

7. Vorlesung Mikroskopische Bildgebung

Wahlpflichtmodul 9522: EI-M im 1. und 3. Fachsemester - WS 2015/2016

Initialisierung

22. Januar 2016

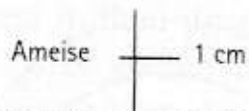
Lichtblattmikroskopie

Nico Scherf - MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik

Elektronenmikroskopie

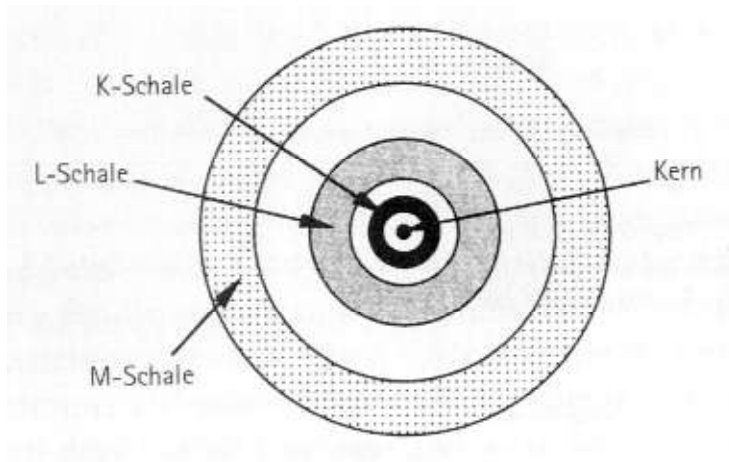
- ab 1930er Jahre
- atomare Strukturen im industriellen Bereich
- analytische EM erlaubt Nachweis und chem. Analyse von Nanostrukturen
- EM: Instrument, dessen Ergebnisse interpretiert werden müssen
- d.h. es müssen Vorstellungen bestehen über Umrisse, Form, Größe, Farbe
- d.h. Interpretation der Bilder via theoretischer Überlegungen

Längenskalen

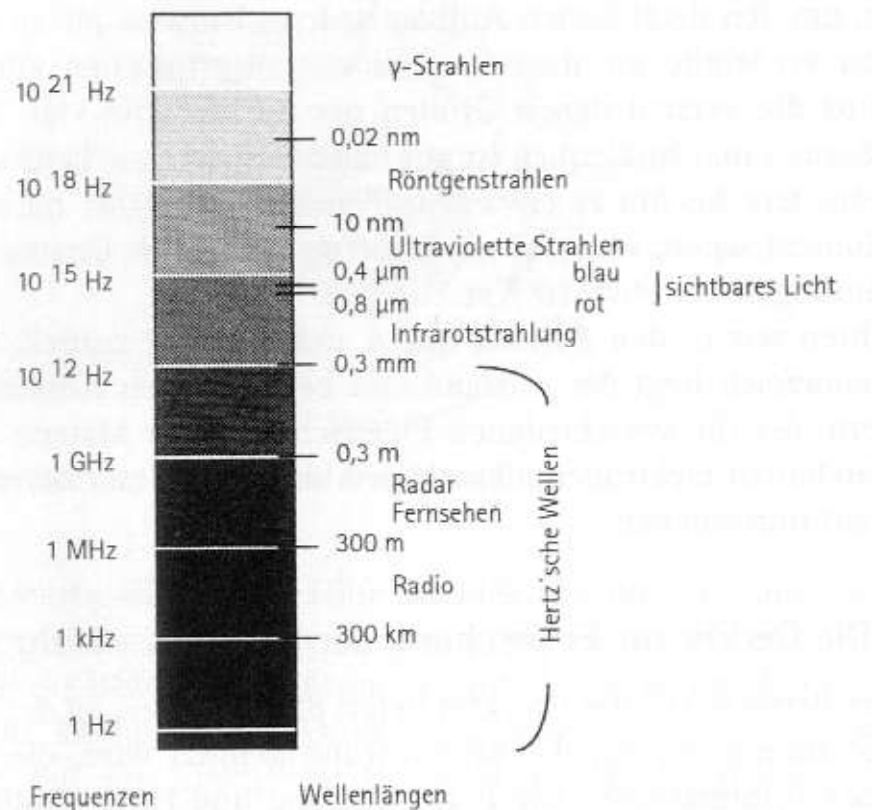


- Lichtmikroskopie ca. 250nm
- Superresolution ca. 50nm
- Elektronenmikroskopie ca. 0.1nm = 1Å (Ångström)
 - etwa die untere Grenze des Durchmessers eines Atoms bzw. Gitterabstand

Atomaufbau



- Aufenthalts-Wahrscheinlichkeit der Elektronen
 - innerhalb von Elektronen-Wolken mit wohldefinierten Energien
 - Schalenwechsel und Herauslösung von Elektronen
 - Elektronen als freie Ladungsträger nutzbar: beschleunigen, auf Objekt schießen, Strukturen untersuchen
- Veränderung (WW) der einfallenden elektromagnetischen Strahlung liefert objektbezogene Informationen
- Ausbreitung mit Lichtgeschwindigkeit $c = \nu \cdot \lambda$
- Frequenz bestimmt Energie: $E = h \cdot \nu$



- jedem Teilchen der Masse m und der Geschwindigkeit v kann eine Welle mit $\lambda = h / (m \cdot v)$ zugeordnet werden (de Broglie 1923)
 - Welle-Teilchen-Dualismus
 - zur Untersuchung von Materie anstelle von Photonen (masselose Energiepakete) beschleunigte Teilchen einsetzbar
 - Idee, Elektronen zur Strukturuntersuchung
 - andere Möglichkeiten:

Photonen (sichtb. Licht)	400 ... 700nm	$\approx 2\text{eV}$
Photonen (Röntgen)	0.05 ... 1.25nm	$\approx 25\text{keV} \dots 1\text{keV}$
Elektronen	$10^{-3} \dots 3 \cdot 10^{-3}\text{nm}$	$1\text{MeV} \dots 100\text{keV}$
Protonen oder Ionen	$\approx 10^{-4}\text{nm}$	$\approx 10\text{keV}$
Neutronen	$\approx 0.1\text{nm}$	$\approx 0.025\text{eV}$

Elektronen als Primärstrahlung

- Röntgenstrahlen als Ansatz zur erhebl. Auflösungsverbesserung lange schwierig, erst mit Röntgenspiegeln Fokussierung möglich
- da Materialien bei Rö-Strahlen Brechzahl nahe 1 haben, sind linsenartig fokussierende Elemente für Rö-Strahlung nicht möglich
- mit ca. halber Lichtgeschwindigkeit c im Elektronenmikroskop (abhängig von Beschleunigungsspannung)
- wesentliche Parameter für schnelle Elektronen:

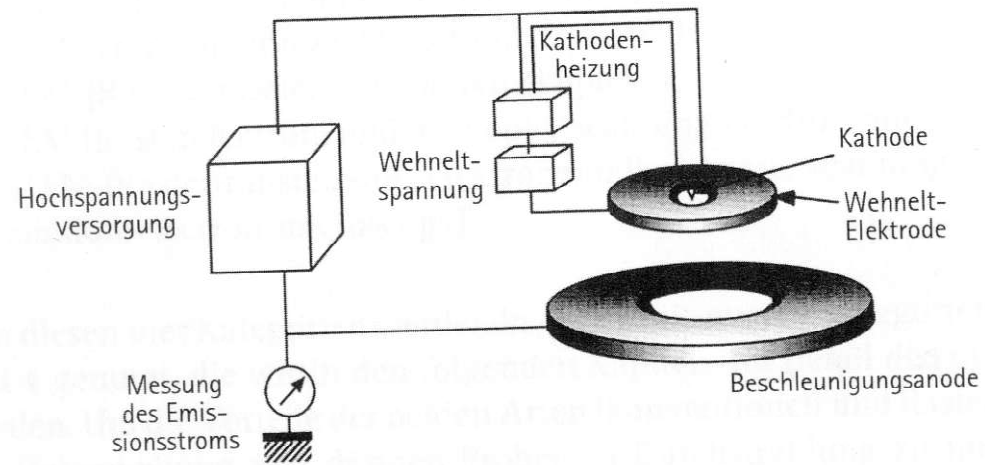
U [kV]	v/c	m/m_0	λ [nm]
100	0.548	1.196	0.0037
300	0.776	1.587	0.00197
1000	0.941	2.957	0.00087

- da die Wellenlänge von Elektronen viel kleiner ist als die die mittlere interatomaren Abstände, sind sie für die Erforschung der Materie auf einer Subnanometerskala prinzipiell geeignet
- durch elektromagnetische Felder Kräfte auf geladene Teilchen ausübbar
 - Bahnen von geladenen kontrolliert beeinflussbar
 - elektronenoptisches Instrument baubar, das Lichtmikroskop sehr ähnlich ist
 - durch Wahl geeigneter Feldverteilungen sind Elektronenlinsen baubar
 - Elektronen wechselwirken stark, daher nur im Vakuum frei ausbreitbar

Elemente des Elektronenmikroskops

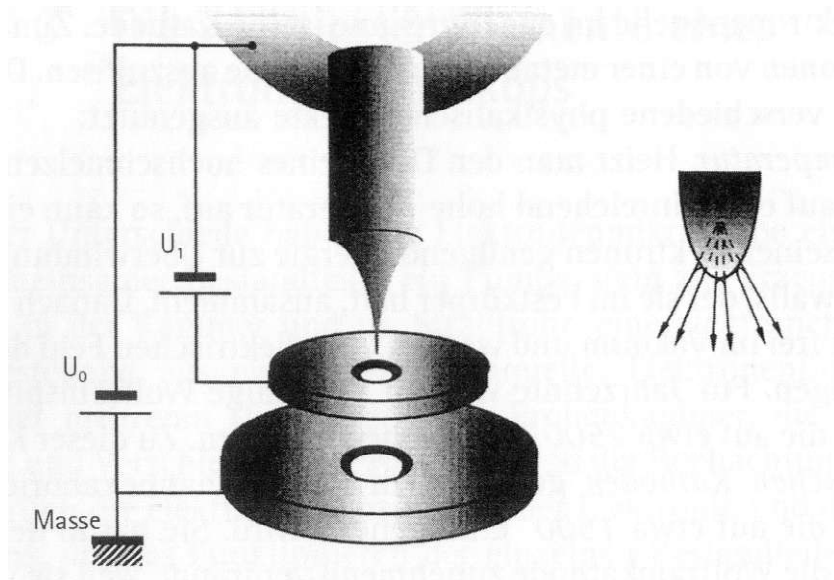
- Elektronenquellen:

→ mit Glühkathoden mit hoher Temperatur



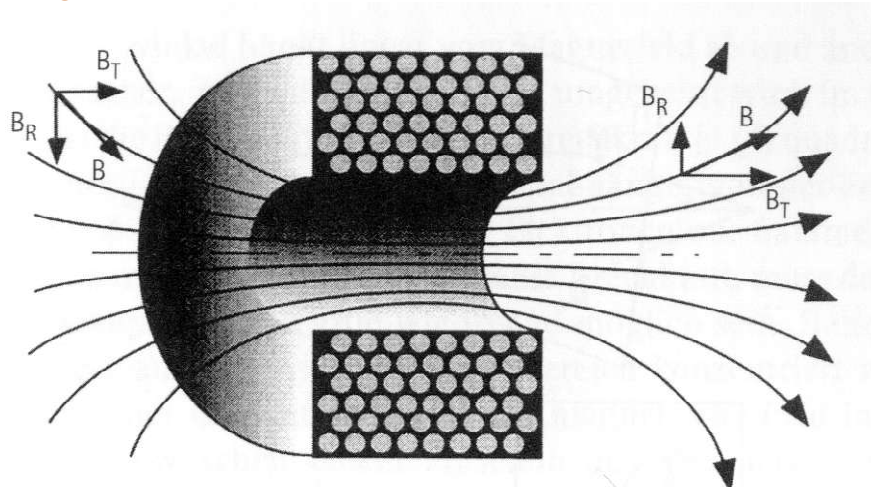
oder

→ Feldemissionskathoden mit extremen elektrischen Feldstärken

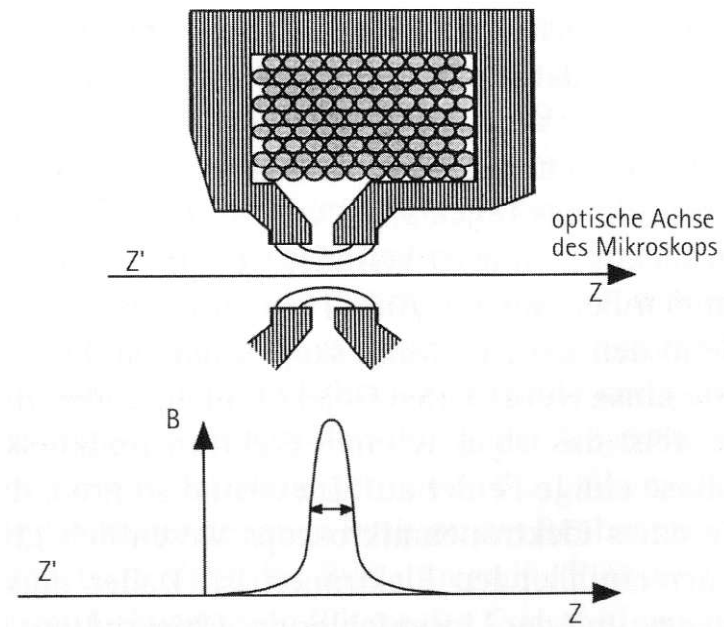


- Elektronenlinsen

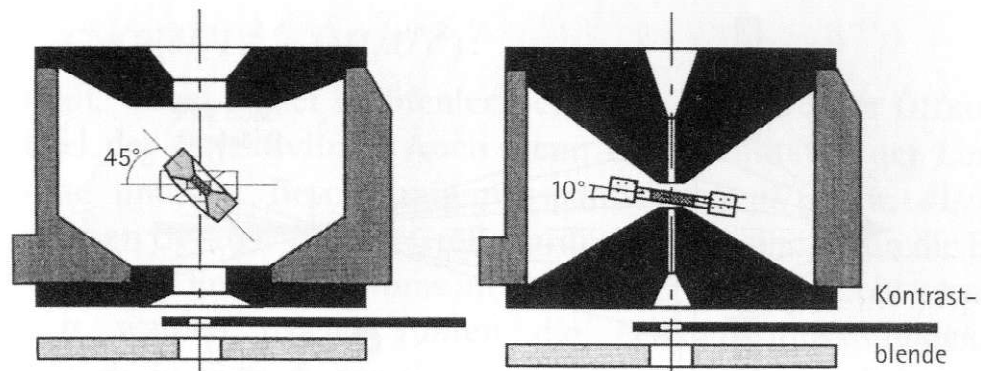
- elektrostatische Linsen nur im Bereich der Quellen
- Magnetlinsen



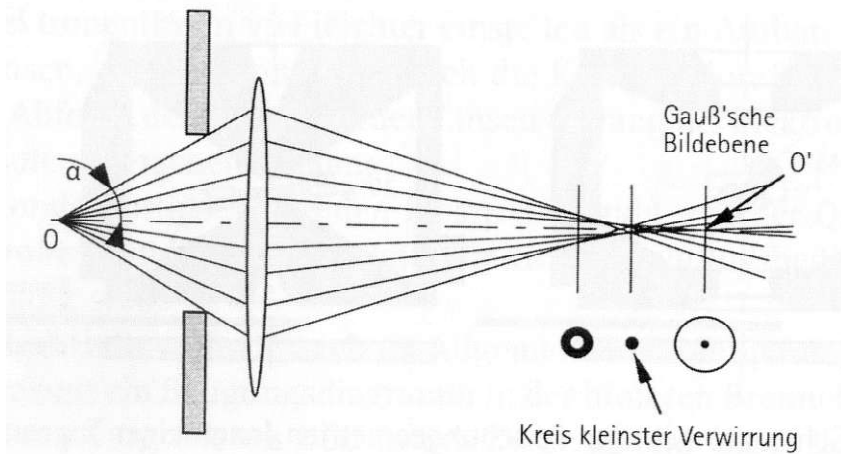
- um eine Fokussierung zu erreichen, die der Wirkung einer Glaslinse entspricht, nutzt man das Randfeld einer kurzen Spule
- für Linsen kurzer Brennweite, also großer Brechkraft, muß die radiale Feldkomponente so groß wie irgend möglich sein
- daher muß das Magnetfeld auf einen kleinen Raumbereich konzentriert werden, mittels Polschuh aus Weicheisen



→ Objektivlinse ist das Herzstück: kurze Brennweite mit 1 ... 3 mm und ca. 10 ... 100 facher Vergrößerung

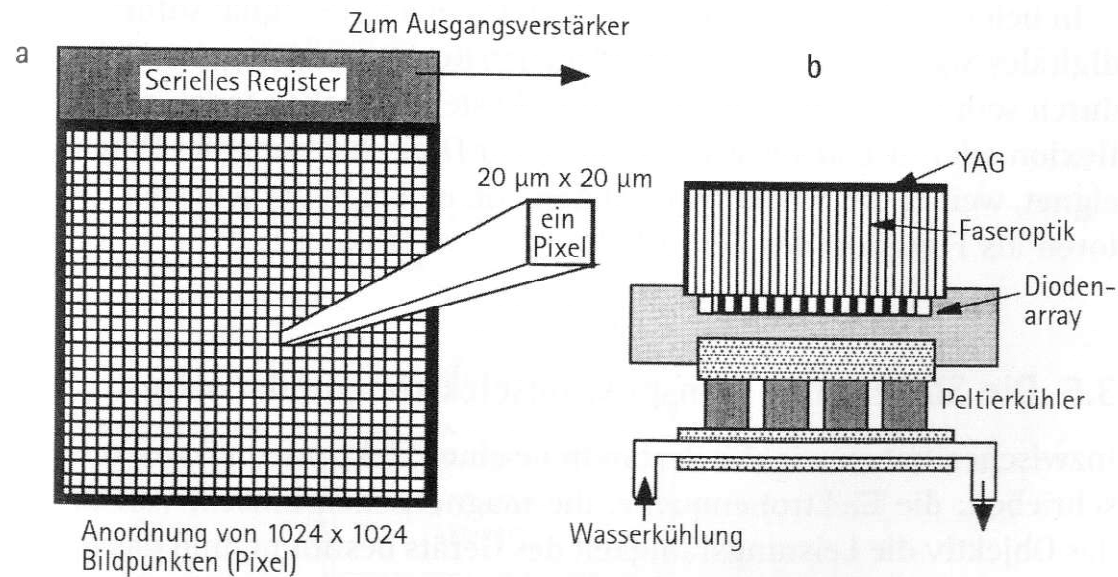


→ Markantester Abbildungsfehler ist Öffnungsfehler: Randstrahlen werden stärker fokussiert als achsennahe Strahlen



- Elektronendetektoren

- direkt mit phosphorizierenden Leuchtschirm (Achtung, Röntgen-Strahlung ausfiltern)
- Photoplatte
- Kamera hinter Szintillator (Elektronen-Photonen-Konverter)
- direkt auf Halbleiterdetektorarrays

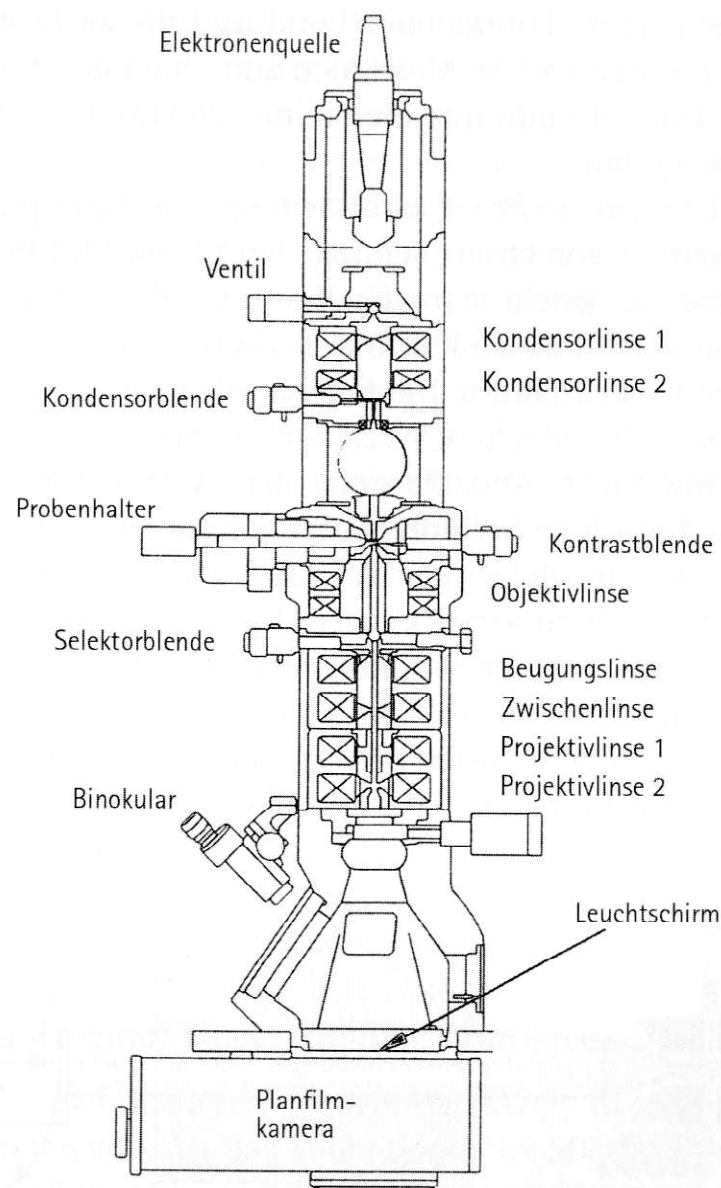
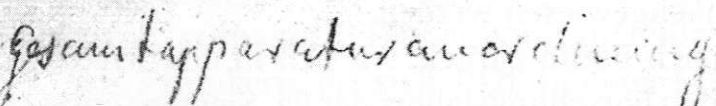


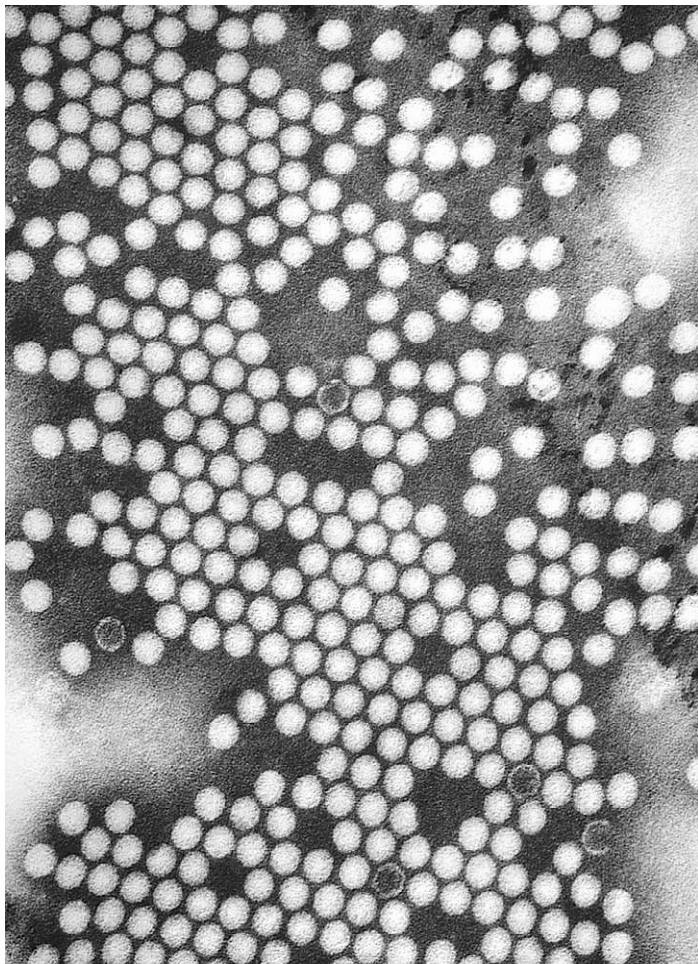
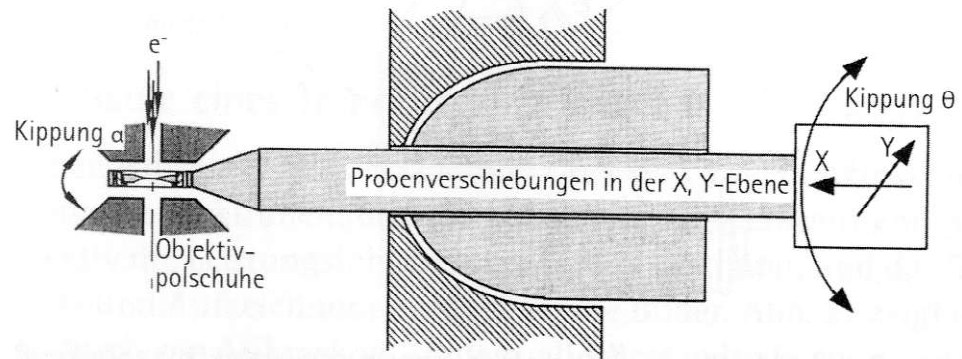
→ für Scanningtechniken sind Einkanalidetektoren erforderlich, mit Szintillator/PMT oder Halbleiter

Elektronenmikroskop

Max Knoll und Ernst Ruska 1931 (... 1986 Nobelpreis Physik):

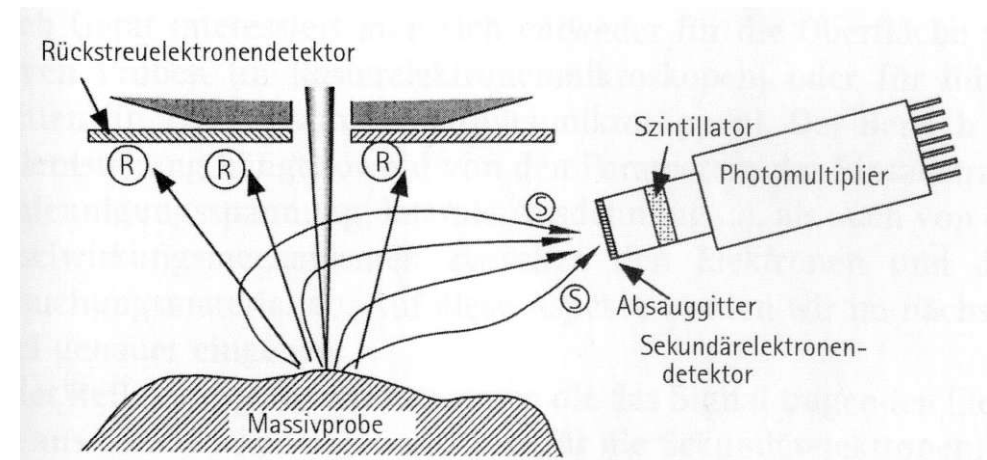
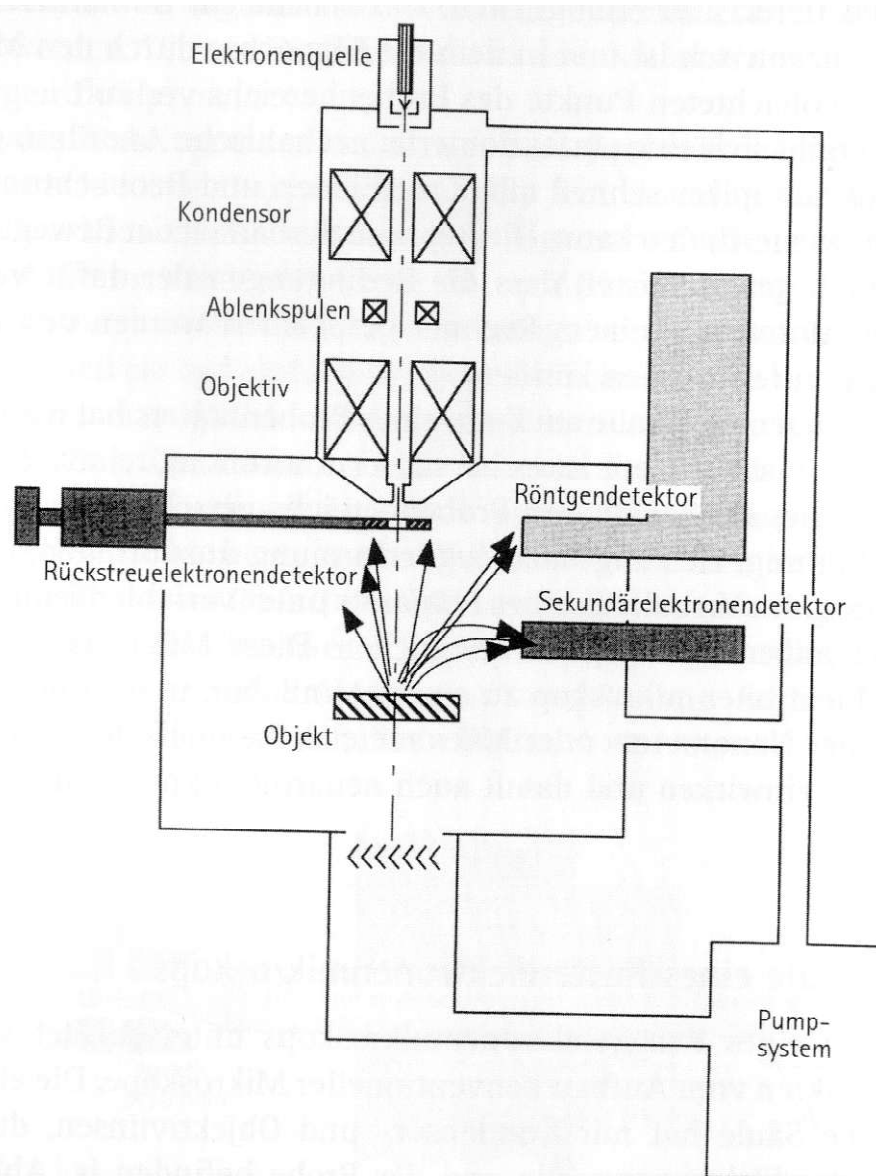
→ Transmissionselektronenmikroskop (TEM)





Poliovirus im TEM

→ Rückstreu-Rasterelektronenmikroskopie mit bewegtem Elektronenstrahl (SEM)





Kralle einer Pfirsichblattlaus

WD	HV	Det	Mag	
11.8 mm	15 kV	SE	2500 x	Blattlaus Nympe
				— 10 µm —

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cc/TarsusREM.jpg>

Präparationsmethoden

- Proben müssen Vakuum und Elektronenbeschuß aushalten
 - Morphologie und Struktur müssen erhalten bleiben
 - keine irreversiblen Änderungen unter Elektronenstrahl, also keine Einflüsse der elektrischen Oberflächenladung
- TEM: dünne Proben

Tab. 5:

