

**Wissen kompakt:
Lichtmikroskopie im Jahre 2012**

Flexibel. Verlässlich. Persönlich.

Das konventionelle Lichtmikroskop ist auch 160 Jahre nach seiner industriellen Einführung ein zentrales analytisches Werkzeug der modernen Laboratorien. Licht ist in diesen Geräten dabei das Transportmittel der vom Präparat stammenden Informationen. Die für das Licht seinerzeit universell gefundenen Gesetzmäßigkeiten (Abbe'sche Formel) gelten noch heute. Der Anwender betrachtet dabei nur das mikroskopische Bild des Präparates, nicht das Präparat selber. Je sorgfältiger mit dem Informationsträger Licht

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

umgegangen wird, desto ähnlicher und wirklichkeitsnäher sind sich Präparat und das mikroskopische Bild des Präparates.

Des Weiteren ergänzen sogenannte Kontrastverfahren den Nutzen der Geräte. Die Zahl der visualisierbaren Mikrostrukturen wurde ausgeweitet.

Speziell die neuen Entwicklungen rund um das Lichtmikroskop als Teil einer analytischen Routineuntersuchung sollen hier erörtert werden. Für weiterführende Nachschlagewerke in diesem thematischen Zusammenhang werden im Anhang Links mit entsprechenden PDF Downloads aufgeführt.

Technische Grundlagen der Mikroskopie

Ein Mikroskop beinhaltet neben der Optik auch mechanische sowie zunehmend motorisierte Komponenten. Eine moderne Optik ist heutzutage in der Lage, das Bild des Präparates in Gänze verzeichnungsfrei (d.h. im Sehfeld geebnet) abzubilden. Das geschieht bei leistungsfähigen Mikroskopen an der Grenze dessen, was die Lichtwelle an Bildinformation zu transportieren in der Lage ist. Man verwendet komplex aufeinander abgestimmte Linsensysteme, Gruppierungen unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften und Beschichtungen.

Je nach Güte der verwendeten Optik ist die Farbkorrektur zunehmend optimiert und das durch das Okular erzeugte Abbild entsprechend farbtreuer. Für die Güte eines optischen Verbundsystems ist es zudem wichtig, dass sämtliche Bauteile des Strahlenganges in die Betrachtung eines optimalen Bildes integriert werden. Eine einzelne falsch beschichtete Linse reicht aus, um jedwede Hochauflösung zunichte zu machen. Hinzu kommt, dass in heutigem optischen Glas Schwermetalle weitestgehend ersetzt worden sind. Die noch in den 50er Jahren oftmals verwandten Uranyle sind längst nicht mehr in Gebrauch. Ebenfalls Teil des optischen Systems ist das bei höheren numerischen Aperturen verwandte Immersionsöl. Dieses darf keinesfalls verharzen, keine Eigenfluoreszenz zeigen und soll trotzdem eine gute Fließfähigkeit aufweisen. Heutzutage gibt es speziell für biologische Applikationen in wässriger Lösung Optiken, die in das Wasser,

in dem sich die Probe befindet, eintauchen kann. Die sogenannte Unendlich-Korrektur erlaubt es heute, mannigfaltige optische Bauteile (z. B. Filter) nach Bedarf in den Strahlengang zu integrieren. Die Wahl der richtigen Vergrößerung und des optimalen, stets präparateabhängigen Kontrastes, ist dabei von der Applikation abhängig. Für den Fall der Nachrüstung ist eine Vielzahl an Schnittstellen vorhanden. Ein hochwertiges Gerät kann in hohem Maße mit den Ansprüchen seiner Nutzergruppe mitwachsen.

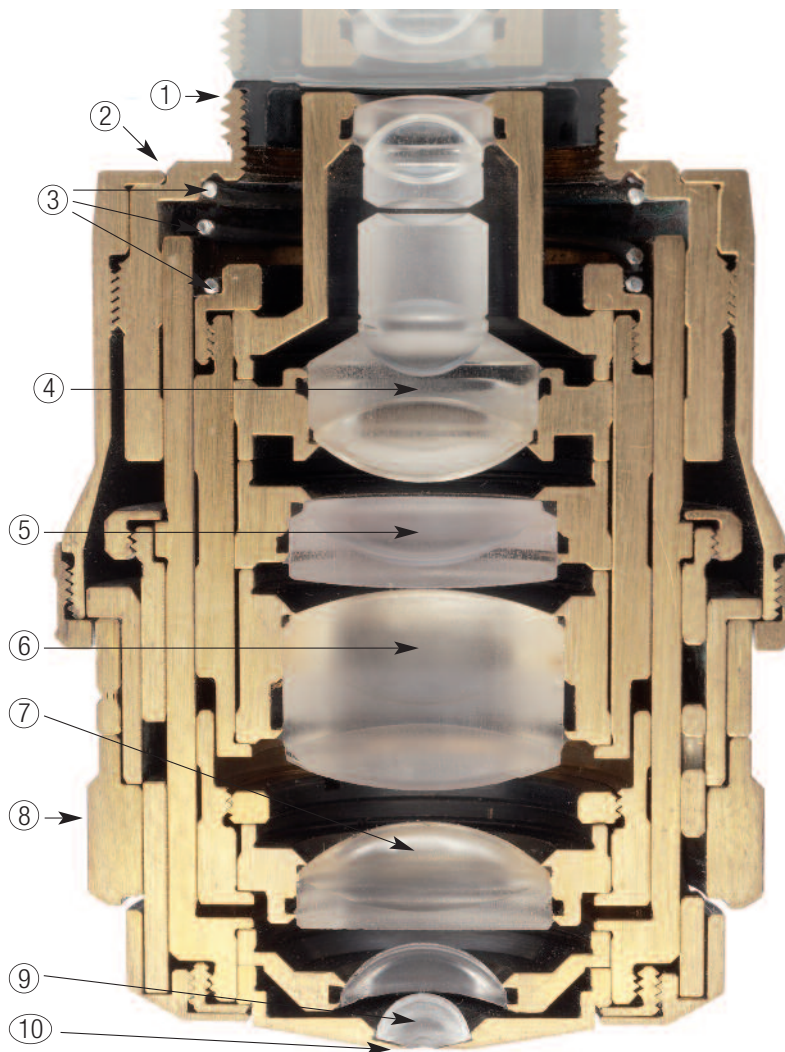


Abb. 1: Querschnitt eines Objektivs

- ① Objektivgewinde
- ② Anlagefläche des Objektivs
- ③ Federsystem für den Präparateschutz-Mechanismus
- ④-⑦ Linsengruppen zur Korrektur von Bildfehlern
- ⑧ Korrektionsring zur Anpassung an abweichende Deckglasdicken oder Temperaturen
- ⑨ Frontlinsensystem
- ⑩ Frontlinsenfassung

Es ist naheliegend, dass derartige Linsensysteme entsprechend mechanisch gefasst und präzise gegeneinander bewegt werden müssen. Resistenz gegenüber der mitunter aggressiven Laborluft muss gewährleistet sein, aber auch mikrobiologische Probleme (z. B. Verpilzung) müssen bei den weltweit eingesetzten Geräten berücksichtigt werden. Der heutige Laboralltag stellt zudem ästhetische Ansprüche an das Arbeitsgerät und möchte die Leistungsfähigkeit der Mitarbeiter über Jahre gewährleistet sehen.

Die Erkenntnis, dass die ergonomische und damit gesunde Körperhaltung zur Qualität der Analytik beiträgt, ist auch bei modernen Mikroskopen Bestandteil jeder Entwicklung. Antiallergene Kontaktpunkte, haptisch optimierte Bedienelemente und dem menschlichen Funktionsapparat angepasste Funktionalitäten sind ergänzende Maßstäbe eines hochwertigen Gerätes. Nicht zuletzt deswegen hat zum Beispiel der TÜV Rheinland ein Ergonomie-Prüfsiegel speziell für Mikroskope vergeben.

Typen

Man unterscheidet drei Haupttypen: Das klassisch aufrechte Stativ (2D-Bild am Auge), das inverse Stativ (2D-Bild am Auge) und das Stereomikroskop (3D-Bild am Auge). Basierend auf der Applikation des Anwenders wird das passende Mikroskop individuell gewählt, hinsichtlich der optischen Leistung und des gewünschten Kontrastes.

Aufrechtes Stativ

Im klassischen, aufrechten Stativ werden gefärbte oder ungefärbte Proben auf Objektträgern betrachtet. Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe von Spezialfärbungen / -methoden ist möglich, ebenso wie die Auflichtmikroskopie am Schliff oder im erweiterten Probenraum in der Materialmikroskopie.



Inverses Stativ

Das inverse Stativ ist für die Untersuchung von gefärbten oder ungefärbten Objektträgern, Petrischalen, Rollerflasks etc. geeignet. Immer dann, wenn in einem Behältnis durch den Boden auf das Präparat geschaut wird. Diese Geräte werden häufig mit Zellmanipulatoren / -inkubatoren ausgestattet.

Stereomikroskop

Steht ein räumlicher Eindruck im Vordergrund, bietet sich die Verwendung eines Stereomikroskopes an. Mit diesem überaus verbreiteten Mikroskop-Typ wird das Präparat mit dem physiologisch recht nahen Stereowinkel mit zwei getrennten Strahlengängen betrachtet. Durch den hohen Arbeitsabstand, das räumliche Bild und die universellen Beleuchtungsmöglichkeiten sind diese Geräte weitreichend einsetzbar und entsprechend verbreitet. Seine Grenze liegt in der erreichbaren Auflösung des Präparates. Details kleiner 10 μ Größe werden mit konventionellen Stativen betrachtet.

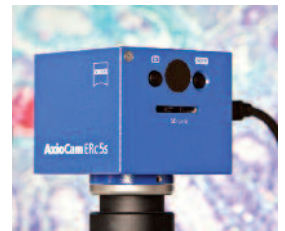


Kamera und Mikroskop

Ergänzend zur Bildaufnahme hat sich eine Vielzahl von bildgebenden Systemen etabliert. Das Prinzip ist allerdings immer gleich: das vom Mikroskop erzeugte Bild wird auf dem Chip einer Kamera abgebildet. Dabei ist es wichtig, dass die verwendete Chipgröße und ihre Pixelzahl (d.h. die kleinste Einheit zur Lichtaufnahme) mit der optischen Auflösung des verwendeten Mikroskops korreliert (siehe Literatur 1). Darum kann man unmöglich allein aus der Pixelzahl auf die Aussagekraft des Mikroskops mit angeschlossener Kamera zurückschließen.

Für eine optimale Abbildung des mikroskopischen Bildes wird ein Kameraadapter benötigt, welcher der Chipgröße und dem optischen System Rechnung trägt, aber auch dem Transport des Lichtes. Darüber hinaus muss der verlustfreie elektronische Informations- / Datenverkehr zwischen Kamerachip, Computer, Monitor und Drucker oder Beamer sichergestellt sein. Analog zu den optischen Betrachtungen macht auch hier ein einzelnes, datenkomprimierendes Bauteil jedes noch so gute Bild zunichte.

Bei der Aufnahme eines mikroskopischen Bildes gilt es zudem, die Leistungsparameter der benutzten Kamera zu beachten. Die Dynamik, die Full Well Capacity, die Lichteffizienz, die Belichtungszeit einer Kamera, die Pixelbeschaffenheit (CMOS oder CCD) seien als einige Parameter nur kurz exemplarisch genannt.



Handelsübliche Kameras sind nicht mit einer Mikroskop-Kamera zu verwechseln. Diese Wunderwerke des Alltags sind für den optimalen Nutzen im privaten Bereich konstruiert. Die im Labor gewünschte Datentreue und pixelgenaue Messung ist hier in einem kostenverträglichen Rahmen meist nicht möglich.

Software für Mikroskope

Eine moderne Mikroskopsoftware erlaubt die Steuerung und gleichzeitige Live-Bildübertragung des Kamerabildes zum PC oder Beamer. Die bei der mikroskopischen Aufnahme nötigen Feinjustagen hinsichtlich Kontrast, Helligkeit, Farbsättigung, Weißabgleich etc. müssen einfach zugänglich sein, da sie meist für jedes Bild leicht nachjustiert werden müssen. Bei der Datenspeicherung ist sicherzustellen, dass Bildinformationen möglichst authentisch die Lichteinfallssituation am Sensor darstellen. Im Berichtswesen stehen Exportfunktionen und firmenkonfigurierbare Berichte zur Verfügung sowie Messfunktionen erheblichen Umfangs. Bei aller Funktionalität muss aber eine intuitive Struktur und Datenkonsistenz sichergestellt sein.



Mikroskop im Dialog

Soll das mikroskopische Bild von mehreren Nutzern interpretiert werden, so kann dieses mit Hilfe einer Mitbeobachtereinrichtung geschehen. Das Bild wird hier auf verschiedene Tuben aufgeteilt. Natürlich gibt es im Hörsaalbetrieb die Beamerfunktionalität.

Seit Neuestem ist ein mikroskopischer Tablet PC (Tab4Lab) erhältlich. Hierbei kann eine Mikroskopkamera direkt via USB an einen Tablet-PC angeschlossen werden. Diese Geräte sind dadurch sehr leicht transportierbar und die Funktionalität der speziellen Mikroskop-Software bleibt vollständig erhalten.

30989 Gehrden / HannoverElbingeröder Straße 1
Telefon 0 51 08 / 91 67-0**22143 Hamburg**Neuer Höltigbaum 30
Telefon 0 40 / 65 90 95-0**VERTRIEBSBÜROS****Berlin**

Telefon 0 33 22 / 20 24 69

Braunschweig

Telefon 0 53 08 / 69 38 64

Essen

Telefon 02 01 / 105 46 34

Kiel

Telefon 0 40 / 65 90 95 40

Magdeburg

Telefon 03 92 92 / 6 56 51

Münster

Telefon 04 21 / 175 99 324

Osnabrück

Telefon 04 21 / 175 99 321

Nürnberg

Telefon 0 89 / 6 92 57 18

Rostock

Telefon 03 84 55 / 2 23 29

Ruhrgebiet

Telefon 015 20 / 166 98 00

Ulm

Telefon 0 89 / 6 92 57 18

Schubert & Weiss OMNILAB**81547 München**Fromundstraße 34
Telefon 0 89 / 6 92 57 18**OMNILAB-KRANNICH****37079 Göttingen**Elliehäuser Weg 17
Telefon 05 51 / 6 94 02-0**OMNILAB baltic****1002, Riga / Lettland**Maza Nometnu iela 45A
Telefon +371 6767 0510**OMNILAB Laboratuvar****Malzemeleri San. ve Tic. Ltd. Şti.****35170 Mersinli / İzmir / Türkei**Su Plaza No: 2 1201 / 1 Street
5 th. floor Number: 502

Praktische Tipps

Köhlern: Zur optimalen Auflösung muss die Beleuchtungseinheit des Mikroskops auf die Objektive abgestimmt sein. Diesen Vorgang nennt man „Köhlern“. Für eine ausführliche Anleitung siehe Literatur 3.

Reinigung Ihres Mikroskops: Eine saubere Optik im Mikroskop ist die Voraussetzung für erfolgreiches Mikroskopieren und einwandfreie Bilder. Die Auswahl des besten Reinigungsverfahrens richtet sich nach der Art der optischen Oberfläche und der Art der zu entfernenden Verunreinigungen. Häufig übersehen: Auch Objektträger und Deckglas sowie das Präparat sollten sauber und rückstandsfrei sein. Weiterführende Informationen erhalten Sie als Download (siehe Literatur 2).

Literatur und Links

Downloads

www.omnilab.de im Bereich "Wissen kompakt"

- 1) "Mikroskopie von Anfang an"
- 2) "Das saubere Mikroskop"
- 3) "Die Beleuchtung nach Köhler am aufrechten Mikroskop"

www.zeiss.com/campus

- 4) "Kamera Assistent"
- 5) "Cormic"
- 6) "Objektive - Eine Frage des Anspruches"

LED-Licht: Seit neuestem sind LED-Beleuchtungssysteme für Lichtmikroskope erhältlich. Lange Lebensdauer (> 10.000 Stunden), konstante Farbtemperatur bei sich ändernder Lichtintensität und hohe Lichtausbeute sind die Merkmale dieser Technik.

Unterricht / Kurssaal: Moderne Kurssaalmikroskope sind auf Langlebigkeit und Robustheit hin optimiert. Zudem wird der Ergonomie im Unterricht Rechnung getragen: Transportgriffe, sichere Netzteile, Make-up feste Optiken und Diebstahlsicherungen sind nur einige Beispiele.

Ausblick: Lichtmikroskope sind ein zentrales analytisches Werkzeug und werden permanent weiterentwickelt. Die Innovationen passen dieses Gerät stets der vorherrschenden Laboranforderung an. Darüber hinaus widmen sich große Forschungsbereiche den sogenannten Laser Scanning Mikroskopen und der Korrelativen Mikroskopie - dem Brückenschlag zwischen Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop (siehe Literatur 5).

Literatur

- 7) R. Käthner Praxis der Naturwissenschaften 4/53 2004 6-13
- 8) M. Zoelffel, Praxis der Naturwissenschaften 4/53 2004 20-24

Gerne stehen wir Ihnen auch persönlich für eine Beratung zur Verfügung.

 **OMNILAB**

Robert-Hooke-Straße 8 · 28359 Bremen · Telefon 04 21 / 1 75 99-0

www.omnilab.de · info@omnilab.de**Flexibel. Verlässlich. Persönlich.**