



ZEISS

GROSSE

LUMINESZENZ- EINRICHTUNG

CARL ZEISS
JENA

CZ 30 - 541 a - 1

Die Bilder sind nicht in allen Einzelheiten für die Ausführung des Gerätes maßgebend. Für wissenschaftliche Veröffentlichungen stellen wir Druckstöcke der Bilder oder Verkleinerungen davon — soweit sie vorhanden sind — gern zur Verfügung. Die Wiedergabe von Bildern oder Text ist ohne unsere Zustimmung nicht gestattet. Das Recht der Übersetzung ist vorbehalten.

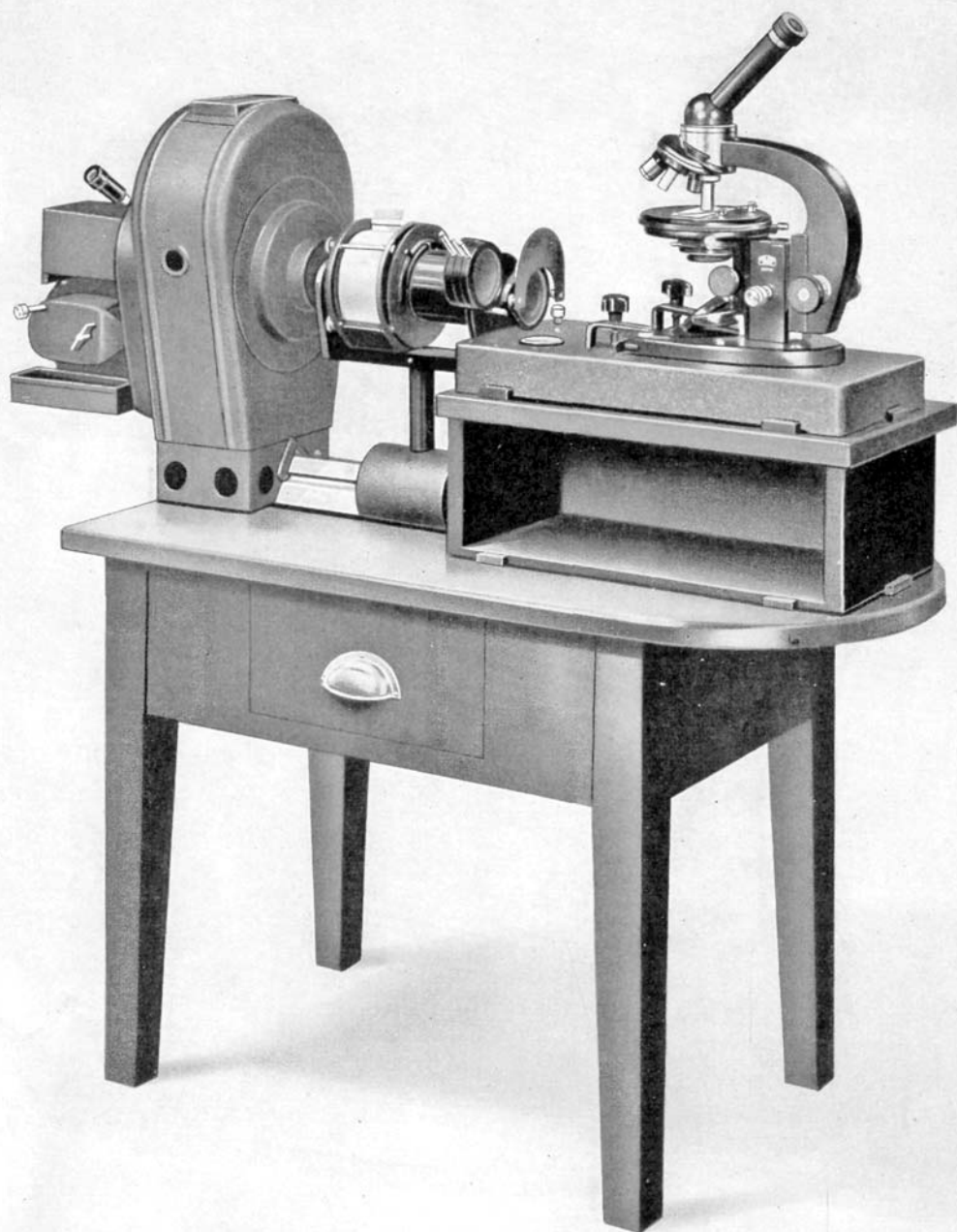
V E B C A R L Z E I S S J E N A

Abteilung für Mikroskopie

Drahtwort: Zeisswerk Jena

Fernsprecher 3541

Die große **LUMINESZ**



ENZ-EINRICHTUNG

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| 1. Prinzip lumineszenzmikroskopischer Beobachtung | 3 |
| 2. Einrichtung | 3 |
| 2.1 Lichtquelle | 3 |
| 2.2 Beleuchtungseinrichtung..... | 4 |
| 2.3 Mikroskop | 6 |
| 3. Durchfallendes Licht | 8 |
| 4. Präparate für durchfallendes Licht | 8 |
| 5. Auffallendes Licht | 9 |
| 6. Mikrophotographie mit dem Lumineszenzmikroskop | 12 |
| 7. Spektraluntersuchungen des Lumineszenzlichtes | 15 |
| 8. Dunkelfeldbeobachtung mit sichtbarem Licht | 16 |
| 9. Anweisung für die Aufstellung und Justierung der Einrichtung ... | 16 |
| 10. Grundlegende und zusammenfassende Arbeiten aus allen Gebieten der Lumineszenzmikroskopie..... | 20 |

1. Prinzip lumineszenzmikroskopischer Beobachtung

Im Gegensatz zu mikroskopischen Methoden, bei denen die Strahlen der Mikroleuchte durch das Objekt hindurch (Durchlicht) oder von der Oberfläche des Objektes zurückgeworfen (Auflicht) das Auge des Beobachters erreichen, handelt es sich beim Lumineszenzmikroskop um Lichterscheinungen, die im Objekt selbst durch intraatomare Umsetzungen entstehen. Dieses Licht, das Lumineszenzlicht, tritt in sehr vielen organischen und anorganischen Stoffen bei Bestrahlung mit gefiltertem Ultraviolettlicht (Woodlicht) oder Blaulicht auf. Es kann bei Anwendung geeigneter Lichtfilter mit jedem normalen Mikroskop beobachtet werden.

Es ist falsch, bei der Lumineszenzmikroskopie von Dunkelfeldbeleuchtung zu sprechen. Die Dunkelfeldmethode beruht darauf, daß sichtbares Licht, dessen Richtung an der Objektivöffnung vorbeiführt, an solchen Stellen des Präparates abgelenkt wird und in das Objektiv gelangt, die sich durch ihre optischen Konstanten vom umgebenden Medium unterscheiden. Im Lumineszenzmikroskop dagegen erscheinen keine beleuchteten, sondern selbstleuchtende Teilchen auf dunklem Grund. Feste, ungefärbte Partikel von der gleichen Brechungszahl und Durchlässigkeit wie das sie umgebende Medium sind im Dunkelfeld unsichtbar, können aber im Lumineszenzmikroskop sichtbar sein, wenn sie Fluoreszenzfähigkeit besitzen. Dabei ist es im Prinzip zunächst gleichgültig, ob der Kondensor des Lumineszenzmikroskops ein Hell- oder Dunkelfeldkondensor ist.

In jüngster Zeit erlebten die Methoden der Lumineszenzmikroskopie einen neuen Aufschwung, einmal durch die Untersuchung **Hagemanns**, dem es gelang, Protozoen, Bakterien und, was besonders hervorzuheben ist, auch Viruskörperchen auf diese Weise darzustellen, zum anderen durch die grundsätzlich neuen Erkenntnisse, die **Strugger** auf dem Gebiet der Vitalfärbung von Mikroorganismen und dem der Physiologie der Pflanzenzelle mit dem Lumineszenzmikroskop gewann.

2. Einrichtung

An der Lumineszenzeinrichtung unterscheidet man drei Hauptteile: Lichtquelle, Beleuchtungseinrichtung und Mikroskop.

2.1 Die Lichtquelle

Als Lichtquelle dient eine Kohlenbogenlampe mit Uhrwerk, die auf einer kurzen optischen Bank steht. Es hat sich gezeigt, daß der Kohlelichtbogen im

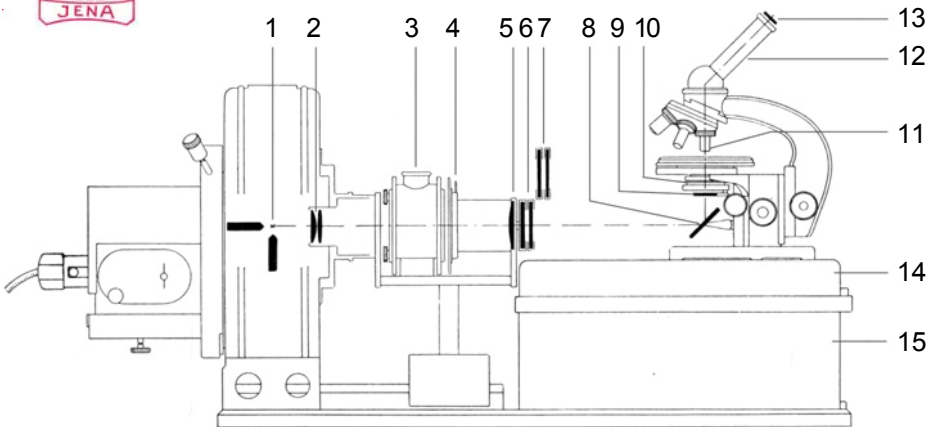


Bild 1. Aufbau der großen Lumineszenzeinrichtung

- | | |
|------------------------------------|--------------------------|
| 1 Bogenlampe | 9 Uranglas mit Ringmarke |
| 2 Hinterglied des Kollektors | 10 Mikroskopkondensor |
| 3 Küvette | 11 Objektiv |
| 4 Irisblende (Leuchtfeldblende) | 12 Okular |
| 5 Vorderglied des Kollektors | 13 Okularsperrfilter |
| 6, 7 Lichtfilter | 14 Grundplatte |
| 8 Mikroskopspiegel | 15 Aufsetzkasten |

langwelligem UV-Gebiet, das dem sichtbaren Spektrum dicht benachbart ist, sehr intensiv und für die Anregung der Lumineszenz besonders gut geeignet ist. Die beste Lichtausbeute erzielt man mit einer Gleichstromlampe, die vorübergehend überlastet werden kann, um eine noch größere Intensität im Ultraviolett zu bekommen.

Da in den meisten Fällen die Benutzer unserer Geräte nur über Wechselstromanschluß verfügen, wird die große Lumineszenzeinrichtung mit einer Wechselstromlampe 10 A ausgerüstet.

2.2 Beleuchtungseinrichtung

Die Beleuchtungseinrichtung besteht aus Kollektor, Leuchtfeldblende, Küvette und Beleuchtungsfiltren. Alle diese Teile stehen mit einem gemeinsamen Reiter auf der optischen Bank.

Der Bogenlampe zunächst befindet sich das zweilinsige Hinterglied des Kollektors, das das einfallende Licht annähernd gleichlaufend richtet. Das Licht durchsetzt dann die Küvette, die mit einer 1- bis 3%igen Kupfersulfatlösung gefüllt wird. Die Konzentration der Lösung richtet sich nach den Eigenschaften des Objektes und der angewendeten Lichtfilter. Durch einige Versuche findet man leicht die jeweils günstigste Konzentration. Sie ist erreicht, wenn das Objekt hell auf möglichst dunklem Untergrund erscheint. Die blaue Kupfersulfatlösung absorbiert von dem hindurchgehenden Licht alles Rot und Infrarot und verhindert damit eine Überhitzung der wärmeempfindlichen Lichtfilter und des Präparates.

Da nach längerem Gebrauch die Kupfersulfatlösung an Durchlässigkeit für Ultraviolett verliert, ist es ratsam, sie von Zeit zu Zeit zu erneuern. Zu verwenden sind stets chemisch reines Cuprum sulfuricum und destilliertes Wasser. Zur Klärung werden der Lösung einige Tropfen reiner Schwefelsäure zugesetzt.

Der Küvette folgt eine Irisblende, die als Leuchtfeldblende dient. Sie wird durch den Kondensator des Mikroskops im Präparat scharf abgebildet. Durch Schließen dieser Blende wird das ausgeleuchtete Feld im Präparat kleiner, aber nicht dunkler. Man wird hiervon Gebrauch machen müssen, wenn man störendes Lumineszenzlicht beseitigen will, das bei zu großem, bestrahltem Feld in der Umgebung der betrachteten Objektstelle entsteht und unangenehme Überstrahlungen verursachen kann, oder um noch nichtuntersuchte Teile des Präparates vor unnötiger Bestrahlung zu schützen. Vor der Leuchtfeldblende steht eine plankonvexe Sammellinse, das Vorderglied des Kollektors. Hierdurch wird die Lichtquelle (der Krater der waagrecht liegenden Kohle) in die Aperturblendenebene des Kondensators abgebildet. Die Beobachtung erfolgt mit Hilfe der beigegebenen Uranglasplatte, die man zur Zentrierung des Lichtbogenabbildes vor Beginn der Beobachtung in den Blendenträger des Abbeschen Beleuchtungsapparates am Mikroskop einlegt. Während der eigentlichen Untersuchung wird die Uranglasplatte ausgeschwenkt.

Vor dem Kollektor sind die Ultraviolett- und Blaufilter in wegklappbaren Fassungen auswechselbar angeordnet. Sie absorbieren das durch die Küvette kommende Licht außer Ultraviolett bzw. Blau.

Die Farbfilterausrüstung der großen Lumineszenzeinrichtung besteht aus zwei ultraviolettdurchlässigen Filtern (Schott UG 1) von 3,5 und 1,5 mm Dicke und zwei Blaufiltern (Schott BG 3) von 4,0 und 2,0 mm Dicke, die wahlweise vorgeschaltet werden können. Der Beobachter ist also in der Lage, zwischen drei Dicken jeder Filterart zu wählen. Für Sonderzwecke können die Filter der normalen Ausrüstung (von 55 mm Durchmesser) gegen solche anderer Glasart ausgetauscht werden.

2.3 Mikroskop

Als Mikroskop kann jedes normale Modell benutzt werden, das mit einem in der Höhe verstellbaren Abbeschen Beleuchtungsapparat ausgerüstet ist. Die Anschlüsse für das Mikroskop an der Grundplatte sind für die Maße unserer Stative eingestellt. Sollen fremde Stative benutzt werden, müssen die Anschlüsse verändert, notfalls das Gerät zur Anpassung eingeschickt werden. Das im Präparat entstehende Lumineszenzlicht gehört dem sichtbaren Spektrum an, deshalb werden zur Beobachtung normale Objektive und Okulare benutzt. Es kann gelegentlich vorkommen, daß der in Achromaten und Fluoritsystemen verwendete Flußspat fluoresziert, so daß die Klarheit der mikroskopischen Abbildung leidet. Die Eigenfluoreszenz eines Objektivs läßt sich mit einem Deckglas aus UV-undurchlässigem Glas ausschalten, das das Erregerlicht am Eintritt in das Objektiv hindert.

Als Okulare können sämtliche gängigen Typen angewendet werden, soweit sie korrektionsmäßig zu den Objektiven passen. Okulare enthalten niemals Flußspat.

Sollen unbedeckte Präparate untersucht werden, z. B. bakterielle Ausstriche, ist noch folgendes zu beachten:

Die normalen stärkeren Trockensysteme sind für Präparate gerechnet, die mit einem Deckglas von 0,17 mm Dicke bedeckt sind. Fehlt dieses oder ist es zu dick, kann bei Anwendung solcher Objekte eine merkliche Verschlechterung der Abbildung eintreten. Es ist deshalb empfehlenswert, in diesen Fällen Immersionsobjektive anzuwenden, da hier das fehlende Deckglas durch die Immersionsflüssigkeit ersetzt wird. Als Immersionsmittel kann man nur fluoreszenzfreies Öl benutzen. Das gewöhnliche Zedernholzöl ist infolge seiner starken Eigenfluoreszenz völlig unbrauchbar. Auch für Kondensorimmersion ist es unter keinen Umständen zu verwenden.

Um gewöhnliche Immersionsobjektive für bedeckte und unbedeckte Präparate brauchbar zu machen, führen wir fluoreszenzfreies Öl in zwei Qualitäten:

mit der Brechungszahl $n_D = 1,515$ für Präparate mit Deckglas

mit der Brechungszahl $n_D = 1,52$ für Präparate ohne Deckglas

Mit der etwas höheren Brechungszahl wird die durch das Fehlen des Deckglases bedingte sphärische Unterkorrektion des Objektivs ausgeglichen. Ist bei der Untersuchung unbedeckter Präparate, z. B. bei laufender Tbc-Untersuchung, die Anwendung eines Immersionssystems nicht erwünscht, so empfiehlt sich die Benutzung unseres für diese Zwecke entwickelten Spezialachromaten 40/0,95 für unbedeckte Objekte.

Bild 2

Blutgefäß vom Molch ♀ quer

Coriphosphin O/Ultraviolett

Abb.-Maßstab 150 :1

Agfa Isopan F, 10 s

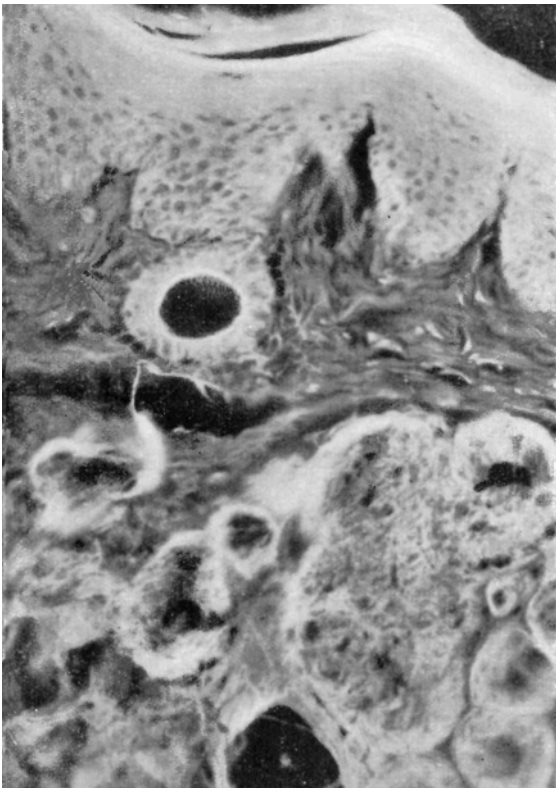
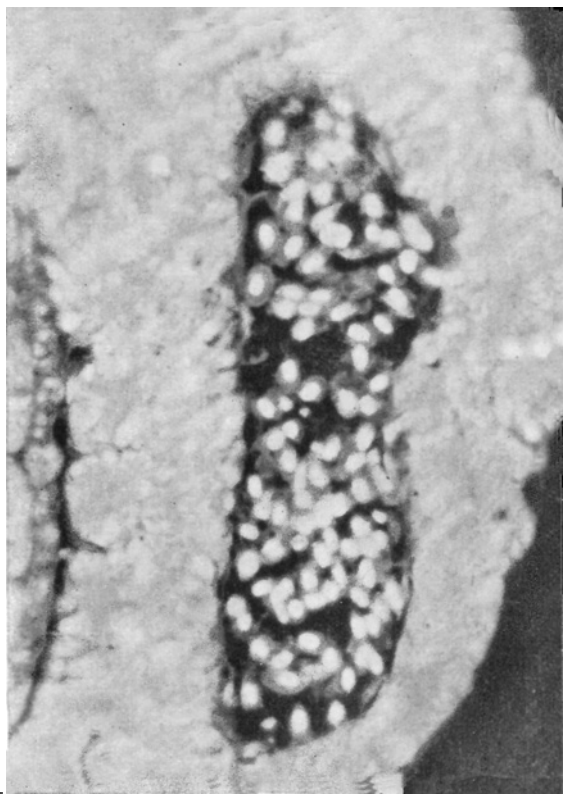


Bild 3

Kaninchen, Zunge quer

Coriphosphin O/Ultraviolett

Abb.-Maßstab 150 :1

Agfa Isopan FF, 1 min

3. Durchfallendes Licht

Die Grundplatte mit dem Mikroskop steht auf einem Aufsetzkasten vor der Schiene der optischen Bank. Kasten und Platte sind durch Anschläge in ihrer richtigen Lage gesichert. Im Blendenträger des Abbeschen Beleuchtungsapparates liegt die Uranglasplatte mit Ringmarke. Sie dient zum Justieren der Beleuchtung und ist während des Beobachtens auszuklappen. Man beobachtet sie am besten in einem Spiegel, den man auf den Fuß des Mikroskops legt. Die Intensität des Lumineszenzlichtes ist um so größer, je größer die Apertur des Kondensors ist. Durch Schließen der Kondensorblende (Aperturblende) kann eine gleichmäßige Schwächung des Erregerlichtes erzielt werden, ohne daß an der Größe des Leuchtfeldes und an der Güte der Abbildung etwas geändert wird. Da die Lumineszenzerscheinungen (Lumineszenzlicht) jedoch immer sehr lichtschwach sind, empfiehlt es sich, die Aperturblende **stets ganz geöffnet** zu halten. Auf den Kontrast des Bildes hat die Aperturblende im Gegensatz zur Hellfeldmikroskopie **keinen Einfluß**.

Da der Kondensor im Interesse einer großen Lichtausbeute ein Hellfeldkondensor ist, gelangt noch ein verhältnismäßig großer Teil der erregenden Strahlung durch das Mikroskop hindurch. Um zu verhüten, daß sie auch das Auge des Beobachters erreicht, wird über das Okular ein Sperrfilter gesteckt, das nur Fluoreszenzlicht durchläßt, alles Erregerlicht jedoch absorbiert. Ohne diese Schutzmaßnahme würde durch Ultraviolett im Auge selbst eine sehr störende Fluoreszenz bzw. bei Blaulichterregung eine Überstrahlung des erregten Fluoreszenzlichtes durch das Erregerlicht auftreten. Auch ein Dunkelfeldkondensor verhindert das Auftreten dieser störenden Erscheinungen nicht, er würde nur die Helligkeit der Lumineszenzabbildung erheblich schwächen.

4. Präparate für durchfallendes Licht

Man unterscheidet bei biologischen Objekten primäre und sekundäre Fluoreszenz. Unter primärer oder Eigenfluoreszenz wird das Leuchten unbehandelter, d. h. chemisch nicht vorbereiteter, Präparate verstanden, unter sekundärer das Fluoreszieren der Objekte nach „Färben“ mit sogenannten Fluorochromen (**Haitinger**).

Viele Teile des Pflanzenkörpers fluoreszieren in dünnen Schnitten schon primär. Häufig kann man dabei erstaunlich farbenprächtige Bilder beobachten. Im Gegensatz dazu fluoreszieren tierische Gewebe meist erst nach Behandlung mit bestimmten Fluorochromen. Wegen der Stoffe und Methoden, die hier in Betracht kommen, muß auf das Schrifttum verwiesen werden, das

wir in einer Sonderdruckschrift zusammengestellt haben. Einige wichtige oder zusammenfassende Arbeiten sind am Schluß dieser Druckschrift genannt.

Am hellsten pflegen Objekte zu fluoreszieren, die trocken in Luft liegen. Je stärker das Präparat durch Einschlußmittel aufgehellt wird, desto schwächer erscheint in der Regel die Fluoreszenz. Einschlußmittel mit Eigenfluoreszenz, wie Kanadabalsam, Zedernholzöl und verschiedene andere Stoffe sind unbrauchbar. Geeignet dagegen sind reines Wasser, Glycerin, fluoreszenzfreies Paraffinöl und fluoreszenzfreies Immersionsöl. Die Präparate können mit Deckglaskitt, Paraffin oder Wachs umrandet werden.

Die meisten käuflichen Objektträger bestehen aus fluoreszenzfreiem Glas und sind deshalb ohne weiteres zu verwenden, desgleichen genügen gewöhnliche Deckgläser völlig. Bei ihrer Anwendung muß man das Okularsperrfilter benutzen.

Es ist manchmal wünschenswert, vor Beginn der Fluoreszenzbeobachtung" die Präparate im normalen Hellfeld zu beobachten. Zu diesem Zweck klappt man einfach die Farbfilter aus und setzt das beigegebene Neutralglas auf das Okular auf.

Sollte die Kupfersulfatlösung stören, so entfernt man die Küvette bzw. ersetzt die Kupfersulfatlösung durch destilliertes Wasser. (Hierbei sei bemerkt, daß die Farbfilter sich infolge ihrer Rotabsorption leicht bis zum Zerspringen erhitzen, wenn man sie ohne zwischengeschaltete Wasserschicht benutzt.)

5. Auffallendes Licht

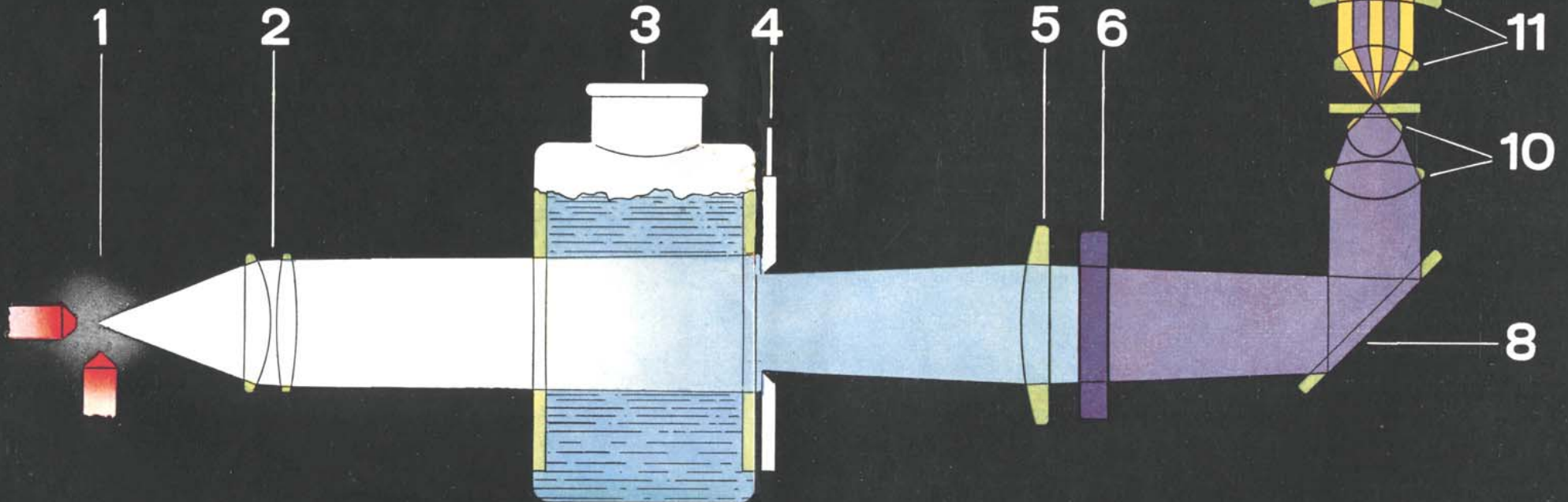
Ebensogut wie für durchfallendes Licht eignet sich die Lumineszenzmikroskopie auch für auffallendes Licht zur Beobachtung undurchsichtiger Objekte. Am Prinzip ändert sich dabei nichts. Nur die Art der Objekte bedingt den verschiedenen **Aufbau** der Einrichtung.

Bei Verwendung auffallenden Lichtes steht die Grundplatte für das Mikroskop direkt auf der Tischplatte, der Aufsetzkasten fällt weg. An Stelle des Objektivrevolvers tritt hier ein Auflichtkondensator oder ein Vertikalilluminator, von dem die Beleuchtungseinrichtung abgenommen wurde. Der Hell-Dunkelfeldschieber soll aus dem Epikondensator entfernt werden, so daß also Hellfeld- und Dunkel-feldbeleuchtung gleichzeitig benutzt wird. Sonst arbeitet man bei Trockensystemen besser mit Dunkel-feld, bei Immersionen mit Hellfeld. Weiter soll aus dem Beleuchtungshohlspiegel die ringförmige Mattscheibe entfernt werden. Dadurch wird zwar das beleuchtete Feld kleiner, die Fluoreszenzhelligkeit

Lichtfilterwirkung in der großen Lumineszenzeinrichtung

- 1 Bogenlampe
- 2 Hinterglied des Kollektors
- 3 Küvette
- 4 Irisblende (Leuchtfeldblende)
- 5 Vorderglied des Kollektors
- 6 Lichtfilter

- 8 Mikroskopspiegel
- 10 Mikroskopkondensator
- 11 Objektiv
- 12 Okular
- 13 Okularsperrfilter



aber merklich größer. Zur Zentrierung der Beleuchtung dient die vorher erwähnte Uranglasplatte, die hier in den Beleuchtungsstützen des Auflichtkondensators eingesetzt wird.

Mit dem Grobtrieb wird der Tubus so eingestellt, daß das Licht gut auf die Mitte der Uranglasplatte fällt. Danach darf am Grobtrieb nichts mehr verstellt werden, alle weiteren Einstellungen erfolgen am Tisch oder am Feintrieb. Die Höhe der Tischverstellung richtet sich nach der Dicke der Objekte, der Tischtrieb dient dabei als Grobtrieb. Die Feineinstellung wird wie üblich mit dem Feintrieb vorgenommen.

6. Mikrophotographie mit dem Lumineszenzmikroskop

Wie fast alle vom Mikroskop erzeugten Abbildungen lassen sich auch die des Lumineszenzmikroskops photographisch festhalten. Neuerdings ist es sogar gelungen, im Lumineszenzmikroskop mikrokinematographische Aufnahmen mit dem Zeitraffer herzustellen. Da die Intensität des Fluoreszenzlichtes gewöhnlich sehr gering ist, müssen höchstempfindliche Platten oder Filme verwendet werden. Kommen rote Fluoreszenzfarben vor, nimmt man zweckmäßig panchromatisches Material, sonst sind orthochromatische Emulsionen praktischer, da wegen ihrer Unempfindlichkeit im Rot die Konzentration der Kupfersulfatlösung und die Dicke der Farbfilter im Interesse einer größeren Lichtausbeute geringer gewählt werden kann. Um die Belichtungszeiten möglichst zu verkürzen, ist es empfehlenswert, das Kleinbildformat zu benutzen. Da die Belichtungszeiten sich zueinander ungefähr wie die belichteten Flächen verhalten, erfordert eine Platte 9×12 die 12fache Belichtungszeit eines Kleinbildfilms. Hierbei ist vorausgesetzt, daß die beiden Emulsionen die gleiche Empfindlichkeit haben und auf beiden Negativen der gleiche Ausschnitt des Präparates abgebildet wird. Dagegen muß der Kleinbildfilm ebensolange wie eine große Platte belichtet werden, wenn beide sich in der gleichen Entfernung vom Okular befinden, d. h., wenn der Abbildungsmaßstab der gleiche ist und also auf dem Kleinbild ein entsprechend kleinerer Ausschnitt festgehalten wird. Ein weiteres Mittel, die Belichtungszeiten zu verkürzen, ist die Benutzung von Objektiven hoher Apertur, wie sie die Achromate darstellen.

Für die Belichtungsdauer gibt es keine allgemeingültigen Regeln, sie muß durch Probeaufnahmen von Fall zu Fall ermittelt werden. Gewisse Anhalte über die Größenordnung der Belichtungszeiten mögen die gezeigten Aufnahmen geben.

Die Filterzusammenstellung für subjektive Beobachtung ist für die photographische Aufnahme desselben Objektes nicht immer geeignet. Um eine

möglichst große Intensität des Erregerlichtes zu erzielen, wird man auf ein zu strenges BeleuchtungsfILTER verzichten, da dieses die Helligkeit des Fluoreszenzbildes merklich herabsetzt. Rote Fluoreszenzfarben, z. B. von Porphyrinen und Chlorophyll, gestatten die Anwendung besonders heller BeleuchtungsfILTER. Das Okularsperrfilter muß dann entsprechend streng, am besten rot, sein. Auch Farbaufnahmen lassen sich mit dem Lumineszenzmikroskop machen. Man wählt zweckmäßig die für Kunstlicht bestimmten Filmsorten.

Weil das Auge eine andere Farbenempfindlichkeit als die photographische Schicht besitzt, kann man die Zusammenstellung der Filter nicht nach dem subjektiven Eindruck der Abbildung im Mikroskop oder auf der Einstellfläche treffen, sondern muß die Wirkung auf dem Negativmaterial ausprobieren, das man verwenden will. Sollte in einzelnen Fällen das beigegebene Sperrfilter GG 9 zuviel Erregerlicht durchlassen und damit keine brauchbaren Aufnahmen ergeben, benutzt man das strengere Filter GG 11. Da dieses jedoch Eigenfluoreszenz hat, muß man, wie auch beim OG 1 bei subjektiver Beobachtung, das GG 9 vorschalten, um diese Eigenfluoreszenz zu beseitigen.

Zur Ermittlung der Belichtungszeit und der richtigen Filterzusammenstellung dient die bekannte Belichtungsreihe. Man sucht für die Probeaufnahme nach Möglichkeit einen solchen Teil des Objektes auf, der außer den fluoreszierenden Stellen auch noch ein ausreichend großes Stück des dunklen Hintergrundes darstellt. Den endgültig aufzunehmenden Teil des Objektes setzt man besser nicht schon bei der Probeaufnahme dem Erregerlicht aus, da man vorher nie genau weiß, ob nicht das Objekt strahlungsempfindlich ist.

Als Mikrophotokamera eignet sich, wie schon gesagt, am besten eine Kleinbildkamera. In Frage kommen entweder Spiegelreflexkameras mit Klarscheibe oder andere Kleinbildkameras in Verbindung mit unserer Universal-Aufsetzkamera „Miflex“ mit Einstellfernrohr.¹⁾ Das kleine Format erlaubt verhältnismäßig kurze Belichtungszeiten (s. S. 12). Die Beobachtung auf der Klarscheibe ist deshalb notwendig, weil lichtschwache Fluoreszenzerscheinungen, wie sie z. B. Bakterien bieten, von der Mattierung verschluckt oder doch so geschwächt werden, daß eine einwandfreie Einstellung nicht möglich ist. Man ist immer wieder auf das Einstellen mit der Lupe auf der Klarscheibe oder mit dem Einstellfernrohr angewiesen.

Die Zeiss-Vertikalkamera „Standard“ bietet natürlich auf ihrer Klarglasscheibe an sich eine gute Einstellmöglichkeit; sie weist aber die oben erwähnten Nachteile der langen Belichtungszeiten und, im ursächlichen Zusammenhang damit, auch sehr lichtschwache Einstellbilder auf.

¹⁾ s. Druckschrift CZ 30-605a-1.

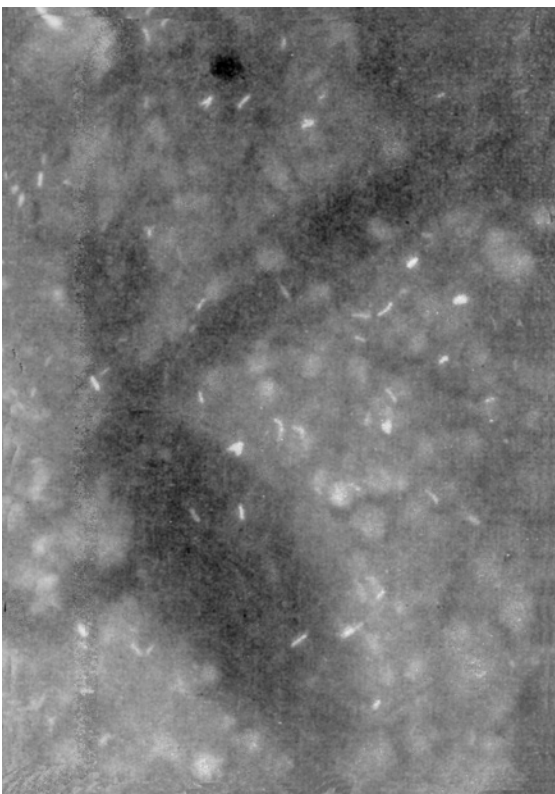


Bild 5

Mykob. tub. hom. Sputumausstrich

Auramin, Blaulicht

Abb.-Maßstab 300 :1

Agfa Isopan F, 1 min

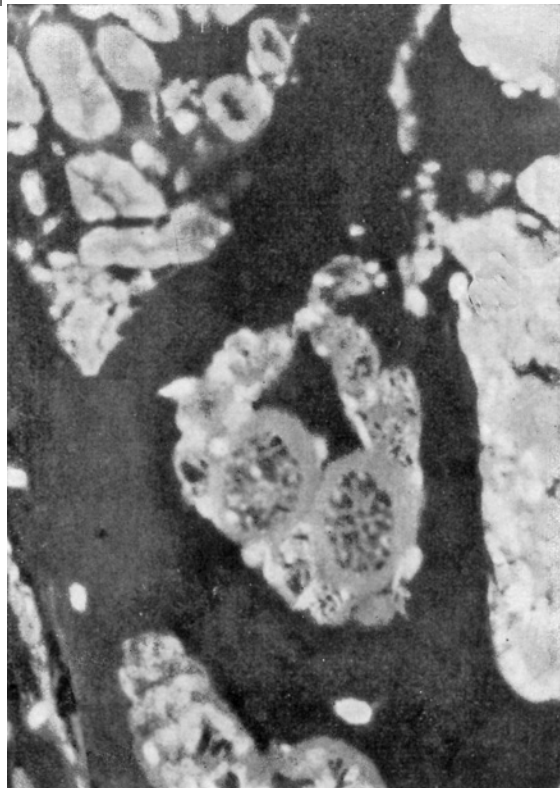
Bild 6

Molch, Ovar quer

Coriphosphin O/Ultraviolett

Abb.-Maßstab 150 :1

Agfa Isopan F, 40 s



Ihre Laufstange kann ohne weiteres an Stelle der Spezialschraube an der linken Ecke der Grundplatte eingesetzt werden. (Näheres hierüber auf Anfrage.)

Die große Lumineszenzeinrichtung läßt sich in Anbetracht der großen Helligkeit der Bogenlampe in Verbindung mit der Standard-Kamera vorzüglich als Mikrophotoeinrichtung für höchste Ansprüche anwenden.

7. Spektraluntersuchungen des Lumineszenzlichtes

Physiologische Zustände oder Abläufe drücken sich im lumineszenzmikroskopischen Abbild häufig durch Änderungen der Wellenlängen des ausgestrahlten Lichtes aus, vor allem, wenn man zur Fluorochromierung Indikatorfarbstoffe benutzt, wie sie **Strugger** und seine Mitarbeiter gefunden haben. Die genaue Analyse dieser Wellenlängenschwankungen erfolgt durch spektroskopische oder spektrographische Untersuchung. Hierzu wird das geradsichtige Handspektroskop mit Hilfe seines Halters am Tubus befestigt. Der Halter besitzt ein Gelenk zum Wegklappen. Für spektrographische Untersuchungen wird oberhalb des Spektroskops die zugehörige Kamera an einer Laufstange befestigt, die an Stelle der erwähnten Spezialschraube in die Grundplatte eingesetzt werden kann.

Zusammen mit dem Spektrum kann eine Wellenlängenteilung beobachtet oder photographiert werden, die sich in dem seitlichen Rohr des Spektroskops befindet und von unten mittels eines Prismas beleuchtet wird. Das Spektroskop wird hier als sogenanntes Pupillenspektroskop angewendet. Es soll so eingestellt sein, daß sich die Austrittspupille des Mikroskops, der Ramsdensche oder Augenkreis, im Spalt des Spektroskops befindet.

Weiter soll in der oberen spaltförmigen Abschlußblende ein Abbild des Objektes entstehen, das man bequem mit einer Lupe beobachten kann. Alles Licht, das von dem Abbild ausgeht, trägt zur Erzeugung des Spektrums bei. Das Pupillenspektroskop gibt also einen mittleren Farbwert aller in der Pupille sichtbaren Objektteile.

Da man jedoch im allgemeinen nur die Farbänderungen gleichartiger Objektteile zu untersuchen haben wird, ist es erforderlich, daß nur gleichartig fluoreszierende Strukturen in der Abschlußblende sichtbar werden. Störende Reste anders leuchtender Substanzen lassen sich durch Einlegen Ehrlichscher Blenden in das Okular beseitigen. Das Spektrum ist um so heller, je dichter die leuchtende Substanz darin verteilt ist, d. h. je weniger dunkle, völlig leere Stellen darin vorkommen.

Das Pupillenspektroskop ist besonders dann mit Vorteil anzuwenden, wenn die zu untersuchende Substanz in so großer Menge vorliegt, daß eine

mikroskopische Einrichtung eigentlich entbehrlich wäre. Aber das Lumineszenzmikroskop bietet die Möglichkeit, mit dem Kondensator ein kleines Feld intensiv zu bestrahlen und dadurch eine sehr helle Fluoreszenz zu erzeugen.

8. Dunkelfeldbeobachtung mit sichtbarem Licht

Die hier beschriebene große Lumineszenzeinrichtung ist hervorragend geeignet für Untersuchungen im Dunkelfeld mit sichtbarem Licht. Der Hellfeldkondensator wird durch den Kardiodkondensator ersetzt und gibt in Verbindung mit der Bogenlampe sehr lichtstarke und kontrastreiche Abbildungen. (Näheres über den Kardiodkondensator enthält die Druckschrift CZ 30-G 306-1.)

9. Anweisung für die Aufstellung und Justierung der Einrichtung

Auf die Tischplatte mit der Schiene der optischen Bank wird der Aufsetzkasten so gestellt, daß er an den beiden Anschlängen links und dem Anschlag am vorderen Ende der Tischplatte anliegt. Er wiederum trägt auf seiner Oberseite entsprechende Anschlüsse für die Grundplatte, die genauso liegen müssen. Mit diesen Anschlüssen richtet man die Grundplatte aus.

Das Mikroskop wird auf die Grundplatte wie üblich gegen die Anschlüsse gestellt und festgeschraubt.

Die Beleuchtungseinrichtung auf Reiter setzt man mit der Filteranordnung zum Mikroskop hin so auf die Schiene und läßt sie die Grundplatte etwas überragen. Danach wird die Bogenlampe so aufgesetzt, daß ihr Fuß mit dem Ende der Schiene abschneidet und mit der Klemmschraube im Fuß festklemmt.

In den Blendenträger des Abbeschen Beleuchtungsapparates ist die beigegebene Uranglasplatte einzulegen.

Nach Einschalten der Bogenlampe, die man über den beigegebenen Widerstand an das Wechselstromnetz anschließt, leuchtet das Uranglas hellgrün auf. (Bei Anschluß an Gleichstrom muß darauf geachtet werden, daß die waagerechte Kohle heller glüht als die senkrechte. Durch Umstecken des Netzsteckers oder des Gerätesteckers an der Bogenlampe — Umpolen — läßt sich das erreichen.)

Durch Verschieben der Beleuchtungseinrichtung auf der optischen Bank wird der Krater der waagerechten Kohle auf dem Spiegel des Mikroskops abgebildet. Das ist erreicht, wenn der Lichtfleck die kleinste Ausdehnung und größte Helligkeit angenommen hat. Mit den Zentrierschrauben der Bogenlampe ist der Lichtfleck genau in die Mitte des Spiegels zu rücken. Dann



bringt man den Lichtfleck durch Verstellen des Mikroskopspiegels in die Mitte der Uranglasplatte, die man dabei mit einem auf den Fuß des Mikroskops gelegten Spiegel beobachtet. Am besten ist es, wenn man diese Manipulation bei völlig geöffneter Leuchtfeldblende und vorgeschaltetem Ultraviolettfiter vornimmt.

Nach der Zentrierung schlägt man das Uranglas zur Seite und stellt das Präparat zunächst mit schwacher Gesamtvergrößerung und aufgesetztem Okularsperrfilter ein. Bei sehr lichtschwachen Objekten benutzt man am besten vorher ein stark fluoreszierendes Testobjekt, wie Anthracen oder Zinkoxyd in Luft oder fluoreszenzfreiem Paraffinöl. Durch Heben und Senken des Kondensors stellt man die größtmögliche Fluoreszenzhelligkeit ein, die Kondensordblende bleibt dabei geöffnet. Auftretende Überstrahlung durch besonders hell fluoreszierende Teilchen beseitigt man durch Zuziehen der Leuchtfeldblende.

Um überhaupt beobachten zu können, ist auf die richtige Zusammenstellung der Filter zu achten.

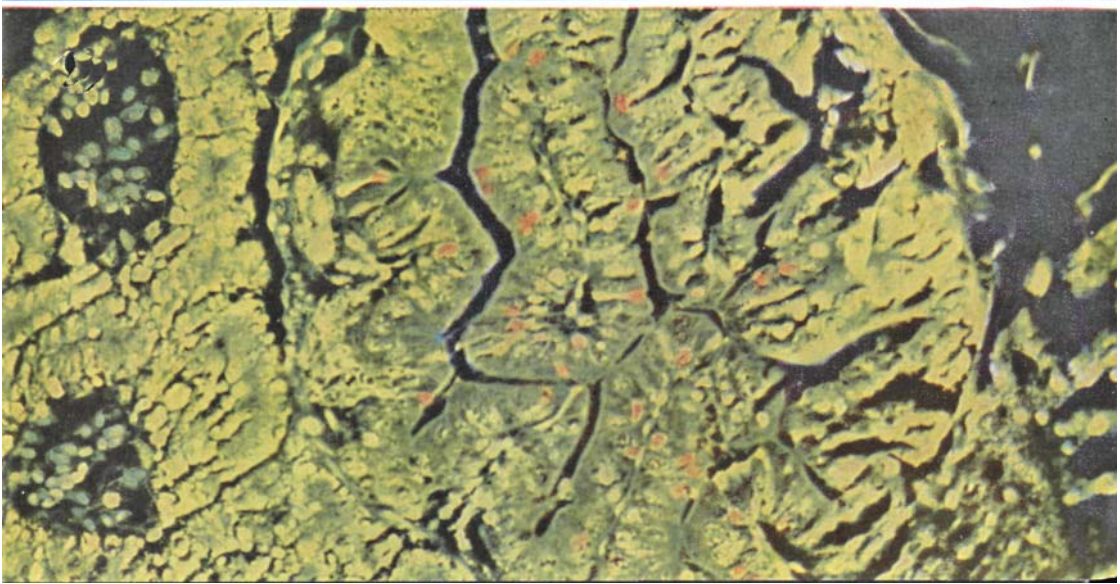
Soll Ultraviolett als Erregerlicht benutzt werden, sind eins der dunklen Uvetgläser als Lichtfilter und das gelbe Sperrfilter (GG 9) anzuwenden. Diese Zusammenstellung kommt besonders dann in Frage, wenn blaues Fluoreszenzlicht beobachtet werden soll. Für Objekte, die nur grünes, gelbes oder rotes Licht emittieren, setzt man ein Blaufilter als Lichtfilter und das Orangefilter (OG 1] als Sperrfilter ein.

Beobachtet man bei Blaulichterregung dünne Präparate, etwa bakterielle Ausstriche, kann es vorkommen, daß durch das Präparat hindurchgehendes Erregerlicht das Sperrfilter zur Eigenfluoreszenz anregt. Diese an sich lästige Eigenschaft ist durch die Zusammensetzung des Glases bedingt. Macht sich die Erscheinung störend bemerkbar, kann man sie durch Vorschalten des ultraviolettundurchlässigen GG 9 vor das OG 1 vermeiden. Zu diesem Zweck sind die Fassungen der beiden Sperrfilter so gestaltet, daß man sie aufeinanderstecken kann. Tritt also störende Eigenfluoreszenz im OG 1 auf, nimmt man es ab, steckt das GG 9 auf das Okular und darüber das OG 1.

Soll die Einrichtung zum **Beobachten im Dunkelfeld oder im Hellfeld** benutzt werden, stellt man unter Weglassen der Lichtfilter die Leuchtfeldblende mit Hilfe des Kondensors in der Präparatebene scharf ein (Köhlersches Beleuchtungsprinzip) und mikroskopiert mit der Bogenlampe wie mit jeder anderen Mikroleuchte. Zur Dämpfung der sehr hellen Beleuchtung werden das Neutralglas in Aufsteckfassung und die beigegegebene Mattscheibe benutzt, die an Stelle eines Beleuchtungsfilters in eine der wegklappbaren Halterungen an der Beleuchtungseinrichtung einzusetzen sind.

Bild 8 (nebenstehend oben). Kammolch ♀, Rumpf quer, Coriphosphin O/Ultraviolett, Agfacolor K, 2 min, Übersicht: 42 :1

Bild 9 (unten). Ausschnitt aus obigem Bild, Mitteldarm, Leber, 175 :1



10. Grundlegende und zusammenfassende Arbeiten aus allen Gebieten der Lumineszenzmikroskopie

Grundlagen der Lumineszenzmikroskopie

Danckwort, P.: Die Lumineszenzanalyse im filtrierten UV-Licht Leipzig: Akad. Verl.-Ges. 1940

Déhére, Ch.: Nachweis der biologisch wichtigen Körper durch Fluoreszenz und Fluoreszenzspektren. In: Abderhalden, Handb. Biol. Arbeitsmeth. Abt. II, Teil 3 (1933)

Déhére, Ch.: Die Fluoreszenz in der Biochemie. Monographie biol. Probleme, Paris: Les presses univ. de France 1927

Haitinger, M.: Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Leipzig: Akad. Verl.-Anst. 1938

Lehmann, H.: Das Lumineszenzmikroskop, seine Grundlagen und seine Anwendung. Z. wiss. Mikroskopie **30** (1913), S. 417

Meyer-Seitz: Ultraviolette Strahlen. Berlin: Gruyter & Co. 1942

Polacsek: Über die Fluoreszenzmikroskopie. Med. Mschr. 1 (1947), H. 37/39

Reichert, C.: Das Fluoreszenzmikroskop. Physik. Z. **12** (1911), S. 1010

Pringsheim: Fluoreszenz und Phosphoreszenz im Lichte der neueren Atomtheorie. Berlin: Springer 1928

Botanik

Hilbrich, P.: Fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Sporen von *Nosema bombycis* Nägeli und *Nosema apis* Zander mit Hilfe der Akridinorangemethode. In: Seidenbauforschung. Stuttgart-. Kernen 1942

Strugger, S.: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymenten. Biol. Zbl. 59 (1939), S. 409

Strugger, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Z. Naturwiss. 73 (1940), S. 97

Strugger, S.: Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. Flora **135** (1941)

Zoologie

Ellinger-Hirt: Eine Methode zur Beobachtung lebender Organe mit stärksten Vergrößerungen im Lumineszenzlicht (Intravitalmikroskopie). In: Abderhalden, Handb. Biol. Arbeitsmeth. Abt. V, Teil 2 (1930), S. 1753

Schümmelfeder: Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Acridinorange. Naturwiss. **35** (1948), H. 11, S. 346

Stübel: Die Fluoreszenz tierischer Gewebe in ultraviolettem Licht. Pflügers Arch. ges. Physiol. d. Menschen u. Tiere **142** (1911), S. 1

Mikrobiologie

Bock-Oesterlin: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen von Malaria-plasmodien im Gewebe unter Atebrin- und Chinineinwirkung. Zbl. Bakt. 1 **143** (1938/39), S. 306

Hagemann, P.: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von Leprabakterien im Nasenschleim und im Blut. Dtsch. med. Wschr. **63** (1937), S. 514

Hagemann, P.: Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Münch. med. Wschr. **28** (1938), S. 1066

Hagemann, P.: Über Fluoreszenzmikroskopie. Arch. exp. Zellforsch. **22** (1939), S. 459

Keller, Ch. J.: Der Nachweis von Diphtheriebazillen mit einem neuen Fluoreszenzmikroskop. Wien. med. Wschr. **329** (1938)

Strugger, S.: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von Trypanosomen im Blut. Dtsch. tierärztl. Wschr. **54** (1947), S. 161

Strugger, S.: Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien. Mikroskopie **3** (1948), S. 23

Strugger, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover-Schaper **1949**

Vonkennel-Wiedemann: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Gonokokken nach Sulfonamideinwirkung. Dtsch. med. Wschr. **70** (1944), S. 529

Chemie

Jancso, N. v.: Beobachtung chemotherapeutischer Vorgänge im Fluoreszenzmikroskop. Klin. Wschr. **11** (1932), S. 689

Schulze-Göthel: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Papierfaserstoffen. Papierfabrikant **32** (1934)

Wasitzki, R.: Das Fluoreszenzmikroskop in der Pharmakognosie. Pharmaz. Post (1913), H. 82

Lebensmitteluntersuchung

Hintersatz: Nachweis von Fischfleisch in Wurstwaren im filtrierte ultravioletten Licht. Z. Infekt.-Krankh., paras. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere **54** (1939), S. 87

Köhler: Vitalfärbung von Milchsedimentausstrichen. Dtsch. tierärztl. Wschr. **54** (1947), S. 215

Paläontologie

Miethe: Fotografie von Fossilien im primären Fluoreszenzlicht. Photogr. Korresp. **63** (1927), S. 69

Bestellliste

| Benennung | Bestellnummer | Bestenwort |
|---|----------------|------------|
| Grundausrüstung | | |
| Tisch mit Schubkasten , wegklappbarer Tischplatte einschl. Holzaufsatz und Schiene zur optischen Bank..... | 30 04 50 | Kymyy |
| Beleuchtungseinrichtung auf Reiter, bestehend aus: Zweiteiligem Kollektor mit Irisblende, Kühlküvette, Filtersystem mit 4 wegklappbaren Fassungen (für Filter $\varnothing = 55$ mm) und Blendschutzblech, 2 Blaufiltern BG 3 (4 mm und 2 mm dick), 2 Uvetfiltern UG1 (3,5 mm und 1,5 mm dick)..... | 30 04 57 | Kymzz |
| Grundplatte mit Stellschraube, verstellbaren Anschlägen und Klemmschrauben | 30 04 56 | Kynaz |
| Uranglasplatte, $\varnothing = 32$ mm, 3 mm dick, mit Ringmarke..... | 30 47 55 -0141 | Kynba |
| Dämpfungsfilter NG 10, in Aufsteckfassung | 30 47 51 -0101 | Kyncb |
| Okularsperrfilter GG 9, in Aufsteckfassung | 30 47 51 - 095 | Kyndc |
| Okularsperrfilter OG 1, in Aufsteckfassung | 30 47 51 - 098 | Kyned |
| Beobachtungsspiegel für die Bogenlampe | 31 26 03 | Kynle |
| Bogenlampe mit Uhrwerk für Wechselstrom 220 V 10 A | 30 42 60 | Kydzi |
| Bogenlampe mit Uhrwerk für Gleichstrom 220V 6A | 30 42 61 | Kynih |
| 100 Paar Kohlen für die Bogenlampe für Wechselstrom 220 V 10 A (5×200 H und 10×100 D) | 30 42 91 | Ktoun |
| 100 Paar Kohlen für die Bogenlampe für Gleichstrom 220V 6A (5×200H und 8×100D) | 30 42 90 | Ktosk |
| Widerstand 17 Ω 10 A..... | 05 87 12 | Petuo |
| Widerstand 28 Ω 6 A | 05 87 16 | Kynji |
| Geräteanschlußleitung B/NMH 3x1 ZN 5066 | — | Kywiz |
| Geräteanschlußleitung C/NMH 3x1 ZN 5066 | — | Kyzwj |
| Grundausrüstung für Wechselstrom 220 V 10 A (ohne Mikroskop) | 30 04 00 | Kyhjo |
| Grundausrüstung für Gleichstrom 220 V 6 A (ohne Mikroskop) | 30 04 01 | Kyhms |