

LABO 7-8/2019

Juli/August 2019

www.labo.de

50 Jahre
LABO



Richtig bewegt: Was bei der Auswahl von Proben-tischen und Objektivscannern zu berücksichtigen ist

Seite 8

**SCHWER-
PUNKT:**
AUTOMATION /
ROBOTIK

**LIFE
SCIENCES:**
AUTOANTIKÖR-
PER-BASIERTE
DIAGNOSTIK

UMWELT:
SOP FÜR DIE
BODENANALYTIK

**Polymer-
Analytik**
GPC meets PVC

Richtig bewegt

Was bei der Auswahl von Proben-tischen und Objektivscannern zu berücksichtigen ist



Wann immer über Mikroskopie gesprochen wird, stehen Hochleistungsobjektive, ausgeklügelte Beleuchtungssysteme und -methoden sowie die Probenpräparation im Mittelpunkt. Für gute Arbeitsergebnisse sind aber auch Module zur Proben- und Objektivbewegung wichtig. Denn so, wie man ohne Reifen nicht ein einziges PS auf die Straße bekommt, können Anwender von Mikroskopen keine aussagekräftigen Bilder ohne präzise Proben- oder Objektivbewegung erstellen. Vor der Auswahl von Proben-tischen und Objektivscannern lohnt es sich daher, die entsprechenden Anforderungen der geplanten Experimente zu analysieren.

Folgende Fragen sind entscheidend: In welchen und in wie vielen Achsen wird die Probe bewegt? Welche Stellwege sind gefordert? Soll für die Z-Fokussierung die Probe bewegt werden oder das Objektiv? Wie lauten die Anforderungen an die Positioniergenauigkeit für die jeweiligen Bewegungsachsen? Können diese mit einem System abgedeckt werden, oder ist eine Kombination von Tischen für die Grob- und die Feinpositionierung erforderlich? Weitere Aspekte sind u. a. die geometrischen Abmessungen von Proben-tischen, die Lärmbelastung durch den Antrieb oder die Verfügbarkeit von Haltern für Einsätze.

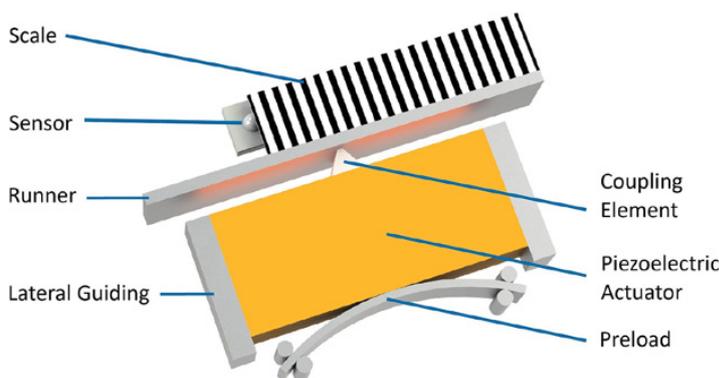


Bild 1: Das Prinzip des Ultraschallmotors. © PI

Weitfeldmikroskopie

Eine der häufigsten Anwendungen von Weitfeldmikroskopen ist die Analyse von Gewebeproben. Die laterale Auflösung des Mikroskops liegt beugungsbegrenzt in der Größenordnung von ≥ 250 nm. Um interessante Probenstellen jederzeit schnell, sicher und ohne Blinken wieder anfahren zu können, muss die bidirektionale Wiederholgenauigkeit des Proben-tischs um mindestens den Faktor 2,1 besser sein als die Auflösung, sie muss also bei rund 100 nm liegen. Piezoultraschalltische können diese Anforderung erfüllen.

Die Z-Positionierung im Weitfeldmikroskop erfolgt idealerweise über einen Objektivscanner, da oft große Stellwege von 100 – 400 μ m mit einer bidirektionalen Wiederholgenauigkeit von 200 nm benötigt werden. Kurze Einschwingzeiten von 20 ms helfen, einen optimalen Workflow aufrechtzuerhalten. Piezobasierte Objektivversteller leisten sogar Auflösungen bis zu 5 nm.

Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie bezeichnet zahlreiche Mikroskopie-Varianten bis hin zu Superresolution. Jede stellt ihre eigenen Anforderungen an die Probenbewegung. Beispiel: die TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy). Hier trifft der anregende Laserstrahl nicht orthogonal auf das zu untersuchende Präparat, sondern in einem flachen Winkel. Dadurch werden nur die dicht an der Oberfläche liegenden Moleküle zur Fluoreszenz angeregt, was eine verbesserte Z-Auflösung ermöglicht (100 – 200 nm im Vergleich zu ca. 500 nm anderer Mikroskopietechnologien). Um diese Auflösung nutzen zu können, ist eine entsprechend präzise Positionierung der Probe in Z-Richtung erforderlich. Hierfür bieten sich Einsätze im Mikroskoptisch an, die nicht nur lateral eine Positioniergenauigkeit von unter 100 nm bieten, sondern auch in Z-Richtung. So kann das

volle Potenzial dieser Technologie genutzt werden. Ein Beispiel dafür ist das GATTAScope, ein Open-source Projekt von GATTaquant zur TIRF-Mikroskopie.

Lichtblattmikroskopie

Auch die Lichtblattmikroskopie (LSFM = Light Sheet Fluorescence Microscopy) gehört zur Gruppe der Fluoreszenzmikroskope. Hier werden der Beleuchtungs- und der Beobachtungsstrahlengang auf zwei orthogonal zueinander angeordnete Optiken aufgeteilt. Der Laserstrahl zur Probenbeleuchtung wird in eine Ebene aufgefächert und bildet einen optischen Schnitt („Lichtblatt“), der eine dünne Schicht innerhalb der Probe ausleuchtet. Das dort emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv erfasst und detektiert. Im Vergleich zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie belastet dieses Verfahren die Probe wesentlich weniger mit Licht. Das prädestiniert die LSFM dafür, lebende Organismen zu untersuchen. Für die Analyse hochdynamischer Prozesse, wie die embryonale Morphogenese, wird diese Technologie eingesetzt. Dafür werden in der Regel Z-Stacks mit einer Dicke von mehreren hundert Mikrometern mit Bildraten von > 100 Bildern pro Sekunden erzeugt. Je nach Aufbau des Mikroskops wird dafür entweder das Objektiv bewegt, oder die Probe wird mittels Linearverstellern auf- und abgefahren. Diese Methode nutzen die Systeme des Flamingo-Projekts von Prof. Jan Huisken und seinem Team am Morgridge Institute for Research (USA). Zusätzlich werden in diesen Systemen die Proben auch gedreht; hier finden Drehtische auf Basis von Ultraschall-Piezomotoren Einsatz. Geschwindigkeit und Gleichmäßigkeit der Bewegung sind hier entscheidend.

Piezomotortische bieten zahlreiche Vorteile

Für die Bewegung von Proben und Objektiven gibt es verschiedene Antriebssysteme – neben Spindel/Motor-Kombinationen und Linearmotoren sind häufig Ultraschall-Piezomotoren im Einsatz. Deren Funktionsprinzip ist einfach: Ein Piezoaktor wird mittels eines Kopplungselements gegen einen beweglichen Läufer vorgespannt. Hochfrequente Wechselspannung versetzt den Aktor in Schwingungen mit bis zu 200 kHz. Die Deformation des Aktors führt zu einer periodischen Bewegung des Kopplungselements zum Läufer. Je Zyklus beträgt der erzeugte Vorschub wenige Nanometer, die hohen Frequenzen führen zu den hohen Geschwindigkeiten. Auch große Stellwege sind hiermit einfach realisierbar (Bild 1).

Dieses Prinzip vereint mehrere Vorteile in sich: Die Motoren sind sehr flach, was bei inversen Mikroskopen mit beengten Platzverhältnissen unabdingbar ist, damit die Probe im Fokusstellbereich des Mikroskops bleibt. Außerdem sind Ultraschall-

motoren nahezu geräuschlos – wichtig in Laboren mit mehreren Mikroskopen. Ultraschalltische erlauben zudem eine gleichmäßige, ruckelfreie Bewegung, sowohl bei Langsamfahrten als auch beim Anfahren definierter Probenstellen mit hohen Geschwindigkeiten. Schaltet man die Tische stromlos, halten sie aufgrund der Selbsthemmung ihre Position. Piezomotoren zeichnen sich zudem durch hohe Zuverlässigkeit und Lebensdauer aus (Bild 2).

Die Piezotechnologie kann auch direkt genutzt werden. Die Ausdehnung des Piezokristalls aufgrund des Anlegens einer elektrischen Spannung ermöglicht hochpräzise Bewegungen mit Auflösungen im Sub-Nanometerbereich, höchstauflösende Stellwege von bis zu 300 µm, mit Hebelübersetzung sogar bis zu 2 mm, werden so möglich.



Bild 2: Der für inverse Mikroskope mehrerer Hersteller geeignete U-780 Kreuztisch von PI basiert auf der Piezomotortechnologie. Er bietet, modellabhängig, Stellwege bis zu 135x85 mm, die Bauhöhe liegt zwischen 31mm und 48mm. © PI

Von großer Bedeutung ist übrigens auch, ob alle benötigten Einsätze – von Haltern für Petrischalen, Well-Plates und Slides bis hin zu applikationsspezifischen Einsätzen – mechanisch zum Mikroskoptisch passen. Und nicht zuletzt spielt die Softwareanbindung eine Rolle. Kompatibilität zu Bediensoftware von Mikroskopen und den wichtigsten Programmiersprachen sollte gegeben sein.

Fazit

Um aus dem großen Angebot an Probenstischen und Objektivscannern für die Mikroskopie eine optimale Auswahl zu treffen, sollten Anwender im Vorfeld die Randbedingungen der Aufgabe detailliert klären. Es lohnt sich, hier Zeit und Arbeit zu investieren, um gute Arbeitsergebnisse zu erzielen.

AUTOREN

Dr. Thomas Bocher

Head of Segment Marketing/
Microscopy & Life Sciences

Markus Wiederspahn

Global Campaign Manager /
Marketing & Communications
Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG
