

# Fluoreszenzmikroskopie

Bernhard Möhl

Vorlagen und Bilder teilweise von Martin Oberringer



## Leuchteigenschaften:

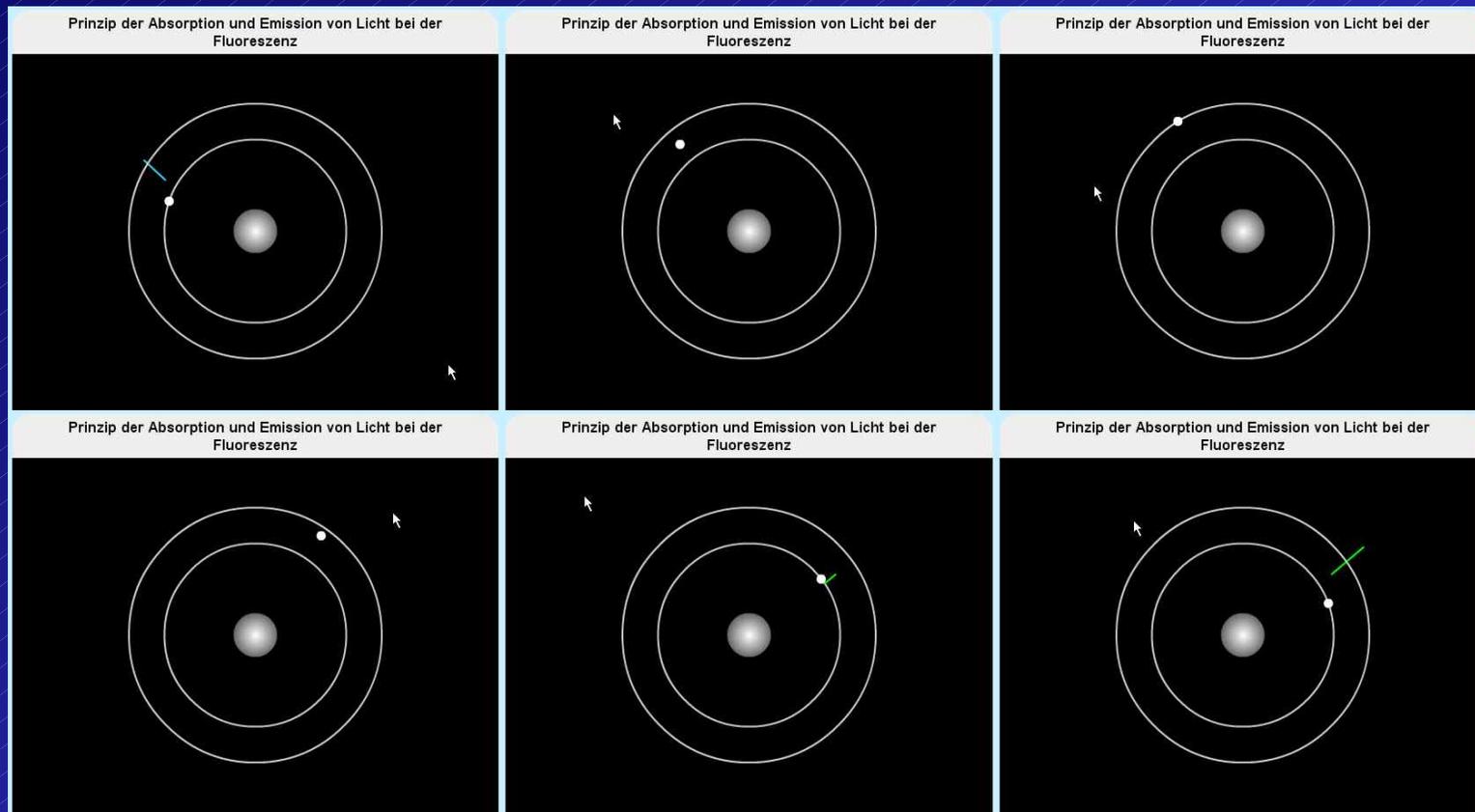
***Phosphoreszenz:*** Da die Lichtemission die Zeit der Einwirkung der Lichterregung überdauert, kommt es zum Nachleuchten.  
(Zwischenstufe der Elektronen beim Übergang vom angeregten in den Grundzustand).

***Lumineszenz:*** Unter Lumineszenz versteht man den Prozess, bei dem durch unterschiedliche Vorgänge elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts emittiert wird.

***Fluoreszenz:*** Die Lumineszenz endet unmittelbar nach Beendigung der Anregung.



# Fluoreszenz:



© 2002 Christian Linkenheld: <http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html>



<http://www.uni-saarland.de/fak7/hartmann>



## Strahlengang im Fluoreszenz-Mikroskop (Auflicht)

Anregung

Emission



Die Wellenlänge bestimmt  
die Farbe des Lichts.

Je größer die Wellenlänge  
umso energieärmer  
ist das Licht.

Lichtquelle

Anregungsfilter

Okular

Emissionsfilter

Filter-  
Block

Strahlteiler

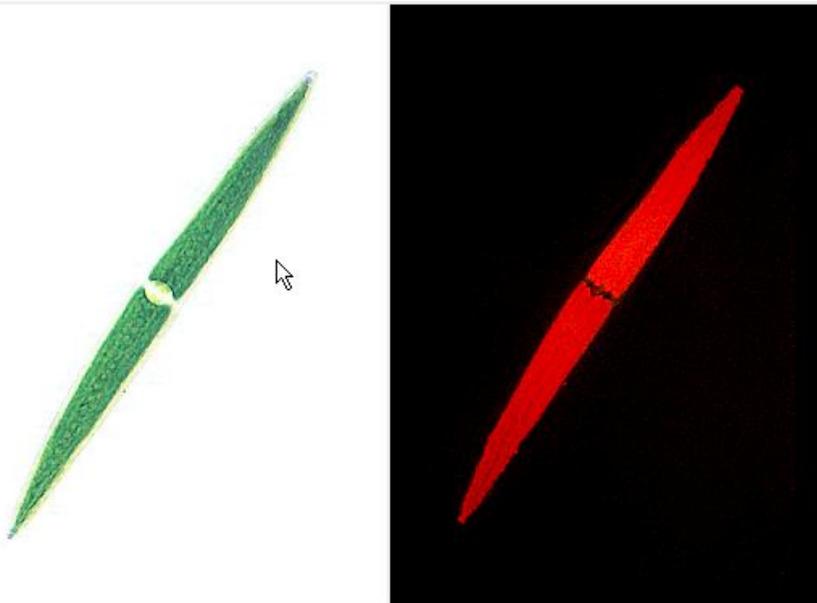
Objektiv

Präparat



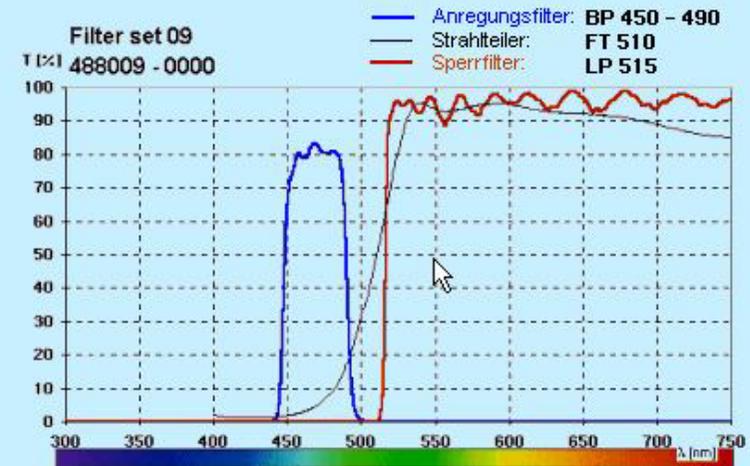
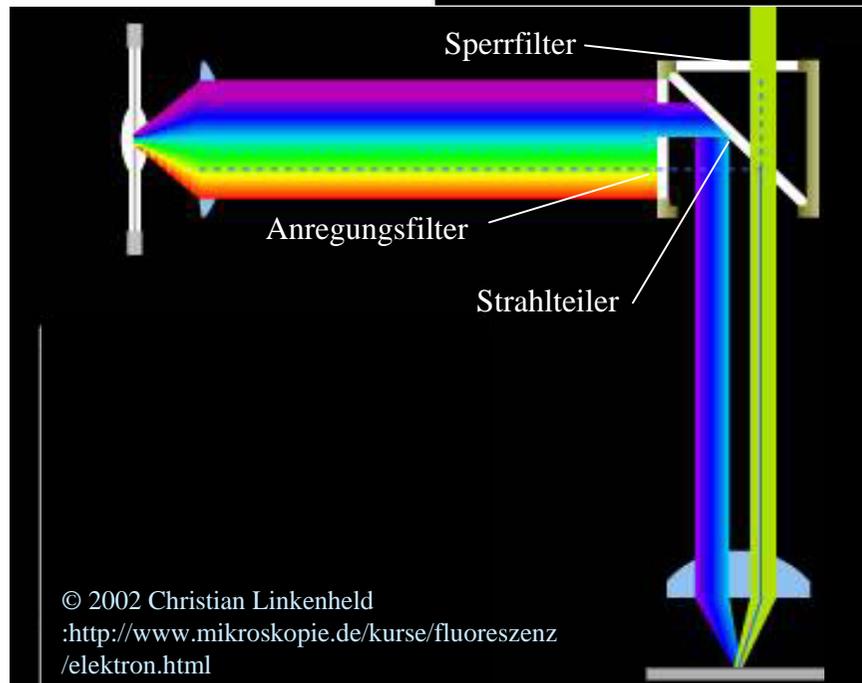
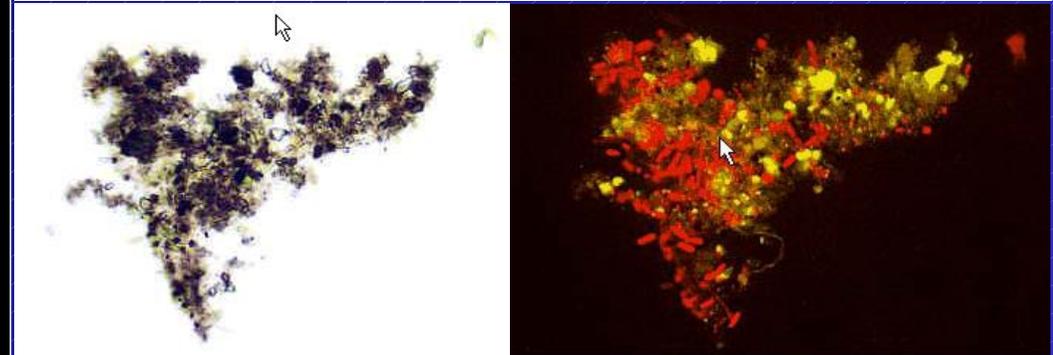
## Primärfluoreszenz des Chlorophylls

Einzellige Alge der Gattung *Closterium* mit zwei Chloroplasten - links im Hellfeld; rechts im Fluoreszenz-Mikroskop



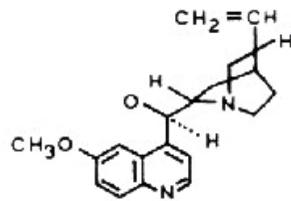
## Flocke aus einem Gewässer-Sediment

Im Hellfeld ist die Anwesenheit einzelliger Algen bestenfalls zu erahnen. In der Fluoreszenz fallen diese Organismen dagegen viel stärker durch die rote Fluoreszenz des Chlorophylls auf. Die zusätzliche gelbliche Fluoreszenz deutet auf cellulosehaltige Partikel pflanzlichen Ursprungs in der Flocke hin.

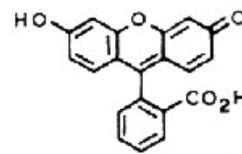


Der grüne Blattfarbstoff (Chlorophyll) zeigt im Fluoreszenz-Mikroskop eine intensive rötliche Fluoreszenz.

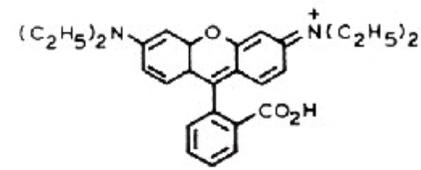
## Einige fluoreszierende Moleküle



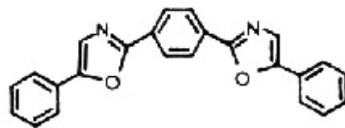
Quinine



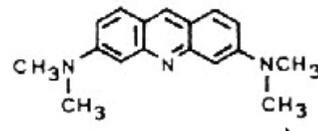
Fluorescein



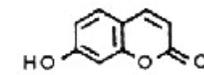
Rhodamine B



POPOP



Acridine Orange



7-Hydroxy-  
coumarin  
or Umbelliferone

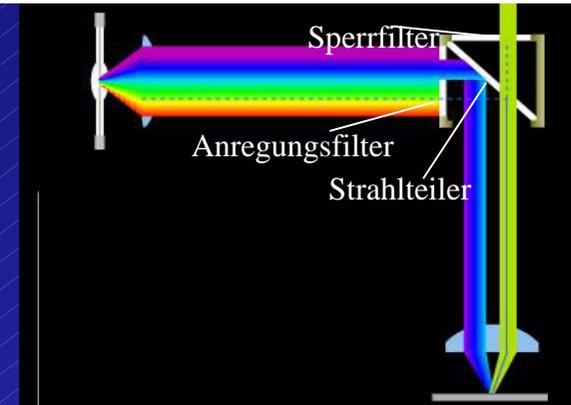
Viele Fluorochrome haben aromatische Ringsysteme, deren delokalisierte Elektronen in bindenden p-Orbitalen für die Entstehung von Fluoreszenz wichtig sind. Chinin (quinine) war eine der ersten Substanzen, an denen Fluoreszenz untersucht worden ist (Herschel, 1845). Chinin wird durch UV-Licht angeregt und erzeugt eine schwache, bläuliche Fluoreszenz in Tonic Water, das mit Chinin versetzt ist. Fluorescein und Rhodamin spielen eine große Rolle bei der Fluoreszenz-Immunhistochemie. POPOP wird für Szintillationszähler verwendet und Acridin-Orange eignet sich als DNA-Farbstoff. Coumarin-Derivate werden in vielen Bereichen verwendet, zB für ELISA-Tests. mit

Aus: Lakowicz, J.R. (1999)

# Fluoreszenzmikroskopie

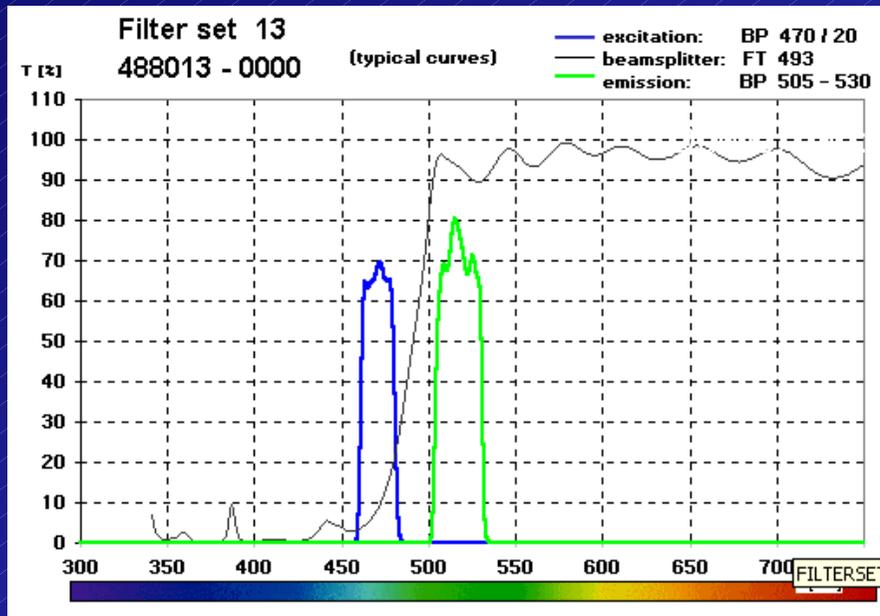
## Auflicht-Fluoreszenz-Anregung

### Filtertypen



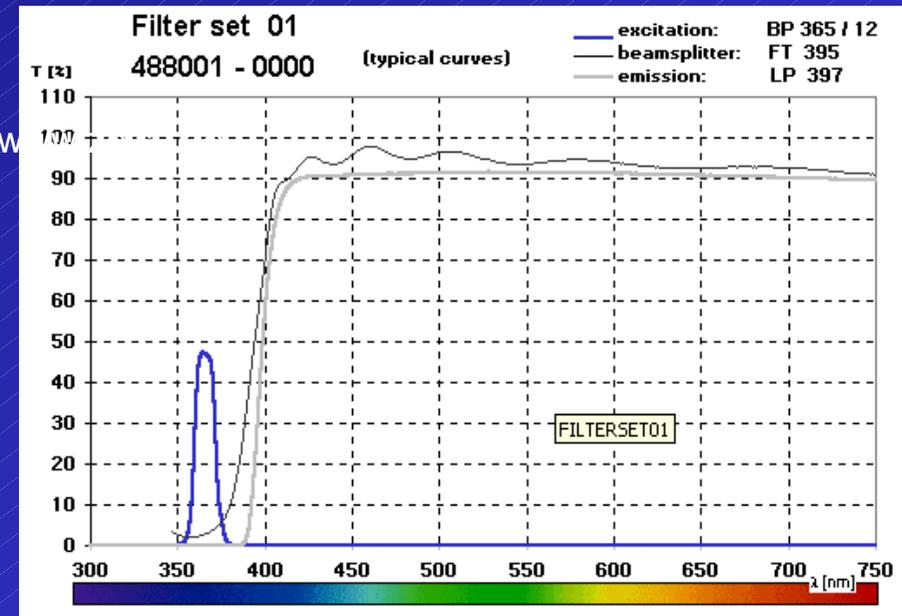
### Bandpass

Fluoresceinisothiocyanat (488nm/ 525nm)  
(FITC)



### Longpass

DAPI (359nm/ 461nm)



Quelle: <http://www.zeiss.de>



<http://www.uni-saarland.de/fak7/hartmann>

# Fluoreszenzmikroskopie

## Auflicht-Fluoreszenz-Anregung

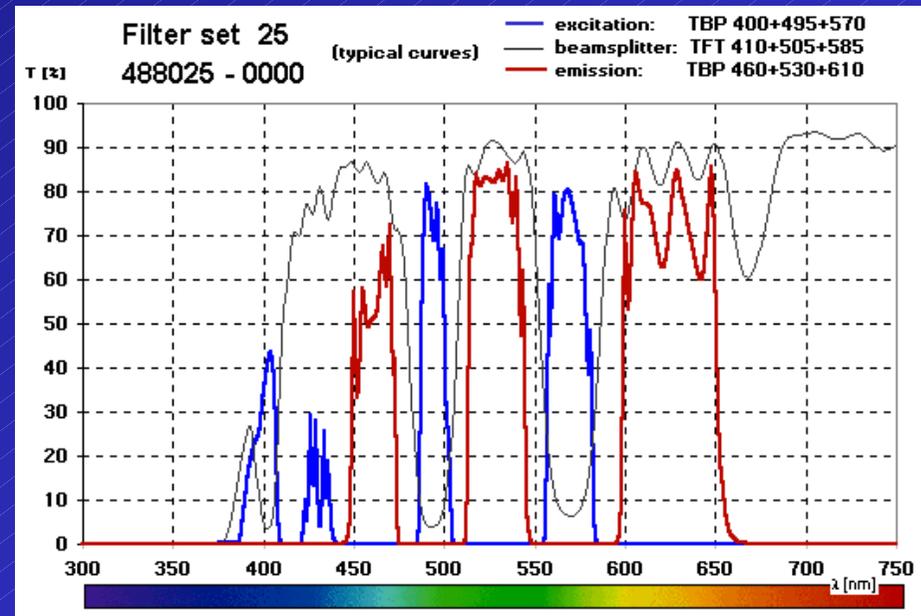
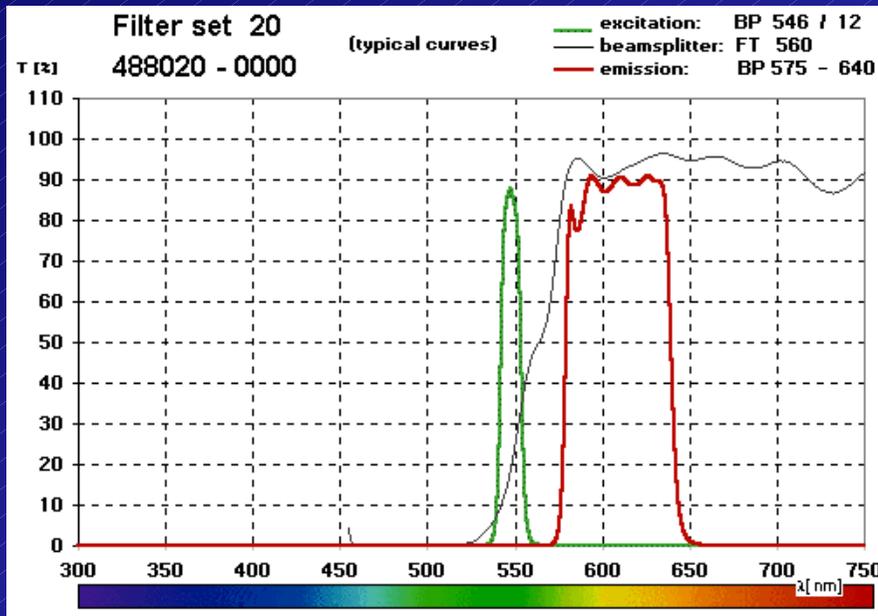
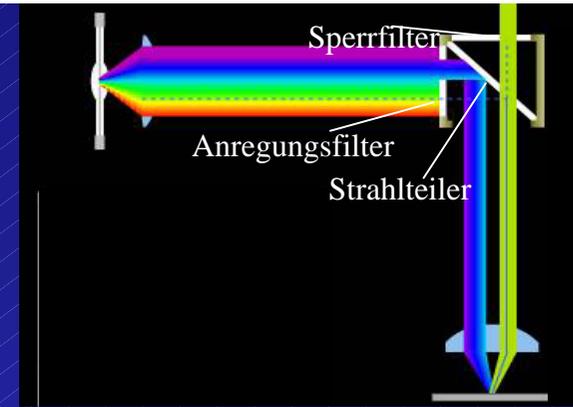
### Fluorochrome/ Filtersätze

#### Bandpass

Cy3 (552nm/ 570nm)

#### Triple Bandpass

FITC, Cy3, DAPI

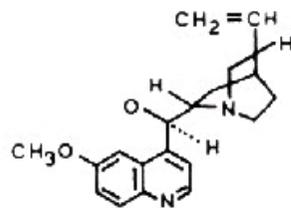


Quelle: <http://www.zeiss.de>

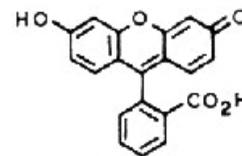


<http://www.uni-saarland.de/fak7/hartmann>

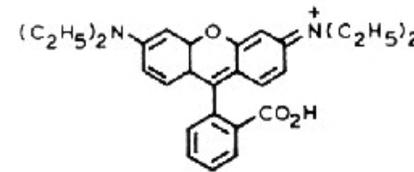
**Fluoreszenzmikroskopie:** fluoreszierende Moleküle sind i. d. R. klein und unspezifisch und deshalb zur (spezifischen) Färbung zunächst nicht geeignet. Der entscheidende Vorteil ergibt sich in der Kombination mit hochspezifischen Methoden in der Biologie.



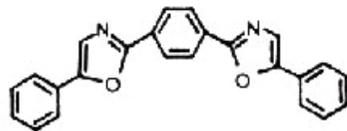
Quinine



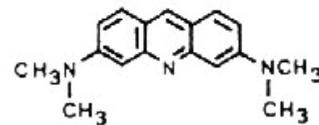
Fluorescein



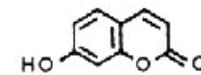
Rhodamine B



POPOP



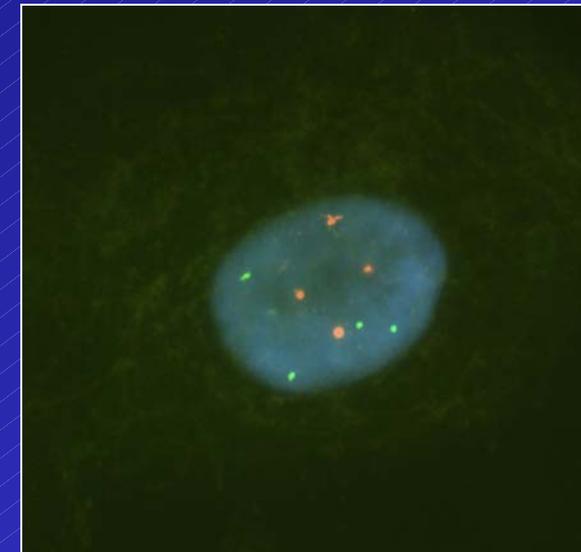
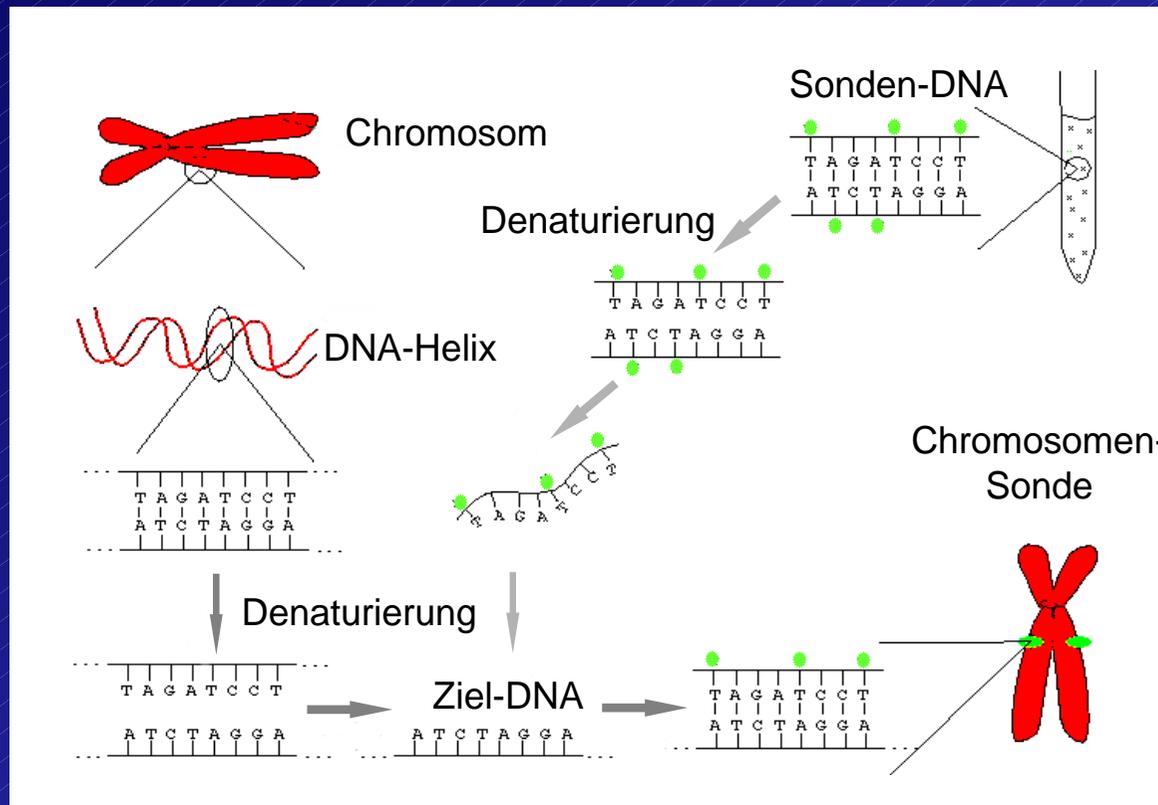
Acridine Orange



7-Hydroxy-  
coumarin  
or Umbelliferone

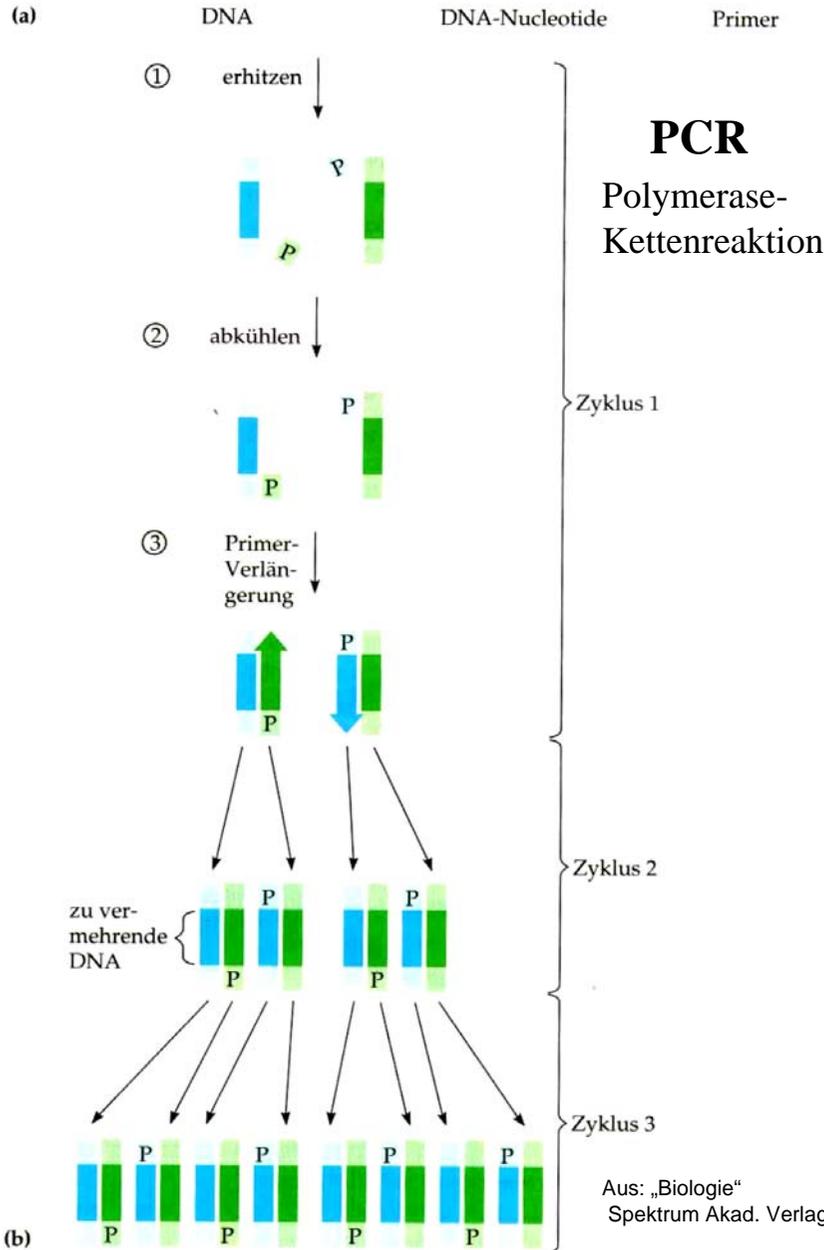
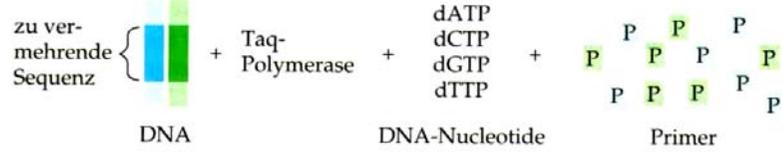
# Fluoreszenzmikroskopie

## Beispiel biologischer Anwendung



Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) mit Zentromersonden, Cy3 und FITC markiert, Kern-Gegenfärbung mit DAPI

Ausgangsmaterial:



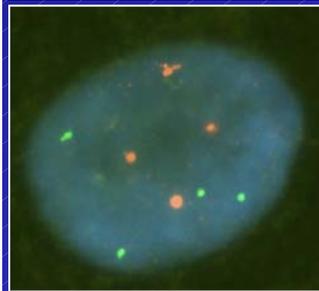
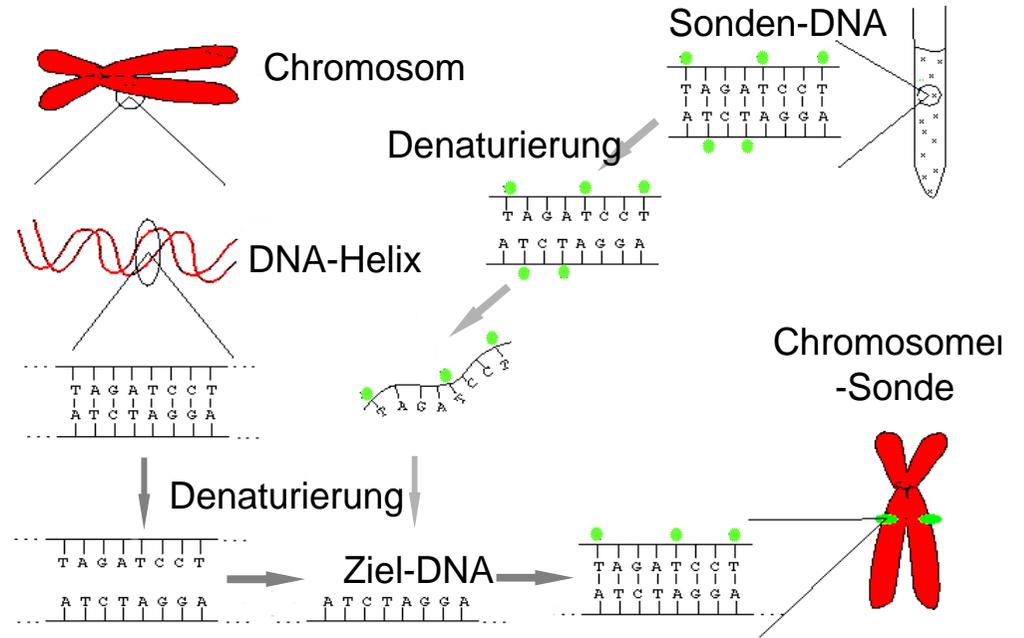
**PCR**  
Polymerase-Kettenreaktion

Zyklus 1

Zyklus 2

Zyklus 3

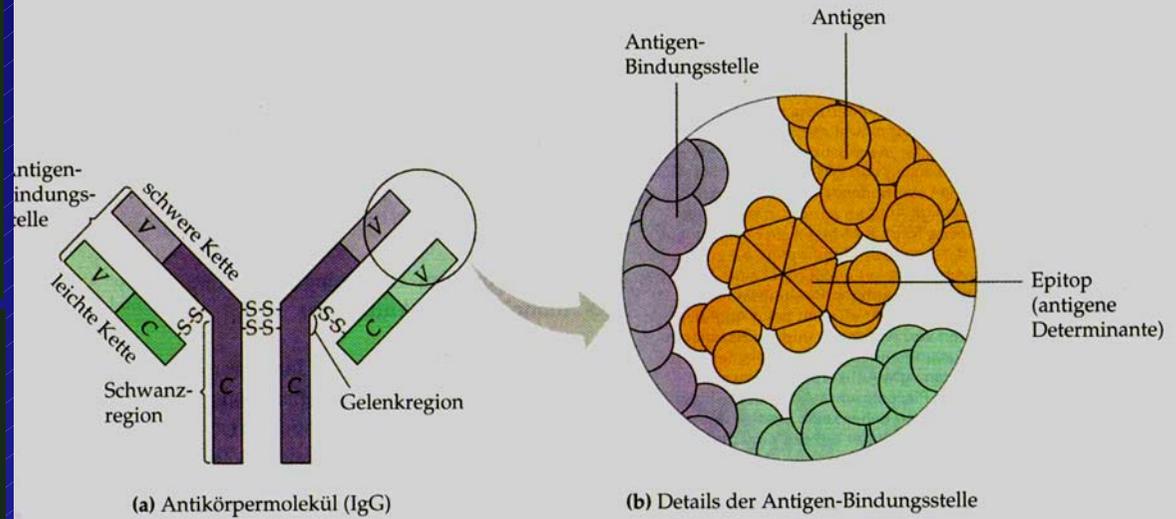
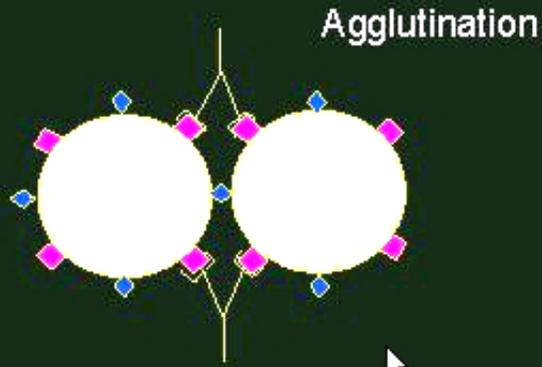
Aus: „Biologie“  
Spektrum Akad. Verlag



**Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) mit Zentromersonden, Cy3 und FITC markiert, Kern-Gegenfärbung mit DAPI**



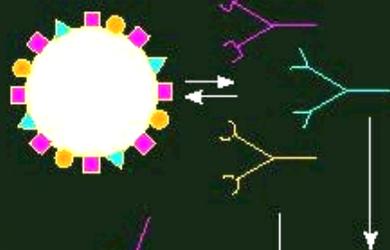
Aus: „Biologie“  
Spektrum Akad. Verlag



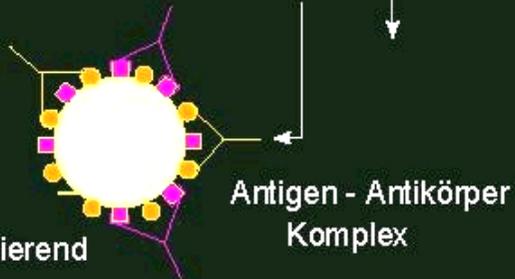
### Antigen

### Antikörper

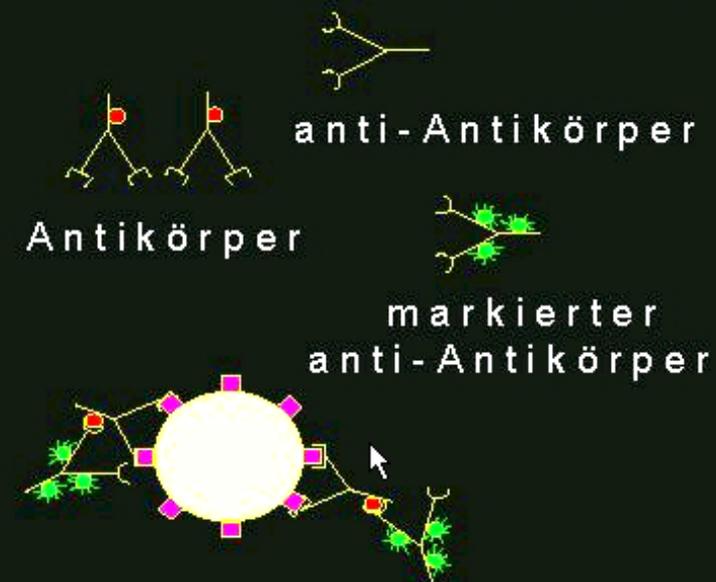
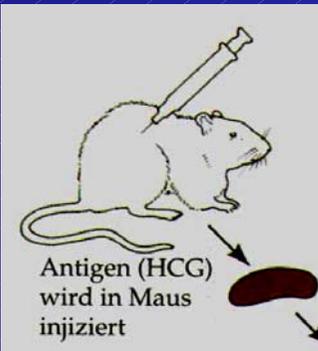
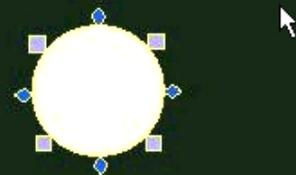
1. homolog



2. partiell homolog ; kreuzreagierend

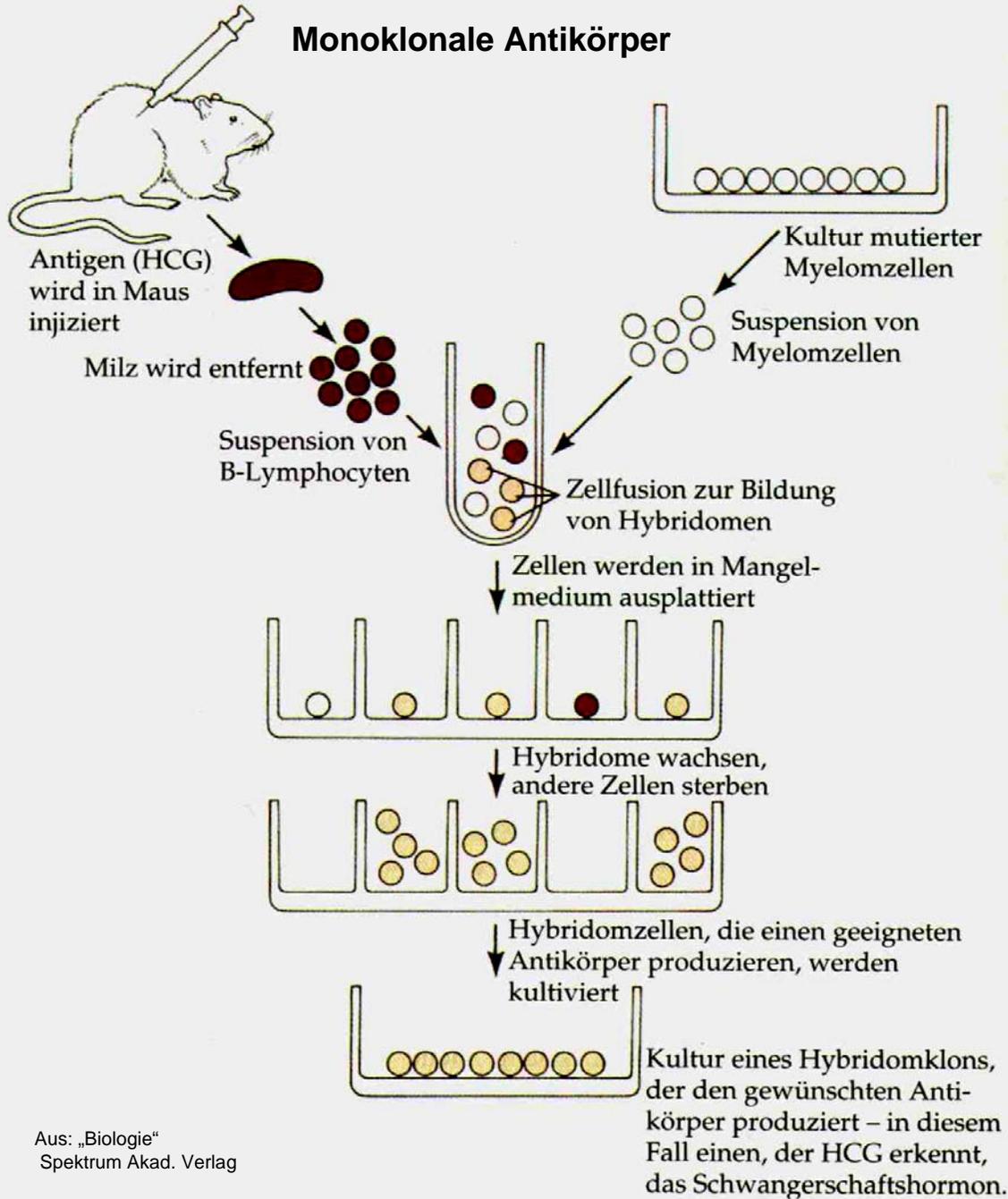


3. heterolog ; nicht kreuzreagierend



Komplex zwischen Antigen-Antikörpern und anti-Antikörper

# Monoklonale Antikörper



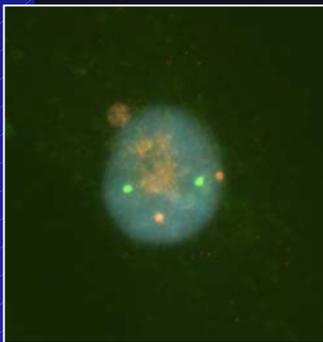
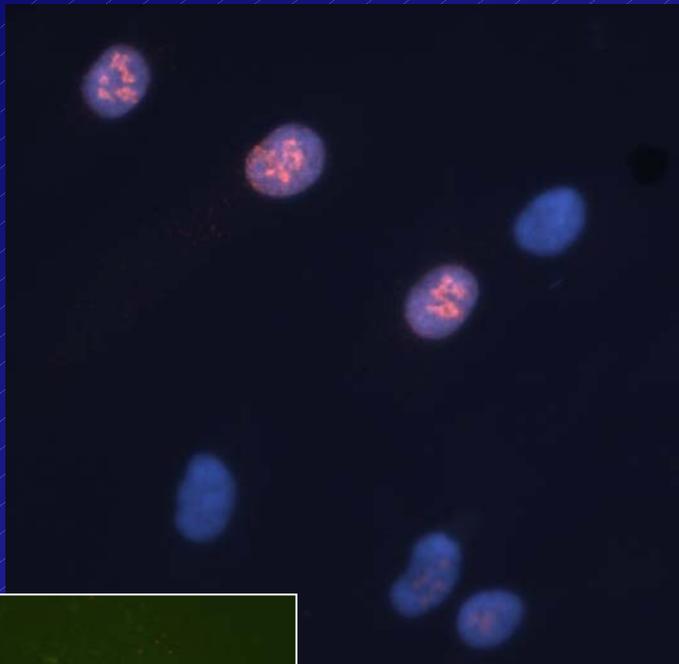
Aus: „Biologie“  
Spektrum Akad. Verlag



# Fluoreszenzmikroskopie

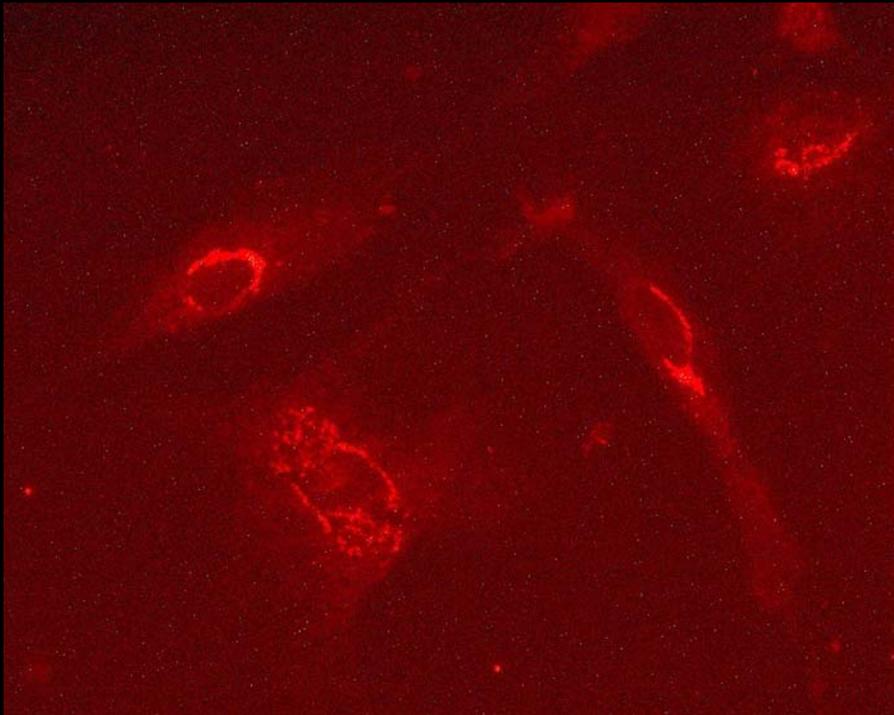
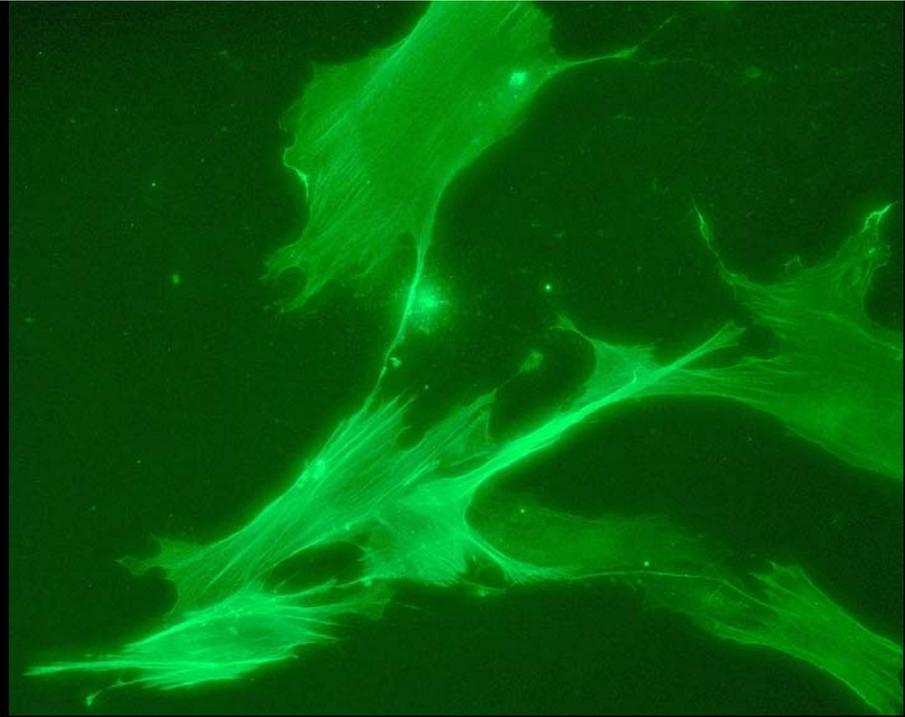
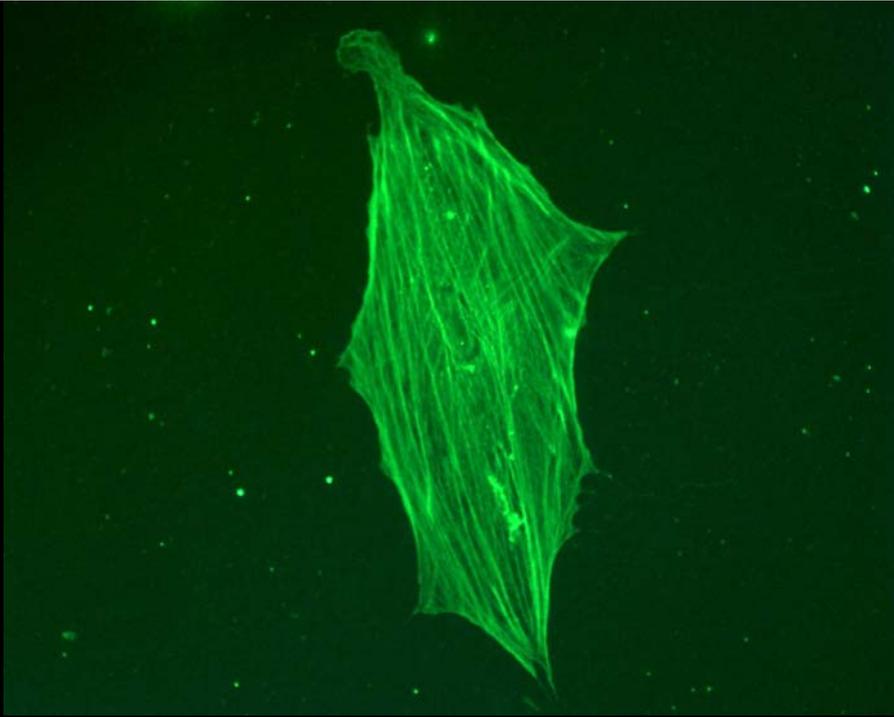
## Beispiele biologischer Anwendungen

Immunfluoreszenzfärbung  
Mib-Ki67-Cy3 (+ FISH)



Immunfluoreszenzfärbung  
vWF-Cy3





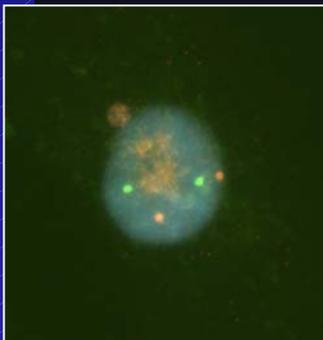
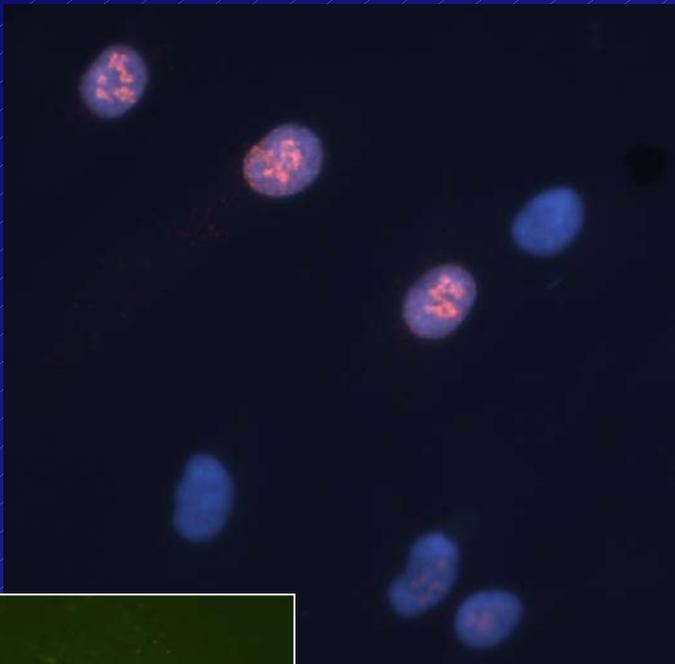
Fotos: J. IBle

# Fluoreszenzmikroskopie

Worin besteht das Besondere? Warum sollte das Färbemittel fluoreszieren?

Aussendung von Licht ohne störendes Fremdlicht - Selbstleuchten im Dunkeln

Immunfluoreszenzfärbung  
Mib-Ki67-Cy3 (+ FISH)



Immunfluoreszenzfärbung  
vWF-Cy3

