

Marktübersicht Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopie heute:

Die lebende Zelle als Meßküvette

Dieter G. Weiss und Walter Steffen

Institut für molekulare und zelluläre Physiologie der Tiere und Zentrum für lichtmikroskopische Meß- und Beobachtungsverfahren, Fachbereich Biologie, Universität Rostock

Die Zeiten sind vorbei, in denen Lichtmikroskopiker ihre Zeit nur an Mikroskopen verbrachten und stundenlang beobachteten und zeichneten. Mikroskope werden heute vor allem zur Dokumentation von Szenen und Abläufen sowie für zwei-, drei- und mehrdimensionale Messungen verwendet. Die Möglichkeiten der analogen und digitalen Bildverbesserung, Aufzeichnung und Analyse haben die Arbeitsweise von Okularen an Bildschirmen und Videogeräte verlagert. Viele Lichtmikroskopiker verwenden die Okulare nur noch zu Beginn der Arbeit, um die Objektebene einzustellen und steuern dann Szenenfolge, Fokus, Filterwechsler und Aufnahmegeräte per Keyboard und Joystick. Neben dieser Erleichterung, die durch ergonomisches Design der Mikroskope für alle, die dennoch viel am Mikroskop selbst arbeiten, abgerundet wird, ist durch die neuen Technologien eine Vielzahl von quantitativen Verfahren erschlossen worden. Mikroskope messen heute Konzentrationen, Enzymaktivitäten, Stofftransport, pH-Wert-Änderungen in der Zelle und die Genexpression. Neben den Ortskoordinaten sind fast immer über die Intensität Konzentrationsmessungen, über Fluoreszenz- und spektrale Verfahren Stoffzuordnungen und über Videosequenz-Analysen Stofftransport- und -Umsatz-Messungen möglich. Bereits vor 15 Jahren, als sich die elektronische Renaissance der Lichtmikroskopie abzeichnete, die uns die heutige, nahezu unüberblickbare Methodenvielfalt gebracht hat, haben die Autoren den Begriff „Die lebende Zelle als Meßküvette“ geprägt. Damit weitet sich der Einsatzbereich der Mikroskopie in der Biologie heute weit in die molekulare Biologie, Biochemie und Genetik aus.

Einige der zahlreichen neuen Meßverfahren und Entwicklungen sowie absehbare Trends sollen hier vorgestellt werden. Sonderzubehör, Video-Einrichtungen und Bildverarbeitungs-Soft- und Hardware werden später gesondert besprochen.

Weiterentwicklung der Optik

Aberrationsfreie Optiken, die das Erreichen der Abbeschen theoretischen Auflösungsgrenze erlauben, stehen schon seit längerer Zeit zur Verfügung. Dies wurde allerdings meist mit komplizierten viellinsigen Systemen erzielt, die bei Verfahren, bei denen mit Licht gezeitigt werden muß (Fluoreszenz, Lumineszenz), Nachteile boten. Heute bieten fast alle Hersteller die flexibleren, auf unendlich korrigierten Optiken im neuen Design an, das von Jahr zu Jahr Steigerungen der Lichtstärke und damit brillantere Abbildungen der Fluoreszenzpräparate gebracht hat. Die Front der Entwicklung befaßt sich zur Zeit mit der Erhöhung des Arbeitsabstandes in „long working distance“- und „extremely long working distance“-Objektiven und der Erhöhung der Numerischen Apertur (N.A.) (z.B. 1.4 bei 100x und 63x-Objektiven). Letzteres ist besonders wichtig für die heute meistens angewandte Epi-Fluoreszenz, weil dabei die Lichtstärke des Objektivs mit dem Quadrat der Vergrößerung abnimmt, aber mit der 4. Potenz der N.A. zunimmt.

Für alle, die mit größeren Objekten arbeiten (Larven, Gewebeschnitte), sind die äußerst praktischen Übersichtsobjektive ein dramatischer Fortschritt, wobei erstmals 0,5x-Objektive mit Bilddiagonalen von 5 cm zur Verfügung stehen (s. Tabellen zu technischen Daten, S. 73 ff.). Diese Entwicklungstendenzen haben dazu geführt, daß die bis in die siebziger Jahre geltende gegenseitige Verwendbarkeit der Objektive in Mikroskopen verschiedener Hersteller inzwischen fast völlig aufgegeben wurde. Die Hersteller gehen verschiedene Wege im Design, wobei Nikon mit seiner CFI60-Optik am radikalsten mit den Traditionen gebrochen hat und mit den deutlich längeren Objektiven (60 mm Abgleichlänge) – kombiniert mit der Tubuslinse von 200 mm

Brennweite – deutliche Vorteile bei der Flexibilität der einsetzbaren Kontrastverfahren, bei der Lichtstärke, dem effektiven Pupillendurchmesser und der Qualität des 0,5x-Objektivs erzielt.

Deutlich wird auch der Trend, mehrere Kontrast-Verfahren der klassischen Lichtmikroskopie in einem Gerät zu kombinieren (Hellfeld, Dunkelfeld, differentieller Interferenzkontrast (DIC), Polarisation, Phasenkontrast, Anaxialkontrast, Varelkontrast, Hoffman-Modulationskontrast u.a.).

Konfokale Mikroskope und andere 3D-Verfahren

Einsatzgebiete der konfokalen Mikroskopie sind die Erzeugung von Bildern optischer Schnittebenen bei der Fluoreszenzmikroskopie von dickeren Präparaten, die Rekonstruktion dreidimensionaler Strukturen und – was weniger bekannt ist – die Fluoreszenzmikroskopie bei sehr niedrigen Vergrößerungen (für Übersichten, Ausstrichpräparate), die wegen der geringen N.A. der niedrigen Objektive im konventionellen Mikroskop kaum möglich war [1]. Messungen schneller Prozesse, wie Muskelkontraktion, Vorgänge in lebenden Zellen etc., sind bei voller örtlicher Auflösung und in Videofrequenz oder schneller nach wie vor nur mit den Geräten weniger Hersteller möglich (z.B. Noran).

Bei den konfokalen Laser-Raster-Mikroskopen gehen die Trends einerseits zu kleineren Geräten („personal confocal“), die zum Teil sogar als Zusatz zu Geräten verschiedener Hersteller genutzt werden können. Der zweite Trend ist die Erhöhung des Tiefenbereiches, in dem die Korrektur der Objektive optimale Bildqualität erlaubt. Der dritte Trend geht zu multispektralen Systemen (z.B. Fa. Leica), mit denen mehrere bis viele Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet werden können. Dies ist bei der Vielfarben-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (multicolor-FISH) wichtig. Hier können heute schon alle menschlichen Chromosomen durch Kombination von Farbstoffen unterschieden werden. Auch der alte Traum der echten spektralen Analyse von Bildern Pixel für Pixel ist heute erfüllbar, und mehrere Entwicklungslabors arbeiten an der Verbesserung und Vereinfachung dieser Anwendung.

Die Einführung der 2-Photonen-Laser-Raster-Mikroskope hat einen weiteren Fortschritt gebracht. Mit ihr ist es möglich, dynamische Prozesse in lebenden Zellen mit

noch höherer Auflösung und dabei schonender zu untersuchen, da bei der verwendeten Wellenlänge (Infrarot) weniger Laserenergie absorbiert wird [2].

Dreidimensionale Darstellungen von Strukturen oder Fluoreszenzmarkern sind wichtig für die Interpretation topologischer Verhältnisse bei komplex geformten Zellen

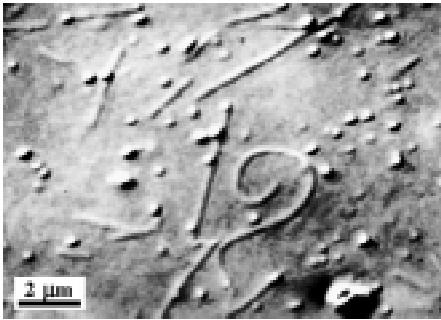


Abb. 1: Darstellung von Mikrotubuli (25 nm) und synaptischen Vesikeln (70 nm) im isolierten Tintenfisch-Axoplasma mit der AVEC-Mikroskopie. Die Objekte werden einzeln und in ihrer Bewegung aufgezeichnet, haben aber den scheinbaren Durchmesser der Beugungsbilder von etwa 200 nm (Auflösungsgrenze).

oder Organellensystemen. Die Mikroskophersteller widmen sich daher wieder vermehrt dem Problem, auf klassische Weise Raumbilder zu erzeugen. Neben dem Ansatz schnell alternierender Beleuchtung durch Aperturteilung mittels elektronisch modulierter Polarisatoren (Spatial Image Microscopy, Fa. Zeiss) zeichnet sich ein anderes, weitgehend auf einer Softwarelösung beruhendes Prinzip dadurch aus, daß es die volle Apertur nutzt und noch größere Abbildungstiefe mit der Eigenschaft der Kombinierbarkeit mit verschiedenen Durchlichtverfahren bietet (Digitaloptisches 3D-Mikroskop, Fa. Schwertner, Jena). Bei beiden Verfahren erfolgt die Betrachtung durch eine Shutter-Brille à la Cyberspace.

Die elektronische Revolution

Der Einsatz von Videokameras statt des menschlichen Auges hat dazu geführt, daß fast alle klassischen Begrenzungen der Lichtmikroskopie überschritten wurden. Die von Abbe beschriebene Auflösungsgrenze gilt nur für das Auge, elektronische Detektoren können um einen Faktor von etwa 2 besser sein. Restlicht- und Photon-Counting-Kameras nehmen Bilder von Szenen auf, die für das Auge schwarz sind. Kontraste können durch elektronische Verstär-

kung erzielt werden, wo das Auge kein Objekt mehr unterscheiden konnte. Bisher qualitative Verfahren werden jetzt zu quantitativen und neue Anwendungen werden erschlossen. So wird heute von Videomikroskopie oder „elektronischer Lichtmikroskopie“ gesprochen [3, 4], worunter die Techniken der Erzeugung von Bildern im konfokalen Mikroskop, bei der Video-Restlichtmikroskopie (video-intensified microscopy, VIM) und der Video-Kontrastverstärkungsmikroskopie (video-enhanced contrast, VEC) verstanden werden. Diesen Verfahren ist gemeinsam, daß Video- und elektronische Bildverarbeitung notwendig sind, um die Bilder zu erzeugen [5]. Dies ist nicht mit der digitalen Bildanalyse zu verwechseln, die mit ihren Morphometrie-Paketen auch nachträglich noch auf alle Bilder angewandt werden kann.

Die Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie nach Allen (AVEC), kombiniert mit differentiell Interferenzkontrast nach Nomarski (DIC), eignet sich besonders für extreme Vergrößerungen an ungefärbten, kontrastarmen Objekten wie etwa lebenden Zellen. Das AVEC-DIC-Verfahren erlaubt ein schichtweises Durchfokussieren dreidimensionaler Objekte (x, y-Auflösung: 0,2 µm, z-Auflösung (optischer Schnitt): 0,3 µm), da Bildinhalte vor und hinter der sehr engen Fokusebene nicht abgebildet werden. Da die Videomikroskopie teilweise anderen Prinzipien unterliegt als die konventionelle Lichtmikroskopie, gelingt es, auch Objekte zu beobachten, die 10- bis 20mal kleiner sind als die Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie, etwa einzelne Mikrotubuli (25 nm) (Abb. 1), kleine Actinbündel, synaptische Vesikel (50-70 nm), Bakteriengeißeln, einzelne Goldpartikel (bis 5 nm Durchmesser). Vergrößerungen bis zu 20.000fach werden möglich und sinnvoll, so daß erstmals alle Organellen in lebenden Zellen sichtbar werden [6, 7], von denen die meisten bisher nur nach Fixierung und Wasserentzug im Elektronenmikroskop nachweisbar waren. Die typische Ausrüstung besteht aus einer steuerbaren Video-Kamera (z.B. Chalnicon, Newvikon), einer DIC-Einrichtung mit de-Sénarmont-Kompensator zur Einstellung der lambda/9-Position (serienmäßig bei Nikon Eclipse 800) und einer Bildverarbeitungseinheit mit analoger und digitaler Kontrastverstärkung (z.B. Hamamatsu Argus20). Besonders hohe Auflösungen können durch spezielle „low shear“-Wollastonprismen erreicht werden (Nikon Eclipse 800) [6].

Das Verfahren der Video-Restlicht-Mikroskopie (VIM) zum Nachweis schwacher Fluoreszenzen eignet sich zur Darstellung von Zellorganellen nach Färbung mit Vitalfluoreszenzfarbstoffen, zur Immunzytochemie und zum „Ion Imaging“ (s.u.). Mit Fluoreszenzfarbstoffen kann eine simultane Darstellung der Fluoreszenz mehrerer zellulärer Parameter erreicht werden (Abb. 2). Entscheidend für die Entwicklung der Video-Restlicht-Mikroskopie war die Entwicklung von neuen Farbstoffen mit höherer Stabilität und besserer Quantenausbeute und die Entwicklung von Kameras mit hoher Lichtempfindlichkeit (SIT, silicon intensified target) beziehungsweise mit sehr geringem Dunkelstrom (gekühlte CCD-Kameras) [8]. Durch die Verfügbarkeit der neuen hochempfindlichen Restlichtkameras lassen sich auch Untersuchungen an lebenden Zellen in der UV- und der IR-Anregung durchführen ohne die Zellen durch hohe Farbstoffkonzentrationen oder Lichtintensitäten zu schädigen, wie Analysen der Chromatinverteilung und der Chromosomenbewegungen und ihrer Pathologie (Mikrokernentstehung, Aneuploidie, u.a. Veränderungen) während der Mitose. Ein Einsatzgebiet der Video-Restlicht-Mikroskopie ist die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH). Diese Methode wird zur zytogenetischen Charakterisierung und zur Analyse von Chromosomenaberrationen (Kinetocho- und Telomer-Markierung, „chromosome painting“, u.a.) herangezogen.

Die physikalischen Eigenschaften des Lichts erlauben nicht nur die Darstellung von Zellen und Zellstrukturen mit hoher Auflösung, sondern auch die Erhebung von Meßdaten. Durch den Einsatz einer Fülle spezifischer, hochempfindlicher Fluoreszenz-Farbstoffe ist es möglich, biochemische und biophysikalische Parameter zu messen (Tab. 1).

Messende Mikroskopie

Die physikalischen Eigenschaften des Lichts erlauben nicht nur die Darstellung von Zellen und Zellstrukturen mit hoher Auflösung, sondern auch die Erhebung von Meßdaten. Durch den Einsatz einer Fülle spezifischer, hochempfindlicher Fluoreszenz-Farbstoffe ist es möglich, biochemische und biophysikalische Parameter zu messen (Tab. 1).

Mit der Technik des *Ion imaging* oder *Ratio imaging* werden Ionenkonzentrationen (Ca²⁺, pH-Wert, etc.) und ihre Änderungen innerhalb einer Zelle quantifiziert. Solche Messungen werden meist mit zwei Wellenlängen gemessen, die zueinander ins Verhältnis gesetzt werden (ratio imaging), weil dadurch die Messung von der Zelldicke (opt. Weglänge, „Küvetten“-Länge) unabhängig wird, die sich herauskürzt. Wichtig für das Ion Imaging sind sehr lichtempfindliche Kameras bei flachen Zellen oder ein schnell rasterndes konfokales Mikroskop bei dickeren Zellen und Zellverbänden (Abb. 3).

Die *Spektralphotometrie* und die *Spektralfluorometrie* können zur Bestimmung von Absorptions-Spektren in kleinsten Bildausschnitten und zur Messung schwächster Lichtmengen beziehungsweise zur Bestimmung von Fluoreszenzspektren in kleinsten Bildausschnitten eingesetzt werden. So werden bei monochromatischer Beleuchtung endogene (NADPH, Pigmente, fluoreszierende Enzymsubstrate) und exogene Chromophore meßbar.

Spektrale, bildgebende Messungen werden auch durch die *Fourier-interferometrische Bildanalyse (FIBA)* ermöglicht. Es wurden Geräte entwickelt, die zu 256x256 Pixeln jeweils ein Spektrum mit 256 Stützpunkten im sichtbaren Bereich liefern, bei einer zeitlichen Auflösung von wenigen Sekunden. Dadurch werden spektrale Veränderungen in der Zelle meßbar, die metabolische oder Konzentrationsveränderungen anzeigen, und dies – bei günstiger Lage der spektralen Maxima – für mehrere Moleküle simultan.

Das *Zellelektrophorese-Mikroskop* dient zur Messung der elektrophoretischen Mobilität und damit der Nettoladung von Zellen in einem elektrischen Feld. Mit dieser Mikroskopiemethode lassen sich Zellen auch multiparametrisch charakterisieren (Formparameter, Masse über die Messung der Brownschen Bewegung).

Biochemische Protein-Protein-Interaktionen können innerhalb einer lebenden Zelle durch den Einsatz der *Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-Mikroskopie* ermittelt werden. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Energie von einem fluoreszierenden Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen wird. Durch den Einsatz geeigneter Fluoreszenz-markierter Proteine können Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen oder zwischen Rezeptor und Ligand orts aufgelöst untersucht werden.

Kombination optischer Verfahren

Zur strukturellen Zuordnung der Verteilung von fluoreszierenden Molekülen ist stets die Kombination von Epi-Fluoreszenz mit einer hochauflösenden Durchlichtmethode erforderlich, wenn unbekannte Zellen, große Eizellen oder Embryonen untersucht werden. Verschiedene mikroskopische Verfahren, wie zum Beispiel die AVEC-Mikroskopie und die Fluoreszenzmikroskopie, lassen sich auch gleichzeitig anwenden, wenn für beide monochromatisches Licht

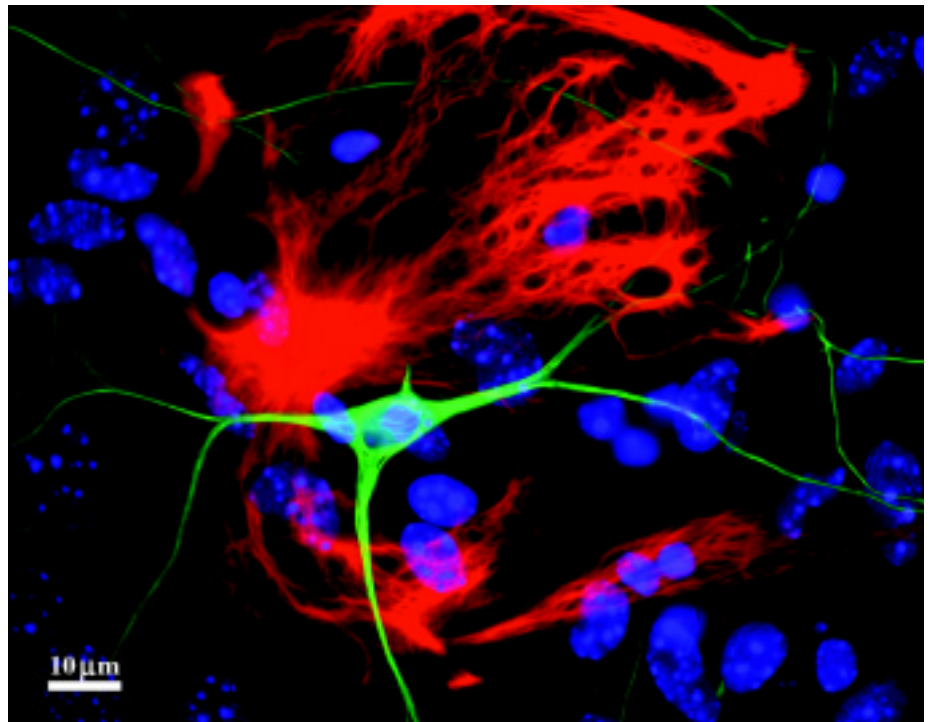


Abb. 2: Mehrfachfluoreszenz einer Co-Kultur aus Mäuse-Rückenmarkszellen. Rot: „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP, CY-3-gekoppelt) der Gliazellen, grün: 68kD-Neurofilament-Protein der Nervenzellen (2. Antikörper FITC-markiert) und blau: DNA-Farbstoff Hoechst 33258. Die Farbstoffe wurden einzeln angeregt, mit einer gekühlten CCD-Kamera (Photometrics) aufgenommen und dann mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Photoshop) in ein Farbbild umgewandelt.

verschiedener Wellenlänge und die geeigneten dichroitischen Strahlenteiler und Filter sowie zwei Kamerasysteme benutzt werden. In lebenden Zellen, die mit Vitalfarbstoffen gefärbt wurden, lassen sich so bestimmte Zellorganellen identifizieren und gleichzeitig morphologische und dynamische Veränderungen beobachten [9] (Abb. 4). Mit der Einführung des GFP (green fluorescent protein) als zelleigenem fluoreszierenden Marker für exprimierte Proteine ist es nun auch möglich, durch Kombination mit der Phasenkontrast- oder DIC-Mikroskopie, die Expression und Umverteilung bestimmter Proteine innerhalb einer Zelle oder während der Ontogenese zu untersuchen. Mit Hilfe von GFP lassen sich auch definierte Zellen in einem Zellverband markieren, und es kann so untersucht werden, welche Proteine in welchen Zellen bei der Larvalentwicklung eine wichtige Rolle spielen.

„Physiologische Workstations“

Für das Arbeiten mit lebenden Zellen sind im Bereich der Physiologie Spezialtechniken erforderlich, die eine Veränderung der Mikroskopkonzeption verlangt haben, damit Mikromanipulatoren, Mikroinjektionspipetten und Ableit-Elektroden, Petrischalen, Gewebebäder, Thermokammern und Zell-

kultur-Superfusionskammern etc. Platz finden. Alle großen Hersteller bieten daher heute Physiologie-Mikroskope mit folgender Ausstattung an: aufrechtes Mikroskop, feststehender Objektstisch mit Aufnahmen für die Zusatzgeräte, dafür zur Fokussierung bewegliche Objektive, „long distance“ und Wasser-Immersion-Objektive, hochfahrbare Objektive auf einer Schiene statt auf dem Revolver (z.B. Zeiss, Nikon) und Schwingungsisolierung des Tisches. Wichtig bei diesen Mikroskopen ist die Korrektur der Optik von 340 nm (zur Anregung für Ca²⁺ und pH-Farbstoffe) bis in den nahen IR-Bereich. Bei 800-1000 nm sind viele Gewebe völlig transparent, so daß durch IR-VEC-DIC die Positionierung von Patch-clamp-Pipetten tief im Schnittpräparat möglich ist [10]. In diese Gruppe gehören z.B. die Mikroskope Leica DM LFS, Nikon PhysioStation E600FN und Zeiss Axioskop 2 FS.

Optische Manipulationstechniken

Moderne Mikroskope werden immer öfter auch zur Manipulation des Objekts benutzt. So können Zellen mit Licht definierter Wellenlänge angeregt und chemische Reaktionen ausgelöst werden, Zellen oder Zellbestandteile können im Laserfokus gefangen und bewegt oder in Sekundenbruch-

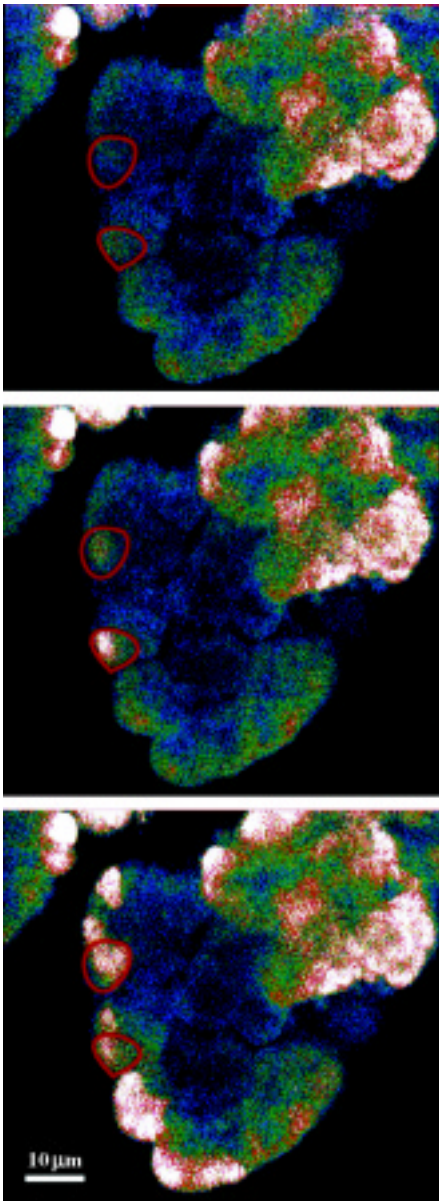


Bild: A. Gramowski

Abb. 3: Zeitliche Ausbreitung der Ca^{2+} -Konzentrationswellen von der basalen zur apikalen Seite in den Zellen eines Pankreas-Acinus nach Stimulierung mit $\text{CCK-8}(10^{-9} \text{ M})$. Das Ca^{2+} wurde im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop mit dem Farbstoff Fluo-3-AM nachgewiesen und in den gesetzten Fenstern quantifiziert (Noran Odyssey, Filter 488/515nm). Bildintervall 30 s.

teilen verdampft werden [2].

Für ein *Laser-Strahl-Stichmikroskop* benötigt man einen eingekoppelten Stickstoff-Laser (337 nm) und eventuell einen HeNe-Ziel-Laser. Es dient zur mikroskopischen Material-Ablation, Entfernung von Organellen, Chromosomen, Durchtrennung von Zellfortsätzen, Ausschneiden von Zellen und Zellgruppen aus Schnitten u.ä. Mikroskopische Objekte (Organellen, Zellkerne, Partikel, Zellen) können aber auch mit dem Focus eines abgeschwächten Laserstrahls

(Nd-YAG-Laser, 1064 nm) gefangen und zerstörungsfrei bewegt werden: *Laserpinzette* (*Laser tweezers*, *Laser trap*).

Die *UV-Blitzphotolyse* erlaubt die gezielte, rasche und örtlich definierte Freisetzung von Wirkstoffen in der lebenden Zelle durch Aktivierung geschützter („caged“) Verbindungen (geschütztes Ca^{2+} , geschütztes ATP, Calmodulin, Transmitter etc.). Sie kann aber auch für Messungen von Diffusions- und Bindungseigenschaften fluoreszierender Moleküle in der Zelle durch „*Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)*“ eingesetzt werden.

Neben den mechanischen Mikromanipulatoren gibt es auch Zusatzgeräte für die *Mikroskopie im definierten Magnetfeld* (Magnetodrom) für Studien mit magnetischen Mikropartikeln (z.B. an Antikörper gekoppelt), zur Analyse magnetischer Eigenschaften (Biominalisation, magnetotaktische Bakterien) und zum Studium von Zellreaktionen in homogenen und inhomogenen Magnetfeldern variabler Feldstärke [11].

Die lebende Zelle in ihren vier Dimensionen

Die Herausforderung der modernen biologischen und medizinischen Forschung besteht darin, möglichst umfassende Informationen über die Abläufe in der lebenden Zelle zu erhalten. Die neuen höchstauflösenden und quantitativen Verfahren der elektronischen und computergestützten Lichtmikroskopie können direkt zu Studien der Dynamik zellulärer Strukturen und Prozesse genutzt werden. Diese Technologie ist eine zukunftssträchtige Methode zur orts- und zeitaufgelösten Bestimmung von morphologischen Parametern, aber auch von Enzymaktivitäten, Ionen und Antigenen in der lebenden Zelle (Konzentrationen, Konzentrationsveränderungen, pH-Wert, zytosolisches Ca^{2+} , Viskosität, etc.) (Tab. 1).

Dynamische Verhaltensweisen sind ganz essentiell mit Leben an sich verbunden: „Where there is life, there is motion.“ Zellen „funktionieren“ in vier und mehr Dimensionen (2D oder 3D räumlich, Zeit, Konzentration). Es gibt keinen anderen adäquaten Weg, diese Dynamik und Komplexität zu beschreiben und zu analysieren als das Erstellen und Auswerten von Bildsequenzen. Die Meßergebnisse liegen als Film vor, das heißt mit räumlicher und zeitlicher Auflösung. Bei schwacher Vergrößerung können Werte für viele Zellen in einem Feld gemessen werden, bei starker Vergrößerung

mißt man die regionale Verteilung des Parameters in verschiedenen Bereichen und Ausläufern einer Zelle [12].

Der rasche Fortschritt bei der Erforschung der Dynamik in der lebenden Zelle wurde vor allem dadurch ermöglicht, daß durch die Kombination von Licht-Mikroskopie und digitaler Bildverarbeitung eine Vielzahl neuer Verfahren verfügbar wurden, die es erlauben, die Abläufe in der lebenden Zelle direkt zu studieren. Das heißt, Mengen, Konzentrationen, Transport und Stoffwechsel intrazellulärer Substanzen können in der Zelle analysiert werden, ohne daß diese wie bisher homogenisiert werden muß. Ebenso werden Morphologie, Verteilung, Interaktion und Bewegung intrazellulärer Feinstrukturen entweder direkt oder nach Einführung spezifischer Fluoreszenzmarker bestimmbar. Da die meisten Messungen berührungslos und in der lebenden Zelle ablaufen, wird sich die Entwicklung immer mehr in Richtung „Die lebende Zelle als Meßküvette“ bewegen.

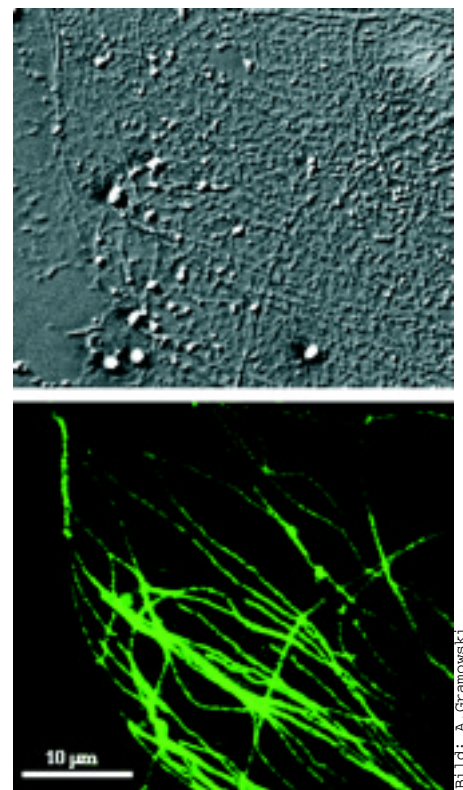


Bild: A. Gramowski

Abb. 4: Kombination von Verfahren am gleichen Objekt. Mikrotubuli in einer flachen neuronalen Stammzelle. Oben, filamentäre Strukturen werden mit Hilfe der AVEC-Mikroskopie sichtbar gemacht und können mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (unten, SIT-Kamera, grün pseudocoloriert) eindeutig als Mikrotubuli identifiziert werden.

A. Feinmorphologische Parameter

1. Bessere Visualisierung und Auflösung durch Video-Kontrastverstärkungsmikroskopie (z.B. AVEC-DIC)
2. Sichtbarmachung von Zellen und ihren Ausläufern in dicken Gewebeschnitten (IR-VEC-DIC, Anaxial-Kontrast-VEC)
3. Selektive Sichtbarmachung fluoreszenzierender Komponenten, Autofluoreszenz (Restlicht-Video-mikroskopie, VIM)
4. Zahl, Ort und Formparameter freier Zellen (z.B. durch Video-Mikrointerferometrie)
5. Zahl, Ort, Formparameter, Größe und Gesamtfläche der Zellorganellen nach Färbung mit organellenspezifischen Vitalfarbstoffen:
 - Endosomen, Lysosomen, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien, Kern, u.a. (VIM)
6. Quantitative Morphometrie
7. Chromosomendefekte (Hybridisierung und Detektion mit Fluoreszenz (VIM) oder kolloidalem Gold (EPI-POL))
8. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)
9. Dickenprofil der Zelle (d.h. optische Weglänge für die Berechnung von intrazellulären Konzentrationen)
10. Dreidimensionale Darstellung von Zellen und Geweben (konfokale Laser-Raster-Mikroskopie)

B. Biochemische Parameter

1. Trockenmasse von Einzelzellen (Video-Mikrointerferometrie):
 - Gesamttrockenmasse
 - Verteilung der Trockenmasse
 - Flußmuster der Trockenmasse (Lokomotion, Kontraktion und intrazelluläre Motilität)
 - kinetische Energie der intrazellulären Motilität und der Lokomotion
2. Verteilung und Konzentration von Proteinen und anderen Antigenen (nach Antikörper-Mikroinjektion oder Fixierung der Zellen):
 - fluoreszenzmarkierte Antikörper (VIM)
 - goldmarkierte Antikörper (auch für Rezeptormarkierung und Antigentransportstudien) (EPI-POL)
3. Substanzkonzentrationen (monochromatische Beleuchtung) (Vitalfluoreszenz-Farbstoffe akkumulieren in der Zelle; in einigen Fällen ist aber Mikroinjektion zu bevorzugen) (VIM)
 - Ionen-Konzentration in Cytosol (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^-) (RATIO IMAGING)
 - pH-Wert (H^+ -Konzentration) (RATIO IMAGING):
 - im Cytoplasma
 - in Organellen
 - Endogene, absorbierende Substanzen (mit bekanntem Spektrum) (RATIO oder DIFF.-IMAGING)

- Endogene fluoreszierende Substanzen (mit bekanntem Spektrum) (VIM, FIBA) (möglich: Fluoreszenz-Enzymtests)
4. Messung von Metaboliten durch Luciferasegekoppelte Enzymtests, „metabolic imaging“ (an Gefrierschnitten oder nach Mikroinjektion):
 - Lactat, Glucose, ATP
 5. *In situ*-Hybridisierung mit fluoreszenz- oder goldmarkierten Proben (EPI-POL, VIM)
 - auf zellulärer Ebene
 - auf Chromosomenebene
 6. Genexpression („lux“-Gen, *in-situ*-Hybridisierung und Erkennung mit kolloidalem Gold oder Lumineszenz)

C. Zellphysiologische Parameter

1. Zellbewegung (AVEC, SEQU, SUBTR)
2. Viskosität des Cytoplasmas (Brownsche Bewegung) (erfordert Mikroinjektion von Standards)
3. Elastische Eigenschaften von Membranen, Zellen, Organellen und Mikrotubuli
4. Cytoplasmatischer Transport, Axonaler Transport, Organellenbewegung, Protoplasmaströmung (Bewegungsanalyse-Software):
 - Geschwindigkeit, Geradlinigkeit, Geschwindigkeitsfluktuation, Rhythmizität, thermische Komponente (Brownsche Bewegung), Richtungsumkehr, Ruhepausen (SEQU, SUBTR)
 - Chromosomen-Dynamik in der Mitose (supravitale UV-Video-mikroskopie)
 - *in vitro*-Assay von Motorenzymen (AVEC-DIC und Bewegungsanalyse; x-t-Scan mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie für schnelle Abläufe im ms-Bereich)
5. Zellwachstum (Ausläufer, Axone, etc.) (Bewegungsanalyse und nichtradioaktive Messung

- der Trockenmasse durch Bildanalyse von Interferenzmikroskopie-Bildern)
6. Bewegungsintensität an jedem Bildpunkt (mittlere quadratische Abweichung der Variation der Pixelintensität)
 7. Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit von Partikeln und gelösten Makromolekülen, Bestimmung von Strömungsgeschwindigkeiten (Laser-Doppler-Velocimetrie-Mikroskop)
 8. Messung von Kräften im mikroskopischen und molekularen Bereich:
 - Mikroskopie im Magnetfeld („Magnetmikroskopie“, Magnetodrom)
 - Mikromanipulation von Zellorganellen mit der Laserpinzette („laser trap“, „optical tweezers“)
 9. Membranpotential (VIM)
 - Plasmamembran
 - Organellenmembranen
 10. Exo/Endocytose-Tests (z.B. Aufnahme von Lumineszenzmarkern)
 11. Zellphysiologische Regelprozesse: momentane Freisetzung von geschützten Metaboliten („caged compounds“) durch Blitzphotolyse zur Messung der Kinetik der Wiederherstellung des Gleichgewichts (zur Photoaktivierung ist Videomikroskopie nicht erforderlich, wohl aber zur optimalen Beobachtung der Effekte):
 - käuflich erhältlich sind z.B.: caged ATP, cAMP, GTP, cGMP, CTP, H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , IP_3 , Transmitteragonisten
 12. Diffusionskoeffizienten bzw. Viskosität: Fluoreszenz-Erholung nach Photobleichung (FRAP):
 - räumlich und zeitlich aufgelöst
 13. Austausch von fluoreszenzmarkierten Verbindungen zwischen Nachbarzellen (erfordert Mikroinjektion)
 14. Tod der Zelle (Verlust der Farbstoffaufnahme; live-dead-Farbstoffe)

Abkürzungen:

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| AVEC | Allen Video-Enhanced Contrast Microscopy |
| EPI-POL | Auflicht-Polarisationsmikroskopie |
| DIC | Differentieller Interferenzkontrast nach Allen und Nomarski |
| oder Smith | |
| DIFF | Differenzbilder, Bild-Subtraktion |
| FIBA | Fourier-interferometrische Bildanalyse |
| FRAP | Fluorescence Recovery After Photobleaching |
| RATIO | Verhältnissbilder, Bild-Division |
| SEQU SUBTR | Sequentielle Subtraktion |
| VEC | Video-Enhanced Contrast |
| VIM | Video-Intensified Microscopy, Restlichtmikroskopie |

Tab. 1: An lebenden Zellen oder Gewebeschnitten videomikroskopisch meßbare Parameter

Lichtmikroskopie-Zentren

Die „neue“ Lichtmikroskopie ist heute in einer Situation, die vielleicht mit dem Durchbruch der Elektronenmikroskopie in der fünfziger und sechziger Jahren verglichen werden kann. So werden in den USA bereits an vielen Forschungseinrichtungen neue Lichtmikroskopie-Zentren oder „Integrated Microscopy Facilities“ (für Lichtmikroskopie, Elektronenmikroskopie und computergestützte Bildanalytik) eingerichtet. An der Universität Rostock wurde durch Initiative des Lehrstuhls für Tierphysiologie ein solches „Zentrum für lichtmikroskopische Meß- und Beobachtungsverfahren“ (www.uni-rostock.de/fakult/manafak/biologie/alle.htm) eingerichtet. Ein solches Zentrum sollte Techniken

- ▶ der abbildenden Mikroskopie,
- ▶ der messenden Mikroskopie,
- ▶ Spezialtechniken für das Arbeiten mit lebenden Zellen,
- ▶ Mikromanipulationstechniken,
- ▶ Video-Bild- und Daten-Verarbeitung und
- ▶ ein Gästelabor umfassen.

Der Schwerpunkt des Zentrums liegt bei den Techniken, die Messungen mit höchster räumlicher, zeitlicher und spektraler Auflösung an lebenden Zellen erlauben (siehe Tab. 1). Haupteinsatzgebiete sind Untersuchungen zur zellulären Dynamik des Zytoskeletts, der Zellorganellen, der Motorenzyme, der Zellteilung, der Chromosomenverteilung, der Zell-Proliferation, der Lokomotion und Bewegung von Bakterien, Magnetbakterien, höheren Pflanzen- und Tierzellen sowie der Wirkung von Substanzen und von physikalischen Einflüssen auf die Zelle.

Diese Testbatterie kann für vielfältige Studien eingesetzt werden, die Hinweise auf die Art und den Mechanismus von Schädigungen auf zellulärer Ebene durch beliebige Noxen erbringen. Solche Tests könnten auf den verschiedensten Gebieten eingesetzt werden, z.B.

- ▶ Umwelttoxikologie (Einzelzellen und neuronale Netzwerke in Kultur, Protozoen, durchsichtige Kleinlebewesen, Algenzellen),
- ▶ Analyse der Funktion von Neuronenverbänden und neuronalen Netzwerken,
- ▶ Analyse der Wirkungsmechanismen von Pharmaka an Zellen in Kultur und an neuronalen Netzwerken,
- ▶ Bestimmung des gesamten Wirkungsspektrums einzelner toxischer Substanzen,
- ▶ pathophysiologische Veränderungen bei Krankheitsmodellen und an Biopsaten,

- ▶ Tests auf Zell- und Gewebeerträglichkeit (Wirkstoffe, Implantat-, Prothesen-Material).

So ist das Rostocker Mikroskopiezentrum eines der wenigen Labors, die fast das ganze Spektrum der neuen lichtmikroskopischen Verfahren anwenden und auch Gastforschern zugänglich machen.

Ausblick

Dramatische Verbesserungen der Optik, modulare Bauweise der Mikroskope und Quantifizierbarkeit vieler Verfahren durch Echtzeit-Bildverarbeitung haben die Lichtmikroskopie in ganz wenigen Jahren, und von manchen unbemerkt, zu einer der modernsten und aussagekräftigsten Methoden der Biologie gemacht. Mit diesen *in vitro*-Techniken wird die Komplexität der lebenden Zelle oder auch der vernetzten Zellverbände wesentlich adäquater erfaßt als mit den herkömmlichen punktuellen Methoden (z.B. Einzelenzym-Tests), und es werden dabei stets quantitative Aussagen erzielt. Diese Technologie kommt auch dem derzeitigen Bedarf nach aussagekräftigen, neuen *in vitro*-Verfahren entgegen, die in der Zukunft auf einigen Gebieten den Tierversuch ersetzen können.

Die elektronische Lichtmikroskopie wird künftig weiter an Bedeutung gewinnen, weil sie die Brücke von der mikroskopischen Morphologie sowohl zur Zellphysiologie als auch zur molekularen Zytoarchitektonik und zu einer dynamischen Biochemie schlagen kann.

Literatur

- [1] Sheppard, C.J.R., and Shotton, D.M. (1997) Confocal Laser Scanning Microscopy. *Bios Scientific Publishers, Oxford*, 106 p.
- [2] Halhuber, K.-J. and König, K. eds. (1998) Modern Laser Microscopy in Cellular and Molecular Biology. *Cell. Molec. Biol.* 44(5) 657-881 Special issue.
- [3] Weiss, D.G., Maile, W., Wick, R.A. (1989) Video Microscopy. (Chapter 8) In: *Light Microscopy in Biology. - A Practical Approach*, A.J. Lacey (ed.) IRL Press, Oxford, pp. 221-278
- [4] Shotton, D.M. (ed.) (1993) Electronic Light Microscopy: The Principles and Practice of Video-Enhanced Contrast, Digital Intensified Fluorescence and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Wiley-Liss, New York*
- [5] Inoué, S., and Spring, K.R. (1997) Video Microscopy: The Fundamentals" 2nd. Ed., *Plenum Press, New York*, 741 p.
- [6] Weiss D.G. (1998) Video-enhanced contrast microscopy. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook* (J.E. Celis, ed.), *Academic Press*, 2nd ed., Vol. 3, pp. 99-108
- [7] Weiss, D.G., W. Maile (1993) Principles, practice, and applications of video-enhanced contrast microscopy. In: *Electronic Light Microscopy: Shotton, D.M. (ed.) Wiley-Liss, New York*, pp. 105-140
- [8] Lange, B.M.H., Sherwin, T., Hagan, I.M., and Gull, K. (1996) The basics of immunofluorescence video-microscopy for mammalian and microbial systems. *Trends in Cell Biol.* 5 328-332.
- [9] Foksett, J.K. (1993) Simultaneous differential interference contrast and quantitative low-light fluorescence video imaging of cell function. In: *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications*. B. Herman and J.J. Lemasters, (eds.), pp.237-261. *Academic Press, New York*.
- [10] Dødt, H.U., and Ziegglänsberger, W. (1990) Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-video microscopy. *Brain Res.* 537 333-336.
- [11] Petermann, H., D.G. Weiss, L. Bachmann, N. Petersen (1990) Motile behaviour and measurement of the magnetic moment of magnetotactic bacteria in rotating magnetic fields. In: *Biological Motion*, W. Alt and G. Hoffmann (eds.) *Lecture Notes in Biomathematics*, Vol. 89, *Springer-Verlag Berlin*, pp. 387-395
- [12] Weiss D.G. (1989) Videomicroscopic measurements in living cells: Dynamic determination of multiple end points for *in vitro* toxicology. *Molec. Toxicol.* 1 465-488

Korrespondenzadresse

Prof. Dieter G. Weiss
Dr. Walter Steffen

Institut für molekulare und zelluläre Physiologie der Tiere und Zentrum für lichtmikroskopische Meß- und Beobachtungsverfahren
Fachbereich Biologie
Universität Rostock
Universitätsplatz 2
D-18051 Rostock

BIOspektrum Marktübersicht: Konfokale Laser Scanning-Mikroskope

| | | | | |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Firma | BIO-RAD Laboratories GmbH Heidemannstr. 164 D- 80939 München Tel.: +49-89-31884-0, Fax: 100 | Carl Zeiss Jena GmbH, Mikroskopte D- 07740 Jena Tel.: +49-3641-641616 Fax: -3144 | CHROMAPHOR Analysetechnik GmbH Lauterberger Str. 11 D- 47259 Duisburg Tel.: +49-203-9986-28, Fax: -30 | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Lilienthalstr. 39-45 D- 64625 Bensheim Tel.: +49-6251-136-0, Fax: -155 |
| Gerätename / Serie | Radiance | LSM 510 | NORAN Oz | TCS-SP |
| Ausführung | Micro R, R Plus | UV, Visible, Multiphoton | | Spektrales Konfokales Komplettsystem |
| Komplettsystem oder Zusatzgerät | Zusatzgerät | Zusatzgerät | Zusatzgerät | mit frei definierbaren Emissionsfiltern für Leica DMR-, DMIR-Mikroskope |
| Zusatzgerät | passend für alle gängigen Mikroskope aller Hersteller | passend für alle gängigen Mikroskope aller Hersteller | fur alle aufrechten inversen Stativ | für alle Leica-Objektive von 1,6x bis 100x Vergrößerung |
| Komplettsystem | | | | |
| Typ | Konfokales Punktscanning-System | Konfokales Punktscanning-System mit Multi Photonen-Option | Laser-Konfokal | Punktscanner (Pinholes) |
| Lichtquelle | Ar-Laser, HeNe-Laser, Laserdioden | verschiedene Laser | Argon-, Krypton- und He-Ne-Laser | Laser |
| Wellenlänge | 488 - 637 nm | 351-1047 nm | Ar 457/488/514, HeNe 543 HeNe 633 ArKr 488/568, Ar 351/364, NIR 700-900 (fs) | von 350 nm bis 900 nm |
| Laser-Typ | Gas- und Diodenlaser | Gas- und Diodenlaser | Ar, ArKr, HeNe, TiSapphire (fs-Impulse) | Ar, ArKr, HeNe, Kr, HeNe, TiSa |
| Leistung [W] | Typabhängig, auf Anfrage | Typabhängig, auf Anfrage | 50 - 300 mW | von 10 mW bis 5 W |
| Anzahl der Meßkanäle | 1 - 3 | | | 5 |
| für Fluoreszenz | | 3 normale und 2 non-descanning FI-Detektion | | 4 |
| für zusätzliches Kanal-Durchlicht | 1 | 3 Transmissionskanäle, | 1, RGB möglich | 1 |
| für Reflexionskanal | | auch für Reflexion geeignet | 4 | 1 Reflexion + 3 Fluoreszenz |
| x-y-Richtung | 180 nm bei 488 und NA von 1,4 | 180 nm bei 488 und NA von 1,4 | 100 nm (0,1 µm) | 0,18 µm |
| z-Richtung | 340 nm bei 488 nm und NA von 1,4 | 340 nm bei 488 und NA von 1,4 | 200 nm (0,2 µm) | 0,35 µm |
| Zeitlich (Vollbilder / sec) | 1 (768 x 512 pixel) | 1 (768 x 512 pixel) | 2,6 (512 x 512) | 30 (max 480 / s, 256 x 32 pixel) |
| Art | Stepper-Motor | Stepper-Motor | interner Z-Trieb (Stepper-Motor, Harmonic Drive) Feinfokussiertisch HRZ 200 | Galvanometer-getriebener Feinfokussiertisch |
| Schritte | 0,05 µm | 0,05 µm | 0,1 µm (HRZ: 10 nm) | 0,04 µm |
| Geschw. (Schritte / sec) | 1 | 1 | 3 (HRZ: 300) | 1900 Linien / sec |
| Detektoren (Anzahl) | 4 (Videoausgabe möglich) | 8 (Videoausgabe möglich) | PMT (5), Monitoriode | 5x PMT |
| Software /Rechnersystem | Standard PC mit OS / 2W4 | Standard PC mit OS / 2W4 | LSM 510 SW (Zeiss), Windows NT SNI-Rechner (PC, 256 MB RAM, 400 MHz) | Windows NT 4.0 |
| Bildaufnahme | Bio Rad-Lasersharp SW | Bio Rad-Lasersharp SW | LSM 510 SW / Zeiss | Frame Grabber |
| 3D-Rendering | * | * | 3D for LSM / CZ Vision | AUS |
| Quantitative Analyse 2D | * | * | LSM 510 SW / Zeiss | ja |
| Quantitative Analyse 3D | * | * | 3D for LSM, KS 100...400 / CZ-Vision | ja |
| Spezielles Zubehör | Bio Rad Kinetik-Software Zeiss Axiotech Vario-Anpassung | U.a. Bio Rad Kinetik-Software | DIC, Phako, mot. xy-Scanning-Tisch, HRZ 200, spez. Filter (Indo, SNARF), aktiv gedämpfter Systemtisch, Monitoriode | AUI-Files, Laserpinzette, Laserschere, Raman-Spektrometer |

BIOspektrum Marktübersicht: Konfokale Laser Scanning-Mikroskope

| Firma | Nikon GmbH Tiefenbacher Weg 25 D- 40472 Düsseldorf Tel.: +49-211-9414-0 Fax: 49-211-9414-322 | Olympus Optical Co. (Europa) GmbH Wendenstr. 14-16 D- 20097 Hamburg Tel.: +49-40-23773-0 Fax: 49-40-233765 / 230761 | Polytec GmbH Polytec-Platz 5-7 D- 76337 Waldbronn Tel.: +49-7243-604-0 Fax: -49-7243-699-44 | Schwertner GbR Closewitzer Str. 3 D- 07743 Jena Tel. und Fax: +49-3641-821167 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Gerätename / Serie | PCM2000 (= Personal Confocal Microscope) | FLUOVIEW | | Digitaloptisches 3D-Mikroskopsystem |
| Ausführung | Komplettsystem oder Zusatzgerät | Komplettsystem, Scanner als Modul | Komplettsystem oder Zusatzgerät | Komplettsystem |
| | Zusatzgerät | | Als Ausbausystem, passend zu den Mikroskopen der Firma Olympus, Serien BX und IX | |
| | Komplettsystem | Kombinierbar mit allen aufrechten und inversen Forschungsmikroskopen von Nikon 0,5x - 100x Objektiv | Inverses oder aufrechtes Forschungsmikroskop, speziell Fixed-Stage-Physiologiestativ BX 50WI, Trocken-, Wasser- bzw. Ölimmersionsobjektive hoher NA, max. NA 1,4, max. Objektivvergr. 100x, Transmissions-DIC-Kontrast, simultane Videoadaptation | Herstellerabhängig, je nach Objektive, Vergrößerung, NA |
| Typ | Konfokales Laser-Scan mit "Pinholes" (Point-Scanner) | | Point-Scanning-System, Galvanometerspiegel, Konfokales Laser Scanning-System, 5 verschiedene feste Pinholes | Konfokales Laser Raster-Mikroskop mit motorisch, verstellbaren Pinholes (20-3000 µm) |
| Lichtquelle | | | | Hg / Xe |
| Anzahl der Meßkanäle | Wellenlänge | 457, 488, 514 nm Argon-Ionen-Laser | 488 / 568 / 647 nm | Jede verfügbare Wellenlänge |
| | Laser-Typ | 543 nm HeNe-Laser 633 nm HeNe-Laser | Argon-Argon- / Krypton-Ionengaslaser | Jeder verfügbarer Laser |
| | Leistung [W] | 25 mW Argon-Ionen 2 mW beide HeNe-Laser | max. 15 mW pro Wellenlänge (< 5 mW erforderlich) | Laserabhängig |
| für Fluoreszenz | | 2 | 2 oder 3 | 2 (standard), 3 (optional) |
| | für zusätzliches Kanal-Durchlicht | 1 | 1 opt. | 2 (standard) optional |
| für Reflexionskanal | | 2 unter Benutzung der Fluoreszenzkanäle | 1 opt. | optional |
| | x-y-Richtung | 0,180 µm | 0,174 µm | 1 |
| Maximale Auflösung | z-Richtung | 0,400 µm | 0,339 µm | z.B.: Objektiv 60x / 1.40 Öl: 170 nm bei 488 nm |
| | Zeitlich (Vollbilder / sec) | 640 x 480 pixels 1 Bild / sec 1024 x 1024 pixels 0,5 Bilder / sec | 2 / sec | z.B.: Objektiv 60x / 1.40 Öl: < 100 nm |
| z-Vortrieb | Art | Stepper-Motor | Piezo | Piezo (Nachrüstung) oder Stepper-Motor |
| | Schritte | 0,1 µm | 10 nm | < 20 nm |
| | Geschw. (Schritte / sec) | Variabel | 2 mm / sec | 0,05 µm 2 Schritte / sec |
| Detektoren (Anzahl) | 2 (für Fluoreszenz) + 1 Transmissionskanal | 2/3 PMT | | 3 Chp CCD |
| Software / Rechmersystem | | Pentium II, 400 MHz, 265 MB RAM, Windows NT, Windows 95 | Pentium 400 MHz, 256 MB SDRAM, MO-Drive, Windows NT, Systemsoftware, Unterstützung durch SG-Workstation / Enhanced 3D-Software IMARIS (Bitplane) Scan-Mode: XT, XZ, XZT, XY, XYZ, XYZT | Speziell konfiguriertes Pentiumsystem |
| | Bildaufnahme | Compix, EZ-2000 | Auto-Sensitivity, 1x-10x Hardware-Zoom, Aquisition-Filter | WIN NT / MGM |
| 3D-Rendring | EZ-2000 (Volume) | Unterstützung durch IMARIS-Bildanalyse (Bitplane) | ja | |
| Quantitative Analyse 2D | Compix, EZ-2000 | Physiologie-Software, Kalzium, 2D-Densitometrie, Histogramme | optional | |
| Quantitative Analyse 3D | | Unterstützung durch IMARIS-Bildanalyse (Bitplane) | optional | |
| Spezielles Zubehör | EZ200-Software Darstellung eines Bildstapels mit simultaner Darstellung orthogonaler Schnittebenen 3-D Volume-Rendring, 3-D Volume Rendering vom "Regions of Interest", 3D-Movies | Durchlichtdetektor für DIC, 2-Photonen CLSM-Ausrüstung | optional | 3D- true color, SVGA 100 Hz mit IR-LC Shutterbrille |

BIOspektrum Marktübersicht: Forschungsmikroskope

| Firma | Gerätename / Typ / Serie | Objektive | | | | Einsatzgebiet | UO / BFD* | Sonderobjektive | IR- oder UV-Objektive | Durchlicht & Fluoreszenz? | Beleuchtung | 3D-Systeme (Typenbezeichnung) | Einrichtung für Ratio Imaging | | Automatisierung | Bildausgänge | | | Photosystem | Spezialzubehör |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------|----------------|
| | | Baureihe | Verg. / NA (Auswahl) | Verg. / NA (Auswahl) | Objektive | | | | | | | | Typ | Geschw. | | Beobachter | Foto | Video | | |
| Carl Zeiss Jena Mikroskope D- 07740 Jena Tel.: +49-3641-641616, Fax: -3144 | Axioskop 2 | A-Plan, Achroplan, Plan-Neofluar | 10x / 0,5 20x / 0,75 40x / 1,3 63x / 1,4 100x / 1,4 | Hell- und Dunkelfeld, DIK, Fluoreszenz, Phase, einfaches Pol | 1,25/0,4 bis zu 20 mm | Multi-Immersion 16x, 25x, 40x | Achroplan 40x/0,8 W IR, Fluore | ja | HBO 50 HBO 100 XBO 75 Hal 100 | Zeiss Vision Deconvolution Raumbild | Ca ²⁺ , pH-Imaging | Filterrad, Ratio-Arc | bis zu 12 | 1 | 1 | MC 80 MC 200 (Spot, Flying Spot) | Motorische Tische, Bildanalyse, Pinkefilterrad, Mikroharprüfung, Photometrie | | | |
| | Axiocvert 135 | LD-Achroplan, LD-Achrostigmat | 10x / 0,25 20x / 0,4 40x / 0,6 63x / 0,8 | Phasenkontrast, DIK, Varel, Hell- und Dunkelfeld, Pol | 5x/0,15, 4 mm | LD-Achrostigmat, Varel Objektive | Fluare, Ultrafluare | ja | HBO 50 HBO 100 XBO 75 Hal 100 | Zeiss Deconvolution | Ca ²⁺ , pH-Imaging | Filterrad, Ratio-Arc | 1 | 4 | MC 80 MC 200 (Spot, Flying Spot) | Manipulation, Mikroinjektion, IVP, Lasereinkeplung, Temperiereinrichtung, Inkubation, Bildanalyse, Motorische Tische | | | | |
| | Axioplan 2 | A-Plan, Achroplan, Fluor, Plan-Neofluar, Plan-Apo | 10x / 0,5 20x / 0,75 40x / 1,3 63x / 1,4 100x / 1,4 | Hell- und Dunkelfeld, DIK, Fluoreszenz, Phase, Pol | 1,25/0,4 20 mm | Multi-Immersion 16x / 0,5, 25x / 0,8 | Achroplan 40x/0,8 W IR, Fluare | ja | HBO 50 HBO 100 XBO 75 Hal 100 | Zeiss Vision Deconvolution Raumbild | Ca ²⁺ , pH-Imaging | Filterrad, Ratio-Arc | bis zu 12 | 1 | 2 | MC 80 MC 200 (Spot, Flying Spot) | Telepathologie System, motorische Tische, Bildanalyse, Pinkefilterrad, Mikroharprüfung, Photometrie | | | |
| Gerhardt GmbH Bahnhofstr. 35 D- 34311 Naumburg Tel.: +49-5625-9992-30, Fax: -44 | PRIMUS-T-BIN-K-AK | achromatisch | 5x / 0,10 10x / 0,30 40x / 0,65 100x / 1,30 | Hellfeld, Polarisation | | | | | Halogene 6 V / 10 W | | | 2 | - | - | | | | | | |
| | CN-HFT-BIN-VK-ZT | achromatisch | 4x / 0,10 10x / 0,30 40x / 0,65 100x / 1,30 | Hell- und Dunkelfeld, Phasenkontrast, Polarisation | | | | | Halogene 6 V / 10 W | | | 2 | - | - | | | | | | |
| | CN-HFT-BINfo 30°-VK-ZT-AFL | achromatisch | 10x / 0,30 40x / 0,65 100x / 1,30 | Aufflicht-Fluoreszenz | | | | | Hg 50 W | | | | 2 | 1* | - | | | | | |
| Helmut Hund GmbH Wilhelm-Wilf-Str. 7 D- 35580 Wetzlar Tel.: +49-6441-20040, Fax: -200444 | SUPERPAN A-BINfo30°-VK-ZT-PL | plan-achromatisch | 5x / 0,18 10x / 0,25 20x / 0,45 40x / 0,65 100x / 1,25 | Hell- und Dunkelfeld, Fluoreszenz, Phasenkontrast, Polarisation | | | | | wahlweise Halogen 6 V / 20 W oder Halogen 12 V / 100 W | | | 2 | 1* | - | | | | | | |
| | H 600 Phako | Semiplan-achromatische Planobjektive | 10x / 0,25 20x / 0,35 40x / 0,65 100x / 1,25 | Hellfeld und Phasenkontrast | SPL PH 10x / 0,25 | | | ja ¹ | 6 V / 30 W | | | 1 | † | † | | | | | | |
| | Wilvovert S PH AFL | achromatisch bzw. semiplan | 4x / 0,10 10x / 0,25 20x / 0,35 | Hellfeld, Phasenkontrast, Aufflichtfluoreszenz | | | | ja | 6 V / 20 W Durchlicht HF/PH 50 W / 100 W HBO Aufflichtfluoreszenz | | | | 1 | † | † | | | | | |
| Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Lilientstr. 39-45 D- 64625 Bensheim Tel.: +49-6251-136-0, Fax: -136-155 | H 600 AFL | achromatische Objektive | 10x / 0,25 40x / 0,65 100x / 1,25 | Hellfeld, Fluoreszenz | | | | ja | Durchlicht Hellfeld 6 V / 30 W Aufflichtfluoreszenz HBO 50 / 100 W | | | 1 | † | † | | | | | | |
| | DM IRBE** | N-Plan, PI Fluotar, PI Apo | 1,6x / 0,05 bis 100x / 1,40 | Hell- und Dunkelfeld, Phaco, ICT, Leica Modulationskontrast, Fluoreszenz | 1,6x / 0,05 14 mm | N-Plan Corr-Serie | UV 40x/100x | ja | Halogene 12 V / 100 W Hg 100, Xe 75 W | ja, über Software | Laserein- kopplung | 1 und 2 (Diskus- sion) | 2 | 3 | Spot-, Integral- messung, Chipensoren, Belichtungs- programme, Fluoreszenz- tauglich | Laserein- kopplung, Laserkalpell, Chromosomen-Dissek- tion, Klimakammer, Photometer | | | | |
| | DM R HC / Medizin** | N-Plan, PI Fluotar, PI Apo | 1,6x / 0,05 bis 100x / 1,40 | Hell- und Dunkelfeld, Phaco, ICT, Polarisation, Fluoreszenz, Reflexionskontrast | 1,6x / 0,05 17,5 mm | PI Apo- Wasser- Immersion | 40x/100x UV-Objektive | ja | 12 V / 100 W Halogene, Xe 75, Hg 50/100 W | ja, über Software | Laserein- kopplung | 5 | 2 | 2 | Spot-, Integral, Chipensor, Belichtungs- programme, Digitalkameras | Photometer, Scanningfische, Archivierung, Digitalkameras | | | | |

*: Übersichtsobjektive / Bildfelddurchmesser **: Mehr als 100 Stativvarianten möglich +: auch Video †: mit entsprechender Zusatzrichtung

BIOspektrum Marktübersicht: Forschungsmikroskope

| Firma | Gerätename / Typ / Serie | Objektive | | | Durchlicht & Fluoreszenz? | | | Beleuchtung | 3D-Systeme (Typenbezeichnung) | Einrichtung für Ratio Imaging | | Automatisierung | Bildausgänge | | | Photosystem | Spezialzubehör |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | Baureihe | Verg. / NA (Auswahl) | Einsatzgebiet | UO / BFD* | Sonderobjektive | IR- oder UV-Objektive | | | ja | ja | | Typ | Geschw. | Beobachter | | |
| Nikon GmbH Tiefenbroicher Weg 25 D- 40472 Düsseldorf Tel.: +49-211-9414-0 Fax: -322 | E600FN "Phyostation" (Patch-Clamp) Serie Eclipse | Planachromat, Plan Fluor, Super Fluor, Plan Apochromat | Plan Fluor: 4x / 0,13 40x Öl/1,3 100x Öl/1,3 | Hell- und Dunkelfeld, Phasenkontrast (DIC, Nomarski) NIR-DIC, Fluoreszenz, Polarisation | 1x Objektiv: 2mm 25 mm | Long-Distance Wasser-Objektive (Arbeitsabstand Für UV: Super Fluor 10x, 20x, 40x, 40x Öl, 100x Öl | ja | Halogene 12 V 100 W, Hg 100 W für Fluoreszenz | | Problem- freie Adaption von Spezial- herstellern, z.B. Axon, Applied Imaging, Improvisation | | - | bis 9 | 1** 2* | 1** 2* | U-II und H-III automatische Systeme, P-II manuelles System | Scanningtische, Z-Motoren, Temperierungsein- richtungen für Tische, Fixed-Stage- und Mikromanipulatorsysteme, XX-Verschiebetische, Videokameras, Drucker, Bildverarbeitung, Bildarchivierung |
| | inverses Forschungs- mikroskop TE200/300 Serie Eclipse | Achromat, Plan Achromat, Plan Fluor, Superfluor, Plan Apochromat, Hoffman Modulations- kontrast | Plan Fluor: 4x / 0,13 40x Öl/1,3 100x Öl/1,3 | Hell- und Dunkelfeld, Phasenkontrast, Differentieller Interferenz- kontrast (DIC Nomarski), Fluoreszenz, Polarisation | 4x Plan Fluor: 6,3 mm | Für IR: Plan Apochromat 100x NA 1,4; Für UV: Super Fluor 10x, 20x, 40x, 40x Öl, 100x Öl | ja | Halogene 100 W, Hg 100 W für Fluoreszenz | Hoffman Modulations- kontrast (HMC) | Problem- freie Adaption von Spezial- herstellern, z.B. Axon, Applied Imaging, Improvisation | | - | bis zu 5 | 1** 2* | 1-2 3-4 | Spiegelreflex- kamera-gestützte Frontaus- gang (TE300) | Scanning-Tische, Z-Motoren, Temperierungsein- richtungen für Tische, Videokameras, Drucker, Bildverarbeitung, Bildarchivierung, Mikromanipulatoren, TE300 "direct view" mit einem Ausgang nach unten |
| Olympus Optical Co. (Europa) GmbH Wendenstr. 14-16 D- 20097 Hamburg Tel.: +49-40-23773-0 Fax: +49-40-233765 | aufrechtes mikroskop E600 Serie Eclipse | Plan Achromat, Plan Fluor, Super Fluor, Plan Apochromat | Hell- und Dunkelfeld, Differentieller Interferenz- kontrast (Nomarski), Fluoreszenz, Ca ²⁺ -Imaging, konfokale Mikroskopie, Pol. | 1x Objektiv: 25 mm | Für IR: Plan Apochromat 100x NA 1,4; Für UV: Super Fluor 10x, 20x, 40x, 40x Öl, 100x Öl | ja | Halogene 12 V / 100 W, Hg 100 W für Fluoreszenz | | Problem- freie Adaption von Spezial- herstellern, z.B. Axon, Applied Imaging, Improvisation | | | | bis 9 | 1** 2* | 1** 2* | U-II und H-III automatische Systeme, P-II manuelles System (SLR) | Scanning-Tische, Z-Motoren, Temperierungsein- richtungen für Tische, Videokameras, Bildverarbeitung, Bildarchivierung, Farb- und SW-Drucker |
| | aufrechtes, motorisiertes Forschungs- mikroskop E1000, E1000M (M-Makro) Serie Eclipse | Plan Achromat, Plan Fluor, Super Fluor, Plan Apochromat | Hell- und Dunkelfeld, Phasenkontrast, Differentieller Interferenz- kontrast (Nomarski, DIK), Fluoreszenz, Polarisation | 0,5x Objektiv: 50 mm 1x Objektiv: 25 mm | 0,5x Objektiv (nur für E1000M): Gesichtsfeld für 50 mm | Für IR: Plan Apochromat 100x NA 1,4; Für UV: Super Fluor 10x, 20x, 40x, 40x Öl, 100x Öl | ja | Halogene 100 W, Hg 100 W für Fluoreszenz | | Problem- freie Adaption von Spezial- herstellern, z.B. Axon, Applied Imaging, Improvisation | | Objektivrevolver, Fokussierung, Kondensor, Aperturblende, Feldblende, Graudfilter, Fluoreszenzfilter- blöcke, Smart- Card, Strich- Code-Lesegerät | | bis 8 | 1** 2* | 1** 2* | U-II und H-III automatische Systeme, P-II manuelles System (SLR) |
| Olympus Optical Co. (Europa) GmbH Wendenstr. 14-16 D- 20097 Hamburg Tel.: +49-40-23773-0 Fax: +49-40-233765 | AX (aufrecht) | Trocken/ Wasser- und Öl- immersion Verg.: 0,5-100x NA: 0,02-1,40 | Durchlicht bzw. Auflicht, Hell- und Dunkelfeld, DIK, Fluoreszenz, Phasenkontrast, Polarisation, PSF | 0,5x / 54 mm / Sehfeld 26,5 | ja | ja | 100 W Halogene 100 W Hg 75 W Xe | Dekonvolu- tion | Ratio Imaging / Photo- metrie, etc. | max. 400 Hz Rätos/s | Komplett incl. Autofocus | >10 | 3 | 2 | Universelles vollautoma- tisches Photosystem incl. flexible Spotmessung, spezielle Fluoreszenz- modi, Autofocus, digitale Kamera | Objektivfokussierung, Wellenlängenmodulation und optische Zentrierung für die Fluoreszenz | |
| | BX (aufrecht) | Trocken/ Wasser- und Öl- immersion Verg.: 1,25-100x NA: 0,04-1,40 | Hell- und Dunkelfeld, DIK, Fluoreszenz, Phasenkontrast, Polarisation, PSF Auflicht, PSF | 1,25x / 0,04 und 2x / 0,08 Sehfeld 26,5 | LMPLAPO 150x / 0,9 und 250x / 0,9 UPLAPO 60W / 1,20 PSF | ja | 30 W/100 W Halogene 50/100 W Hg 75 W Xe | spezielle Objektive für Digital Dokumen- tation | Ca ²⁺ , pH- Imaging / Photo- metrie | System- abhängig, max. 400 Hz | Autofokus, motoris. Revolver und Tisch | > 10 | 2 | 2 | Spotmessung (0,1% + 1%), Super Fluoreszenz und Fluores- zenzmode, Speicher auf Chipkarte, digitale Kamera | 8 Position Fluoreszenzmodul für MFISH, CLSM, Objektivfokussierung | |

*: Übersichtsobjektive / Bildfelddurchmesser **: Trinokulartubus †: mit Strahleneinteilermodule

Marktübersicht: Forschungsmikroskope

| Firma | Gerätename / Typ / Serie | Objektive | | | | Durchlicht & Fluoreszenz? | Beleuchtung | 3D-Systeme (Typenbezeichnung) | Einrichtung für Ratio Imaging | | Automatisierung | Bildausgänge | | | Photosystem | Spezialzubehör |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|---------------------|--------------|----------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| | | Baureihe | Verg. / NA (Auswahl) | Einsatzgebiet | UO / BFD* | | | | Sonderobjektive | IR- oder UV-Objektive | | Typ | Geschw. | Beobachter | | |
| Olympus Optical Co. (Europa) GmbH Wendensstr. 14-16 D-20097 Hamburg Tel.: +49-40-23773-0 Fax: +49-40-233765 | IX (Umkehr-Mikroskop) | Achromate bis Plan APOchromate (Komplettprogramm) Lange Arbeitsabstände, Trocken/Wasser und Öl-Immersion | Verg.: 1,25-100x NA: 0,04-1,40 | Hell- und Dunkelfeld, DIK, Fluoreszenz, Phasenkontrast, HMC, Polarisations | Sehfeld (22) | Projektionsphasenkontrast für hochnumerische Objektive | ja | Spezielle Objektive für Digital Dekonvolution, Ultra Vis CLSM (Fluor-View) | Galvanometer / Monochromator Filterrad | Systemabhängig, max. 400Hz | motorisierte Tische | 1 oder 2 | 2-4 | 2-4 | Spotmessung (0,1%+1%), Fluoreszenz und Superfluoreszenzmode, digitale Kamera | Laserpinzette, Lasermikroskop, Inkubatoren, Temperiereinrichtung, CLSM |
| | SZX Stereo-Zoom-Mikroskop | Plan, Planfluoride, PlanApo, Achromat | Verg.: 0,3x / 0,036 0,45x / 0,05 0,5x / 0,55 1x / 0,110 1,2x / 0,13 1,6x / 0,176 | Heil- und Dunkelfeld, Fluoreszenz, Polarisations, Schräglicht, Spaltlicht | Je nach Hersteller des System-Mikroskops | 0,3x/0,036 104, 8-8,1 mm 1x/0,110 34, 9-3,9 mm | 20x / 0,275 Parfokale Objektive 0,5, 1, 1,2 und 1,6x | ja | HBO 100 W, Hg 100 W | - | - | - | 1 oder 2 | -3 -3 -3 | 0,1%, 1% Superfluoreszenzmode, digitale Kamera | Revolver, Kaltlichtbeleuchtung, Heiztisch, Mikromanipulator |
| Schwertner G&R Closewitzer Str. 3 D-07743 Jena Tel.:/Fax: +49-3641-821167 | Digitaloptisches 3D-Mikroskopsystem | Alle Objektive des jeweiligen Herstellers des systemintegrierten Mikroskops | Verg.: 0,5-100x NA: 0,1-1,4 | Alle Beleuchtungs- und Kontrastechniken außer Fluoreszenz | Vom Hersteller des System-Mikroskops abhängig | Vom Hersteller des Systemintegrierten Mikroskops abhängig | Vom Hersteller des Systemintegrierten Mikroskops abhängig | Digitaloptisches Mikroskop | nein | PC-gesteuert | - | 1 | 1 | Digitaloptische Mikrofotografie | Herstellerebedingt | |
| thermo-DUX GmbH Postfach 1622 D-97866 Wertheim Tel.: +49-9342-8801-88, Fax: -8801-91 | M-100 Labormikroskop (Aufrechtmikroskop) | Semiplan oder Plan | Verg.: 4x / 0,1 10x / 0,25 40x / 0,65 100x/1,25 Öl | Hell-, Dunkelfeld, Phasenkontrast, Polarisations, Auflicht-Fluoreszenz | - | 2,5x / 0,07; 25x / 0,4 | - | Halogen 35 W Hg 50 W (Fluoreszenzeinrichtung) | nein | - | - | 1** | 1† | - | Heiztisch | |

*: Übersichtsobjektive / Bildfelddurchmesser **: Binokulartubus †: Trinokulartubus