

Lebende Zellen besser sichtbar im schrägen Licht

Integrierter Modulationskontrast – Mikroskopieren ohne Spezialobjektive

Dipl.-Phys. Bernard Kleine und Anja Schué,

Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Der Modulationskontrast nach Hoffman hat sich für Untersuchungen ungefärbter, kontrastarmer biologischer Proben als Standard etabliert. Die innovative technische Umsetzung von Leica Microsystems ermöglicht nun eine deutlich einfachere Handhabung und flexiblere Einsatzmöglichkeiten. Die Integration des Modulators in den Strahlengang des Mikroskops erlaubt nun, eine Vielzahl von Hellfeld- oder Phasenobjektiven anstelle weniger Spezialobjektive einzusetzen. Über frei zugängliche Modulatoren kann der Kontrast erstmals individuell modifiziert und optimiert werden. Der von Leica Microsystems entwickelte integrierte Modulationskontrast (IMC) ist damit nicht nur für Routineuntersuchungen von biologischem Material geeignet, sondern auch ein exzellentes Werkzeug für anspruchsvolle Anwendungen wie Mikromanipulation, Mikroinjektion oder Mikrodissektion.

Bei Manipulationstechniken wie der In-Vitro-Fertilisation bietet der Modulationskontrast eine hervorragende Möglichkeit zur Visualisierung der Zellen. Eine Kombination von Modulator und Schlitzeblende wandelt Phasengradienten der Probe mithilfe einer „schrägen Beleuchtung“ in Helligkeitsgradienten um. Der objektivseitige Modulator besitzt unterschiedlich lichtdurchlässige Bereiche. Das Licht fällt über die beleuchtungsseitige Schlitzeblende seitlich auf die Probe und wird an Phasenübergängen gebeugt. Je nach Vorzeichen des Gradienten wird es zum undurchlässigen oder zum transparenten Modulatorteil hin abgelenkt. Das Ergebnis sind Graustufen, die das Auge zu einem reliefartigen, dreidimensionalen Bildeindruck zusammensetzt – analog Licht und Schatten bei seitlich beleuchteten Objekten (Abbildungen 1 a, b).



Abbildung 1a:

Der Modulationskontrast visualisiert transparente kontrastarme Proben durch Umwandlung von Phasengradienten in Helligkeitsgradienten. Das Ergebnis sind kontrastreiche Graustufen, die einen reliefartigen dreidimensionalen Bildeindruck ergeben.

Abbildung 1a mit freundlicher Genehmigung von C. Mehnert, Zentrum für In-Vitro-Fertilisation, Gießen

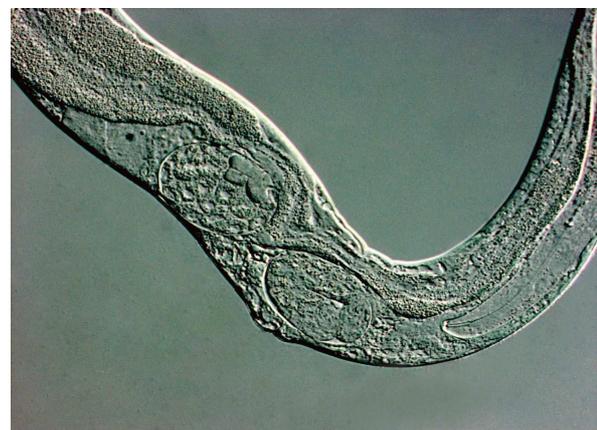


Abbildung 1b:

Die ursprüngliche technische Umsetzung erforderte allerdings Spezialobjektive, da der Modulator fest im Objektiv eingebaut war. Für Hellfeld und Fluoreszenz sind diese Objektive nur bedingt geeignet. Zudem muss bei jedem Objektiv- oder Vergrößerungswechsel die Schlitzblende manuell auf den Modulator ausgerichtet werden.

IMC – mehr Freiheiten, weniger Kosten

Leica Microsystems hat den integrierten Modulationskontrast (IMC) entwickelt, der erheblich einfacher zu handhaben und flexibler anzuwenden ist. Beim IMC ist der Modulator außerhalb des Objektivs in einer zum Kondensator konjugierten Fokusebene (Zwischenpupille) im Strahlengang integriert (Abbildung 2).

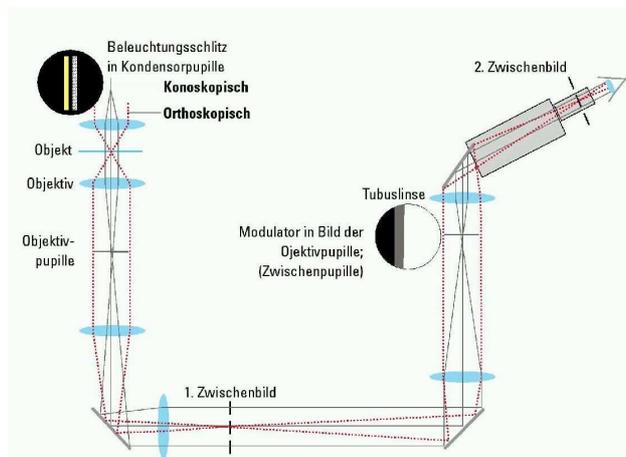


Abbildung 2: IMC-Lösung in den inversen DigitalMikroskopen von Leica Microsystems. Der Modulator ist außerhalb des Objektivs frei zugänglich und flexibel einstellbar in der Zwischenpupille positioniert. Die Schlitzblende ist in der Kondensorpupille platziert.

Die Modulatoren sind auf Schiebern angebracht, die seitlich am Stativ über ein Interface in die Zwischenpupille geführt werden. Sie sind somit frei zugänglich und erlauben dem Anwender, den Kontrast jederzeit und schnell individuell zu optimieren.

Darüber hinaus können Modulatoren mit unterschiedlichen Transmissionen verwendet werden. Auf dem Schieber befindet sich auch eine Hellfeldposition für unmodulierte Bilder. Bei allen Mikroskopen von Leica Microsystems, die mit IMC ausgestattet sind, ist analog zum DIC die Ausrichtung des Kontrastes (Schattenrichtung des Reliefeindrucks) für alle Objektive einheitlich voreingestellt. Beim Wechsel der Objektive oder der Vergrößerung bleibt der räumliche Bildeindruck des Präparates unverändert erhalten. Das Nachjustieren der Schlitzblende entfällt.

Grundsätzlich war bei der Auskopplung des Modulators zu berücksichtigen, dass sich die hintere Brennpunktebene des Objektivs im gesamten Bereich der 45 mm Parfokalitäts-Distanz befinden kann. Demnach müsste ein Modulator außerhalb des Objektivs um mindestens diese Distanz verschiebbar sein. Das Design der Leica Objektive, die durch feste Fokusebenen definiert sind, der

Einsatz in inversen Mikroskopen und die festgelegten Vergrößerungsstufen von 5x-63x erlaubten, die Anzahl der Modulationsebenen auf zwei Pupillenlagen zu reduzieren (Abbildung 3).

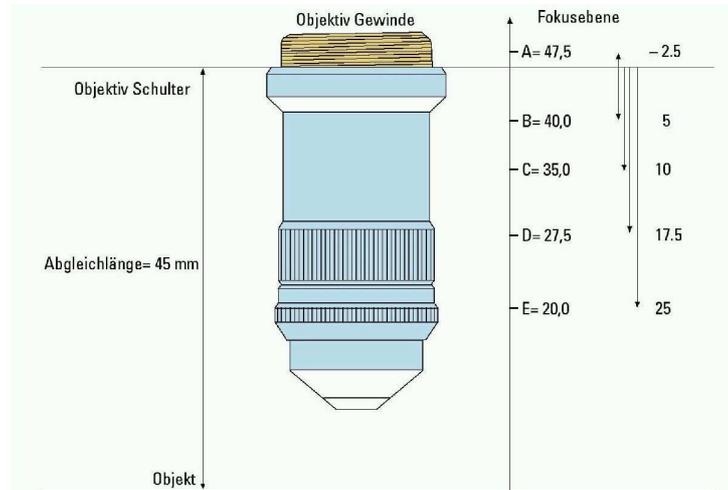


Abbildung 3: Leica Objektive sind durch feste Fokusebenen definiert. Durch den Einsatz in inversen Mikroskopen und durch festgelegte Vergrößerungsstufen von 5x-63x konnte die Anzahl der Modulationsebenen auf zwei Pupillenlagen reduziert werden.

Der Strahlengang bis zum Bild der Pupille, der so genannten Zwischenpupille, ist als 1x vergrößerndes Teleskopsystem aufgebaut. Der Unendlichstrahlengang hinter dem Objektiv wird in der Zwischenpupille reproduziert. Dadurch können auch in der Zwischenpupille planparallele optische Modulatoren beliebiger Dicke gekippt oder unverkippt in den Strahlengang gebracht werden, ohne dass Bildlage oder -qualität beeinträchtigt werden. Das optimal monochromatisch und chromatisch korrigierte Teleskopsystem reduziert Streu- oder Falschlicht auf ein Minimum. Auch die metallisch aufgedampften Grau- und Dunkelbereiche des IMC-Modulators sind sehr reflexarm.

Die Vorteile des IMC:

- Keine zusätzlichen Spezialobjektive
- Eine Objektivreihe für alle Kontrastierverfahren ohne Transmissionsverlust
- Schnelle Anpassung an neue Anwendungen durch Modulatoren mit unterschiedlicher Transmission
- Kontrast individuell einstellbar

Individuell modifizierbare Parameter

Das leicht zu handhabende IMC-Konzept lässt viel Raum für individuelle Anpassungen des Modulationskontrasts. Um einen jederzeit homogenen Bildeindruck zu erhalten, ist der Modulator höhenverstellbar zum Ausgleich unterschiedlicher Tischhöhen, unterschiedlich hohe Pufferlösungen und veränderter Probenposition im Gefäß. Wird der Modulator seitlich verschoben, beeinflusst dies die Auflösung. Je weiter Modulator und Schlitzblende nach außen verschoben werden, desto höher die Auflösung (maximale Auflösung: $Res = \lambda/2NA$).

Die Intensität des Kontrastes wird durch die Lichtdurchlässigkeit und die Breite des Modulators bestimmt. Je geringer die Transmission im Graubereich, desto stärker der Kontrast. Eine Transmission von 25% erzeugt einen weichen Kontrast; bei 10% entsteht ein harter Kontrast. Unterschiedlich breite Modulatoren verändern den Kontrast in gleicher Weise (Abbildung 4).

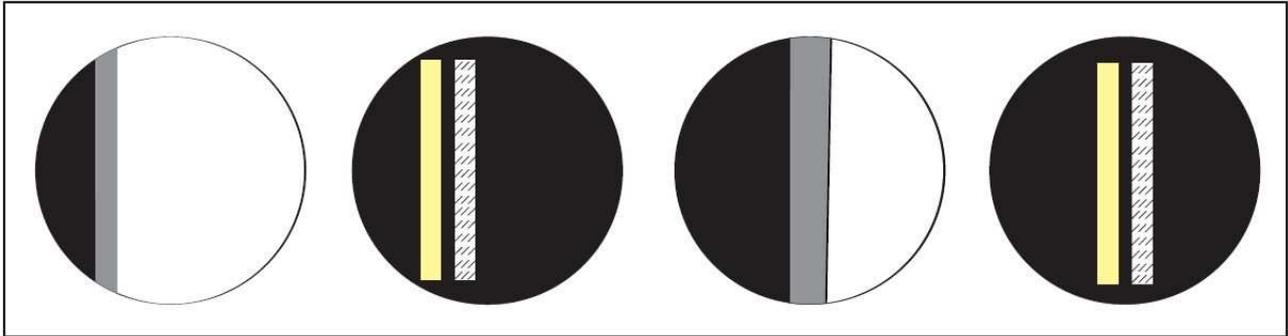


Abbildung 4: Seitlich verstellbare Modulatoren für variable Auflösung, Schlitzblende mit zusätzlichem Polarisationschlitz mehr oder weniger Reliefeindruck

Je schmaler der graue Bereich, desto stärker ist der Kontrast. Breite Graubereiche wirken als Weichzeichner. Auf der Beleuchtungsseite wird eine Schlitzblende mit zwei Beleuchtungsschlitz eingesetzt. Der erste Schlitz wird auf den Graubereich des Modulators abgebildet und bewirkt die schiefe Beleuchtung für den Modulationskontrast. Der zweite ist mit einer Polarisationsfolie abgedeckt (Abbildung 4).

In Verbindung mit einem vorgeschalteten, drehbaren Polarisator kann der Reliefeindruck des Modulationskontrastes verstärkt oder vermindert werden. Der Polarisator beeinflusst nicht die Bildqualität beim Arbeiten mit Plastikgefäßen, da das Licht nur beleuchtungsseitig polarisiert wird und auf Objektivseite kein Analysator eingesetzt wird. Die Größen der Schlitzblenden sind auf die gängigen Kondensoren abgestimmt.

Individuell modifizierbare Parameter des IMC:

- Homogenität
- Auflösung
- Kontrastintensität
- Reliefeindruck

Danksagung

Wir danken Ralf Krüger, Leica Microsystems, Systemplanung Optik, für die ausführlichen Diskussionen und Hintergrundinformationen. Ralf Krüger war maßgeblich an der Entwicklung und Implementierung des IMC in die inversen Forschungsmikroskope von Leica Microsystems beteiligt.

Literatur

Hoffman, R., The Modulation Contrast Microscope: Principles and Performance, Journal of Microscopy, Vol. 110, pt 3, August 1977, pp. 205-222