Optische Filter

und ihre

Anwendung

in der

Mikroskopie

Dr.G.Rosenfeldt 2013

Optische Filter und ihre Anwendung in der Mikroskopie

1. Optische Filter

Optische Filter sind Gläser oder Folien, die für einen Teil des sichtbaren Lichtes mehr oder weniger undurchlässig sind. Da sich nun nicht mehr alle Anteile des sichtbaren Lichtes paarweise zu weißem Licht ergänzen („Komplementärfarben"), erscheinen derartige Filter farbig. Werden alle Anteile des sichtbaren Lichtes in gleichem Maße geschwächt, spricht man von „Grauscheiben".

1.1. Absorptions- und Reflektionsfilter

Absorptionsfilter sind gefärbte Gläser und farbige Gelatineschichten, die denjenigen Teil des Lichtes absorbieren, der geschwächt oder gesperrt wird. Sie wandeln dessen Energie in Wärme um. Bei den in der Mikroskopie üblichen Lichtintensitäten kann die Erwärmung eines solchen Filters vernachlässigt werden, arbeitet man jedoch mit sehr intensiven Lichtquellen (Fluoreszenzmikroskopie), kann die Erwärmung zur Zerstörung des Filters führen.

Reflektionsfilter bestehen aus einem Glasplättchen, auf das zahlreiche sehr dünne halbdurchlässige Schichten aufgedampft sind. Durch Interferenz werden Teile des sichtbaren Lichtes durchgelassen, während andere reflektiert werden. Ein derartiges Filter erwärmt sich folglich auch bei hohen Lichtintensitäten nicht. Man erkennt solche Filter daran, daß sie im auffallenden Licht wie ein farbiger Spiegel aussehen – erst wenn man sie gegen eine Lampe hält, erkennt man, daß sie auch farbiges Licht durchlassen. Angemerkt sei, daß die Bezeichnung „Reflektionsfilter" unüblich ist – man bezeichnet diese Filter gewöhnlich als „Interferenzfilter". Wegen ihrer aufwendigen Herstellungsweise sind Interferenzfilter recht teuer, dafür sind sie aber wesentlich leistungsfähiger als Absorptionsfilter (s.u.).

1.2. Spektral-, Sperr- und Kantenfilter

Ein Spektralfilter (Abb.1) ist nur für einen sehr schmalen Längenwellenbereich durchlässig, das austretende Licht ist daher weitgehend monochromatisch.

Ein Sperrfilter (Abb.2) ist für einen mehr oder weniger breiten Wellenlängenbereich undurchlässig, kürzerwellige und längerwellige Anteile werden jedoch durchgelassen (oft unerwünscht!).

Ein Kantenfilter (Abb.3) läßt alle Wellenlängen unterhalb (oberhalb) einer bestimmten Wellenlänge durch (Absorptionskante) und sperrt für alle Wellenlängen oberhalb (unterhalb) dieser Wellenlänge. Derartige Filter sind besonders wichtig; erwünscht ist eine möglichst steile „Absorptionskante".

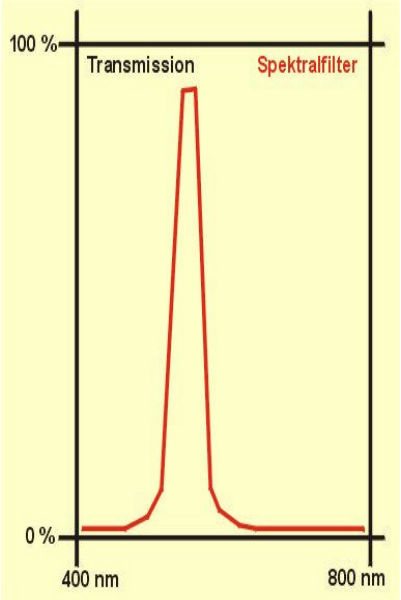

Abb.1 Spektralfilter

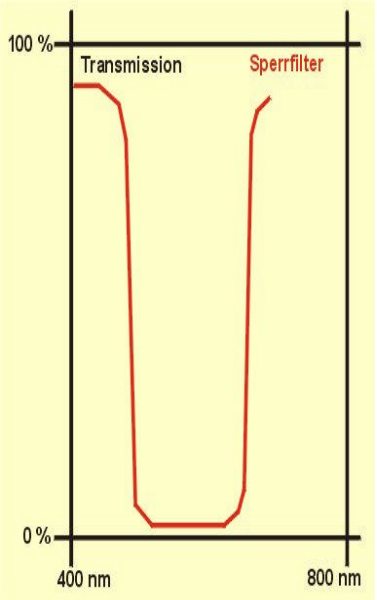

Abb.2 Sperrfilter

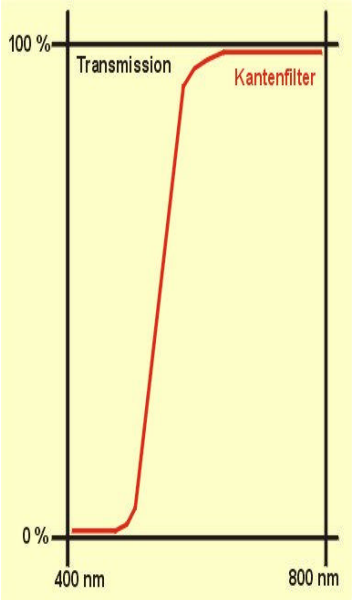

Abb.3 Kantenfilter

1.3. Filtercharakteristik

Zur Bestimmung der „Filtercharakteristik“ mißt man die „Transparenz“ in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Wird das Licht nicht geschwächt, hat die Transparenz den Wert 100 %; wird das Licht vollständig gesperrt, beträgt die Transparenz 0 %.

Angemerkt sei, daß eine Transparenz von 100 % niemals erreicht werden kann, da an beiden Seiten eines Filters unweigerlich einige Prozent des Lichtes reflektiert werden. Gewöhnlich trägt man dem bei der Aufnahme der Transparenzkurve durch eine entsprechende Justierung Rechnung, so daß die Transparenzkurven dann trotzdem zwischen 0 % und 100 % verlaufen (sog. „interne Transparenz“).

2. Handelsübliche Farbfilter (Glas); s.a. Anhang 5

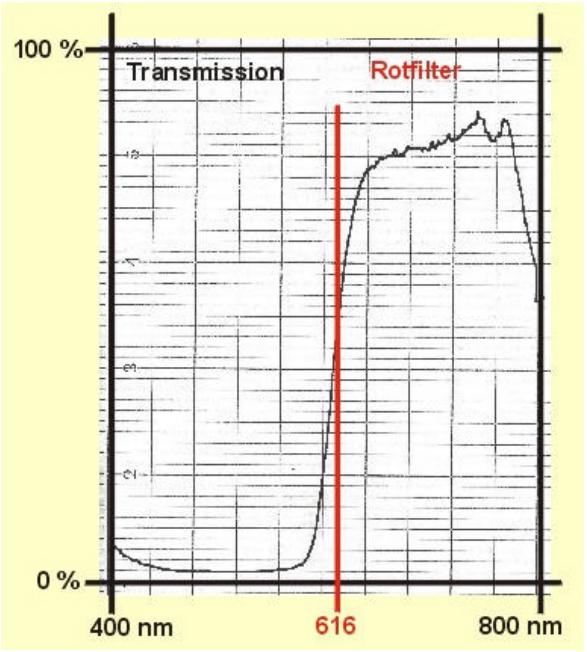

Abb.4 Kantenfilter „rot“

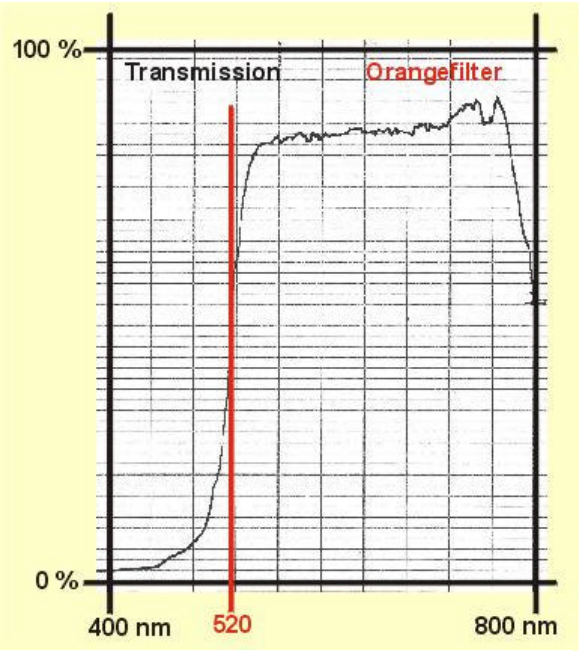

Abb. 5 Kantenfilter „orange“

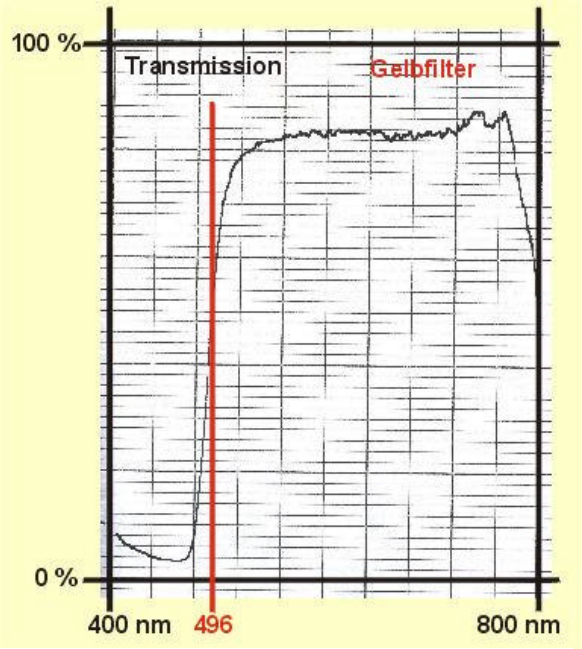

Abb.6 Kantenfilter „gelb“

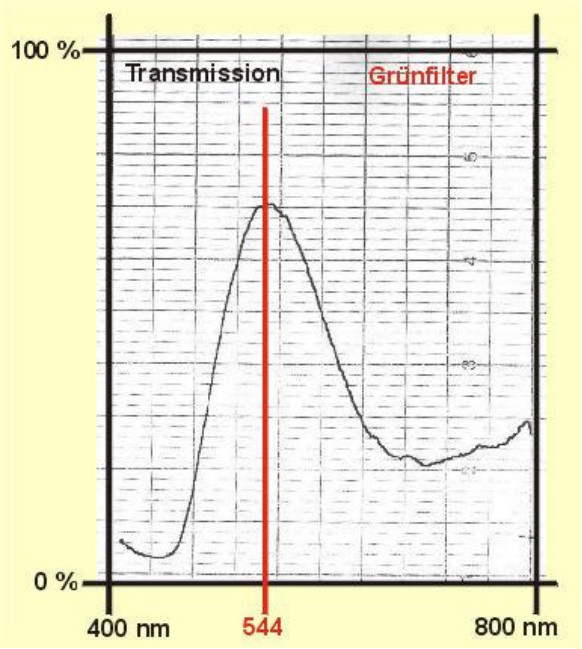

Abb.7 Spektralfilter „grün“

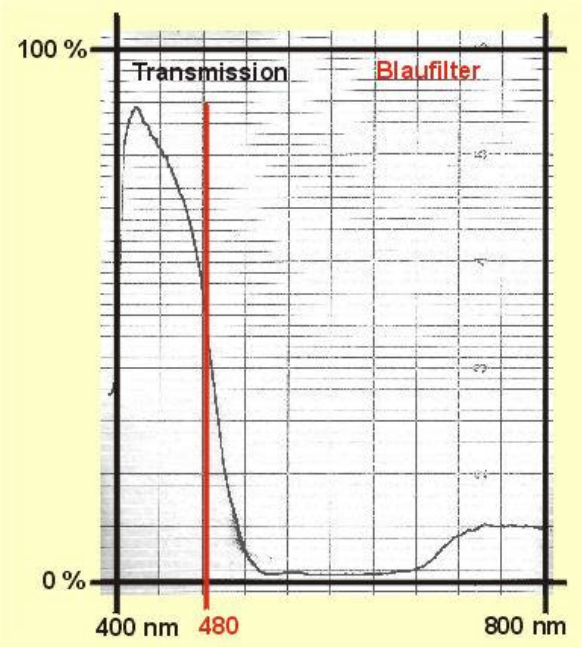

Abb.8 Kantenfilter „blau“

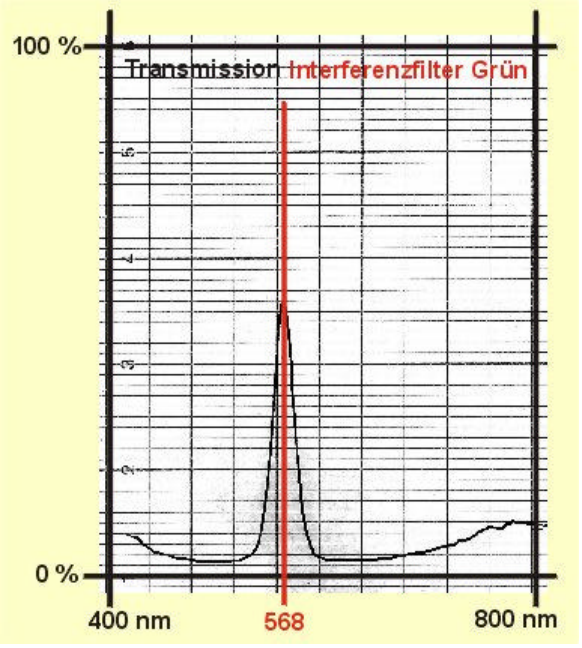

Abb.9 Spektralfilter „grün“

Die hier gezeigten Transmissionskurven gehören zu handelsüblichen Farbfiltern, wie sie in der Fotografie verwendet werden. Die meisten dieser Filter sind Kantenfilter, lediglich das Grünfilter (Abb.7) gehört zu den Spektralfiltern, allerdings ist das durchgelassene Licht bei weitem nicht spektralrein (breiter Durchlassbereich, unzureichende Sperrwirkung im langwelligen Bereich). Abb.9 zeigt die Transmissionskurve eines Interferenzfilters, das grünes Licht durchläßt. Hier ist der durchgelassenen Wellenlängenbereich sehr schmal, das Licht ist folglich weitgehend spektralrein. Dies ist ein Beispiel für die viel höhere Leistungsfähigkeit von Interferenzfiltern. Entsprechende Kantenfilter (Abb.10) besitzen äußerst steile Absorptionskanten.

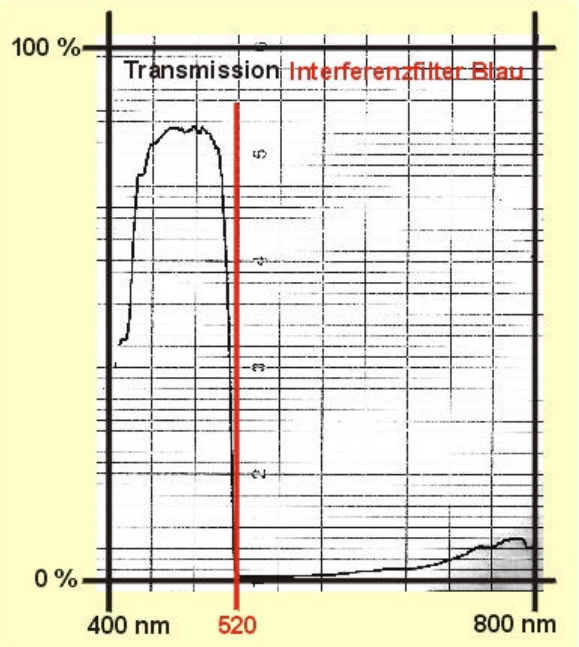

Abb.10 Kantenfilter blau

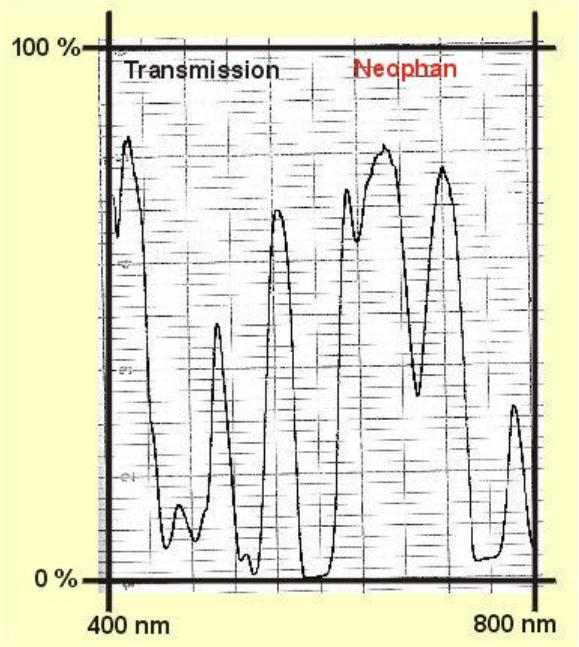

Abb.11 Neodymglas (schwach rosa)

Nun ist es naheliegend, Spektralfilter durch Kombination zweier geeigneter Kantenfilter zu realisieren, aber dies gelingt nur mit Interferenzfiltern – andernfalls sind die Kantensteilheiten zu gering.

Schließlich sei noch die Transmissionskurve eines schwach rosa gefärbten Neodymglases gegeben (Abb.11). Obwohl sich das Filter kaum von einer einfachen Glasscheibe zu unterscheiden scheint – es ist lediglich schwach rosa gefärbt – werden mehrere schmale Wellenlängenbereiche fast vollständig unterdrückt. Derartige Transmissionskurven sind typisch für Gläser, die Oxide bestimmter Seltenerdmetalle enthalten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

1. Es ist unmöglich, von der Färbung eines Filters auf dessen Transmissionskurve zu schließen.

2. Will man Filter gezielt einsetzen, muß man die entsprechenden Transmissionskurven kennen.

3. Steht kein Spektralfotometer zur Verfügung, sollte man nur mit Filtern arbeiten, deren Durchlaßkurven vom Hersteller angegeben werden.

4. Viele Probleme lassen sich nur mit den leistungsfähigeren Interferenzfiltern lösen (Fluoreszenzmikroskopie, s.u.).

3. Gelatinefilter; s.a. Anhang 5

Gelatinefilter lassen sich sehr leicht selbst herstellen: Man benötigt eine warme, möglichst konzentrierte Gelatinelösung und konzentrierte wässrige (!) Lösungen unterschiedlicher Farbstoffe.

Die Gelatinelösung wird mit der erforderlichen Menge Farbstofflösung versetzt, dann rührt man sehr gründlich um, damit die Filter keine Farbschlieren enthalten, schließlich gießt man die Gelatinelösung auf eine saubere Glasplatte, läßt erkalten und wartet einige Tage, bis das in der Schicht enthaltene Wasser verdunstet ist. Danach löst man die nun harte Gelatineschicht von der Glasplatte. Es empfiehlt sich, durch Vorversuche zu ermitteln, von welchem Trägermaterial sich die getrocknete Gelatine besonders leicht ablösen läßt.

Noch besser ist es, runde Weißglasfilter mit einem Ring aus Tesafilm zu versehen und die gefärbte Gelatine in das so entstandene Näpfchen zu gießen. Man erhält dann von vornherein ein mechanisch stabiles Filter passender Größe und muß die Gelatineschicht nicht erst mühsam vom Trägermaterial lösen.

Es ist auf diese Weise auch leicht möglich ganze Filtersätze zu gießen. Etwa 100 ml Gelatinelösung werden mit 1 ml Farbstofflösung versetzt, man gießt ein kleines Filter, versetzt abermals mit 1 ml Lösung, gießt ein zweites kleines Filter, versetzt mit 2 ml Lösung, gießt das nächste Filter u.s.w. (1+1+2+4+8+16...). Verwendet man den Farbstoff „Direkttiefschwarz“, erhält man einen Satz unterschiedlich dunkler Grauscheiben.

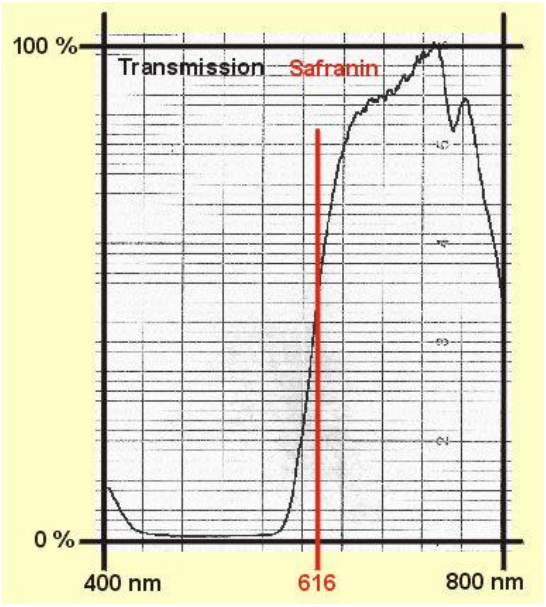

Abb.12 Rotfilter (Safranin)

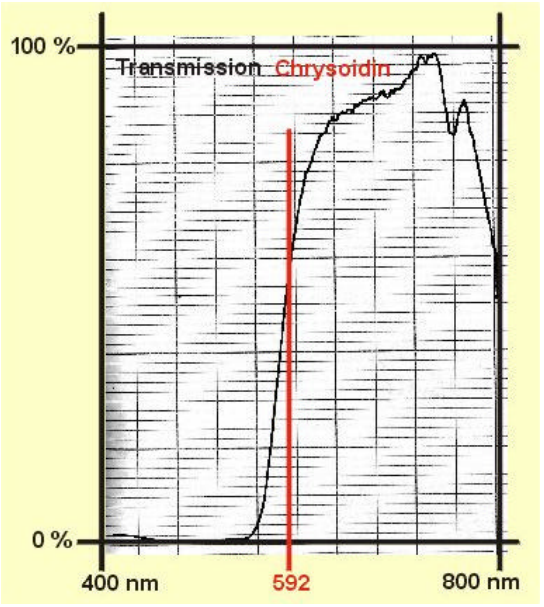

Abb.13 Orangefilter (Chrysoidin)

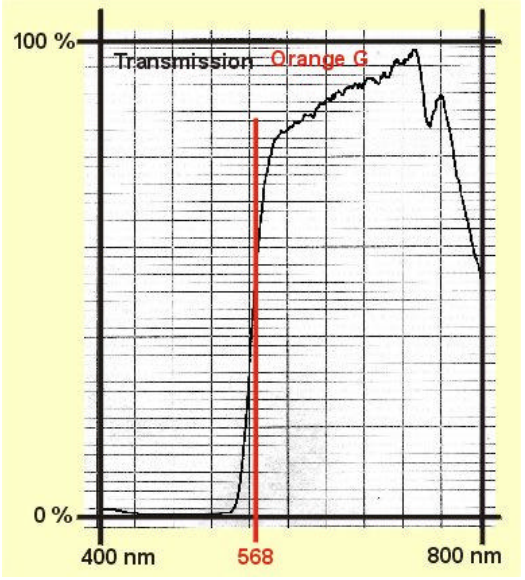

Abb.14 Gelbfilter (Orange G)

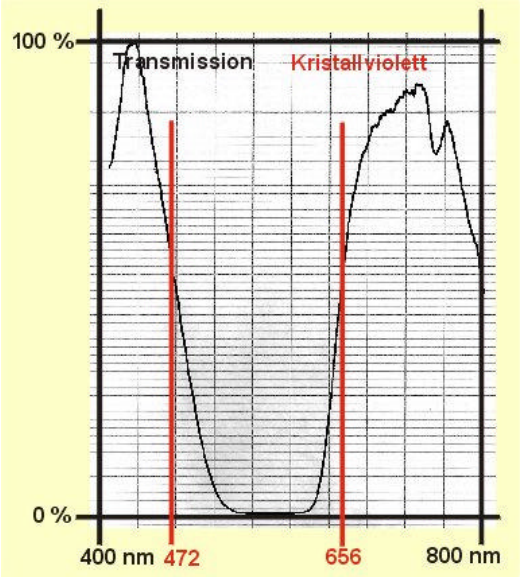

Abb.15 Violettfilter (Kristallviolett)

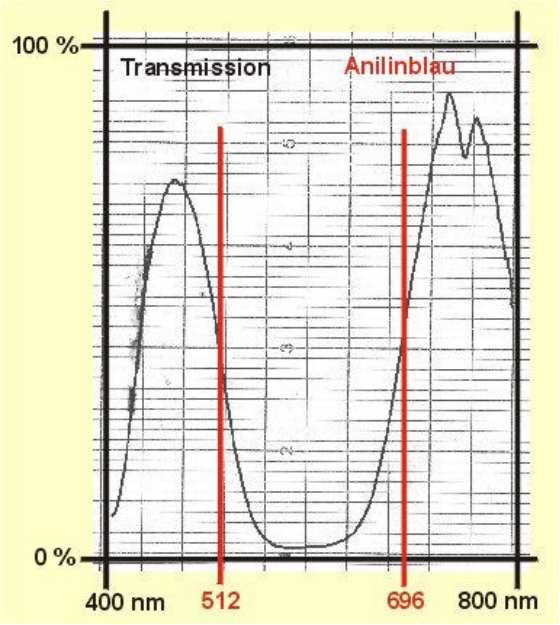

Abb.16 Blaufilter (Anilinblau)

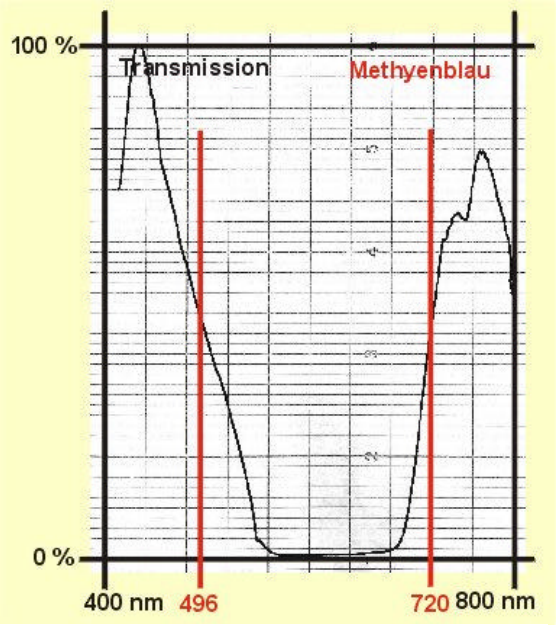

Abb.17 Blaufilter (Methylenblau)

Gelatinefilter bewahrt man vor Licht geschützt auf, am besten in einem mit Trockenmittel versehenen Exsiccator, um Schimmelbildung zu vermeiden. UV-haltiges Licht führt zum Ausbleichen der Farbstoffe, starke Erwärmung zum Schmelzen der Gelatine.

Die Abbildungen 12 bis 17 zeigen die Transmissionskurven gängiger organischer Farbstoffe, die wohl jeder Mikroskopiker zur Hand hat. Safranin, Chrysoidin und Orange-G liefern Kantenfilter, Kristallviolett, Anilinblau und Methylenblau ergeben typische Sperrfilter.

Man erkennt jedoch an allen Transmissionskurven eine gemeinsame Schwäche von Filtern, die mit Hilfe organischer Farbstoffe realisiert werden: Organische Farbstoffe sind in aller Regel zumindest für langwelliges Rot mehr oder weniger durchlässig. Deshalb sind z.B. die gezeigten Blaufilter als Erregerfilter (Fluoreszenzmikroskopie) ungeeignet, da sie den hohen Rotanteil von Lampenlicht nicht sperren, so daß bei Verwendung eines orangefarbenen Sperrfilters der Hintergrund nicht schwarz, sondern dunkelrot erscheint.

4. Anwendungen

4.1. Lichtschwächung

Ist die mikroskopische Beleuchtung zu hell, so pflegen selbst erfahrene Mikroskopiker einfach die Aperturblende zuzuziehen. Das Bild erscheint dann dunkler und zugleich kontrastreicher, außerdem nimmt die Tiefenschärfe zu. Trotzdem ist dieses Verfahren falsch, denn durch Schließen der Aperturblende nimmt die effektive numerische Apertur des Objektives ab, Feinstrukturen verschwinden und man gerät in den Bereich der „leeren Vergrößerung“, wodurch die Bildqualität weiter sinkt. Man sollte daher die Aperturblende nur soweit schließen, daß Überstrahlungen vermieden werden.

Besser ist es, die Beleuchtung zu dimmen, aber hierdurch wird das Bild immer gelbstichiger. Unser Auge nimmt dies zwar kaum wahr, wohl aber das Filmmaterial und auch die Digitalkamera.

Richtig ist es, die Lichtintensität durch das Einlegen von Grauscheiben zu verringern, und die kann man sich leicht selbst herstellen (s.o.).

4.2. Konversionsfilter

Lampenlicht besitzt einen starken Gelbstich, auch wenn wir das nicht so empfinden. Stellt man Farbfotografien bei Lampenlicht mit einem Tageslichtfilm her, so besitzen die Bilder einen sehr starken Gelbstich. Man vermeidet dies, indem man ein passendes Blaufilter in den Strahlengang bringt. Derartige Kompensationsfilter werden als „Konversionsfilter“ bezeichnet.

Arbeitet man, wie heute üblich, mit einer Digitalkamera, so stört ein starker Farbstich der Rohbilder nicht, da man diesen später mit einem Bildverarbeitungsprogramm beseitigen kann. Da aber jede nachträgliche Bildbearbeitung tendenziell mit einer Qualitätsminderung verbunden ist, sollte man sich bemühen, ein möglicht „gutes“ Rohbild zu erzeugen, so daß nur noch geringfügige Nachbearbeitungen erforderlich werden. Daher ist die Anwendung geeigneter Konversionsfilter (Blaufilter oder Violettfilter) auch bei der digitalen Mikrofotografie sehr zu empfehlen!

Da sich beim Dimmen der Farbton des Lampenlichtes immer weiter in den längerwelligen Bereich verschiebt, müssen die Konversionsfilter dem angepaßt werden. Es ist daher besser, bei konstanter Lampenhelligkeit zu arbeiten und das Licht ggf. durch Grauscheiben zu schwächen, da diese den Farbton des Lichtes nicht verändern.

4.3. Beseitigung störender Farbsäume

Gewöhnlich sind Mikroskope mit „achromatischen Objektiven“ ausgerüstet. Diese Objektive sind „weitgehend“ farbkorrigiert, allerdings treten bei stärkeren Objektiven immer noch störende Farbsäume auf, die sich insbesondere bei der Untersuchung von farblosen Objekten (Diatomeen, Radiolarien, Foraminiferen) störend bemerkbar machen, zumal sie gleichzeitig die Bildschärfe vermindern. Eine (sehr teure!) Abhilfe sind vollständig farbkorrigierte „apochromatische Objektive“, aber es geht auch anders:

Es genügt, die genannten farblosen Objekte mit monochromatischem Licht zu untersuchen und die intensiv farbstichigen Digitalbilder dann in Graustufenbilder umzuwandeln. Da im Idealfall Licht von nur einer Wellenlänge vorliegt, können Farbsäume nicht entstehen, selbst bei unzureichender Farbkorrektur!

Folgende Lichtquellen kommen infrage:

1. Natriumdampflampe

2. Glühlampe in Kombination mit einem grünen Spektralfilter (gemäß Abb.7).

3. Glühlampe in Kombination mit einem Interferenzfilter (gemäß Abb.9).

Die Abbildungen 18 – 20 und 21 – 23 zeigen eine Kieselalge, aufgenommen mit ungefiltertem Lampenlicht (Abb.18), unter Verwendung eines Grünfilters (Abb.19, vergl. Abb.7) und unter Verwendung eines Interferenzfilters (Abb.20, vergl. Abb.9). Es wurden lediglich die Filter ausgetauscht, die Fokussierung blieb unverändert.

Die Abbildungen a zeigen das Rohbild, die Abbildungen b das nachbearbeitete Bild.

Nachbearbeitung:

1. Farbformat konvertieren RGB -- > Graustufenbild

2. Farbformat konvertieren Graustufenbild -- > RGB

3. Kontrast und Helligkeit optimieren

4. Bild schwach blau tönen (Geschmackssache)

Die Bilder 18 b und 21 b erscheinen deutlich angenehmer als die entsprechenden Rohbilder, da nun die Farbsäume nicht mehr störend in Erscheinung treten, aber die farbsaumbedingten Unschärfen sind nach wie vor vorhanden, denn die Farbsäume wurden ja lediglich „entfärbt“.

Die Bilder 19 und 22 zeigen, daß ein Grünfilter zwar eine gewisse Verbesserung bringt, jedoch sind immer noch rote Farbsäume zu erkennen. Dies liegt daran, daß ein solches Filter nur sehr näherungsweise als „Spektralfilter“ betrachtet werden kann – es läßt noch erhebliche Rotanteile des Lampenlichtes durch (vgl. Abb.7!).

Die Bilder 20 und 22 sind am brillantesten: Da fast reines monochromatisches Licht verwendet wurde (vgl. Abb.9!), ist schon das Rohbild frei von Farbsäumen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Wie zu erwarten, ist ein Interferenzfilter einem Glasfilter gleicher Färbung bei weitem überlegen.

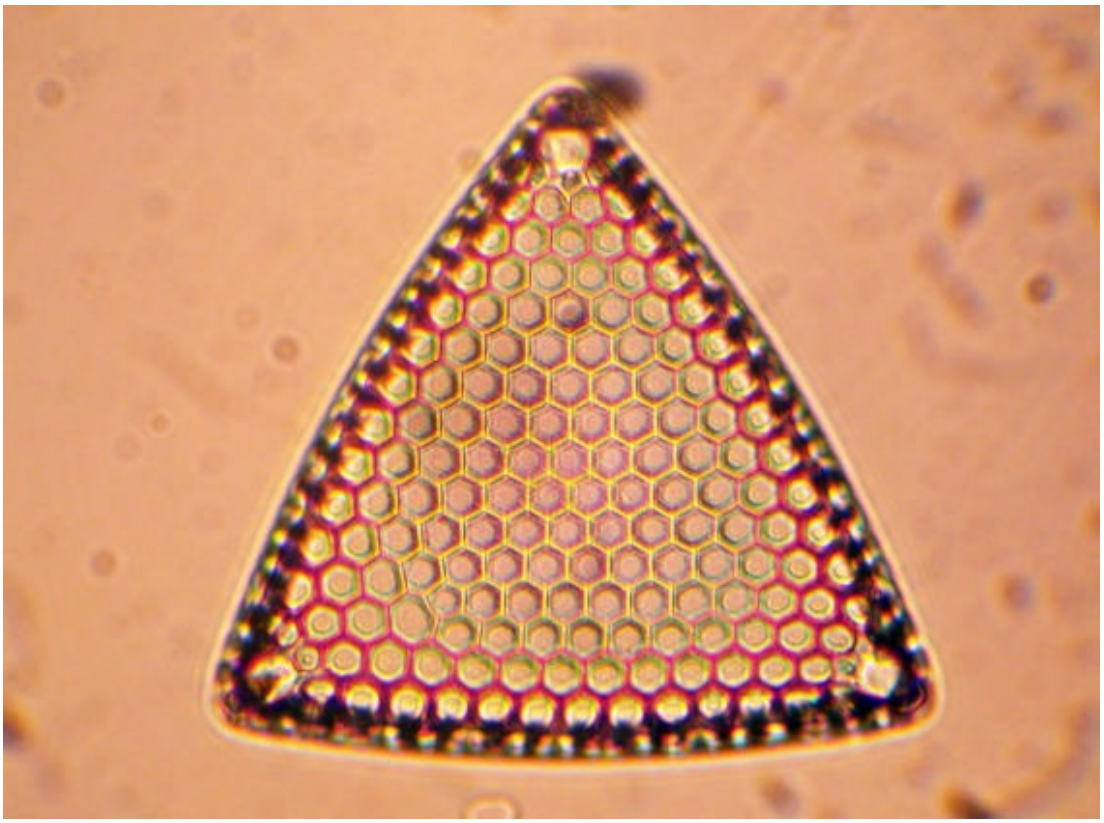

Abb. 18 a 40x Achromat Lampenlicht ungefiltert

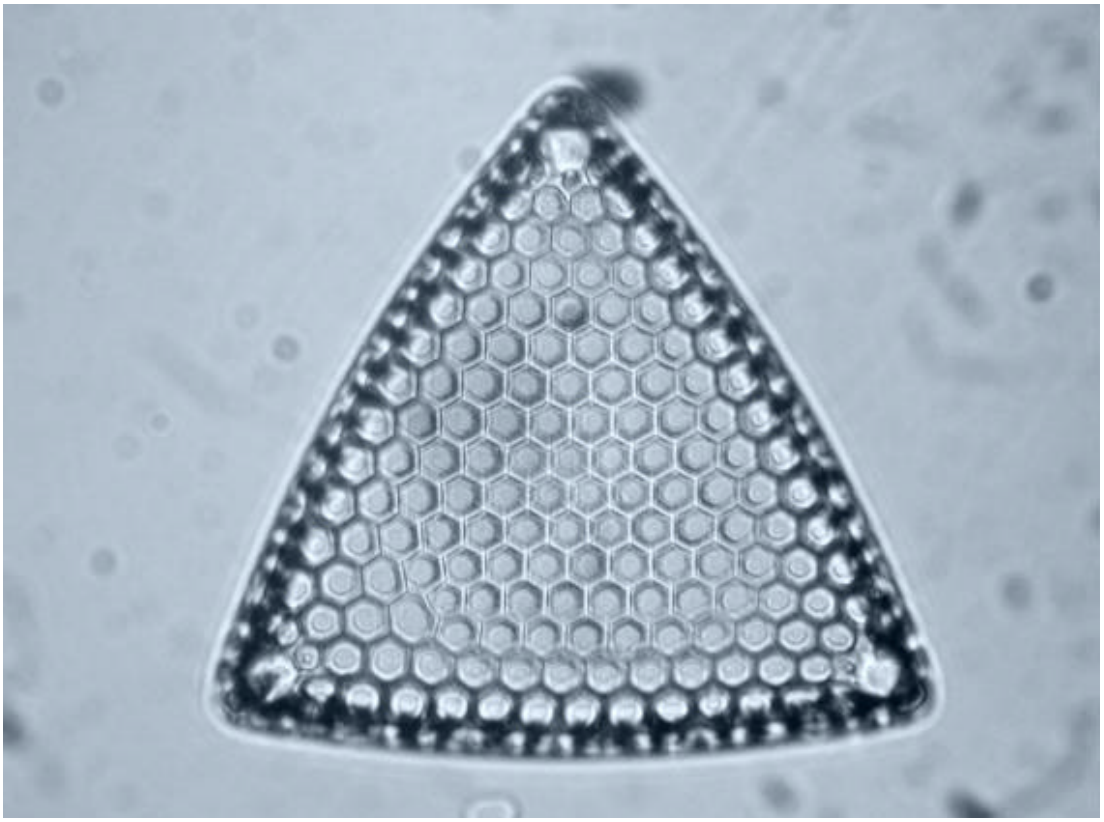

Abb. 18 b Die Farbsäume sind nur scheinbar verschwunden

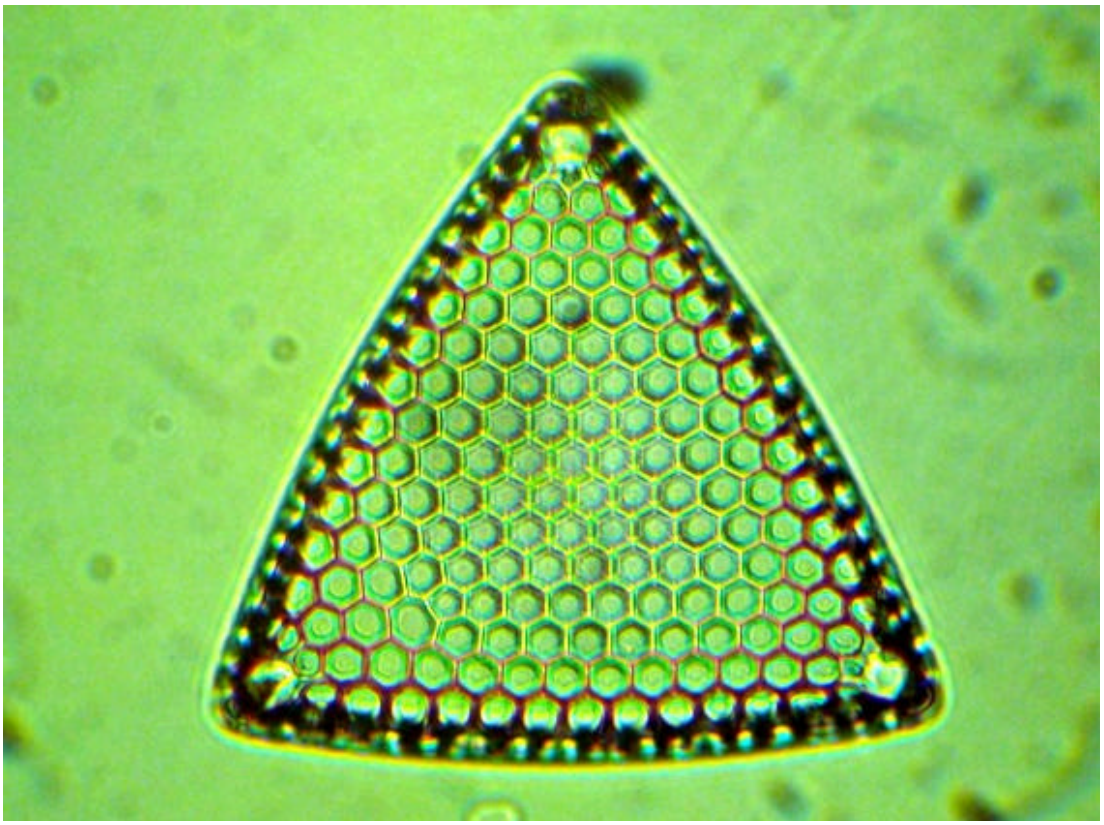

Abb. 19 a 40x Achromat Lampenlicht + Grünfilter
Farbsäume nur teilweise unterdrückt

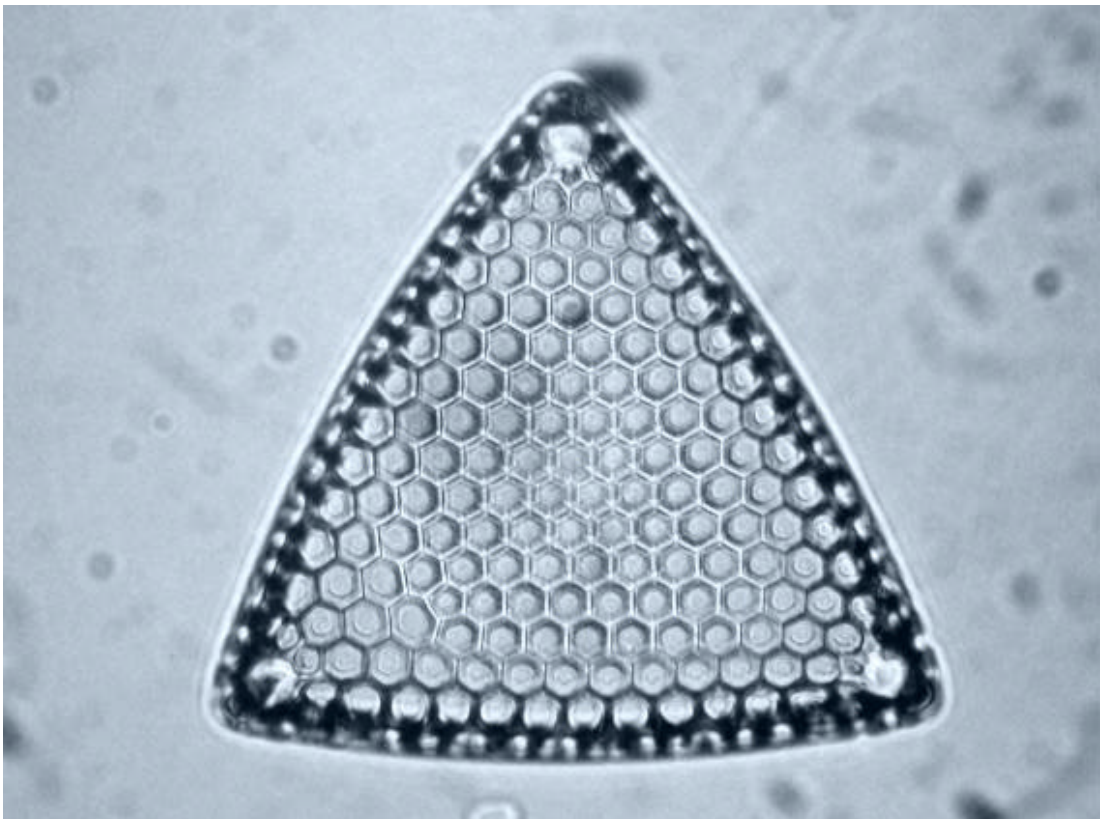

Abb. 19 b Das nachbearbeitete Bild ist etwas brillanter als 17 b

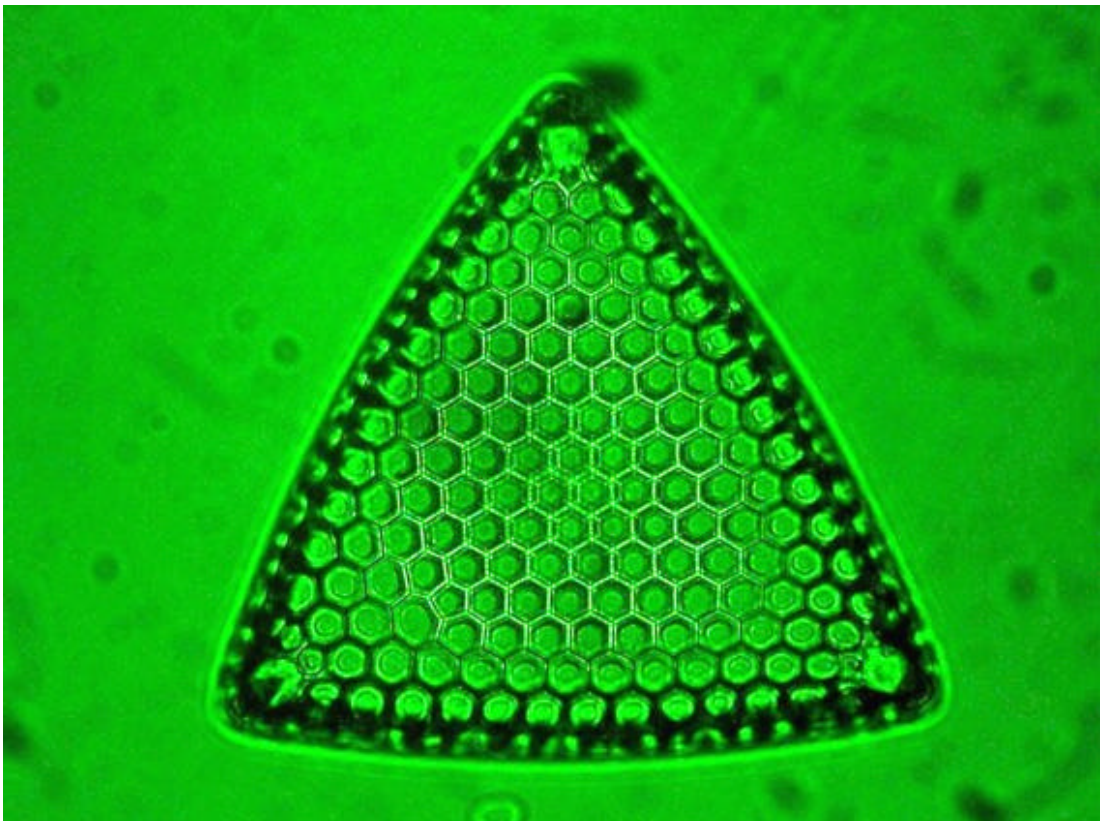

Abb. 20 a 40x Achromat Lampenlicht + Spektralfilter (Interferenzfilter) Schon das Rohbild ist frei von Farbsäumen!

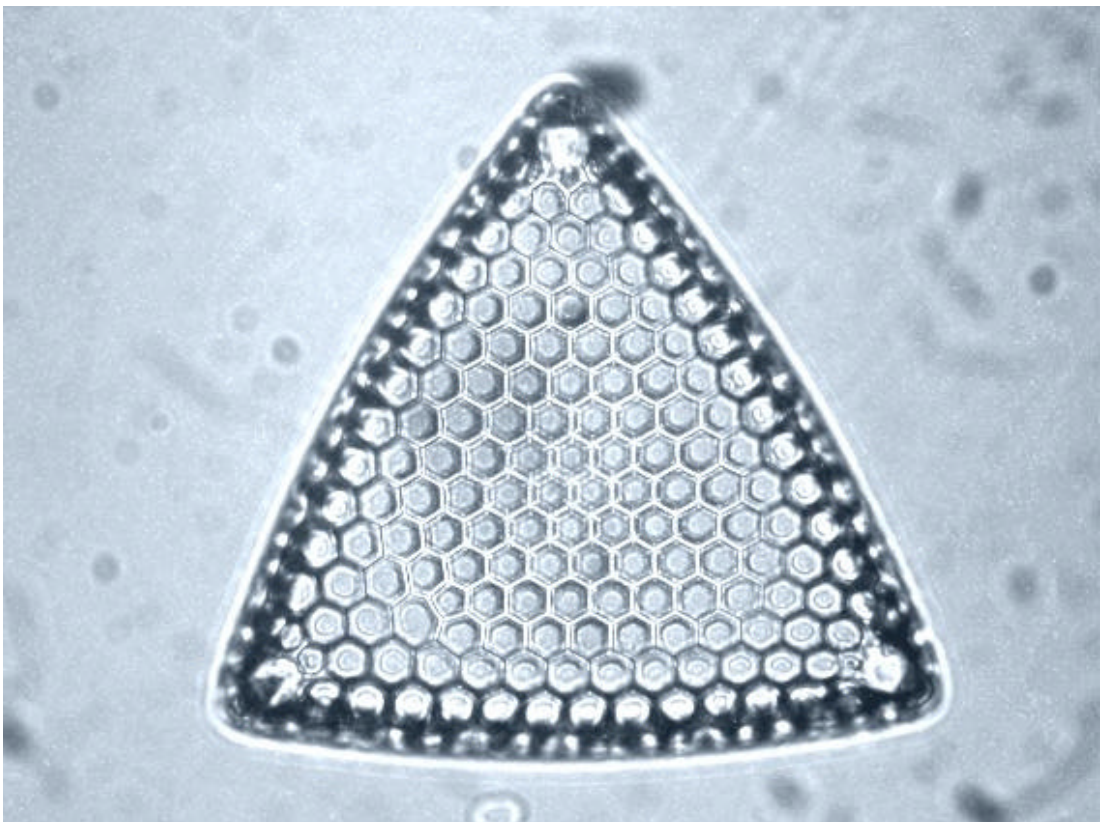

Abb. 20 b Das nachbearbeitete Bild ist brillanter als 18 b, allerdings wird dies erst bei großformatiger Wiedergabe deutlich

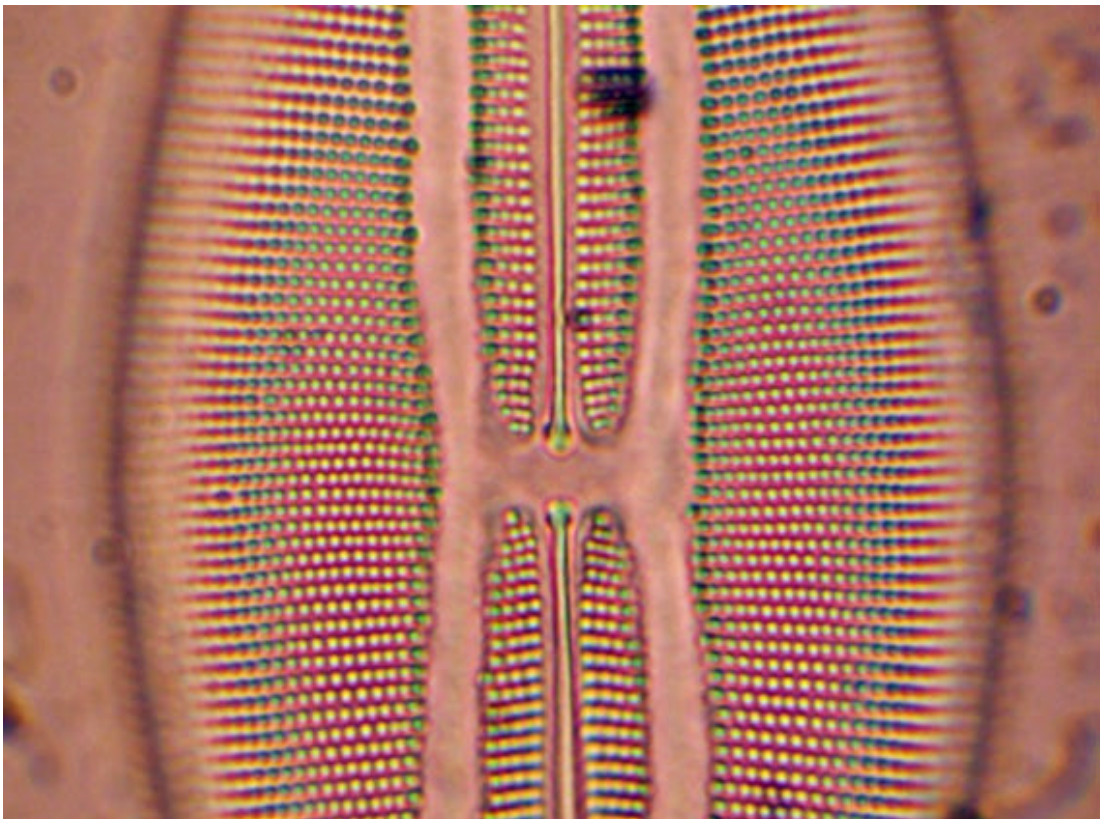

Abb.21 a 100x Achromat Öl Lampenlicht ungefiltert

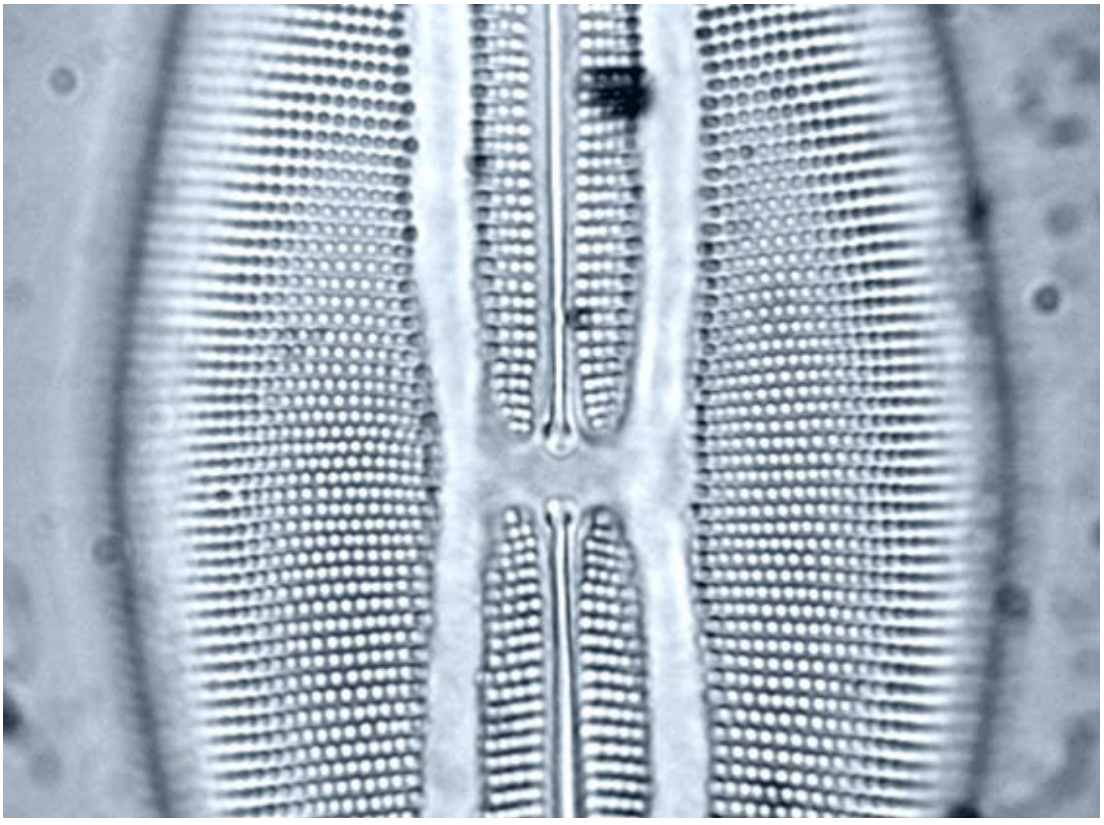

Abb.21 b

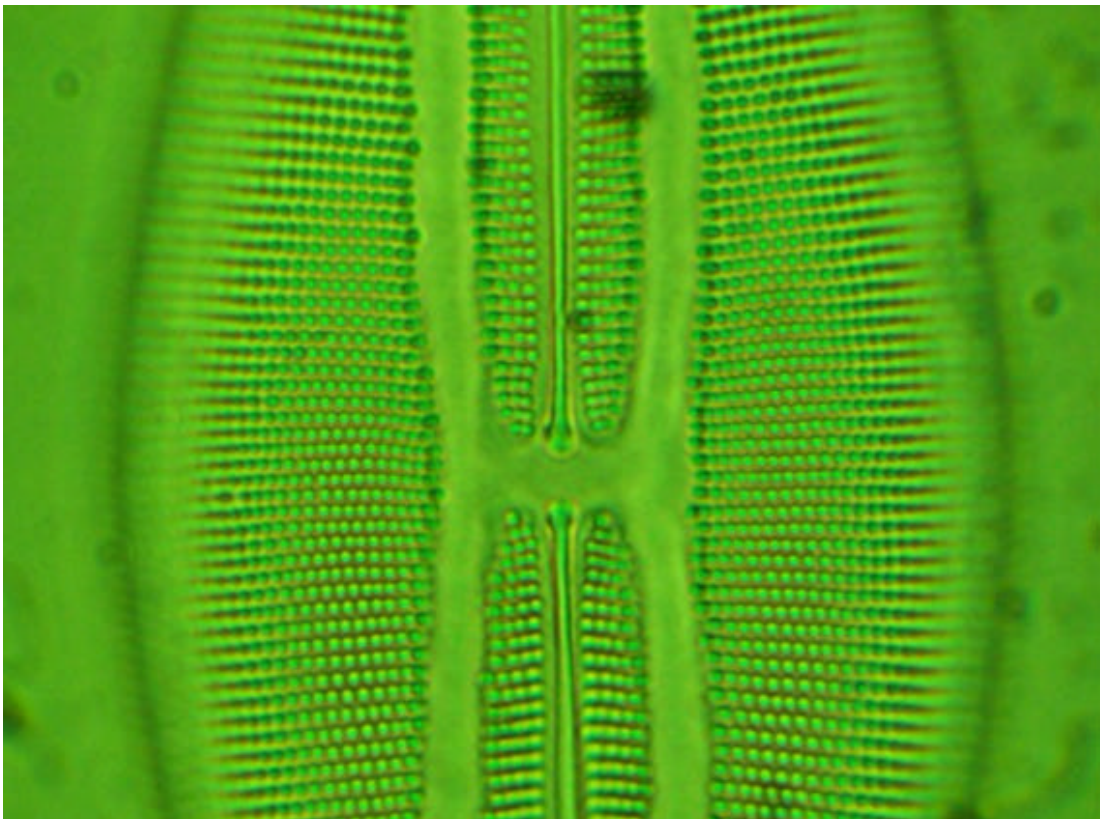

Abb. 22 a 100x Achromat Öl Lampenlicht + Grünfilter

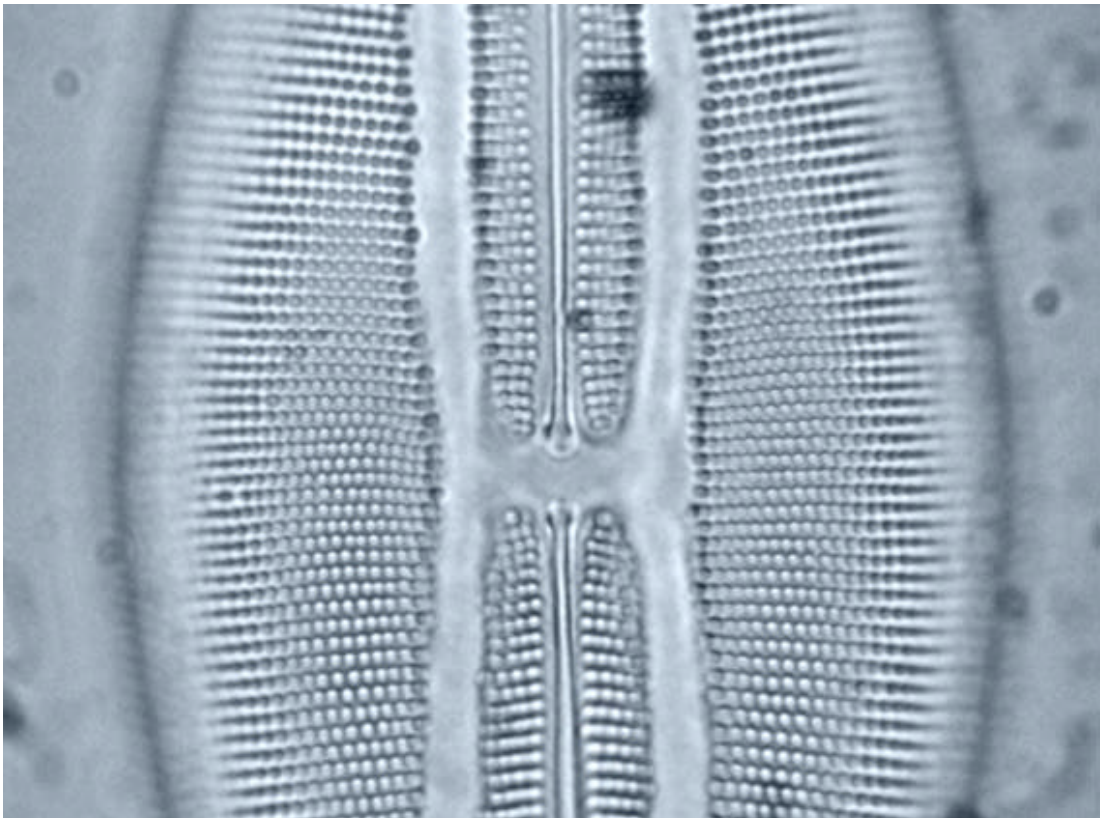

Abb.22 b

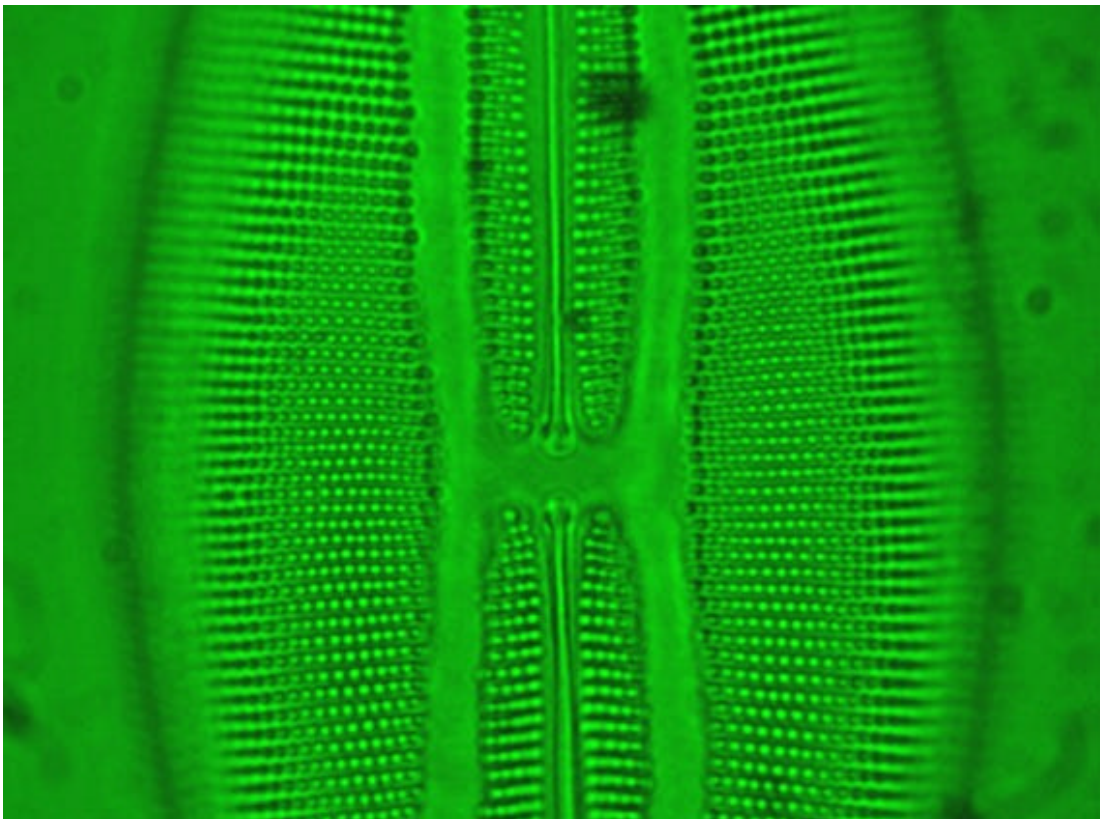

Abb.23 a 100x Achromat Öl Lampenlicht + Spektralfilter

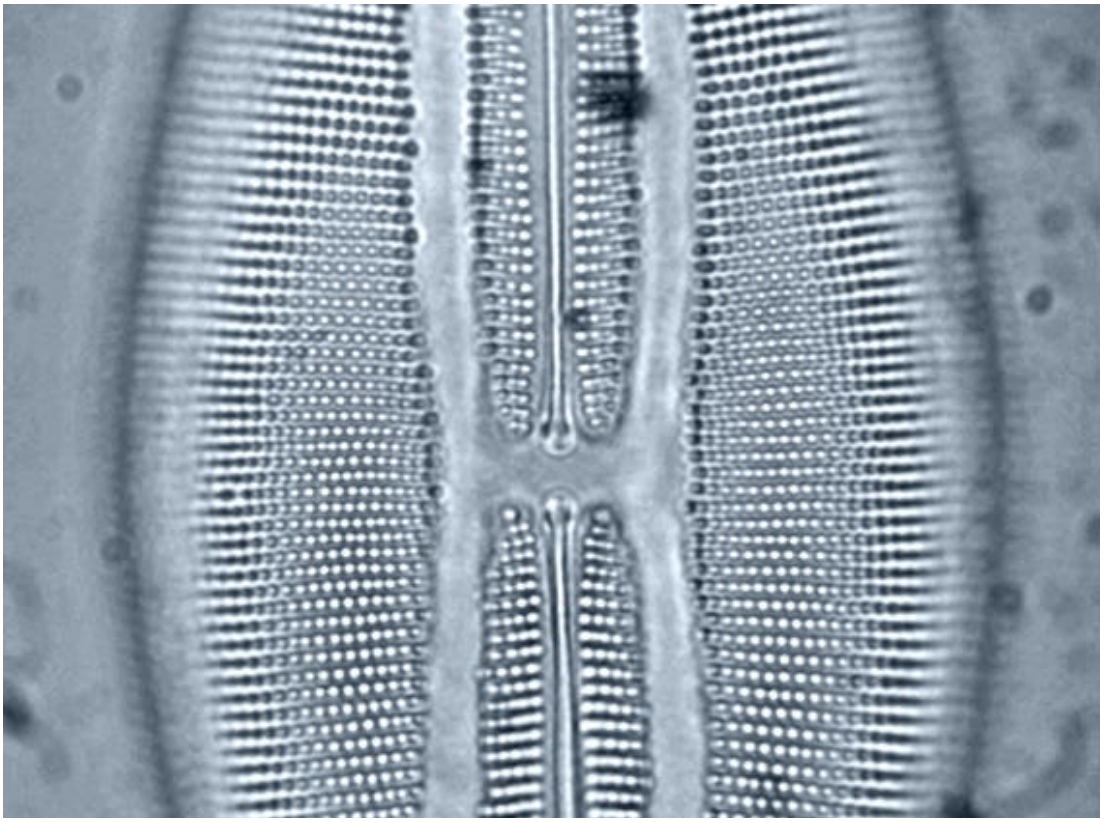

Abb.23 b

5. Fluoreszenzmikroskopie

Dieses Spezialgebiet der Mikroskopie setzt die geschickte Kombination hochwertiger Spezialfilter voraus, es ist geradezu die Domäne für den Einsatz von Interferenzfiltern. Aus diesem Grunde wird es hier in einem gesonderten Kapitel behandelt.

5.1. Fluoreszenz

Zahlreiche Naturstoffe, Chemikalien, Farbstoffe und Mineralien besitzen die Eigenschaft, bestimmte absorbierte Wellenlängenbereiche nicht vollständig in Wärme umzuwandeln, sondern einen Teil dieser absorbierten Energie als farbiges Licht abzustrahlen – sie zeigen Fluoreszenz. Man bezeichnet denjenigen Spektralbereich, der die Fluoreszenz auslöst, als „Erregerlicht“, das abgestrahlte Licht als „Fluoreszenzlicht“. Hierbei ist das Fluoreszenzlicht stets längerwelliger als das Erregerlicht.

Im Alltag bemerken wir Fluoreszenz gewöhnlich nicht, da das i.d.R recht schwache Fluoreszenzlicht vom Tageslicht überstrahlt wird. Nur sehr starke Fluoreszenz fällt dann auf (gelbgrüne Warnwesten der Polizei, Lösungen von Fluorescein, Eosin oder Rhodamin). Anders liegen die Dinge, wenn man Fluoreszenz mit „Schwarzlicht“ (UV-A) oder dunkelblauen TL-Leuchten anregt („Diskobeleuchtung“).

5.2. Blaulicht-Fluoreszenzmikroskopie

Diese Urform der Fluoreszenzmikroskopie kommt auch für Amateure in Betracht, denn gewöhnliche Mikroskope lassen sich leicht entsprechend umrüsten.

Als Lichtquelle benötigt man einen Quecksilberbrenner (am besten), eine „blaue“ Autoscheinwerferbirne oder eine helle Quarzlampe (ca. 30 – 100 W), denn das Licht muß einen hinlänglich hohen Anteil an blauem Licht besitzen, möglichst auch einen Anteil von UV-A.

Als „Anregungsfilter“ legt man ein tiefblaues Kantenfilter in den Filterhalter. „Kobaltglas“ ist ungeeignet, da dieses ebenfalls tiefblaue Glas rotes Licht durchläßt.

Als „Sperrfilter“ verwendet man ein gelbes oder orangefarbenes Kantenfilter, das man auf die Okularblende legt (am besten mit Hilfe eines Abstandsringes, da dann Verunreinigungen des Filters nicht stören).

Ohne Sperrfilter soll der Untergrund leuchtend blau erscheinen, mit Sperrfilter völlig schwarz.

Heute wird Blaulicht-Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr angewendet, denn die Methode besitzt mehrere grundsätzliche Nachteile:

1. Bei Schnitten leuchtet die Schnittunterseite viel heller auf als die Schnittoberseite. Fokussiert man auf die helle Unterseite, stören die darüber liegenden Schichten; fokussiert man auf die Oberseite, stört die nun unscharfe, aber helle Unterseite.

2. Es ist nicht möglich, durch Wahl geeigneten Anregerlichtes bestimmte Stoffe selektiv zur Fluoreszenz anzuregen.

3. Nur solche Stoffe werden zur Fluoreszenz angeregt, deren Erregerlicht im blauen Bereich liegt.

4. Nur lägerwelliges Fluoreszenzlicht kann das Sperrfilter passieren – blaues oder grünes Fluoreszenzlicht kann nicht beobachtet werden.

5.3. Praktische Hinweise zur Blaulichtfluoreszenz

Um Enttäuschungen zu vermeiden, hier einige Hinweise:

1. Bei der Fluoreszenzmikroskopie ist nicht der Beleuchtungsapparat die Lichtquelle (dessen Licht wird vom Orangefilter gesperrt), sondern das nun zum Leuchten angeregte Präparat. Die Aperturblende ist daher wirkungslos. Man arbeitet mit vollständig geöffneter Aperturblende und stellt die Höhe des Kondensors so ein, daß das Fluoreszenzbild maximale Helligkeit besitzt.

2. Da die Aperturblende wirkungslos ist, läßt sich die effektive Apertur der Objektive nicht verringern. Man arbeitet daher unweigerlich mit der maximalen Apertur der Objektive und der damit verbundenen mehr oder weniger geringen Tiefenschärfe. Selbst dünne Pflanzenschnitte (ca. 20 um) sind deswegen schon fast zu dick, sie ergeben nur mit einem schwachen Objektiv (10-fach) brauchbare Bilder, stärkere Objektive liefern wegen der oben beschriebenen Überstrahlungen keine brauchbaren Bilder mehr.

3. Stark vergrößernde Objektive lassen sich nur bei sehr dünnen Präparaten mit Gewinn einsetzen (z.B. Blutausstriche, Bakterienausstriche, dünne Paraffinschnitte).

4. Nur wenige Fluorochrome besitzen eine so starke Fluoreszenz, daß sie auch bei schwachem Anregerlicht hinlänglich helle Bilder liefern. Zu dieser Gruppe gehört Acridinorange.

5. Viele Fluorochrome färben nicht selektiv, ihr Einsatz ist daher oft enttäuschend.

5.4. Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie

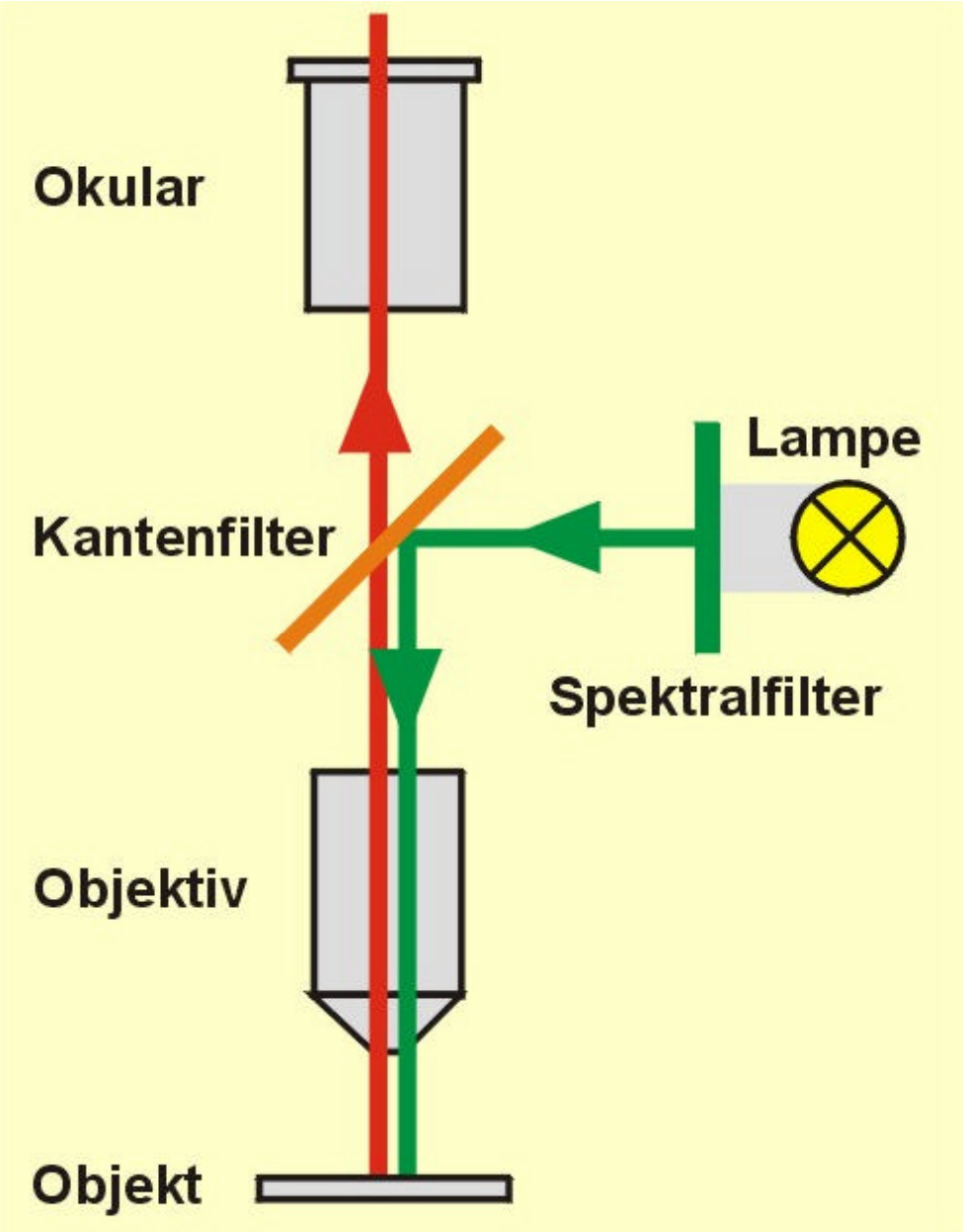

Abb.24 Strahlengang eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskopes

Moderne Fluoreszenzmikroskope sind stets Auflichtmikroskope, da dann die hellste Partie eines Schnittes dessen Oberseite ist. Hierdurch wird die Bildqualität erheblich verbessert.

Mit Hilfe schmalbandiger Interferenzfilter kann die Wellenlänge des Erregerlichtes beliebig variiert werden, so daß es möglich ist, Fluoreszenz selektiv anzuregen.

Das Sperrfilter ist ein auswechselbares Kantenfilter mit sehr steiler Kante. Es ist zum einen möglich, auch blaues oder grünes Fluoreszenzlicht zu beobachten, zum anderen liefert das Mikroskop auch dann noch gute Ergebnisse, wenn sich Anregerlicht und Fluoreszenzlicht nur wenig unterscheiden (z.B. Anregerlicht gelbgrün, Fluoreszenzlicht gelb).

Natürlich könnte man das Kantenfilter (Abb.24) auch durch einen halbdurchlässigen Spiegel ersetzen und das Filter statt dessen in das Okular einlegen, aber das wäre mit einem doppelten Lichtverlust verbunden: Nur 50% des Anregerlichtes erreicht das Präparat, nur 50% des ohnehin schon schwachen Fluoreszenzlichtes erreicht das Auge des Beobachters. Man macht daher gezielt von der Eigenschaft der Interferenzfilter Gebrauch, auf gesperrtes Licht wie ein Spiegel zu wirken.

5.4. Anwendungsbereiche

5.4.1. Fluoreszenz von Inhaltsstoffen

Zahlreiche pflanzliche Inhaltsstoffe (auch das Chlorophyll) zeigen Fluoreszenz. Diese zu beobachten gelingt schon mit einfacher Blaulicht-Fluoreszenzmikroskopie; für Amateure ein durchaus lohnendes Gebiet.

5.4.2. Vitalfärbungen

Färbt man lebende Zellen oder Einzeller mit stark verdünnten Farblösungen an, so führt oft die starke Anreicherung des Farbstoffes zu Schädigungen. Im Falle der Fluoreszenzmikroskopie kann man mit wesentlich stärker verdünnten Lösungen arbeiten, so daß keine Schädigungen auftreten.

5.4.3. Fluorochromierung

Tierische und pflanzliche Gewebe lassen sich auch mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) anfärben. Wichtig ist es, die gefärbten Objekte gründlich zu waschen, denn Reste der Farblösung führen zu einer störenden Aufhellung des Untergrundes. Oder aber man färbt längere Zeit mit einer so weit verdünnten Lösung, daß schließlich der gesamte Farbstoff vom Objekt absorbiert wird und die Farblösung dann frei von Farbstoff ist. Beim Anfertigen von Dauerpräparaten dürfen nur nichtfluoreszierende Einschlußmittel verwendet werden – der auch heute noch gern verwendete CAEDAX ist ungeeignet.

Seit langem sind die Farbstoffe Acridingelb und Acridinorange als Fluorochrome in Gebrauch, allerdings färben diese wie auch viele andere nicht selektiv. Heute stehen aber auch zahlreiche selektiv färbende Fluorochrome zur Verfügung, entsprechende Listen findet man im Internet. Da die Fluoreszenz oft pH-abhängig ist, sollte man Fluorochrome in Verbindung mit geeigneten Pufferlösungen anwenden. Weiterführende Schriften und Listen mit Fluorochromen werden im Anhang gegeben.

5.4.4. Immunfluoreszenz

Dies ist die wohl wichtigste Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie, allerdings kommt sie für Amateure nicht infrage. Es sei daher nur das Grundsätzliche kurz skizziert.

Man benötigt einen Antikörper („Antikörper_A“), der selektiv an ein Zellprotein bindet (z.B. an das Aktin des Cytoskelettes), ferner einen weiteren Antikörper („Antikör-

per_B“), der mit Antikörpern von Typ_A reagiert und dessen Molekül zugleich kovalent gebundene Fluorochrommoleküle trägt.

Zunächst wird das Material mit dem Antikörper_A behandelt, wobei nur ganz bestimmte Proteinstrukturen markiert werden, dann behandelt man das Material mit dem (farbigen) Antikörper_B, wobei die von Antikörper_A markierten Strukturen angefärbt werden.

Im Durchlichtmikroskop wäre nun die oben beschriebene Färbung nicht zu erkennen, denn die lokale Farbstoffkonzentration ist viel zu gering. Im Fluoreszenzmikroskop sind die Strukturen dagegen leuchtend hell vor schwarzem Hintergrund zu sehen, da nun keine Überstrahlung durch den Hintergrund erfolgt.

ANHANG 1

Weiterführende Schriften

MIKROKOSMOS

Göke G (1976)
Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. 1. Grundlagen S 382

Göke G (1977)
Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. 2. Die praktische Arbeit S 24

Göke G (1977)
Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. 3. Schmalbandfluoreszenz S 148

Anhang 2

Fluorochrome

http://de.wikipedia.org/wiki/Kategorie:Fluoreszenzfarbstoff

http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorophore

http://flowcyt.salk.edu/fluo.html

Anhang 3 Filter der Firma SCHOTT

http://www.pgo-online.com/de/katalog/schott_filter.html

Anhang 4

Tabellen nach GÖKE (MIKROKOSMOS 1977 S 24 ff.)

Farbstoff	**Spezielle Anwendung**	**Erregerfilter**	**Sperrfilter**
Antigen-Antikörper-Reaktion			
FITC (Fluoresceinthiocyanat)	Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen	FITC-Filter	OG 515 / 2 mm
Evans Blue	Rot-Kontrastierung von FITC-Färbungen	FITC-Filter	OG 515 / 2 mm
DANS (Diaminosulfonsäure)	Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen	UG 1 / 2 mm + BG 38 / 4 mm	GG 10 / 2 mm GG 4 / 2 mm
Rhodamin B200 (Lisamin-Rhodamin)	Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen	Interferenzfilter 546 / 20 Grün	OG 590 / 3 mm RG 610 / 2 mm
TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat)	Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen	Interferenzfilter 546 / 20 Grün	OG 590 / 3 mm RG 610 / 2 mm
Bakteriologie			
Acridinorange	Viele Bakterien; Unterscheidung lebender und toter Bakterien	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm
Acridingelb	Tuberkulose	BG 12 / 4 mm	OG 530 / 2 mm
Auramin	Tuberkulose Lepra	BG 12 / 4 mm	OG 530 / 2 mm
Berberinsulfat	Viele Bakterien	UG 1 / 2 mm + BG 38 / 4 mm	GG 10 / 2 mm
Coriphosphin	Diphtherie u.a. Bakterien	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm

Chromosomen			
Atebrin	Chromosomen-Banden	Interferenzfilter 436 / 20	OG 515 / 2 mm
Chinacrin	Chromosomen-Banden	Interferenzfilter 436 / 20	OG 515 / 2 mm
Quinacrine-Mustard	“Drumsticks”	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm
Eiweiß, Schleim			
Acridinorange	Schleim	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm
Aurophosphin G	Schleim	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Euchrysin	Schleim	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Coriphosphin	Schleim	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Tizianrot R	Eiweiß	Interferenzfilter 546 / 20	OG 590 / 2 mm OG 590 / 3 mm
Sulfaflavin	Eiweiß	UG 1 / 2 mm + BG 38 / 4 mm	GG 10 / 2 mm
Holz			
Euchrysin	Zellulose	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Coriphosphin	Zellulose	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Primulin O	Zellulose	BG 12 / 4 mm	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm

Knochen			
Calceinblau-Xylenorange	Polychrome Sequenzmarkierung	Interferenzfilter KP 490 / 500	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Calceinblau-Alizarin-Komplexon	Polychrome Sequenzmarkierung	Interferenzfilter KP 490 / 500	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Oxytetracyclin	Polychrome Sequenzmarkierung	BG 12 / 4 mm	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Säurefuchsin	Osteonen	Interferenzfilter 546 / 20	OG 590 / 2 mm OG 590 / 3 mm
Hydrobiologie			
Acridinorange	Vitalfärbung	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Coriphosphin	Vitalfärbung	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm
Rhodamin B	Vitalfärbung	Interferenzfilter 546 / 20	OG 590 / 2 mm OG 590 / 3 mm RG 610 / 2 mm
Zytologie			
Acriflavin	Nucleinsäuren	Interferenzfilter 436 / 20	OG 512 / 2 mm
BOA (Bis-aminophenyl-oxadiazol)	Quantitative DANN-Bestimmung	UG 1 / 2 mm + BG 38 / 4 mm	GG 10 / 2 mm
Coriphosphin	Lymphocyten Leukocyten	BG 12 / 4 mm FITC-Filter	OG 530 / 2 mm OG 515 / 2 mm

Fluorochrom	Konz. 1:	Zellkern	Plasma	Schleim	Markscheiden	Elastisxche Fasern	Quergestr. Muskulatur	Fett
Acridinorange	50.000	grün - rot						
Aurophosphin	50.000	goldgelb	blaßgelb	grün		E	hellgrün	bläulich
Berberin-Sulfat	100.000	gelb				E		
Brillantdianil-Grün G	100.000	weiß			blau			rosa, blau
Coriphos-phin O	1.000.000	gelbgrün	blaßgelb	orange	gelb	grün	blaßgrün	gelbgrün
Coriphosphin + Fuchsin	100.000	gelb	rötl.-elb	leuchtend rot		gelb	gelb	blau
Rheumsinen-se-Extrakt	unverdünnt	blaß gelbgrün	blaß gelbgrün		lichtgelb	E	graugrün	leuchtend gelb
Chelidonium-Extrakt	unverdünnt	goldgelb						
Chlorophyll-Extrakt	unverdünnt							blutrot
Euchrysin	300.000	gelb	gelbgrün			E	blaßgrün	
Flavopho-sphin	50.000	gelb	gelbgrün	grün		grün	olivgrün	grün
Fuchsin	10.000			rot				blau
Geranin G	10.000				rosa	weißlich	rötlich	blau
Neutralrot	20.000	dunkelrot	rötlich		gelblich	E	rötlich	gelbrün – blaugrün
Phosphin 3 R	1.000.000	goldgelb	gelblich		gelblich	rötlich	gelb	gelbgrün
Pinachrom	1.000	blaßblau	blaßblau	weißlich		blaßblau	blaßblau	blau
Primulin	100.000	blauweiß	blauweiß		blaßblau	blaßweiß	hellblau	
Primulingelb	100.000	weißlich	weißlich	weißblau	bläulich	weißlich	blauweiß	blau
Rhodamin G	100.000	blaßgelb	blaßgelb	gelblich		E	gelb	gelb
Rosolrot	50.000	gelbrot	gelbrot			rot	rot	gelbgrün
Thiazolgelb G	100.000		blaßblau		blau	gelbgrün	blau	
Thioflavon S	1.000.000	hellblau	hellblau	blau	hellblau	hellgelb	gelbgrün	dunkelblau
Trypaflavin	5.000.000	gelbgrün	gelbgrün	grün		grün	grünlich	gelb

E = Eigenfluoreszenz

Anhang 5

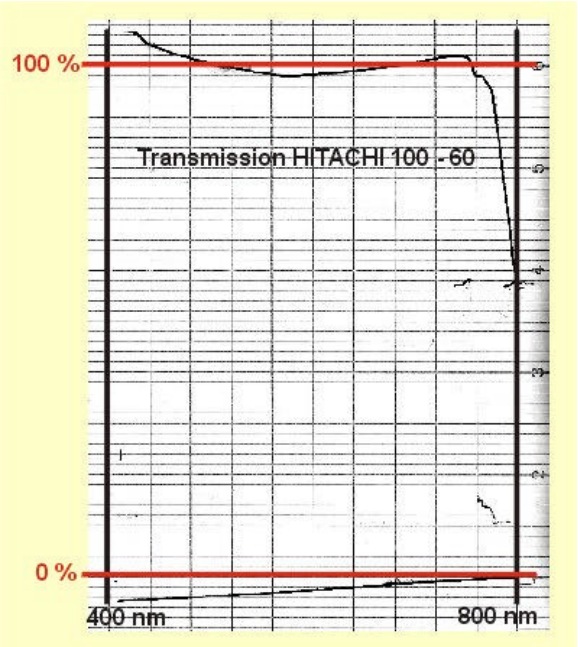

Abb.25 Transmission 0% und 100%

Alle Meßkurven wurden mit dem Spektralfotometer HITACHI 100–60 aufgenommen. Wie Abbildung 25 zeigt, fällt die 0%-Linie zu kürzeren Wellenlängen hin leicht ab, die 100%-Linie ist nicht ganz linear. Trotzdem sind die Meßwerte zwischen 400 nm und 700 nm für den hier verfolgten Zweck durchaus brauchbar. Oberhalb 700 nm fällt die 100%-Linie stark ab, die in diesem Bereich gemessenen Transmissionswerte (Rohwerte) müssen folglich umgerechnet werden (s.u.). Qualitativ bedeutet dies, daß die tatsächliche Transparenz T_{real} höher ist als die gemessene Transparenz T_{roh}.

Umrechnungsformel, gültig für den gesamten Wellenlängenbereich. H sei der Abstand der 100%-Linie von der 0%-Linie, gemessen in Skalenteilen SKT.

$$T_{real}\ \% = (T_{roh} / H) \cdot 100$$

Messungen der Transparenz im nahen Infrarotbereich sind bei der Verwendung von Digitalkameras deshalb wichtig, weil die CCD-Chips auch infrarotempfindlich sind (bis ca. 1050 nm), allerdings wird dies durch fest eingebaute Filter mehr oder weniger unterdrückt. Man muß jedoch damit rechnen, daß die Verwendung eines Blaufilters zur Verbesserung der Auflösung zu enttäuschenden Ergebnissen führt, wenn nämlich das Filter langwelliges Licht durchläßt und die Kamera dieses „wahrnimmt“. Dem hochaufgelösten „Blaubild“ überlagert sich dann ein „Infrarotbild“ geringer Auflösung, daß zudem noch unscharf ist, denn die Brennweite einer Optik ist für IR-Licht deutlich größer als für sichbares Licht. (Mitteilung PETER HÖBEL, Mikroskopie-Forum).

Die folgenden Bildpaare zeigen den Unterschied zwischen einem IR-durchlässigen Blaufilter und einem IR-sperrenden Blaufilter (Foto: PETER HÖBEL):

Testobjekt :	Diatomee
Objektiv:	Zeiss Planapo 25/0,65
Beleuchtung:	20 Watt Halogenleuchte
Kamera:	ImagingSource DMK72 (monochtome Kamera 350nm - 1000nm)
Filter A:	einfaches Blauviolettfilter von Teleskop Service http://www.teleskop-express.de/shop/product_info.php/info/p113_TS-1-25--Farbfilter---violett--47.html
Filter B:	Infrarotsperrfilter von Fa. Astronomik

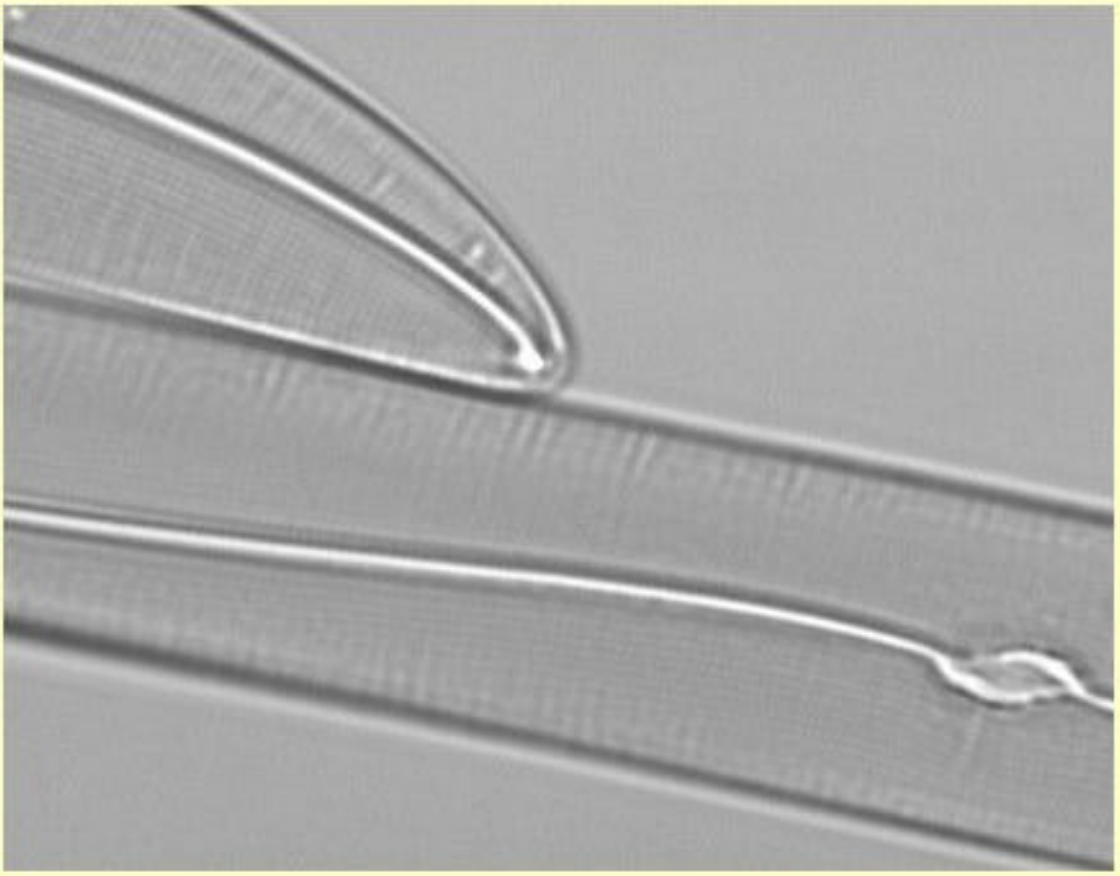

Abb.26 Verwendung eines IR-durchlässigen Filters. Man beachte die schlechte Bildqualität trotz bester Ausrüstung!

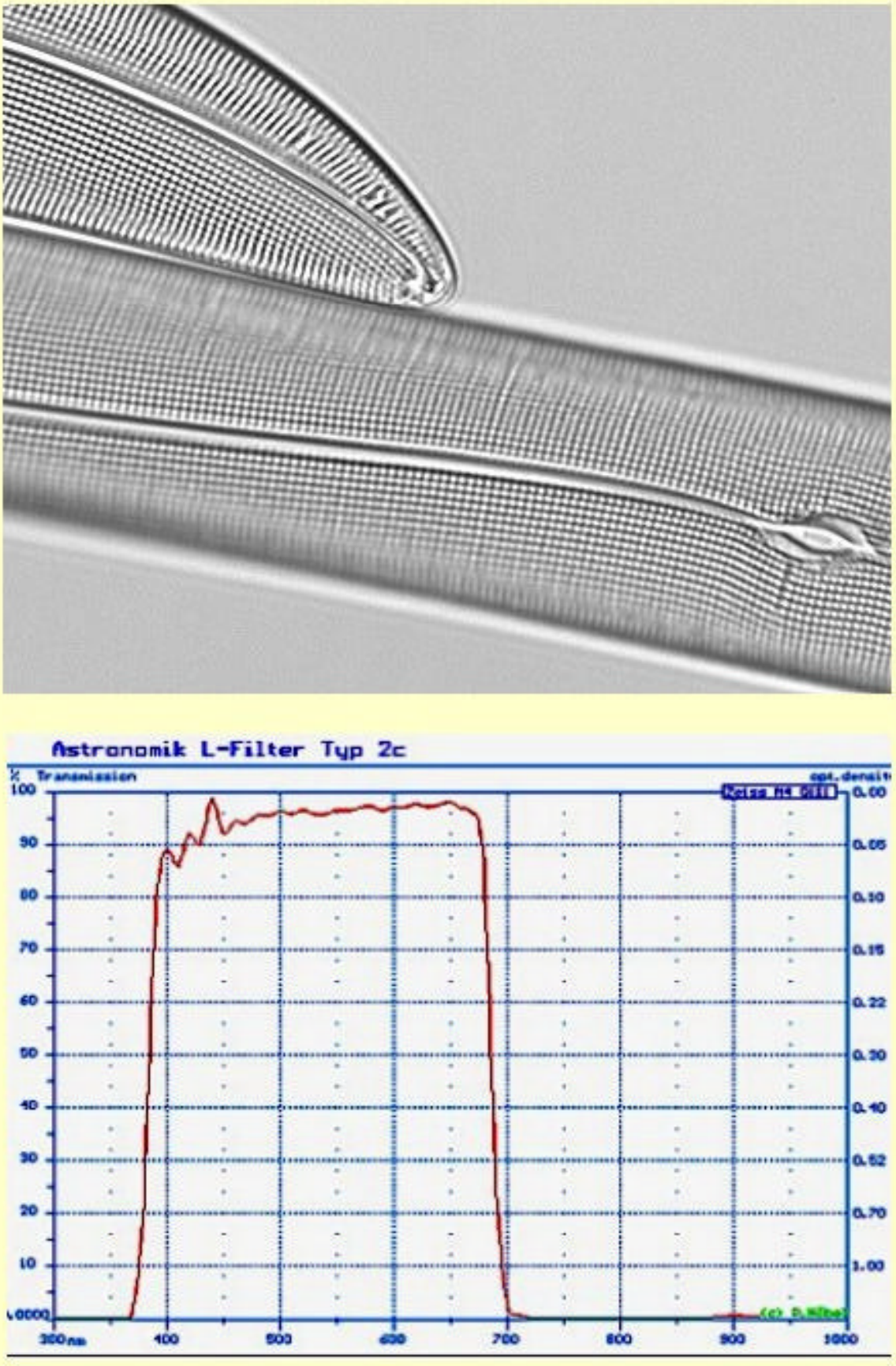

Abb. 27 Verwendung eines IR-sperrenden Filters. Man beachte die dramatische Qualitätssteigerung!