

# Elektronenmikroskopischer Kurs

20.-26.9.2006  
Dr. Golecki



Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg

# **Inhaltsverzeichnis**

	Seite
1. Auflösung	3
2. Elektromagnetische Linsen	3
3. Aufbau eines Elektronenmikroskops	4
4. Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	4
4.1 Grids	5
4.2 Folien-Beschichtung	5
4.3 Vakuumpumpen	5
4.4 Fixierungen	6
4.5 Einbettungen	6
4.6 Ultramikrotomie	7
4.7 Kontrastierungen	8
4.8 Nachweismethoden	8
4.9 Metall-Bedampfung	9
4.10 Autoradiographie	9
5. Rasterelektronenmikroskopie (REM)	10
5.1 Kritische Punkt-Trocknung und Sputtern	10
6. Raster-Tunnel-Mikroskopie	11
7. Abbildungsfehler	11
8. Cryo-Methoden	12
9. Analytische Elektronenmikroskopie	12
10. Elektronenmikroskopische Tomographie	13
11. Artefakte	14
12. Aussichten	14

## 1. Auflösung

Das „unbewaffnete Auge“, also Auge ohne technische Hilfsmittel wie Vergrößerungslinsen einer Brille kann auf eine Bezugssehweite von 25 cm eine Punktauflösung von ca. 0,07 mm erreichen. Das heißt es können zwei in diesem Abstand von einander liegende Punkte getrennt wahrgenommen werden. Mithilfe eines Lichtmikroskops lässt sich diese Auflösung bis etwa auf 0,2  $\mu\text{m}$  verbessern.

Dabei ist das Auflösungsvermögen  $d$  abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$  und der Apertur  $A$ . Die Grenze des Auflösungsvermögens bei Lichtmikroskopen ist von der Wellenlänge des sichtbaren Lichts abhängig. Bei einem Elektronenmikroskop werden statt Lichtstrahlen Elektronen verwendet, die eine kürzere Wellenlänge besitzen. Deshalb kann damit eine bessere Auflösung erzielt werden. Die Grenze liegt hier bei ca. 0,1 nm = 1 Å (Ångström).

Die Wellenlänge des Elektrons ergibt sich folgendermaßen:

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

$h$  = Plancksches Wirkungsquantum

$m$  = Masse des Elektrons

$v$  = Geschwindigkeit des Elektrons

Das bedeutet, dass die Wellenlänge direkt abhängig ist von der Geschwindigkeit des Elektrons. Diese lässt sich mit der an das Elektronenmikroskop angelegten Spannung variieren, wobei höhere Spannung zu höheren Geschwindigkeiten und damit zu kürzeren Wellenlängen führt.

$$\lambda = \frac{1,2}{\sqrt{U_0}}$$

$U_0$  = angelegte Hochspannung

So ergeben z.B. 100 kV eine Wellenlänge von 0,0038 nm. Im Gegensatz zum Lichtmikroskop, wo die Wellenlänge auch der tatsächlichen Auflösungsgrenze praktisch entspricht, verschlechtert sich die Auflösung im Elektronenmikroskop durch Aberrationen der Bauteile auf die oben genannten 0,01 nm.

## 2. Elektromagnetische Linsen

Elektronen, die im rechten Winkel in ein Magnetfeld eintreten, werden auf eine Kreisbahn gelenkt, die von Masse und Geschwindigkeit des Elektrons sowie der Feldstärke des Magnetfeldes abhängt.

Dieser Effekt wird verwendet um in einem Elektronenmikroskop die von einer Elektronenquelle freigesetzten Elektronen zu bündeln und auf das Objekt auszurichten. Heute werden im Gegensatz zu früher keine Dauer- sondern Elektromagneten verwendet, die über Spannung regulierbar sind.

Durch den so genannten Polschuh wird das Magnetfeld auf einen engen Raum konzentriert und es entsteht eine hohe Magnetfelddichte. Dabei gilt je mehr Spannung angelegt wird, desto größer ist die Brechung der elektromagnetischen Linse.

### 3. Aufbau eines Elektronenmikroskops

Der Aufbau entspricht in seinen groben Zügen dem eines Lichtmikroskops, wobei die Lichtquelle jedoch durch eine Elektronenquelle ersetzt ist.

Im so genannten Strahlkopf befindet sich eine Kathode aus der durch Anheizung Elektronen austreten. Dabei werden Temperaturen von über 2000°C erreicht. Durch diese Glühemission freigesetzte Elektronen werden durch die angelegte Spannung in Richtung der Anode gezogen und erfahren dabei eine hohe Beschleunigung.

Um die Elektronen nur zielgerichtet zur Anode zu beschleunigen, befindet sich die Kathode in einem Wehnelt-Zylinder, der eine negative Vorspannung besitzt, so dass sich die Elektronen zu einer Raumladungswolke verdichten. Durch Änderung der Spannung kann die Intensität des Strahls beeinflusst werden.

Verwendet werden Haarnadelkathoden, die billig sind und eine lange Haltbarkeit aufweisen, jedoch nur eine geringe Leuchtdichte erzeugen. Besser geeignet sind Spitzenkathoden, die einen kleineren Austrittsbereich besitzen und damit einen besseren Elektronenstrahl erzeugen können. Noch heller und feiner sind Lanthanhexaborid-Kathoden, die jedoch teurer sind und eine wesentlich kürzere Lebensdauer haben.

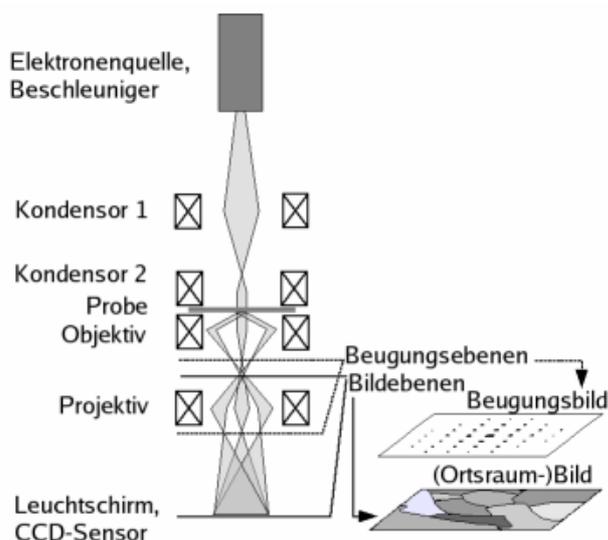
An der Anode wird eine Spannung von meist 40-100 kV angelegt.

Im Tubus wird ein Hochvakuum erzeugt, so dass ein Druck von ca.  $10^{-8}$  Torr - entspricht ca.  $1,3 \cdot 10^{-11}$  bar – entsteht. Theoretisch sollen die Elektronen auf ihrem Weg nur auf das Objekt treffen und nicht auf ablenkende Gasmoleküle.

Weitere Bestandteile des Elektronenmikroskops sind die Kondensoren, die die Strahlung auf das Objekt fokussieren, Linsensysteme nach dem Objekt, die für eine Nachvergrößerung sorgen sowie Blenden, die gestreute Elektronen ausfiltern und den Kontrast erhöhen.

Das Problem bei biologischen Präparaten liegt in den nur wenig streuenden Materialien aus denen die Proben bestehen (C, H, O...). Daher ergeben sich nur kontrastarme Bilder, die verbessert werden können durch den Einsatz von Blenden sowie einer Kontrastierung des Objekts z.B. durch Färbung.

### 4. Transmissionselektronenmikroskop (TEM)



Quelle: Wikipedia

Das TEM ist im Gegensatz zum Rasterelektronenmikroskop (REM) für die Betrachtung durchstrahlbarer Objekte geeignet.

#### **4.1 Grids**

Als Objektträger dienen so genannte Netzträger oder Grids aus Nickel, Kupfer oder Gold. Diese besitzen einen Durchmesser von 2-3 mm und eine definierte Anzahl von Gitterlinien. Diese wird in mesh (Maschen) angegeben, also den Gitterlinien pro inch. Je höher die mesh-Zahl, desto dichter liegen die Linien. Die verwendete Gitterlinienzahl wird abhängig von den betrachteten Proben gewählt. Kleine Objekte wie Viren erlauben mehr mesh als größere Proben wie Gewebeproben in der Pathologie. Die Wahrscheinlichkeit, dass wichtige Informationen nicht sichtbar auf einem Steg liegen, erhöht sich natürlich mit Anzahl der Gitterlinien, die durchstrahlbare Fläche verringert sich.

Die Gitterlinien dienen auch zur Ableitung der Wärme, die durch die Bestrahlung des Objektes entsteht. Viele Stege bieten eine bessere Wärmeableitung.

Verwendet werden auch Sandwich-Träger, die die Objekte zwischen zwei Netzen einschließen. Ebenso werden Schlitznetzchen, Wabenmuster und zum erneuten Auffinden bestimmter Stellen nummerierte Finder-Netzchen angeboten.

#### **4.2 Folien-Beschichtung**

Die Grids werden vor Aufbringen der Proben mit einer Folie beschichtet. Diese kann aus Plastik, Kohle oder Metall oder bestehen.

Die Plastikfilm-Materialien wie Formvar oder Pioloform werden z.B. in Chloroform gelöst und ein Glas-Objektträger in die Lösung eingetaucht. Beim Trocknen bildet sich eine Folie, die auf einer Aqua bidest. Oberfläche abgeschwemmt wird. Die Dicke der Folie beträgt so ca. 20-30 nm. Die Grids werden nun auf die schwimmende Folie aufgelegt und bleiben daran haften. Mit einem Streifen Parafilm werden Folie und Grids von der Wasseroberfläche abgenommen. Nach dem Trocknen können die beschichteten Grids lange gelagert werden. Bei der Herstellung sollte darauf geachtet werden, dass die Luftfeuchtigkeit niedrig ist, da sich sonst beim Trocknen Wassertropfen auf der Folie anlagern und so Löcher in der Folie ergeben.

Die Grids können anschließend auch noch mit einer stabilisierenden Kohlebedampfung überzogen werden. Die Dicke sollte bei 5-10 nm liegen.

Die verschiedenen Folien unterscheiden sich z.B. in Hydrophobizität oder der Schrumpfung bei Betrachtung. Sie sollten aber generell über eine gewisse thermische Resistenz und Haltbarkeit verfügen, gleichzeitig aber eine Durchlässigkeit für die Elektronen gewährleisten.

Sollten im Normalfall Löcher in der Folie vermieden werden, können bei bestimmten Betrachtungen gerade diese nützlich sein. Für hochaufgelöste Bilder von sehr kleinen Objekten wie z.B. Phagen werden Formvar-Folien mit Löchern hergestellt und diese mit einer dickeren Kohleschicht (ca. 30 nm) bedampft. Darüber wird eine Formvar-Folie ohne Löcher gezogen und diese mit einer deutlich dünneren Kohleschicht (~0,5 nm) versehen. Mit Lösungsmitteln lassen sich nun die Formvar-Folien auflösen, so dass über den Löchern nur die dünne Kohleschicht erhalten bleibt. An diesen Stellen lassen sich kleinste Objekte gut auflösen, da nur sehr wenig Trägermaterial die Sicht behindert.

#### **4.3 Vakuumpumpen**

Das Hochvakuum wird mit einer Schaltung verschiedener Pumpen erreicht. Am hier verwendeten TEM sorgt zunächst eine Rotationspumpe für die Evakuierung des Strahlengangs. Anschließend wird eine Öldiffusionspumpe eingesetzt, die das Vakuum verbessert. Als letzte Stufe wird eine Ionengetter-Pumpe verwendet. Diese benötigt ein gutes

Vorvakuum und erreicht ein Hochvakuum bis zu  $10^{-7}$  bar. Das Restgas wird durch Elektronenstöße ionisiert und durch ein Magnetfeld zu einem Sorptionsmittel getrieben. Hierbei handelt es sich um Titangitter, die hin und wieder erneuert werden müssen.

#### 4.4 Fixierungen

Um die Proben in ihrem Zustand für die Betrachtung zu konservieren, müssen sie fixiert werden. Als Fixierungsmittel kommen dabei vor allem in Betracht:

- Aldehydfixierer wie Glutaraldehyd, Formaldehyd oder Acrolein
- Osmiumtetroxid
- Kaliumpermanganat

Die Fixierer werden in Puffern aufgenommen wie z.B. Phosphat- oder Natrium-Arsenat-Puffer.

Osmiumtetroxid vernetzt ungesättigte Doppelbindungen und führt so zu einer Stabilisierung der Probe. Zusätzlich führt es zu einer Kontrastverstärkung. Bei längerer Anwendungszeit werden allerdings Proteine aus der Probe ausgewaschen. Es dringt recht langsam ins Gewebe ein. 1% Osmiumtetroxid-Lösung braucht ca. 4 Stunden für 1 mm Eindringtiefe.

Aldehydfixierer sind wesentlich schneller, so dass man meist eine Doppelfixierung anwendet, bei der mit 1-2% Glutaraldehyd 2 Stunden vorfixiert wird, um inter- und intramolekulare Verbindungen zu stabilisieren. Dann erfolgt eine Nachfixierung mit Osmiumtetroxid.

Kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) wird vor allem bei pflanzlichen Objekten angewendet. Es zerstört bei der Fixierung die enthaltenen Nukleinsäuren.

Durch die Anwendung der verschiedenen Fixierungen kann es zu Artefaktbildungen kommen, die nachher nicht mit natürlichen Strukturen verwechselt werden dürfen.

Als Kriterium, ob es sich um eine gute Fixierung handelt, können z.B. durchgehende Zellwände ohne Wölbungen dienen. Auch Mitochondrien, die nicht geschrumpft oder geschwollen erscheinen sowie intakte Cristae aufweisen können ein Merkmal für gute Fixierung sein. Wichtig dafür ist bei der Fixierung die Verwendung von isotonischen Puffern.

#### 4.5 Einbettungen

Um aus den fixierten Präparaten Ultradünnschnitte herstellen zu können, müssen diese in einer Substanz eingebettet werden. Dabei handelt es sich um verschiedene Harze, denen jeweils ein Härter, ein Polymerisations-Beschleuniger sowie ein Weichmacher zugesetzt werden. Bei diesen Zusätzen handelt es sich um gesundheitsschädliche Stoffe, die mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden sollten.

Vor der Einbettung müssen Reste der Fixierung ausgewaschen werden. Anschließend wird die Probe in Agar aufgenommen und muss aushärten. Der Agarblock kann nun in kleinere Blöckchen zerteilt werden, die nun entwässert werden müssen. Dazu bedarf es einer Entwässerungsreihe mit Ethanol oder Aceton mit steigender Konzentration. Üblicherweise wird mit einer Anfangskonzentration von 60% bis zu 100% gearbeitet. Bei manchen Harzen ist es allerdings nicht notwendig, das Präparat vollständig zu entwässern.

Anschließend wird das Blöckchen in die Kunstharzumkleidung eingebettet.

Es stehen verschiedene Kunstharze für die Einbettungen zur Auswahl. Sie unterscheiden sich z.B. in Viskosität und Polymerisationstemperatur-Optimum. Epon-Harz, das einen fixierenden Glycidether enthält, besitzt eine Viskosität, wogegen Spurr-Harz deutlich flüssiger ist. LR-White ist ein Acrylharz, das besonders für die Immunhistochemie verwendet wird, da hier keine völlige Entwässerung notwendig ist, die zu Artefakten führen kann. Bei Nanoplast handelt es sich um ein Melaminharz, das eine wasserhaltige Probe aufnehmen

kann, da es selbst wasserlöslich ist. Es ist aber für Osmium-fixierte Proben sowie immunologische Nachweise nicht geeignet. Für diese Nachweise wird Unicryl verwendet, da es beim Schneiden bricht und damit mehr Probenoberfläche bietet. Lowicryl-Harz jedoch ist für immunologische Nachweise am besten geeignet. Es kann bei Temperaturen von  $-45^{\circ}\text{C}$  bis  $-70^{\circ}\text{C}$  verwendet werden und härtet im UV-Licht aus.

Schließlich werden die Harzblöckchen inklusive einer Beschriftung in Gelatine kapseln eingebettet. Dies kann ungerichtet geschehen oder in einer flachen Einbettung mit Ausrichtung.

So können die Proben jahrelang aufbewahrt werden. Einige Proben seien nach fast 40 Jahren noch für neue Schnitte verwendbar.

#### **4.6 Ultramikrotomie**

Um aus den eingebetteten Proben Ultradünnschnitte zu fertigen, sind einige notwendige Vorbereitungen zu treffen.

Die Kunstharzkapsel muss getrimmt werden; das bedeutet, dass die Kapselrundung angespitzt wird, um beim Schneiden direkt die Probe zu erreichen. Bei einer Schnittdicke von 50-100 nm sind andernfalls viele Leerschnitte zu machen, bis die Probe angeschnitten wird. Bei interessanten Arealen im Blöckchen empfiehlt sich ein Feintrimmen nach Betrachtung eines Schnittes im Lichtmikroskop.

Vorbereitet werden müssen auch die Glasmesser, die beim Anschneiden der Blöcke zum Einsatz kommen. Es werden zunächst quadratischen Glasstücke hergestellt, die dann in der Diagonalen an einer vorgezeichneten Kante auseinander brechen. Daraus ergibt sich eine sehr scharfe Messerkante. Die Glasmesser sollten nur für den aktuellen Tagesbedarf hergestellt werden, da sie durch Lagerung an Schärfe und Präzision verlieren.

Für die eigentlichen Schnitte sollten Diamantmesser verwendet werden, die in verschiedenen Winkeln erhältlich sind. Ein mit Wasser gefüllter Trog im Messerblock nimmt die fertigen Schnitte auf der Wasseroberfläche auf. Von dort können die entstehenden Schnittbänder dann auf die beschichteten Grids überführt werden.

Das Messer muss im richtigen Winkel zur Probe ausgerichtet sein, da sonst unregelmäßig dicke oder unvollständige Schnitte entstehen. Ein gewisser Freiwinkel zwischen Messer und Präparat muss beachtet werden, damit das Messer nicht direkt an der Probe vorbei gleitet und die Oberfläche beschädigt.

Die ideale Schichtdicke liegt bei 50-100 nm. Die Schnitte erscheinen dann grau bis silbern. Bei kontrastärmeren Präparaten können sich aber auch goldfarbene Schnitte bis ca. 120 nm Dicke empfehlen, um den Kontrast zu erhöhen. Ab 150 nm spricht man von Semidünnschnitten, die dann lila bis blau erscheinen. Für das Lichtmikroskop werden Schnitte von ca.  $1\mu\text{m}$  benötigt.

Der Vorschub des Ultramikrotoms war früher mechanisch gesteuert. In den neuen Modellen wird ein thermischer Vorschub verwendet, bei dem sich ein Metallstab durch Hitze ausdehnt und bei dieser Verlängerung die Probe verschiebt. Daraus ergibt sich allerdings die Fehlerquelle, dass bei zu hohen Temperaturen die Ausdehnung unkontrolliert erfolgt.

Weitere Fehler, die bei der Ultramikrotomie auftreten können sind Vibrationen und Schwingungen, die sich auf das Gerät übertragen und zum so genannten „Chatter“ oder auch „Zebrastreifen“ führen. Dabei sind die Schnitte nicht gleichmäßig dick, sondern dickere und dünnere Abschnitte wechseln sich ab und ergeben dabei ein Bandenmuster.

Bei Scharfen in der Messerklinge, die vor allem bei Glasmessern auftreten, zeigen sich im Schnittband Streifen. Das Messer sollte dann ersetzt werden.

## 4.7 Kontrastierungen

Man unterscheidet bei den Färbungen zwischen positiven und negativen Kontrastierungen.

Unter positiver Kontrastierung versteht man die Anlagerung von Kontrastmittel an vorhandene Strukturen. Bei der negativen Kontrastierung werden die Ränder der Proben besonders betont, da sich das Kontrastmittel um die Objekte herum anlagert.

Diese Verfahren können manuell oder durch einen Kontrastierautomat erfolgen. Verwendung finden dabei vor allem Uranylacetat, Bleicitrat und Phosphorwolframsäure.

Für die Negativ-Kontrastierung ist keine Fixierung und Einbettung erforderlich, und es handelt sich daher um eine schnelle Methode, Objekte kontrastreich sichtbar zu machen. Sie ist vor allem für Material in Suspensionen geeignet z.B. für Bakterien. Die Suspension sollte eine Dichte von ca.  $10^6$  Partikel/ml besitzen.

Ca. 10  $\mu$ l Suspension werden auf ein befilmtes Grid aufgetropft und Phosphorwolframsäure zugeben. Nach knapp einer Minute wird mit Aqua bidest. gespült und mit einem Filterpapier die restliche Feuchtigkeit abgetrocknet. Um die Partikel bildet sich ein Film aus Kontrastmittel, der zu einem längeren Weg der Elektronen durch die Phosphorwolframsäure führt. An den Rändern ist somit eine stärkere Brechung zu beobachten.

Diese Methode eignet sich jedoch nur für die Darstellung der äußeren Form und erlaubt keine Einblicke in das Innere der Partikel. Verwendung findet die Methode z.B. in der Feststellung von Verunreinigungen in Proteinaufreinigungen.

Man sollte als Kontrolle den Puffer alleine mit Kontrastmittel anfärben, da es zu Präzipitaten kommen kann, die das Ergebnis möglicherweise verfälschen können.

Da es durch Eintrocknen des Kontrastmittels und des damit entstehenden Drucks auf das Präparat zu Deformationen kommen kann, empfiehlt sich in solchen Fällen eine Gefriertrocknung nach Nermut. Dabei wird die Probe in flüssigen Stickstoff getaucht. Im Vakuum bei  $-150^{\circ}\text{C}$  bis ansteigend auf  $-80^{\circ}\text{C}$  sublimieren die Kristalle ab und die Probe trocknet schonender.

## 4.8 Nachweismethoden

### 4.8.1 Enzymnachweise

Je nachdem verwendeten Nachweis stellt sich die Frage, ob eine Fixierung der Probe sinnvoll ist. Vielfach kann die Inkubation im Medium direkt durchgeführt werden. Sehr wichtig sind hierbei Kontrollen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Häufig verwendet wird der saure Phosphatase-Nachweis. Dabei werden Phosphate durch Zugabe von Bleinitrat und des Enzyms Saure Phosphatase in elektronenmikroskopisch nachweisbare Bleiphosphate umgesetzt. Die anschließende Färbung sollte nur mit Uranylacetat geschehen.

### 4.8.2 Immunologische Nachweise

Bei den immunologischen Nachweisen wird mit Antikörpern gearbeitet, die spezifisch sind für bestimmte Zellbestandteile Sie sind an stark elektronenstreuendes Material wie Gold oder Ferritin gekoppelt. Diese können je nach Anwendung verschiedene Durchmesser haben, meist werden aber Größen von etwa 5 bis 15 nm verwendet. Diese sind groß genug um sie im Präparat recht leicht aufzufinden, jedoch nicht zu schwer um bei den letzten Waschsritten von den Bindestellen durch ihren Widerstand abgeschwemmt zu werden.

Bei der pre-embedding Methode erfolgt die Kopplung der Antikörper an die Zielstellen vor der Einbettung. Die Probe ist daher nur von außen zugänglich. Bei der post-embedding

Methode werden die einzelnen Schnitte behandelt. Damit sind auch Strukturen im Zellinnern zugänglich.

Immunologische Nachweise können direkt oder indirekt erfolgen. Beim direkten Nachweis ist der spezifische Antikörper selbst mit Gold oder Ferritin gekoppelt. Im indirekten Fall wird ein spezifischer Antikörper z.B. aus Kaninchen verwendet. In einem zweiten Schritt wird dann ein weiterer Antikörper mit Gold gegen Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Dazwischen sind verschiedene Waschschrte notwendig.

#### **4.9 Metall-Bedampfung**

Die Bedampfung der Probenoberfläche erfolgt im Vakuum und erzeugt eine Kontrastverstärkung. Als Materialien werden Platin, Kohlenstoff und Wolfram verwendet. Voraussetzung ist eine dünne, gleichmäßige Bedampfung ohne größere Brocken, die die Abbildung verfälschen. Anschließend werden die Objekte in der Bedampfungsapparatur getrocknet, wobei eine ähnliche mechanische Belastung auftritt wie bei der Negativ-Kontrastierung. Es bieten sich verschiedenen Möglichkeiten der Bedampfung an, die sich in den Bedampfungswinkeln unterscheiden. Bei einer Schrägbedampfung wird meist mit einem gleich bleibenden Winkel von  $45^\circ$  gearbeitet. Bei der Kegelbedampfung dagegen wird das Objekt unter  $45^\circ$  gedreht und damit von allen Seiten gleichmäßig erreicht. Die Portrait-Technik zeichnet sich hingegen durch die Abmilderung von zu starken Kontrasten aus. Dabei wird einseitig ca. 80% der Bedampfungsdicke erreicht und nach Drehung um  $180^\circ$  weitere 20 % bedampft. Für den Betrachter ergibt sich generell ein angenehmeres Bild, wenn in der anschließenden Bildbearbeitung eine Negativ-Kopie erzeugt wird.

Gerade bei Metall-Bedampfungen können auskristallisierte Puffersalze auf der Oberfläche störend wirken. Daher sollte vorher mit der Agardiffusionsmethode der Puffer auf dem Grid durch Diffusion in die untenliegende Agarschicht von störenden Salzen gereinigt werden.

Verwenden lässt sich die Metall-Bedampfung auch zum Nachweis kleiner Partikel und Strukturen wie z.B. DNA-Strängen. Es können doppelsträngige, einsträngige Bereiche sowie Loops aufgefunden werden. Mit der Kleinschmidtschen-Spreading-Methode wird DNA in einem so genannten Langmuir-Trog auf einer Wasseroberfläche ausgebreitet und von dort auf ein Grid aufgenommen. In der folgenden Bedampfung wird unter einem flachen Winkel von  $8-10^\circ$  gearbeitet, was die DNA-Fäden deutlich sichtbar werden lässt.

Obwohl es sich beim TEM um ein Durchstrahlungsmikroskop handelt, lassen sich mit einer Technik auch Oberflächen dickerer Objekte sichtbar machen, wofür sonst ein REM benötigt wird. Beim Abdruck-Verfahren wird daher entweder in einem einstufigen Verfahren ein Filmabdruck erstellt oder in einer zweistufigen Technik ein Matrizenabdruck gefertigt. Beim Filmabdruck handelt es sich um eine negative Kopie, da eine Replica auf das Objekt aufgedampft und dann betrachtet wird. Bei der Matrizenherstellung wird ein Plastik-Negativ hergestellt und dann diese bedampft. Es entsteht so eine positive Kopie.

#### **4.10 Autoradiographie**

Die Autoradiographie wurde zum Teil durch die post-embedding Methode verdrängt. Dabei wird radioaktives Material fixiert und eingebettet. Anschließend erfolgen die Kontrastierung und eine dünne Kohlebedampfung. Diese Methode erzielt eine Auflösung von  $0,1 \mu\text{m}$ , wobei hier die optische Trennung von 2 radioaktiven Strahlquellen gemeint ist. Die ausgesandte  $\beta$ -Strahlung wird mit Hilfe einer Filmemulsion detektiert. Diese wird mit der Loop-Methode über das Grid gezogen und nach einer bestimmten Expositionszeit entwickelt. Mit den Zeiten muss experimentiert werden. Generell ist die Herstellung der Präparate schwierig und es muss

mit hohen Ausfallquoten gerechnet werden. Eine dünnere Emulsion sowie geringere Silberkorngröße tragen zu einer besseren Auflösung bei.

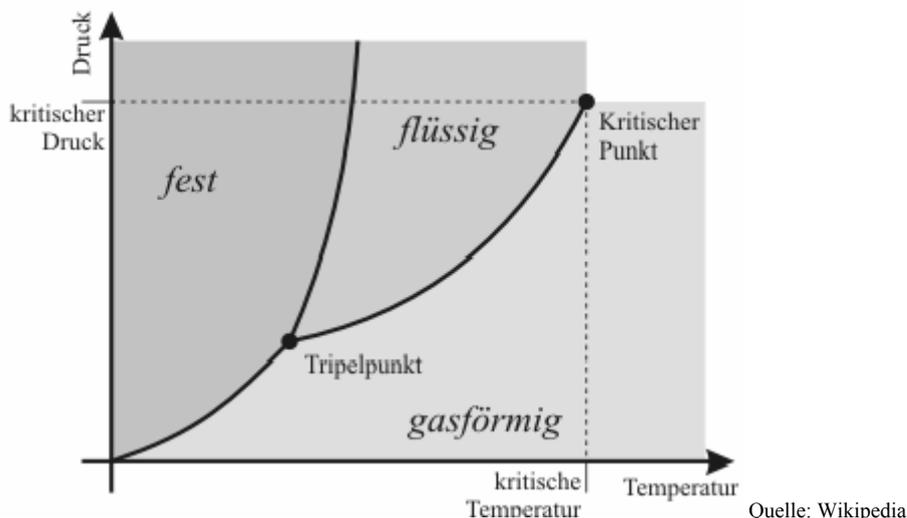
## 5. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie werden Proben untersucht, die nicht durchstrahlbar sind. Die Elektronen werden von der Oberfläche reflektiert und durch einen Detektor aufgenommen. Daraus kann dann durch Bildverarbeitung eine Abbildung der Probe erzeugt werden. Es wird dabei mit einem feinen Elektronenstrahl gearbeitet, dem so genannten Primärelektronenstrahl, der die Probe rasterartig abfährt. Dabei entsteht aus den reflektierten Elektronen der Sekundärelektronenstrahl, der detektiert werden kann. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die aus dem Material herausgeschlagenen Elektronen zu detektieren, die so genannten Rückstreuelektronen. Der Detektor muss dazu sehr nah am Objekt angebracht sein, um Verzerrung über längere Distanzen möglichst zu vermeiden. Durch einen Photomultiplier wird das ausgehende Signal verstärkt. Die Auflösungsgrenze liegt beim REM bei etwa 40 nm, also deutlich über dem TEM. Es wird daher meist für einen Vergrößerungsbereich von etwa 5.000fach eingesetzt.

### 5.1 Kritische Punkt-Trocknung und Sputtern

Die Proben müssen für die Rasterelektronenmikroskopie völlig entwässert und dann mit einer Elektronen reflektierenden Schicht überzogen werden. Die Entwässerung findet mit Hilfe der Kritischen-Punkt-Trocknung statt, bei der ausgenutzt wird, dass ab einem bestimmten Druck und einer Temperatur Substanzen in festem und flüssigem Zustand die gleiche Dichte aufweisen. Dabei verschwindet dann die Phasengrenze.

Für Wasser handelt es sich dabei um Werte von 374°C und 218 kg/cm<sup>2</sup>. Früher wurde für die Kritische-Punkt-Trocknung Freon verwendet, heute ist CO<sub>2</sub> im Gebrauch, das Werte von 31°C und 75 atm benötigt.



Zunächst wird die Probe in Aceton gelagert in die Apparatur eingebracht und dann flüssiges CO<sub>2</sub> eingeleitet. Durch mehrfaches Mischen und Gas ablassen, wird das Aceton ausgewaschen und die Probe in reinem CO<sub>2</sub> gelagert. Anschließend werden der Druck und die Temperatur ausreichend erhöht bis die Phasengrenze verschwindet.

Anschließend ist die Probe vollständig entwässert und daher sehr leicht. Sie kann nun sehr vorsichtig auf den Probenhalter aufgebracht werden. Bei größeren Proben kann eine Pinzette verwendet werden, kleine Proben werden aufgestäubt und liegen daher unausgerichtet.

Nachfolgend werden die Präparate mit einer Goldschicht bedampft. Diese Kathodenzerstäubung findet im Vakuum statt. Dort werden durch eine angelegte Spannung Goldpartikel aus einer Goldplatte freigesetzt, diese diffundieren im Vakuum und stoßen auf eingeleitete Argon-Gas-Moleküle. Durch diese Ablenkung treffen die Goldpartikel aus allen Winkel auf die Probe und es erfolgt eine völlig gleichmäßige Bedampfung. Diese Methode wird als Sputtern bezeichnet. Wichtig ist dabei, dass die aufgetragene Schicht nicht zu dick ist, um feine Oberflächendetails nicht zuzuschneiden.

Die Elektronen reflektierende Schicht sorgt nicht nur für ein entstehendes Bild, sondern hilft auch die durch Bestrahlung entstehende Wärme abzuleiten.

## **6. Raster-Tunnel-Mikroskopie**

Bei der Raster-Tunnelmikroskopie - auch Rasterkraftmikroskopie genannt - werden auch Oberflächen abgebildet. Im Englischen ist der Begriff Atomic Force Microscopy (AFM) gebräuchlich. Dabei macht man sich jedoch ein anderes Prinzip zu Nutze.

Aus der Probenoberfläche treten Elektronenwolken aus, die in größer werdendem Abstand zur Oberfläche schwächer werden. Es fährt nun eine Abtastnadel mit einer angelegten Spannung über die Oberflächenstruktur. Der Stromfluss soll dabei immer gleich bleiben, was zur Folge hat, dass die Nadel immer den gleichen Abstand zur Oberfläche behält. Dazu muss sie sich aber bei welligen Strukturen nach oben oder unten verbiegen. Diese Nadelbewegung wird mit einem Detektor registriert und auf einem Bildschirm sichtbar gemacht. Die abtastende Nadel modelliert also die Oberfläche nach.

Die benötigten Geräte sind relativ klein und einfach, aber die nachfolgende Bildverarbeitung erfordert aufwändige und damit teure Rechner.

Zudem ist die Methode auf unbedingte Ruhe angewiesen, da geringste Vibrationen die Hebelarmbewegung verfälschen.

## **7. Abbildungsfehler**

Bei der Abbildung des Präparats können verschiedene Abbildungsfehler auftreten. Zu den Linsenfehlern gehört dabei die geometrische Verzeichnung, die vor allem in den äußeren Bildbereichen zu einer Verzerrung führt. Bei der sphärischen Aberration treten verschiedene Foki von Linsenbereichen auf.

Die chromatische Aberration hingegen zeichnet sich durch fehlenden Fokuspunkt aus, und wird durch Hochspannungsschwankungen verursacht. Es werden also konstante Bedingungen benötigt, um diesen Abbildungsfehler zu vermeiden.

Der Astigmatismus kann durch einen Stigmator korrigiert werden. Diese Korrektur ist vor allem für die Objektivlinse entscheidend. Jedes Gerät besitzt einen Grundastigmatismus der auf jeden Fall korrigiert werden muss.

Bei der Fokussierung ist darauf zu achten, dass keine Über- oder vor allem Unterfokussierung vorliegt. Bei Unterfokussierung ergibt sich ein für den Betrachter kontrastreicher erscheinendes Bild, das aber bei nachfolgenden Vergrößerungen gegenüber dem richtig fokussierten Bild verliert. Als Hilfsmittel kann ein so genannter Wobbler verwendet werden, der ein Doppelbild erzeugt. Wenn sich das Präparat im Fokus befindet, zeigt sich ein stehendes Bild.

Zur Aufnahme von Bildern einer Probe aus verschiedenen Winkeln kann ein Goniometer verwendet werden. Es kann Objekte kippen und drehen, ohne die Probe aus dem Strahlengang herausnehmen zu müssen.

## **8. Cryo-Methoden**

Bei den Cryo-Methoden handelt es sich um Präparat-Fixierungen die im Gegensatz zu den chemischen Fixierung auf physikalischen Grundlagen beruhen. Dazu gehören die Cryofixation (Schockgefrieren) die Gefriertrocknung, die Ultracryotomie, also das Schneiden der Probe im gefrorenen Zustand sowie die Gefrierbruchtechnik mit nachfolgender Gefrierätzung. Diese Methode wird seit 1957 verwendet. Dabei wird die Probe auf einen speziellen Präparatteller aufgebracht. Es kann sich dabei um eine Suspension oder auch Gewebestücke handeln.

Anschließend wird die Probe in flüssigem Propan eingefroren. Wichtig ist dabei eine schnelle Abkühlung, auch Vitrifizierung zu erreichen. Entscheidend ist dabei nicht nur die Temperatur der Flüssigkeit sondern vor allem auch seine Abkühlrate °C/s. Flüssiges Propan erreicht zwar nur -190°C in Gegensatz zu flüssigem Stickstoff mit -196°C, es besitzt aber eine mehr als sechsfach höhere Abkühlrate mit 98.000 °C/s. Bei einer mittleren Abkühlung entsteht intrazelluläre Eisbildung, die zur Zerstörung der Zellen führt. Eine langsame Abkühlung führt sogar zum extrazellulären Gefrieren.

Flüssiger Stickstoff bietet sich zudem nicht zum Schockgefrieren an, da es durch die als Leidenfrostsches Phänomen bezeichnete Eigenschaft eine isolierende Gasschicht zu bilden die Probe nicht schnell genug einfrieren könnte.

Im Anschluss an die Cryofixation wird die Probe zügig um ein Auftauen zu vermeiden in die Gefrierätztemperatur in ein Hochvakuum eingebracht. Die folgenden Schritte werden bei ca. -100°C durchgeführt. Die Kühlung erfolgt hier über flüssigen Stickstoff. Mit einem gekühlten Messer wird nun die Oberfläche der Probe aufgebrochen, wo bei das Brechen bevorzugt in der hydrophoben Region der Membran geschieht. Die entstehende Bruchansicht wird als Fracture Face bezeichnet und je nachdem welche Membranseite sie zeigt mit dem Zusatz Plasmic oder Exoplasmic versehen (PF und EF).

Durch die nachfolgende Ätzung werden weitere Oberflächen frei. Dabei wird durch eine über der Probe angebrachte Kühlfalle (-180°C) dafür gesorgt, dass Flüssigkeit aus der Probe sublimiert und tiefer im Eis liegende Oberflächenstrukturen frei gegeben werden. Diese werden dann als Surface bezeichnet und ergeben dann PS und ES.

Je besser das Vakuum ist, desto weniger Artefakte bilden sich durch Niederschlag auf der Bruchfläche.

Die Bruchoberfläche wird dann mit Platin-Kohle bedampft wodurch eine Replica mit ca. 1,5 nm Schichtdicke entsteht. Diese wird dann noch mal mit einer zehnfachen Menge Kohle also etwa 15 nm verstärkt.

Bei Raumtemperatur wird dann die eigentliche Probe von der Replica abgelöst und diese auf ein Grid zur Betrachtung aufgebracht.

Um komplementäre Oberflächen zu erhalten, wird die Probe zwischen Sandwich-Träger aufgebracht und eingefroren. Anschließend werden die beiden Sandwichhälften auseinander gezogen und einzeln weiter verarbeitet.

Die Herstellung von Gefrierbruchproben erfordert viel Übung und Erfahrung, da die Handgriffe schnell erfolgen müssen, um ein Auftauen und damit eine Artefaktbildung der Präparate zu vermeiden.

## **9. Analytische Elektronenmikroskopie**

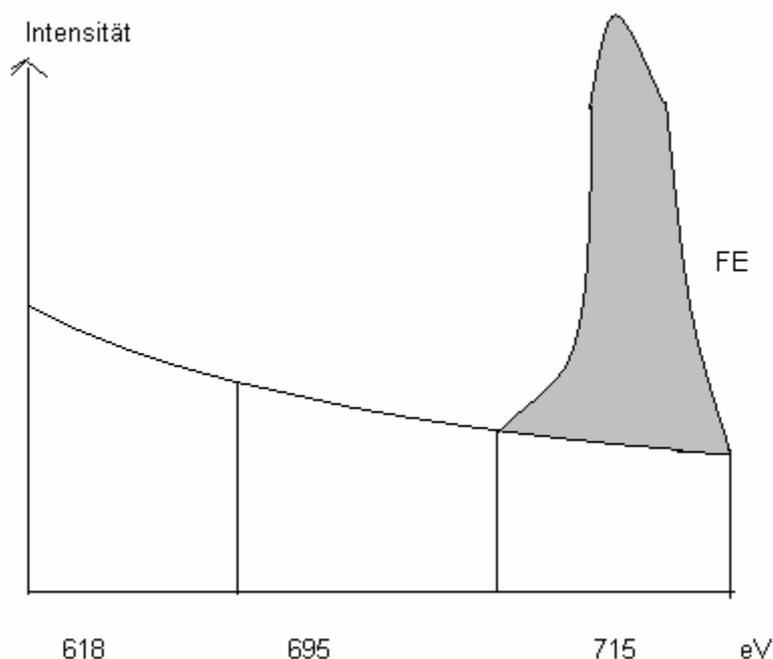
Bei der analytischen Elektronenmikroskopie besteht das Ziel in der Bestimmung der in der Probe enthaltenen Elemente. Dazu werden die von der Probe gestreuten Elektronen verwendet. Ungestreute Elektronen passieren die Probe ohne Richtungsänderung und ohne Energieverlust, elastisch gestreute Elektronen ändern dagegen ihre Richtung sehr stark, erfahren aber ebenfalls keinen Energieverlust. Bei der Analyse finden hingegen die inelastisch gestreuten Elektronen Verwendung. Sie werden zwar nur schwach abgelenkt, verzeichnen

jedoch einen messbaren Energieverlust  $\Delta E$ . Dabei trifft ein Elektron aus dem Strahl auf ein Elektron des zu untersuchenden Teilchens.  $\Delta E$  ist dabei spezifisch für das Element z.B. besitzt Phosphor ein  $\Delta E$  von 209 eV.

Das herausgeschlagene Elektron erhält dabei den Energiebetrag  $\Delta E$ , der sich bestimmen lässt, da eine elementspezifische Röntgenstrahlung frei wird. Sie entsteht durch das Springen der Elektronen aus einer höheren Schale in die niedrigere, um den Verlust des herausgeschlagenen Elektrons auszugleichen. Man spricht dann von der Röntgenmikroanalyse, die diese Röntgenstrahlung auswertet. Es handelt sich dabei um eine sehr empfindliche Methode, die ein Spektrum mit Peaks als Ergebnis anzeigt.

Möglich ist aber auch den Verlust von  $\Delta E$  zu analysieren, eine Methode auf die immer mehr zurückgegriffen wird. Dabei werden die ungestreuten Elektronen, die durch das Präparat gelang sind an Prismen gestreut und mit Spiegeln auf einen Detektor umgeleitet.

Die beiden hauptsächlich verwendeten Verfahren in der analytischen Elektronenmikroskopie sind EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy) und ESI (Electron Spectroscopic Imaging). Dabei wird zunächst mit EELS ein Spektrum aufgenommen, das die Intensität bei verschiedenen Elektronenvolt zeigt. Es dient somit zum Auffinden der enthaltenen Elemente. Anschließend können mit ESI aufnahmen der einzelnen Elemente gemacht werden. Man spricht hier vom Element-mapping.



Dabei werden mehrere Aufnahmen bei verschiedenen Elektronenvolt gemacht und durch Extrapolation der Untergrund berechnet. Dieser wird rechnerisch abgezogen und man erhält zum Beispiel bei 715 eV eine Abbildung der Eisen-Verteilung. Das Element erscheint dann an konzentrierten Stellen heller wie z.B. Phosphor in Phosphat-Granula.

## **10. Elektronenmikroskopische Tomographie**

Bei dieser Technik wird das Objekt in vielen verschiedenen Winkeln gekippt und gedreht und die aufgenommenen Bilder mit den dazugehörigen Winkeln im Computer verarbeitet. Daraus lassen sich dann 3-dimensionale Modelle berechnen.

Durch die Aufnahme vieler Bilder und der aufwändigen Rechnernutzung ist diese Anwendung sehr teuer und wird momentan nur in bestimmten Zentren angewendet (z.B.

Biochemisches Institut München). Die Technik ist noch recht neu und wird erst seit ca. 8 Jahren angewendet.

## **11. Artefakte**

Die Elektronenmikroskopie ist aufgrund ihrer oft schwierigen Probenvorbereitung vor der Betrachtung sehr anfällig für die Ausbildung von Artefakten, also ein künstlich entstandenes Phänomen, das aber nichts mit dem tatsächlichen Objekt zu tun hat. Es kann dabei leicht zu fehlerhaften Deutungen kommen. Beispielhaft sind dafür die so genannten „Mesosomen“, die lange für Membraneinstülpungen mit ungeklärter Funktion gehalten wurden, letztlich aber durch falsche Einbettung der Proben entstanden sind. Bei Gefrierbruchpräparaten traten die Mesosomen nie auf.

Auch Polyhydroxybuttersäure (PHB) erzeugt ein nicht wirklichkeitsgetreues Bild, da es durch die Alkoholreihe herausgelöst wird und nur helle Flecken hinterlässt. Auch Schwefeltröpfchen sollten lieber im Lichtmikroskop nachgewiesen werden.

Um ein Artefakt handelt es sich auch bei der Phasentrennung. Normalerweise sind die Lipide und Intermembranpartikel (IMP) in der Membran statistisch verteilt. Bei Überschreiten der Phasenübergangstemperatur beginnt die Entmischung und es kommt zu einer Fleckenbildung.

Früher wurde zur Vermeidung von Eiskristallbildung beim Einfrieren der Proben Glycerin zugegeben. Dies führte aber zur Schrumpfung der Zellen und zur Ablösung der Cytoplasmamembran. Die störende Eiskristallbildung findet vor allem statt, wenn die Abkühlung im Bereich von -20 bis -80 °C nicht schnell genug erfolgt.

Um Artefakte zu vermeiden sollte bei der Probenherstellung im Ultrahochvakuum mit tiefen Temperaturen von ca. -260°C gearbeitet werden. Bei Temperaturen von ca. -100°C sind manche Materialien noch nicht fest und es kommt bei Bearbeitung im Gefrierbruch zur plastischen Deformation. Bei tiefen Temperaturen in zu schlechtem Vakuum wiederum kann die Probe zur Kühlfalle werden. Dann lagern sich Wasserpartikel auf der Oberfläche ab und „dekorieren“ diese.

## **12. Aussichten**

Die Weiterentwicklung in der Elektronenmikroskopie beschäftigt sich nach wie vor mit der Verbesserung der Auflösung, wobei inzwischen durch Korrekturen an den Objektivlinsen eine Grenze von ca. 0,08 nm erreicht wurde. Man befindet sich damit im Sub-Ångström-Bereich.

Beim Hochvakuum lassen sich zur Zeit kaum noch weitere Verbesserungen erzielen, da man sich mit  $10^{-8}$  Torr in Bereichen befindet, die nur mit sehr großem Aufwand weiter verschoben werden können.

Hingegen wird an den analytischen Methoden der Elektronenmikroskopie weiter gearbeitet und diese durch neue Methoden verbessert.

Um auch in TEM dickere Präparate untersuchen zu können, kann die angelegte Hochspannung erhöht werden. 300.000 – 400.000 V können erreicht werden.

Ein wesentlicher Punkt der Weiterentwicklung ist zudem bei den immer komplexer werdenden Geräten auch die Bedienbarkeit in anwenderfreundlichem Rahmen zu gestalten. Der Trend geht immer weiter von mechanischen Einstellungen zur computergesteuerten Handhabung.

Auch im Bereich der computergestützten Bildbearbeitung wird durch weiterentwickelte Software die Möglichkeit der Nachbearbeitung verbessert.