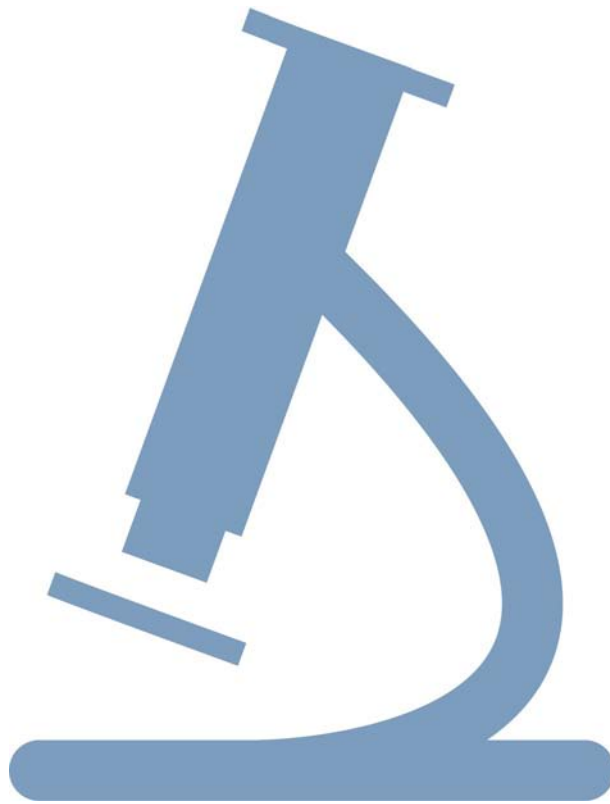


Lichtmikroskopie

Theorie und Anwendung



Lichtmikroskopie - Theorie und Anwendung

Autor: Mag. Michael Volgger

Ausgabe: 29. Februar 2008

online - Ausgabe

<http://www.univie.ac.at/mikroskopie/>

Kontakt

Ao. Univ.-Prof. Dr. Irene Lichtscheidl

Einrichtung Cell Imaging und Ultrastrukturforschung - Universität Wien

Althanstrasse 14

A-1091 Vienna, Austria

Tel +43 1 4277 54270, Fax +43 1 4277 9542

Email: irene.lichtscheidl@univie.ac.at

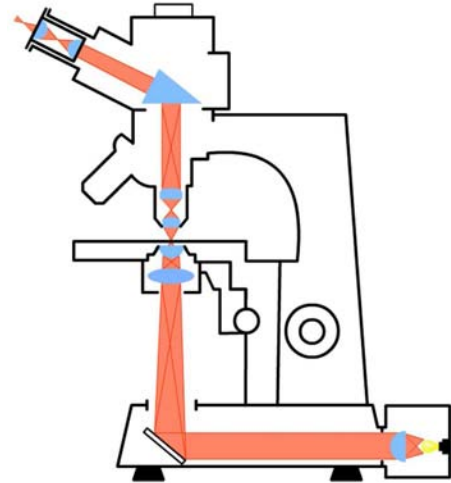
Web: <http://www.univie.ac.at/IECB/cell/>

1 Grundlagen

Dieses erste Kapitel soll ein Verständnis für die Funktion und Handhabung eines Mikroskops sowie für die richtige Herstellung von Präparaten vermitteln.

Um erfolgreich zu mikroskopieren, ist es nicht notwendig von Anfang an alles zu wissen.

Verschaffen sie sich zuerst einen Überblick über die verschiedenen Bereiche; für Details kann man später noch immer darauf zurückkommen.



1.1 Literatur

1.1.1 Lichtmikroskopie

Bradbury, S., Bracegirdle, B., 1998: **Introduction to Light Microscopy**. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks 42. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. ISBN 1 859961 21 5

Bradbury, S., Evenett, P.J., 1996: **Contrast Techniques in Light Microscopy**. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks 34. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. ISBN 1 85996 085 5

Bradbury, S., Evenett, P.J., Haselmann, H., Piller, H., 1989: **RMS Dictionary of Light Microscopy**. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks 15. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. ISBN 0-19-856413-9

Gerlach, D., 1976: **Das Lichtmikroskop. Eine Einführung in Funktion, Handhabung und Spezialverfahren für Mediziner und Biologen**. Georg Thieme Verlag Stuttgart. ISBN 3-13-530301-2

Oldfield R., 1994: **Light Microscopy: an Illustrated Guide**. Wolfe Publishing. ISBN 0 7234 1876 4

Slayter, E.M., Slayter, H.S., 1992: **Light and Electron Microscopy**. Cambridge University Press.

1.1.2 Fluoreszenz – Mikroskopie

Hermann, B., 1998: **Fluorescence Microscopy**. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks 40. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. ISBN 1 872748 84 8 second edition

Hepler, P.K., Gunning, B.E.S., 1998: **Confocal fluorescence microscopy of plant cells**. *Protoplasma* 201, 121-157.

Wang, Y., Lansing-Taylor, D., eds., 1989: **Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part A: Fluorescent Analogs, Labeling Cells, and Basic Microscopy. Methods in Cell Biology**, Vol 29 Academic Press, Inc., San Diego ISBN 0-12-684754-1

Lansing-Taylor, D., Wang, Y., eds., 1989: **Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part B: Quantitative Fluorescence Microscopy - Imaging and Spectroscopy Methods in Cell Biology**, Vol 30 Academic Press, Inc., San Diego ISBN 0-12-684755-X

Rost, F.W.D., 1991: **Quantitative Fluorescence Microscopy**. Cambridge University Press ISBN 0 521 39422 8

Pawley, J.B., 1990: **Handbook of Biological Confocal Microscopy**. Plenum Press, New York. ISBN 0-306-43538-1

1.1.3 Mikroskopie Techniken - Biologie

Hayat, M.A., ed., 1987: **Correlative Microscopy in Biology: Instrumentation and Methods**. Academic Press, Inc., Orlando. ISBN 0-12-333922-7

Cherry, R.J., ed., 1991: **New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy**. The Macmillan Press Ltd ISBN 0-333-49108-4

Herman, B., Jacobson, K., eds, 1990: **Optical Microscopy for Biology**. Wiley-Liss, Inc. ISBN 0-471-56762-0

Duke, P.J., Michette, A.G., 1990: **Modern Microscopies: Techniques and Applications**. Plenum Press, New York. ISBN 0-306-43288-9

1.1.4 Video Mikroskopie

Inoué, S., 1986: **Video Microscopy**. Plenum Press, New York. ISBN 0-306-42120-8

Shotton, D., ed, 1993: **Electronic Light Microscopy: Techniques in Modern Biomedical Microscopy**. Wiley-Liss, Inc. ISBN 0-471-56077-4

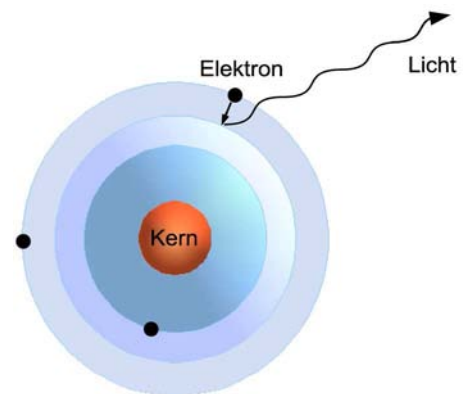
1.1.5 Dokumentation

Bracegirdle, B., Bradbury, S., 1995: **Modern Photomicrography**. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks 33. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. ISBN 1 85996 09 01

1.2 Optik

Die Optik befasst sich mit den Eigenschaften von Licht.

Dieses entsteht durch Elektronenübergänge in einem Atom. Dabei werden Elektronen in einen höheren angeregten Energiezustand gehoben, manchmal so stark, dass die Elektronen ganz aus dem Atom entfernt werden. Die entstandenen Elektronenlücken werden mit Elektronen gefüllt, die aus den äußeren Schalen nachrücken. Diese Elektronen kommen damit auf einen niedrigeren Energiezustand und die freiwerdende Energie wird als Licht abgestrahlt. Die freiwerdende Energie kann nicht jede beliebige Gesamtmenge haben, sondern nur in Stufen (Quanten) zu- und abnehmen.



Das Anregen der Atome zur Lichtabstrahlung geschieht meistens durch Hitze (z.B. Flamme, Glühwendel).

1.2.1 Eigenschaften des Lichtes

Licht stellt eine elektromagnetische Welle dar, deren „Bausteine“ Photonen sind.

In der der Physik bezeichnet man mit Photon (griechisch: phos = Licht) die elementare Anregung (Quant) des elektromagnetischen Feldes. Ein Photon ist jedoch kein „klassisches“ Teilchen. Photonen sind unendlich lang und haben eine fix definierte Frequenz und Wellenlänge sowie eine feste Energie, die ausschließlich von der Wellenlänge abhängt.

Photonen als Bausteine elektromagnetischer Strahlung besitzen aber nicht nur die Eigenschaften einer Strahlung, sondern auch die einer Welle. Diese beiden Eigenschaften werden in den beiden großen Bereichen der Optik (**Strahlenoptik und Wellenoptik**) behandelt.

Licht stellt somit auch eine elektromagnetische Welle dar, die transversal (also senkrecht) zur Ausbreitungsrichtung schwingt.

Im Gegensatz zu transversal schwingenden Wellen gibt es auch noch Longitudinalwellen; das sind Wellen, die in Richtung ihrer Ausbreitung schwingen und auf ein Medium angewiesen sind. Wichtige Formen von Longitudinalwellen sind etwa Stoßwellen und Schallwellen.

Im Gegensatz zu longitudinalen Schallwellen können sich die transversalen Lichtwellen daher auch ohne Materie, also im Vakuum, ausbreiten.

- Die Welleneigenschaft des Lichts wird durch die Intensität und Wellenlänge charakterisiert.
- Die Strahleneigenschaft hingegen durch die Richtung und die Geschwindigkeit der elektromagnetischen Welle.

1.2.2 Strahlenoptik

In der Strahlenoptik oder geometrischen Optik steht die Strahleneigenschaft des Lichtes im Vordergrund. Das Licht wird als aus vielen Lichtstrahlen zusammengesetzt betrachtet.

Eine Lichtquelle sendet Lichtstrahlen divergent in alle Richtungen des Raumes aus, in homogenen Medien breiten sich diese geradlinig aus.

Die Geschwindigkeit des Lichtstrahls hängt von der Dichte des Mediums ab in dem er sich ausbreitet. Im Vakuum ist die Lichtgeschwindigkeit daher am höchsten und beträgt 299.792,458 km/s.



Die Vakuumlichtgeschwindigkeit ist eine Naturkonstante und wird mit „c“ bezeichnet; sie gibt nach Einsteins Relativitätstheorie die maximal erreichbare Geschwindigkeit an, die nicht nur von Licht, sondern auch von jeder anderen Form der Energie erreicht werden kann.

Strahlenoptik kann zur Erklärung von Brechung und Reflexion herangezogen werden, nicht jedoch für Interferenz, Beugung und Polarisierung des Lichtes. Dazu wird das Wellenmodell des Lichtes benötigt.

1.2.2.1 Lichtbrechung

Lichtstrahlen ändern an Grenzflächen von unterschiedlich dichten Medien ihre Richtung und ihre Geschwindigkeit. Bei der Richtungsänderung spricht man auch von Lichtbrechung.

Brechungsindex

ist das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Medium zur Vakuumlichtgeschwindigkeit

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n = \text{const}$$

Brechungsindex (n):

- Luft: 1,0003
- Wasser: 1,333
- Quarzglas: 1,459
- Immersionsöl: ca. 1.515
- Flintglas: 1,613
- Diamant: 2,417

n.....Brechungsindex
 α, β ...Einfallswinkel

Hier ist anzumerken, dass Licht höherer Frequenz (bzw. kürzerer Wellenlänge) stärker gebrochen wird als Licht mit einer niedrigeren Frequenz.

1 <http://www.ccs.k12.in.us/chsPA/drama/Courses/TheatreHistoryProject06/p7/Medieval/lighting.htm>

Snelliussches Brechungsgesetz

Dieses besagt, dass ein Lichtstrahl seine Richtung ändert gebrochen wird wenn er in ein Medium mit anderer Dichte (Phasengeschwindigkeit) übergeht.

$$\sin \alpha : \sin \beta = n = c_1 : c_2$$

Das Gesetz besagt nur, in welche Richtung der Lichtstrahl abgelenkt wird, nicht aber, wie viel am Übergang zwischen den beiden Medien transmittiert bzw. reflektiert wird.
Im Fall der Totalreflexion ist das reelle Brechungsgesetz ungültig.

n.....Brechungsindex
c₁.....Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
c₂.....Lichtgeschwindigkeit im Medium
α, β...Einfallswinkel

Die Ein- bzw. Ausfallswinkel des Lichts werden dabei immer zum senkrecht auf die Mediengrenze stehenden Lot angegeben.

- Vom optisch dünnen ins optisch dichte Medium: Brechung **zum** Lot
- Vom optisch dichten ins optisch dünne Medium: Brechung **vom** Lot

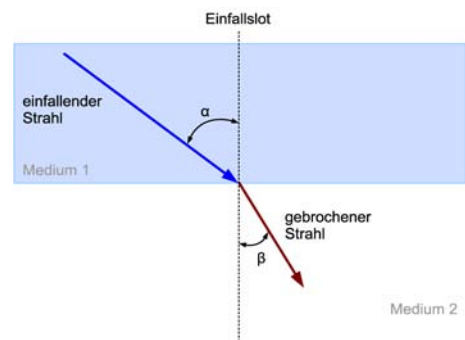
Brechung zum Lot

Eine Brechung zum Lot tritt beim Übergang des Lichtes von einem optisch dünneren in ein optisch dichteres Medium auf.(zB von Luft in Glas)

Der Einfallswinkel ist immer **größer** als der Ausfallswinkel!

$$\sin \alpha > \sin \beta$$

$$c_1 > c_2$$



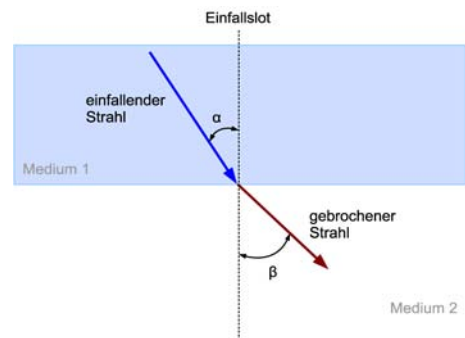
Brechung vom Lot

Beim Übergang von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium kommt es zu einer Brechung vom Lot.

Der Einfallswinkel ist immer **kleiner** als der Ausfallswinkel.

$$\sin \alpha < \sin \beta$$

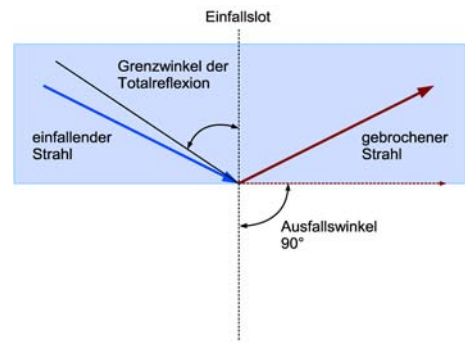
$$c_1 < c_2$$



Sonderfall: Totalreflexion

Übersteigt der Einfallswinkel, beim Übergang vom optisch dichteren ins optisch dünnere Medium, einen bestimmten Wert (Grenzwinkel der Totalreflexion) kann keine Brechung mehr auftreten, da der Brechungswinkel maximal 90° (und der Sinus des Brechungswinkels maximal 1) betragen kann.

Bei allen Einfallswinkeln, die über diesem Grenzwert liegen, wird daher das gesamte Licht reflektiert; die Grenzfläche verhält sich in diesem Fall wie ein Spiegel. Man spricht daher von einer Totalreflexion.



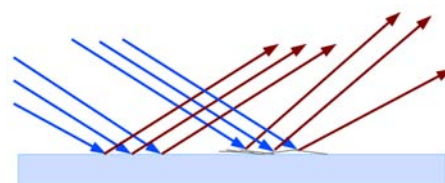
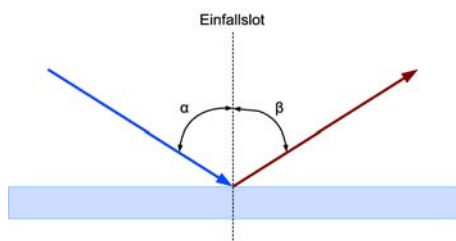
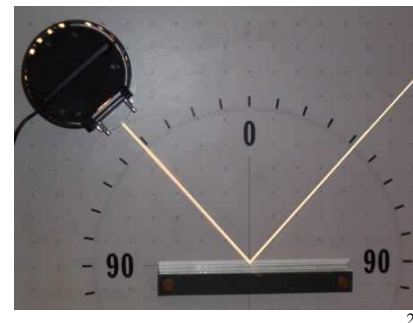
Totalreflexion wird z.B. in Umlenkprismen ausgenutzt; diese Glasprismen werden in Mikroskopen verwendet, um den Lichtstrahl in bestimmte Richtungen zu lenken.

Die Totalreflexion ist auch dafür verantwortlich, dass Diamanten funkeln. Das eintretende Licht tritt an vielen Stellen aus, wenn der Diamant richtig geschnitten ist.

1.2.2.2 Reflexion

An jeder Grenzfläche zwischen zwei Medien wird entweder ein Teil oder bei Totalreflexion das gesamte Licht reflektiert. Je nach Beschaffenheit der Oberfläche erfolgt diese Reflexion spiegelnd oder diffus. In jedem Fall gilt aber für jeden einzelnen Strahl das **Reflexionsgesetz**:

Einfallswinkel = Reflexionswinkel
$\alpha = \beta$



Bei senkrechtem Lichteinfall werden an metallischen Oberflächen ca. 90%, an Glasflächen gegen Luft ca. 4% reflektiert. Der Rest des Lichtes kann durchgelassen oder im Medium absorbiert werden.

2 http://leifi.physik.uni-muenchen.de/web_ph07_g8/grundwissen/02reflexionsgesetz/reflexion4.htm

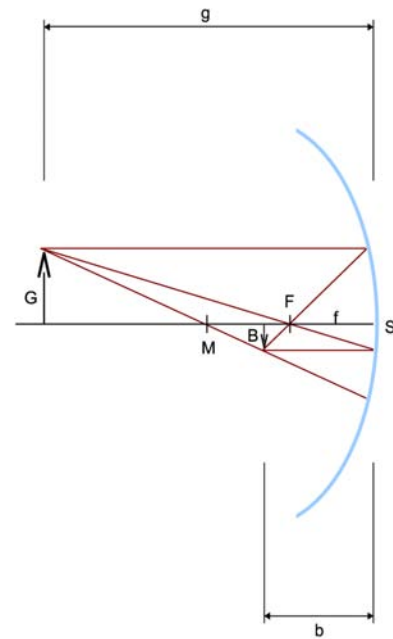
Parabolspiegel

In einen Parabol- oder Hohlspiegel verhält sich jeder Punkt der inneren Oberfläche so wie eine ganz kurze Gerade an der das Licht reflektiert wird.

- Strahlen parallel zur optischen Achse werden zum Brennpunkt reflektiert.
- Strahlen durch den Brennpunkt werden parallel zur optischen Achse reflektiert.
- Strahlen durch den Mittelpunkt werden in sich selbst reflektiert.

Die Lichtstrahlen folgen dabei dem Superpositionsgesetz; Dieses besagt, dass sich Lichtstrahlen gegenseitig durchdringen können, ohne sich zu stören oder zu beeinflussen.

Praktische Anwendung findet dieses Prinzip zum Beispiel bei Spiegel-Ojektiven.



- | | |
|--------------------------|---------------------|
| M...Mittelpunkt | S.....Scheitelpunkt |
| F.....Brennpunkt (Fokus) | f.....Brennweite |
| G...Gegenstand | B....Bild |
| g....Gegenstandsweite | b.....Bildweite |

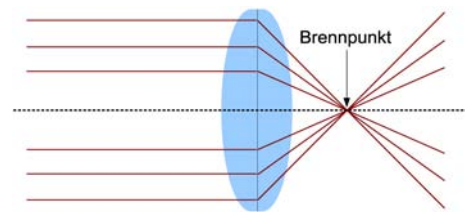
1.2.3 optische Linsen

Als Linse bezeichnet man ein optisch wirksames Bauelement mit zwei lichtbrechenden Flächen, von denen mindestens eine Fläche konvex oder konkav gewölbt ist.



3

Eine gedachte Linie, auf welcher die Krümmungsmittelpunkte der Linsenflächen liegen, wird als Optische Achse bezeichnet. Jede Linse hat einen **Brennpunkt (Focus)** in dem alle Lichtstrahlen gesammelt werden.

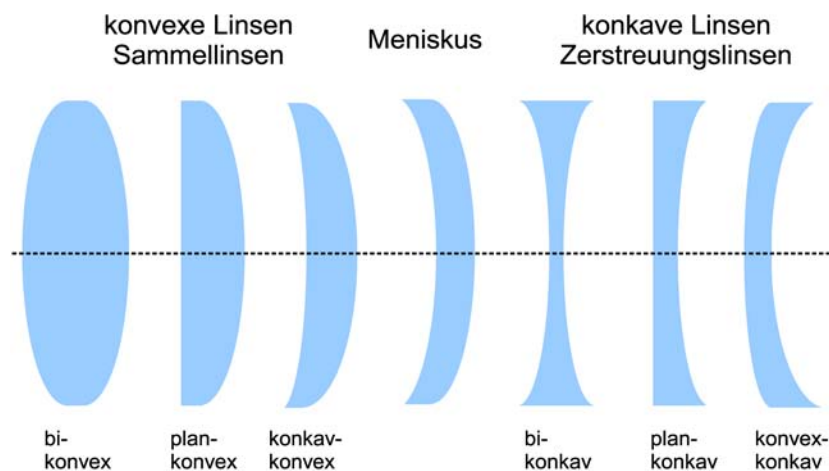


1.2.3.1 Linsenformen

Bei den einfachsten Linsen sind die beiden optisch aktiven Flächen sphärisch. Das heißt, sie sind Oberflächenausschnitte einer Kugel. Daher kann man diesen Flächen Krümmungsradien zuordnen. Je größer dieser Radius wird, desto kleiner muss daher auch die Linse werden; daraus ergibt sich eine bestimmte Grenze beim Krümmungsradius.

Jede Linsenfläche kann konvex, konkav oder plan (eben) sein:

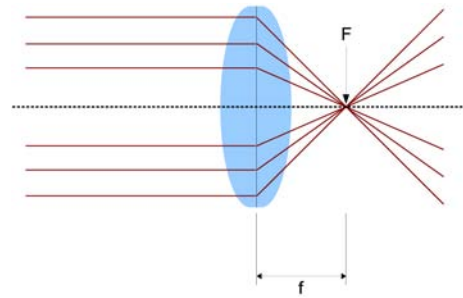
- konvex: die Fläche ist nach Außen gewölbt
- konkav: die Fläche ist nach Innen gewölbt
- plan: eine ebene Fläche wird durch einen unendlichen Krümmungsradius beschrieben



3 <http://www.gdoptics.de/>

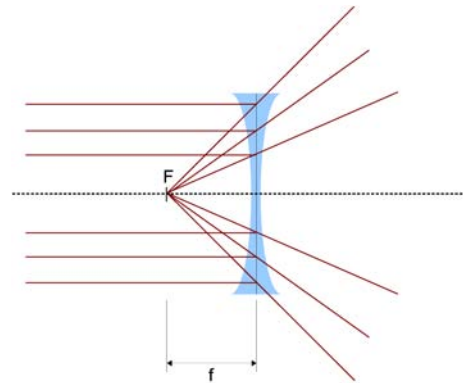
Sammellinsen

Bikonvexe und plan-konvexe Linsen wirken als Sammellinsen; parallel einfallende Lichtstrahlen werden idealerweise in einem Punkt, dem Fokus oder Brennpunkt (F), gesammelt. Der Abstand zwischen Linsenmitte und dem Brennpunkt ist die Brennweite (f).



Zerstreuungslinsen

Plan-konkave und bikonkave Linsen wirken als Zerstreuungslinsen; einfallende Parallelstrahlen laufen scheinbar vom Brennpunkt auf der Einfallsseite des Lichtes auseinander.



1.2.3.2 Bildkonstruktion

Für die Konstruktion eines Bildes benötigt man zwei Strahlen.

- den Zentralstrahl:
Er geht vom Objekt aus und schneidet die optische Achse ohne Richtungsänderung in der Mitte der Linse
- den Parallelstrahl:
Er fällt parallel zur optischen Achse ein.
Bei Sammellinsen wird er stets zum Brennpunkt hin gebrochen und bei Zerstreuungslinsen scheint es als käme er vom rückwärtigen Brennpunkt.

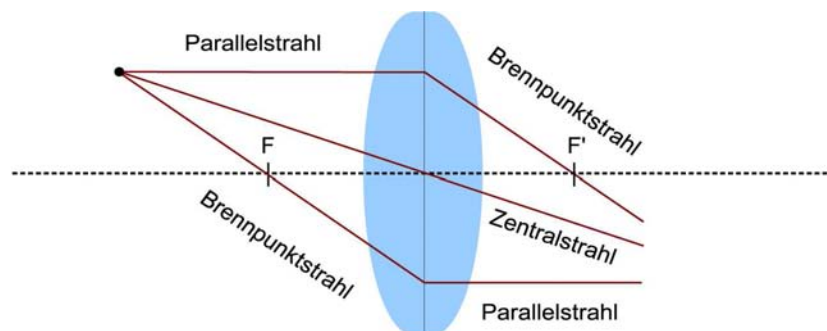


Abbildung durch Sammellinsen

Beim Durchtritt durch eine konvexe Linse schneiden sich Zentralstrahl und Parallelstrahl in einem Punkt hinter der Linse. Dieser Schnittpunkt definiert den Ort des Bildes. Eine Sammellinse bildet also einen Gegenstand ab, indem sie ein reelles Bild erzeugt, das mit einer Kamera aufgefangen oder auf einem Schirm sichtbar gemacht werden kann.

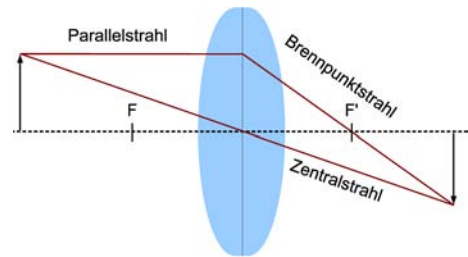
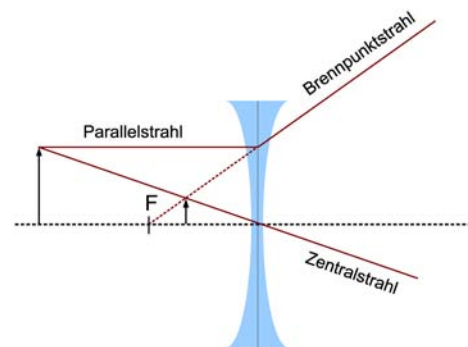


Abbildung durch Zerstreuungslinsen

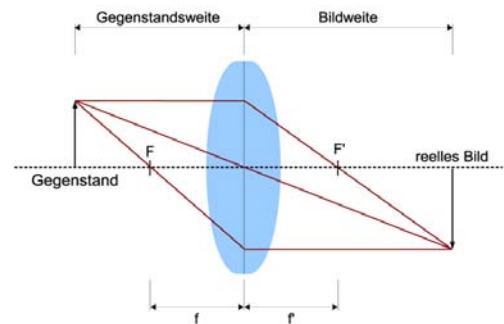
Da die Lichtstrahlen durch eine konkave Linse zerstreut werden, können sie kein reelles Bild produzieren. Betrachtet man ein Objekt durch eine Zerstreuungslinse, so scheinen alle Lichtstrahlen von einem verkleinerten virtuellen Bild vor der Linse zu kommen. In diesem Punkt schneiden sich der Zentralstrahl und der nach hinten verlängerte Parallelstrahl.



Gegenstandsweite und Bildweite

Die Gegenstandsweite beschreibt den Abstand zwischen dem abzubildenden Objekt und der optischen Linse bzw. dem optischen Systems.

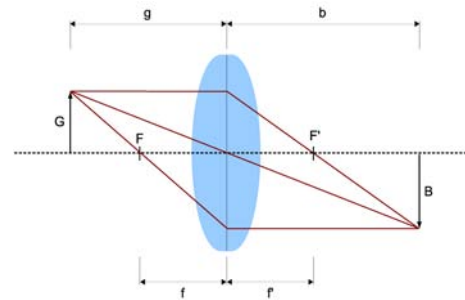
Die Bildweite dagegen stellt die Entfernung des erzeugten Bildes zum optischen System dar.



1.2.3.3 Linsengleichung und Abbildungsmaßstab

Mit der Linsengleichung, auch Abbildungsgleichung genannt, kann man die optische Abbildung einer idealen Linse berechnen.

Für die Strahlenkonstruktion betrachten wir die wichtigen Lichtstrahlen: Parallelstrahl, Brennpunktstrahl und Zentralstrahl bei einer dünnen (idealen) Linse.



Setzen wir nun die Bildgröße B (Bild im Mikroskop oder auf dem Film) mit der Größe des Objekts G (betrachteter oder fotografierter Gegenstand) in Beziehung so erhalten wir den Abbildungsmaßstab (A).

$$A = \frac{B}{G} = \frac{b}{g}$$

In Folge entspricht das Verhältnis von Abbildungsgröße zu Objektgröße dem Verhältnis von Bildweite (b) zu Gegenstandsweite (g).

Wendet man den Strahlensatz der Geometrie auf den Brennpunktstrahl und die sich mit ihm im Brennpunkt kreuzende optische Achse an, so erhält man:

$$\frac{B}{G} = \frac{b-f}{f} \quad \text{oder} \quad \frac{b}{g} = \frac{b-f}{f}$$

Mit einer Division durch b und Umordnen der Gleichung erhält man folgende Beziehung die als **Linsen- oder Abbildungsgleichung** bezeichnet wird.

$$\frac{1}{b} + \frac{1}{g} = \frac{1}{f}$$

1.2.3.4 Linsenfehler

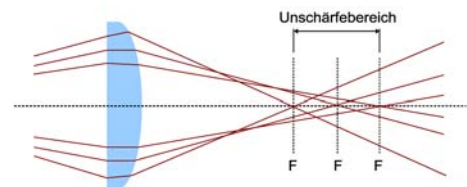
Durch Abweichungen von den in den vorhergehenden Kapiteln dargestellten idealen optischen Abbildungen entsteht ein unscharfes oder verzerrtes Bild. Diese optischen Abbildungsfehler (Aberrationen) treten vor allem bei Einzellinsen mit sphärischen Oberflächen (Schnitt aus einer Kugel) auf und können durch spezielle Linsen-Konstruktionen behoben werden.

Im folgenden werden besprochen:

- sphärische Aberration
- chromatische Aberration
- Bildfeldwölbung
- Verzeichnung
- Koma

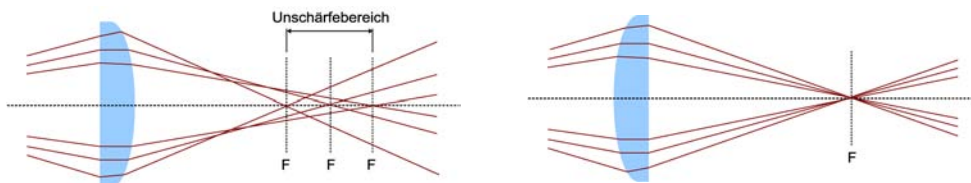
sphärische Aberration

Sphärische Aberration (Öffnungsfehler) ist ein Abbildungsfehler der bei einfachen Linsen auftritt, die mit sphärischer Krümmung geschliffen sind. Lichtstrahlen, die durch die Randzonen der Linse gehen, werden stärker gebrochen und in einem der Linse näher liegendem Brennpunkt fokussiert als mittig einfallende Lichtstrahlen; die Folge ist ein leicht verschwommenes, unscharf wirkendes Bild.

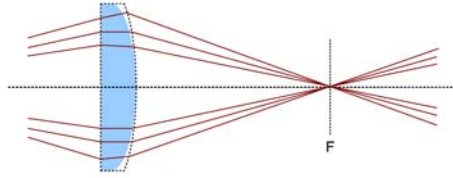


Korrektur:

- Da Lichtstrahlen, die den Rand der Linse passieren, am meisten zur Unschärfe beitragen, kann der Fehler am einfachsten durch **Ablenden der Randstrahlen** verringert werden.
- Bei **asymmetrisch sphärischen Linsen** (Linsen mit zwei unterschiedlichen Krümmungsradien) kann durch die Orientierung der Linse die Sphärische Aberration gehoben werden. Bei „Linsen bester Form“ wird dabei die effektive Brechkraft gleichmäßig auf beide Grenzflächen verteilt, was zu einer nahezu fehlerfreien Abbildung führt.

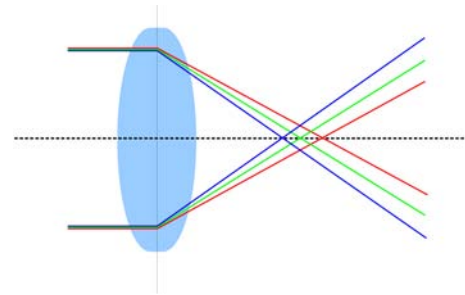


- Bei der Verwendung von **asphärischen Linsen** tritt dieser Fehler nicht auf, da bei ihnen der Radius der Oberflächen nicht konstant ist, sondern von der Mitte zum Rand hin abnimmt. Diese Variante zeigt die beste Korrektur der Sphärischen Aberration, sie ist jedoch auch mit Abstand die teuerste.



chromatische Aberration

Die Chromatische Aberration (Farblängsfehler) tritt auf, weil am Rand der Linse Licht unterschiedlicher Wellenlänge verschieden stark gebrochen und wie bei einem Prisma in seine spektralen Bestandteile aufgespalten wird; dieser Effekt führt zu Farbsäumen am Bildrand.

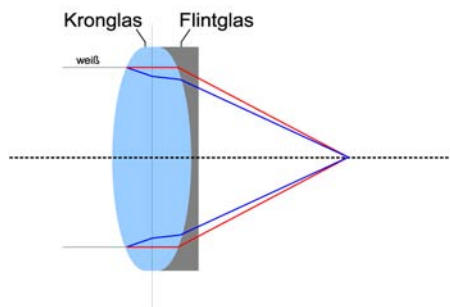


Korrektur:

- Da wiederum der Rand der Linse den Großteil der Aberration verursacht, kann der Fehler wie bei der sphärischen Aberration am leichtesten durch die Verwendung einer Blende gehoben werden.
- Für hochwertigere Optiken wird die Korrektur durch die Kombination von zwei Linsen erreicht, welche zusammen einen so genannten Achromaten bilden. Die Linsen werden dabei so gewählt, dass die Linsengruppe für mehrere Wellenlängen annähernd die gleiche Brennweite besitzt.

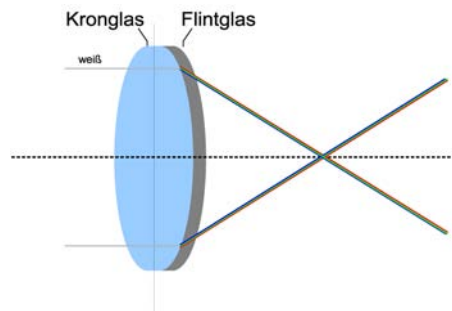
Je nach verwendeten Glassorten können 2 oder 3 Farben zusammengeführt werden.

Achromat: die Linsen und Glassorten sind so gewählt,



dass der rote und der blaugüne Spektralteil zusammenfallen

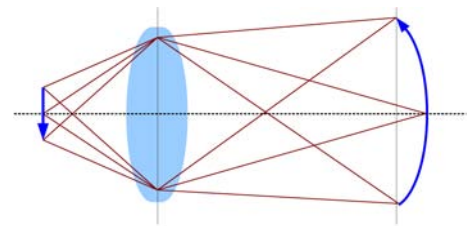
Apochromat: stellt eine aufwändigere Konstruktion dar, bei der drei Wellenlängen (rot, grün und blau) zusammenfallen, dieser Mehraufwand lohnt sich insbesondere bei langen Brennweiten.



- Bei Spiegelobjektiven tritt keine chromatische Aberration auf!!!

Bildfeldwölbung

Bei der Bildfeldwölbung wird das Bild nicht eben auf einer Fläche, sondern gewölbt abgebildet. Man kann das Bild somit nicht an allen Punkten gleichzeitig scharf stellen; wenn man auf die Bildmitte scharf stellt, ist der Rand unscharf und umgekehrt. Dieser Fehler entsteht weil Punkte am Rand der Linse näher zur optischen Achse abgebildet werden als Mittige.

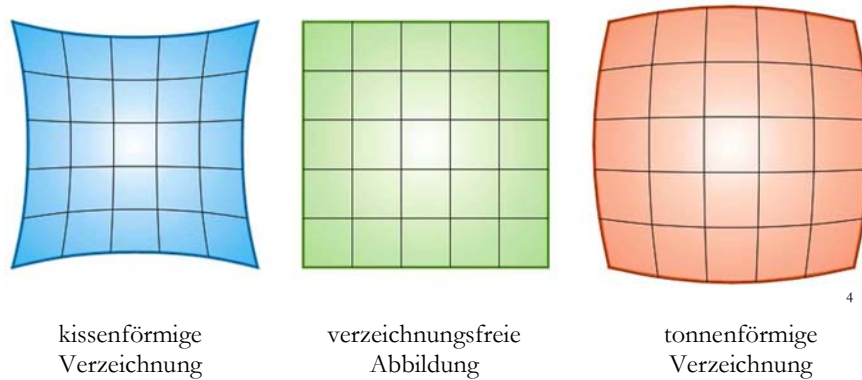


Korrektur:

- Durch die Verwendung einer Blende können die Randbereiche ausgeblendet werden; die Schärfentiefe wird dabei höher und die Bildfeldwölbung verliert an Bedeutung.
- Bei hochwertigen Optiken wird die Korrektur durch die Kombination mehrerer Linsen erreicht.

Verzeichnung

Unter Verzeichnung versteht man die nicht maßstabsgetreue Abbildung eines Objektes. Dieser Fehler entsteht durch einen veränderten Abbildungsmaßstab bei weit von der optischen Achse entfernten Bildpunkten. Daraus resultiert, dass Linien die nicht durch den Bildmittelpunkt verlaufen gekrümmt dargestellt werden. Je nachdem ob der Abbildungsmaßstab zum Bildrand hin zu- oder abnimmt erhält man eine kissen- oder tonnenförmige Verzeichnung. Besonders stark tritt dieser Fehler in der Fotografie bei extremen Tele- oder Weitwinkelobjektiven (Fish-eye) auf.

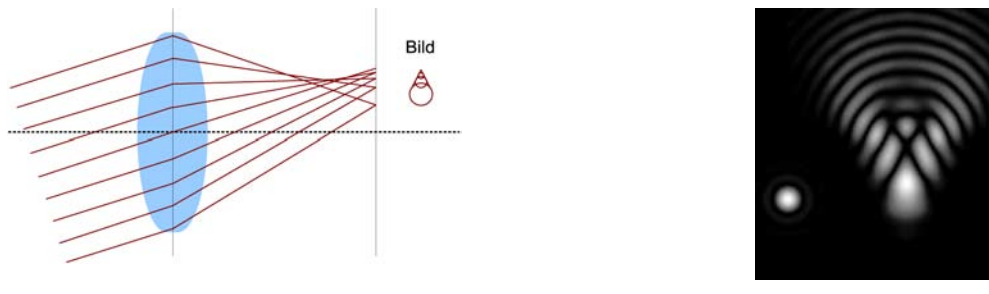


Korrektur:

- Eine Korrektur ist nur mit speziellen Objektiven aus mehreren Linsen möglich, ein Ablenden der Randstrahlen zeigt in diesem Fall keinen Effekt.

Koma

Lichtstrahlen eines Objektes abseits der optischen Achse treffen als paralleles Strahlenbündel schräg auf die Linse und werden auch schräg wieder gebündelt. Bei unkorrigierten Optiken kann es zu einer verzerrten Abbildung kommen. Das Objekt wird mit einem zum Rand hin verlaufenden Schweif abgebildet.



Durch Ablenden der Randstrahlen ist eine leichte Hebung des Fehler möglich, eine vollständige Korrektur kann nur durch speziell konstruierte Optiken erfolgen; diese aufwendigen Linsensysteme werden als aplanat bezeichnet.

4 <http://de.wikipedia.org/wiki/Abbildungsfehler#Verzeichnung>

5 http://de.wikipedia.org/wiki/Abbildungsfehler#Koma_.28Asymmetriefehler.29

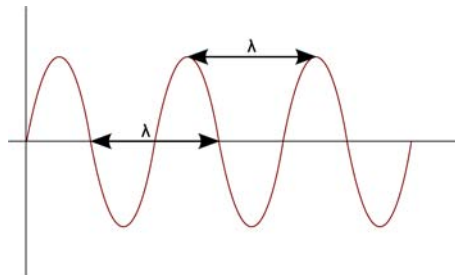
1.2.4 Wellenoptik

1.2.4.1 Welleneigenschaft

Unter Wellenoptik versteht man den Bereich der Optik, der sich mit der Welleneigenschaft des Lichts beschäftigt.

Licht besteht demnach aus elektrischen und magnetischen Feldern, die sich wellenförmig ausbreiten, also einer elektromagnetischen Welle. Dargestellt wird sie normalerweise als Sinuswelle welche durch Wellenlänge, Frequenz, Amplitude und Phase charakterisiert wird.

- Wellenlänge: Als Wellenlänge λ (Lambda) versteht man den Abstand zweier Punkte mit gleicher Phase. Punkte die im zeitlichen Ablauf die gleiche Auslenkung (Amplitude) und die gleiche Bewegungsrichtung haben. Die Angabe der Wellenlänge erfolgt normalerweise in nm.

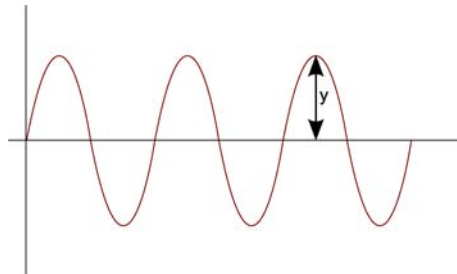


- Frequenz: Die Frequenz f gibt die Anzahl der vollen Schwingungen (Perioden - T) pro Zeiteinheit (s) an und wird nach dem deutschen Physiker Heinrich Hertz in Hertz (Hz = 1/s) gemessen.

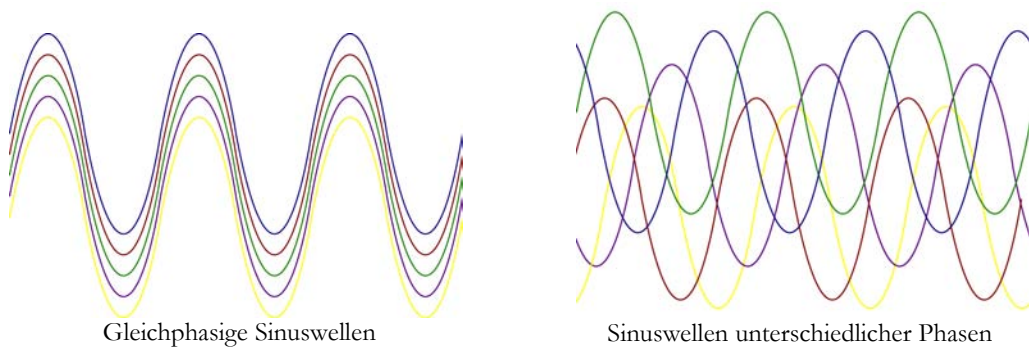
Zwischen der Frequenz und der Wellenlänge besteht ein direkter physikalischer Zusammenhang:

$$\text{Wellenlänge } \lambda \cdot \text{Frequenz } f = \text{Lichtgeschwindigkeit } c$$

- Amplitude: Die Amplitude y beschreibt die maximale Auslenkung einer Schwingung, also dort wo der Wellenberg am höchsten ist. Bei Lichtwellen ist die Amplitude nicht immer direkt messbar; von ihr abhängig ist jedoch die Intensität (Helligkeit); diese kann in Folge auch gemessen werden kann



- Phase: Die Phase φ gibt an, wann und wo die Wellenberge, bzw. die Wellentäler sind – also den Schwingungszustand einer Welle



Mit dem Wellenmodell des Lichts lassen sich viele Eigenschaften erklären und auch berechnen, die sich durch die geometrische Optik nicht beschreiben lassen. Dazu gehören Farbe, Interferenz, Beugung und Polarisation.

1.2.4.2 Farben & Wellenlängen

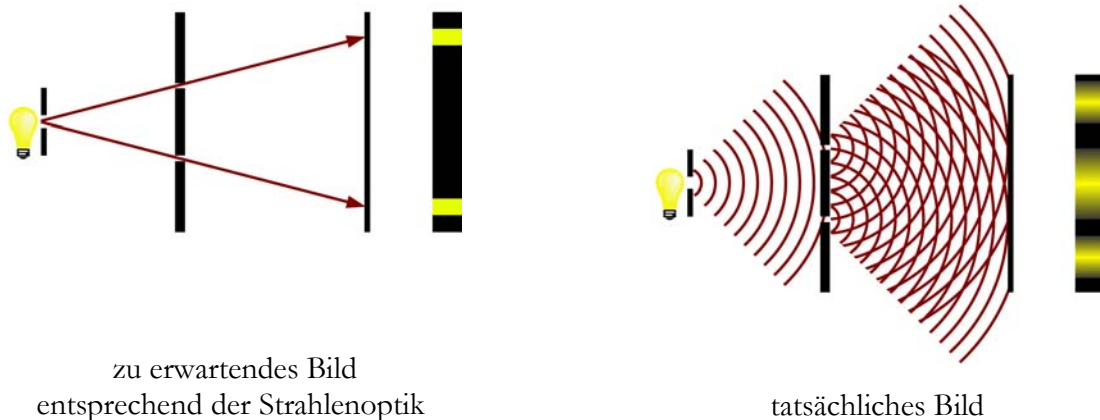
Die Farbe des Lichts ist abhängig von der Wellenlänge. Monochromatisches Licht besteht nur aus einer Wellenlänge, weißes Licht hingegen entsteht durch die Überlagerung vieler Wellen mit unterschiedlicher Wellenlängen.

- **Sichtbares Licht** befindet sich in einem Wellenlängen- und Frequenzbereich der vom Auge in Schempfindungen umgesetzt werden kann (**400 – 760 nm**).
- **UV-Licht** ist kurzwelliger (**250 – 400 nm**) und sehr energiereich
- **Infrarot-Licht** hingegen ist langwellig (**über 760 nm**) und damit auch energieärmer.



1.2.4.3 Beugung

Aufgrund der Welleneigenschaft des Lichtes weicht das reale Verhalten stark von jenem ab, welches man von der zuvor besprochenen Strahlenoptik erwarten würde. Belegt wurde dies 1802 von Thomas Young mit seinem Doppelspaltversuch:



Das physikalische Modell für die Beugung ist das Huygenssche Prinzip (nach Christiaan Huygens), es besagt, dass jeder Punkt einer Wellenfront als Ausgangspunkt einer neuen Welle, der so genannten Elementarwelle, betrachtet werden kann.

Überlagerung von Wellen

Die Überlagerung sämtlicher Elementarwellen (in drei Dimensionen sind Elementarwellen kugelförmig, in zwei Dimensionen kreisförmig) ergibt die beobachtete Wellenfront.



Die Welle geht durch ein Hindernis und erzeugt dort eine **neue Elementarwelle**.

Zusammensetzung von 2 Elementarwellen zu einer **neuen Wellenfront**.

Die Überlagerung von Elementarwellen kann zu gegenseitiger Verstärkung (konstruktive Interferenz) oder gegenseitiger Abschwächung (destruktive Interferenz) oder gar Auslöschung führen.

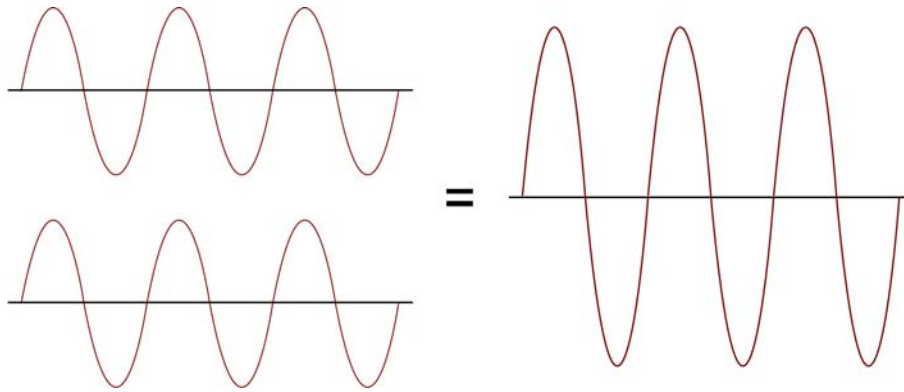
1.2.4.4 Interferenz

Um eine stabile Überlagerung von Wellen zu erhalten, müssen die Wellen kohärent sein (dh. sie müssen die gleiche Frequenz besitzen) und es muss eine zeitlich konstante Phasenbeziehung zwischen den überlagerten Wellen bestehen.

Bei den entstehenden Überlagerungen addieren sich die kohärenten Wellen und es bilden sich neue Wellen. Dabei ist zu beachten, dass sich die Wellen je Verschiebung der Schwingung (Gangunterschied) verstärken (konstruktive Interferenz) oder auslöschen (destruktive Interferenz).

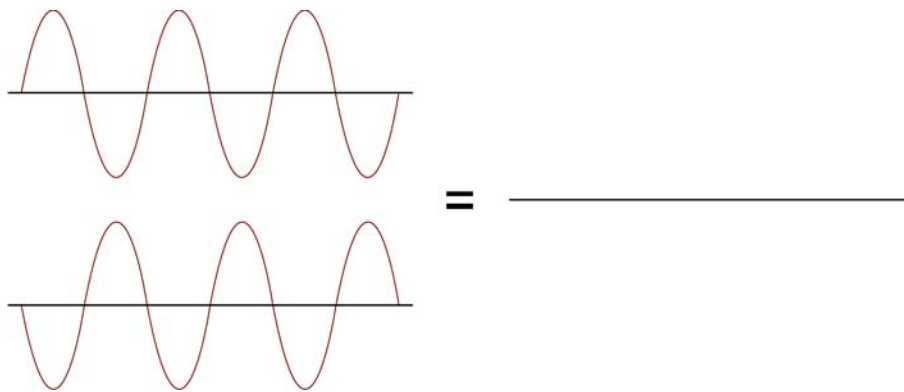
Konstruktive Interferenz

tritt dann auf, wenn der Gangunterschied der beiden Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist, somit trifft immer ein Wellenberg auf einen Wellenberg und ein Wellental auf ein Wellental. Haben beide Wellen dieselbe Amplitude so führt konstruktive Interferenz zu einer doppelt so großen Amplitude (Gangunterschiede/Phasendifferenz: $\Delta\phi = 0, 2\pi, 4\pi, 6\pi, \dots$).



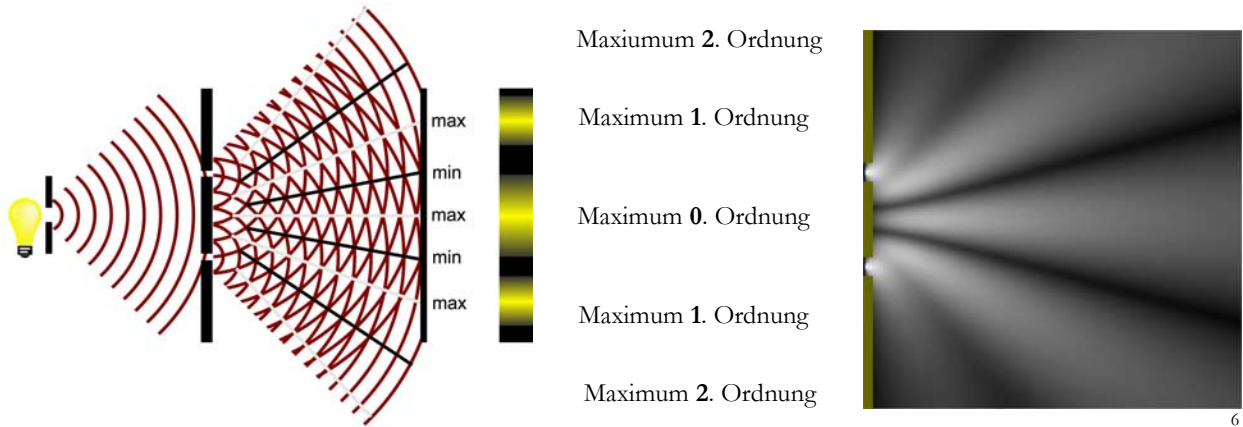
Destruktive Interferenz

hier beträgt der Gangunterschied immer nur ein Vielfaches der halben Wellenlänge; die beiden Wellen schwingen also gegenphasig. Es treffen somit immer Wellenberg auf Wellental und umgekehrt. Die resultierende Welle ist daher kleiner als bei den beiden ursprünglichen Wellen - daher der Name destruktive Interferenz. Haben beide Wellen dieselbe Amplitude, so löschen sie sich sogar gänzlich aus. (Gangunterschiede/Phasendifferenz: $\Delta\phi = \pi, 3\pi, 5\pi, 7\pi, \dots$)



Doppelspaltversuch

Beim Doppelspaltversuch von Thomas Young (1802) lässt man kohärentes - monochromatisches Licht auf eine Blende mit zwei schmalen Schlitzen fallen, an denen das Licht gebeugt wird. Die dabei neu entstandenen Wellen sind kohärent und breiten sich so aus, dass sie an vielen Punkten zusammentreffen und interferieren.

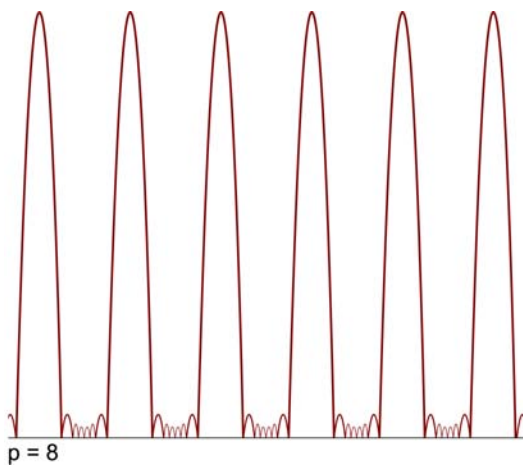


Besteht zwischen den Wellen ein Phasenunterschied von einem ganzen Vielfachen der Wellenlänge, so addieren sich die Amplituden, und es entsteht an dieser Stelle eine Verstärkung – **Maximum**. Im entgegengesetzten Fall beträgt der Gangunterschied nur ein halbes Vielfaches der Wellenlänge und es kommt zur Auslöschung – **Minimum**.

Beugung am Gitter

Wie beim Doppelspaltversuch lassen wir kohärentes – monochromatisches Licht auf eine Blende fallen. Diesmal allerdings auf eine Blende mit einer große Anzahl von Einzelspalten (p), jeweils mit dem Abstand g zueinander (g = Gitterkonstante).

Die Teilwellen von den Spalten geben durch Interferenz in der Beobachtungsebene scharfe, gut getrennte Hauptmaxima (0.,1.,2.... Ordnung). Dazwischen liegen kaum sichtbare Nebenmaxima.



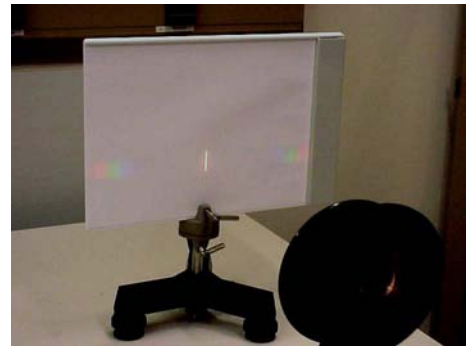
Bspl: Bei $p = 4$ ist jedes 3. Maximum ein Hauptmaximum, bei $p = 8$ jedes 7. Maximum usw.

6 <http://vqm.uni-graz.at/qms/index-2.html>

Versuch mit weißem Licht:

Man erhält in der Mitte des Schirms ein scharfes Spaltbild
= Hauptmaximum 0. Ordnung.

Rechts und links davon sind die beiden Maxima
1. Ordnung als kontinuierliche Spektren abgebildet.



1.2.4.5 Polarisation

Licht stellt eine elektromagnetische Welle dar, die transversal zur Ausbreitungsrichtung schwingt. Senkrecht zur Ausbreitungsrichtung sind Schwingungen nach allen Raumrichtungen möglich.

Unpolarisiertes Licht

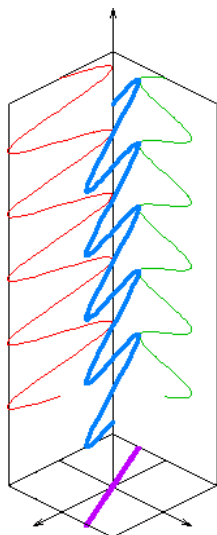
besteht aus einer Überlagerung von Wellen die nach allen Richtungen schwingen.

Polarisiertes Licht

besteht hingegen nur aus Wellen die alle in der gleichen Ebene schwingen.

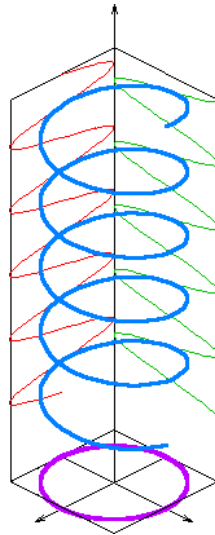
Dabei lassen sich 3 Formen von polarisiertem Licht unterscheiden:

Linear polarisiertes Licht



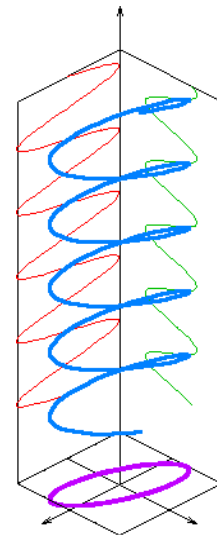
Schwingungen erfolgen nur in **einer bestimmten Richtung** senkrecht zur Ausbreitungsrichtung.

Zirkular polarisiertes Licht



Die Schwingungsebene des elektrischen Feldes dreht sich bei **konstanter Feldstärke**.

Elliptisch polarisiertes Licht



Ähnlich wie zirkular polarisiertes Licht, nur ändert sich hier die **Feldstärke** der elektro-magnetischen Welle **elliptisch**.

7 <http://kaluza.physik.uni-konstanz.de/DP/dparchiv/dp2003/wienbr/Spektrum.html>

8 <http://de.wikipedia.org/wiki/Polarisation>

Polarisationsfilter

Die Polarisation von Licht wird durch Polarisationsfilter erreicht; diese lassen nur Licht passieren, welches in der Polarisationsebene des Filters liegt. Dem zufolge ist das Licht, welches den Polarisationsfilter verlässt, immer polarisiert.

Trifft dieses polarisierte Licht nun auf einen weiteren Polfilter mit senkrecht dazu stehender Polarisationsebene so wird das gesamte Licht blockiert.



Bei **linearen Polarisationsfiltern** schwingt das ausfallende Licht in genau einer Richtung und wird daher linear polarisiertes Licht genannt.

Bei zirkularen **Polarisationsfiltern** wird das Licht zunächst linear polarisiert und anschließend durch ein $\lambda/4$ -Plättchen geschickt. Dadurch wird pro Phase eine Drehung um die Ausbreitungsachse erreicht, wobei aber die Polarisationsrichtung erhalten bleibt.

Ein **$\lambda/4$ -Plättchen** ist meist ein doppelbrechender Kristall, der das einfallende Licht um eine viertel Wellenlänge ($\pi/2$) gegen die dazu senkrechte Richtung verzögert. Mit einem $\lambda/2$ -Plättchen kann das Licht um eine halbe Wellenlänge (π) verzögert und damit die Polarisationsrichtung von linear polarisiertem Licht gedreht werden.

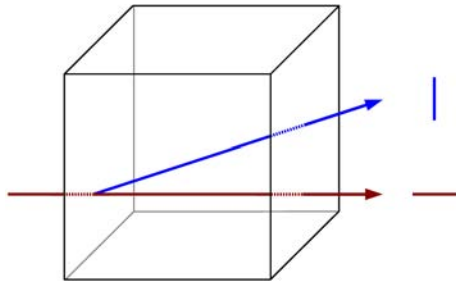
natürliche Polarisation

Polarisiertes Licht kann nicht nur künstlich mit Hilfe von Filtern erzeugt werden, sondern es wird auch von den folgenden Phänomenen erzeugt.

- Reflexion: Betrachtet man das von einer glatten Fläche (zB Glas- oder Wasserfläche) reflektierte Licht durch ein Polarisationsfilter, so sieht man dass es hauptsächlich in einer Ebene schwingt.
- Absorption
- Streuung
- Doppelbrechung (Kristalle)

1.2.4.6 Doppelbrechung

Als doppelbrechend werden Strukturen bezeichnet die in der Lage sind einfallende Lichtstrahlen in zwei Teilstrahlen oder Wellenzüge aufzuspalten, von denen jeder linear polarisiert ist und deren Schwingungsebenen senkrecht aufeinander stehen. Wobei jedes Material definierte Schwingungsrichtungen für die Teilstrahlen besitzt.



Fällt nun Licht gerade auf ein doppelbrechendes Medium so verläuft der ordentliche Strahl (ordinärer Strahl "o") ungebrochen durch das Medium, der außerordentliche Strahl (extraordinärer Strahl "e") hingegen wird abgelenkt.

- **ordentlicher Strahl:** folgt konstant dem Brechungsgesetz und wird entsprechend dem jeweiligen Brechungsindex gebrochen
-- er verläuft bei geradem Lichteinfall ungebrochen
- **außerordentlicher Strahl:** der Brechungsindex für diesen Strahl ist nicht konstant sondern abhängig vom Einfallswinkel des Lichtes.
-- wird bei geradem Lichteinfall abgelenkt.

Aufgrund dieser abweichenden Brechungsindices verlaufen die beiden Strahlen verschieden schnell durch das Medium; wodurch sie beim Austritt in ihrer **Phase verschoben** sind. Die Schwingungsebene des außerordentlichen Strahls ist senkrecht zum ordentlichen Strahl ausgerichtet.

Doppelbrechende Strukturen zeigen also ein vom Einfallswinkel abhängiges Brechungsverhalten und werden daher als **anisotrop** bezeichnet.

Im Gegensatz dazu stehen isotrope Materialien die keine Abhängigkeit vom Einfallswinkel zeigen (zB: Steinsalz oder spannungsfreies Glas).

Stärke der Doppelbrechung

Die Stärke der Doppelbrechung ergibt sich aus der Differenz der beiden Brechungsindices ($n_o - n_e$) und ist bei Materialien mit Eigendoppelbrechung eine Materialkonstante.

⁹ <http://de.wikipedia.org/wiki/Doppelbrechung>

Je nach dem, ob die Differenz negativ oder positiv ist, spricht man auch von **optisch negativ** oder **optisch positiv**.

Beispiel:

Kalzit mit einem Brechungsindex von 1,4864. Bei geradem Lichteinfall ergibt sich für den außerordentlichen Strahl der Brechungsindex $n_e = 1,6583$
 $1,4864 - 1,6583 = -0,1719$ (optisch negativ)

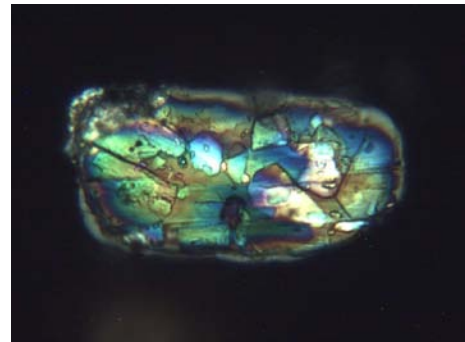
Doppelbrechung kann in Kombination mit polarisiertem Licht und einer speziellen optischen Anordnung im Mikroskop genutzt werden, um eine Interferenz der beiden Strahlen zu erreichen. Dadurch kann ein kontrastreicheres Bild erzeugt oder durch das Auftreten von unterschiedlichen Farbsäumen Mineralen bestimmt werden.

Doppelbrechende Materialien werden auch in optischen Bauelementen wie etwa Phasenverschiebern (λ/n -Plättchen) oder Interferenzkontrast-Prisma genutzt.

Bei der Art der doppelbrechenden Strukturen lassen sich 3 Typen unterscheiden:

Eigendoppelbrechung

Eigendoppelbrechung kommt bei Objekten vor die aus Kristallgittern aufgebaut sind. Dazu zählen alle Kristalle mit Ausnahme von Steinsalz.



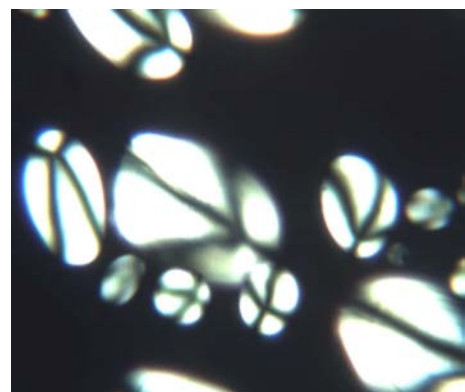
Glucose im Polarisationsmikroskop

Formdoppelbrechung

Nicht doppelbrechende Teilchen, die in einer Dimension kleiner sind als die Lichtwellen, können ebenfalls doppelbrechend werden. Dazu müssen die Teilchen gleichmäßig angeordnet sein und sich zwischen ihnen ein Medium mit abweichender Brechkraft befinden.

Zu diesem Typ zählen viele biologische Objekte wie zum Beispiel Zellulose oder Stärke.

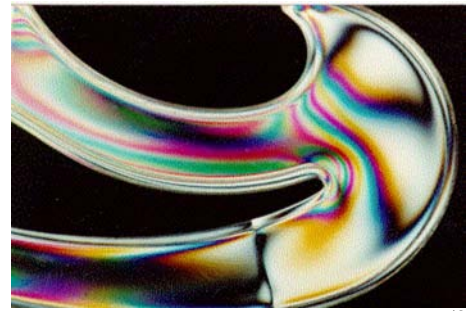
Die Formdoppelbrechung kann sich auch mit der Eigendoppelbrechung überlagern, wenn die einzelnen Teilchen selbst Eigendoppelbrechung besitzen.



Stärke im Polarisationsmikroskop

Spannungsdoppelbrechung

Doppelbrechung kann auch bei nicht doppelbrechenden isotropen Materialien auftreten, wenn diese bestimmten Kräften ausgesetzt werden (zB Verformung).

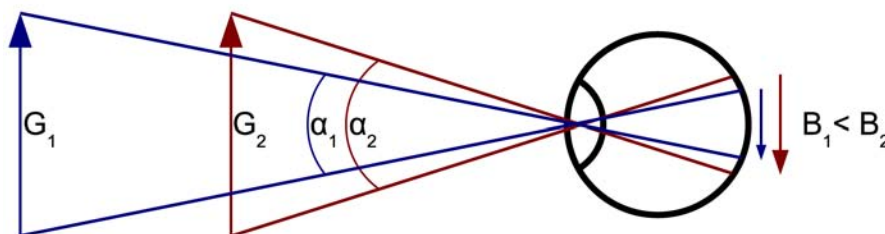


Kurvenlineal zwischen Polfiltern¹⁰

1.2.5 Optische Instrumente

Das einfachste optische Instrument ist unser Auge, es besteht vereinfacht aus einer Linse und der Netzhaut, auf der der zu beobachtende Gegenstand abgebildet wird.

Die beobachtete Größe (**scheinbare Größe**) eines Objekts hängt vom Winkel (Sehwinkel α), unter dem es von einem Beobachter wahrgenommen wird, ab. Objekte gleicher Größe (G_1 und G_2) erscheinen in unterschiedlicher Entfernung unterschiedlich groß, weil sie unter verschiedenen Sehwinkeln und damit auch unterschiedlich groß auf der Netzhaut abgebildet werden.



Durch die Veränderung des Augenlinsen-Durchmessers kann die Brennweite und damit der Sehwinkel des Auges vergrößert oder verkleinert werden. Bis zu einem bestimmten Grad ist so eine Anpassung an die jeweilige Objektentfernung möglich (Akkommodation). Ohne Anstrengung des Auges ist eine längere Beobachtung von Objekten nur in einer Entfernung von etwa 25 cm möglich (konventionelle Sehweite).

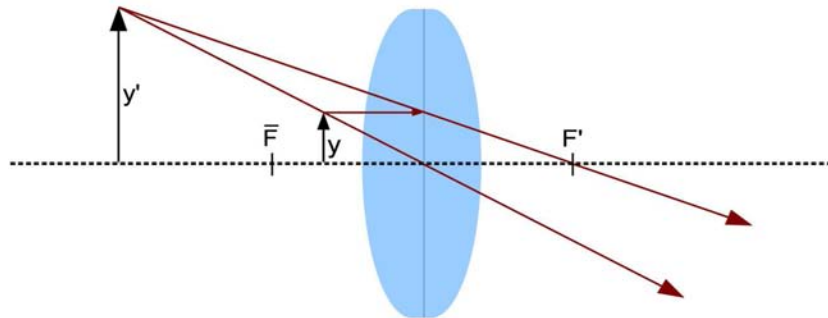
Um den Sehwinkel bzw. die Sehweite des Auges künstlich zu vergrößern verwendet man Hilfsmittel wie Lupe, Mikroskop oder Fernrohr.

¹⁰ <http://pluslucis.univie.ac.at/FBA/FBA95/Schloegl/schloegl.html>

1.2.5.1 Lupen

Eine Lupe, auch Brennglas genannt, ist eine einfache konvexe Linse mit kleiner Brennweite. Dabei befindet sich der abzubildende Gegenstand innerhalb der Brennweite f , die Gegenstandsweite ist also kleiner als die Brennweite. Somit ist die Bildweite kleiner null und es entsteht ein vergrößertes, aufrechtes jedoch nur virtuelles Bild.

Die Funktion einer Lupe besteht also darin den Sehwinkel für das Auge zu vergrößern.



1.2.5.2 Objektive

Objektive sind optische System, die ein reelles Bild eines Objektes erzeugen. Sie sind zumeist aus mehreren Einzellinsen oder Spiegeln zusammengesetzt und werden für Kameras, Mikroskope oder Ferngläser verwendet.

Die Größe des erzeugten Bildes hängt von der Brennweite der Linse und von der Lage des Objektes ab.

Mikroskop-Objektiv

Bei einem Mikroskop-Objektiv liegt der betrachtete Gegenstand im Bereich zwischen der einfachen Brennweite (f) und der doppelten Brennweite ($2f$). Es entsteht ein vergrößertes und reelles aber seitenverkehrtes (auf dem Kopf stehendes) Bild.

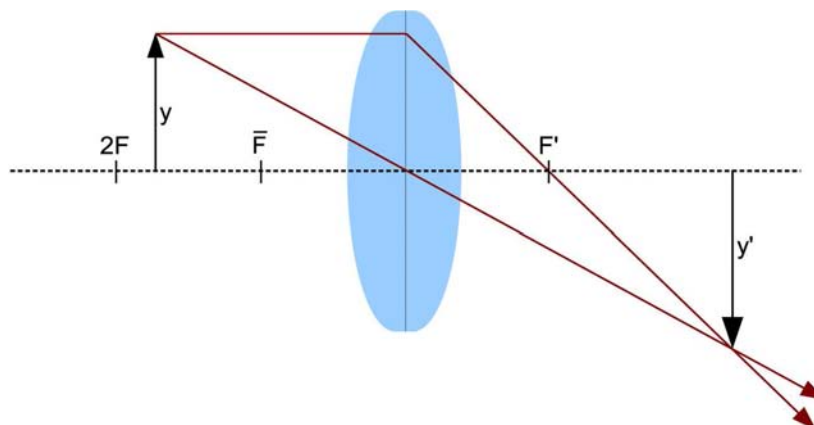
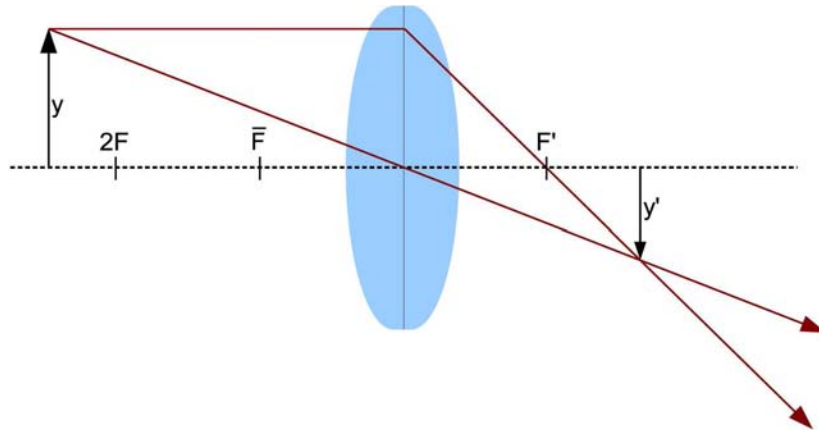


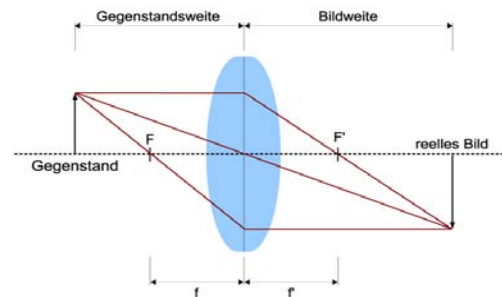
Foto-Objektiv

Im Falle des Foto-Objektives liegt der abzubildende Gegenstand außerhalb der doppelten Brennweite ($2F$), es entsteht wieder ein reelles und verkehrtes Bild, wobei der Gegenstand jetzt aber verkleinert abgebildet wird.



1.2.5.3 Gegenstandsweite und Bildgröße

Die Linsengleichung beschreibt das Verhältnis zwischen Bildgröße und Gegenstandsgröße, das heißt den Abbildungsmaßstab.



Abbildungsmaßstab

Der Abbildungsmaßstab kann 3 Größen einnehmen:

- Der Abbildungsmaßstab ist **größer als 1**:
 der Gegenstand befindet sich innerhalb der einfachen Brennweite
 hier ist die Bildgröße größer als die Gegenstandsgröße,
 der Gegenstand wird vergrößert aber virtuell abgebildet – **Lupe**.

der Gegenstand befindet sich zwischen der einfachen und der doppelten Brennweite
 damit ist die Bildgröße größer als die Gegenstandsgröße,
 der Gegenstand wird vergrößert und reell abgebildet – **Mikroskop Objektive**.

- Der Abbildungsmaßstab ist **kleiner als 1**:
 der Gegenstand befindet sich außerhalb der doppelten Brennweite
 die Bildgröße ist in diesem Fall kleiner als die Gegenstandsgröße,
 der Gegenstand wird verkleinert aber reell abgebildet – **Foto Objektive**.
- Der Abbildungsmaßstab ist **gleich 1**:
 der Gegenstand befindet sich genau auf der doppelten Brennweite ($2f$)
 hier sind Bild- und Gegenstandsgröße gleich groß und
 der Gegenstand wird reell und in seiner wirklichen Größe auf dem Film abgebildet.
- Sonderfall:
 der Gegenstand befindet sich genau auf der einfachen Brennweite (f)
 in dieser Position ist die Bildweite unendlich groß und es entsteht somit kein Bild.

Zusammenfassung

	Gegenstandsweite g	Bildweite b	Bildgröße B	Bildart
1	$g > 2f$	$f < b < 2f$	$B < G$	reell, umgekehrt
2	$g = 2f$	$2f = b$	$B = G$	reell, umgekehrt
3	$f < g < 2f$	$b > 2f$	$B > G$	reell, umgekehrt
4	$g = f$	$b = \infty$	-	kein Bild
5	$g < f$	$b < 0$	$B > G$	virtuell, aufrecht

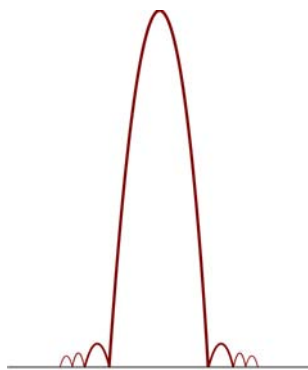
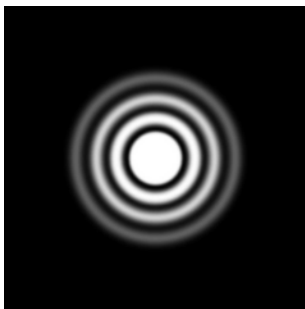
1.2.5.4 Auflösungsvermögen

Unter dem Auflösungsvermögen versteht man die Fähigkeit eines optischen Instrumentes Objektdetails getrennt abbilden zu können. Also den Abstand den 2 Punkte haben können, um noch als 2 getrennte Strukturen erkennbar zu sein.

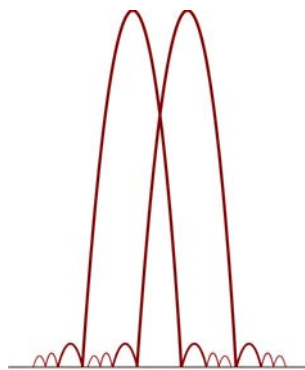
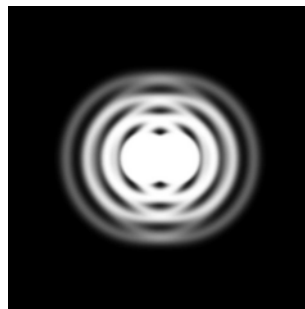
Durch die Beugungseffekte an den Strukturen treten wie im Kapitel Beugung besprochen mehrere Maxima auf. Zur Definition des Auflösungsvermögens wird daher in der Regel das Rayleigh-Kriterium verwendet.

Das Rayleigh-Kriterium besagt, daß sich zwei Beugungsscheibchen (**Airy-Discs**) gleicher Helligkeit und Farbe noch trennen lassen, wenn das Minimum des ersten mit dem Maximum des zweiten zusammenfällt, also sich die beiden Maxima 0. Ordnung gerade nicht mehr überschneiden.

Die zur Bestimmung der Auflösung verwendeten Airy-Discs sind an einer Lochblende gebeugte Lichtstrahlen.

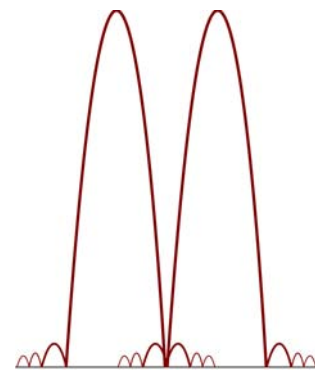
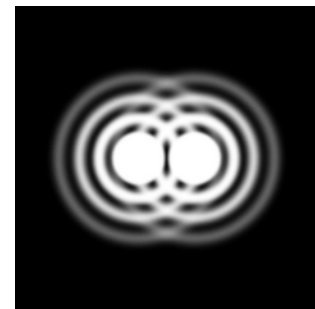


1 Airy Disc - **Beugungsbild**



2 Airy Discs - **nicht aufgelöst**

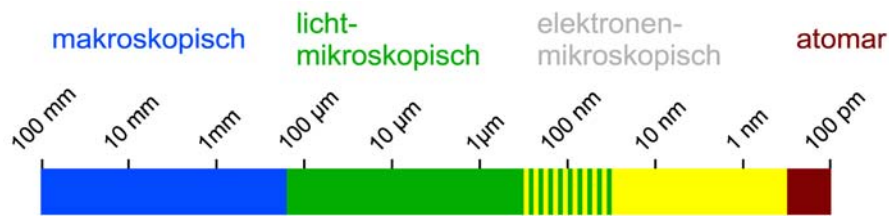
Maxima 0. Ordnung
überschneiden sich



2 Airy Discs – **aufgelöst**

Maxima 0. Ordnung
überschneiden sich nicht

1.2.5.5 Auflösungsgrenzen

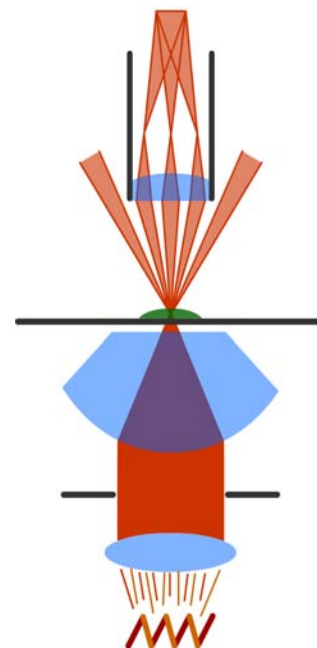


- Mit freiem Auge sind Strukturen bis zu einer Größe von höchstens 0,2 mm erkennbar.
zB: Flöhe, Riesenamöben, große Pflanzenzellen (Paprika-Innenwand ~5mm)
- Für kleinere Objekte ist eine Lupe oder ein Mikroskop erforderlich. Mit einem Lichtmikroskop lassen sich Strukturen bis zu einer Größe von 500 nm auflösen, mit Videomikroskopie oder Dunkelfeld sogar bis zu 50 nm.
Das bedeutet, dass praktisch alle Zellen von Tieren, Pilzen und Pflanzen und die meisten ihrer Organellen sichtbar werden. Auch die meisten Bakterien sind sichtbar.
zB: Chloroplasten, rote Blutkörperchen, Mitochondrien, Bakterien, Cilien
- Bei Größenordnungen unter 500 nm ist eine Auflösung nur mehr mit dem Elektronenmikroskop möglich. Die untere Grenze für Elektronenmikroskope liegt bei etwa 0,5 nm. Mit speziellen und extrem leistungsstarken Elektronenmikroskopen können sogar noch einzelne Atome dargestellt werden.
zB: Viren, Cilien, Mykoplasmen, Mikrotubuli, Ribosomen, DNS-Doppelhelix, H₂O-Molekül

1.2.5.6 Mikroskop-Auflösung / Abbe-Theorie

Die Abbe'sche Theorie der Mikroskop-Auflösung geht wie bei den Airy-Discs davon aus, dass jedes Objekt Beugungseffekte hervorruft. Das bedeutet, dass die Bildinformation des Objektes auf die Beugungsmaxima aufgeteilt wird!! Je mehr Maxima eines Objektes nun für die Bildgebung genutzt werden können, desto mehr Informationen sind über das Objekt vorhanden und umso höher ist daher auch die Auflösung.

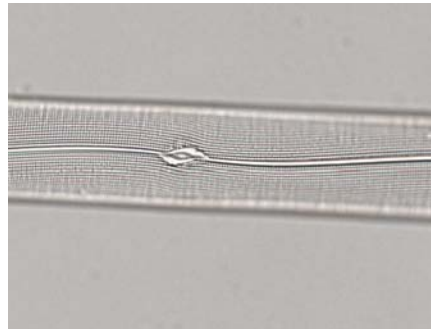
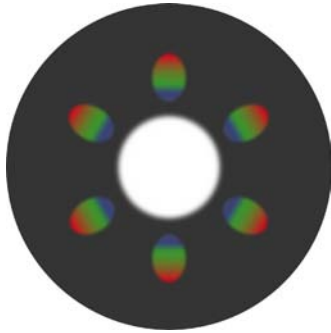
Die Öffnung eines Objektivs (Apertur) ist aber nicht unendlich groß, sodass nicht alle Maxima eingefangen werden können. Um eine minimale Strukturinformation und damit eine Auflösung zu erhalten müssen mindestens Maxima der nullten und ersten Ordnung erfasst werden. Ist die Objektivöffnung zu klein, gelangen die Maxima der ersten Ordnung nicht mehr ins Objektiv und es kann kein Bild entstehen.



Numerische Apertur

Blickt man mit einem Einstellfernrohr in die hintere Brennebene des Objektivs so sieht man bei hoher Apertur in der Mitte das helle Bild des Maximums 0. Ordnung umgeben von den Beugungsbildern der Maxima 1. Ordnung.

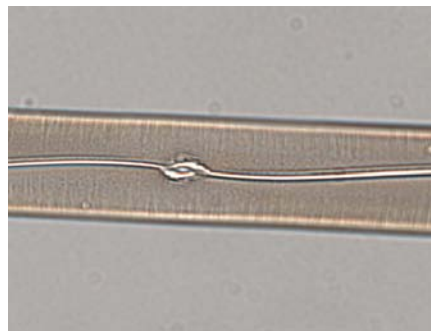
Durch die Interferenz dieser beiden Maxima kann ein voll aufgelöstes Bild erzeugt werden.



aufgelöste Strukturen

Bei zu kleiner numerischer Apertur gelangen die Maxima 1. Ordnung nicht mehr in des Objektiv oder sie werden von die Objektivblende geblockt.

Zur Bildgebung steht hier nur das 0. Maximum zur Verfügung. Diese Bildinformationen reichen aber nicht aus um die Strukturen völlig aufzulösen.



nicht aufgelöste Strukturen

Wellenlänge

Das Auflösungsvermögen wird neben der numerischen Apertur von Objektiv und Kondensor auch von der Wellenlänge des Lichtes beeinflusst; je kürzer die Wellenlänge desto höher die Auflösung. Wobei generell monochromatisches Licht (also Licht einer Wellenlänge) die Bildqualität verbessert, weil dadurch weniger chromatische Fehler auftreten.

Das Auflösungsvermögen lässt sich nun mit folgender Formel berechnen.

$$d = 1,22 \times \lambda / (NA_{obj.} + NA_{cond.})$$

λ = Wellenlänge des Lichts
 NA = numerische Apertur von Objektiv und Kondensor

Diese Formel gilt allerdings nur für punktförmige (ideale) Objekte. Für einfache Berechnungen kann daher auch folgende, reduzierte Formel verwendet werden.

$$d = \lambda / (2 \cdot NA_{obj.})$$

1.2.5.7 Qualität von Optiken

Lupen, Kameras, Mikroskope und Ferngläsern sind aus Linsen oder Linsensystemen aufgebaut, diese sind immer der zentrale Bestandteil eines optischen Gerätes und dessen Bildqualität.

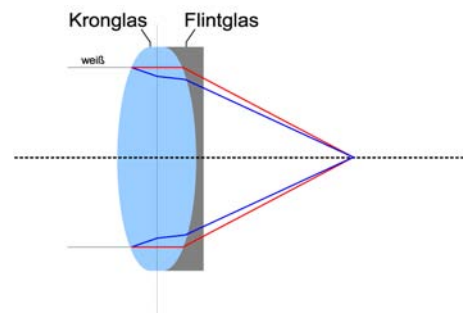
Linsenfehler beeinträchtigen daher die Bildqualität massiv, aus diesem Grund werden für hochwertigere optische Geräte nur korrigierte Linsen und Linsensysteme verwendet.

Je nach Qualität der Linsen sind ein oder mehrerer Fehler korrigiert.

Achromate

Bei achromaten Optiken ist die chromatische Aberration für rot und blau sowie meistens auch die sphärische Aberration gehoben.

Dazu werden 2 dünne Linsen aus Gläsern mit extremen Eigenschaften (Fluorkronglas, Kalziumfluorid oder spezielles Kurzflintglas) verwendet. Die beiden Linsen grenzen direkt aneinander und sind meistens miteinander verkittet. In anderen Fällen bleibt ein kleiner Luftspalt zwischen den Linsen; dieser erzeugt eine zusätzlich Lichtbrechung, die auch eine Korrektur der sphärischen Aberration ermöglicht.

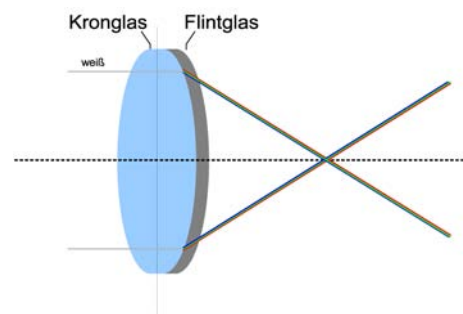


Achromate stellen die preisgünstige Lösung von korrigierten Linsen dar und eignen sich im Routinebetrieb hervorragend für Hellfeld und Phasenkontrast.

Apochromate

Bei apochromaten Linsensystemen sind Farbfehler vollständig beseitigt, also die chromatische Aberration für rot, blau und grün gehoben.

Das Prinzip ist gleich wie bei achromaten Systemen, nur dass durch den Einsatz eines dritten Linsenmaterials auch noch das beim Achromaten verbleibende sekundäre (grüne) Spektrum gehoben wird.



Fluorite

Durch besondere Materialien wie Fluorit-Glas und "ED" (extreme low dispersion) Glas kann das sekundäre Spektrum auch mit einer an sich nur achromatischen Konstruktion stark verringert werden.

Fluorit besitzt die Eigenschaft das Lichtspektrum gleichmäßig zu brechen, damit lässt sich die Chromatische Aberration von Objektiven mit weniger Linsen ausgleichen als mit herkömmlichen Materialien.

Fluorit-Objektive haben den Vorteil, dass weniger Linsen zusammengesetzt sind, damit wird der Lichtverlust durch das optische System reduziert. Durch dieses Verfahren erhält man kontrastreiche Bilder mit optimaler Qualität.

Planobjektive

Planobjektive besitzen die aufwendigste Konstruktion von allen optischen Systemen. Bei diesen Objektiven ist die störende Bildfeldwölbung weitgehend beseitigt.

Zusätzlich kann bei diesen Objektiven auch noch die chromatische Aberration gehoben sein. Je nach Art der Korrektur spricht man dann von Planachromaten oder Planapochromaten.

Objektive dieser Art sind sehr teuer und werden in erster Linie für Mikroskopietechniken verwendet die auf besonders gute Qualität und Auflösung angewiesen sind.

Vergütung

Vergütung ist eine Behandlung optischer Gläser, bei der auf das Glas eine dünne Schicht mit geringerer Brechkraft (z.B. Magnesiumfluorid) aufgebracht wird. Vergütung wird zum Beispiel bei optischen Geräten (Mikroskop- und Foto-Objektive, Ferngläser) sowie bei Brillen angewendet. Am Übergang zwischen Luft und Glas beträgt die Reflexion je nach Glassorte und Einfallswinkel etwa 4-9 % des einfallenden Lichtes. Bereits mit einer einfachen Vergütung kann dieser Wert auf unter ein Prozent reduziert werden. Das wirkt sich besonders bei Systemen aus mehreren Linsen positiv aus, aufwändige Linsensysteme mit zehn oder mehr Linsen wären ohne Vergütung praktisch nicht einsetzbar.

Vergütete Flächen sind besonders empfindlich gegen mechanische Einwirkung (zerkratzen extrem leicht) und können daher nur schwer gereinigt werden. Ausgenommen sind nach außen zeigende Linsenflächen welche „hart“ vergütet sind und vorsichtig gereinigt werden können.

Mikroskop

Ein Mikroskop (griechisch mikrós: klein; skopein: betrachten) dient wie der Name schon sagt, zum betrachten von sehr kleinen Objekten.

Einfache Vergrößerungslinsen waren schon im 16. Jahrhundert bekannt, und das Prinzip der Vergrößerung durch mit Wasser gefüllte Glasschalen wurde bereits von den Römern beschrieben.

Das erste Mikroskop wurde wahrscheinlich vom Brillenschleifer Hans Janssen um das Jahr 1595 konstruiert und gebaut.

1610 benutzte Galileo Galilei sein Fernrohr als Mikroskop, indem er die Rohre länger auseinanderzog. Als Okular verwendete er eine Zerstreuungslinse und als Objektiv eine Sammellinse.



Als Pioniere der modernen Mikroskopie sind Robert Hooke (1635-1703) und Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) zu nennen.

Hooke konstruierte 1665 erstmals ein aus mehreren Linsen zusammengesetztes Mikroskop und konnte damit Zellen eines Korkgewebes sehen.

Leeuwenhoek war damals als einziger in der Lage, Linsen so exakt anzufertigen, dass mit ihnen eine 270 fache Vergrößerung erreicht werden konnte. 1685 Jahre später konnte Leeuwenhoek auch Bakterien beobachten. Sein Mikroskop vergrößerte etwa 270fach.

Moderne Mikroskope sind wie bei Leeuwenhoek aus zahlreichen Linsen zusammengesetzt (**compound microscopes**). Durch diese Art der Konstruktion lässt sich eine stärkere Vergrößerung sowie eine besserer Bildqualität erreichen.

Das Mikroskop

Moderne Mikroskope sind in den meisten Fällen nach einem Baukastensystem konstruiert, je nach Mikroskopklasse mit unterschiedlicher Flexibilität und Ausbaumöglichkeit.

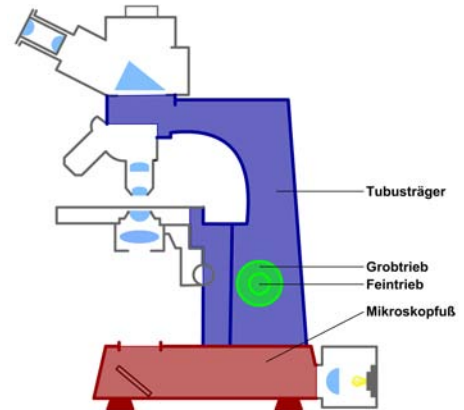
Bei einfachen Kurs-Mikroskopen beschränken sich die Möglichkeiten meist nur auf den Wechsel von Objektiven und Okularen. Größere Forschungsmikroskope hingegen sind sehr vielseitig erweiterbar. Auf dieses Thema wird im Kapitel Mikroskop-Klassen näher eingegangen.

Der prinzipielle Aufbau ist aber bei allen Mikroskopen identisch und soll im folgenden anhand eines einfachen Mikroskops skizziert werden, die einzelnen Bauteile werden in den anschließenden Kapiteln näher erklärt.

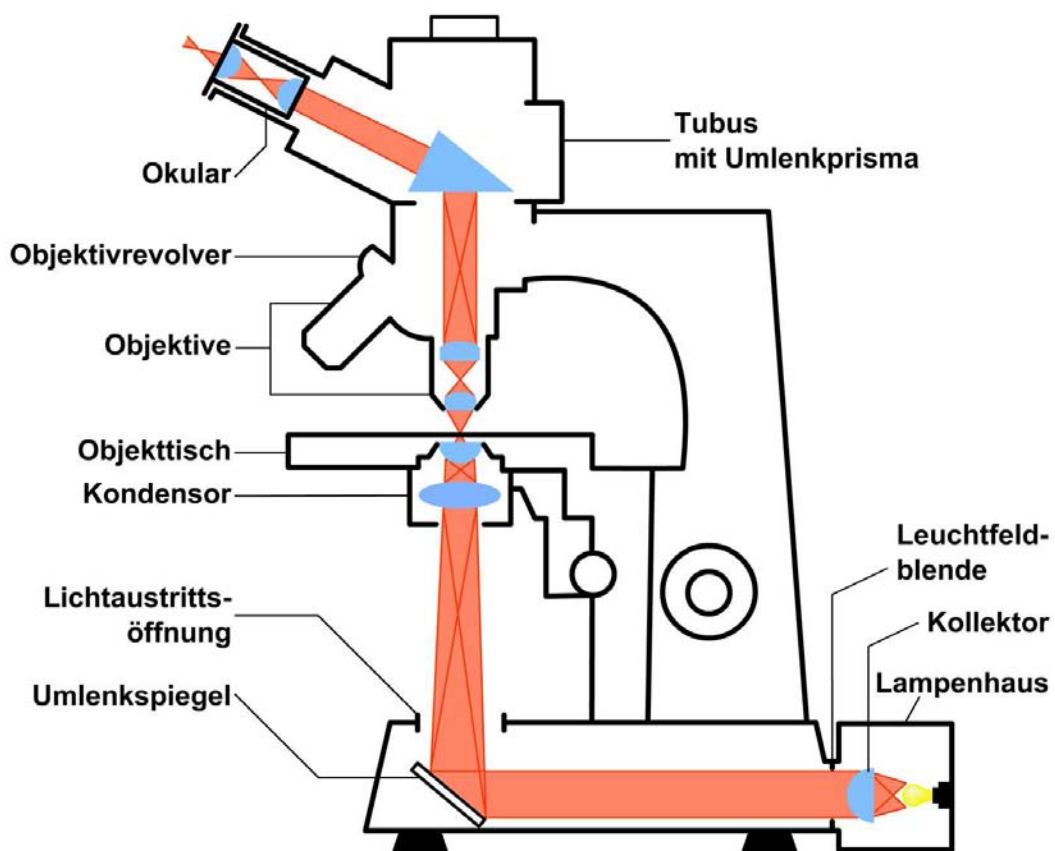
Aufbau

Das Grundgerüst eines einfachen Mikroskops ist das **Stativ**.
Es besteht aus :

- **Mikroskopfuß (1)**
Grundplatte des Mikroskops
- **Tubusträger oder Stativarm (2)**
Säule zur Befestigung von Optik und der Objektstisch
- **Grob- und Feintrieb (3)**
Einstellräder zum Scharfstellen der Präparates



An diesem Grundgerüst werden alle weiteren Bestandteile zur Vergrößerung und Beleuchtung montiert. Zum besseren Verständnis der Anordnung folgen wir dabei dem Lichtverlauf im Mikroskop.



Die **Beleuchtungseinheit** ist entweder direkt im Mikroskop-Fuß oder bei stärkeren Lampen wegen der enormen Hitzeentwicklung in einem eigenen Lampenhaus untergebracht.

Von dort ausgehend passiert das Licht zuerst eine Sammellinse, den **Kollektor**; er bündelt das Licht der Lampe und erzeugt ein einheitlich helles Bündel parallel verlaufender Lichtstrahlen.

Über dem Kollektor befindet sich bei allen besseren Mikroskopen eine Leuchtfeldblende, welche für die Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung erforderlich ist.

Der **Kondensor** fokussiert die parallelen Lichtstrahlen in die Präparatebene.

Das Präparat selbst liegt über dem Kondensor auf einem **Objektisch**. Das Scharfstellen des Objektes erfolgt durch Heben und Senken des Objektisches. Dazu befinden sich seitlich am Mikroskop der Grob- und Feintrieb.

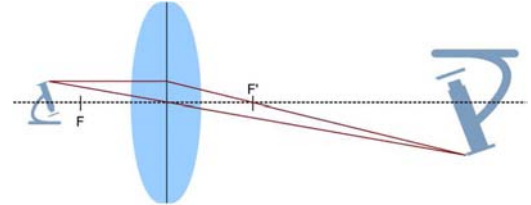
Oberhalb des Präparates befindet sich das zentrale optische Bauteil, das **Objektiv**.

Daran schließt der **Tubus** an, eine Röhre an dessen oberem Ende sich die **Okulare** befinden; mit ihnen kann das vom Objektiv produzierte reelle Zwischenbild wie durch eine Lupe nochmals vergrößert betrachtet werden.

Gesamtvergrößerung - Strahlengang

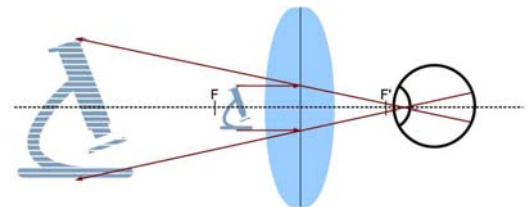
einfache Vergrößerungen – Objektiv

Das Objektiv produziert ein vergrößertes, reelles und seitenverkehrtes Bild, da sich im Mikroskop das betrachtete Präparat im Bereich zwischen der einfachen Brennweite und der doppelten Brennweite befindet.



einfache Vergrößerungen – Okular

Ein Okular entspricht in seiner Funktion einer Lupe; es erzeugt somit ein virtuelles vergrößertes und nicht seitenverkehrtes Bild. Dazu muss sich der abzubildende Gegenstand innerhalb der einfachen Brennweite befinden.



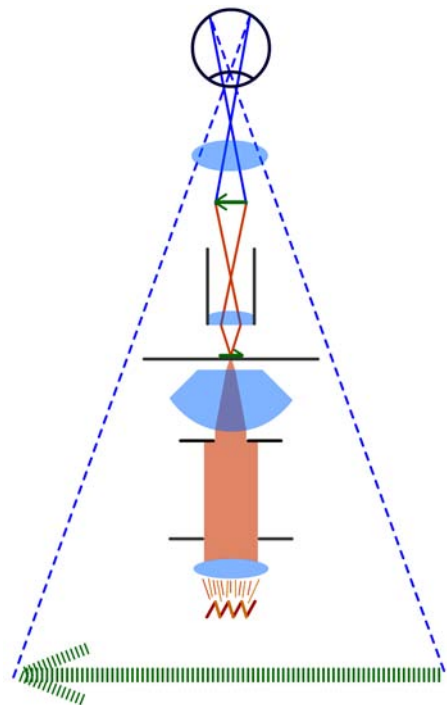
zusammengesetzte Vergrößerung – Mikroskop

1. Vergrößerung

Die erste Vergrößerung erfolgt durch das Objektiv. Dieses erzeugt in einer bestimmten Entfernung ein reelles Zwischenbild, ähnlich einem Diaprojektor der ein Bild auf eine Leinwand wirft.

2. Vergrößerung

Das Zwischenbild wird nun mit dem Okular betrachtet. Das Okular hat dabei die Funktion einer Lupe welche das reelle Zwischenbild auf die Netzhaut des Auges projiziert. Dadurch erscheint das Zwischenbild vergrößert aber virtuell in einer Entfernung von etwa 25 cm. Diese zweite Vergrößerung ist zu vergleichen mit dem projizierten Dia, welches mit einer Lupe vergrößert betrachtet wird.



Lichtquellen

Halogenlampen

In einer Glühlampe wird ein Glühfaden (meist aus dem hochschmelzenden Metall Wolfram) durch Stromfluss so stark erhitzt, dass er glüht, dabei wird die elektrische Energie in elektromagnetische Strahlung (Infrarot- und sichtbares Licht) umgewandelt und abgestrahlt. An der normalen Luft würde der Glühfaden sofort zu Pulver verbrennen, daher wird der Glühfaden durch eine spezielle Gasatmosphäre in einem Glaskolben abgeschirmt.

Die Zugabe des Halogens Brom oder Iod steigert die Lebensdauer auf 2.000 bis 4.000 Stunden – bei einer Betriebstemperatur von ca. 3.000 K.



Bei so genannten Halogenglühlampen wird durch die Zugabe des Halogens Brom oder Iod ein höhere Betriebstemperatur und damit auch eine höhere Lichtausbeute erreicht. Dabei reagiert das Halogen mit den vom Glühdraht verdampften Wolframatomen und stabilisiert eine wolframhaltige Atmosphäre. Der Prozess ist reversibel: Bei hohen Temperaturen zerfällt die Verbindung durch Pyrolyse wieder in ihre Elemente – Wolframatome kondensieren auf oder in der Nähe der Glühwendel. Zusätzlich verhindert der Halogenzusatz bei einer Glastemperatur von mehr als 250 °C den Niederschlag von Wolframdämpfen auf dem Glaskolben.



Lichtausbeute

Halogenlampen: 28 Lumen/Watt bei 3000K
normale Glühlampen: 15 Lumen/Watt bei 2.700 K.

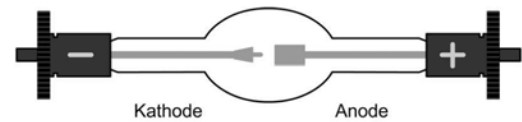
Gasentladungslampen

Bogen- oder Gasentladungslampen sind neben Lasern eine der stärksten Lichtquellen und zeichnen sich auch durch einen hohen UV-Anteil im Spektrum aus.

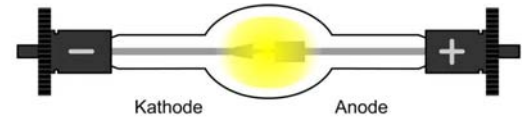


Bogenlampen bestehen aus einem mit isolierendem Gas (zB. Quecksilber oder Xenon) gefüllten Quarzglaskolben, in den zwei Elektroden eingeschmolzen sind.

Der Elektrodenabstand beträgt je nach Typ 0,25 bis mehrere Millimeter. Das Licht wird durch eine Bogenentladung zwischen den beiden Elektroden erzeugt.



Die Zündung des Lichtbogens erfolgt durch das Anlegen einer Zündungsspannung von ca. 20 kV bis 35 kV. Hochleistungs-Netzgeräte regeln die Betriebsspannung, die nach der Zündung auf ca. 30 V herabgesetzt werden muss.



Um eine lange Lebensdauer und einen einwandfreien Betrieb zu gewährleisten ist darauf zu achten, dass die Lampen immer mindestens 20 Minuten brennen, um eine volle Aufheizung zu gewährleisten. Ebenso ist darauf zu achten, die Lampen nach dem Abschalten völlig auskühlen zu lassen (20 – 30 Minuten), um die Bildung von Quecksilberniederschlägen am Glaskolben zu verhindern.

Neutrale Graufilter

Bei Gasdrucklampen lässt sich die Lichtstärke nicht wie bei Halogenlampen durch ein Potentiometer regeln. Statt dessen werden Neutrale Graufilter (Neutral Density-Filter) eingesetzt. Diese schwächen die Lichtintensität farbneutral und gleichmäßig über einen großen Wellenlängenbereich.

Graufilter gibt es verschieden Stärken; je nach dem wie stark sie das Licht abschwächen.
zB ND2, ND4, ND8

In der Mikroskopie werden meist verschiedene Graufilter kombiniert um die optimale Lichtstärke zu erreichen.

Gasdruck

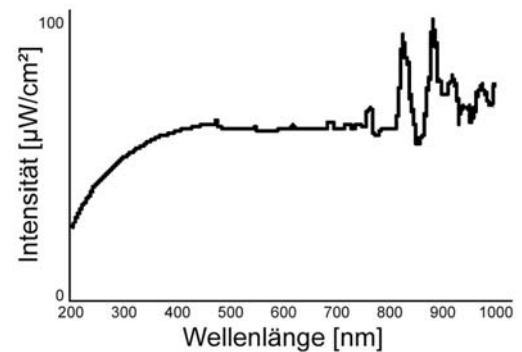
Hinsichtlich des Innendruckes der Lampen können **Niederdrucklampen** (Neonröhren) sowie **Hoch- und Höchstdrucklampen** (Quecksilber-, Xenon- oder Metallhalogenid-Lampen) unterschieden werden.

Die Edelgasfüllung im Inneren des Glaskolbens von Hoch- und Höchstdrucklampen hat einen Überdruck von einigen bar. Während des Betriebes erhöht sich dieser Überdruck je nach Lampentyp auf bis zu 100 bar.

Dieser enorme Druck erfordert daher besondere Aufmerksamkeit und Vorsicht im Umgang mit Bogenlampen (Gesichtsschutz und Handschuhe). Heiße Leuchtmittel sollten nach Möglichkeit überhaupt nicht bewegt werden.

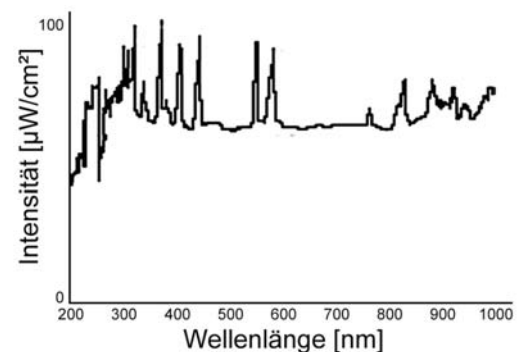
Xenon-Bogenlampen

Bogenlampen mit Xenongasfüllung haben über einen weiten Wellenlängenbereich (300 – 700 nm) ein sehr einheitliches Spektrum. Die Lichtausbeute von Xenon-Bogenlampen beträgt ungefähr 40 Lumen/Watt. Durch den Gleichstrombetrieb und den hohen Innendruck ergibt sich ein flickerfreier punktförmiger Leuchtbogen mit konstanter Farbtemperatur über die gesamte Lebensdauer. Die Lebensdauer von Xenon-Bogenlampen beträgt ungefähr 2000 Betriebsstunden.



Quecksilber-Bogenlampen

Quecksilber-Bogenlampen haben eine Gasfüllung aus Quecksilber und einem Edelgas (Argon oder Xenon), wobei das Edelgas für den Aufbau der Entladung zuständig ist. Die Entladungswärme des Lichtbogens erhitzt das Quecksilber und bringt es zum Verdampfen. Das Edelgas beschleunigt nicht nur die Aufwärmung sondern verbessert auch die Bogenstabilität sowie die Lampenlebensdauer.



Durch die Aufwärmphase, in der das Quecksilber verdampft, liefern Hg-Bogenlampen erst nach 3 bis 5 Minuten den vollen Lichtstrom. Im kalten Zustand ist der Gasdruck im Inneren des Kolbens niedrig und es sind kleine Quecksilberkugeln zu sehen.

Dieser Lampentyp erzeugt ein Spektrum mit charakteristischen Hg-Linien zwischen 240 und 620 nm. Die mittlere Lichtausbeute von Quecksilberdampf-Hochdrucklampen liegt dafür bei ungefähr 60 Lumen/Watt und ist damit höher als bei Xenon-Bogenlampen.

Quecksilber(Xenon)-Lampen

Quecksilber(Xenon)-Lampen verwenden Xenon als Starter-Gas. Sie starten zuerst als Xenon-Lampe; mit zunehmender Verdampfung des Quecksilbers dominiert das Hg-Spektrum. Das Spektrum dieser Lampen entspricht jedoch im wesentlichen dem von Quecksilber-Bogenlampen mit einigen schwachen Xe-Linien im IR. Im Vergleich zu reinen Hg-Lampen liefern sie aber im UV-Bereich mehr Intensität.

Der Vorteil gegenüber normalen Hg-Lampen liegt im unproblematischen Betrieb (Stabilität, Kühlung), sowie in der deutlich höheren Lebensdauer.

Metallhalogenid Lampen

Metallhalogenid-Strahler sind Quecksilber-Mitteldruckstrahler deren Spektren durch den Zusatz von Metallhalogeniden (Reaktionsprodukte von einem Metall mit einem Halogen) an das des Sonnenlichtes angepasst wird.

MHs geben ein diffuseres Licht und weniger UV-Strahlung ab und sind deshalb für die Augen etwas weniger bedenklich. Ihre Lichtleistung ist allerdings vermindert.

Laser

Ein Laser (**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation) ist eine Lichtquelle, die räumlich und zeitlich kohärentes Licht erzeugt. Als kohärent wird eine Strahlung bezeichnet, bei der alle enthaltenen Photonen die gleiche Energie, gleiche Richtung und Phase besitzen. Aufgrund dieser Kohärenz ist Laserlicht monochromatisch und stark gebündelt.

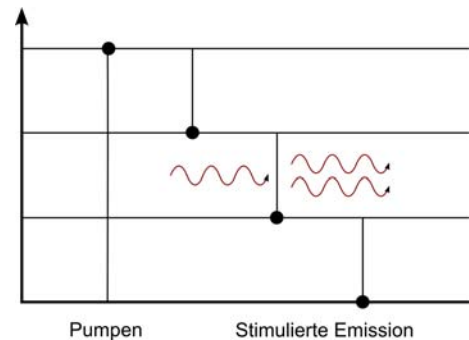
In der Mikroskopie werden Laser hauptsächlich in der Konfokal-Mikroskopie eingesetzt.

Prinzip

Die Arbeitsweise eines Lasers beruht auf der so genannten **induzierten oder auch stimulierten Emission**, mit der die Lichtenergie stark erhöht wird. Dabei wird ein Atom durch Energiezufuhr in einen angeregten Zustand versetzt.

Durch **ein Photon** wird nun eine Emission induziert und es werden **zwei Photonen** gleicher Energie, Phase, und Richtung abgegeben.

Die Zufuhr von Energie, die benötigt wird, um die Atome oder Moleküle in die angeregten Zustände zu versetzen, wird als **Pumpen** bezeichnet und kann elektrisch oder optisch durch das Licht einer Gasentladungslampe erfolgen.

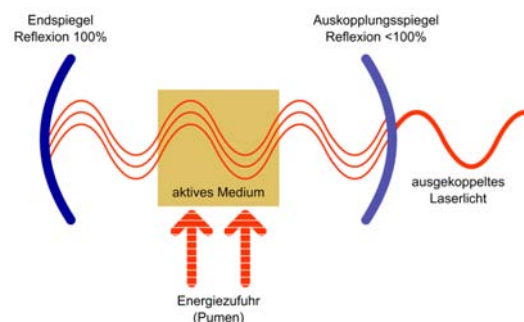


- Energiezufuhr: e^- wird angeregt (Pumpen)
- e^- fällt wieder auf energetisch niedrigeren Zustand
- Stimulierte Emission: ein Lichtteilchen stimuliert Übergang, dadurch entsteht 2. Lichtteilchen
- Eigenschaften der Lichtteilchen sind ident
- Lichtverstärkung

optischer Resonator

Setzt man einen Stoff, der viele angeregte Atome oder Moleküle enthält (aktives Medium) in einen optischen Resonator, so sorgt die stimulierte Emission dafür, dass das meiste Licht in Richtung des schon vorhandenen Lichts emittiert wird. Das Licht im Resonator wird also immer mehr verstärkt.

Ein optischer Resonator besteht aus mindestens zwei Spiegeln, die das Licht auf sich selbst abbilden. Im Resonator wird das Licht beim Hin- und Herlaufen zwischen den beiden Spiegeln durch stimulierte Emission immer weiter verstärkt. Über einen halbdurchlässigen Spiegel (Auskopplungsspiegel) wird das Laserlicht aus dem Resonator ausgekoppelt.



Laserresonatoren bestehen meist nicht nur aus Spiegeln, sondern besitzen zusätzliche Linsen und andere optische Bauteile, um den Resonator für den gewünschten Zweck zu optimieren.

Laser-Typen

Die Einteilung und Benennung der Lasertypen erfolgt in der Regel nach dem verwendeten aktiven Medium. Für die Mikroskopie sind vor allem Gaslaser und verstärkt auch Halbleiterlaser von Bedeutung.

- **Gaslaser**

Das aktive Medium ist hier gasförmig. Das Pumpen erfolgt meistens elektrisch durch eine Gasentladung im aktiven Medium selbst.

Helium-Neon-Laser

wichtigste Emissionswellenlänge bei 632,8 nm (rot)

Argon-Ionen-Laser

mehrere Linien bei 457,9 nm, 476,5 nm 488,0 nm, 496,5 nm, 501,7 nm, 514,5 nm (blau bis grün)

Mischgas-Laser

enthalten keine reinen Gase, sondern eine Mischung verschiedener Gase (meistens Argon und Krypton)

Kohlenmonoxidlaser

mittleres Infrarot

Stickstofflaser

337,1 nm (UV)

...

- **Farbstofflaser**

Bei Farbstofflasern dient ein organischer Farbstoff in alkoholischer Lösung als aktives Medium.

Stilbene - Klasse von Farbstoffen im blauen Spektralbereich

Cumarine - Klasse von Farbstoffen im blauen bis grün-gelben Spektralbereich

Rhodamine - Klasse von Farbstoffen im gelben bis orange-roten Spektralbereich

- **Festkörperlaser**

Bei Festkörperlasern wird ein Trägerwerkstoff mit Ionen eines fremden Stoffes dotiert. Diese Ionen bilden das eigentliche aktive Medium; das Trägermaterial nimmt dabei nur geringen Einfluss auf die Eigenschaften der Ionen.

Trägermaterialien

Glas
Al₂O₃ (Korund, Saphir)
YAG (Yttrium-Aluminium-Granat)

Dotierungsmaterialien

Chrom
Neodym,
Ytterbium
Titan
Erbium

- **Halbleiterlaser**

Wie der Name schon sagt werden hier Halbleiter zum Anregen der Elektronen verwendet. Laserdioden sind also direkt elektrisch gepumpte Laser.

Die Wellenlänge der Laserstrahlung hängt dabei vom verwendeten Halbleitermaterial ab.

Diodenlaser sind im Vergleich zu herkömmlichen Lasern bedeutend kleiner, energiesparender, oft auch kostengünstiger und vor allem einfach zu betreiben.

Laser – Klassen

- 1 Die zugängliche Laserstrahlung ist ungefährlich. (CD-Player)
- 1 M Die zugängliche Laserstrahlung ist ungefährlich, solange keine optischen Instrumente, wie Lupen oder Ferngläser verwendet werden.
- 3B Die zugängliche Laserstrahlung ist gefährlich für das Auge und in besonderen Fällen auch für die Haut. (Mikroskopie!!!!)



LED (Light Emitting Diode)

Eine Leuchtdiode (LED) ist ein elektronisches Halbleiter-Bauelement. Fließt Strom in Durchlassrichtung durch die Diode so emittiert sie Licht.

Anders als Glühlampen emittieren LED's Licht nur in einem begrenzten Spektralbereich, das Licht ist annähernd monochrom. Die Wellenlänge hängt dabei vom Halbleitermaterial ab.

LED's besitzen eine sehr hohe Lebensdauer (bis zu 100.000 Stunden) und produzieren keine Wärme, was sie für den Einsatz in der Mikroskopie sehr interessant macht.

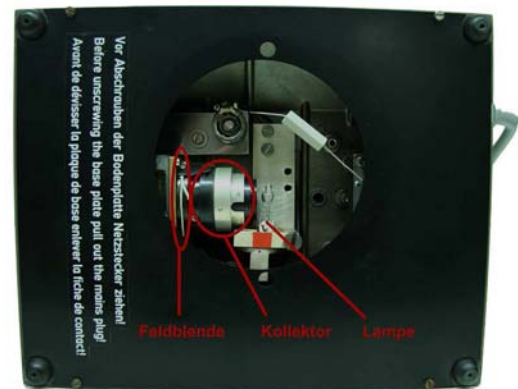
Kollektor

Der Kollektor besteht meist aus einer einzelnen Linse. Seine Aufgabe ist nicht, wie die Bezeichnung vermuten ließe Licht zu sammeln sondern einen Gegenstand abzubilden.

Im Falle des Mikroskops projiziert der Kollektor das Bild der Lichtquelle (Glühwendel) in den Kondensor.

Der Kollektor befindet sich in den meisten Fällen eingebaut im Fuß des Mikroskopes oder im Lampenhaus direkt vor der Lampe.

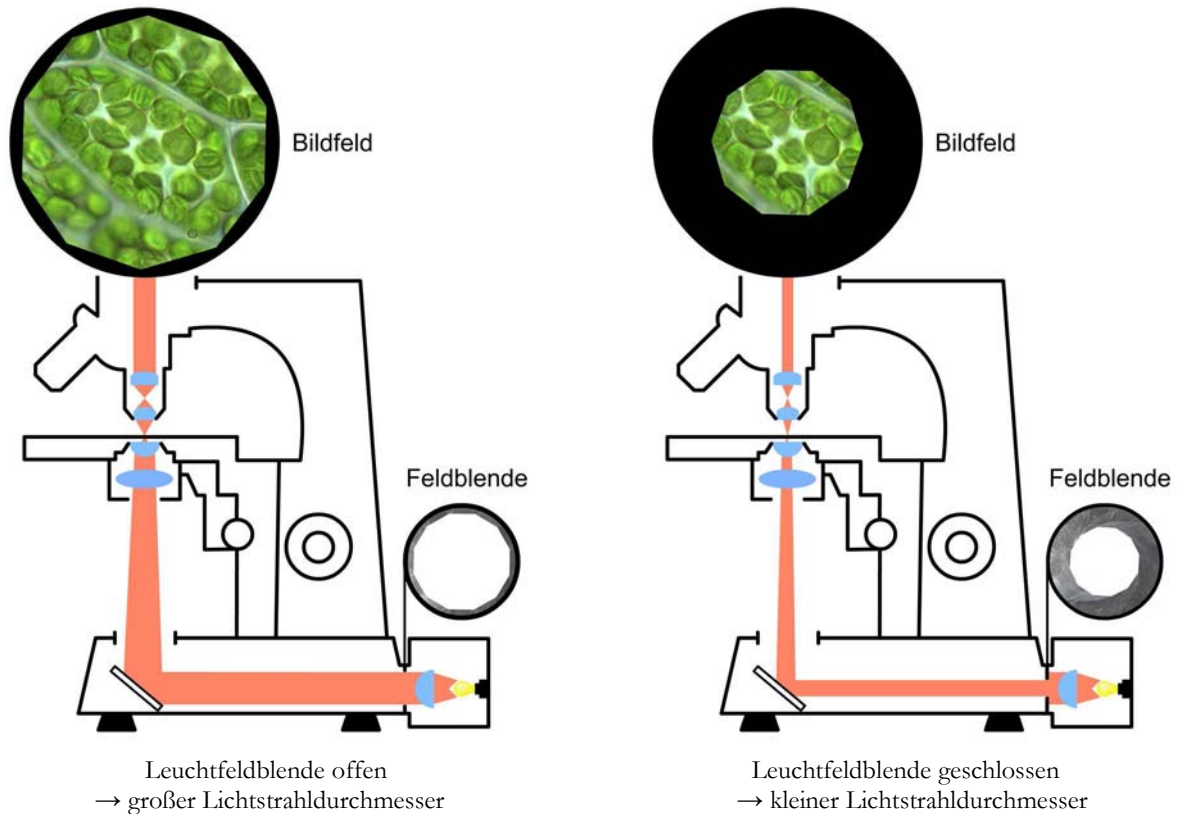
Die Kollektorlinse bildet eine gleichmäßig ausgeleuchtete Fläche und wird daher bei der Köhler'schen Beleuchtung als beleuchtendes Element im Strahlengang verwendet.



Leuchtfeldblende:

Nach dem Kollektor (zumeist knapp oberhalb) befindet sich eine Irisblende, die so genannte Leuchtfeldblende oder einfach Feldblende. Die Feldblende liegt im Strahlengang in einer Bildebene, das bedeutet, dass sie auch im Mikroskopbild abgebildet wird. Aufgrund dieser Position im Strahlengang kann mit ihr der Durchmesser des Lichtstrahls und somit die Größe des ausgeleuchteten Feldes reguliert werden.

Durch die Anpassung des Lichtstrahl-Durchmessers an die Größe des Bildfeldes können Überstrahlungen im Objekt durch Licht außerhalb des Bildfeldes verhindert werden.



Kondensator

Der Kondensator ist ein optisches System und besteht aus einer oder mehreren Sammellinsen oder Spiegelflächen. Er bildet die Lichtquelle (Lampe oder Kollektor) in der hinteren Brennebene des Objektivs ab. Beim Mikroskop hat er zusätzlich die Aufgabe, die gesamte Apertur (die Öffnungsweite) des Objektivs mit Licht auszufüllen, um so eine größtmögliche Auflösung zu erreichen.

Je nach Einsatzbereich des Kondensators gibt es unterschiedliche Qualitäten des Linsensystem. Einfache Kondensoren für Kursmikroskope bestehen meist nur aus wenigen unkorregierten Linsen. Für hochwertigere Mikroskope werden Kondensoren mit korregierter chromatischer Aberration und Bildfeldwölbung verwendet. Zusätzlich können hochwertige Kondensoren auch immergierbar sein, und dann eine numerische Apertur bis 1,4 erlangen.

Bauarten

Bei der Bauweise sind grundsätzlich 2 Typen zu unterscheiden.

Scheibenkondensator

Bei dieser Bauweise befindet sich unter dem Linsensystem des Kondensators eine Scheibe mit verschiedenen Einsätzen für Dunkelfeld, Phasenkontrast oder Interferenzkontrast. Bei einigen Scheibenkondensatoren ist auch die Kondensorblende in diese Scheibe eingebaut, bei anderen ist sie gesondert unterhalb dieser Scheibe angebracht.



ältere Bauweise mit modularen Aufsätzen

Der Kondensator besteht hier nur aus dem Linsensystem selbst. Alle weiteren Teile wie die Kondensorblende oder Einsätze für Dunkelfeld und Phasenkontrast müssen jeweils separat aufgesteckt werden.



Kondensorblende

Unterhalb des Kondensors befindet sich eine weitere Blende; die Kondensor- oder Aperturblende. Sie befindet sich im Strahlengang **IMMER** außerhalb von Objekt-, Bild- oder Zwischenbildebenen. Sie wird abgebildet in der hinteren Brennebene des Objektivs sowie im Ramsdenschen Kreis (Austrittspupille des Okulars), jedoch nicht in der Präparatebene. Es kommt daher zu **KEINER** Veränderung der Bildfeldgröße.

Aufgrund der Lage außerhalb einer Bildebene bewirkt die Veränderung des Strahlenbündels durch die Kondensorblende, dass Kontrast, Schärfentiefe und Auflösung reguliert werden können.

Bei geschlossener Kondensorblende und somit einem sehr schmalen Lichtkegel erhält man einen starken Kontrast und eine große Schärfentiefe, verliert gleichzeitig aber auch an Auflösung. Die Kondensorblende darf daher **NIE** zum Einstellen der Lichtstärke verwendet werden, sondern **NUR** zur Kontrastregulierung!!!



Schärfentiefe

In der geometrischen Optik werden Bildpunkte nur in der exakten Bildweite scharf abgebildet.

Der von der Linse ausgehende Lichtkörper ist kegelförmig, daher wird mit zunehmender Entfernung von der Bildebene aus jedem scharf abgebildetem Bildpunkt ein immer größeres unscharfes Scheibchen. Diese Scheibchen werden als Unschärfekreise bezeichnet.

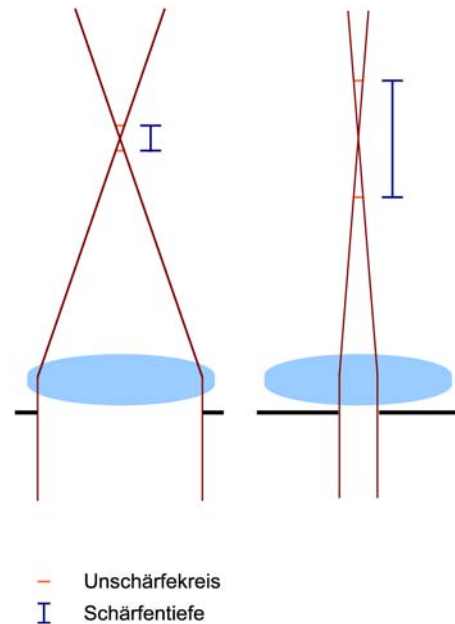
Der Übergang vom Punkt zu Scheibchen ist fließend, und irgendwo dazwischen befindet sich die Grenze zwischen dem was noch als scharf und dem was schon als unscharf wahrgenommen wird.

Wie groß dieser Bereich ist, hängt vom Winkel des Lichtkegels ab.

Bei sehr engem Lichtkegel, zB bei geschlossener Kondensor- oder Objektiv-Blende, ist der Bereich in dem die Unschärfekreise noch scharf erscheinen sehr groß.

Daraus resultiert eine hohe Schärfentiefe.

Bei einem sehr breitem Lichtkegel erreichen die Unschärfekreise sehr schnell die maximale Größe und man erhält daher nur eine sehr geringe Schärfentiefe.



Objekttisch

Der Objekttisch befindet sich direkt über dem Kondensor; auf ihm liegt das zu untersuchende Präparat.

Bei einfacheren Mikroskopen besteht der Objekttisch aus einer runden Platte die auf einem Fettfilm gleitet; daher auch der Name **Gleittisch**. Das Präparat wird durch Objektklemmen fixiert. Der Vorteil dieser Variante liegt in der absolut freien Positionierung des Objektes.



Besser ausgestattete Mikroskope verfügen über einen so genannten Kreuztisch. Hier wird das Präparat in einen Führungsmechanismus eingespannt und über coaxial angeordnete Triebe bewegt.

Kreuztische bieten im wesentlichen zwei Vorteile.

Einerseits ist eine sehr komfortable und exakte Bewegung des Präparates möglich, zum anderen verfügen die meisten Kreuztische über eine Messkala, wodurch eine Stelle im Objekt genau bestimmt und später auch wieder gefunden werden kann.

Manche Kreuztische können auch gedreht werden, damit das Objekt frei positioniert werden kann.



Objektiv

Die Objektive sind die „Herzstücke“ eines Mikroskops, sie sind für die Qualität der Bilder und zum überwiegenden Teil auch für die Auflösung des gesamten Systems verantwortlich. Das Objektiv erzeugt vom beleuchteten Objekt ein reelles, verkehrtes Zwischenbild, dieses wird mit den Okularen vergrößert betrachtet.

Die Auflösung des betrachteten Bildes wird aber NUR vom Objektiv erzeugt; die Okulare können nur vergrößern was vom Objektiv erfasst wurde!!

Maßstabszahl

Fälschlicherweise wird bei einem Objektiv oft von „Vergrößerung“ gesprochen. Ein Objektiv erzeugt aber keine Vergrößerung sondern ein Zwischenbild mit einem bestimmten Abbildungsmaßstab. Ein Objektiv mit einer Maßstabszahl von 40 erzeugt also (nach DIN 58887) 10mm unterhalb des oberen Tubusrandes ein reelles Zwischenbild mit einem Abbildungsmaßstab von 40:1.

Parfokaler Abstand

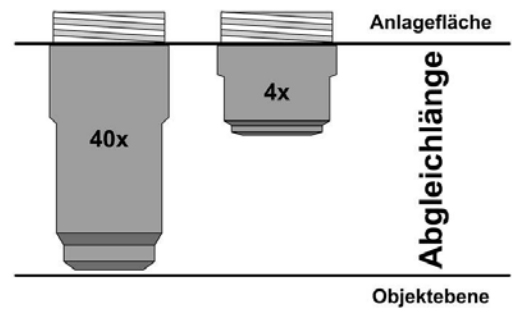
Betrachtet man die Objektive eines Mikroskops, so erkennt man, dass sie unterschiedlich lang sind. Schwach vergrößernde Objektive haben meist eine wesentlich kürzere mechanische Länge als stärker vergrößernde.

Um zwischen verschiedenen Vergrößerungen wechseln zu können, besitzt das Mikroskop einen so genannten **Objektivrevolver**, welcher meist für 4 bis 6 Objektive Platz bietet. Auf diesem ordnet man die Objektive praktischerweise in ansteigender Maßstabszahl. Das bedeutet aber auch, dass die Objektive immer länger und der Abstand zum Objekt immer kleiner wird.



Objektivrevolver
mit parfokalen Objektiven

Verschieden stark vergrößernde Objektive eines Herstellers sind immer so gebaut, dass sie **parfokal abgeglichen** sind. Das bedeutet, dass der Abstand zwischen dem Objektivrevolver und dem Präparat bei allen Objektiven, ungeachtet deren Länge, immer gleich ist (**Abgleichlänge oder parfokaler Abstand**).



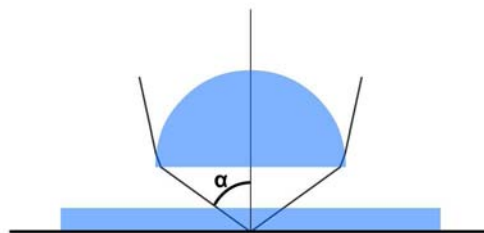
Beim Wechseln auf eine stärkere Vergrößerung bleibt daher die eingestellte Fokusebene erhalten und man muss nur mit dem Feintrieb etwas nachstellen.

Vorsicht ist geboten, wenn **Objektive unterschiedlicher Hersteller** auf einem Mikroskop verwendet werden!! Hier ist der parfokale Abstand der Objektive unterschiedlich und beim Wechseln der Objektive könnte das Präparat und auch das Objektiv selbst beschädigt werden!!! In solchen Fällen daher vor dem Wechseln der Objektive den Objektstisch immer absenken und das Präparat erneut und bei stärkeren Vergrößerungen vorsichtig und nur mit dem Feintrieb scharfstellen!!

numerische Apertur & Auflösung

Die numerische Apertur (NA oder n.A.) eines Objektivs oder eines anderen optischen Elementes beschreibt dessen Lichtstärke und Auflösungsvermögen. Je größer die NA desto besser kann ein Objektiv Details im Präparat auflösen (siehe Abbe-Theorie)

Der Wert für die numerische Apertur ergibt sich aus dem halben Öffnungswinkel des Objektivs sowie dem Medium zwischen Frontlinse und Deckglas.



$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

n = Brechungsindex des Mediums (Luft, Öl, Wasser)
 α = halber Öffnungswinkel des Objektivs

Befindet sich Luft als Medium zwischen Objektiv und Deckglas so kann die numerische Apertur maximal 1 betragen. Ansonsten ist der Öffnungswinkel zu flach und es kommt zur Totalreflexion des Lichts am Deckglas.

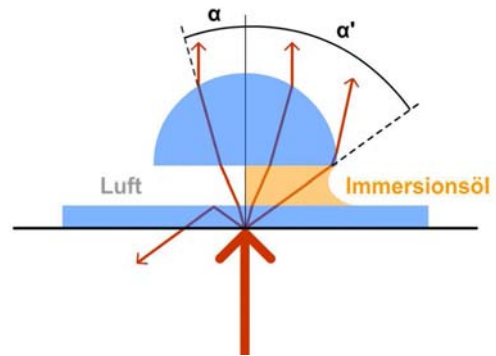
Um eine höhere numerische Apertur und damit auch einen größeren Lichteinfallswinkel zu erreichen muss die Totalreflexion an der Phasengrenze zwischen Deckglas und Medium verhindert werden. Dazu wird ein Medium verwendet, welches in etwa den selben Brechungsindex aufweist wie Glas. Dies ist in den meisten Fällen Immersionsöl.

Immersion & Auflösung

Bei Trockenobjektiven werden die Lichtstrahlen beim Übergang vom Deckglas in die Luft gemäß des Brechungsgesetzes vom Lot weggebrochen. Dadurch gelangen etwas flacher einfallende Lichtstrahlen bereits nicht mehr in das Objektiv, was direkt zu einem Verlust an Auflösung führt.

Durch die Verwendung von so genannten Immersionsobjektiven, bei denen zwischen Deckglas und Objektiv ein Immersionsöl aufgebracht wird welches einen in etwa gleichen Brechungsindex wie Glas aufweist, wird die Lichtbrechung reduziert und es gelangen auch flachere Lichtstrahlen noch ins Objektiv.

Durch diese Verfahren wird es möglich, auch Objektive mit numerischen Apertur über 1 auszunutzen, wodurch sich die vom Objektiv aufgenommenen "Lichtmenge" und damit auch das Auflösungsvermögen stark erhöht. Hochwertige Ölimmersionsojektive können numerische Aperturen bis 1.40 erreichen.



vereinfachte Berechnung der Mikroskop-Auflösung:

$$d = \lambda / (2 \cdot Na_{obj.})$$

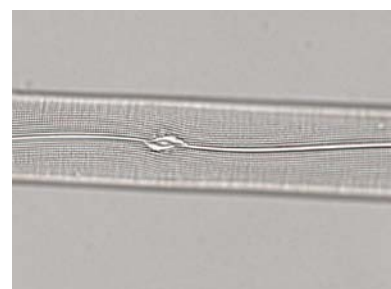
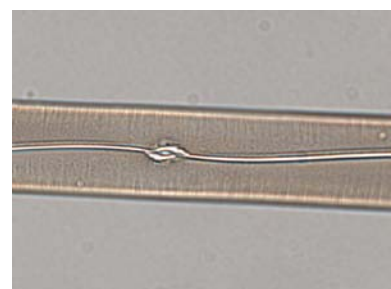
Als Wellenlänge wird ein Wert von 550 nm eingesetzt – in diesem Bereich des sichtbaren Lichts ist das menschliche Auge am empfindlichsten.

Beispiele:

Objektiv 10x **NA 0.25** $d = 550 / (2 \cdot 0.25) = 1100 \text{ nm}$

Objektiv 40x **NA 0.65** $d = 550 / (2 \cdot 0.65) = 423 \text{ nm}$

Objektiv 40x **NA 1.40** $d = 550 / (2 \cdot 1.40) = 196 \text{ nm}$



Zur Feststellung der Objektivqualität (Auflösung und Fehler) werden (wie auch hier) meistens Diatomeenpräparate verwendet

Deckglaskorrektur

Durch den unterschiedlichen Brechungsindex von Deckglas und Medium kommt es zur Beeinflussung des vom Präparat kommenden Lichtstrahls. Dies wird bei der Konstruktion von Objektiven berücksichtigt. Normalerweise sind Objektive auf die Standard-Deckglasdicke von 0,17 mm korrigiert.



1

Vor allem hochauflösende Objektive reagieren oft sehr empfindlich, wenn das Deckglas von seiner „Idealdicke“ abweicht oder sich zu viel Wasser bzw. Einbettungsmedium darunter befindet. Das Bild erscheint dann kontrastarm und verschleiert.

Aus diesem Grund besitzen vor allem Long Distance Objektive, aber auch einige andere hochwertige Objektive die Möglichkeit, das optische System auf die tatsächliche Deckglasdicke einzustellen.



Long Distance Objektiv
mit Deckglaskorrektur von 0 – 2.5 mm

1 <http://home.arcor.de/bergmann.peter/75.htm>

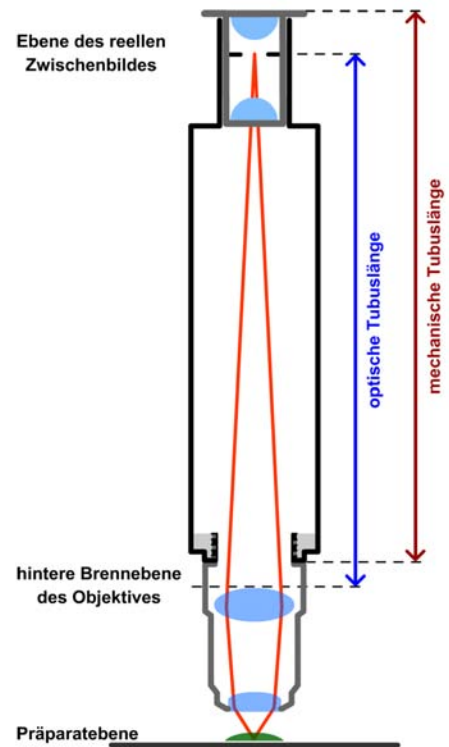
Tubuslänge

Der Abstand zwischen der Anlagefläche des Objektivs am Objektivrevolver und dem oberen Tubusrand wird als **mechanische Tubuslänge** bezeichnet. Der Abstand zwischen der hinteren Brennebene des Objektivs und dem reellen Zwischenbild ist die optische Tubuslänge.

160 mm Optiken

Ältere oder einfachere Mikroskope haben im allgemeinen Objektive die auf eine mechanische Tubuslänge von 160 mm berechnet sind. Das bedeutet, dass das Objektiv knapp unterhalb des oberen Tubusrandes ein reelles Zwischenbild erzeugt.

Bei älteren Mikroskopen und Objektiven können teilweise auch andere mechanische Tubuslängen vorkommen (z.B. Leitz 170 mm).



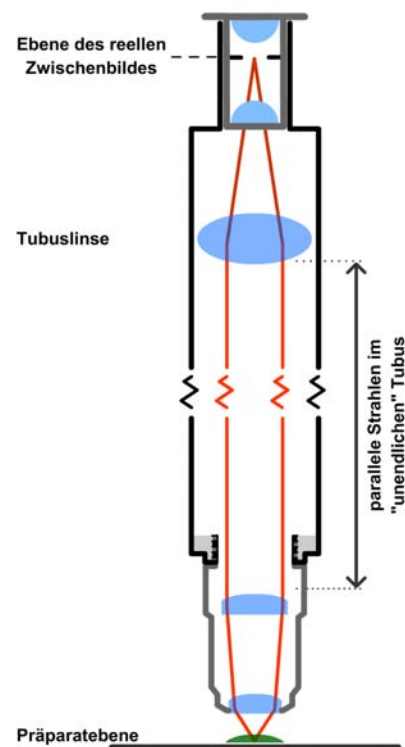
Unendlich Optiken

Größere Labor- oder Forschungsmikroskope besitzen „Unendlich-Optiken“.

In diesem Fall erzeugt das Objektiv kein Zwischenbild sondern das Licht verlässt das Objektiv als unendliche parallele Strahlen, was einen „unendlich“ langen Tubus ermöglicht.

Dieser beliebig lange Tubus bietet nun ausreichend Platz, um Eingriffe in den Strahlengang vorzunehmen; z.B. Einschub von Filtern, Phasenringen oder Prismen, für die bei herkömmlichen 160 mm Tuben kein Platz wäre.

Aus den parallel verlaufenden Lichtstrahlen kann allerdings kein Bild entstehen, daher befindet sich am Ende von unendlich-Tuben eine **Tubuslinse**. Diese erzeugt aus den parallelen Lichtstrahlen ein reelles Zwischenbild und verbessert zusätzlich noch die chromatische Aberration.

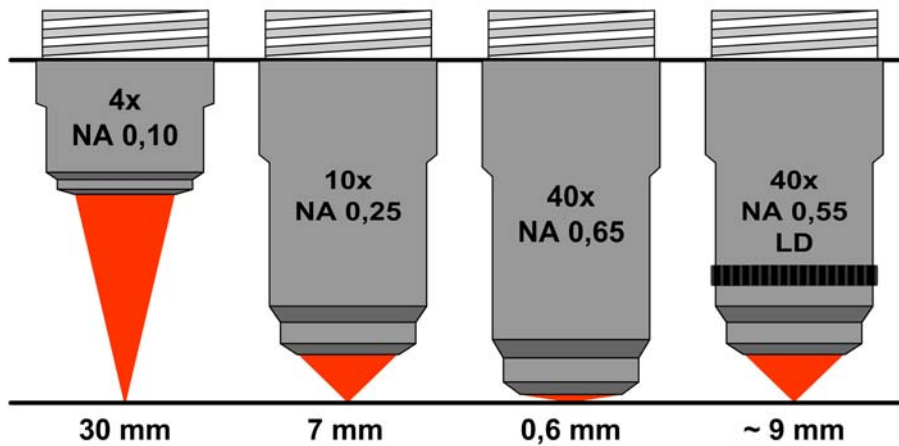


Arbeitsabstand

Der Abstand zwischen dem Deckglas des Präparates und der Objektivfrontlinse wird als Arbeitsabstand bezeichnet und besitzt für jedes Objektiv einen bestimmten Wert. Mit steigender Maßstabszahl des Objektivs und vor allem mit einer höheren numerischen Apertur wird der Arbeitsabstand immer kleiner.

Ein 40x Objektiv mit einer NA von 0,6 hat einen Arbeitsabstand von etwa 0,4 - 0,5 mm, ein 100x Objektiv Öl mit einer NA von 1,25 hingegen nur rund 0,1 mm.

Um die Frontlinse von Objektiven mit besonders geringen Arbeitsabständen zu schützen sind diese Objektive mit einer gefederten Objektivfrontlinse ausgestattet, die bei Kontakt mit dem Präparat nachgibt.



Long Distance Objektiv (LD)

Für manche Anwendungen ist ein besonders großer Arbeitsabstand notwendig (zB Mikromanipulation, dicke Probenkammern, ...)

In diesen Fällen benutzt man so genannte „Long Distance Objektiv“; diese speziellen Objektiv ermöglichen einen Arbeitsabstand von über 1cm, wobei bei einigen Modellen der Arbeitsabstand durch ein Stellrad noch korrigiert werden kann.

Objektivklassen – Qualitäten

Die Bildqualität eines Mikroskops hängt hauptsächlich von der Qualität der Objektive ab. Für die Korrektur von Linsenfehlern der Objektive wird ein großer Aufwand betrieben. Objektive, bei denen alle Abbildungsfehler gehoben sind, sind aber extrem teuer und nicht immer notwendig. So ist zum Beispiel eine komplette Korrektur der Bildfeldwölbung nur für Mikrofotografie notwendig und nicht unbedingt für den normalen Betrieb.

Unabhängig von der Qualität der Linsenkorrektur gibt es Objektive als Trocken- oder Immersionsobjektive.

Trocken- und Immersionsobjektive

Am weitesten verbreitet sind so genannte **Trockenobjektive**, also Objektive bei denen sich zwischen Deckglas und Objektiv Luft befindet.

Bei diesen Objektiven ist die numerische Apertur aufgrund der Lichtbrechung an der Phasengrenze zwischen Deckglas und Luft auf maximal 1 beschränkt.

Die Frontlinsen dieser Objektive sind meistens eingesenkt und daher nur sehr schwer zu reinigen!!!



Objektive mit hoher Auflösung und einer numerische Apertur über 1 müssen immergiert werden, dh der Bereich zwischen Frontlinse und Deckglas wird durch ein Medium mit hoher Brechkraft (zB Immersionsöl) überbrückt.

Die Anwendung von **Immersionsobjektiven** ist nicht immer unproblematisch. Es kann leicht vorkommen, dass sich feine Luftbläschen im Öl bilden, die das Bild stören. Bei der Untersuchung von Lebendpräparaten kann es außerdem vorkommen, dass sich das Deckglas durch die Bewegung des Objektives im zähflüssigen Öl verschiebt und damit auch das Präparat.



Will man von einem Immersionsobjektiv auf ein Trockenobjektiv zurückgehen, besteht die Gefahr, die Frontlinse des Trockenobjektives mit Immersionsöl zu verschutzen. In diesem Fall daher immer auf genügend Arbeitsabstand achten (10x Objektiv) oder ein neues Präparat anfertigen!!!!

Achromate

Bei Achromaten ist nur die chromatische Aberration für blau und rot gehoben. Sie stellen somit die günstigste Variante an Objektiven dar.

Achromate weisen noch eine Bildfeldwölbung auf; das bedeutet, dass sich die Mitte und der Rand des Bildes nicht gleichzeitig scharf stellen lassen. Außerdem können Strukturen im Objekt noch blaue oder rote Farbsäume aufweisen.



Für den Routinebetrieb oder für Hobby-Mikroskopiker sind diese Objektive aber trotzdem gut geeignet, denn bei normaler visueller Betrachtung des Mikroskopbildes haben die genannten Abbildungsfehler kaum eine Bedeutung. Das Auflösungsvermögen ist bei diesen Optiken entsprechend ihrem Einsatzbereich nicht so hoch wie bei den später erwähnten Apochromaten.

Planachromate

Bei Planachromaten ist die chromatische Aberration in gleicher Weise korrigiert wie bei Achromaten. Zusätzlich ist auch noch die Bildfeldwölbung gehoben.

Bei diesen Objektiven erhält man daher ein über die gesamte Fläche scharfes Bild, wodurch sich diese Objektive für Mikrofotografie sehr gut eignen.



Apochromate

Hier sind sämtliche Farbsäume der chromatischen Aberration gehoben. Meistens werden diese Objektive auch mit einer hohen numerischen Apertur ausgestattet, wodurch man ein gutes Auflösungsvermögen erhält.



Planapochromate

Sie stellen die qualitativ besten Objektive dar. Bei ihnen sind sowohl alle chromatischen Fehler wie auch die Bildfeldwölbung gehoben. Mit diesen Optiken erhält man ein kontrastreiches, ebenes Bild welches so gut wie keine Abbildungsfehler mehr enthält.

Planapochromate sind aufgrund des hohen Konstruktionsaufwandes auch die teuersten Objektive und können leicht einen Preis von mehreren tausend Euro erreichen.



Universalobjektive

Diese Objektivklasse liegt im Bereich zwischen Planachromat und Planapochromat.

Universalobjektive bieten bei hohem Auflösungsvermögen ein brillantes, kontrastreiches und vollständig ebenes Bild.



Sie finden in der anspruchsvollen Labor- und Forschungsmikroskopie eine weite Verbreitung; sie eignen sich unter anderem für Differentiellen Interferenzkontrast und durch die Verwendung spezieller Glassorten mit geringer Eigenfluoreszenz sind viele dieser Objektive auch für die Fluoreszenz-Mikroskopie besonders gut geeignet.

zB: Zeiss "Plan-Neofluare"
Olympus: "UPLFL-Objektive"

Fluorit-Objektive

Fluorit-Objektive weisen nur geringe Farbsäume auf, und besitzen im Vergleich zu normalen (Plan-) Achromaten eine verbesserte Auflösung (höhere numerische Apertur). Durch die Verwendung von speziellen Fluorit-Linsen kann der Aufbau dieser Objektive relativ einfach gehalten werden; es werden nur wenige Linsen benötigt. Durch die vergleichsweise geringe Anzahl an Linsen sind diese Objektive relativ lichtstark und kontrastreich, was vor allem für verschiedene Kontrastverfahren und die Fluoreszenzmikroskopie von Bedeutung ist.



Phasenkontrastobjektive

Für den Phasenkontrast werden spezielle Objektive benötigt, welche einen sogenannten Phasenring in der hinteren Brennebene des Objektivs besitzen und mit der Aufschrift Ph gekennzeichnet sind.

Der dunkle Phasenring befindet sich je nach Lage der Objektivbrennebene entweder auf einem eigenen Glasplättchen, oder er ist auf eine der Objektivlinsen aufgedampft. Die Eigenschaften des Phasenringes werden im Kapitel optische Kontrastverfahren – Phasenkontrast genau erklärt.

Bei Unendlich Optiken kann der Phasenring auch irgendwo im Tubus angebracht sein.

Phasenkontrastobjektive gibt es auch in den unterschiedlichen Objektivklassen (Achromate, Planachromate, ...).



Phasenring im Objektiv

Objektive mit Irisblende

Vor allem in der Fluoreszenzmikroskopie, aber auch in der normalen Lichtmikroskopie kommen Objektive zum Einsatz, die in der hinteren Brennebene des Objektivs eine Irisblende besitzen.

Diese Blende erfüllt dieselben Funktionen wie die Aperturblende im Kondensator; mit ihr lässt sich der Lichtkegel verkleinern und damit Streulicht, aber auch die Auflösung reduzieren.

Wie der Phasenring kann auch die Irisblende bei Unendlich-Optiken im Tubus angebracht sein.



Irisblende im Objektiv

Objektivbeschriftung

Die wichtigsten technischen Daten sind auf den Objektiven aufgedruckt oder eingraviert. Hier finden sich Angaben zu Objektivserie, Objektivklasse, Maßstabszahl, numerische Apertur, Deckglaskorrektur und mechanische Tubuslänge

Beispiele



PlanC N	Objektivserie, Objektivklasse(Planachromat)
20x / 0.40	Maßstabszahl / numerische Apertur
∞ / 0.17 / FN 22	Tubuslänge / Deckglasdicke / Schfeldgröße (Field Number)



E 40	Objektivserie Maßstabszahl
0.65	numerische Apertur
160 / 0.17	Tubuslänge / Deckglasdicke
Ph3 DL	Phasenobjektiv (Ringgröße 3)



UPlanApo	Objektivklasse (Planaopchromat)
40x / 1,00 / Öl Iris	Maßstabszahl / numerische Apertur / Ölimmersionsobjektiv mit Irisblende
∞ / -	Tubuslänge / Deckglasdicke
1.0 > < 0.5	Einstellrad für die Irisblende (Angabe der NA)

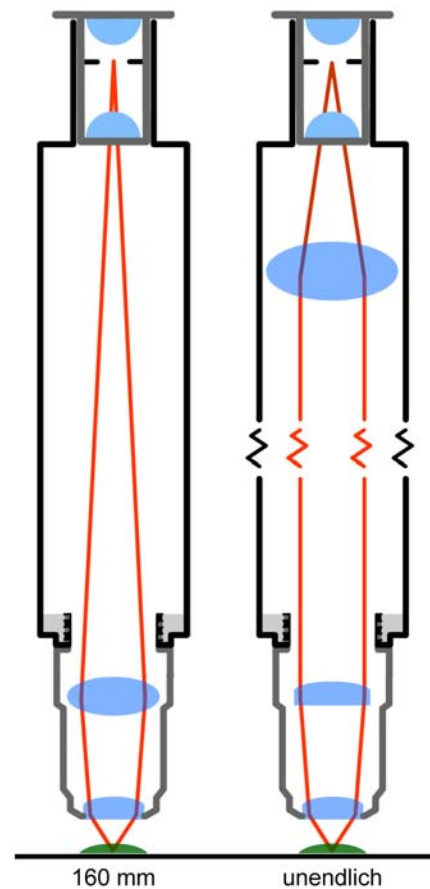
Tubus

Zwischen dem Objektiv und den Okularen befindet sich der Tubus, eine ursprünglich gerade Röhre, in der die Lichtstrahlen verlaufen und an deren Ende das reelle Zwischenbild erzeugt wird.

Einfache und ältere Mikroskope besitzen meist einen **Tubus mit 160 mm Länge**.

Bei neueren oder größeren Forschungsmikroskopen ist der Tubus meistens länger und besitzt am Ende eine zusätzliche Tubuslinse (**unendlich Tubus**).

Ein längerer Tubus hat den Vorteil, dass ausreichend Platz vorhanden ist um Eingriffe im Strahlengang vorzunehmen (zB Einschub von Filtern oder Prismen). Je nach Art des Tubus, 160 mm oder unendlich, müssen auch die dafür geeigneten Objektive verwendet werden.



Bei einem „normalen“ Durchlichtmikroskop liefert jeweils ein einziges Objektiv einen einzigen Lichtstrahl mit einem einzigen Bild; daher besitzt es auch immer nur 1 Tubus.

Monotubus

Bei älteren Mikroskopen befindet sich am Ende des Tubus auch nur 1 Okular, weshalb dieses System als Monotubus bezeichnet wird.



Binotubus

Mittlerweile verfügen die meisten Mikroskope über einen so genannten Binotubus, der eine bequeme Beobachtung des Präparates mit beiden Augen ermöglicht.

Ein Binotubus entspricht aber noch KEINEM Stereomikroskop, mit dem man ein Objekt plastisch und dreidimensional betrachten kann.

Hier wird der EINE Lichtstrahl, der vom Objektiv kommt, lediglich durch ein Prisma in **zwei idente Strahlengänge** für die zwei Okulare aufgespalten.



Tritubus

Für die Dokumentation von Mikroskop-Bildern ist es notwendig eine Kamera, genauer gesagt den Aufnahmechip oder den Film, in der Ebene des reellen Zwischenbildes anzubringen. Alternativ kann man auch das Zwischenbild durch ein Projektiv auf dem Target abbilden.

Grundsätzlich können Kamera oder Projektiv auch anstelle eines Okulares angebracht werden. Einfacher und komfortabler ist aber die Verwendung eines Tritubus.

Dieser besitzt wiederum ein Prisma welches den einen Lichtstrahl des Objektivs auf 2 idente Lichtstrahlen für die 2 Okulare aufspaltet.

Davor gibt es zusätzlich noch ein 2. Prisma oder einen Spiegel, mit dem der Lichtstrahl auf einen 3. Ausgang aufgeteilt oder gänzlich dorthin umgelenkt werden kann.

An diesen dritten Ausgang können Kameras montiert werden ohne auf das komfortable Arbeiten mit zwei Okularen verzichten zu müssen.

Bei den meisten Trituben gibt es 3 Einstellmöglichkeiten:

1. das ganze Licht geht zu den Okularen.
2. das meiste Licht geht zur Kamera und nur ein kleiner Teil zu den Okularen
3. das gesamte Licht geht zur Kamera

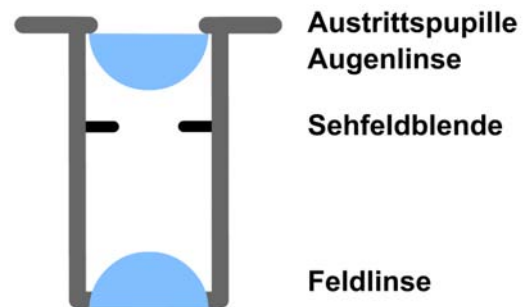


Okular

Ein Okular ist eine Linse oder ein Linsensystem mit der Funktion einer Lupe.

Die wichtigsten Bestandteile eines Okulars sind:

- Austrittspupille (Ramsdenscher Kreis)
- Augenlinse
- Sehfeldblende
- Feldlinse



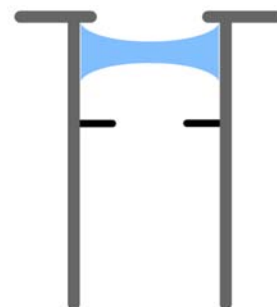
Blickt man mit dem Auge ins Okular so kann man das vom Objektiv erzeugte reelle Zwischenbild nochmals vergrößert dargestellt betrachten. Das reelle Zwischenbild liegt dabei innerhalb der einfachen Brennweite des Okulars auf Höhe der Sehfeldblende.

Vom Okular wird in Verbindung mit dem optischen System des Auges ein Bild auf die Netzhaut projiziert. Dazu muss aber die Austrittspupille des Okulars mit der Eintrittspupille des Auges übereinstimmen. Das Bild erscheint dann vergrößert, aufrecht aber virtuell in einem Abstand von etwa 25 cm vor dem Auge.

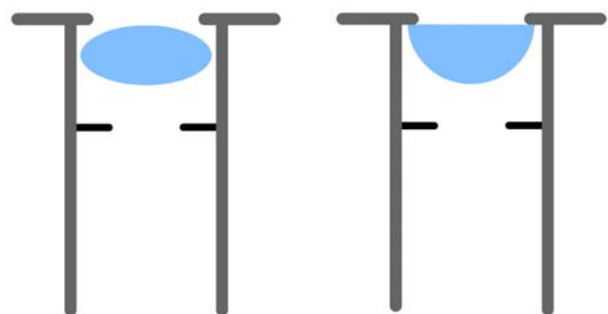
Bautypen

Einlinsige Okulare

- Galilei-Okular
Ein Galilei-Okular besteht aus nur einer einzelnen bikonkaven Linse. Diese Bauweise ist die ursprünglichste und wird heute nur noch in billigen Mikroskopen verwendet.

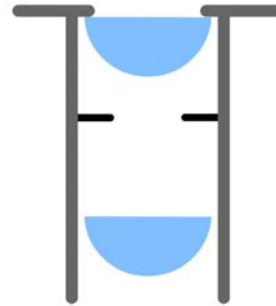


- Kepler Okular
Dem Kepler Okular liegt eine bikonvexe oder plankonvexe Linse zugrunde



Mehrlinsige Okulare

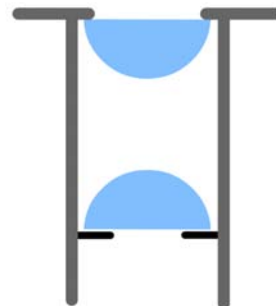
- Huygens-Okular
Bei diesem Bautyp wird durch die Aufteilung der plankonvexen Linse in zwei Einzellinsen der Farbfehler berichtigt. Huygens-Okulare werden immer noch bei günstigen Mikroskopen eingesetzt.



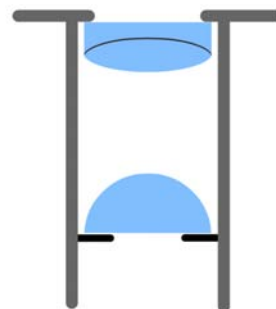
- Ramsden-Okular
Das Ramsden-Okular arbeitet ebenfalls mit zwei plankonvexen Linsen, wobei im Gegensatz zum Huygen-Okular die Feldlinse umgedreht ist; sie zeigt mit ihrer planen Seite zum Objektiv.

Dadurch liegt die Zwischenbildebene auf der Planseite der ersten Linse, so dass sich darauf Strichmarken für Messzwecke oder ähnliches aufbringen lassen.

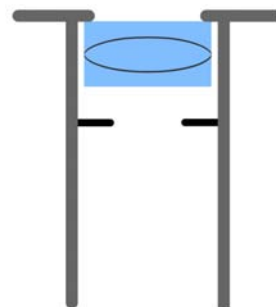
Die Eigenschaften sind sonst ähnlich dem Huygens-Okular, nur liegt die Austrittspupille auf der Planseite der Augenlinse, wodurch das Gesichtsfeld nicht vollständig zu überblicken ist.



- Kellner-Okular
Das Kellner Okular unterscheidet sich vom Ramsden-Okular auf der Augenseite durch ein Linsenpaar anstatt einer Einzellinse zur Farbkorrektur. Damit wird auch der Überblick über das Gesichtsfeld verbessert.

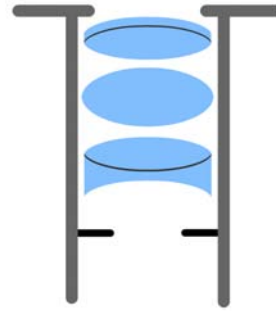


- Monozentrisches Okular
Ein Monozentrische Okular besteht aus einer symmetrischen bikonvexen Kronglaslinse, die von zwei Flintglasmenisken eingeschlossen wird. Der Farbfehler ist hier vollständig korrigiert.



Periplane Okulare

Moderne Okulare sind aus mehreren Linsen und Linsengruppen konstruiert, damit können durch die Beseitigung von Farbfehlern, Bildfeldwölbung sowie durch die Erweiterung des Bildfeldes sehr gute Bildqualitäten erreicht werden.



Vergrößerung

Beim Okular kann nicht, wie beim Objektiv, ein Abbildungsmaßstab angegeben werden, weil das Bild, das vom Okular erzeugt wird, virtuell ist und im Unendlichen entsteht. Man kann das Bild also nicht abmessen und so auch keinen Maßstab bestimmen.

Daher gibt man nur an, um wie viel größer das Bild in 25 cm Entfernung erscheint. Dieser Abstand entspricht der „**konventionellen Sehweite**“ und ist eine willkürliche Vereinbarung. Ob der Betrachter in einer Entfernung von 25 cm überhaupt scharf sehen kann spielt für die Angabe der Vergrößerung keine Rolle, denn es handelt sich nur um eine Rechengröße.

Dioptrienausgleich

Der Dioptrienausgleich ist eine Einstellmöglichkeit am Okular und dient dazu eine mögliche Fehlsichtigkeit der Augen auszugleichen.

Der Dioptrienausgleich ist meist nur an einem Okular möglich. Bei der Einstellung wird dabei so vorgegangen, dass man zuerst das Mikroskopbild mit dem Okular ohne Dioptrienausgleich scharf stellt und erst danach auf dem 2. Okular mit Hilfe des Dioptrienausgleichs die Schärfe nachjustiert und anpasst.



Okulare für Brillenträger

Um eine vollständige Farbkorrektur zu gewährleisten liegt, vor allem bei älteren Okularen, die Austrittspupille sehr dicht hinter der letzten Linse.

Diese Okulare sind für Brillenträger oft ungeeignet, weil sie keine vollständige Anpassung an das Auge ermöglichen; Es gibt daher spezielle Okulare bei denen der Ramsdensche Kreis weiter außen liegt und so ein mikroskopieren mit Brille erleichtert. Gekennzeichnet sind diese Okulare meist mit einem kleinen Brillensymbol.



Messokulare

Für die Durchführung von Messungen im Mikroskop sind spezielle Okulare notwendig. Bei diesen so genannten Messokularen befindet sich im Bereich der Zwischenbildebene ein Glasplättchen, auf dem eine Skala, ein Gitter oder ähnliche Unterteilungen aufgebracht sind.



Messokular mit Glasplättchen

Je nach Bauweise des Okulars können diese Skalen auch auf eine plane Linsenfläche eingätzt sein, wenn sich diese auf der Zwischenbildebene befindet (zB Ramsden Okular)



Glasplättchen mit Skala

Durch die Lage der Skala in der Zwischenbildebene wird sie auch gemeinsam mit dem Mikroskopbild scharf abgebildet und ermöglicht eine annähernd exakte Längenmessung.

Bei den meisten Messokularen lässt sich die Skala durch einen Drehmechanismus zusätzlich noch fokussieren, um Fehler des Auges auszugleichen

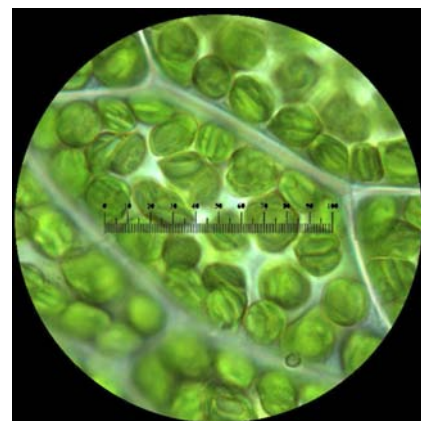


Auszug zum Fokussieren der Skala

Zu beachten ist allerdings, dass jede dieser Skalen oder Gitter nicht geeicht sind. Die Unterteilungen werden unabhängig von der Maßstabszahl des Objektivs immer gleich groß abgebildet und müssen daher erst für jedes Objektiv geeicht werden!



Objektiv 10x



Objektiv 40x

Einstellfernrohre

Bei der Arbeit am Mikroskop ist es öfters notwendig, in die hintere Brennebene des Objektivs zu blicken um zB beim Phasenkontrast die Ringblende und den Phasenring zu zentrieren.

Die einfachste Möglichkeit ist das Okular zu entfernen und ein Blatt Papier mit einem kleinen Loch auf den Tubus zu legen. Bei schwachem Licht lässt sich der Phasenring erkennen.

Für eine genauere und komfortablere Beobachtung gibt es ein **Einstellfernrohr**. Dieses wird anstelle eines Okulars angebracht und ermöglicht durch einen Auszug die exakte Einstellung auf das Auge und so eine scharfe Darstellung der hinteren Brennebene des Objektivs.



Einstellfernrohr mit Auszug zum Fokussieren auf die hintere Brennebene



Abbild der Ringblende und des verschobenen Phasenringes in der hintere Brennebene

In großen Forschungsmikroskopen mit unendliche-Optiken ist dieses Einstellfernrohr oft als so genannte "Bertrandlinse" bei Bedarf direkt in den Strahlengang einzuschwenken.

Projektiv

Aufgrund der Lage des Zwischenbildes innerhalb der einfachen Brennweite funktioniert ein Okular wie eine Lupe und erzeugt ein virtuelles, vergrößertes Bild.

Verändert man nun aber die Lage des Zwischenbildes durch „Herausziehen“ des Okulars in der Weise, dass es sich zwischen einfacher und doppelter Brennweite befindet, so erhält das Okular die Funktion eines **Projektivs**.

Ein Projektiv erzeugt vom reellen Zwischenbild ein vergrößertes, reelles Bild, das auf einem Schirm oder mit einer Kamera aufgefangen werden kann.



Okularbeschriftung



- WHN Typenbezeichnung (Wide Field)
- 10 x Vergrößerung
- H High Eyepont
durch weiterern Abstand der Austrittspuile
für Brillenträger besonders geeignet
- 22 Sehfeldzahl
- + 0 - Dioptrienausgleich

Beleuchtungsanordnung

Bei den folgenden Erklärungen der Strahlengänge sollen wir uns wieder daran erinnern, dass durch ein optisches Linsensystem immer eine Abbildung zustande kommt.

Die Funktion von Kollektor und Kondensor ist, entgegen ihrer Bezeichnung, einen Gegenstand abzubilden und nicht Licht zu sammeln oder zu verdichten. Beide erzeugen also Abbildungen von Objekten.

Die Bildqualität eines Mikroskops beginnt schon bei der Beleuchtung. Deshalb ist es notwendig, eine exakte Strahlenführung schon vor dem Präparat, nämlich bei der Lichtquelle beginnen zu lassen.

Die Lichtquelle eines Mikroskops ist in den allermeisten Fällen eine Lampe mit Glühwendel oder Lichtbogen. Diese Lampen, vor allem Halogenlampen mit einer Glühwendel, bilden keine homogene Lichtquelle. Es kommt daher zu keiner gleichmäßigen Ausleuchtung des Bildfeldes und zu einer Abbildung der Glühwendel-Struktur in der Präparatebene.

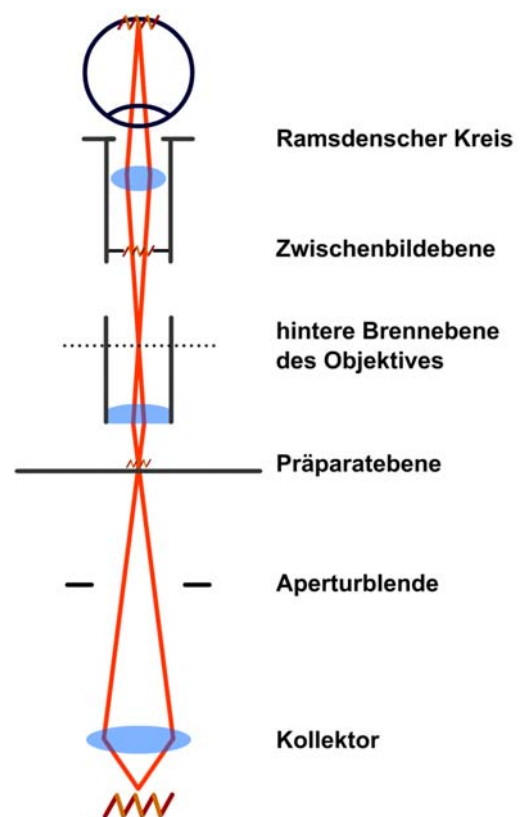
Kritische Beleuchtung

Bei dieser Art der Beleuchtung bildet der Kollektor das Bild der Lichtquelle, also die Glühwendel in die Präparatebene ab. Dies führt zu einem sehr unregelmäßig ausgeleuchtetem Bildfeld sowie zu einer störenden Abbildung der Lichtquelle im Präparat.

Um das Bildfeld dennoch gleichmäßiger auszuleuchten können Mattscheiben zwischen Kollektor und Präparat eingesetzt werden um ein ein diffuses Licht zu erzeugen. Dabei geht allerdings viel Licht verloren.

Kritische Beleuchtung wird bei oft bei einfachen, billigen Mikroskopen verwendet.

Aber auch kleine Mikroskope mit einem Spiegel zur Beleuchtung arbeiten nach diesem Prinzip. Hier kann es vorkommen, dass auch Gegenstände aus der Umgebung vom Spiegel ins Präparat reflektiert werden (z.B. Bäume, Häuser, Fenster)



Köhlersche Beleuchtung

Mikroskope mit der Möglichkeit einer Köhlerschen Beleuchtung müssen folgende Bauteile besitzen:

- Kollektor mit Irisblende (Leuchtfeldblende)
- Kondensator mit einem Trieb in der Höhe verstellbar
- Kollektor oder Kondensator horizontal verstellbar

bei Bogenlampen (manchmal auch bei Halogenlampen)

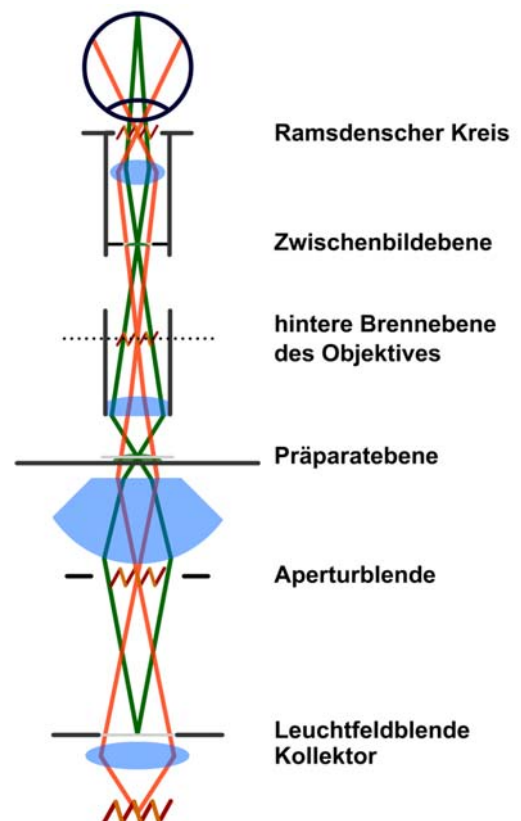
- Lampe mit Schrauben justierbar
- Kollektor fokussierbar

Durch die Köhlersche Beleuchtungsanordnung erreicht man ein gleichmäßig ausgeleuchtetes Bildfeld ohne die Abbildung der Lichtquelle in der Präparatebene. Zusätzlich wird durch das Zentrieren von Kondensator oder Lichtquelle eine maximale Lichtausbeute erreicht, was besonders für die Kontrastverfahren von großer Bedeutung ist.

Das Prinzip der Köhlerschen Beleuchtung ist, dass der Kollektor das Bild der Glühwendel in der Brennebene des Kondensators abbildet und der Kondensator in der Präparatebene ein Bild der gleichmäßig ausgeleuchteten Fläche der Kollektorlinse bzw. der Leuchtfeldblende erzeugt. Es kommt hier zu einer Auftrennung der Strahlengänge in einen

beleuchtenden Strahl (Pupillenstrahl) und einen

abbildenden Strahl (Lukenstrahl).



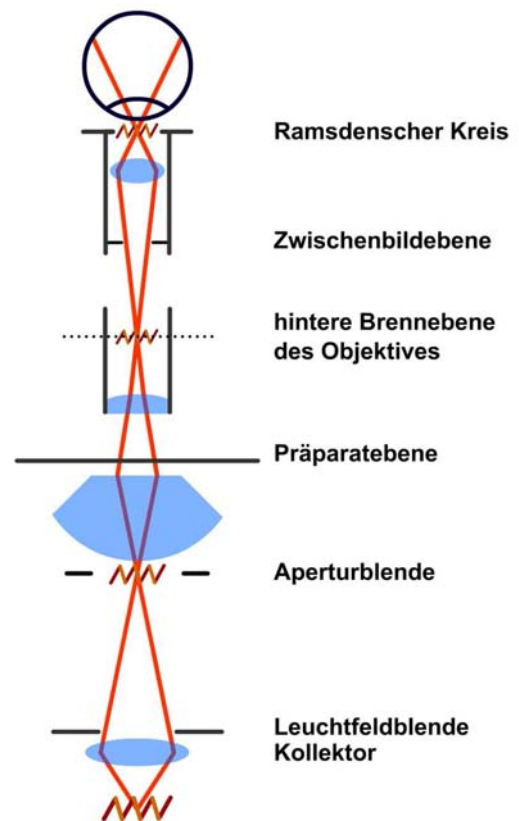
Beleuchtender Strahl

Die Glühwendel der Lampe wird vom Kollektor in der unteren Brennebene des Kondensors, in etwa auf Höhe der Kondensorenblende, abgebildet.

Dieser nimmt das Bild dort auf und bildet es – durch das Präparat hindurch – in der hinteren Brennebene des Objektivs ab.

Vom Okular wird nun das Glühwendelbild von der hinteren Brennebene des Objektivs erfasst und in der Augenpupille (Ramsdenscher Kreis) des Beobachters abgebildet.

In der Abbildung ist zu sehen, dass ein paralleles Lichtbündel vom Kondensator durch das Objekt ins Objektiv verläuft, also in der Präparatebene kein Bild der Lichtquelle entsteht.



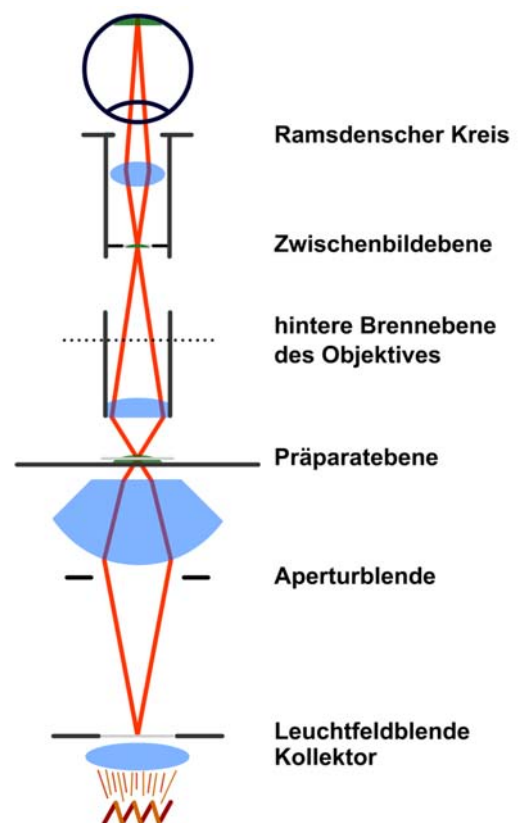
Abbildender Strahl

Hier bildet der Kondensator die vom Kollektor gleichmäßig ausgeleuchtete Öffnung der Leuchtfeldblende sowie die Ränder der Blende selbst im Präparat ab.

Vom Objektiv werden also nur das vom Licht durchströmte Präparat und die schwarzen Ränder der Leuchtfeldblende aufgenommen. Diese erzeugt davon das reelle Zwischenbild auf Höhe der Sehfeldblende des Okulars.

Von dort wird es durch das Okular vergrößert und von der Linse unseres Auges auf die Netzhaut projiziert.

Auch in der Netzhautabbildung ist von dem gesamten von der Lichtquelle ausgehenden Licht nur ein paralleles Strahlenbündel und somit keine Abbildung der Glühwendel zu sehen.



Die genaue Kenntnis des Strahlengangs hilft oft, die Ursachen von Unregelmäßigkeiten wie Staubpartikel und anderen Verunreinigungen im Bild zu finden und zu beseitigen. Bei der Köhlerschen Beleuchtung wirken sich Verunreinigungen immer nur auf bestimmten Linsen im Bild aus. Durch Bewegungen von Kondensator, Objekt, Objektiv und Okularen lassen sich die Verunreinigungen meist leicht lokalisieren und beseitigen. Manchmal genügt schon eine winzige Höhenverstellung des Kondensators, um Schmutz unsichtbar zu machen.

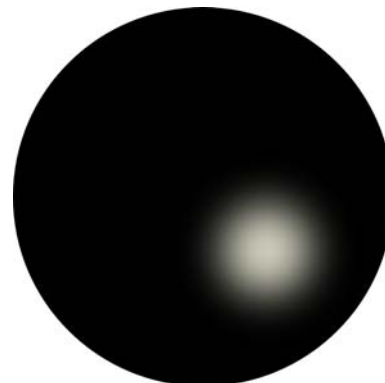
"Gewusst wo": oft genügt ein kleiner Handgriff, ohne dass man das gesamte Mikroskop zerlegen muss.

Einstellen der Köhlerschen Beleuchtung

Zuerst wird der Kondensator mit dem Kondensortrieb ganz nach oben gedreht und so in eine Position direkt unter dem Objektisch gebracht. Mit dieser Kondensatorposition wird nun im Hellfeld ein Präparat scharf gestellt.

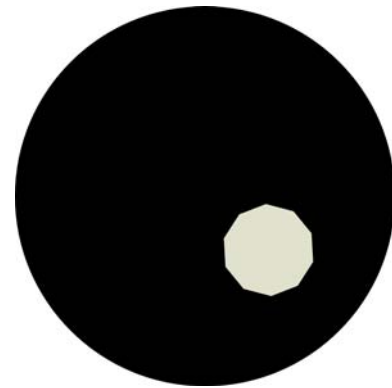


Im zweiten Schritt wird die Feldblende im Fuß des Mikroskops geschlossen, so dass die Blende beim Blick ins Mikroskop als unscharfer Punkt zu sehen ist. Sollte kein leuchtender Kreis zu sehen sein, so befindet sich das Zentrum der Leuchtfeldblende außerhalb des Bildfeldes und muss durch Verstellen der Zentrierschrauben am Kondensator (bzw durch Bewegen des Kollektors) ins Bildfeld gebracht werden.



Nun wird der Kondensator in der Höhe so verstellt, dass der Rand der Leuchtfeldblende scharf abgebildet wird. Oft ist dies auch mit einem Umschlag der Farbsäume von rot auf blau verbunden.

Bei einigen Mikroskopen kann der Kondensator allerdings auch über die Objektträgerebene hinaus angehoben werden; hier ist also besondere Vorsicht geboten um eine Kollision zu vermeiden.



Mit den Zentrierschrauben am Kondensator (bzw durch Bewegen des Kollektors) das Bild der Leuchtfeldblende in die Mitte des Bildfeldes bringen.



Zuletzt wird die Leuchtfeldblende wieder so weit geöffnet, dass gerade das gesamte Bildfeld ausgeleuchtet ist. Wenn notwendig kann hier noch leicht nachzentriert werden.



Die Einstellungen der Köhlerschen Beleuchtung sollten nach jedem Objektivwechsel kontrolliert werden. Geübte Mikroskopiker greifen nach einem Objektivwechsel wie von selbst zur Leuchtfeldblende und zur Aperturblende um die Köhlersche Beleuchtung und den Kontrast nachzustellen.

Mikroskop-Typen

Mikroskope können zum einen hinsichtlich der angewendeten Beleuchtungstechnik (**Durchlichtmikroskope** und **Auflichtmikroskope**) unterschieden werden.

Zum andern gibt es beide Typen in zwei unterschiedlichen Bauweisen: als **aufrechtes Mikroskop** oder **inverses Mikroskop**.

Der Verlauf des Lichtes nach der Köhlersche Beleuchtung ist bei beiden Bauweisen ident.

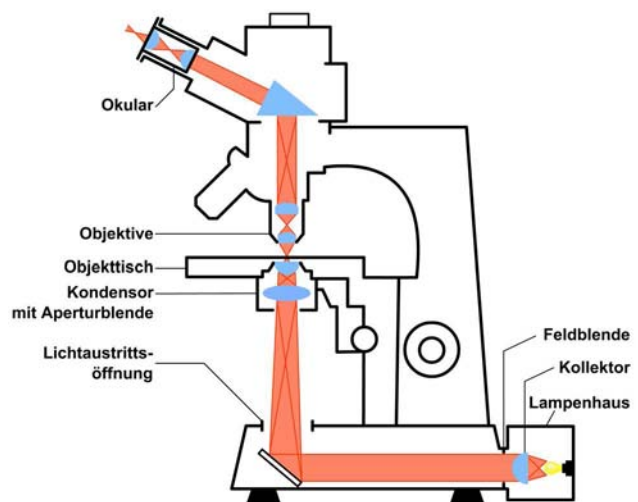
Als „Sonderfall“ ist hier auch noch das **Stereomikroskop** erwähnt; mit diesem lassen sich in geringer Vergrößerung Objekte dreidimensional betrachten.

Beleuchtungstechnik

Durchlichtmikroskop

Bei Durchlichtmikroskopen kommt das Licht von unten und verläuft durch das Präparat bevor es vom Objektiv aufgefangen wird.

Bei diesem Mikroskoptyp sind durchsichtige oder dünn geschnittene Präparate erforderlich um ein gutes Ergebnis zu bekommen.

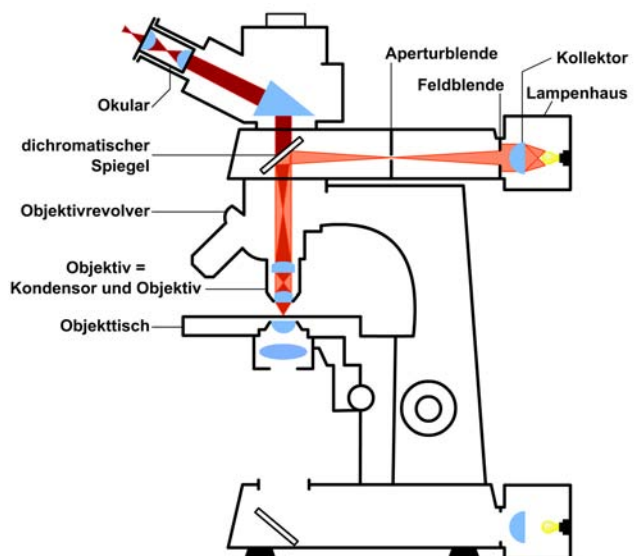


Auflichtmikroskop

Bei der Auflichtmikroskopie wird das Licht entweder von oben durch das Objektiv auf das Präparat geleitet oder von der Seite eingestrahlt (schräge Beleuchtung). Das vom Präparat reflektierte Licht wird wiederum vom Objektiv aufgefangen.

In der Auflichtmikroskopie können daher auch lichtundurchlässige oder sehr dicke Präparate verwendet werden.

Häufige Anwendung findet dieser Mikroskoptyp in der Fluoreszenzmikroskopie oder in den Materialwissenschaften (Mineralogie).



Bauweise

aufrechtes Mikroskop

Mikroskope, bei denen sich das Objektiv oberhalb des Präparates befindet werden als aufrechte Mikroskope bezeichnet.

Diese Bauweise ist wohl die verbreitetste und auch für die meisten Anwendungen geeignet.



inverses Mikroskop

Bei dieser Bauweise sind die Objektive unter dem Präparat angebracht, daher auch der Name „invers“.

Der Verlauf des Strahlenganges sowie die Bauteile sind ident mit denen des aufrechten Mikroskops; nur eben von oben nach unten verlaufend. Nach den Objektiven wird das Licht durch einige Spiegel wieder nach oben geleitet um die Okulare in einer bequemen Höhe zu haben.

Diese Bauweise ermöglicht einen großen Abstand zwischen Präparat und Kondensator. Es können somit auch besonders dicke Präparate untersucht werden, bzw. bietet dieser enorme Arbeitsabstand auch genügend Raum für Mikromanipulation.



Stereomikroskop

Das Stereomikroskop zählt grundsätzlich zu den Auflichtmikroskopen. Das Präparat wird üblicherweise mit Punktstrahlern von oben oder von der Seite beleuchtet. Die meisten Stereomikroskope besitzen aber auch eine Beleuchtungsmöglichkeit von unten.

Der Unterschied zu den anderen genannten Mikroskopen liegt in den 2 getrennt verlaufenden Strahlengängen, die in einem bestimmten Winkel zueinander angeordnet sind. Dabei besitzt jeder Strahlengang sein eigenes Objektiv und sein eigenes Okular. Bei einigen Stereomikroskopen gibt es vor den Objektiven zusätzlich noch eine gemeinsame Linse, um eine weitere Vergrößerung zu erreichen.

Durch dieses System lassen sich Objekte dreidimensional und durch spezielle Prismen auch seitenrichtig betrachten, wodurch Stereomikroskope zur dreidimensionalen Darstellung von feinen Oberflächenstrukturen geeignet sind.

Die Vergrößerung von Stereomikroskopen liegt unterhalb von 100:1.



getrennte Objektive eines Stereomikroskops



Stereomikroskop mit einer gemeinsamen Frontlinse sowie einer Aperturblende

Mikroskop-Klassen

Feldmikroskop

In der untersten Klasse finden wir mit der einfachsten Bauweise das Feldmikroskop.

Zur Beleuchtung des Präparates besitzt es meistent nur einen Spiegel; bei einigen Modellen kann unter dem Objektstisch auch eine kleine Lampe montiert werden. Anstelle eines Kondensors gibt es nur eine Lochblende (meist mehrere Größen) und die Vergrößerung ist auf ein Objektiv beschränkt.

Diese Klasse ist nur für Beobachtungen im Hellfeld geeignet. Aufgrund seiner einfachen und robusten Bauweise eignen sich diese Mikroskope sehr gut für Beobachtungen im Freiland.



Kursmikroskop

Diese Mikroskopklasse besitzt bereits eine eingebaute Beleuchtung, einen Kondensor, mehrere Objektive und meist auch einen Binotubus für ein bequemeres Mikroskopieren.

Durch eine fehlende oder eingeschränkte Einstellmöglichkeit des Kondensors ist nur eine kritische Beleuchtung möglich.

Bei Kurmikroskopen ist ebenfalls nur das Arbeiten im Hellfeld möglich. Sie werden daher hauptsächlich im Kursbetrieb an Schulen und Universitäten eingesetzt.



Labormikroskop

Bei dieser Mikroskopklasse findet man schon die Voraussetzungen für eine Köhlersche Beleuchtung.

Neben dem Hellfeld sind hier auch noch einfache Kontrastverfahren wie Dunkelfeld und Phasenkontrast möglich. Einige Modelle bieten im Tubus auch schon Einschubmöglichkeiten für Filter und sind auch modular erweiterbar.

Um Beobachtungen dokumentieren zu können, sind Labormikroskope meist auch mit einem Tritubus ausgestattet, der den Anschluss einer Kamera ermöglicht.

Diese Mikroskope finden in der täglichen Routinepraxis in Biologie und Medizin Verwendung.



Forschungsmikroskop

Forschungsmikroskope zählen zu den sogenannten Systemmikroskopen, sie sind modular aufgebaut und daher sehr vielseitig einsetzbar. Sie erfüllen natürlich wie schon die Labormikroskope alle Voraussetzungen für die Köhlersche Beleuchtung.

Durch die modulare Bauweise finden sich hier oft mehr Plätze für Objektive, mehr Einschubmöglichkeiten für Filter und Prismen und somit auch die Möglichkeit für Polarisationsmikroskopie oder Interferenzkontrast. Aufgrund dieser zahlreichen Erweiterungen im Strahlengang finden sich ab dieser Klasse nur mehr unendlich Optiken, die einen längeren Tubus und damit mehr Platz ermöglichen.

Die meisten Forschungsmikroskope sind auch mit einer Epifluoreszenzeinheit ausgestattet, die eine Beobachtung von Präparation in der Fluoreszenz ermöglicht.

Im Vergleich zu Labormikroskopen kommen hier auch schon bessere Optiken mit weitgehend korrigierten Linsenfehlern zum Einsatz.

Standardmäßig sind diese Mikroskope mit einem Tritubus oder sogar mit mehreren Ausgängen ausgestattet.



großes Forschungsmikroskop

Eine Steigerung des Forschungsmikroskops stellt ein großes Forschungsmikroskop dar. Es bietet einen noch größeren Umfang an Erweiterungen, Einschubmöglichkeiten, und Ausgängen zum Anschluss von Kameras und ähnlichem.

Diese Mikroskope mit sehr teuren und qualitativ hochwertigen Optiken bringen eine maximale Auflösung und Bildqualität. Sie sind oft auch mit einer Bogenlampe für das Durchlicht ausgestattet, was eine deutliche Verbesserung in den verschiedenen Kontrastverfahren bringt.



Qualitätsmerkmale

Beim Erwerb eines Mikroskops sollte man immer einen prüfenden Blick auf die mechanische Qualität des Gerätes werfen. Denn sie ist verantwortlich für die Präzision und Langlebigkeit des Instruments. Für ein gutes Mikroskop ist daher nicht nur eine gute Optik sondern auch die Präzision, Robustheit, Wartungsfreiheit und Langlebigkeit der Mechanik entscheidend.

Entscheidende Qualitätskriterien für ein Mikroskop sind:

- stabiles Stativ und robuste Mechanik
- numerische Apertur der Objektive und die Abbildungsqualität der Objektive und Okulare,
- eine zweckmäßige und hochwertige elektrische Beleuchtung

Die Vergrößerung alleine ist kein Qualitätskriterium. Eine Vergrößerung über 400-fach (Objektiv 40:1 und Okular 10x) ist für die meisten alltäglichen Untersuchungen nicht notwendig.

Eichen und Messen

In vielen Fällen ist es notwendig, die Größe eines Objektes oder die Größe von Strukturen im Objekt zu messen. Um dies zu ermitteln gibt es mehrere Möglichkeiten.

Größe des Bildfeldes

Auch ohne weitere Hilfsmittel ist es möglich, die Größe von Objekten im Mikroskop annäherungsweise zu bestimmen.

Dazu wird der Durchmesser des überblickten Bildfeldes aus der Sehfeldzahl des Okulars (ist am Okular aufgedruckt) und der Maßstabszahl des Objektivs errechnet.

Aus dem errechneten Durchmesser des Bildfeldes ist es möglich die Größe eines Objektes von Strukturen annäherungsweise abzuschätzen.

$$D = \frac{S (\text{Sehfeldzahl des Okulars})}{M (\text{Maßstabszahl des Objektivs})}$$

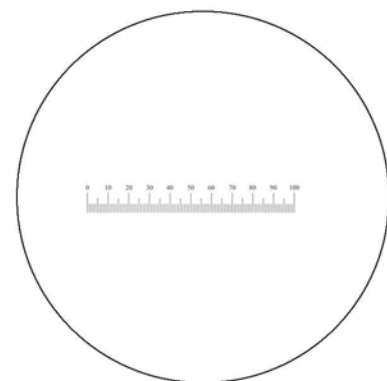
Beispiel: Objektiv 100x und Okular mit einer Sehfeldzahl von 20 mm

$$D = 20 \text{ mm} / 100 = 0,2 \text{ mm}$$

Messokulare & Objektmikrometer

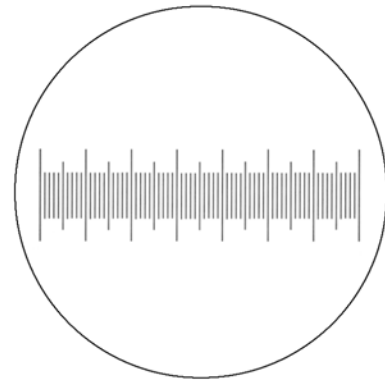
Für eine exakte Messung im Mikroskop ist die Verwendung von speziellen Messokularen notwendig. Das Messokular beinhaltet auf der Ebene des Zwischenbildes eine Glasplatte mit aufgebrachtener Skala, diese lässt sich durch die verstellbare Augenlinse scharf stellen; blickt man nun in das Okular so werden die Skala und das Mikroskopbild gemeinsam und scharf abgebildet.

Die Skala im Messokular ist aufgrund ihrer Lage im Strahlengang unabhängig von der Maßstabszahl des Objektivs immer gleich groß und muss daher für jedes Objektiv mit Hilfe des Objektmikrometers geeicht werden, um festzulegen wie groß die Intervalle auf der Skala sind.



Messokular

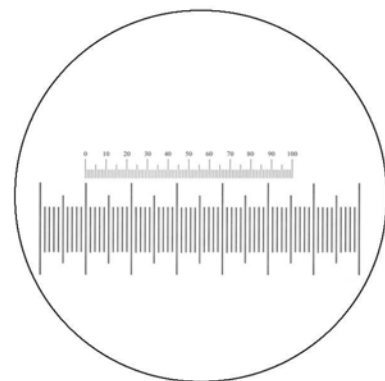
Ein Objektmikrometer ist ein herkömmlicher Objektträger auf dem ein Maßstab in Einheiten von meistens 1/100 mm (10 µm) aufgebracht ist.



Objektmikrometer

Eichung des Messokulars

1. Ein normales Okular gegen ein Messokular tauschen und scharf stellen.
2. Objektmikrometer einlegen und ebenfalls scharf stellen.
3. Die beiden Skalen so ausrichten, dass sie parallel nebeneinander liegen (durch Drehen des Okulars)
4. Feststellen, welche Anzahl an Teilstrichen des Okularmikrometers welcher Länge des Objektmikrometers entspricht und damit die Länge bestimmen, die einem Teilstrich des Messokulars gleichkommt.
 Bsp: 100 Teilstriche = 450µm
 1 Teilstrich = $450 \mu\text{m} / 100 = 4,5 \mu\text{m}$
5. Der so ermittelte Eichwert gilt NUR für das Objektiv und das Messokular mit dem die Eichung erfolgte. Die Eichung muss für jedes verwendete Objektiv gemacht werden.



Messokular und Objektmikrometer

Alternative Eichhilfen – Interne Standards

Zum Ausmessen des Bildfeldes oder zum Eichen des Messokulars können im Grunde jede Skala oder jede Struktur mit bekannter Größe verwendet werden. So zum Beispiel Millimeterpapier oder rote Blutkörperchen; diese eignen sich besonders, da sie im Mikroskop als kreisförmige Scheibchen zu sehen sind und ihr Durchmesser sehr konstant etwa 7,5 µm entspricht.

Die Eichung mit roten Blutkörperchen oder Millimeterpapier ist allerdings nur bei schwach vergrößernden Objektiven möglich. Bei Objektiven mit stärkerer Vergrößerung wird das Präparat nicht mehr als ganzes abgebildet, wodurch eine genaue Messung nicht mehr möglich ist.

Mikroskop-Pflege

Saubere Optiken sind eine Voraussetzung für gutes Mikroskopieren und einwandfreie Bilder. Staub ist dabei das größte Problem; zum einen stören die Verunreinigungen auf den Bildern, zum anderen kann der Staub, der zu einem großen Teil aus Sand- und Quarzteilchen besteht, Glasflächen zerkratzen und auch Getriebe und Gleitflächen beschädigen.

Der Schutz des Mikroskops vor Staub ist daher eine der wichtigsten Maßnahmen, um Verunreinigungen und Schäden vorzubeugen. Daher das Mikroskop nach dem Arbeiten immer mit einer leicht zu reinigenden Haube abdecken und diese auch regelmäßig mit einem feuchten Tuch reinigen um zu verhindern, dass Staub von der Abdeckung ins Mikroskop gelangt. Offene Ausgänge am Tubus sollten daher ebenfalls immer abgedeckt werden.

Bei der Reinigung von optischen Bauteilen ist die Art der Verunreinigung für die sachgemäße Entfernung entscheidend. Dabei ist zwischen Staubteilchen (Glasabrieb von Objektträgern, Textilfusseln, Pollenkörner, Sand, ...) sonstigem Schmutz (Fingerabdrücke, Rückstände von unsachgemäßen Reinigungsversuchen, flüssige oder eingetrocknete Einbettung- oder Immersionsmedien) zu unterscheiden.

Reinigungsmittel

- Blasebalg - KEINE Sprühdosen, diese verursachen Rückstände
 - nicht mit dem Mund auf die Linse blasen,
 - durch die Feuchtigkeit wird der Staub fester an die Linse geklebt.
- Wattestäbchen, hochreine langfädige Augenwatte
- Linsenputzpapier, weiche Kosmetik-Zellstoff-Tücher, Leinentuch
- destilliertes Wasser
- verdünnte Spülmittellösung
- Wundbenzin, Ether-Alkohol Mischung (4 : 1) - NIEMALS Alkohol oder Aceton!!!
- Glasreiniger ohne Ammoniak und Alkohol
- Lupe (oder umgedrehtes Okular) zur genauen Kontrolle der zu reinigenden Linsen

Linsen

Fast alle Teile der Mikroskop-Optik sind mit einer Oberflächenvergütung zur Verringerung der Reflexion versehen. Diese Beschichtungen können **hart** und damit wischfest sein wie alle nach außen liegenden Flächen (z.B. Objektiv-Frontlinse, Kondensor-Frontlinse, Okular-Augenlinse oder die Oberfläche der Lichtaustrittsöffnung)

oder sie sind nur **weich** wie alle im Innern der Geräte liegenden Linsenflächen sowie die Bestandteile von Fluoreszenzwürfeln.

Grundsätzlich gilt: **AN OPTISCHEN GERÄTEN SO WENIG PUTZEN WIE MÖGLICH!!!**

Gereinigt werden dürfen NUR wischfeste, hart vergütete Linsenflächen!

Die Beschichtung von weich vergüteten Flächen würde durch eine Reinigung so stark beschädigt werden, dass die Qualität der Linse enorm verschlechtert oder sie sogar unbrauchbar wird. Aus diesem Grund NIEMALS die rückseitigen Linsen von Objektiven oder Okularen putzen, und diese auch nicht zerlegen und von innen reinigen.

Reinigung von hart vergüteten Flächen

Reflexmindernde Vergütungen von Linsen bestehen meist aus Magnesiumfluoridschichten und sollten nur mit ammoniak- und säurefreien Mitteln gereinigt werden.

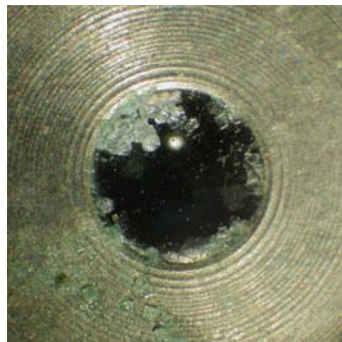
1. Zuerst werden feine **Staubpartikel** mit einem Blasebalg entfernt; am besten mit einem Blasebalg ohne Pinsel denn darin verfängt sich leicht Staub der dann auf die Linse geblasen wird. An der Linse anhaftende Staubpartikel können mit einem feinen entfettetem Pinsel oder einem Wattestäbchen vorsichtig gesäubert werden. Falls notwendig kann auch mit destilliertem Wasser und Watte oder Wattestäbchen gereinigt werden. Hier ist darauf zu achten, dass für jeden Reinigungsvorgang frische Watte benutzt wird und zum Schluss eine Trockenreinigung erfolgt.
2. **Öl, Fett oder Fingerabdrücke** sanft mit Linsenputzpapier oder fusselfreiem weichen Tuch abwischen (trocken oder feucht). Bei starker Verschmutzung kann eine Reinigung mit Wundbenzin, Ether-Alkohol oder verdünnter Spülmittellösung erfolgen. Dabei immer spiralförmig von der Mitte nach außen hin putzen und die Watte oder das Tuch nach jedem Putzvorgang erneuern.

Vor dem Abwischen der Linsen mit einem Tuch oder Watte **IMMER** zuerst den Staub entfernen, sonst können Kratzer entstehen!!! Die Verschmutzung immer wieder mit einer Lupe oder einem umgedrehten Okular kontrollieren

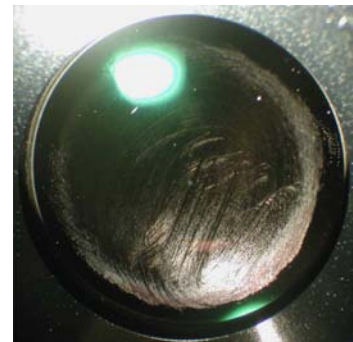
Nach innen gewölbte Frontlinsen, wie man sie bei Trockenobjektiven vorfindet, lassen sich am besten mit Blasebalg und Wattestäbchen reinigen. Es sollte aber beim Mikroskopieren besonders darauf geachtet werden, dass diese Linsen nicht mit Immersionsöl verschmutzt werden, da die Reinigung äußerst schwierig sein kann und die Verwendung von Lösungsmitteln bei Trockenobjektiven vermieden werden soll.



Frontlinse - Trockenobjektiv



Stark verschmutzte Frontlinsen



Stativ und Gehäuse

Das Stativ sowie alle Objektiv-, Okular- oder sonstige Linsenfassungen NUR mit einem feuchten Tuch reinigen. Andere Reinigungs- oder Lösungsmitteln können Beschriftungen ablösen oder den Kitt, mit dem die Linsen befestigt sind, angreifen.

Fremdkörper im Strahlengang

Selbst bei äußerster Sorgfalt beim Umgang und der Pflege des Mikroskops kann es immer wieder zu Verunreinigungen wie Staub oder Fingerabdrücken auf Linsen, Prismen, Filtern und anderen Glasflächen kommen.

Diese Verschmutzungen sind bei aufgenommenen Bildern besonders störend. Wie extrem sich die Verschmutzung auf die Bildqualität auswirkt, hängt von ihrer Lage im Strahlengang ab. Je näher sie sich am Objekt oder an einem Kamerasensor befindet, umso größer ist ihre Auswirkung auf das visuelle oder aufgenommene Bild.

Folgende Bereiche sind meist besonders kritisch:

- Frontlinse des Objektivs
- Kamerasensor sowie dessen Schutzglas
- Deckglas
- Linsen der Kamera-Adapter
- Augenlinse des Okulars sowie die Oberflächen von Strichplatten

weitere zu beachtende Bereiche

- Kondensorlinse
- Sonstige Glasoberflächen im Strahlengang, z.B. die von Halogen- oder Hochdrucklampen,
- Fluoreszenzfilter und Strahlenteiler
- Kollektor, Filter oder Wärmeschutzgläser

Verschmutzungen im Strahlengang finden

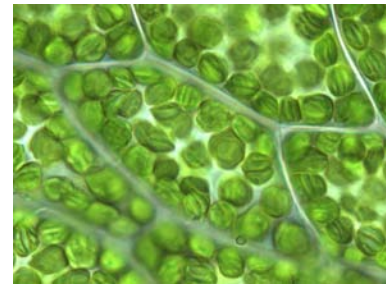
1. Bevor man sich auf eine langwierige Suche nach Schmutz im Mikroskop macht, sollte man zuerst einmal die Frontlinsen der Objektive säubern und die Deckgläser kontrollieren. Diese beiden Faktoren führen in den meisten Fällen zu unscharf und flau wirkenden Bildern.
2. Durch Fokussieren auf die Verschmutzung und durch Verschieben des Präparates kann festgestellt werden, ob sich der Schmutz irgendwo am Präparat befindet.
3. Durch Drehen der Okulare kann abgeklärt werden, ob sich auf der Augenlinse oder der Strichplatte Verunreinigungen befinden.
4. Verschmutzungen auf dem Kamerachip oder dessen Schutzglas bleiben bei Drehen der Kamera immer an der gleichen Position.
5. Mit einer Höhenverstellung des Kondensors kann überprüft werden, ob sich Ablagerungen auf dem Lampenkolben oder dem Kollektor befinden.
Bei gekühltem Kondensator zeigt sich Schmutz auf dem Kollektor oder den Glasflächen nahe der Feldblende.
6. Bewirkt eine Veränderung der Schärfenebene des Präparates, dass auch der Schmutz unscharf wird, so könnte die Ursache am Präparat selbst oder an der Kondensator-Frontlinse liegen
7. Konnte die Verschmutzung bis jetzt noch nicht lokalisiert werden so kann man vorsichtig das Objektiv in seiner Schraubfassung drehen, dadurch sollte sich zeigen ob sich ein Fremdkörper darin befindet.
8. Als letzte Möglichkeit kann man noch den Tubusaufsatz etwas lockern und ihn drehen. Bewegt sich dabei der Schmutz mit, so befindet er sich nicht auf den Umlenkprismen. Andernfalls müssen die Prismen auf Verunreinigungen kontrolliert werden. Eine Reinigung der Prismen sollte aber wenn möglich vermieden werden, weil dabei die Wahrscheinlichkeit einer Verschlechterung sehr hoch ist. Im Notfall den Schmutz äußerst vorsichtig entfernen, am besten nur mit einem Blasebalg; dabei immer darauf achten, dass nicht noch zusätzliche Fremdkörper, etwa Augenbrauen, in den Tubus gelangen.

1.4 Präparation

Die richtige Präparation der Objekte ist ebenso ausschlaggebend für die Qualität der Ergebnisse wie das Mikroskop selbst.

Lebendpräparat – Dauerpräparat

Ob ein Präparat im lebenden Zustand oder fixiert mikroskopiert wird hängt oftmals von der Fragestellung ab oder davon, ob man das Präparat für längere Zeit aufbewahren möchte.



Lebendpräparat

Zerkleinern

Kleine und dünne Präparate können meist als Ganzes mikroskopiert werden. Bei großen oder dicken Präparaten ist es notwendig das Präparat zu zerteilen oder Schnitte anzufertigen, um das Präparat im Mikroskop betrachten und auch die inneren Strukturen analysieren zu können.



gefärbtes Dauerpräparat

Fixieren und Einbetten

Für besonders dünne Schnitte oder für die Anfertigung von Dauerpräparaten müssen die Objekte fixiert werden.

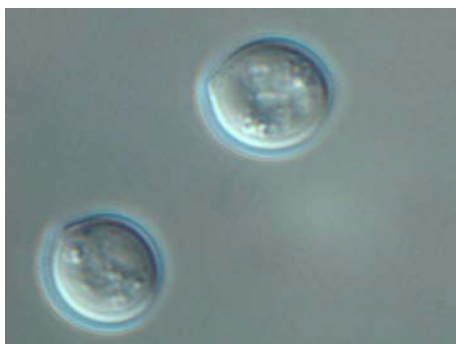
1.4.1 Lebendpräparat

Lebende Präparate ermöglichen die Analyse von dynamischen und physiologischen Prozessen. Zudem entfällt bei ihnen auch eine unter Umständen langwierige Fixierung und Einbettung.

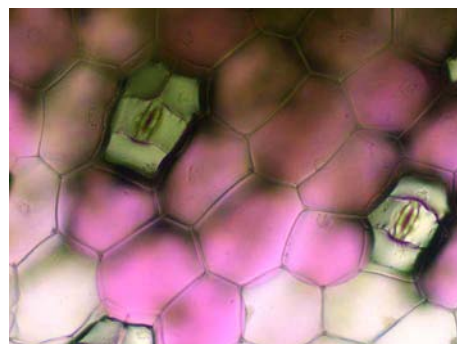
Größe des Präparates

Einzellige oder sehr kleine Präparate können ohne weitere Behandlung direkt ins Mikroskop gelegt werden.

Bei dickeren und größeren Präparaten ist es notwendig das Präparat zu zerkleinern, dabei ist jedoch darauf zu achten, dass die zu beobachtenden Zellen nicht zerstört werden. Die Schnittdicke muss daher die Zellgröße übersteigen. Für Lebenpräparate sind daher Handschnitte besonders geeignet.



einzelne Hefezellen

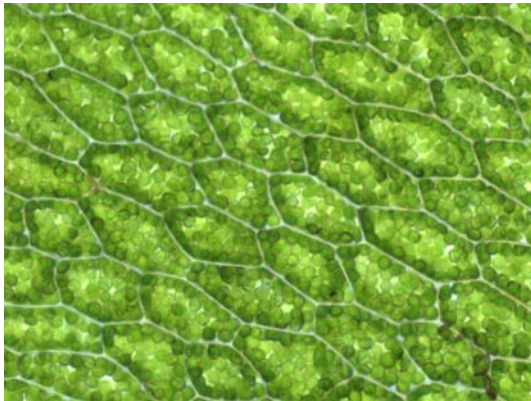


Flächenschnitt eines Blattes

Umgebungs- oder Einbettmedium

Um störende Lichtbrechungen und damit schwarze Flecken im Bild zu vermeiden muss das Präparat in ein flüssiges Medium eingebettet werden. Bei pflanzlichen Zellen genügt hier häufig Wasser, bei tierischen Zellen ist allerdings die Verwendung einer Pufferlösung erforderlich.

Tierische Zellen müssen aufgrund ihres osmotischen Wertes und der fehlenden Zellwand auf jeden Fall in einem isotonischen Medium mikroskopiert werden, ansonsten würden die Zellen platzen oder schrumpfen.



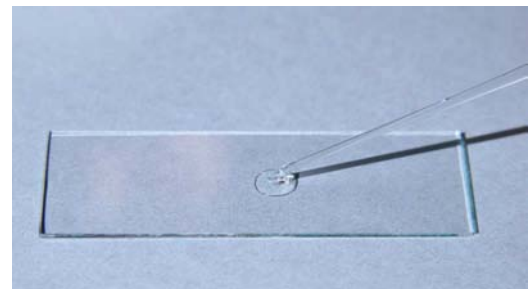
Präparat OHNE Luftblasen



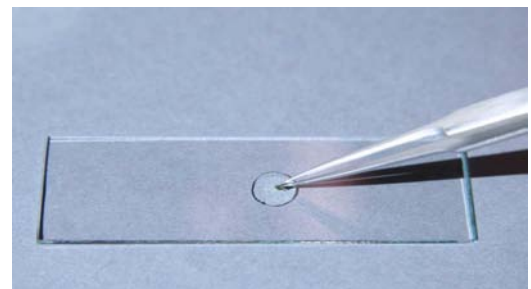
Präparat MIT Luftblasen

1.4.1.1 Herstellung eines Lebendpräparates

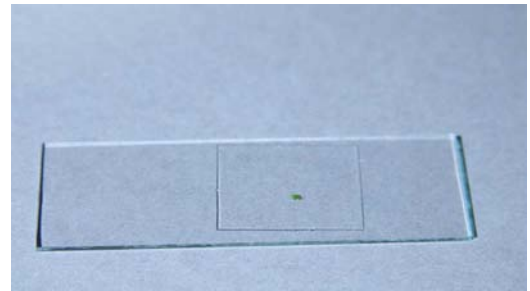
Auf einem Objektträger wird ein Tropfen Medium (Wasser oder Puffer) mittig aufgebracht.



Das Präparat wird mit einer Pinzette oder einer Präpariernadel im Medium platziert.

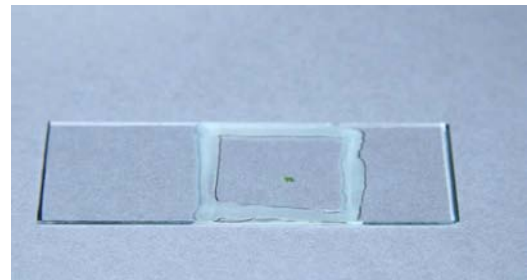
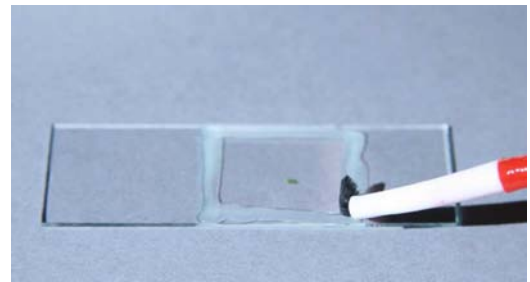


Das Deckglas wird schräg auf den Objektträger aufgesetzt; mit Hilfe einer Präpariernadel lässt man das Deckglas vorsichtig auf das Präparat gleiten. Dies soll den Einschluss von Luftblasen im Medium verhindern.



Als Verdunstungsschutz oder bei Versuchen mit giftigen Chemikalien kann man das fertige Präparat noch mit einem Vaselineering versehen.

Dazu Vaseline langsam erwärmen bis sie flüssig wird, dann mit einem Pinsel rundum das Deckglas auftragen.

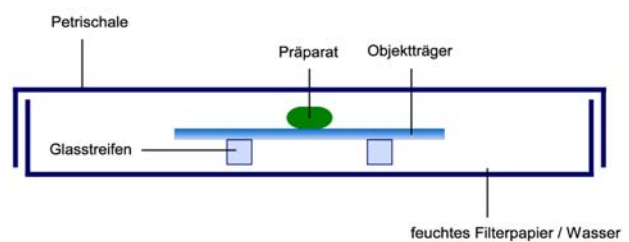
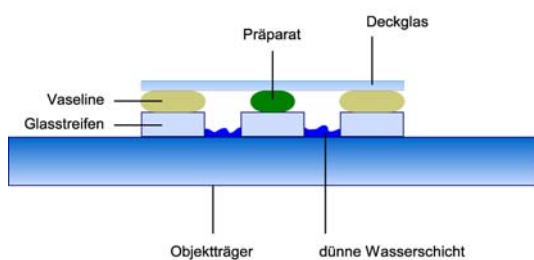
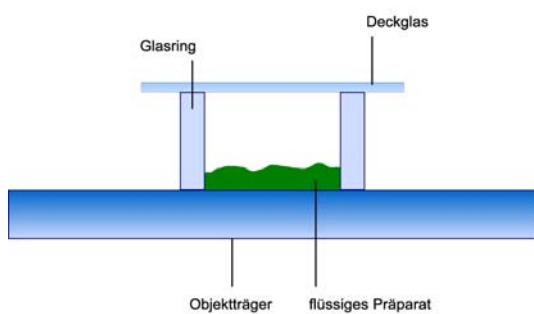
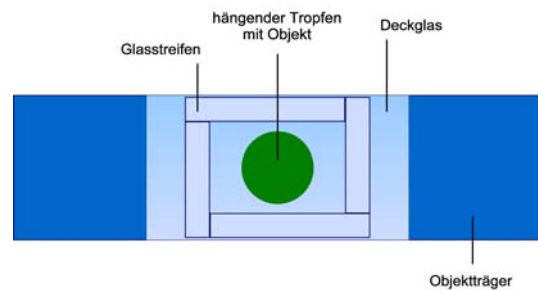
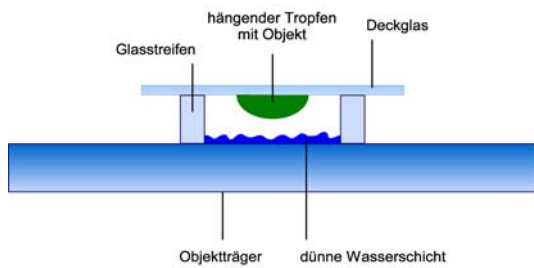
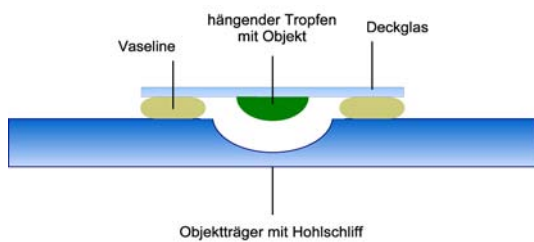


1.4.1.2 Feuchte Kammern

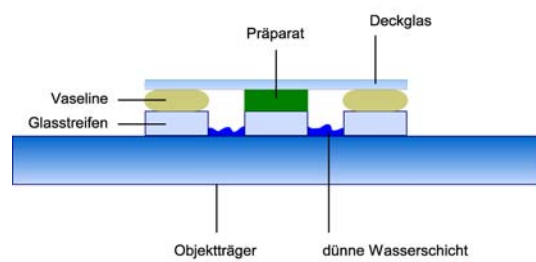
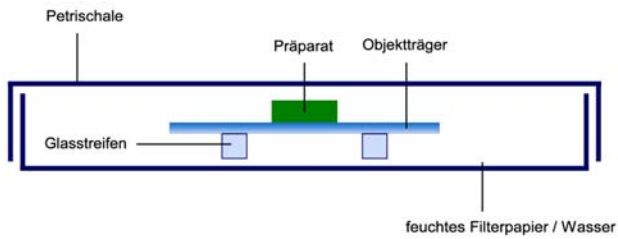
Eine weitere Methode die Verdunstung des Mediums zu verhindern ist, neben dem Verschluss des Deckglases mit Vaseline, die Verwendung von feuchten Kammern.

Für die Herstellung einer Feuchten Kammer gibt es je nach Anforderungen durch das Objekt oder den Versuch unterschiedliche Möglichkeiten.

Feuchte Kammern für flüssige Objekte



Feuchte Kammern für feste Objekte

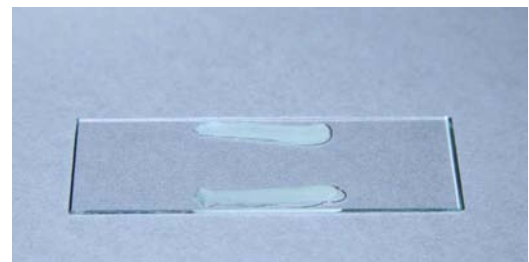


1.4.1.3 Durchflusskammern

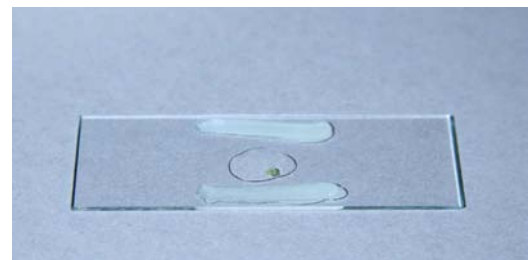
Für die längere Beobachtung von lebenden Geweben oder für spezielle Versuchsansätze ist es notwendig das Umgebungsmedium schnell und effizient wechseln zu können. Für diesen Zweck gibt es so genannte Durchflusskammern.

Einfache Durchflusskammer

Eine sehr einfache Variante einer Durchflusskammer kann man sich leicht selber machen. Dazu werden auf einem Objektträger der Länge nach zwei Abstandhalter aufgebracht. Diese können aus Vaseline, Wachsen, Parafilm, usw. bestehen.

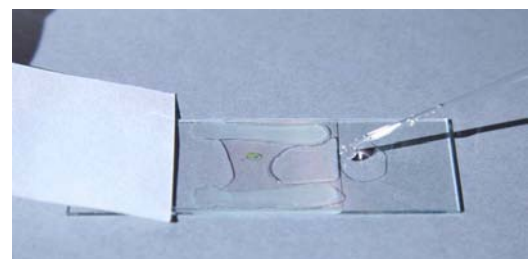


Zwischen diese beiden Streifen platziert man das Medium und das Präparat.



Zum Schluss legt man das Deckglas auf die beiden Abstandhalter über das Präparat.

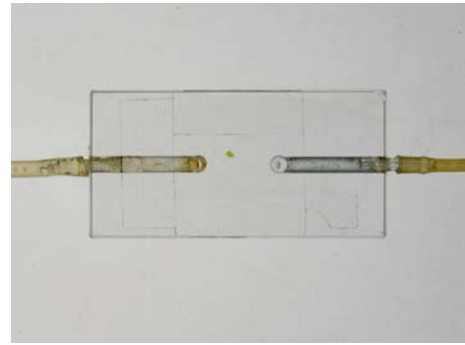
Die Flüssigkeit lässt sich nun sehr einfach und problemlos mit einem Stück Filterpapier absaugen. Neue Flüssigkeit wird auf der anderen Seite mit einer Pipette zugegeben.



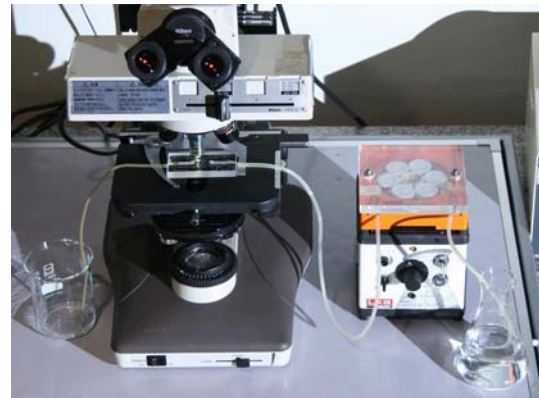
Automatische Durchflussskammer

Vor allem bei längeren Untersuchungen von Geweben muss eine konstante Qualität des Mediums und/oder ein rascher Wechsel möglich sein.

Dazu gibt es spezielle Durchflussskammern, in denen das Präparat eingespannt wird. Über Schläuche und Peristaltikpumpe kann das Medium die Kammer kontinuierlich versorgen und gleichmäßig getauscht werden.



Peristaltikpumpe



Mikroskop mit Durchflussskammer

1.4.2 Suspensionspräparat

Sehr kleine Objekte wie etwa Plankton, einzellige Algen, Einzellerkulturen, Bodenproben oder diverse Pulver können einfach in Flüssigkeit gelöst unter dem Mikroskop betrachtet werden.

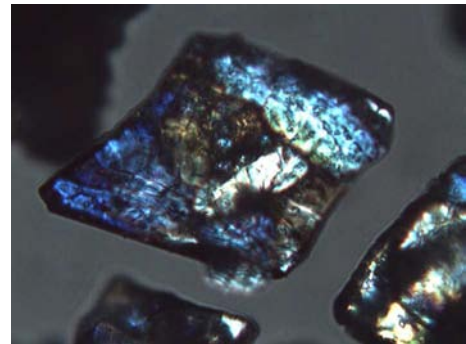
Dies ist häufig Wasser oder eine Pufferlösung.

Bei der Präparation empfiehlt sich in jedem Fall die Präparate sehr dünn zu machen, damit sich die Strukturen während des Mikroskopierens nicht ständig bewegen können.

Für die Untersuchung von wasserlöslichen Strukturen wie etwa Glucose oder Salzkristallen ist die Verwendung von **Glyzerin, Paraffin- oder Immersionsöl als Suspensionsmedium** erforderlich, um die Strukturen zu erhalten.



Chlamydomonas sp.



Glucose-Suspension in Glyzerin
Polarisationsmikroskopie

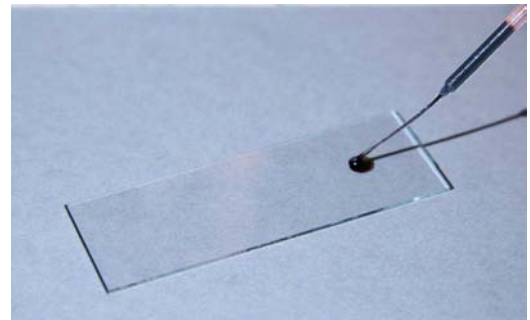
1.4.3 Ausstrichpräparat

Ein Ausstrichpräparat entspricht im wesentlichen einem Suspensionpräparat mit dem Unterschied, dass die Suspension gleichmäßig dünn aufgetragen wird.

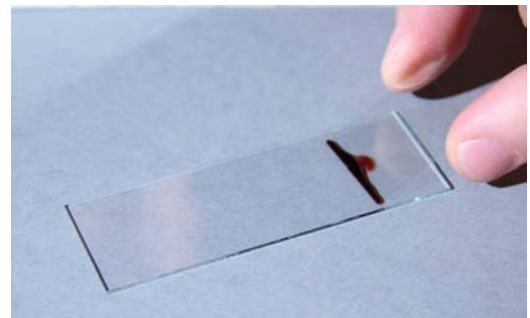
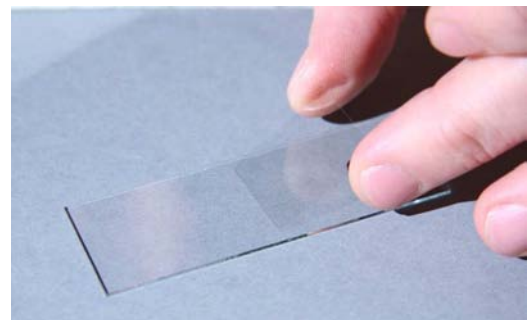
Ausstrichpräparate werden unter anderem für die Analyse von Bakterienkulturen oder Blutproben verwendet.

Zu Herstellung eines Ausstrichpräparates wird ein mit Alkohol oder Spülmittel entfetteter Objektträger benötigt. Diesen mit destilliertem Wasser gut abspülen und mit einem fusselfreiem Tuch trocknen.

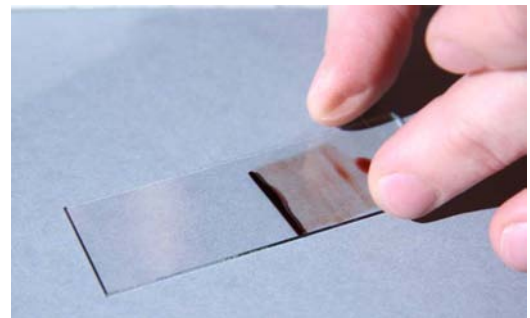
An einem Ende des Objektträgers wird ein kleiner Tropfen der Suspension aufgetragen.



Ein Deckglas mit der Kante in der Mitte des Objektträgers aufsetzen und es soweit an den Probe heranführen bis es mit der Suspension Kontakt aufnimmt.



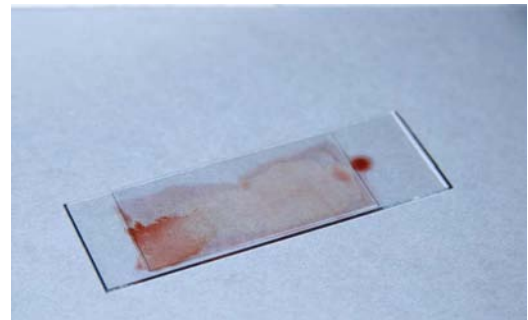
Das Deckglas nun in einem spitzen Winkel vom Tropfen weg über den Objektträger schieben; es entsteht ein dünner Film der Probe auf dem Objektträger.



Das weitere Verfahren hängt nun von der Probe und dem Versuch ab.

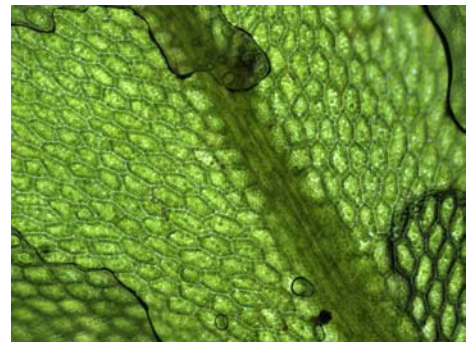
Am einfachsten legt man ein frisches Deckglas auf den Ausstrich und kann schon mikroskopieren.

Es besteht aber auch die Möglichkeit das Ausstrichpräparat trocknen zu lassen, zu färben oder daraus ein Dauerpräparat zu machen.



1.4.4 Zupfpräparat / Quetschpräparat

Die einfachste Möglichkeit ein Präparat zu zerkleinern ist ein Stück abzupfen. Zum Beispiel ein Blättchen von einem Moos, ein Stück von einer Flechte oder auch etwas tierisches Gewebe, hier empfiehlt sich eine zusätzliche Mazeration mit 10% Weinsäure für mehrere Stunden oder Tage.

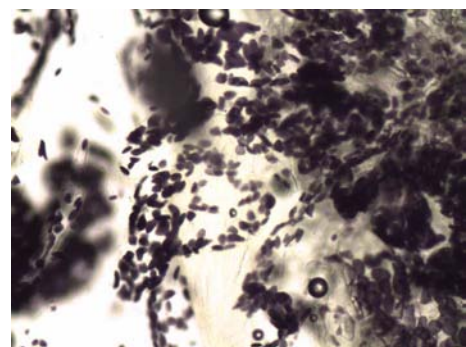


Moosblättchen

Durch Quetschen des Präparates kann dieses flacher und dünner gemacht werden, was das Mikroskopieren erleichtert.

Dazu drückt oder klopft man mit dem Griff eines Pinsels oder einer Präpariernadel leicht auf das Deckglas des fertigen Präparates. Das austretende, überschüssige Medium wird mit Filterpapier aufgesaugt.

Quetschpräparate finden zum Beispiel in der Pilzkunde zur Analyse von Strukturen des Pilzorganismus (Hyphen, Basidien oder Sporen) Anwendung oder bei der Untersuchung von Mitosestadien in Wurzelspitzen oder anderen Geweben.



Bananen-Quetschpräparat für Stärkenachweis mit Lugol

1.4.5 Mazeration

Die Mazeration (von lat. *macerare*/einweichen) ist ein chemisches Verfahren, bei dem ein Körper oder Gegenstand einige Zeit der Einwirkung einer Flüssigkeit wie zum Beispiel Wasser, Öl oder Alkohol ausgesetzt wird, wodurch bestimmte Inhaltsstoffe des Gegenstandes herausgelöst werden.

In der Biologie wird unter Mazeration das Zerfallen von pflanzlichem Gewebe in seine einzelnen Zellen durch Auflösung der Mittellamellen zwischen den Zellwänden verstanden (z.B. beim „Mehligwerden“ von Äpfeln).

In der Mikroskopie wird dieses Verfahren zur Isolierung von Gewebsanteilen verwendet. Die Mazeration erfolgt dabei natürlich durch enzymatische Prozesse oder künstlich durch Chemikalien (zB Kalilauge, Essigsäure oder Weinsäure).

1.4.6 Dünnschnittpräparat

Die Anfertigung von Schnitten ist ein sehr zentrales Thema in der Mikroskopie. Wie dick und wie groß die Schnitte sein sollen oder ob man ein Lebendpräparat schneidet oder ein fixiertes ist sehr stark vom jeweiligen Präparat und von der Fragestellung abhängig.

Nicht alle Präparate lassen sich gleich gut schneiden; störend beim Schneiden sind oft eine dicke Cuticula oder andere harte äußere Schichten. Aber auch extrem weiche und wasserreiche Objekte lassen sich nur schwer schneiden.

Grundsätzlich gibt es 2 Möglichkeiten Schnitte für die Mikroskopie anzufertigen.

- Handschnitte
- Mikrotom

1.4.6.1 Handschnitte

Handschnitte mit einer Rasierklinge anzufertigen mag altmodisch oder auch schwierig klingen, ist es aber keineswegs. Denn gute Schnitte mit dem Mikrotom herzustellen ist auch nicht einfacher aber bei weitem zeitaufwendiger und bringt nicht bei jedem Objekt ein besseres Ergebnis.

Hier liegen die Vorteile des Handschnittes:

- einfach: ohne viele Aufwand und unkompliziert herzustellen
- schnell: die angefertigten Schnitte können sofort mikroskopiert werden
→ daher besonders gut geeignet für Lebendpräparate!!!

Ein guter Handschnitt kann bis zu 30 µm dünn sein; dünner muss ein Schnitt bei pflanzlichen Geweben im allgemeinen nicht sein um einen Überblick über den Zellaufbau eines Gewebes zu geben.

Ein Handschnitt ist deshalb kein minderwertiger Ersatz für einen Mikrotomschnitt, sondern ein vollwertiges Präparat!!

Anfertigung eines Handschnittes

Handschnitte macht man am besten mit einer Rasierklinge. Diese nimmt man an einem Ende zwischen Daumen und Mittelfinger, das andere Ende fixiert man mit dem Zeigefinger.

Wichtig ist, die Klinge immer mit einem ziehendem Schnitt durch das Präparat zu führen – NICHT hin und her bewegen, dabei wird das Gewebe zerstört!!

Um ein optimales Ergebnis zu bekommen ist auch darauf zu achten, dass Klinge und Präparat **IMMER** feucht sind (Wasser oder Puffer)



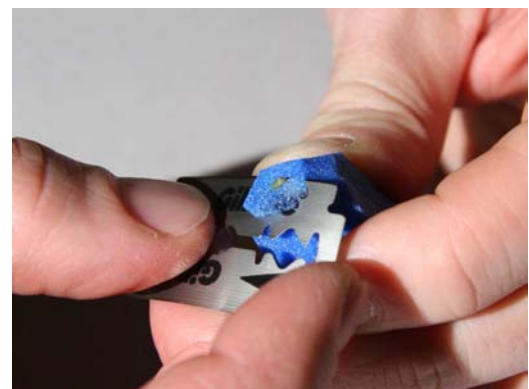
Flächenschnitte von Blättern oder Stängeln lassen sich problemlos auch ohne Einbettung vornehmen; dazu einfach das Präparat um den Finger wickeln und mit einer feuchten Rasierklinge ziehende Schnitte vornehmen.



Vor allem bei **Querschnitten** und bei **sehr kleinen oder weichen Präparaten** ist eine Einbettung notwendig um das Präparat beim Schneiden zu fixieren.

Das Präparat muss dazu vom Einbettmedium völlig umgeben sein; es soll ein etwa 5 mm dicker Mantel um das Präparat gebildet werden.

Vor dem Schneiden das Obere Ende des Einbettmediums etwas abkanten. Die Schnitte wiederum ziehend mit einer Rasierklinge anfertigen.



1.4.6.2 Mikrotomschnitte

Für die Anfertigung von gleichmäßigen und dünnen Schnitten ist die Verwendung eines Mikrotoms notwendig. Damit können Schnitte zwischen 10 und 100 μm hergestellt werden.

Anfertigung eines Mikrotomschnittes

- Für Mikrotomschnitte ist es notwendig das Objekt einzubetten.
- Das eingebettete und oben abgekantete Präparat wird in einen Objekhalter eingespannt, welcher durch einen Vorschubmechanismus mikrometergenau angehoben werden kann.
- Die Schnitte werden mit einem ebenfalls fest montierten und geführten Messer gemacht. Dabei das Messer mit einem Pinsel vor dem Schneiden mit Alkohol befeuchten!!
- Die fertigen Schnitte mit einem feinen Pinsel vom Messer abnehmen und in ein Schälchen mit destilliertem Wasser geben → Das Messer dabei **IMMER** nur von hinten nach vorne berühren!!!

Die Schnitte können auch sofort auf einen Objektträger mit einem Wasserfilm (destilliertes Wasser + Ethanol zur Reduzierung der Oberflächenspannung) gelegt werden.

Durch die verminderte Oberflächenspannung breiten sich die Schnitte von selbst darauf aus und können mit einer Präpariernadel noch orientiert werden.

Nach dem Trocknen kleben die Schnitte fest am Objektträger und können so gefärbt und anschließend sofort in Kunstharz eingebettet werden.

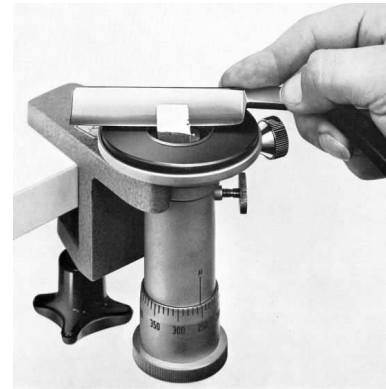
Mikrotome – Bautypen

Handmikrotom oder Tischmikrotom

Stellt die einfachste Form eines Mikrotoms dar.

Das Präparat wird in eine Halterung eingespannt und kann mit einem Objektvorschub Mikrometer genau angehoben werden.

Der Schnitt selbst erfolgt noch händisch mit einer Rasierklinge oder einem Rasiermesser.

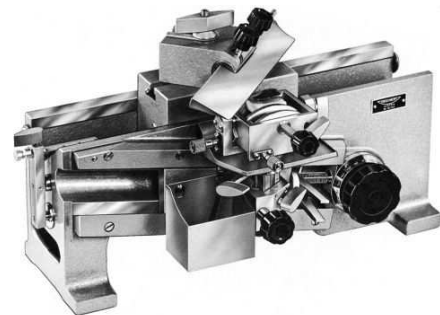


1

Schlittenmikrotom

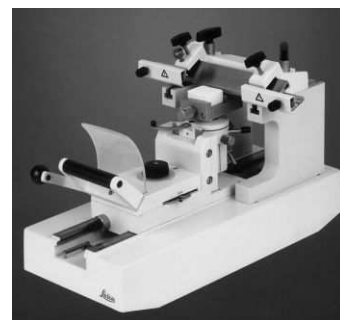
Beim Schlittenmikrotom können grundsätzlich zwei Varianten unterschieden werden.

Bei dem gängigsten ist das zu schneidende Objekt auf einem Blockträger fixiert. Das Messer ist beweglich in einem Messerschlitten montiert; dieser gleitet auf Stahlschienen vor und zurück. Durch das Ziehen des Messers über das Präparat können die Schnitte gemacht werden. Nach jedem Schnitt wird der Blockträger um die eingestellte Schnittdicke nach oben geschoben, so dass der nächste Schnitt ebenfalls die eingestellte Dicke besitzt.



2

Beim zweiten Bautyp, dem Grundschlittenmikrotom, wird nicht das Messer bewegt sondern der Blockträger. Die sonstige Funktionsweise ist gleich.



3

1 <http://www.mikroskopie-muenchen.de/handmikrotom.jpg>
2 <http://www.mikroskopie-muenchen.de/reichert-sm.jpg>
3 <http://www.mikroskopie-muenchen.de/grund-sm.jpg>

Rotationsmikrotom

Beim Rotationsmikrotom wird das eingespannte Objekt durch ein Schwungrad vertikal bewegt und so am fest montierten Messer vorbeigezogen.

Die Bewegung des Schwungrades erfolgt meistens händisch, wobei eine Umdrehung das Präparat einmal senkt und wieder anhebt und somit einen Schnitt erzeugt.

Nach jeder Umdrehung wird wie beim Schlittenmikrotom das Präparat um die eingestellte Schnittdicke nach vorne geschoben.

Das Rotationsmikrotom eignet sich besonders für die Anfertigung von Schnittserien, da die in Paraffin oder Kunstharz eingebetteten Schnitte wie ein Band zusammenhängen.

Geräte mit motorischer Bewegung eignen sich besser zum Schneiden für in härtere Kunstharze eingebettetes Material.

Der Bautyp des Rotationsmikrotoms findet sich auch bei Spezialmikrotomen wie etwa Gefrier- oder Ultramikrotomen.



4

1.4.6.3 Einbetten und Umschließen

Für die Anfertigung von Schnitten müssen die Objekte eine minimale Härte besitzen und sollten sich aus Strukturen etwa gleicher Konsistenz zusammensetzen. Dies ist allerdings nur selten der Fall, wodurch es in den meisten Fällen notwendig ist das Objekt einzubetten.

Hier muss zwischen Einbetten und Umschließen unterschieden werden:

Einbetten: Das Objekt wird vollständig mit einer Flüssigkeit (Paraffin / Kunstharz) **durchtränkt**. Anschließend wird die Flüssigkeit zum Erstarren gebracht. Auf diese Weise erhält man ein Präparat von durchgehend ziemlich homogener Festigkeit.

Für dünnere Mikrotomschnitte sind eingebettete Objekte unbedingt erforderlich.

Das Einbettmedium sollte so gewählt werden, dass es im festen Zustand die gleiche Härte besitzt oder etwas härter ist wie die härtesten Stellen im Objekt.

Je dünner die Schnitte werden sollen – desto härter muss das Einbettungsmedium sein.

- zB:
- Paraffin
 - Kunstharze (nur für Mikrotomschnitte)

4 http://www.medite.de/rotationsmikrotom_rmt_40.html

Umschließen: Das Objekt wird lediglich von einem Medium **eingehüllt!**

Umschließen eignet sich vor allem für Handschnitte beziehungsweise bei sehr homogenen oder fixierten Objekten auch für dickere Mikrotomschnitte

- zB:
- Holundermark
 - Brombeermark
 - Rüben
 - (• Styrodur)

 - NICHT geeignet: Styropor und Kork

1.4.6.4 Einbettmedien

Paraffin

Paraffin (Latein *parum affinis*, „wenig reaktionsfähig“) bezeichnet ein Gemisch aus gesättigten Kohlenwasserstoffen. Es ist geruch- und geschmacklos, ungiftig und gegenüber vielen Chemikalien reaktionsträge (inert). Zum Einbetten verwendetes Paraffin hat einen Schmelzpunkt von 60°C.



5

- Präparate, die in Paraffin eingebettet werden, muss man zuvor fixieren und in einer Ethanolreihe entwässern (Ethanol 60 % / 75% / 100% - je 15 Minuten)
- Objekte in kleinen Stücken in flüssiges Paraffin legen und für einige Stunden durchtränken lassen (im Wärmeschrank bei 60°C)
- erstarrte Paraffinblöcke zurecht schneiden und Schnitte anfertigen.

Kunstharze

Kunstharze werden durch Polymerisations-, Polyadditions- oder Polykondensationsreaktionen hergestellt. Sie bestehen in der Regel aus zwei oder mehreren Komponenten (Harz und Härter). Die Vermischung dieser Teile (Harz und Härter) ergibt eine reaktionsfähige Harzmasse (Härtung).

Während der Härtung steigt die Viskosität und nach abgeschlossener Härtung erhält man einen unschmelzbaren Kunststoff.



zB: LR White, Kulzers Technovit 7100, Epoxidharze

5 http://www.jarstore.com/assets/images/Waxes/IGI_Clean_Paraffin_Wax.jpg

- Zum Durchtränken der fixierten und speziell entwässerten Präparate werden diese für etwa 1 Tag in eine Infiltrationslösung überführt (zB Harz + Härter 1).
- Die durchtränkten Präparate werden in teflonbeschichteten Formen in flüssigem Kunstharz (zB Infiltrationslösung + Härter 2) eingebettet.
- Im Wärmeschrank härtet das Kunstharz völlig aus und man kann den Kunstharzblock aus der Form nehmen.

AUHTUNG!!

Nicht ausgehärtetes Kunstharz enthält Styrol oder andere reaktionsfähige Komponenten und ist extrem gesundheitsschädlich!!!

!!!! NUR IM ABZUG ARBEITEN !!!!
!!!!HAUTKONTAKT VERMEIDEN!!!!

Holundermark

Die Einbettung in Holundermark ist wohl eine der ältesten Methoden. Dazu wird das Mark von schwarzem Holunder (*Sambucus nigra*) verwendet.

In das runde Mark wird der Länge nach mit der Rasierklinge ein Schnitt gemacht und das Präparat darin eingeklemmt. Nun ist das Präparat optimal fixiert und es können wieder mit ziehenden Schnitten einwandfreie Querschnitte produziert werden.

Zum Sammeln von Holundermark zitiere ich am besten Rainer GERSTLE (1987) von der ehemaligen Stuttgarter Redaktion des Mikrokosmos:

"Seltsamerweise hört man immer wieder die ratlose Frage nach Bezugsquellen für Holundermark. Phywe in Göttingen liefert es; es ist aber viel zu teuer, wenn man bedenkt, dass man Holundermark an fast jedem Waldrand oder Gebüschsaum selber sammeln kann. Das Sammeln macht aber offenbar auch Schwierigkeiten. Viele Mikroskopiker versuchen, normale Holunderäste zu schälen und können daraus natürlich kein schönes, rundes, unverletztes Mark gewinnen. Man muss zur Gewinnung des Markes die vorjährigen Wasserschößlinge wählen. Das sind die geraden, nie verzweigten Triebe, die meist ein bis zwei Meter senkrecht in die Höhe ragen. Geerntet wird im Frühjahr vor dem Blattaustrieb. Dann erkennt man im Gestrüch auch gut die dünnen, abgestorbenen Wasserschößlinge."

Brombeermark

An oft zurückgeschnittenen Brombeersträuchern bilden sich mehrmals im Jahr 1cm dicke Wasserschosse, die im Innern ebenfalls ein Mark enthalten. Dieses ist etwas fester als Holundermark, aber zum Einbetten ebenfalls hervorragend geeignet.

Die Wasserschosse der Brombeere können im Gegensatz zum Holunder auch frisch verwendet werden. Dazu einfach ein Stück mit einer Gartenschere abschneiden, an allein Seiten das feste Gewebe mit einer Rasierklinge abschneiden, sodass nur mehr das Mark übrig bleibt. Die weitere Verwendung ist wie beim Holundermark.

Rüben

Auch Rüben, Karotten oder Kartoffeln eignen sich hervorragend als Einbettmedium. Sie sind billig, leicht zu bearbeiten und lassen sich auf jede Form zuschneiden. Rüben bieten dazu auch noch einen optimalen Schneidewiderstand und schonen die Klingen.

Zum Einbetten des Präparates wird die Rübe gereinigt, die äußeren Schichten abgeschnitten und das Innere auf eine passende Größe zugeschnitten.

Aufgrund der festeren Konsistenz der Rübe muss eine für das Objekt passende Aussparung aus dem Gewebe herausgeschnitten werden.

Dazu das Rübenstück in der Mitte teilen und aus jeder Hälfte eine passende Rille herausschneiden und das Präparat vorsichtig dazwischen einklemmen.

Es ist allerdings damit zu rechnen, dass Inhaltsstoffe der Rübe wie etwa Stärkekörner oder Chromoplasten das Präparat verunreinigen können. Am besten eignen sich daher weiße Kohl- oder Futterrüben, diese verursachen keine störenden rötlichen Verunreinigungen wie dies Karotten der Fall ist!!!

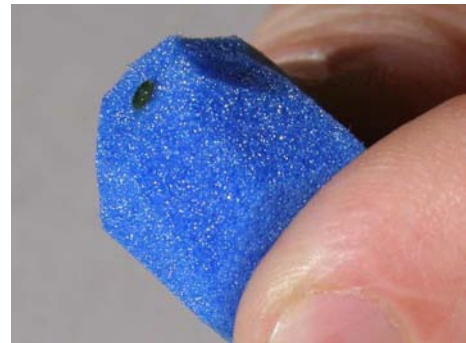
Styrodur

Ist ein extrudierter Polystyrolschaum, ähnlich Styropor nur etwas feiner und homogener.

Zum Einbetten von Schnitten ist es nur mäßig gut geeignet.

Es verursacht wie alle Polystyrole eine starke Beschädigung der Klingen. Man kann zwar auch mit einer stumpfen Klinge Schnitte anfertigen, aber schön glatt und frei von Rissen werden die Schnitte nicht werden.

Styrodur findet trotzdem häufig Verwendung in Kursen von Schulen und Universitäten. Für höhere Ansprüche sollte aber darauf verzichtet werden!!!



nicht geeignet

Von der Verwendung von **Styropor** ist dringend abzuraten, es beschädigt die Schneide der Rasierklinge schon beim ersten Schnitt gravierend.

Auch **Kork** ist wegen seiner zu festen Konsistenz und seiner harten Einschlüsse zum Einbetten von Präparaten nicht geeignet.

1.4.6.5 Messer

Rasierklingen

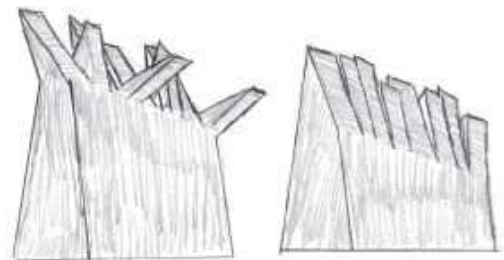
Für die Herstellung von Handschnitten sind normale im Drogeriemarkt erhältliche Rasierklingen bestens geeignet.

Wichtig ist hier allerdings die richtige Handhabung:

- Zum Schneiden nimmt man die Rasierklinge an einem Ende zwischen Daumen und Mittelfinger, das andere Ende fixiert man mit dem Zeigefinger.



- Um mit einer Klinge längere Zeit einwandfreie Schnitte zu bekommen ist es notwendig diese jedes mal abzuziehen, denn die Schneide der Rasierklinge ist sehr dünn und die darauf befindlichen Gratzähne werden beim Schneiden in alle Richtungen verbogen.



A.E. Boon

Durch das Abziehen auf dem Leder werden diese Zähne wieder gerade ausgerichtet und somit die Qualität der Schneide wiederhergestellt.

Das Abziehleder sollte auf einen dicken unbiegsamen Holzblock auf gezogen sein. Aufgehängte Riemen wie beim Friseur sind nicht geeignet; sie erzeugen eine abgerundete Kante.



Abziehblock ⁶

- Im Gegensatz zu Klingen, die zum Rasieren verwendet werden, sollen Rasierklingen nach dem Schneiden von biologischen Präparaten sofort abgezogen werden um zu vermeiden, dass winzige Wassertropfen aus dem Präparat zwischen den verbogenen Zähnen stehen bleiben.

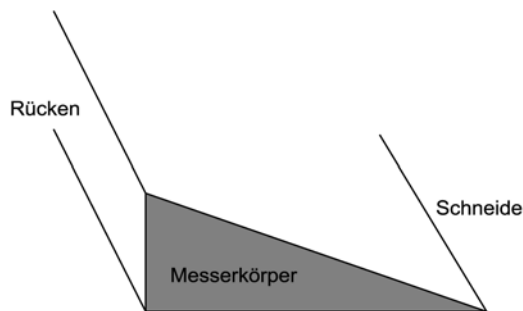
Generell empfiehlt es sich beim Schneiden immer mehrere Klingen parallel zu verwenden und diese auch vor dem Schneiden immer abzuziehen.

⁶ <http://www.mikroskopie-muenchen.de/streichriemen1.jpg>

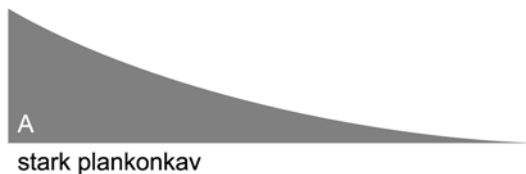
Mikrotommesser

Mikrotommesser sind nichts für ungeschickte Hände!!!
Durch ihre enorme Schärfe und das massive Gewicht durchtrennen diese Messer mühelos Muskel und Sehnen und verursachen tiefe Schnitte.

Verwendung von Mikrotommessern nur unter Anleitung von Profis!!!!!!



Messerprofile



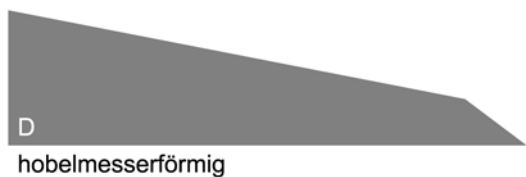
- A** Sehr scharf und sehr empfindlich
 – für weiche Einbettungen und Präparate



- B** ähnlich A
 – auch für etwas härteres
 und frisches biologisches Material geeignet



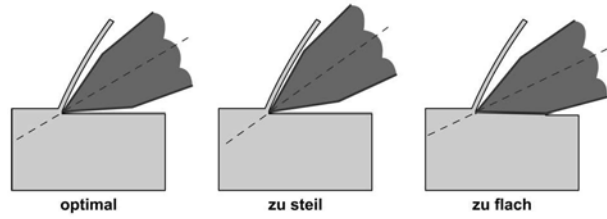
- C** wenig empfindliches Messer
 – sehr universell einsetzbar



- D** sehr stabil
 – für harte und große Kunstharzblöcke
 sowie für industrielle Materialien

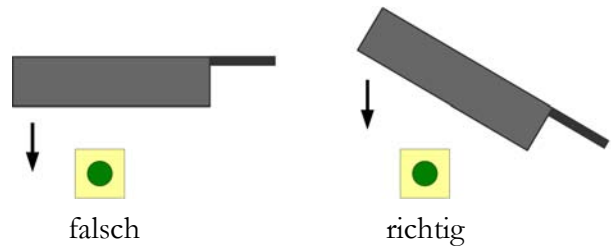
Inklination

Für einen guten Schnitt muss ein Neigungswinkel (Inklination) von cirka 13 – 15° eingestellt werden.



Deklination

Um auch beim Mikrotom einen ziehenden Schnitt zu erreichen darf das Messer nicht im rechten Winkel zum Objekt geführt werden, sondern etwa in einem Winkel von 30°.

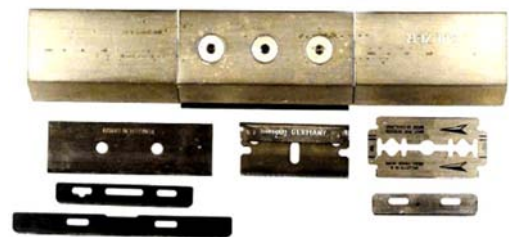


Ein planes Ansetzen des Messer würde zum Quetschen des Präparates führen.

Messerhalter

Besonders für Anfänger geeignet sind Messerhalter. In diese können normale Klagen eingespannt und dann anstelle des Mikrotommessers montiert werden.

Sie bieten den Vorteil, dass die Verletzungsgefahr etwas geringer ist als bei herkömmlichen Mikrotommessern.



Außerdem sind die Klagen unempfindlicher und nicht so teuer, was sie auch für die Verwendung bei Präparaten mit vielen Kristallen oder andern harten Einschlüssen prädestiniert.

7

Pflege

Mikrotommesser müssen ebenso wie Rasierklagen vor jedem Schneiden auf einem Abziehbloc abgezogen werden. Damit aber das Profil der Klinge beim Abziehen nicht verloren geht MÜSSEN so genannte Abziehhülsen verwendet werden, in welche das Messer eingespannt wird.

Beim Abziehen selbst immer vorsichtig vorgehen damit es zu keinen Verkantungen des Messers am Anziehbloc kommt; das Messer immer mit dem Rücken voran über das Leder ziehen!!!!

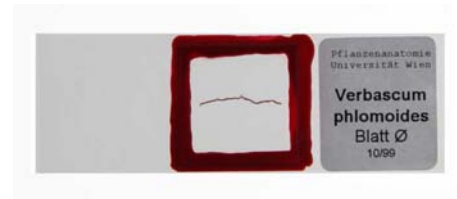
Nach jedem Gebrauch das Messer an der Unterseite von hinten nach vorne trocken wischen

7 <http://www.amuseum.de/physik/alwaze/Exponate/cut/micMesser1.jpg>

1.4.7 Dauerpräparat

Ein Dauerpräparat ist ein gefärbtes oder ungefärbtes mikroskopisches Präparat, welches zwischen Objektträger und Deckglas in einem speziellen Medium eingeschlossen und so für längere Zeit konserviert wird.

Gute Dauerpräparate halten oft jahrzehntelang, manche sogar über hundert Jahre. Daher sollte ein ordentliches Dauerpräparat auch richtig und vollständig beschriftet werden.



1.4.7.1 Herstellung

Dauerpräparate können von allen fixierten Präparaten oder getrockneten Ausstrichen hergestellt werden. Bei frischen Präparaten besteht zum einen die Gefahr dass sie durch Bakterien zerstört werden, zum anderen müssen die Präparate für die Herstellung von Kunstharz-Dauerpräparaten vollständig entwässert werden.

Dauerpräparate sind oft auch gefärbt um verschiedene Strukturen im Objekt unterscheiden zu können und auch um den Kontrast der oft dünnen und farblosen Schnitte zu verbessern.

Bei der Herstellung von Dauerpräparaten gibt es im wesentlichen 2 Möglichkeiten:

- Glyzerin-Dauerpräparate
- Kunstharz-Dauerpräparate

Fertige Kunstharz-Dauerpräparate können nach dem Aushärten des Eindeckmittels in Präparat-Kästen und Mappen waagrecht oder senkrecht gelagert werden.

Bei Glyzerin-Dauerpräparaten empfiehlt sich auch nach Trocknen des Einschlusslackes eine waagrechte Lagerung, da die Objekte sonst im Glyzerin verrutschen können.

Glyzerin-Dauerpräparat

Glyzerin ist die gebräuchliche Bezeichnung von Propantriol und stellt einen dreiwertigen Alkohol dar. Es findet als Feuchthaltemittel sehr vielseitige Anwendung in Kosmetik, Industrie und auch als Lebensmittelzusatzstoff.

Glyzerin ist ungiftig und wirkt konservierend und aufhellend, was es als Einschlussmedium in der Mikroskopie sehr interessant macht. Die in Glyzerin eingeschlossenen Objekte werden mit der Zeit etwas transparenter; daher ist allerdings eine Färbung von Glyzerin-Dauerpräparaten unbedingt notwendig. Ein weiterer Vorteil von Glyzerin ist seine Wasserlöslichkeit, daher müssen die Präparate vor dem Einschließen nicht unbedingt entwässert werden.

Zur Herstellung verwendet man mit (vergälltem) Alkohol gereinigte, staubfreie Objektträger!!!

- In die Mitte des Objektträgers einen kleinen, luftblasenfreien Tropfen eines Glycerin-Wasser Gemisches (1:1) geben und mit einer Präpariernadel das Präparat, möglichst ohne Wasser, darin platzieren und hinunterdrücken.
- Das gesäuberte Deckglas wird schräg auf den Objektträger aufgesetzt und mit Hilfe einer Präpariernadel lässt man das Deckglas vorsichtig auf das Glycerin gleiten. Dies soll den Einschluss von Luftblasen verhindern!!
- Wichtig ist, dass das Glycerin nicht unter dem Deckglas hervorquillt oder gar auf das Deckglas gelangt, da sonst der Einschlusslack nicht ordentlich abdichtet.
- Zum Schluss wird das Präparat mit Einschlusslack (Nagellack) versiegelt. Dazu zuerst die Ecken des Deckglases mit jeweils einen Tropfen Lack fixieren, erst danach die Kanten mit einem durchgehendem cirka 1,5 – 3 mm breitem Lack-Strich in einem Zug versiegeln.
- Das fertige Präparat gut trocknen lassen und auch dannach vorsichtig behandeln, damit die Lackschicht und somit die Versiegelung nicht beschädigt wird.



Glycerin-Dauerpräparat

Kunstharz-Dauerpräparat

Dauerpräparate mit Kunstharz sind im Vergleich zu Glycerin-Präparaten besser haltbar und wesentlich robuster. Obwohl die Herstellung zwar eine Entwässerung der Objekte erfordert, da die Einschlussharze wasserunverträglich sind, ist sie dennoch sehr einfach und schnell.

Vor dem Einschluss in das Kunstharz müssen die fixierten und eventuell auch gefärbten Präparate wie folgt **entwässert** werden:

30% Ethanol → 60% Ethanol* → 95% Ethanol* → Terpeniol – je ~3 Minuten
danach in NeoClear* (Xylol-Ersatz) darin können die Schnitte auch einige Zeit aufbewahrt werden.

* Schälchen mit diesen Substanzen abdecken – schädliche Dämpfe!!!

Um mehrere Schnitte gleichzeitig zu entwässern können diese in ein kleines Netz gelegt werden. Zwischen den einzelnen Entwässerungsschritten die Schnitte auf einem Stück Zellstoff kurz trockentupfen.

Die weiteren Schritte entsprechen im Wesentlichen denen zur Herstellung von Glycerinpräparaten, mit der Ausnahme, dass ein Versiegeln mit Einschluslack nicht notwendig ist.

- Die für das Dauerpräparat verwendeten Objektträger müssen zuvor wieder mit Alkohol gereinigt und trocken gerieben werden.
- Ein kleiner Tropfen Einschlussharz wird in die Mitte des Objektträgers gegeben und das entwässerte Objekt mit einer Präpariernadel darin platziert. Dabei immer darauf achten, dass sich keine Luftblasen bilden und diese gegebenenfalls mit einer Nadel aufstechen.
- Wie gehabt wird zuletzt das gesäuberte Deckglas schräg auf den Objektträger aufgesetzt und mit Hilfe einer Präpariernadel vorsichtig auf das Harz gelegt. Sobald das Harz mehr als die Hälfte des Deckglases bedeckt darf das Deckglas nicht mehr angehoben werden! Jetzt einfach die Nadel wegnehmen und das Harz verteilt sich durch das Gewicht des Deckglases von selbst.
- Zum Aushärten des Kunstharzes die Objektträger für mindestens 24 Stunden am besten aber für einige Tage in den Wärmeschrank legen.



Kunstharz-Dauerpräparat

1.4.7.2 Einschlussharze

Malinol ist ein Naturharz und besteht aus einem Gemisch verschiedener Harzsäuren. Sein Brechungsindex entspricht mit 1,52 annähernd dem von Glas, wodurch Lichtbrechungen beim Mikroskopieren vermieden werden.

Weitere Vorteile sind das ausgezeichnete Fließvermögen und die sehr gute Haftung am Glas. Kleine Luftblasen wandern während des Aushärtens zum Rand und verschwinden so.

Euparal besitzt mit 1,53 - 1,54 einen Brechungsindex nahe dem Idealwert. Die Präparate trocknen in der Regel innerhalb von 6 - 12 Stunden. Die Haltbarkeit bei säureempfindlichen Färbungen kann problematisch sein. Für Färbungen, die in schwach sauren Medien besser haltbar sind (zB Karminfärbungen) hat sich Euparal als günstiges Einschlußmittel erwiesen. Der beachtliche Schwund während des Trocknens kann durch Verwendung von eingedicktem Euparal reduziert werden.

DePeX ist als Schnelleinschlusmittel geeignet. Es besitzt ebenfalls einen für mikroskopische Zwecke günstigen Brechungsindex und ist außerdem völlig neutral, was eine nahezu unbegrenzte Haltbarkeit verspricht. Der Schwund während des Aushärtens ist zwar sehr gering, ein luftblasenfreies Einbetten ist dafür aber nur sehr schwer möglich.

1.4.7.3 Beschriftung

Bei einem Objektträger mit mattierter Schreibfläche kann dies auch mit einem schwarzen Fineliner erfolgen, ansonsten mittels zweier Etiketten.



Links vom Deckglas

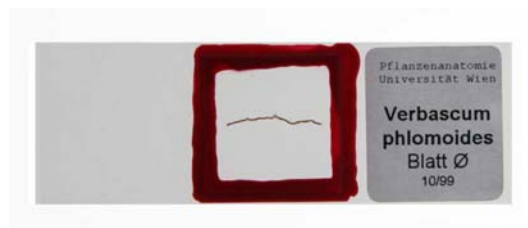
- Objektname (wiss. lateinischer Name)
- evtl. Fundort
- präparierter Teil
- evtl. zu sehende Strukturen

Rechts vom Deckglas

- eigener Name
- Datum der Herstellung
- evtl. Fixiermittel
Färbung
Einschlussmedium

Für eine kurze Beschriftung ist auch ein Etikett ausreichend. Diese muss auf jeden Fall enthalten:

- Objektname (wiss. lateinischer Name)
- präparierter Teil
- Datum



1.4.8 Fixierung

Unter Fixierung versteht die möglichst schonende Abtötung des Gewebes unter gleichzeitiger Erhaltung der Zellstruktur.

Die Fixierung eines Präparates kann aus vielen Gründen notwendig sein.

- Bewegung stoppen – Erhalten eines Zustandes
- fixierte Präparate zeigen eine stärkere Lichtbrechung und damit höheren Kontrast
- fixiertes Gewebe ist stabiler – Anfertigung von Schnitten
- Manche Färbungen sind ohne Fixierung nicht möglich
- Anfertigung eines Dauerpräparates

Methodisch kann unterschieden werden zwischen

physikalischer Fixierung: durch schnelles Einfrieren (Abkühlung von $10.000^{\circ}/\text{sec}$) um Eiskristallbildung zu vermeiden.

chemischer Fixierung: Moleküle der Zelle werden durch Chemikalien miteinander vernetzt

1.4.8.1 Probenvorbereitung

Um eine gute Fixierung zu erreichen, also ein schonendes Abtöten (Immobilisieren) der Zellen, ist sowohl die Wahl des Fixiermittels als auch die Probenvorbereitung ausschlaggebend.

- Präparate müssen vor der Fixierung voll turgeszent sein
- Fixiermittel muss möglichst schnell ins Gewebe eindringen und an die Zellen herankommen:
 - kleine Proben, möglichst $< 1 \text{ mm}^3$
 - Cuticeln oder dergleichen anstechen
 - Luft durch Anlegen von Unterdruck aus den Interzellularen und zwischen Haaren entfernen

1.4.8.2 physikalische Fixierung

Die Physikalische Fixierung erfolgt durch schnelles Einfrieren der Proben. Dabei müssen Abkühlraten von $10.000^{\circ}/\text{sec}$ erreicht werden, damit das Wasser in den Zellen zu einer amorphen Masse erstarrt.

Erfolgt die Abkühlung langsamer, so kommt es zur Eiskristallbildung im Präparat, was eine Zerstörung der Zellmembranen zur Folge hat → **Gefrierschäden**

Der Vorteil der Gefrierfixierung liegt in der extrem schnellen Abtötung der Zellen – Veränderungen während der Fixierung können so gut wie ausgeschlossen werden.

Verhindern von Gefrierschäden

- möglichst kleine Proben einfrieren
 - Wärme aus der Mitte des Präparates muss erst nach außen transportiert werden!!
- Einfrieren der Proben mit Gefrierschutzmittel
 - Gefrierpunktniedrigung durch Zugabe hoher Konzentrationen von Zucker oder Glycerin
 - keine Bildung von Eiskristallen, aber zahlreiche osmotische Effekte können auftreten.
- Verwendung eines möglichst kalten Mediums zum Einfrieren
 - zB flüssiger Stickstoff (-183°C) oder flüssiges Propan / Ethan / ...
 - Flüssiger Stickstoff wäre zwar kalt genug aber beim Eintauchen des Präparates bildet sich durch den verdampfenden Stickstoff eine isolierende Dampfschicht um das Präparat, welche die Abkühlung extrem verlangsamt (**Leidenfrost-Effekt**).
- „Slam-Freezing“
Die Probe wird auf eine durch flüssigen Stickstoff gekühlte Kupferplatte „geklatscht“
 - Verminderung des Leidenfrost-Effekts
- „Plunge-Freezing“
Die Proben werden über eine Vorrichtung extrem schnell in flüssiges Propan getaucht
 - Verminderung des Leidenfrost-Effekts, Reduktion der Eiskristallbildung
- „Jet-Freezing“
Flüssiges Propan wird von 2 Seiten und mit hohem Druck auf die Probe gespritzt
 - Verminderung des Leidenfrost-Effekts
- „High-Pressure-Freezing“
Das schnelle Einfrieren der Proben erfolgt unter einem Druck von über 2000 bar. Durch diesen starken Überdruck wird eine Volumenausdehnung der Probe durch Eiskristallwachstum während des Einfrierens verhindert.
 - ermöglicht das schadlose Einfrieren von dickeren Proben.

Weitere Probenbearbeitung

Das Problem der Eiskristallbildung entsteht auch beim Auftauen der Proben, was eine spezielle Behandlung von gefrierfixierten Proben erfordert. Im wesentlichen gibt es dabei 2 Möglichkeiten:

- Die Proben werden im gefrorenen Zustand mikroskopiert
 - dies erfordert allerdings spezielle Mikroskope mit gekühlten Objektstischen oder Kammern.
- Gefriersubstitution

Gefriersubstitution

Bei dieser Methode wird im gefrorenen Zustand das Wasser in den Zellen durch flüssiges Aceton ersetzt. Reines Aceton lässt sich auf -80°C abkühlen ohne zu gefrieren.

Die Proben werden nach der Gefrierfixierung in eine Aceton/Fixiermittel Mischung (zB Osmium) überführt. Während des langsamen Auftauens (schrittweise über mehrere Tage) löst das Aceton das Wasser aus den Zellen und das Fixiermittel sorgt gleichzeitig für eine Stabilisierung.

Die aufgetauten, fixierten Proben können nun ganz normal weiter behandelt werden.

1.4.8.3 Chemische Fixierung

Bei der Chemischen Fixierung werden die Moleküle einer Zelle durch Chemikalien miteinander vernetzt, dabei kann es allerdings noch zu Veränderungen in den Zellen kommen. Ein gutes Fixiermittel sollte daher folgende Eigenschaften besitzen:

- schnell eindringen
- schnell abtöten
- gut vernetzen und stabilisieren
- nichts beeinflussen
- keine Artefakte bilden

Grundsätzlich lassen sich **4 Gruppen von Fixiermitteln** unterscheiden:

- Alkohol + Essigsäure wirken Protein fällend
- Aldehyde binden an Aminogruppen
zB Formaldehyd, Glutaraldehyd, Akrolein
- starke Oxidationsmittel verbinden Lipide
zB Chromsäure, Kaliumpermanganat, Osmiumtetroxid
- Gerbstoffe binden an Aminogruppen und vernetzen Proteine

Meistens werden Mischungen mehrerer Fixiermittel verwendet um das Fixierergebnis zu optimieren. Die Menge des Fixiermittels muss in jedem Fall mindestens das 10x Probenvolumen betragen.

1.4.8.4 Chemische Fixiermittel

Auswaschen: vor Färbung oder Entwässerung muss das Fixiermittel vollständig mit Wasser oder Puffer ausgewaschen werden. Dauer 30 Minuten bis 12 Stunden.

Carnoy C

Anwendung: 3 - 6 T Ethanol 96%, 1 T Essigsäure

Fixierdauer: 1 h – 24 h

Auswaschen mit Ethanol, 96 %

Verwendung: Anatomische Präparate

Anmerkung: Für schrumpfungsempfindliche Objekte können 3 T Chloroform zugesetzt werden. Essigsäure kann durch Propionsäure ersetzt werden

Chromsäuremischungen

Anwendung: 1 % Chromsäure (**Giftig!**) in H₂O,
bei leicht schrumpfenden Objekten in ~ 1 % Essigsäure

Fixierdauer: 1 Min – 24 h

Auswaschen in H₂O

Verwendung: Universell, aber oft schlechte Färbbarkeit

Anmerkung: Für besonders hohe Fixierqualitäten sind auch Chromsäure-Essigsäure-Formaldehyd-Mischungen gebräuchlich.

Kaliumpermanganat

Anwendung: Eventuell zunächst Infiltration mit Pufferlösung
2 % – 5 % KMnO₄ in Wasser oder Puffer

Fixierdauer: 5 Min – 2h, Auswaschen mit H₂O oder Pufferlösung

Verwendung: Guter Erhalt von Membransystemen, auch in der Elektronenmikroskopie

Pfeiffers Gemisch

Anwendung: 1 T Essigsäure, 1 T Formaldehyd 37 %, 1 T Methanol

Fixierdauer: 30 Min – 24 h, auch zur längeren Aufbewahrung

Auswaschen : mit H₂O, Ethanol 40 % oder Glyzerin 10 %

Verwendung: v. a. für niedere Pflanzen und embryologische Präparate

Aldehydmischungen

Anwendung: Eventuell zunächst Infiltration mit Pufferlösung

2 % – 5 % Glutaraldehyd oder Formaldehyd oder beides zusammen in H₂O oder Puffer

Fixierdauer: 1 h, eventuell durch Eis auf 0° C kühlen

Auswaschen mit H₂O oder Pufferlösung

Verwendung: Universell, auch in der Elektronenmikroskopie

Anmerkung: Für derbe Objekte wird auch der sehr schnell eindringende Aldehyd Acrolein (**Giftig!**) nach dem gleichen Rezept verwendet.

Pikrinsäure-Formaldehyd

Anwendung: 10 ml Formaldehyd 40%, 56 ml Ethanol (100%), 0,18 g NaCl,
0,15 g Pikrinsäure (explosiv!), 34 ml destilliertes Wasser.
bei schrumpfungsempfindlichen Objekten bis zu 5% Essigsäure.
Fixierdauer: > 1 h, Auswaschen mit H₂O oder 50% Ethanol
Verwendung: vor allem in der Zytochemie

Osmiumtetroxid

Anwendung: Vorfixierung mit einer gepufferten Aldehydmischung
1 % OsO₄ (**Giftig!**) in Puffer
Fixierdauer: 1 h bei Raumtemperatur, 12 h bei 4° C (weniger störende Ausfälle)
Auswaschen: mit Pufferlösung
Verwendung: Für Elektronenmikroskopie oder höchste Ansprüche in der Lichtmikroskopie
Anmerkung: Für das Lichtmikroskop sind auch Osmiumtetroxid-Cromsäure-Essigsäuremischungen
ohne Vorfixierung in Verwendung.

1.4.8.5 Fixierpuffer

saure Fixierlösungen	gute Fixierung der Zellkerne
basische Fixierlösungen	Cytoplasma und Organellen bleiben erhalten allerdings meist schlechte Färbbarkeit der Präparate

Zytoskelettstabilisierender - Fixierpuffer

1,4-Piperazindiethansulfonsäure [100 mMol l⁻¹]
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure [10 mMol l⁻¹]
MgSO₄ [5 mMol l⁻¹]
Mit KOH auf pH 7 einstellen
Anmerkung: Stabilisiert das Zytoskelett;

Cacodylatpuffer

50 mM Cacodylsäure in H₂O, mit HCl oder NaOH auf pH 7,2 einstellen
Cacodylsäure (Giftig!): C₂H₆AsNaO₂

Anmerkung: für geringere Ansprüche reicht Natriumphosphatpuffer oder Barbituratpuffer.

!!!! Fixiermittelabfall muss gesondert als Chemikalienabfall entsorgt werden !!!!

1.4.9 Literatur

Braune W., Leman A., Taubert H.: Pflanzenanatomisches Praktikum II. Einführung in den Bau, das Fortpflanzungsgeschehen und die Ontogenie der niederen Pflanzen und die Embryologie der Spermatophyta. Gustav Fischer Verlag; Jena; 1982

Plattner H., Zingsheim H. P.: Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Ein kritischer Leitfaden zur biologischen Ultrastrukturforschung für Biologen und Mediziner. Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, New York; 1987

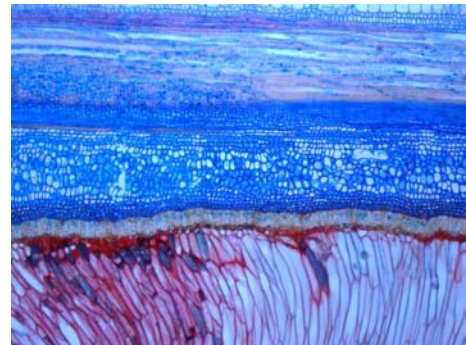
D. Gerlach (1977): Botanische Mikrotechnik. Thieme, Stuttgart. 311 pp.

1.5 Färbung und Farbstoffe

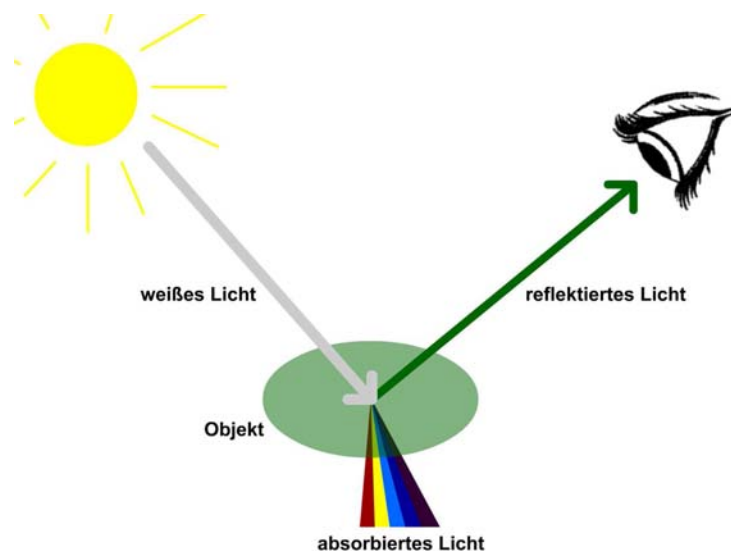
Durch das Färben können bestimmte Zell- und Gewebestrukturen deutlich sichtbar gemacht und exakt und kontrastreich abgegrenzt werden.

Voraussetzung dafür ist, dass sich die Farbstoffe aufgrund von chemischen oder physikalischen Faktoren selektiv in Zellen oder Strukturen anreichern.

Dadurch lassen sich oft schon auf den ersten Blick Strukturen unterscheiden, die sonst kaum wahrnehmbar wären.



Objekte erscheinen gefärbt, weil sie einen Teil des sichtbaren, weißen Lichtes absorbieren. Als Farbe nehmen wir das vom Objekt reflektierte Licht wahr. Welche Wellenlängen vom Präparat absorbiert werden und wie gefärbt wir es wahrnehmen hängt von den Farbstoffen ab, die darin enthalten sind.



1.5.1 Farbstoffe

Die meisten Farbstoffe werden aufgrund von chemischen oder physikalischen Eigenschaften selektiv in Zellen oder Strukturen angereichert.

In Farbstoffen liegen die färbenden Substanzen meist als Ionen vor. Trägt nun dieser Farbstoff eine positive Ladung, wird er als kationisch oder **basisch** bezeichnet. Ist das Farbstoff tragende Ion ein Anion, also negativ geladen, so spricht man von einem anionischen oder **sauren** Farbstoff. Abhängig vom pH Wert des Mediums sind die Farbstoffe dissoziiert oder undissoziiert.

1.5.1.1 Mechanismen der Farbstoffbindung

Farbstoffe können durch mehrere Mechanismen sehr selektiv an Strukturen im Präparat binden.

elektrostatische Bindung

Durch elektrischen Ladungen werden Farbstoffe an entgegengesetzt geladene Zellkomponenten gebunden (zB Adsorption von kationischen Farbstoffen an der Zellwand).

Ionenfalle: Beispiel: Ein Farbstoff liegt bei neutralem pH-Wert undissoziiert vor; so kann er durch Membranen und das Cytoplasma diffundieren. Gelangt der Farbstoff in saure Kompartimente, dann dissoziiert er und kann in diesem Zustand nicht mehr durch die Membran zurück
→ es erfolgt eine Anreicherung des Farbstoffes in diesen Kompartimenten

chemische Bindung

Die Farbstoffe gehen eine chemische Bindung mit bestimmten Molekülen des Präparates ein.
→ sehr feste Bindung

Komplexbildung

1. Erst durch eine Komplexbildung zwischen Farbstoff und bestimmten Zellkomponenten kommt es zu einer Farbreaktion.
2. Durch die Bildung von Komplexen entstehen meist unlösliche Niederschläge.

Löslichkeit

Lipophile und hydrophile Farbstoffe reichern sich nach ihrer Löslichkeit in unterschiedlichen Kompartimenten an.

Teilchengröße

Auf Grund ihrer Größe bleiben die Farbstoffteilchen in Hohlräumen stecken.

1.5.1.2 Einteilung der Farbstoffe

primäre Farbstoffe oder natürliche Farbstoffe

sind von Natur aus in den Zellen enthalten (Chlorophyll, Hämoglobin, Anthocyane, ...)

sekundäre Farbstoffe

werden dem Objekt künstlich durch Färbung zugeführt.

Als Sekundäre Farbstoffe können sowohl natürliche Farbstoffe wie zum Beispiel Safranin verwendet werden als auch synthetisch hergestellte **künstliche Farbstoffe**.

Vital-Farbstoffe

Bezeichnung für ALLE Farbstoffe die für lebende Zellen verwendet werden können

Hellfeld-Farbstoffe (Diachrome)

Diese Farbstoffe absorbieren einen Teil des sichtbaren Lichts und erscheinen damit im Mikroskop bei der Beleuchtung mit weißem Licht (Hellfeld) färbig.

Sie können auch natürlich im Gewebe vorkommen (zB Chlorophyll, Hämoglobin oder Anthocyan)

Fluoreszenz-Farbstoffe (Fluorochrome)

Fluoreszenzfarbstoffe haben die besondere Eigenschaft, Licht nicht nur wie die Hellfeld-Farbstoffe zu absorbieren, sondern sie senden einen Teil des absorbierten Lichts auch wieder als Licht zurück.

1.5.1.3 Hellfeld-Farbstoffe

Diese Farbstoffe absorbieren einen Teil des sichtbaren Lichts und erscheinen damit im Mikroskop bei der Beleuchtung mit weißem Licht (Hellfeld) färbig.

Sie können natürlich im Gewebe vorkommen (zB Chlorophyll, Hämoglobin oder Anthocyan) oder durch Färbung zugeführt werden.

Mit einigen Hellfeld-Farbstoffen können auch lebende Zellen gefärbt werden (Vitalfarbstoffe); hier ist die Färbung aber meistens nur sehr schwach und die Analyse erfordert viel Geduld und ein gutes Auge. Um eine stärkere Färbung zu erreichen muss die Farbstoffkonzentration meist schon so hoch sein, dass sie für die Zellen toxisch wird.

Für die meisten Hellfeld-Farbstoffe ist eine vorhergehende Fixierung der Zellen notwendig. Außerdem kann bei fixierten Zellen mit einer höheren Farbstoffkonzentrationen gearbeitet werden; dadurch erhält man mit diesen Farbstoffen eine intensive Färbung des Präparates.

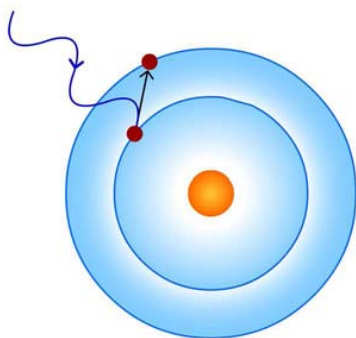
Beispiele:

- | | |
|--|--|
| • Safranin, Auramin, Gentianaviolett, Malachitgrün | für verholzte Zellwände |
| • Astrablau, Anilinblau, Mucicarmin, Eosin, | für unverholzte Zellwände |
| • Neutralrot | Ionenfallen-Farbstoff
für saure Kompartimente |

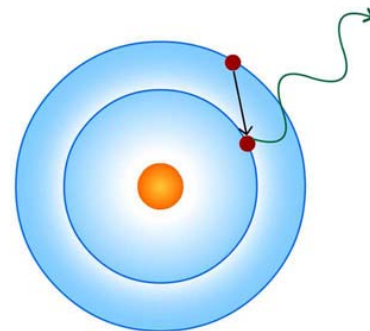
1.5.1.4 Fluoreszenz-Farbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe haben die besondere Eigenschaft, Licht nicht nur wie die Hellfeld-Farbstoffe zu absorbieren, sondern sie senden einen Teil des absorbierten Lichts auch wieder als Licht zurück.

Trifft ein Lichtstrahl bestimmter Wellenlänge auf dieses Farbstoffmolekül so kommt es zur Absorption des Lichtstrahls und damit zur **Anregung** eines Elektrons, welches dabei in eine höhere Schale gehoben wird. Fällt das Elektron aus diesem instabilen Zustand auf seinen ursprünglichen Niveaue zurück so gibt es die absorbierte Energie in Form von Wärme und Licht wieder ab.



Anregung eines Elektrons



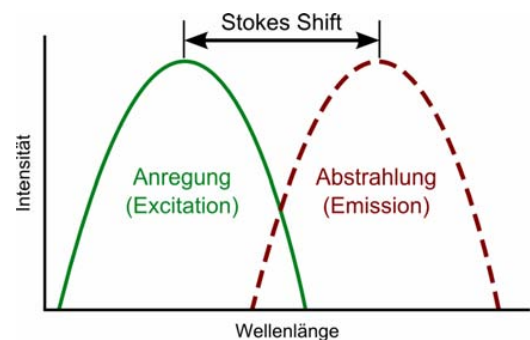
Abgabe von Fluoreszenzlicht

Durch lange und/oder sehr intensives Anregungslicht nimmt die Intensität der Fluoreszenz ab, dieser Prozess wird als „ausbleichen“ oder „*photobleaching*“ bezeichnet.

Stokes Shift

Da ein Teil der absorbierten Lichtenergie als Wärme verloren geht ist das abgestrahlte Licht immer längerwelliger und damit energieärmer als das eingestrahle Licht.

Aufgrund dieses Phänomens leuchten die gefärbten Strukturen sozusagen von selbst, was im Mikroskop einen starken Kontrast zum dunklen Hintergrund ergibt. Daher ist die verwendete Farbstoffkonzentration bei Fluoreszenz-Farbstoffen sehr gering und damit auch oft sehr schonend für die Zellen.



Bindung an Antibodies

Eine Möglichkeit eine sehr selektive Färbung von bestimmten Proteinen zu erreichen ist die Verwendung von selektiven Antikörpern (*Antibodies*). Bei dieser Methode werden Antikörper gegen das gewünschte Protein erzeugt (in Ratten, Ziegen oder Mäusen) und diese dann mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt.

Vorteil: selektive Anfärbung spezieller Proteine

Nachteil: nur bei fixierten Zellen möglich,
→Antikörper können nicht durch die Plasmamembran diffundieren.

Green Fluorescent Protein (GFP)

Das „*Green Fluorescent Protein*“ (grün fluoreszierende Protein) ist ein erstmals 1961 von Osamu Shimomura beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*.

Seine große Bedeutung liegt darin, dass es mit dem Gen eines anderen Proteins fusioniert und in die DNA jeder beliebigen Zelle eingebaut werden kann; synthetisiert nun die Zelle das gewünschte Protein, so wird automatisch ein GFP-Protein daran angehängt.

Vorteil: Durch die grüne Fluoreszenz des GFP (Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht) kann die räumliche und zeitliche Verteilung des gewünschten Proteins in lebenden Zellen und Organismen direkt analysiert werden

Nachteil: die Überexpremierung des Ziel-Proteins kann möglicherweise zu Anomalien im Zellgeschehen führen

1.5.2 Färbemethoden

Vitalfärbung: Färbungen werden am lebenden Objekt durchgeführt
wichtig für physiologische Untersuchungen

Färbung toter, fixierter Gewebe: ist unumgänglich wenn etwa Schnitte angefertigt werden müssen oder der Farbstoff in lebende Zellen nicht eindringen kann (zB. durch: semipermeable Membran, dicke Zellwand oder impermeable Cuticula).

Schnittfärbung: Objekt wird zuerst geschnitten und dann die Schnitte gefärbt

Stückfärbung: Das Präparat wird schon vor dem Schneiden gefärbt

Transpirationsmethode: Die Pflanze wird direkt in den Farbstoff gesetzt, so dass dieser mit dem Transpirationsstrom aufgenommen werden kann (ähnlich wie Blumen in einer Vase)
→ Messung von Phloemströmen, etc.

Injektionsmethode: der Farbstoff wird direkt in eine Zelle injiziert
→ Analyse wo der Farbstoff eingebaut wird

Immersionsmethode: das Präparat wird in eine Farbstofflösung eingelegt und anschließend ausgewaschen

Progressive Färbung:	Einwirken des Farbstoffes bis der gewünschte Effekt eintritt → nur geringe Farbstoffkonzentration notwendig
Regressive Färbung:	Einlegen in stark konzentrierte Farbstofflösung → dabei wird alles angefärbt → durch Einlegen in Differenzierungsgemisch wird der Farbstoff dort herausgewaschen wo er nicht gut bindet, also von den Strukturen die er nicht färben soll

Einfach-Färbung: es wird nur mit einem Farbstoff gefärbt

Mehrfach-Färbung: dabei wird das Präparat mit mehreren Farbstoffen behandelt

- Simultane Färbung
die Farbstoffe werden als Mischung gleichzeitig aufgetragen
- Sukzedane Färbung
die Farbstoffe werden einzeln und hintereinander aufgetragen.
→ erzielt schönere Ergebnisse als die simultane Färbung

1.5.3 Färbungen und Nachweise

Im täglichen Umgang mit Nachweisreaktionen haben sich die folgenden Färbemethoden als erfolgreich und leicht anwendbar erwiesen. Für genauer Hinweise oder weitere Methoden siehe weiterführende Literatur.

Übersichtsfärbung mit Alizidinviridin (Kerne, Nucleoli, Plasma, Chloroplasten, Pyrenoide)

Fixierung in Chromsäure, 1%, 5 Minuten
Auswaschen in destilliertem Wasser
Einlegen in Alizidinviridin-Chromalaun
Auswaschen in destilliertem Wasser

→ Kerne, Nucleoli, Cytoplasma, Chloroplasten und Pyrenoide in abgestuften Grüntönen

Methylenblaufärbung nach Löffler (Kerne und Plasma / Bakterienfärbung)

Stammlösung: 2g Methylenblau in 100ml 70% Ethanol
Färbelösung: 30 ml Stammlösung
69 ml destilliertes Wasser
1 ml 1% NaOH

etwa 10 – 15 Minuten färben, anschließend auswaschen.

→ Blaufärbung von Kernen und proteinreichen Plasmabereichen

Doppelfärbung mit Safranin-Astrablau (verholzte / unverholzte Zellwände von Pflanzen)

Herstellung eines Handschnittes
Fixierung in Carnoy C, 5 Minuten
(Alternativ: Verwendung eines entparaffinierten Mikrotomschnittes)
Ohne Auswaschen einlegen in Safranin, 1%, in 50% Ethanol
Differenzieren in 70% Ethanol
(Bei Bedarf: absteigende Ethanolreihe)
Auswaschen in destilliertem Wasser
Einlegen in Astrablau, 2%, in 0,5% Weinsäure in Wasser
Auswaschen in destilliertem Wasser

→ verholzte Zellwände rot, unverholzte Zellulosewände blau

Karmin-Essigsäure-Färbung (Chromosomen)

Fixieren mit Carnoy C
Ohne Auswaschen in Karminessigsäure einlegen (im Idealfall mehrere Tage)
Erwärmen im siedenden Wasserbad (~1h)
Bei zu starker Erwärmung bilden sich störende Ausfällungen!!!!
Bei Bedarf: Quetschen

→ Rotfärbung der Chromosomen

Proteinnachweis mittels Xanthoproteinreaktion

Entlüftung
Fixierung in Carnoy C, 5 Minuten
Farbstoffextraktion in warmem Ethanol, 70%, bis Objekt farblos
Auswaschen des Ethanols in destilliertem Wasser
Einlegen in 50% Salpetersäure, 5 Minuten; Proteine werden blaßgelb
Auswaschen in destilliertem Wasser
Einlegen in 10% Ammoniak; Färbung wird intensiver

→ Nachweisreaktion für aromatische Aminosäuren in Proteinen

1.5.4 Literatur

Gerlach D. (1977): Botanische Mikrotechnik. Thieme, Stuttgart. 311 pp.

Jensen, W. A. (1962): Botanical Histochemistry. Principles and Practice. Freeman, San Francisco. 408 pp.

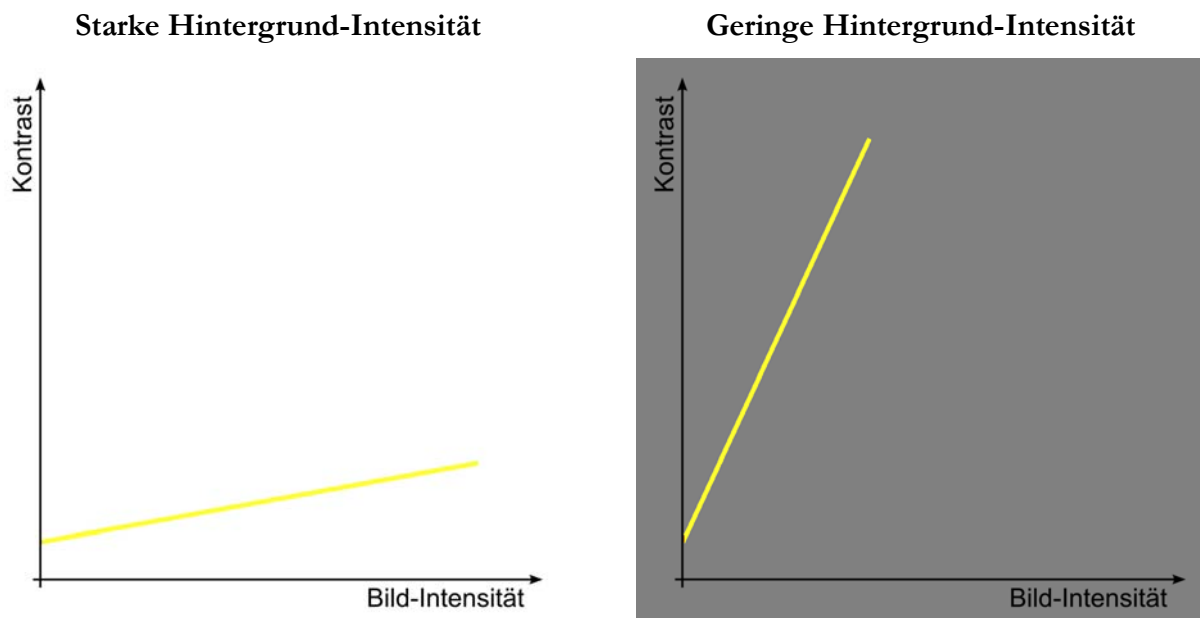
2 Kontrastverfahren

Kontrast (C) ist das Intensitäts- oder Helligkeits-Verhältnis von zwei Bereichen eines Bildes, zum Beispiel der Helligkeitsunterschied zwischen der aufgelösten Struktur ($I_S = \text{Structure}$) und dem Hintergrund ($I_B = \text{Background}$).

$$C = ((I_S - I_B) \times 100) / I_B$$

Um vor einem sehr hellen Hintergrund eine geringe Kontraststeigerung zu erhalten, muss die Intensität der Struktur massiv erhöht werden; eine Unterscheidung vom Untergrund ist nur sehr schwer möglich. Bei dunklem Hintergrund hingegen bewirkt eine geringfügige Erhöhung der Struktur-Intensität eine massive Steigerung des Kontrastes. Man kann die Struktur klar und deutlich sehen.

Die folgenden Grafiken zeigen den Kontrast als eine Abhängigkeit von der Intensität des Hintergrunds.



Auch bei bester Auflösung ist ein Objekt NUR mit ausreichend Kontrast sichtbar.

Kontrasterzeugung durch:

- | | |
|-----------------------|---|
| • Absorption: | Hellfeld, UV-Mikroskopie, Färbung mit Hellfeldfarbstoffen |
| • Lichtbrechung: | Hellfeld, Dunkelfeld |
| • Phasenverschiebung: | Phasenkontrast, Polarisierung, DIC |
| • Lichtreflexion: | Auflichtmikroskopie |
| • Leuchtendes Objekt: | Fluoreszenz |

2.1 Hellfeld

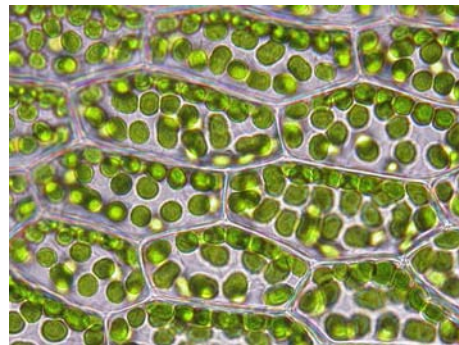
Die Hellfeldmikroskopie ist die einfachste und grundlegendste Methode im Lichtmikroskop. Dabei wird das Präparat von unten durch einen Lichtkegel beleuchtet.

Befindet sich kein Objekt im Strahlengang, so treffen die Lichtstrahlen ungestört ins Objektiv und man erhält ein gleichmäßig helles Bild.

Durch ein Präparat werden Lichtstrahlen bestimmter Wellenlängen absorbiert und dadurch die Amplitude der durch tretenden Lichtstrahlen verringert; man erhält ein farbiges und dunklers Objekt vor einem hellen Hintergrund.



gleichmäßig helles Bildfeld



Moosblättchen im Hellfeld

2.1.1 Erstes Einstellen eines Präparates

- Kondensor mit dem Kondensortrieb ganz nach oben drehen und so in eine Position direkt unter dem Objekt bringen.
- Aperturblende weit öffnen und das Präparat bei einer kleinen Vergrößerung im Strahlengang positionieren.
- Aperturblende schließen und das Präparat mit dem **GROBTRIEB** scharfstellen.
- Aperturblende soweit öffnen, dass keine Beugungs-säume mehr auftreten aber noch genug Kontrast vorhanden ist.
- Ab einer Vergrößerung von 20x NUR mehr mit dem **FEINTRIEB** arbeiten!!!
- Vor dem Entfernen des Präparates IMMER auf eine kleine Vergrößerung gehen!!!

2.1.2 Köhlersche Beleuchtung

Durch die Köhlersche Beleuchtungsanordnung erreicht man ein gleichmäßig ausgeleuchtetes Bildfeld ohne die Abbildung der Lichtquelle in der Präparatebene. Zusätzlich wird durch das Zentrieren von Kondensator oder Lichtquelle eine maximale Lichtausbeute erreicht, was besonders für die Kontrastverfahren von großer Bedeutung ist.

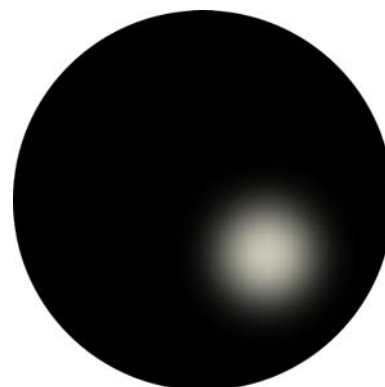
Für gute Ergebnisse in der Mikroskopie muss daher die Köhlersche Beleuchtungsanordnung vor jedem Arbeiten am Mikroskop eingestellt werden!!!!!!

2.1.2.1 Einstellen der Köhlerschen Beleuchtung

Zuerst wird der Kondensator mit dem Kondensortrieb ganz nach oben gedreht und so in eine Position direkt unter dem Objektisch gebracht. Mit dieser Kondensatorposition wird nun im Hellfeld ein Präparat scharf gestellt.

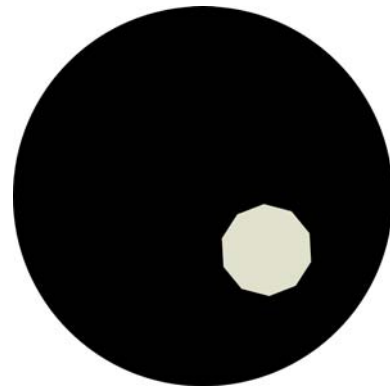


Im zweiten Schritt wird die Feldblende im Fuß des Mikroskops geschlossen, so dass die Blende beim Blick ins Mikroskop als Punkt zu sehen ist, der häufig unscharf ist. Sollte kein leuchtender Kreis zu sehen sein, so befindet sich das Zentrum der Leuchtfeldblende außerhalb des Bildfeldes und muss durch Verstellen der Zentrierschrauben am Kondensator (bzw durch Bewegen des Kollektors) ins Bildfeld gebracht werden.



Nun wird der Kondensor in der Höhe so verstellt, dass der Rand der Leuchtblende scharf abgebildet wird. Oft ist dies auch mit einem Umschlag der Farbsäume von rot auf blau verbunden.

Bei einigen Mikroskopen kann der Kondensor allerdings auch über die Objektträgerebene hinaus angehoben werden; hier ist also besondere Vorsicht geboten um eine Kollision zu vermeiden.



Mit den Zentrierschrauben am Kondensor (bzw durch Bewegen des Kollektors) das Bild der Leuchtblende in die Mitte des Bildfeldes bringen.



Zuletzt wird die Leuchtblende wieder so weit geöffnet, dass gerade das gesamte Bildfeld ausgeleuchtet ist. Wenn notwendig kann hier noch leicht nachzentriert werden.



Die Einstellungen der Köhlerschen Beleuchtung sollten nach jedem Objektivwechsel kontrolliert werden. Geübte Mikroskopiker greifen nach einem Objektivwechsel wie von selbst zur Leuchtblende und zur Aperturblende um die Köhlersche Beleuchtung und den Kontrast nachzustellen.

2.1.3 Kontrasterzeugung im Hellfeld

- Durch **Absorption von Lichtstrahlen** durch das Objekt.
- Durch das Ausblenden des Streulichtes (Schließen der Aperturblende) wird die **Hintergrundintensität reduziert** und so der Helligkeitsunterschied zwischen Präparat und Hintergrund vergrößert.

Beim Schließen der Aperturblende im Kondensator oder im Objektiv wird die numerische Apertur verringert und es kommt zu einer **Vergrößerung der Beugungsscheibchen** (siehe unten).

Dies führt zwar zu einem Verlust an Auflösung, da die nahe beisammenliegenden Strukturen miteinander verschmelzen. Man erhält damit aber größere Strukturen, die weiter von einander entfernt sind und daher einen höheren Kontrast geben.

2.1.3.1 Kontrast und Auflösung im konventionellen Hellfeld

Bei **voll geöffneter Aperturblende**, sind die Strukturen **maximal aufgelöst**. Vor allem bei biologischen Objekten haben sie aber oft nur sehr **geringen Absorptionskontrast**.

Die Strukturen sind kaum vom hellen Hintergrund zu unterscheiden und daher nicht sichtbar, obwohl die Airy Discs genügend Abstand zueinander haben.

Beispiel:

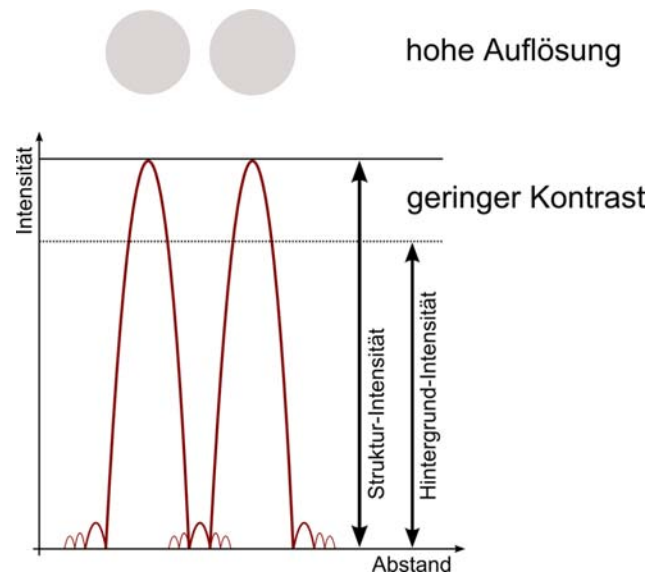
Struktur-Intensität = 25

Hintergrund-Intensität = 20

Intensitätsunterschied ($I_s - I_B$) = 5

$$C = 5 \times 100 / 20$$

$$C = 25$$



In der konventionellen Mikroskopie erhöht man den Kontrast am einfachsten durch **Schließen der Aperturblende** (Kontrastblende).

Mit dem Schließen der Aperturblende wird die numerische Apertur verkleinert, dabei wird das Bild dunkler, die Strukturen gewinnen an **Kontrast**. Gleichzeitig führt die kleinere Apertur aber zum **Verlust von Auflösung**, da die Airy Discs einen größeren Durchmesser bekommen und einander überlappen.

Beispiel:

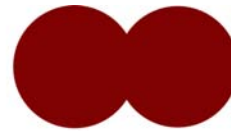
Struktur-Intensität = 15

Hintergrund-Intensität = 10

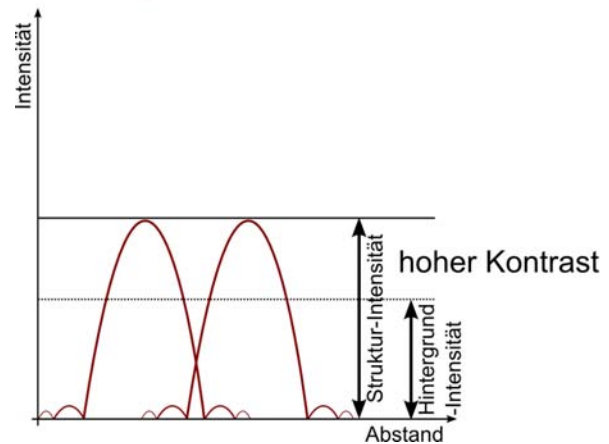
Intensitätsunterschied ($I_s - I_B$) = 5

$$C = 5 \times 100 / 10$$

$$C = 50$$



geringe Auflösung

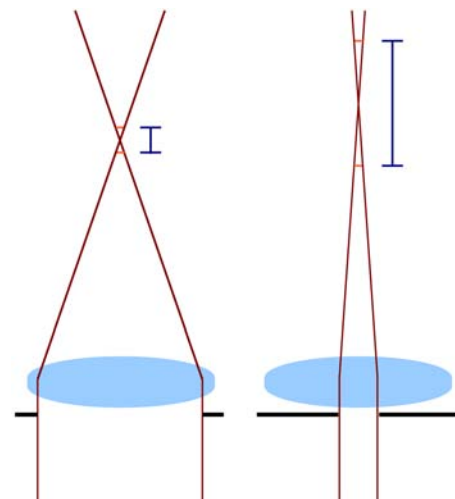


2.1.4 Schärfentiefe

In der geometrischen Optik werden Bildpunkte nur in der exakten Bildweite scharf abgebildet.

Der von der Linse ausgehende Lichtkörper ist kegelförmig, daher wird mit zunehmender Entfernungen von der Bildebene aus jedem scharf abgebildetem Bildpunkt ein immer größeres unscharfes Scheibchen. Diese Scheibchen werden als **Unschärfekreise** bezeichnet.

Der Übergang vom Punkt zu Scheibchen ist fließend, und irgendwo dazwischen befindet sich die Grenze zwischen dem was noch als scharf und dem was schon als unscharf wahrgenommen wird. Wie groß dieser Bereich ist, hängt vom Winkel des Lichtkegels ab.

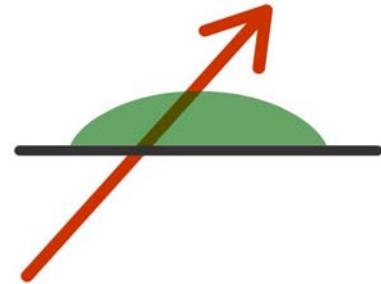


— Unschärfekreis
I Schärfentiefe

- Bei sehr **engem Lichtkegel**, zB bei geschlossener Kondensor- oder Objektiv-Blende, ist der Bereich in dem die Unschärfekreise noch scharf erscheinen sehr groß. Daraus resultiert eine **hohe Schärfentiefe**.
- Bei einem sehr **breiten Lichtkegel** erreichen die Unschärfekreise sehr schnell die maximale Größe und man erhält daher nur eine sehr **geringe Schärfentiefe**.

2.1.5 Schiefe Beleuchtung

Bei dieser Methode wird das Präparat nicht gleichmäßig und von allen Seiten beleuchtet, sondern der Lichtstrahl trifft nur von einer Seite her auf das Objekt. Das Objekt erscheint dadurch plastischer als im herkömmlichen Hellfeld.



Das Bild ist ähnlich einem Interferenzkontrastbild; somit ist diese Schrägbeleuchtung eine sehr einfache und billige Methode zur Erzeugung eines räumlichen Eindrucks.

Besonders geeignet ist dieses Verfahren für durchsichtige / transparente Objekte. Bei gefärbten und undurchsichtigen Präparaten kann es zu starker Schattenbildung kommen.

Aus wissenschaftlicher Sicht ist aber zu beachten, dass die Beobachtungen mit schiefer Beleuchtung nur schwer reproduzierbar sind, was auch in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte!!!



Hellfeld



Schiefe Beleuchtung

2.1.5.1 Technische Voraussetzungen

Kondensator mit beweglicher Aperturblende

Am einfachsten lässt sich eine schiefe Beleuchtung mit einer beweglichen Aperturblende erzeugen. Dazu wird die Blende einfach soweit dezentriert, dass die Beleuchtung nur mehr von einer Seite erfolgt.

Kondensoren mit einer beweglichen Aperturblende finden sich meist nur mehr auf älteren Mikroskopen. Bei neueren Modellen ist sie in der Regel fix am Kondensator montiert. In diesem Fall ist die Variante mit Sektorenblenden zu wählen.



1

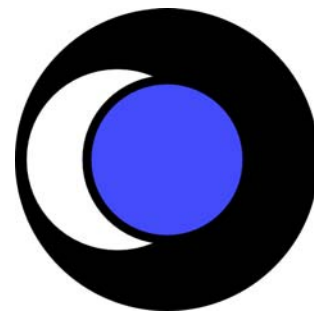
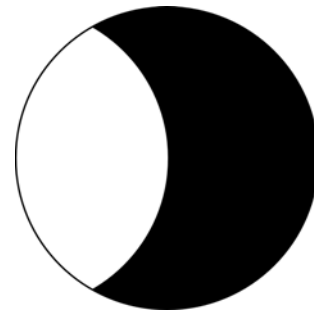
1 <http://www.archaeometrielabor.com/Bilder/pdf/Mikroskopie/mikroskopische%20Verfahren%2001.pdf>

Sektorenblende

Besitzt das verwendete Mikroskop keine bewegliche Aperturblende, kann man eine Sektorenblende verwenden. Diese besteht aus einer schwarzen Scheibe mit einer seitlichen Aussparung zum Lichtdurchtritt.

Die verbesserte Variante einer Sektorenblende für die schiefe Beleuchtung besitzt in der Mitte eine zusätzliche runde Öffnung, die mit einem farbigen Filter versehen ist. Durch diese zentrale farbige Beleuchtung erreicht man ein gleichmäßiger ausgeleuchtetes Bildfeld und einen schöneren plastischen Effekt bei transparenten Objekten.

Diese Sektorenblenden lassen sich einfach auf Overhead Folie aufdrucken und in den Filterhalter des Kondensors einlegen.



Sektorenblenden für Schrägbeleuchtung



Filterhalter am Kondensor

2.2 Dunkelfeld

Im Hellfeld erhält man den Kontrast hauptsächlich auf Grund der Absorption von Lichtstrahlen durch das meist gefärbte Präparat.

Bei transparenten und sehr dünnen Präparaten oder Strukturen ist das Hellfeld oft nicht sehr brauchbar, da von diesen Objekten kaum Licht absorbiert wird. Für derartige Objekte kann man Methoden wie Phasenkontrast oder Dunkelfeld anwenden.

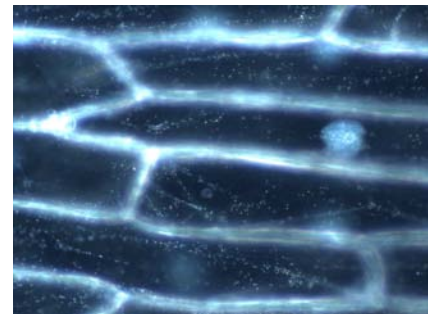


transparentes Präparat im Hellfeld

2.2.1 Prinzip

Bei transparenten ungefärbten Präparaten kommt es, wie bei allen Präparaten, auch zu einer Lichtbrechung an Phasengrenzen, also an Grenzen zwischen unterschiedlich dichten Strukturen.

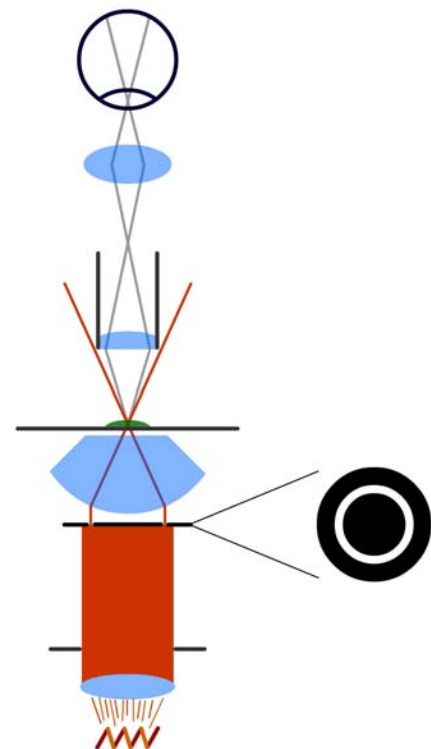
An diesen Grenzen wird das Licht so gebrochen, dass es seine Richtung ändert; dieses Prinzip nutzt man im Dunkelfeld um **Phasengrenzen** sichtbar zu machen.



transparentes Präparat im Dunkelfeld

Dazu beleuchtet man das Präparat mit einem Hohlkegel, der so breit ist, dass kein direktes Licht vom Kondensator in das Objektiv gelangt. Befindet sich kein Präparat im Lichtstrahl erhält man ein einheitlich schwarzes Bild.

Durch Lichtbrechung an Phasengrenzen innerhalb des Präparates ändern die Lichtstrahlen ihre Richtung und treffen ins Objektiv. Man sieht diese Strukturen dann auf schwarzem Hintergrund hell aufleuchten.



Dunkelfeld - Schematischer Verlauf des Lichts

In der Dunkelfeld-Mikroskopie können auch Strukturen unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops sichtbar gemacht werden. Dabei wird aber nicht die Auflösung verbessert sondern lediglich das Vorhandensein von sehr kleinen Strukturen durch ein Aufleuchten nachgewiesen. Für diese so genannte „Selbstleuchter“ gilt nämlich die Abbe'sche Formel für die Auflösung nicht!

Aus diesem Grund ist es sehr schwierig festzustellen wie groß im Dunkelfeld sichtbare Strukturen wirklich sind, da sie größer abgebildet werden als sie wirklich sind!

2.2.2 Technische Voraussetzungen

Für das Dunkelfeld ist ein breiter Hohlkegel zur Beleuchtung des Präparates notwendig. Um diesen Hohlkegel zu erzeugen gibt es mehrere Möglichkeiten:

- Schwarzscheibe / zentrale Blende im Kondensator
- spezielle Dunkelfeldkondensoren

2.2.2.1 Schwarzscheibe / zentrale Blende

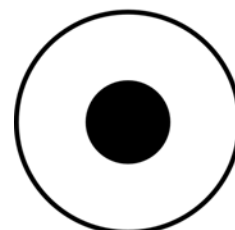
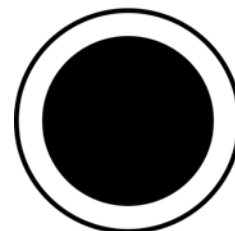
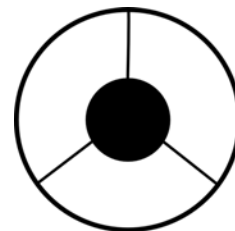
Die einfachste Methode einen Hohlkegel für die Dunkelfeldmikroskopie zu erzeugen ist die Verwendung einer zentralen Blende bei einem herkömmlichen Hellfeldkondensator.

Dazu wird unterhalb des Kondensators eine schwarze Scheibe in den Strahlengang gebracht.

Bei Scheibenkondensoren sind solche Blenden eingebaut und müssen nur eingeschwenkt werden, bei älteren Mikroskopen kann man an Stelle der Irisblende eine zentrale Blende anbringen.

Behelfsmäßig kann man sich eine solche Blende auch selber machen, indem man in den Filtereinsatz am Kondensator eine Glasscheibe mit zentraler Blende einlegt. Die Blende kann aus schwarzer Pappe ausgeschnitten und aufgeklebt werden oder mit schwarzem Lack aufgemalt sein.

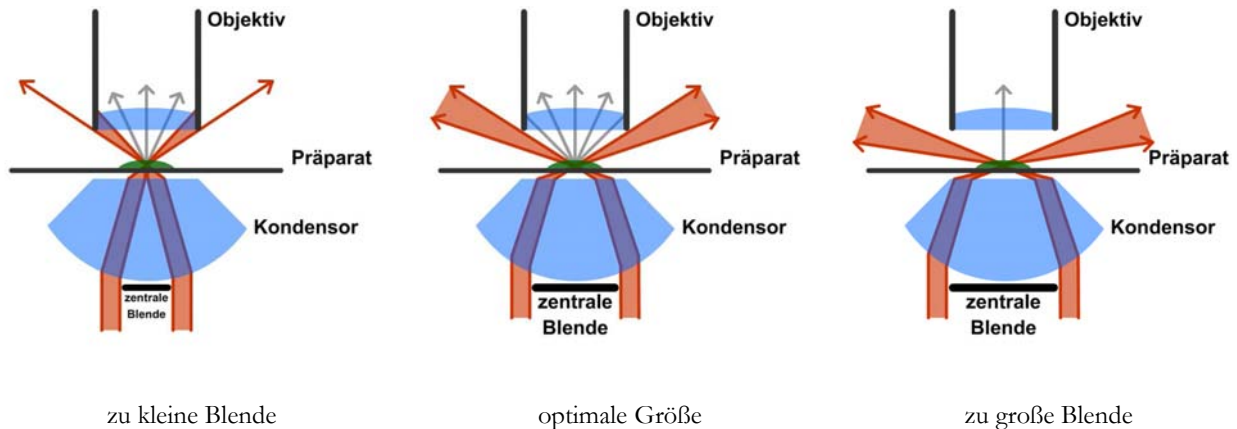
Bei Objektiven mit einer numerischen Apertur bis 0,65 lässt sich mit zentralen Blenden ein akzeptables Dunkelfeld erzeugen.



Größe der zentralen Blende

Die Größe dieser Scheibe hängt von der numerischen Apertur des Objektivs ab. Bei einer NA von 0,25 ist eine Scheibe mit einem Durchmesser von etwa 5 mm notwendig.

Der passende Durchmesser der zentralen Blende ist entscheidend für die Qualität des Dunkelfeldes. Ist die Scheibe **zu klein**, so gelangt auch direktes Mikroskopierlicht in des Objektiv, ist sie **zu groß**, so wird das Präparat nur unzureichend ausgeleuchtet und die Strukturen leuchten nicht hell genug auf.



2.2.2.2 Dunkelfeld-Kondensoren

Für höhere Ansprüche und stärkere Vergrößerungen (höhere numerische Aperturen) werden spezielle Dunkelfeld-Kondensoren verwendet; diese erzeugen durch **Reflexion** einen sehr flachen und dickwandigen Hohlkegel.

Bei den Dunkelfeld-Kondensoren lassen sich 2 Bauweisen unterscheiden:

- Paraboloid-Kondensator
- Kardioid-Kondensator

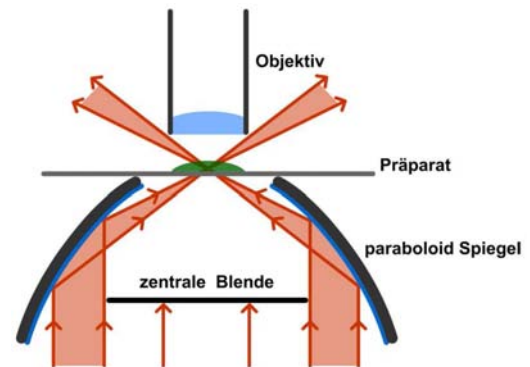
Paraboloid-Kondensator

Dieser Bautyp besitzt an Stelle einer Kondensatorlinse einen **Parabolspiegel** der das Licht in der Präparatenebene zentriert.

Eine zentrale Blende in der Mitte des Parabolspiegels dient auch hier zur Erzeugung eines Lichtringes.

Paraboloid-Kondensatoren sind meist **Trockenkondensatoren** und für Trockenobjektive bis zu einer numerischen Apertur von 0,65 geeignet.

Der Vorteil dieser Bauweise liegt darin, dass das Licht nicht durch Brechung sondern durch Spiegelung gesammelt wird. Das bedeutet eine hohe **sphärische und chromatische Korrektur** des Kondensators und damit auch eine höhere Lichtstärke als bei normalen Kondensatoren mit zentraler Blende.



Kardioid-Kondensator

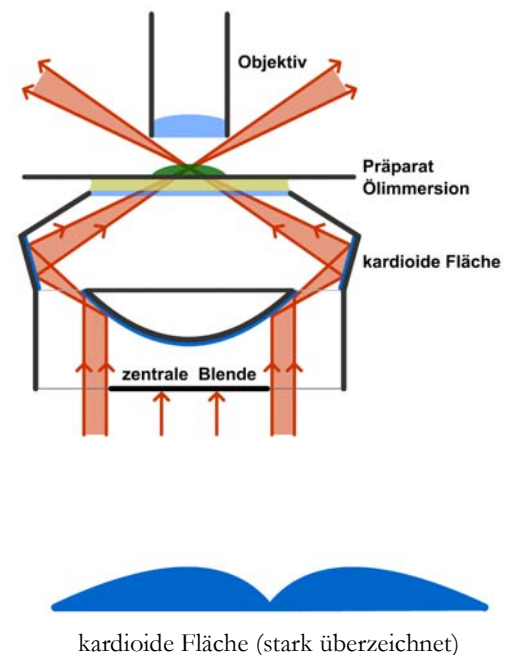
Dieser Bautyp besitzt in der professionellen Dunkelfeld-Mikroskopie die bei weitem größere Bedeutung.

Ähnlich dem Paraboloid-Kondensator wird auch beim Kardioid-Kondensator das Licht mit Hilfe von Spiegeln gesammelt.

Im Gegensatz zum Paraboloid-Kondensator besteht der Kardioid-Kondensator aus **zwei Spiegelflächen**; die erste besitzt eine **sphärische**, die zweite eine **kardioid** Oberfläche.

Durch dieses zusammengesetzte System lässt sich ein sehr flacher Lichtkegel mit **hoher numerischer Apertur** erzeugen.

Dies macht zwar eine **Immersion des Kondensators** erforderlich, dafür können aber auch Immersionsobjektive mit hoher numerischer Apertur für die Dunkelfeldmikroskopie verwendet werden ohne dass direktes Licht ins Objektiv gelangt.



Durch das Immersionsöl werden auch Reflexionen zwischen Kondensator und Objektträger ausgeschlossen, die bei Trockenkondensatoren zu einer Aufhellung des Hintergrunds führen. Kardioid-Kondensatoren erzeugen so einen besonders dunklen Hintergrund und damit auch einen weitaus **besseren Kontrast**.

Durch den Einsatz von Spiegeln statt Linsen erhält man eine hohe sphärische und chromatische Korrektur des Kondensators und damit auch eine höhere Lichtstärke. Zusätzlich ist der Kardioid-Kondensator durch die kardioid Spiegelfläche nahezu **aplanat**.

Allerdings verliert ein aplanater Kondensator schon bei sehr kleinen Abweichungen in der Fokussierung erheblich an Abbildungsqualität.

2.2.2.3 Dunkelfeld-Objektträger

Für die Dunkelfeld-Mikroskopie sollten unbedingt spezielle Dunkelfeld-Objektträger mit einer Dicke von max. 1mm verwendet werden. Diese Objektträger sind zumeist auch poliert, um Reflexionen und Lichtbrechungen an Unebenheiten im Glas zu reduzieren.

Vor der Verwendung für das Dunkelfeld sollten die Objektträgern in Chromschwefelsäure (oder zumindest mit Alkohol) gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit einem fusselfreien Tuch trocken gerieben werden.

Denn an Schmutz- und Staubteilchen wird das Licht natürlich ebenfalls gestreut, wodurch der Hintergrund aufgehellt und so der Kontrast vermindert wird.

2.2.3 Einstellen der Dunkelfeldbeleuchtung

- Als erstes wird das Präparat bei der gewünschten Vergrößerung im Hellfeld eingestellt.
- Anschließend die Schwarzscheibe in den Kondensor geben oder auf einen Dunkelfeldkondensor wechseln.
- Bei der Verwendung einer **Schwarzscheibe** im Hellfeld-Kondensor ist eine Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung im Hellfeld ausreichend.
- Um auch mit einem **Dunkelfeldkondensor** eine einwandfreie Dunkelfeldbeleuchtung zu erhalten muss die Spitze des Hohlkegels genau in die Präparatebene gebracht und zentriert werden.
 1. Dazu stellt man das Präparat mit einer kleinen scharf, anschließend dreht man den Kondensortrieb, bis die kleinen Strukturen im Objekt so hell wie möglich aufleuchten; nun ist die Spitze des Lichtkegels genau in der Präparatebene.
 2. Zuletzt den hell leuchtenden Fleck mit den Einstellschrauben des Kondensors in die Mitte des Bildfeldes bringen. Nun kann das für die Beobachtung gewünschte stärkere Objektiv verwendet werden wobei eine geringe Nachzentrierung notwendig sein kann, damit alle Strukturen mit gleicher Intensität leuchten.
 3. Bei Immersions-Dunkelfeldkondensoren wird immer zuerst der Kondensor immergiert, dann mit kleiner Vergrößerung die Einstellung des Kondensors vorgenommen und anschließend erst auf das gewünschte Immersionsobjektiv gewechselt.

2.2.3.1 Einstellungs-Fehler

- Nur ein Teil des Objektes leuchtet → Kondensor nicht richtig zentriert
- Nur sehr schwaches Leuchten → Keglspitze nicht in der Präparatebene
- Kondensor nicht richtig eingestellt
- Objektträger zu dick
→ zentrale Blende zu groß
- Kein dunkler Hintergrund → zentrale Blende zu klein
→ Apertur des Objektives zu groß

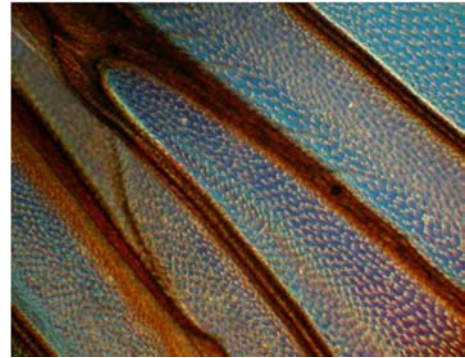
2.2.4 Rheinbergbeleuchtung

Eine spezielle Variante des Dunkelfeldes ist die so genannte Rheinbergbeleuchtung.

Sie beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Dunkelfeldbeleuchtung mit zentraler Blende, nur dass an Stelle einer schwarzen Scheibe ein farbiger Filter (Rheinbergfilter) verwendet wird.

Der Hintergrund ist somit nicht dunkel und schwarz, sondern homogen farbig ausgeleuchtet. Das Objekt selbst erscheint in seinen natürlichen Farben.

Mikroskopische Bilder mit Rheinbergbeleuchtung sind äußerst eindrucksvoll.



Flügel einer Stubenfliege unter Rheinbergbeleuchtung ¹

Verwendet man auch in der Randzone einen Farbfilter so leuchtet das Objekt in eben dieser Farbe. Den Farbkombinationen sind keine Grenzen gesetzt.

Die Herstellung eines Rheinbergfilters ist wie die einer zentralen Blende leicht möglich. Dazu benötigt man ebenfalls eine runde Glasscheibe (Größe des Filtereinsatzes vom Kondensor).

Mit Hilfe von verschiedenen großen, provisorisch montierten Schwarzscheiben wird der passenden Durchmesser für die zentrale Blende festgestellt.

Anschließend in dieser Größe einen Farbfilter auf der Glasscheibe anbringen und den fertigen Rheinbergfilter in den Filtereinsatz des Kondensors geben.

¹ <http://chf.de/eduthek/projektarbeit-mikroskopie.html#2-3>

2.2.5 Anwendungsbereiche

- Darstellung von kleinen Strukturen
- Visualisierung von sub-lichtmikroskopischen Strukturen
- Analyse des Brechungsindex von kleinen Strukturen
- ...

2.3 Phasenkontrast

Der Phasenkontrast stellt das wichtigste optische Kontrastverfahren dar; er ist im Vergleich zu anderen Kontrastverfahren in der Anschaffung relativ günstig, leicht einzustellen und daher auch dementsprechend weit verbreitet. Entwickelt wurde der Phasenkontrast in den 1930 Jahren von Frits Zernike, der 1953 dafür den Nobelpreis für Physik erhielt.

Die gesamte physikalische Theorie des Phasenkontrastes ist nur mit umfassendem mathematischen Wissen und Aufwand vollständig zu erfassen. Für die praktische Anwendung und vor allem für die korrekte Interpretation der Phasenkontrastbilder sollen die hier aufgezeigten Grundlagen ausreichen.

2.3.1 Amplituden- und Phasenpräparate

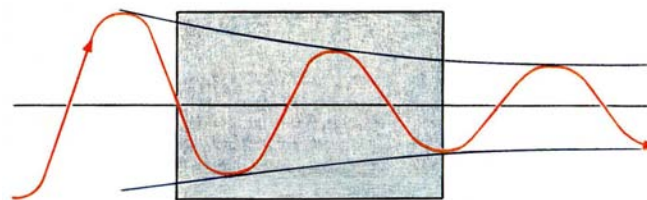
2.3.1.1 Amplitudenpräparat

Bei dicken und gefärbten Präparaten wird das einfallende **Licht durch das Präparat absorbiert** oder die Intensität vermindert und somit die Amplitude verändert. Solche Objekte werden daher auch als Amplitudenpräparate bezeichnet.

Das Objekt erscheint daher dunkel, gefärbt und mit starkem Kontrast.



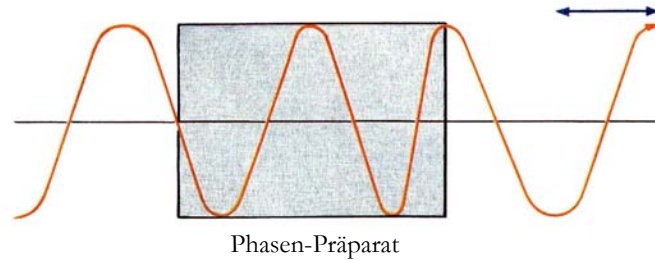
gefärbtes Dauerpräparat im Hellfeld



Amplituden-Präparat

2.3.1.2 Phasenpräparat

Sehr dünne und transparente Objekte können kein Licht absorbieren und erzeugen auch **keine Veränderung der Amplitude**. Aber durch die unterschiedliche Dichte der einzelnen Strukturen im Präparat (zB Zellkern, Plasma, Organellen, ...) wird das Licht unterschiedlich stark „abgebremst“ und somit werden die Lichtwellen in ihrer Phase zurückgehalten. Präparate, die keine Veränderung der Amplituden sondern nur eine Phasenverschiebung erzeugen, werden daher auch Phasenpräparate genannt.

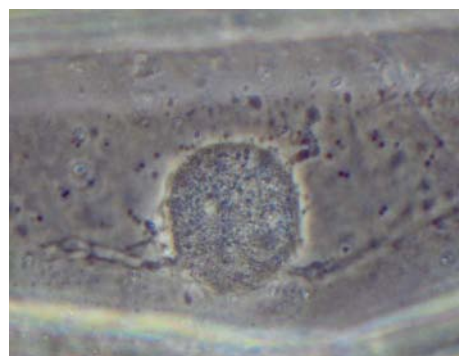


Weil diese Phasenverschiebung für unser Auge nicht sichtbar ist erscheinen Phasenobjekte transparent und zeigen nur sehr wenig Kontrast.

Durch Verfahren wie etwa den Phasenkontrast kann die Phasenverschiebung durch das Objekt in eine Amplitudenveränderung umgewandelt und so sichtbar gemacht werden.



Zwiebel-Innenepidermis im Hellfeld



Zwiebel-Innenepidermis im Phasenkontrast

2.3.2 Prinzip

Beim Phasenkontrast werden **Unterschiede in der Dichte** von Strukturen dargestellt. Dabei werden Objekte mit höherer Dichte und damit höherem Brechungsindex (zB Zellkern) normalerweise dunkler abgebildet als Strukturen mit geringer Dichte und damit kleinerem Brechungsindex (zB Plasma). Aus diesem Grund eignen sich nur dünne, transparente oder nur schwach gefärbte Objekte für die Phasenkontrast-Mikroskopie.

Ein Phasenkontrastmikroskop ist in der Lage die unsichtbaren Phasenverschiebungen in für unser Auge wahrnehmbare Helligkeitsunterschied umzuwandeln. Erreicht wird dieser Effekt durch die Interferenz von gebeugtem Licht aus dem Präparat und dem direkten Mikroskopierlicht. Die Phasenverschiebung durch das Objekt wird also in eine Amplitudenveränderung umgewandelt.

Dazu wird wird das Präparat, ähnlich dem Dunkelfeld, wieder mit einem Hohlkegel beleuchtet. Vom Phasenobjekt wird das Licht einerseits zurückgehalten, also in seiner Phase verschoben aber auch gebrochen und gestreut.

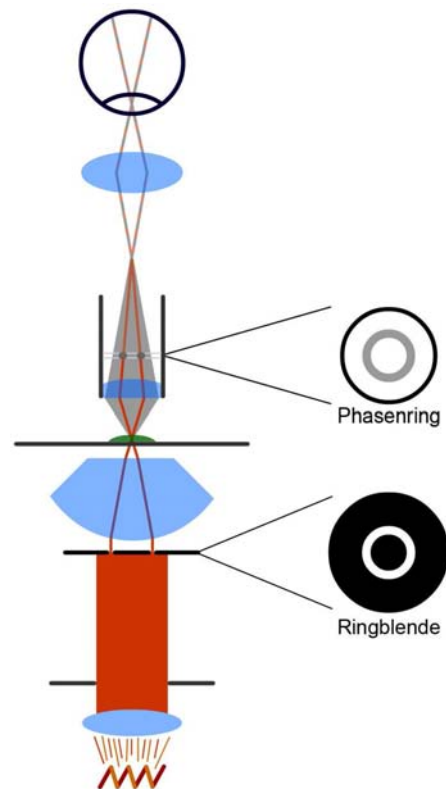
Bei biologischen Objekten beträgt diese Phasenverschiebung in der Regel $\frac{1}{4} \lambda$.

Der beleuchtende Hohlkegel wird durch eine Ringblende im Kondensator erzeugt, gelangt durch das Objekt bis in das Objektiv und trifft dort in der hinteren Brennebene auf den **Phasenring**.

Dieser erhöht zum einen den Phasenunterschied zum gebeugten Licht aus dem Präparat; und ermöglicht so erst eine Interferenz dieser beiden.

Zum anderen reduziert er die Helligkeit des direkten Lichtes, damit es zu keiner Überstrahlung der Interferenz kommt.

Das vom Präparat phasenverschobene, gestreute Licht geht zum überwiegendsten Teil am Phasenring vorbei und kann danach mit dem direkten und durch den Phasenring modifiziertem Licht interferieren.



2.3.3 Technische Voraussetzungen

Phasenkontrast kann man mit nahezu jedem Mikroskop machen. Dazu ist nur ein Objektiv mit einem Phasenring und eine in der Größe passende Ringblende im Kondensator notwendig. Um die Blende und den Phasenring korrekt einstellen zu können ist es allerdings auch notwendig, dass sich das Mikroskop köhlern lässt.

2.3.3.1 Ringblende

Bei vielen Mikroskopen sind Ringblenden in mehreren Größen in einem Scheibenkondensator eingebaut und können so je nach Bedarf verwendet werden. Ansonsten sind die Ringblenden in der unteren Brennebene des Kondensators anzubringen.

Die benötigte Größe der Ringblende ist in Form einer Nummer auf jedem Phasenobjektiv angegeben.



Scheibenkondensator mit Phasenring

2.3.3.2 Phasenkontrast-Objektive

Um die Phasenverschiebung zwischen dem gebeugtem Licht und dem direkten Mikroskopierlicht sichtbar zu machen sind spezielle Phasenkontrast-Objektive notwendig. Diese haben in der hinteren Brennebene einen Phasenring.

Eine Ausnahme sind große Forschungsmikroskope, bei denen die Phasenringe gesondert in den Strahlengang eingeschoben werden können.



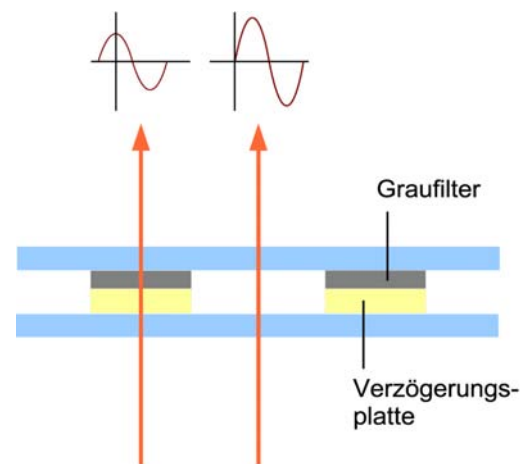
Phasenring
in der hinteren Brennebene des Objektiv

Phasenring

Der Phasenring besteht aus einer Verzögerungsplatte (λ/n -Plättchen) und einem Graufilter.

Das λ/n -Plättchen bremst das direkte Licht ab und vergrößert damit den Phasenunterschied zum gebeugten Licht so weit, dass es zu einer Interferenz der beiden Wellen kommt.

Durch den Graufilter wird die Helligkeit des direkten Lichtes reduziert um eine Überstrahlung des Interferenz-Bildes zu verhindern.



Wie stark das direkte Licht in seiner Phase verschoben wird hängt von der verwendeten Verzögerungsplatte ab (zB $1/4$, $1/2$, $3/4$). Je nach untersuchtem Präparat und gewünschtem Kontrast müssen unterschiedliche Phasenringe und Phasenobjektive verwendet werden.

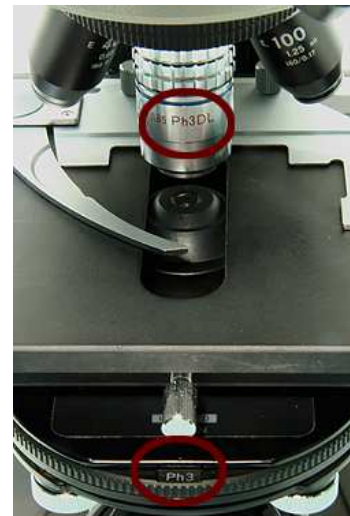
Normalerweise sind die eingebauten Phasenringe für dünne biologische Präparate und positiven Phasenkontrast konstruiert.

2.3.4 Einstellen des Phasenkontrastes

Bevor man den Phasenkontrast anwendet wird das Präparat zuerst normal im Hellfeld eingestellt und das Mikroskop geköhlt. Die **Köhlersche Beleuchtung** ist beim Phasenkontrast besonders wichtig, da sonst die Ringblende nicht in der hinteren Brennebene des Objektivs, wo sich auch der Phasenring befindet, abgebildet wird; die beiden Ringe könnten nicht zur Deckung gebracht werden.

WICHTIG: Immersionsobjektive mit Phasenring liefern im Hellfeld ein deutlich schlechteres Bild als Objektive ohne Phasenring – daher diese Objektive wenn möglich nicht für Untersuchungen im Hellfeld verwenden.

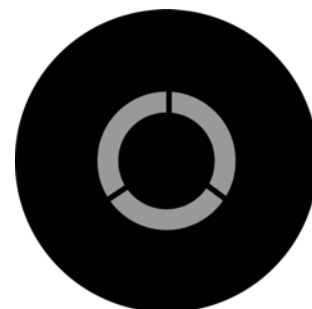
- Ist das Präparat mit dem gewünschten Phasenobjektiv im Hellfeld eingestellt, kann man auf den Phasenkontrast wechseln. Dazu einfach die auf dem Objektiv angegebene Ringblende (Nummer) in den Kondensor geben.



- Für ein optimales Bild müssen die Ringblende und der Phasenring genau übereinander liegen. Um dies zu kontrollieren wird ein so genanntes **Einstellfernrohr** verwendet. Dieses wird an Stelle eines Okulars eingesetzt; durch einen Auszug lässt sich damit auf die hintere Brennebene des Objektivs scharf stellen. Dort sollten die helle Ringblende und der graue Phasenring schwarz und deckungsgleich abgebildet werden.



Bei größeren Forschungsmikroskopen kann alternativ dazu eine **Bertrandlinse** vorhanden sein. Diese lässt sich im Tubus in den Strahlengang einschwenken und besitzt ansonsten die gleiche Funktion wie das Einstellfernrohr.



Blick in die hintere Brennebene des Objektivs:
Phasenring (grau) und Ringblende
sind deckungsgleich.

- Mit Hilfe von zwei Stellschrauben am Kondensator kann die Ringblende positioniert werden und so mit dem Phasenring zur Deckung gebracht werden. (ACHTUNG: nicht mit den Stellschrauben zum Zentrieren des ganzen Kondensators verwechseln!!!)

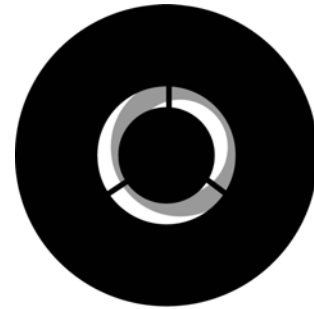
Bei Mikroskopen mit einer beweglichen Lichtaustrittsöffnung zum Zentrieren des Lichtstrahls (Köhler'sche Beleuchtung) sind Kondensator und Ringblende fix montiert und vorzentriert!!!

- Stimmt die Größe der Ringblende nicht exakt mit dem Phasenring überein so kann man den Kondensator etwas heben oder senken und so deren Größe etwas verändern.

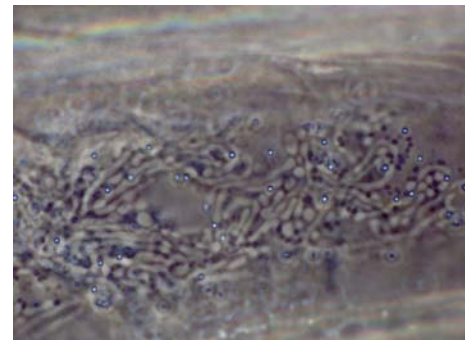
Ist eine Korrektur auf diese Weise nicht möglich so ist eine größere oder kleinere Ringblende zu verwenden.

- Am Schluss das Einstellfernrohr oder die Bertrandlinse wieder entfernen.

Um ein klares und helles Phasenkontrastbild zu bekommen muss man das Mikroskoplicht sehr hell aufdrehen, denn durch die Ringblende und den Phasenring geht sehr viel an Lichtintensität verloren.



Blick in die hintere Brennebene des Objektivs:
Phasenring (grau) und Ringblende (weiß)
sind **nicht** deckungsgleich.



Endoplasmatisches Reticulum
im Phasenkontrast

2.3.4.1 Einstellungsfehler

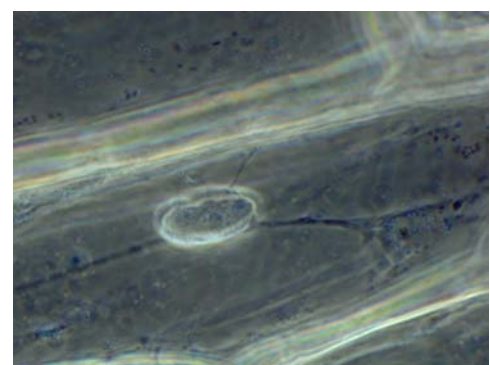
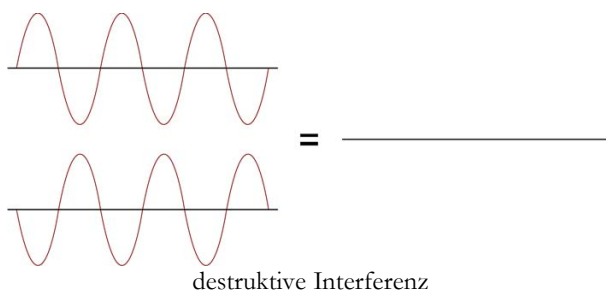
- Ringblende nicht zentriert:
Ringblende und Phasenring decken sich nicht und man erhält keinen schönen Kontrast.
- falsche Ringblende:
Passt die verwendete Ringblende nicht zum Phasenring im Objektiv, ist sie also zu groß oder zu klein, trifft das direkte Licht nicht auf den Phasenring und es entsteht kein Phasenkontrast.
- Phasenring nicht geeignet:
Ein Phasenring ist auf Grund der definierten Stärke seiner Lichtabsorption nicht für alle Präparate geeignet. Dünne biologische Präparate erzeugen meist nur eine sehr geringe Phasenverschiebung und benötigen daher für einen guten Kontrast andere Phasenringe als dicke Präparate, die eine starke Phasenverschiebung bewirken.
- zu wenig Licht:
Hohe Lichtintensität ist für ein klares und helles Phasenkontrastbild besonders wichtig, denn durch die Ringblende und den Phasenring geht sehr viel an Intensität verloren.

2.3.5 Das Phasenkontrastbild

Bei biologischen Objekten beträgt die Phasenverschiebung normalerweise 90° ; das bedeutet, die Wellen laufen um eine viertel Wellenlänge verschoben hinter dem Hauptmaximum des direkten Lichtes her.

2.3.5.1 Positiver Phasenkontrast

Beim positiven Phasenkontrast wird das direkte Licht vom Phasenring so stark zurückgehalten, dass sich eine Phasenverschiebung um 180° ergibt; es kommt somit zu einer destruktiven Interferenz und die Strukturen erscheinen dunkel auf hellem Hintergrund.

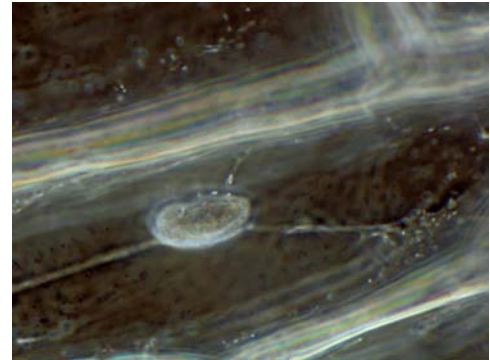
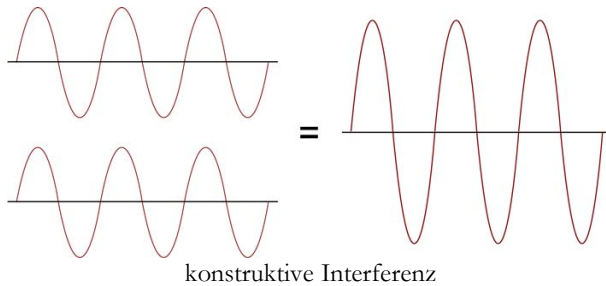


Allium cepa - positiver Phasenkontrast

Diese Variante ist die gängigste und daher auch bei allen Routinemikroskopen zu finden.

2.3.5.2 Negativer Phasenkontrast

Bei dieser Variante des Phasenkontrastes wird das direkte Licht vom Phasenring so beeinflusst, dass es keinen Phasenunterschied zwischen direktem und gebeugtem Licht gibt. In diesem Fall kommt es zu einer konstruktiven Interferenz und damit erscheinen die Strukturen heller als der Untergrund.

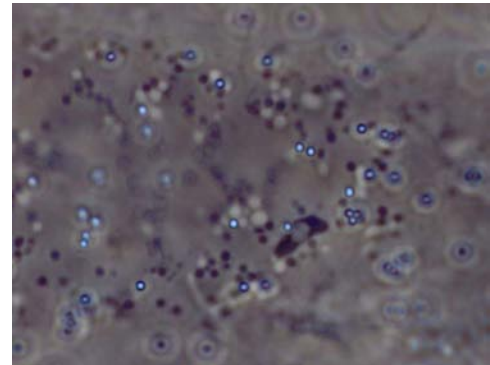


Allium cepa - negativer Phasenkontrast

2.3.5.3 Inversion

Im positiven Phasenkontrast erscheinen dichtere Strukturen normalerweise immer dunkler; von extrem dichten Strukturen (zB ölhältige Vesikel) wird das Licht aber so stark zurückgehalten, dass es bei der Interferenz mit dem direkten Licht zu einer konstruktiven Interferenz kommt und damit zu einem hellen Aufleuchten der Struktur (Inversion).

Beim negativen Phasenkontrast erscheinen diese besonders dichten Strukturen dann dunkel statt hell.



Allium cepa - Inversion

2.3.6 Störungen im Phasenkontrastbild

2.3.6.1 Halo-Effekt

In der Theorie wird beim Phasenkontrast nur das direkte Licht gedämpft und in seiner Phase beeinflusst. Praktisch ist das aber nicht realisierbar, dann ein kleiner Teil des gebeugten Lichtes fällt immer auch in den Phasenring und wird von diesem beeinflusst.

Dies bewirkt den „Halo“-Effekt, einen hellen Lichtsaum um dunkel kontrastierte Strukturen.

Das Ausmaß des Halo-Effekts ist hauptsächlich abhängig von:

- der Objektgröße
- der Breite des Phasenringes
- der Differenz zwischen den Brechungsindices von Einschussmedium und Objekt!!

2.3.6.2 Shading-Off

Eine weitere Störung kann bei großen Flächen mit gleichem Brechungsindex und gleicher Dicke (zB eine dünne Folie) auftreten. Hier wird nicht die ganze Fläche entsprechend der konstanten Dicke und Dichte überall gleich dunkel abgebildet, sondern die Fläche wird in der Mitte heller.

Das bedeutet, dass in der Mitte der Fläche eine andere Dichte vorgetäuscht wird, die im realen Präparat nicht vorhanden ist.

2.3.6.3 Linseneffekt

Befinden sich im Präparat linsenförmige Strukturen mit einem vom Umgebungsmedium stark abweichendem Brechungsindex (zB Blutkörperchen), wird die Abbildung der Ringblende in der hinteren Brennebene des Objektivs massiv gestört.

Dadurch liegen Ringblende und Phasenring nicht mehr exakt übereinander und die Qualität des Phasenkontrastbildes wird verschlechtert.

2.3.7 Anwendungsbereiche

- Darstellung von kontrastarmen Strukturen
- Dichtemessungen (zB von Bakterien, ...) durch Vergleich mit einem Medium bekannter Dichte.

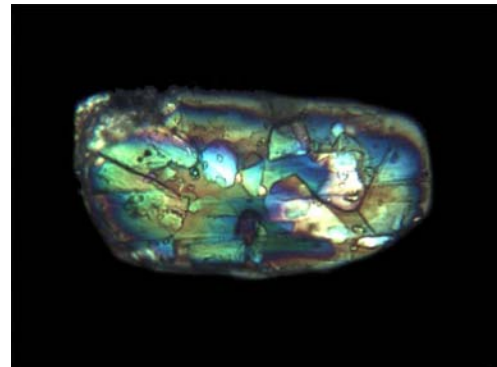
2.4 Polarisation

Manche Objekte haben die Eigenschaft Lichtstrahlen in zwei Teilstrahlen aufzuspalten, sie werden daher als doppelbrechend bezeichnet.

Doppelbrechende Strukturen sind aus regelmäßig angeordneten Einheiten (Molekülen, Atomen) aufgebaut. Meistens handelt es sich dabei um Kristalle, die ja immer regelmäßig gebaut sind, aber auch biologische Objekte wie Zellulose oder Stärke sind doppelbrechende Strukturen.

Das Phänomen der Doppelbrechung kann in Kombination mit polarisiertem Licht und einer speziellen optischen Anordnung im Mikroskop genutzt werden, um eine Interferenz der beiden Teilstrahlen zu erreichen. Dadurch kommt es zur Bildung von unterschiedlichen Farbringen beziehungsweise zu einem Aufleuchten der Strukturen.

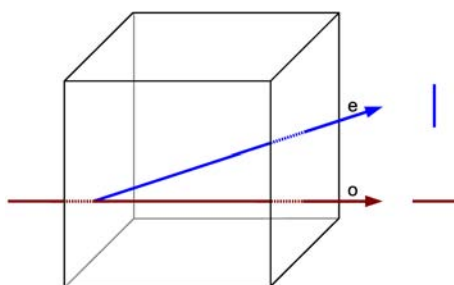
Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie können Strukturen analysiert oder durch das Auftreten von unterschiedlichen Farbsäumen Mineralen bestimmt werden.



Glucose im Polarisationsmikroskop

2.4.1 Doppelbrechung

Als doppelbrechend werden Strukturen bezeichnet die in der Lage sind, einfallende Lichtstrahlen in zwei Teilstrahlen oder Wellenzüge aufzuspalten, von denen jeder linear polarisiert ist und deren Schwingungsebenen senkrecht aufeinander stehen. Jedes Material besitzt definierte Schwingungsrichtungen für die zwei Teilstrahlen.



Kalzitkristall ¹

Fällt nun Licht senkrecht auf ein doppelbrechendes Medium, so verläuft der ordentliche Strahl (**ordinärer Strahl "o"**) ungebrochen durch das Medium, der außerordentliche Strahl (**extraordinärer Strahl "e"**) hingegen wird abgelenkt.

¹ <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Calcite.jpg>

- **ordentlicher Strahl:** folgt konstant dem Brechungsgesetz und wird entsprechend dem jeweiligen Brechungsindex gebrochen;
→ bei senkrechtem Lichteinfall verläuft er ungebrochen.
- **außerordentlicher Strahl** der Brechungsindex für diesen Strahl ist nicht konstant sondern abhängig vom Einfallswinkel des Lichtes;
→ bei senkrechtem Lichteinfall wird dieser Strahl abgelenkt.

Aufgrund dieser abweichenden Brechungsindices verlaufen die beiden Strahlen verschieden schnell durch das Medium, wodurch sie beim Austritt in ihrer **Phase verschoben** sind. Darüber hinaus sind die beiden Teilstrahlen polarisiert; die Schwingungsebene des außerordentlichen Strahls ist senkrecht zu der des ordentlichen Strahls ausgerichtet.

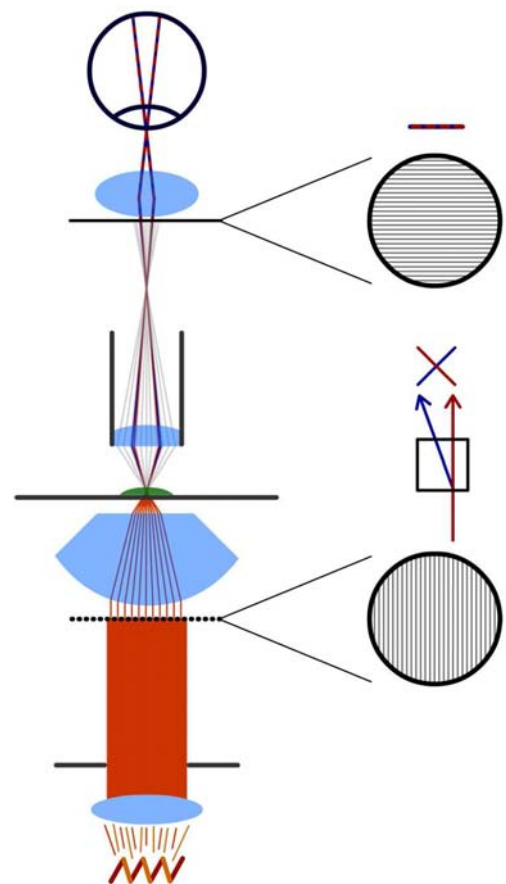
→ mehr siehe Kapitel Optik / Wellenoptik /Doppelbrechung

2.4.2 Prinzip

Doppelbrechende Strukturen können in der Polarisationsmikroskopie durch Interferenz der von ihnen erzeugten Teilstrahlen sichtbar und damit identifizierbar gemacht werden.

Dazu wird das zu untersuchende Objekt zwischen 2 Polfiltern mikroskopiert.

- Der erste Polfilter, der **Polarisator**, liegt vor dem Objekt, meist an der Lichtaustrittsöffnung unterhalb des Kondensators; er erzeugt linear polarisiertes Licht, mit dem das Präparat beleuchtet wird.
- Der 2. Polfilter, der **Analysator**, wird nach dem Objekt in den Strahlengang eingebracht. Dazu ist im Tubus eine Einschubmöglichkeit für Filter notwendig. Behelfsmäßig kann man den Analysator auch auf das Okular legen. Wenn die Schwingungsebene des Analysators senkrecht zu der des Polarisators steht, dann blockt der Analysator das gesamte Licht; ohne Objekt im Strahlengang erhält man somit ein komplett schwarzes Bild.



Doppelbrechende Strukturen bewirken eine Aufspaltung des einfallenden Lichtes in 2 Teilstrahlen.

Durch die Beleuchtung mit polarisiertem Licht ist eine Doppelbrechung allerdings nur in einer bestimmten Position des Präparates zur Polarisationssebene möglich.

Jede doppelbrechende Struktur erzeugt nun 2 mögliche Schwingungsebenen. Ist die Polarisationssebene des Lichtes ident mit einer dieser beiden Schwingungsebenen der Struktur, so geht das polarisierte Licht ungehindert durch das Präparat und es kommt zu keiner Doppelbrechung.

Stimmen Polarisationssebene und Schwingungsebenen nicht überein, kommt es zur Doppelbrechung und damit zur Aufspaltung des polarisierten Lichtes in 2 Teilstrahlen, die senkrecht aufeinander stehen.

Ein gewisser Anteil dieser Teilstrahlen kann aufgrund der veränderten Schwingungsebene den Analysator passieren. Dieser Anteil ist am größten, wenn die Teilstrahlen in einem Winkel von 45 Grad zum Analysator stehen.

Durch den Analysator werden die beiden Teilstrahlen auf die gleiche Schwingungsebene gebracht und können so interferieren. Welche Amplitudenveränderung dabei entsteht hängt vom Gangunterschied der beiden Teilstrahlen ab.

Durch Drehen des Objektes im Strahlengang erhält man daher 4 mal keine Doppelbrechung, und zwar immer wenn eine der beiden möglichen Schwingungsebenen der Struktur mit der Polarisationssebene des Lichtes übereinstimmt. Polarisationsmikroskopie kann somit auch dazu verwendet werden um die Anordnung, Orientierung und Ausrichtung von Strukturen zu analysieren.

2.4.3 Technische Voraussetzungen

Für die Polarisationsmikroskopie sind im wesentlichen nur 2 Polfilter notwendig:

- 1. Polfilter = Polarisator
- 2. Polfilter = Analysator

Spezielle Objektische und Objektive können die Möglichkeiten des Polarisationsmikroskops zusätzlich noch erweitern.

2.4.3.1 Polfilter

Der **Polarisator** befindet sich unter dem Kondensator; in der Regel liegt er einfach auf der Lichtaustrittsöffnung.

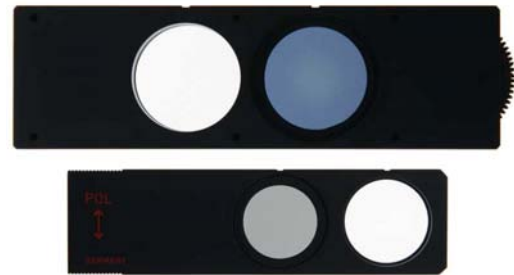
Bei besseren Mikroskopen ist er drehbar und mit einer Gradskala versehen.



drehbarer Polarisator

Der **Analysator** ist über dem Objekt angebracht; meistens zwischen Objektiv und Okular.

Für behelfsmäßige Polarisationsmikroskopie kann der 2. Polfilter auch einfach auf das Okular gelegt werden.



ACHTUNG:

Die Hitze der Lampe kann die Filter (vor allem den Polarisator) stark beschädigen und man erhält dann auch bei gekreuzten Polfiltern keinen schwarzen Hintergrund mehr.

Daher die **Polfilter immer vor Überhitzung schützen**; also immer darauf achten, dass das einfallende Licht nicht zu heiß ist oder einen **Wärmeschutzfilter** vor der Lampe verwenden.

2.4.3.2 Objektisch

Zur Beobachtung und Analyse von doppelbrechenden Strukturen im Polarisationsmikroskop ist ein drehbarer Objektisch sehr nützlich. Mit ihm kann die Ausrichtung des Präparates leicht verändert werden.

Bei fixierten Objektischen müssen Polarisator und Analysator gedreht werden, um das Präparat mit unterschiedlichen Polarisationssebenen zu beleuchten.



2.4.3.3 Objektive

Für einfache Untersuchungen in der Polarisierung können „normale“ Hellfeldobjektive verwendet werden.

Durch Spannungsdoppelbrechung der Objektivlinsen erscheint der Hintergrund bei gekreuzten Polfiltern aber oft leicht aufgehellt. Bei sehr schwach doppelbrechenden Objekten kann dies ein sehr störender Effekt sein.

Für anspruchsvolle Polarisationsmikroskopie gibt es daher auch spezielle **spannungsfreie Objektive**, die einen einheitlich schwarzen Hintergrund erzeugen.

2.4.4 Einstellung des Polarisationsmikroskops

Die Einstellung des Präparates erfolgt wie gewohnt im Hellfeld, wobei zugleich auch die Köhlersche Beleuchtung korrekt eingestellt wird.

Anschließend bringt man Polarisator und Analysator in gekreuzter Stellung in den Strahlengang, sodass man einen schwarzen Hintergrund erhält.

Doppelbrechende Strukturen sollten auf dem dunklen Hintergrund nun hell aufleuchten. Ist dies nicht der Fall so könnte die Möglichkeit bestehen, dass die Schwingungsrichtung des Objektes ident mit der Polarisationsrichtung ist. Durch Drehen des Objektisches, der Filter oder des Präparates selbst kann getestet werden ob dies der Fall ist.

Doppelbrechende Strukturen leuchten nach jeder 90° Drehung hell auf und erscheinen dazwischen dunkel. Isotrope, nicht doppelbrechende Strukturen hingegen bleiben in jeder Position dunkel.

2.4.5 Anwendungsbereiche

Die Polarisationsmikroskopie findet in den Naturwissenschaften vielseitige Anwendung, beispielsweise zur Identifizierung oder Kontrastierung von doppelbrechenden Strukturen, wie etwa von Kristallen. Sie findet aber auch bei Bestimmung von Mineralien in der Geologie und in den Materialwissenschaften Verwendung. Mit ihrer Hilfe lässt sich auch die Textur von Zellulosefasern in den Zellwänden von Pflanzenzellen und die Schichtung von Stärkekörnern analysieren.

2.5 Interferenzkontrast

Der Physiker G. Nomarski entwickelte Mitte der fünfziger Jahre ausgehend von der Polarisations-Mikroskopie den Differentiellen Interferenzkontrast (DIC).

Beim DIC wird das Objekt von zwei senkrecht aufeinander stehenden Wellenzügen durchlaufen, wodurch, ähnlich wie beim Phasenkontrast, **Unterschiede in der Dichte von Strukturen** sichtbar gemacht werden. Im Gegensatz zum Phasenkontrast kann beim DIC der Kontrast allerdings stufenlos verstellt und so die Helligkeit und Farbe des Untergrundes verändert werden

2.5.1 Prinzip

Wie bei der Polarisation wird auch beim Interferenzkontrast mit polarisiertem Licht gearbeitet. Zusätzlich werden aber noch 2 Prismen, so genannte **Wollaston Prismen**, in den Strahlengang eingebracht.

Das **erste Prisma** befindet sich vor dem Objekt und spaltet das einfallende polarisierte Licht in **zwei senkrecht aufeinander stehende Strahlen gleicher Amplitude** auf; es stellt somit ein doppelbrechendes Element dar, bei dem zusätzlich die Teilstrahlen seitlich etwas versetzt sind.

Die beiden Strahlen verlaufen parallel aber räumlich etwas versetzt durch das Präparat, wobei der Abstand der beiden Strahlen immer unter der Auflösungsgrenze liegt.

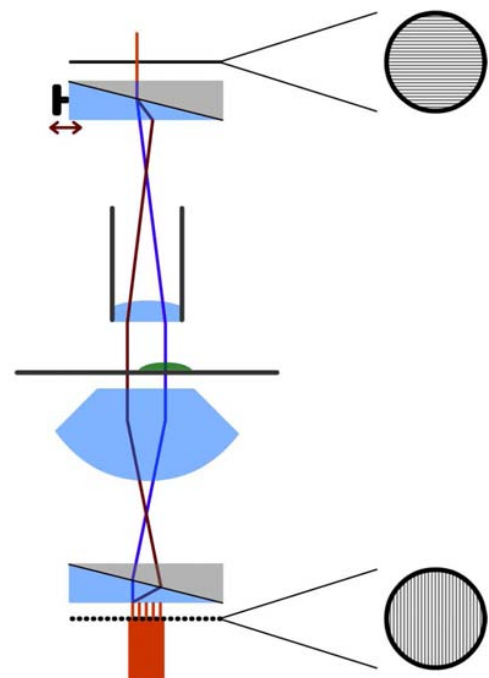
Je nach Dicke und Dichte der Strukturen die die Strahlen durchlaufen, werden sie unterschiedlich stark abgebremst und so in ihrer Phase verschoben.

Durchlaufen beide Strahlen eine Struktur, so werden sie auch beide in gleicher Weise in ihrer Phase verschoben.

An den **Kanten** von Strukturen verläuft ein Strahl durch die Struktur selbst, der andere hingegen durch das Umgebungsmedium. Durch die meist unterschiedlichen Brechungsindices der beiden Medien resultiert daraus auch eine unterschiedliche Phasenverschiebung der beiden Strahlen.

Nach dem die getrennten Strahlen das Objekt durchlaufen haben, werden sie vom **zweiten Prisma** wieder **zusammengeführt** und vom Analysator zur Interferenz gebracht, wodurch sich ähnlich dem Phasenkontrast ein deutlich kontrastiertes Bild ergibt. Besonders deutlich tritt der DIC an Kanten im Präparat hervor, wo die beiden Teilstrahlen in ihrer Phase unterschiedlich verschoben werden und so eine abweichende Amplitude erzeugen. Die Kanten erscheinen dadurch dunkler oder heller, was einen 3D-Effekt erzeugt (Reliefkontrast).

Die Stärke der Phasenverschiebung und somit des Kontrastes kann durch horizontales Verschieben des 2. Prismas (Interferenzkontrast nach NOMARSKI) oder mit Hilfe einer Platte und Drehen des Polarisators (Interferenzkontrast nach SMITH) geregelt werden.



Interferenzkontrast nach NOMARSKI

2.5.2 Technische Voraussetzungen

Wie für die Polarisationsmikroskopie, aus welcher Nomarski den Interferenzkontrast entwickelte, sind auch für den DIC zwei Polfilter (**Polarisator und Analysator**) notwendig, die sich in diesem Fall aber an bestimmten Positionen im Strahlengang befinden müssen.

Zusätzlich werden bei dieser Methode noch **2 Prismen (Wollaston Prismen)** in den Strahlengang eingebracht. Dazu benötigt man aber zusätzliche Einschubmöglichkeiten, welche meist nur bei größeren Mikroskopen vorhanden sind.

Das erste Prisma befindet sich vor dem Kondensator, das zweite oberhalb des Objektives.

2.5.2.1 Polfilter

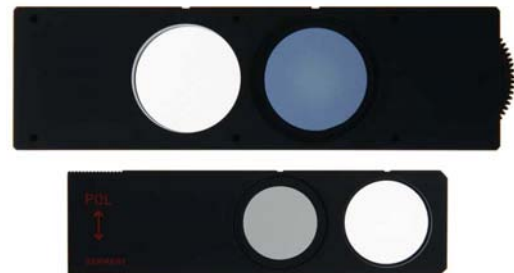
Der erste Polfilter, der **Polarisator**, befindet sich in den allermeisten Fällen vor dem ersten Prisma.

Entweder liegt er direkt auf der Lichtaustrittsöffnung oder er befindet sich auf einem Schieber zwischen Lampe und Lichtaustrittsöffnung.



drehbarer Polarisator

Der **Analysator** lässt sich über einen Schieber oder Schalter nach dem 2. Prisma in den Strahlengang einbringen.



ACHTUNG:

Die Hitze der Lampe kann die Filter (vor allem den Polarisator) stark beschädigen und man erhält dann auch bei gekreuzten Polfiltern keinen schwarzen Hintergrund mehr.

Daher die **Polfilter immer vor Überhitzung schützen**; also immer darauf achten, dass das einfallende Licht nicht zu heiß ist, oder einen **Wärmeschutzfilter** vor der Lampe verwenden.

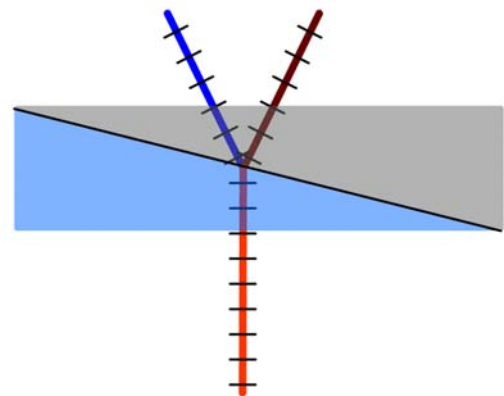
2.5.2.2 Wollaston-Prismen

Die für den Interferenzkontrast notwendigen Wollaston-Prismen bestehen aus zwei in Subtraktionsstellung miteinander verkitteten Kalkspatkeilen (Teilprismen). Diese Teilprismen sind extrem flach, so dass das Wollaston-Prisma die Form eines Scheibchens besitzt.



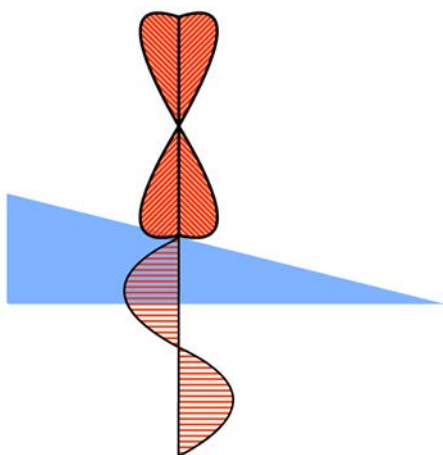
Wollaston Prisma für ein 40x Objektiv / NA 0.6

Linear polarisiertes Licht, dessen Schwingungsebene in einem 45° Winkel zu der Schwingungsrichtung des Prismas steht, wird vom ersten Teilprisma in zwei senkrecht zueinander stehende Wellenzüge gleicher Amplitude aufgespalten.

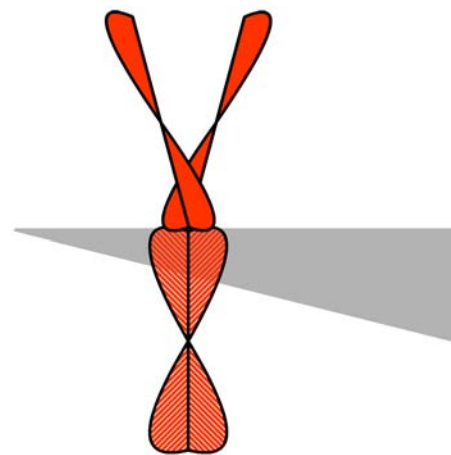


Durch das in Subtraktionsstellung angebrachte zweite Prisma werden die beiden Teilstrahlen von einander weg gebrochen.

Vom Kondensator werden die beiden Strahlen parallel ausgerichtet und so durch das Objekt geschickt.



1. Teilprisma – Aufspaltung in 2 Teilstrahlen



2. Teilprisma – räumliche Trennung der Strahlen

Lage der Prismen

Besonders die Lage des 2. Prismas, dessen Aufgabe es ist die beiden räumlich getrennten Teilstrahlen wieder zusammenzuführen, stellt ein Problem dar; denn die Strahlen, die dieses Prisma verlassen, sind leicht gegeneinander geneigt.

Um bei der anschließenden Interferenz der beiden Wellenzüge ein homogenes Feld zu bekommen muss der Winkel zwischen den beiden Wellenzüge aber 0° betragen. Dazu muss die Vereinigung der beiden Teilstrahlen genau in der **hinteren Brennebene** des Objektivs erfolgen.

Um dies zu erreichen gibt es 2 Möglichkeiten:

1. Das Prisma wird im Strahlengang so positioniert, dass die Vereinigung der Teilstrahlen in der hinteren Brennebene des Objektivs erfolgt.
Dies stellt aber vor allem bei Objektiven mit höherem Abbildungsmaßstab ein Problem dar, weil sich hier die hintere Brennebene mitten im Linsensystem befindet und bei herkömmlichen Objektiven dort kein Prisma Platz hat.
Für diesen Zweck wurden daher **spezielle Objektive** entwickelt, bei denen das Prisma an der richtigen Stelle eingebaut ist. (Interferenzkontrast nach SMITH).
2. Auf andere Weise wurde von NOMARSKI das Problem gelöst, indem er die **optische Achse** des Wollaston **Prismas** so **veränderte**, dass der Punkt der Strahlenvereinigung außerhalb des Prismas liegt. Somit lässt es sich weit genug oberhalb des Objektivs anbringen und es sind keine speziellen Objektive notwendig.

2.5.3 Einstellen des Gangunterschiedes

Nach dem Wollaston Prisma sind die beiden Wellenzüge entweder phasengleich oder besitzen einen variablen Phasenunterschied.

Die Größe des Gangunterschiedes hängt von der Stelle ab, an der das Prisma durchstrahlt wird; je länger der Teil ist der gerade durchlaufen wird, desto höher ist der Phasenunterschied.

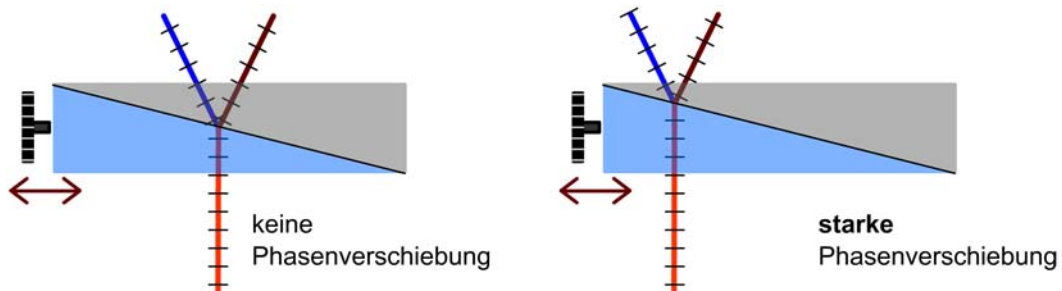
Je nach eingestelltem Phasenunterschied erscheint der Hintergrund heller, dunkler oder auch in einer bestimmten Farbe. Bei einem Gangunterschied von 0λ erscheint der Hintergrund völlig dunkel. Mit steigendem Phasenunterschied erreicht man über mehrere Graustufen das Weiß der I. Ordnung und in weiterer Folge Interferenzfarben von gelb über rot bis blau. Bei der Verwendung von monochromatischem Licht hat man nur den hell/dunkel Kontrast zur Verfügung, auf den Farbkontrast muss man dabei verzichten.

Zum Einstellen des Phasenunterschiedes werden je nach Verfahren 2 unterschiedliche Methoden verwendet.

- Verschieben des 2. Prismas (NOMARSKI)
- Drehen des Polarisators (SMITH)

Interferenzkontrast nach NOMARSKI

Das 2. Wollaston Prisma über dem Objektiv ist horizontal verschiebbar, damit kann die Position des Lichtstrahls und somit die Phasenverschiebung direkt verändert werden.



Interferenzkontrast nach SMITH

Bei diesem Verfahren befindet sich das 2. Prisma fix im Objektiv eingebaut und kann daher nicht verschoben werden. Um den Gangunterschied auch hier verstellen zu können befindet sich über dem Polarisator eine $\lambda/4$ Platte, und der Gangunterschied wird durch Drehen des Polarisators verstellt.

2.5.4 Bautypen

Interferenzkontrast-Mikroskope können zum einen hinsichtlich der Position der Prismen im Strahlengang (hier sind nur die beiden wichtigsten erwähnt)

- Interferenzmikroskop nach SMITH
- Interferenzmikroskop nach NOMARSKI

und zum anderen aufgrund der Beleuchtung unterschieden werden:

- Durchlicht Interferenzmikroskope
- Auflicht Interferenzmikroskope

Interferenzmikroskop nach SMITH

Beim Interferenzkontrast nach SMITH wird ein Spezialkondensator verwendet. Dieser trägt das erste Wollaston-Prismen ähnlich den Ringblenden für Dunkelfeld und Phasenkontrast auf einer Revolverscheibe. Der Polarisator sowie eine $\lambda/4$ und λ Platte sind ebenfalls am Kondensator angebracht.

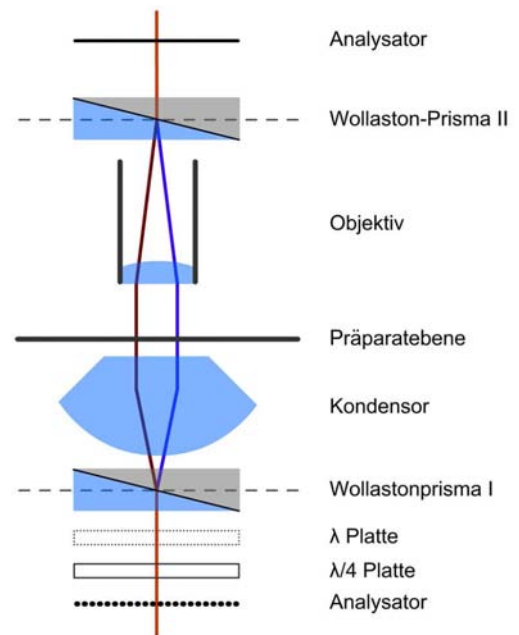
Das zweite Prisma ist bei dieser Bauart fix im Objektiv eingebaut und kann somit nicht verschoben werden.

Um den Gangunterschied auch hier verstellen zu können befindet sich über dem Polarisator eine $\lambda/4$ Platte; der Gangunterschied wird durch Drehen des Polarisators verstellt.

Der Analysator wird über einen Tubusschlitz nach dem Objektiv in den Strahlengang eingebracht.

Die hier verwendeten speziellen Interferenzobjektive sind fix mit dem Objektivrevolver verschraubt um die Position des Prismas nicht zu verändern.

Der Interferenzkontrast nach SMITH ist daher nur an Mikroskopen zu finden, bei denen der gesamte Objektivrevolver ausgetauscht werden kann.



Interferenzmikroskop nach NOMARSKI

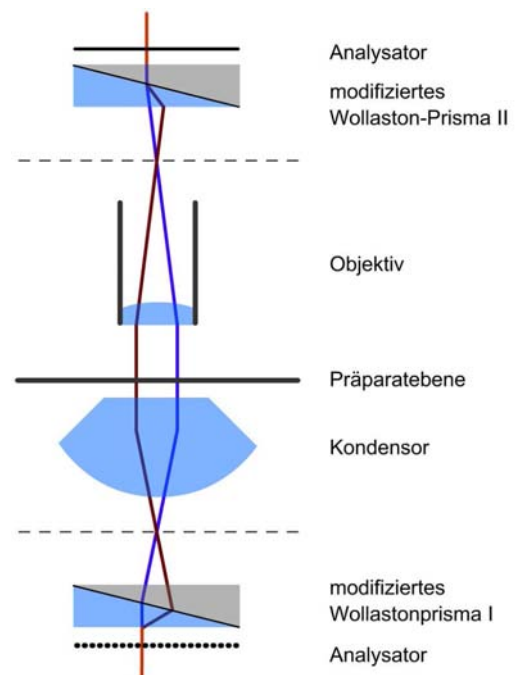
Auch beim Interferenzkontrast nach NOMARSKI wird ein Spezialkondensator verwendet, bei dem das erste Prisma in der Scheibe eingebaut ist.

Der Polarisator liegt in den meisten Fällen einfach auf der Lichtaustrittsöffnung oder er kann über einen Schieber in in den Strahlengang eingebracht werden.

Das zweite und verstellbare Prisma wird in einen Tubusschlitz oberhalb des Objektivs gesteckt. Das Einstellen des Gangunterschiedes erfolgt hier durch das horizontale Verschieben des zweiten Prismas.

Ebenso wie das 2. Prisma wird auch der Analysator über einen Tubusschlitz in den Strahlengang gebracht.

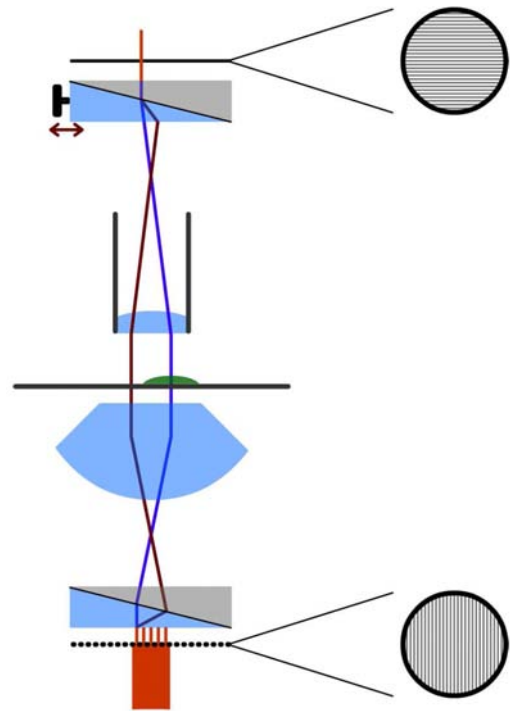
Bei einigen Mikroskopen (zB Zeiss) können das 2. Prisma und der Analysator auch zu einer Einheit zusammengefasst sein.



Durchlicht Interferenzmikroskop

Dieser Bautyp entspricht der bisher besprochenen Anordnung mit 2 Polfiltern und 2 Prismen; das Objekt wird vom Licht durchstrahlt.

In der Biologie und Medizin hat sich so gut wie nur die Durchlichtinterferenzmikroskopie durchgesetzt.



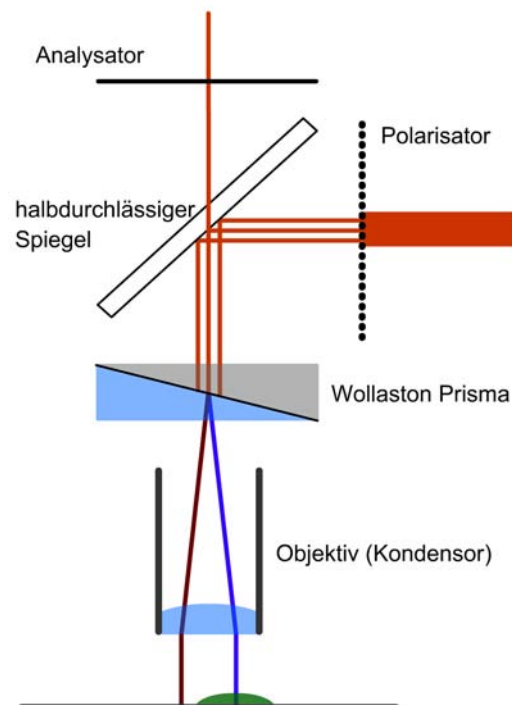
Auflicht Interferenzmikroskop

Bei dieser Bauart wird das Präparat von oben beleuchtet, dabei dient das Objektiv gleichzeitig auch als Kondensator. Es wird daher auch nur ein einziges Wollaston Prisma benötigt, welches sich oberhalb des Objektivs befindet.

Das Prisma spaltet das polarisierte Licht auf; nach Passieren des Objektivs (dient zuerst als Kondensator) verlaufen die beiden Strahlen parallel und räumlich etwas versetzt.

Vom Objekt reflektierte Strahlen werden vom Objektiv wieder aufgefangen und anschließend vom gleichen Prisma wie zuvor wieder zusammengeführt.

Durch einen halbdurchlässigen Spiegel kann das reflektierte Licht zum Analysator und damit zur Interferenz gelangen.



2.5.5 Einstellung des Interferenzkontrastes

- Wie auch bei den anderen Kontrastverfahren wird das Objekt zuerst im Hellfeld eingestellt und auch die Köhlersche Beleuchtung justiert.
- Anschließend werden die beiden Polfilter in Kreuzstellung sowie die beiden Prismen in den Strahlengang gebracht. Hier sind die Unterschiede zwischen den Bauarten zu beachten!!

Abhängig vom Abbildungsmaßstab des Objektivs gibt es unterschiedliche Wollaston-Prismen (für schwach / mittel / starke Vergrößerungen) !!!!

Beim Einstellen ist daher immer darauf zu achten, dass die beiden Prismen mit dem Abbildungsmaßstab (und der N.A.) des Objektivs übereinstimmen!

- Zuletzt können durch Verändern des Gangunterschiedes der gewünschte Kontrast und Kanteneffekt eingestellt werden.
- Für ein optimales DIC Bild ist meist sehr viel Licht notwendig. Deshalb sind Forschungsmikroskope oft mit Bogenlampen ausgestattet, die auch für den DIC verwendet werden. Um eine Schädigung der Augen und des Objektes durch UV-Licht zu vermeiden wird in diesen Fällen ein Grünfilter verwendet. Dann ist allerdings nur mehr ein hell/dunkel Kontrast möglich.

2.5.6 Das Interferenzkontrast-Bild

Der Kontrast des Interferenzkontrast Bildes hängt vom eingestellten Gangunterschied sowie von der durch das Objekt verursachten Phasenverschiebung ab.

Im zweiten Prisma werden die beiden Strahlen, die das Objekt durchlaufen haben, wieder zusammengeführt. Dabei werden die erzeugten Bilder etwas gegeneinander verschoben, was als Bildverdopplung bezeichnet wird.

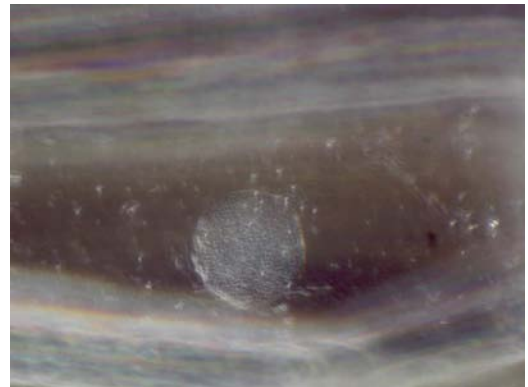
Bei einem Gangunterschied von $\lambda/2$ tritt der gegenteilige Effekt ein; man erhält einen hellen Hintergrund und zwei dunkle Kanten.

→ **positiver Kontrast**



Wird der Gangunterschied so eingestellt, dass die beiden Strahlen das Prisma **phasengleich** verlassen, so erscheint der Untergrund dunkel und zwei gegenüberliegende Kanten des Objektes hell.

→ **negativer Kontrast**



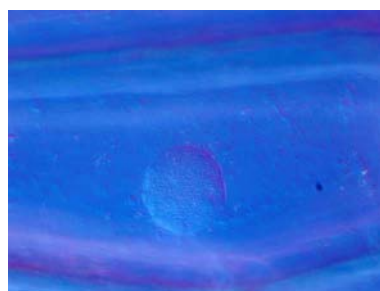
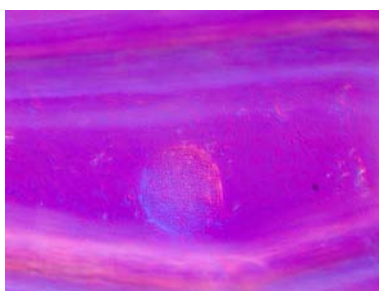
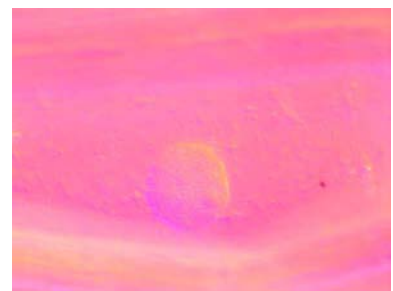
Durch Verstellen des Gangunterschiedes kann auch ein so genannter **Reliefkontrast** erzeugt werden. Dabei erscheint eine Kante des Objektes hell und die gegenüberliegende dunkel. Welche hell und welche dunkel ist hängt vom eingestellten Gangunterschied ab.



Bei einem Gangunterschied zwischen den beiden Strahlen von $\lambda/4$ erscheint beispielsweise die linke Kante hell und die rechte dunkel.

Bremst man nun den beschleunigten Strahl so weit ab, dass er dem anderen um $\lambda/4$ nachläuft, so erscheint die zuvor helle Kante dunkel und umgekehrt.

Mit steigendem Phasenunterschied erreicht man über mehrere Graustufen das Weiß der I. Ordnung und in weiterer Folge Interferenzfarben von gelb über rot bis blau.



2.5.7 Kontrast-Probleme

Um im DIC an Kanten im Präparat einen Kontrast zu erhalten muss es zu einer Änderung des Gangunterschiedes kommen. Und zwar zwischen dem Strahl der durch das Objekt verläuft und dem, der nur das Umgebungsmedium passiert.

Ein optimaler Kontrast ist daher nur an Kanten zu sehen, die eine bestimmte Orientierung besitzen. Für eine optimale Beobachtung aller Strukturen ist daher ein drehbarer Objektstisch von Vorteil, auf dem das Präparat nach allen Richtungen gedreht werden kann.

Extrem senkrecht stehende Kanten bleiben allerdings immer kontrastlos.

Vor allem mit dem Reliefkontrast sind sehr eindrucksvolle Bilder zu erzielen. Bei der Interpretation dieser Bilder ist jedoch Vorsicht geboten, denn einem reliefartiges Aussehen im DIC muss nicht unbedingt ein reliefartiger Aufbau des Präparates zugrunde liegen!!!!

2.5.8 Anwendungsbereiche

Beim Interferenzkontrast erreicht man auch bei weit geöffneter Aperturblende und damit hoher Auflösung immer noch ausreichenden Kontrast. Der DIC eignet sich daher ähnlich dem Phasenkontrast für dünne und transparente **Phasenobjekte** sowie für **fibrilläre Strukturen** wie etwa Geißeln.

Im Gegensatz zum Phasenkontrast können im DIC auch **optische Schnitte** gemacht werden. Das heißt es werden einzelne Schichten des Objektes durch Verstellen des Feintriebels nacheinander untersucht. Der DIC kann daher auch bei dickeren Präparaten verwendet werden.

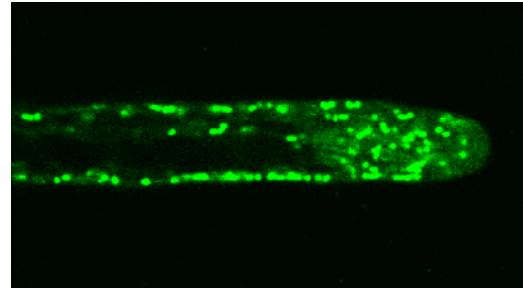
Durch die stufenlose **Einstellmöglichkeit des Kontrastes** können einerseits Objekte untersucht werden, die selbst nur eine extrem **geringe Phasenverschiebung** erzeugen (zB Plasmastränge), aber auch Objekte die sehr dick oder gefärbt sind und daher eine **starke Phasenverschiebung** erzeugen. Die Verwendung eines Phasenkontrastes wäre bei solchen Objekten nicht immer möglich.

Sehr schwache Farbtöne können mit Hilfe des **Amplitudenkontrastes** verstärkt werden. Dieses Verfahren findet oft bei sehr **schwachen Vitalfärbungen** oder histochemischen Reaktionen Verwendung. Außerdem lässt sich damit die Apertur des Objektivs voll ausnutzen, da mit weit offener Aperturblende gearbeitet werden kann.

3 Fluoreszenz

Die Fluoreszenzmikroskopie ist in der Biologie und Medizin ein sehr wichtiges Werkzeug, da sich mit ihr auch noch Strukturen darstellen lassen die weit unter der Auflösungsgrenze liegen.

Darüber hinaus lassen sich mit Hilfe von spezifischen Färbungen in der Fluoreszenz bestimmte Strukturen genau identifizieren und lokalisieren oder Funktionen in der Zelle analysieren.



Wurzelhaar – DIOC Färbung

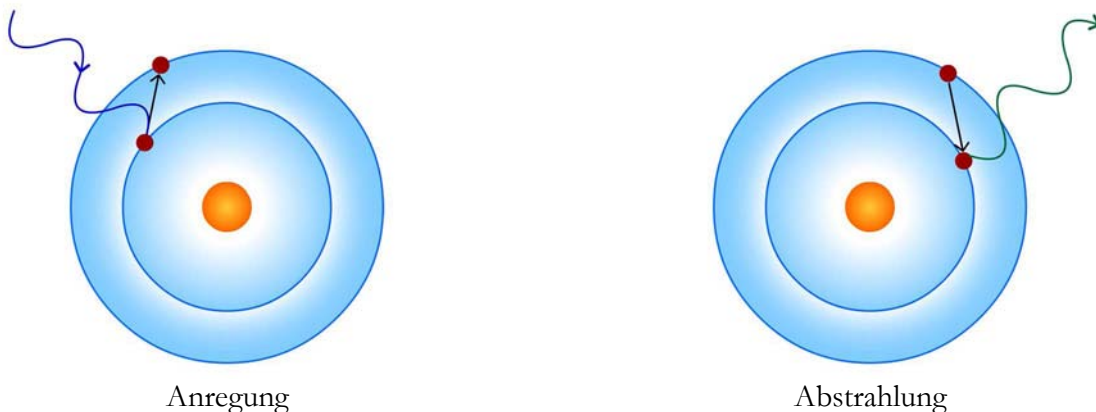
Wie in der Dunkelfeld-Mikroskopie werden kleinste Strukturen durch hohen Kontrast dargestellt; das Vorhandensein von sehr kleinen Strukturen wird durch ein Aufleuchten, also mittels negativem Kontrast, nachgewiesen. Dadurch werden auch Strukturen unter der Auflösungsgrenze sichtbar. Für diese so genannten „Selbstleuchter“ gilt daher die Abbe'sche Formel für die Auflösung nicht!

Aus diesem Grund ist es sehr schwierig festzustellen wie groß Strukturen die in der Fluoreszenz beobachtet werden wirklich sind, da sie größer als real abgebildet werden!!!

3.1 Was ist Fluoreszenz?

Als Fluoreszenz wird die spontane Emission von Licht bezeichnet, die beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems zurück in einen Zustand niedrigerer Energie erfolgt. Dies geschieht, wenn Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge) zum Beispiel auf ein Molekül trifft. Dabei werden Photonen absorbiert und Elektronen des Moleküls in ein energetisch höheres Orbital gehoben, also angeregt. Fallen sie von dort auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, wird die freiwerdende Energie als Wärme und Photonen (Fluoreszenzlicht) abgegeben.

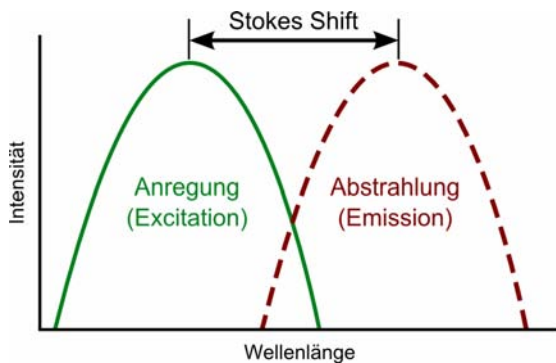
Dabei werden Elektronen von Doppelbindungen leichter angeregt, weil die p-Elektronen der Doppelbindung über beide Atome verteilt und daher nicht so stark gebunden sind. Besonders gut geeignet für die Fluoreszenz sind Moleküle mit konjugierten Doppelbindungen; hier sind die Elektronen über mehrere Atome verteilt und so sehr leicht anzuregen.



3.1.1 Stokes Shift

Aufgrund der Aufteilung der abgegebenen Energie in Wärme und Licht ist das abgestrahlte Fluoreszenzlicht immer längerwelliger, also energieärmer, als das Anregungslicht. Dieser Zusammenhang wird nach seinem Entdecker **Stokessche Regel** genannt.

Die Verschiebung der Abstrahlungs- zur Anregungswellenlänge beträgt in etwa 20 - 50 nm. Diese Differenz der beiden Wellenlängen wird als Stokes-Differenz (**STOKES SHIFT**) bezeichnet.



Anregung	Abstrahlung
UV	Blau / Grün / Gelb / Rot
Blau	Grün / Gelb / Rot
Grün	Gelb / Rot

3.1.2 Phosphoreszenz

Die Phosphoreszenz ist ebenso wie die Fluoreszenz eine Luminiszenz, also ein kaltes Leuchten. Sie unterscheidet sich von der Fluoreszenz aber in der Dauer des Leuchtens. Während die Lichtabgabe bei der Fluoreszenz schon innerhalb von Sekundenbruchteilen nach Ende der Anregung aufhört, kann sie bei der Phosphoreszenz bis zu einigen Stunden andauern.

Phosphoreszierende Materialien sind meist Kristalle mit einer geringen Beimischung eines Fremdstoffes, der die Gitterstruktur des Kristalls stört.

3.2 Fluorochrome

Als Fluorochrome werden Moleküle bezeichnet, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren, und einen Teil des absorbierten Lichts als längerwellige Strahlung wieder abgeben.

Farbe und Intensität des emittierten Lichts sind charakteristische Eigenschaften des jeweiligen fluoreszierenden Moleküls.

In der Fluoreszenz-Mikroskopie können im wesentlichen zwei Arten von Fluorochromen unterschieden werden.

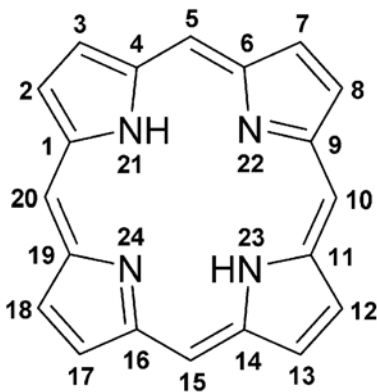
- Primärfluoreszenz (Autofluoreszenz)
- Sekundärfluoreszenz (Fluorochromierung)
 - Fluoreszenzfarbstoffe
 - Immunofluoreszenz
 - Green Fluorescent Protein

3.2.1 Primärfluoreszenz (Autofluoreszenz)

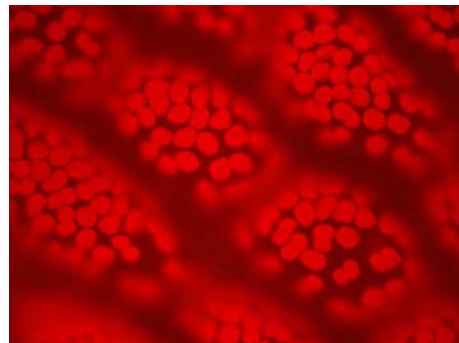
Einige Objekte fluoreszieren bei der Anregung mit meist kurzzeitigem Licht von sich aus, ohne dass weitere Präparationschritte notwendig sind.

Diese Primärfluoreszenz oder Autofluoreszenz tritt häufig bei Strukturen auf die viele konjugierte Doppelbindungen enthalten, wie dies zum Beispiel bei Ringstrukturen der Fall ist.

Der grüne Blattfarbstoff **Chlorophyll** ist ein sehr charakteristischer Vertreter für Primärfluoreszenz; Chlorophyll ist aus einem Porphyrin Ring mit zahlreichen Doppelbindungen aufgebaut und zeigt bei Anregung mit grünem Licht eine starke rote Fluoreszenz.



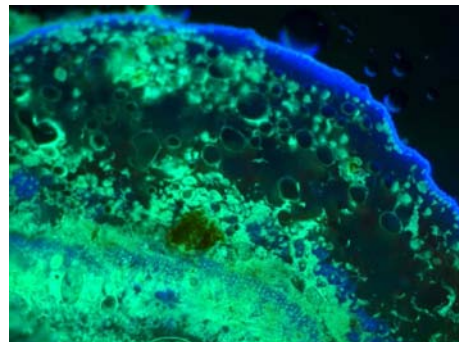
Struktur – Porphyrin Ring



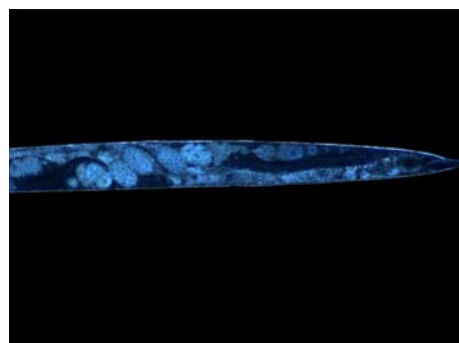
Moos Chloroplasten - grün Anregung

weitere Beispiele:

- Harze
- Öle
- Cuticula
- Lignin
- phenolische Inhaltsstoffe
- ...



Eucalyptus Blattquerschnitt – UV Anregung



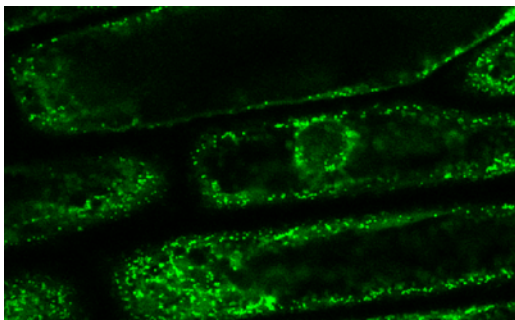
Nematode Lebendpräparat – UV Anregung

3.2.2 Sekundärfluoreszenz (Fluorochromierung)

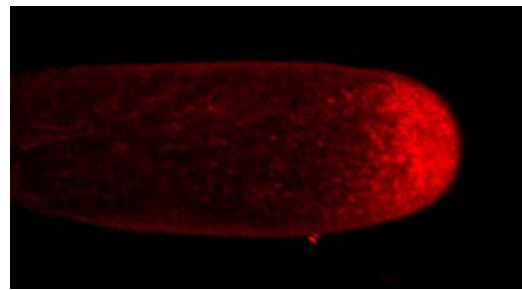
Um Strukturen ohne Primärfluoreszenz mittels Fluoreszenz darstellen zu können, müssen diese mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden; man spricht von **Fluorochromierung**.

Durch den starken Kontrast in der Fluoreszenz ist meistens eine sehr geringe Konzentration des Farbstoffes ausreichen um ein gute Färbung zu erhalten; Fluoreszenzfarbstoffe sind daher für die Zellen oft schonender als Hellfeldfarbstoffen.

Zur Fluorochromierung können **natürliche oder synthetisch** hergestellte Farbstoffe verwendet werden. Unabhängig davon müssen sie, wie alle anderen Farbstoffe auch, **spezifisch an Strukturen binden oder sich selektiv in bestimmten Kompartimenten anreichern**.



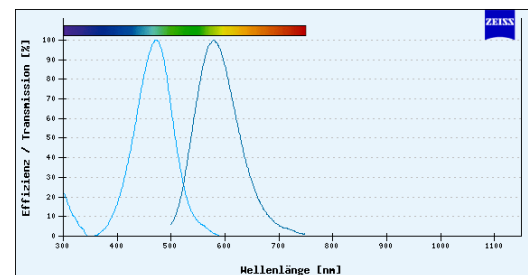
Zwiebel Lebendpräparat – DIOC Färbung



Wurzelhaar Lebendpräparat – FM1 Färbung

Jeder Farbstoff hat charakteristische Anregungs- und Emissionswellenlängen, die bei der Einstellung des Fluoreszenz-Mikroskopes beachtet werden müssen. Die genauen Spektren eines Farbstoffes sind im Datenblatt der Erzeugerfirma zu finden.

Die weitere Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen entspricht im Wesentlichen der von Hellfeldfarbstoffen.
→ siehe Grundlagen / Färbung



FM1-43 - Anregungs- und Emissionsspektrum

einige Farbstoffe

- DAPI DNA
- DIOC Mitochondrien, ER
- FM Plasmamembran und Endocytosevesikel

3.2.3 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz oder Antikörperfärbung ist eine vielseitig einsetzbare Methode, bei der ein bestimmtes Protein mit Hilfe eines **Antikörpers (Immunglobulin)** markiert und mit einem Farbstoffmolekül sichtbar gemacht wird.

Mit dieser Methode lassen sich Proteine und damit spezifische Strukturen in Zellen und Geweben genauer lokalisieren als dies mit organellenspezifischen Farbstoffen möglich wäre.

Aufgrund der Größe der Antikörper müssen die Membranen der Zellen permeabilisiert, also durchlässig gemacht werden, um ein Eindringen zu ermöglichen. Daher kann nur mit fixierten, toten Zellen gearbeitet werden.

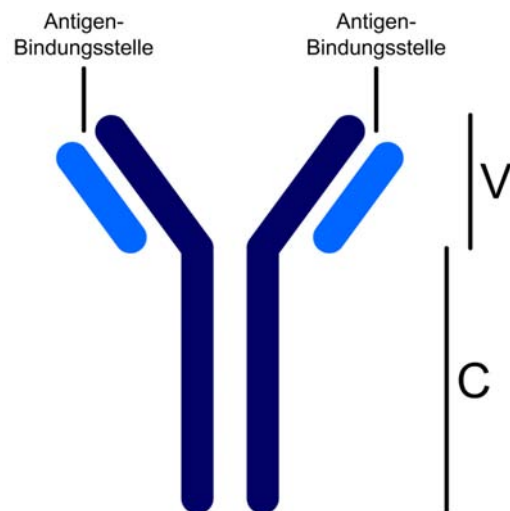
Ein weiterer Nachteil liegt in der sehr aufwendigen Präparation, die oft mehrere Tage in Anspruch nimmt, sowie in der Gefahr der Artefaktbildung durch unspezifische Bindung der Antikörper.

3.2.3.1 Antikörper & Antigene

Antikörper sind Proteine die vom Immunsystem des Körpers (durch B-Zellen) als Reaktion auf fremde Makromoleküle (Antigene) gebildet werden.

Antikörper bestehen aus **2 schweren Ketten** (~440 AS) und **2 leichten Ketten** (~220 AS).

Die **C-Region** ist bei allen Antikörpern sehr ähnlich, die **V-Region** hingegen ist äußerst variabel und bildet die spezifische Bindungsstelle für das Antigen. Sodass jeder Antikörper zwei Antigene erkennen und binden kann.



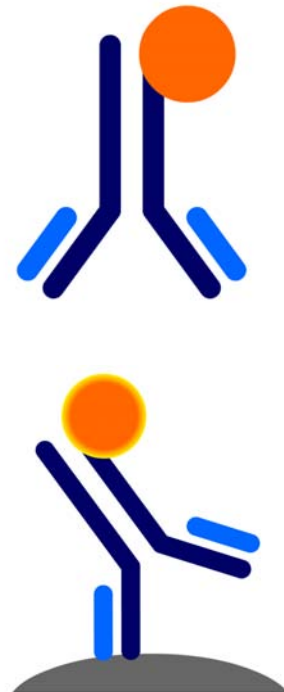
Der Nachweis eines bestimmten Proteins mittels Immunfluoreszenz beruht also auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Durch eine starke Affinität des **Antikörpers** zu einem bestimmten Bereich (**Epitop**) des Proteins (**Antigen**) kommt es im Idealfall zu einer sehr spezifischen und starken Bindung zwischen dem Antikörper und dem Antigen.

3.2.3.2 direkte Immunfluoreszenz

Bei der direkten oder primären Immunfluoreszenz wird der spezifische Antikörper für das zu untersuchende Protein mit dem **Fluorochrom** gekoppelt.

Werden die markierten Antikörper auf die Probe aufgebracht so binden sie nur spezifisch an den **gesuchten Proteinen (Antigenen)**; nicht gebundene Antikörper lassen sich wieder auswaschen.

Im Fluoreszenzmikroskop können die gebundenen Antikörper über ihren gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen und so das gesuchte Protein lokalisiert werden.



3.2.3.3 indirekte Immunfluoreszenz

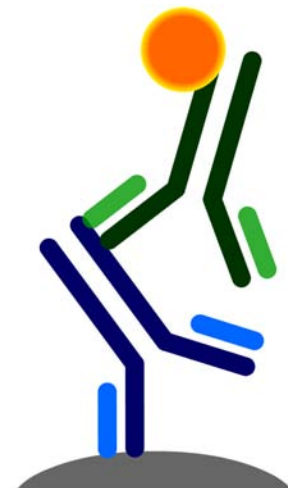
Der **Epitop spezifische Antikörper**, der an das zu untersuchende Protein bindet, ist in der indirekten Immunfluoreszenz unmarkiert, also nicht mit einem Fluorochrom versehen.

Die „Färbung“ erfolgt in einem zweiten Schritt, bei dem ein **zweiter markierter Antikörper** auf die Probe aufgebracht wird der spezifisch an den ersten Antikörper bindet.

Beispiel:

- **1. Antikörper / Rat – Anti Tubulin**
Antikörper gegen Tubulin, erzeugt in einer Ratte.
- **2. Antikörper / Goat – Anti Rat fluoreszenzmarkierter** Antikörper gegen Ratte, erzeugt in einer Ziege

Bei einer Negativprobe wird der 1. Antikörpers weggelassen; damit kann getestet werden, ob der fluoreszenzmarkierte 2. Antikörper auch unspezifisch im Präparat bindet.



Die fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper können für alle in einem Tier produzierten Antikörper verwendet werden. Ein Ziegen Serum gegen Ratte reagiert zum Beispiel mit alle primären Antikörpern, die in Ratten produziert wurden.

Daher ist es bei dieser Methode nicht notwendig, unter hohem Produktions- und Kostenaufwand für jedes Antigen einen eigenen fluoreszenzmarkierten Antikörper herzustellen. Zusätzlich sind hier auch Blindproben möglich, mit denen man die unspezifische Bindung des Antikörpers testen kann.

Im täglichen Laborbetrieb ist die indirekte Immunfluoreszenz daher wesentlich flexibler und auch kostengünstiger.

3.2.3.4 Gewinnung von Antikörperseren

Nach der Art von Antikörperseren können 3 Gruppen unterschieden werden:

- Polyklonale Antikörper
- Monoklonale Antikörper
- Synthetische Antikörper

Polyklonale Antikörper

sind eine Mischung von Antikörpern, die alle unterschiedliche Epitope eines Antigens erkennen, also an unterschiedlichen Bereichen des Proteins binden.

Das Protein, für das man einen Antikörper erzeugen möchte (zB Tubulin), wird einem Säugetier injiziert; dies sind zumeist Ratten, Mäuse oder Ziegen. Durch deren Immunreaktion werden Antikörper gegen dieses Protein gebildet. Die Antikörper werden dann aus dem Blutserum isoliert.

Monoklonale Antikörper

Diese Seren enthalten nur Antikörper, die alle an ein und dieselbe Stelle am Protein binden.

Wie für die Herstellung von Polyklonalen Antikörpern werden die Tieren durch Injektion des gewünschten Proteins zuerst immunisiert.

Anschließend werden ihnen aber B-Zellen aus Milz oder Lymphknoten entnommen und diese mit Krebszellen fusioniert, um ein ungebremstes Wachstum der B-Zellen zu erreichen.

Von diesen B-Zellen werden Zellkulturen angelegt, wobei von jeder ein Antikörper mit **einer** spezifische Bindungsstelle produziert wird. Aus den unterschiedlichen Zellkulturen werden nun jene selektiert, die Antikörper für das gewünschte Epitop erzeugen.

Synthetische Antikörper

Werden ohne Versuchstiere, also *in vitro* durch Mikroorganismen (zB *Escherichia coli*) hergestellt und sind ebenfalls monoklonal.

Die Diversität der Antikörper wird durch Rekombination in den V-Bereichen erzeugt.

3.2.3.5 Immunfärbung - Protokoll

Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung am Beispiel von Mikrotubuli in Wurzelspitzen

- Wurzelspitzen in einer Länge von etwa 2 mm entlüften und 10 Min in einen Cytoskelett stabilisierten Puffer einlegen.
- 30 Min. in 1,5 % Formaldehyd in gepufferter Lösung fixieren.
- 3x in Puffer waschen, insgesamt 15 Min.
- Zellwände in gepuffertem Medium mit 1% Zellulase und 1 % Pektinase 1 Std. abbauen.
- 3x in Puffer waschen, insgesamt 15 Min.
- Wurzelspitzen in Puffer auf Polylysin-beschichtete Deckgläser überführen. Quetschen. Fast abtrocknen lassen, damit sich die Zellen auf dem Polylysin absetzen können.
- Deckgläser für die folgenden Schritte in feuchte Kammern überführen.
- Membranen mit 0,2 % Triton X-100 in Puffer permeabilisieren, 40 Min.
- 3x in Puffer waschen, insgesamt 15 Min.
- Antikörper I (Antitubulin) 1 : 1.500, 24 Std.
- 3x in Puffer waschen, insgesamt 15 Min.
- Antikörper II (Fluoreszenzmarkiert) 3 %, 1 Std. bei 37° C.
- 6x in Puffer waschen, insgesamt 30 Min.
- Deckglas auf Objektträger, mit Vaseline umranden. Das Präparat ist im Dunklen einige Tage haltbar.

Um eine unspezifische Bindung der 2. Antikörpers auszuschließen muss auch eine Kontroll-Probe ohne 1. Antikörper gemacht werden.

Sollte es zu einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers kommen, können nach dem Auswaschen des Primärantikörpers die noch freien Bindungsstellen mit einem inerten Protein (zb BSA – Bovine serum albumin) abgesättigt werden.

3.2.4 Green Fluorescent Protein

Eines der heute wichtigsten Werkzeuge in der Zellbiologie ist das Green Fluorescent Protein (GFP).

Dieses aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende, grün fluoreszierende Protein wurde 1961 von [Osamu Shimomura](#) beschrieben. Bei Anregung mit blauem (oder UV-Licht) fluoresziert dieses Protein grün.

Seine enorme Bedeutung liegt in der Möglichkeit, Zellen und sogar ganze Organismen mit diesem GFP-Gen zu transformieren.

Dazu wird das GFP-Gen alleine oder mit beliebigen anderen Proteinen Gen-spezifisch fusioniert in die Zelle eingeschleust. Die Zelle produziert nun entweder das GFP alleine oder gemeinsam mit der Synthese des gekoppelten Proteins.



*Aequorea victoria*¹

Die Transformierung ist zwar sehr aufwendig, dafür ist die Präparation sehr einfach und die Zellen werden bei weitem weniger beeinflusst als durch Farbstoffe.

Mittlerweile gibt es Varianten des original GFP, die auch in anderen Farben fluoreszieren. Entsprechend sind sie auch benannt:

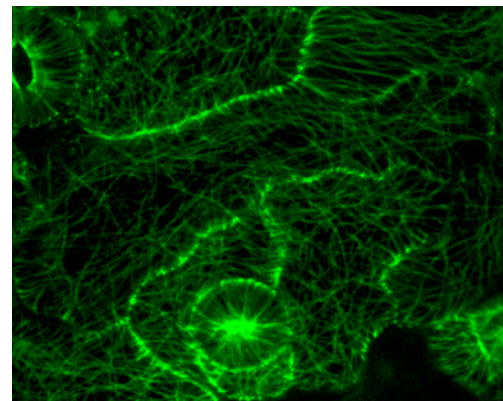
- Blue Fluorescent Protein - BFP
- Cyan Fluorescent Protein - CFP
- Yellow Fluorescent Protein - YFP

Immer mehr Bedeutung erlangen auch fluoreszierende Proteine aus Korallen.
zB Kaede aus der Steinkoralle *Trachypyllia geoffroyi*.

Durch die Fluoreszenz des GFP kann die räumliche und zeitliche Verteilung des gewünschten Proteins in **lebenden Zellen!!**, Geweben oder Organismen direkt beobachtet und analysiert werden.

Es lassen sich auf Vorgänge in der Zelle analysieren:

- Proteinproduktion
- Transport
- Sekretion
- Abbau
- etc.



Arabidopsis thaliana - GFP
Microtubule Associated Protein

¹ http://mabryonline.org/blogs/larkin/GFP%5CGFP_aequorea_victoria-1.jpeg



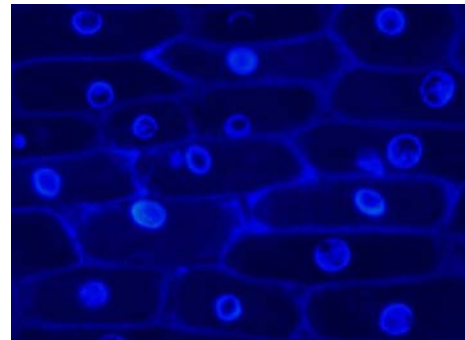
Ein und dieselbe Maus: Links unter blau Licht und rechts unter weißem Licht. ²

3.2.5 Anwendung von Fluorochromen

3.2.5.1 Identifizierung sichtbarer Strukturen

Strukturen, die zwar im auch im Hellfeld erkennbar sind, werden mittels spezifischer Farbstoffe oder Antikörper markiert und können so eindeutig identifiziert werden.

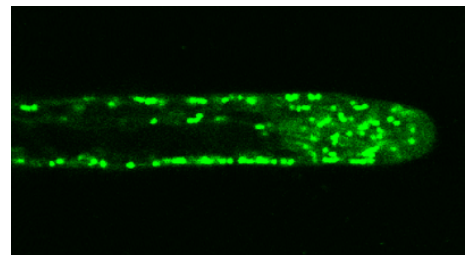
zB Zellkern, Plastiden, Vakuole, ...



Allium cepa - Zellkerne / DAPI Färbung

3.2.5.2 Lokalisierung und Identifizierung unsichtbarer Strukturen

Im Hellfeld nicht sichtbare Strukturen oder Strukturen unter der Auflösungsgrenze können durch Färbung mit Fluorochromen sichtbar gemacht und damit lokalisiert und auch identifiziert werden.



Wurzelhaar - Mitochondrien / DIOC Färbung

² <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP4.htm>

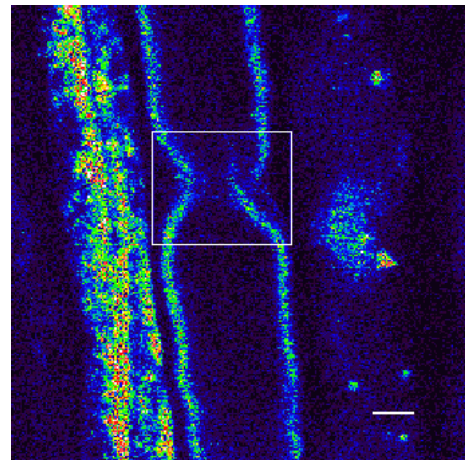
Zur Identifizierung und Lokalisierung von Organellen und anderen Strukturen stehen zahlreiche **organellenspezifische Farbstoffe** zur Verfügung:

- Kern
- Chromosomen
- Plastiden
- Mitochondrien
- Golgi-Apparat
- ER
- Ionenkanäle
- Plasmalemma
- Endozytose-Vesikel
- Tonoplast / Vakuole
- Zytoskelett
- Zellwand

3.2.5.3 Verfolgung physiologischer Vorgänge

Physiologische Vorgänge oder bestimmte Kompartimente können in der lebende Zelle mit Hilfe von speziellen Farbstoffen analysiert werden:

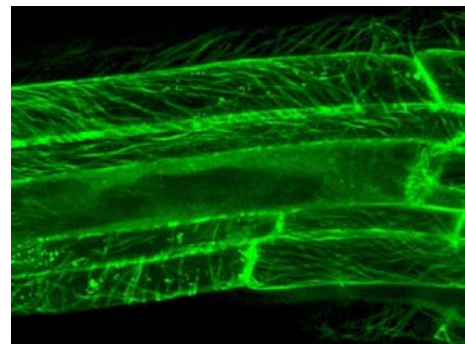
- Ionenfallen
- pH-sensitive Farbstoffe
- Ionenempfindliche Farbstoffe (zB für Ca)
- Enzymmarker
- Membranpotential-Indikatoren



Nervenfasern – Kalzium sensibler Farbstoff³

3.2.5.4 Gezielter Nachweis eines Proteins

Die Darstellung eines einzelnen Proteins ist in der Fluoreszenz durch die Verwendung einer Immunfärbung oder durch die Erzeugung eines GFP-Konstruktes möglich.



Arabidopsis thaliana - GFP
Microtubule Associated Protein

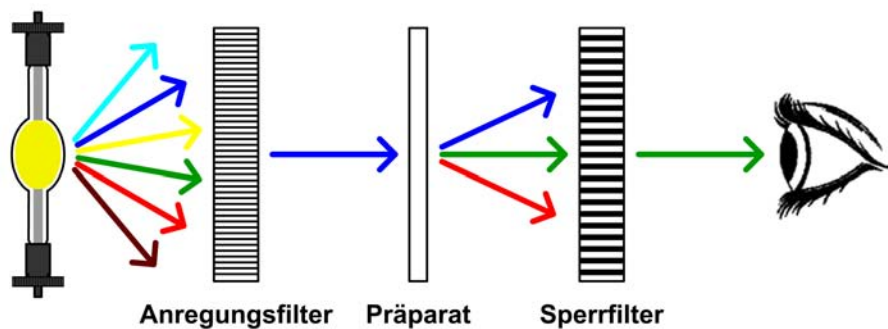
³ <http://www.physiol.usyd.edu.au/daved/papers/1998/calcium/images/fig7.gif>

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

3.3.1 Prinzip

In der Fluoreszenzmikroskopie steht man vor dem Problem, dass das emittierte **Fluoreszenzlicht** **meist nur sehr schwach** ist und vom wesentlich stärkeren Anregungslicht, also von der Beleuchtung des Mikroskops überstrahlt wird. Aus diesem Grund ist im normalen Hellfeld keine Fluoreszenz zu sehen.

Um die Fluoreszenz sichtbar zu machen muss das **Licht gefiltert** werden; dabei wird das durch die Stokesche Verschiebung längerwellige Fluoreszenzlicht vom kurzwelligen Anregungslicht getrennt.



Um möglichst nur die gesuchte Struktur anzuregen, verwendet man als Anregungslicht nur jenen Wellenlängenbereich, der dafür notwendig ist. Die gewünschte Farbe (UV, blau, grün, gelb, rot) wird durch Lichtfilter oder Prismen vom Licht der Lichtquelle herausgefiltert. Dieser Filter wird daher als **Anregungsfilter** oder **Excitation Filter** bezeichnet.

Jedoch entsteht auch bei Anregung mit einem sehr engen Wellenlängenbereich Fluoreszenz in mehreren Farben, außerdem wird auch nicht das gesamte Anregungslicht vom Präparat absorbiert und würde so auch die Fluoreszenz stören.

Um nur das gewünschte Fluoreszenzlicht zu erhalten wird das gesamte Licht nach dem Objektiv nochmals gefiltert. Dieser **Sperrfilter** oder **Barrier-Filter** lässt nur Licht der gesuchten Fluoreszenz-Wellenlänge passieren.

Welche Anregungs- und Emissionswellenlängen bei den Filtern gewählt werden, hängt vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff und der Autofluoreszenz des Objektes ab.

3.3.2 Technische Voraussetzungen

3.3.2.1 Lichtquelle

Die normalerweise in der Mikroskopie verwendeten Halogenlampen sind für den Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie nur bedingt geeignet.

Denn zum Einen ist für sehr viele Farbstoffe eine kurze Anregungswellenlänge oft im kurzen Blau oder im UV-Bereich notwendig. Das Spektrum von Halogenlampen reicht aber nur bis in den Blaubereich.

Zum anderen wird für die Fluoreszenzmikroskopie nur ein kleiner Teil des gesamten Spektrums zur Anregung verwendet. Um auch in diesen kleinen Wellenlängenbereichen noch genügend Helligkeit zu erreichen müssen die verwendeten Lampen eine hohe Lichtintensität aufweisen, was bei Halogenlampen nicht ausreichend ist.

Daher werden in der Fluoreszenz-Mikroskopie fast ausschließlich **Gasentladungslampen** verwendet. Diese besitzen eine hohe Lichtintensität und ein Wellenlängenspektrum, das bis in den UV-Bereich reicht.

WICHTIG!!!

Immer darauf achten, dass sich beim Mikroskopieren mit UV-Licht immer ein UV-SPERRFILTER im Strahlengang befindet, damit kein UV-Licht auf die Augen trifft!!!!!!

Um die Augen auch vor Streulicht zu schützen muss beim Arbeiten mit UV-Licht IMMER auch ein STREULICHTSCHUTZ am Mikroskop angebracht werden!!!!!!

Nach dem Arbeiten den UV-Anregungsfilter IMMER entfernen um nachfolgende Kollegen nicht zu gefährden!!!

3.3.2.2 Strahltrennung

Um das Fluoreszenzlicht optimal zu selektieren ist es wichtig, dass die verwendeten Filter auf die spezifischen Anregungs- und Emissionsspektren des fluoreszierenden Moleküls angepasst sind.

- In den meisten Fällen erfolgt die Filterung durch gefärbtes Glas. Dieses ist spezifisch durchlässig für bestimmte Wellenlängen. Grundsätzlich können dabei **Kantenfilter** und **Bandfilter** unterschieden werden.
- Eine Trennung von Wellenlängenbereichen ist auch mit **dichroitischen Spiegeln** möglich. Diese speziell bedampften Spiegel reflektieren bestimmte Wellenlängen und lassen andere durch.
- Filter und dichroitische Spiegel sind zwar exakt an Farbstoffe angepasst, aber sehr unflexibel. Eine variable Filterung des Lichtes ist mit **Prismen** oder **Beugungsgittern** möglich.

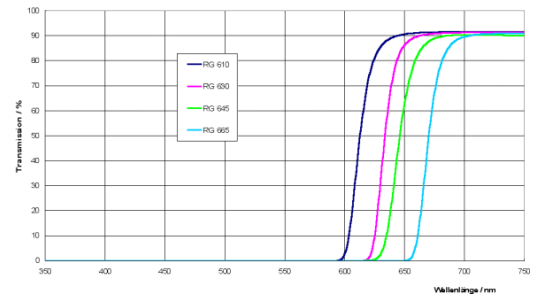
Bessere Mikroskope können mehrere Methoden zur Strahltrennung gleichzeitig und auf mehreren Kanälen anwenden.

Kantenfilter

Kantenfilter lassen ab einem bestimmten Wellenlängenbereich das gesamte Licht passieren.

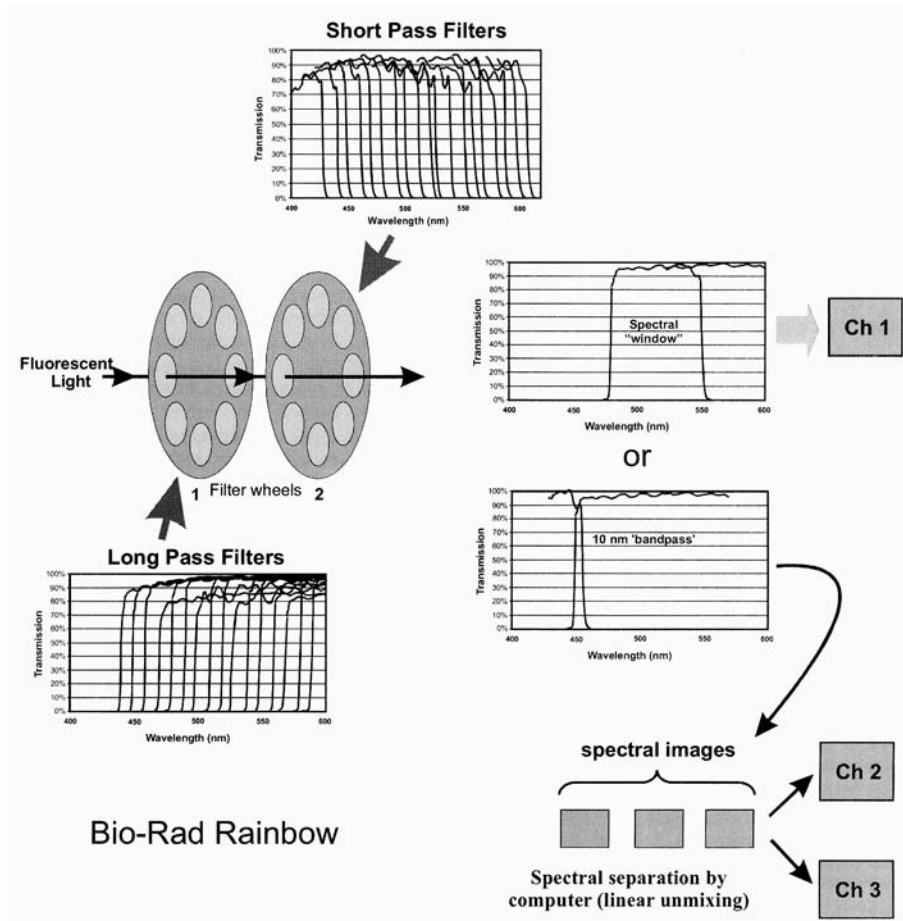
Unterschieden wird hier zwischen **Kurzpassfiltern (Short Pass Filters)** und **Langpassfiltern (Long Pass Filters)**

- Kurzpassfilter transmittieren kurzwellige Strahlung und blockieren langwellige.
- Langpassfilter lassen langwellige Strahlung passieren und blockieren kurzwellige.



verschiedene Langpassfilter ⁴

Durch die Kombination eines Kurz- und eines Langpassfilter kann ein bestimmter Wellenlängenbereich selektiert werden.



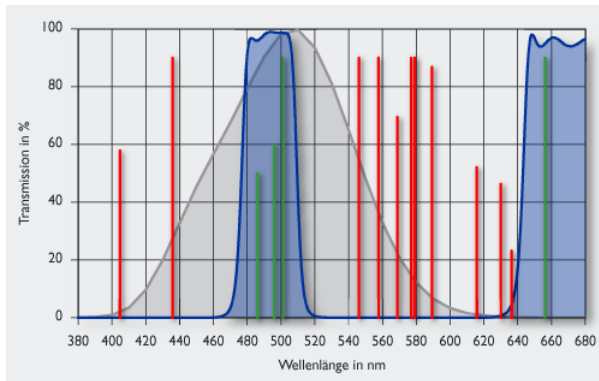
Filtersystem aus Kurz- und Langpassfiltern ⁵

4 http://www.reichmann-feinoptik.de/assets/images/autogen/a_RG_610_-_665.gif

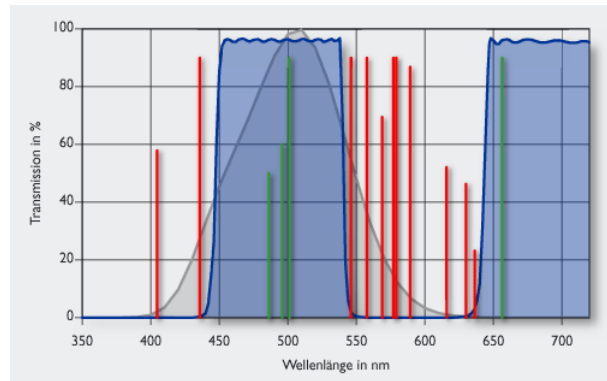
5 Hibbs, A. (2004). Concofocal Microscopy for Biologists. New York, Kluver Academic/Plenum Publishers.

Bandfilter

Bandfilter lassen Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches passieren und blockieren beidseitig das restliche Spektrum. Je nach der Breite des Wellenlängenspektrums das der jeweilige Filter passieren lässt, spricht man von **Schmalbandfiltern (Narrow Band Pass Filters)** (enges Spektrum) oder **Breitbandfiltern (Wide Band Pass Filters)** (breites Spektrum).



Schmalbandfilter⁶



Breitbandfiltern⁷

Mit Schmalbandfiltern erhält man einen engen Bereich um das Anregungs- oder Emissionmaximum des Farbstoffes und somit eine sehr genaue und spezifische Darstellung der gesuchten Struktur.

Durch den schmalen Wellenlängenbereich, der durchgelassen wird, kann es allerdings passieren, dass das erhaltene Signal nur sehr schwach und kaum wahrnehmbar ist.

In diesen Fällen ist auf Breitbandfilter zurückzugreifen, diese lassen einen weitaus breiteren Wellenlängenbereich passieren, was in einem stärkeren Signal resultiert. Bei einem breiten Bereich des Anregungsfilters besteht die Gefahr, dass auch andere Strukturen als die Gesuchten mit angeregt werden. Ein sehr breiter Sperrfilter hingegen könnte auch Licht passieren lassen, das nicht von der gesuchten Struktur stammt.

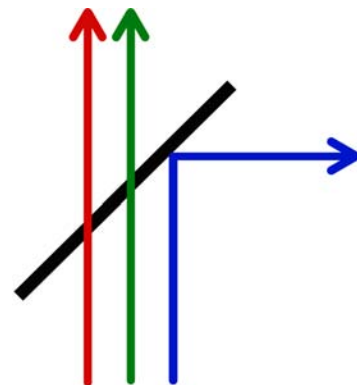
Um diese Fehler zu minimieren gibt es für die gängigsten Farbstoffe spezielle Filterkombinationen, mit denen man ein deutliches, aber trotzdem spezifisches Signal erhält.

Dichroischer Spiegel

Dichroische Spiegel bestehen aus speziell bedampftem Glas; sie reflektieren selektiv bestimmte Wellenlängen und lassen andere durch.

Wie bei den herkömmlichen Glasfiltern kann auch hier zwischen mehreren Arten der Filterung unterschieden werden.

- Kurzpass
- Langpass
- Schmalband
- Breitband



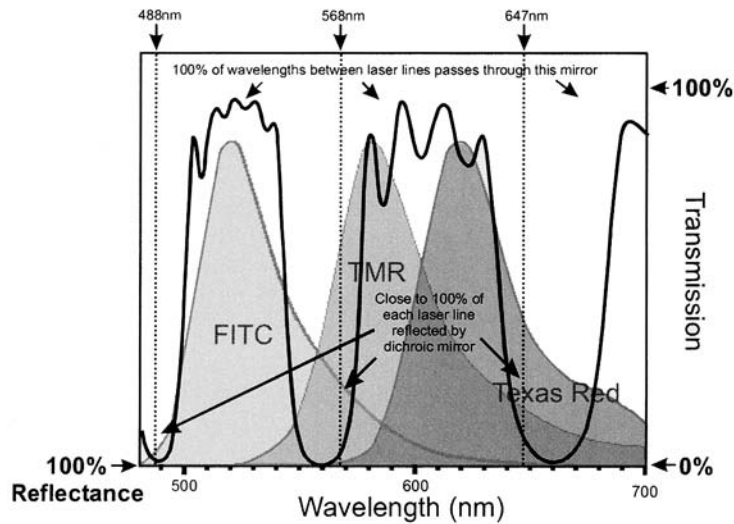
Schema eines dichroischen Langpass Spiegels

⁶ http://www.binoviewer.at/testberichte/images/astronomik_uhc_graph.gif

⁷ http://www.binoviewer.at/testberichte/images/astronomik_cls.gif

Allerdings kann bei der Strahlentrennung durch einen dichroischen Spiegel sowohl das reflektierte als auch das durchgelassene Licht weiterverwendet werden!!

Daher werden dichroische Spiegel vor allem in der Fluoreszenz-Mikroskopie als wellenlängenselektive Bauelemente eingesetzt.



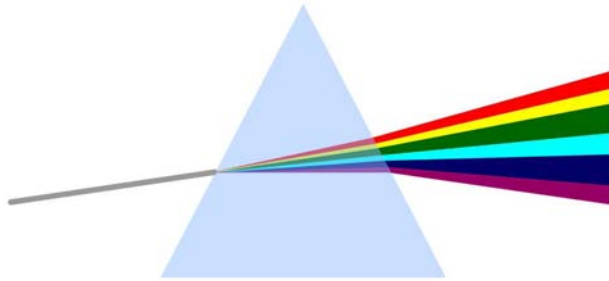
dreifach dichroischer Spiegel ⁸

!!! Die Spiegelflächen sind aufgrund ihrer Spezialbeschichtung extrem empfindlich und sollten NIEMALS gereinigt werden. Daher auch NIE mit den Fingern auf die Spiegelflächen greifen!!!

⁸ Hibbs, A. (2004). Concofocal Microscopy for Biologists. New York, Kluver Academic/Plenum Publishers.

Prismen & Beugungsgitter

Prismen und Beugungsgitter sind in der Lage, das einfallende Licht nach Wellenlängen aufzuspalten.

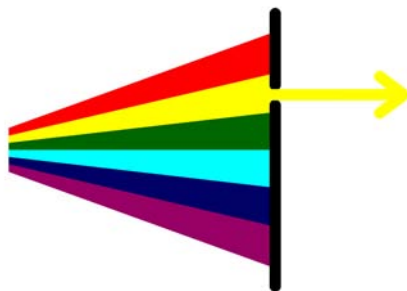


Prisma

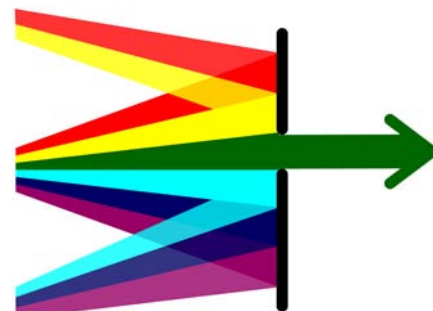


Beugungsgitter

Der gewünschte Spektralbereich wird dann über stufenlos verstellbare spiegelnde Spaltblenden ausgewählt. Die ausgeblendeten Bereiche werden somit nicht blockiert, sondern an der spiegelnden Fläche der Spaltblende reflektiert und können so noch weiter verwendet und gefiltert werden. Dies ermöglicht die gleichzeitige Detektion von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen.



schmalere Spektralbereich



breiter Spektralbereich - ausgeblendetes Licht wird reflektiert

Damit ist diese Methode wesentlich flexibler als Filter oder dichroische Spiegel und findet vor allem in der Konfokalen Mikroskopie bei λ -Scans und spektraler Farbstofftrennung Verwendung. Diese Analysen erfordern während der Aufnahme eine kontinuierliche Veränderung des Spektralbereiches und können mit Filtern oder dichroischen Spiegeln nicht durchgeführt werden.

Acousto Optic Tunable Filter (AOTF)

Ein AOTF ist ein akusto-optischer Kristall; er besteht aus einem optischen anisotropen Kristall aus Tellur-Dioxid, Lithium-Niobat oder Quarz, an den ein Piezokristall (acoustic transducer) gekoppelt ist.

AOTF werden hauptsächlich in der Konfokalen Laser Scan Mikroskopie eingesetzt, um Laserlicht unterschiedlicher Farben vom infraroten bis zum ultraviolettem Bereich zu sortieren.

Vorteile

- keine mechanische Beanspruchung wie bei Filtern
- keine Vibrationen wie bei mechanischen Filterrädern
- gleichzeitige Veränderung von Wellenlänge und Intensität mehrerer Laserquellen

Funktion

Durch Anlegen einer Radiofrequenz von 150-350 MHz an den Piezokristall erzeugt dieser eine Ultraschallwelle, die sich im Kristall fortsetzt.

Die Ultraschallwelle erzeugt im Kristall ein Brechungsindexgitter und Licht (meistens Laserlicht) einer bestimmten Wellenlänge wird gebeugt. In Abhängigkeit von der Frequenz der Schallwelle ändert sich auch die Wellenlänge des gebeugten Lichts.

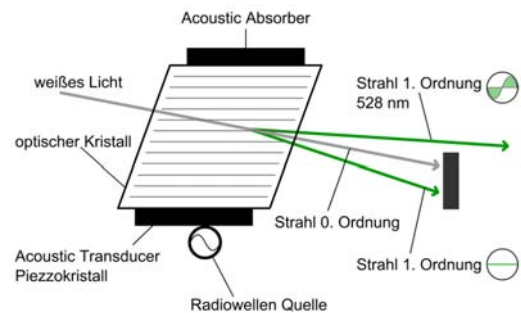
Die Intensität des gebeugten Lichtes lässt sich durch die Intensität der Schallwellen regeln.

Das einfallende Licht wird vom AOTF in einen Strahl 0. Ordnung (direkter Strahl) und in einen Strahl 1. Ordnung (gebeugter Strahl) aufgespalten.

Der Strahl 0. Ordnung geht direkt durch den Kristall und wird danach von einem so genannten „beam-stop“ absorbiert.

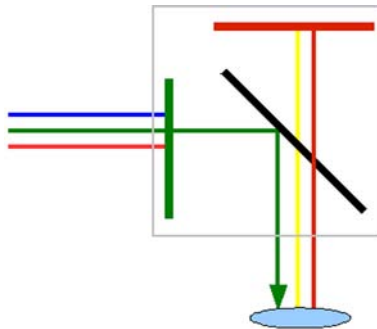
Das gebeugte Licht einer bestimmten Wellenlänge bildet zwei Strahlen 1. Ordnung, die in senkrecht aufeinander stehenden Ebenen polarisiert sind. Einer der beiden Strahlen wird ebenfalls vom „beam-stop“ absorbiert.

Der verbleibende Strahl wird für die Beleuchtung des Präparates in einen Lichtleiter eingekoppelt.



3.3.2.3 Spiegel-Filter-Würfel

Für die Auflichtfluoreszenz werden heute Anregungs- und Sperrfilter sowie dichroitische Spiegel in geeigneter Kombination als Würfel zusammengefasst verwendet.



Anregungsfilter

Dichroischer Filter

Sperrfilter

- vorne dichroischer Spiegel
- oben Sperrfilter
- hinten Anregungsfilter



Filterwürfel



Filterwürfel

- links Anregungsfilter
- oben Sperrfilter

Für die meisten Fluoreszenzfarbstoffe gibt es auch jeweils eigene Filterwürfel:

- die kritische Wellenlänge des dichromatischen Spiegels liegt dabei zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes.
- Die Filter grenzen den Wellenlängenbereich um die Anregungs- und Emissionswellenlänge ein (Schmalbandfilter oder Breitbandfilter).

!!! Die Spiegel- und Filterflächen sind aufgrund ihrer Spezialbeschichtungen extrem empfindlich und sollten nicht gereinigt werden. Daher auch NIE mit den Fingern auf diese Flächen greifen!!!

3.3.3 Bauarten

Hinsichtlich des Verlaufs des Anregungslichts im Mikroskop können 3 Arten von Fluoreszenz-Mikroskopen unterschieden werden.

- Durchlicht – Hellfeld
- Durchlicht – Dunkelfeld
- Auflicht

Für unterschiedliche Untersuchungen ist natürlich der eine oder andere Bautyp geeigneter. In den meisten Labors wird aber ein Auflichtfluoreszenz-Mikroskop, auch Epifluoreszenz-Mikroskop genannt vorhanden sein.

Für die Anregung mit UV-Licht sind keine speziellen Optiken aus Quarzglas notwendig, denn herkömmliches optisches Glas ist für das in der Fluoreszenz-Mikroskopie verwendete langwellige UV-Licht in ausreichender Weise durchlässig.

3.3.3.1 Durchlicht-Hellfeld

Bei der Durchlicht-Hellfeld-Fluoreszenz wird das Anregungslicht durch einen normalen **Hellfeldkondensator** ins Präparat geschickt. Der Anregungsfilter befindet sich vor dem Kondensator entweder zum Einschieben in den Strahlengang oder er wird einfach auf die Lichtaustrittsöffnung gelegt.

Nach dem Objektiv befindet sich ein Sperrfilter, um nur das gewünschte Fluoreszenzlicht herauszufiltern.

Bei dieser Methode wird das gesamte **Präparat vom Anregungslicht durchstrahlt** und somit in allen Ebenen Fluoreszenz angeregt.

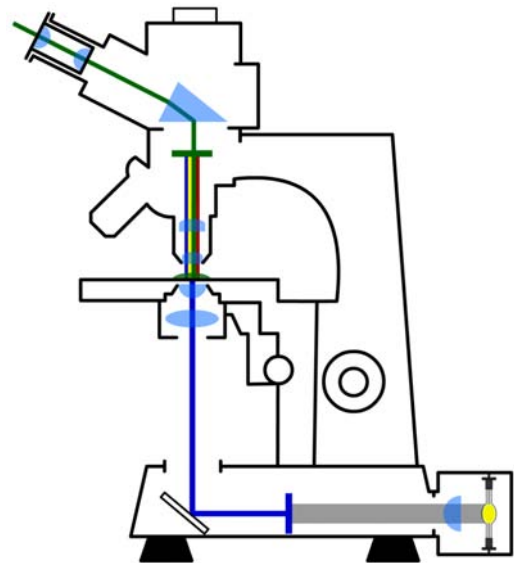
Dieses Fluoreszenzlicht, das nicht aus der Focusebene stammt, wird auch als **Streulicht** oder **out of focus – Licht** bezeichnet. Es bewirkt eine unspezifische Aufhellung des Bildhintergrundes.

Darüber hinaus werden fluoreszierende Strukturen außerhalb der Fokusebene werden unscharf abgebildet, was eine starke Unschärfe des gesamten Bildes bewirkt.

Bei der Durchlicht-Hellfeld-Fluoreszenz wird das Anregungslicht mit hoher Intensität auf das Präparat geschickt und so eine starke und helle Fluoreszenz erzeugt. Vom Sperrfilter kann aber dieses intensive Anregungslicht nicht zur Gänze absorbiert werden, wodurch es zusätzlich zur Aufhellung des Untergrundes und zu einem Kontrastverlust kommt.

Für schwache Vergrößerungen und sehr dünne Präparate ist diese Methode aber dennoch sehr gut geeignet, weil damit noch genügend Fluoreszenz erzielt wird, um ein akzeptables Bild zu bekommen.

Durchlicht-Hellfeld-Fluoreszenz lässt sich mit den passenden Filtern auch leicht provisorisch herstellen, indem der Anregungsfilter auf die Lichtaustrittsöffnung und der Sperrfilter auf das Okular gelegt wird.

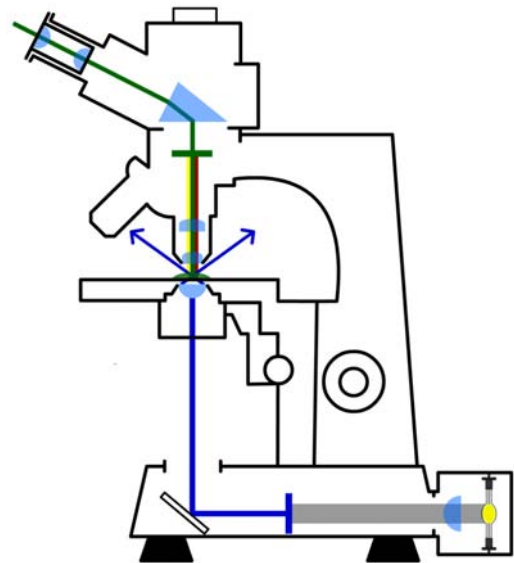


3.3.3.2 Durchlicht-Dunkelfeld

Durch die Verwendung eines **Dunkelfeldkondensors** ist die Intensität des Anregungslichtes zwar etwas geringer, dafür gelangt aber nur ein extrem kleiner Teil des Anregungslichtes direkt ins Objektiv.

Vom Sperrfilter kann dieses geringe Anregungslicht leicht absorbiert werden; man erhält einen schönen dunklen Untergrund und damit einen weit **besseren Kontrast** als in der Hellfeld-Durchlicht-Fluoreszenz.

Bei Durchlichtfluoreszenz-Verfahren ist für numerische Aperturen unter 0,6 das Dunkelfeld die bessere Methode.



Aufgrund des guten Kontrastes, den man durch den dunklen Untergrund erhält, können auch bei stärkeren Vergrößerungen noch gute Ergebnisse erzielt werden.

Da die Intensität des Anregungslichts durch den Dunkelfeldkondensator abgeschwächt wird, ist das Präparat keinen so starken Lichtintensitäten ausgesetzt und viele Fluoreszenzfarbstoffe bleichen auch nicht so schnell aus; daher können allerdings auch nicht ganz so starke Fluoreszenzintensitäten erreicht werden.

Durchlicht-Dunkeld-Fluoreszenz lässt sich mit den passenden Filtern und einem Dunkelfeldkondensator ebenfalls leicht provisorisch herstellen. Der Anregungsfilter wird dazu auf die Lichtaustrittsöffnung und der Sperrfilter auf das Okular gelegt.

3.3.3.3 Auflicht

Bei der Auflichtfluoreszenz wird das Objekt von oben **durch das Objektiv beleuchtet**, dieses dient daher gleichzeitig auch als Kondensator.

→ siehe auch Grundlagen/Mikroskop/Bauarten/Auflicht

Das Anregungslicht wird durch einen **dichroitischen Spiegel** in den Strahlengang eingekoppelt. Dieser ist spezifisch für jede Anregungswellenlänge; das Licht wird reflektiert und durch das Objektiv auf das Präparat gelenkt.

Das vom Präparat emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv wieder aufgefangen und kann anschließend den dichroitischen Spiegel passieren.

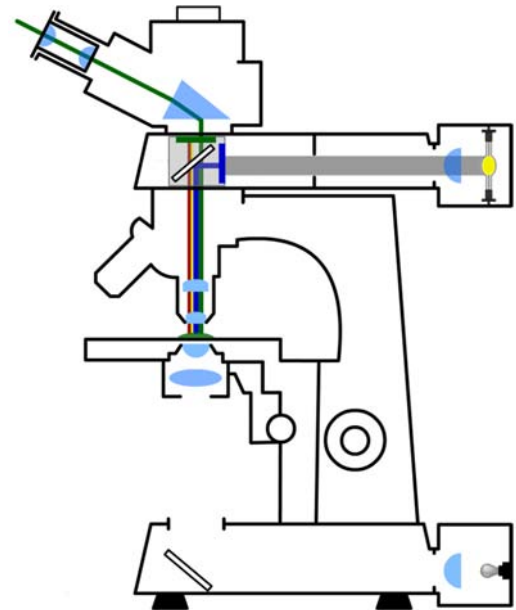
Vom Anregungslicht gelangt nur ein sehr kleiner Anteil zurück ins Objektiv, der Großteil davon wird vom dichroitischen Spiegel reflektiert und zur Lampe zurück gelenkt.

Vom Sperrfilter kann die geringe Menge an Anregungslicht, die noch durch den dichroitischen Filter gelangt, mühelos absorbiert werden, und man erhält einen schönen dunklen Hintergrund.

Vom Sperrfilter werden auch noch alle anderen unerwünschten Fluoreszenz-Wellenlängen absorbiert.

Durch die Beleuchtung des Objektes von oben dringt das Anregungslicht nur bis zur Focusebene ein und erzeugt daher auch nur bis dorthin Fluoreszenz. Somit kommt es im Vergleich zur Durchlicht-Fluoreszenz zu einer massiven **Reduktion von Streulicht**.

Grundsätzlich ist auch bei Auflichtfluoreszenz ein Dunkelfeldmodus möglich, diese Methode ist aber nicht sehr gebräuchlich und soll hier daher nur kurz erwähnt sein.



Fluoreszenz-Würfel

Für die unterschiedlichen Farbstoffe sind Anregungs- und Sperrfilter sowie dichroischer Spiegel in geeigneter Kombination als Würfel zusammengefasst.

Auf einer Schiebe- oder Drehvorrichtung lassen sich mehrere solcher Würfel im Mikroskop einbauen, was den Wechseln zwischen den verschiedenen Anregungswellenlängen erleichtert.



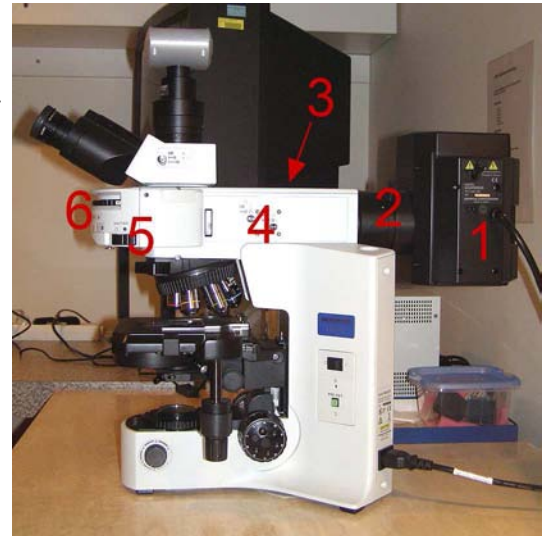
Filterwürfelrad

Aufrechte Epifluoreszenz-Mikroskope

Bei aufrechten Mikroskopen befinden sich die Filterwürfel mit dem dichroischen Spiegel zur Einkopplung des Anregungslichts in einem so genannten Fluoreszenzaufsatz.

Dieser Aufsatz wird auf den Tubusträger aufgesetzt und besteht aus:

- 1 Bogenlampe
- 2 Kollektor und Feldblende
- 3 Graufilter zur Regulierung der Lichtstärke
- 4 Aperturblende (bei neueren Modellen)
- 5 "Shutter" zum Unterbrechen des Lichtstrahls
- 6 Filterwürfel-Rad



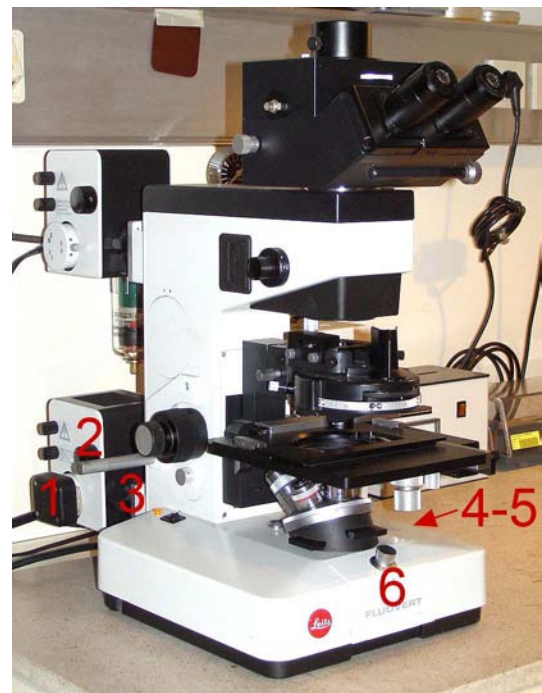
Aufrechtes Epifluoreszenzmikroskop

Inverse Epifluoreszenz-Mikroskope

Bei inversen Mikroskopen ist die Fluoreszenzeinrichtung direkt im Mikroskop integriert.

Das Filterwürfelrad ist unterhalb der Objektive eingebaut, die Bogenlampe befindet sich in einem eigenen Lampenhaus ebenfalls direkt am Stativ.

- 1 Bogenlampe
- 2 Kollektor
- 3 Graufilter zur Regulierung der Lichtstärke
- 4 Feldblende
- 5 "Shutter" zum Unterbrechen des Lichtstrahls
- 6 Filterwürfel-Schieber



Inverses Epifluoreszenzmikroskop

3.3.4 Einstellen der Fluoreszenzbeleuchtung

WICHTIG!!!

Immer darauf achten, dass sich beim Mikroskopieren mit UV-Licht immer ein UV-SPERRFILTER im Strahlengang befindet, damit kein UV-Licht auf die Augen trifft!!!!!!

Um die Augen auch vor Streulicht zu schützen muss beim Arbeiten mit UV-Licht IMMER auch ein STREULICHTSCHUTZ am Mikroskop angebracht werden!!!!!!

Nach dem Arbeiten den UV-Anregungsfilter IMMER entfernen um nachfolgende Kollegen nicht zu gefährden!!!

3.3.4.1 Durchlicht

Ist das Präparat sowie die Köhlersche Beleuchtung im Hellfeld korrekt eingestellt, können der Anregungsfilter und der Sperrfilter in den Strahlengang geschoben werden.

Der Verlauf der Fluoreszenzbeleuchtung ist hier ident mit der Hellfeldbeleuchtung und muss daher nicht separat gekühlt werden.

Um eine ausreichende Fluoreszenzintensität zu erhalten, muss die Halogenlampe voll aufgedreht werden. Bei sehr schwachen Fluoreszenzen wird es notwendig sein, statt der Halogenlampe eine Bogenlampe zu verwenden.

Die Fluoreszenzintensität wird durch Verändern der Anregungslichtstärke eingestellt. Bei Halogenlampen wird die Lichtstärke durch ein Potentiometer reguliert, bei Bogenlampen durch die Verwendung von Graufiltern.

Mit der Aperturblende im Kondensor bzw. im Objektiv kann störendes Streulicht reduziert werden, um ein klareres Fluoreszenzbild zu erhalten. Da es sich bei den fluoreszierenden Strukturen um Selbstleuchter handelt, ist der Auflösungsverlust durch Schließen der Aperturblende nicht so gewichtig wie beim Hellfeld.

AUHTUNG!!!

Beim Arbeiten mit UV-Anregung IMMER den STREULICHTSCHUTZ am Mikroskop anbringen!!!!!!



Streulichtschutz

3.3.4.2 Auflicht

Lichtquelle

Auflichtfluoreszenz-Mikroskope arbeiten normalerweise immer mit Gasentladungslampen, modernere Geräte auch mit LEDs.

Bei der Verwendung von Gasentladungslampen daher unbedingt auf die richtige und korrekte Handhabung achten!!!

Um eine Schädigung des Objektes zu vermeiden, muss der „Shutter“ immer geschlossen sein, wenn keine Fluoreszenzanregung erwünscht ist.



Shutter geschlossen

AUHTUNG!!!

Beim Arbeiten mit UV-Anregung IMMER den STREULICHTSCHUTZ am Mikroskop anbringen!!!!

Um eine optimale Fluoreszenzbleuchtung zu erhalten ist es notwendig, auch bei der Auflichtmikroskopie eine Köhlersche Beleuchtung einzustellen.

Da bei der Auflichtfluoreszenz das Objektiv gleichzeitig auch als Kondensator fungiert, ist eine Einstellung des Kondensors, wie in der Durchlichtmikroskopie nicht möglich.

Die Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung erfolgt in der Auflicht-Mikroskopie durch Zentrieren der Lampe selbst sowie durch Einstellen des Kollektors.

Zentrieren der Bogenlampe in der Auflichtfluoreszenz

Zuerst im Hellfeld bei kleiner Vergrößerung (10x) ein Objekt einstellen um die Präparatebene in die richtige Focusebene zu bringen.



Nun das Durchlicht abdrehen und das Präparat durch ein Stück weißes Papier ersetzen. Dabei darauf achten, dass die Höhe des Objektisches nicht verstellt wird.

Zum Zentrieren der Lampe einen Filterwürfel in den Strahlengang bringen (keine UV-Anregung) und den Shutter öffnen. Sollte das Licht zu grell sein einfach einen Graufilter einschieben.

Um das ganze Bildfeld zu sehen unbedingt die Feldblende ganz öffnen!!



Durch vor und zurück schieben des Kollektors mit einer Schraube am Lampenhaus kann das Abbild des Lichtbogens in der Präparatebene scharf gestellt werden.



Am Lampenhaus befinden sich auch Stellschrauben mit denen die Lampe horizontal (1) und vertikal (2) bewegt werden kann. Die Lampe nun so einstellen, dass der Lichtbogen zentriert im Bildfeld liegt.

Die Position des Lichtbogens muss öfters nachgestellt werden, da sie sich durch das Abbrennen der Elektroden fortlaufend verändert.



Zum Schluss wird der Kollektor in eine Position gebracht in der ein gleichmäßig ausgeleuchtetes und möglichst helles Bildfeld zu sehen ist und kein Abbild des Lichtbogens in der Präparatebene entsteht.



Einstellen des Präparates

Nach dem Einstellen Präparates im Hellfeld muss das „Durchlicht“ abgedreht werden!!

Nun können der Anregungsfilter und der Sperrfilter sowie der dichroitische Spiegel in den Strahlengang geschoben werden. Dies erfolgt durch Drehen oder Schieben des Filterwürfelrades/-schiebers auf die gewünschte Position.



Zur Reduktion von Streulicht steht bei älteren Auflichtfluoreszenzeinrichtungen oft nur die Aperturblende im Objektiv zur Verfügung.



Bei neueren Modellen befindet sich auch eine eigene Aperturblende (AS) im Strahlengang; damit können auch Objektive ohne Aperturblende für die Fluoreszenz verwendet werden!!

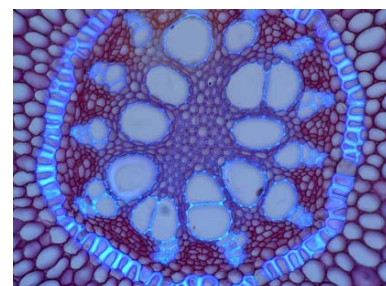
Der Auflösungsverlust durch das Schließen der Aperturblende ist hier nicht so gewichtig wie beim Hellfeld, da es sich bei fluoreszierenden Objekten um Selbstleuchter handelt und somit die herkömmliche Formel für die Auflösungsgrenze nicht gilt.



Blenden im Fluoreszenzaufsatz
 FS = Feldblende
 AS = Aperturblende

Bei Präparaten mit besonders starker Fluoreszenz kann das Fluoreszenzbild auch mit dem Hellfeldbild kombiniert werden.

Dazu wird einfach die normale Mikroskoplampe so stark aufgedreht, dass man zwar ein schönes Hellfeldbild erhält, aber die Fluoreszenz nicht überstrahlt.



Überlagerung von Hellfeld- und Fluoreszenzbild

3.3.5 Reduktion von „Out of Focus“ – Licht

Vom Anregungslicht wird Fluoreszenz mehr oder weniger im ganzen Präparat angeregt. Fluoreszenzlicht außerhalb der Fokusebene wird aber unscharf abgebildet. Dieses Streulicht wird als „**Out of Focus** – Licht“ bezeichnet. Es verursacht, besonders bei dicken Präparaten, eine starke Beeinträchtigung der Bildqualität.

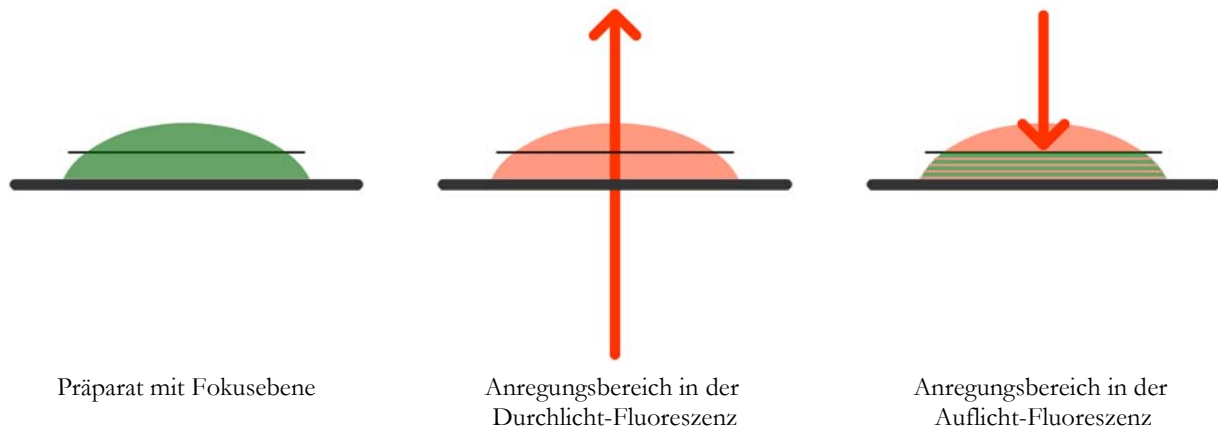
Eine Reduktion dieses *Out of Focus* – Lichtes kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden.

- Beleuchtung des Präparates (Mikroskoptyp)
- Blenden
- Konfokal-Mikroskopie
- Multiphotonmikroskopie
- OptiGrid (Konfokalssoftware)

3.3.5.1 Mikroskoptyp

Eine erste und massive Reduktion des *Out of Focus* Lichtes erreicht man durch die Verwendung eines Auflichtmikroskops anstelle eines Durchlichtmikroskops.

Da bei der Auflichtfluoreszenz das Präparat nicht mehr komplett vom Anregungslicht durchstrahlt wird, sondern nur bis zur Focusebene, entsteht auch nur bis dorthin Fluoreszenz und *Out of Focus* Licht.



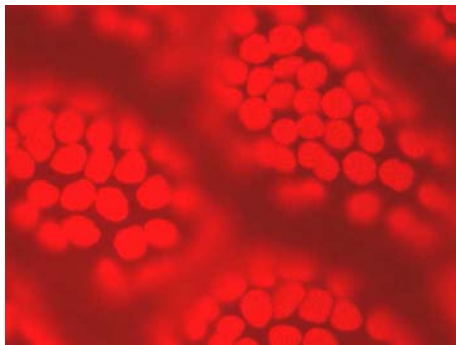
3.3.5.2 Blenden

Die einfachste Möglichkeit Streulicht, also Fluoreszenzlicht, das nicht aus der Focusebene des Bildfeldes stammt, zu reduzieren ist die Verwendung von Blenden.

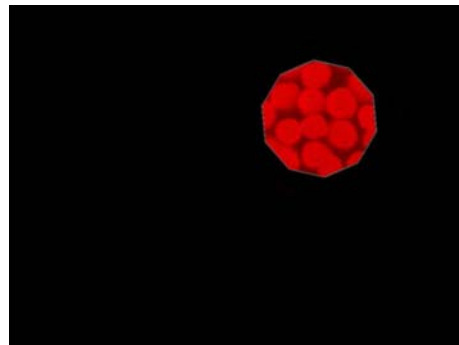
Feldblende

Mit der Feldblende kann der ausgeleuchtete Bereich auf das Bildfeld oder sogar nur auf einen kleineren Bereich, der von Interesse ist, eingeschränkt werden.

Damit wird nur ein sehr kleiner Bereich angeregt und Streulicht aus Bereichen außerhalb des Bildfeldes kann verhindert werden.



Feldblende offen



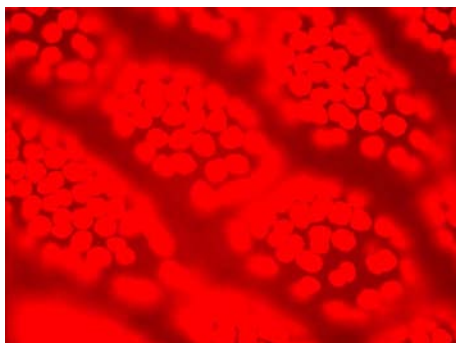
Feldblende zu

Aperturblende

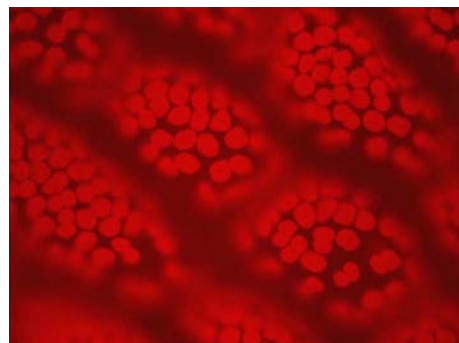
Durch Schließen der Aperturblende kann Streulicht aus dem Bildfeldbereich reduziert werden, wobei auch die Intensität des Fluoreszenzbildes abnimmt.

Bei neueren Fluoreszenzmikroskopen befindet sich eine eigene Aperturblende für die Auflichtbeleuchtung im Strahlengang; somit können auch Objektive ohne Aperturblende für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden!!

Bei älteren Mikroskopen ist in den meisten Fällen keine eigene Aperturblende vorhanden und man ist, vor allem bei stärkeren Vergrößerungen, auf die Verwendung von Objektiven mit Irisblende angewiesen.



Aperturblende offen
Fluoreszenz überstrahlt



Aperturblende geschlossen
keine Überstrahlung

3.3.5.3 Konfokal-Mikroskopie

Im Gegensatz zur normalen Fluoreszenzmikroskopie wird in der Konfokalmikroskopie das Präparat nicht von einem Lichtstrahl zur Gänze beleuchtet, sondern nur von einem Lichtpunkt streifenweise abgetastet.

Fluoreszenz wird daher immer nur an einem Punkt angeregt und so die Entstehung von Streulicht in den umliegenden Bereichen minimiert.

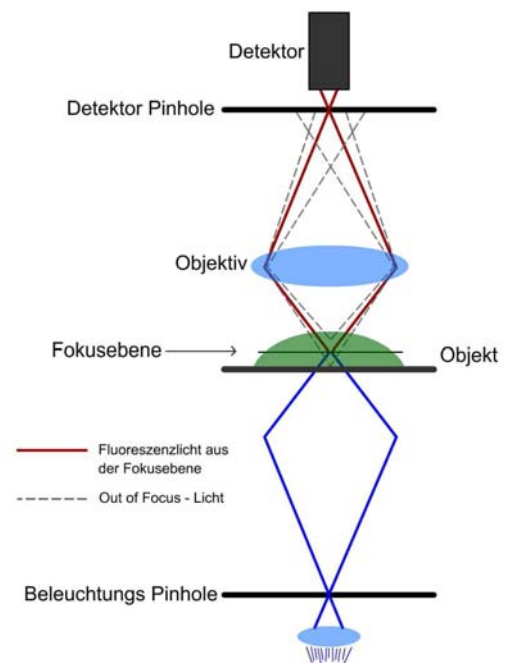


zeilenweise abgetastetes Bild

Bei Konfokal-Mikroskopen befindet sich vor dem Detektor, in der hinteren Brennebene, eine zusätzliche Blende, das „*Pinhole*“.

Dieses *Pinhole* blendet das *Out of Focus* – Licht, das ober- und unterhalb der Focusebene entsteht, aus. Durch diese Anordnung kann nur Licht aus der Focusebene den Detektor erreichen.

Durch die massive Reduktion von Streulicht wird eine sehr gute Auflösung auch auf der *Z*-Achse erreicht, dies ermöglicht die Durchführung von optischen Schnitten sowie eine 3D-Rekonstruktion des Objektes.



Grundprinzip der Konfokal-Mikroskopie

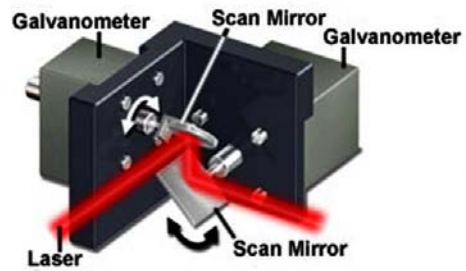
Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

Bei einem Konfokalen Laser-Rastermikroskop (CLSM) wird das Objekt, wie der Name schon sagt, von einem **Laser** abgetastet.

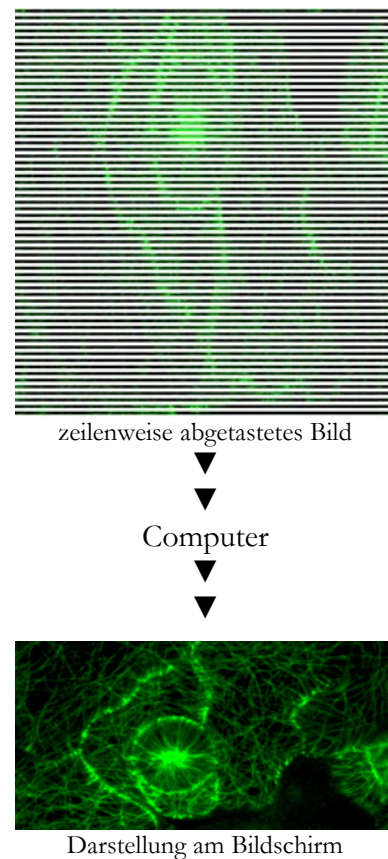
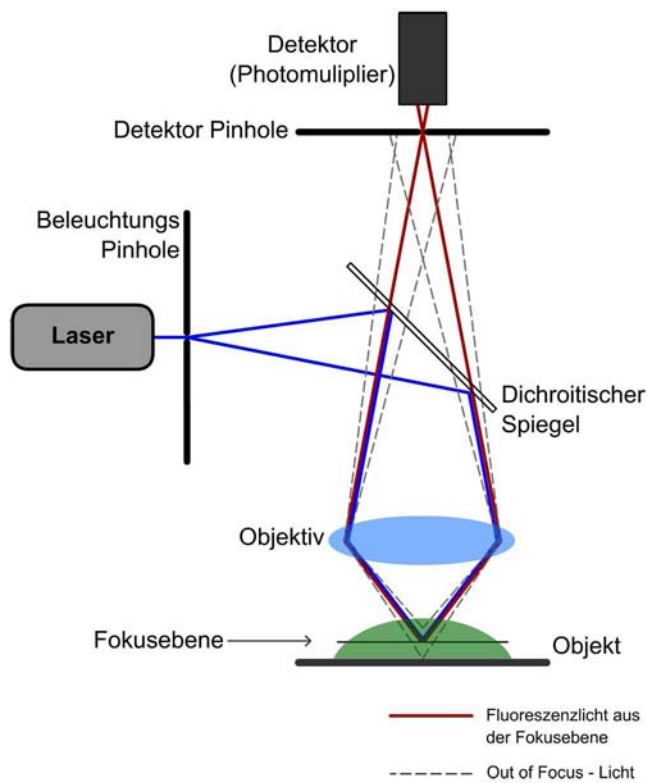
Über ein **bewegliches Spiegelsystem** (Scan-System) wird dabei der Laser Zeile für Zeile über das Präparat geleitet.

Das Fluoreszenzlicht wird von einem Detektor (Photomultiplier) aufgefangen und meistens an einen Computer weitergeleitet.

Das konfokale Bild kann durch den relativ langsamen zeilenweisen Aufbau nur auf dem Bildschirm betrachtet werden.



Scan-System eines CLSM ¹



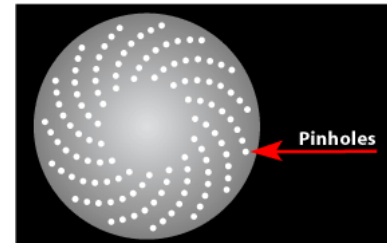
Schema eines Konfokalen Laser-Rastermikroskops

¹ <http://www.olympusconfocal.com/theory/images/scanningsystemsfigure5.jpg>

Nipkow-Disc

Da es sich bei Mikroskopen mit einer Nipkow-Disk ebenfalls um Konfokalmikroskope handelt, wird auch hier das Objekt wie beim CLSM abgescannt, in diesem Fall aber von vielen Lichtpunkten gleichzeitig.

Die Lichtpunkte werden durch eine **drehbare Scheibe mit spiralförmig angeordneten quadratischen Löchern (Pinholes)** erzeugt, der namensgebenden Nipkow-Disk.



Für die Beleuchtung können außer Lasern auch **Bogenlampen und Leuchtdioden** verwendet werden.

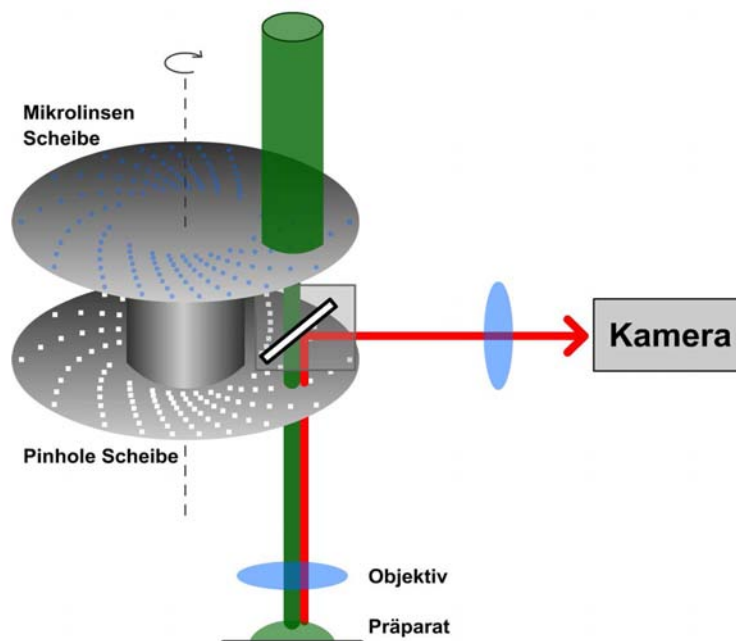
Die Beleuchtungs-Pinholes in der Scheibe dienen gleichzeitig auch als Detektor-Pinholes und blockieren das *Out Of Focus* Licht aus dem Präparat.

Ein Konfokalmikroskop mit Nipkow Disk hat den Vorteil, dass das Objekt simultan von sehr vielen Lichtstrahlen beleuchtet wird und daher der **Bildaufbau wesentlich schneller ist als beim CLSM**.

Durch den schnelle Bildaufbau ist zum einen eine **direkte Beobachtung durch die Okulare** möglich, zum anderen können auch sehr schnelle Vorgänge verfolgt werden, was mit einem CLSM nicht möglich wäre. Aus diesem Grund finden Mikroskope mit Nipkow Disk verstärkt im „Life Cell Imaging“ Verwendung.

Aufgezeichnet werden diese „Live-Bilder“ daher auch nicht über einen Photomultiplier sondern mit einer **CCD Video-Kamera**.

Der Nachteil liegt allerdings in der **fix definierten Größe der Pinholes**; Eine exakte Anpassung des *Pinhole* Durchmessers an das Objektiv bzw. an das Präparat ist nur durch Tausch der gesamten *Pinhole*-Scheibe möglich.



Schema eines Konfokalmikroskops mit Nipkow Disk

3.3.5.4 Multiphotonmikroskopie

Im Wesentlichen funktioniert die Multiphotonenmikroskopie genauso wie die herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie.

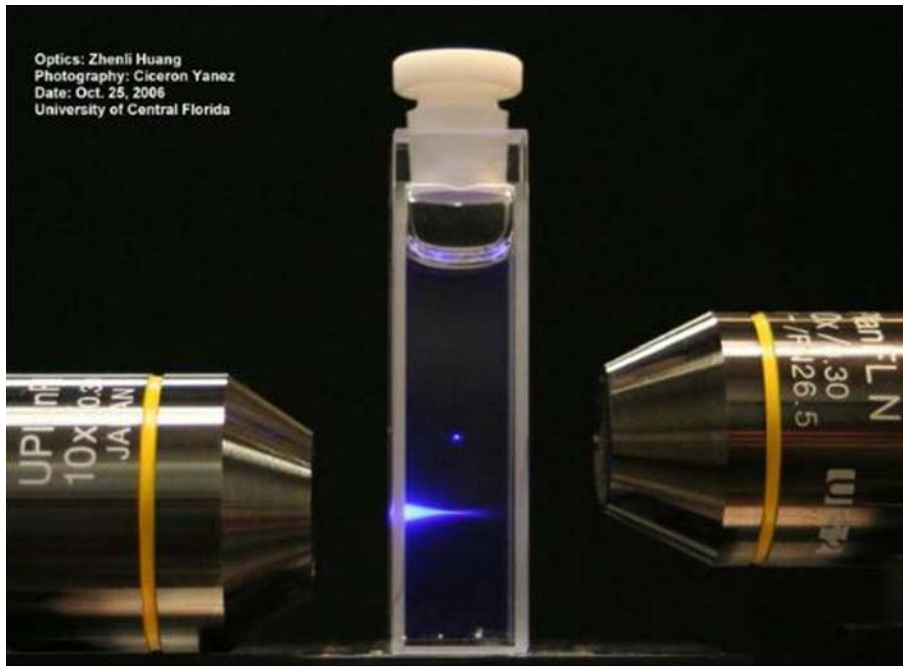
Nur erfolgt bei der normalen Fluoreszenzmikroskopie die Anregung durch 1 energiereiches kurzwelliges Photon, während bei der Multiphotonenmikroskopie die Anregungsenergie auf 2 oder 3 längerwellige Photonen aufgeteilt wird. Diese Photonen besitzen also nur die halbe oder nur ein Drittel der notwendigen Anregungsenergie. Je nach Anzahl der Photonen spricht man von 2-Photonenmikroskopie oder 3-Photonenmikroskopie.

Normale Fluoreszenz

1 kurzwelliges Anregungsphoton
 1 langwelliges Emissionsphoton
 Anregungsenergie > Emissionsenergie

Multiphoton Fluoreszenz

≥ 2 langwellige Anregungsphotonen
 1 kurzwelliges Emissionsphoton
 Anregungsenergie > Emissionsenergie



2

Die einzelnen langwelligeren Photonen haben jeweils zu wenig Energie um das Molekül in einen angeregten Zustand zu versetzen.

Um dennoch Fluoreszenz anzuregen, müssen 2 oder 3 Photonen nahezu gleichzeitig und in einem sehr kleinen Anregungsbereich zusammentreffen. Nur so kann sich die Energie der Photonen addieren und eine Anregung des Moleküls erfolgen.

Die Anregung erfolgt nur in dem kleinen Bereich in der Fokusebene wo die Photonen aufeinander treffen. Die Entstehung von *Out of Focus* Licht wird somit zur Gänze verhindert, und man erhält einen sehr hohen Kontrast und damit auch eine höhere Auflösung.

Für die Multiphotonenmikroskopie sind allerdings Objektive mit hoher numerischer Apertur sowie extrem leistungsstarke Infrarot-Laser notwendig.

2 <http://belfield.cos.ucf.edu/image/Gallery/on%20vs%20two/fluorene%203.jpg>

Vorteile der Multiphotonmikroskopie

- Sehr große Eindringtiefe ($\leq 700 \mu\text{m}$)
→ daher auch für sehr dicke Objekte geeignet
- Ein Laser kann viele Farbstoffe anregen
- Auch UV-Farbstoffe anregbar
- Durch externe Detektoren sehr hohe Ausbeute
- Geringes Ausbleichen, da Anregungslicht nur in der Fokusebene absorbiert
- Wenig Strahlungsstreß durch energiearmes Anregungslicht
→ wichtig bei Objekten die durch kurzwelliges Laserlicht zerstört würden.

Nachteile der Multiphotonmikroskopie

- Sehr teurer IR-Laser
- Anregungseigenschaften für viele Farbstoffe nicht bekannt

3.3.5.5 OptiGrid

Das *Out of Focus* Licht wird hier von spezieller Software aus dem Bild heraus gerechnet. Dafür ist allerdings auch eine spezielle Beleuchtung des Objektes notwendig.

Bei einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop wird an Stelle der Feldblende ein schwingendes Gitter (OptiGrid) in den Strahlengang eingebracht. Dieses wird daher wie auch die Feldblende in der Präparatebene abgebildet und bewirkt, dass das Objekt immer nur streifenweise beleuchtet wird.

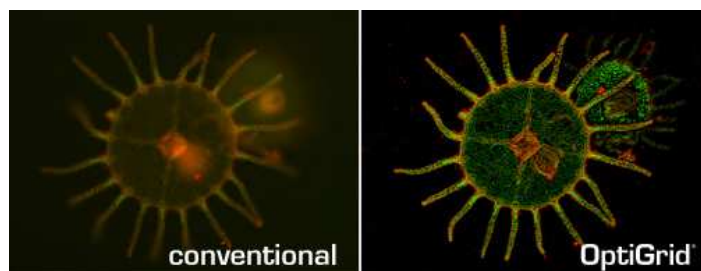


Einschubelement mit Steuerbox



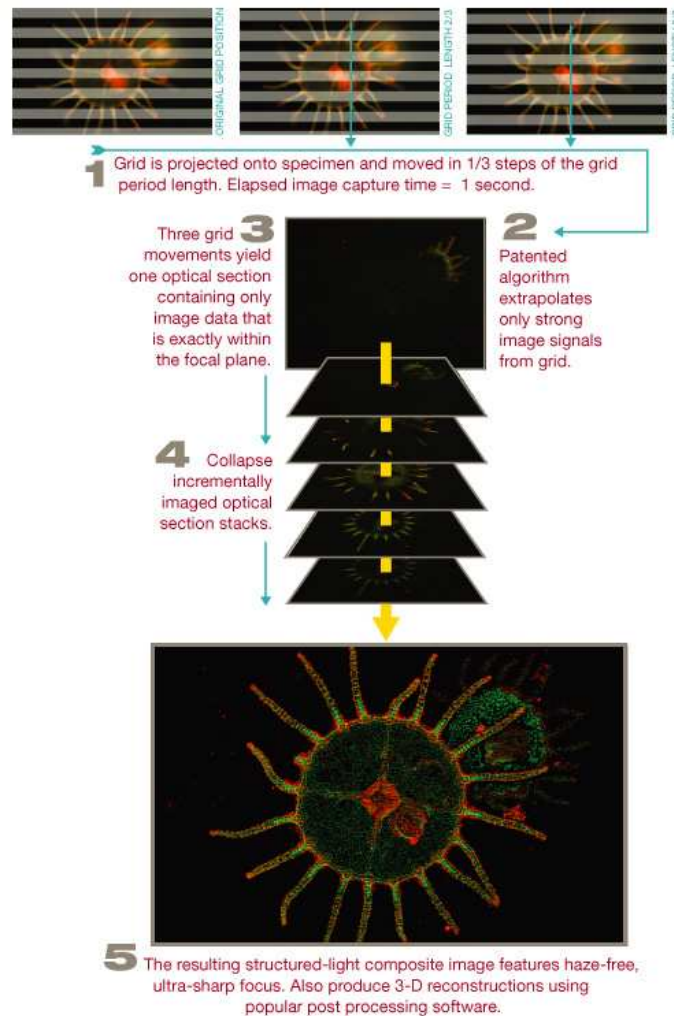
Einschub anstelle der Feldblende

Die Software errechnet aus den Bildstreifen ein Bild mit leicht konfokalartigem Effekt. Diese Methode ist zwar nicht so effektiv wie richtige Konfokal-Mikroskopie dafür aber wesentlich billiger und bei vielen Epifluoreszenz-Mikroskopen nachrüstbar.



Medusa form of Obelia jellyfish³

³ <http://www.qioptiqimaging.com/Products/StructuredLightSystem/OptiGridGallery/>



4

3.3.6 Farbstoffartefakte in der Fluoreszenz-Mikroskopie

- **Bleaching** Fluoreszenzfarbstoff wird durch Bestrahlung zerstört
- **Quenching** bei sehr hoher Farbstoffkonzentration kommt es zur Löschung der Fluoreszenz
- **Cross-Talk / Bleed through** mehrere Fluoreszenzfarbstoffe in einer Probe werden nur unzureichend getrennt
- **Double Staining** Anregungs- und Emissionsbereiche überschneiden sich
- **Probleme beim Beladen**

4 <http://www.qioptiqimaging.com/data/images/Grid-Op-Schematic.jpg>

3.3.6.1 Bleaching

Durch die Anregung wird der Farbstoff zerstört und die Fluoreszenzintensität nimmt daher ständig ab. Dieses Ausbleichen der Farbstoffe ist jedoch nicht immer von Nachteil; es wird in speziellen Methoden wie FRAP oder FLIM auch gezielt eingesetzt.

Abhilfe

- schnell und bei geringer Licht- oder Laserintensität arbeiten
- Anti-Fading
 - Spezielle Medien verzögern das Bleaching
 - nur bei fixiertem Material möglich
 - im Notfall kann auch einfach Ascorbinsäure als Strahlenschutz verwendet werden

3.3.6.2 Quenching

Bei hoher Farbstoffkonzentration kann Energie strahlungsfrei zwischen Molekülen weitergegeben werden, sodass kaum Fluoreszenzlicht abgegeben wird.

Um dies zu vermeiden, soll immer mit möglichst geringer Farbstoffkonzentration gearbeitet werden.

Doch auch dieser Farbstoffartefakt kann für bestimmte Anwendungen gezielt eingesetzt werden:

- Fluoreszenzmikroskopische Enzymnachweise
- FRET

3.3.6.3 Cross-Talk / Bleed through

Werden mehrere Farbstoffe in einer Probe verwendet, können zwei Probleme auftreten:

Cross Talk

Bei ungenügender Trennung der **Anregungswellenlängen** kommt es zur gleichzeitigen Anregung beider Farbstoffe.

Bleed through

Bei ungenügender Trennung der **Emissionswellenlängen** können Farbstoffe vom Photomultiplier nicht mehr unterschieden werden.

3.3.6.4 Double Staining

In vielen Fällen wird die Probe mit zwei oder mehreren Farbstoffen behandelt oder das Objekt selbst besitzt eine Autofluoreszenz.

Um die unterschiedlichen Färbungen trennen zu können und einen *Cross-Talk* oder *Bleed through* zu vermeiden, müssen die Farbstoffe bestimmte Eigenschaften besitzen.

- Die Farbstoffe können getrennt angeregt werden.
- Die Emissionspektren sind deutlich getrennt.
- Die Emissionspektren überschneiden sich, können aber rechnerisch getrennt werden.

**Vor jedem Experiment muss auf Autofluoreszenz getestet
und ggf. ihr Einfluss ausgeschaltet werden!**

3.3.6.5 Probleme beim Beladen

Beim Färben (Beladen) der Probe muss sichergestellt sein, dass der Farbstoff in die Zellen oder an die Strukturen gelangt, die er färben soll. Manche Farbstoffe benötigen auch eine bestimmte Umgebung, um eine Farbreaktion zu zeigen.

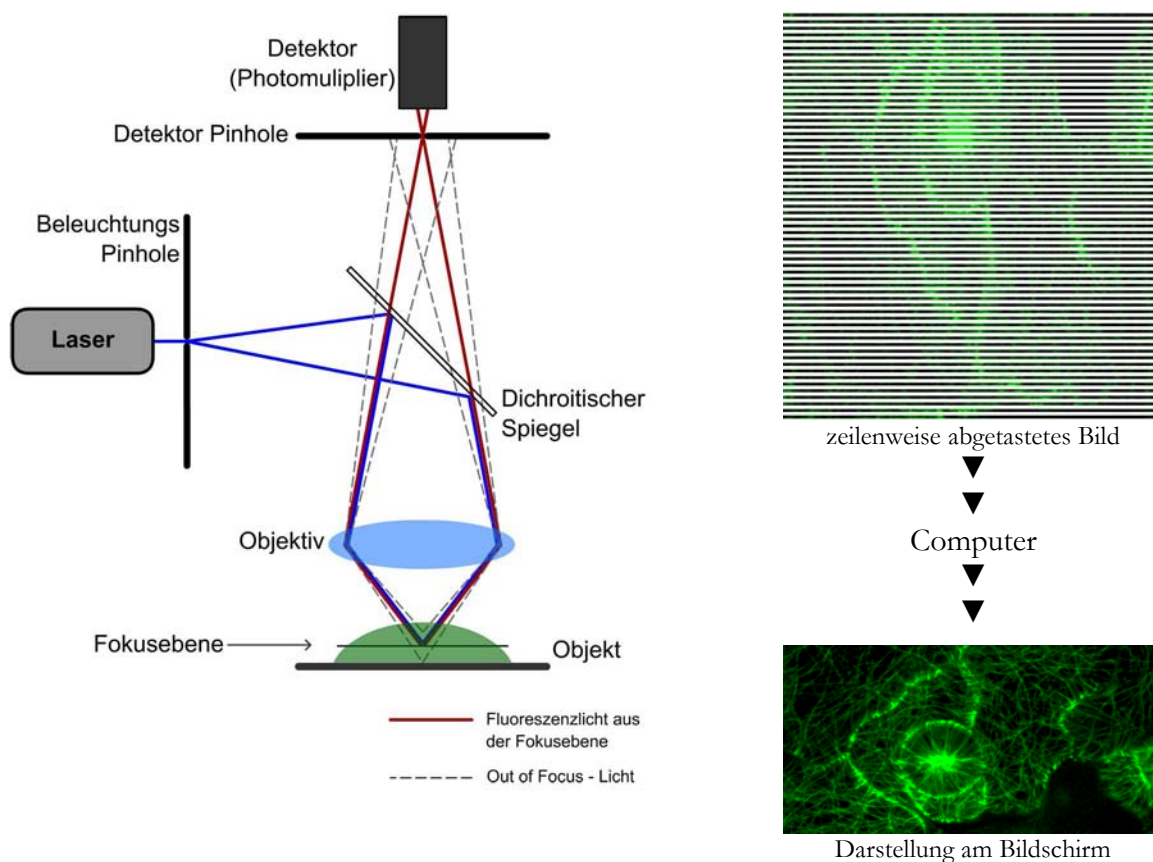
- Membranpermeable Farbstoffe
- Mikroinjektion
- unpolare Farbstoff-Ester: Farbstoff wird in der Zelle erst durch Esterasen freigesetzt!!
- Säure-Beladung: saurer Farbstoff ist in saurem Milieu ungeladen!!

3.4 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

Beim Konfokalen Laser-Rastermikroskope (CLSM) wird das Objekt, wie der Name schon sagt, von einem Laser abgetastet. Über ein bewegliches Spiegelsystem wird dabei der Laser Zeile für Zeile über das Präparat geleitet. Das Fluoreszenzlicht wird von einem Detektor aufgefangen und meistens an einen Computer weitergeleitet.

Das konfokale Bild kann durch den relativ langsamen zeilenweisen Aufbau nur auf dem Bildschirm betrachtet werden.

Bei den modernen Geräten können auch die meisten Mikroskop-Einstellungen direkt über den Computer vorgenommen werden.



Schema eines Konfokalen Laser-Rastermikroskops

Vorteile

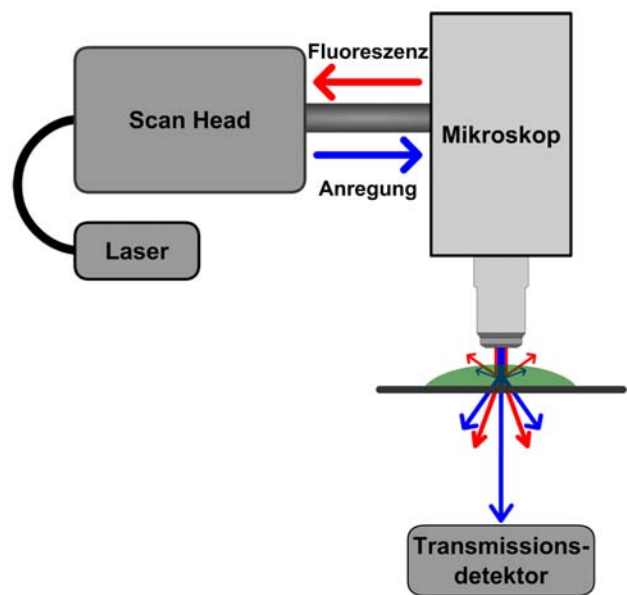
- sehr gute Auflösung – auch in der Z-Achse
- hohe Sensitivität – auch sehr geringe Signale können noch detektiert und dargestellt werden.
- Quantifizierung der Fluoreszenzintensität ist grundsätzlich möglich
- simultane Aufnahme von unterschiedlichen Farbstoffen auf mehreren Kanälen
- digitale Daten erleichtern die weitere Bearbeitung

Nachteile

- extrem hohe Kosten
- umfassende Einschulung in die Benutzung des Gerätes erforderlich
- Gefahr der Fehlinterpretation der Bilder
- Artefakte durch intensive Laserstrahlung

3.4.1 Aufbau eines CLSM

1. Laser
2. *Scan Head*
 - Filter / Strahlteiler
 - *Pinhole*
 - Scan-System
 - Fluoreszenz-Detektoren
3. Mikroskop
4. Transmissions-Detektor
5. Computer



Schema eines Konfokalen Laser-Rastermikroskops



inverses CLSM

3.4.1.1 Laser

In der Konfokal-Mikroskopie werden Laser (meistens der Klasse IIIb) als Lichtquelle verwendet. Diese produzieren monochromatisches Licht mit hoher Intensität. Die meisten Laser erzeugen mehrere charakteristische Wellenlängen. Die verschiedenen Laser werden über einen Lichtleiter in den Scankopf eingekoppelt.

Die Auswahl der benötigten Anregungswellenlängen sowie deren Intensität wird in den meisten Fällen über einen AOTF gesteuert.

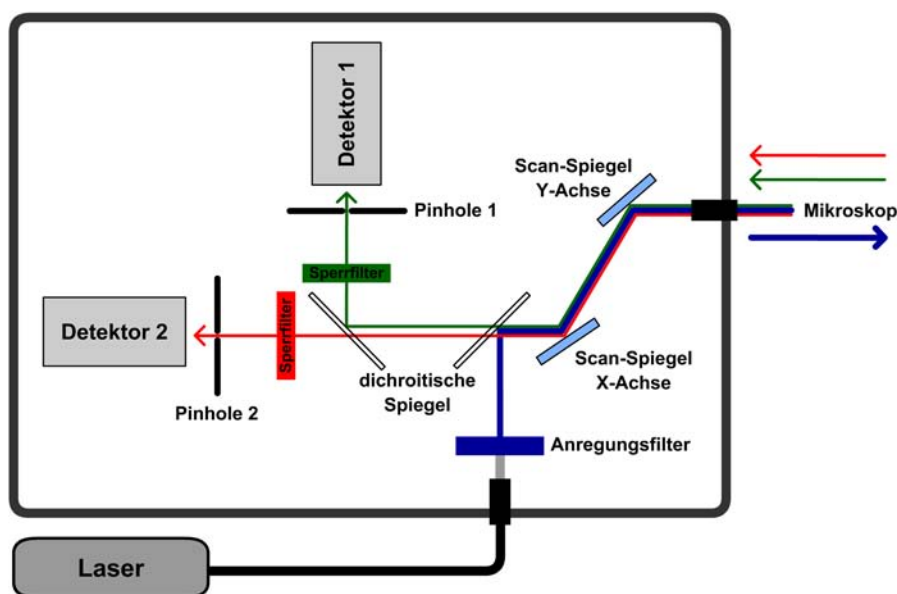
Beispiele für gebräuchliche Laser:

- He-Ne Laser: 543, 633 nm
- Ar/Ar-Kr Laser: 458, 476, 488, 514 nm
- UV-Laser: 361 -365 nm
- Diode-Laser: 405 nm
- IR-Laser

3.4.1.2 Scan Head

Der zentrale Bauteil eines CLSM ist der *Scan Head* oder Scankopf. Dieser beinhaltet:

- Anregungsfilter / Wellenlängenauswahl
- Scan-System
- Strahlteiler:
 - dichroitische Spiegel
 - Beugungsgitter / Blenden
 - Sperrfilter
- *Pinhole*
- Detektoren (Photomultiplier)

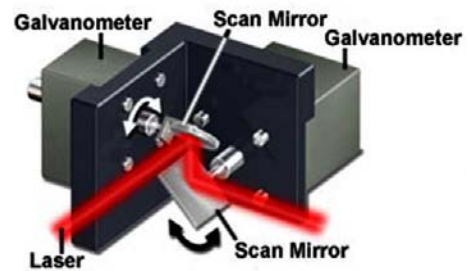


Schema eines Scankopfes für ein CLSM

3.4.1.3 Scan-System

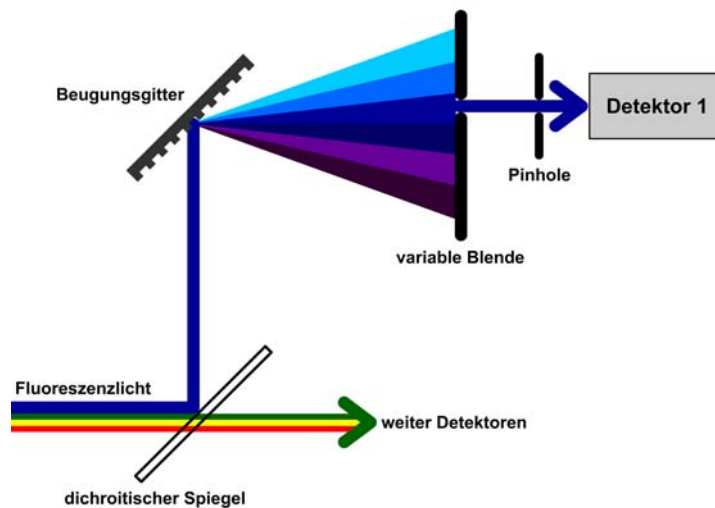
Über ein Spiegelsystem wird der Laserstrahl Zeile für Zeile über das Präparat geleitet.

Dieses System besteht aus zwei beweglichen Spiegeln; einer für die Bewegung des Lasers in der X-Achse, der andere für die Bewegung in der Y-Achse.



Scan-System eines CLSM ⁵

3.4.1.4 Strahlentrennung



Beispiel für die Aufteilung des Fluoreszenzlichtes auf mehrere Detektoren

In der Konfokalmikroskopie werden oft bis zu 4 Wellenlängenbereiche parallel detektiert. Die Strahlteilung erfolgt daher nicht durch Sperrfilter sondern variabel durch Beugungsgitter und dichroitische Spiegel; dadurch kann das ausgefilterte Licht noch weiter gefiltert und aufgeteilt werden.

3.4.1.5 Pinhole

Das *Pinhole* in der hinteren Brennebene, vor dem Detektor, lässt sich in seiner Größe stufenlos verstellen. Damit kann geregelt werden, wie viel Streulicht blockiert wird und wie viel Licht auf den Detektor gelangt.

Je kleiner das *Pinhole* ist, desto besser ist natürlich die Auflösung, da exakt nur Licht aus der Fokusebene auf den Detektor fällt. Allerdings nimmt damit auch die Helligkeit stark ab.

⁵ <http://www.olympusconfocal.com/theory/images/scanningsystemsfigure5.jpg>

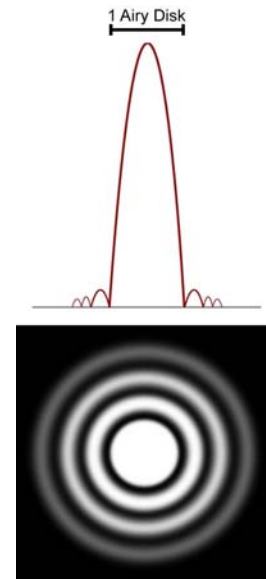
Durchmesser des *Pinhole*

1 *Airy Disc*

ist die standardmäßig Einstellung; der Durchmesser des *Pinhole* entspricht dem Durchmesser des Maximums 0. Ordnung einer *Airy Disc*.

Die Größe dieses Maximums ist vor allem vom Abbildungsmaßstab des Objektivs abhängig, aber auch von der Wellenlänge des verwendeten Lasers oder Lichtes.

Der Durchmesser des *Pinhole* muss daher immer an das verwendete Objektiv angepasst werden, was bei computergesteuerten Mikroskopen meist automatisch passiert. Eine zusätzliche Anpassung an die Wellenlänge ist nicht unbedingt notwendig.



< 1 *AiryDisk*

- verbesserte Auflösung, vor allem in Z-Richtung
- starker Lichtverlust!!!

> 1 *AiryDisk*

- verbesserte Helligkeit
- teilweiser Verlust des Konfokaleffekt
--> viel *Out of Focus* Licht gelangt auf den Detektor!!!

3.4.1.6 Photomultiplier

Als Detektoren werden im CLSM **Photomultiplier (PMT's)** eingesetzt.

Diese „Sekundärelektronenvervielfacher“ sammeln und verstärken die einfallenden Elektronen/Photonen und reagieren dabei sehr schnell und sensitiv auf das einfallende Licht.

PMT's erzeugen noch kein Bild !!!

Der Bildaufbau erfolgt erst durch den Computer!!!!
PMT's verstärken lediglich das einfallende Photon und können nur die Helligkeit, also die Intensität des einfallenden Lichtes wiedergeben.

PMT's sehen nur schwarz/weiß

Welche Wellenlänge das einfallende Licht besitzt, ist für den PMT bedeutungslos. Daher muss für Messung verschiedener Wellenlängenbereiche das Licht gefiltert und auf mehrere Detektoren aufgeteilt werden, von denen jeder dann nur die Intensität des selektierten Wellenlängenbereiches darstellt.

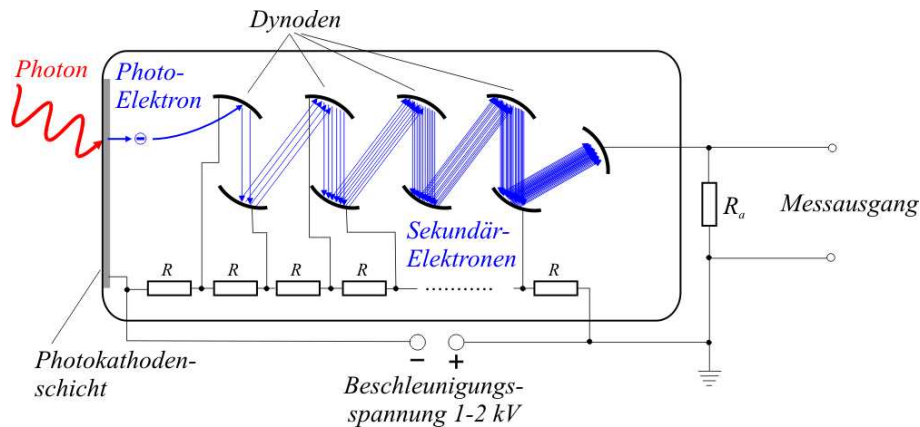


Multialkali Photokathode ⁶

⁶ <http://sales.hamamatsu.com/en/products/electron-tube-division/detectors/photomultiplier-tubes/part-r9220.php#>

Bauprinzip eines Photomultipliers

Ein PMT ist eine Elektronenröhre mit vielen Parallelelektroden, an deren Beginn eine Photokatode steht, die letzte Parallelelektrode ist die Anode. Alle Elemente befinden sich in einer Vakuumröhre und werden von einer anliegenden Hochspannung gespeist, wobei die Spannung zwischen Anode und den einzelnen Elektroden stufenweise zunimmt.



- Die einfallende Photonen schlagen Elektronen aus der Photokathodenschicht, diese werden dann auf die erste Parallelelektrode “Dynode” hin beschleunigt und schlagen dort mehrere Elektronen heraus (Sekundärelektronen).
- Der Elektronenstrahl trifft auf eine weitere “Dynode“ und schlägt dort wieder Elektronen heraus.
- Mehrere in Serie geschaltete Dynoden und erzeugen so eine enorme Verstärkung des Signals von jedem einzelnen einfallenden Photon.
- Der Verstärkungsfaktor hängt dabei von der angelegten Spannung ab.

Regelung des Photomultipliers

Über die Beschleunigungsspannung (**PMT-Voltage**) kann der **Verstärkungsfaktor** verändert werden.

Vor allem bei einem sehr **hohen Verstärkungsfaktor** liefern PMT's auch ohne Eingangssignal einen geringen Anodenstrom. Diese Signale werden auch als **Rauschstrom** bezeichnet.

Er entsteht zum größten Teil durch Elektronen aus **thermischer Emission** aber auch durch Feldemission, Lichtrückkoppelung, Ionisierung des Restgases und die natürliche Radioaktivität des Kolbenglases.

Weiters können noch die Helligkeit und der Kontrast des erhaltenen Signals verändert werden (**PMT-Gain** und **PMT-Offset**). Hier ist aber Vorsicht geboten, besonders beim PMT-Offset, denn bei falschen Einstellungen kann es zum Verlust von Signalen und damit zu falscher Darstellung des Objektes kommen!!!

7 http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/Photomultiplier_schema_de.png

3.4.2 Bildeinstellungen im CLSM

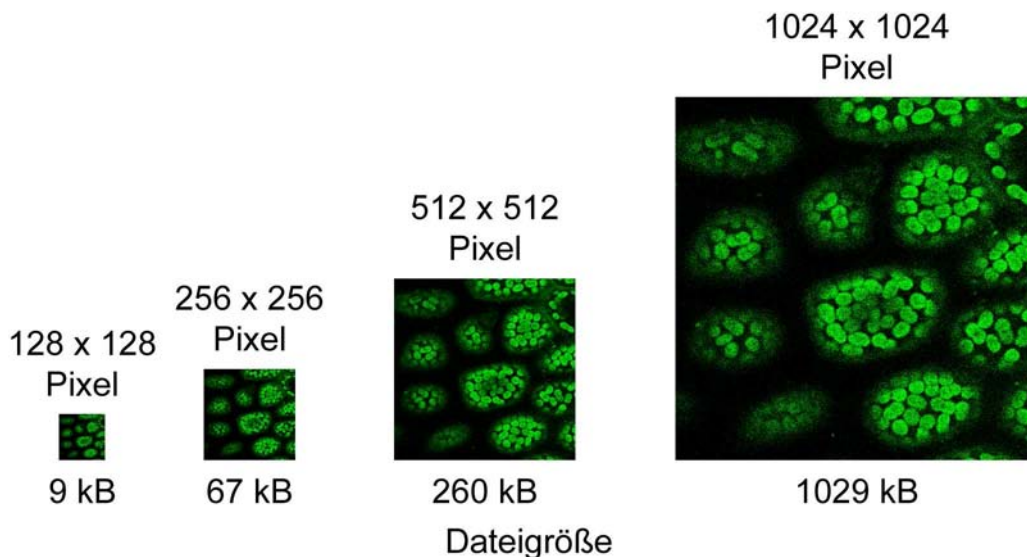
3.4.2.1 Auflösung in der Konfokalmikroskopie

Die Auflösung in der Konfokalmikroskopie folgt einer leicht modifizierten Formel.

$$d_z = \frac{(0,64 \cdot \lambda_{exc})}{(n - \sqrt{n^2 - NA^2})}$$

Diese Formel gilt für punktförmige (ideale) Objekte.

3.4.2.2 Bildgröße / Dateigröße



Bei Routineuntersuchungen ist eine Bildgröße von 512 x 512 Pixel optimal. Für höhere Ansprüche oder genauere Analysen sollte eine Auflösung von 1024 x 1024 verwendet werden.

Auflösung und Bildgröße

- Die „Structure of Interest“ sollte ≥ 4 Pixel groß sein.
- Eine Nachvergrößerung ist ohne Qualitätsverlust üblicherweise um **3x** möglich.
- Eine hohe Auflösung verbessert den Kontrast, verringert aber die Scangeschwindigkeit!!!

3.4.2.3 Helligkeit und Kontrast

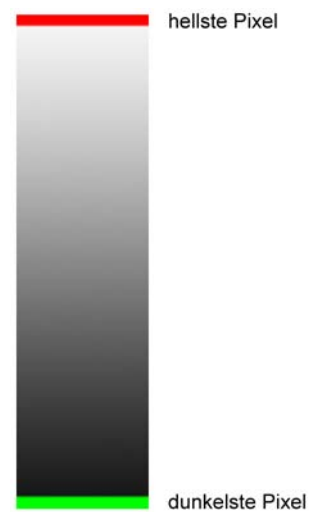
Die richtige Einstellung von Helligkeit und Kontrast ist von besonderer Bedeutung um den Verlust von Bildinformationen zu vermeiden.

- Die Helligkeit (Gain) wird so eingestellt, dass der hellste Punkt der Region of Interest (ROI) gerade nicht weiß ist.
- Der Kontrast (Contrast) wird so eingestellt, dass der dunkelste Bildpunkt der ROI gerade nicht schwarz ist.

LUT-Einstellung

Bei dieser Einstellung werden schwarze und weiße Pixel eingefärbt um schneller Einstellung der optimalen Helligkeit zu ermöglichen.

- schwarze Pixel grün
- weiße Pixel rot

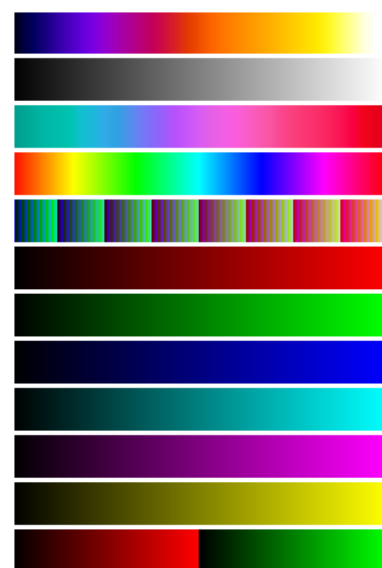


Color Lookup Table

Die Intensitätsverteilungen im Objekt lassen sich auch in einem Color Lookup Table (LUT) darstellen. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten durch Farben codiert.

gängige Codierung:

- blau / Schwarz - geringe / keine Intensität
- rot / weiß - starke Intensität



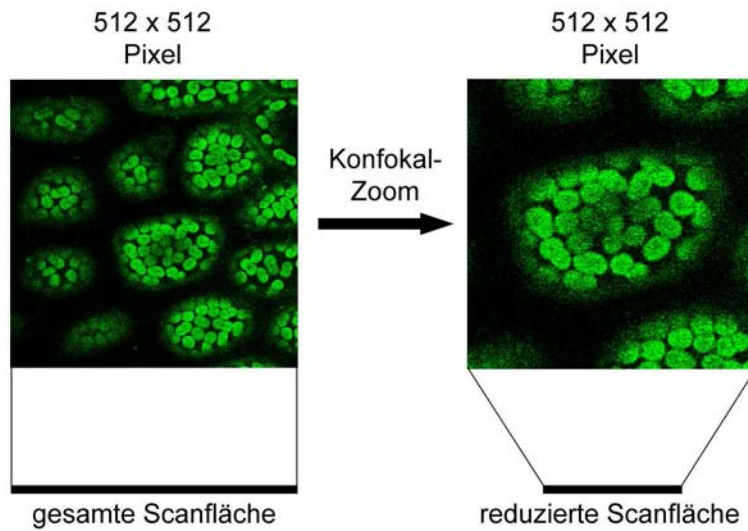
Verschiedene Color Lookup Tables ⁸

⁸ http://imagejdocu.tudor.lu/media-files/howto_images/luts.png

3.4.2.4 Konfokal Zoom

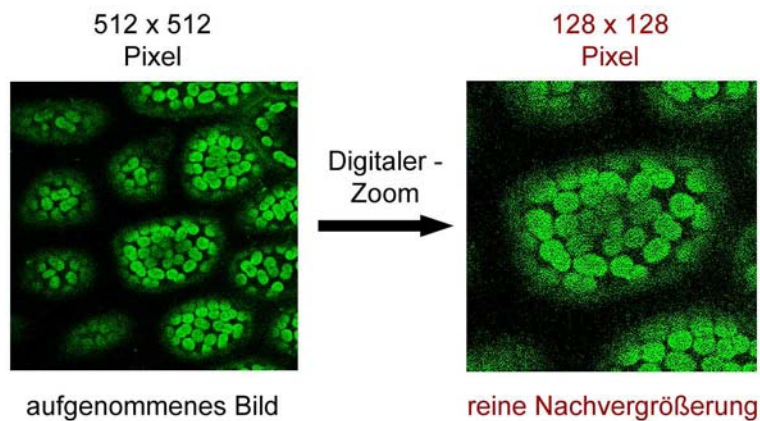
Beim Konfokalen Zoom wird bei gleich bleibender Pixelanzahl nur die gescannte Fläche verkleinert, und damit die Pixelanzahl je aufgenommenener Fläche erhöht!

Konfokaler Zoom ist bis zu 3x sinnvoll, darüber erhält man nur mehr leere Vergrößerung.



3.4.2.5 Digital Zoom

Im Vergleich dazu wird beim digitalen Zoom nur die dargestellte Fläche nachvergrößert; die Pixelanzahl je Fläche bleibt gleich, was zu einer extremen Verschlechterung der Bildqualität führt. Digitaler Zoom sollte daher eher vermieden werden!



3.4.2.6 Rauschunterdrückung

Rauschen, also statistisch zufällig verteilte Signale im Bild, die nicht von Strukturen im Objekt stammen, ist ein äußerst störender Effekt und verschlechtert massiv die Bildqualität.

Das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*) ist ein Maß für die Qualität einer Signalquelle. Es ist definiert als das Verhältnis der durchschnittlichen Stärke des Nutzsignals einer Signalquelle zur mittleren Stärke des Störsignals (Rauschen) der gleichen Signalquelle.

Verursacht wird dieses Rauschen durch verschiedene Faktoren:

- Detektor: Elektronen können auch durch Wärmebewegung freigesetzt werden
- Verstärker
- Streulicht: Raumbelichtung, reflektierende Teile im Mikroskop etc.
- Poisson Effekt: jede Lichtquelle emittiert Photonen statistisch verteilt

Rauschunterdrückung

Rauschen entsteht bei jeder Signalverarbeitung und kann nie komplett verhindert sondern nur verringert werden, wodurch sich das signal-to-noise-ratio verbessert.

Dazu stehen in der Konfokal-Mikroskopie mehrere Möglichkeiten zur Verfügung:

- Erhöhung der Laserintensität
- Erhöhung der Farbstoffkonzentration
- Verringerung der Scangeschwindigkeit
- Mehrmaliges Scannen des Bildes (Screen Average)
- Mehrmaliges Scannen jeder Zeile (Line Average)

Nachteile:

- schnelleres Ausbleichen der Farbstoffe durch hohe Laser- und Lichtintensität
- Langsamere Aufnahme durch geringe Scangeschwindigkeit und Wiederholungen
- nur bei wenig empfindlichen Objekten möglich (Laserintensität /Farbstoffkonzentration)
- nur bei wenig bewegten Objekten; oftmaliges Scannen erfordert unbewegte Strukturen

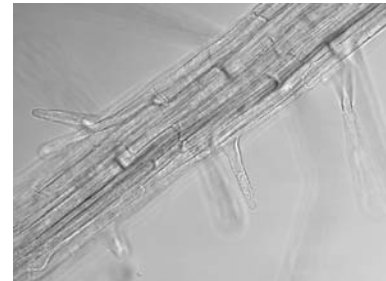
3.4.3 Bildgebung im CLSM

3.4.3.1 Transmissions-Bild

Das meiste Anregungslicht wird vom Objekt absorbiert und das entstehende Fluoreszenzlicht wird wieder in das Objektiv zurückgeworfen.

Ein Teil des Anregungslichtes dringt aber durch das Objekt und wird vom Kondensator gebündelt und auf einen Photomultiplier gelenkt; den **Transmissions-Detektor**.

Das vom Transmissions-Detektor erzeugte Bild ist aber **kein normales Hellfeld**, obwohl es so aussieht!!



Wurzel von *Arabidopsis thaliana* -
Transmissionsbild

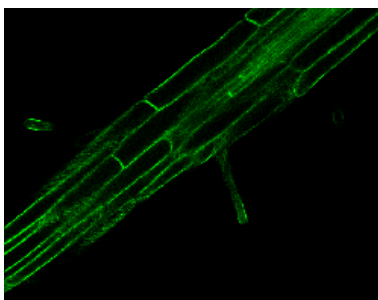
Im Gegensatz zu den Fluoreszenzbildern ist es auch **kein konfokales Bild**, weil auch *Out of Focus* Licht auf den Transmissions-Detektor gelangt!!!

Für das Transmissions-Bild besteht auch die Möglichkeit einen Differentiellen Interferenzkontrast einzustellen; dabei geht aber viel Fluoreszenzlicht verloren. Phasenkontrast ist grundsätzlich auch möglich, allerdings ist hier der Lichtverlust enorm.

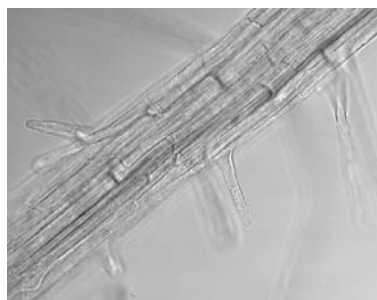
3.4.3.2 Overlay

Um fluoreszierende Strukturen in der Zelle oder im Gewebe zu lokalisieren, können Fluoreszenz- und Transmissionsbild übereinander gelegt werden (Overlay).

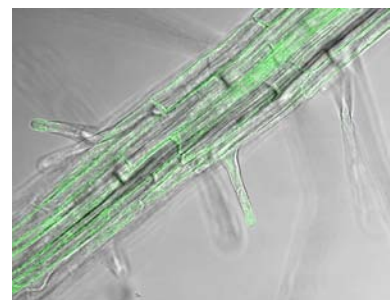
FLUORESZENZ



TRANSMISSION

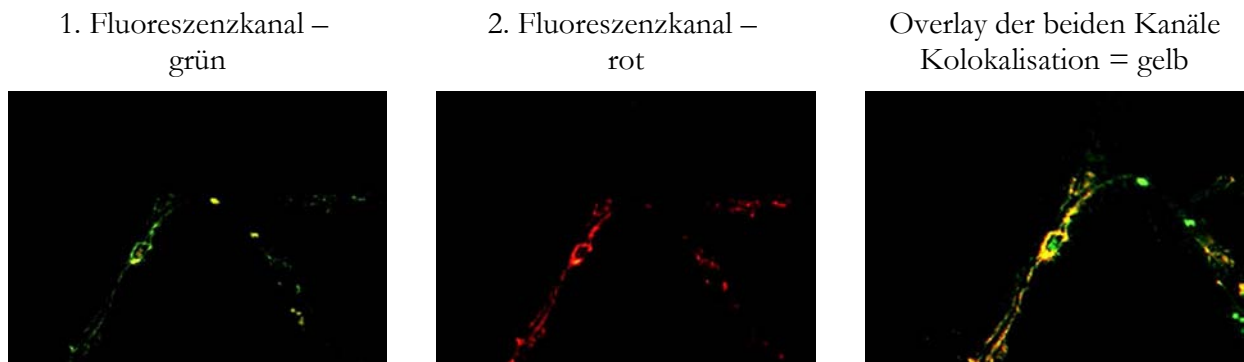


OVERLAY



Wurzel von *Arabidopsis thaliana*

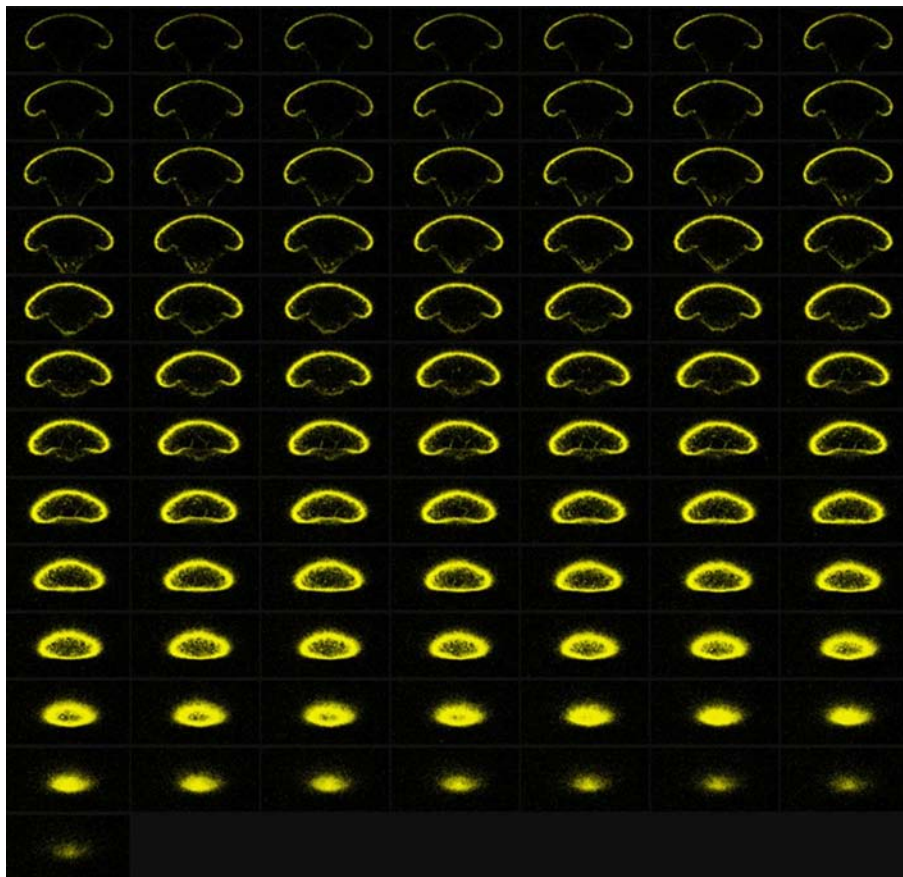
Ein Overlay kann auch mit 2 oder mehreren Fluoreszenzkanälen durchgeführt werden und ermöglicht so eine Analyse der Kollokalisierung der Farbstoffe.



9

3.4.3.3 Optische Schnittserien

Das Präparat wird mehrere Male gescannt und dabei der Focus jedes Mal automatisch um einen definierten Betrag verändert. Man erhält damit einen Stapel von Bildern im Verlauf der Z-Achse.



Schnittserie eines Drüsenköpfchens von *Drosophyllum lusitanicum*

9 http://www.neurologie.klinik.uni-erlangen.de/e1846/e78/e354/e380/RAGE_NCAM_Satellite.jpg

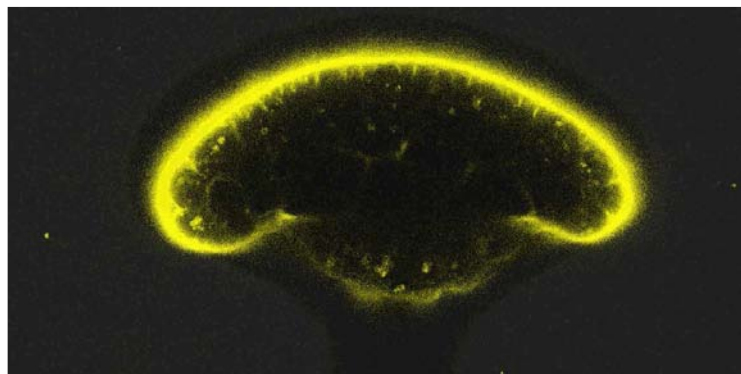
Mit solchen optischen Schnittserien lassen sich viele verschiedene Ansichten des Präparates erstellen.

- „Fahrt“ durch das Objekt
- Erweiterter Fokus
- Errechnen beliebiger Schnittebenen
- Stereobilder
- 3D-Rekonstruktion und Animation
- Dekonvolution

Je genauer diese Darstellung sein soll, umso geringer muss der Abstand zwischen den einzelnen Schnitten sein. Je mehr Schnitte aber angefertigt werden, desto länger dauert der Scan und desto schneller bleicht auch das Präparat aus.

„Fahrt“ durch das Objekt

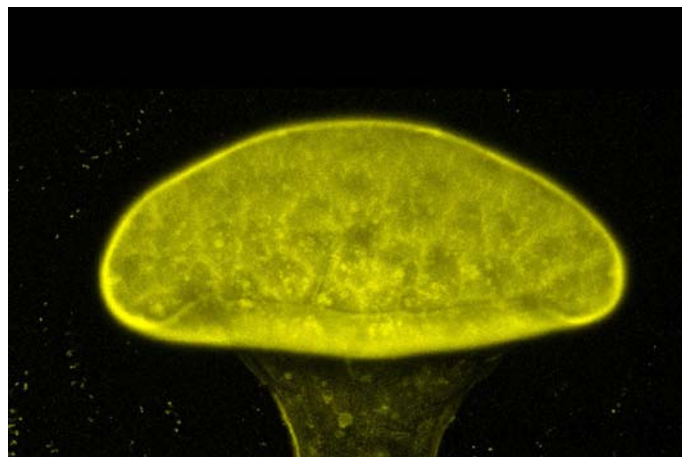
Die einzelnen Bilder der Schnittserie werden einfach nacheinander abgespielt; dabei entsteht der Eindruck, als würde man durch das Objekt fahren



Drüsenköpfchen von *Drosophyllum lusitanicum*

Erweiterter Fokus

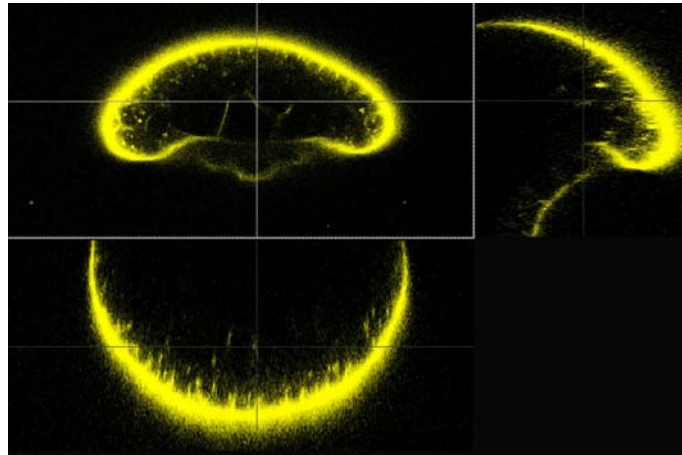
Mehrere Bilder einer Serie werden dazu übereinander gelegt und zu einem Bild zusammengerechnet. Dadurch erscheinen Strukturen aus verschiedenen Ebenen gleichzeitig scharf.



Drüsenköpfchen von *Drosophyllum lusitanicum*

optische Schnittebenen

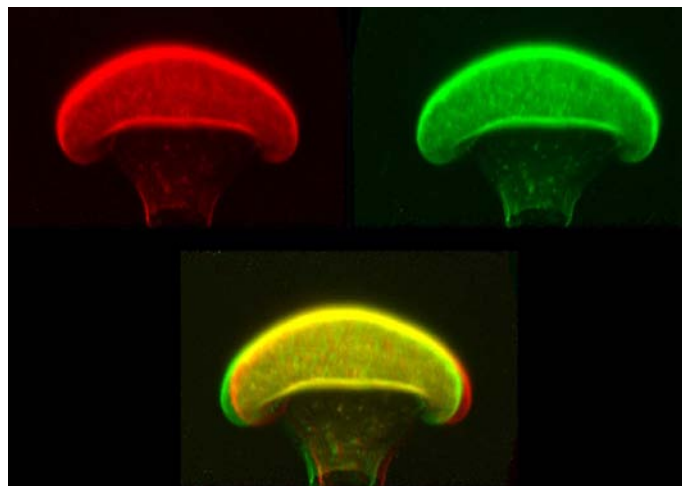
Aus dem gesamten Stapel der Schnittserie können an beliebiger Stelle Schnitte in X und Y Richtung gemacht und so der Aufbau des Objektes analysiert werden.



Drüsenköpfchen von *Drosophyllum lusitanicum*

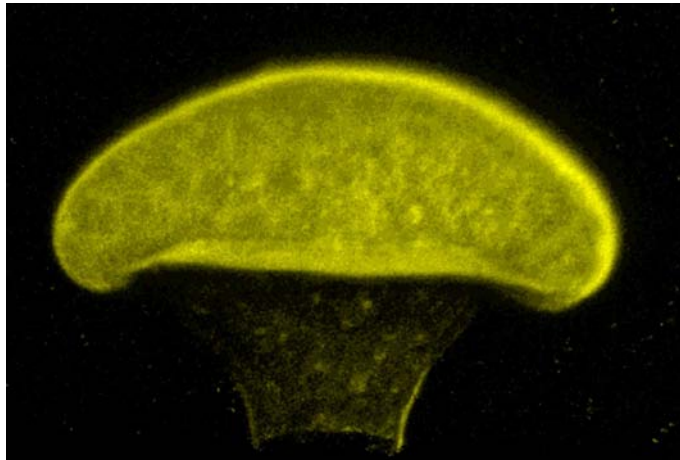
Stereobild

Aus der Schnittserie kann die Software zwei Bilder mit einem bestimmten Blickwinkel errechnen. Für ein Stereobild wird ein Bild rot und eins grün eingefärbt und die beiden zu einem Overlay zusammengeführt. Betrachtet man dieses Bild mit einer 3D-Brille so sieht man eine räumliche Darstellung des Objektes.



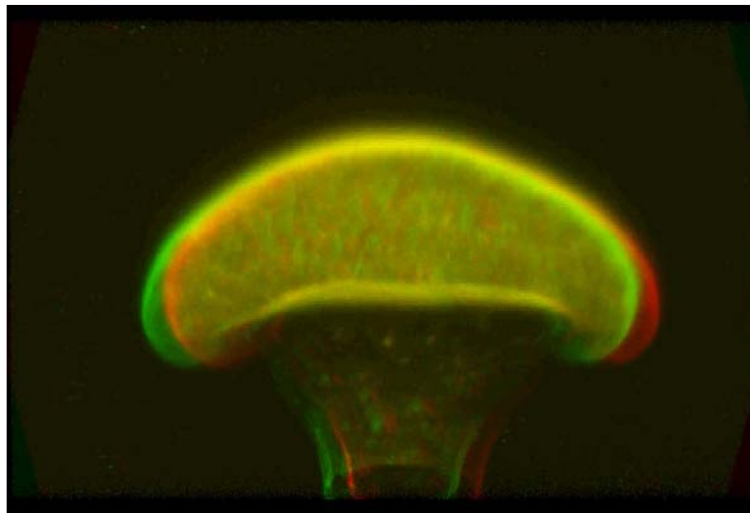
Drüsenköpfchen von *Drosophyllum lusitanicum*

3D Rekonstruktion



Drüsenköpfchen von *Drosophyllum lusitanicum*

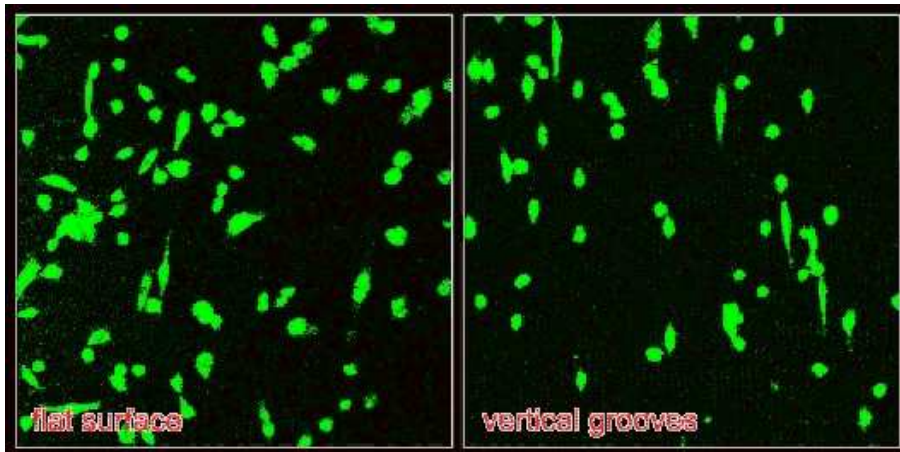
Animation



Drüsenköpfchen von *Drosophyllum lusitanicum*

3.4.3.4 Time Lapse Aufnahmen

Das Objekt wird immer an der gleichen Stelle und bei gleichen Einstellungen in bestimmten Intervallen gescannt. Mit dieser zeitlichen Serie an Bildern können zum Beispiel dynamische Vorgänge verfolgt werden.



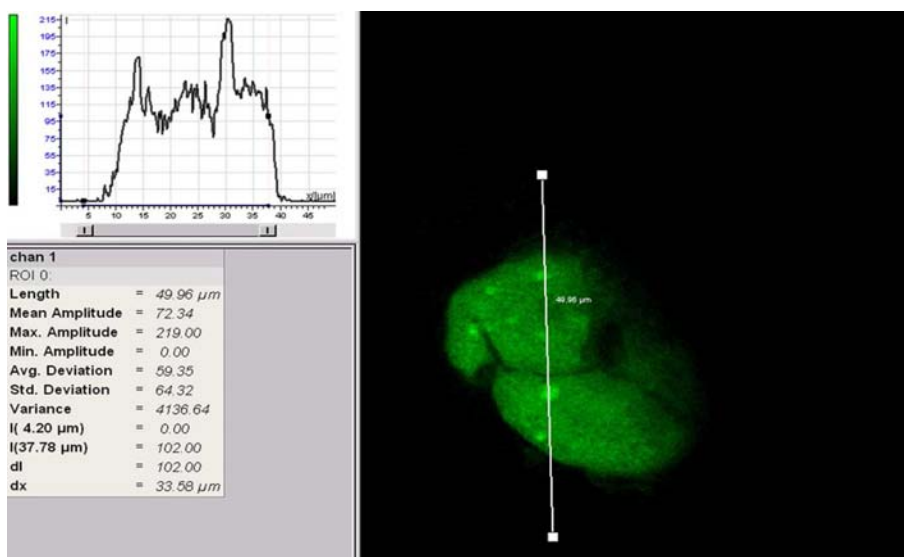
cell migration movie on structured vs. unstructured surfaces ¹⁰

3.4.3.5 Quantifizierung

Da jeder Bildpunkt als Zahlenwert vorliegt, sind zahlreiche Berechnungen möglich. Die Kalibrierung der Analysesoftware kann allerdings sehr schwierig und langwierig sein.

Beispiele:

- Helligkeit von Pixeln, entlang von Linien und Flächen
- Boolesche-Logik mit Bildern: Auffinden gleicher und unterschiedlicher Pixel etc.



lineare Quantifizierung

¹⁰ http://www.empa.ch/plugin/template/empa/*/33420/---/l=2

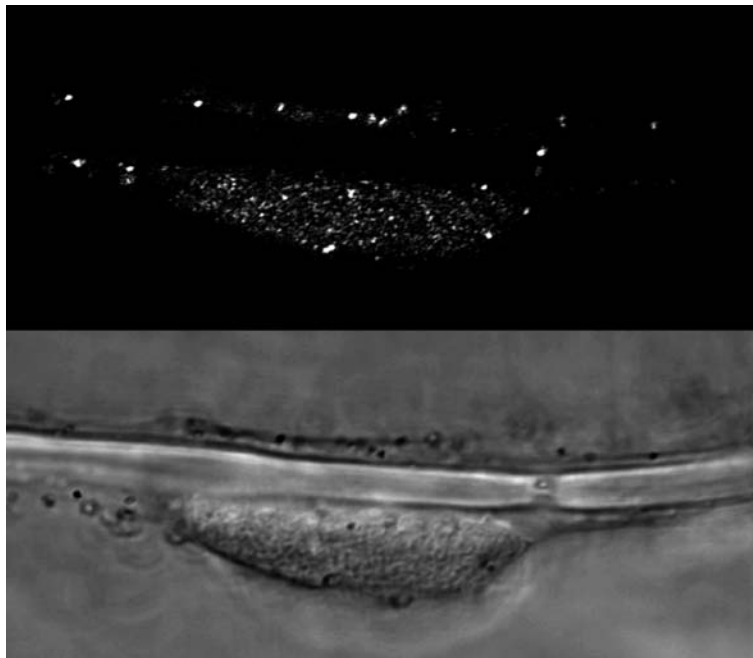
3.4.4 Spezialtechniken

3.4.4.1 Backscattered Light Imaging

Der Detektor erfasst nicht das Fluoreszenzlicht, sondern das Licht, das vom Präparat zurückgestreut oder reflektiert wird. Dazu werden die Detektoreinstellungen so gewählt, dass sie sich mit dem Anregungslicht überschneiden!!

Das rückgestreute Licht verläuft wie auch das Fluoreszenzlicht durch das *Pinhole* und ist daher auch ein **konofkales Bild**!!

Diese Methode bietet die höchste Auflösung von Oberflächen, die mit dem Lichtmikroskop möglich ist. Damit lässt sich die **Oberfläche eines Präparates** und unter Umständen sogar die von Organellen darstellen.



Allium cepa / Zellwand und Zellkern - Rückstreubild

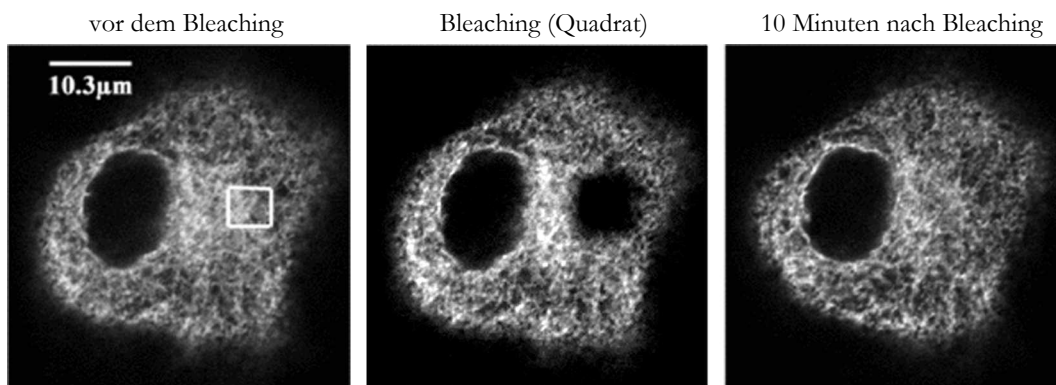
3.4.4.2 FRAP

Fluorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching (FRAP)

- In einer definierten Region des Objekts wird der Fluoreszenzfarbstoff durch intensive Bestrahlung zerstört (Bleaching).
- Die bestrahlte Stelle erscheint zunächst schwarz
- Die Dauer der Rückkehr der Fluoreszenz an diese Stelle gibt Auskunft über die **Beweglichkeit des Farbstoffes im Objekt**

FRAP – Anwendungen:

- Diffusionsgeschwindigkeiten
- Aktive Transportprozesse
- Verhältnis mobiler : immobilisierter Fluorophor



11

3.4.4.3 FLIP

Fluorescence **L**oss **I**n **P**hotobleaching (FLIP)

- Es werden mehrere FRAP-Experimente durchgeführt und die Abnahme der Gesamtfluoreszenz gemessen
- So kann bestimmt werden, **von wo die Fluorophore nachgeliefert** werden

11 <http://www.biocell.org/boc/097/0699/boc0970699f02.htm?resolution=STD>

3.4.4.4 FRET

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

- Energie kann strahlungsfrei zwischen zwei Fluorophoren übertragen werden, wenn sich diese extrem knapp nebeneinander befinden.
- Diese Energieübertragung zwischen zwei Farbstoffen kann daher zum **Nachweis engen Kontakts** verwendet werden

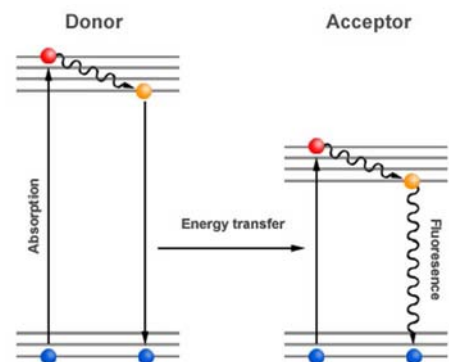
FRET -Prinzip

Es werden 2 Farbstoffe auf die Probe aufgebracht, die jeweils an unterschiedliche Strukturen binden.

- Donor gibt Energie ab
- Akzeptor nimmt Energie auf

Durch das Anregungslicht werden nur Elektronen des Donors angeregt; fallen diese auf ihr ursprüngliches Niveau zurück so geben sie die Energie nicht als Fluoreszenz ab, sondern übertragen diese auf den Akzeptor.

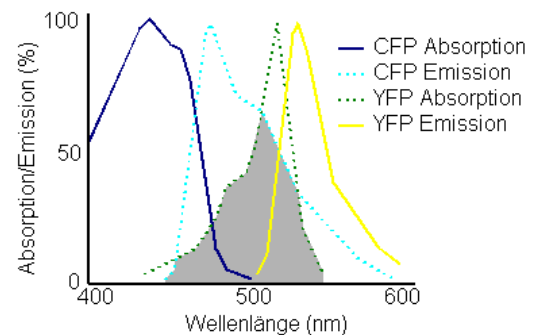
Durch die übertragene Energie werden Elektronen des Akzeptors angeregt; dieser gibt die aufgenommene Energie nun als Fluoreszenz ab.



12

Die Energieübertragung zwischen Donor und Akzeptor findet allerdings nur statt,

- wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor weniger als **5 nm** beträgt und
- Donor und Akzeptor müssen **unterschiedliche Absorptionsspektren** besitzen.
- das **Emissionsspektrum** des Donors mit dem **Absorptionsspektrum** des Akzeptors **überlappt**



13

FRET – Anwendungen

- Proteinkomplexe
- DNA-bindende Proteine
- Enzym-Substrat-Interaktion

12 <http://mekentosj.com/science/fret/images/fret.jpg>

13 <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/43/FRET-Spektren.png>

3.4.4.5 FLIM

Fluorescence **L**ifetime **I**maging **M**icroscopy (FLIM)

- Die Zeitspanne zwischen Anregung und Emission hängt vom Farbstoff und seiner **chemischen Umgebung** ab
- Da Laserlicht kohärent ist, bewirkt diese Zeitspanne eine Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht
- Das FLIM-Bild wird nach dieser Phasenverschiebung eingefärbt

Diese Methode erlaubt mikroskopische Beobachtung molekularer Interaktionen, wie

- Protonierung
- Ionenmilieu
- Bindung von Enzymen, Substraten, ...

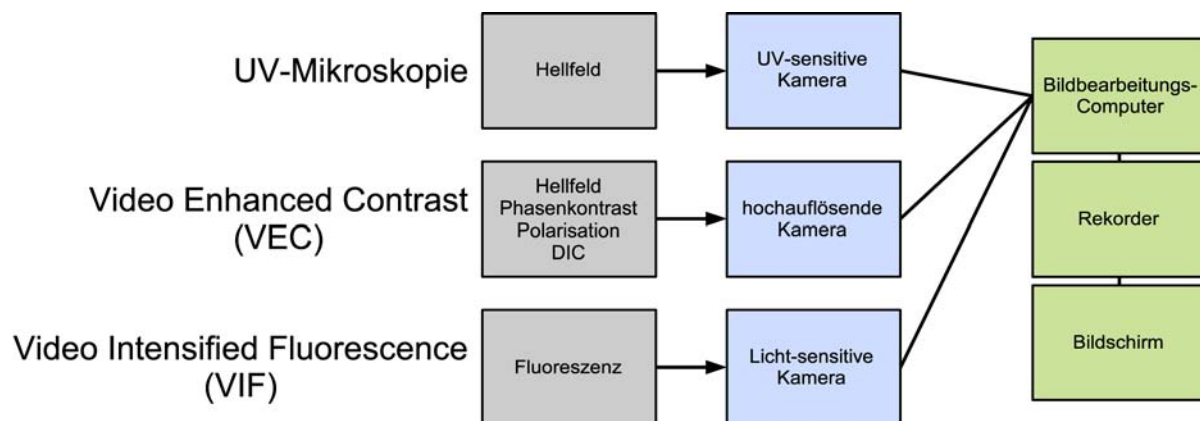
4 Advanced Techniques

In der Video Mikroskopie nutzt man Videokameras und CCDs für die Verbesserung des konventionellen Lichtmikroskops. Im Kombination mit elektronischen Bild Prozessoren lässt sich die Auflösung im Vergleich zu herkömmlichen lichtmikroskopischen Techniken mehr als verdoppeln. Damit können kleine Strukturen in der Zelle wie Golgi Vesikel und dünne Elemente des Endoplasmatischen Retikulums, die man sonst nur aus dem Elektronenmikroskop kennt, in der lebenden Zelle dargestellt werden.

Die Auflösung wird verbessert, entweder durch eine Reduzierung der Wellenlänge der Mikroskop Beleuchtung, also durch die Verwendung von ultraviolettem (UV) Licht, oder durch die vollständige Öffnung der Aperturblende.

Die Untersuchung dicker, wenig durchsichtiger Präparate kann durch die Verwendung von infrarotem Licht verbessert werden. Das unsichtbare infrarote Licht hat eine höhere Wellenlängen bis 40.000 nm und kann viele Materialien besser durchdringen als sichtbares Licht.

Für die verschiedenen Kontrastverfahren und Videotechniken werden jeweils entsprechende Kameras verwendet. Eine weitere Verbesserung und Bearbeitung der Kamerabilder erfolgt durch einen Bildbearbeitungs-Computer.



Die Life-Bilder aus dem Bildbearbeitungscomputer können über einen Rekorder aufgezeichnet und direkt auf einem Bildschirm dargestellt werden.

Was ist Kontrast

Kontrast (C) ist das Intensitäts- oder Helligkeits-Verhältnis von zwei Bereichen eines Bildes, zum Beispiel der Helligkeitsunterschied zwischen der aufgelösten Struktur ($I_S = \text{Structure}$) und dem Hintergrund ($I_B = \text{Background}$).

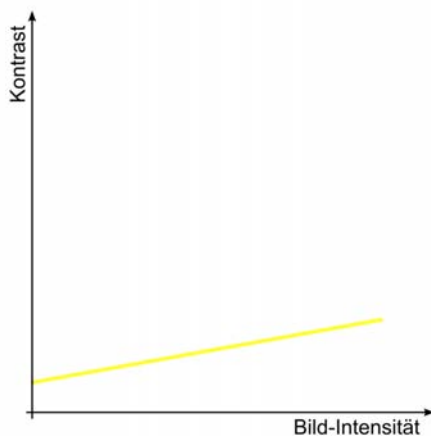
$$C = ((I_S - I_B) \times 100) / I_B$$

Um vor einem sehr hellen Hintergrund eine geringe Kontraststeigerung zu erhalten, muss die Intensität der Struktur massiv erhöht werden; eine Unterscheidung vom Untergrund ist sonst nur sehr schwer möglich.

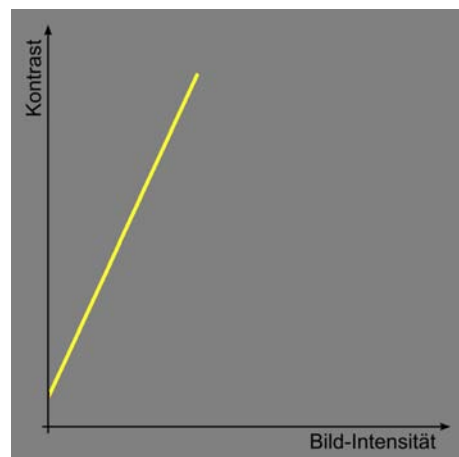
Bei dunklem Hintergrund hingegen bewirkt eine geringfügige Erhöhung der Struktur-Intensität eine massive Steigerung des Kontrastes. Man kann die Struktur klar und deutlich sehen.

Die folgenden Grafiken zeigen den Kontrast als eine Abhängigkeit von der Intensität des Hintergrunds.

Starke Hintergrund-Intensität



Geringe Hintergrund-Intensität



Kontrasterzeugung im konventionellen Hellfeld

Bei **voll geöffneter Aperturblende** sind die Strukturen **maximal aufgelöst**. Vor allem bei biologischen Objekten haben sie aber oft nur sehr **geringen Absorptionskontrast**.

Die Strukturen sind kaum vom hellen Hintergrund zu unterscheiden und daher nicht sichtbar, obwohl die Airy Discs genügend Abstand zueinander haben.

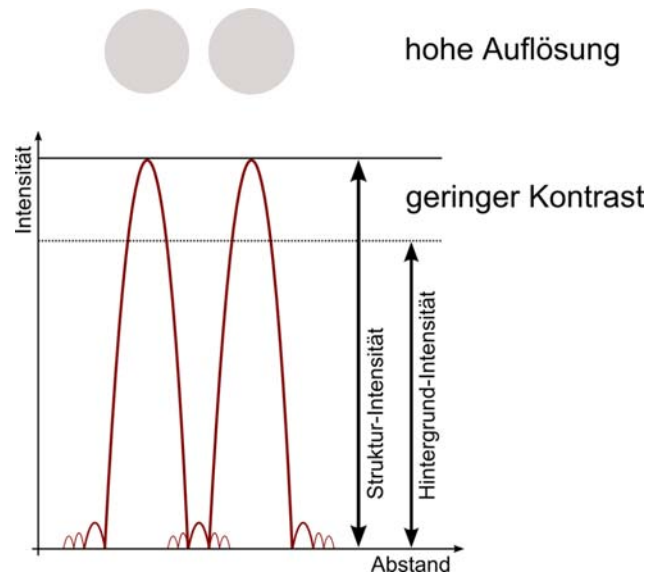
Beispiel:

Struktur-Intensität = 25

Hintergrund-Intensität = 20

$$C = (25 - 20) \times 100 / 20$$

C = 25



In der konventionellen Mikroskopie erhöht man den Kontrast am einfachsten durch **Schließen der Aperturblende** (Kontrastblende).

Mit dem Schließen der Aperturblende wird die numerische Apertur verkleinert, dabei wird das Bild dunkler, die Strukturen gewinnen an **Kontrast**.

Gleichzeitig führt die kleinere Apertur aber zum **Verlust von Auflösung**, da die Airy Discs einen größeren Durchmesser bekommen und einander überlappen.

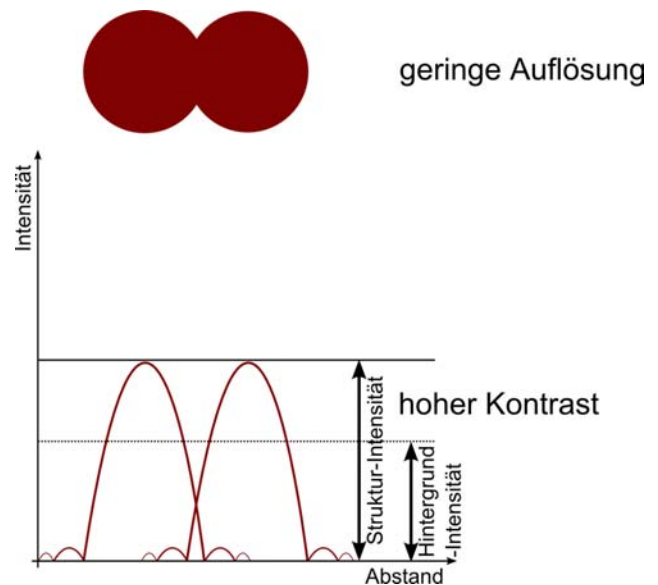
Beispiel:

Struktur-Intensität = 15

Hintergrund-Intensität = 10

$$C = (15 - 10) \times 100 / 10$$

C = 50



4.4 UV-Mikroskopie

Die Verwendung von monochromatischem Licht mit kurzer Wellenlänge bewirkt nach der Abbe'schen Gleichung eine höhere Auflösung.

$$d = 1,22 \cdot \lambda / (\text{NA obj.} + \text{NA cond.})$$

Eine besonders hohe Auflösung wird dabei mit Licht im UV-Bereich erzielt. Denn zum einen bewirkt die kurze Wellenlänge des UV-Lichts schon eine höhere Auflösung, zum anderen wird UV-Licht auch vom Präparat absorbiert (zB von Proteinen und Aminosäuren), dadurch erhält man auch mehr Kontrast als bei anderen Wellenlängen; Organellen und kleine Strukturen sind somit auch ohne zusätzliche Kontrastverfahren deutlich sichtbar.

Der durch das UV-Licht höhere Kontrast ermöglicht eine weitere Öffnung der Aperturblende, was wiederum eine höhere Auflösung erzielt.

WICHTIG!!!

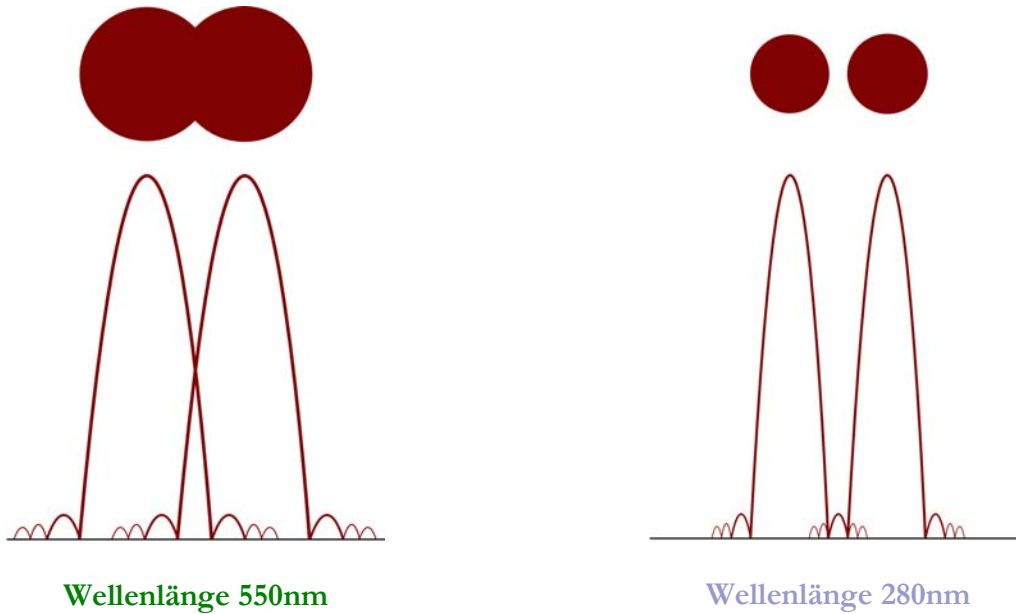
Immer darauf achten, dass sich beim Mikroskopieren mit UV-Licht immer ein **UV-SPERRFILTER** im Strahlengang oder vor den Okularen befindet, damit kein UV-Licht auf die Augen trifft!!!

Um die Augen auch vor Streulicht zu schützen muss beim Arbeiten mit UV-Licht **IMMER** auch ein **STREULICHTSCHUTZ** am Mikroskop angebracht werden!!!

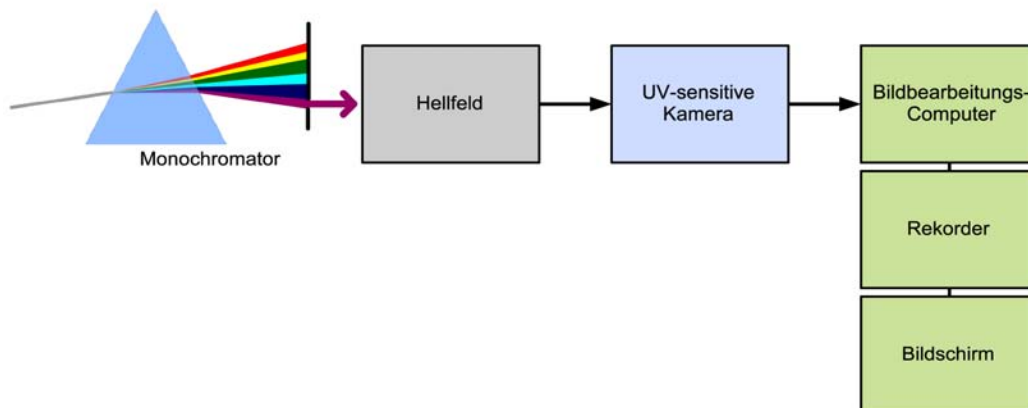
Nach dem Arbeiten mit UV-Licht den Monochromator **IMMER** auf einen längerwelligen Bereich umstellen, um nachfolgende Kollegen nicht zu gefährden!!!

4.4.1 Wellenlänge und Auflösung

In der UV-Mikroskopie wird die Auflösung durch die Verwendung von kurzwelligem UV-Licht verbessert. Bei kurzwelligem Licht werden die Airy Discs von Strukturen kleiner abgebildet; sie bekommen einen kleineren Durchmesser und die Auflösungsgrenze d wird verringert.



4.4.2 Technische Voraussetzungen



- monochromatisches Licht (Monochromator)
- Optiken aus Quarzglas
→ „normales“ Natron-Kalk-Glas ist für Ultraviolettstrahlung unterhalb 350 nm undurchlässig
- UV - sensitive Kamera
- Bildschirm

4.4.3 Vor- und Nachteile

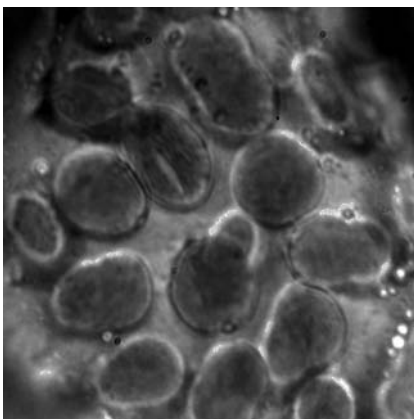
Vorteile:

- verbesserte Auflösung – bis 50nm
- verbesserter Kontrast durch Absorption
→ Amplitudenkontrast ermöglicht Arbeiten im Hellfeld
- keine chromatische Aberration durch die Verwendung von monochromatischem Licht

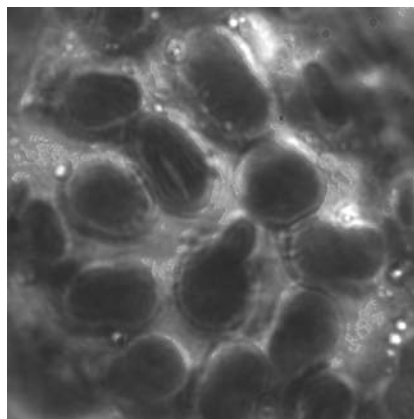
Nachteile:

- Optiken aus Quarzglas und UV sensitive Kamera sind sehr teuer
- UV-Strahlung ist schädlich für die Objekte, vor allem unter 360nm
- Augen müssen vor der schädlichen UV-Strahlung geschützt werden (Sperrfilter und Streulichtschutz)
- Objekte mit vielen UV absorbierenden Komponenten werden schwarz und undurchsichtig

4.4.4 Bilder



Moos-Chloroplasten bei 310 nm



Moos-Chloroplasten bei 400 nm



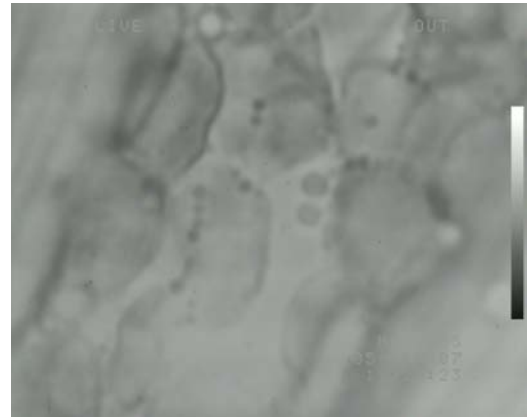
Moos-Chloroplasten bei 690 nm

4.5 Video Enhanced Contrast (VEC)

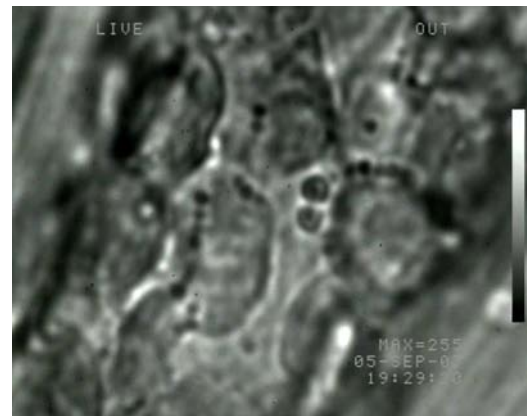
Die Auflösungsgrenze des Mikroskops hängt in erster Linie von der Numerischen Apertur des Objektivs und des Kondensors ab.

$$d = 1,22 \lambda / (\text{NA obj.} + \text{NA cond.})$$

Um die Apertur des Objektivs voll auszunützen müssen auch alle Aperturblenden (Kondensor und Objektiv) ganz geöffnet sein. Bei geöffneter Aperturblende ist aber der Kontrast des Bildes extrem gering und man kann kaum Strukturen erkennen.



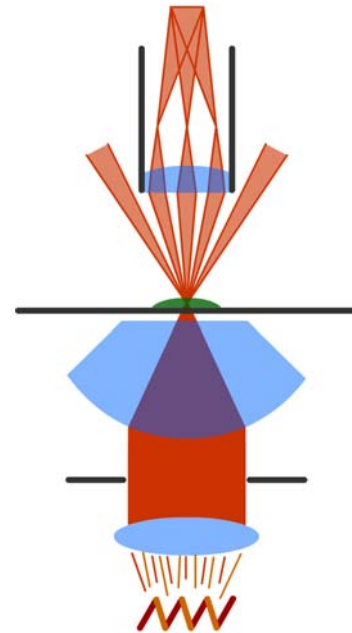
Durch den Einsatz einer Video-Kamera und eines Bildbearbeitungscomputers lässt sich der Kontrast so verstärken, dass selbst bei weit geöffneter Aperturblende ein kontrastreiches Bild zustande kommt.



4.5.1 Auflösung

Um eine minimale Strukturinformation und damit Auflösung zu erhalten müssen mindesten Maxima der nullten und ersten Ordnung erfasst werden.
 → **numerische Apertur** entscheidend!!

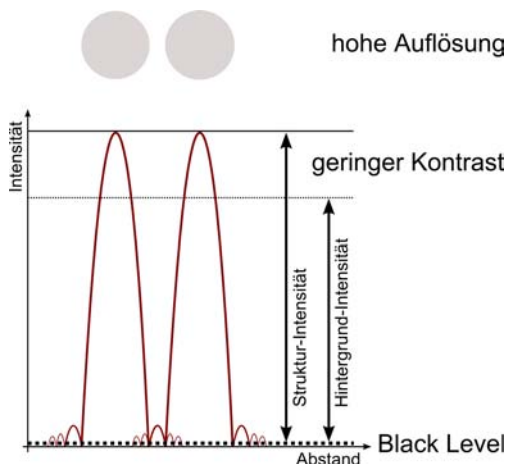
siehe Grundlagen / Optik / optische Instrumente /
 Mikroskop-Auflösung/Abbe-Theorie



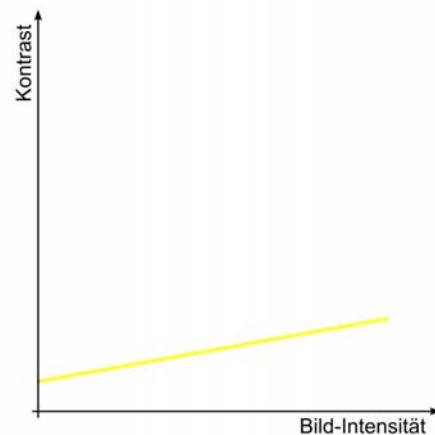
4.5.2 elektronische Kontrasterzeugung

In der **herkömmlichen Lichtmikroskopie** erhält man bei voll geöffneter Aperturblende maximale Auflösung. Aufgrund der starken Hintergrundintensität ist der Helligkeitsunterschied zur Strukturintensität aber sehr gering und man erhält **keinen oder kaum Kontrast**.

Der Kontrast kann in der herkömmlichen Lichtmikroskopie nur durch **Schließen der Aperturblende** vergrößert werden, was aber die Auflösung verschlechtert.



Kontrast bei voll geöffneter Aperturblende

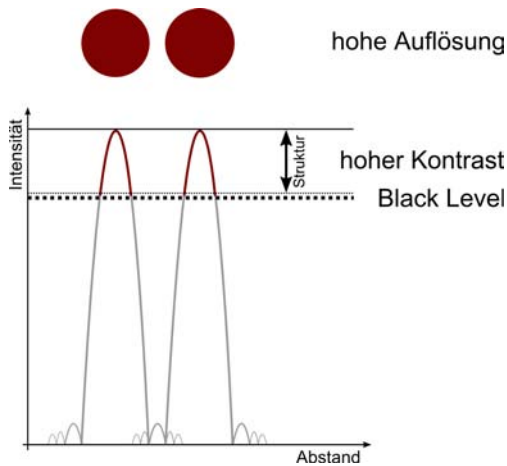


Zusammenhang zwischen Bild-Intensität und Kontrast bei **hoher** Hintergrundintensität

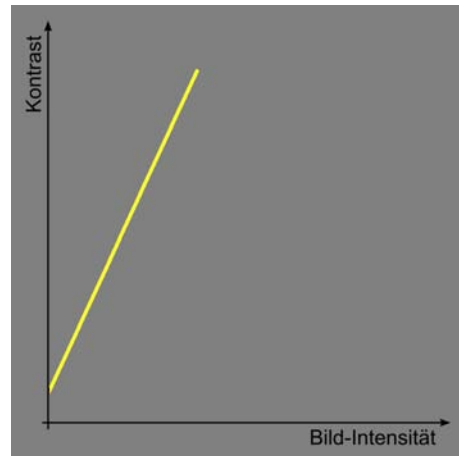
In der **Videomikroskopie** kann mit voll geöffneter Blende, also mit maximaler Auflösung gearbeitet werden. Die Kontrasterzeugung erfolgt hier elektronisch, indem der **Black Level der Videokamera angehoben** wird; dabei wird die gesamte Intensität des Bildes reduziert.

Die Hintergrundintensität liegt jetzt knapp oberhalb des Black Levels und ist somit nur mehr sehr schwach. Bei dieser geringen Hintergrund-Intensität, also einem sehr dunklen Hintergrund, reicht eine geringe Struktur-Intensität aus, um eine hohen Kontrast zu erhalten.

Über die Helligkeitsteuerung der Kamera kann das Signal noch zusätzlich geregelt werden.

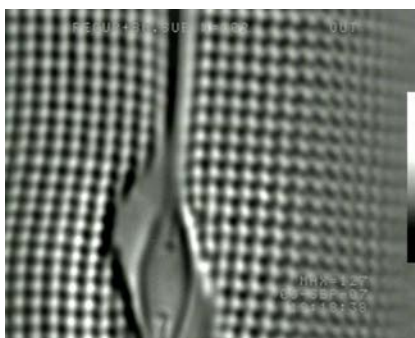


Kontrast bei voll geöffneter Aperturblende



Zusammenhang zwischen Bild-Intensität und Kontrast bei **geringer** Hintergrundintensität

4.5.3 Bilder



Diatomeen-Präparat



Diatomeen-Präparat



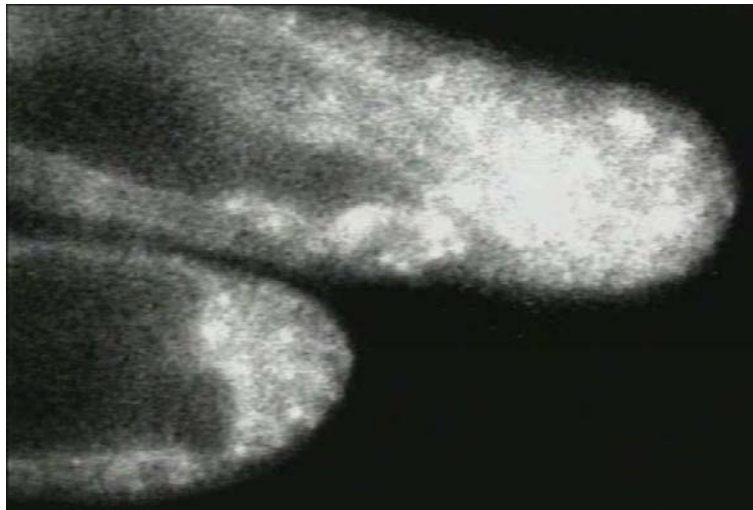
Hefe-Zellkern

4.6 Video Intensified Fluorescence (VIF)

Mit Hilfe der Video Intensified Fluorescence (VIF) Mikroskopie können schwache Fluoreszenz Signale durch den Einsatz von extrem lichtempfindlichen Kameras verstärkt werden. Durch die Verwendung eines Bildverarbeitungs- Computers können die Bilder weiter verbessert und dünnen Fäden und kleine Strukturen deutlich dargestellt werden.

Durch diese Methode können auch bewegte Strukturen, die nur schwach fluoreszieren, in lebenden Zellen verfolgt und analysiert werden.

Zusätzlich kann die verwendete Farbstoffkonzentration verringert werden. Die geringere Fluoreszenz Intensität bewirkt, dass nur sehr wenig Out-Of-Focus Licht entsteht und Strukturen außerhalb der Focusebene unsichtbar bleiben.



Wurzelhaarspitze – fluoreszenzmarkierte Vesikel

4.7 Infrarot-Mikroskopie

Sichtbares Licht hat eine Wellenlänge zwischen 400 und 750 nm. Das unsichtbare infrarote Licht hat eine höhere Wellenlängen bis 40.000 nm. Infrarot kann viele Materialien besser durchdringen als sichtbares Licht. Die Untersuchung dicker, wenig durchsichtiger Präparate im infraroten Licht liefert daher oft bessere Ergebnisse. Die Erfassung des Bildes erfolgt hier natürlich nicht über das Auge, sondern mit Hilfe einer infrarot-empfindlichen Video- oder Fotokamera.

Anwendungsbereiche

- Chitin ist für infrarotes Licht weitgehend durchlässig. Große oder stark pigmentierte Insekten können daher noch gut durchleuchtet werden. Die Infrarot-Mikroskopie ist daher eine zerstörungsfreie Alternative zum Bleichen oder Schneiden.
- Menschliche und tierische Haut erscheint im infraroten Licht ebenfalls transparent, wohingegen die Blutgefäße darunter sich deutlich abzeichnen. Besonders gute Ergebnisse erzielt man bei kompakten, undurchsichtigen Tumoren.
- Chlorophyll erscheint im infraroten Licht weiß. Bereits kleinste Schädigungen der Chloroplasten, die im sichtbaren Licht unsichtbar sind, bewirken eine auffallend dunkle Färbung im Infrarot.
- Erzminerale sind im sichtbaren Licht völlig undurchsichtig und erfordern spezielle Auflicht-Erzmikroskope für ihre Untersuchung. Die Infrarot-Mikroskopie ist vielfach eine kostengünstige Alternative. Für kristalloptische Zwecke kann sie mit der Polarisationsmikroskopie kombiniert werden.

Vor- und Nachteile

Vorteile

- Sehr durchdringungsfähig, die Beobachtung dicker oder undurchsichtiger Präparate wird erleichtert.
- Energiearme Strahlung, lebende Präparate werden kaum geschädigt und können sehr lange beobachtet werden.
- Für viele Organismen unsichtbar. Dunkelheitsliebende Protozoen oder Tiere können untersucht werden, ohne durch die Beleuchtung beeinträchtigt zu werden.

Nachteile

- Durch die große Wellenlänge ist die Auflösung deutlich schlechter als bei sichtbarem Licht.
- Feine Strukturen ergeben oft ungenügenden Kontrast

Literatur

A. Nürnberg (1957): Infrarot-Photographie. VEB Wilhelm Knapp Verlag, Halle/Saale. 135 pp
G. Wagner (1965): Infrarot Fotografie. Der Weg ins Unsichtbare. Verlag der Schönen Bücher, Stuttgart. 203 pp

4.7.1 Technische Voraussetzungen

Die meisten Lichtmikroskope können problemlos für Infrarot-Beobachtungen hergerichtet werden. Als Lichtquelle können Glüh-, Halogen- oder Bogenlampen verwendet werden; nur Leuchtdioden sind ungeeignet.

Generell kann im Mikroskop nur relativ kurzwelliges IR mit einer Wellenlänge von 750 nm bis etwa 1.100 nm nachgewiesen werden. Optisches Glas ist für dieses infrarote Licht durchlässig; anders als bei der UV-Mikroskopie können normale Objektive, Projektive und Objektträger verwendet werden. Allerdings ist die chromatische Aberration nur bei apochromatischen Linsen für infrarotes Licht ausreichend korrigiert.

Das IR-Bild wird mit einer IR-empfindlichen Videokamera detektiert und schwarz/weiß dargestellt.

Alternativ können eine analoge Kamera und IR-empfindlicher Film benutzt werden. Nur in diesem Fall sind auch Falschfarbenaufnahmen möglich. IR-Kameras und -Filme sind auch für sichtbares Licht empfindlich. Dieses muß daher mit einem infrarotdurchlässigen Filter ausgeblendet werden. Die meisten Belichtungsmesser sind für infrarotes Licht kaum empfindlich; die richtige Belichtungszeit muss durch Probieren gefunden werden.

Achtung

Bei vielen Mikroskopen befindet sich im Strahlengang ein IR-Sperrfilter, der die Wärmestrahlung der Lampe vom Präparat abhalten soll. Dieser muß gegebenenfalls vor der IR-Beobachtung entfernt werden.

4.7.2 Bilder



Kopf eines Wasserkäfers
im konventionellen Hellfeld



Kopf eines Wasserkäfers
im nahen Infrarot

1 <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/imgoct05/dwir1.jpg>

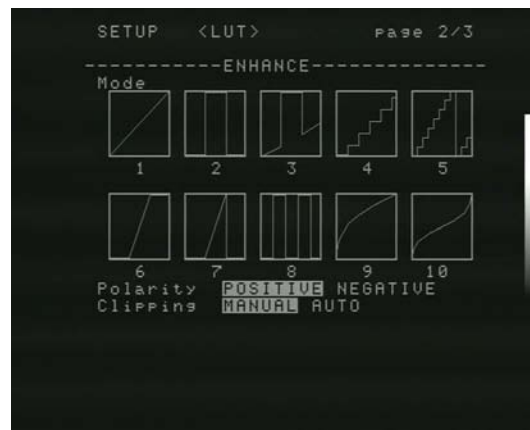
2 <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/imgoct05/dwir5.jpg>

4.8 Bildverarbeitung

Mit Hilfe eines Bildverarbeitungs-Computers (Bild Prozessor) kann das Kamerabild in Echtzeit weiter verbessert oder analysiert werden.

4.8.1 Verbesserung des Bildes

- **Kontrastverstärkung**



Gradationskurven und Kontrastverstärkung
Hamamatsu DVS-300

- **Helligkeit**

- **Rauschunterdrückung**

Zur Reduktion von Hintergrundrauschen können 2 oder mehrere hintereinander aufgenommene Bilder zu einem zusammengerechnet werden. Dadurch fällt das zufällig auftretende Rauschen weg.

- **Background Subtraction**

Um einen unregelmäßig beleuchteten Hintergrund zu verbessern, wird zunächst ein Bild ohne Präparat aufgenommen; also ein Bild vom unregelmäßigen Hintergrund. Dieses Bild wird als Referenz gespeichert und in Folge von jedem weiteren aufgenommenen Bild subtrahiert.



Objekt mit unregelmäßigem
Hintergrund



Referenzbild des unregelmäßigen
Hintergrundes



im Live-Modus subtrahierter
Hintergrund

4.8.2 Bild – Analyse

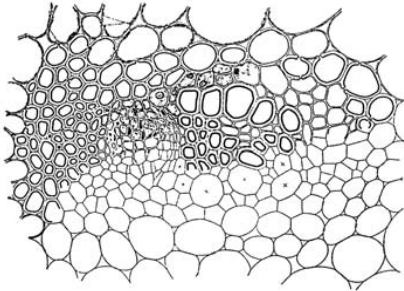
Spezielle Programme ermöglichen eine detaillierte und umfassende Auswertung der Bilddaten. Die Möglichkeiten, die moderne Bildanalyse-Programme bieten, werden immer umfangreicher; daher sind hier nur einige der häufigsten Funktionen erwähnt.

- Messung der Größe und Verteilung von Zellen und Organellen
- Auswertung von dynamischen Vorgängen, Bewegungsanalyse
- Intensitätsverteilung (Histogramme)
- Intensitätsmessungen (Fluoreszenz)

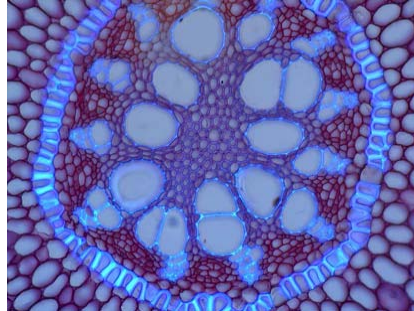
5 Dokumentation

Um ein mikroskopisches Bild festzuhalten gibt es drei Möglichkeiten:

Zeichnung



Foto



Video & Film



Jede dieser Methoden hat spezielle Anwendungsbereiche und natürlich auch Vor- und Nachteile, die auf den folgenden Seiten erläutert werden.

Foto- & Videoprotokoll

Besonders bei der Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen ist es wichtig, die aufgenommenen Bilder und Videosequenzen gut zu protokollieren, um auch später noch eine eindeutige Zuordnung der Daten zu gewährleisten.

Eine Foto- oder Videoprotokoll sollte folgende Angaben enthalten:

- Datum
- Objekt
- Videobandnummer / Ordnername
- Timecode bei Bandaufzeichnungen / Dateiname oder Negativnummer
- verwendete Methode (Kontrastverfahren, Färbungen, ...)
- verwendete Kamera
- Blende / Belichtungszeit
- Vergrößerung / Abbildungsmaßstab

- Bemerkungen

Zeichnungen müssen ebenfalls mit genauen Angaben über das Präparat versehen werden.

- Objekt (wissenschaftlicher Name, Familie)
- Dargestellter Teil / Struktur
- Zeichner
- Datum

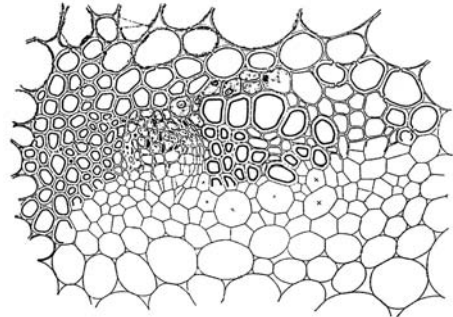
- Bemerkungen

5.1 Zeichnen

5.1.1 Bedeutung und Grenzen

Mikroskopische Zeichnungen sind nach wie vor eine der wichtigsten wissenschaftlichen Darstellungsmöglichkeiten.

Sie dienen zum einen der Dokumentation; darüber hinaus zwingt die Anfertigung einer Zeichnung aber auch zum intensiven Betrachten und fördert so das Verständnis des mikroskopischen Bildes.



5.1.2 Vor- und Nachteile

Wie jede Methode gibt es auch beim Zeichnen Vor- und Nachteile:

Vorteile

- Fördert intensives Beobachten und Verständnis.
- Mehrere optische Ebenen können zu einer räumlichen Darstellung vereint werden.
- Wichtige Strukturen können hervorgehoben, unwesentliche Strukturen nur angedeutet und Verunreinigungen ausgelassen werden → sauberes und klar verständliches Bild!
- Auch von dickeren und schlechteren Präparaten können noch gute und aussagekräftige Abbildungen angefertigt werden.
- Sehr schnell bewegte Objekte können „eingefroren“ dargestellt werden.

Nachteile

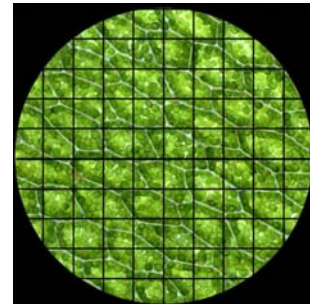
- Sehr zeitaufwändig.
- Gefahr der subjektiven Darstellung.

5.1.3 Zeichenhilfen

Mikroskopische Zeichnungen bestehen aus dünnen Linien und feinen Punkten; um diese Elemente gut darstellen zu können sind glattes **weißes Papier** und **gespitzte Bleistifte verschiedener Härtegrade** notwendig (evtl. Tuschestifte). Um die Anfertigung einer Zeichnung zu erleichtern gibt es verschiedene Hilfsmittel:

5.1.1.1 Zeichennetz:

Im Okular befindet sich auf Höhe des reellen Zwischenbildes ein Glasplättchen mit eingravierter Gitterstruktur. Damit lassen sich Proportionen und Lage der Strukturen besser erkennen.



Zeichennetz im Okular

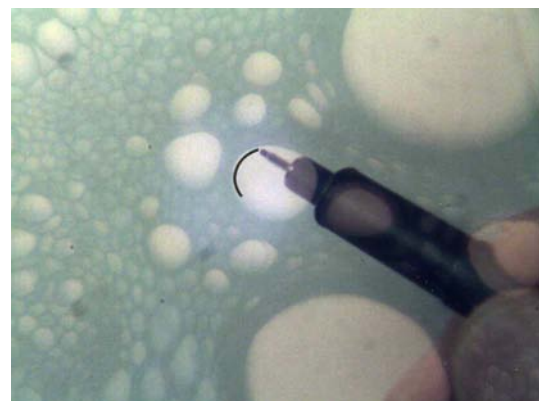
5.1.1.2 Zeichentubus

Über Prismen werden die Zeichenfläche und der Bleistift in das Mikroskopbild im Okular projiziert. Mit dem Einstellrad am Zeichentubus kann auf die Zeichenfläche scharfgestellt werden. So lassen sich die groben Umrisse und Proportionen des Objektes gut auf das Papier übertragen; Details müssen anschließend durch direkte Beobachtung eingezeichnet werden.

Um eine optimale Abbildung des Stiftes in mikroskopischen Bild zu erhalten, muss die Zeichenfläche gut beleuchtet und das Mikroskoplicht nur schwach aufgedreht werden.



Mikroskop mit Zeichentubus



Mikroskopbild mit projizierter Zeichenfläche

5.1.1.3 Monitor / Mattscheibe

Mit Hilfe einer Kamera kann das mikroskopische Bild auf einem Monitor dargestellt werden. Das große Monitorbild erleichtert oft das Zeichnen und erspart das anstrengende Beobachten durch die Okulare.

Zusätzlich kann auf dem Monitor eine transparente Folie angebracht werden, auf die sich mit einem Foliienstift die Konturen des Objektes übertragen lassen. Diese Methode ist vor allem für die Durchführung von Messungen sehr hilfreich.



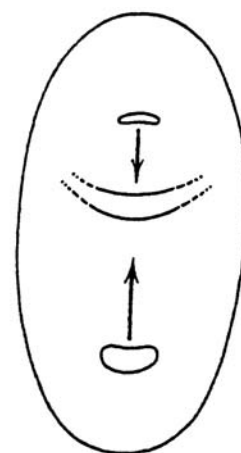
Das gleiche gilt auch für die Verwendung von Mattscheiben; hier wird das reelle Zwischenbild entweder direkt oder durch ein Projektiv vergrößert abgebildet.

5.1.4 Darstellungsmöglichkeiten

Je nach dem, für welchen Zweck eine Zeichnung verwendet wird, gibt es unterschiedliche Arten wie eine Zeichnung angefertigt werden kann. Dies beginnt bei einer Skizze und endet bei einer zellgetreuen Wiedergabe des Objektes. Es ist aber auch möglich, mehrere Darstellungsformen in einer Zeichnung zu vereinigen.

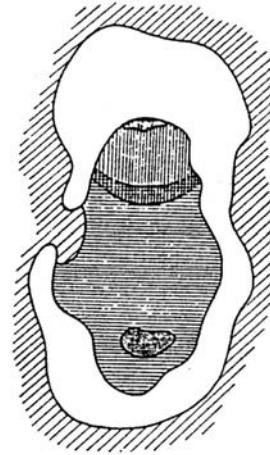
5.1.4.1 Skizze

Eine Skizze ist die einfachste Form der Darstellung und dient hauptsächlich der Erläuterung typischer Merkmale. Die abstrakte Darstellungsweise erfordert allerdings ein gutes theoretisches Verständnis.



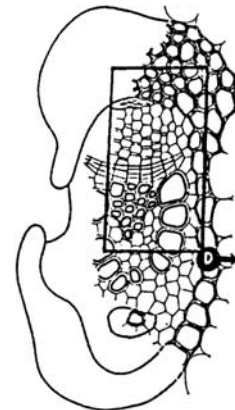
5.1.4.2 Übersichtszeichnung

Eine Übersichtszeichnung (Schema) stellt Gewebestrukturen in ihren Umrissen dar und berücksichtigt auch Proportionen und Lagebeziehungen. Unterschiedliche Strukturen werden dabei mit verschiedenen Schraffuren dargestellt.



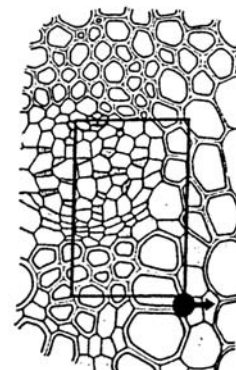
5.1.4.3 Halbschematische Zeichnungen

Entspricht einer Schemazeichnung, bei der Einzelzellen in typischer und allgemeiner Form, aber NICHT ZELLGETREU dargestellt werden.



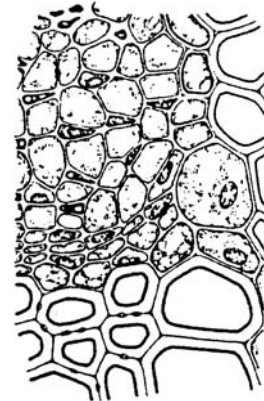
5.1.4.4 Zeichnung mit einfachen Konturen

Die Zeichnung erfolgt hier zellgetreu, wobei die Zellwände meist nur als einfache Striche dargestellt werden. Dickere Zellwände lassen sich allerdings mit dickeren Strichen hervorheben. Zellinhalte sind nicht zwingend einzuzeichnen.



5.1.4.5 Zeichnung mit doppelten Konturen

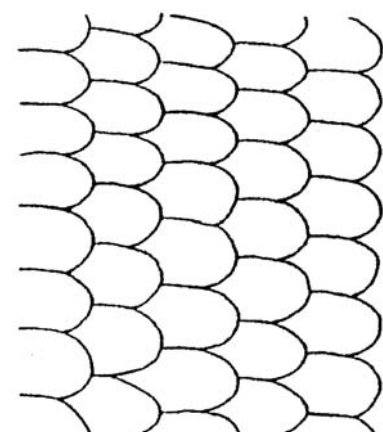
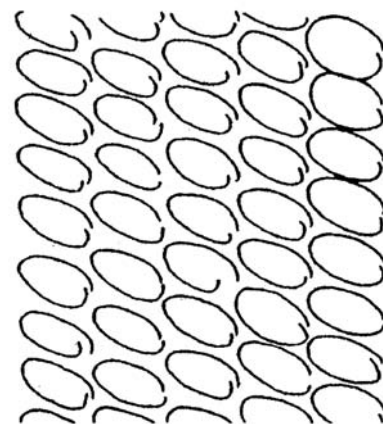
Diese Zeichnungstyp ist der detaillierteste. Die Darstellung erfolgt zellgetreu unter Berücksichtigung der tatsächlichen Zellwanddicke sowie des Zellinhaltes. Diese Art der Zeichnung liefert eine naturgetreue Abbildung des Objektes, was mit einem dementsprechend hohem Arbeitsaufwand verbunden ist. Daher werden solche Zeichnungen nur für Ausschnitte und Einzelheiten verwendet.



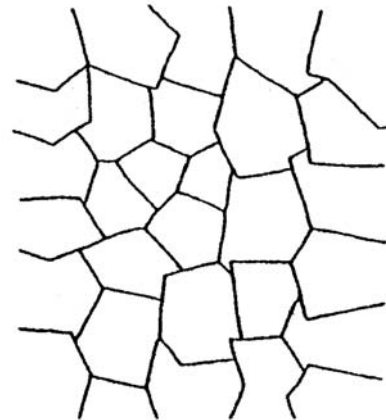
5.1.5 Zeichenfehler

Fehlerhafte Zeichnungen deuten oft darauf hin, dass ein Objekt nur oberflächlich beobachtet, bzw. die Anatomie des Objektes nicht verstanden wurde. Einige der häufigsten Fehler sind:

- Bei jungem Parenchym wird die hexagonale Grundform der pflanzlichen Zelle nicht erkannt und statt dessen elliptische Zellen gezeichnet. Es entsteht daher nicht der Eindruck eines zusammenhängenden Gewebes.
- Die Zellen werden durch schlampiges Arbeiten nicht geschlossen gezeichnet sondern nur als offene Kreise.
- Durch schematisches Aneinanderreihen von Zellen entsteht das Muster eines Ziegeldaches. Was auf Unkenntnis von Zellteilung und Wandbildung hinweist.



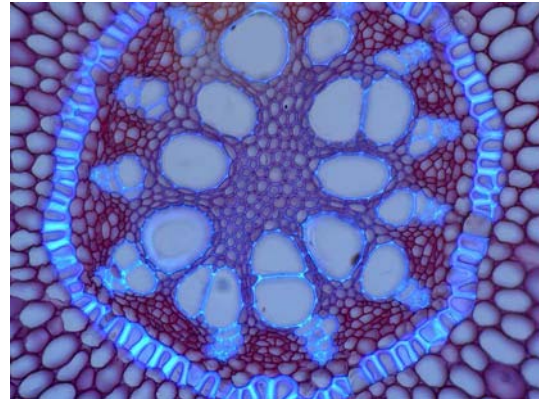
- Interzellularen werden häufig vernachlässigt oder falsch eingezeichnet. Die Ursache ist neben mangelnder Beobachtung auch Unklarheit über die Entstehung die Funktion von Interzellularen.



- Zellkern und Plastiden befinden sich im Plasma und es darf nicht so aussehen als würden sie in der Vakuole schwimmen.

5.2 Fotografie

Die fotografische Dokumentation ist eine wichtige Möglichkeit, die mikroskopischen Ergebnisse festzuhalten. Dabei spielt heute vor allem die digitale Fotografie eine große Rolle. Der zeitliche Aufwand ist hier zwar wesentlich geringer als bei der Anfertigung einer Detailzeichnung, trotzdem kann die Fotografie die Zeichnung nicht vollkommen ersetzen.



Ob man sich nun für eine Zeichnung entscheidet oder fotografiert, hängt vom Objekt selbst ab beziehungsweise davon, was man mit den Bildern machen möchte (Analyse, Lernen, Präsentation, ...).

Vorteile

- Die Abbildung der Objekte erfolgt maßstabsgetreu; daher können auf dem Foto nachträglich noch Größe und Lage von abgebildeten Strukturen bestimmt werden.
- Der zeitliche Aufwand ist sehr gering. (von der analogen Film- und Fotoentwicklung abgesehen)

Nachteile

- Am Foto wird nur das abgebildet, was zum Zeitpunkt der Belichtung im Mikroskop zu sehen war.
- Für ein gutes und scharfes Foto benötigt man auch ein gutes und vor allem dünnes Präparat.
- Ein intensives Beobachten und Verständnis des Objektes ist nicht notwendig.

5.2.1 reelles Bild – Projektiv

Bei Mikroskopen mit „unendlich“ Optiken wird das von der Tubuslinse erzeugte reelle Zwischenbild direkt auf den Chip der Kamera oder den Chemiefilm projiziert.

Auch bei Systemen mit 160mm Optiken sollte zuerst versucht werden, den Chip oder den Film in die Ebene des reellen Zwischenbildes zu bringen. Sollte man damit kein zufriedenstellendes Bild erhalten (Farbfehler) kann ein Kompensationsokular als Projektiv verwendet werden. Dazu wird das Okular so positioniert, dass es ein reelles Bild auf den Chip oder den Film projiziert.

Mit Hilfe von speziellen optischen Adaptern wird das Bild auf dem Chip oder Film im Vergleich zu einem einfachen Projektiv verkleinert dargestellt; also ein größerer Bildausschnitt auf dem Chip abgebildet.

In den meisten Fällen ist es aber zweckmäßiger, die Kamera ohne Projektiv oder optischen Adapter zu verwenden und die Chip- oder Filmebene direkt in die Ebene des mikroskopischen Zwischenbildes zu bringen.

5.2.2 Nachvergrößerung

Die Endvergrößerung eines Objektes sollte nicht über das 500- bis 1000-fache der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs hinausgehen. Oberhalb dieser förderliche Vergrößerung werden keine neuen Details sichtbar. Man spricht dann von „leerer Vergrößerung“ oder „Übervergrößerung“.

Erfordert das Objekt eine hohe Tiefenschärfe ist es besser, Objektive mit geringer Vergrößerung zu verwenden und das Bild nachzuvergrößern, als direkt mit hoch vergrößernden Objektiven zu arbeiten.

Beispiele für Tiefenschärfe:

- Achromat 10/0,25 = 8,5 μm
- Achromat 40/0,65 = 1,0 μm

5.2.3 Beleuchtung

Normalerweise wird mit der **normalen Mikroskopbeleuchtung** gearbeitet, wobei eine relativ hohe Lichtintensität notwendig ist.

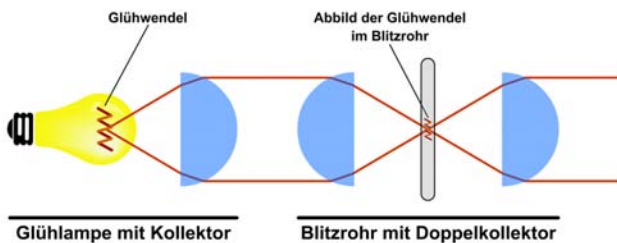
Halogenlampen und Bogenlampen haben aber einen hohen IR-Anteil und erwärmen bei hoher Lichtintensität die Präparate unnötig stark. Außerdem kann die Lichtfarbe von Halogen- und anderen Glühlampen je nach Betriebsspannung und Alter der Lampe stark variieren. Das rotlastige Lichtspektrum dieser Lampen verursacht zudem einen roten Farbstich; dieser kann im einfachsten Fall durch einen Blaufilter reduziert werden; bei digitalen Kameras ist ein Weißabgleich möglich um den Farbstich zu beseitigen.

Für anspruchsvollere Anwendungen und empfindliche Präparate ist daher die Verwendung eines **Mikroblitzes** ratsam. Denn zum einen muss das Objekt nicht über einen längeren Zeitraum der hohen Lichtintensität der Halogenlampe ausgesetzt werden und zum anderen besitzt Blitzlicht im Gegensatz zu herkömmlichen Glühlampen ein dem Tageslicht sehr ähnliches Spektrum.

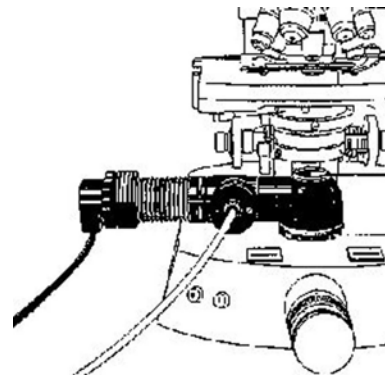
5.2.3.1 Mikroblitz

Normalerweise führen bei starker Vergrößerung schon leichteste Erschütterungen (z.B. durch den Verschuß, Spiegelschlag) zu einem stark verwackelten Bild. Durch den Einsatz von Elektronenblitzen kann die effektive Belichtungszeit auf unter 1/1000 Sekunde verringert und damit die Verwacklungsunschärfe fast vollständig eliminiert werden; besonders bei Aufnahmen von lebenden, sich bewegenden Organismen ist dies von Vorteil.

Die Einkopplung des Mikroblitzes in den Strahlengang erfolgt entweder über ein Prisma bzw. einen halbdurchlässigen Spiegel oder über einen zusätzlichen Doppelkollektor. Wie der Begriff schon andeutet, besteht ein Doppelkollektor aus zwei identischen Kollektorlinsen. Die erste Linse des Doppelkollektors bündelt das vom Mikroskoplampen-Kollektor kommende Licht in einem Fleck. An dieser Stelle wird die Blitzröhre in den Strahlengang eingefügt. Die zweite Linse sorgt dafür, dass Blitz- und Mikroskoplampe gemeinsam entsprechend dem Köhler'schen Beleuchtungsprinzip abgebildet werden.



Beleuchtung mit Doppelkollektor nach F. K. Möllring,
Linsensysteme vereinfacht



Leuchte mit Doppelkollektor (Zeiss)
und seitlich eingestecktem Blitzrohr
als Aufsatzleuchte auf der Lichtaustrittsöffnung

Provisorisch kann ein handelsübliches Blitzgerät verwendet werden; dazu wird direkt unter dem Kondensor eine Mattscheibe angebracht und mit Hilfe eines kleinen Blitzgerätes aus nächster Nähe angeblitzt. Dies entspricht zwar nicht dem Köhlerschen Beleuchtungsprinzip, aber im Hellfeld können damit recht gute Aufnahmen erzielt werden. Für andere Kontrastverfahren wie Phasenkontrast oder Dunkelfeld ist diese Methode nicht geeignet, da die Lichtausbeute dabei zu gering ist.

5.2.4 Analog-Kamera

Analoge Fotografie wird in der Mikrofotografie heute kaum noch verwendet. Grund dafür sind einerseits die doch sehr **hohen Kosten** für Filme, Fotopapier und Entwicklung, andererseits sind die aufgenommenen analogen Bilder **nicht sofort verfügbar**. Zudem müssen sie für die Verwendung in digitalen Medien (Präsentationen, Artikel, ...) erst eingescannt werden.

Durch die Verwendung von sehr **lichtempfindlichen** Filmen ist auch die Aufnahme von sehr lichtschwachen Strukturen (Fluoreszenzen) möglich.

Für spezielle Anwendungen können auch größere Filmformate wie Mittelformat oder Planfilm verwendet werden.

5.2.4.1 Spiegelreflexkamera

Die einfachste Möglichkeit, analoge Fotos am Mikroskop zu machen, ist die Verwendung einer Spiegelreflexkamera die, **ohne Objektiv**, mit einem passendem Adapter auf einen Fototubus (Tritubus) aufgesetzt wird. Das reelle Zwischenbild wird so direkt auf den Film projiziert.

Das größte Problem bei der Verwendung einer Spiegelreflexkamera ist allerdings der Spiegelschlag beim Auslösen der Kamera.

Vor allem bei starken Vergrößerungen kann dies zu verwackelten Bildern führen.

Um dies zu vermeiden, wird mit **Spiegelverriegelung** gearbeitet. Das heißt der Spiegel wird in einer hochgeklappten Position fixiert.



Beim Auslösen der Kamera werden dann entweder die Verschlusslamellen der Kamera geöffnet und geschlossen, was kaum zu Vibrationen führt. Die Ermittlung der Belichtungszeit erfolgt bei vielen modernen Spiegelreflexkameras durch Messung auf der Filmoberfläche.

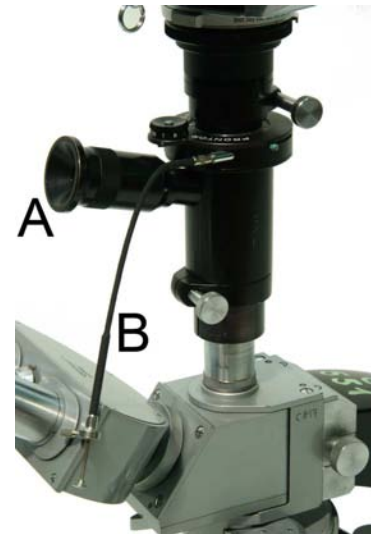
Befinden sich die Belichtungssensoren oberhalb des hochgeklappten Spiegels, also im Prismengehäuse, muss die Messung der Belichtungszeit vor dem Hochklappen des Spiegels erfolgen. Um die Messung nicht zu verfälschen muss man den Okulareinblick verschließen, damit durch ihn kein Licht ins Prismengehäuse fällt.

Alternativ kann man einen Kameraadapter mit eingebautem Auslösemechanismus verwenden. In diesem Fall wird nicht nur der Spiegel hochgeklappt, sondern auch der Verschluss der Kamera geöffnet (**Dauerbelichtungs-Modus**). Der Verschluss im Adapter ist eine Irisblende und verursacht beim Öffnen und Schließen keinerlei Erschütterungen. Die Belichtungsdauer muss zuerst über die Kamera ermittelt und danach am **Verschluss des Adapters** eingestellt werden.

Die Einstellung der passenden Fokusebene erfolgt über ein eigenes Okular am Kameradapter (A).

In diesem **Einstellokular** befindet sich in den meisten Fällen ein Kreuz, welches man zuerst durch Drehen am Okular scharf stellen muss, um den Dioptriefehler der Augen auszugleichen. Stellt man nun auf die gewünschte Stelle im Präparat scharf, wird diese auch in der Filmebene scharf abgebildet.

Um die Kamera beim Betätigen des Auslösers nicht mehr zu bewegen wird normalerweise mit einem Kabel oder Infrarot-**Fernauslöser** (B). gearbeitet oder, wenn möglich, die Kamera direkt über einen **Computer** gesteuert.



5.2.4.2 Mikrokamera

Die professionellere Variante für analoge Mikrofotografie ist eine so genannte Mikrokamera.

Sie besteht aus einem Mikroskopadapter mit eingebauter Verschlussvorrichtung, auf den eine Filmkassette montiert wird. Die Steuerung erfolgt über eine separate Steuerungseinheit. Dort können neben Messung und Einstellung der Belichtungszeit auch Bildzähler, Doppelbelichtung und Filmtransportsperre eingestellt werden. Die Auslösung erfolgt ebenfalls über diese Steuereinheit. Zusätzlich sind bei vielen Modellen auch Anschlüsse für einen Elektronenblitz vorhanden.

Die Einstellung der Fokusebene erfolgt wie auch bei den Adaptern für Spiegelreflexkameras über ein Einstellokular. In diesem befindet sich in den meisten Fällen ein Kreuz, welches man zuerst durch Drehen am Okular scharf stellen muss, um den Dioptriefehler der Augen auszugleichen. Stellt man nun auf die gewünschte Stelle im Präparat scharf, wird diese auch in der Filmebene scharf abgebildet.

Durch die abnehmbare Filmkassette können parallel auch mehrere unterschiedliche Filme (s/w, Farbe, Dia, versch. Empfindlichkeiten,...) verwendet und so der Film sehr einfach und schnell an die jeweilige Aufnahmesituation angepasst werden.



5.2.5 Digital-Kamera

Digitale Fotografie und Bilddokumentation sind heutzutage eigentlich schon fast Standard in jedem Labor. Im Gegensatz zur analogen Fotografie sind bei digitalen Methoden die **Bilder sofort verfügbar** und für computergestützte Verwendung und Archivierung bestens geeignet, außerdem sind die laufenden **Kosten nur sehr gering**.

Vor allem die Verwendung von digitalen Mikroskop-Kameras mit Steuerung über Computer und spezielle Software Programme ist sehr benutzerfreundlich und komfortabel.

Allerdings ist bei den meisten digitalen Mikroskopkameras die Farbwiedergabe nicht ganz naturgetreu und die **Lichtempfindlichkeit** vor allem in der Fluoreszenzmikroskopie zu **gering**.

Bei anspruchsvolleren Mikroskop-Kameras kann die Lichtsensitivität des Aufnahmechips durch **Binning (Zusammenrechnen mehrerer Pixel zu einem)** erhöht werden. In diesem lichtsensitiven Modus erhält man allerdings nur schwarz/weiß Bilder. Um Farbbilder aufzeichnen zu können sind grüne, blaue und rote Sensorpixel notwendig, diese Farbinformation geht allerdings beim Zusammenrechnen der Pixel verloren. Je nach Anzahl der vereinigten Pixel reduziert sich auch die Auflösung des Chips.

5.2.5.1 Aufnahme-Chip – Auflösung

Die notwendige Auflösung von Mikroskopkameras wird häufig überbewertet.

Für ein achromates Objektiv mit einem Abbildungsmaßstab von 10x sind zum Beispiel 1,5 Mio. Pixel ausreichend um alle aufgelösten Strukturen darstellen zu können. Bei stärker vergrößernden Objektiven ist die Anzahl sogar noch geringer.

Chips mit einer hohen Pixelanzahl werden erst dann sinnvoll, wenn man schwach vergrößernde Objektive mit hoher Apertur verwendet (Plan-Apochromate) und die Bilder eventuell auch noch nachvergrößern möchte.

Objektivklasse	Abbildungsmaßstab/n.A.	notwendige Pixelanzahl
Achromat	4x / 0,10	1,52 Mio.
	10x / 0,25	1,52 Mio.
	20x/0,40	0,97 Mio.
	60x / 0,80	0,43 Mio.
	100x /1,25	0,38 Mio.
Plan Apochromat	4x / 0,20	6,08 Mio.
	10x / 0,45	4,93 Mio.
	20x/0,75	3,42 Mio.
	60x / 1,40	1,32 Mio.
	100x /1,40	0,47 Mio.

Berechnet wird die notwendige Pixelanzahl des Chips aus dem Größenverhältnis zwischen den einzelnen Fotodioden und der Größe des auf den Chip abgebildeten Mikroskopbildes.

Berechnungsbeispiel

Bei einer Wellenlänge von $\lambda=550$ nm (grünes Licht) erhält man bei einem Objektiv 20x / $NA=0,75$ eine Auflösung von $d=0,447$ μm .

$$d = 1,22 \cdot 0,55 / (0,75 + 0,75) = 0,447 \mu\text{m}$$

Die Abbildung auf dem Chip erfolgt im Abbildungsmaßstab des Objektivs; in unserem Beispiel also um den Faktor 20.

$$0,447 \cdot 20 = 8,94 \mu\text{m}$$

Nehmen wir eine Breite des abgebildeten Objekts von 9mm an, so können rund 1007 Bildpunkte unterschieden werden.

$$9000 / 8,94 = 1007 \text{ Bildpunkte}$$

Damit auch die Kamera diese Punkte unterscheiden kann, muss sie (nach Shannon und Nyquist) doppelt so viele Pixel aufweisen. Dies würde also einer Pixelanzahl 2014 entsprechen.

$$1007 \cdot 2 = 2014 \text{ Pixel}$$

Gehen wir nun von einem Seitenverhältnis von 5/4 aus, erhalten wir für die Bildhöhe eine Pixelanzahl von 1611.

$$5 / 4 = 2014 / 1611$$

Somit erhalten wir eine notwendige Pixelanzahl von 3,25 Mio. Pixel.

$$2014 \cdot 1611 = 3.244.554 \text{ Pixel}$$

Eine detaillierte Erklärung bzw. eine interaktive Berechnung der Chip-Größen ist unter folgendem Link zu finden: <http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/pixelcalc/index.html>

5.2.5.2 Weißabgleich

Durch das rotlastige Lichtspektrum der Glühlampen ist ein Weißabgleich unumgänglich, um einen Rotschlag der Bilder zu vermeiden.

Beim Weißabgleich (engl. white balance, WB) wird die Kamera an die Farbtemperatur der Beleuchtung (Lichtverhältnisse) angepasst.

In der digitalen Mikrofotografie erfolgt die Einstellung des Weißabgleichs in Regel manuell durch Definition eines weißen Bereiches. Dazu stellt man im Mikroskop eine Stelle ohne Objekt ein und führt für diesen Bereich den Weißabgleich durch. Anschließend kann das Objekt wieder ins Bildfeld gebracht und fotografiert werden.

5.2.5.3 Kompaktkamera

Die einfachste Methode ein digitales Mikrofoto zu erstellen ist die Verwendung einer handelsüblichen Kompaktkamera. Mit dieser fotografiert man einfach durch das Okular und erhält so mit etwas Spielerei auch sehr ansehnliche Fotos.



Für längere Versuche und Dokumentationen ist diese Methode natürlich nicht geeignet. Als kostengünstigere Lösung bieten sich Kompaktkameras an, die sich über einen Adapter am Fototubus oder anstatt eines Okulars direkt am Mikroskop montieren lassen.



Dazu muss die verwendete Kamera eine Vorrichtung besitzen, mit der die Kamera über den Adapter am Mikroskop befestigt werden kann. In den meisten Fällen ist dies ein Gewinde am Objektiv. Viele Mikroskop-Hersteller bieten solche Adapter für zahlreiche Kompaktkameras vieler Marken an. Diese Adapter besitzen ein zusätzliches optisches Linsensystem, welches die Optik der Kamera ausgleicht und so eine optimale Abbildung des Zwischenbildes auf dem Aufnahmechip der Kamera ermöglicht.

Anhand der sehr häufig verwendeten Modelle der Nikon Coolpix Serie soll hier eine kurz Beschreibung der notwendigen Einstellung für die Verwendung von Kompaktkameras am Mikroskop gegeben werden.

Voreinstellungen zur Nutzung der Nikon Coolpix 4500 am Mikroskop

Manueller Modus:	M
Blende möglichst weit öffnen:	zB 2,6
Empfindlichkeit:	ISO-Knopf + Daumenrad > ISO 100
Soweit einzoomen , daß die Vignettierung verschwindet	
Zeitauslöser aktivieren:	MF-Knopf mehrfach drücken bis Zeitauslösersymbol erscheint (10sec)

Setup-Einstellungen

Automatisches Ausschalten entschärfen:	MENU>SETUP>Autom.Ausschalten>30Minuten
Sprache einstellen:	MENU>SETUP>Sprache>...

Aufnahmemenü-Einstellungen

Bildqualität maximal:	MENU>Aufnahmemenü>Bildqualität>HI oder FINE
Bildgröße maximal:	MENU>Aufnahmemenü>Bildgröße>2272x1704
Blitz abschalten:	MENU>Aufnahmemenü>Blitzgerät Option >Blitzleistung Strg.>Int. Blitz aus
Schärfe:	MENU>Aufnahmemenü>Fokusooptionen >MF-Schärfeindikator Manueller Fokus (Bergsymbol), Großer Monitor zur Beurteilung der Schärfe
Zoom beim Ausschalten speichern:	MENU>Aufnahmemenü>Zoomoptionen >Zoom-Einstellungen>letzte Position
Kontrast erhöhen:	MENU>Aufnahmemenü>Bild einstellen >Mehr Kontrast
Weißabgleich bei JEDER Helligkeitsveränderung der Lichtquelle:	MENU>Aufnahmemenü>Weißabgleich >Weißpunkt setzen>Messen
eventuell Belichtungsreihe (Bracketting):	MENU>Aufnahmemenü>Belichtungsreihe >EIN>3+/-1

5.2.5.4 Spiegelreflexkamera

Für die Verwendung am Mikroskop gilt für digitale Spiegelreflexkameras im Wesentlichen das gleiche wie für analoge Spiegelreflexkameras.

Mit einem Kamera-Adapter wird das Kameragehäuse **ohne Objektiv** auf den Fototubus (Tritubus) montiert. Das reelle Zwischenbild wird so direkt auf den Aufnahmechip projiziert.

Das Problem des Spiegelschlags beim Auslösen der Kamera kann wie auch bei analogen Kameras durch Verwendung der **Spiegelverriegelung** verhindert werden. Das heißt der Spiegel wird in einer hochgeklappten Position fixiert.

Beim Auslösen der Kamera werden dann entweder die Verschlusslamellen der Kamera geöffnet und geschlossen, was kaum zu Vibrationen führt. Die Ermittlung der Belichtungszeit erfolgt bei vielen modernen Spiegelreflexkameras durch Messung auf der Filmoberfläche. Befinden sich die Belichtungssensoren oberhalb des hochgeklappten Spiegels, also im Prismengehäuse, muss die Messung der Belichtungszeit vor dem Hochklappen des Spiegels erfolgen. Um die Messung nicht zu verfälschen muss man den Okulareinblick verschließen, damit durch ihn kein Licht ins Prismengehäuse fällt.

Alternativ kann man einen Kameraadapter mit eingebauten Auslösemechanismus verwenden. In diesem Fall wird nicht nur der Spiegel hochgeklappt sondern auch der Verschluss der Kamera geöffnet (**Dauerbelichtungs-Modus**). Der Verschluss im Adapter ist eine Irisblende und verursacht beim Öffnen und Schließen keinerlei Erschütterungen. Die Belichtungsdauer muss zuerst über die Kamera ermittelt und danach am **Verschluss des Adapters** eingestellt werden.

Die Einstellung der passenden Fokusebene erfolgt, wie bei analogen Spiegelreflexkameras, über ein Einstellokular am Kameradapter. In diesem befindet sich in den meisten Fällen ein Kreuz oder ein Kreis aus Doppellinien. Auf diese muss man das Einstellokular durch Drehen zuerst scharf stellen, um den Dioptriefehler der Augen auszugleichen. Stellt man nun mit dem Feintrieb des Mikroskops auf die gewünschte Stelle im Präparat scharf, wird das Objekt auch in der Filmebene scharf abgebildet.

Bei Spiegelreflexkameras mit Livebild-Vorschau kann die Einstellung des Fokus auch über das Display oder einen angeschlossenen Monitor durchgeführt werden.



Digitale Spiegelreflexkamera mit Livebild-Vorschau

Um die Kamera beim Betätigen des Auslösers nicht mehr zu bewegen wird normalerweise mit einem **Fernauslöser** (Kabel oder Infrarot) gearbeitet oder, wenn möglich, die Kamera direkt über einen **Computer** gesteuert.

5.2.5.5 Mikroskop-Kamera

Spezielle Mikroskop-Kameras sind heutzutage die beste Möglichkeit am Mikroskop digitale Bilder zu erstellen. Über einen Computer und die Kamera-Software lässt sich die Kamera sehr bequem steuern und einstellen. Bei den meisten der mitgelieferten Softwarepakete lassen sich zumindest Messbalken erstellen sowie einfache Messungen und grundlegende Bildbearbeitung durchführen.

Die Montage der Kamera erfolgt über Adapter am Fototubus oder am Okular, wobei der Aufnahmechip in die Ebene des reellen Zwischenbilds gebracht wird.

Die Einstellung der Fokusebene, der Belichtungszeit oder des Weißabgleichs erfolgt über die Kamerasoftware am Computer.

Mikroskopkameras gibt es in allen Preisklassen.

Die einfachsten Mikroskopkameras sind **Okularkameras** mit USB Anschluss; diese sind schon unter 100 Euro erhältlich.

Die Auflösung ist bei diesen Kameras allerdings meist sehr gering ($\sim 640 \times 480$ Pixel) und die Software bietet keine oder kaum Mess- oder Auswertfunktionen.



Bessere, **semiprofessionelle Mikroskopkameras**, bieten schon eine wesentlich höhere Auflösung ($\sim 1600 \times 1200$ Pixel) und auch mehr Softwarefunktionen.

Mit Hilfe von Kalibrierungsplatten lässt sich die Software auch eichen, was die Durchführung von Messungen und Analysen ermöglicht.

Diese oft etwas kleineren Kameras lassen sich sowohl am Fototubus als auch am Okular montieren.



Professionelle Mikroskopkameras zeichnen sich durch Farbtreue, hervorragenden Kontrast, hohe Bildwiederholungsraten und ein ausgezeichnetes Signal-Rausch-Verhältnis aus.

Viele dieser Kameras besitzen oft auch eine eigene Kühlung; durch diese wird thermisches Rauschen verringert. Vor allem in der Fluoreszenzmikroskopie und bei sehr schwachen Signalen können damit noch schönere Ergebnisse erzielt werden.

Die Auflösung von professionellen Mikroskopkameras liegt momentan zwischen 4 und 5 Megapixel.

Alle Steuerungsfunktionen erfolgen über die Software. Je nach Funktionsumfang (Messen, Analysieren, Deconvolution, 3D-Rekonstruktion, ...) ist diese oft um ein vieles teurer als die Kamera selbst, bietet dafür aber viele Möglichkeiten die Bilddaten weiter zu bearbeiten und auszuwerten.



5.2.6 Kein Bild – was tun?

5.2.6.1 Schwarzes Bild

- Kamera ist **nicht** mit dem Computer / Monitor **verbunden**
 - prüfen ob die Kamera eingeschaltet ist
 - Steckverbindungen prüfen:
wurden die richtigen Aus- und Eingänge verwendet und aktiviert
- die Kamera erhält **kein Signal**
 - kontrollieren ob der Strahlteiler im Tritubus in richtiger Stellung ist
oder ob der richtige Ausgang am Mikroskop aktiv ist.
- die Kamera erhält ein zu **schwaches Signal**
 - für die Mikro-Fotografie ist meistens mehr Licht notwendig
kontrollieren ob genügend Licht auf die Kamera gelangt oder
die Sensitivität der digital Kamera erhöhen.
 - es könnten sich auch noch unerwünschte Filter, Prismen oder Blenden
im Strahlengang befinden.
- Bei der Software ist eine **falsche Kamera** eingestellt

5.2.6.2 Weißes Bild

- Die Belichtungseinstellung der Kamera ist falsch justiert und es kommt zur **Überbelichtung**
 - eine Autobelichtung durchführen um eine passende Einstellung zu finden.
- Das Objekt befindet sich außerhalb des **Kameraausschnitts** oder ist **nicht fokussiert**
 - Objekt in die Mitte des Bildfeldes bringen und/oder fokussieren.
- Blende zu weit offen → **kein Kontrast**

5.3 Video und Film

Oberhalb der Verschmelzungsfrequenz des menschlichen Auges von 12-18 Bilder / Sekunde sehen wir keine einzelnen Bilder mehr sondern einen flüssigen Bewegungsablauf.

Um bewegte Strukturen optimal zu dokumentieren, ist daher die Aufnahme von mindestens 25 Bildern pro Sekunde notwendig.

Beim Video werden diese 25 Vollbilder/sek. als 50 Halbbilder (gerade Zeilen und ungerade Zeilen) gezeigt, wodurch ein filmmerfreies Bild entsteht.

Diese Bildwiederholffrequenz von 25 Bildern/sek. (fps – frames per second) entspricht dem **PAL** Standard von 50 Hz (50 Halbbilder/sek.)

In den USA und Japan ist das **NTSC** System mit 30 Vollbildern (60 Halbbildern) pro Sekunde Standard.

Durch die schnellen Aufnahme-Bildraten von modernen Digitalkameras hat die Bedeutung von Videoaufnahmen in der mikroskopischen Dokumentation etwas abgenommen.

Besondere Bedeutung haben Film- und Videoaufnahmen noch immer bei Zeitdehnung bzw. bei der Verwendung von speziellen Mikroskopieverfahren (UV- und Videomikroskopie).

5.3.1 Zeitdehnung

Bei einer richtigen Zeitdehnung sind spezielle Kameras notwendig, die mehr als 25 fps. aufzeichnen können (bis zu 10.000). Werden diese dann wieder mit der normalen Bildwiederholffrequenz von 25 fps. Abgespielt, so erhält man eine Zeitlupendarstellung des Bewegungsablaufs.

Je mehr Bilder pro Sekunde aufgezeichnet werden, desto mehr Detailinformationen der Bewegung können dokumentiert werden.

Werden 25 Bilder in der Sekunde aufgenommen (Normalfrequenz) und einfach nur langsamer abgespielt (zB 10 fps), so erhält man auch eine langsamere Darstellung der Bewegung; in dieser ist aber nicht mehr Information enthalten als in den 25 Bildern aufgenommen wurde!!!!!!

5.3.2 Zeitraffung

Für Zeitraffung werden weniger Bilder pro Sekunde aufgenommen, diese dann aber trotzdem mit 25 fps. abgespielt; die Bewegung wird also schneller dargestellt als sie wirklich ist. Zeitraffung ist mit jeder Kamera möglich; die Einzelbilder können mit Hilfe von Videoschnittprogrammen zu einem Film zusammengesetzt werden.

5.3.3 Chemie-Film

Lange Zeit wurden in der Mikroskopie 16mm Filme zur Dokumentation von Bewegung verwendet. Durch die extrem hohen Kosten für Filmmaterial und Ausarbeitung sowie durch die lange Wartezeit auf den entwickelten Film finden sie heute eigentlich keine Anwendung mehr.

16mm Kameras waren allerdings bis vor kurzem die einzige Möglichkeit überhaupt wirkliche Zeitdehnung zu machen bzw. sind noch immer von enormer Bedeutung wenn besonders starke Zeitdehnung erforderlich ist.

Mit speziellen Hochgeschwindigkeitskameras sind Aufnahmen von bis zu 10.000 Bildern pro Sekunde auf 16mm Film möglich!!!

Mit modernen Hochgeschwindigkeitskameras können bei einer Auflösung von 800x600 Pixel 1000 fps aufgezeichnet werden. Bei geringer Auflösung bis zu 5000 fps.

5.3.4 CCD-Kamera

Heutzutage erfolgt die Dokumentation von Bewegungsvorgängen mittels CCD-Kameras. Ein CCD (Charge Coupled Device) Sensor ist ein lichtempfindliches Bauteil, dass proportional zur eingestrahnten Lichtmenge ein elektrisches Signal ausgibt.

In professionellen Kameras wird das einfallende Licht mit einem Prisma in die drei Farben Rot, Blau und Grün zerlegt und auf drei CCD-Chips aufgeteilt (3 CCD Kameras)



Diese Signale werden dann noch verstärkt und durch komplexe Schaltungen in ein digitales Videosignal umgesetzt. Die Schaltungen und der CCD-Chip selbst bestimmen die wesentlichen Eigenschaften einer Kamera, wie z.B. die Lichtempfindlichkeit, UV-Sensitivität, ...

In der Mikroskopie werden CCD-Kameraköpfe ohne Objektive verwendet. Wie bei digitalen Kameras wird auch hier der CCD-Chip einfach in die Ebene des reellen Zwischenbildes gebracht.

Je nach System wird die Kamera dann mit einem Monitor oder Computer verbunden. Die Aufzeichnung des Videosignals kann auf mehrere Arten erfolgen:

- Festplatte
- Videorekorder (digital oder analog)



WICHTIG

Rekorder sollten immer ZWISCHEN Kamera und Monitor geschaltet werden; damit stellt man sicher, dass auch das Bild aufgezeichnet wird das am Monitor zu sehen ist!!

Wie bei digitalen Fotokameras muss auch hier auf einen **Weißabgleich** geachtet werden!

Die Auflösung von CCD-Kameras hängt natürlich vom jeweiligen Chip ab, der in der Kamera verwendet wird, generell ist sie aber wesentlich geringer als die von Fotokameras (~800 x 600 Pixel) Bei Hochgeschwindigkeitskameras ist die Auflösung zu Gunsten der Bildrate noch etwa geringer.

Diese geringe Auflösung ist normalerweise ausreichend, denn von den meisten Kameras wird zum einen nur ein relativ kleiner Bildausschnitt dargestellt, für den keine so hohe Auflösung benötigt wird (siehe Kapitel Aufnahme-Chip – Auflösung), zum anderen ist die Darstellung auf einem Monitor begrenzt durch dessen geringe Auflösung.

5.3.5 Speichermedien

5.3.5.1 Festplatte

Bei modernen Aufnahmesystemen erfolgt die Speicherung des Videosignals direkt auf eine Festplatte. Dadurch kann eine besonders gute Bildqualität erreicht werden und außerdem muss zur Nachbearbeitung das Videomaterials nicht mehr extra in den Computer eingespielt werden, was wieder einen Qualitätsverlust bedeuten würde

5.3.5.2 digital Video

Eine sehr weit verbreitetes System ist die Aufzeichnung auf miniDV-Bänder. Diese digitale Aufzeichnung ermöglicht eine hohe Bildqualität und den verlustfreien Import in den Computer, da das Videosignal bereits digital vorliegt.

Die Aufzeichnung von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen ist nur mit Spezialgeräten möglich.

5.3.5.3 analog Video

Keine oder kaum mehr Anwendung findet die analoge Videoaufzeichnung auf VHS, Hi8 oder Umatic Bänder, denn neben der schlechteren Bildqualität muss das Videosignal zur Bearbeitung am Computer erst digitalisiert und importiert werden.

Die Aufzeichnung von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen ist nur mit Spezialgeräten möglich.

5.3.5.4 Chemiefilm

In der Mikroskopie wurde eigentlich nur das Schmalformat 16mm verwendet.

Damit ist Zeitraffung und auch Zeitdehnung bis über 3000 Bilder pro Sekunde möglich, allerdings ist der Zeit- und vor allem der Kostenaufwand extrem hoch.

Inhaltsverzeichnis

1 GRUNDLAGEN.....	1
1.1 Literatur.....	1
1.1.1 Lichtmikroskopie.....	1
1.1.2 Fluoreszenz – Mikroskopie	2
1.1.3 Mikroskopie Techniken - Biologie.....	2
1.1.4 Video Mikroskopie.....	3
1.1.5 Dokumentation.....	3
1.2 Optik.....	4
1.2.1 Eigenschaften des Lichtes.....	4
1.2.2 Strahlenoptik.....	5
1.2.2.1 Lichtbrechung.....	5
1.2.2.2 Reflexion.....	7
1.2.3 optische Linsen.....	9
1.2.3.1 Linsenformen.....	9
1.2.3.2 Bildkonstruktion.....	10
1.2.3.3 Linsengleichung und Abbildungsmaßstab.....	12
1.2.3.4 Linsenfehler.....	13
1.2.4 Wellenoptik.....	17
1.2.4.1 Welleneigenschaft.....	17
1.2.4.2 Farben & Wellenlängen.....	19
1.2.4.3 Beugung.....	19
Überlagerung von Wellen.....	20
1.2.4.4 Interferenz.....	20
Konstruktive Interferenz	21
Destruktive Interferenz	21
Doppelspaltversuch.....	22
Beugung am Gitter.....	22
1.2.4.5 Polarisierung.....	23
Unpolarisiertes Licht	23
Polarisiertes Licht	23
Polarisationsfilter.....	24
natürliche Polarisierung.....	24
1.2.4.6 Doppelbrechung.....	25
Stärke der Doppelbrechung.....	25
Eigendoppelbrechung.....	26
Formdoppelbrechung.....	26
Spannungsdoppelbrechung.....	27
1.2.5 Optische Instrumente.....	27
1.2.5.1 Lupen.....	28
1.2.5.2 Objektive.....	28
Mikroskop-Objektiv.....	28
Foto-Objektiv.....	29

1.2.5.3 Gegenstandsweite und Bildgröße.....	29
Abbildungsmaßstab.....	29
1.2.5.4 Auflösungsvermögen.....	31
1.2.5.5 Auflösungsgrenzen.....	32
1.2.5.6 Mikroskop-Auflösung / Abbe-Theorie.....	32
Numerische Apertur.....	33
Wellenlänge	33
1.2.5.7 Qualität von Optiken.....	34
Achromate.....	34
Achromate.....	34
Fluorite.....	35
Planobjektive.....	35
Vergütung.....	35
1.3 Mikroskop.....	36
1.3.1 Das Mikroskop.....	36
1.3.1.1 Aufbau.....	37
1.3.1.2 Gesamtvergrößerung - Strahlengang.....	39
einfache Vergrößerungen – Objektiv	39
einfache Vergrößerungen – Okular.....	39
zusammengesetzte Vergrößerung – Mikroskop.....	39
1.3.2 Lichtquellen.....	40
1.3.2.1 Halogenlampen.....	40
1.3.2.2 Gasentladungslampen.....	40
Neutrale Graufilter.....	41
Gasdruck.....	41
Xenon-Bogenlampen.....	42
Quecksilber-Bogenlampen.....	42
Quecksilber(Xenon)-Lampen.....	42
Metallhalogenid Lampen.....	42
1.3.2.3 Laser.....	43
Prinzip.....	43
optischer Resonator.....	43
Laser-Typen.....	44
Laser – Klassen.....	45
1.3.2.4 LED (Light Emitting Diode).....	45
1.3.3 Kollektor.....	46
Leuchtfeldblende:.....	47
1.3.4 Kondensator.....	47
1.3.4.1 Bauarten.....	48
Scheibenkondensator.....	48
ältere Bauweise mit modularen Aufsätzen.....	48
1.3.4.2 Konsensorblende.....	49
1.3.4.3 Schärfentiefe.....	50
1.3.5 Objektisch.....	50
1.3.6 Objektiv.....	51

1.3.6.1 Maßstabszahl.....	51
1.3.6.2 Parfokaler Abstand.....	51
1.3.6.3 numerische Apertur & Auflösung.....	52
1.3.6.4 Immersion & Auflösung.....	53
vereinfachte Berechnung der Mikroskop-Auflösung.....	53
1.3.6.5 Deckglaskorrektur.....	54
1.3.6.6 Tubuslänge.....	55
160 mm Optiken.....	55
Unendlich Optiken.....	55
1.3.6.7 Arbeitsabstand.....	56
Long Distance Objektive (LD).....	56
1.3.6.8 Objektivklassen – Qualitäten.....	57
Trocken- und Immersionsobjektive.....	57
Achromate.....	58
Planachromate.....	58
Apochromate.....	58
Planapochromate.....	59
Universalobjektive.....	59
Fluorit-Objektive.....	59
Phasenkontrastobjektive.....	60
Objektive mit Irisblende.....	60
1.3.6.9 Objektivbeschriftung	61
1.3.7 Tubus.....	62
Monotubus.....	62
Binotubus	63
Tritubus.....	63
1.3.8 Okular.....	64
1.3.8.1 Bautypen.....	64
Einlinsige Okulare.....	64
Mehrlinsige Okulare.....	65
Periplane Okulare.....	66
1.3.8.2 Vergrößerung.....	66
1.3.8.3 Dioptrienausgleich.....	66
1.3.8.4 Okulare für Brillenträger.....	66
1.3.8.5 Messokulare.....	67
1.3.8.6 Einstellfernrohre.....	68
1.3.8.7 Projektiv.....	69
1.3.8.8 Okularbeschriftung.....	69
1.3.9 Beleuchtungsanordnung.....	70
1.3.9.1 Kritische Beleuchtung.....	70
1.3.9.2 Köhlersche Beleuchtung.....	71
Beleuchtender Strahl.....	72
Abbildender Strahl.....	72
1.3.9.3 Einstellen der Köhlerschen Beleuchtung.....	73
1.3.10 Mikroskop-Typen.....	75
1.3.10.1 Beleuchtungstechnik.....	75
Durchlichtmikroskop.....	75
Auflichtmikroskop.....	75

1.3.10.2 Bauweise.....	76
aufrechtes Mikroskop.....	76
inverses Mikroskop.....	76
Stereomikroskop.....	77
1.3.11 Mikroskop-Klassen.....	78
Feldmikroskop.....	78
Kursmikroskop.....	78
Labormikroskop.....	78
Forschungsmikroskop.....	79
großes Forschungsmikroskop.....	79
1.3.12 Qualitätsmerkmale.....	80
1.3.13 Eichen und Messen.....	81
1.3.13.1 Größe des Bildfeldes.....	81
1.3.13.2 Messokulare & Objektmikrometer.....	81
Eichung des Messokulars.....	82
1.3.13.3 Alternative Eichhilfen – Interne Standards.....	82
1.3.14 Mikroskop-Pflege.....	83
1.3.14.1 Reinigungsmittel.....	83
1.3.14.2 Linsen.....	83
Reinigung von hart vergüteten Flächen.....	84
1.3.14.3 Stativ und Gehäuse.....	85
1.3.14.4 Fremdkörper im Strahlengang.....	85
Verschmutzungen im Strahlengang finden.....	86
1.4 Präparation.....	87
1.4.1 Lebendpräparat.....	87
Größe des Präparates.....	87
Umgebungs- oder Einbettmedium.....	88
1.4.1.1 Herstellung eines Lebendpräparates.....	88
1.4.1.2 Feuchte Kammern.....	90
Feuchte Kammern für flüssige Objekte.....	90
Feuchte Kammern für feste Objekte.....	91
1.4.1.3 Durchflussskammern.....	91
Einfache Durchflussskammer.....	91
Automatische Durchflussskammer.....	92
1.4.2 Suspensionspräparat.....	93
1.4.3 Ausstrichpräparat.....	94
1.4.4 Zupfpräparat / Quetschpräparat.....	95
1.4.5 Mazeration.....	96
1.4.6 Dünnschnittpräparat.....	96
1.4.6.1 Handschnitte.....	96
Anfertigung eins Handschnittes.....	97
1.4.6.2 Mikrotomschnitte.....	98
Anfertigung eines Mikrotomschnittes.....	98
Mikrotome – Bautypen.....	99
1.4.6.3 Einbetten und Umschließen.....	100
1.4.6.4 Einbettmedien.....	101

1.4.6.5 Messer.....	104
Rasierklingen.....	104
Mikrotommesser.....	105
Messerprofile.....	105
1.4.7 Dauerpräparat.....	107
1.4.7.1 Herstellung.....	107
Glyzerin-Dauerpräparat.....	107
Kunstharz-Dauerpräparat.....	108
1.4.7.2 Einschlussharze.....	109
1.4.7.3 Beschriftung.....	110
1.4.8 Fixierung.....	111
1.4.8.1 Probenvorbereitung.....	111
1.4.8.2 physikalische Fixierung.....	111
Verhindern von Gefrierschäden.....	112
Weitere Probenbearbeitung.....	112
Gefriersubstitution	113
1.4.8.3 Chemische Fixierung.....	113
1.4.8.4 Chemische Fixiermittel.....	114
1.4.8.5 Fixierpuffer.....	115
1.4.9 Literatur.....	116
1.5 Färbung und Farbstoffe.....	117
1.5.1 Farbstoffe.....	117
1.5.1.1 Mechanismen der Farbstoffbindung.....	118
1.5.1.2 Einteilung der Farbstoffe.....	118
1.5.1.3 Hellfeld-Farbstoffe.....	119
1.5.1.4 Fluoreszenz-Farbstoffe	120
Stokes Shift.....	120
Bindung an Antibodies.....	120
Green Fluorescent Protein (GFP).....	121
1.5.2 Färbemethoden.....	121
1.5.3 Färbungen und Nachweise.....	122
1.5.4 Literatur.....	123
2 KONTRASTVERFAHREN.....	124
2.1 Hellfeld.....	125
2.1.1 Erstes Einstellen eines Präparates.....	125
2.1.2 Köhlersche Beleuchtung.....	126
2.1.2.1 Einstellen der Köhlerschen Beleuchtung.....	126
2.1.3 Kontrasterzeugung im Hellfeld.....	128
2.1.3.1 Kontrast und Auflösung im konventionellen Hellfeld.....	128
2.1.4 Schärfentiefe.....	129
2.1.5 Schiefe Beleuchtung.....	130
2.1.5.1 Technische Voraussetzungen.....	130
Kondensator mit beweglicher Aperturblende.....	130
Sektorenblende.....	131

2.2 Dunkelfeld.....	132
2.2.1 Prinzip.....	132
2.2.2 Technische Voraussetzungen.....	133
2.2.2.1 Schwarzscheibe / zentrale Belende.....	133
Größe der zentralen Blende.....	134
2.2.2.2 Dunkelfeld-Kondensoren.....	134
Paraboloid-Kondensor.....	135
Kardioid-Kondensor.....	135
2.2.2.3 Dunkelfeld-Objektträger.....	136
2.2.3 Einstellen der Dunkelfeldbeleuchtung.....	136
2.2.3.1 Einstellungs-Fehler.....	137
2.2.4 Rheinbergbeleuchtung.....	137
2.2.5 Anwendungsbereiche	138
2.3 Phasenkontrast.....	139
2.3.1 Amplituden- und Phasenpräparate.....	139
2.3.1.1 Amplitudenpräparat	139
2.3.1.2 Phasenpräparat.....	139
2.3.2 Prinzip.....	140
2.3.3 Technische Voraussetzungen.....	141
2.3.3.1 Ringblende.....	141
2.3.3.2 Phasenkontrast-Objektive.....	142
Phasenring.....	142
2.3.4 Einstellen des Phasenkontrastes.....	143
2.3.4.1 Einstellungsfehler.....	145
2.3.5 Das Phasenkontrastbild.....	145
2.3.5.1 Positiver Phasenkontrast.....	145
2.3.5.2 Negativer Phasenkontrast.....	146
2.3.5.3 Inversion.....	146
2.3.6 Störungen im Phasenkontrastbild.....	147
2.3.6.1 Halo-Effekt.....	147
2.3.6.2 Shading-Off.....	147
2.3.6.3 Linseneffekt.....	147
2.3.7 Anwendungsbereiche.....	147
2.4 Polarisations.....	148
2.4.1 Doppelbrechung.....	148
2.4.2 Prinzip.....	149
2.4.3 Technische Voraussetzungen.....	150
2.4.3.1 Polfilter	150
2.4.3.2 Objektisch.....	151
2.4.3.3 Objektive	152
2.4.4 Einstellung des Polarisationsmikroskops.....	152
2.4.5 Anwendungsbereiche.....	152

2.5 Interferenzkontrast.....	153
2.5.1 Prinzip.....	153
2.5.2 Technische Voraussetzungen.....	154
2.5.2.1 Polfilter.....	154
2.5.2.2 Wollaston-Prismen.....	155
Lage der Prismen.....	156
2.5.3 Einstellen des Gangunterschiedes.....	156
Interferenzkontrast nach NOMARSKI.....	157
Interferenzkontrast nach SMITH.....	157
2.5.4 Bautypen.....	157
Interferenzmikroskop nach SMITH.....	158
Interferenzmikroskop nach NOMARSKI.....	158
Durchlicht Interferenzmikroskop.....	159
Auflicht Interferenzmikroskop.....	159
2.5.5 Einstellung des Interferenzkontrastes.....	160
2.5.6 Das Interferenzkontrast-Bild.....	160
2.5.7 Kontrast-Probleme.....	162
2.5.8 Anwendungsbereiche.....	162
3 FLUORESZENZ.....	163
3.1 Was ist Fluoreszenz?.....	163
3.1.1 Stokes Shift.....	164
3.1.2 Phosphoreszenz.....	164
3.2 Fluorochrome.....	164
3.2.1 Primärfluoreszenz (Autofluoreszenz).....	165
3.2.2 Sekundärfluoreszenz (Fluorochromierung).....	166
3.2.3 Immunfluoreszenz.....	167
3.2.3.1 Antikörper & Antigene.....	167
3.2.3.2 direkte Immunfluoreszenz.....	168
3.2.3.3 indirekte Immunfluoreszenz.....	168
3.2.3.4 Gewinnung von Antikörperseren.....	169
Polyklonale Antikörper.....	169
Monoklonale Antikörper	169
Synthetische Antikörper.....	169
3.2.3.5 Immunfärbung - Protokoll.....	170
Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung am Beispiel von Mikrotubuli in Wurzelspitzen.....	170
3.2.4 Green Fluorescent Protein.....	171
3.2.5 Anwendung von Fluorochromen.....	172
3.2.5.1 Identifizierung sichtbarer Strukturen.....	172
3.2.5.2 Lokalisierung und Identifizierung unsichtbarer Strukturen.....	172
3.2.5.3 Verfolgung physiologischer Vorgänge.....	173
3.2.5.4 Gezielter Nachweis eines Proteins.....	173

3.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	174
3.3.1 Prinzip.....	174
3.3.2 Technische Voraussetzungen.....	175
3.3.2.1 Lichtquelle.....	175
3.3.2.2 Strahltrennung.....	175
Kantenfilter.....	176
Bandfilter.....	177
Dichroischer Spiegel.....	177
Prismen & Beugungsgitter.....	179
Acousto Optic Tunable Filter (AOTF).....	180
3.3.2.3 Spiegel-Filter-Würfel.....	181
3.3.3 Bauarten.....	181
3.3.3.1 Durchlicht-Hellfeld.....	182
3.3.3.2 Durchlicht-Dunkelfeld.....	183
3.3.3.3 Auflicht.....	184
Fluoreszenz-Würfel.....	184
Aufrechte Epifluoreszenz-Mikroskope.....	185
Inverse Epifluoreszenz-Mikroskope.....	185
3.3.4 Einstellen der Fluoreszenzbeleuchtung.....	186
3.3.4.1 Durchlicht.....	186
3.3.4.2 Auflicht.....	187
Lichtquelle.....	187
Zentrieren der Bogenlampe in der Auflichtfluoreszenz.....	187
Einstellen des Präparates.....	190
3.3.5 Reduktion von „Out of Focus“ – Licht.....	191
3.3.5.1 Mikroskoptyp.....	191
3.3.5.2 Blenden.....	192
Feldblende.....	192
Aperturblende.....	192
3.3.5.3 Konfokal-Mikroskopie.....	193
Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM).....	194
Nipkow-Disc.....	195
3.3.5.4 Multiphotonmikroskopie.....	196
Vorteile der Multiphotonmikroskopie.....	197
Nachteile der Multiphotonmikroskopie.....	197
3.3.5.5 OptiGrid.....	197
3.3.6 Farbstoffartefakte in der Fluoreszenz-Mikroskopie.....	198
3.3.6.1 Bleaching.....	199
3.3.6.2 Quenching.....	199
3.3.6.3 Cross-Talk / Bleed through.....	199
Cross Talk.....	199
Bleed through.....	199
3.3.6.4 Double Staining.....	200
3.3.6.5 Probleme beim Beladen.....	200

3.4 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)	201
Vorteile.....	201
Nachteile.....	202
3.4.1 Aufbau eines CLSM.....	202
3.4.1.1 Laser	203
3.4.1.2 Scan Head.....	203
3.4.1.3 Scan-System.....	204
3.4.1.4 Strahltrennung.....	204
3.4.1.5 Pinhole.....	204
Durchmesser des Pinhole.....	205
3.4.1.6 Photomultiplier.....	205
Bauprinzip eines Photomultipliers.....	206
Regelung des Photomultipliers.....	206
3.4.2 Bildeinstellungen im CLSM.....	207
3.4.2.1 Auflösung in der Konfokalmikroskopie.....	207
3.4.2.2 Bildgröße / Dateigröße.....	207
Auflösung und Bildgröße	207
3.4.2.3 Helligkeit und Kontrast.....	208
LUT-Einstellung.....	208
Color Lookup Table.....	208
3.4.2.4 Konfokal Zoom.....	209
3.4.2.5 Digital Zoom.....	209
3.4.2.6 Rauschunterdrückung.....	210
Rauschunterdrückung.....	210
3.4.3 Bildgebung im CLSM.....	211
3.4.3.1 Transmissions-Bild.....	211
3.4.3.2 Overlay.....	211
3.4.3.3 Optische Schnittserien.....	212
„Fahrt“ durch das Objekt.....	213
Erweiterter Fokus.....	213
optische Schnittebenen.....	214
Stereobild.....	214
3D Rekonstruktion.....	215
Animation.....	215
3.4.3.4 Time Lapse Aufnahmen.....	216
3.4.3.5 Quantifizierung.....	216
3.4.4 Spezialtechniken.....	217
3.4.4.1 Backscattered Light Imaging.....	217
3.4.4.2 FRAP.....	218
3.4.4.3 FLIP.....	218
3.4.4.4 FRET.....	219
FRET -Prinzip.....	219
3.4.4.5 FLIM.....	220

4 ADVANCED TECHNIQUES.....	221
4.4 UV-Mikroskopie.....	224
4.4.1 Wellenlänge und Auflösung	225
4.4.2 Technische Voraussetzungen.....	225
4.4.3 Vor- und Nachteile.....	226
4.4.4 Bilder.....	226
4.5 Video Enhanced Contrast (VEC).....	227
4.5.1 Auflösung.....	228
4.5.2 elektronische Kontrasterzeugung.....	228
4.5.3 Bilder.....	229
4.6 Video Intensified Fluorescence (VIF).....	230
4.7 Infrarot-Mikroskopie.....	231
4.7.1 Technische Voraussetzungen.....	232
4.7.2 Bilder.....	232
4.8 Bildverarbeitung.....	233
4.8.1 Verbesserung des Bildes.....	233
4.8.2 Bild – Analyse.....	234
5 DOKUMENTATION.....	235
Foto- & Videoprotokoll.....	235
5.1 Zeichnen.....	236
5.1.1 Bedeutung und Grenzen.....	236
5.1.2 Vor- und Nachteile.....	236
5.1.3 Zeichenhilfen.....	237
5.1.1.1 Zeichennetz:.....	237
5.1.1.2 Zeichentubus.....	237
5.1.1.3 Monitor / Mattscheibe.....	238
5.1.4 Darstellungsmöglichkeiten.....	238
5.1.4.1 Skizze.....	238
5.1.4.2 Übersichtszeichnung.....	239
5.1.4.3 Halbschematische Zeichnungen.....	239
5.1.4.4 Zeichnung mit einfachen Konturen.....	239
5.1.4.5 Zeichnung mit doppelten Konturen.....	240
5.1.5 Zeichenfehler.....	240

5.2 Fotografie.....	242
Vorteile.....	242
Nachteile.....	242
5.2.1 reelles Bild – Projektiv.....	243
5.2.2 Nachvergrößerung.....	243
5.2.3 Beleuchtung.....	243
5.2.3.1 Mikroblitz	244
5.2.4 Analog-Kamera.....	245
5.2.4.1 Spiegelreflexkamera.....	245
5.2.4.2 Mikrokamera.....	246
5.2.5 Digital-Kamera.....	247
5.2.5.1 Aufnahme-Chip – Auflösung.....	247
Berechnungsbeispiel.....	248
5.2.5.2 Weißabgleich.....	248
5.2.5.3 Kompaktkamera.....	249
Voreinstellungen zur Nutzung der Nikon Coolpix 4500 am Mikroskop.....	250
5.2.5.4 Spiegelreflexkamera.....	251
5.2.5.5 Mikroskop-Kamera.....	252
5.2.6 Kein Bild – was tun?.....	254
5.2.6.1 Schwarzes Bild	254
5.2.6.2 Weißes Bild.....	254
 5.3 Video und Film.....	 255
5.3.1 Zeitdehung.....	255
5.3.2 Zeitraffung.....	255
5.3.3 Chemie-Film.....	256
5.3.4 CCD-Kamera.....	256
5.3.5 Speichermedien.....	257
5.3.5.1 Festplatte.....	257
5.3.5.2 digital Video.....	257
5.3.5.3 analog Video.....	257
5.3.5.4 Chemiefilm.....	257

INHALTSVERZEICHNIS.....	258
--------------------------------	------------