromosomen	Atebrin	Chromosomen-Banden	Interferenzfilter 436/20	OG 515/2 mm
	Chinacrin	Chromosomen-Banden	Interferenzfilter 436/20	OG 515/2 mm
	Quinacrine-Mustard	„Drumsticks“ (Ge- schlechtsbestimmung)	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm
Eiweiß, Schleim	Akridinorange	Schleim	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm
	Aurophosphin G	Schleim	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	Euchrysin	Schleim	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	Coriphosphin	Schleim	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	Tizianrot R	Eiweiß	Interferenzfilter 546/20	OG 590/ 2-3 mm
	Sulfäflavin	Eiweiß	UG 1/2 mm + BG 38/4	GG 10/2 mm
Holz	Euchrysin	Zellulose	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	Coriphosphin	Zellulose	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	Primulin 0	Zellulose	BG 12/4 mm	OG 515/2 mm OG 530/2 mm
Knochen	Calceinblau- Xylenorange	Polychrome Sequenzmarkierung	Interferenzfilter KP 490/500	OG 515/2 mm OG 530/2 mm
	Calceinblau-Alizarin- komplexon	Polychrome Sequenz- markierung	Interferenzfilter KP 490/500	OG 515/3 mm OG 530/2 mm
	Oxytetracyclin	Polychrome Sequenz- markierung	BG 12/4 mm	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	Säurefuchsin	Osteonen	Interferenzfilter 546/20	OG 590/ 2-3 mm
	Limnologie Hydrobiologie	Akridinorange	Vitalfluorochromierung	BG 12/4 mm FITC-Filter
Coriphosphin		Vitalfluorochromierung	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
Rhodamin B		Vitalfluorochromierung	Interferenzfilter 546/20	OG 590/ 2-3 mm RG 610/2 mm
Zytologie und verwandte Gebiete	Acridflavin	Nukleinsäuren	Interferenzfilter 436/20	OG 515/2
	BAO (Bis-amino- phenyloxadiazol Coriphosphin	Quantitative DNA-Bestimmung Lymphozyten, Leukozyten	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm BG 12/4 mm FITC-Filter	GG 10/2 mm OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	Dansylchlorid	Lysine	UG 1/2 mm + BG 38/4 mm	GG 10/2 mm
	Euchrysin	Lymphozyten, Leukozyten	BG 12/4 mm FITC-Filter	OG 530/2 mm OG 515/2 mm
	MPS nach Ploem (Methylgrün- Pyronin-Stilben)	Blutbild-Differenzie- rung (Doppelfärbung)	Interferenzfilter BP 365 und Inter- ferenzfilter 546/ 20 im Wechsel	GG 10/2 mm GG 395/3 mm OG 590/3 mm im Wechsel

Tabelle 2: Konzentrationen und Fluoreszenzfarben bei verschiedenen Fluorochromen.

Fluorochrom	Konzentration	Zellkern	Protoplasma	Schleim	Mark-scheiden	Elastische Fasern	Quergestreifte Muskeln	Fett
Akridinorange	1 : 50 000	grün-rot	—	—	—	—	—	—
Aurophosphin	1 : 50 000	goldgelb	blaßgelb	grün	—	E	hellgrün	bläulich
Berberin-sulfat	1 : 100 000	gelb	—	—	—	E	—	—
Brilliantdianilgrün G	1 : 100 000	weiß	—	—	blau	—	—	rosa, blau
Coriphosphin O	1 : 1 000 000	gelbgrün	blaßgelb	orange	gelb	grün	blaßgrün	gelbgrün
Coriphosphin-Fuchsin	1 : 100 000	gelb	rötlich-gelb	leuchtend rot	—	gelb	gelb	blau
Rheum sinense-Extrakt	unverdünnt	blaßgelb-grün	blaßgelb-grün	—	lichtgelb	E	grau-grün	leuchtend gelb blau
Chelidonium-Extrakt	unverdünnt	goldgelb	—	—	—	—	—	—
Chlorophyll-Extrakt	unverdünnt	—	—	—	—	—	—	blutrot
Euchrysin	1 : 300 000	gelb	gelbgrün	—	—	E	blaßgrün	—
Flavophosphin	1 : 50 000	gelb	gelbgrün	grün	—	grün	oliv	grün
Fuchsin	1 : 10 000	—	—	rot	—	—	—	blau
Geranin G	1 : 10 000	—	—	—	rosa	weißlich	rötlich	blau
Neutralrot	1 : 20 000	dunkelrot	rötlich	—	gelblich	E	rötlich	gelbgrün-blaugrün
Phosphin 3 R	1 : 1 000 000	goldgelb	gelblich	—	gelblich	rötlich	gelb	gelbgrün
Pinachrom	1 : 1 000	blaßblau	blaßblau	weißlich	—	blaßblau	blaßblau	blau
Primulin	1 : 100 000	blauweiß	blauweiß	—	blaßblau	blaßweiß	hellblau	—
Primulingelb	1 : 100 000	weißlich	weißlich	weißblau	bläulich	weißlich	blauweiß	blau
Rhodamin G	1 : 100 000	blaßgelb	blaßgelb	gelblich	—	E	gelb	gelb
Rosolrot	1 : 50 000	gelbrot	gelbrot	—	—	rot	rot	gelbgrün
Thiazolgelb G	1 : 100 000	—	blaßblau	—	blau	gelbrün	blau	—
Thioflavin S	1 : 1 000 000	hellblau	hellblau	blau	hellblau	hellgelb	gelbgrün	dunkelblau
Trypaflavin	1 : 5 000 000	gelbgrün	gelbgrün	grün	—	grün	grünlich	gelb

E = Eigenfluoreszenz

Fett in menschlichem oder tierischem Gewebe (nach HAITINGER)

A. Mehrere lipophile Fluorochrome in wässriger Lösung sind geeignet:

Fluorochrom	Konzentration	Einwirkungs-dauer	Fluoreszenzfarbe
Chelidonium-Extrakt	unverdünnt	3 Min.	türkisblau
Chlorophyll-Extrakt	unverdünnt	3 Min.	feuerrot
Coriphosphin O	1 : 1000	1 Min.	gelbgrün
Neutralrot B	1 : 2000	2 Min.	goldgelb
Phosphin 3 R	1 : 10 000	2 Min.	grün
Primulin O	1 : 10 000	10 Min.	grün
Thioflavin S	1 : 10 000	10 Min.	dunkelblau

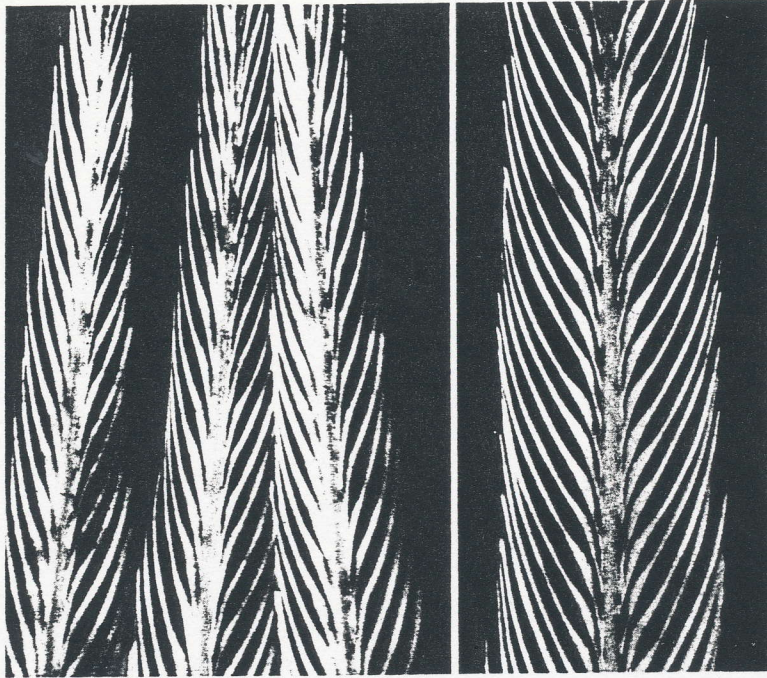
B. Farbstoffüberschuß auswaschen.

C. In Glycerin einbetten

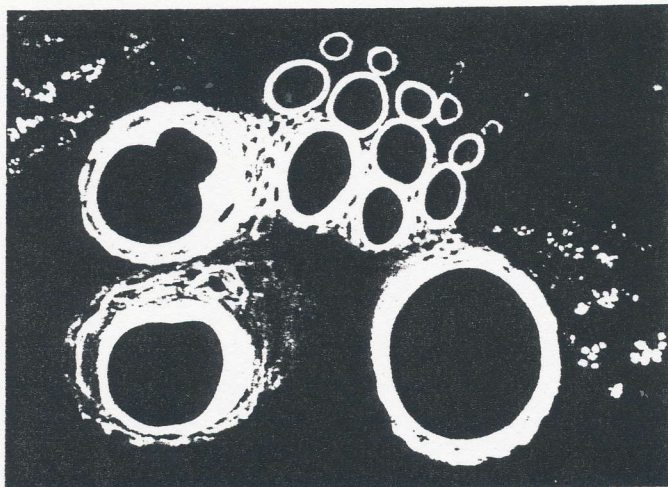
Literaturhinweise:

HAITINGER, M.: Fluoreszenzmikroskopie. Leipzig 1938
 HAITINGER, M.: Fluoreszenzmikroskopie. 2. erweiterte Auflage. Neu bearbeitet unter besonderer Berücksichtigung der Anwendung in der Medizin und Biologie von J. EISENBRAND und G. WERTH. Leipzig 1959. (Das Literaturverzeichnis dieses Werkes enthält 413 Literaturstellen)
 HASELMANN, H. und D. WITTEKIND: Phasenkontrast-Fluoreszenz-Mikroskopie. Z. Wiss. Mikroskopie 63. 147-151 (1957)
 HOLZ, H. M.: Was man von der Fluoreszenzmikroskopie wissen sollte. 2. Auflage. Carl Zeiss. D-7082 Oberkochen.
 KUNZ, CH., F. GABLER und F. HERZOG: Kontrastfluoreszenz, eine neue Methode der Fluoreszenzmikroskopie. Mikroskopie 16. 1-7 (1961)
 STRUGGER, S.: Die Untersuchung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung. MIKROKOSMOS 36, 21-23 (1942/43)
 STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949
 Farb- und Filterglas für Wissenschaft und Technik. Jenauer Glaswerk Schott & Gen., Mainz
 Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen. Rezepte und Tabellen.
 Optische Werke C. Reichert, Wien 1963 (Als Ergänzung zu M. HAITINGERS „Fluoreszenzmikroskopie“).

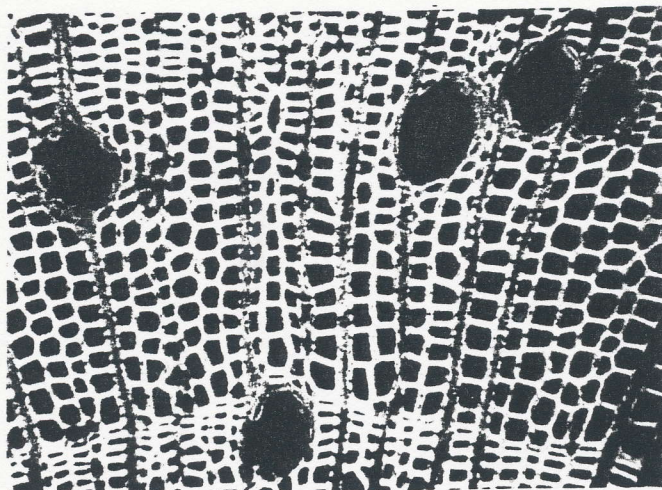
Verfasser: Gerhard Göke,
 Bahnhofstr. 27,
 5800 Hagen 1



Feder aus der
Haube des Nymphen-
sittichs. Primäre Fluores-
zenz. Film: Fujichrome
400 ASA. Erregerfilter
BG 12/4 mm. Sperrfilter
OG 530/2 mm. Plana-
chromat 10×/0,24 und
Planachromat 20×/0,40:
Projektiv 8×



Cucurbita pepo (Kürbis), Stamm quer. Fluo-
rochromiert mit Primulin. Film: Ektachrome 400 ASA
Erregerfilter BG 12/4 mm. Sperrfilter OG 530/2 mm
Achromat 10×/0,24"; Projektiv 8×



Verholzte Wurzel der Kiefer, quer. Primäre
Fluoreszenz. Film: Fujichrome 400 ASA Erregerfilter
BG 12/4 mm. Sperrfilter OG 530/2 mm Achromat
20×/0,40; Projektiv 8×

Fluoreszenzmikroskopie

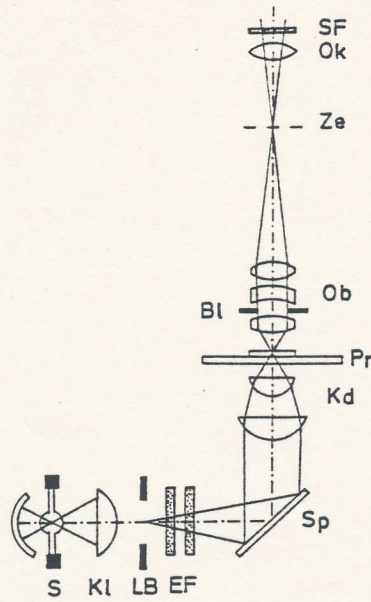


Bild 160: Durchlicht-Hellfeldanregung schematisch.
S Brenner, *KI* Kollektor, *LB* Leuchtfeldblende, *EF* Erregerfilter, *Sp* Umlenkspiegel, *Kd* Kondensator, *Pr* Präparat, *Bl* Blende, *Ob* Objektiv, *Ze* Zwischenbildebene, *Ok* Okular, *SF* Sperrfilter.

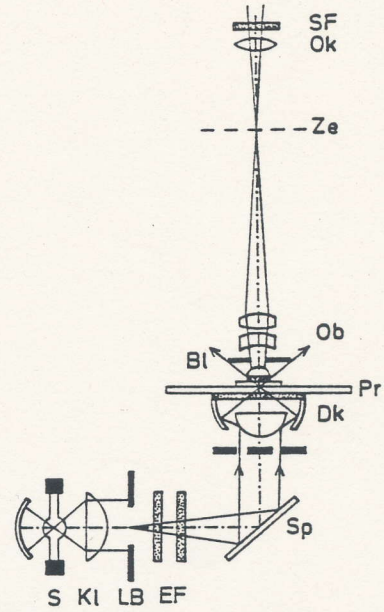


Bild 161: Durchlicht-Dunkelfeldanregung schematisch.
DK Durchlicht-Dunkelfeldkondensator. Die anderen Bezeichnungen wie in Bild 160.

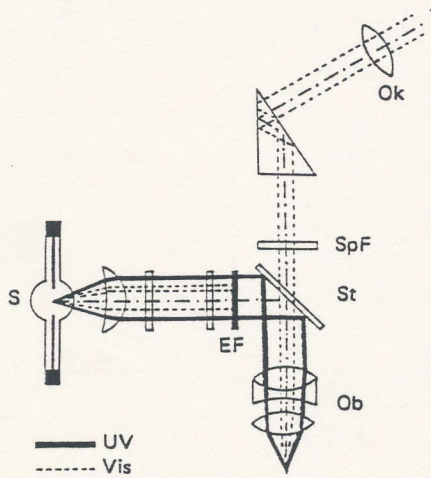


Bild 162: Aufsicht-Fluoreszenzanregung schematisch.
S Brenner, *EF* Erregerfilter, *St* Strahlenteiler, *Ob* Objektiv, *SpF* Sperrfilter, *Ok* Okular.

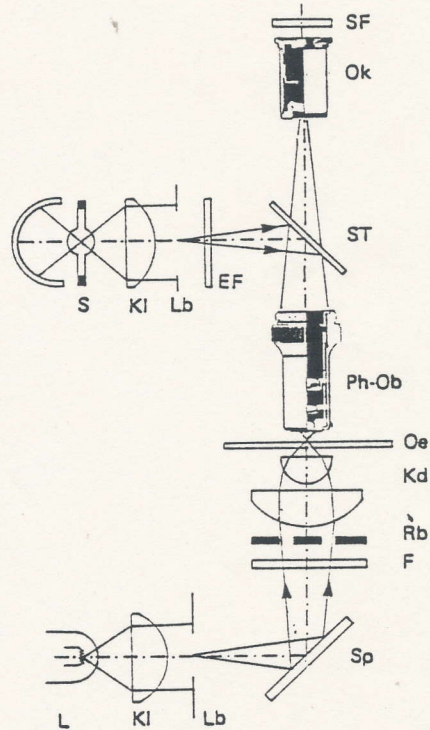


Bild 172: Aufsicht-Fluoreszenzanregung in Kombination mit Phasenkontrast oder Amplitudenkontrast, schematisch. *L* Glühbirne, *KI* Kollektor, *Lb* Leuchtfeldblende, *Sp* Umlenkspiegel, *F* Farbfilter, *Rb* Ringblende, *Kd* Kondensator, *Oe* Objektebene, *Ph-Ob* Phasenkontrastobjektiv, *ST* Strahlenteiler, *S* Brenner, *EF* Erregerfilter, *Ok* Okular, *SF* Sperrfilter.

Die vier möglichen Strahlengänge bei der Fluoreszenzmikroskopie.
 Aus G.GÖKE : "Moderne Methoden der Lichtmikroskopie".
 Franckh-Stuttgart 1988

Fluoreszenzmikroskopie

Literatur

- BECKER, H.: „Fluoreszenzhistochemie biogener Amine“. *Mikroskopie* Bd. 26 (1970), S. 153-168.
- CASPERSSON, T., ZECH, L., MODEST, E. J., FOLEY, G. E., WAGH, U. und SIMONSSON, E.: „Chemical Differentiation With Fluorescent Alkylating Agents in VICA FABA Metaphase Chromosomes.“ *Experimental Cell Research*, 58 (1969), S. 128-140.
- CASPERSSON, T., ZECK, L., JOHANSSON, C. und MODEST, E. J.: „Identification of Human Chromosomes by DNA-Binding Fluorescent Agents.“ *Chromosoma (Berl.)* 30 (1970), S. 215-227.
- COONS, A. H. and KAPLAN, M. H.: „Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.“ *The Journal of Experimental Medicine*, 111, 1-13 (1950).
- COONS, A. H.: „Fluorescent antibodies as histochemical tools.“ *Federation Proceedings* 10, Nr. 2, 558-559 (1951).
- 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. IV* (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.
- PLOEM: „Performance Testing of Fluorescent Antisera Against Human Immunoglobulins“, 1970 in E. J. HOLBOROW (Ed.) *Standardization in Immunofluorescence* 193-202, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh 1970.
- KOCH, K.-F.: „Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie. 1. FITC-Immunfluoreszenz.“ *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. V* (1971), 146-148.
- NAIRN, R. C.: „Fluorescent Protein Tracing“. E. & S. Livingstone Ltd.; Edinburgh and London. 1. Aufl. 1962; 3. Aufl. 1969. Dort weitere Literatur.
- NITSCH, B., MURKEN, J.-D. und BRÜCK, H.-J.: „Determinating Feulgen-DNA of Individual Chromosomes by Fluorescence Cytophotometry with Incident Light“. *Histochemie* 23 (1970), S. 254 bis 265.
- PEARSON, P. L. und BOBROW, M.: „Technique of Identifying Y-Chromosomes in Human Interphase Nuclei“. *Nature* 226 (1970), April 4.
- PERNIS, B., FORNI, L. und AMATE, L.: „Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes“. *J. exp. med.* 132 (1970).
- PLOEM, J. S.: „A new microscopic method for the visualisation of blue formaldehydeinduced catecholamine Fluorescence“; *Arch. int. Pharmacodyn.* 182/2 (1969), 421.
- PLOEM, J. S.: „The Use of a Vertical Illuminator with Interchangeable Dichroic Mirrors for Fluorescence Microscopy with Incident Light“. *Z. Wiss. Mikroskopie* 68 (3), 129-142 (1967).
- PLOEM, J. S.: „Quantitative Immunofluorescence“, 63-73. *Standardization in Immunofluorescence* in E. J. HOLBOROW (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh 1970.
- PLOEM, J. S.: „Standards for Fluorescence Microscopy“ 137-153. *Standardization in Immunofluorescence* in E. J. HOLBOROW (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh 1970.
- SCHUIT, H. R. E.: „Photomicrographic Recording of Immunofluorescence“. In E. J. HOLBOROW (Ed.), *Standardization in Immunofluorescence* (1970), 159-162. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh 1970.
- SERNETZ, M., and A. THAER: „A capillary fluorescence standard for microfluorometry“. In *Journal of Microscopy* 91, 43-52, 1970.
- THAER, A.: „Microfluometric Analysis of the Reticulocyte Population in Peripheral Blood of Mammals“. *Cytol. Automation, Proceedings of the sec. Tenovus Symposium Cardiff 1968*, 189 bis 195. London/Edinburgh (Livingstone) 1970.
- WALTER, F.: „Über die Fluoreszenzmikroskopie mit markierten Proteinen“. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. II* (1964) 207.
- WALTER, F.: „Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin“. *LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn. V*, (1970), 33-40.
- WALTER, F. und EICHLER, J.: „A new fluorescence microscope technique applied for bone tissues“. Vortrag an Tagung der „Royal Microscopical Soc. and Anatomica Soc. of Great Britain and Ireland“ in Sheffield (England) April 1968.