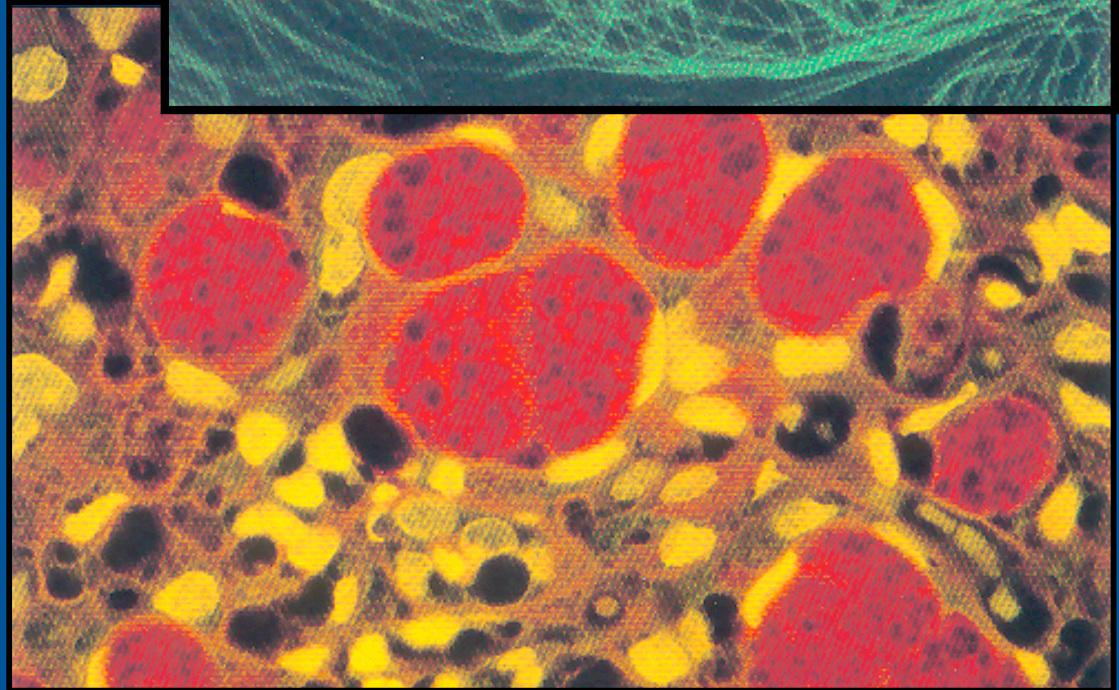
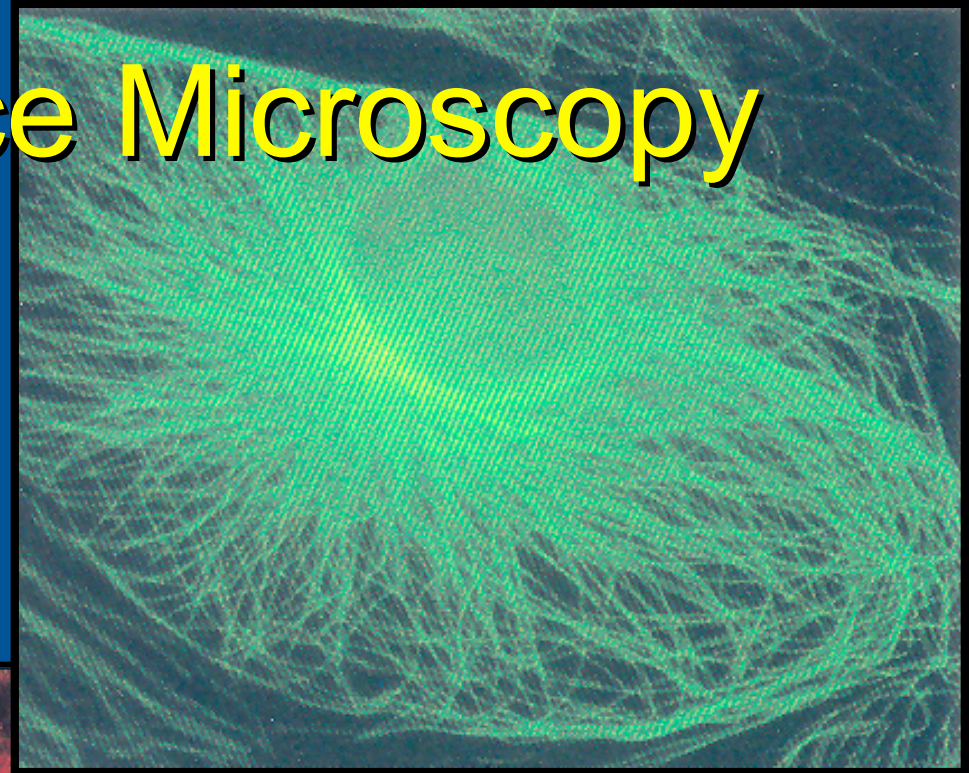
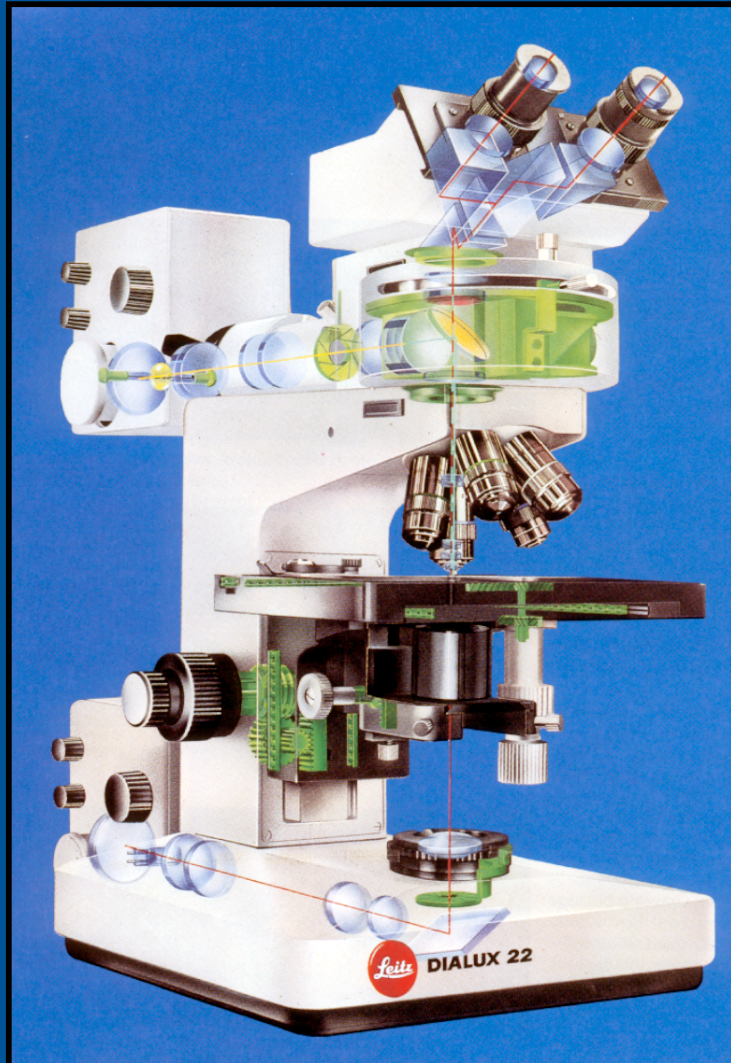
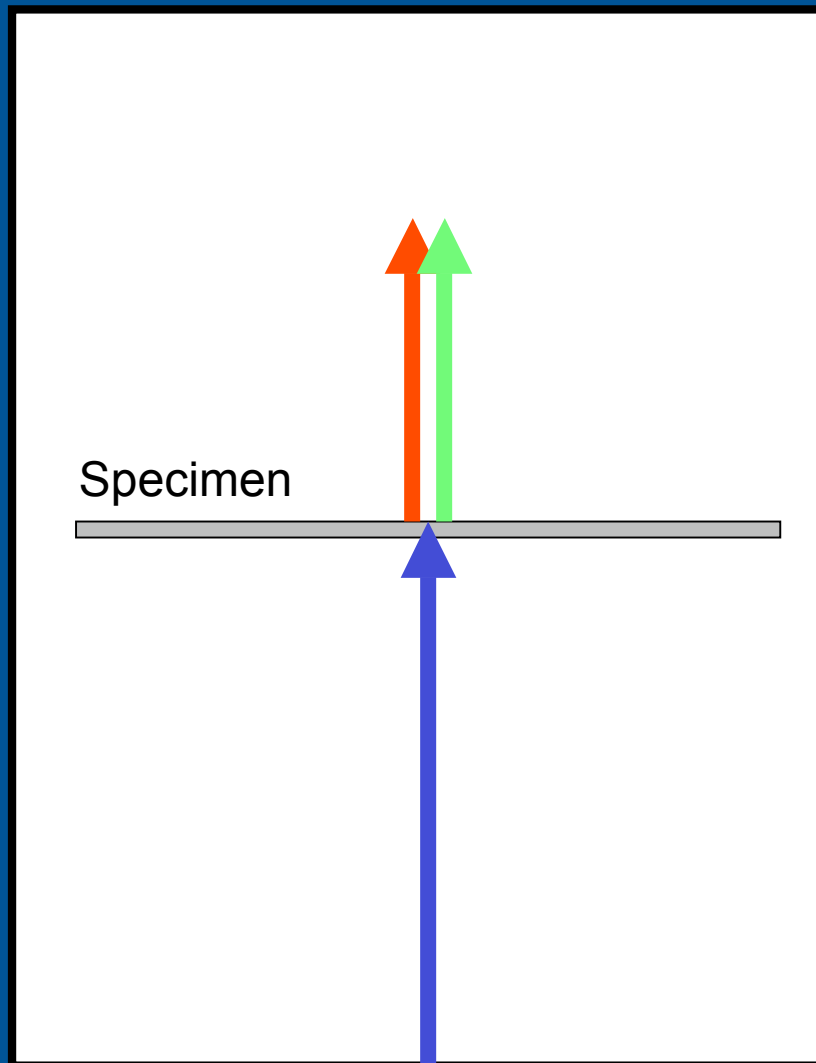


Fluorescence Microscopy



Fluorescence

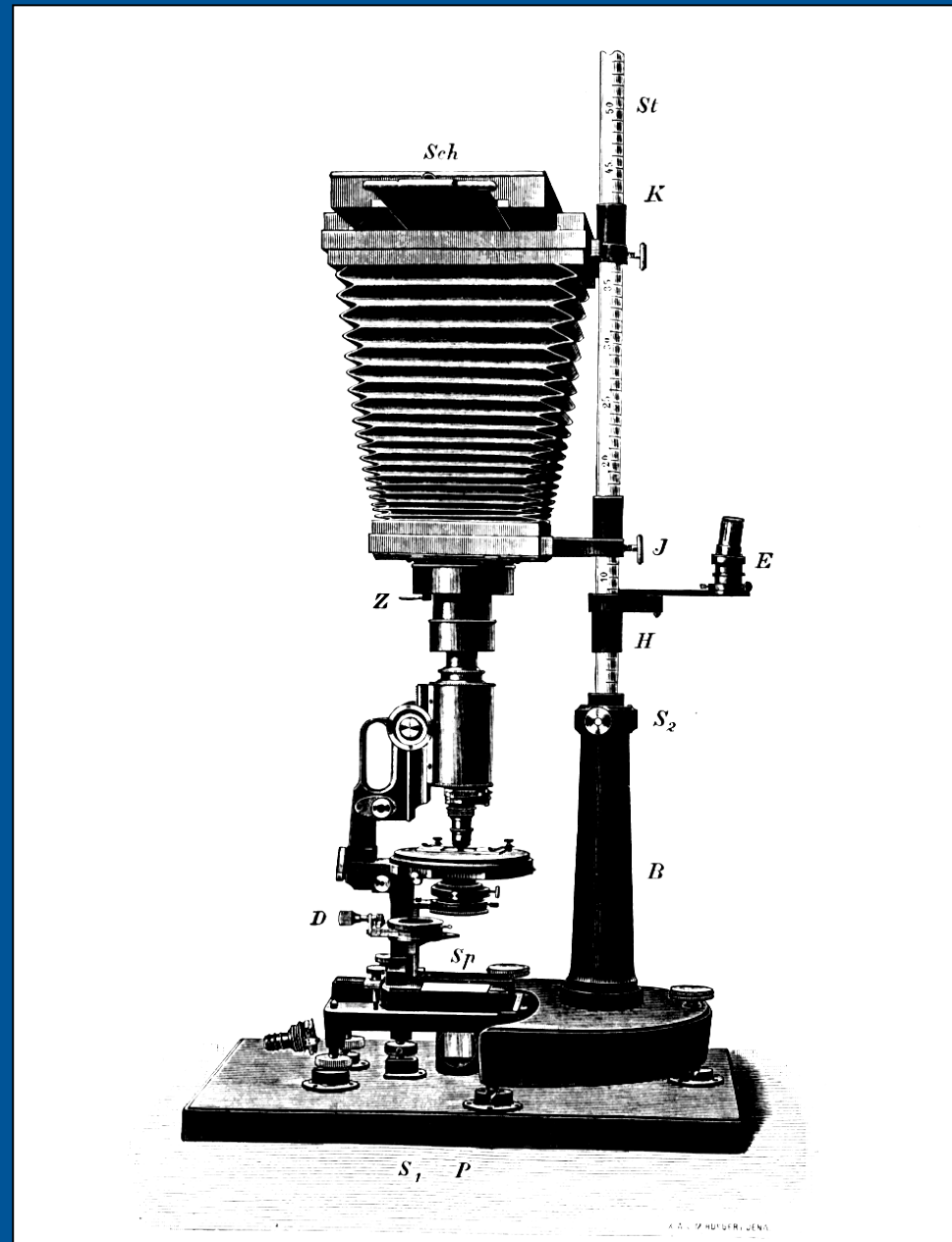


Longer wavelength
lower energy
radiation emitted

Short wavelength
high energy
radiation absorbed

The earliest Fluorescence Microscope?

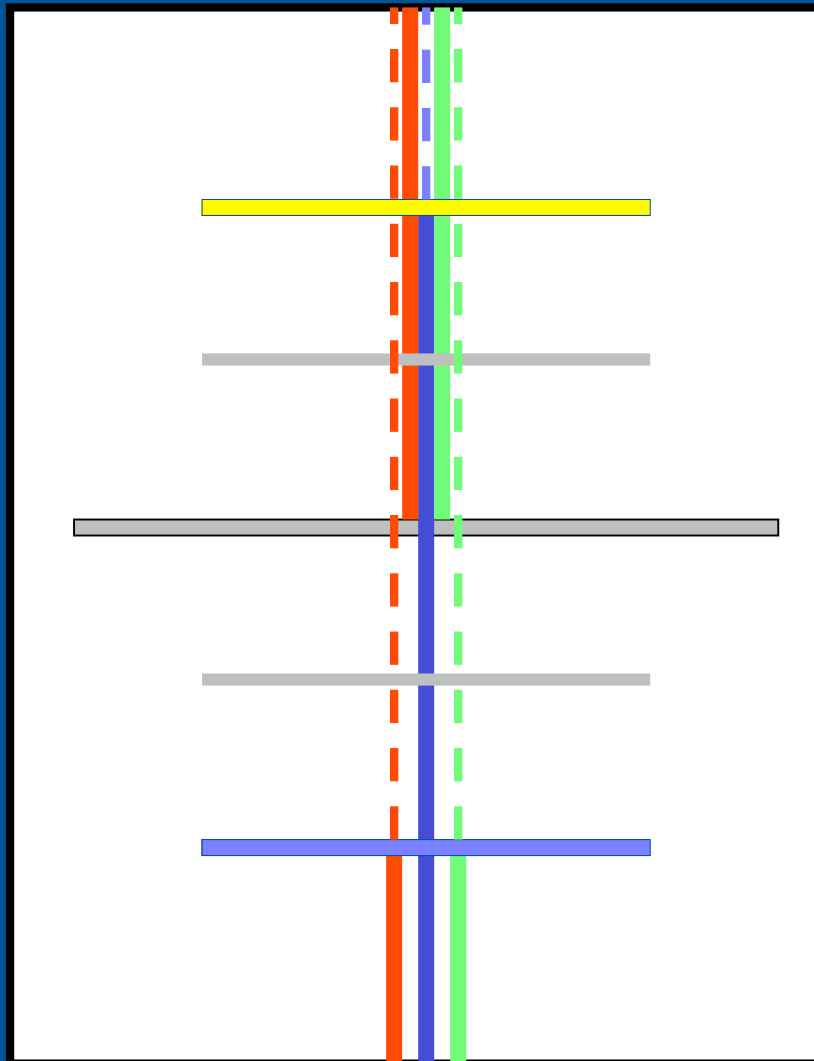
August Köhler
1904



Köhler's discovery of Fluorescence Microscopy in 1904

Bei der intensiven Bestrahlung mit ultraviolettem Licht fangen die meisten Objekte selbst zu fluoreszieren an, z. T. so stark, daß man sie noch bei ihrem eignen Fluoreszenzlicht beobachten kann, wenn man das Mikroskop sogar mit einem starken achromatischen oder apochromatischen System und einem entsprechenden Okular versieht. Dieses vom Objekt ausgehende Fluoreszenzlicht tritt natürlich auch durch die Monochromate und Quarzokulare hindurch und zugleich mit dem ultravioletten Licht in den Sucher ein. Es wird sogar die Austrittspupille des ganzen Mikroskops (der sog. Augenpunkt) für dieses Fluoreszenzlicht nahezu mit dem für das ultraviolette Licht zusammenfallen. Ein scharfes Bild des Objekts wird allerdings von diesem Licht nicht erzeugt werden, weil die Monochromate, von der chromatischen Unterkorrektur ganz abgesehen, auch keine sphärische Korrektur in diesem Bereich des Spektrums aufweisen, es führt aber eine starke Erhellung des ganzen Sehfeldes herbei, die bei der Verwendung des Suchers die deutliche Wahrnehmung des Bildes auf der Uranglasplatte *F1* verhindern würde.

Transmitted light bright-field



Fluorescence + background

Barrier filters are imperfect

Objective lens

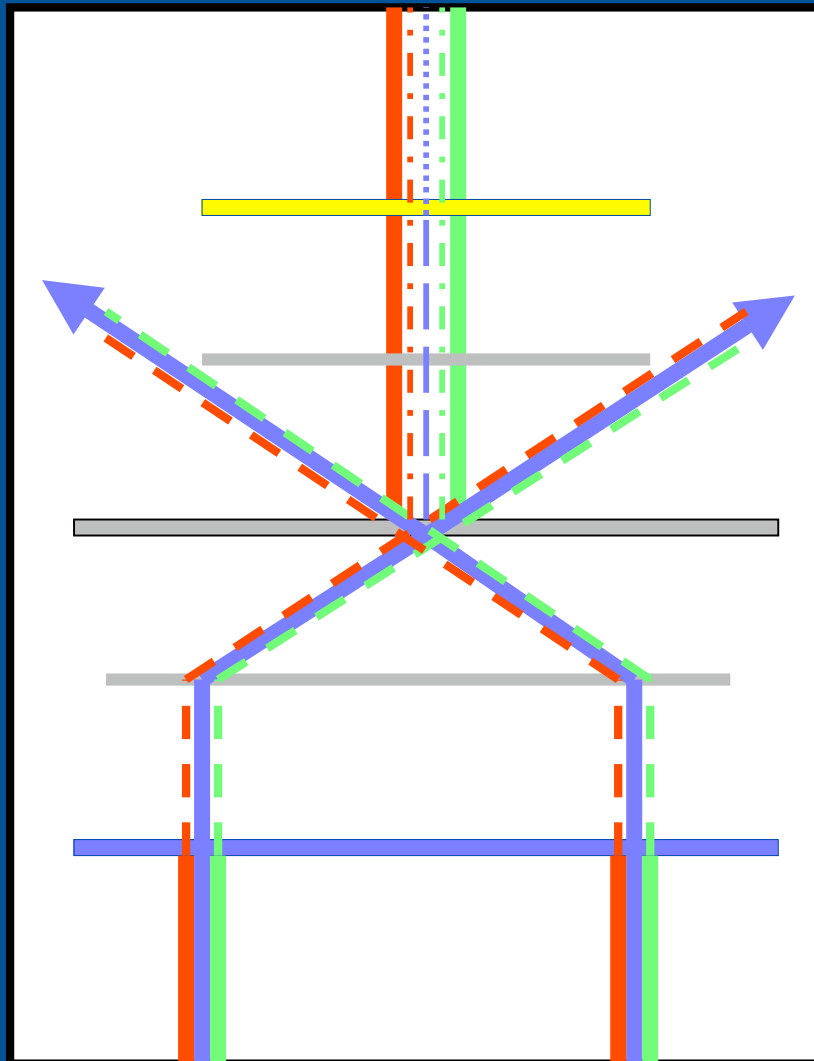
Specimen

Condenser lens

Exciter filters are imperfect

White light

Transmitted light dark-field



Fluorescence + reduced background

And the (imperfect) barrier filter passes some of this

Objective lens

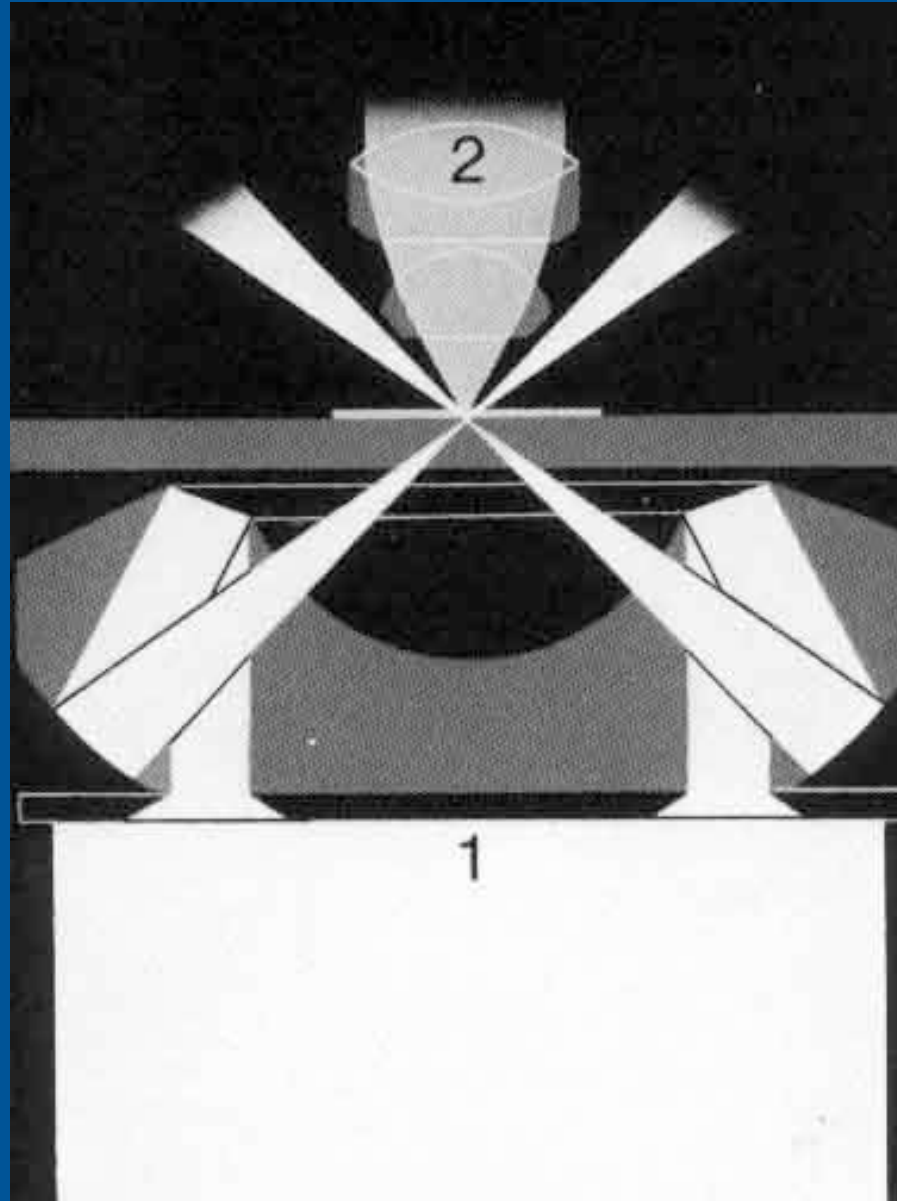
The specimen scatters light into the objective lens

Dark-field condenser

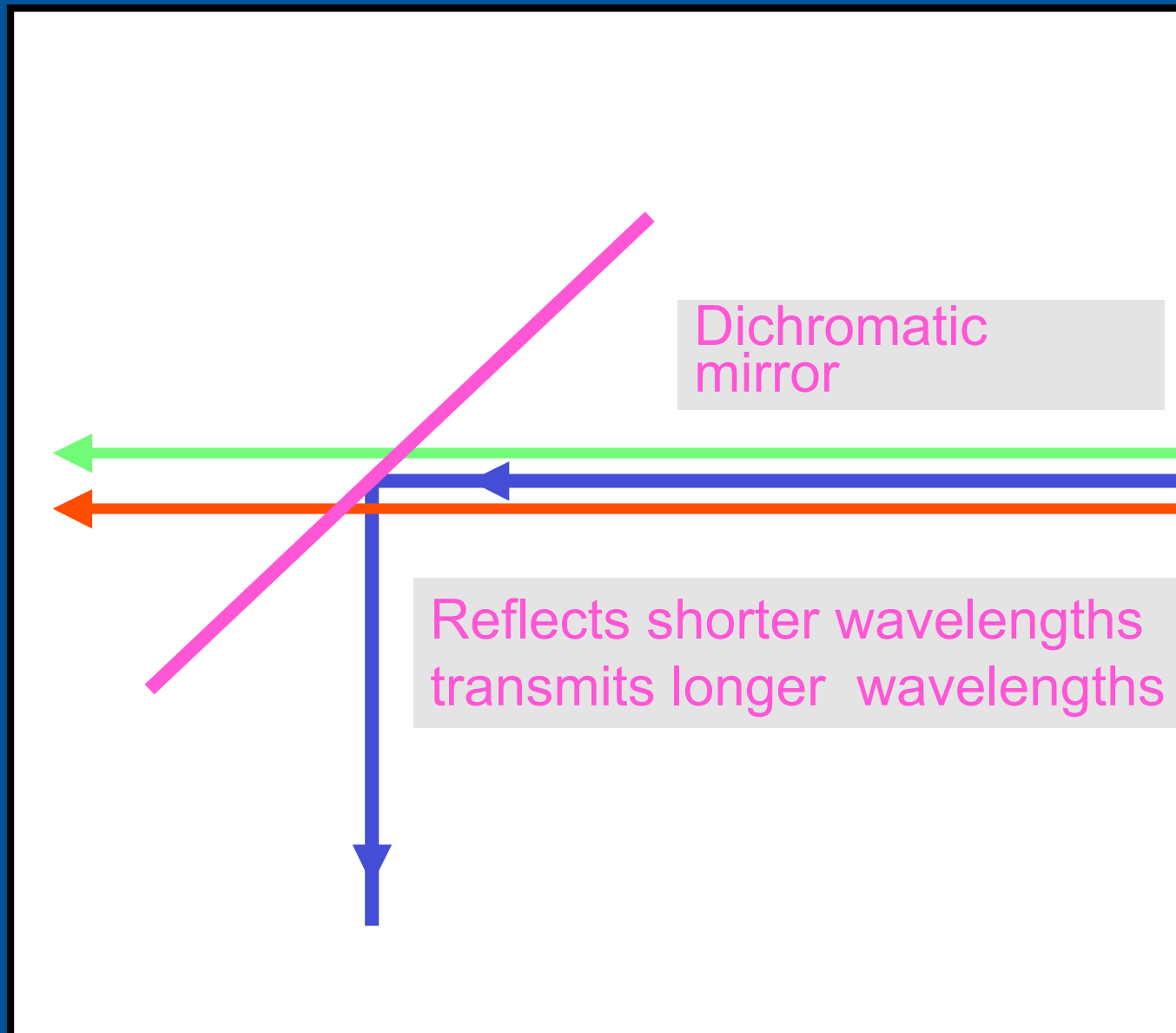
Exciter filters are imperfect

White light

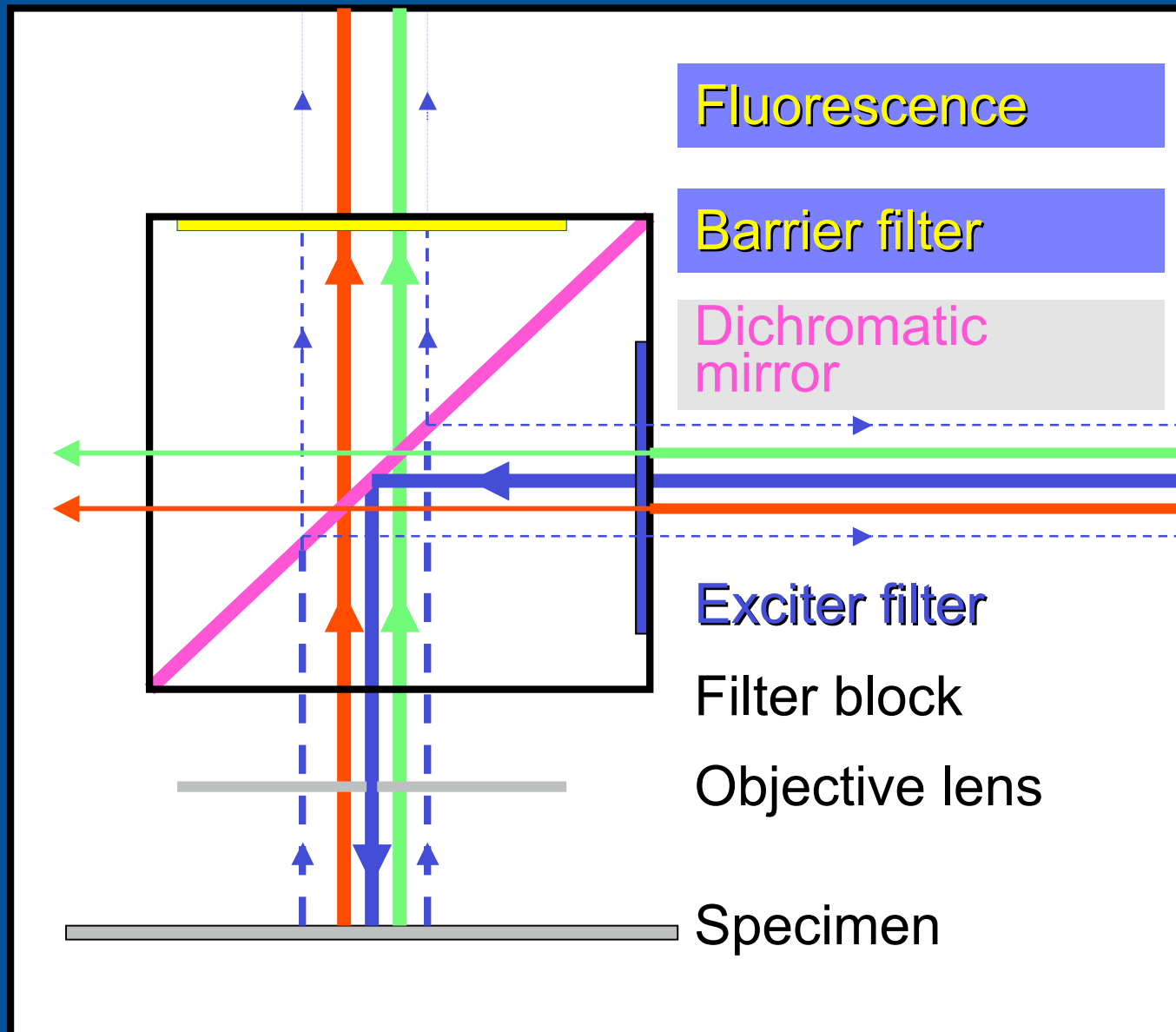
Transmitted light dark-field



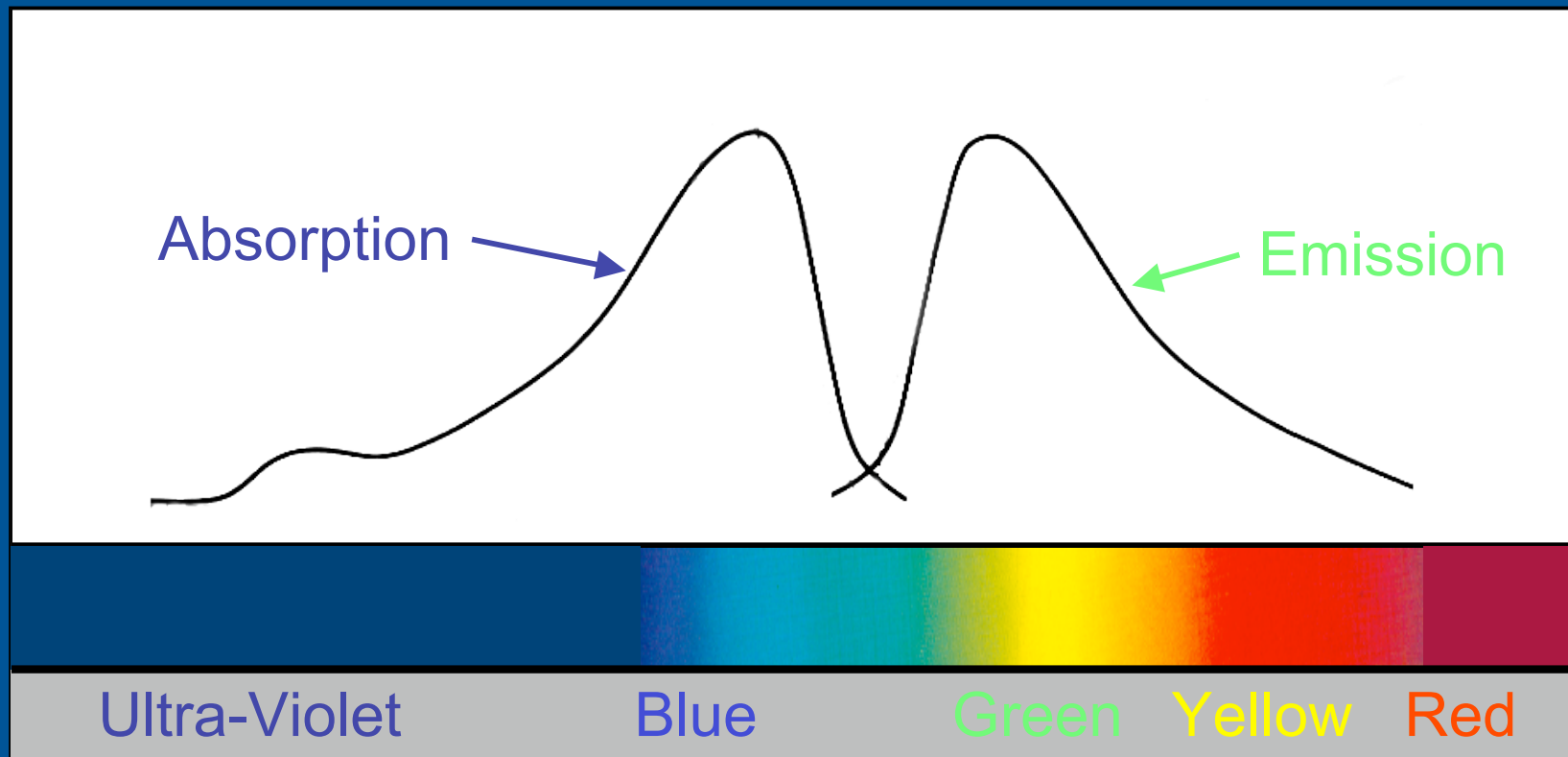
The dichromatic mirror



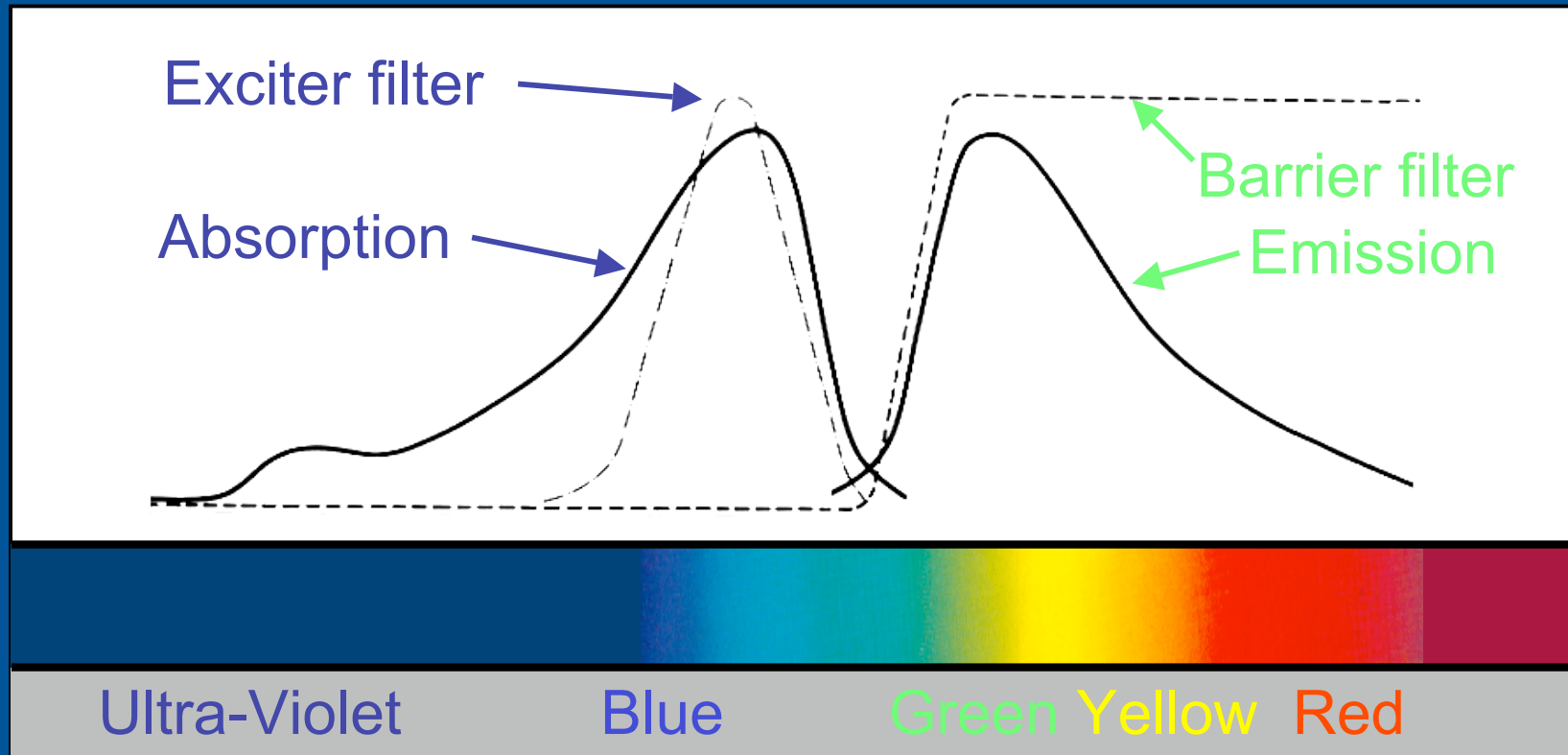
Epi-fluorescence



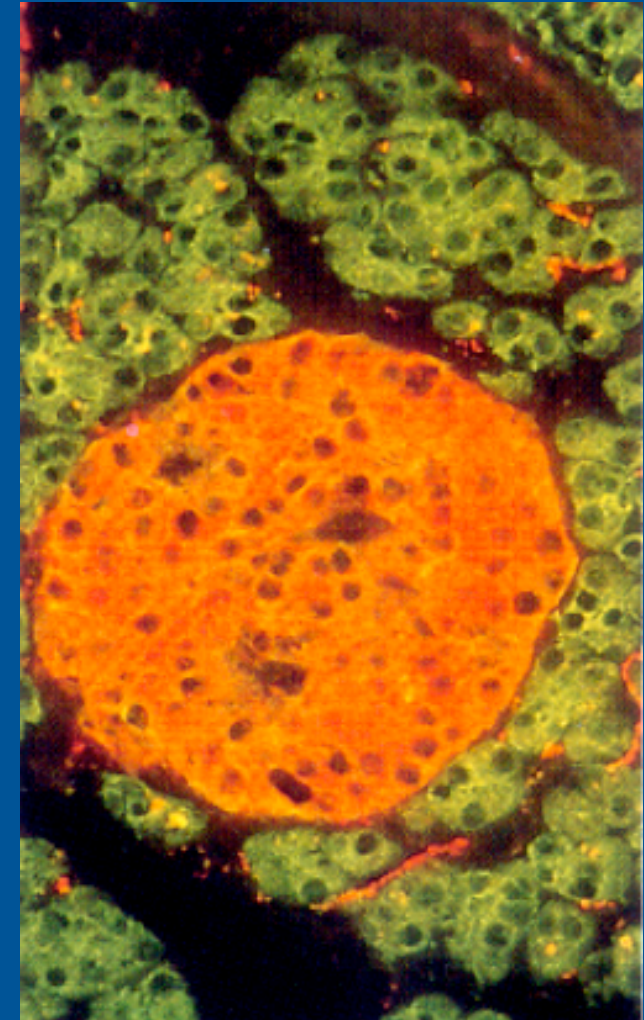
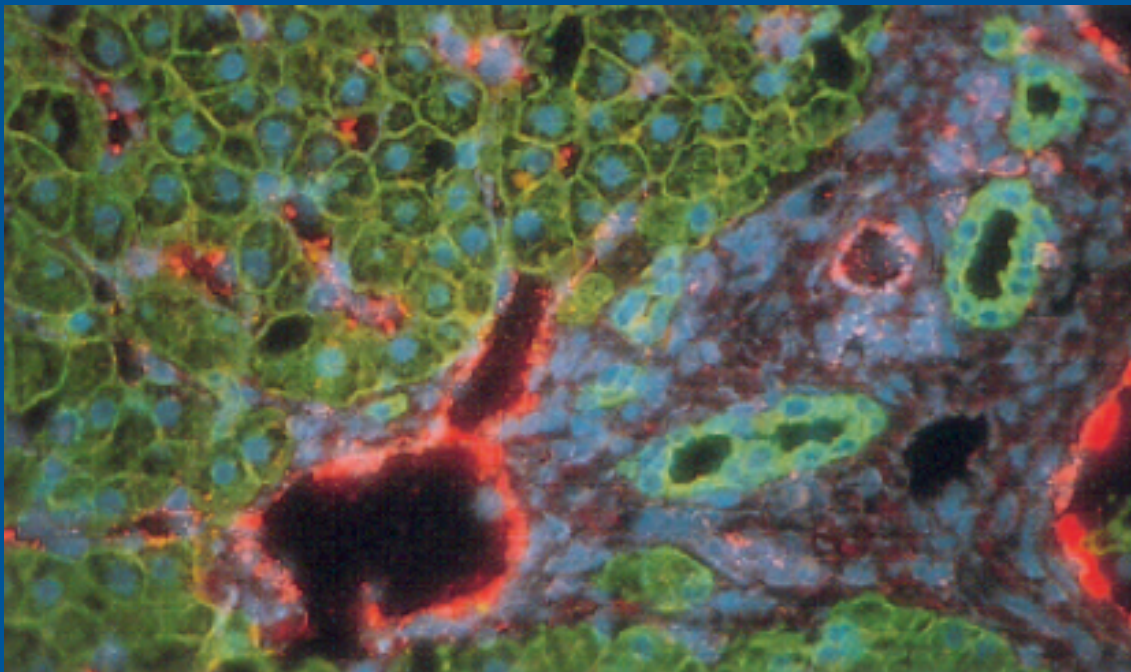
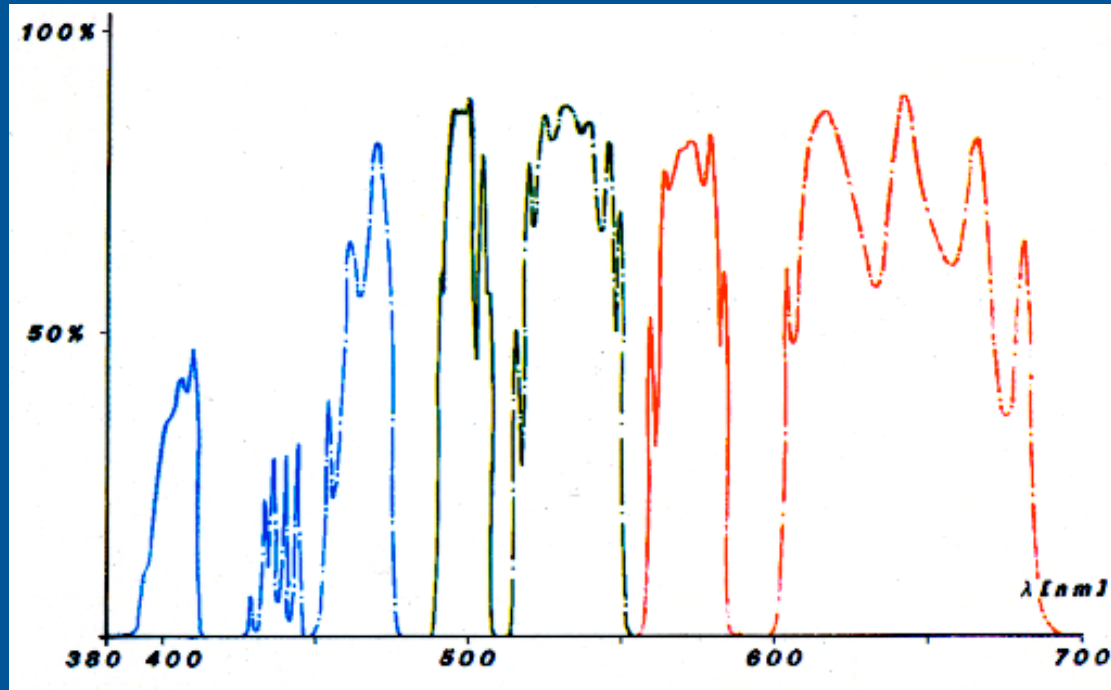
Absorption and emission spectra



Exciter and Barrier filters



Multiple-excitation filters



Fluorescence Microscopy

