

Cytecs-Publikation

AlSiO₂ Schicht erhöht die Photonen- ausbeute in der Fluoreszenzmikroskopie

Franz-Josef Wischmann¹, Katrin Borrmann³, Nancy Adriana Espinoza Sanchez³, Burkhard Greve³,
Wolfgang Göhde^{1,2}

¹ Cytecs GmbH, Im Derdel 8, 48161 Münster

² Medizinische Fakultät, Universitätsklinikum Münster

³ Universitätsklinikum Münster, Klinik für Strahlentherapie – Radioonkologie, Albert-Schweitzer-
Campus 1, Gebäude A1, 48149 Münster



AlSiO₂ beschichtete Objektträger erhöhen die Photonenausbeute in der Fluoreszenzmikroskopie

Franz-Josef Wischmann¹, Katrin Borrmann³, Nancy Adriana Espinoza Sanchez³, Burkhard Greve³, Wolfgang Göhde^{1,2}

¹ Cytecs GmbH, Im Derdel 8, 48161 Münster

² Medizinische Fakultät, Universitätsklinikum Münster

³ Universitätsklinikum Münster, Klinik für Strahlentherapie – Radioonkologie, Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A1, 48149 Münster

The amplification of weak fluorescence signals is still challenging. Here we present an AlSiO₂ coated microscopic slide, that enhances fluorescence signals up to four times. It is essential to place specimen directly on the AlSiO₂ layer. These new commercially available microscopic slides can be used for conventional fluorescence microscopy as well as for confocal laser scan microscopy.

Die Verstärkung von Fluoreszenzsignalen in der Fluoreszenzmikroskopie ist nach wie vor eine große Herausforderung. Weltweit beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen und Firmen mit dieser Fragestellung. Dabei fand der Einsatz verspiegelter Flächen oder optischer Elemente bereits mehrfach Berücksichtigung [1,2]. Ein kommerzielles Produkt für den Anwender ist aus diesen Ansätzen unser Erkenntnis nach nie entstanden.

Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie befinden sich in den meisten Fällen auf Objektträgern und werden mit einem Deckglas fixiert. Alle fluoreszenzmarkierten Präparate, auch Ultradünnschnitte oder zweidimensionale Zellkulturen, stellen stets einen dreidimensionalen Körper dar, der sein Fluoreszenzlicht in X-,Y- und Z- Richtung abstrahlt. Die Menge an detektierbarem Fluoreszenzlicht richtet sich dabei hauptsächlich nach dem Öffnungswinkel des

Objektivs. Unabhängig davon wie groß der Öffnungswinkel des Objektivs ist, geht bei der Benutzung transparenter Objektträger alles Fluoreszenzlicht verloren, das nicht vom Öffnungswinkel des Objektivs erfasst werden kann. Dies ändert sich, wenn der Objektträger mit AlSiO₂ beschichtet wird. Licht, welches sich im dreidimensionalen Raum vom Objektiv wegbewegt, wird an der AlSiO₂ Schicht reflektiert und kann somit größtenteils vom Objektiv zusätzlich erfasst werden.

Die Betrachtung des Strahlenganges für das Anregungslicht zeigt einen ähnlichen Effekt. Bei der Verwendung konventioneller, transparenter Objektträger passiert das Anregungslicht die Objektebene einmal und tritt dann rückseitig wieder am Objektträger aus. Ist der Objektträger hingegen mit AlSiO₂ beschichtet, wird das Anregungslicht an der AlSiO₂ Fläche reflektiert und es besteht die Möglichkeit die Fluorophore ein zweites Mal anzuregen.

AlSiO₂-Beschichtung steigert die Photonenausbeute um das Vierfache

Da etwa doppelt so viele Fluorophore durch das Exzitationslicht angeregt werden können und etwa doppelt so viel Emissionslicht durch das Objektiv gesammelt werden kann, führt dies in der Summe theoretisch zu einer Vervielfachung der Intensität des Fluoreszenzsignals gegenüber der Verwendung konventioneller Objektträger. Diese Berechnung deckt sich mit den tatsächlich beobachteten Verstärkungseffekten. In einer dimensionslosen, semi-quantitativen Bestimmung mittels XIMEA Kamera-

Software (XIMEA API Software Package V4, Version 4.20, 64-bit, XIMEA, Münster) sowie ImageJ (ImageJ 1.52a, National Institutes of Health, USA) konnte die beobachtete Vervielfachung der Fluoreszenzintensität messtechnisch bestätigt werden.

Das Objekt muss direkt auf der Spiegelfläche aufgebracht sein

Damit dieser Effekt vollumfänglich entstehen kann, ist es zwingend notwendig, das Objekt direkt auf der Spiegelfläche aufzubringen. Die Orientierung des Objektträgers ist somit entscheidend für den Verstärkungseffekt [3]. Der Grund hierfür wird bei der Betrachtung

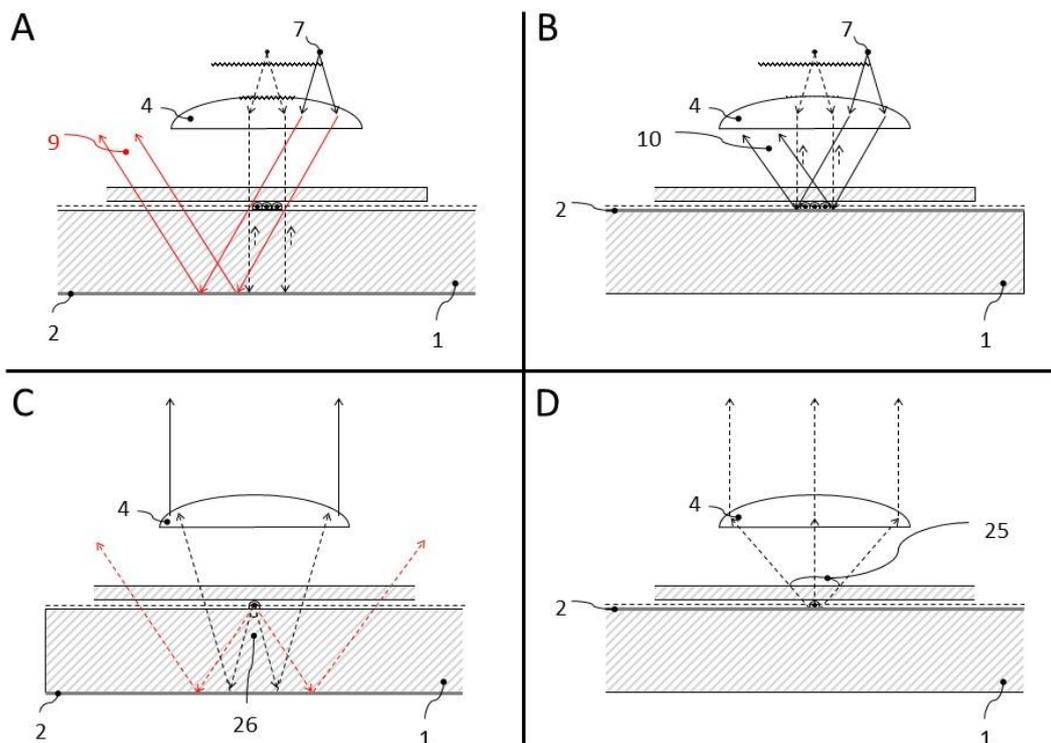


Abbildung 1: Exzitationslicht mit großem Einfallswinkel (B7) kann das Objekt nur ein zweites Mal passieren, wenn das Objekt auf der Spiegelschicht (B2) aufgebracht ist (B10). Wäre die gegenüberliegende Seite verspiegelt, wäre das Licht ungenutzt (A9, rot).

Emissionslicht, mit großem Abstrahlwinkel (D25), wird nur erfasst, wenn das Objekt auf der Spiegelschicht (D2) aufgebracht ist. Andernfalls wird nur Licht mit kleinem Abstrahlwinkel (C26) zum Objektiv reflektiert.

der Strahlengänge für Exzitations- und Emissionslicht in Abbildung 1 deutlich. Wenn das Objekt auf der Spiegelfläche (Abb. 1 B, 2) aufgebracht ist, kann der Einfallswinkel des Exzitationslichts nahezu beliebig groß sein, es wird so reflektiert, dass es das Objekt ein zweites Mal passiert (Abb. 1 B, 10). Wäre die Spiegelfläche (Abb. 1 A, 2) auf der gegenüberliegenden Seite des Objektträgers (Abb. 1 A, 1) aufgebracht, so würden große Teile des reflektierten Exzitationslichtes das Objekt kein zweites Mal passieren (Abb. 1 A, 9, rot). Eine ähnliche Situation besteht auch für

den Strahlengang des Emissionslichtes, dargestellt in Abbildung 1 C und D. Dadurch, dass das Objekt direkt auf der Spiegelfläche aufgebracht ist, kann Emissionslicht, welches in einem großen Abstrahlwinkel (Abb. 1 D, 25) reflektiert wird, noch vom Objektiv (Abb. 2 D, 4) erfasst werden. Ist hingegen die gegenüberliegende Seite verspiegelt, so könnte nur Emissionslicht in einem deutlich kleineren Abstrahlwinkel (Abb. 2 C, 26) vom Objektiv erfasst werden. Emissionslicht, das in einem größeren Abstrahlwinkel reflektiert

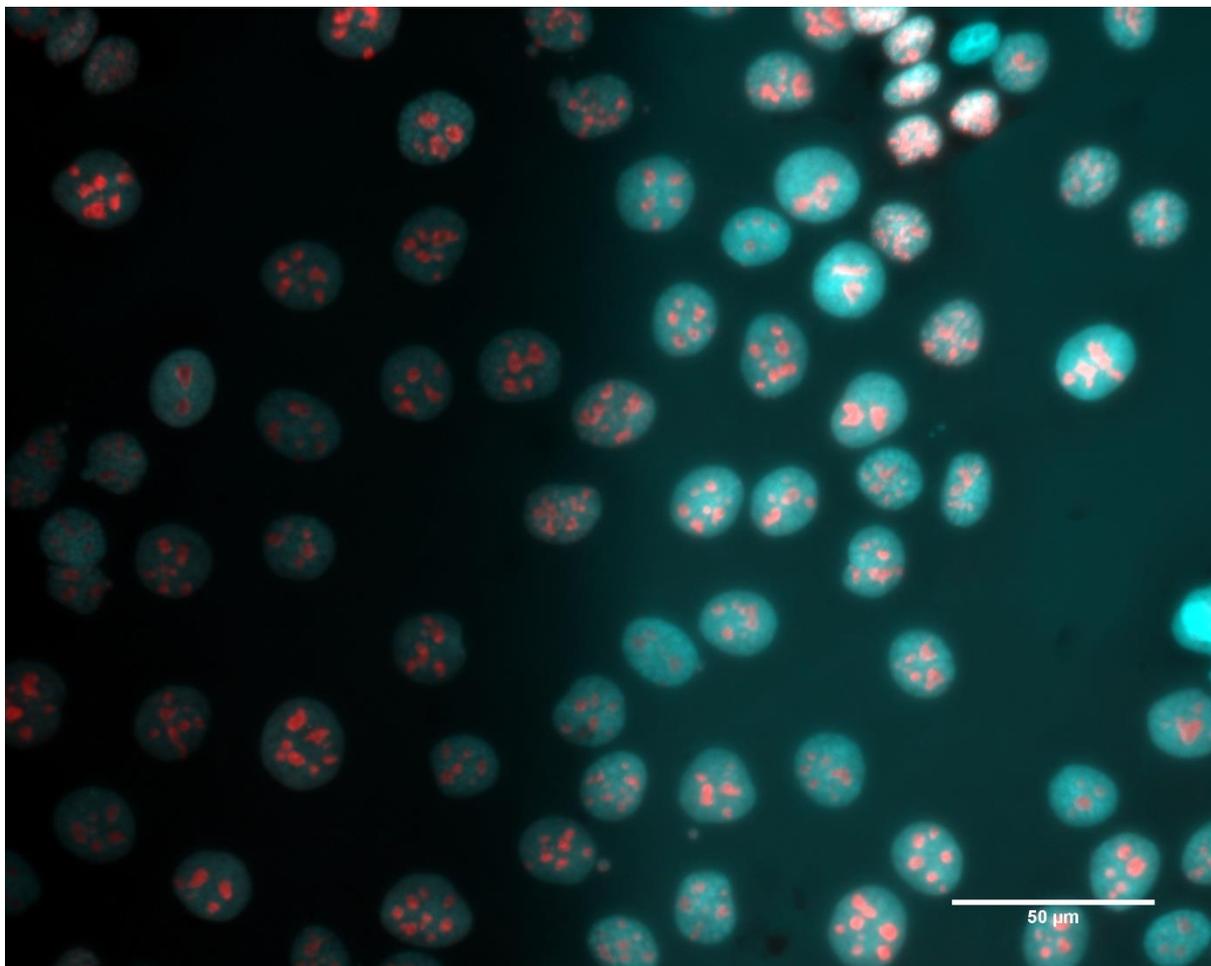


Abbildung 2: Bei der Benutzung eines konfokalen Laserscan-Mikroskops, wie dem Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen), ist die Fluoreszenzausbeute in der rechten Bildhälfte aufgrund der Al-SiO₂ Beschichtung größer. Die auf einem Deckgläschen kultivierten HaCat Zellen wurden fixiert, gegen KI-67 gefärbt und die Zellkerne mit Hoechst33342 markiert.

wird, kann nicht vom Objektiv erfasst werden (Abb.2 C, rot) und geht verloren.

Der CySlide ist auch mit konfokalen Laserscan-Mikroskopen anwendbar

Der Effekt, der Vervierfachung der Fluoreszenzintensität kann auch durch den Benutzer selbst im mikroskopischen Bild erkannt werden. In der Abbildung 2 wurden auf Deckgläschen kultivierte HaCat Zellen gegen KI-67 und Hoechst33342 gefärbt. Die mikroskopische Aufnahme stammt von einem Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen). Im dargestellten Bildausschnitt handelt es sich um jeweils dasselbe Präparat, welches derselben Färbung und denselben Belichtungsparametern ausgesetzt wurde. In etwa der Bildmitte verläuft vertikal der Limes zwischen dem Al-SiO₂ beschichtetem Teil des Objektträgers (rechts) und dem unbeschichteten, transparenten Teil des Objektträgers (links). Es ist klar zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität mit der AlSiO₂ Beschichtung um ein Vielfaches höher ist.

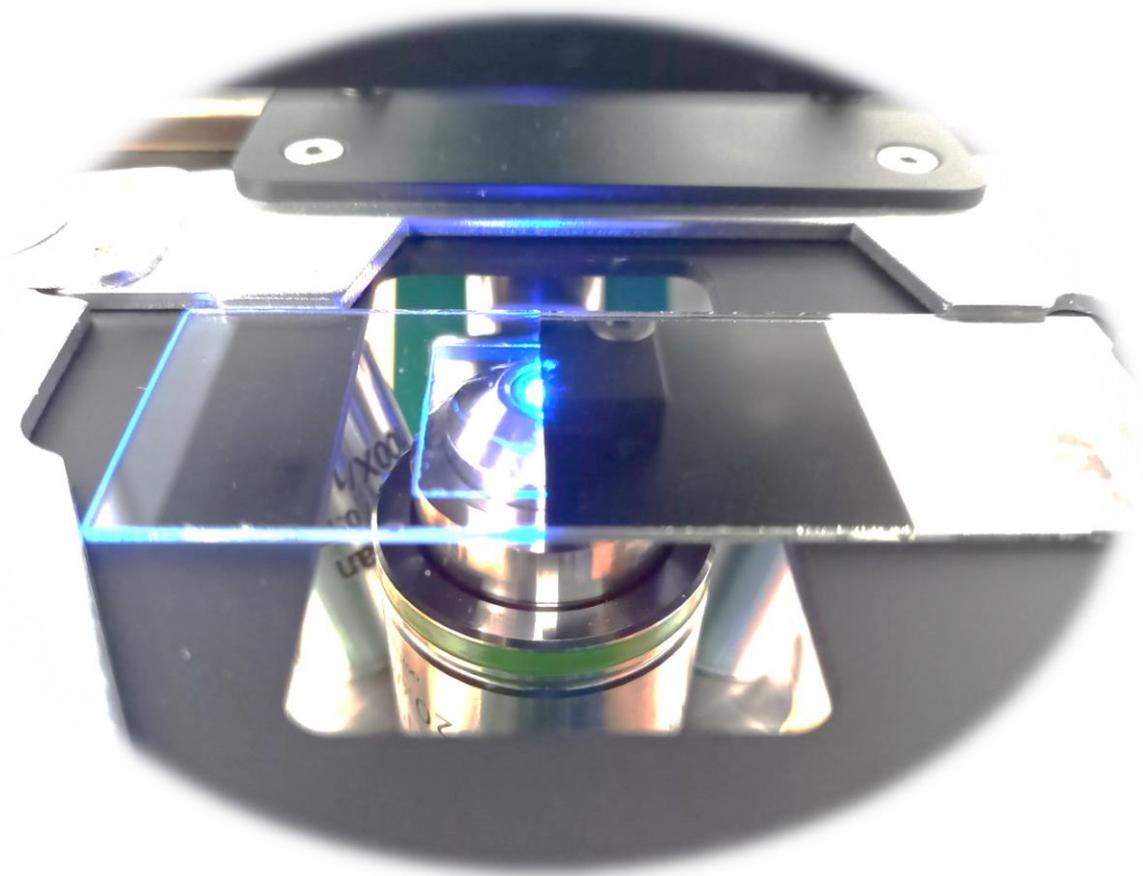
Gleichwertige Ergebnisse konnten mit einem LED basierten Mikroskop (Cytecs INVERSO, Cytecs, Münster) und einem Mikroskop, das eine Quecksilberdampflampe als Lichtquelle nutzt, erzeugt werden (Zeiss Axiophot). Diese Daten sind hier nicht gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Photonenausbeute durch die Nutzung AlSiO₂ beschichteter Objektträger um ein Vielfaches steigern lässt. Diese einfache, aber wirkungsvolle Modifikation bringt große Vorteile für die Fluoreszenzmikroskopie. Damit stellt der CySlide von Cytecs eine technisch simple und kostengünstige Lösung dar auch schwächste Floreszenzen gut und sicher abzubilden. Er kann auf verschiedenen Mikroskop-Plattformen mit einer Auflicht-Beleuchtung angewendet werden.

Abhängig vom zu untersuchenden Fluoreszenzspektrum lassen sich weitere Optimierungen durch die Benutzung von Ag-, Al-, oder Au-Legierungen erzielen.

Literatur

1. Takeshi Sudo, Masayuki Mizusawa, **Vertical illumination type fluorescence microscope**, Japanese Patent Office 09292572 A, 11.11.1997
2. Triantafyllos Tafas, **System and method for increasing the contrast of an image produced by an epifluorescence microscope**, US 2006/0056016 A1, 16, März 2006
3. Wolfgang Göhde, **Objektträger für die Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie**, DE20 2022 101 038 U1, Mai 2022



cytecs
cell analysis
immundiagnostic

55 YEARS
EXPERTISE IN
FLOW CYTOMETRY

Cytecs GmbH
Im Derdel 8
48161 Münster

Fon: +49 2534 97736-0
Fax: +49 2534 97736-29
E-Mail: info@cytecs.com
www.cytecs.com