

Fluorescentie microscopie: principe en toepassingen

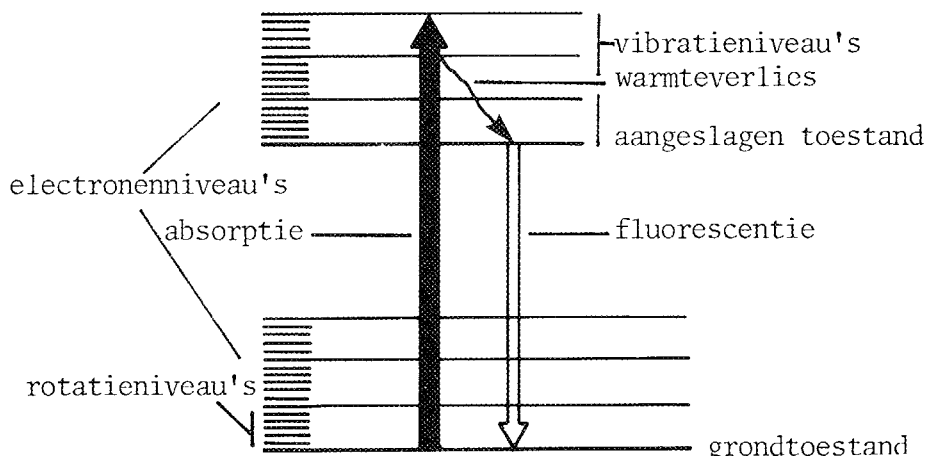
Dr. H.J. Tanke; *Laboratorium voor Cytochemie en Cytometrie, Rijksuniversiteit Leiden, Wassenaarseweg 72, 2333 AL Leiden*

1. Wat is fluorescentie?

Sommige stoffen kunnen geabsorbeerde energie weer afstaan door licht uit te zenden. Men noemt dit verschijnsel luminescentie. Indien de geabsorbeerde energie in de vorm van licht is opgenomen, spreekt men van fotoluminescentie, waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen fluorescentie en fosforescentie. Fluorescentie is gedefinieerd als het uitzenden van licht tijdens (eigenlijk "zeer kort na") de absorptie van licht van een andere lichtbron.

De eigenschappen van fluorescentie zijn het best te verklaren door de fysische aspecten van fluorescentie nader te bekijken. De energie van een molecuul wordt bepaald door de elektronenenergie, en de vibratie- en rotatie-energie van de atomen.

Men onderscheidt o.a. de grondtoestand en de eerste aangeslagen toestand van de elektronen. In figuur 1 zijn tevens enkele vibratie- en rotatietoestanden getekend. Voor het optreden van fluorescentie wordt licht geabsorbeerd, waarbij elektronen overgaan naar een hoger electronenniveau en een hogere vibratietoestand (proces wordt excitatie genoemd). Terugkeren naar de eerste aangeslagen toestand gaat gepaard met het verlies aan vibratie-energie (warmte); terugkeren naar de verschillende vibratieniveaus van de grondtoestand kan gepaard gaan met fluorescentie. De zogenaamde "life-time" van de elektronen in de aangeslagen toestand is zeer kort, minder dan 1 pico sec. Als de



Figuur 1
Energiediagram met gequantiseerde electronen-, vibratie- en rotatietoestanden, met daarin de overgangen die tot fluorescentie kunnen leiden

excitatie-lichtbron uitgeschakeld wordt, zou het fluorescentieverschijnsel zelf niet veel langer duren dan enkele nanosec. Fluorescerende stoffen heten ook wel fluorochromen of fluoroforen. Een tweede vorm van luminescentie is fosforescentie, waarbij andere energieovergangen betrokken zijn. De fosforescentie "life-time" is veel groter. De emissie kan seconden, zelfs minuten duren.

De energie van het licht wordt gegeven door de wet van Planck, die zegt dat de energie recht evenredig is met de frequentie (omgekeerd evenredig met de golflengte) van het licht. De geabsorbeerde energie wordt niet volledig omgezet in emissie, er ontstaat ook warmte (vergelijk de lengte van de pijl = energie in figuur 1). Het uitgezonden fluorescentielicht is derhalve van hogere golflengte (lagere energie) dan het geabsorbeerde licht (Wet van Stokes). Het verschil in excitatie- en emissiegolflengte vormt de basis voor het waarnemen van fluorescentie. Fluorescentiemicroscopie heeft doorgaans te maken met de golflengten in het zichtbare gebied van het spectrum (400-700 nm) en het nabij ultraviolet (UV) (300-400 nm).

De ratio tussen de uitgezonden en de geabsorbeerde energie wordt de "quantum efficiency" genoemd (Q). De Q waarde geeft een indruk van de relatieve intensiteit van een bepaald fluorochroom. Tijdens aanstralen van het fluorochroom neemt de Q waarde in de regel af. Dit proces noemt men bleking. Het is o.a. het gevolg van fotochemische reacties, die tot ontleding van fluorochroom moleculen kunnen voeren. Er zijn omstandigheden en stoffen (zuurstof en zware metalen), die een remmend effect hebben op de fluorescentie. Laatstgenoemden gaan een interactie aan met de elektronenconfiguratie van het fluorochroom, hetgeen vaak tot een reductie van de Q waarde leidt. Dit proces wordt "quenching" (= remming) genoemd.

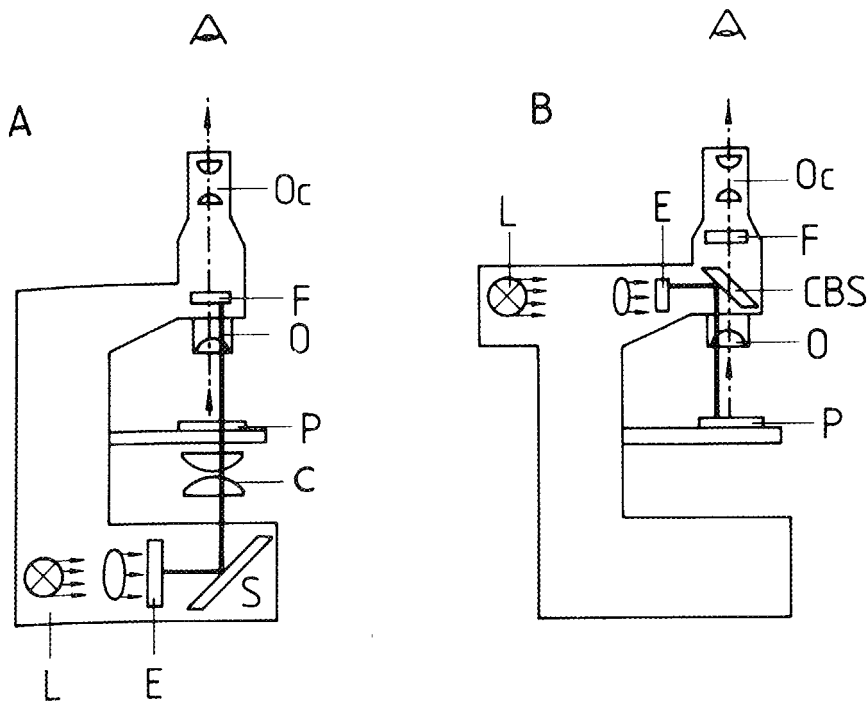
2. Het fluorescentiemicroscopie

Het zichtbaar maken van fluorescentie vereist tenminste drie componenten fluoro-

chroom, lichtbron, detectiesysteem (ook, lichtgevoelig meetsysteem). Daarnaast zijn filters nodig om de juiste excitatie- en emissiegolflengten te selecteren. Een excitatiefilter wordt gebruikt om de geschikte golflengten door te laten die de lichtbron (bijv. een kwiklamp) uitzendt. Het fluorescerende voorwerp wordt met licht van deze golflengten bestraald en een tweede filter (spfilter) scheidt het fluorescentie-emissie licht van het niet geabsorbeerde excitatie licht. Efficiënte onderdrukking van het niet geabsorbeerde licht is noodzakelijk omdat het emissielicht vaak slechts een fractie van de intensiteit van het excitatie licht heeft.

Het fluorescentiemicroscopie bevat al deze elementen. Daarnaast worden optische lenzen gebruikt om objecten met microscopische afmetingen te kunnen zien. Moderne fluorescentie microscopen maken bijna uitsluitend gebruik van opvallende belichting volgens Ploem (figuur 2b).

Bij opvallende belichting wordt met een enkele lens het excitatie licht op het preparaat gefocuseerd, en tevens het fluorescentie beeld gevormd. Om het excitatie- en emissielicht te scheiden wordt een chromatische stralendeler gebruikt, die de eigenschap heeft kortgolvig licht te reflecteren en licht van langere golflengten door te laten. Fluorescentiemicroscopie met opvallend licht heeft een aantal belangrijke voordelen. Omdat het objectief ook de rol van condensor vervult, is er slechts een optische as. Uitlijnen betekent focuseren van het objectief. Het geexciteerde microscopische veld is tevens het waargenomen veld. Fluorescentiemicroscopie met opvallend licht heeft het ook mogelijk gemaakt niet of nauwelijks transparante objecten (mineralen, halfgeleider chips) te bestuderen. Bovendien kan het opvallende systeem gemakkelijk gecombineerd worden met elke vorm van doorvallende belichting (fase contrast, interferentie contrast volgens Nomarski, helderveld microscopie), omdat geen eisen aan de condensor gesteld hoeven te worden.



Figuur 2

Figuur A en B tonen een schematische voorstelling van een fluorescentiemicroscop met doorvallend, respectievelijk opvallend licht

Doorgetrokken lijn excitatielicht, stippellijn emissielicht. L = lichtbron; E = excitatiefilter, S = totaal reflecterende spiegel, CBS = chromatische stralendeler P = preparaat, F = spierfilter, Oc = Oculair, O = objectief, C = condensor

Componenten van het fluorescentiemicroscop

Excitatiebron In vergelijking met andere vormen van lichtmicroscopie is een hoog-energetische lichtbron nodig. De fluorescentieopbrengst is evenredig met de excitatieenergie. Om vooral zwakke fluorochromen (lage Q waarde) zichtbaar te maken is een sterke lichtbron noodzakelijk. Veelgebruikte lampen zijn hoge druk kwiklampen en xenolampen. Nadeel van deze lampen is hun beperkte levensduur (circa 200 uur). Mede daardoor neemt het gebruik van kleine luchtgekoelde lasers

toe: bijv. argon lasers voor excitatie met blauw (488 nm). Verdere ontwikkeling van halfgeleider lasers, die voldoende blauw of groen emissie geven, biedt belangrijke toepassingsmogelijkheden voor fluorescentie microscopie.

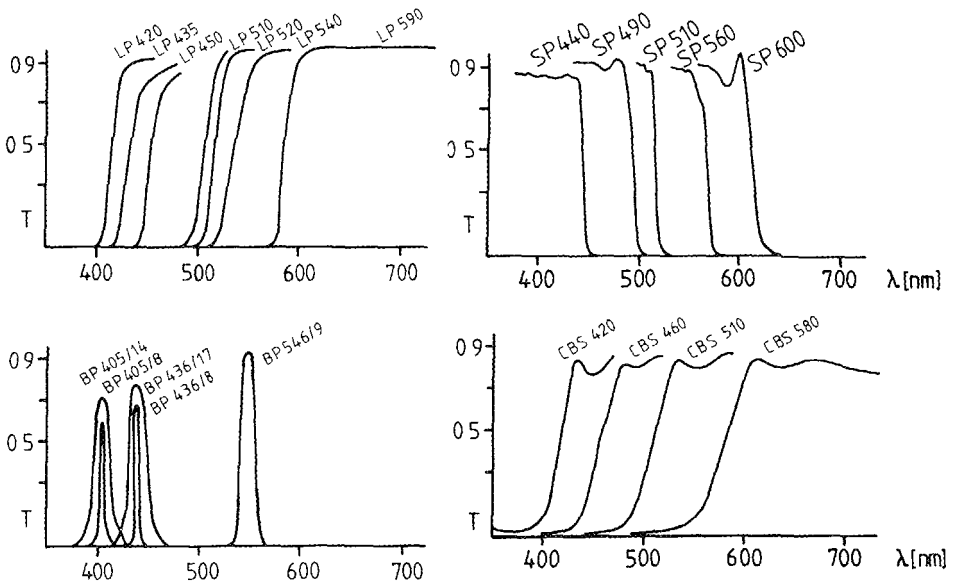
Filters: Deze worden gebruikt om een gedeelte van het spectrum te blokkeren (door absorptie of door reflectie) en een ander gedeelte door te laten. Er bestaan filters met verschillende functie en derhalve verschillende transmissiecarakteristiek (figuur 3).

Het lensstelsel: Bij opvallende belichting functioneert het objectief tevens als condensor. De numerieke apertuur (opening van de lens) is derhalve zeer belangrijk. De fluorescentieintensiteit is evenredig met de vierde macht van de numerieke apertuur (NA). In het algemeen wordt gestreefd naar lenzen met een zo laag mogelijke vergroting (hoog contrast) en een hoge N.A. Om deze hoge apertuur te bereiken worden vaak immersie-lenzen gebruikt. Als immersievloeistof dienen olie, glycerine en water. Water vertoont geen autofluorescentie (= eigen fluorescentie), hetgeen nuttig kan zijn voor bepaalde toepassingen. De keuze van objectief en oculair is bepalend voor een optimaal resultaat. Niet alle objectieven, die als goed bekend staan voor helderveld microscopie, zijn dat ook voor fluorescentie toepassingen. Vaak zijn ze voorzien van allerlei hulplenzen om lensfouten zoals randonscherpte of chromatische aberratie te corrigeren. Elke ex-

tra lens betekent echter een nieuw reflectievlak en derhalve potentieel lichtverlies. Met name voor de excitatie met ultraviolet licht is een dergelijk gecorrigeerde lens een probleem, omdat de vele glaslenzen nauwelijks noch het nabije UV doorlaten. Vaak is de keuze van het objectief een "deal" tussen beeldkwaliteit en fluorescentie intensiteit. Moderne objectieven zijn echter voldoende lichtsterk en geven een uitstekende beeldkwaliteit.

3. Immunofluorescentie

Immunofluorescentie is een van de meest gebruikte toepassingen van fluorescentie-microscopie. De methode is oorspronkelijk ontwikkeld door A. Coons. Indien lichaamsvreemde stoffen als eiwitten of suikers (antigenen genaamd) ingespoten worden in proefdieren worden hiertegen antilichamen geproduceerd. Deze antilichamen kunnen gemerkt worden met een fluorescerende kleurstof als FITC of TRITC, of een van de



Figuur 3 Transmissie karakteristiek van long pass (LP), short pass (SP) band pass (BP) filters, en van chromatische stralendelers (CBS)

phycobiliproteïne kleurstoffen, die voorkomen in blauwe en groene algen, en recentelijk voor IF geïntroduceerd zijn. Een antilichaam-kleurstof verbinding noemt men een conjugaat. Zo'n conjugaat kan gebruikt worden om antigenen, die in weefsels of cellen voorkomen zichtbaar te maken. Een belangrijk voordeel van de fluorescentiemicroscopie hierbij is de grote gevoeligheid. In vergelijking met het heldere veld lichtmicroscop zijn kleurstofconcentraties aan te tonen die 100 tot 1000 maal kleiner zijn. De hoeveelheid aan te tonen antigen is daardoor ook veel kleiner. Een grote stimulans voor de immunofluorescentie is de ontwikkeling van monoclonale antilichamen geweest door Koehler en Milstein. Dergelijke monospecifieke antilichamen worden door genetisch gemanipuleerde cellen in een kweekstelsel in onbeperkte hoeveelheden geproduceerd. Voor het aantonen van meerdere antigenen kunnen conjugaten met verschillende excitatie- en emissie eigenschappen ge-

bruikt worden. Met een standaard fluorescentiemicroscop zijn zo drie antigenen in drie kleuren (meestal blauw, groen en rood) zichtbaar te maken. Figuur toont een voorbeeld.

4. Microfluorometrie

Theoretische achtergrond: Microfluorometrie is het meten van de fluorescentieintensiteit van objecten in een microscopisch veld, met als doel om de hoeveelheid van een cellulair macromolecuul te bepalen. Het gaat er hierbij eerst om de relatie te weten tussen de hoeveelheid fluorochroom en de fluorescentie. Vervolgens de relatie tussen de hoeveelheid fluorochroom en de hoeveelheid cellulair structuur waaraan het gebonden is. Dat laatste is vaak erg moeilijk. Echter uit vergelijkende experimenten kan veel informatie worden verkregen. De eerste relatie is theoretisch af te leiden.

Wanneer licht met intensiteit I_0 op een kleurstofoplossing valt zal een gedeelte geabsorbeerd en een gedeelte (I) doorgelaten worden. Dus $I_0 - I$ is het geabsorbeerde gedeelte. Als gevolg van absorptie treedt (soms) fluorescentie op, met een bepaalde quantum opbrengst. Er geldt dus:

$$F = Q(I_0 - I)$$

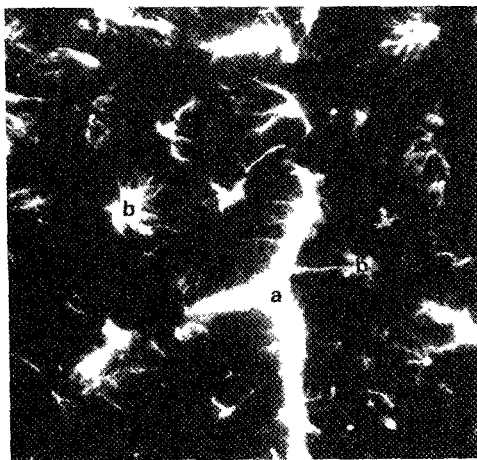
waarbij F de fluorescentie, Q de quantum efficiency en $(I_0 - I)$ de absorptie voorstellen. De wet van Lambert-Beer zegt dat de absorptie $A = -\log \text{transmissie} = -\log I/I_0$. Dit gecombineerd levert:

$$F = Q(1 - e^{-A})$$

Wanneer A laag is, dwz. de absorptie ter plaatse laag is, dan kan dit geschreven worden als:

$$F = I_0 \cdot Q$$

De fluorescentie-intensiteit is dus recht evenredig met de excitatie-intensiteit en met de quantum efficiency. De absorptie van een kleuroplossing is gerelateerd aan de hoeveelheid moleculen. Door de fluor-



Figuur 4
Immunofluorescentie kleuring van c-GMP in de hersenen van een rat; het bij de prikkelgeleiding betrokken c-GMP werd aangekleurd met een groen fluorescerend FITC-antilichaam en met behulp van een speciaal laseraftastmicroscop zichtbaar gemaakt (a) bloedvat (b) c-GMP producerende ganglioncellen.

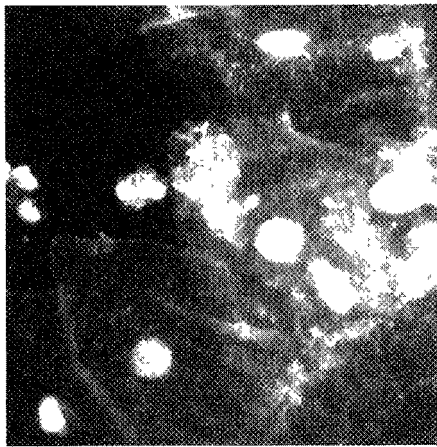
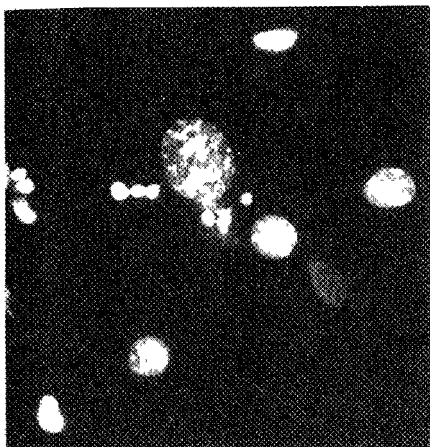
escentie te meten is dus kwantitatief de hoeveelheid fluorochroom te bepalen. Hieruit dient dan de hoeveelheid macromolecuul of antigeen in de cel door vergelijking met behulp van een geschikte standaard te worden vastgesteld.

Toepassingen: Een belangrijke toepassing betreft het meten van het DNA gehalte van een cel. DNA, het molecuul waarin de genetische informatie ligt opgeslagen, bevindt zich verpakt in chromosomen in de celkern. Een normale cel heeft een vastgesteld DNA gehalte (42 chromosomen). Kankercellen hebben vaak een afwijkend DNA gehalte. Wanneer cellen gekleurd worden met een fluorochroom, dat zich specifiek bindt aan het DNA in de kern, en vervolgens de fluorescentie van deze cel gemeten wordt, is het DNA gehalte van een celkern te meten. Op deze manier zijn normale cellen en kankercellen, als ze verschillen in DNA gehalte, van elkaar te onderscheiden. Figuur 5 toont een baarmoederhals uitstrijkje, dat met een DNA specifiek fluorochroom is gekleurd. De grote, sterk fluorescerende kern is in dit geval een tumorcel.

5. Fluorescentie microfotografie

De apparatuur die gebruikt wordt voor het maken van fotografische beelden van een fluorescerend microscopisch object, kan variëren van een eenvoudige handbediende camera tot een volautomatische fotomicroscop, waarmee automatisch de juiste belichtingstijd wordt bepaald. Dit laatste is een probleem bij fluorescentiefotografie. De fluorescentie komt van enkele punten in het microscopisch veld; meten van de belichtingstijd betekent dat de waarde uitgemiddeld wordt over het hele veld. Er zijn derhalve systemen ontwikkeld die de belichtingstijd meten bij veldbelichting en bij puntbelichting. Ook dan leidt meten lang niet altijd tot een goed fotografisch resultaat. Hier zijn twee hoofdredenen voor:

- 1) Bleking van het object tijdens excitatie. Dit heeft vaak onderbelichte foto's tot gevolg.
- 2) Reciprociteitsfout van de film. Onder ideale fotografische omstandigheden bestaat een reciproke relatie tussen de lichtintensiteit van het object en de belichtingstijd. Deze relatie geldt echter voor de



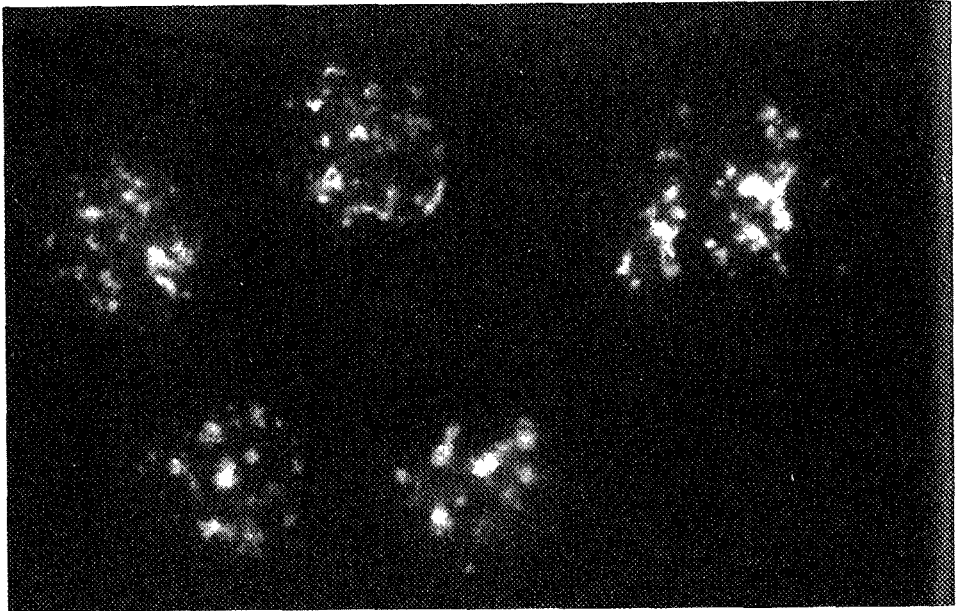
Figuur 5
Uitstrijkje van de baarmoederhals gekleurd voor DNA en eiwit volgens de acriflavine-Feulgen-SITS methode. Bij blauw excitatie worden gele celkernen (DNA) gezien (links). Als tegenkleuring dient de SITS eiwitkleuring, die resulteert in een blauw fluorescentiebeeld als met ultraviolet licht geexciteerd wordt (rechts).

commercieel beschikbare films, die geschikt zijn voor belichtingstijden van 0.01 tot 1 sec. Extreem zwakke intensiteiten gehoorzamen niet aan deze wet, en hebben veel minder zwarting in de film tot gevolg. Als consequentie moet langer belicht worden. Echter, bij langere belichting (dus ook langere excitatie) treedt bleking op, waardoor nog weer langer belicht moet worden: een vicieuze cirkel waaraan nauwelijks lijkt te ontsnappen

Een tweede gevolg van langer belichten is een verstoorde kleurbalans. De drie kleurenemulsies van een film hebben in principe hun eigen reciprociteitsfout, waardoor het nodig is bij langer belichten de verstoorde kleurbalans met compensatiefilters te corrigeren. In het algemeen geldt dat kunstlicht kleurenfilms een lagere reciprociteitsfout hebben, waardoor de bovengenoemde fouten kleiner zijn

Om toch goede fotografische opnames van microscopische fluorescentiebeelden te kunnen maken, is het essentieel zoveel mogelijk fluorescentie licht te genereren. Er bestaat fotoapparatuur waarmee automatisch gecorrigeerd kan worden voor de reciprociteitsfout en de optimale belichting geregeld wordt. Vaak worden goede foto's echter verkregen door "trial en error".

Voor de fluorescentiefotografie is het gebruik van kleuren negatiefilm af te raden. Omdat op het kleurennegatief alleen de complementaire kleuren te zien zijn, is het voor een buitenstaander die de foto's ontwikkelt en afdruckt, vaak moeilijk om de juiste kleurvarianten te verkrijgen. Beter is het om uit te gaan van een diapositief film, en hiervan afdrukken in de juiste kleurvarianten te maken.



Figuur 6

Aantonen van satelliet DNA (genetisch inactief DNA met een nog onbekende functie) in muise leverkernen met behulp van fluorescentiemicroscopie. De sequenties werden gehybridiseerd met een hapteen gemerkte probe, en zichtbaar gemaakt met een fluorescerend antilichaam gericht tegen het hapteen.

6. Toepassingen van fluorescentie-microscopie

Het gebruik van fluorescentiemicroscopie neemt sterk toe. Door verbeterde apparatuur en reagentia biedt fluorescentiemicroscopie vaak een goed alternatief voor de zeer gevoelige methoden, waarbij een radioactieve merker gebruikt wordt. Laatstgenoemde technieken zijn vaak tijdrovend, terwijl bovendien aan het gebruik en verwerking van radioisotopen strenge eisen worden gesteld. Het aantonen van specifieke stukjes nucleïnezuur in celkernen was tot voor kort alleen mogelijk met radioactief gemerkte nucleïnezuur probes, die zwarte korrels te zien gaven in een aangebrachte zilveremulsie (zgn. autoradiografie). Figuur 6 geeft een voorbeeld van het aantonen van een specifiek nucleïnezuur met behulp van een fluorescentie in situ hybridisatiemethode, waarbij de radioactieve merker in principe vervangen is door een fluorochroom.

Toepassingen van fluorescentiemicroscopie hebben lange tijd voornamelijk op biomedisch gebied gelegen. De mogelijkheid om cellen en weefsels met behulp van gevoelige fluorescentiemicroscopie te kunnen bestuderen wordt nog steeds intensief gebruikt bij zowel fundamenteel als diagnostisch onderzoek. Voorbeelden zijn de studies van chromosomen voor het aantonen van genetische afwijkingen, de immunologische typeringsreacties bij niertransplantaties en het vinden van zeer zeldzame, fluorescerend gemerkte kankercellen. Daarnaast is een toenemend gebruik in andere gebieden waar te nemen. In de microelectronica dient fluorescentiemicroscopie voor de bestudering van chips, in de geologie worden aardmonsters onderzocht om op grond van de fluorescentie eigenschappen van het fossiele plantenmateriaal voorspellingen te kunnen doen over de aanwezigheid van olie. Bierbrouwerijen bestuderen de fluorescentie van gistcellen. De echtheid c q leeftijd van

antieke waardevolle voorwerpen is soms vast te stellen door de fluorescentie van de houtlak te bestuderen: de originele natuurlijke lak van een Stradivarius viool fluoresceert anders dan de kunsthars van een moderne viool.

Voor verdere verdieping in principes en toepassingen van fluorescentiemicroscopie kan verwezen worden naar onderstaande literatuur.

Literatuur

- H.M. Holtz: Worthwhile facts about fluorescence microscopy. Carl Zeiss, Oberkochen, W. Germany.
- Karl-Friedrich Koch: Fluorescence microscopy Instruments, Methods and Applications. Ernst Leitz Wetzlar, W Germany
- J. James: Light microscopic Techniques in Biology and Medicine. Martinus Nijhoff Medical Division, Amsterdam (1976).
- Olympus Optical Company: The use of the olympus fluorescence microscope Olympus Opt. Co. Ltd, Tokyo, Japan.
- R.C. Nairn: Fluorescent protein tracing Churchill Livingstone, Edinburgh
- C.A. Parker: Photoluminescence of solutions With applications to photochemistry and analytical chemistry. Elsevier publishing company. Amsterdam, London, New York (1968).
- J.S. Poem en H.J. Tanke: Introduction to fluorescence microscopy, Handbook Royal Microscopical Society, Oxford University Press, 1987
- Fritz Ruch: Principles and some applications of cytofluorimetry. In: Introduction to quantitative cytochemistry-II Ed GL Wied, GF Bahr, Academic Press (1970)
- H.R.E. Schuit: Photographic recording of immunofluorescence In E.J. Holborow, Standardization of Immunofluorescence Blackwell, Oxford (1970)