

Lichtmikroskop

„Der Blick ins Unsichtbare“ – gemeint ist der Blick in eine Welt, die mit dem bloßen menschlichen Auge nicht zu erkennen ist – wird vermutlich erstmals im 13. Jahrhundert eröffnet. Der Franziskaner Roger Bacon (1214 –1294) beschreibt die Verwendung von einfachen Linsen als Sehhilfe und löst damit die Handwerkskunst des Schleifens und Polierens von Glas zu Vergrößerungslinsen aus. Am Ende des 16. Jahrhunderts entstehen die ersten Mikroskope, zusammengesetzt aus zwei Linsen und einer drei- bis sechsfachen Vergrößerung.

Robert Hooke veröffentlicht 1665 damit erste wissenschaftliche Beobachtungen. Antoni van Leeuwenhoek sieht durch sein um 1660 gebautes, einlinsiges Mikroskop 1674 erstmals einzellige Lebewesen. Es ist der Beginn des eindrucksvollen Siegeszuges des Mikroskops, mit dessen Hilfe in den nächsten Jahrhunderten Bausteine des Lebens – und auch dessen Zerstörung – entdeckt und verstanden werden (Abb. 1).

Interessanterweise erfolgt die Herstellung der Linsen sowie die Zusammenstellung der schon bald üblichen mehrlinsigen Mikroskopobjektive bis zur zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts eher intuitiv und durch ausprobieren. Erst Ernst Abbe (1840-1905) betrachtet die Probleme aus wissenschaftlicher Sicht und formuliert das entscheidende optische Gesetz der Mikroskopie. Danach besteht ein fester Zusammenhang zwischen der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes und der Auflösung des Mikroskops; es scheint, als ob die Mikroskopie bei einer Auflösung von 200 nm an ihre absolute Grenze stößt.

Zur Betrachtung einzelner Moleküle oder gar Atome sind Auflösungen von wenigen bis zu Bruchteilen eines Nanometers (nm) erforderlich. Die Lösung liefert das Elektronenmikroskop bzw. etwas später das Rasterelektronenmikroskop (REM), bei denen anstelle der Lichtstrahlenbündelung mit optischen Linsen die Bündelung von wesentlich kurzwelligeren Elektronenstrahlen durch elektrische Felder tritt. Mit dem REM wird erstmals 1942 die Auflösung des Lichtmikroskops – so die nun zur Unterscheidung notwendige Bezeichnung der bisherigen Mikroskope – unterboten. Mit den heutigen Elektronenmikroskopen lassen sich Auflösungen bis etwa 0,1 nm erreichen.

Gleichwohl bedeutet die neue Entwicklung keinesfalls das Ende der Lichtmikroskopie, da sich beispielsweise die gerade für Biologie und Medizin so wichtige Untersuchung lebender Organismen mit dem Elektronenmikroskop prinzipbedingt nicht durchführen lässt. Vielmehr sind die theoretischen Arbeiten von Abbe Auslöser einer beachtlichen Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie bis zum heutigen Tage.



Abb. 1: Mikroskop um 1890,
Hersteller: Optische Werke C. Reichert, Wien;
aus Sammlung LTA. Bild LTA

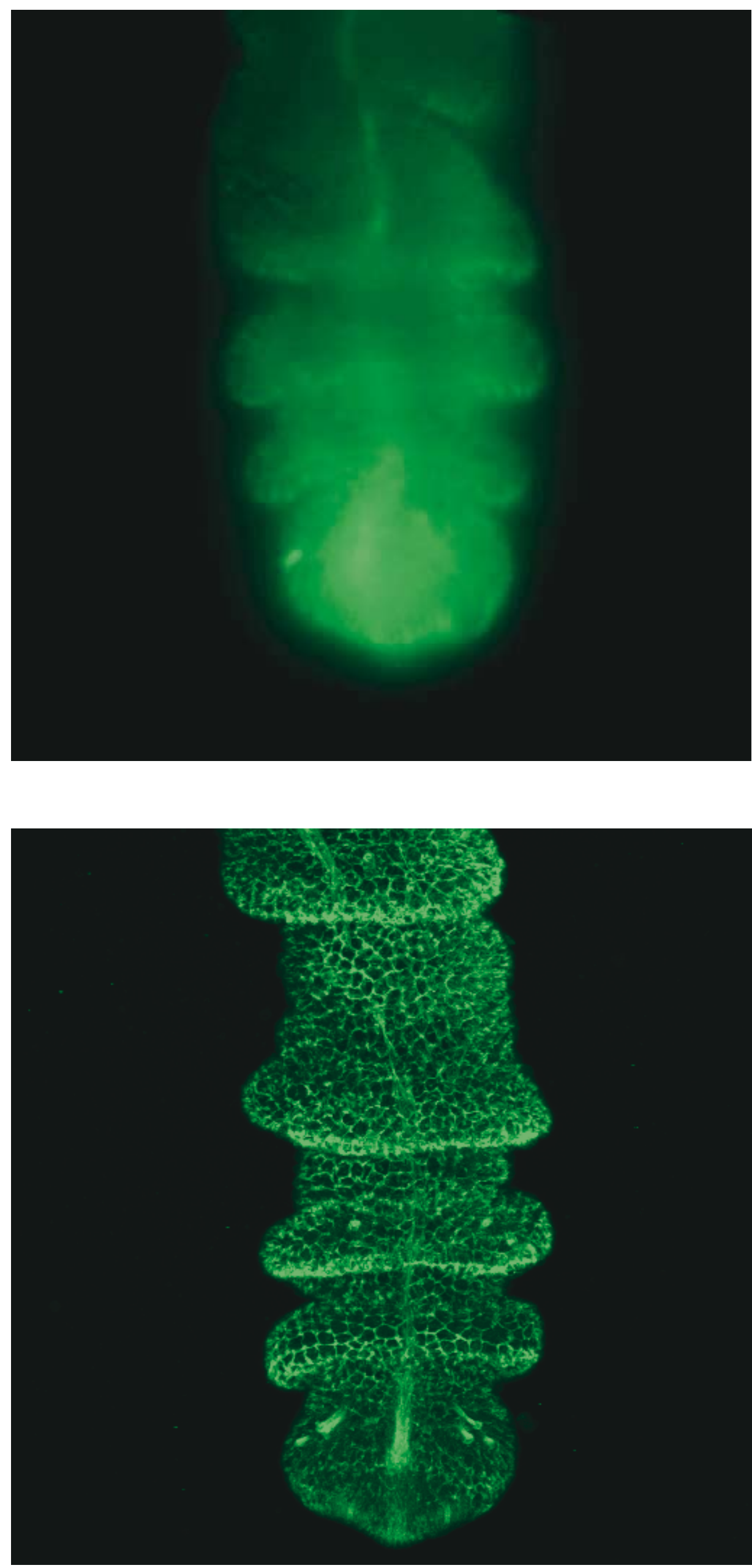


Abb 2: Nicht-konfokale Abbildung (oben) und konfokale Abbildung (unten) eines Beins von *Drosophila melanogaster* (Taufliege). Bild Leica Microsystems GmbH

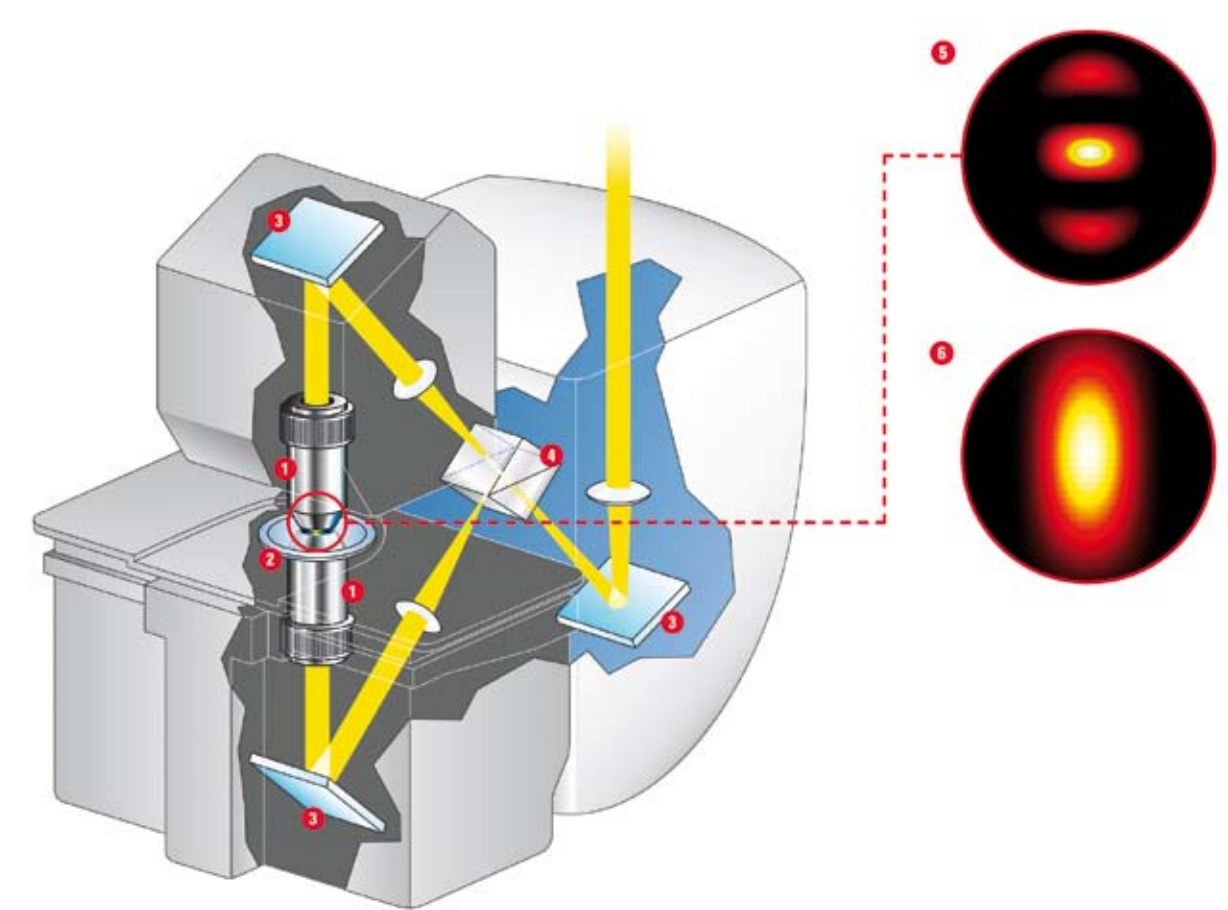


Abb. 3: Das „Geheimnis“ der 4Pi-Mikroskopie: Sie nutzt die Interferenz zweier Laserstrahlen durch zwei gegeneinander gerichtete Mikroskopobjektive zu höchstmöglicher Auflösung. Bild Leica Microsystems GmbH

Abb. 4: Aktuelles Konfokal Laser Scan Mikroskop Leica TCS SP5. Bild Leica Microsystems GmbH

Durch neue Glassorten und immer weiter verfeinerter Schleifmethoden werden Abbildungs- und Farbfehler reduziert und die optische Abbildungsleistung der Objektive bis heute praktisch an die theoretische Grenze gesteigert. Die Kontrastarmut speziell biologischer Objekte ist eines der Hauptprobleme der Lichtmikroskopie.

Frits Zernicke gelingt 1935 ein Verfahren zur deutlichen Kontraststeigerung. Für seine Phasenkontrastmikroskopie erhält er 1953 den Nobelpreis für Physik. Bei geeigneten Objekten zielt die Fluoreszenzmikroskopie (Amplitudenkontrast) ebenfalls auf Leistungssteigerung durch Kontrasterhöhung.

Die Abbesche Auflösungsgrenze von 200 nm für Lichtmikroskope bezieht sich auf die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes von 800 bis 400 nm. Mit kurzwelligeren Lichtquellen lässt sie sich unterbieten. So wird mit der UV-Mikroskopie (Wellenlänge UV-Licht < 310 nm) die Auflösungsgrenze auf unter 70 nm abgesenkt. Eine weitere Absenkung ist mit Röntgenstrahlen möglich, allerdings schädigt die höhere Strahlungsenergie lebende Organismen, weshalb diese Art der Lichtmikroskopie nicht in der Lifescience sondern in der Industriemikroskopie eingesetzt wird.

Beim 1957 durch Marvin Lee Minsky patentierten Konfokal-Mikroskop werden allein Objektpunkte aus der Brennebene für die Abbildung herangezogen. Damit geht eine deutliche Steigerung von Auflösung und Kontrast einher, da das Bild gegenüber dem des konventionellen Lichtmikroskops von den verschwommenen Abbildungen der Objektpunkte vor und hinter der Brennebene befreit ist (Abb. 2). Die Ausblendung dieses unfokussierten

Lichtes erfolgt über kleine Lochblenden. Es wird nur ein einziger Bildpunkt abgebildet. Für ein Gesamtbild muss deshalb das Objekt Punkt für Punkt gescannt und über einen Rechner digital aufbereitet werden. Im modernen Konfokalen Laser Scan Mikroskop (Abb. 4) erfolgt dies mit Laserlicht über zweidimensional bewegliche Scanspiegel quasi in Echtzeit. Der Lichtpunkt hat in der Objekt-Brennebene nur noch einen Durchmesser von 250 nm, und der „Schnitt“, der damit durch das Objekt gelegt wird, ist nur 500 nm dick. Dank digitaler Datenaufbereitung ist die dreidimensionale Darstellung beweglicher Objekte möglich.

Die von Abbe vor mehr als einhundert Jahren formulierten Grenzen der Lichtmikroskopie werden spätestens durch die 4pi-konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3) von 1990 voll ausgeschöpft und der Stimulated-Emission-Depletion Mikroskopie (STED) von 1994 überschritten, deren beider Grundlagen Stefan Hell (*1962) erarbeitet hat. Das Lichtmikroskop von morgen kann somit eine Kombination beider Prinzipien sein, wie 2002 erstmals berichtet wird: Das STED-4Pi Mikroskop hat eine Auflösung von 30 nm und gibt damit den Blick frei in das Innere einer lebenden Zelle mit einer bisher nicht erreichbaren Detailgenauigkeit.



Rasterelektronenmikroskop (REM)

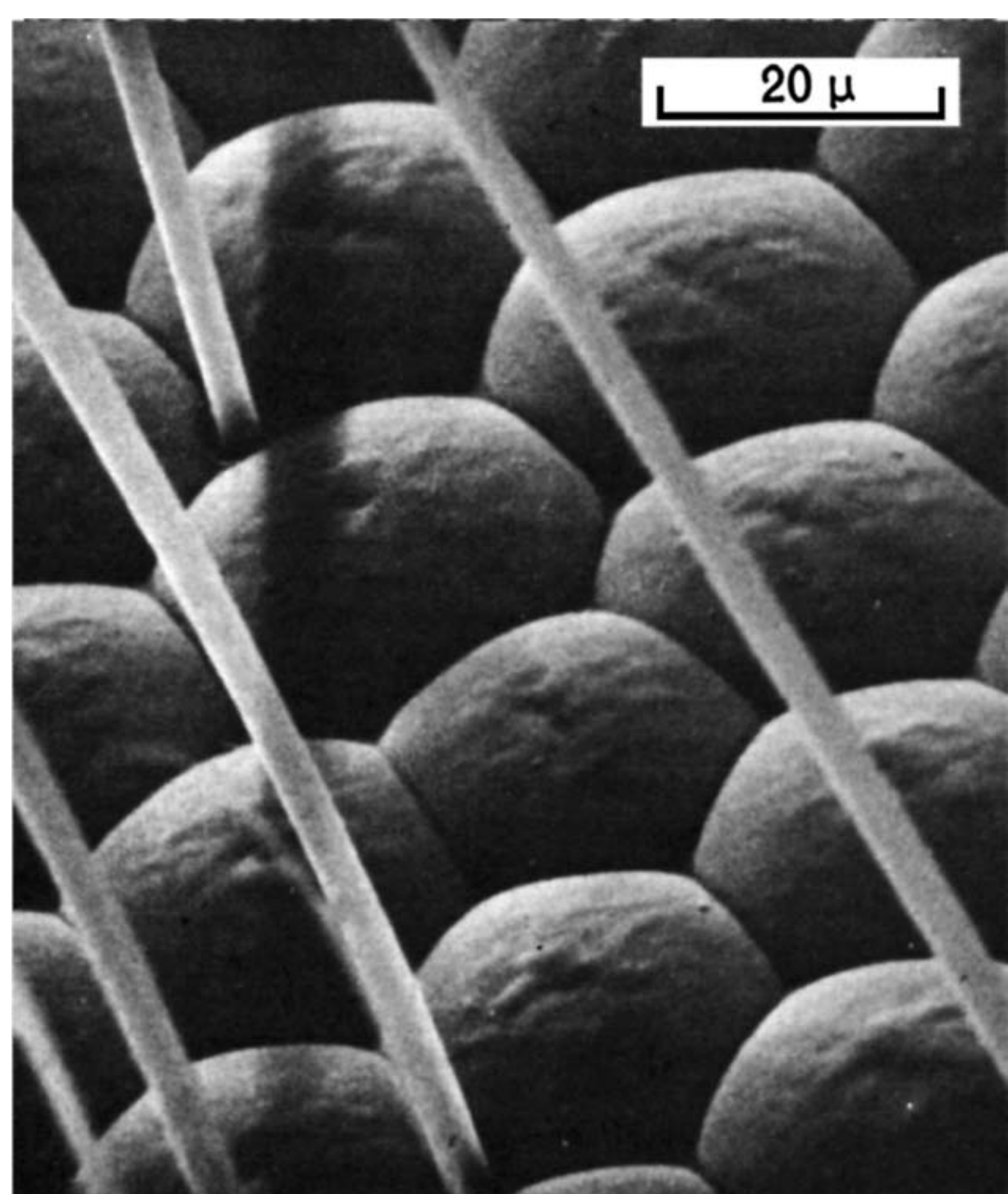


Abb. 1: REM-Aufnahme des Facettenauges eines Nachtfalters. Bild.. C.G. Bernhard, aus Endeavour, Bd. XXVI, Nr. 98, Mai 1967

Die Grundlagen der Elektronenmikroskopie schaffen L. de Broglie (1892 – 1987) mit seiner Theorie der Materiewellen (für die er 1929 den Nobelpreis für Physik erhält) sowie Hans Busch, der zeigt, dass sich Elektronenstrahlen mit Hilfe elektrischer Felder wie mit Linsen bündeln lassen. Mit diesen Erkenntnissen bauen Max Knoll und Ernst Ruska 1931 den ersten Prototypen eines Elektronenmikroskops (heute: Transmissionselektronenmikroskop TEM). 1935 beschreibt Knoll das rasterförmige Abtasten einer Oberfläche mit einem Elektronenstrahl und Manfred von Ardenne entwickelt 1937 hieraus das erste Rasterelektronenmikroskop (REM). Als Ruska 1986 für seine Verdienste mit dem Physik-Nobelpreis geehrt wird, sind TEM und REM in Wissenschaft und Technik längst fest etabliert.

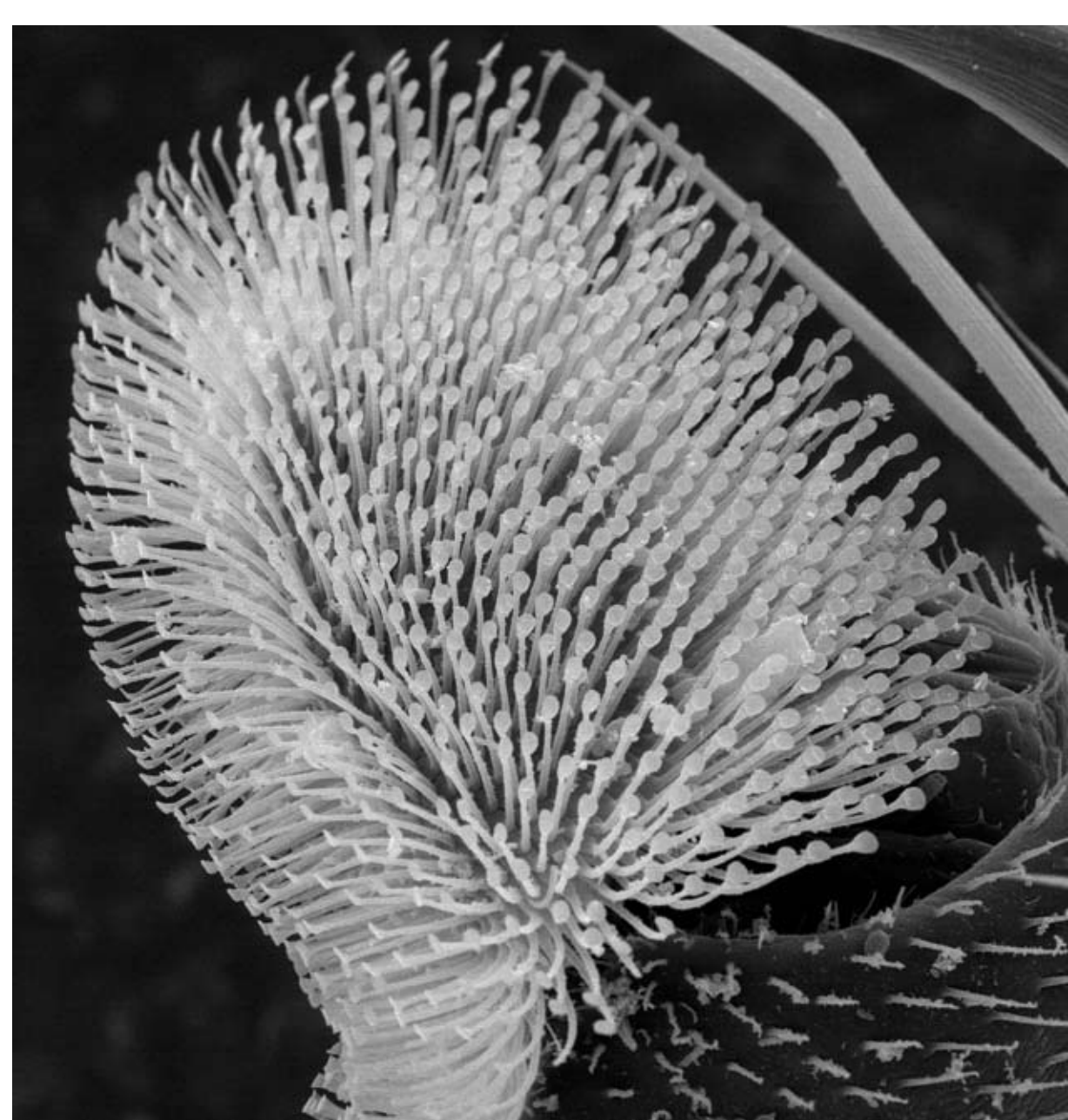


Abb. 2: REM-Aufnahme des Haftläppchens des Fliegenfußes einer Winterschwebfliege (Episyrphus balteatus). Bild S.Gorb, Max-Planck-Institut für Metallforschung, Stuttgart

Beide Bauarten nutzen die wesentlich geringere Wellenlänge des Elektronenstrahls gegenüber der Lichtwellenlänge des konventionellen Mikroskops, von der gemäß Abbe die erreichbare Auflösung abhängt. Der Elektronenstrahl wird unter Vakuum durch eine glühende, nadelförmige Wolframkathode (heute vermehrt auch LaB6- oder Feldemissionskathoden) erzeugt und mittels einer an eine Hochspannung angelegte, ringförmige Anode stark beschleunigt. Analog zum Lichtstrahl in einem Lichtmikroskop lässt sich der Elektronenstrahl durch elektromagnetische Felder (elektromagnetische Linsen) bündeln.

In einem Rasterelektronenmikroskop kann dieser Elektronenstrahl auf einen Durchmesser von bis zu 1 nm fokussiert und zeilenförmig mittels einer elektromagnetischen Ablenkung über die Probenoberfläche geführt werden. Beim Auftreffen auf die Oberfläche werden u.a. niederenergetische Sekundärelektronen ausgelöst, die, verstärkt und aufbereitet, synchron zur Probenrasterung Punkt für Punkt das Abbild der dreidimensionalen Probenoberfläche auf dem Bildschirm beschreiben.

Für die Rasterelektronenmikroskopie, die prinzipbedingt nur Abbildungen in schwarz-weiß liefert (Abb. 1/2), müssen die Proben normalerweise elektrisch leitend sein. Für biologische Proben bedeutet dies, dass zunächst eine dünne Metallschicht, meist Gold, aufgedampft wird. Da sich die Objekte noch zusätzlich in Vakuum befinden müssen, ist eine Untersuchung von lebenden Objekten mit dem REM ausgeschlossen.

Heutige Rasterelektronenmikroskope (Abb. 3) haben ein Auflösungsvermögen von bis zu 1 nm. Sie zeichnen sich durch eine gegenüber dem Lichtmikroskop um mehrere Größenordnung höhere Schärfentiefe aus, weshalb sie besonders zur plastischen Darstellung dreidimensionaler Oberflächen geeignet sind.

Abb. 3: Rasterelektronenmikroskop (REM) Zeiss ULTRA 55. Bild Carl Zeiss NTS GmbH



Mikroskop-Präparate

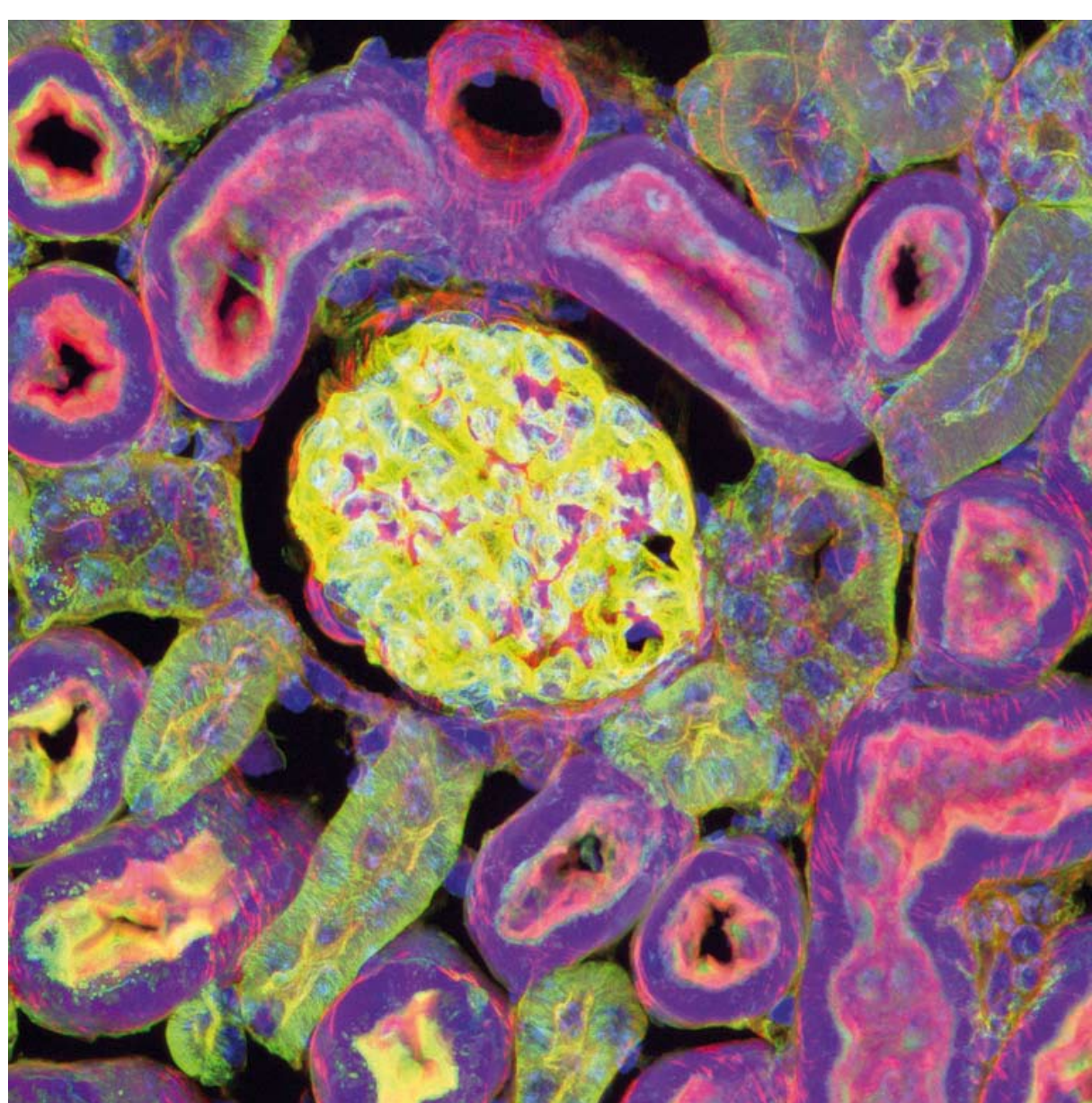


Abb. 1: Lichtmikroskoppräparat: Niere einer Maus. Bild Leica Microsystems Nussloch GmbH



Abb. 2: Vollautomatisiertes Mikrotom mit rotierender Scheibe Leica DSC1. Bild Leica Microsystems Nussloch GmbH

Heute mögliche Mikroskopauflösungen (STED-4Pi Lichtmikroskop 30 nm, Rasterelektronenmikroskop (REM) 1 nm, Transmissionselektronenmikroskop (TEM) 0,1 nm) sind in der Praxis meist nicht erreichbar, da die Voraussetzungen bei der Präparateherstellung nicht gegeben sind. Trotz erheblichem Aufwand bei der Vorbereitung und stetig verbesserter Methoden bleibt auch heute noch die Gefahr der Artefaktbildung (d.h. die abgebildete Struktur entspricht nicht der Wirklichkeit sondern ist Folge der Präparation).

In der Lichtmikroskopie interessiert vor allem das Innere eines Objektes. Deshalb wird ein dünner Querschnitt (Abb. 1) von diesem angefertigt und flach zwischen Objekträger und Deckglas gelegt. Es leuchtet unmittelbar ein, wie abhängig das Ergebnis von der Überführung des Präparates auf den Träger und von der Güte des Schnittes ist, ob die Schnittfläche beispielsweise gestaucht oder abgesichert wurde. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, werden Mikrotome eingesetzt; dies sind maschinelle Schneidgeräte für voreinstellbare Schnittdicken von unter 10 µm (Abb. 2).

In der Transmissionselektronenmikroskopie ist die Probenpräparation noch aufwendiger. Prinzipbedingt können nur extrem dünne Schnitte untersucht werden, wofür ein Ultramikrotom für Schnittdicken von 15 bis 100 nm benötigt wird. In der Rasterelektronenmikroskopie interessiert vornehmlich die Oberfläche bzw. die Struktur des Objektes. Es werden ganze Proben und keine Ultradünnschnitte untersucht. Dennoch ist auch hier

die Präparateherstellung nicht unproblematisch: So muss die Probe elektrisch leitfähig sein, was speziell bei biologischen Objekten die Bedampfung beispielsweise mit einer dünnen Goldschicht erfordert (Abb.3). Ferner müssen biologische Proben entwässert werden, da sie wegen der Mikroskopierung unter Vakuum ansonsten kollabieren würden.

In der Rasterelektronenmikroskopie interessiert vornehmlich die Oberfläche bzw. die Struktur des Objektes. Es werden ganze Proben und keine Ultradünnschnitte untersucht. Dennoch ist auch hier die Präparateherstellung nicht unproblematisch: So muss die Probe elektrisch leitfähig sein, was speziell bei biologischen Objekten die Bedampfung beispielsweise mit einer dünnen Goldschicht erfordert. Ferner müssen biologische Proben entwässert werden, da sie wegen der Mikroskopierung unter Vakuum ansonsten kollabieren würden. Die Untersuchung lebender Objekte mit dem REM und TEM ist damit ausgeschlossen.



Abb. 3: REM-Probenhalter mit vergoldeter Stubenfliege (Musca domestica). Bild eye of science