

3. Vorlesung Mikroskopische Bildgebung

Wahlpflichtmodul 9522: EI-M im 1. und 3. Fachsemester - WS 2015/2016

Wiederholung von der 2. Vorlesung

Website

`website`

`website // last`

Web-Server Mikroskopische Bildgebung im WS 2015/16

http://izbifs.izbi.uni-leipzig.de/~braumann/HTWK/Mikroskopische_Bildgebung/

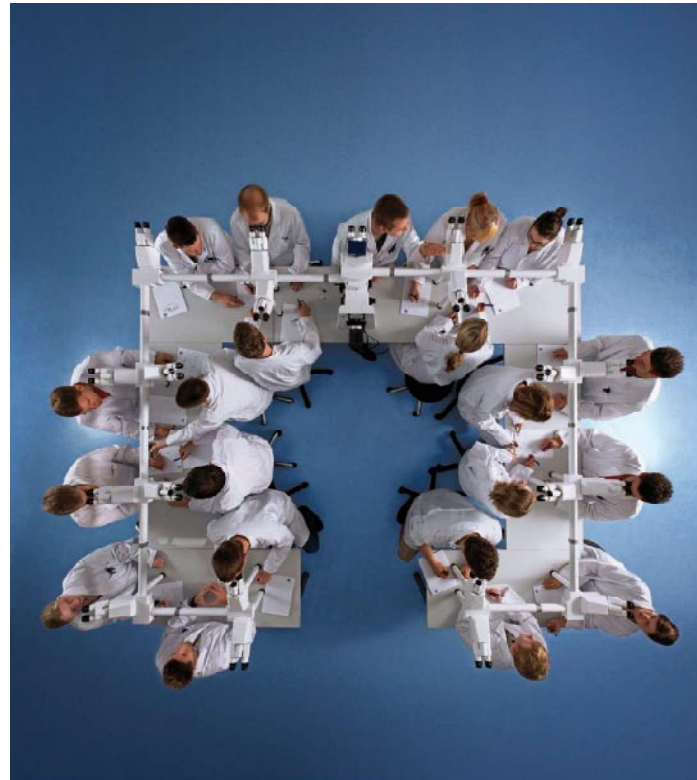
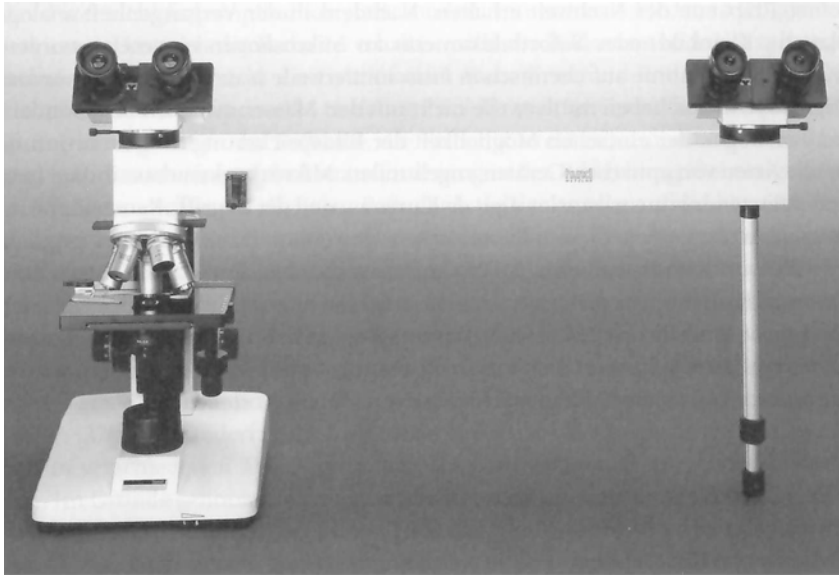
Initialisierung

13. November 2015

Aus 4. Aufrechtes Durchlichtmikroskop (Fortsetzung)

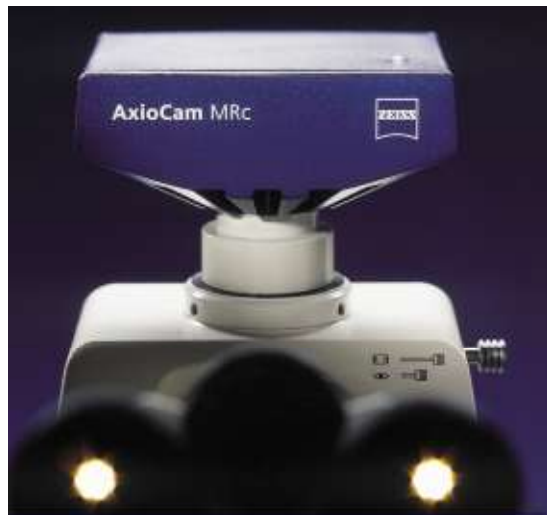
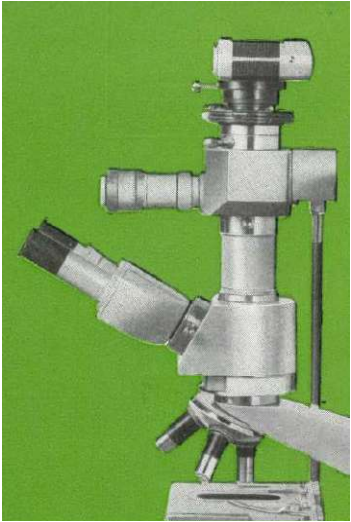
Diskussionsbrücken

⇒ zu Schulungszwecken, für Simultanbegutachtungen, mittels Strahlengangerweiterungen



Bilddokumentation

- ⇒ zur Archivierung, zur Akquise für nachfolgende Bildanalysesysteme
- ⇒ prinzipiell jede Kameraart anbaubar :
 - (Kompaktkamera),
 - Systemkamera (Spiegelrefl., spiegellos),
 - C – Mount – Kamera (Gewinde 1 Zoll Außendurchmesser)



Sensorik heute :

- ⇒ CCD (ladungsgekoppelte Schaltungen, die als "Schieberegister" ausgelesen werden)
 - CMOS meist kleiner lichtempfl. Fläche, daher weniger lichtstark, in allen Fotokameras
- ⇒ CMOS (aktiver Pixelsensor, nachgeschaltete Elektronik für jedes Pixel)
 - CCD bei besonders lichtschwachen Anwendungen gekühlt

Marketingparameter : Pixelzahl des Detektors

Rayleigh – Kriterium zur Auflösung :
$$\Delta x = \frac{0,61 \lambda}{N.A.}$$

Passender Pixelabstand : $\Delta p = \frac{M_{obj} \cdot \Delta x}{2}$ mit M_{obj} als Vergrößerung des erfaßten Zwischenbildes

Erforderliche Pixelanzahl (Kreisbild mit ϕd) :
$$N = \frac{\pi}{4} \left(\frac{2 d}{M_{obj} \cdot \Delta x} \right)^2$$

```

NA = 0.1;
M = 4;
λ = 550 / 1000000000;
erstesminimum = First@Union@ReplaceAll[r, NSolve[{(BesselJ[1, 2 π r] / (π r))^2 == 0, 0 < r < 4}, r]]
Δx = erstesminimum * λ / NA;
d = 18 / 1000;
π / 4 (2 * d / M / Δx)^2
0.609835

5.6549 × 106

π / 4 (2 * d / #[[1]] / (erstesminimum * λ / #[[2]]))^2 & /@ {{4, 0.1}, {10, 0.25}, {40, 0.65}, {100, 1.25}}
{5.6549 × 106, 5.6549 × 106, 2.3892 × 106, 1.41372 × 106}

```

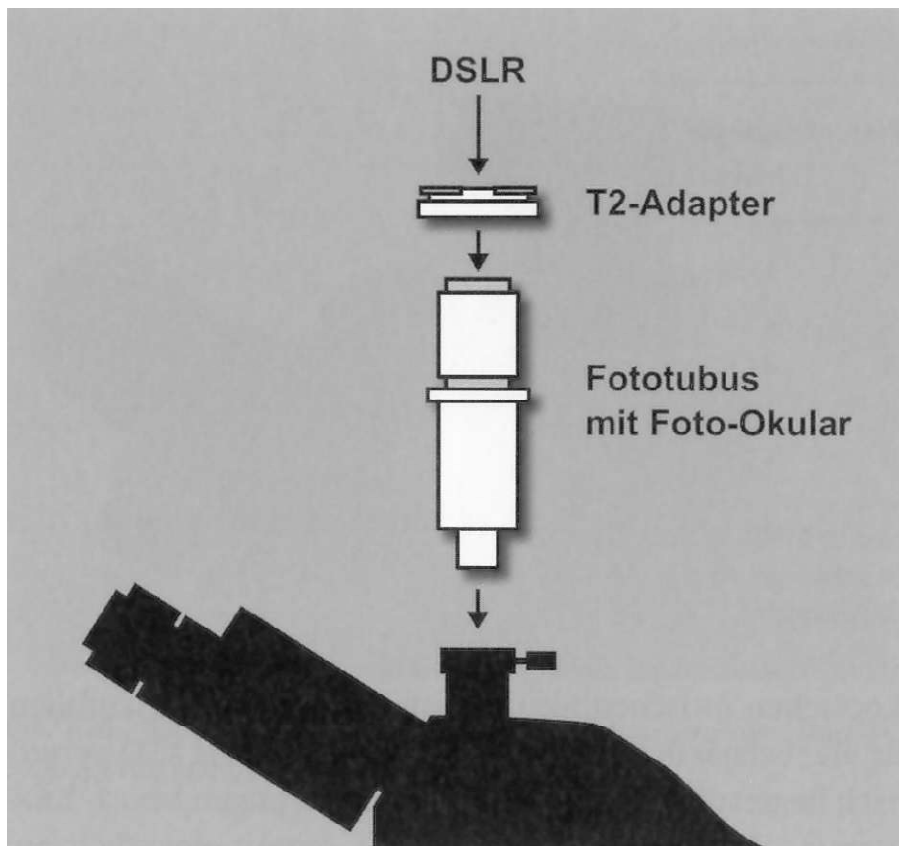
Wertebeispiele für d=18mm (Zwischenbilddurchmesser):

Objektiv	N [Megapixel]
4/0.10	5.7
10/0.25	5.7
40/0.65	2.4
100/1.25	1.4

Paradoxon: erforderliche Pixelzahl sinkt mit stärker vergrößernden Objektiven

Grund: N.A. der Objektive steigt nicht linear mit Abbildungsmaßstab, sondern geringer
 → das Auflösungsvermögen steigt nicht im gleichen Maße an

Beispiel für Systemkameras: Digitale Spiegelreflex (DSLR)

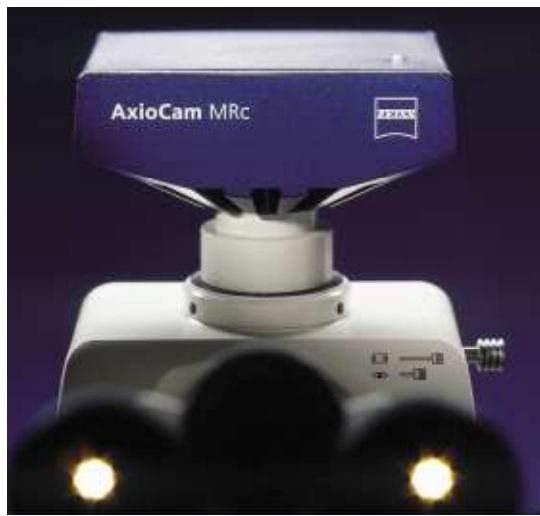
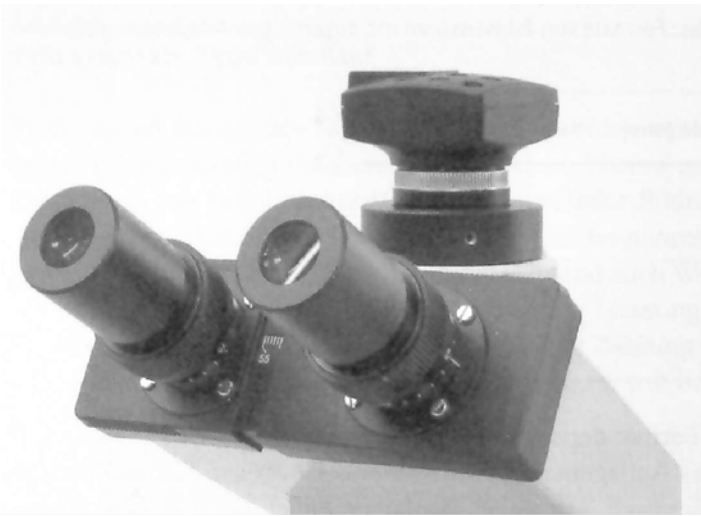


Kameraadaptierung am Trinokulartubus:

⇒ Fotookular meist 2,5× für Kleinbildkameras (Vollformat)

⇒ im Fototubus befindet sich das Fotookular

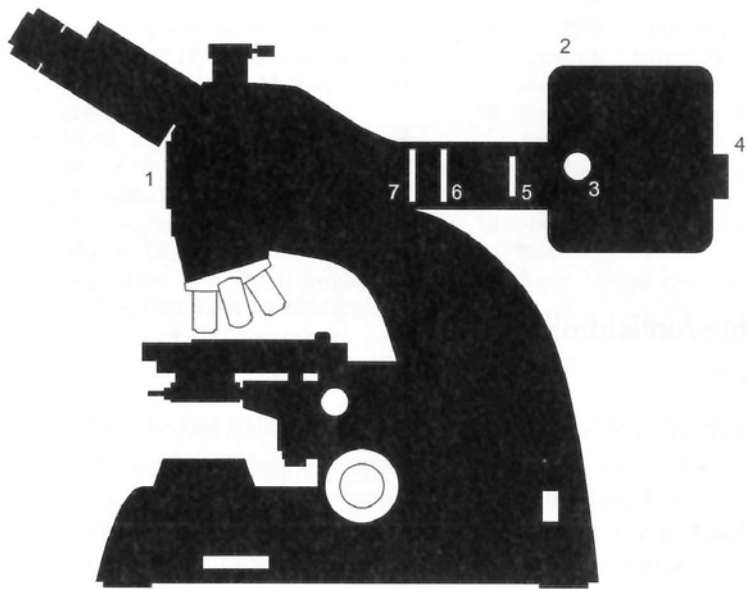
Beispiel für C-Mount-Kameras:



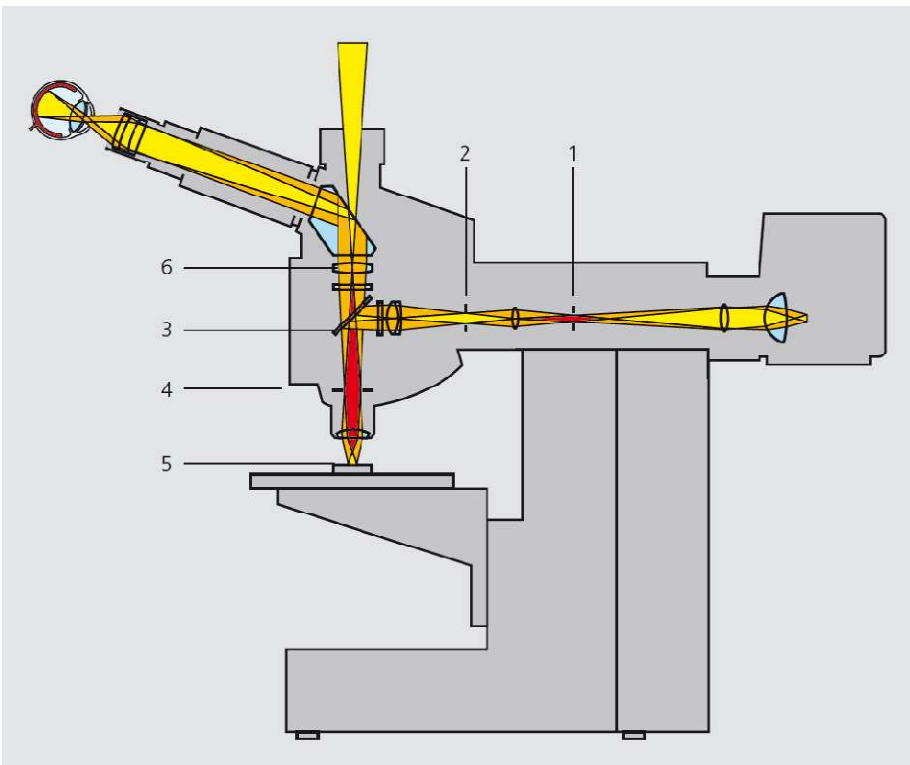
- ⇒ Fototuben deutlich kleiner, da u.U. der Sensor direkt in Zwischenbildebene gebracht werden kann
- ⇒ Bildsensoren ohne zusätzliche Kameraoptik

Aus 5. Aufrechtes Auflichtmikroskop

- ⇒ Beleuchtungsseite wie Beobachtungsseite
- ⇒ für opake Proben



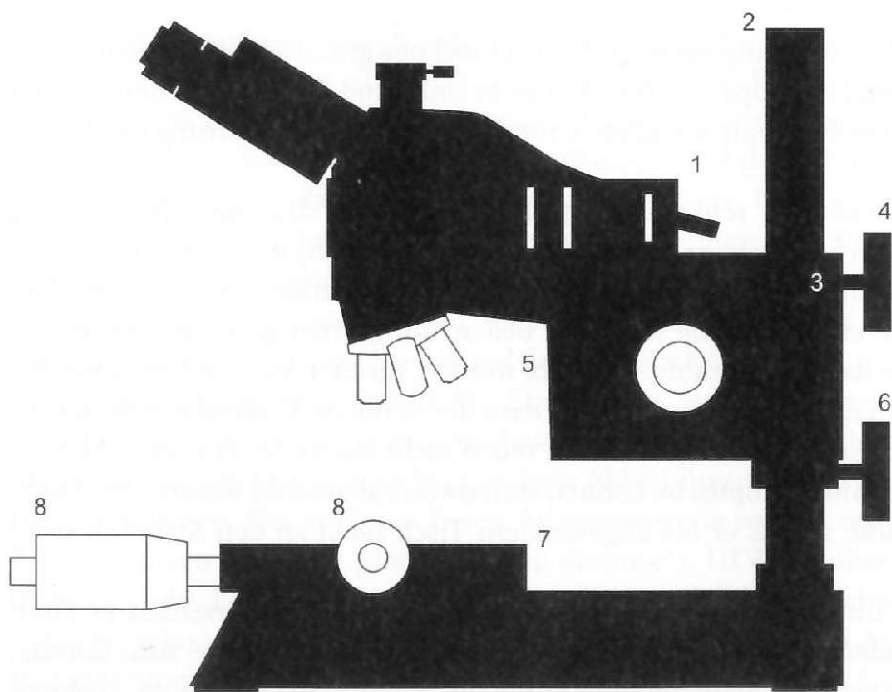
1: Auflichtilluminator; 2: Lampenhaus; 3: Einstellvorr. Kollektor; 4: Einstellvorr. Rückrefl.; 5: Filterschieber; 6: Aperturblende; 7: Leuchtfeldblende (zentrierbar)



1: Aperturblende für Auflicht; 2: Leuchtfeldblende; 3: Reflektor (neutraler Strahlteiler); 4: Objektivpupille; 5: Probenoberfläche; 6: Tubuslinse

⇒ Besonderheit: Objektive wirken hier auch als Kondensoren!

⇒ Variante: Meßmikroskope mit Säulenstativ im Stativunterteil
der gesamte Mikroskopkörper mit Beleuchtung kann höhenmäßig frei bewegt werden



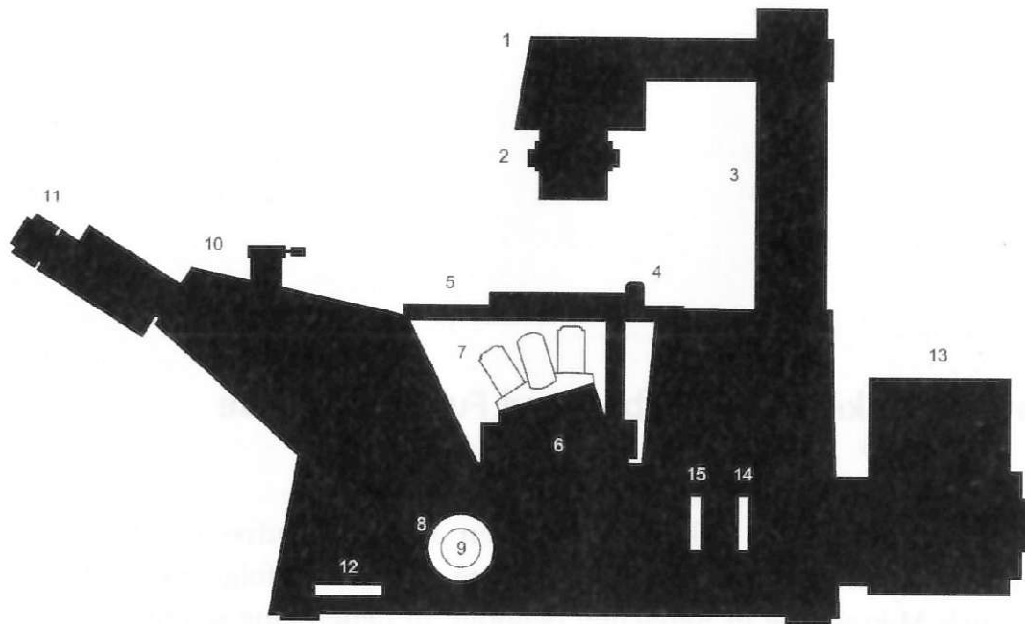
1: Auflichtilluminator mit externer Beleuchtung über Lichtleiter; 2: Stativ mit Säule; 3: Triebkasten (Grob-/Feintrieb); 4: Klemmschraube; 5: Mikroskopgrundkörper mit Objektivrevolver; 6: Sicherungsring mit Klemmschraube; 7: Koordinatenmeßtisch; 8: Meßschraube



Halbleitermeßplatz mit Mitutoyo FS-70Z-S

Aus 6. Inverses Mikroskop

- ⇒ wenn aufrechte Beobachtungsgeometrien nicht praktikabel sind, z.B. Zellkulturen in flüssigen Medien
- ⇒ als Durchlicht- und Auflichttypen ausführbar
- ⇒ auch materialwiss. Proben, die angeschliffen auf Tisch gelegt werden können



1: Durchlichtbeleuchtung; 2: Kondensor mit Aperturblende; 3: Stativsäule; 4: Objektführer; 5: feststehender Mikroskoptisch; 6: Revolverhalterung; 7: Objektivrevolver mit Objektiven; 8: Grobtrieb Fokussierung; 9: Feintrieb Fokussierung; 10: Trinokulartubus; 11: Okular; 12: Helligkeitsregelung; 13: Lampenhaus Auflichtbeleuchtung; 14: Aperturblende; 15: Leuchtfeldblende

- ⇒ Besonderheit:
- Objektive im Prinzip wie die der aufrechten Modelle
 - aber angepaßt auf stärkere Petrischalendicken (0.6mm bis 1.6mm).
 - Ölimmersion: Rand muß vorhanden sein, damit Öl nicht hinabläuft
 - wg. größeren Arbeitsabstandes sind N.A.s stark vergrößernder Objektive kleiner.
 - Fokussierung über Bewegung des Revolvers

Reflected Light
Microscope
Tube Length

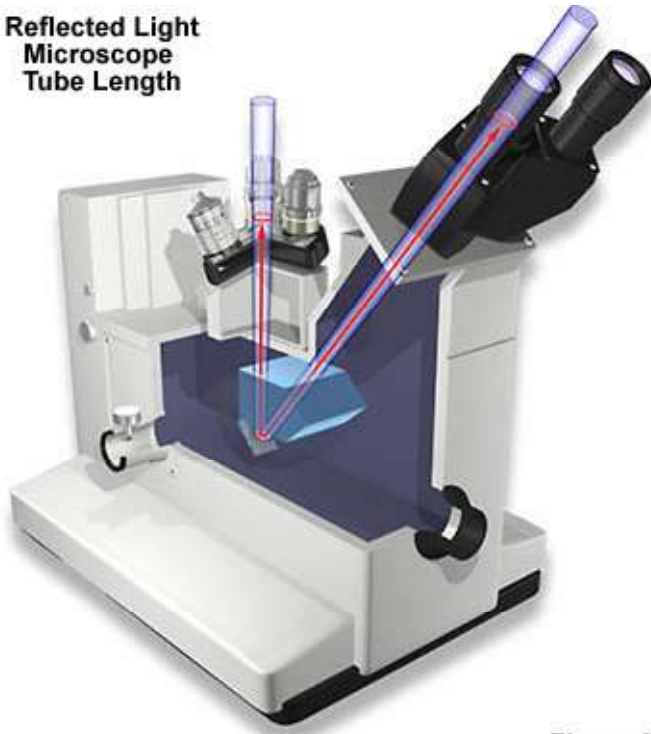
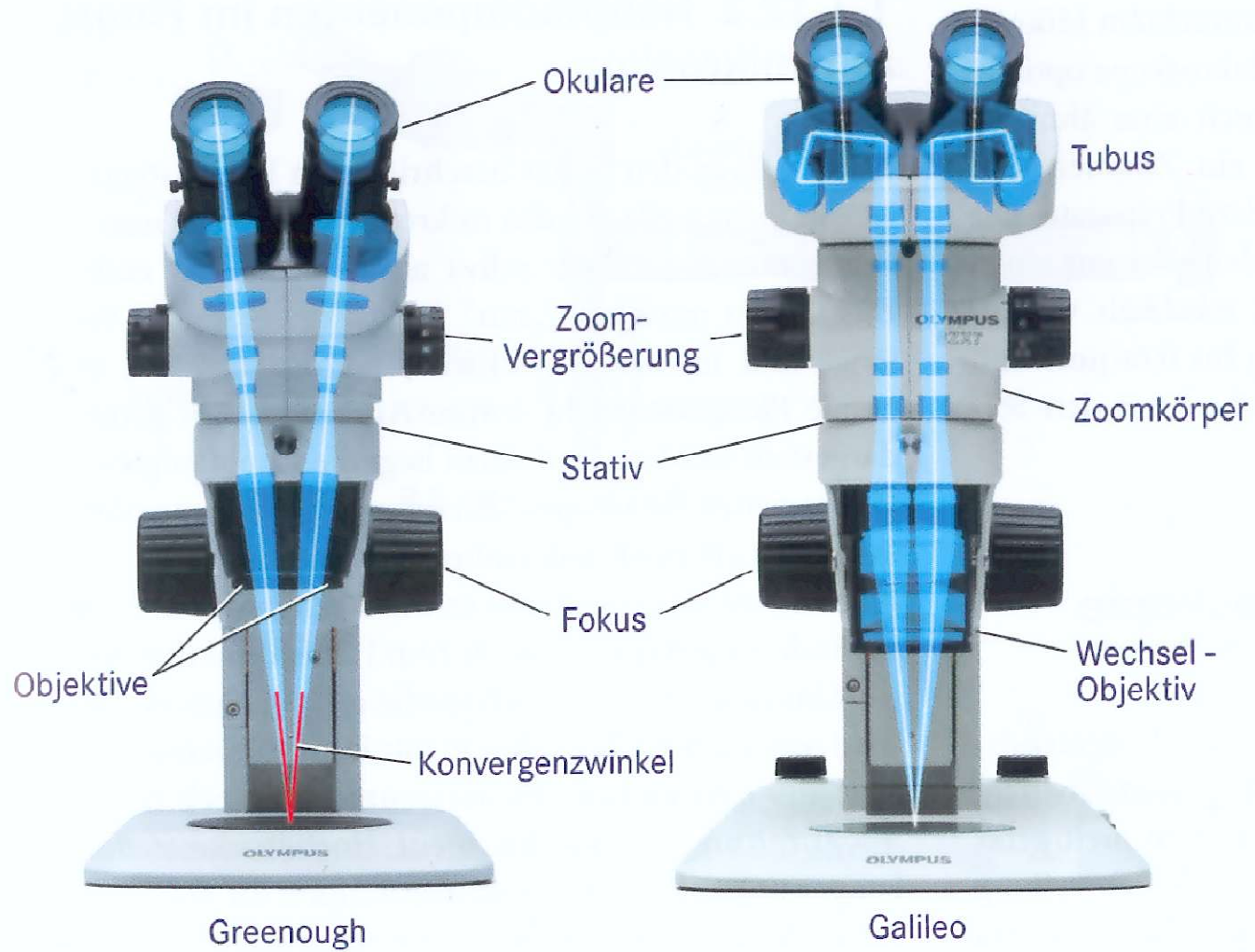


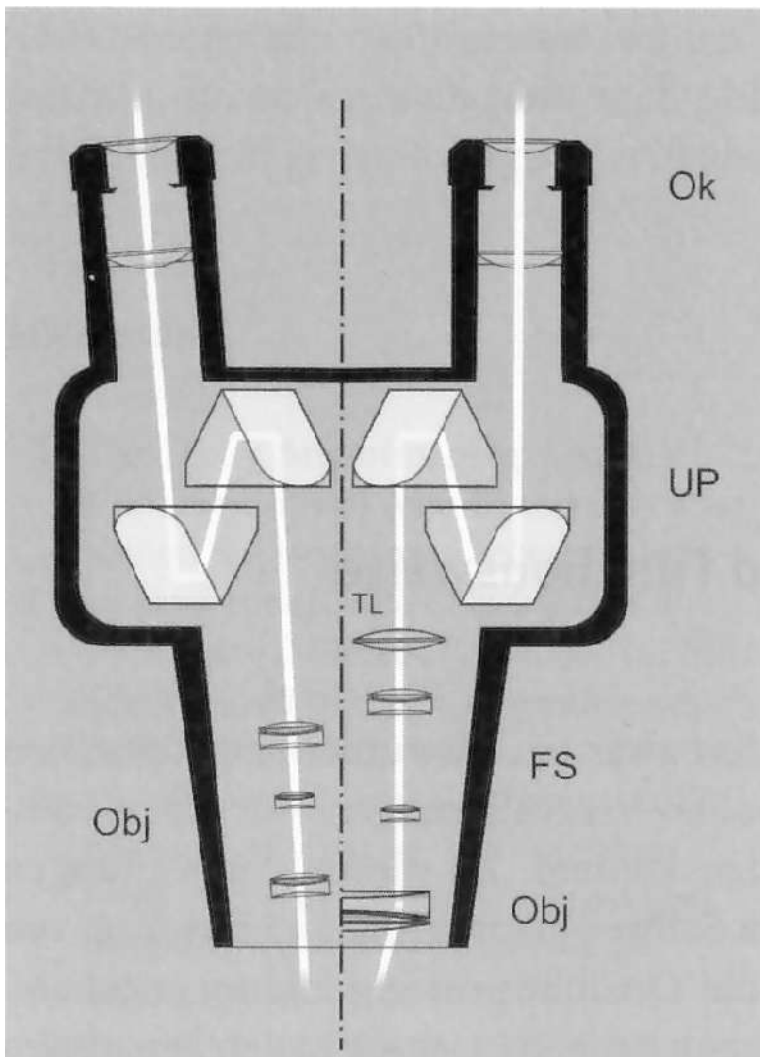
Figure 2



Aus 7. Stereomikroskop

- ⇒ bei geringen Vergrößerungsanforderungen:
 - Sichtprüfung von Leiterplatten
 - Qualitätsprüfung kleiner mechanischer Teile
 - Sektion von Versuchstieren
- ⇒ aufrechtes, seitenrichtiges Bild
- ⇒ für jedes Auge separater Strahlengang
- ⇒ Greenough-Typ (zwei je 7.5° aus der Senkrechten zueinander geneigte Strahlengänge)
- ⇒ Fernrohr-Typ (mit zwei Unendlichstrahlengängen, die ein gemeinsames Objektiv verwenden)





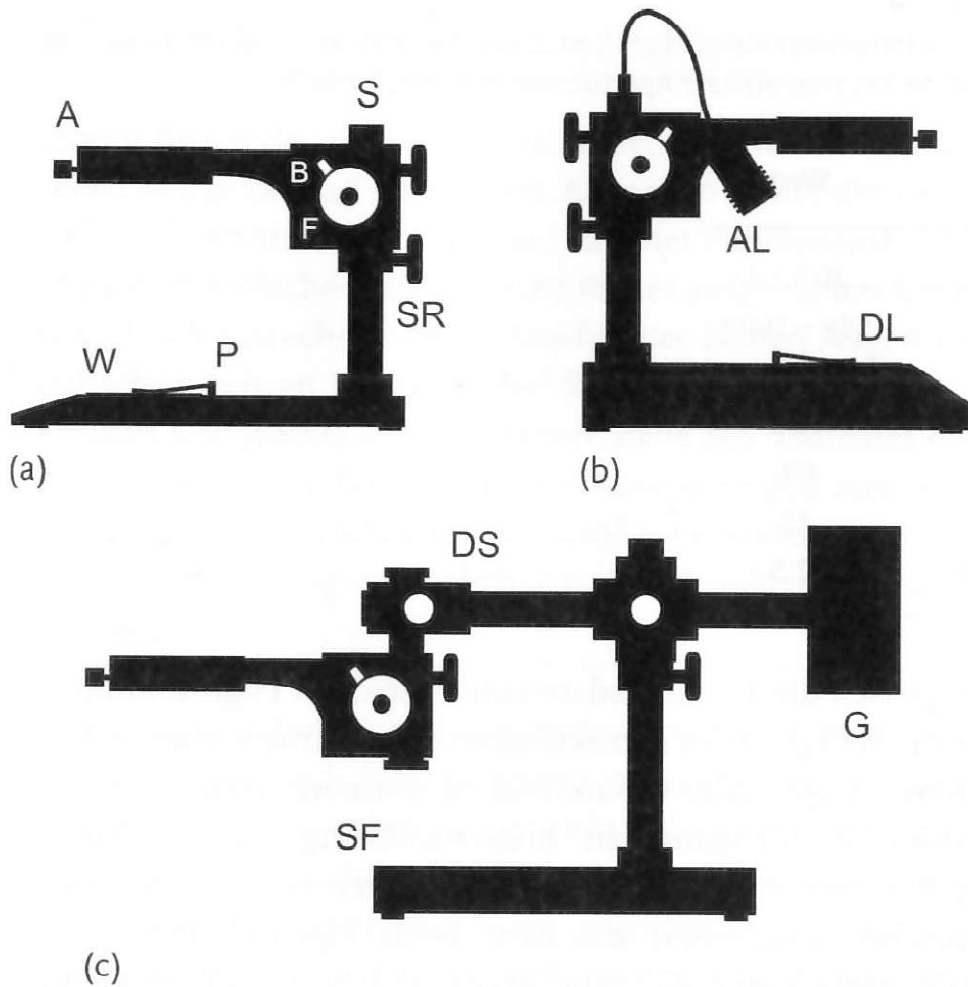
Greenough-Typ (links) und Fernrohr-Typ (rechts); Ok: Okular; UP: Umkehrprisma (für seitenrichtiges Bild); Obj: Objektiv; TL: Tubuslinse; FS: Fernrohrsystem

- ⇒ Besonderheiten:
- Objektive: typ. $0.5\times$ bis $2\times$, max. bis $5\times$
 - Stativzoom: typ. $6.3\times$ (stufenlos änderbar)
 - Okulare: typ. $10\times$



Olympus SZX10: Fernrohr-Typ (Galileo-Typ)

- ⇒ Varianten:
- Modelle typ. für Auflicht, aber auch Durchlicht
 - Stative mit Fokussierarm mit Aufnahmering für Kopf des Stereomikroskops

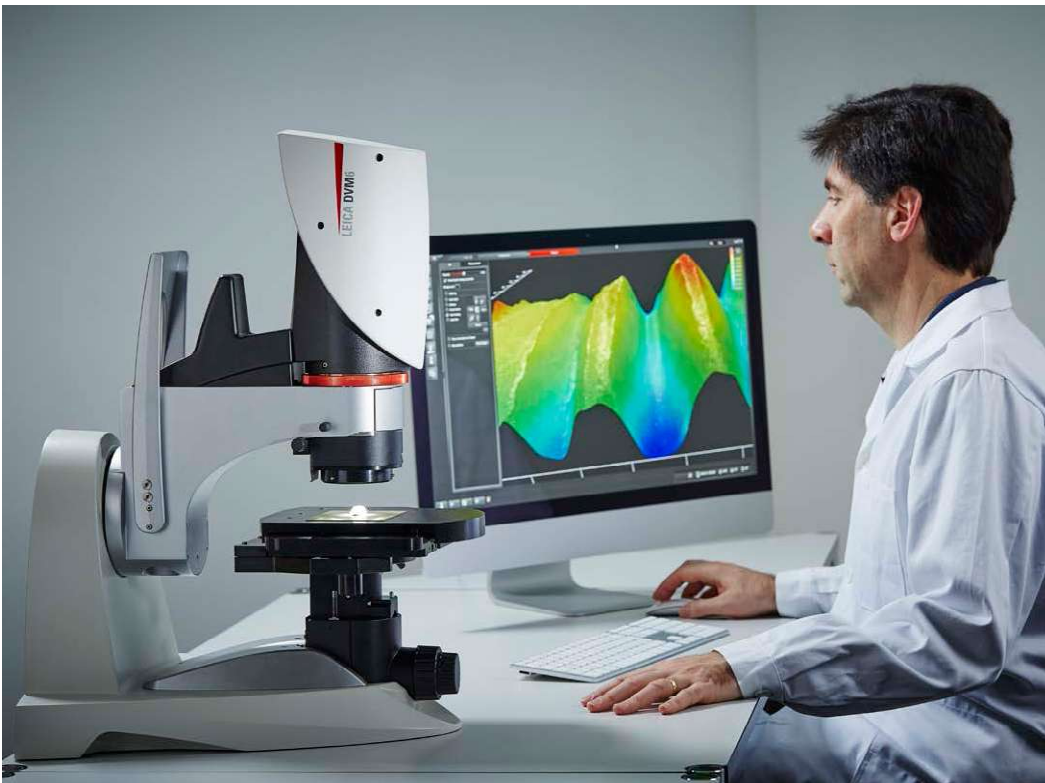


(a) Auflichtstativ; (b) Auflicht- und Durchlichtstativ; (c) Schwenkarmstativ

- ⇒ Beleuchtungstypen:
- Durchlichtbeleuchtung aus Stativfuß (Beleuchtungsbasis)
 - Auflichtbeleuchtung (mit Kaltlichtquellen)
 - Ringlicht (am Objektiv anklemmbar)
 - Punktstrahler



Aktuelle Entwicklung weg vom Stereomikroskop : Leica DVM6 – Oberflächenerfassung mittels Extended Focusing



8. Kontrastverfahren: Hellfeld

Fall 1: Durchlicht-Hellfeld
 ⇒ transparente Proben

Fall 2: Auflicht-Hellfeld
 ⇒ opake Proben

Durchlicht-Hellfeld

Lichtausbreitung im Medium: $n(\lambda) = n'(\lambda) + i n''(\lambda)$

⇒ n' : Brechung/Phaseneffekte

⇒ n'' : Absorption/exp. Intensitätsabnahme

Absorptionsgesetz

Intensität I : $I(d) = I_0 e^{-\alpha(\lambda) \cdot d}$ mit $\alpha \propto -n''$

⇒ je dicker Präparatstelle, umso mehr Licht wird absorbiert

⇒ da α von λ abhängt: Absorptionsspektrum

Weitere Einflußgrößen: Reflexion, Beugung, Streuung

Beispiel für ungefärbtes Präparat:

Kieselalge der Gattung *Pleurosigma angulatum* mit Schale aus nahezu transparentem Siliziumdioxid

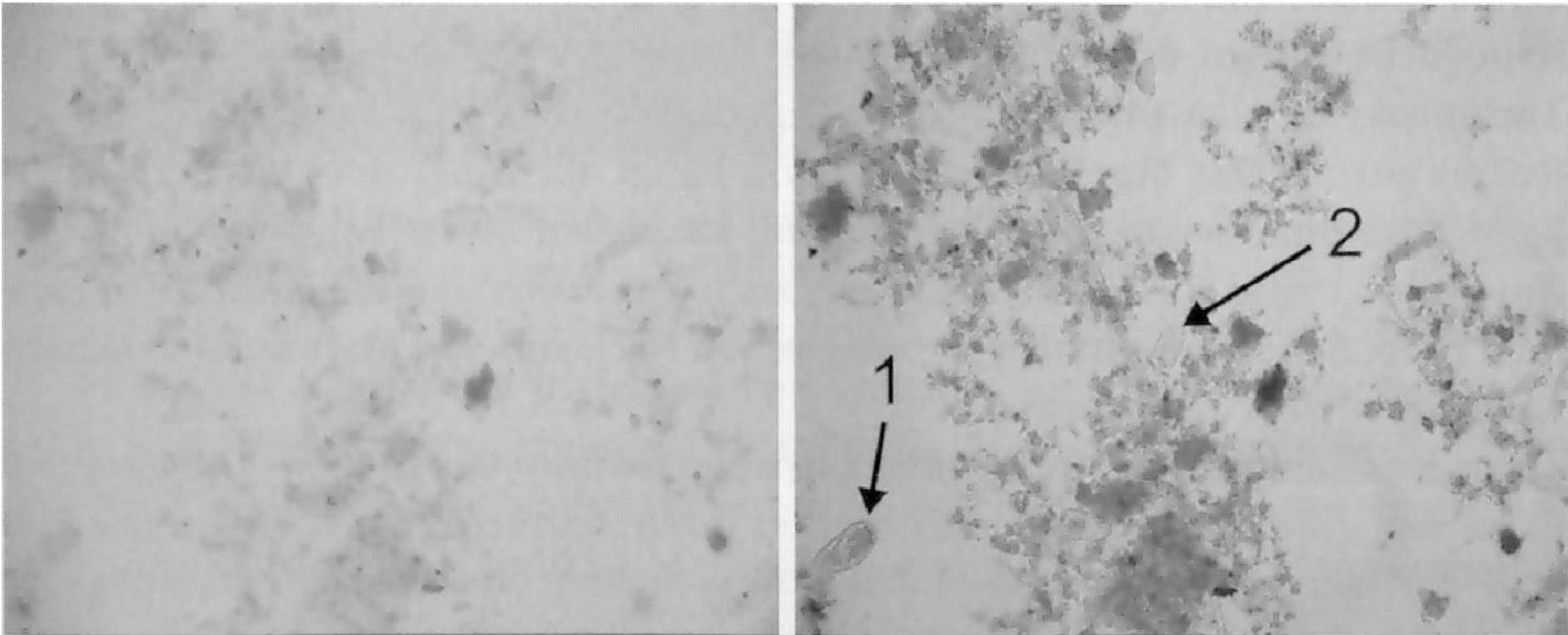
⇒ Strukturmerkmale reflektieren, brechen oder streuen Licht



Möglichkeiten der Kontrastverbesserung: Schließen der Aperturblende (Cave: Auflösungsverlust)

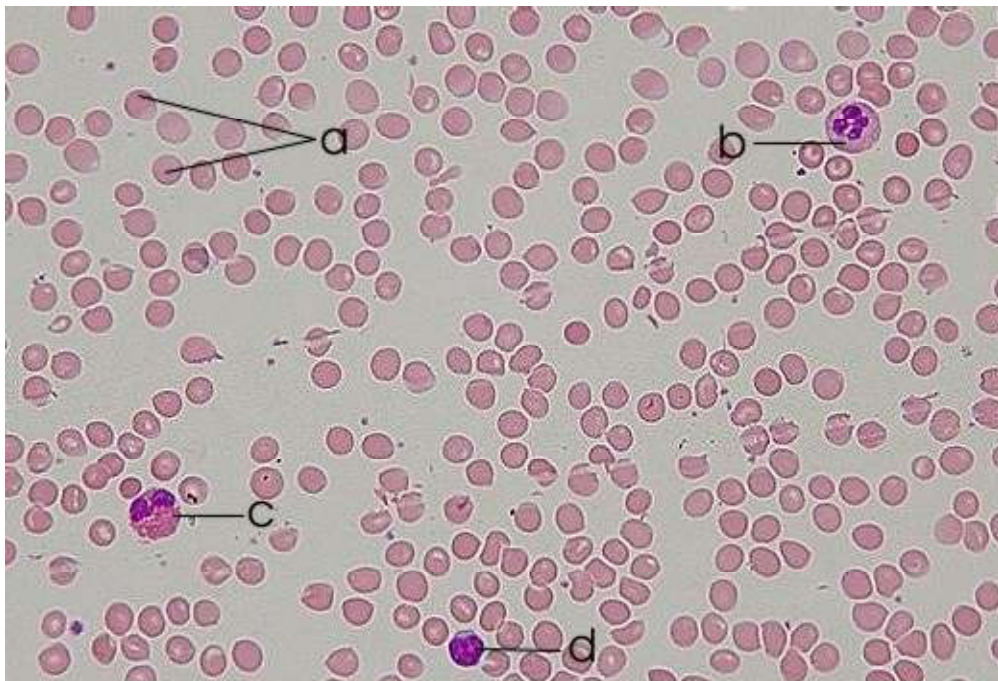
Beispiel:

Belebtschlammpräparat



1: Pantoffeltierchen; 2: Glockentierchen

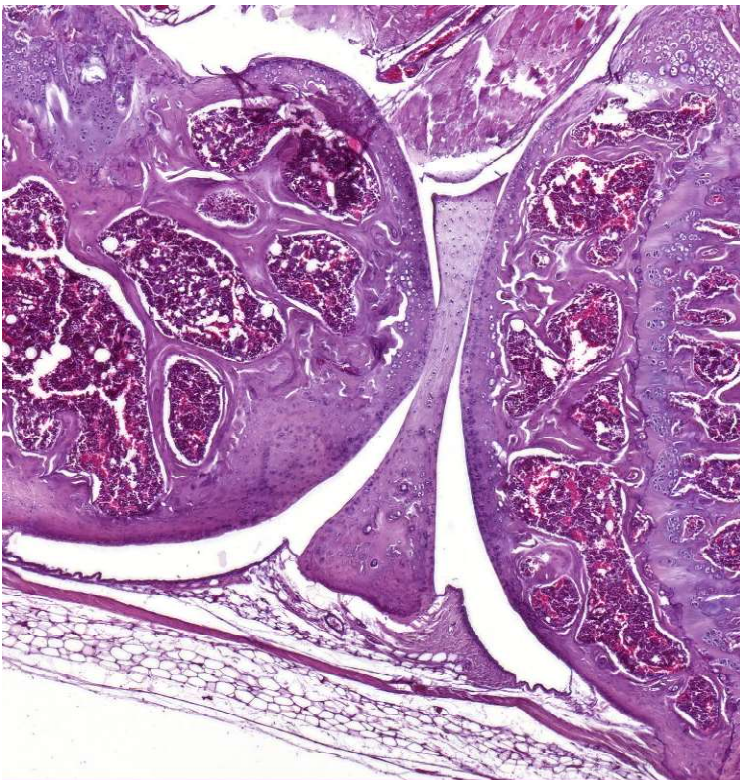
Genereller Ausweg: zytologische und histologische Färbeverfahren



Normaler menschlicher Blutaussstrich in Pappenheim-Färbung: a - Erythrozyten; b - Neutrophiler Granulozyt; c - Eosinophiler Granulozyt; d - Lymphozyt

Vielzahl von Färbemethoden (siehe spätere Vorlesung):

- chemische
- physikalische
- physiko-chemische
- immunologische



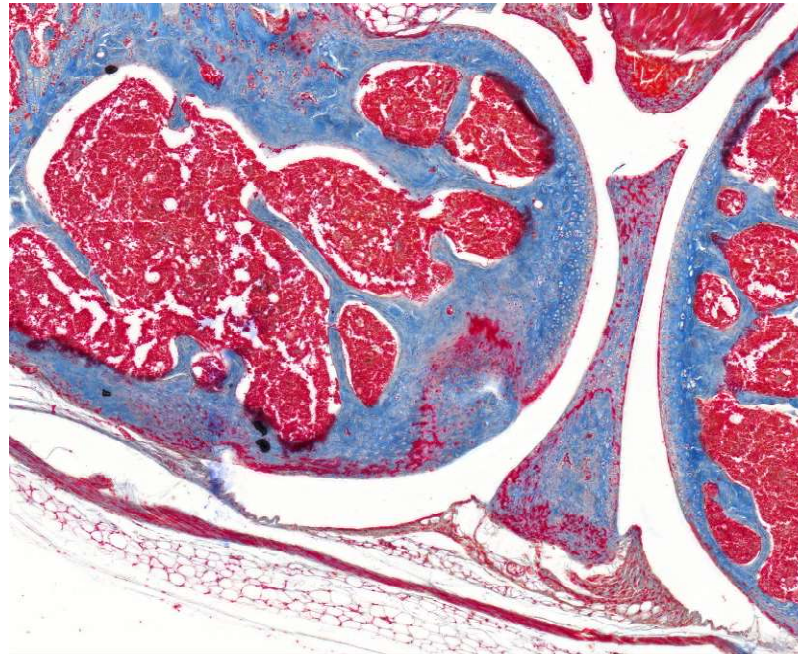
Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Auflicht-Hellfeld

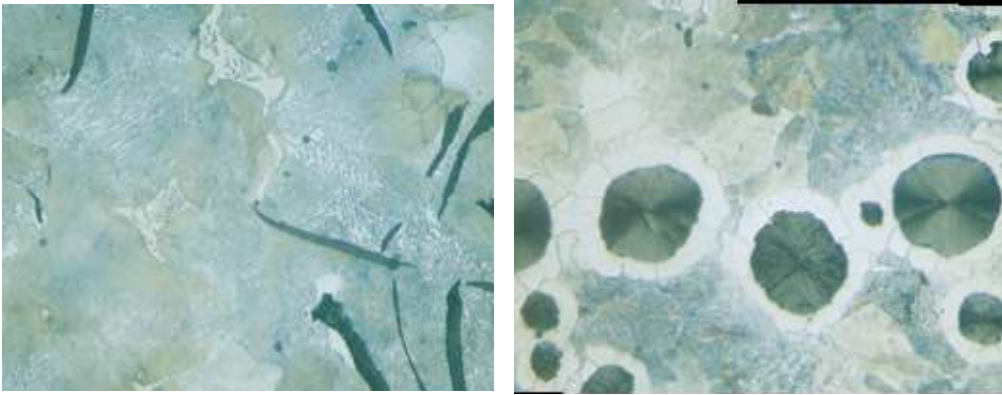
wellenlängenabhängiger Reflexionsgrad

Voraussetzungen:

- Oberfläche der Präparate geschliffen/poliert
- senkrechte Ausrichtung zur optischen Achse

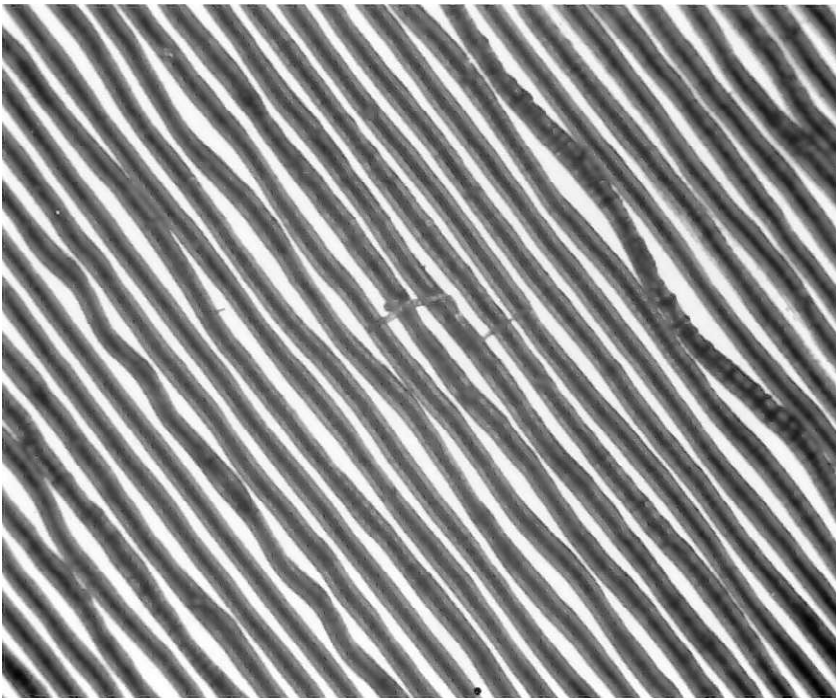


Kernechtrot-Anilinblau-Orange-(KAO)-Färbung



Graugußproben

evtl. Nutzung des Schattenwurfs:



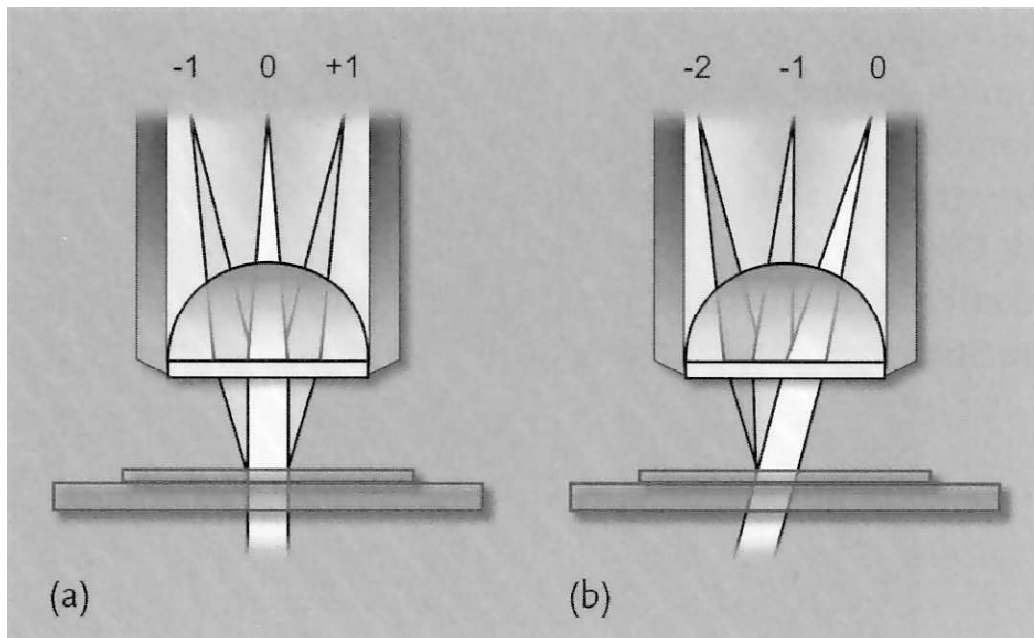
Schallplattenausschnitt mit Schmutzfaser

ebene Vinylfläche reflektiert das Licht gleichmäßig, vertiefte Rille kann im Profil “erahnt” werden

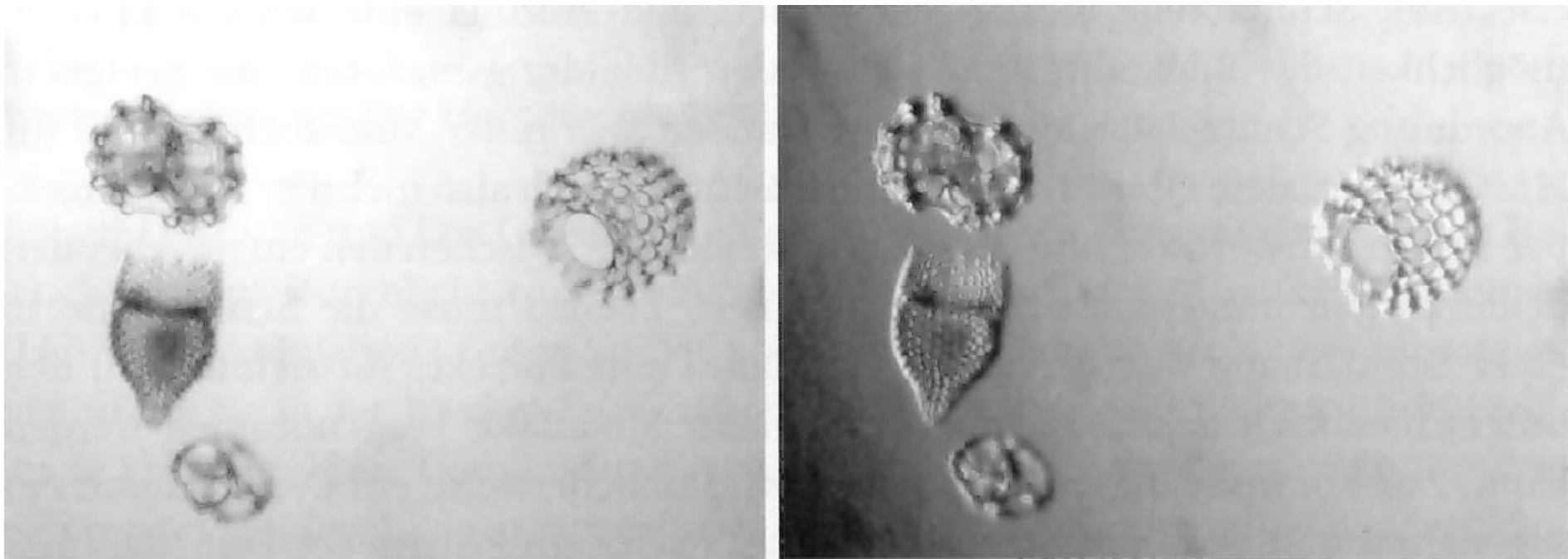
Variante der Hellfeld-Mikroskopie: Schiefe Beleuchtung

⇒ Eingriffe in die Beleuchtungsgeometrie können zu kontrastreicherer Darstellung führen

- ⇒ einfachste Weise: keine zentrierte, symmetrische Einstrahlung, sondern unter bestimmtem Winkel
 - Dezentrieren von Aperturblende oder Kondensor
 - Einbringen zusätzlicher halbkreisförmiger Blenden nahe Aperturblendenebene (Filterhalter)
- ⇒ Erzeugung von Schlagschatten durch asymmetrische Beleuchtung
 - Oberflächenstruktur wird Helligkeitsunterschiede transformiert
 - reliefartige Darstellung abhängig von der optischen Weglänge
- ⇒ Einbeziehung höherer Beugungsordnungen, Dezentrierung der nullten Ordnung
 - ⇒ höhere Auflösung in Schrägstellungsrichtung, als bei zentrierter Beleuchtung



Durch Drehen der Blende Richtungsvariation des Effektes möglich.



Aufnahme von Strahlentierchen im zentrierten und schiefen Hellfeld



Kieselalge im zentr. Hellfeld



Kieselalge in schiefer Beleuchtung

Schiefe Beleuchtung auch im Auflicht möglich:

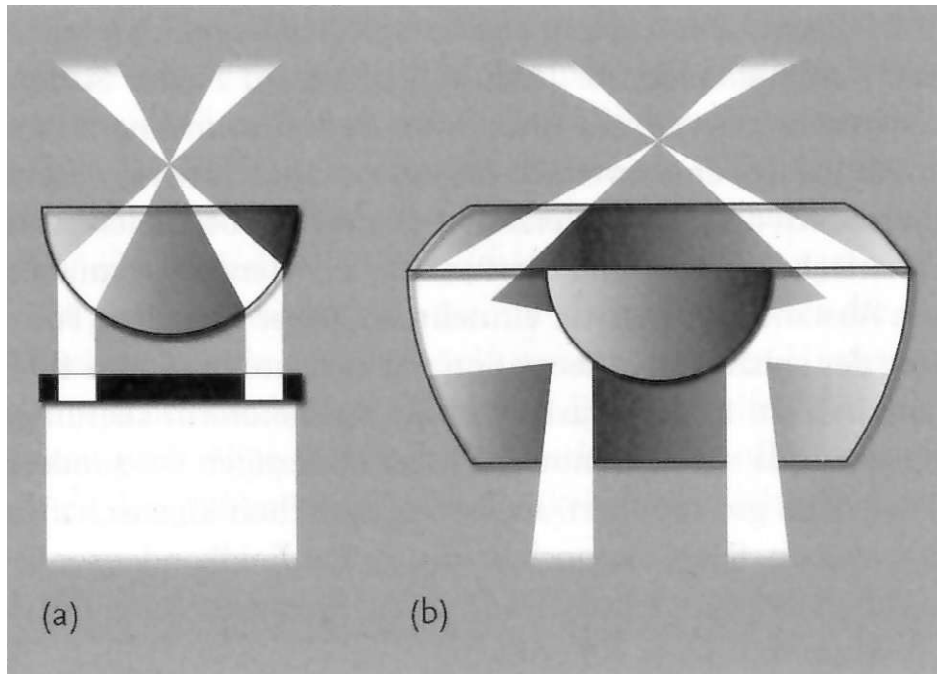


Holzoberfläche

9. Kontrastverfahren: Dunkelfeld

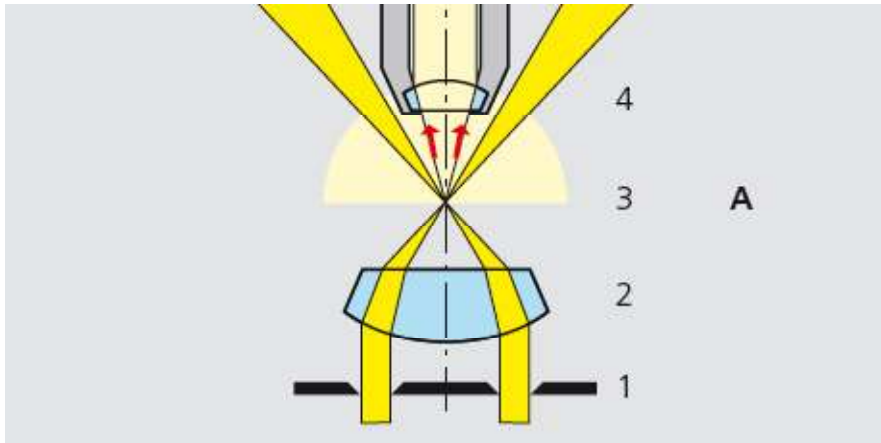
Durchlicht-Dunkelfeld

- ⇒ Erweiterung des Eingriffs in die Beleuchtungsgeometrie
- ⇒ Ausblendung der Beugungsordnung nullter Ordnung
 - ⇒ (a) Einbringen einer Ringblende (Zentralblende) in Filterhalter des Hellfeldkondensors
 - bei Objektiven geringer N.A.
 - ⇒ (b) Einsatz eines Dunkelfeldkondensors (hier: platzsparender Kardioidkondensor mit Spiegeln)



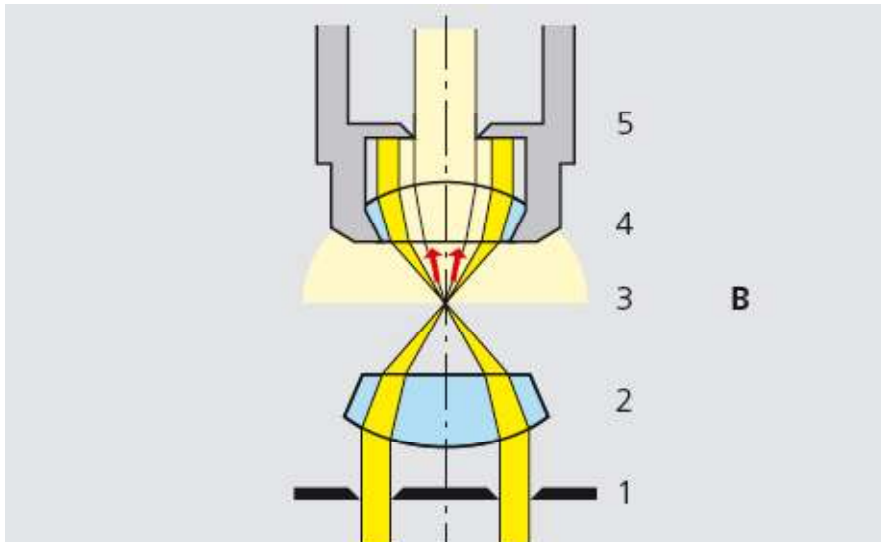
- ⇒ N.A. des Kondensors muß größer als die des Objektivs sein, typ. mindestens doppelt so groß
- ⇒ N.A. des Kondensors ist entscheidender Faktor für Bildentstehung und -qualität im Dunkelfeld
- ⇒ Bilderzeugung nur durch Beugungseffekte an Präparatstrukturen
- ⇒ Dunkelfeldbeleuchtung erzeugt "Licht-Hohlkegel"

- Kegelspitze liegt in Präparatebene
- öffnet sich wieder zum Objektiv hin
- ohne Präparat bliebe das Bild im Okular völlig dunkel
- nur Präparat beugt Licht in Richtung Objektiv

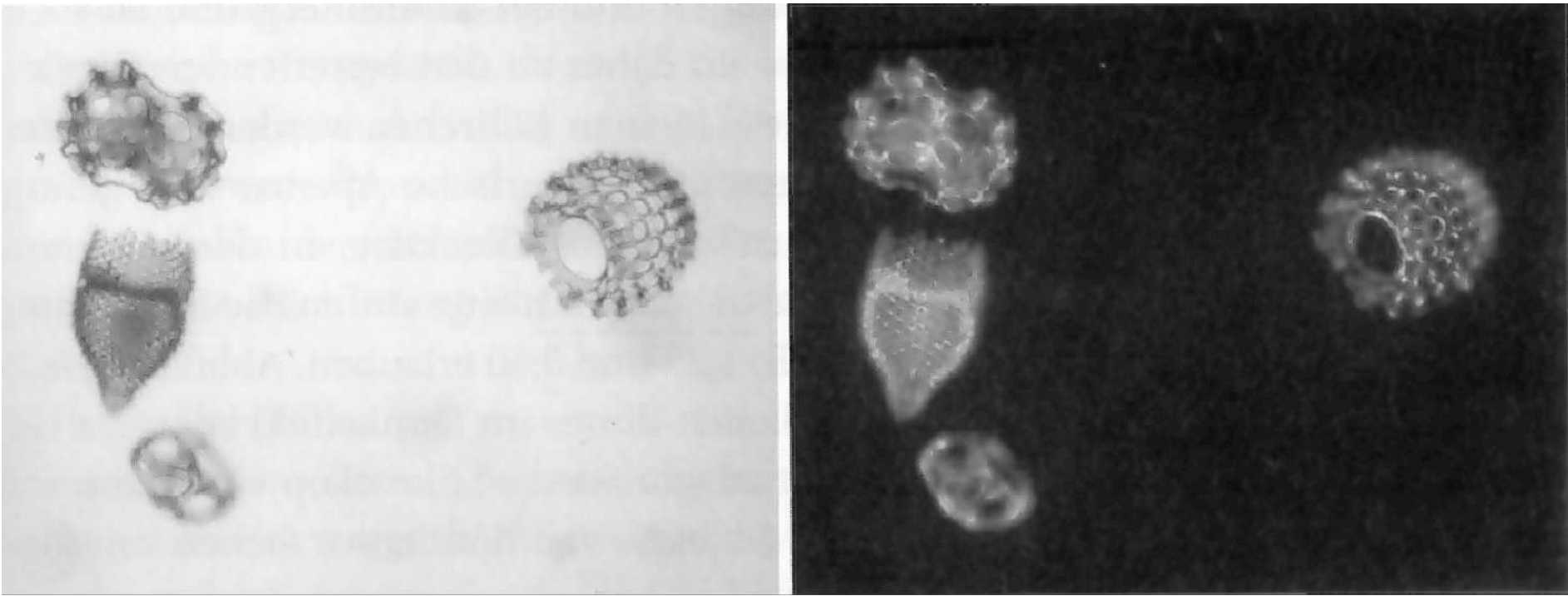


Variante mit erhöhter Kondensor-N.A.

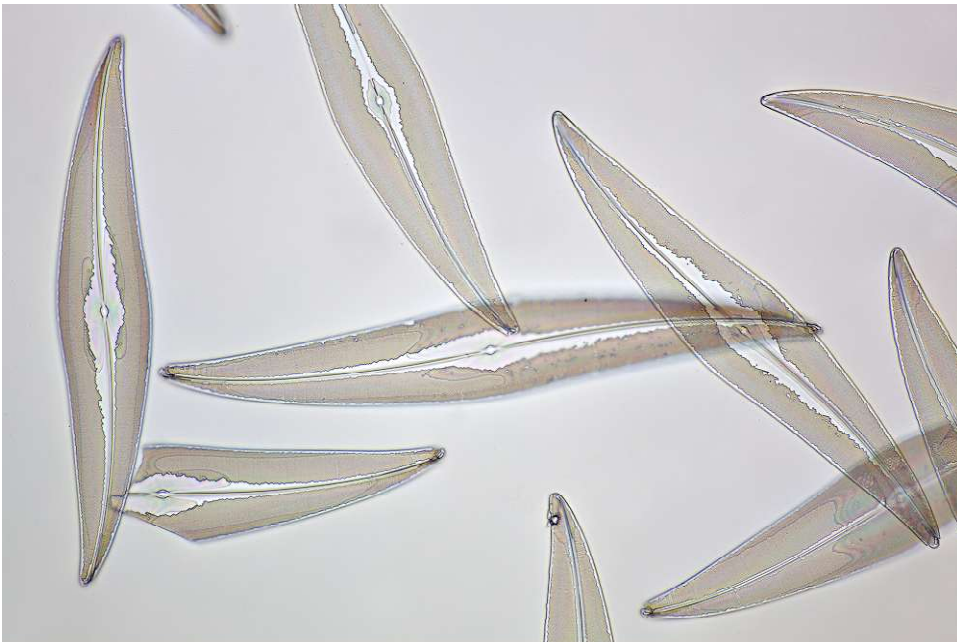
1: Ringblende; 2: Kondensoroptik; 3: Präparat; 4: Objektiv



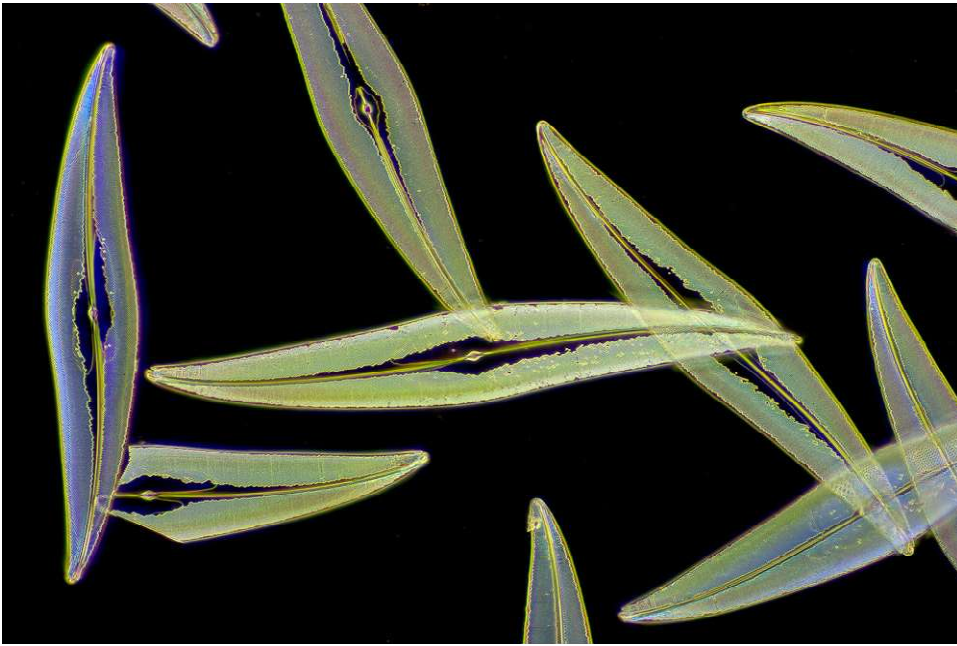
Variante mit verstellbarer Irisblende (5) im Objektiv (für hohe Objektiv-N.A.s)



Aufnahme von Strahlentierchen im Hellfeld und im Dunkelfeld



Kieselalgen im Hellfeld



Kieselalgen im Dunkelfeld

Besonderheiten im Dunkelfeld:

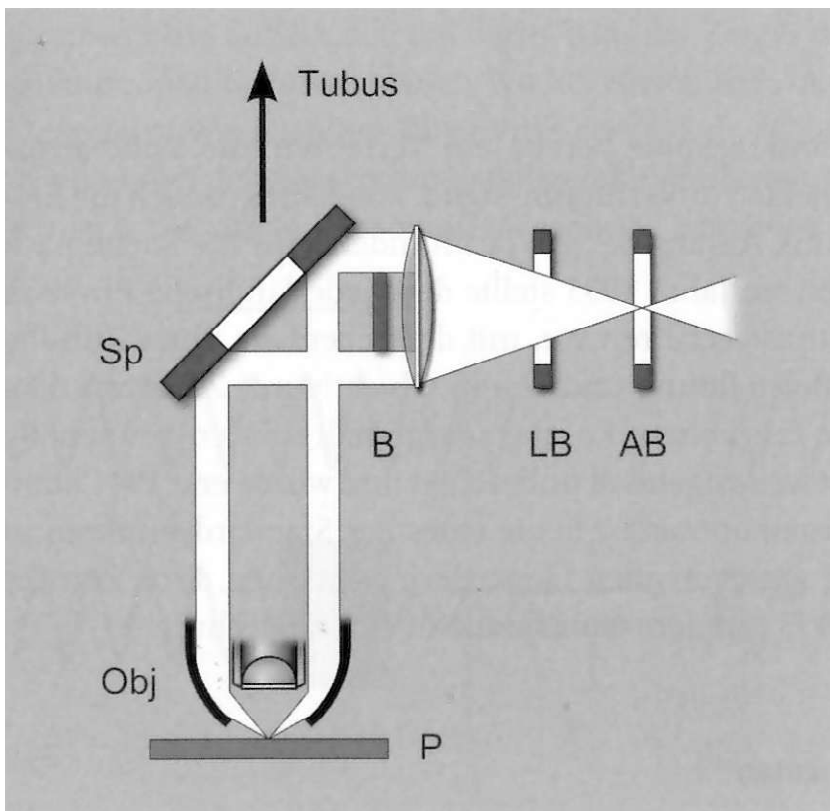
⇒ Objekte werden beobachtbar mit Abmessungen unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops

Anwendung: Beobachtung ungefärbter Präparate, z.B. Darstellung von Borreliose (aus Zeckenbissen)



Auflicht-Dunkelfeld

- ⇒ glatte Oberflächen sind im Auflicht-Hellfeld problematisch
 - Überstrahlungen im Bild
 - feinere Details werden unbeobachtbar
- ⇒ besser Kontrast kann durch Dunkelfeldbeleuchtung erzielt werden
- ⇒ technische Schwierigkeit: von Objektivseite einzustrahlen
 - mit ausreichender Intensität
 - mit ausreichender N.A.
- ⇒ Anleihe bei Auflicht-Hellfeldbeleuchtung, bei der Strahlteiler durch Umlenkspiegel ersetzt ist:



AB: Aperturblende; LB: Leuchtfeldblende; B: Dunkelfeldblende; Sp: ringförmiger Umlenkspiegel; Obj: Objektiv; P: Präparat

- ⇒ kollimiertes Licht der fällt auf Dunkelfeldblende
 - "Licht-Hohlzylinder" bleibt übrig
- ⇒ Reflexion in Objektrichtung
- ⇒ Objektiv mit Spiegelsystem
 - nur Licht mit hoher Apertur wird auf Präparat gelenkt und dort fokussiert

Besonderheiten:

- ⇒ Auflicht-Dunkelfeld-Objektive
 - haben daher einen größeren Durchmesser
 - sind i.d.R. Trockenobjektive (Immersion würde typ. Probe beeinträchtigen)
 - haben N.A. kleiner 1



Beispiele für Grauguß:



Hellfeld

Auflicht-



Auflicht-Dunkelfeld

10. Phasenkontrastmikroskopie

Hintergrund:

- 1935 von Frits Zernike
- ringförmige Beleuchtung
- Objektiv mit Zusatzeinrichtung
- 1953 Nobelpreis

Funktionsprinzip und Komponenten:

Lichtausbreitung im Medium: $n(\lambda) = n'(\lambda) + i n''(\lambda)$

$\Rightarrow n'$: Brechung/Phaseneffekte $\Rightarrow$ "Phasenobjekte"

$\Rightarrow n''$: Absorption/exp. Intensitätsabnahme $\Rightarrow$ "Amplitudenobjekte"

(a) "Amplitudenobjekte"

- Absorption

(b) "Phasenobjekte"

- absorbieren Licht kaum

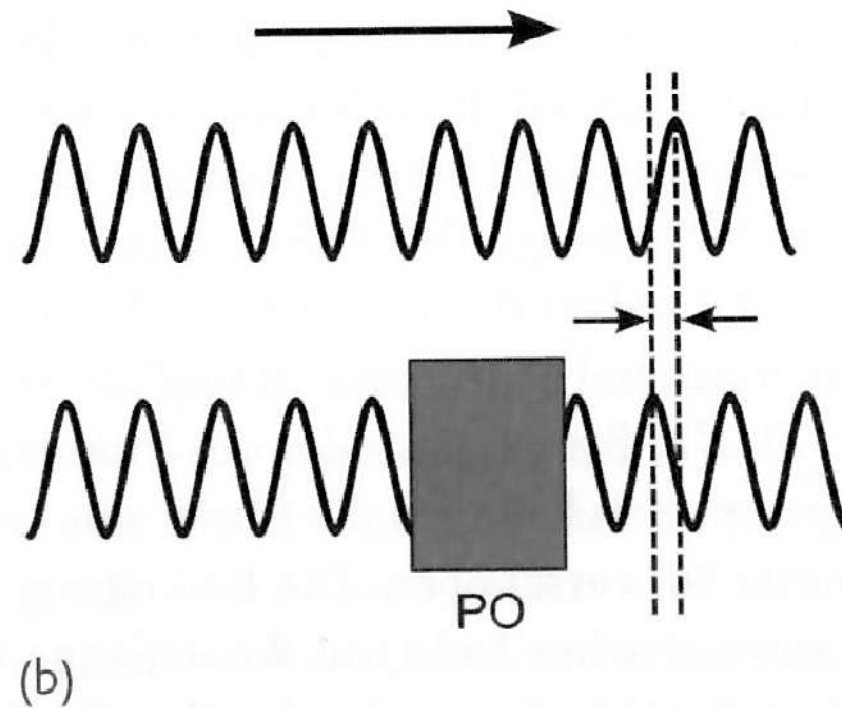
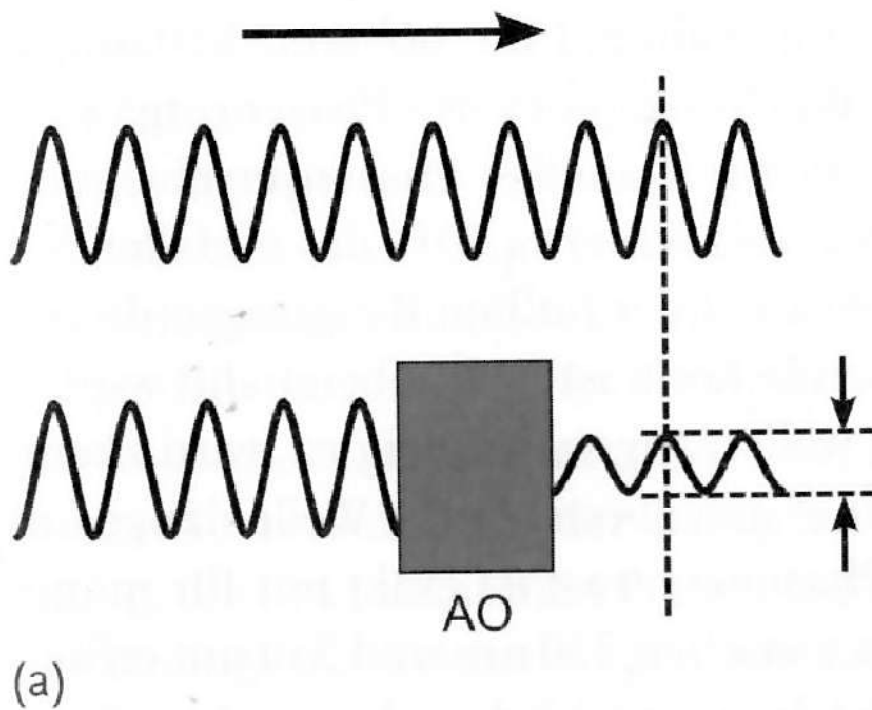
- wechselwirken mit einfallendem Licht über Brechungsindex

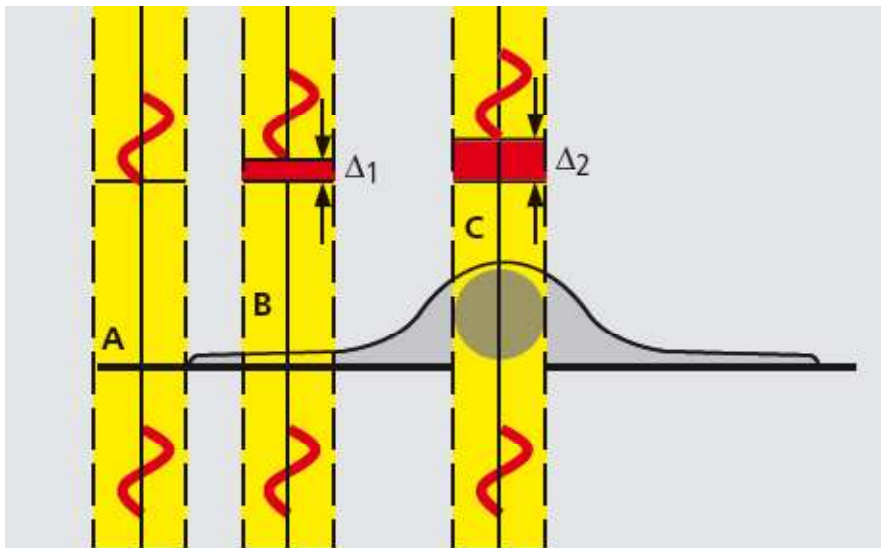
$\Rightarrow$ Verringerung der Lichtgeschwindigkeit im Medium, d.h. Verzögerung

- Amplitude verringert sich kaum

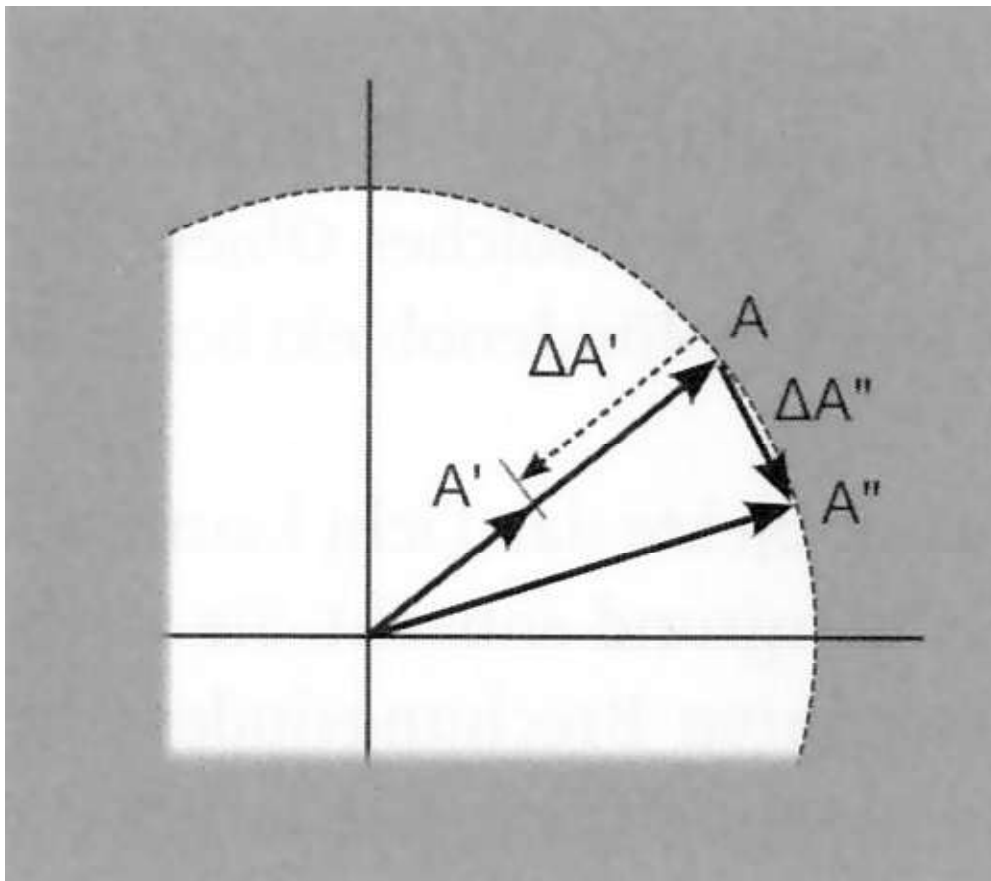
- sind schlecht beobachtbar

- Phasenverzögerung sehr gering, da Brechungsindizes von biol. Objekt und Umgebung klein





Zeigerdiagramm



zw. $\Delta A''$ und $\Delta A'$: ca. 90° Phasendifferenz

Idee:

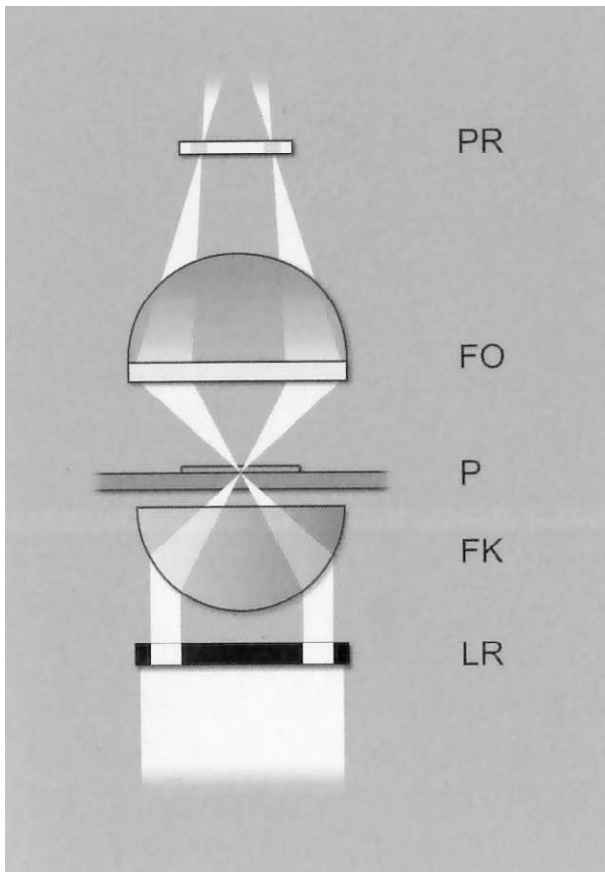
Durch Kompensation dieses Winkels sollte es möglich sein, aus einem "Phasenobjekt" ein Bild zu erzeugen, das dem eines "Amplitudenobjekts" entspricht.

Umsetzung:

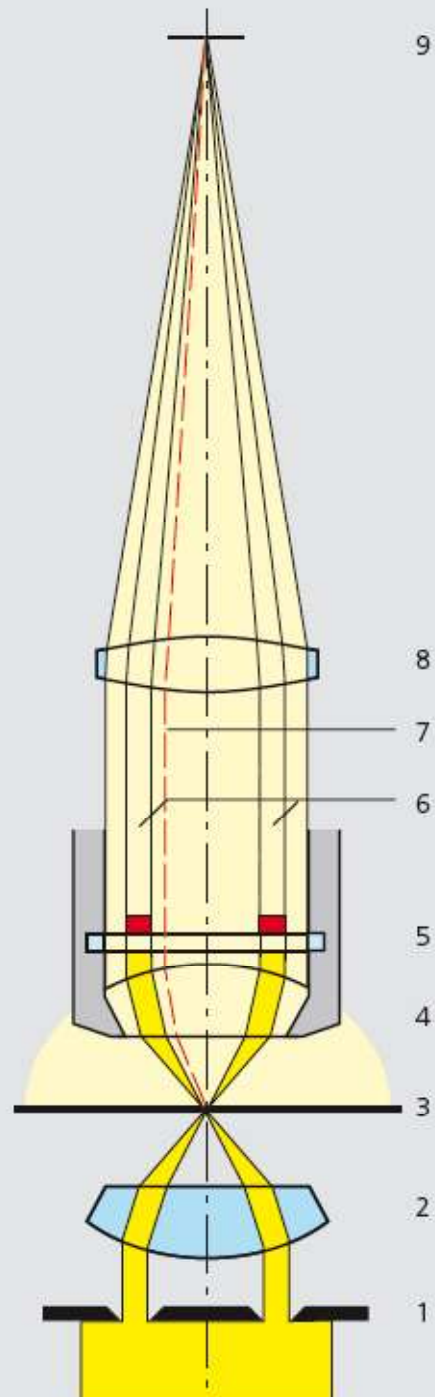
- Lichtanteile, die mit "Phasenobjekt" wechselwirken, sind in höheren Beugungsordnungen zu finden
- Nullte Beugungsordnung enthält unbeeinflusstes Hintergrundlicht
- ⇒ gebeugtes und ungebeugtes Licht lokalisierbar machen
- ⇒ zusätzliche kompensatorische Phasenverschiebung gezielt einbringen

1. Ringblende wie in Dunkelfeldmikroskopie
2. in hinterer Brennebene des Objektivs Einsatz eines "Phasenrings"
 - Licht der nullten Ordnung trifft dort auf und wird geblockt

- höhere Ordnungen gehen daran vorbei
- Dicke und Brechungsindex des "Phasenrings" für 90° Verschiebung dimensioniert
- ca. 70% des eintretenden Lichts nullter Beugungsordnung absorbiert
- streng genommen sind diese Phaseneffekte wellenlängenabhängig
 - ⇒ Bezug auf 530...550nm
 - ⇒ Grünfilter
 - ⇒ "Phasenobjekte" sowieso nahezu farblos
 - ⇒ das LEDs in diesem Bereich schwach: Phasenkontrast mit Halogenlicht

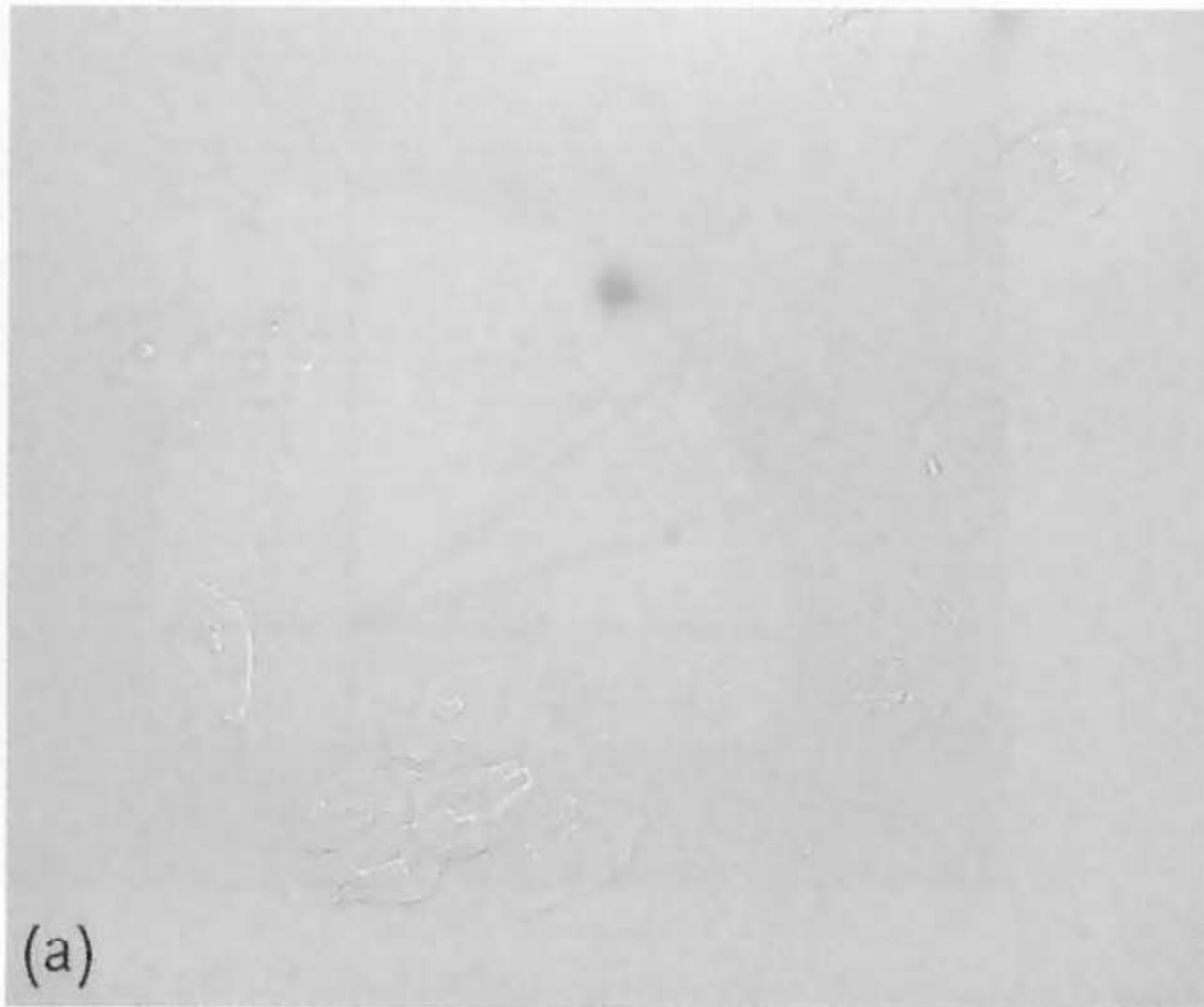


LR: Lichtring; FK: Frontlinse Kondensor; P: Präparat; FO: Frontlinse Objektiv; PR: Phasenring



1: Ringblende; 2: Kondensoroptik; 3: Präparat; 4: Objektiv; 5: Phasenring; 6: Phasenversetzter Bereich; 7: durch Präparat gebeugtes Licht; 8: Tubuslinse; 9: Zwischenbildebene

Durch die Überlagerung des gedämpften, phasenmäßig verschobenen Lichts mit dem gebeugten Licht entsteht ein Gesamtbild.



a) Hellfeld, b) Phasenkontrast



Bei positivem Phasenkontrast sind Objekte umso dunkler, je höher die Brechzahl ist.

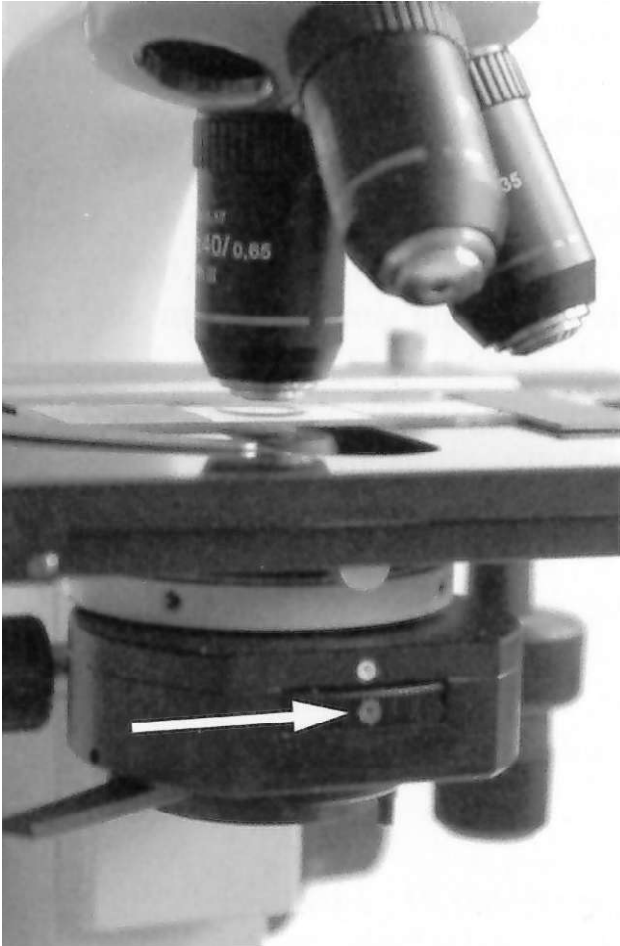
Es gibt auch negativen Phasenkontrast, bei dem der Phasenring eine Verschiebung von 180° erzeugt, so daß Objekte hell auf dunklem Hintergrund erscheinen.

Probleme von Phasenkontrast: Lichthöfe (Halos), besonders bei dickeren Proben

Ausrüstung:

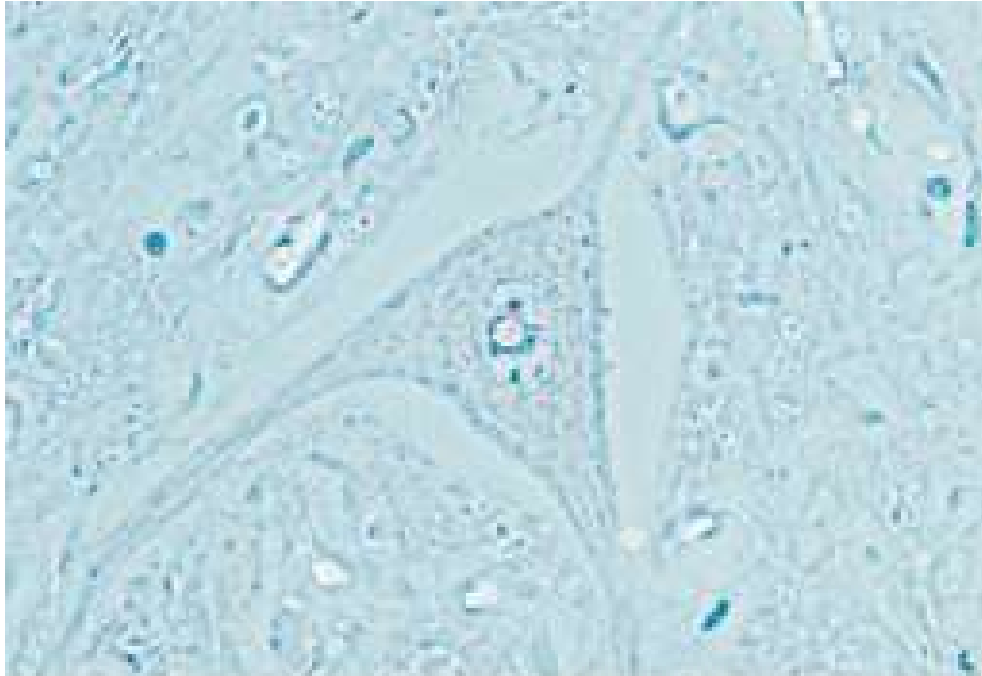
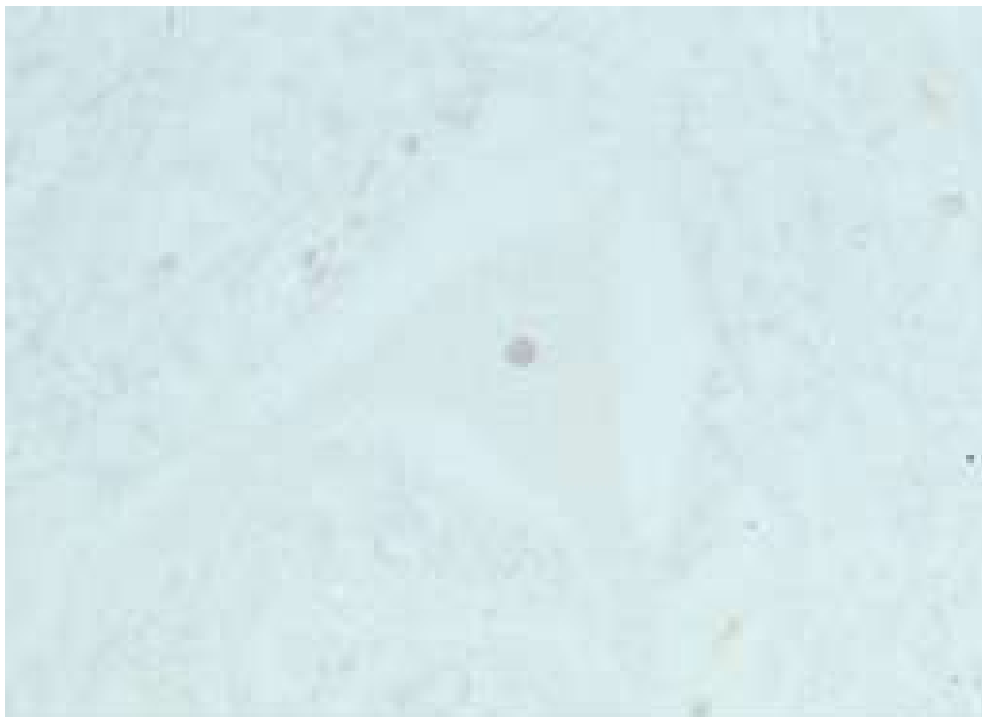


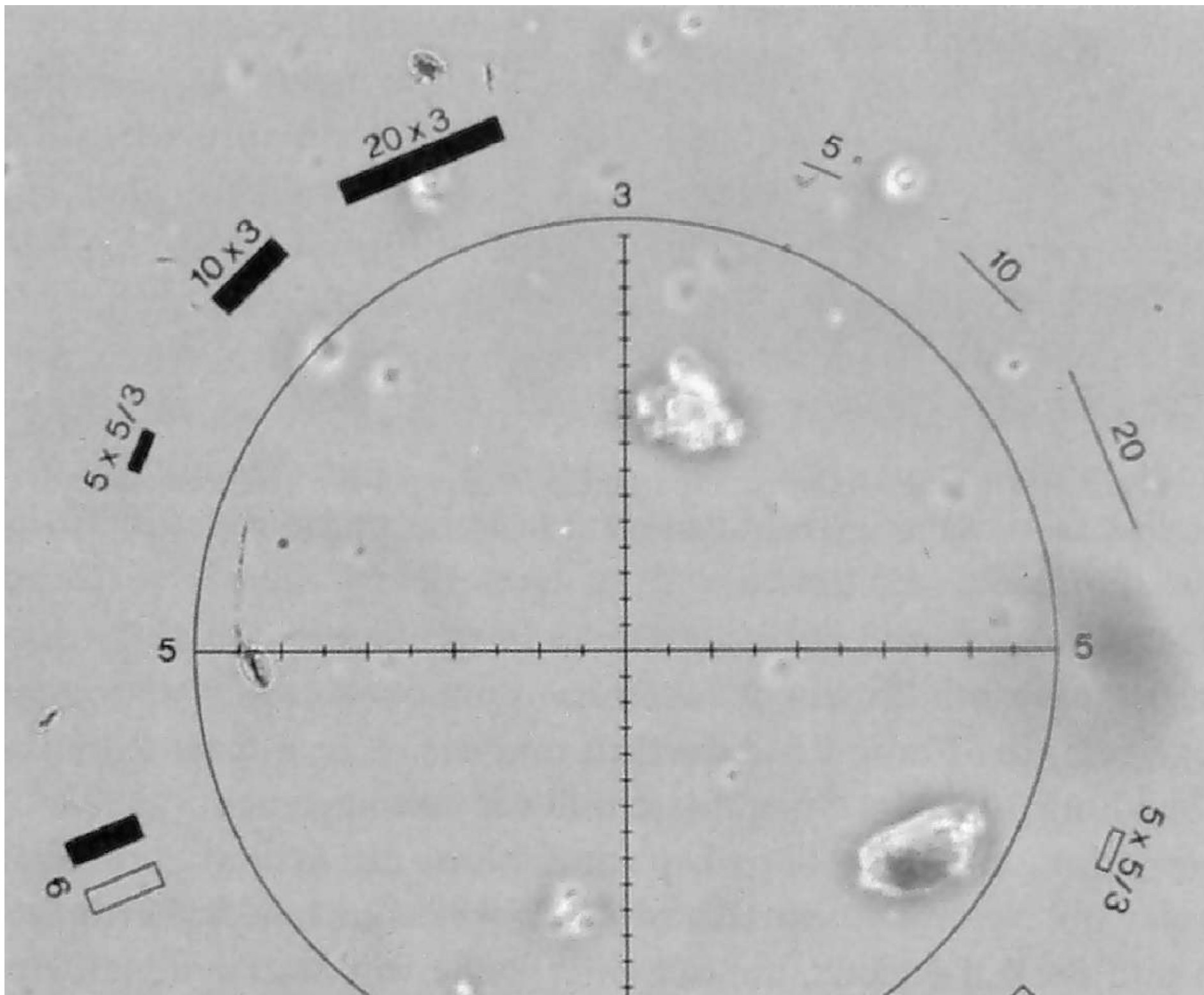
je nach Objektiv Ph1, Ph2 oder Ph3 benötigt man Ringblende 1, 2 oder 3 im Kondensor



Kondensor mit Blendenrevolver zur objektivabh. Auswahl

Weiteres Beispiele:





Zähllokular mit Strichplatte zur Analyse von Asbeststaubfasern



Belebtschlammpräparat, Durchlicht Dunkelfeld und Phasenkontrast



Kieselalge

Phasenkontrast im Auflicht möglich, aber unüblich

11. Polarisationsmikroskopie

Hintergrund:

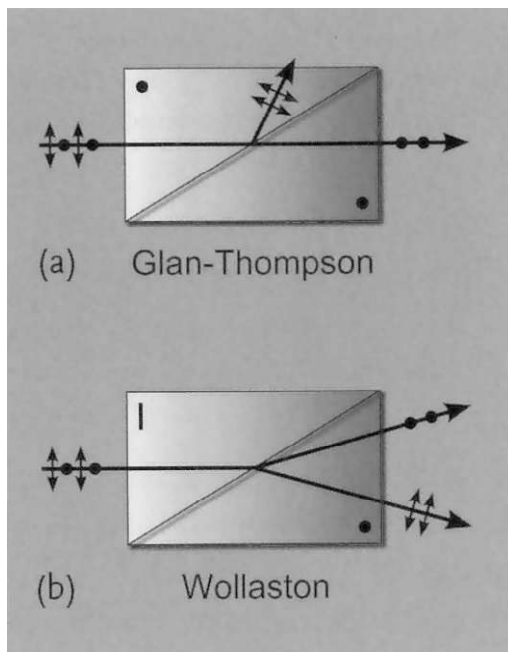
- Hellfeld: Absorption
- Dunkelfeld: Beugung an Strukturen
- Phasenkontrast: Verzögerung durch Brechzahldifferenzen
- in anisotropen (senkrecht zueinander, d.h. doppelbrechenden) Materialien:
 - ⇒ Kontraste durch unterschiedliche, richtungsabh. optische Eigenschaften
 - ⇒ Kristalle, Stärke, Polymere, Mineralien

Doppelbrechung: Brechungsindex hängt von der Schwingungsrichtung des einfallenden Lichts ab

Funktionsprinzip und Komponenten:

es braucht zweimal Lichtpolarisation, vor Kondensor (Polarisator) und hinter Objektiv (Analysator)

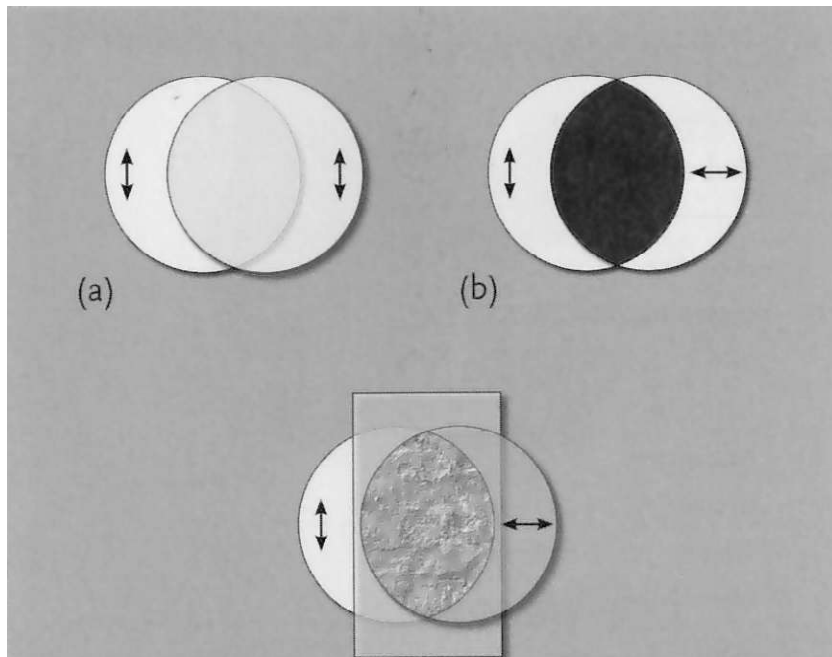
1. Variante: Filterfolien mit gerichteten nadelförmigen Farbstoffmolekülen
2. Variante: Polarisationsprismen



natürliche Doppelbrechung in Kalzit, Quarz oder Magnesiumfluorid

Punkte: senkrecht zur Blattebene polarisiert, Pfeile: in Blattebene polarisiert; im Kristall die Lage der optischen Achsen

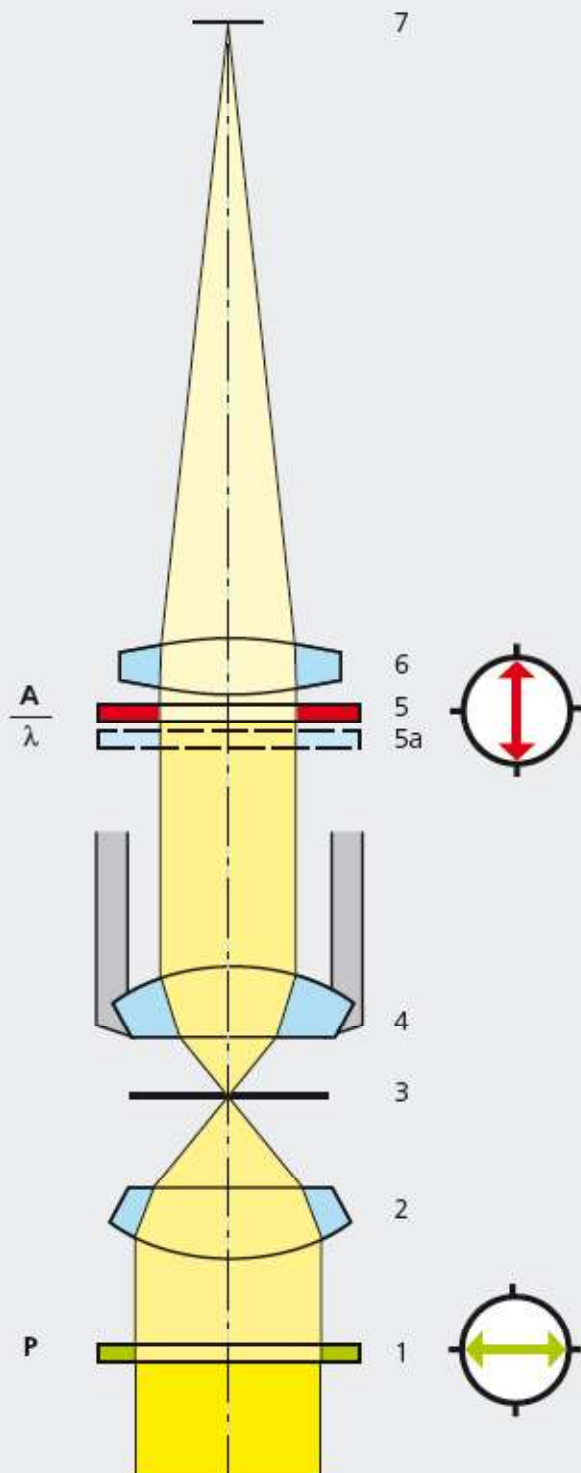
Prismen sind hinsichtlich des spektralen Transmissionsbereichs, des Durchlaß- und Löschungsvermögens besser.



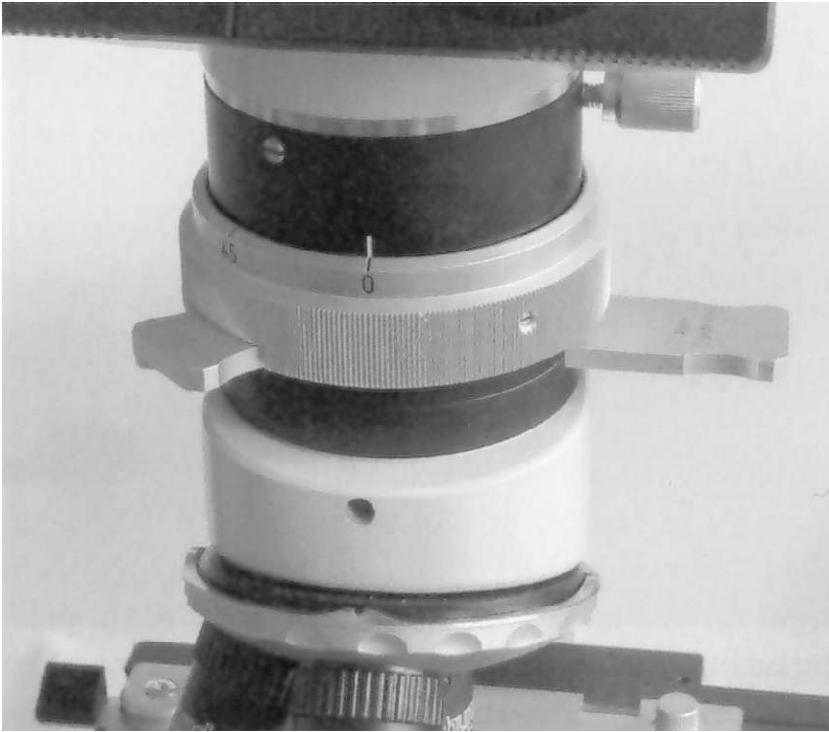
Wirkungsweise zweier Polarisatoren:

a: geöffnet; b: gekreuzt; c: mit doppelbrechendem Präparat

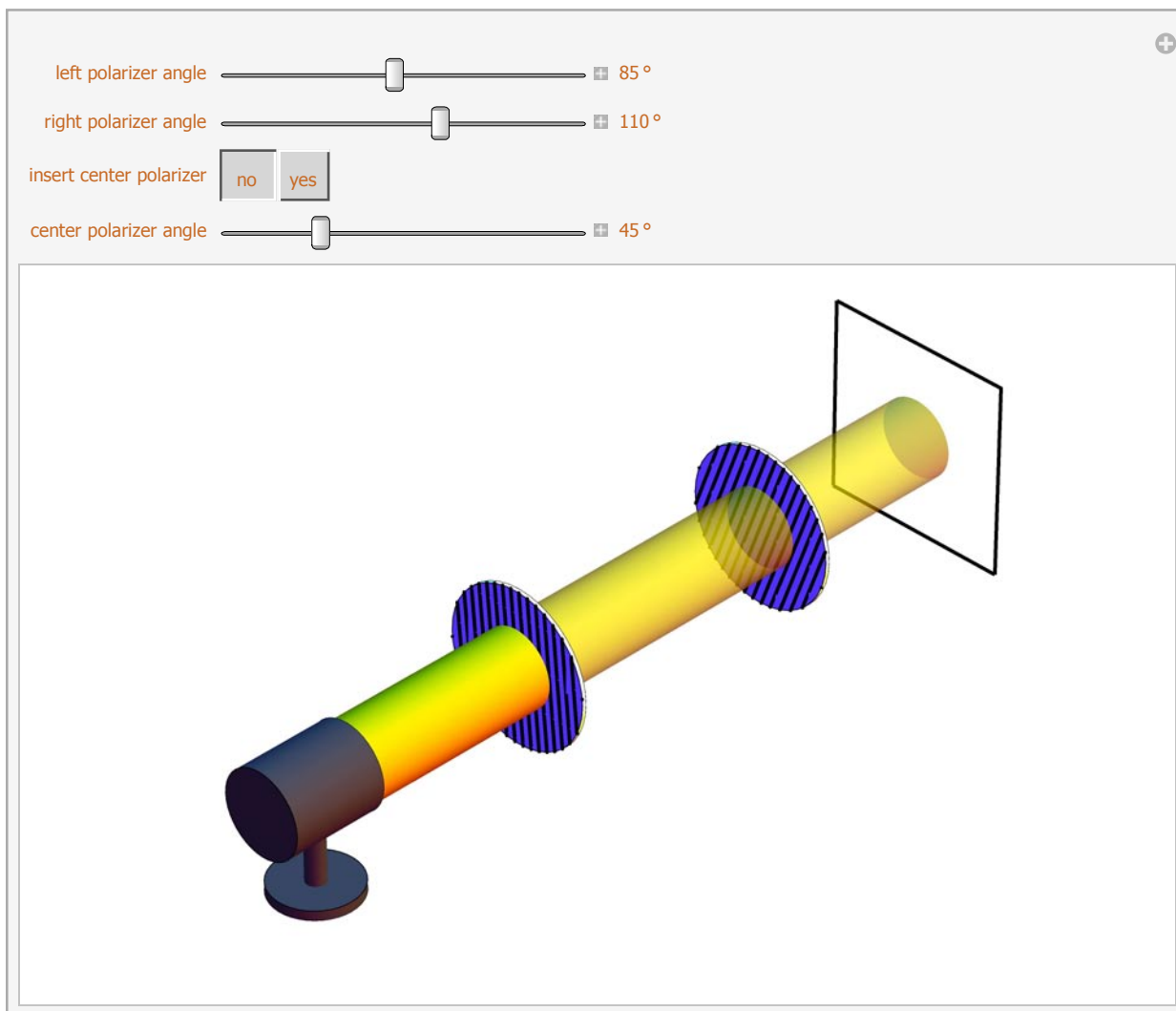
Ausgangszustand: liegt kein Präparat auf, ist das Bild völlig dunkel.



1: Polarisator; 2: Kondensor; 3: Präparat; 4: Objektiv; 5: Analysator; 6: Tubuslinse; 7: Zwischenbild; 5a Lambdaplatte (Kompensator oder Hilfsobjekt zur Einbringung bestimmter Phasenverschiebungen)



links drehbarer Analysator, rechts Lambdaplatte

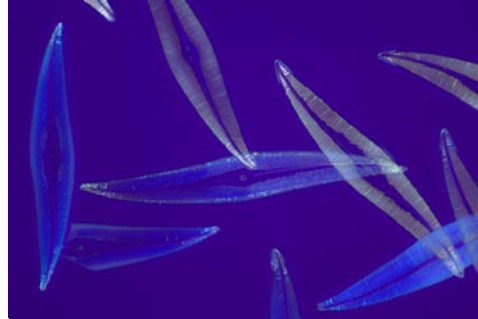
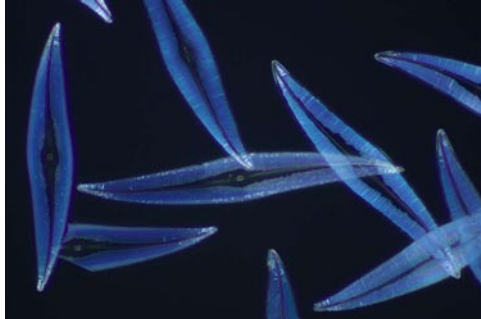


Beispiele:

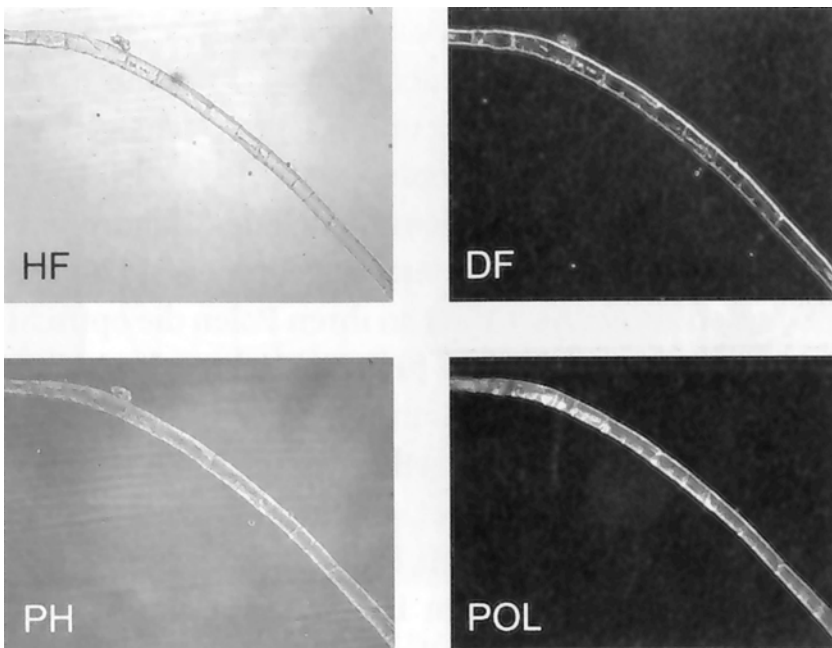


Polymerfaser im Hellfeld und im Polarisationskontrast (ohne und mit Lambdaplatte)

Aus der Interferenzfarbe lässt sich über Tafeln ein Gangunterschied (Phasendifferenz) abschätzen, der wiederum zur Materialidentifikation herangezogen werden kann.

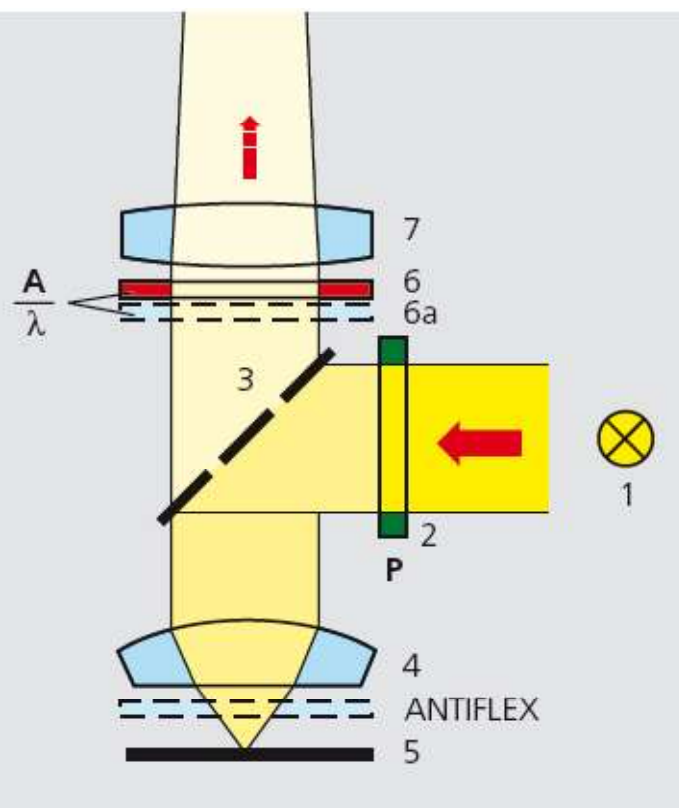


Kieselalge im Hellfeld und im Polarisationskontrast (ohne und mit Lambdaplatte)



Flachsfaser (Grauwertdarstellung)

Polarisationskontrast im Auflicht möglich:





Sphärolitenstruktur der Gußprobe im Auflicht



im Pol-Auflicht Strukturen besser erkennbar

12. Differentieller Interferenzkontrast

Hintergrund:

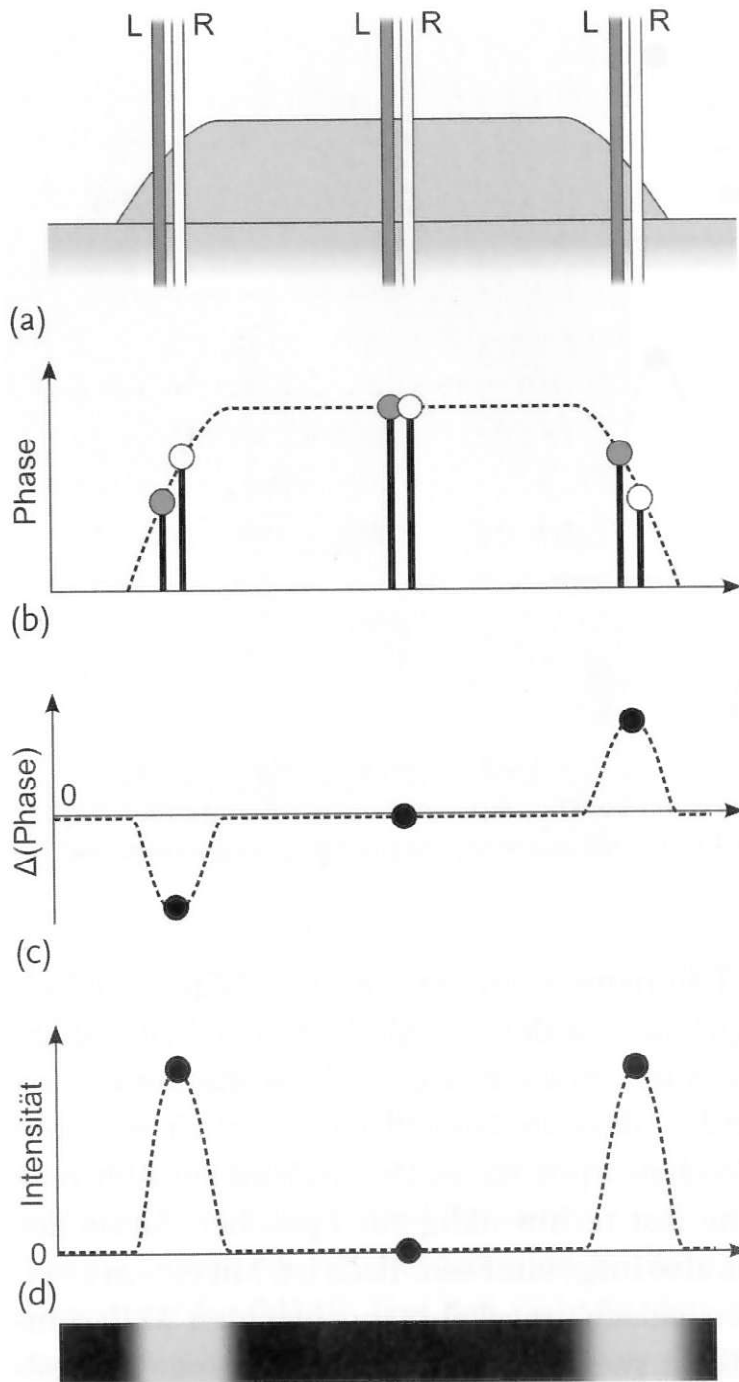
- Phasenkontrast bleibt auf dünne Präparate beschränkt

Funktionsprinzip und Komponenten:

- baut auf Polarisationskontrast auf
- Kontraste aus vorhandenen Gradienten im optischen Weg durch das Präparat
⇒ Quasirelief aus Intensitäts- und Farbgradienten
- jede Lichtwelle im Bereich des Präparats in zwei eng benachbarte parallele Teilwellen aufgespalten

- nicht weit genug, daß Doppelbilder entstünden, d.h. in Größenordnung der lateralen Auflösung
- im Präparat vorhandene Gradienten führen zu Gangunterschieden zwischen den Teilwellen
- Gangunterschiede spiegeln optische Wegunterschiede innerhalb des Präparats wider
- Teilwellen werden danach wieder zur Interferenz gebracht
 - ⇒ an jedem Bildpunkt entsteht ein den Gangunterschied ausdrückender Helligkeitswert
 - ⇒ differentieller Interferenzkontrast (DIC)

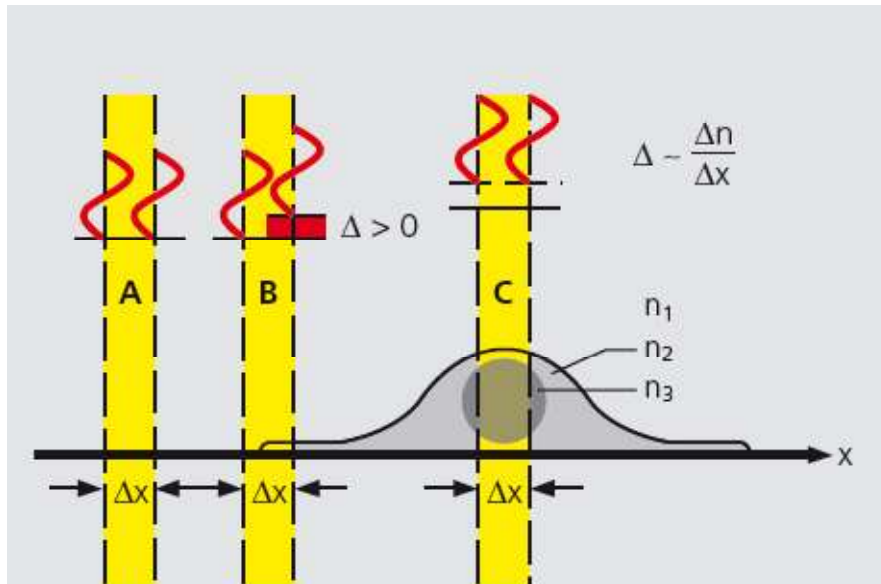
Beispiel eines transparenten Flüssigkeitstropfens auf Objektträger mit aufgespaltenen Lichtwellenpaaren an drei Positionen (a):



(b): absolute Phasen der Lichtwellen für die Lichtwellenpaare aus (a)

(c): zugehörige Phasendifferenzen (Phase Welle L minus Phase Welle R)

(d): resultierende Intensität



Gangunterschiedsdifferenzen sind entscheidend

Lichtaufspaltung und Zusammenführung durch Prismen (Nomarski-Prismen: modifizierte Wollaston-Prismen):



1: Polarisator; 2: doppelbrechendes Prisma; 3: Kondensor; 4: Präparat; 5: Objektiv; 6: doppelbrechendes Prisma; 7: Analysator; 8: Tubuslinse; 9: Zwischenbild; 7a: Lambdaplatte

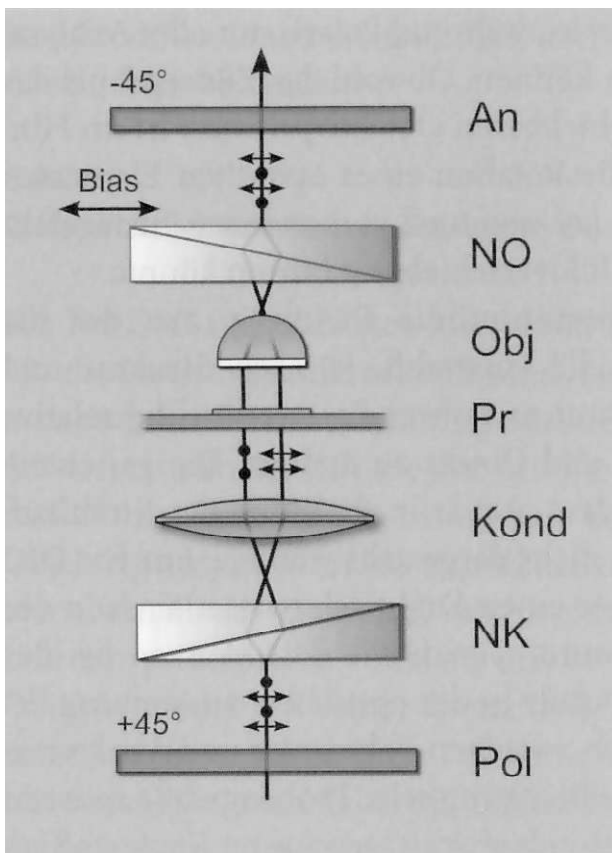
Das untere Prisma (2) spaltet linear polarisiertes Licht in zwei senkrecht zueinander stehende Schwingungsrichtungen und versetzt die Teilstrahlen seitlich mit Δx zueinander.

Das obere Prisma (6) hebt die Aufspaltung wieder auf.

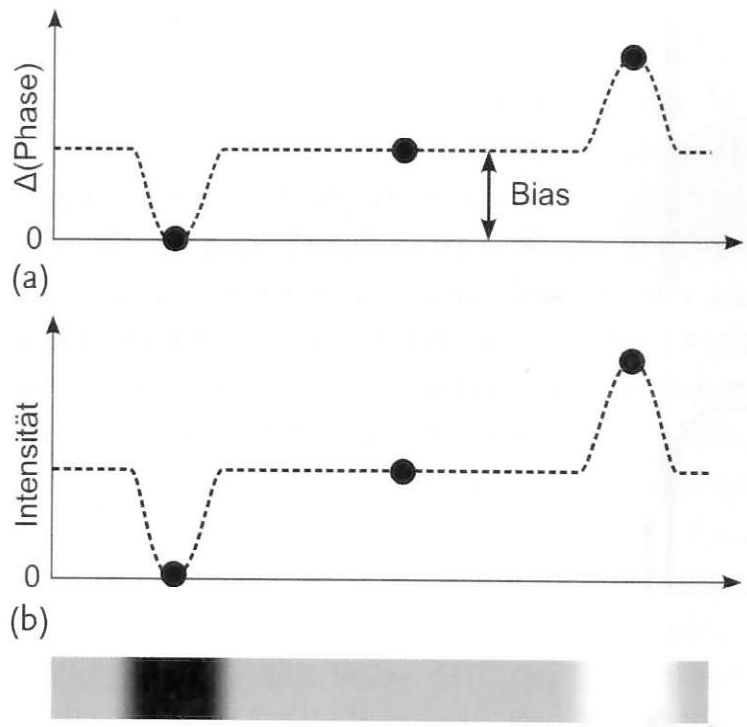
Der Analysator (7) selektiert diejenigen Komponenten aus den phasenverschobenen Wellenzügen, die in seiner Schwingungsebene liegen.

In dieser gemeinsamen Schwingungsebene erst kommt es zur Interferenz, so daß Gangunterschiede in Intensitätsunterschiede umgesetzt werden.

Nochmal in einem anderen Schema:

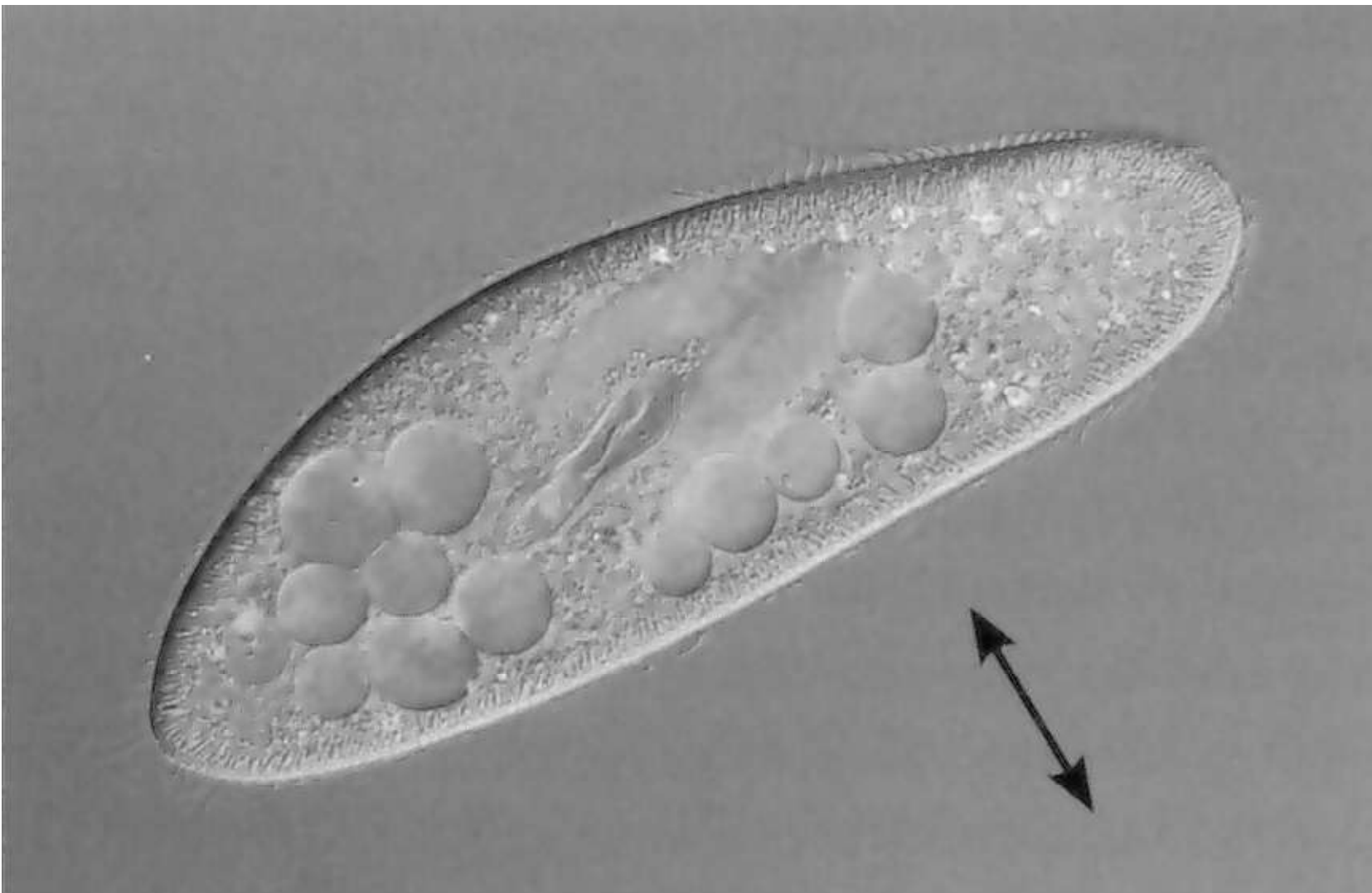


Pol: Polarisator; NK: Nomarski-Kondensorprisma; Kond: Kondensor; Pr: Präparat; Obj: Objektiv; NO: Nomarski-Objektivprisma; An: Analysator; Bias: gerichtete seitliche Verschieblichkeit des NO → **zusätzlicher** Gangunterschied zwischen Teilstrahlen, bei großem Bias Interferenzfarben.

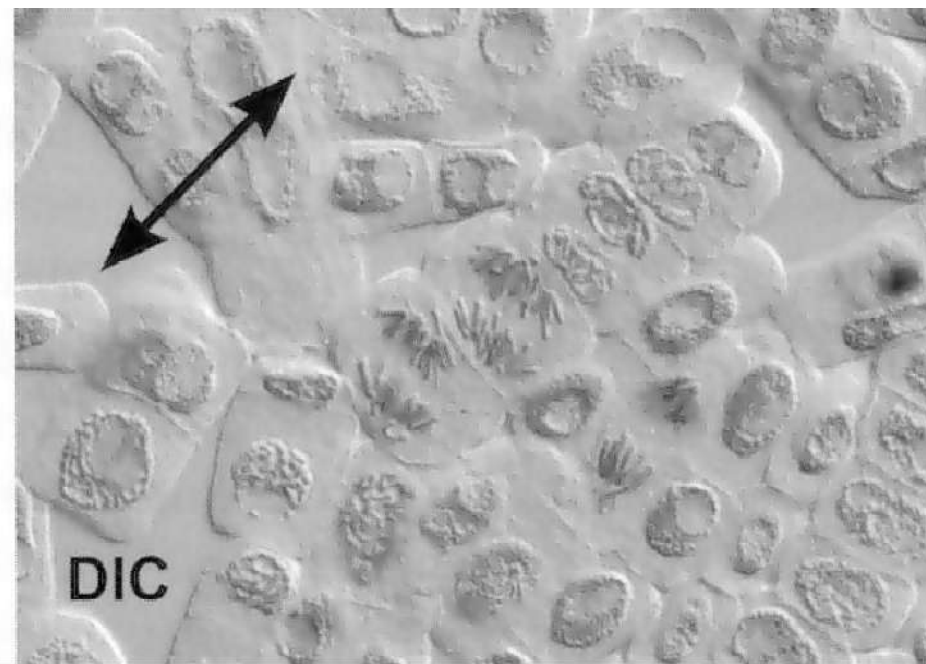
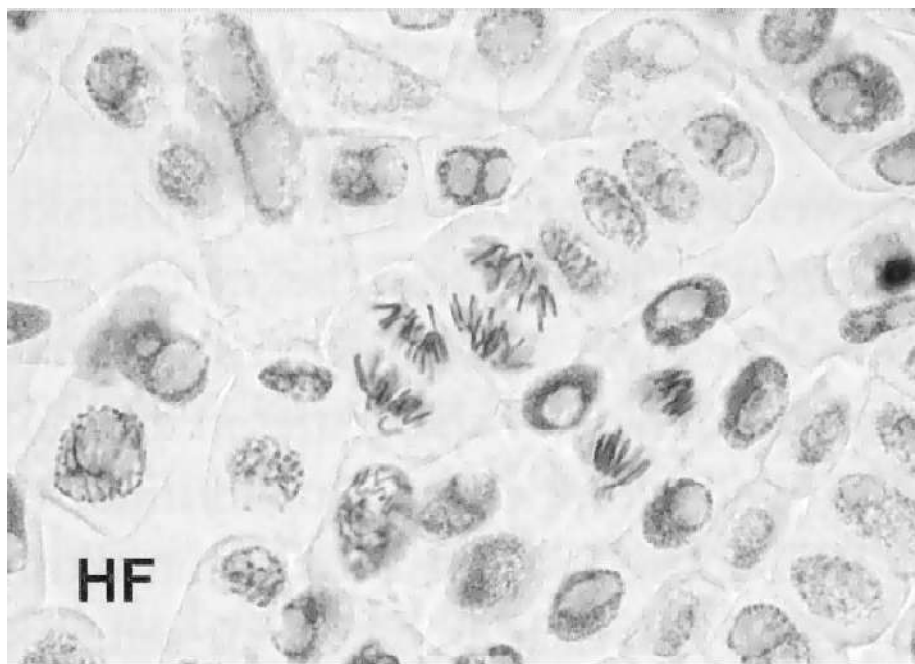


Durch den Bias werden die Kanten der im Objekt vorhandenen Phasenobjekte so dargestellt, als ob eine in Richtung der Strahlaufspaltung gerichtete Beleuchtung ein Oberflächenrelief dieser Objekte erzeugt.

Beispiele:

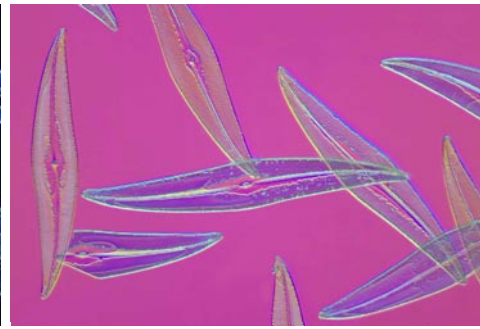
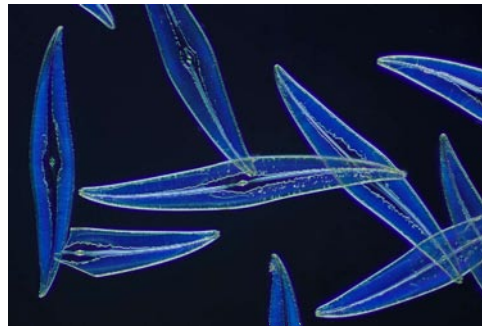


Pantoffeltierchen im Durchlicht-DIC; der Doppelpfeil weist die Richtung der Strahlaufspaltung



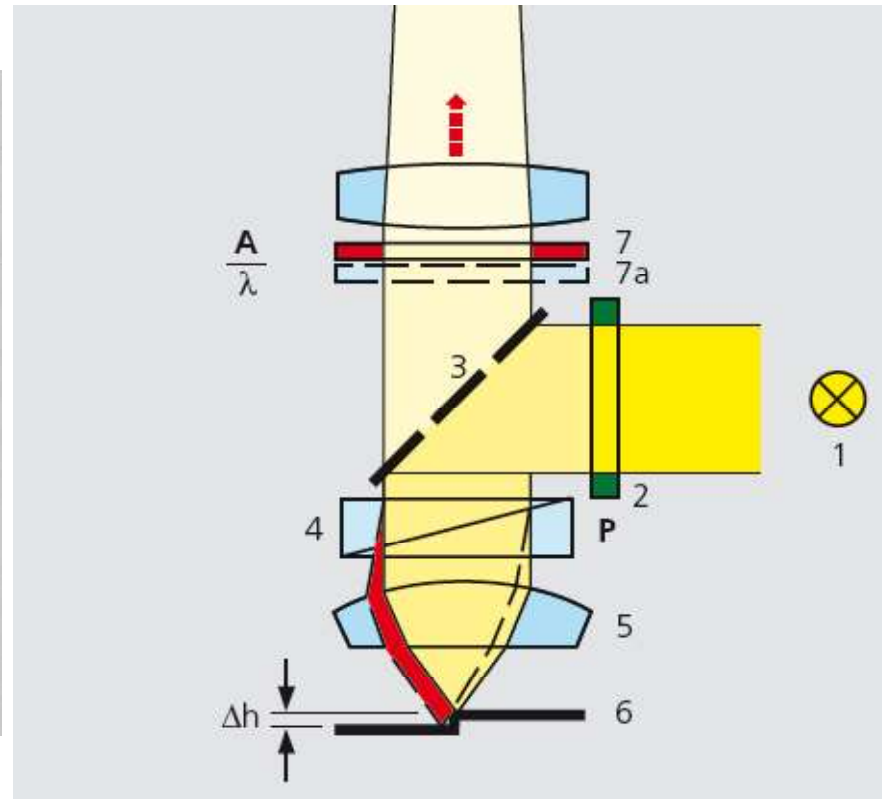
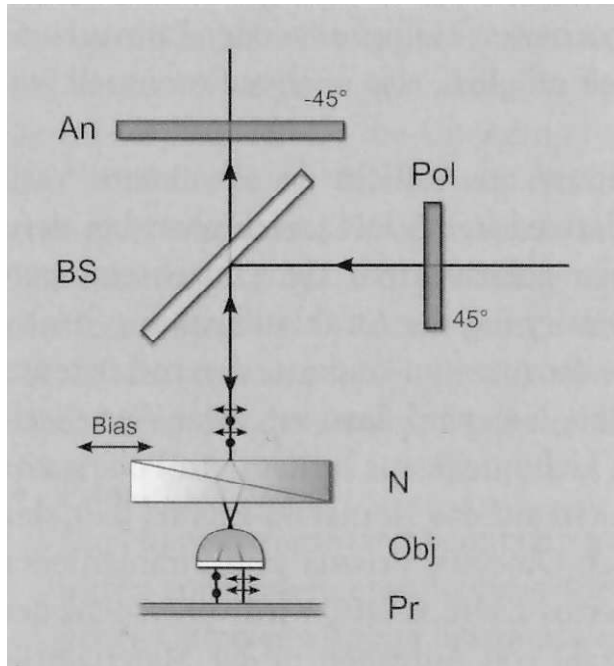
Zellen einer Zwiebelwurzel in verschiedenen Stadien der Zellteilung





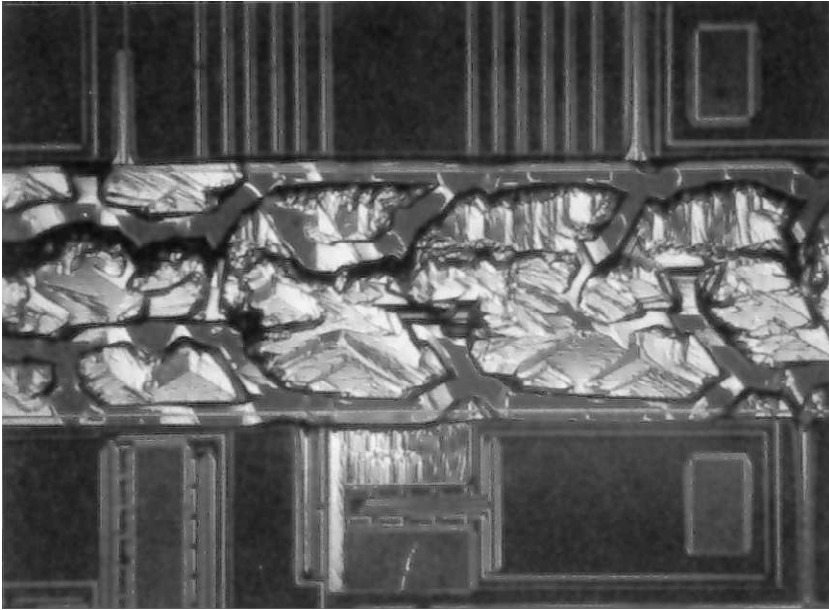
Kieselalgen im Hellfeld und im DIC (ohne und mit Lambdaplatte)

DIC im Auflicht:



Pr: Präparat; Obj: Objektiv; N: Nomarski-Prisma; BS: Strahlteiler; Pol: Polarisator; An: Analysator

kleinste Höhenunterschiede lassen sich damit darstellen:



Silizium-Wafer: zentral Bereiche von unvollständig geätztem Siliziumdioxid



Gefüge einer Messingprobe: Hellfeld-Auflicht



im Auflicht-DIC

13. Fluoreszenzmikroskopie

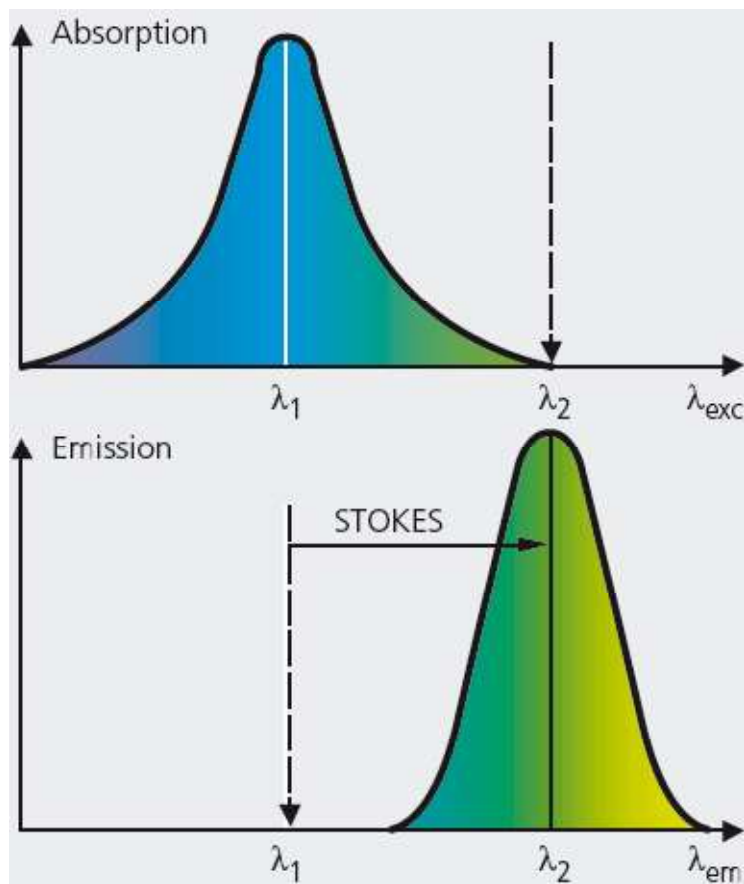
Hintergrund:

- die Nutzung spezifischer Emissionseigenschaften kann die mikroskopische Diagnostik erheblich vereinfachen

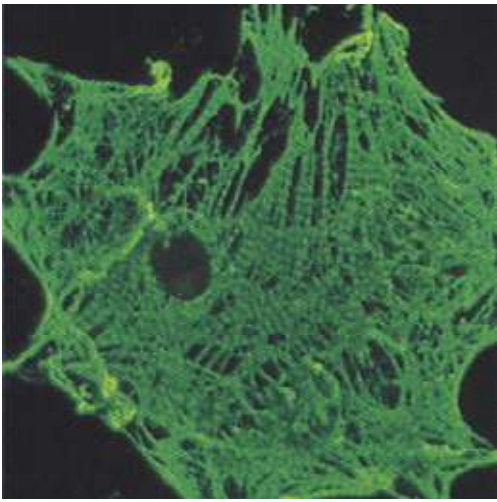
Funktionsprinzip und Komponenten:

- Nutzung einer Form der Lumineszenz (Strahlung bei Übergang aus einem angeregten Zustand in Grundzustand):
 - Phosphoreszenz (langnachleuchtende Luminophore)
 - **Fluoreszenz (unmittelbar leuchtende Fluorophore)**

- Begriff aus CaF_2 (Fluorit; Flußspat)
- meist Nutzung von:
 - dedizierten Fluorochromen
 - dedizierter Anregungsstrahlung
- praktische Spielarten:
 - Immunfluoreszenz (gekoppelt an Antikörper)
 - Sekundärfluoreszenz (gekoppelt an Zellwände oder DNS)
 - grün-fluoreszierendes Protein (GFP)
- sog. Autofluoreszenz (Primärfluoreszenz): Fluoreszenzeffekte auch ohne *eingebrachte* Fluorochrome
- Köhler (1908): Primärfluoreszenz in “Ultraviolett-mikroskop” genutzt
- heute: Organismen genetisch veränderbar, so daß sich fluoreszierende Proteine ausbilden
- Stokes (1852):
 - Wellenlänge emittierten Lichts ggü. der absorbierten Lichts “in Richtung Rot” verschoben
⇒ Stokes-Verschiebung
 - Einstrahlung von kurzwelligem Licht ⇒ Emission langwelligen Lichts (sowie von Wärme)
- Effekt: Anregung durch Absorption eines Photons, Rückkehr in Grundzustand unter Strahlung (Emission eines energieärmeren Photons) und Schwingungsrelaxation (nichtstrahlend)

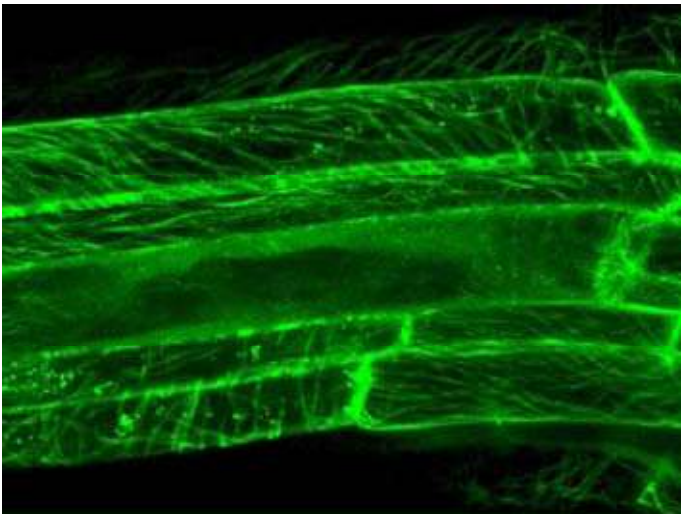


- Übergänge zwischen angeregtem und Grundzustand: diskrete Energiezustände
 - ⇒ jedes Molekül kann nur in einem bestimmten Wellenlängenbereich fluoreszieren
 - ⇒ Blaufluoreszenz bei Ultraviolettanregung
 - ⇒ Grünfluoreszenz bei Blauanregung
 - ⇒ Rotfluoreszenz bei Grünanregung
- Sekundär- und Immunfluoreszenz:
 - viele anwendungsspezifische Fluorochrome verfügbar
 - Auswahl von Anregungs- und Emissionsspektren
- Früher: meist unspezifische Färbung, wobei der “Farbstoff” die Bindungsstelle bestimmt
- Heute: spezifischere Färbung, damit genauere Bewertungen in der Diagnostik

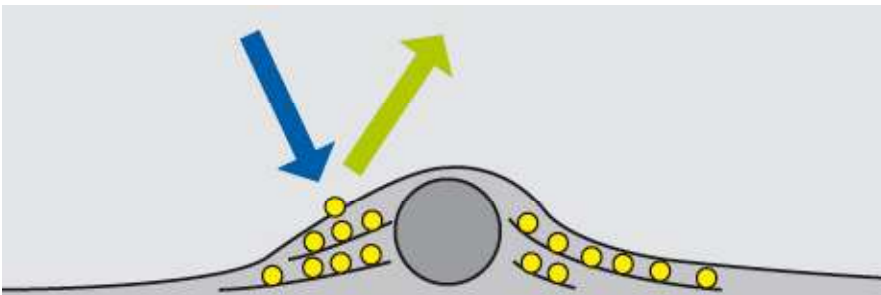


Zellskelett

Fluoreszenzmarker machen Strukturen im Emissionslicht sichtbar:



GFP an Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (Schottenkresse)



emittiertes Licht typ. eine 20 bis 50nm langwelliger

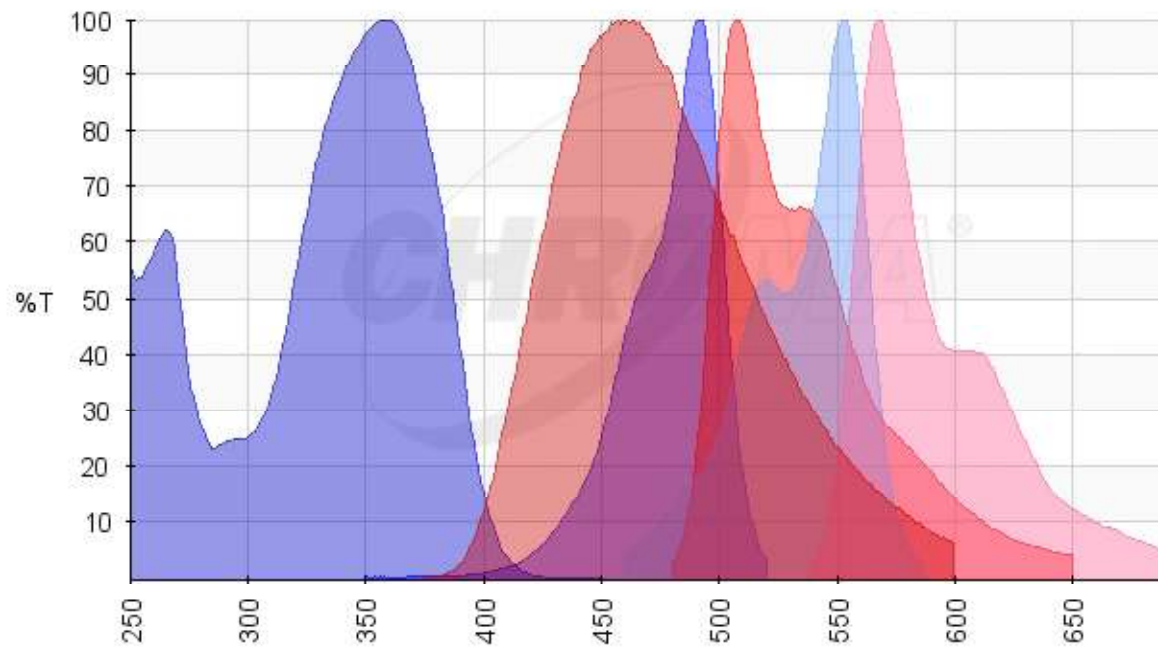


Anregung mit blauem Licht

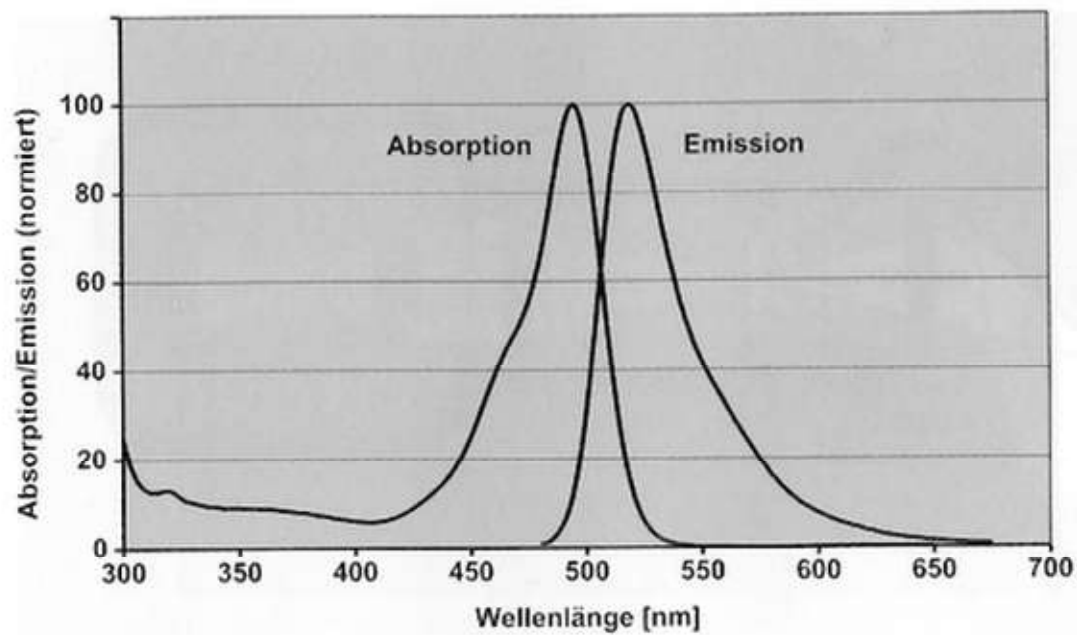


hinter Blau-Sperrfilter nur fluoreszierendes Gelblicht

Für die Anwendung ist der Einsatz von Sperrfiltern essentiell, da Anregungs- von Emissionslicht getrennt werden muß:



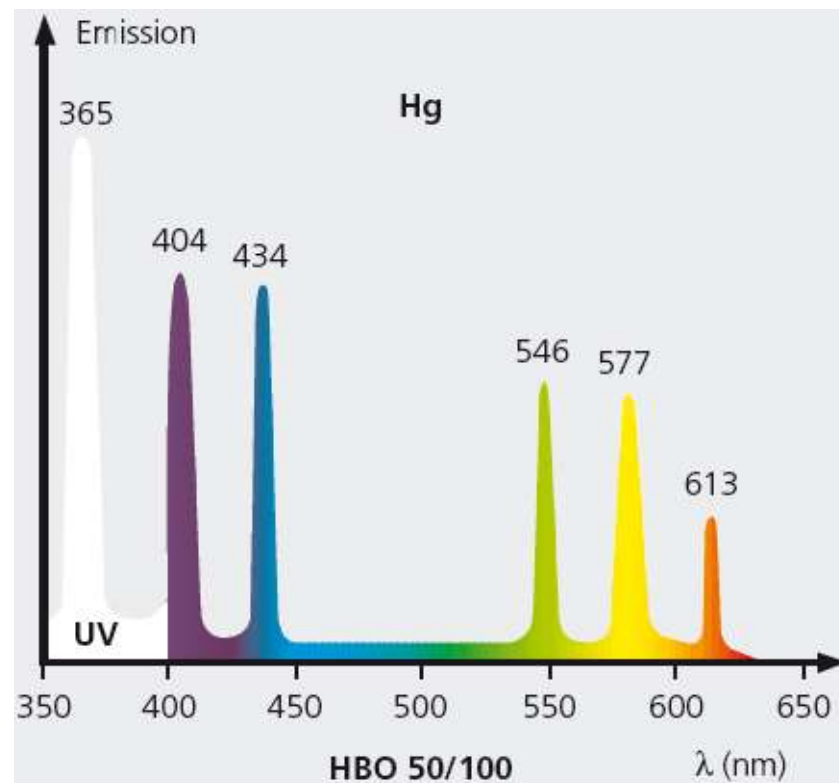
V.l.n.r: DAPI-Anregung/-Emission, Cyanin2-Anregung/-Emission, Cyanin3-Anregung/-Emission



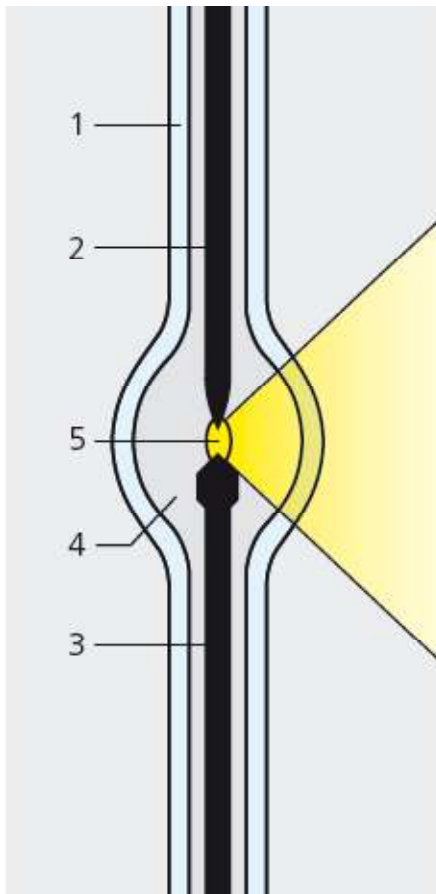
Kurven für Fluorochrom Fluorescein (FITC)

Glühlampen sind für Fluoreszenzmikroskopie ungeeignet, da zu rot und infrarotlastig.

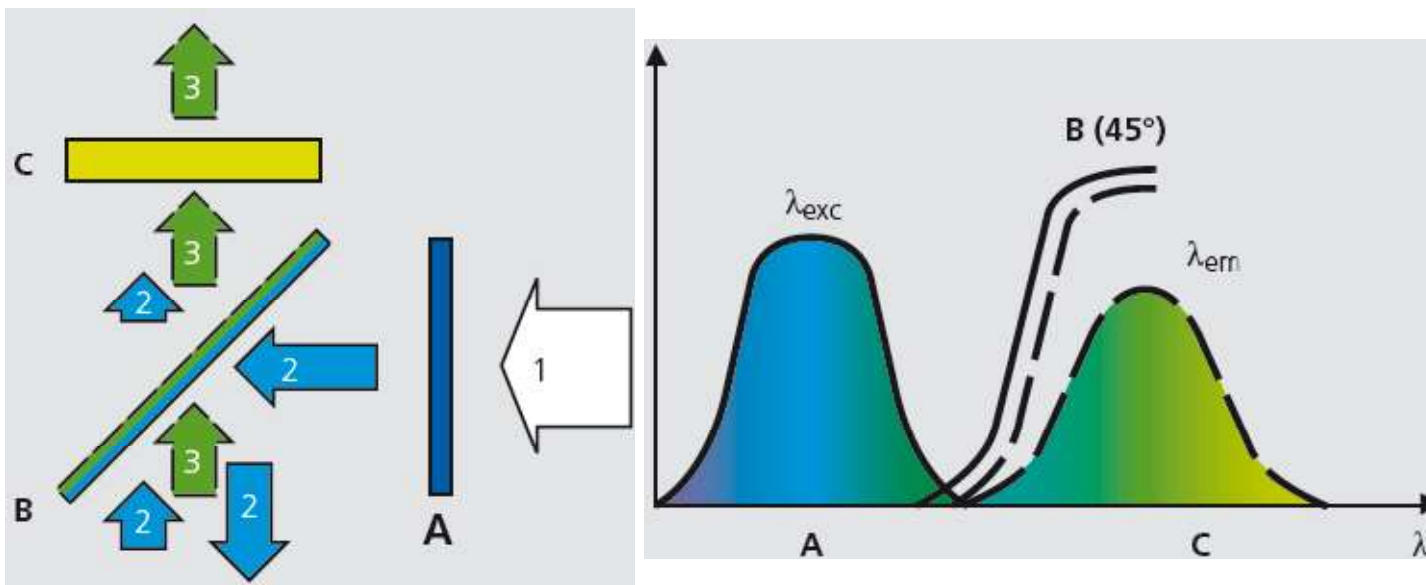
Für Fluoreszenz wird intensives kurzwelliges Licht benötigt.



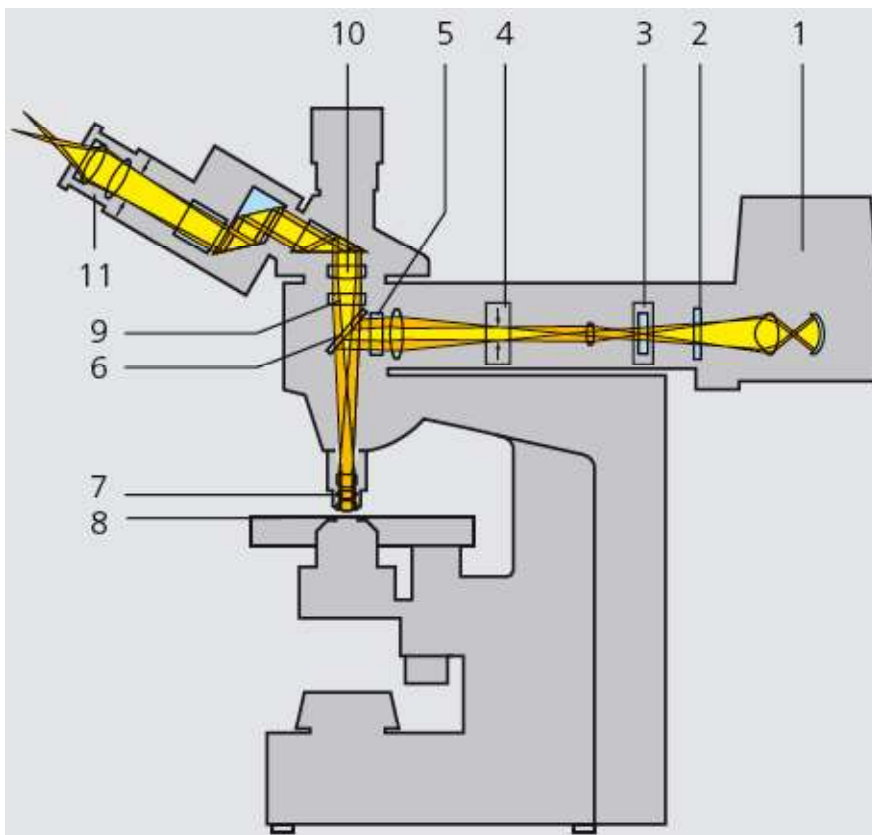
	Wavelength	Color
1	340 - 400 nm	near ultraviolet (UV) – invisible
2	400 - 430 nm	violet
3	430 - 500 nm	blue
4	500 - 560 nm	green
5	560 - 620 nm	yellow to orange
6	620 - 700 nm	orange to red
7	over 700 nm	near infrared (IR) – invisible



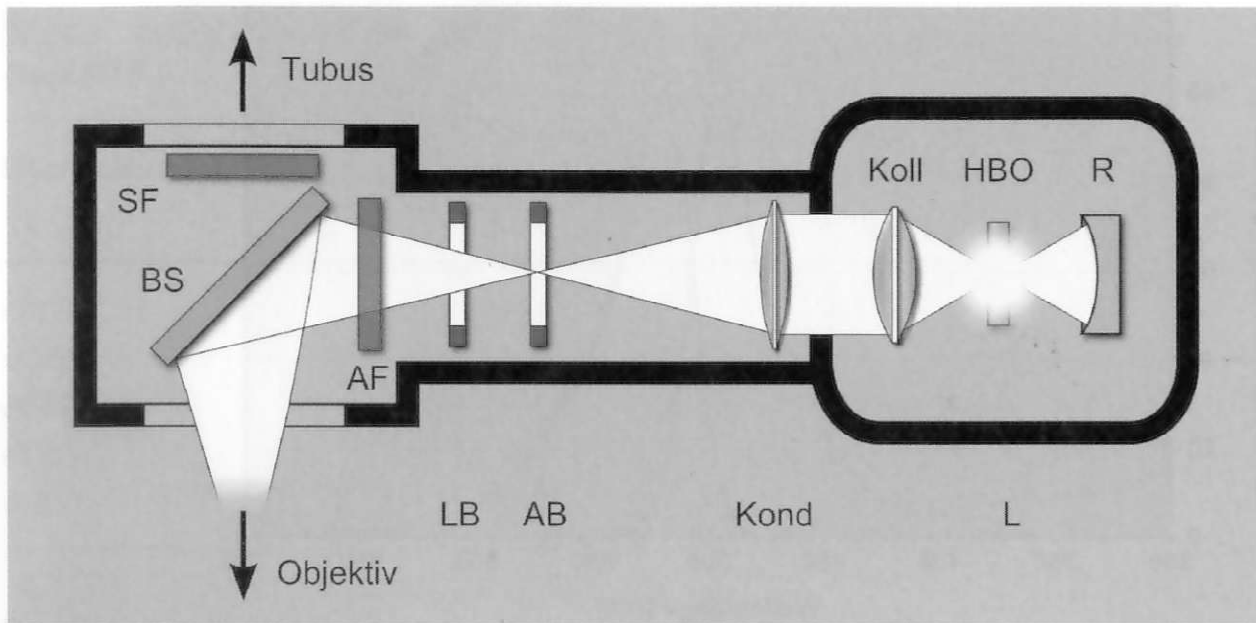
Quecksilber-Höchst Drucklampe: 1: Quarzglaskolben, 2: Kathode, 3: Anode, 4: Brennraum, 5: Lichtbogen



Filter und Reflektor: A: Anregungsfilter, B: Strahlteilerreflektor, C: Sperrfilter, 1: Lichtquellenstrahlung, 2: nahezu einfarbiges Anregungslicht, 3: emittiertes Fluoreszenzlicht



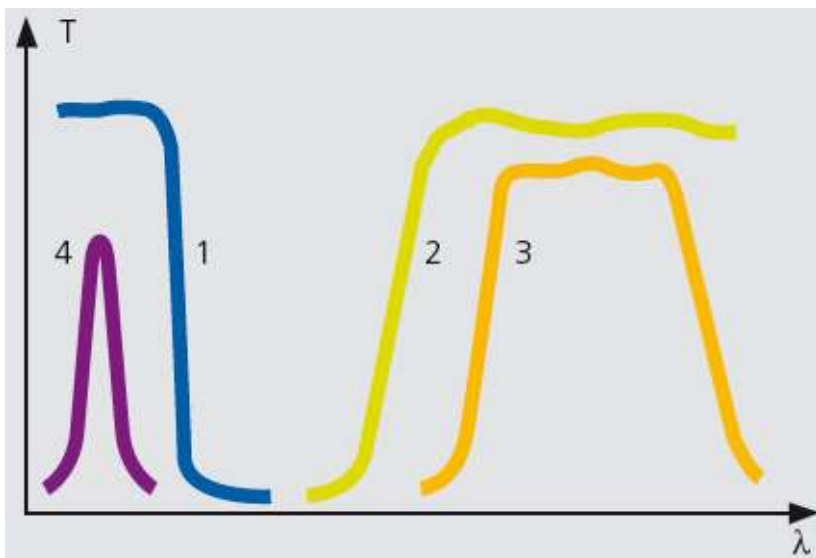
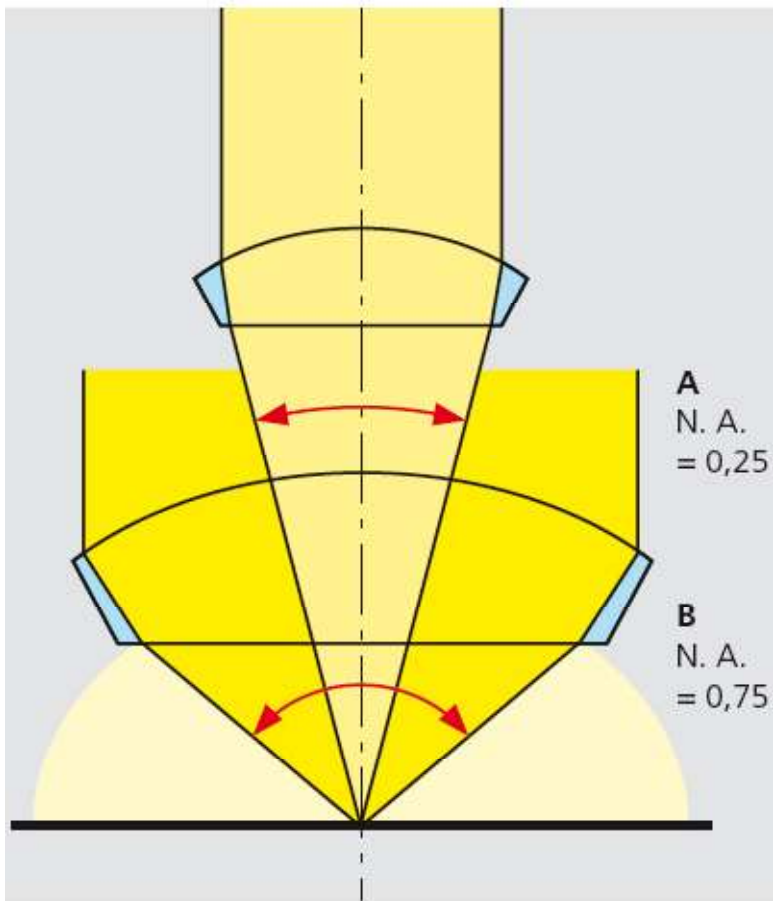
1: Quecksilber-Höchstdrucklampe, 2: Wärmeschutzfilter, 3: Rotdämpfungsfilter/Absperrschieber, 4: Leuchtfeldblende, 5: Anregungsfilter, 6: dichroischer Strahlteiler, 7: Objektiv, 8: Präparat, 9: Emissionsfilter, 10: Tubuslinse, 11: Okular



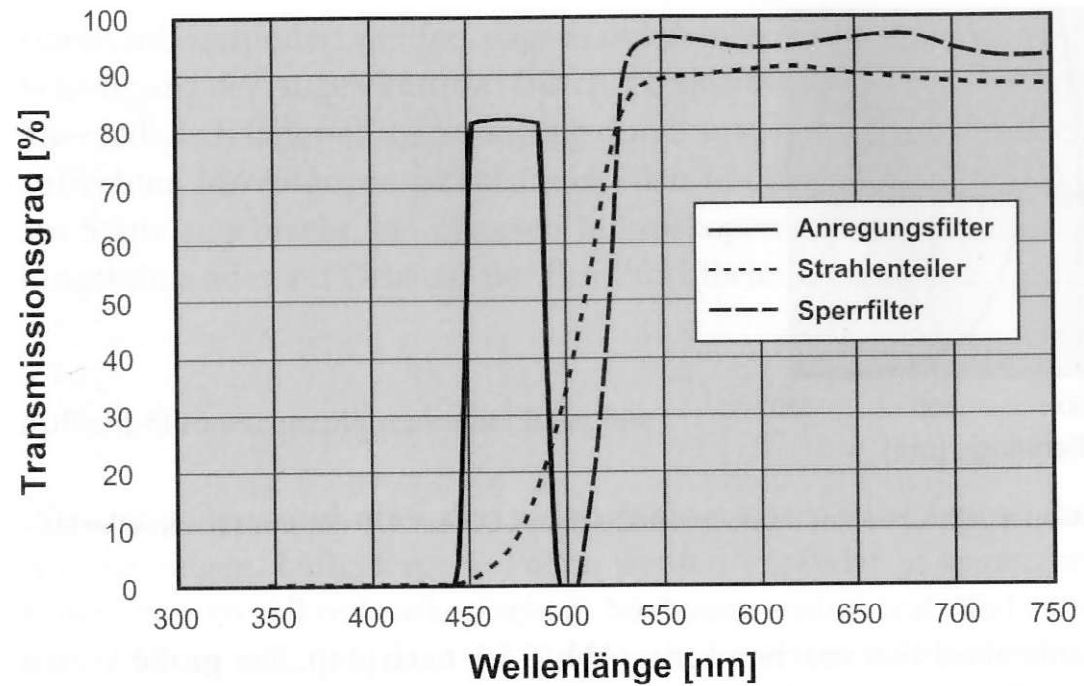
L: Lampenhaus, R: Rückreflektor, HBO: Quecksilber-Kurzbogenlampe, K: Kollektor, Kond: Kondensor, AB: Aperturblende, LB: Leuchtfeldblende, AF: Anregungsfilter, BS: Strahlteiler, SF: Sperrfilter

Worauf kommt es bei Auflichtfluoreszenzmikroskopie an:

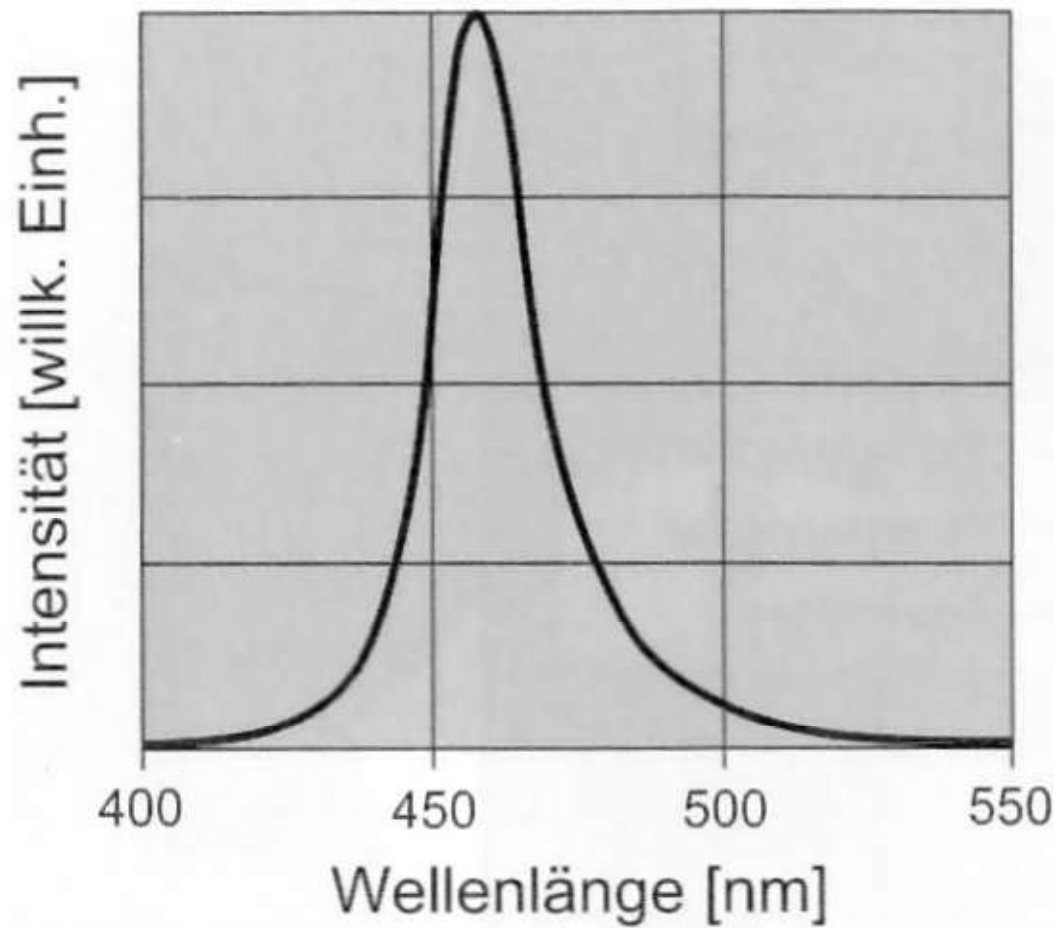
- höchste Qualität der Fluoreszenzfilter
- hohe Intensität der Anregung
- hohe Lichtdurchlässigkeit der Objektive
- keine Eigenfluoreszenz der Mikroskopoptik
- hohe numerische Apertur des Objektivs, damit mehr Licht "eingesammelt" werden kann



Transmission von Filtern: 1: Kurzpaßfilter, 2: Langpaßfilter, 3: Bandpaßfilter, 4: Schmalbandfilter



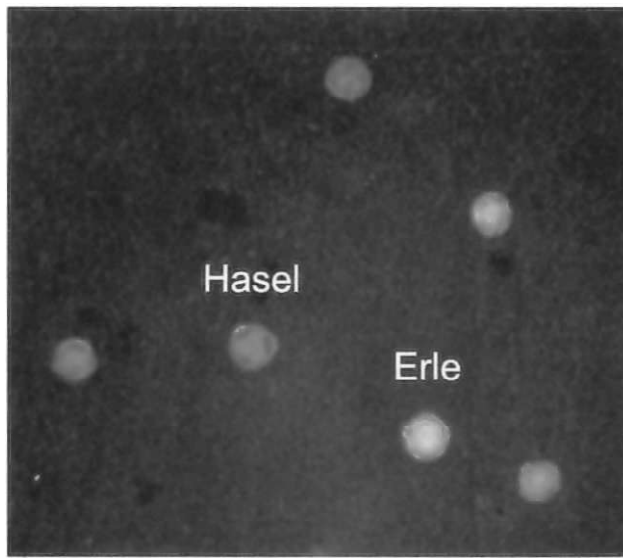
Filtersatz für FITC, Transmissionskurven



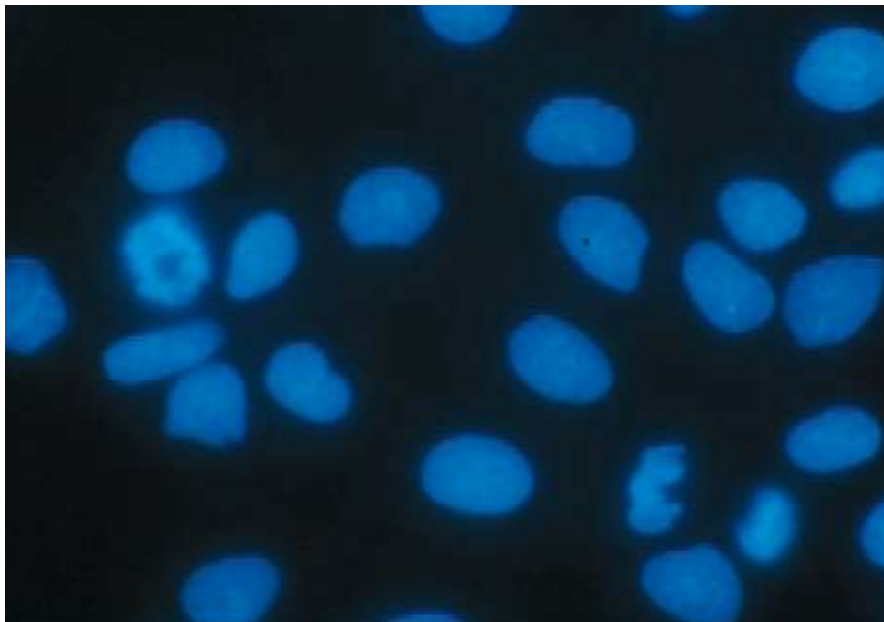
Emissionsspektrum einer monochromatischen LED mit 470nm Emissionswellenlänge



Zeiss Axiolab: 2: Auflichtilluminator, 2a: Absperr- und Filterschieber, 2b: Leuchtfeldblende, 3: Reflektorschieber

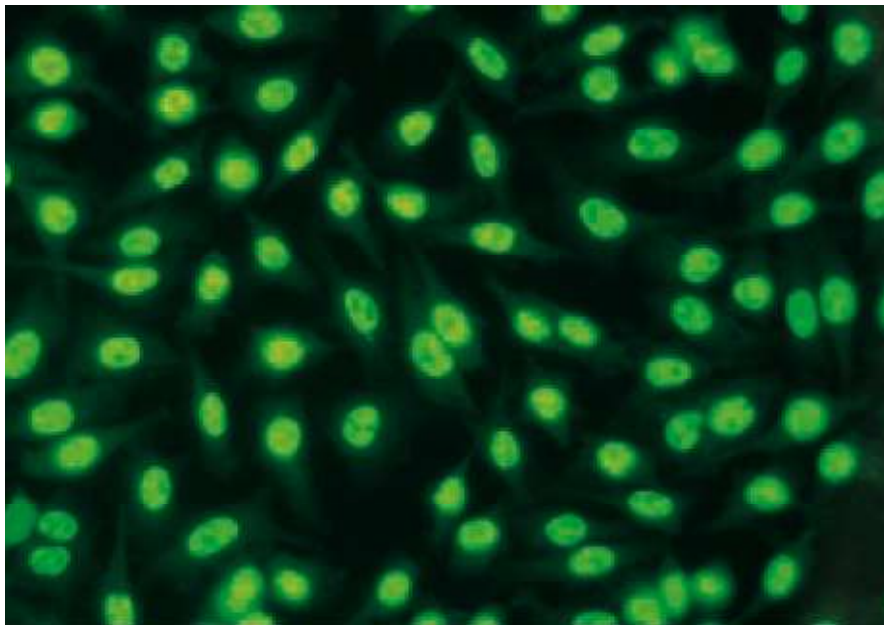


(Blaue) Autofluoreszenz im ungefärbten Präparat von Pollen, Anregung bei 365nm



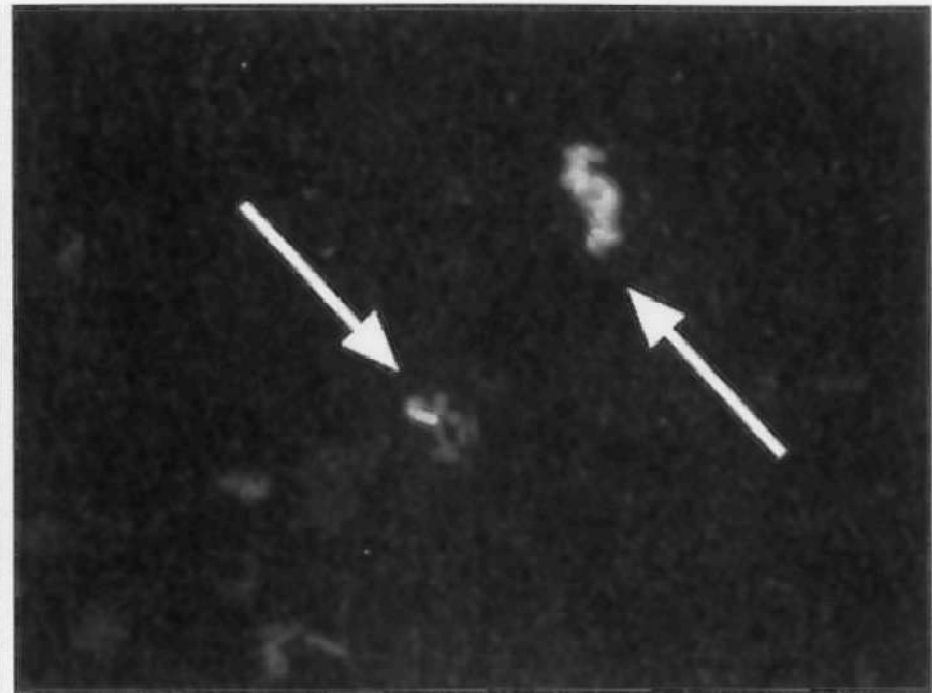
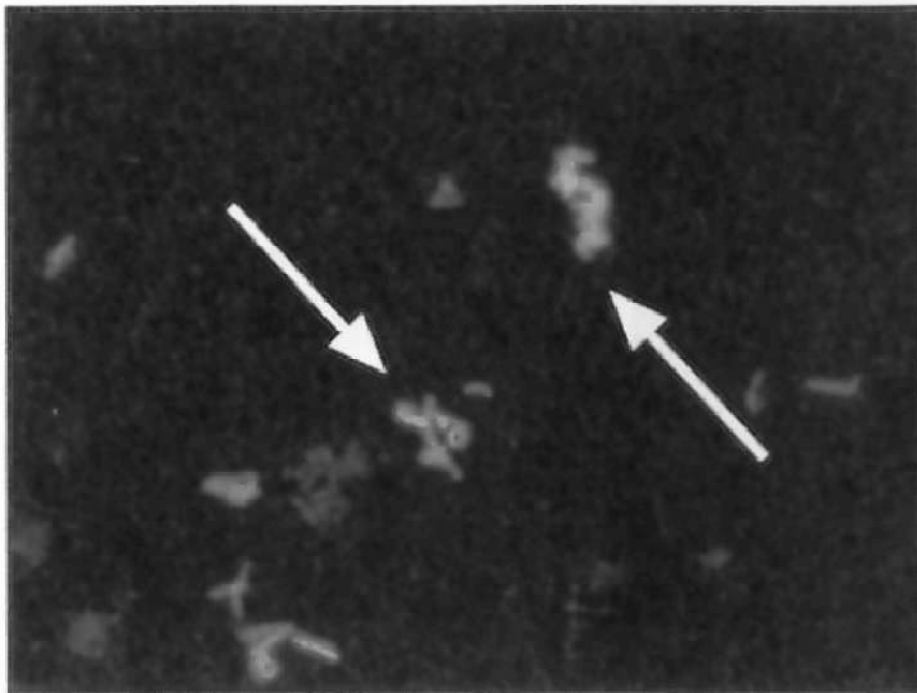
63x/1,40 Öl

DAPI-Zellkernfärbung bei 365nm im nahen Ultraviolett angeregt,



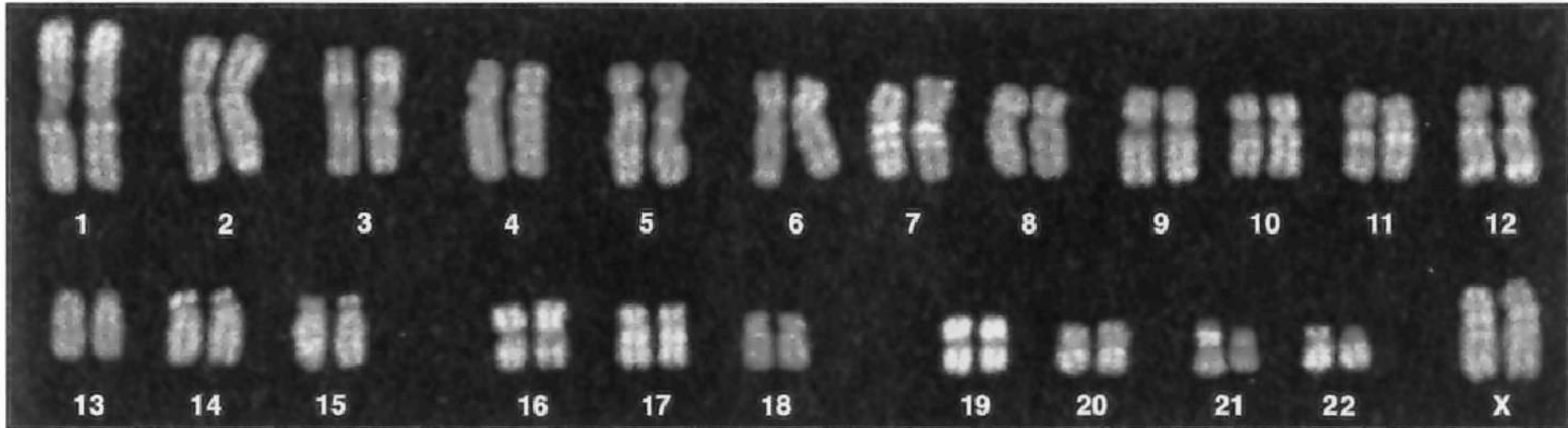
40x/1,30 Öl

Fluorescein (FITC) mit Antinukleärem Antikörper HEP-2 (Autoimmunerkrankungs-Indiz)



Milchsäurebakterien: links grüne 5-FAM-Fluoreszenz unter Blauanregung, rechts rote Cy3-Fluoreszenz unter

Grünanregung (100x/1,25 Öl)



Chromosomendarstellung (Karyogramm) eines (weiblichen) Lymphozyten: zwei verschiedene “Gensonden” stellen Abschnitte mit bestimmten DNS-Sequenzen dar (dunkel: rot im Original, hell: grün im Original).