

Rolf Theodor Borlinghaus

Konfokale Mikroskopie in Weiß

Optische Schnitte in allen Farben



Springer Spektrum

Konfokale Mikroskopie in Weiß

Rolf Theodor Borlinghaus

Konfokale Mikroskopie in Weiß

Optische Schnitte in allen Farben

 Springer Spektrum

Rolf Theodor Borlinghaus
Sinsheim-Eschelbach, Deutschland

ISBN 978-3-662-49358-8
DOI 10.1007/978-3-662-49359-5

ISBN 978-3-662-49359-5 (eBook)

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen.

Planung: Kaja Rosenbaum

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier.

Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer Science+Business Media
(www.springer.com)

Für meine Töchter

Vorwort

„Wer nicht neugierig ist, erfährt nichts“¹, dieses Goethe-Zitat klingt trivial und ist gleichwohl falsch. Wir wollen aber nicht nur *etwas* wissen, sondern *alles* – wir sind sehr neugierig. Ob das nun redlich oder verwerflich sei, ist eine philosophische oder theologische Frage. Jedenfalls ist Neugier die wichtigste menschliche Eigenschaft, die Wissenschaft überhaupt erst möglich gemacht hat. Auch soll hier nicht untersucht werden, ob das eine gute oder eine am Ende katastrophale Wendung war.

Neugier ist immer mit dem Wunsch verknüpft, etwas zu erfahren, was man so ohne weiteres nicht in Erfahrung bringen kann, man muss sich darum bemühen. Auch darin mag ein Teil des Reizes liegen. Ein Ohr an der Wand etwa wird dem Lauscher das Prädikat „neugierig“ einbringen. Auch ein Blick durchs Schlüsselloch hat meist einen eher anröchigen Beigeschmack. Diese nicht eben freundlichen Varianten haben immer mit Neugier auf Geheimnisse anderer Menschen zu tun. Wenn sich indes unsere Neugier auf Objekte der Natur im Allgemeinen richtet, dann nennt man sie freundlich Wissensdurst. Schnell hat sich gezeigt, dass auch hier Wände und Schlüssellocher zu überwinden sind, will man neues Terrain erobern. Und das nächstliegende Instrument zur Überwindung natürlicher Schlüssellocher ist das Mikroskop geworden. Schon der Anblick eines Mikroskopikers, wie er angestrengt seinen Blick durch ein enges Metallrohr zwingt, erinnert deutlich an einen Schlüssellochgucker. Wiewohl die moderne Technik uns da einige Erleichterung verschafft hat, etwa indem wir bequem zurückgelehnt auf unserem Sessel einen Bildschirm betrachten können.

Dieses Buch enthält zwar viele Bilder, es ist aber kein Bilderbuch: Da es um Erläuterungen zu technischen Problemen geht, gibt es viele graphische Abbildungen. Hie und da tauchen auch ein paar Formeln auf, wobei Kenntnisse zur Mathematik und Physik aus der Mittelstufe ausreichen. Wenn Sie keine Formeln mögen, dann glauben Sie einfach das Ergebnis.

Es ist auch keine Anleitung zum Mikroskopieren, und es beleuchtet nicht die Frage, welches Verfahren für welche Fragestellungen wohl am besten geeignet sei.

¹ Goethe, J.W. von: „Der Triumph der Empfindsamkeit“, Sora im 5. Akt.

Dieses Buch ist für interessierte Laien und praktizierende Mikroskopiker geschrieben, mit einem Schwerpunkt für konfokale Mikroskopie. Viele Mikroskopiker benutzen Mikroskope so, wie etwa Zugfahrer eine Eisenbahn benutzen. Man weiß: Oben geht Strom rein, und dann fährt das Gerät auf Schienen – meist an den gewünschten Ort, nicht so oft zur gewünschten Zeit. Natürlich erinnert man sich noch, wie ein Elektromotor funktioniert, und was man beim Aufbau eines Kugellagers beachten muss. Aber damit ist die Kenntnis des Gerätes oft schon abgeschlossen. Und das reicht auch für die meisten Fälle. Man kann sich ganz der mitgebrachten Lektüre widmen oder die Welt draußen vor den Fenstern bestaunen.

Deshalb beginnt dieses anschauliche Buch mit den ganz grundlegenden Dingen: etwa einer optischen Linse. Und wie ein zusammengesetztes Mikroskop aufgebaut ist. Und was zur Auflösung zu sagen ist. Weiter werden die Grundlagen zur Fluoreszenz besprochen und wie ein konfokales Mikroskop funktioniert. Das ist der allgemeine Teil, er umfasst die Kap. 1 bis 3.

Anschließend werden die Neuerungen in der konfokalen Mikroskopie beleuchtet, die mit Begriffen wie „spektrale Freiheit“ oder „filterfreie Zone“ verknüpft sind. Es geht dabei im Wesentlichen darum, in allen Stufen der Fluoreszenzeinrichtung kontinuierlich einstellbare Farben verwenden zu können. Wegen der spektralen Unabhängigkeit wird dafür etwas salopp der Begriff „weißes Konfokalmikroskop“ eingeführt. Das ist der spezielle Teil, er umfasst die Kap. 4 bis 9.

Der Anspruch dieses Buches ist also nicht geringer, als einen weiten Bogen von den Urgründen der vergrößernden Optik zu den neuesten Technologien der modernsten Rastermikroskopie zu spannen – und zwar in der Weise, dass auch Leser, die weder das eine noch das andere Fach studiert haben, diesem Bogen folgen können, und jene, die sich schon länger mit der Materie befassen, dennoch (hoffentlich) nicht das Buch gelangweilt in die Ecke legen. Damit das Buch noch in der Hand gehalten werden kann, folgen wir dabei natürlich nur einem schmalen Pfad in den Weiten der modernen Mikroskopie, und viele spannende Seitenwege bleiben unbesucht.

Ob diesem Anspruch Genüge getan werden konnte, werden Sie entscheiden. Ich freue mich auf Anregungen, Kritik und natürlich auch auf Lob.

Wie zumeist, so ist auch in dieser Schrift der allergrößte Teil dem Autor von anderen Menschen zugewachsen, denen ich dafür herzlich danken möchte. Das gilt meinen früheren Kollegen von Carl Zeiss, zunächst in Oberkochen, dann in Jena. Es gilt weiter meinen jetzigen Kollegen von Leica Lasertechnik in Heidelberg, heute Leica Microsystems in Mannheim. Natürlich auch den vielen Vortragenden auf Konferenzen und Seminaren, den vielen Interessenten und Benutzern, die mich in Diskussionen verwickelt und zur Formulierung verständlicher Erklärungen angestiftet haben; und hie und da habe ich freilich

auch eine Veröffentlichung und Bücher gelesen. Besonderer Dank geht an Chem. Ing. Anke Fähnrich und PD Dr. rer. nat. Christina Schlatterer, die sich der Mühe des Probelesens unterzogen haben und durch viele Anregungen und Korrekturen die größten Schnitzer verhindern konnten.

Wer der Einfältigkeit der modernen Zivilisation entfliehen will, befasse sich ohne Absichten mit der Natur. Ein Mikroskop ist dazu ein guter Einstieg. Vielleicht führt Sie dann dieses Abenteuer eines Tages an ein weißes Konfokalmikroskop?

Sinsheim-Eschelbach im Oktober 2015

Rolf T. Borlinghaus

Rolf T. Borlinghaus wurde 1988 bei Prof. Dr. Peter Läger am Institut für Biophysik in Konstanz promoviert und bekleidet heute eine Teilzeitposition bei Leica Microsystems CMS in Mannheim als Senior Scientist. Daneben betätigt er sich als freier Autor, Feldbotaniker und Lebenskünstler.



Inhaltsverzeichnis

1	Mikroskopie – Einführung	1
1.1	Linsen	1
1.2	Das Mikroskop	5
1.2.1	Das Objektiv	5
1.2.2	Das Okular	7
1.2.3	Das zusammengesetzte Mikroskop	9
1.3	Die Auflösung und ihre Grenzen	10
1.3.1	Abbes Formel	11
1.3.2	Leuchtende Punkte	18
1.3.3	Die Halbwertsbreite	23
1.3.4	Was ist nun richtig?	24
1.4	Jenseits der Auflösungsgrenzen	25
	Literatur	27
2	Fluoreszenz	29
2.1	Was ist Fluoreszenz?	29
2.1.1	Der Fluoreszenz-Prozess	29
2.1.2	Farbenspiele	32
2.1.3	Lebensdauern	33
2.2	Mikroskopie mit Fluoreszenz	35
2.2.1	Leistungsverhältnisse von Anregungslicht und Emissionslicht	35
2.2.2	Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz	38
2.2.3	Beleuchtung	39
2.2.4	Anregungsfilter	41
2.2.5	Auflicht und Strahlteiler	45
2.2.6	Emissionsfilter	49
2.3	Künstliche Farben	50
	Literatur	52
3	Konfokale Mikroskopie	55
3.1	Das Motiv	55
3.2	Das Prinzip	57
3.2.1	Punktbeleuchtung	58
3.2.2	Punktbeobachtung	60
3.3	Das Rasterbild	62
3.3.1	Aufzeichnung	62

3.3.2	Scanverfahren	64
3.3.3	Schichtdicke	65
3.3.4	Die dritte Dimension	67
3.4	Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie	70
3.5	Elemente eines konfokalen Mikroskops	72
3.5.1	Lichtquelle	72
3.5.2	Anregungsfilter	73
3.5.3	Primärteiler	73
3.5.4	Strahlscanner	73
3.5.5	Objektiv	74
3.5.6	Kanaltrennung	75
3.5.7	Emissionsfilter	75
3.5.8	Sensor	76
3.6	Das „weiße“ konfokale Mikroskop	76
	Literatur	77
4	Lichtquellen	79
4.1	Laser	80
4.2	Lasertypen	82
4.3	Weißlichtlaser	85
	Literatur	88
5	Akustooptische Anregungsfilter	89
5.1	Wie funktioniert ein akustooptisch abstimbarer Filter?	90
5.2	Mehrkanaldimmer für Laserlicht	94
5.3	Spektrale Freiheit: AOTF und Weißlichtlaser	98
	Literatur	99
6	Weißer Strahlteiler	101
6.1	Akustooptische Strahlteiler	102
6.2	AOBS und weiße Quelle	105
	Literatur	107
7	Aufteilung der Emissionen	109
7.1	Prisma	110
7.2	Gitter	115
7.3	Kontinuierliche Richtungsänderung: das Spektrum	118
	Literatur	118
8	Emissionsfilterung	119
8.1	Der Zeilendetektor	121
8.2	Der Multibanddetektor	122
	Literatur	126

9	Trennung in der Zeitdimension	127
9.1	Sensoren fühlen Photonen	127
9.1.1	Photoelektronenvervielfacher	127
9.1.2	Lawinen-Photodiode	130
9.1.3	Hybriddetektor	130
9.2	Weiße Fluoreszenzmessung: FLIM	133
9.3	Ein weißes Filter mit hoher Trennschärfe	135
	Literatur	136
	Sachverzeichnis	137

1

Mikroskopie – Einführung

Um zu verstehen, was ein konfokales Mikroskop ist und welche Rolle die Farbe Weiß in der Mikroskopie spielt, sollen in den ersten zwei Kapiteln die Grundlagen zur Fluoreszenzmikroskopie besprochen werden. Hier wird zunächst eine kurze Einführung in die Wirkungsweise des klassischen Lichtmikroskops gegeben, darauf folgt die wichtige Diskussion um die Auflösung.

1.1 Linsen

Ein Mikroskop wird benutzt, wenn man etwas Kleines sehen möchte; etwas, das ohne Mikroskop eben noch nicht sichtbar ist. Wie das nun bewerkstelligt wird, lässt sich aus dem Wort Mikroskop noch nicht ableiten, und tatsächlich gibt es Mikroskope, die ganz anders funktionieren als die hier beschriebenen Geräte. Dennoch denkt man gemeinhin bei einem Mikroskop an ein optisches Instrument. Die wirksamen Teile eines solchen Gerätes sind optische Linsen. Das Wörtchen „Linse“ leitet sich aus dem lateinischen *lens* für die bekannten Hülsenfrüchte ab. Zu Beginn waren optische Linsen wohl auch meist von dieser Form: beidseitig gewölbt. Schon lange werden auch Kombinationen mit konvexen oder planen Oberflächen als Linse bezeichnet. Dabei können die Formen ganz erheblich von den botanischen Linsen abweichen.

Das grundlegende Prinzip der Linsenwirkung ist das Verhalten von Lichtstrahlen, wenn diese durch eine Grenzfläche zweier durchsichtiger Materialien hindurchtreten (Abb. 1.1). Licht treffe etwa in einem Winkel α_1 (dem Einfallswinkel) auf eine solche Grenzfläche. Dabei ist der Winkel gemeint, den der Lichtstrahl mit einer zur Grenzfläche senkrechten Linie – dem Lot – bildet. Das Licht läuft dann möglicherweise nicht geradeaus weiter, sondern tritt unter einem anderen Winkel α_2 (dem Ausfallswinkel) in das neue Medium über. Es entsteht also ein Knick, weshalb man hier von der Brechung des Lichtes spricht. Das Brechungsgesetz (Gl. 1.1) beschreibt diesen Vorgang auf einfache Weise:

$$n_1 \sin \alpha_1 = n_2 \sin \alpha_2. \quad (1.1)$$

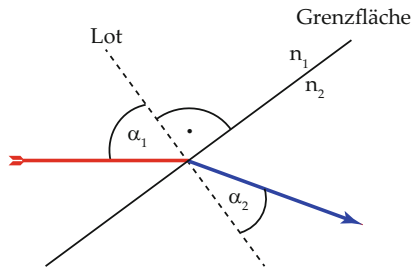


Abb. 1.1 Brechungsgesetz. Ein Lichtstrahl (rote Linie) geht an einer Grenzfläche aus einem optisch dünneren Medium mit dem Brechungsindex n_1 in ein optisch dichteres Medium mit dem Brechungsindex n_2 über. Da nun $n_2 > n_1$ ist, wird der Lichtstrahl zum Lot hin gebrochen (blaue Linie). Das Maß des Abknickens wird durch das Brechungsgesetz beschrieben

Dabei ist n die Brechzahl (auch: der Brechungsindex) des Mediums. Je höher die Brechzahl, desto „optisch dichter“ das Medium. Das optisch dünnste Medium ist das Vakuum, es hat daher die Brechzahl 1. Luft liegt optisch so nahe am Vakuum, dass man ihr üblicherweise auch die Brechzahl 1 zuordnet und die geringe Abweichung vernachlässigt. Reines Wasser hat die Brechzahl 1,333. Die Brechzahl ist hauptsächlich von der Temperatur und von der Farbe (Wellenlänge) des Lichtes abhängig. Der oben angegebene Wert gilt für Zimmertemperatur $20\text{ }^\circ\text{C}$ und gelbes Licht der Wellenlänge 589 nm . Die krumme Zahl rührt daher, dass historisch die gelbe Emission einer Natriumdampflampe als Referenz verwendet wurde. Gewöhnliches Kronglas hat hier eine Brechzahl von 1,510. Diamant hat mit 2,417 eine hohe Brechzahl, ist also optisch sehr dicht.

Die Wirkung einer optischen Linse lässt sich nun am besten verstehen, wenn man sie sich in ganz viele ganz dünne, stäbchenförmige Elemente aufgeschnitten vorstellt – etwa so, wie man eine Kartoffel in Stäbchen schneidet, um Pommes frites daraus zu backen. Diese Elemente kann man dann näherungsweise als Prismen betrachten. In solchen Prismen ist der Strahlverlauf sehr einfach durch das Brechungsgesetz zu bestimmen, wie in Abb. 1.2a vorgeführt wird.

Wir betrachten dazu zwei Strahlen, wobei die Strahlen senkrecht zur Hauptebene der Linse einfallen sollen. Der einfachste Fall ist ein zentraler Strahl, der genau durch die Linsenmitte führt. Hier ist der Einfallswinkel gleich 0, das gilt auch für den Ausfallswinkel – dieser Strahl wird nicht gebrochen. Ein Strahl am Rand der Linse wird zunächst an der Luft-Glas-Grenzfläche zum Lot hin gebrochen. In Abb. 1.2 ist das ein Knick „nach unten“. Beim Austritt aus der Linse wird das Licht vom Lot weg gebrochen, also

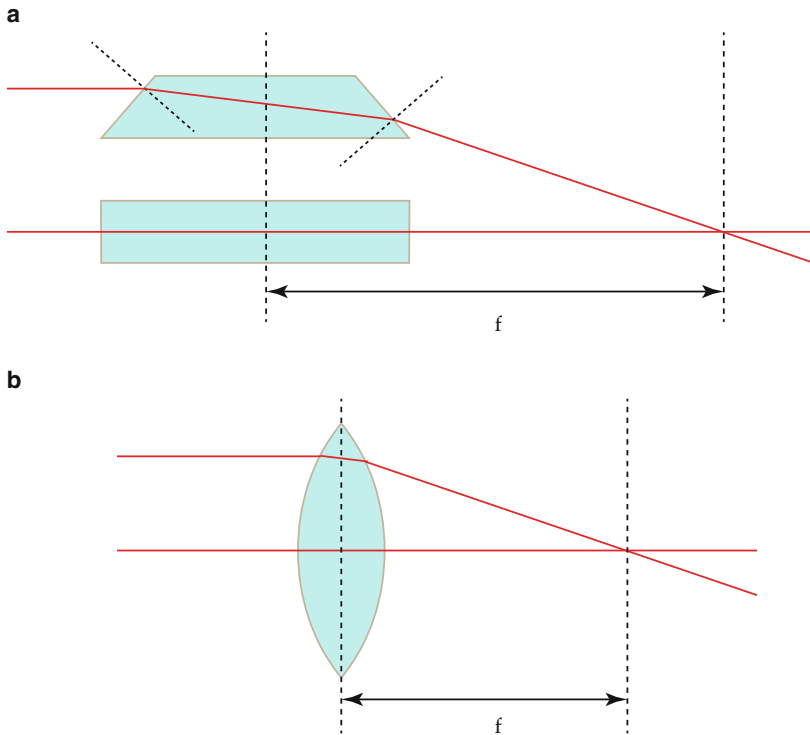


Abb. 1.2 Strahlverlauf in Elementarprismen einer bikonvexen Linse. **a** Ein zentraler Strahl durchläuft ein Prisma mit parallelen Grundflächen bei senkrechtem Einfall. Der Strahl wird nicht gebrochen. Ein parallel dazu verlaufender Strahl in einem oberen Linsenelement wird zweimal in dieselbe Richtung gebrochen, der austretende Strahl schneidet den zentralen Strahl im Abstand der Brennweite f . **b** Eine ideale Linse kann man sich aus sehr vielen Prismen wie bei **a** beschrieben zusammengesetzt vorstellen. Alle parallel zur optischen Achse verlaufenden Strahlen schneiden sich idealerweise im Brennpunkt, der von der Linsenmitte bei der Brennweite f zu finden ist

wieder „nach unten“, da hier die Brechungsindizes umgekehrt durchlaufen werden. Daraus ergibt sich der endgültige Strahlverlauf. Dieser Randstrahl ist nun nicht mehr parallel zum zentralen Strahl, und beide schneiden sich in einem Abstand f von der Hauptebene. Dieser Abstand wird als „Brennweite“ bezeichnet. Im Falle einer idealen Linse würden sich alle parallelen Strahlen in diesem Punkt schneiden. Leider ist das nicht so, und die Kunst der Linsenmacher besteht darin, die unterschiedlichen systematischen Linsenfehler durch geschickte Kombination verschiedener Einzellinsen zu korrigieren, sodass sich die Fehler am Ende aufheben. Ein sehr gut korrigiertes Mikroskop-Objektiv (das gelegentlich auch etwas nonchalant einfach als „Linse“ bezeichnet wird) kann daher aus bis zu ca. 20 Einzellinsen aufgebaut sein. Diese Einzellinsen

haben oft sehr kleine Durchmesser und kleine Krümmungsradien und müssen sehr genau zentriert und auf der Achse justiert werden. Daher kommt es, dass die Kosten solcher optisch-feinmechanischer Kunstwerke schnell jene eines Mittelklassewagens überschreiten können.

Um die wesentlichen geometrischen Aspekte eines optischen Systems zu konstruieren, muss man drei Strahlverläufe kennen. Dazu ein paar Erläuterungen – die Verhältnisse sind in Abb. 1.3 dargestellt: Als Achse (auch: optische Achse) bezeichnet man die Gerade, die senkrecht durch die Linsenmitte führt. Senkrecht dazu steht die Hauptebene, die bei symmetrischen Linsen mit der Mittenfläche der Linse übereinstimmt. Den Brennpunkt F findet man im Abstand der Brennweite f . So wie für Abb. 1.3 abgebildet, gilt der Brennpunkt für achsenparallele Strahlen. Strahlen, die zu einer anderen, durch den Linsenmittelpunkt gehenden Geraden parallel sind, haben einen Brennpunkt ebenfalls im Abstand f , aber nicht auf der optischen Achse. Alle diese Punkte bilden zusammengenommen die „Brennebene“. Da alle Vorgänge symmetrisch sind – es ist also egal, ob das Licht „von links“ oder „von rechts“ kommt –, gibt es auch eine Brennweite f_1 auf der anderen Seite mit dem dazugehörigen Brennpunkt F_1 und einer ebenso gestalteten Brennebene. Wir werden hier das Licht immer „von links nach rechts“ strahlen lassen; f kann man darum auch „hintere Brennebene“ nennen. Aus historischen Gründen findet man in der Literatur für Mikroskopie auch „obere Brennebene“, weil die frühen Mikroskope immer senkrecht aufgebaut waren

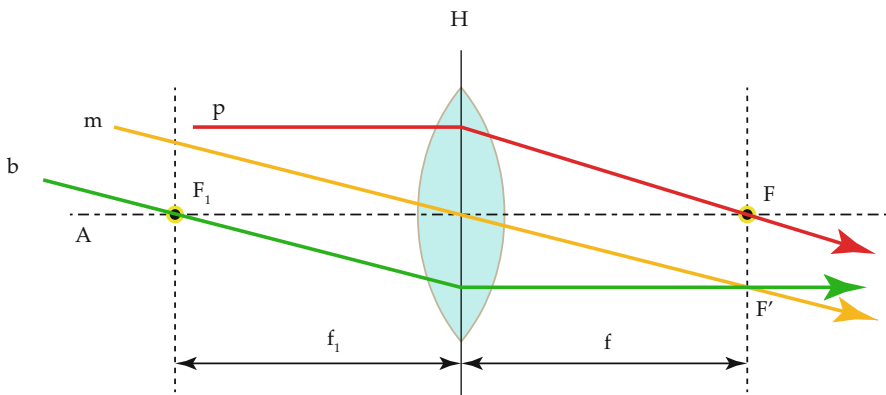


Abb. 1.3 Die wesentlichen Strahlen bei einer optischen Linse. A: optische Achse; F , F_1 : Brennpunkte; f , f_1 : Brennweiten; H : Hauptebene. p Ein zur Achse paralleler Strahl verläuft nach dem Durchgang durch die Linse durch den hinteren Brennpunkt F . m Ein durch die Linsenmitte gehender Strahl wird nicht gebrochen. b Ein durch den vorderen Brennpunkt gehender Strahl wird zum achsenparallelen Strahl. In diesem Beispiel sind die Strahlen m und b parallel, sie schneiden sich deshalb in einem Punkt F' , der in der Brennebene liegt