

## PRO EXPERIMENTIS

**Eine neue Methode der Einstellungsschärfe des Bildes**

Bei Anwendung optischer Apparate und Methoden ist die richtige Scharfstellung des Bildobjektes, das sich im Beobachtungsfeld des optischen Systems befindet, besonders wichtig. Soll mit einem Photometer der Inhalt der in den Zellen vorhandenen Stoffe bestimmt werden, so ist zu beachten, dass eine unrichtige Scharfstellung des Bildes zu Messfehlern führen kann («out of focus error»). Der Messfehler hängt vom Grade der Einstellungsschärfe des Bildes ab und ist bei höheren Extinktionswerten grösser (DAVIES und WALKER<sup>1</sup>, LODIN, PILNY und HARTMAN<sup>2</sup>).

Die Genauigkeit der Einstellung farbiger Objekte wird allerdings von den subjektiven Fähigkeiten des Arbeitenden beeinflusst. Wenn man eine Beleuchtung, deren Wellenlänge ausserhalb des sichtbaren Lichtbereiches liegt, benutzt, ist die richtige Fokussierung schwieriger und eine ungenügende chromatische Korrektion der angewandten Optik kann sich störend bemerkbar machen. In der vorliegenden Mitteilung wird eine Methode beschrieben, die eine genaue Einstellung des Bildes in die Fokus-ebene ermöglicht.

**Beschreibung der vorgeschlagenen Lösung.** Die richtige Fokusebene ist so charakterisiert, dass alle kleinsten Teile, die das optische System unterscheidet, einen maximalen Kontrast ergeben. Die Unterschiede sind am grössten bei einer Wellenlänge mit der maximalen Absorption des Objektes. In unserer Anordnung wird das mit dem Mikroskop vergrösserte Bild des Objektes auf die Projektionsplatte, die mit einer kleinen Öffnung versehen ist, projiziert. Der Durchmesser dieser Öffnung stimmt im wesentlichen mit dem Durchmesser der Photo-

blende des Zytophotometers überein. Hinter dieser Blende befindet sich der Photomultiplier. Den Spannungsabfall (Arbeitswiderstand) des Photomultipliers führen wir über ein spezielles Filter, das die Rauschspannung am Eingang

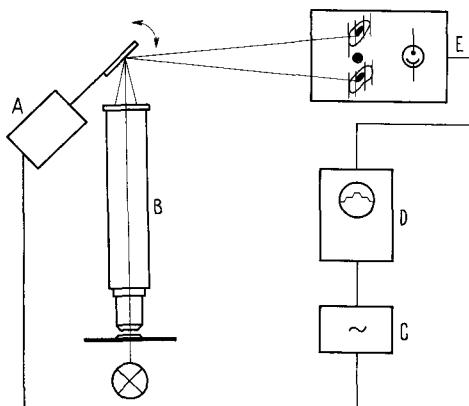


Fig. 2. Blockscheme des angewandten Systems. A, Vibrator mit Spiegel; B, Mikroskop; C, Netztransformator; D, Oscilloskop; E, Schrank mit Photometerblende und Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier).

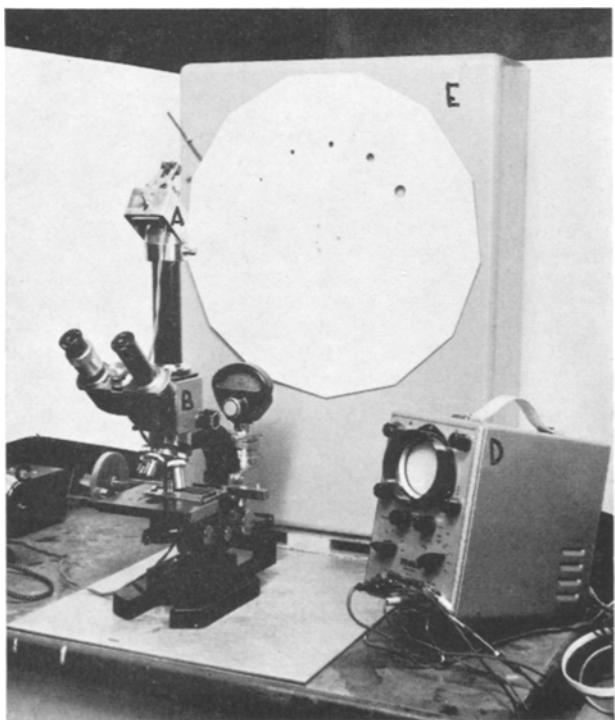


Fig. 1. Gesamtansicht der experimentellen Einrichtung.

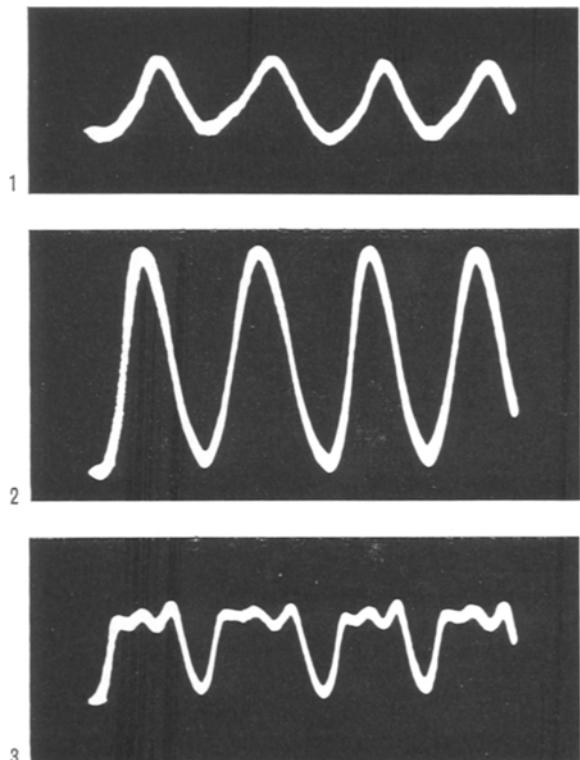


Fig. 3. Oscillogramm der charakteristischen Kurven. 1) entfernt vom Fokus; 2) der Fokus liegt oberhalb der Struktur; 3) die Struktur liegt im Fokus.

<sup>1</sup> H. G. DAVIES und P. M. WALKER, Photogr. J. 90, 13, 92 (1953).

<sup>2</sup> Z. LODIN, J. PILNÝ und J. HARTMAN, Physiologia bohemoslov. 12, 167 (1963).

des Verstärkers des Katodenosiloskopos verkleinert. An der Austrittspupille des Mikroskopprojektivs befindet sich ein kleiner, mit einer Aluminiumoberfläche versehener Spiegel, der an dem von der Netzfrequenz gespiesenem Vibrator befestigt ist. Die Ablenkplatten der Zeitbasis des Oscillographen sind mit derselben Frequenz gespiesen. Durch den Wechselstrom entsteht eine kleine schwingende Bewegung des Spiegels und auch das Bild, das auf die mit der Photometeröffnung versehenen Platte projiziert wird, ist in Schwingung gebracht. Die am Oszillographen gewonnene Kurve zeigt die Unterschiede in der Durchlässigkeit der einzelnen Stellen des Bildes. Bei richtiger Wahl der Wellenlänge des Lichtes werden selbst kleine Unterschiede in der Durchlässigkeit des beobachteten Objektes sichtbar.

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, ist es empfehlenswert, das Köhler-Beleuchtungsprinzip mit einer Leuchtfeldblende von kleinem Durchmesser anzuwenden. Der Durchmesser hängt von der Grösse des Objektes ab, das man einstellt. Das Objekt wird von monochromatischem Licht beleuchtet. Die gewählte Wellenlänge stimmt mit dem Absorptionsmaximum des Objektes überein. Mit Hilfe der beschriebenen experimentellen Methode wurden eine Reihe von Messungen an verschiedenen Objekten durchgeführt (mikroskopische Schnitte von 3, 5, 10, 20 und 30  $\mu$  Dicke, ferner isolierte Kerne und Zellen). Das auf diese Weise eingestellte Objekt kann besser eingestellt werden, als dies bei der üblichen Art der Fall ist. Interessant ist die Veränderung des Kurvenbildes auf dem Oscillographen, wenn das Objekt von der Fokusebene nach oben oder nach unten entfernt wird. Bei isolierten Objekten (Zellen und Kernen) oder bei Objekten, deren Absorption sich merklich von ihrer Umgebung unterscheidet, lassen sich drei Ebenen unterscheiden: eine

obere, ferner die Ebene der optimal scharfen Einstellung und eine untere Ebene. Da die Dicke des gemessenen Objektes von der Distanz der oberen und unteren Fokusierungsebene bestimmt wird, kann diese Tatsache zur Bestimmung der Dicke ausgenutzt werden. Die Bestimmung der oberen und unteren Fläche des Präparates mittels der üblich angewandten Fokusierungsmethode ist meist ungenau und weist beträchtliche subjektive Fehler auf. Wir haben mit Erfolg die vorgeschlagene Methode zum Beispiel bei Bestimmung der Dicke von mit Feulgenreaktion gefärbten Kernen in Leberschnitten angewandt (LODIN et al.<sup>3</sup>). Die beschriebene Einrichtung kann leicht in ein Zytophotometer eingebaut werden.

*Summary.* A method is described which enables the observed picture to be focused objectively. The validity of the method was tested by focusing the picture which appears in the field of the microscope. The significance of the device consists in the possibility of using it for cytophotometric purposes. The construction allows it easily to become part of the cytophotometer set.

J. PILNÝ, Z. LODIN  
und J. HARTMAN

*Physiologisches Institut, Abteilung Zytphysiologie und  
Histochemie der Nervenzelle,  
Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften,  
Prag (ČSSR) 11. Juni 1965.*

<sup>3</sup> Z. LODIN, J. PILNÝ, V. NOVÁKOVÁ, J. HARTMAN und F. MED,  
Act. histochem., Suppl. VI, 215 (1965).

## Kryostatschnittechnik für natives Pflanzengewebe

Histochemische Untersuchungen an Pflanzengewebe gewinnen in den letzten Jahren immer mehr an Interesse<sup>1</sup>. Wesentlich ist eine geeignete Präparations- und Schnitttechnik. Die Anwendung der für tierisches Material viel gebrauchten Kryostatmethode auf Pflanzengewebe blieb bis jetzt beschränkt. CHAYEN et al.<sup>2</sup> gelang es, brauchbare Kryostatschnitte nach Vorbehandlung mit PVA herzustellen. Eine Einbettung in Gelatine führte ebenfalls zum Erfolg<sup>3</sup>. Die Herstellung von Kryostatschnitten von nativem Pflanzenmaterial verlief jedoch nur für stark verholzte Gewebe erfolgreich<sup>4</sup>.

Eine Einbettung in Gehirn verhindert das Zerreissen der Pflanzengewebe während des Einfrierens und Schneidens; die Gewebe bleiben bei raschem Arbeiten nativ.

*Methode.* Natives Pflanzengewebe wird in Gehirnsubstanz eingebettet. Es wurde immer frisches Gehirn von Laboratoriumstieren, meistens von Ratten, verwendet. Das Gehirnstück soll so eingeschnitten werden, dass das Pflanzengewebe allseitig eingebettet werden kann. Der Gewebeblock wird sofort auf einen Mikrotomtisch eines Kryostaten (System *Dittes-Duspiva*) gebracht und mit Kohlensäure in wenigen Sekunden auf etwa -80 °C eingefroren. Nach Einschleusen in den Kryostaten muss zur Einstellung des Gewebes auf die Kryostattemperatur etwa 1 h bis zum Schneiden gewartet werden. Die Güte

der Schnitte ist von der Kryostattemperatur und der Schnittdicke abhängig. Die optimalen Bedingungen müssen jeweils empirisch bestimmt werden. Eine wichtige Rolle spielt der Wassergehalt der Gewebe. Im allgemeinen müssen wasserreiche Gewebe bei höheren Temperaturen geschnitten werden als solche mit niedrigem Wassergehalt. Für verschiedene vegetative Pflanzengewebe liegen die optimalen Kryostattemperaturen bei -12° bis -18 °C, die optimalen Schnittdicken betragen 12-24  $\mu$ .

Die Schnitte werden im Kryostaten durch vorsichtiges Antauen auf Deckgläser aufgezogen und etwa 2 h zum Sublimieren des Eises im trockenen Kryostatraum gelassen. Wegen des Auftretens von Rissen und auch von Kondenswasserartefakten<sup>5</sup> dürfen die Schnitte nicht sofort auf Raumtemperatur gebracht werden, sondern sie werden in einen mit Trockeneis und Trocknungsmittel (Silikagel) beschickten Behälter, z.B. aus Styropor, eingeschleust. Nach Verdampfen des Trockeneises erwärmen

<sup>1</sup> W. A. JENSEN, *Botanical Histochemistry* (Freeman, San Francisco 1962).

<sup>2</sup> J. CHAYEN, G. J. CUNNINGHAM, P. B. GAHAN und A. A. SILCOX, *Nature* 186, 1068 (1960).

<sup>3</sup> M. FRIED und A. H. FRANKLIN, *Nature* 189, 414 (1961).

<sup>4</sup> G. M. WEAVER und R. E. C. LAYNE, *Canad. J. Bot.* 43, 478 (1965).

<sup>5</sup> W. MEIER-RUGE, F. KALBERER und J. GRAUWILER, *Klin. Wschr.* 42, 1024 (1964).