

Fluoreszenz und konfokale Mikroskopie

Autor: Dr. Arwed Weigel

Stand: Januar 2006

Physiologisches Institut
Abteilung für Neurophysiologie und zelluläre Biophysik
Prof. Dr. Dr. Detlev Schild
Humboldtallee 23
37073 Göttingen

Telephon 0551/395915
Fax 0551/398399
Email dschild@gwdg.de
aweigel1@gwdg.de

Stichworte *Fluoreszenz*: Absorption, Emission, Lebensdauer, JABŁOŃSKI-Diagramm, STOKES-Shift; *Mikroskopie*: Strahlengang im konventionellen sowie konfokalen Mikroskop, Beugungsbegrenzung, KÖHLERSche Beleuchtung, laterale und axiale Auflösung, optischer Schnitt.

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt in ihren zahlreichen Anwendungen in allen naturwissenschaftlichen Disziplinen aufgrund selektiver Färbetechniken und hoher Sensitivität eine elementare Methode für die wissenschaftlich-experimentelle Praxis dar. Dieser Praktikumsbaustein gibt eine experimentelle Einführung in die konventionelle und die konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Folgende Punkte werden dabei behandelt:

- Das Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluoreszenzfarbstoffes werden vermessen.
- Die Punktbildfunktion wird im konventionellen sowie im konfokalen Mikroskop bestimmt. Im konfokalen Mikroskop wird dabei zusätzlich die konfokale Blende im Emissionsstrahlengang sowie die numerische Apertur durch Austausch des Objektivs variiert.
- Mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Nervenzellen im Gewebeschnitt werden mittels konventioneller sowie konfokaler Mikroskopie aufgenommen.

I. Vorbereitung

Lesen Sie zur Vorbereitung dieses Praktikumsskript, Kapitel 1 im LAKOWICZ ([Lak99]), Teil 1 (Optische Abbildung) sowie *Details: Fluoreszenz* im beigefügten Grundlagen-Heft von ZEISS ([bas03]) sowie die Seiten 1 – 5, 10 – 11 und 14 der beigefügten Übersicht von INOUÉ ([Ino95]).

II. Grundlagen

A. Fluoreszenz

Unter Lumineszenz versteht man den strahlenden Übergang einer Substanz aus einem elektronisch angeregten, thermisch relaxierten Zustand in den Grundzustand. Je nach elektronischem Übergang unterteilt man die Photolumineszenz, welche durch photonische Anregung hervorgerufen wird, in Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Vor einem Fluoreszenzübergang befindet sich das angeregte Molekül im Singlet (S_1)-Zustand. Der Spin des hierbei auf ein höheres Energieniveau angehobenen Elektrons ist dabei entgegengesetzt dem des im Grundzustand verbliebenen Elektrons, weshalb der Übergang in den Grundzustand quantenmechanisch erlaubt ist (PAULI[1]-Prinzip: in einem Atom dürfen keine zwei Elektronen in allen vier Quantenzahlen übereinstimmen). Typische Fluoreszenzlebensdauern liegen im Bereich von 1 – 10 ns und hängen stark von Umgebungseinflüssen wie Temperatur, pH-Wert, Lösungsmittel etc. ab.

Für das Auftreten von Photolumineszenz ist zunächst eine durch Photonen der geeigneten Energie

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = \frac{1239.84}{\lambda} \text{ nm eV} \quad (1)$$

[1] WOLFGANG PAULI (1900 – 1958)

erfolgte elektronische Anregung erforderlich. Der Übergang aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand erfolgt wegen der im Vergleich zu den Kernen wesentlich kleineren Masse der Elektronen ohne Veränderung der Kernkoordinaten. Dies folgt aus der BORN-OPPENHEIMER[2]-Näherung, nach der man die Gesamtzustandsfunktion des Moleküls als Produkt der elektronischen Wellenfunktion $\psi(\mathbf{r})$, die nur von den Elektronenkoordinaten \mathbf{r} abhängt, und der Schwingungswellenfunktion $\psi(\mathbf{R})$, die nur von den Kernkoordinaten \mathbf{R} abhängt, beschreiben kann: $\psi_{\text{ges}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \psi_{\text{El}}(\mathbf{r}) \cdot \psi_{\text{K}}(\mathbf{R})$. Die Tatsache, dass nur „senkrechte“ (ohne Veränderung der Kernkoordinaten) Übergänge auftreten, wird als FRANCK-CONDON[3]-Prinzip bezeichnet. Das Potential wird empirisch durch ein so genanntes MORSE[4]-Potential genähert:

$$V(R) = D_0 \left(1 - e^{\alpha(R-R_0)}\right)^2 \quad (2)$$

mit D_0 = Tiefe des Potentialminimums an der Stelle $R = R_0$, $\alpha = \sqrt{\frac{\mu}{2D_0}}\omega_0$ und μ = Dipolmoment. Die Abstände der

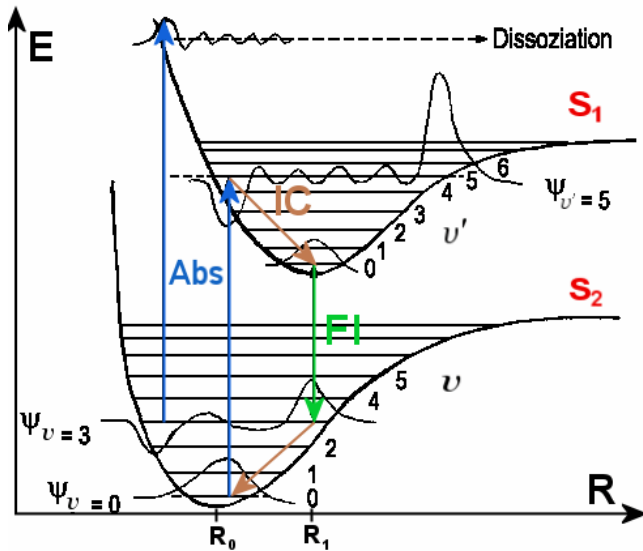


Diagramm zur Darstellung der nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip favorisierten elektronischen Übergänge, Abs Absorption, IC Internal Conversion, Fl Fluoreszenz, v Schwingungsquantenzahl. Beispielfhaft sind einige Zustandsfunktionen eingezeichnet, deren Betragsquadrat die Aufenthaltswahrscheinlichkeit wiedergibt.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft von Fluoreszenzspektren ist die häufig auftretende Spiegelsymmetrie von Anregungs- und Emissionsspektrum. Deren Ursache ist in den sehr ähnlichen Abständen der Schwingungszustände des S_1 -Zustandes und des S_0 -Zustandes zu finden. Abweichungen von der Spiegelsymmetrie können z. B. auftreten, wenn sich die Atomkerne in einem Fluorochrom infolge der Anregung deutlich verschieben, oder es zu Reaktionen im angeregten Zustand kommt, wie z. B. Excimerbildung.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Fluoreszenz ist in den meisten Fällen auftretende Unabhängigkeit des Emissionsspektrums von der Anregungswellenlänge, bekannt als KASHA[6]-Regel. Fluoreszenz tritt häufig in polyaromatischen oder heterocyclischen organischen Molekülen mit einem ausgedehnten π -Elektronensystem auf. Als typische Beispiele seien Chinin, Fluoreszein und Rhodamin genannt. Mit Ausnahme der Lanthaniden tritt Fluoreszenz in elementar kondensierter Materie nicht auf.

Im angeregten Zustand kann das Molekül weiterhin über so genanntes *Inter System Crossing* in den Triplet (T_1)-Zustand wechseln, dessen Schwingungsgrundzustand niedriger liegt als der des S_1 -Zustands. Der strahlende Übergang

Schwingungszustände werden im MORSE-Potential für große Quantenzahlen immer kleiner. Theoretisch sind Anregungen aus höheren Zuständen als dem Schwingungsgrundzustand möglich, faktisch treten diese aber bei Raumtemperatur nicht auf, da hier die thermische Energie $k_B T$ mit ≈ 0.03 eV klein gegenüber der Schwingungsenergie mit ≈ 0.1 eV ist.

Meist unterscheidet sich die Potentialkurve des elektronischen Grundzustandes von den Potentialkurven der angeregten Zustände zumindest durch verschiedene Potentialminima/Gleichgewichtsabstände ($\Delta R = R_i - R_0$). Daher ist für die Anregung ein Übergang in ein höheres Schwingungsniveau eines elektronisch angeregten Zustands am wahrscheinlichsten. Von dort relaxiert das angeregte Molekül über einen *Internal Conversion* (IC) genannten Prozess innerhalb von ps auf den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands. Aus dem thermisch relaxierten S_1 -Zustand erfolgt der Fluoreszenzübergang in den S_0 -Zustand. Anschließend folgt die thermische Relaxation innerhalb des S_0 -Zustands in den Schwingungsgrundzustand. Diese beiden vor und nach dem Fluoreszenzübergang stattfindenden IC's sind der Grund für die als STOKES[5]-Shift bezeichnete Rotverschiebung zwischen Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{em}} > \lambda_{\text{ex}}$).

[2] MAX BORN (1882 – 1979), J. ROBERT OPPENHEIMER (1904 – 1967)

[3] JAMES FRANCK (1882 – 1964), EDWARD U. CONDON (1902 – 1974)

[4] PHILIP MCCORD MORSE (1903 – 1985)

[5] SIR GEORGE GABRIEL STOKES (1819 – 1903)

[6] MICHAEL KASHA (*1945)

aus dem T_1 -Zustand in den S_0 -Zustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Da er aufgrund der erforderlichen Spinumkehr quantenmechanisch prinzipiell verboten ist, ist er durch lange Lebensdauern, typischerweise ms bis s, gekennzeichnet.

Ein ausführliches JABŁOŃSKI[7]-Diagramm mit den meisten der oben beschriebenen Prozesse befindet sich im Anhang, Abbildung 2.

Die Absorption lässt sich mit Hilfe folgender Gleichung beschreiben:

$$I = I_0 \cdot 10^{-OD} = I_0 e^{-\sigma N d}. \quad (3)$$

Hierbei steht d für die optische Weglänge ($[d] = \text{cm}$), N für die Anzahl der absorbierenden Moleküle und σ für den Wirkungsquerschnitt der Photonen ($[\sigma] = \text{cm}^2$). Die *optischen Dichte* OD bezeichnet dabei die *Absorption*:

$$OD = \varepsilon(\lambda_{\text{ex}}) \cdot c \cdot d, \quad (4)$$

$\varepsilon(\lambda_{\text{ex}})$ = molarer Extinktionskoeffizient, für gebräuchliche Fluorochrome im Bereich 5000 – 200 000 $\frac{1}{\text{cm M}}$, c = Konzentration des Fluorophors ($[c] = \frac{\text{mol}}{\text{l}} = \text{M}$) und d = optische Weglänge ($[d] = \text{cm}$).

Die *Fluoreszenzquantenausbeute* berechnet sich aus dem Quotienten der Anzahl der emittierten Photonen und der Anzahl der absorbierten Photonen. Sie wird bestimmt durch die Emissionsrate k_{fl} und die Abklingrate für nicht-strahlende Übergänge k_{nr} , wobei in Letzterem verschiedene Prozesse eine Rolle spielen können, z. B. ISC, IC, FÖRSTER[8]Resonanz-Energietransfer (FRET) oder Bleichen (s. u.). Die Fluoreszenzquantenausbeute berechnet sich dann nach

$$Q = \frac{k_{\text{fl}}}{k_{\text{fl}} + k_{\text{nr}}} = \frac{k_{\text{fl}}}{\sum_i k_i}. \quad (5)$$

Für einige Fluorophore wie z. B. Rhodamin ist $k_{\text{nr}} \ll k_{\text{fl}}$, womit die Quantenausbeute $Q \approx 1$ erreicht. Gängige in biologischen Anwendungen relevante Fluorophore liegen in der Quantenausbeute zwischen $Q = 0.05$ (Benzol) und ≈ 1 (Rhodamin).

Die *Fluoreszenzlebensdauer* ist definiert durch die mittlere Zeit, die ein Molekül im S_1 -Zustand verbringt, bevor es strahlend relaxiert. Da es sich hierbei um einen statistischen Prozess handelt, bezieht sich die Lebensdauer auf eine große Anzahl von Fluoreszenzereignissen:

$$\frac{I(t)}{I_0} = e^{-\frac{t}{\tau}}. \quad (6)$$

Die gemessene Lebensdauer, $\tau = \frac{1}{k_{\text{fl}} + k_{\text{nr}}}$ unterscheidet sich hierbei von der *natürlichen* Lebensdauer, $\tau_{\text{fl}} = \frac{1}{k_{\text{fl}}}$, durch die Berücksichtigung der Zerfallsrate für nicht strahlende Relaxationsprozesse k_{nr} .

Befinden sich Löschmoleküle, so genannte *Quencher*, im Lösungsmittel, können die angeregten Fluorophore auch durch Interaktion mit diesen strahlungslos deaktiviert werden, wobei sich Quencher und Fluorophor in der Anregungsphase zufällig, d. h. bedingt durch Diffusion, begegnen müssen. Man spricht dann von *Quenching*. Dieses tritt u. a. bei Vorhandensein von Sauerstoff, Halogenen, Aminen und Schwermetallsalzen im Lösungsmittel sowie hohen Fluorophorkonzentrationen auf. Die Intensitätsabschwächung wird durch die STERN-VOLMER[9]-Gleichung beschrieben:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q], \quad (7)$$

K = STERN-VOLMER-Löschkonstante, k_q = bimolekulare Löschkonstante, τ_0 = Lebensdauer ohne Quencher-Einfluss und $[Q]$ = Quencher-Konzentration.

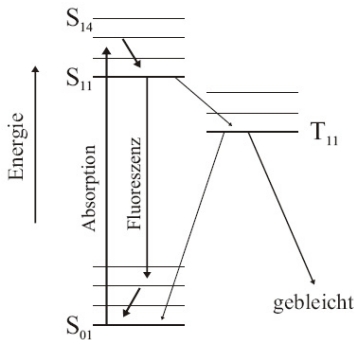
Ein in biologischen Proben nahezu immer auftretendes Problem ist die irreversible Zerstörung des Fluorophors im angeregten Zustand durch Oxidation und Radikalenbildung, häufig in Gegenwart von O_2 . Man spricht von irreversiblen *Photobleaching*. Man vermindert den Effekt durch geringe Anregungsintensitäten, Verwendung (relativ) photostabiler Farbstoffe sowie Einbetten der Proben in möglichst sauerstofffreien Medien, in die man evtl. noch Reduktionsmittel wie DABCO oder PPD (krebserregend!) gibt. Andererseits wird Photobleaching dazu eingesetzt, Mobilitäten von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen wie Proteinen zu untersuchen. Dazu wird ein definierter

[7] ALEXANDER JABŁOŃSKI (1898 – 1980)

[8] THEODOR FÖRSTER (1910 – 1974)

[9] OTTO STERN (1888 – 1969), MAX VOLMER (1885 – 1965)

Ausschnitt unter Einsatz hoher Anregungsintensitäten gebleicht. Anschließend detektiert man das durch das Eindiffundieren von Fluorophoren verursachte „Zurückkehren“ der Fluoreszenz (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*).



Wenn sich aufgrund sehr hoher Anregungsintensitäten nur noch sehr wenige Moleküle im Grundzustand befinden, gelangen auch mehr Moleküle in den Triplet-Zustand. Da dessen Lebensdauer um Größenordnungen länger ist als die des Singlet-Zustands, können diese Moleküle nicht fluoreszieren. Solange sich also ein Molekül im Triplet-Zustand befindet, ist es für die Fluoreszenzmikroskopie „verloren“. In diesem Fall spricht man im Gegensatz zu irreversiblen Photobleaching von reversiblen Photobleaching.

Im Gegensatz zum irreversiblen Photobleaching werden beim reversiblen Photobleaching die Fluorophore nicht zerstört, stehen aber für Fluoreszenzübergänge nicht zur Verfügung. Dies tritt dann auf, wenn sich aufgrund sehr hoher Anregungsintensitäten nur noch sehr wenige Moleküle im Grundzustand befinden. In diesem Fall gelangen mehr Moleküle in den Triplet-Zustand, dessen Lebensdauer um Größenordnungen länger ist als die des Singlet-Zustands.

B. Konventionelle Mikroskopie

In den meisten klassischen Lehrbüchern (siehe z. B. [Nie04]) ist der Strahlengang im Mikroskop recht stiefmütterlich behandelt und geht nicht wesentlich über das Prinzip - Erzeugung des Zwischenbildes mit dem Objektiv, Beobachtung des Zwischenbildes mit dem Okular - hinaus. Dass sich moderne Mikroskope durch einen wesentlich komplizierteren Aufbau auszeichnen, mag man sich anhand Abbildung 3 im Anhang klarmachen. Dennoch ist es notwendig, sich zunächst mit dem sehr vereinfachenden Grundprinzip der mikroskopischen Abbildung vertraut zu machen.

1. Grundprinzip

Das einfachste denkbare Mikroskop besteht aus zwei Sammellinsen. Das zu beobachtende Objekt befindet sich dabei außerhalb der einfachen, aber innerhalb der doppelten Brennweite des Objektivs, welches somit eine reelle, vergrößerte Abbildung des Objektes im Zwischenbild bewirkt. Dieses Zwischenbild befindet sich in der Brennebene des Okulars. Dieses wird somit als Lupe eingesetzt, um das Zwischenbild auf die Netzhaut/den Photodetektor abzubilden. Für diesen einfachen Fall berechnet sich die Gesamtvergrößerung aus dem Produkt des Abbildungsmaßstabes des Objektivs A_{ob} mit dem Vergrößerungsfaktor des Okulars V_{ok} : $M = A_{ob} \cdot V_{ok}$. Erinnern Sie sich an die Eigenschaften von (dünnen) Sammellinsen sowie die Bedeutung der Linsengleichung

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{g} + \frac{1}{b}, \quad (8)$$

f = Brennweite, g = Gegenstandsweite, b = Bildweite.

2. Die Strahlengänge

Im Mikroskop gibt es prinzipiell zwei zueinander komplementäre Strahlengänge, den sogenannten *orthoskopischen* Strahlengang, welcher die Abbildung des Objektes auf die Retina beschreibt, sowie den *konoskopischen* Strahlengang, welcher die Abbildung der Lichtquelle in die Ebene der Aperturblende, Rückapertur sowie Augenpupille beschreibt. Auf den Ebenen, auf denen man ein Bild des Objektes beobachten kann, ist der konoskopische Strahl zu einem parallelen Strahlenbündel aufgeweitet. Auf diese Weise wird das Objekt sehr homogen mit parallelem Licht ausgeleuchtet, und man erhält im Bild des Objektes keine Information von der Struktur der Lichtquelle. Um diese beiden Strahlengänge optimal aufeinander abzustimmen, so dass man bestmögliche Beleuchtung des Objektes bei bestmöglicher Auflösung erhält, muss man die Linsenabstände und Blendendurchmesser nach einem als *Köhlersches Beleuchtungsprinzip* bezeichneten Verfahren einstellen (s. u.). Beachten Sie die Abbildung 3 im Anhang.

3. Linsenfehler

Einfache sphärische Linsen zeichnen sich durch eine Vielzahl von Abbildungsfehlern aus:

- Öffnungsfehler (sphärische Abberation): Randnahe Strahlen werden stärker gebrochen als achsennahe Strahlen.

- Bildfeldwölbung: Das Bild ist nicht coplanar zum Objekt, sondern gewölbt.
- Verzeichnung (Tonnen- oder Kissenverzerrung).
- Astigmatismus: Kreise werden zu Ellipsen verzerrt.
- Koma: Asymmetrische Bündelung von schräg zur optischen Achse einfallenden Lichtstrahlen.
- Chromatische Abberation: Die Stärke der Lichtbrechung ist Abhängig von der Wellenlänge.
- Chromatischer Vergrößerungsfehler: Aufgrund der chromatischen Abberation bildet energiereichere Strahlung anders ab als energieärmere.

Um all diese Fehler zu beheben, werden je nach angestrebter Anwendung verschiedene Linsensysteme entworfen, die mit der ursprünglichen, einfachen Sammellinse nicht mehr viel gemein haben. Die einfachste Art der korrigierten Linsen stellen die *Achromate* dar, welche für den mittleren Wellenlängenbereich („grün“) korrigiert sind. Für Beobachtungszwecke mag das noch hinreichen, zur Dokumentation sind diese Objektive jedoch kaum geeignet. U. a. ist die Bildfeldwölbung noch stark ausgeprägt.

Eine verbesserte Korrektur ist durch die *Apochromate* gegeben, die für 3 Wellenlängen korrigiert sind, daher tritt kaum chromatische Abberation auf. Nachteilig wirkt sich hier die Kontrastminderung durch ein aufwändiges Linsensystem (mitunter mehr als 6 Linsen) und die immer noch vorhandene Bildfeldwölbung aus.

Für die Fluoreszenzmikroskopie werden in den Objektiven Spezialgläser aus Flussspat oder Quarz verwendet, da diese eine im Vergleich zu normalen Gläsern erhöhte Transmission im UV-Bereich haben. Außerdem wird viel Wert auf ein möglichst weniggliedriges Linsensystem gelegt, da an jeder Oberfläche Licht verloren geht. (Erinnern Sie sich an die FRESNEL[10]-Gleichungen: An einer planaren, nicht beschichteten Glasoberfläche werden 4 % des vertikal auftreffenden Lichtes reflektiert.) Diese Linsen werden u. a. als *Neofluare* bezeichnen.

Neben den Linsen spielt auch das Deckglas eine entscheidende Rolle für die Qualität der optischen Abbildung. In hochaperturigen Objektiven (die numerische Apertur $NA = n \sin \alpha$ mit n = Brechungsindex und α = halber Öffnungswinkel des Objektivs hängt eng mit der erreichbaren *Auflösung* zusammen, s.u.) ist dieses Element als Bestandteil des Objektivs berücksichtigt, wobei eine Dicke von 0.17 mm angenommen wird. Da Deckgläser einen Brechungsindex ähnlich dem von standardmäßig eingesetztem Immersionsöl haben ($n_{\text{im}} = 1.518$), fällt eine geringe Abweichung von dieser Dicke bei Öl-Immersionsobjektiven kaum ins Gewicht. Anders sieht dies bei Wasserimmersionsobjektiven ($n_{\text{H}_2\text{O}}$) und Trockenobjektiven aus. Diese sind mit einem Korrekturring ausgestattet, um auf die tatsächliche Deckglasdicke einzustellen.

Die Beschriftung der Objektive gibt Aufschluss über deren Verwendung. Für gewöhnlich findet man die Typbezeichnung wie oben erläutert (Achromat, Apochromat, Plan-Apochromat etc.), den Abbildungsmaßstab gefolgt von der numerischen Apertur und dem Immersionsmedium (z. B. 20x/0.25, 40x/1.2 W, 63x/1.4 oil etc.), Hinweise auf die zu verwendende Kondensoroptik (DIC („Differentieller Interferenz-Kontrast“), PH („Phasenkontrast“) etc.), eine Angabe zur Tubuslänge sowie die zu verwendende Deckglasdicke. Ältere Mikroskope sind auf eine Tubuslänge von 160 mm konstruiert, so dass die Zwischenbildebene an einem definierten Ort im Tubus ist. Dadurch konnten die Objektive verschiedener Hersteller ohne Weiteres ausgetauscht werden. Moderne Objektive sind *unendlich-korrigiert*, erkennbar am „ ∞ “-Zeichen auf dem Mikroskop. Das Zwischenbild wird erst durch die sogenannte *Tubuslinse* produziert, die somit ein integraler Bestandteil der Objektivoptik ist. Zwischen Tubuslinse und Rückapertur des Objektivs ist der Strahlengang parallel. Zweck dieses erweiterten Mikroskops ist die Möglichkeit, den Lichtstrahl im orthoskopischen Strahlengang durch Einsatz von Fluoreszenzfiltern, Strahlteilern etc. manipulieren zu können, ohne dabei die Abbildungseigenschaften zu verändern. Der Nachteil dabei ist, dass die Mikroskophersteller verschiedene Strategien für das System Objektiv-Tubuslinse verfolgen, weshalb am Mikroskop eines bestimmten Herstellers lediglich die Objektive desselben Herstellers verwendet werden können.

4. Licht und Auflösung

Für die Abbildung im Lichtmikroskop werden elektromagnetische Wellen im sichtbaren Wellenlängenbereich verwendet, d. h. $\lambda \approx 400 - 700$ nm. Elektromagnetische Wellen hängen nicht nur von der *Wellenlänge/Frequenz*, sondern auch von *Phase, Polarisation, Amplitude (Intensität), Ausbreitungsrichtung* sowie *Kohärenz* ab. Alle diese Eigenschaften nutzt man mit verschiedenen mikroskopischen Techniken. Für dieses Praktikum sind besonders die Amplitude (klassisch-konventionelle Hellfeld-Mikroskopie) sowie die Wellenlänge (Fluoreszenzmikroskopie) von Bedeutung. Eine herausstechende Gemeinsamkeit dieser beiden Methoden ist die Tatsache, dass man in beiden Fällen zumeist auf spezielle Färbetechniken zurückgreifen muss, um das zu untersuchende Objekt sichtbar zu machen. Im

[10] AUGUSTIN JEAN FRESNEL (1788 – 1827)

Falle der Hellfeldmikroskopie rührt dies daher, dass die Präparate sehr dünn sein müssen, dann aber nur noch wenig Licht absorbieren, da biologisches Gewebe in den meisten Fällen hauptsächlich aus (nichtabsorbierendem) Wasser besteht.



Unter *Auflösungsvermögen* versteht man die Fähigkeit eines abbildenden Systems, zwei nebeneinander liegende Punktlichtquellen noch getrennt voneinander darstellen zu können. Aufgrund des Wellencharakters elektromagnetischer Strahlung wird ein Lichtpunkt in der Abbildung auf eine Art „verwaschen“, die sich lateral mit Hilfe einer BESSEL[11]-Funktion

$$I(r) = I_0 \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^2 \quad (9)$$

beschreiben lässt (v bezeichnet eine generalisierte optische Koordinate vertikal zur optischen Achse mit $v = kr \sin \alpha$, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$). Die lateral beobachtete sogenannte *Beugungsscheibe* wird als AIRY[12]-

Scheibe bezeichnet. Per Definition können zwei nebeneinander liegende Punkte noch genau dann getrennt werden, wenn das Maximum der einen AIRY-Scheibe mit dem Minimum der daneben Liegenden zusammenfällt. Im Falle inkohärenter Beleuchtung ergibt sich nach HELMHOLTZ[13] eine laterale Auflösung von

$$d_r = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{\text{NA}}, \quad (10)$$

λ = Wellenlänge, n = Brechungsindex, α = Öffnungswinkel des Objektivs. d_r bezeichnet dabei den minimalen Abstand zweier auflösbarer Punkte in der Objektebene. Dieser Abstand ist über den Abbildungsmaßstab des abbildenden Systems mit dem *Durchmesser* (1. Minimum) des Beugungsscheibchens in der Bildebene gemäß obiger Definition verknüpft.

Bei Vergleichen der Auflösung verschiedener Mikroskope achtet man darauf, dass statt des Durchmessers häufig der Wert für die „volle Breite bei der Hälfte des Maximalwerts“ der gemessenen Intensitätsverteilung angegeben wird (FWHM, *full width at half maximum*). Gelegentlich verwendet man auch den *Radius* bzw. die *Standardabweichung*. Die axiale (= entlang der optischen Achse) Intensitätsverteilung eines punktförmigen Objekts wird durch eine *sinc*-Funktion beschrieben:

$$I = I_0 \left(\frac{4 \sin\left(\frac{u}{4}\right)}{u} \right)^2. \quad (11)$$

u ist dabei eine generalisierte optische Koordinate parallel zur optischen Achse mit $u = 4kz \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)$.

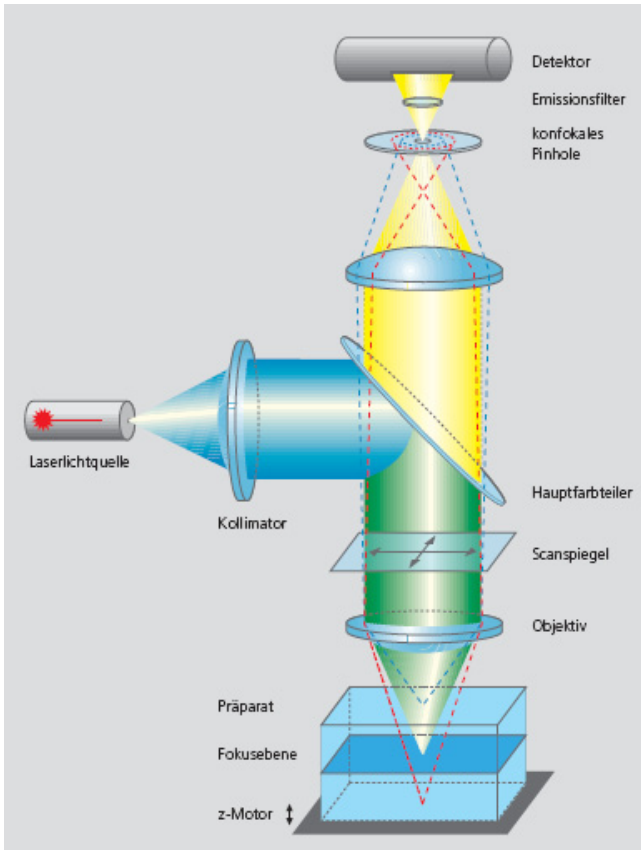
C. Konfokale Laserrastermikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, in der die Bildentstehung parallel durch gleichzeitige Beleuchtung und Betrachtung aller Objektpunkte geschieht, wird in der konfokalen Laserrastermikroskopie das Objekt Punkt für Punkt (seriell) mit einem durch das Objektiv beugungsbegrenzt fokussierten Laserstrahl gerastert (gescannt) und dementsprechend am Detektor auch Punkt für Punkt registriert. Das Rastern geschieht hierbei zumeist mit Hilfe von

[11] FRIEDRICH WILHELM BESSEL (1784 – 1846)

[12] SIR GEORGE BIDDELL AIRY (1801 – 1892)

[13] HERMANN LUDWIG FERDINAND VON HELMHOLTZ (1821 – 1894)



zwei beweglichen Scanspiegeln, die den Laserstrahl in x - bzw. y -Richtung verschieben. In der Zwischenbildebene ist eine Lochblende („Pinhole“) angebracht, die sich in einer zum Objekt und Laserfokus konjugierten Ebene befindet, daher spricht man auch von einer *konfokalen Blende*. Diese Blende stellt einen Sperrfilter für Licht dar, das nicht aus dem Bereich des Laserfokus kommt („out-of-focus light“) und ermöglicht im Gegensatz zum konventionellen Mikroskop Tiefendiskriminierung: durch die hier vorhandene axiale Auflösung ist es möglich, optische Schnitte aufzunehmen. Eine Verkleinerung des Blendendurchmessers verringert die optische Schnitt-dicke, unterdrückt Streulicht und erhöht den Kontrast sowie für sehr kleine Pinhole-Durchmesser auch die laterale Auflösung, führt aber auch zu geringerer Lichtausbeute.

Die nebenstehende Abbildung zeigt ein sehr vereinfachtes Schema eines konfokalen Mikroskops, eignet sich aber gut, um sich das Prinzip der Konfokalität zu verdeutlichen. Als wesentliche Elemente eines typischen konfokalen Aufbaus fehlen hier Tubus- und Scanlinse sowie der notwendigerweise angeschlossene Rechner, mit dessen Hilfe aus den seriellen Signalen ein Bild berechnet wird. Bei dem Detektor handelt es sich üblicherweise um einen Photomultiplier (PMT) mit einer Quanteneffizienz zwischen 10 und 40 %. Empfindlichere Detektoren stellen z. B. Avalanche-Photodioden dar.

Für eine detaillierte Darstellung der Scanoptik betrachten Sie unten Abbildung 1.

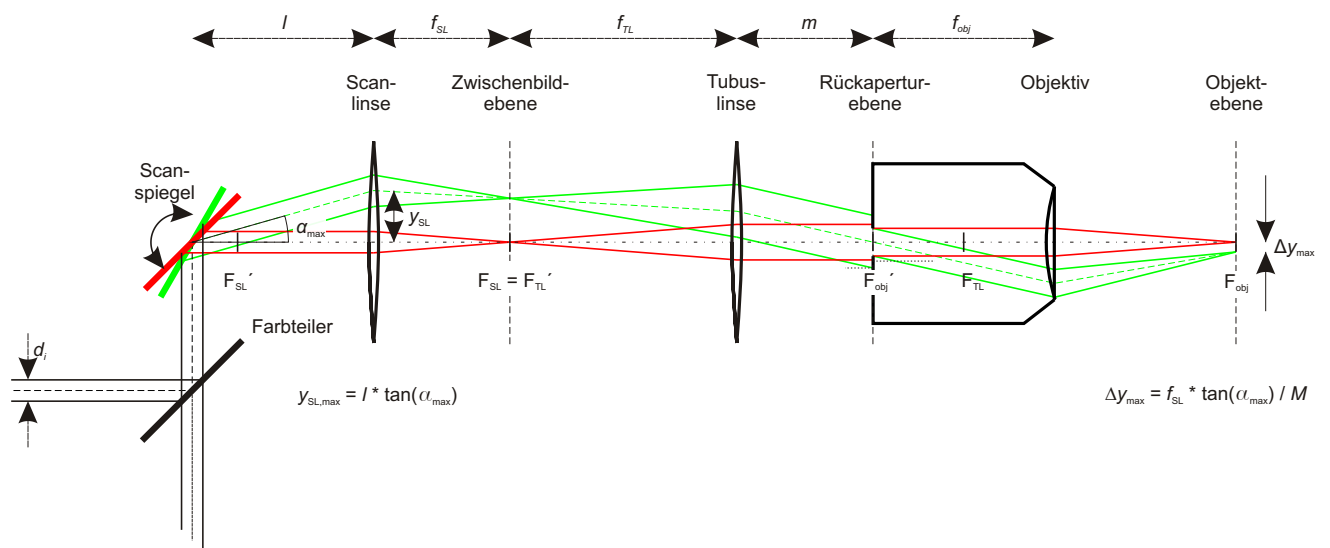


Abbildung 1: „M“ Abbildungsmaßstab des Objektivs. Die Abbildung der Scanspiegel mittels Scanlinse und Tubuslinse in die Rückaperturebene des Objektivs bei Überbeleuchtung der Rückapertur (optimal wäre eine homogene Ausleuchtung) ermöglicht das Abrastern des Objektes in der Objektebene.

III. Aufgabenstellung

1. **Fluoreszenz** Nehmen Sie das Absorptionsspektrum sowie das Emissionsspektrum des Ca^{2+} -Indikators fluo-4 (www.probes.com) auf. Untersuchen Sie dabei den Einfluss der Anregungswellenlänge, der Bandbreite der Anregungswellenlänge (Spaltbreite am Monochromator) und der Schrittweite auf das Emissionsspektrum. Vergleichen Sie ihre Ergebnisse mit den Angaben des Herstellers.
2. **Konventionelles Mikroskop**
 - (a) Nehmen Sie bei Wahl des passenden Objektivs, geeigneter Filter und Belichtungseinstellungen ein Bild eines mit fluo-4 gefärbten Gewebeschnittes (Neurone des Krallenfrosches *Xenopus laevis*) im Epifluoreszenzmodus am konventionellen Mikroskop auf.
 - (b) Bestimmen Sie mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten 200 nm Silika-Kügelchen grob die laterale Auflösung des konventionellen Mikroskops und vergleichen Sie diese mit der theoretischen vorhergesagten Auflösung.
3. **Konfokales Laserrastermikroskop**
 - (a) Machen Sie sich unter Verwendung eines Testpräparats (*convallaria malaris*) mit der Bedienung des konfokalen Laserrastermikroskops vertraut. Notieren Sie dabei insbesondere den Einfluss von Pinholedurchmesser, Belichtungszeit, Verstärkerspannung am Detektor („gain“) und Anregungsintensität.
 - (b) Nehmen Sie bei optimalen Einstellungen ein Bild des oben erwähnten Gewebeschnitts auf.
 - (c) Nehmen Sie bei optimalen Einstellungen einen z-Stapel der oben erwähnten Silika-Kügelchen auf. Wählen Sie einen geeigneten Ebenenabstand und bestimmen Sie grob die laterale und axiale Auflösung des konfokalen Laserrastermikroskops. Wiederholen Sie den Versuch mit einem Objektiv unterschiedlicher numerischer Apertur.
4. Stellen Sie tabellarisch die wesentlichen Unterschiede zwischen konventioneller Mikroskopie und konfokaler Laserrastermikroskopie dar.

IV. Messverfahren

A. Messung der Absorption

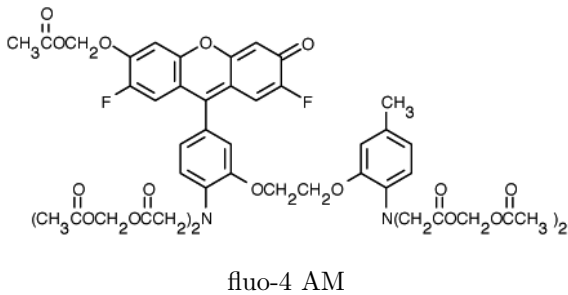
Die Absorption wird mit dem Spektrometer „Ultrospec 3000“ (PHARMACIA BIOTECH, Cambridge, England) aufgenommen. Dieses ist mit einer Deuterium-Lampe sowie einer Halogen-Lampe ausgestattet, die Deuterium-Lampe dient dabei speziell für Absorptionsmessungen im UV-Bereich. Ein sechsteiliger Probenhalter ermöglicht das Messen von bis zu fünf Proben (+ eine Referenz) in einem Messprogramm unter gleichen Bedingungen. Das Licht der Anregungslampen wird durch eine Eingangsschlitzeblende auf den Monochromator gelenkt, in welchem es je nach Experiment verschiedene Filter passiert, bevor es auf ein holographisches Gitter trifft. Anschließend wird die Ausgangsschlitzeblende passiert, deren verstellbare Öffnungsbreite den Wellenlängenbereich und die Anregungsintensität bestimmt. Das Licht wird mit Spiegeln auf die Probe fokussiert. Das Ultrospec 3000 kann entweder als *stand alone*-Gerät oder per Befehlseingabe am PC operiert werden. Bei Letzterem stehen einem die Messdaten in Form eines ASCII-files zur Verfügung. Eine Gerätebeschreibung befindet sich am Messplatz.

B. Messung der Emission

Zur Aufnahme des Emissionsspektrums steht eine Xenon-Bogenlampe als Lichtquelle zur Verfügung. Der Monochromator (Cornerstone 1/8 m, ORIEL, Darmstadt, Deutschland) wird mit Hilfe eines PCs angesteuert. Das Spektrum wird mit Hilfe des Spektrometers USB2000 (OCEANOPTICS, INC., Main St. Dunedin, FL, USA) detektiert und am PC ausgewertet.

C. Inkubation

Der reine, Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff fluo-4 ist hydrophil und daher nicht dazu in der Lage, die Lipidmembran, welche biologische Zellen umgibt, zu permeieren. Um seine nützlichen Eigenschaften dennoch in Form eines intrazellulären Markers verwenden zu können, behilft man sich mit einem biochemischen Kunstgriff: Der Farbstoff wird verestert, wodurch er lipophile Eigenschaften bekommt und problemlos durch die Membran diffundieren kann.



In Zellen gibt es eine Vielzahl von Esterasen, welche die Ester-Gruppen wieder vom Farbstoff abspalten, wodurch intrazellulär der reine Fluoreszenzfarbstoff vorliegt.

Der Farbstoff benötigt jedoch eine gewisse Zeit, um in Zellen zu diffundieren. Eine zu lange Inkubationszeit ist jedoch ebenso abträglich wie eine zu kurze: gegen Letzteres spricht ein zu geringes Signal, gegen ersteres eine Farbstoffkonzentration in der Zelle, die diejenige in der Ringerlösung deutlich übersteigt, da das reine fluo-4 nicht aus der Zelle hinausdiffundieren kann, aber immer mehr fluo-4 AM aufgrund des Konzentrationsgefälles nachströmt.

Weiterhin wird durch das Chelieren von Ca^{2+} -Ionen innerhalb deren eigentlichen Aktionsradius deren Summenwirkung vermindert, d. h. sie werden aus dem Cytosol entfernt, bevor sie ihren Wirkort erreichen.

D. Das konventionelle Mikroskop

Als konventionelles Mikroskop steht das motorisierte, inverse Mikroskop Axiovert 200M (ZEISS, Jena, Deutschland) zur Verfügung. Die Objektbeleuchtung erfolgt wahlweise mit einer dimmbaren Halogenlampe (nur Transmission) oder einer Xenon-Bogenlampe (nur Reflexion). Verschiedene Filtersets ermöglichen eine farbstoffspezifische Messung. Das Mikroskop ist mit folgenden Objektiven ausgestattet: 10x/0.3 Plan-Neofluar, 40x/0.75 Plan-Neofluar, 40x/1.2W C-Apochromat, 40x/1.3 oil Plan-Neofluar, 63x/1.4 oil Apochromat, 100x/1.3 oil Plan-Neofluar. Das Mikroskop funktioniert als eigenständiges Gerät, lässt sich aber auch komplett per PC und der Software AxioVision 4.4 ansteuern. Auf diese Weise lassen sich komplette Experimente programmieren. Die Digitalisierung der Bilddaten erfolgt durch die am Mikroskop angebrachte CCD-Camera AxioCam (1300x1030 Pixel, Pixelgröße $6.7 \mu\text{m} \times 6.7 \mu\text{m}$).

Köhlersche Beleuchtung Um das Mikroskop gemäß Köhlerscher Beleuchtung einzustellen, ist zunächst das Mikroskop/die Leuchtquelle einzuschalten, der Objektausschnitt gegebenenfalls zunächst mit Objektiven kleinerer Vergrößerung (5x, 10x, 20x) auszuwählen und „vorzufokussieren“. Man beachte die Verwendung des für das jeweilige Objektiv vorgesehenen Immersionsmediums. Anschließend geht man wie folgt vor:

- Leuchtfeldblende und Aperturblende werden voll geöffnet, das Objekt wird fokussiert.
- Die Leuchtfeldblende wird geschlossen.
- Das Bild der Leuchtfeldblende wird durch Heben und Senken des Kondensors fokussiert.
- Das Leuchtfeldblendenbild wird durch Verschieben des Kondensors mittels der dafür angebrachten Stellschrauben zentriert.
- Die Leuchtfeldblende wird soweit geöffnet, bis das gesamte Gesichtsfeld gerade ausgeleuchtet ist.
- die Aperturblende wird zur Kontraststeigerung teilweise geschlossen, optimalerweise soweit, bis das Bild gerade eben dunkler wird. ACHTUNG: Ein zu weites Schließen der Aperturblende erhöht zwar den Kontrast, führt aber zu einer erheblichen Herabsetzung des Auflösungsvermögens (warum?).

E. Das konfokalen Laserrastermikroskop

Das konfokale Laserrastermikroskop besteht im Wesentlichen aus fünf Komponenten: Anregungslichtquellen, Filter- und Rastereinheit, Mikroskop, Detektor und PC zur Datenverarbeitung. Als Anregungslichtquellen stehen hier ein Helium-Neon-Laser, $\lambda = 543.5 \text{ nm}$ sowie ein Argon-Laser, $\lambda = 458, 488 \text{ und } 514 \text{ nm}$ zur Verfügung, die in die Laserrastereinheit LSM 510 (ZEISS, Jena, Deutschland) eingekoppelt werden. Dieses ist an einem Axiovert 100M motorisiertem und inversem Mikroskop (ZEISS, Jena, Deutschland) angebracht. Folgende Objektive können eingesetzt werden: 20x/0.5 Plan-Neofluar, 40x/1.25 oil Plan-Neofluar, 40x/1.2W C-Apochromat, 63x/1.25 oil Plan-Neofluar, 63x/1.4 oil Plan-Apochromat. Zwei Detektoren (Photomultiplier) sind im LSM 510 untergebracht. Das Mikroskop kann entweder als konventionelles Mikroskop manuell oder als konfokales Laserrastermikroskop ausschließlich über eine Ansteuerung mit dem Computer bedient werden. Mit dem hierfür verwendeten Software-Interface LSM 510 V 2.02 (ZEISS, Jena, Deutschland), installiert auf einem mit Windows NT ausgestatteten PC, hat man Kontrolle über alle hier benötigten Parameter.

V. Durchführung

A. Vorbereitung

Intrazelluläre Fluoreszenzfarbstoffe benötigen eine gewisse Zeit, um in Zellen diffundieren zu können. Bereiten Sie daher die Versuche [2a](#) und [3b](#) vor, indem Sie den bereit stehenden Gewebeschnitt (Neurone im *bulbus olfactorius* der Larve vom Krallenfrosch *Xenopus laevis*) in einer physiologischen Lösung (BPYR) mit dem Ca^{2+} -Indikator fluo-4 in einer 50 μM Lösung inkubieren. Gehen Sie dabei wie folgt vor: Sollte keine Stammlösung vorrätig sein, bereiten Sie diese wie folgt vor:

a. *Stammlösung* 5 μl DMSO werden in ein fluo-4, AM-Tube pipettiert, ohne die Gefäßwand mit der Pipettenspitze zu berühren. Die Farbstoffmenge ist vom Hersteller (www.probes.com) exakt auf 50 μg bemessen. Der Farbstoff benötigt etwa 15 min, um sich zu lösen. Währenddessen werden 50 μl pluronic acid (2 %) mit 445 μl BPYR (extrazelluläre Ringerlösung, s. u.) vermischt und etwa 10 min in das Ultraschallbad gestellt, bis es schaumig ist. Anschließend wird die Farbstofflösung durch mehrfaches Hin- und Herpipettieren von etwa 200 μl Ringerlösung in diese überführt. Die somit erhaltende Stammlösung von 100 μM fluo-4, AM wird noch 15 min in das Ultraschallbad gestellt. Sie hält sich bis zu vier Tage bei 4°C im Kühlschrank.

b. *BPYR* BPYR ist eine physiologische Lösung bestehend aus 98 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM Glucose, 5 mM PyruvatNa und 10 mM HEPES. Die Osmolarität ist auf etwa 225 mOsm, der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7.8 einzustellen. Für das Experiment steht BPYR bereit.

c. *Inkubation* Für das Experiment wird die Stammlösung mit BPYR auf 50 μM fluo-4, AM verdünnt. Der bereit stehende Gewebeschnitt wird etwa 40 min inkubiert.

B. Versuch 1

Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums ist zunächst das Spektrometer *Ultrospec 3000* (PHARMACIA BIOTECH) an der Gehäuserückseite einzuschalten. Eine mit *aqua dest.* gefüllte Referenzküvette ist in Probenhalter 1 zu platzieren. Die zu untersuchenden Proben werden in den Probenhaltern 2 – 6 platziert. Das Menü des *Ultrospec 3000* ist selbst erklärend.

Um die Daten als ASCII-Datei für eine spätere Auswertung zur Verfügung zu haben, fahren Sie den Computer hoch und starten sie das Programm *BioDC* unter *Start* → *Programme* → *Biochrom Data Capture*. Wählen Sie unter dem *Run*-Reiter die *Start*-Option und drücken Sie den *New Data*-Button. Die weitere Bedienung erfolgt zunächst am Spektrometer. Wenn ein Spektrum eingelesen ist, drücken Sie den *Finish*-Button. Anschließend können Sie die erhaltenen Werte beispielsweise mit Excel weiter bearbeiten.

Die Einweisung in die Versuchsdurchführung zur Aufnahme des Emissionsspektrums erfolgt am Versuchsplatz.

C. Versuch 2

Schalten Sie die Geräte in folgender Reihenfolge an: Steckleiste, Mikroskop, XBO-Lampe, PC. Machen Sie sich zunächst mit der manuellen Bedienung des Mikroskops vertraut. Wo ist die Leuchtfeldblende, wo die Aperturbblende, wo der Kondensor? Wie wechselt man die Filter oder die Objektive?

Legen Sie das ZEISS-Testpräparat *Glomerulonephritis* auf und üben Sie das Köhlern. Welchen Einfluss hat welche Blende auf das Bild, welchen Einfluss hat die numerische Apertur? Achten Sie beim Wechsel zwischen Objektiven mit verschiedenen Immersionsflüssigkeiten darauf, das Deckgläschen des Präparats zu reinigen.

Wenn Sie Objektive verwenden, für die eine Immersionsflüssigkeit benötigt wird, tragen Sie diese immer auf das Deckgläschen auf: Bei Auftragen auf das Objektiv kann die Linse beschädigt werden. Nehmen Sie kleine Mengen der Immersionsflüssigkeit. Reinigen Sie *nicht* das Objektiv, aber lassen Sie sich die Reinigung zeigen. **Berühren Sie niemals eine Objektivlinse. Achten Sie darauf, dass das Objektiv beim Fokussieren nicht das Deckglas berührt!**

Starten Sie nun die Software AxioVision 4.4 und machen sich mit deren Bedienung vertraut.

Wählen Sie den Reflektionsstrahlengang, legen Sie das vorbereitete Gewebeschnitt-Präparat auf den Objektisch, wählen Sie geeignete Filter und wechseln Sie die Objektive, indem Sie mit kleinen Abbildungsmaßstäben anfangen und bei großen aufhören. Welches Objektiv eignet sich am besten für dieses Präparat? Selektieren Sie eine interessante Neuronengruppe, wählen Sie geeignete Parameter für Objektiv, Blenden und Belichtungszeit und machen Sie ein Bild. Speichern Sie dieses im *.zvi-Format unter einem nach Ihnen benannten Order in *D:\Praktikum* ab.

Legen Sie das Präparat mit den fluoreszenten Kügelchen auf. Das Auffinden des Präparats gestaltet sich hier etwas schwieriger, da die Kügelchen recht lichtschwach sind, und ist ausschließlich im Reflexionsstrahlengang möglich. Beobachten und beschreiben Sie genau die Form der Kügelchen bei Defokussierung. Wählen Sie einen geeigneten Ausschnitt und geeignete Belichtungsparameter und machen Sie ein Bild. Vermessen Sie die Bilder der Kügelchen mit dem programminternen Maßstab.

Eine Bedienungsanleitung zur Software liegt am Messplatz aus. Wenn Sie buchstäblich nichts sehen, kann das folgende Gründe haben: Das Licht wird zum Okular *oder* zur Kamera gelenkt. Der interne Shutter ist geschlossen. Der falsche Filtersatz wird verwendet. Die Kügelchen sind vollständig ausgebleicht.

Zum Ausschalten gehen Sie in der umgekehrten Reihenfolge vor wie oben beschrieben.

D. Versuch 3

Zur Inbetriebnahme des konfokalen Laserrastermikroskops stellen Sie *zuerst* den „Remote Control“-Schalter, der sich auf dem Computer-Gehäuse rechts neben dem Faraday-Käfig, in welchem das Setup untergebracht ist, befindet, auf „I“. Fahren Sie anschließend den Rechner hoch und starten Sie die LSM-Software V 2.02 (Button „Start LSM 510“ auf dem Desktop). Wählen Sie „Expert Mode“.

Für die folgenden Ausführungen betrachten Sie die Abbildungen 4 bis 6 im Anhang.

Das Menü „File“ dient zum Öffnen und Speichern von Dateien. Für Experimente benötigen Sie nahezu ausschließlich das Menü „Acquire“. In der erscheinenden Button-Leiste arbeiten Sie sich von „Laser“ bis „Scan“ vor.

Laser Hier schalten Sie den benötigten Laser (HeNe, Ar) an und aus. **Ändern Sie nicht die Einstellung der Leistung des Argon-Ionen Lasers (25 %)! Eine Erhöhung der Leistung führt zu einer Zerstörung der Photomultiplier!**

Micro Hier selektieren Sie das gewünschte Objektiv und können zwischen Transmissionsoptik und Reflexionsoptik wählen.

Config Hier wählen Sie die gewünschten Farbteiler und Emissionsfilter sowohl für Einkanal- als auch für Mehrkanalexperimente.

Scan Hier wählen Sie die Rasterparameter:

Mode Hier können Sie ebenfalls das Objektiv wechseln. Weiterhin bestimmen Sie die Pixel-Auflösung, die je nach Pixelgröße die Bildauflösung deutlich übersteigt. Das Bild muss im Übrigen nicht quadratisch sein, Sie können die Pixelauflösung in gewissen Grenzen auch frei wählen. Achten Sie aber darauf, dass letztlich der auch in „Mode“ wählbare optische „Zoom“ die tatsächliche Pixelgröße bestimmt. Weiterhin wählen Sie in dieser Einstellung die Pixel-Belichtungszeit sowie den Pixel-Dynamikbereich. Als Scan-Richtung belassen Sie es bei der Einstellung *Zeile für Zeile* (gerader Pfeil). Die „Average“-Funktion sollte ebenfalls auf „I“ gestellt bleiben.

Channels In diesem Menü können Sie die Einstellungen der einzelnen Kanäle ändern, die Anregungsleistung der Laser variieren (fangen Sie mit geringen Leistungen an), den Emissionsfilter wechseln sowie den Durchmesser der konfokalen Lochblende bestimmen (fangen Sie mit einem großen Blendendurchmesser an). Eine Airy-Unit wird im Allgemeinen als guter Kompromiss zwischen Konfokalität und Lichtausbeute angesehen. Der „Detector Gain“ bestimmt in nichtlinearer Weise die Signalverstärkung am Photomultiplier und sollte etwa auf „800“ gesetzt werden.

Z Stack Hier setzen Sie die Anzahl der Bilder, den Abstand zwischen den Bildern sowie die Startposition für einen Bildstapel fest. **Klicken Sie nicht auf das Menü „Mark First/Last“!** Der z-drive würde das Objektiv gegen das Deckglas der Probe fahren und so möglicherweise das sehr teure Objektiv beschädigen.

Legen Sie das Testpräparat *Convallaria majalis* auf und betrachten Sie es auf konventionelle Weise. Hierfür müssen die rechts unter dem Revolver angebrachten Schieberegler auf „VIS“ gestellt werden. Wählen Sie einen geeigneten Ausschnitt sowie ein geeignetes Objektiv und fokussieren Sie. Schließen Sie den Shutter hinter dem Okular mit dem dort angebrachten Schieber. Setzen Sie die Schieberegler unter dem Revolver auf „LSM“. Wählen Sie sinnvolle Filter und Spiegel und drücken Sie unter *Scan Control* den „Fast“ Button. Nun wird kontinuierlich ein Bild aufgebaut. Verändern Sie die Scanparameter und beobachten Sie die Wirkung. Sie können den Rastervorgang jederzeit mit der „Stop“-Taste unterbrechen. Ein einzelnes Bild machen Sie mit dem „I/1“-Button. Notieren Sie sich die sinnvollen Einstellungen und legen Sie den gefärbten Gewebeschnitt auf. Wählen Sie wiederum Ausschnitt und Objektiv auf konventionelle Art, wechseln Sie dann in den LSM-Modus und nehmen Sie ein Bild unter optimalen Bedingungen (Auflösung, Schärfe, Rauschen, Belichtung) auf. Speichern Sie dieses Bild in einer Datenbank ab: File → Save as → New MDB. Machen Sie einen nach Ihnen benannten neuen Ordner in *Big (H:)\User*. Geben Sie zunächst der Datenbank einen sinnvollen Namen, z. B. das Datum oder das Oberthema, und dann dem soeben aufgenommenen

Bild, z. B. „Bulb“.

Für die Aufnahme der fluoreszenten Kügelchen bleiben Sie im LSM-Modus, legen Sie das Objekt auf und öffnen Sie die konfokale Lochblende maximal. Beginnen Sie mit einem niedrigen Zoom-Faktor. Wenn Sie die Ebene mit den Kügelchen gefunden haben, verringern Sie nach und nach den Durchmesser der konfokalen Lochblende. Wählen Sie einen Ausschnitt mit möglichst vielen voneinander getrennten Kügelchen. Setzen Sie dabei den Zoom-Faktor auf „4“ und die Pixelauflösung auf $1024 \times ?$. Verringern Sie den Durchmesser der konfokalen Lochblende weiterhin, fokussieren Sie ggf. nach. Ändern Sie bei Bedarf „gain“ und Laseranregungsintensität, bedenken Sie aber, dass eine zu hohe Anregungsintensität den Farbstoff bleicht. Verlängern Sie die Pixelbelichtungszeit bei niedriger Intensität. Schließen Sie die konfokale Lochblende soweit, bis sich die Kügelchen kaum noch ausmachen lassen. Machen Sie ein Bild und speichern Sie dieses ab. Setzen Sie alle Werte zurück, wählen Sie einen neuen Ausschnitt und minimieren Sie wieder die Lochblende. Wählen Sie unter *Z Stack* geeignete Parameter für einen Bildstapel, nehmen Sie diesen auf und speichern Sie ihn ab.

Für das grobe Bestimmen der Ausdehnung der Beugungsscheibchen können Sie z. B. den Zoom in Kombination mit der Lineal-Funktion, die sich hinter dem *Overlay*-Button verbirgt, verwenden.

Wiederholen Sie nun diesen Versuch unter Verwendung eines Objektivs mit anderer numerischer Apertur.

Zum Ausschalten schalten Sie zunächst die Laser aus. Diese benötigen etwa fünf Minuten zum Abkühlen. Anschließend fahren Sie den Computer herunter, schalten diesen aus und setzen den „Remote Control“-Button auf „O“.

[bas03] *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen*. ZEISS-Broschüre, September 2003.

[Hec05] HECHT, EUGENE: *Optik*. Oldenbourg, München, Februar 2005.

[Ino95] INOUÉ, SHINYA: *Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy*. In: PAWLEY, JAMES B. (Herausgeber): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York, 1995.

[Lak99] LAKOWICZ, JOSEPH R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Zweite Auflage, 1999.

[Nie04] NIEDRIG, HEINZ (Herausgeber): *Optik*, Band 3 der Reihe *Bergmann · Schaefer - Lehrbuch der Experimentalphysik*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 10. Auflage, 2004.

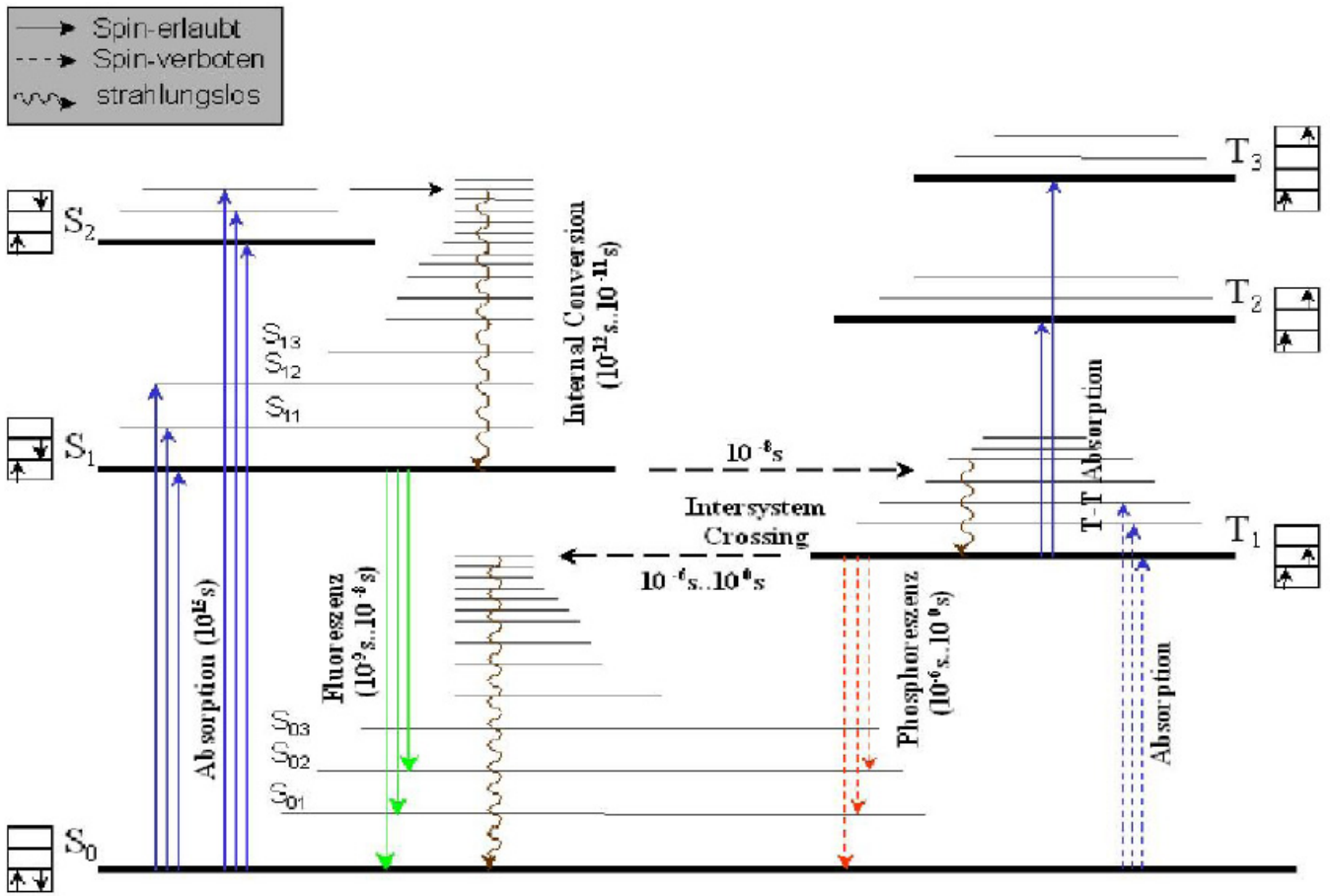


Abbildung 2: Jablonski-Diagramm der wesentlichen in der Photolumineszenz vorkommenden reversiblen Übergänge.

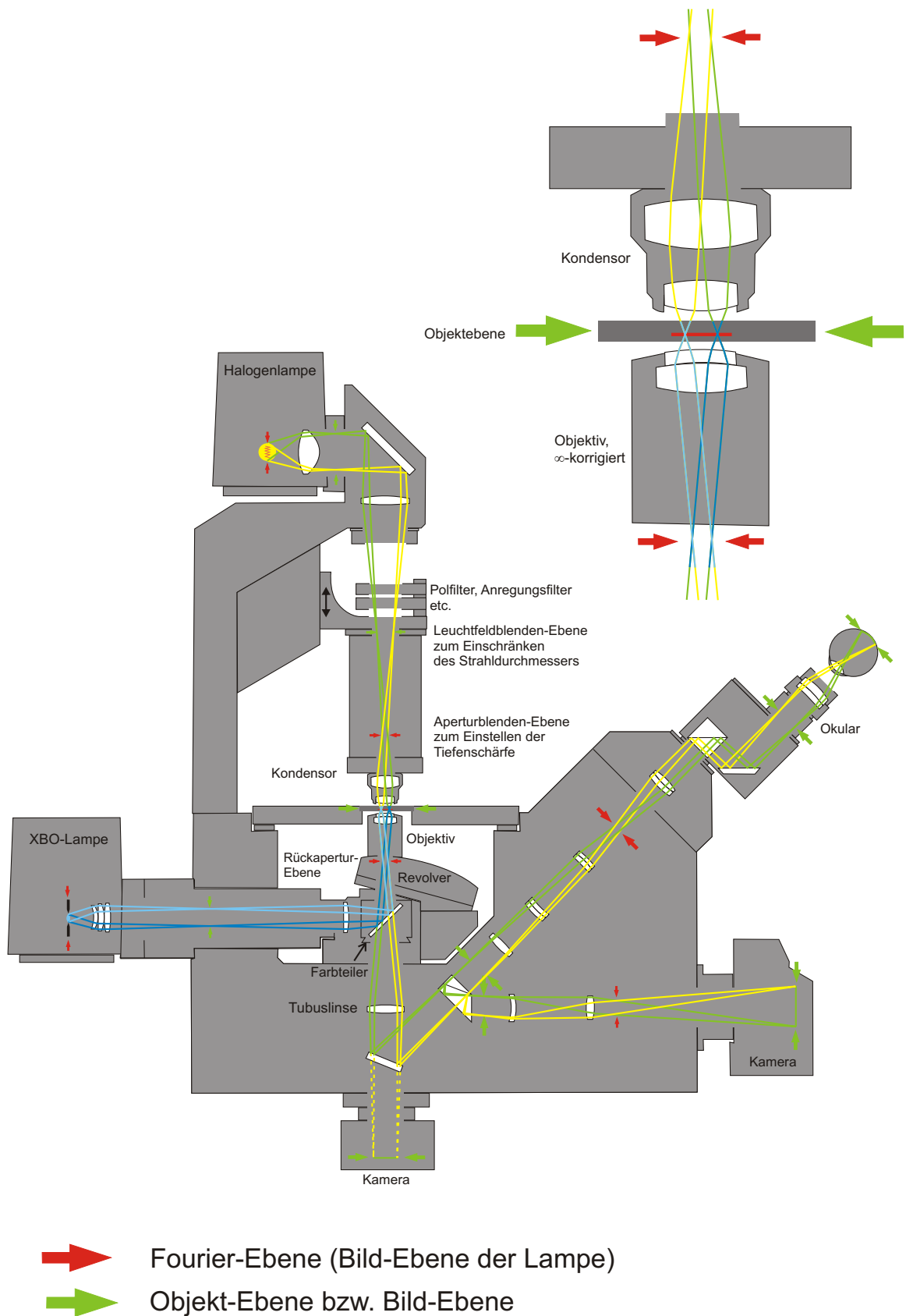


Abbildung 3: Strahlengang in einem konventionellen, inversen Mikroskop, hier beispielhaft in einem Axiovert 200 von ZEISS .

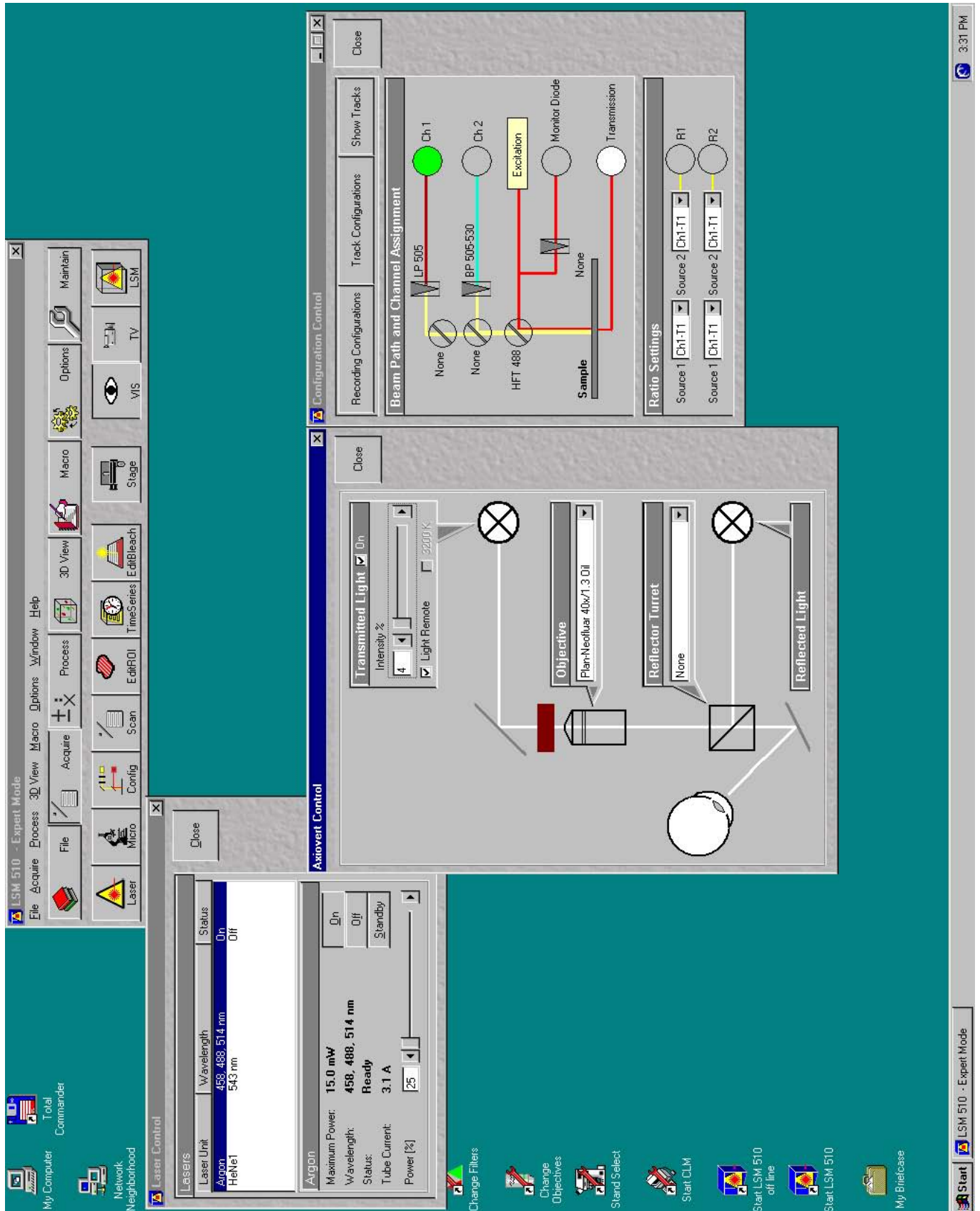


Abbildung 4: Screenshot für die Grundeinstellungsmenüs am konfokalen Laserrastermikroskop.

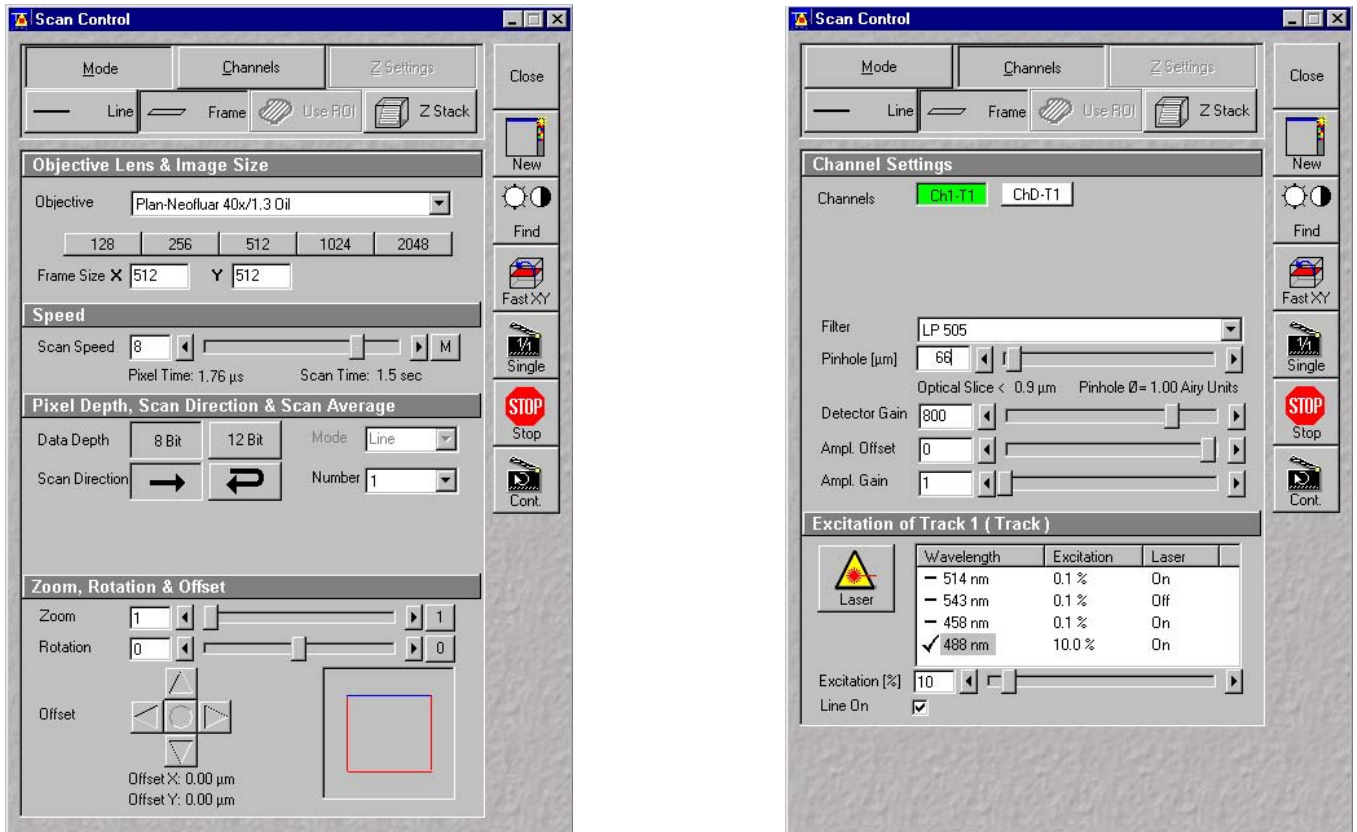


Abbildung 5: Die Menüs zur Einstellung der Rasterparameter.

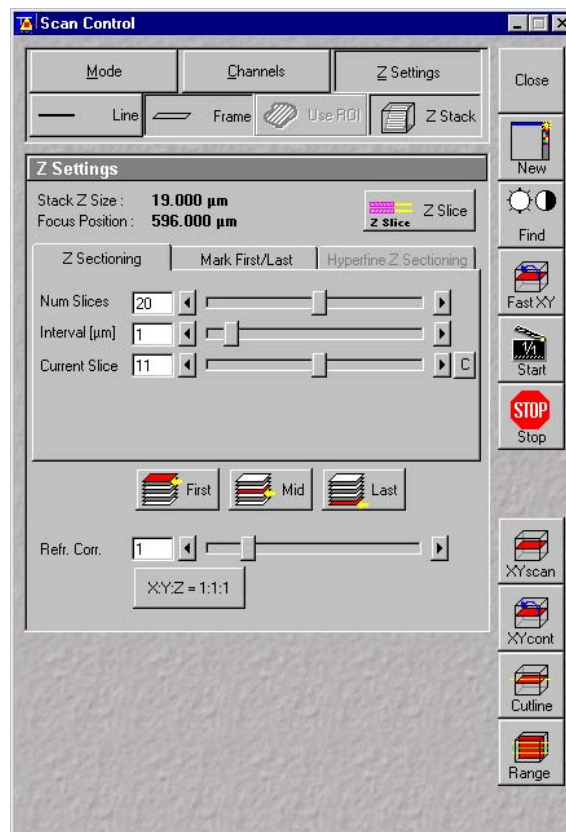


Abbildung 6: Das Menü zur Einstellung der Parameter für einen Bildstapel.