DAS PRINZIP DES ELEKTRONENMIKROSKOPES

download unter www.biologiezentrum.at

Mit 8 Abbildungen

Von L. H. BRETSCHNEIDER, Utrecht
(Dozent für Histologie am Zoologischen Institute der Universität Utrecht und biologischer Mitarbeiter des Institutes für Elektronenmikroskopie in Delft)

Die Wellenlänge des Lichtes begrenzte an sich einen weiteren Fortschritt des optischen Auflösungsvermögens unserer lichtoptischen Mikroskope. Schon ABBE erbrachte im Jahre 1876 den mathematischen Beweis, daß ein Objekt von der Größe der mittleren Wellenlänge des sichtbaren Lichtes ($\lambda = 5550$ Å) nicht mehr objektähnlich abzubilden ist. Es werden vielmehr nur unscharfe Flecken erzeugt, die keinerlei Einzelheiten sehen lassen. Die Lichtstrahlen werden um den Rand des Teilchens gebeugt und umspülen es sozusagen. Die höchsten Trockensysteme erreichten ihre zulässige Grenze mit einem Auflösungsvermögen von Objektabständen von 0,0005 mm (d. h. 0,5 μ); die zu Ende des vorigen Jahrhunderts durch STEPHENSON und ABBE eingeführten homogenen Ölimmersionen mit 0,3 μ. Durch die Anwendung von kurzwelligem Ultraviolettlicht ($\lambda = 3000$ Å) im Jahre 1904 durch KÖHLER erreichte man schließlich die absolute optische Grenze der Auflösung von Objektabständen von 0,1 μ. Jeder weitere sich anschließende Ausbau lichtoptischer Mikroskope betrifft lediglich den mechanischen Stativbau, wie z. B. Objektiv- und Okularrevolver, binokulares Sehen, Einbau der Lichtquelle, der Film- oder Plattenkamera usw., Verbesserungen, die zu den heutigen bequemen Universalinstrumenten führten („Citophot", „Metaphot", „Panphot", „Me F" u. a.), das optische Auflösungsvermögen aber nicht zu steigern vermögen. Außer der Wellenlänge des Lichtes als begrenzender Faktor spielt die Beugung am Rande von Objekten eine mitbestimmende Rolle, denn beim Zusammenfallen von Wellenlänge und Objektabstand wird das Lichtbündel am Objektrand so stark gebeugt, daß keine Objektabbildung mehr zustande kommen kann. Der Grundgedanke zur Verbesserung des mikroskopischen Sehens lag daher im Finden und Anwenden noch kürzerer Wellen, als es die ultravioletten mit $\lambda = 3000$ Å sind. Dieses Ziel rückte plötzlich näher, als DE BROGLIE im Jahre 1925 die Wellennatur bewegter Elektronen erkannte und ihre zugehörige Länge durch die Formel: $\lambda_e \cong \sqrt{\frac{150}{V}} \cdot 10^{-7}$ mm (wobei V der Spannungsunterschied in Volt bedeutet) bestimmte. Die äquivalente Wellenlänge ist dann bei einigen 10.000 Volt um vieles kleiner als die des Lichtes und beträgt z. B. bei 50.000 Volt $\frac{150}{50.000}$ Å $=$ $= 0{,}055$ Å, d. h. sie ist annähernd 100.000mal kleiner als die des sichtbaren Lichtes. Mit dieser fundamentalen Erkenntnis war dem heutigen Elektronenmikroskop prinzipiell die Strahlenart gegeben, und der nächste Weg war die Erschließung einer geometrischen Elektronenoptik, die den Gebrauch der

download unter www.biologiezentrum.at

Abb. 1. Strahlengang der elektrostatischen Linse.

Abb. 2. Strahlengang der elektromagnetischen Linse.

Abb. 3. Elektromagnetische Linse mit Polschuh. Entwirft ein starkes drehsymmetrisches Magnetfeld.

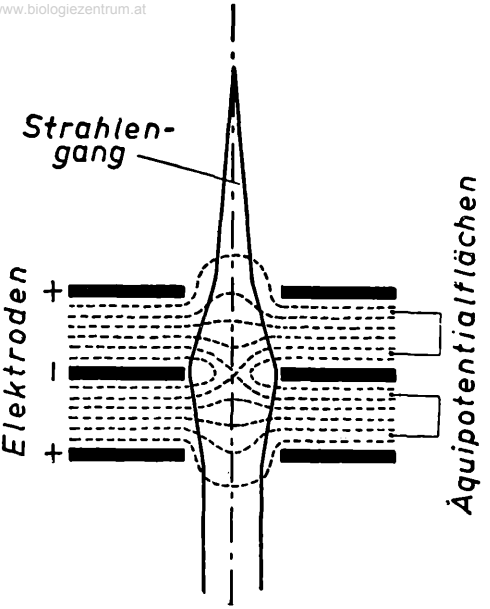

Abb. 1.

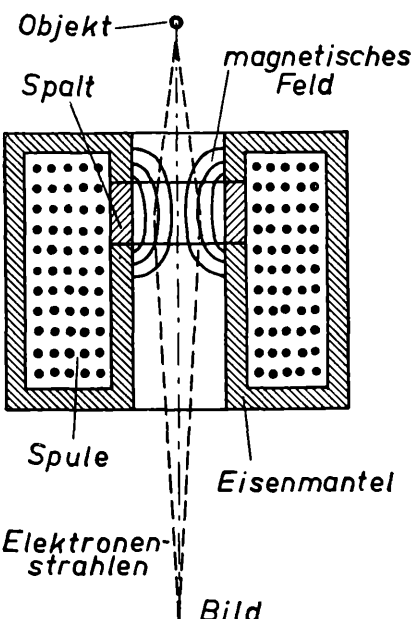

Abb. 2.

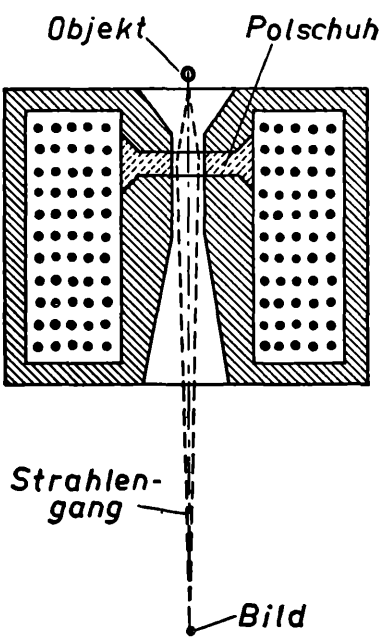

Abb. 3.

Elektronenstrahlen als optisches Instrument erst ermöglichte. Obwohl die Elektronenstrahlen sog. Korpuskularstrahlen sind, d. h. von geladenen Teilchen stammen und daher nicht wie das eigentliche Licht in die Reihe der elektromagnetischen Schwingungen fallen, gehorchen sie dennoch geometrisch-optischen Gesetzen, die mit den licht-optischen vergleichbar sind. So lassen sich Elektronenstrahlen ebenfalls durch den Wechsel des Mediums, in dem sie sich fortpflanzen, wie Lichtstrahlen brechen. Für den Elektronenstrahl, dessen Auftreten an ein hohes Vakuum gebunden ist, bedeutet ein elektrisches oder magnetisches Feld einen solchen Mediumwechsel, weshalb rotationssymmetrisch um die sich linear fortbewegenden Elektronen gruppierte Felder eine „Linsenwirkung" besitzen (Abb. 1). Die Elektronenladung wirkt sich nämlich sowohl in einem elektrischen als auch magnetischen Kraftlinienfelde im selben Sinne durch eine Ablenkung der geradlinigen Bahn aus, wie durchsichtige Prismen oder axialsymmetrische Glaslinsen den Lichtstrahl brechen. Dieses Phänomen führte zur Ausgestaltung zweier verschiedener „Elektronenlinsen", zu der sog. elektromagnetischen durch BUSCH (1927) und der elektrostatischen durch DAVISSON & CALBICK (1931 bis 1932). In Europa und Nordamerika wurden nun mit beiden Linsenprinzipien Elektronenmikroskope gebaut. Ausschließlich elektromagnetische Linsen besitzt zum Beispiel das holländische Elektronenmikroskop von LE POOLE (Delft), das Siemens-Mikroskop von RUSKA & KNOLL, das englische von VICKERS (Manchester), das amerikanische von HILLIER & PREBUS (Toronto); elektrostatische Linsen besitzt u. a. das Schweizer Mikroskop von TRÜB & TÄUBER (Zürich), das Mikroskop der AEG von MAHL (Berlin) und das französische Mikroskop der Comp. Gén. de T. S. F.

Die elektromagnetische Linse

Sie besteht aus einer zylindrischen Spule, einem sog. Solenoid, die in einer eisernen Kapsel eingeschlossen ist (Abb. 2). In der inneren Lichtung dieses Solenoides befindet sich ein ebenfalls zylindrischer Spalt, durch welchen die Kraftlinien in das Vakuum des Strahlenganges austreten können und dabei konzentriert werden, trotzdem aber rotationssymmetrisch bleiben. Der durch die Spule geleitete Strom macht diese zum Magnet. Es ist begreiflich, daß diese Spulen sehr sorgfältig ausgearbeitet sein müssen, um fehlerfreie Bilder zu entwerfen. Die Abb. 2 zeigt uns den Kraftlinienverlauf und die Ablenkung der Elektronenstrahlen.

Die elektrostatische Linse

Diese besteht im Prinzip aus drei scheibenförmigen parallel gestellten Elektroden, in denen sich eine zentrale Bohrung befindet. Die mittlere Elektrode wird mit der Glühkathode des Instrumentes kurzgeschlossen, die mit etwa 50.000 Volt gegen die geerdete Anode aufgeladen ist, während die beiden äußeren Elektroden auf Anodenpotential, d. h. also Erdung, liegen

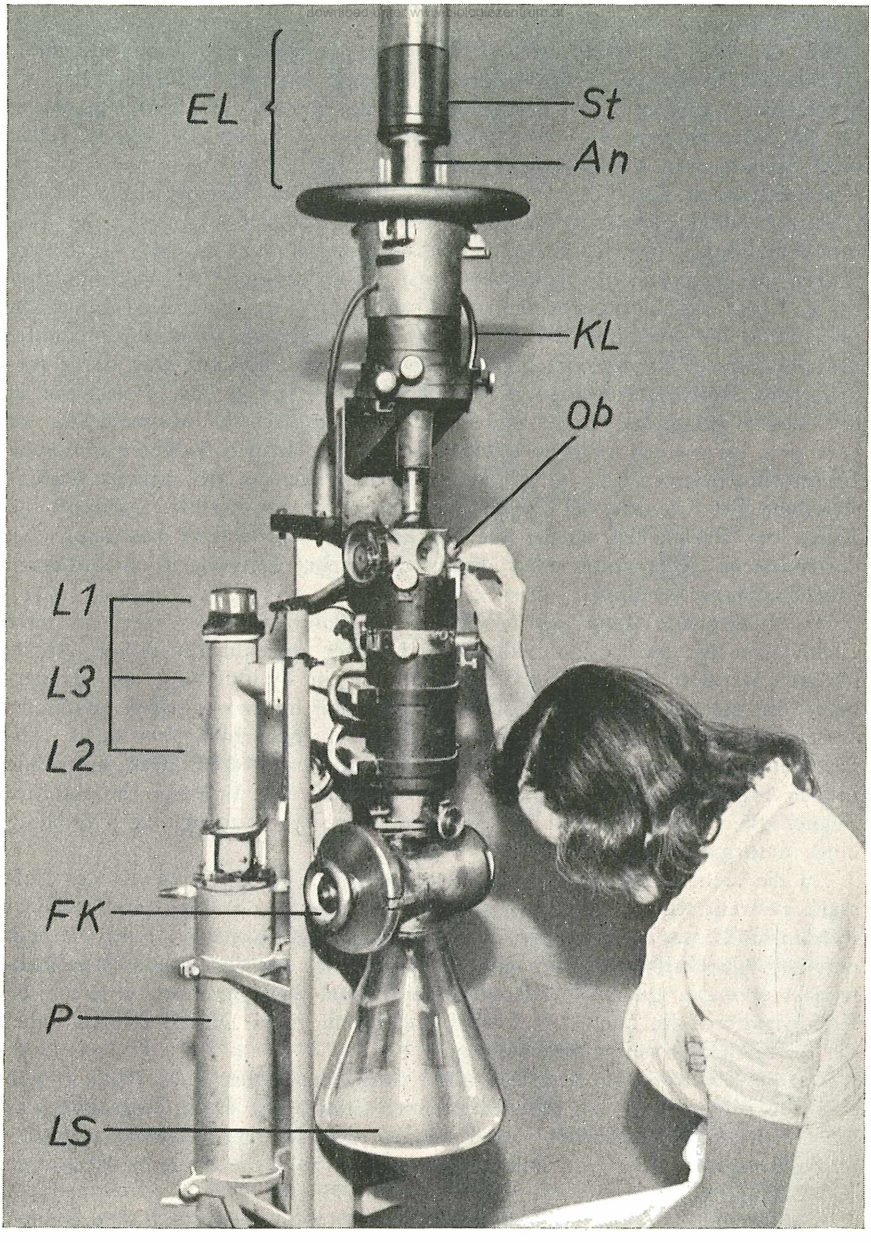

Abb. 4. Elektronenmikroskop aus Delft (elektromagnetisches).

EL Elektronenlampe, An Anode, St Steuerhülse, KL Kondensorlinse, Ob Objektschleuse, FK Filmkamera, P Pumpe, LS Leuchtschirm. L1 Objektivlinse, L2 Projektorlinse. L3 Zwischenlinse. (Original mit Genehmigung des „Institutes für Elektronenmikroskopie" Delft.)

(Abb. 1). Das Kraftfeld tritt teilweise in die Bohrung, wobei die äquipotentialen Schichten in besonders gebildeten Kurven verlaufen, die als brechendes „Medium“ der Elektronenstrahlen dienen. Die Linsenspannung ist also dieselbe wie die der Elektronenquelle, während die Linsen selbst ohne Strombedarf, also leitungslos, arbeiten.

Beide Linsen haben ihre Vor- und Nachteile. Die elektrostatische ist der Glaslinse näher verwandt, sie besitzt eine Achromasie gegenüber der Kathodenspannung, wodurch Spannungsschwankungen nicht zu einer Unschärfe führen und gestalten die Mikroskopkonstruktion billiger. Die elektromagnetische Linse hat dahingegen den großen Vorteil einer „flexiblen“ Linse, da man durch die Regelung der Stromstärke in der Spule ihren Brennpunktsabstand bequem kleiner oder größer machen kann und damit eine stetig veränderbare Bildvergrößerung erzielt. Durch den Einbau sog. Polschuhe in die Spulen gelang es, kurze und stark drehsymmetrische Magnetfelder zu erzeugen, in welchen auch noch sehr schnelle Elektronenstrahlen eine kleine Brennweite liefern (Abb. 3). Dies ermöglicht wiederum eine bessere Durchstrahlung der Objekte bei einem geringeren Strahlenverlust, während die Kürze der Brennweite wieder die Stärke der Vergrößerung bestimmt. Die chromatische Aberration wird durch eine sehr weitgehende stabilisierte Hochspannung verhindert.

Als Lichtquelle dient eine Wolframdraht-Glühkathode, deren emitierte Elektronen mit großer Schnellheit nach einer gegenübergestellten Anode gezogen werden. Um diese Kathode verläuft ein Zylinder, die sog. Steuerhülse, die zusammen mit dem Glühdraht auf einer hohen negativen Spannung steht, während die Anode geerdet ist. In dieser Steuerhülse werden die abgestoßenen Elektronen gerichtet und konzentriert und treten durch die Anode in den Strahlengang des Mikroskopes ein (Abb. 4). Von hier ab ist ihre Schnelligkeit konstant, und dies ist eine der Bedingungen zur Erzielung eines naturgetreuen Bildes.

Da die sich schnell fortbewegenden Elektronen an den Atomen der Luft stark gestreut würden, muß der gesamte Strahlengang weitgehend evakuiert werden, und zwar auf weniger als 1 Millionstel Atmosphäre. Hierfür sorgt eine sog. Quecksilberdiffusionspumpe, bei welcher der durch Gas oder Elektrizität erzeugte Quecksilberdampf in einer von flüssiger Luft unterkühlten Kondensationsfalle kondensiert wird und durch einen Diffusionsspalt dabei die Luftmoleküle weitgehend absaugt.

Da die Elektronenstrahlen für unser Auge unsichtbar sind, bedient man sich zur Bildregistrierung fluoreszierender Stoffe, wie z. B. Zinksulfid, das auf einem Schirm angebracht, die Energie der Elektronen in sichtbare Lichtstrahlen umsetzt, oder man läßt sie eine photographische Schichte schwärzen (Abb. 4 und 5).

Eine besondere Aufmerksamkeit mußte dem Objektträger und dem Kreuztisch zugewendet werden, wenn man bedenkt, daß das Präparat bei solch hohen Vergrößerungen auf etwa 1 Millionstel Millimeter unbeweglich auf seinem Platze gehalten, respektive durch nur sehr geringe mechanische Be-

download unter www.biologiezentrum.at

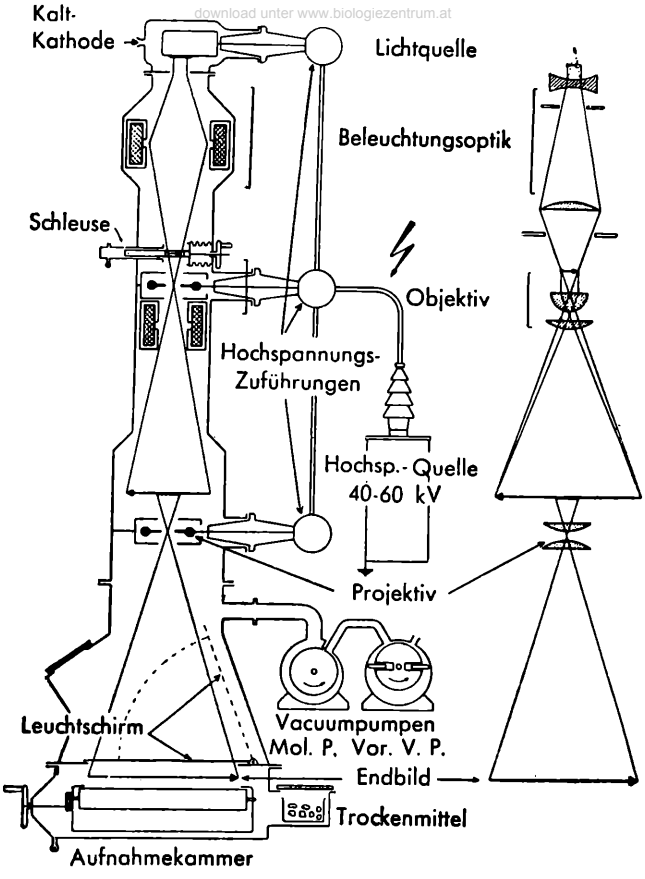

Abb. 5. Schweizerisches Elektronenmikroskop (elektrostatisches) TRÜB, TÄUBER & Co. A. G., Zürich. Rechts als Vergleich Strahlengang eines Lichtmikroskopes mit gleichem Aufbau.

wegungen zur richtigen und wahlweisen Einstellung verschoben werden muß. Durch eine zweckmäßige Objektträgerschleuse wird das Objekt in das Vakuum des Strahlenganges eingeschleust (Abb. 4). Dabei soll, um langwieriges Evakuieren zu vermeiden, die mitgenommene Luftmenge nur sehr gering sein.

Dies sind so die wichtigsten Teile des Elektronenmikroskopes. Prinzipiell stimmt ihre Anordnung wie: die Glühkathode als Lichtquelle, die Kondensorlinse, Objektiv- und Projektorlinse (Okularlinse) als Optik, Leuchtschirm oder photographische Emulsion als Registrierung überein mit den üblichen Lichtmikroskopen. Bei den einfacheren elektrostatischen Mikroskopen (Ab-

download unter www.biologiezentrum.at

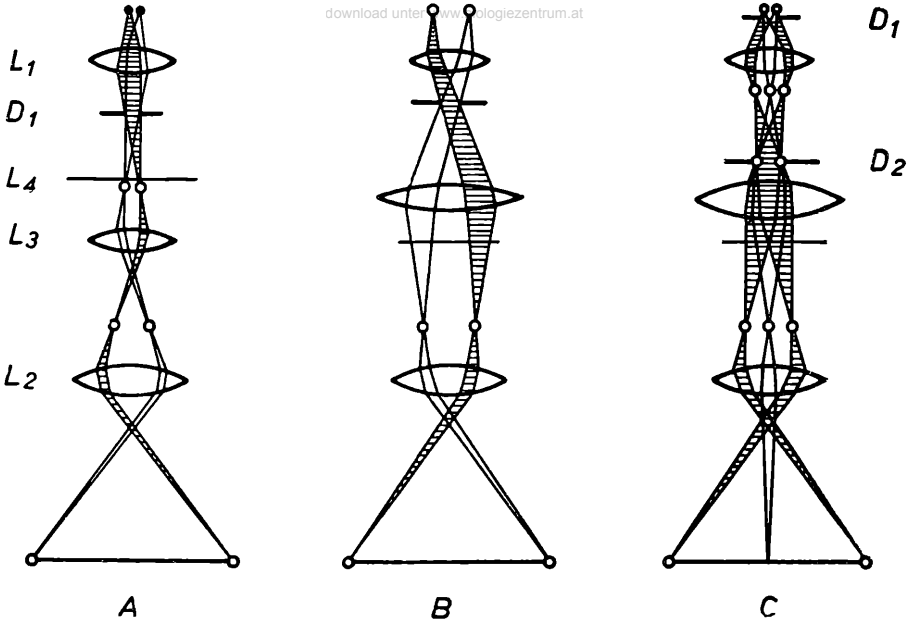

Abb. 6. Schematische Darstellung des Strahlenganges im Delfter Elektronenmikroskop. Schema nach LE POOLE 1947.

L 1 Objektiv, L 2 Projektor, L 3 Zwischenlinse, L 4 Diffraktionslinse, D 1 Objektivdiaphragma, D 2 Diffraktionsdiaphragma. Linsenform bedeutet: eingeschaltete Linse, Strich bedeutet: ausgeschaltete Linse.

A Die Zwischenlinse ist eingeschaltet; Vergrößerungen von 6000 bis 80 000 × in kontinuierlichem Anstieg.

B Diffraktionslinse eingeschaltet: umbiegen der Objektivstrahlen und daher Verkleinerung des Bildes. Vergrößerungen von 1000 bis 6000 × in kontinuierlichem Aufstieg.

C Mikroskopeinstellung für das Beugungsdiagramm. Das Elektronenmikroskop ist auf die Vergrößerung O eingestellt, das Objektivdiaphragma ist hochgestellt. Nur das Primärbild des Objektivs wird durch Diffraktionslinse und Projektor auf dem Schirm vergrößert dargestellt.

bildung 5) wird mittels einer Blende das Elektronenbündel sogleich auf das Objekt fokusiert. Die darunterliegende Abbildungslinse (Objektivlinse) erzeugt vom Objekt ein Durchstrahlungsbild vor der zweiten sog. Projektionslinse. Ein kleiner abgeblendeter Bildausschnitt wird von dieser Linse stark weiter vergrößert auf den Leuchtschirm projektiert. Bei dem derzeitigen Schweizer Elektronenmikroskop wird die Schwierigkeit der Scharfstellung elektrostatischer Linsen durch die Kombination mit einer magnetischen Linse kompensiert (Abb. 5). Das Delfter Elektronenmikroskop, ein elektromagnetisches, wurde durch seinen Erfinder Ing. LE POOLE seit 1942 in mannigfacher Hinsicht verbessert und unterscheidet sich von

download unter www.biologiezentrum.at

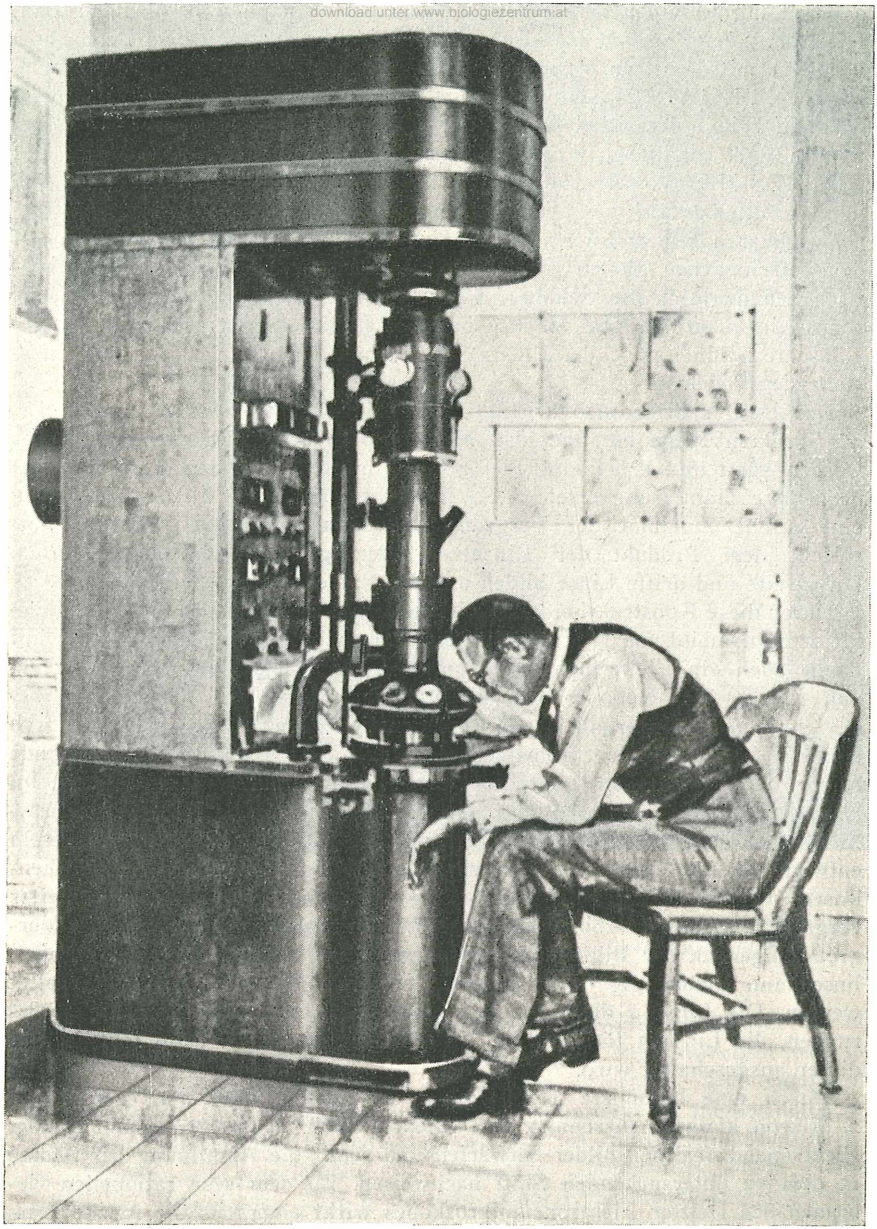

Abb. 7. Elektronenmikroskop zur Kautschukuntersuchung der American Goodyaer Tire and Rubber Co. Nach einer Zeichnung von T KAUTZKY

anderen durch seinen originellen auf eigenen Prinzipien beruhenden Bau. Die Abb. 7 zeigt ein amerikanisches Industriemikroskop mit dem Beobachter vor dem mit Fenstern versehenen Schirmraum. Auch die niederländische Firma „PHILIPS", als Glühlampen- und Radioindustrie weitgehend bekannt, bringt derzeit dieses Delfter Elektronenmikroskop in einer ästhetischen und handlichen Form in den Handel (Abb. 8). Die Achse des PHILIPS-Mikroskopes „M. E. 100" ist schräg aufwärts gestellt, so daß man unmittelbar auf den Leuchtschirm sieht, dessen Bild man mit der einschwenkbaren Lupe absuchen kann. Unterhalb des Schirmes kann man auf den verschiedenen Skalen die Spannungen ablesen, rechts am Bedienungstisch befinden sich die Schalter, während die Pumpe im Bedienungstische selbst eingebaut ist. Die Hochspannungsinstallation, mit der man die gewünschte Schnelligkeit der Elektronen erzeugt, befindet sich in dem linksstehenden Gehäuse.

Das Delfter Mikroskop arbeitet nicht mit zwei, sondern 4 Linsen, was zur direkten Folge hat, daß das Mikroskop in seiner Ausdehnung kürzer werden kann und dabei eine viel größere mechanische Stabilität und eine bequemere Hantierung erreicht. Zweitens bedeutet diese Linsenvermehrung eine rasche Zunahme der Vergrößerung, denn die Endvergrößerung entspricht dem Produkt der Einzelvergrößerungen der einzelnen Linsen. Die zweite und dritte Linse bilden mit der Projektionslinse eine Einheit.

Durch diese Konstruktion konnte LE POOLE nicht nur das überall übliche kleine Schirmbild von 7,5 cm auf 18 cm Durchmesser bringen, sondern schuf damit auch ein Elektronenmikroskop, das das ganze Vergrößerungsgebiet von 1000 × bis 50.000 × (bei der Nachvergrößerung bis 100.000 ×) bestreicht und die innerhalb dieser Grenzen liegenden Vergrößerungen durch einfache Regelung der Stromstärke in den Linsen kontinuierlich zustande bringt, ohne daß an dem Instrument etwas verändert zu werden braucht. Im Strahlengang des Delfter Elektronenmikroskopes fokusiert die Kondensorlinse das Elektronenbündel sinngemäß auf das Objekt (Abb. 6). Von diesem entwirft die Abbildungslinse ein vergrößertes Bild, das durch die Zwischenlinsen (wahlweise) zusammen mit der Projektionslinse wieder stark weiter vergrößert wird. Die Abbildungs- und Projektionslinse nimmt bei allen Vergrößerungen an der Bilderzeugung teil, die dazwischen geschaltete Doppellinse kann unabhängig davon jede für sich jeweils ein- oder ausgeschaltet werden. Die Linse 2 dient für das Zustandekommen schwacher Vergrößerungen, die Linse 3 für stärkere Vergrößerungen, wobei dann jeweils eine dieser ausgeschaltet wird.

Durch eine besondere Kombination der Linsen kann man von einem 2 Mikron kleinen Ausschnitt des Objektes auch Beugungsdiagramme sog. Elektronendiffraktionsbilder entwerfen und somit die Anordnung der Atome in dem zu untersuchenden Stoff nachweisen. Zu dem sehr rationellen Gebrauch des Delfter Elektronenmikroskopes wirkt einerseits die rasche Auswechslung der Objekte mit, andererseits der originelle Einbau einer Kleinbild-Filmkamera, die eine Anfertigung von 30 Einzelaufnahmen er-

Abb. 8. Das holländische Elektronenmikroskop PHILIPS E. M. 100. (Mit Genehmigung der Philipswerke, Eindhoven, Holland.) Es ist die industrielle Ausführung des in Abb. 4 widergegebenen Laboratoriuminstrumentes.

möglicht, während bei den üblichen anderen Elektronenmikroskopen nur Plattenaufnahmen möglich sind, die einen steten Plattenwechsel und das hiermit verbundene zeitraubende Evakuieren erfordern. Die eigentliche Dokumentation in der Elektronenmikroskopie beruht auf der photographischen Aufnahme. Die visuelle Beobachtung, wie wir sie von der Lichtmikroskopie her kennen, das Abzeichnen und subjektive Untersuchen, wobei Nebensächliches weggelassen wird, kennt man in der Elektronenmikroskopie nicht. Auch arbeitet man im dunklen Raume, und das Schirmbild darf nicht allzu licht sein, denn es würden dann bald Artefakte auftreten (Elektronen-

bombardement). Daher werden an die photographische Aufnahme große Anforderungen gestellt. LE POOLE löste dieses Problem in sehr eleganter Weise. Es würde natürlich schwierig sein, das bei dem Delfter Elektronenmikroskop 180 mm große Gesichtsfeld in der Höhe des Leuchtschirmes durch so große photographische Platten aufzunehmen, es sei denn, man verzichtete auf das beobachtete Gesamtbild und würde nur einen kleinen Ausschnitt herausphotographieren. Le POOLE gelang es aber, eine Kleinbild-Filmkamera (Filmbreite 35 mm) so dicht bei der Projektionslinse in den Strahlengang einzubauen, daß dort noch das gesamte Gesichtsfeld zur Abbildung gelangt. Die geringen Aperturen in der Elektronenmikroskopie veranlassen, daß dort auch das Bild ebenfalls scharf eingestellt ist. Das auf diese Weise erreichte Filmbild ist etwa $^1/_5$ so groß als das visuelle Schirmbild, und da das Auflösungsvermögen (Korndichtheit) der photographischen Schichte stärker ist als die des Auges, können die Filme 5- bis 10mal nachvergrößert werden. Auch gestattet die unmittelbare Nähe des Filmes von der Projektionslinse eine nur kurze Belichtungszeit zwischen 2 und 5 Sekunden, weil das Strahlenbündel noch auf einem kleinen Raum konzentriert ist. Durch eine einfache Einrichtung kann man die Kamera in den Strahlengang einschwenken, wobei außerdem eine automatische Vorrichtung für das Weiterschieben des Filmes sorgt, um eine Doppelbelichtung zu vermeiden. Die Auswechslung der Filmkassette und das damit verbundene Nachpumpen erfordert beim Delfter Elektronenmikroskop nur 10 Minuten. Aus begreiflichen Gründen kommt bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung alles auf die scharfe Einstellung des Endbildes an. LE POOLE konstruierte hierfür eine besondere „Fokusiervorrichtung", die eine genaue Scharfstellung gestattet. Auch arbeitet dieses Instrument mit einer höheren Spannung, nämlich bis zu 100.000 Volt (100 kV) als andere Mikroskope. Diese höhere Beschleunigungsspannung läßt auch die Durchstrahlung dickerer Objekte (bis zu einem Mikron) zu und entwirft ein scharfes und lichtstarkes Bild. Der ionisierende Einfluß der Elektronen, als Schädigung des Objektes gefürchtet, nimmt außerdem mit der zunehmenden Schnellheit der Elektronen ab.

Mit dem Elektronenmikroskop, dem das Gebiet zugewiesen ist jenseits des $^1/_{2000}$ Millimeters, wird uns eine neue „elektronenmikroskopische Welt" eröffnet. Gleichzeitig mit der Anwendung und noch steten Verbesserung des Instrumentes wird sich auch eine hinzugeordnete elektronenmikroskopische Technik entwickeln müssen, die in Anbetracht der erforderlichen geringen Dicke (maximal 1 Mikron) der zu untersuchenden Objekte andere Wege gehen muß als die bisherige lichtoptische Färbetechnik. Dazu kommt außerdem noch, daß das Bild auch anders zustande kommt als im Lichtmikroskop und daher andere differenzierende Kontrastmittel erfordert. In einem folgenden Artikel werden das Zustandekommen des elektronenmikroskopischen Bildes, die Vorbereitung des Objektes und einige der bisherigen Anwendungsmöglichkeiten beschrieben werden.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik

Jahr/Year: 1948

Band/Volume: 3

Autor(en)/Author(s): Bretschneider Ludwig H.

Artikel/Article: Das Prinzip des Elektronenmikroskopes. 12-22