

2

Fluoreszenz

Die konfokale Mikroskopie wurde deshalb eine so erfolgreiche Technik, weil sie insbesondere in der Fluoreszenzmikroskopie eine ganz neue Dimension dem Beobachter zugänglich gemacht hat: nämlich die dritte Dimension. Darum soll hier das Phänomen der Fluoreszenz ausreichend Raum finden, da nicht nur die konfokale Mikroskopie, sondern auch die modernen Super-Hochauflösungsverfahren auf dieser Erscheinung aufbauen.

2.1 Was ist Fluoreszenz?

Erste Beschreibungen von Fluoreszenz kennt man aus der Pflanzenwelt und von Mineralien. Zerreibungen stark chlorophyllhaltiger Blätter, wie sie zu pharmazeutischen Zwecken hergestellt werden, zeigen bei starkem Licht am Rand des Glasgefäßes eine rote Färbung. Auch Chininlösung – bekannt als „Tonic Water“ – ist in der Durchsicht farblos, bekommt in heller Sonne aber einen blau-grünlichen Schimmer. Manche Flussspat-Sorten leuchten farbig, wenn man sie mit UV-Licht bestrahlt; die Farbe wird dabei durch die Verunreinigungen bestimmt. Besonders spektakuläre Fluoreszenz kann man an Uranylmineralien beobachten (Abb. 2.1).

Systematisch untersucht wurden diese Erscheinungen erstmals durch G. G. Stokes, der dafür das Wort „Fluoreszenz“ eingeführt hat. Es ist zusammengesetzt aus *fluorspar* (Flussspat) und *luminescence* (Leuchten). Stokes fand heraus, dass die Leuchterscheinungen immer mit einer Verschiebung der Wellenlänge einhergehen. UV-Strahlung wird zu blau, gelb oder grün, blaues Licht zu grün oder rot verschoben. Diese Änderung der Farbe nach längeren Wellenlängen (Rotverschiebung) wird daher „Stokes-Verschiebung“ genannt. Wie kommt so etwas zustande?

2.1.1 Der Fluoreszenz-Prozess

Licht kann auf unterschiedliche Weise mit Materie wechselwirken. Zwei dieser Wechselwirkungen, nämlich die Absorption und die spontane Emission spielen bei der Fluoreszenz eine Rolle. Wenn bei Bestrahlung mit Licht die

Abb. 2.1 Autunit, ein fluoreszierender Uranglimmer, $\text{Ca}[\text{UO}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}]$, hier ein Stück aus Portugal. **a** Aufnahme bei Tageslicht, **b** Beleuchtung mit einer „Schwarzlichtglühlampe“ und Aufnahme durch einen gelben Langpassfilter. Die Autunitkristalle leuchten aufgrund der UV-angeregten Fluoreszenz hell gelblich-grün



Photonen von den Elektronen eines Atoms oder Moleküls eingefangen werden, gehen diese Elektronensysteme in einen höheren Energiezustand über. Die Energiedifferenz entspricht genau der Energie des absorbierten Photons. Da es nur diskrete Energiezustände für die Elektronen gibt, muss das Licht Photonen mit passender Energie enthalten. Daher kommt es, dass Flussspat bei UV-Bestrahlung – also mit Photonen hoher Energie – leuchtet, aber nicht bei Bestrahlung mit blauem oder grünem Licht.

Im Jablonski-Diagramm in Abb. 2.2 werden die Energiezustände durch Abstände in der Vertikalen dargestellt. Sinnbildlich wird bei Absorption das Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben, etwa so, wie man einen Stein vom Boden auf einen Tisch hebt. Auch hier hat der Stein am Ende ja mehr Energie als vorher. Vor der Absorption befinden sich die Moleküle im Grundzustand (G). Durch die Absorption gehen sie in einen angeregten Zustand (A) über. Wie man in der Zeichnung sieht, gibt es jeweils eine ganze Serie von Grundzuständen und angeregten Zuständen. Das hängt mit den Schwingungen der Atome in den Molekülen zusammen: Die Atome können allerlei Formen von Schwingungen gegeneinander ausführen, und auch dazu muss jeweils spezifisch viel Energie aufgenommen werden. Die Energiepakete – die Quanten – sind aber viel kleiner (deshalb sind diese Schwingungszustände so nahe beieinander). Schwingungsanregungen findet man typischerweise im infraroten Bereich (Wärmeschwingungen). Bei Raumtemperatur befinden sich die allermeisten Moleküle im untersten der Schwingungszustände. Die CARS-Mikroskopie (CARS: coherent anti-Stokes Raman scattering) nutzt diese thermischen Schwingungszustände, um Bilder zu erzeugen, die nur von Molekülen mit genau vorgegebenen Schwingungsenergien stammen.

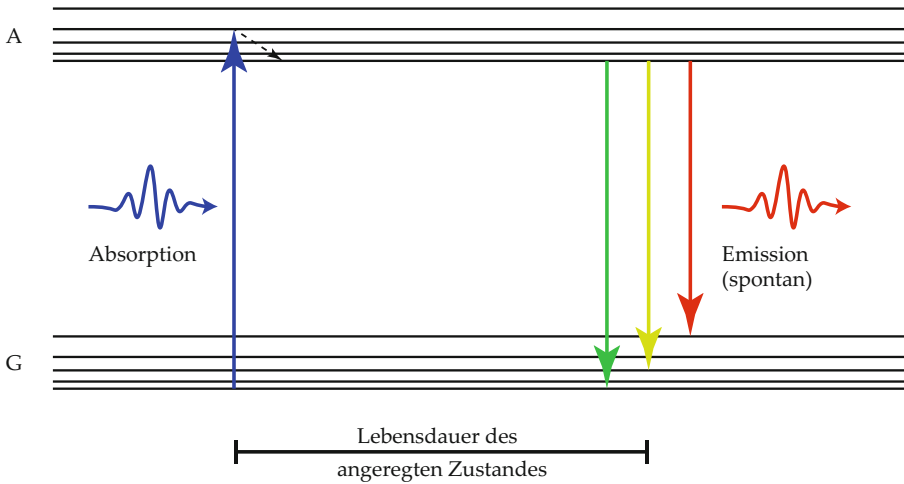


Abb. 2.2 Energieschema einer fluoreszierenden Spezies. Durch Absorption eines *blauen* Photons wird das Elektronensystem aus dem Grundzustand G in den angeregten Zustand A gehoben. Beide Zustände haben mehrere Unterzustände, die mit den Wärmebewegungen der Atome im Kristall oder im Molekül korrelieren. Wird das Molekül in einen der höheren Unterzustände angeregt, fällt es sehr schnell in den tiefsten Unterzustand von A und gibt dabei etwas Energie in Form von Wärme ab. Nach einiger Zeit nimmt das Molekül einen der Grundzustände an, wobei die Energiedifferenz in Form von Licht abgegeben wird. Da ein Teil schon als Wärme abgegeben wurde, haben die emittierten Photonen immer eine kleinere Energie als die absorbierten. Da es verschiedene Unterzustände gibt, in die sie zurückfallen können, ist die Energie bei jedem Ereignis unterschiedlich. Man erhält deshalb ein Emissionsspektrum

Kommt nun ein passendes Photon dem Molekül ausreichend nahe (im Beispiel: blaues Licht), wird das Photon absorbiert und das Molekül in einen der Schwingungszustände des angeregten Zustandes angehoben (blauer Pfeil in Abb. 2.2), dann sickert das Molekül schnell in den untersten Schwingungszustand (gestrichelter Pfeil) und gibt dabei Wärme ab.

Nach einer gewissen Zeit im angeregten Zustand wird die Energie in Form eines Photons wieder abgegeben, und das Molekül nimmt wieder den Grundzustand ein. Der Stein fällt vom Tisch. Dieser Übergang (grüner, gelber und roter Pfeil in Abb. 2.2) kann in irgendeinen der Schwingungszustände des Grundzustandes erfolgen. So wie hier beschrieben, spricht man von „spontaner Emission“. Es gibt alternativ noch die „stimulierte Emission“, die bei Lasern und bei der STED-Mikroskopie (STED: stimulated emission depletion) eine zentrale Rolle spielt. Nach der Emission sickert auch hier der Zustand wieder in den tiefsten der Schwingungsreihe.

2.1.2 Farbenspiele

Die Schwingungszustände in den üblichen Fluoreszenzmolekülen weisen eine sehr dichte Folge von Energieniveaus auf. Deshalb ist die Emission nicht eine Schar von einzelnen Linien, sondern mehr oder weniger kontinuierlich. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter Unterzustand erreicht wird, ist quantenmechanisch festgelegt und nicht für alle Unterzustände gleich. Aus diesem Grund ist die Farbe des emittierten Lichtes durch ein Emissionsspektrum zu beschreiben, das die Intensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge anzeigt (Abb. 2.3). Sehr typisch sind ein etwas steilerer Anstieg auf der „blauen Seite“ und eine weniger steile Abnahme im roten Bereich (es gibt natürlich auch Spektren, die völlig anders aussehen).

Auf eine kurzwellige Anregung (im Beispiel: blau) erfolgt eine längerwellige Emission (im Beispiel: grün, gelb, rot). Durch das breite Band der möglichen Schwingungszustände in A können unterschiedliche Farben zur Anregung benutzt werden, solange die Photonen eine passende Energie besitzen. Das Farbband, das zur Anregung geeignet ist, ist das Anregungsspektrum (Abb. 2.4). Je wahrscheinlicher die Absorption einer bestimmten Farbe, desto höher ist hier der Wert im Anregungsspektrum. Auch die Emission kann in verschiede-

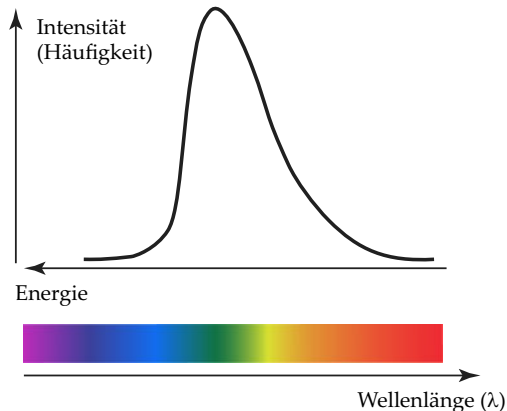


Abb. 2.3 Idealisiertes Emissionsspektrum. Die Anteile der verschiedenen Farben werden durch die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs in einen der Unterzustände des Grundzustandes beschrieben. Diese Wahrscheinlichkeit ist eine Eigenschaft des fluoreszierenden Moleküls und quantenmechanisch festgelegt, kann aber durch die molekulare Umgebung beeinflusst werden. In diesem Beispiel ist die Emission von Photonen mit einer Energie sehr häufig, die einer Wellenlänge von etwa 500 nm entspricht. Die Emission wird daher grünlich erscheinen, da dieser Farbanteil am intensivsten ist. Nach Einstein ist die Energie E eines Photons proportional zur Frequenz und damit umgekehrt proportional zur Wellenlänge. So kommt es, dass in üblichen Spektren von links nach rechts die Energie abnimmt

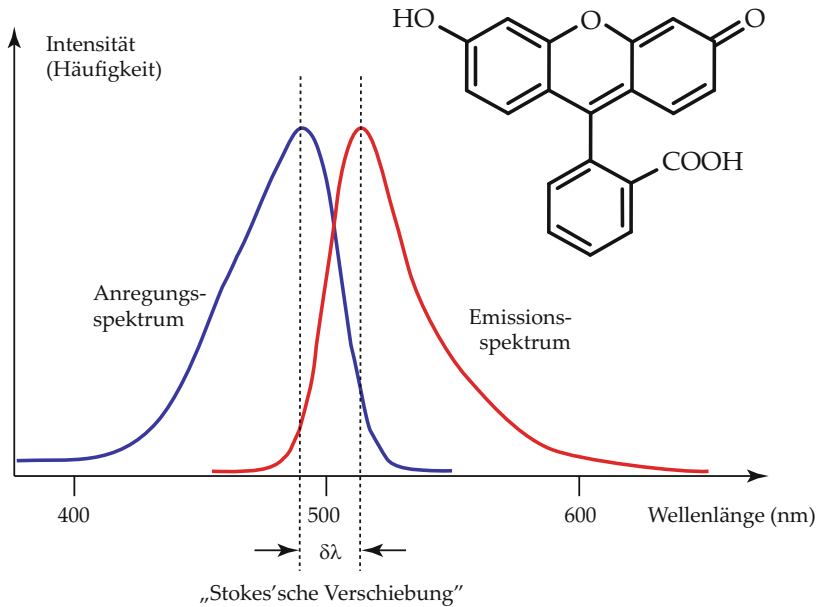


Abb. 2.4 Anregungsspektrum (blaue Kurve) und Emissionsspektrum (rote Kurve) des Farbstoffes Fluorescein (Strukturformel). Das Anregungsspektrum beschreibt die Wahrscheinlichkeit für die Absorption eines Photons in Abhängigkeit von dessen Energie (Farbe). Das Emissionsspektrum die Wahrscheinlichkeit, welche Energie subsequent abgestrahlt wird. Der Abstand der beiden Maxima wird als Stokes’sche Verschiebung bezeichnet

ne Schwingungszustände münden, das wird im Emissionsspektrum sichtbar. Die Werte im Emissionsspektrum entsprechen der relativen Helligkeit der abgestrahlten Farbe. Die schon erwähnte Stokes-Verschiebung beschreibt den Abstand der beiden Maxima.

Reiner Flusspat ist durchsichtig und fluoresziert nicht. Es sind Verunreinigungen, die anregbare Elektronenzustände bewirken. Wir verstehen jetzt, was in diesen Kristallen geschieht: Nach der Anregung mit dem für uns nicht sichtbaren UV-Licht senden die durch Verunreinigungen entstandenen Stellen sichtbares Licht aus. Im Tonic-Water ist es das Chinin, das UV-Licht absorbiert und gelb-grünes Licht aussendet. Das pflanzliche Chlorophyll absorbiert blaues Licht und fluoresziert tiefrot. Es hat also eine sehr große Stokes-Verschiebung.

2.1.3 Lebensdauern

Die Zeitspanne, die das Molekül im angeregten Zustand verbleibt, ist nicht vorhersagbar. Allerdings kann man eine typische Zeit angeben, so wie die

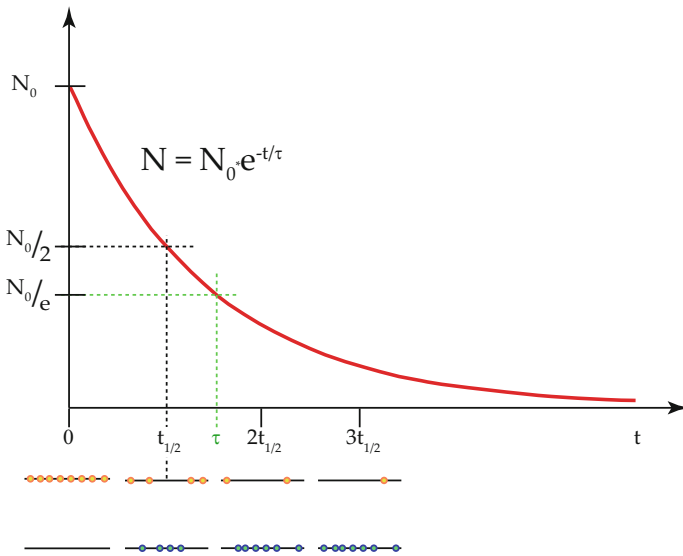


Abb. 2.5 Exponentieller Zerfall angeregter Fluoreszenzmoleküle (rote Kurve). Die Fluoreszenz-Lebenszeit τ ist die charakteristische Zeit, mit der die verbliebene Anzahl der angeregten Zustände N nach einer anfänglichen Anregung eines Ensembles von N_0 Molekülen beschrieben wird. Dieser Zerfall ist vergleichbar mit radioaktivem Zerfall. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ist mit τ über die Beziehung $t_{1/2} = \tau \cdot \ln(2)$ verknüpft. Ein Beispiel mit $N_0 = 8$ ist unter dem Graphen skizziert

Halbwertszeit bei radioaktiven Substanzen. Diese mittlere Lebensdauer des angeregten Zustandes wird etwas lax als „Fluoreszenz-Lebensdauer“ bezeichnet (Abb. 2.5). Man kann diese Lebensdauern messen und hat damit neben den spektralen Eigenschaften noch einen weiteren Parameter, mit dem man fluoreszierende Farbstoffe („Fluorochrome“) charakterisieren kann. Die mittlere Lebenszeit hängt stark von der molekularen Umgebung des fluoreszierenden Stoffes ab, deshalb kann man aus Veränderungen der mittleren Lebenszeit auch auf solche Umgebungsparameter schließen. Es sind sogar Systeme entwickelt worden, bei denen ein Fluorochrom mit geeigneten anderen Molekülgruppen chemisch verbunden wurde, sodass eine Änderung beispielsweise einer Metabolitenkonzentration zu lokalen Änderungen der Umgebung des Fluorochroms führt und aus dessen Helligkeitsänderung dann auf die Konzentrationsänderungen des Metaboliten geschlossen werden kann. Misst man die Lebensdauern für jedes Bildelement, dann erhält man ein Lebenszeit-Bild (FLIM: *fluorescence lifetime imaging*). Weiter kann man auch in der STED-Mikroskopie durch Filterung der Lebenszeiten die Auflösung steuern, da die Intensität des Lichtes für die stimulierte Emission ja direkt die mittlere Lebenszeit beeinflusst.

Fluoreszenz ist in der Natur weit verbreitet, wegen der geringen Intensität fällt sie uns aber meist nicht auf.

2.2 Mikroskopie mit Fluoreszenz

Eine Verbindung der Fluoreszenzphänomene mit der Mikroskopie wurde Anfang des 20. Jahrhunderts durch A. Köhler angestoßen, der sich auch mit der fotografischen Dokumentation und mit Beleuchtungskonzepten im Mikroskop ausführlich auseinandergesetzt hat. Zunächst kam nur ultraviolettes Licht zur Anregung zum Einsatz, weshalb auch heute noch gelegentlich von „UV-Beleuchtung“ gesprochen wird, wenn Beleuchtungseinrichtungen zur Fluoreszenz gemeint sind. UV-Anregung macht aber nur noch einen geringen Teil der Praxis aus, und der Trend geht eher zur infraroten Seite des Spektrums. Das hängt einerseits damit zusammen, dass Optik für kürzere Wellenlängen sehr viel schwieriger und komplexer und damit auch teurer ist, und andererseits damit, dass bei längeren Wellenlängen die Streuung im Präparat schnell abnimmt. Mit „roterem“ Licht wird es also möglich, viel tiefer in inhomogene Präparate hineinzuschauen, das Präparat ist hier durchsichtiger. Aus ähnlichen Gründen betreibt man Infrarot-Astronomie, um durch Staubwolken hindurch etwa in das Zentrum unseres Milchstraßensystems zu schauen.

Die Intensität der Fluoreszenzemission ist in der Regel sehr viel schwächer als die des anregenden Lichtes. Typischerweise wenigstens um ein Zehntausendfaches. Deshalb muss bei der Trennung des Fluoreszenzlichtes vom Anregungslicht viel Aufwand betrieben werden, um ein Fluoreszenzbild ohne hellen Hintergrund zu erhalten. Zudem möchte man Schäden am Sensor (Kamera, Photonenvervielfacher, Auge) natürlich vermeiden. Dazu dienen Emissionsfilter. Sie helfen auch bei Mehrfachfluoreszenzfärbungen die Trennung der einzelnen Kanäle zu verbessern. Weitere Bestandteile des Fluoreszenzmikroskops sind Farbteiler für die Auflichtmikroskopie und Anregungsfilter. Letztere sorgen dafür, dass nur Licht im Bereich der Absorption auf das Präparat fallen kann. Alle diese Bauteile werden in den folgenden Abschnitten etwas näher beschrieben. Für die weiße Konfokalmikroskopie sind dort stufenlos einstellbare Elemente eingeführt worden, denen jeweils ein eigener Abschnitt gewidmet ist.

2.2.1 Leistungsverhältnisse von Anregungslicht und Emissionslicht.

In der täglichen Praxis wird oft über mäßige Qualität von Fluoreszenzmessungen geklagt, insbesondere, wenn es sich um Bilder handelt. Daher werden

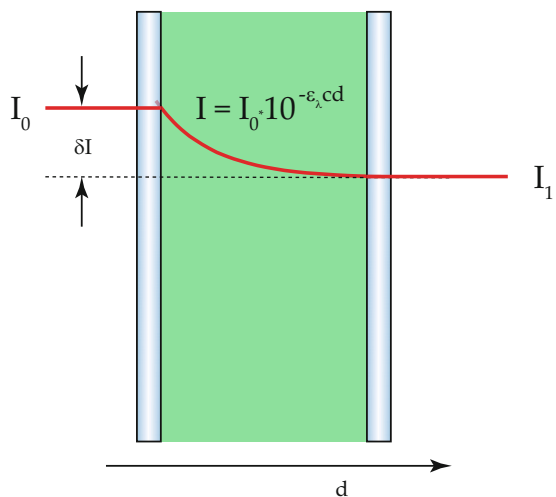
in Werbebroschüren vorzugsweise sehr helle Beispiele abgebildet – das gilt natürlich auch für die Abb. 2.1 in diesem Buch! Manche Geräte nutzen moderne Bildverarbeitungssoftware, um ein mäßiges Bild dennoch vorzeigbar zu machen. In digitalen Kameras ist das heute kaum noch zu unterbinden und geschieht oft ohne Wissen und Einflussnahme des Benutzers. Im wissenschaftlichen Zusammenhang sind solche Verfälschungen durch Weichzeichnung und Interpolation natürlich völlig unangemessen, denn eine quantitative Auswertung der Intensitäten ist nach solchen Manipulationen in der Regel nicht mehr sinnvoll möglich. Es darf also ruhig etwas rauschen. Um ein Gefühl für die wirklichen Lichtverhältnisse zu bekommen, wollen wir ein Beispiel explizit vorführen, dann wird klar, dass eine Menge Technologie benötigt wird, wenn man – ohne verfälschende Rechenverfahren – ein brauchbares Bild erzeugen möchte.

Wir wählen einen klassischen Fluoreszenzfarbstoff, beispielsweise Fluoreszein (Abb. 2.4). Der Einfachheit halber betrachten wir die Situation in einem konfokalen Mikroskop (Details hierzu folgen im Kap. 3). Was uns interessiert, ist die Intensität der Fluoreszenz, die wir aus dem konfokalen Volumen erhalten, wenn dieses von einer typischen Lichtmenge durchstrahlt wird.

Um diese Intensität auszurechnen, benutzen wir das Lambert-Beer'sche Gesetz (Abb. 2.6) zur Absorption E :

$$E_{\lambda} = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_{\lambda} c d. \quad (2.1)$$

Abb. 2.6 Intensitätsabnahme des Anregungslichtes beim Durchgang durch ein absorbierendes Medium. Die Intensität sinkt exponentiell ab. Hier ist die Absorption sehr hoch gewählt. In vielen praktischen Situationen, bei sehr kleinen Konzentrationen, kann man die Abnahme linear annähern



Hier wird die eingestrahlte Intensität I_0 ins Verhältnis gesetzt zur „durchgegangenen“ Intensität I_1 auf der anderen Seite der Messstrecke. Durch Absorption im Präparat ist I_1 kleiner als I_0 , und die Differenz entspricht der Energie, die durch Anregung der Moleküle im Lichtweg abgezogen wird. Man findet, dass I_1 exponentiell abnimmt mit der Konzentration c der absorbierenden Spezies und der Schichtdicke d . Die Proportionalitätskonstante ε_λ ist abhängig von der Wellenlänge λ und eine Eigenschaft des absorbierenden Stoffes. Aus historischen Gründen sind die Absorptionskoeffizienten (auch: Extinktionskoeffizienten) meist für den dekadischen Logarithmus und für eine Schichtdicke von 1 cm tabelliert. In grober Näherung liegt der Extinktionskoeffizient für Fluoreszein an seinem Absorptionsmaximum 485 nm bei $10^5 \ell \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$. Als Konzentration wählen wir eine einmikromolare Lösung ($10^{-6} \text{ Mol } \ell^{-1}$), das ist eine typische Situation. Die Schichtdicke d in einem konfokalen Mikroskop können wir näherungsweise mit einem Mikrometer veranschlagen, das sind 10^{-4} cm und entspricht etwa der Ausdehnung der psf in z -Richtung. So bekommen wir für den Term $\varepsilon_\lambda cd$ den Wert $10^5 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-4} = 10^{-5}$. Das Lambert-Beer'sche Gesetz lässt sich umschreiben zu:

$$I_1 = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda cd}. \quad (2.2)$$

Daraus erhält man die Differenz der ein- und ausgestrahlten Intensität:

$$\Delta = I_0 - I_1 \quad (2.3)$$

$$= I_0 \left(1 - 10^{-\varepsilon_\lambda cd} \right). \quad (2.4)$$

Und wenn wir die bekannten Zahlen von oben einsetzen, erhalten wir sofort:

$$\frac{\Delta}{I_0} = 2,303 \cdot 10^{-5}. \quad (2.5)$$

Das Intensitätsverhältnis liegt sehr nahe bei 1, die Intensitäten unterscheiden sich fast nicht. Das Licht wird demnach fast nicht abgeschwächt, weil die Absorption Δ so gering ausfällt. Dieses „fast“ liegt mit 0,000023 in der Größenordnung von $1/100.000 = 10^{-5}$. Allerdings ist genau diese kleine Intensitätsdifferenz die Lichtmenge, die von den Fluoresceinmolekülen absorbiert wurde. Und wenn man nun davon ausgeht, dass alle Moleküle, die ein Photon absorbiert haben, auch ein Fluoreszenzphoton abgeben, dann ist eben 10^{-5} das Verhältnis des abgestrahlten zum eingestrahlten Anregungslicht. Die Annahme einer so effizienten Umsetzung von Anregung in Fluoreszenz ist für den Farbstoff Fluoreszein gerechtfertigt, da dessen Quantenausbeute nahe bei 1 liegt. Die Quantenausbeute beschreibt das Verhältnis von absorbierten

Photonen zu in Fluoreszenz umgesetzten Photonen. Wir können also grob festhalten, dass die Intensität der Fluoreszenz in einem typischen Fall etwa eine Million Mal schwächer ist als das anregende Licht. Dass nur ein kleiner Teil der emittierten Fluoreszenzphotonen tatsächlich den Detektor erreichen wird, ist dabei noch gar nicht berücksichtigt.

2.2.2 Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz

Die ersten Mikroskope für Fluoreszenz waren Geräte, die aus dem Fundus der bis dahin verwendeten Technik umgebaut und für Fluoreszenz vorbereitet wurden. Das heißt, eine Lichtquelle durchstrahlt das Präparat, und man betrachtet auf der anderen Seite das entstandene Bild. Die bis dato benutzten Lichtquellen, nämlich Petroleumlampen, Glühlampen oder die Sonne, konnten für UV-Fluoreszenz nicht ohne Weiteres brauchbare Ergebnisse liefern. Selbst umfangreichere Sammlung und Bündelung des Lichtes führte nicht immer zu befriedigenden Ergebnissen. Daher wurden bald starke elektrische Bogenlampen eingesetzt. Diese Geräte erzeugen sehr hohe Lichtströme, nehmen gewaltige Leistungen im Kilowattbereich auf und müssen gut gekühlt werden. Das größere Problem ist allerdings, dass in einem gewöhnlichen Mikroskop, also einer Durchlichteinrichtung, fast 100 % des eingestrahnten Lichtes im Okular ankommt – wie wir in Abschn. 2.1.1 berechnet haben. Einerseits ist es nicht möglich, das geringe Fluoreszenzlicht gegen diesen Hintergrund wahrzunehmen, auch wenn es eine andere Farbe hat. Andererseits sind gewöhnliche Detektoren für so hohe Lichtintensitäten nicht geeignet. Insbesondere das Auge ist gefährdet – und es gab wohl einige Fälle, in denen der Experimentator durch unachtsame Benutzung solcher Einrichtungen erblindet war.

Um den extremen Hintergrund zu unterdrücken, muss im Strahlengang auf der Beobachtungsseite ein Filter eingeschaltet werden. Dieser Filter muss das Fluoreszenzlicht möglichst unbehindert passieren lassen, aber das Anregungslicht möglichst vollständig blockieren. Man spricht daher von einem „Blockfilter“, „Sperrfilter“ oder „Emissionsfilter“. Vergisst man diesen Blockfilter und schaut ins Mikroskop, ist eine ernsthafte Augenverletzung sehr wahrscheinlich – insbesondere, wenn das Licht hohe Anteile des unsichtbaren Ultravioletts enthält.

Sowohl der Kontrast als auch die Sicherheit werden wesentlich verbessert, wenn die Beobachtung nicht direkt in die Lichtquelle erfolgt. Das kann erreicht werden, indem mittels eines Strahlteilers die Beleuchtung von der Betrachtung entkoppelt wird (Abb. 2.7). Das Licht zur Beleuchtung wird dabei in einem Winkel gegen die optische Achse des Mikroskops eingekoppelt und strahlt auf dieselbe Seite des Präparates, die anschließend beobachtet wird. Das

Konfokale Mikroskopie in Weiß

Optische Schnitte in allen Farben

Borlinghaus, R.T.

2016, XIII, 141 S. 70 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-662-49358-8