

ÜBER EINE NEUE unter www.biologiezentrum.at LAMPE ZUR FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Mit 2 Abbildungen

Von **PROF. DR. KARL FELLINGER**
und **DR. JOSEF SCHMID**

(Zweite medizinische Universitätsklinik, Wien;
Vorstand Prof. Dr. Karl FELLINGER)

Obwohl HAITINGER durch Verbesserung der Optik und Verwendung einer neuen Type von Quecksilberbrennern die Möglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie für die Forschung wesentlich erweitern konnte, besteht doch nach wie vor für Untersuchungen mit höchster Vergrößerung eine erhebliche Schwierigkeit in der zu geringen Lichtstärke. So ist vor allem die Zellstruktur, insbesondere feinere Details derselben, bei Betrachtung mit Immersionsöl nicht in der Auflösung zu erkennen, die wir bei Betrachtung gefärbter Präparate in natürlichem Licht gewöhnt sind, da die Helligkeit der Farben wesentlich geringer ist. Macht sich dieser Faktor schon bei Benützung von Fluorochromen bei gewissen Fragestellungen störend bemerkbar, so wirkt er sich erst recht bei Betrachtung der Eigenfluoreszenz aus. Hier konnten bisher nur ganz allgemeine Beobachtungen gemacht werden, da sich genaueren Differenzierungen nicht nur die Unmöglichkeit der begrenzten Filterung des UV-Lichtes, sondern auch, wie an anderer Stelle berichtet werden wird, die für die Erreichung des Schwellenwertes im menschlichen Auge oft zu geringe Fluoreszenzstärke in den Weg stellte. Ebenso erfordern photographische Aufnahmen mit der Einrichtung nach HAITINGER noch immer verhältnismäßig lange Belichtungszeiten (bei Blutausrichen 1—2 Stunden und mehr) und die Betrachtung der Präparate unter dem Mikroskop kann nur in einem abgedunkelten Raume nach vorheriger Adaptierung zu einigermaßen genügenden Ergebnissen führen.

Da uns im Rahmen hämatologischer Untersuchungen mittels der Fluoreszenzmikroskopie diese technischen Unzulänglichkeiten besonders eindringlich zu Bewußtsein kamen, haben wir uns die Aufgabe gestellt, die letzten Entwicklungen auf dem Gebiete der Lichttechnik für die Fluoreszenzmikroskopie nutzbar zu machen und Quecksilberlampen mit bedeutend höherer Leuchtdichte als bisher üblich zu verwenden. Solche Brenner werden Quecksilberhöchstdrucklampen genannt und sind als Ergebnis langwieriger Forschungsarbeiten auf dem Gebiete des Quecksilberdampfbogens und der technologischen Eigenschaften der verwendeten Bauelemente, z. B. von der OSRAM, entwickelt worden.

Nach KREEFT, LARCHÉ und RÖSSLER (Z. techn. Phys. 17 [1936] : 374 bis 377) hängt die Strahlungsausbeute der einzelnen Quecksilberlinien im UV vom Dampfdruck, der Stromstärke und dem Rohrdurchmesser ab. Während die Ausbeute der Resonanzlinie $254\text{ m}\mu$ bei niedrigen Stromstärken (2,5 Ampere) und niederem Dampfdruck (unter 0,1 tor) maximal ist und es beim Übergang zu hohen Stromstärken und Dampfdrücken zur „Selbstumkehr der Resonanzlinie“ durch die Absorption der Resonanzstrahlung in den die Entladungsbahn umgebenden Dampf-

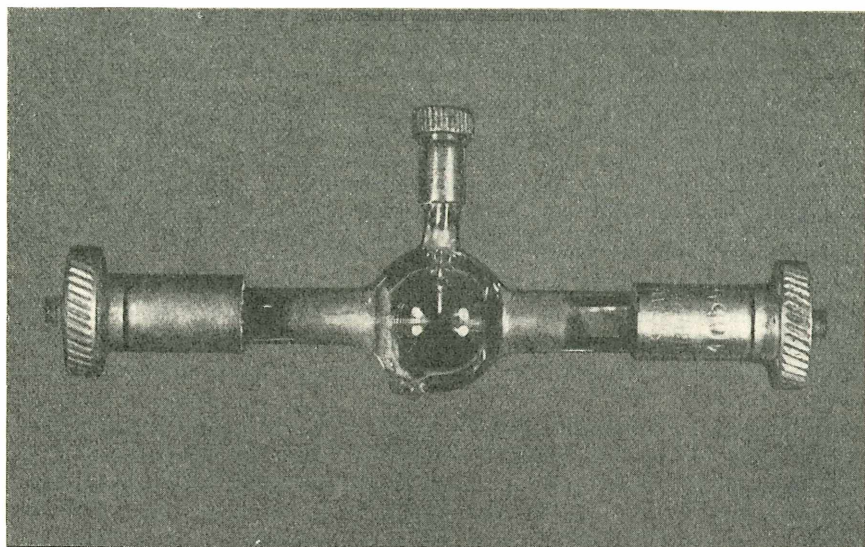


Abb. 1. Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 200 in natürlicher GröÙe.



Abb. 2. Ausstrichpräparat menschlichen Knochenmarkes fluorochemiert mit kombinierter Morin-Thiazinrotfärbung (FELLINGER-PAKESCH). Vergrößerung 1:1000, Belichtungszeit 1 Minute.

schichten kommt (MADDOCK A. J., Proc. phys. soc. London 48 [1936]: 57—62, RÖSSLER F. und SCHÖNHERR F., Z. techn. Phys. 19 [1938]: 588—592), nimmt die Ausbeute der Linie 366 m μ und damit auch der meisten anderen Linien im UV mit steigendem Druck bis 30 at stetig zu. Auf der anderen Seite wird wohl die Ausbeute der sichtbaren Linien mit zunehmendem Rohrdurchmesser größer, aber diejenige der UV-Linien nimmt nach KERN und SCHULZ (Z. Phys. 111 [1939]: 454—466) ab, so daß man bei der Bewertung von Quecksilberlampen für UV-Zwecke nach der Lichtausbeute vorsichtig sein muß, da man nur bei geringem Rohrdurchmesser und wenn sehr kleine Flächen — wie bei der Mikroskopie — zu bestrahlen sind, Vorteile für die UV-Strahlen aus dem Steigen der Lichtausbeute durch den hohen Dampfdruck ziehen kann.

Als erste Lampe dieser Art entstanden die Kapillarlampen, die mit einem Dampfdruck von 100—200 at und Stromstärken von 0,5—2 Ampere arbeiten. Wegen der hohen Klemmenspannung muß der Anschluß über einen Streufeldtransformator erfolgen. Der Innendurchmesser dieser Lampen beträgt einige Millimeter und der Elektrodenabstand 1 cm. Ihr großer Vorteil für die Fluoreszenzmikroskopie bestände außer in der besonders hohen Strahldichte auch in der bei hohen Druckwerten stark hervortretenden Kontinuumstrahlung. Leider muß die Lampe wegen des hohen Leistungsumsatzes wassergekühlt werden und hat deswegen so große Ausmaße, daß sie in den Lichtkasten der REICHERT'schen Fluoreszenzeinrichtung nicht eingebaut werden kann.

Es gelingt nun nicht nur durch Steigerung des Dampfdruckes, sondern auch mit zunehmender Stromstärke, die Strahldichte und Kontinuumstrahlung zu verstärken. Bleibt der Dampfdruck um 30 at, so kann man trotz niedrigerem Gradienten durch die größere Stromstärke die gleiche spez. Belastung wie bei der Kapillarlampe (300—1000 Watt je Zentimeter Entladungsweg) erlangen. Derartige Lampen werden von der Firma Osram hergestellt. Wegen des gegenüber der Kapillarlampe niedrigen Dampfdruckes (35 at) braucht die Temperatur der kältesten Stelle des Entladungsgefäßes nur 660° Celsius zu betragen. Die abkühlende Oberfläche ist so groß, daß eine Wasserkühlung nicht nötig ist, ja die Lampe kann sogar in einem verhältnismäßig engen Gehäuse (Gehäuseoberfläche etwa 4 qcm je Watt Lampenleistung) ohne wesentliche Lüftung verwendet werden. Abb. 1 zeigt die von uns verwendete Hg-Höchstdrucklampe (Osram, Type HBO 200), die sowohl mit Gleich- als auch mit Wechselstrom betrieben werden kann.

An ein 18 mm im Durchmesser messendes kugelförmiges Quarzgefäß sind diametral Füße aus Quarz angeschmolzen, in denen die Zuleitungen zu den Elektroden liegen. In der Kugel zwischen den beiden Elektroden ist eine Zündelektrode eingebaut, welche durch Zuführung eines kurzen Hochfrequenzstoßes die Zündung der Lampe bewirkt. Im Quarzkolben ist neben der Grundgasfüllung ein abgemessener Quecksilbertropfen, der nach Zündung der Lampe völlig verdampft. Die Lampenspannung beträgt etwa 60—70 Volt, der Brennerstrom für Gleichstrom 2,9—3,3 Ampere und für Wechselstrom 3,1—3,7 Ampere, der Anlaufstrom maximal 8 Ampere, die mittlere Leuchtdichte etwa 25000 Stilb bei einer Bogenabmessung von $2,5 \times 1,4$ mm, die Lichtstärke senkrecht zur Bogenachse etwa 1300 HK und der Lichtstrom ungefähr 11000 Hlm.

Schon aus diesen Daten ist der große Vorteil gegenüber der bisher üblichen Quecksilberhochdrucklampe Type S 100 (Hersteller Quarzlampen-

Gesellschaft Hanau) zu erkennen, die bei weitaus größeren Bogenabmessungen nur einen Lichtstrom von etwa 4000 Hlm besitzt. Dazu kommt noch, daß sich bei der spektralen Energieverteilung der neuen Lampe dem für das Quecksilber charakteristischen, hier besonders verbreiterten und starken Linienspektrum ein kräftiges kontinuierliches Spektrum überlagert.

Es nimmt daher nicht wunder, wenn man bei mikro-photographischen Aufnahmen nach $\frac{1}{2}$ —1 Minute Belichtungszeit bei einer Vergrößerung 1:1000 die kontrastreichsten Bilder erhält, wie Abb. 2 zeigt, während 2,5 Minuten schon als Überbelichtung angesehen werden müssen.

Am gleichen Präparat unmittelbar anschließend vorgenommene Aufnahmen unter Beleuchtung mit der Lampe S 100 zeigten selbst nach 30 Minuten Belichtungszeit noch keine differenzierbare Schwärzung auf der photographischen Platte.

Diesem großen Vorteil, dem sich noch eine Reihe weiterer anschließen, wie wesentlich stärkere Eigenfluoreszenz, strengere Filterungsmöglichkeiten, erfolgreiche Auflichtmikroskopie usw., steht kein uns bekannter Nachteil gegenüber. Einzig und allein die mittlere Lebensdauer der Lampe liegt mit 100 Stunden unter derjenigen der Quecksilberhochdruckbrenner, ein Faktor, der aber nicht so schwer ins Gewicht fällt, da die Lampen nach dieser Zeit noch betriebsfähig sind und nur eine um etwa 20% geringere Lichtleistung aufweisen, womit sie noch immer um ein Vielfaches stärker leuchten als die bisher verwendeten Brenner. Mit ihnen dürfte es möglich sein, Probleme anzuschneiden, die in der Biologie von weittragender Bedeutung sind. Die Fluoreszenzmikroskopie ist bis jetzt unentwickelt und erlaubt nur die primitivsten Einblicke in den Zellaufbau, welche die durch Teerfarbstoffe erreichbaren nicht weit übertreffen. Es wird hier mit Lichtquellen gearbeitet, deren spektrale Zusammensetzung in breiten Grenzen variiert, und die Filter, welche dem Präparate vorgeschaltet werden, lassen so große Wellenlängenbereiche durch, daß an genauere Fluoreszenzanalysen, wie sie schon häufig zum Spurennachweis verwendet werden, nicht gedacht werden kann. Ganz anders liegen aber die Verhältnisse, wenn mit solchen Lichtstärken gearbeitet wird, daß spektral zerlegtes Licht, Wellenlänge für Wellenlänge am Versuchsobjekt vorbeigleiten und auf diese Weise sowohl die Wellenlänge der fluoreszenzerregenden als auch die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung selbst ermittelt werden kann. Es ergeben sich dann derzeit noch nicht übersehbare Möglichkeiten in bezug auf die Charakterisierung von Atomen und Molekülen; ja sogar der qualitative und quantitative lokale Nachweis von Zellbestandteilen scheint in den Bereich der Möglichkeit gerückt, wissen wir doch, daß sich nicht nur viele anorganische, sondern auch organische Verbindungen durch Absorption besonderer Wellenlängenbereiche im UV und damit zusammenhängend durch Ausstrahlung bestimmten Fluoreszenzlichtes charakterisieren. Wenngleich selbstverständlich das Arbeitsgebiet zunächst von Chemikern und Physikern bearbeitet werden wird, so dürfte es sich doch lohnen, in der Biologie ebenfalls mit der Pionierarbeit zu beginnen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1948

Band/Volume: [3](#)

Autor(en)/Author(s): Fellingner Karl, Schmid Josef

Artikel/Article: [Über eine neue Lampe zur Fluoreszenzmikroskopie. 314-317](#)