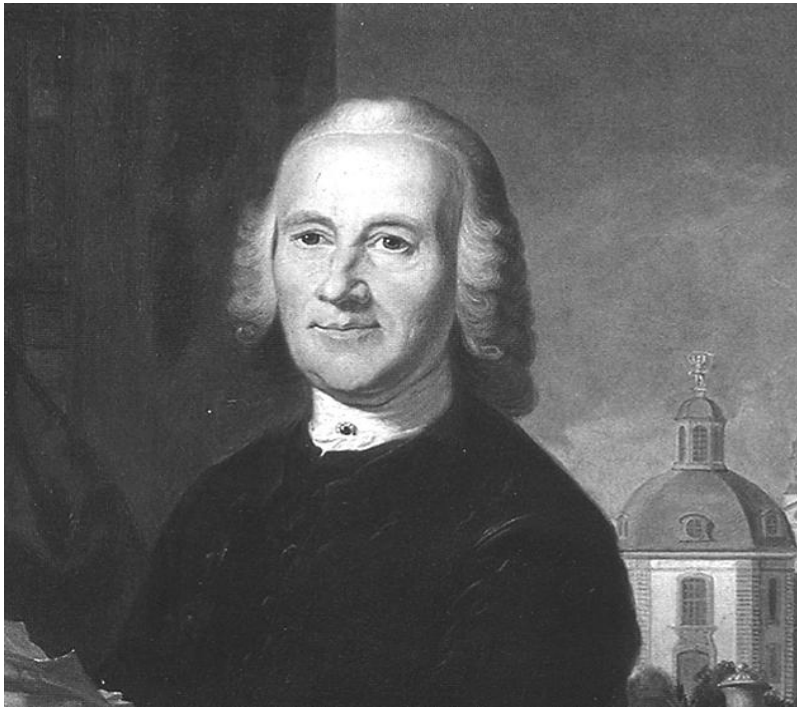


Fachbereich Biowissenschaften
: *EM-Service-Labor*
Rasterelektronenmikroskopie

Der Stifter: Johann Christian Senckenberg (1707-1772)



- Senckenberg stiftete den ersten Botanischen Garten*, den Vorläufer des späteren Botanischen Instituts, das Bürgerhospital im Nordend Frankfurts und nicht zuletzt die Anatomie im heutigen Klinikum der Universität in Frankfurt am Main.
- * allerdings damals in der Innenstadt gelegen
- *neben stehendes Foto: NUM 134 (2004)*

Goethe: Namensgeber dieser Universität

(Der weltbekannte Dichter war auch ein leidenschaftlicher Botaniker...)

- „1776 legt GOETHE in Weimar einen eigenen Garten an und nimmt botanische Studien auf.“
- „1790 veröffentlicht er seinen ‚Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären‘.
- 1817 teilt GOETHE die Geschichte seiner botanischen Studien mit und erst jetzt den von ihm 1796 (...) geprägten Begriff ‚Morphologie‘ (‚Lehre von der Gestalt‘)“.
- aus: Leistikow, 1990
- (Abb.) Mägdefrau, 1992

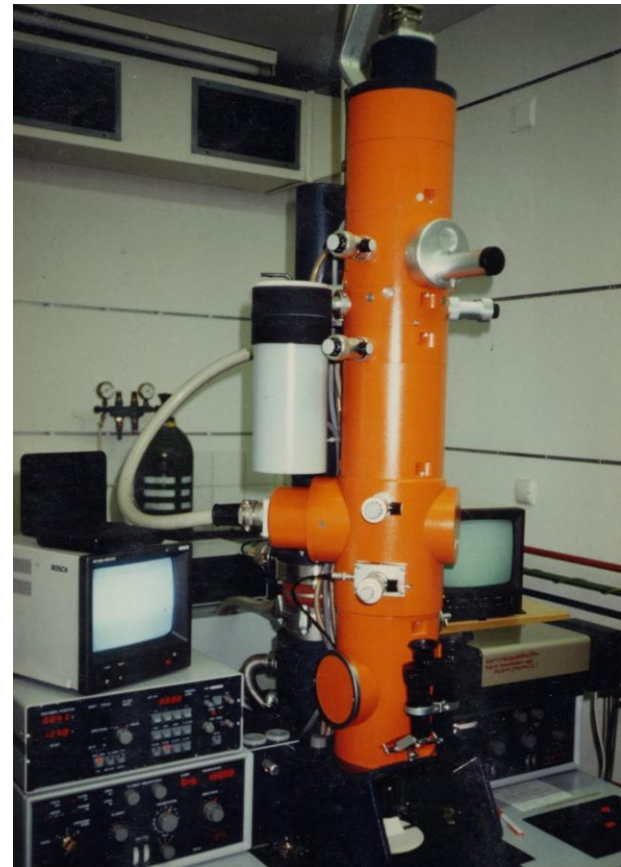


Abb. 70. JOHANN WOLFGANG VON GOETHE (1749–1832) im 42. Lebensjahr

Der Elektronenbeschuss: TEM

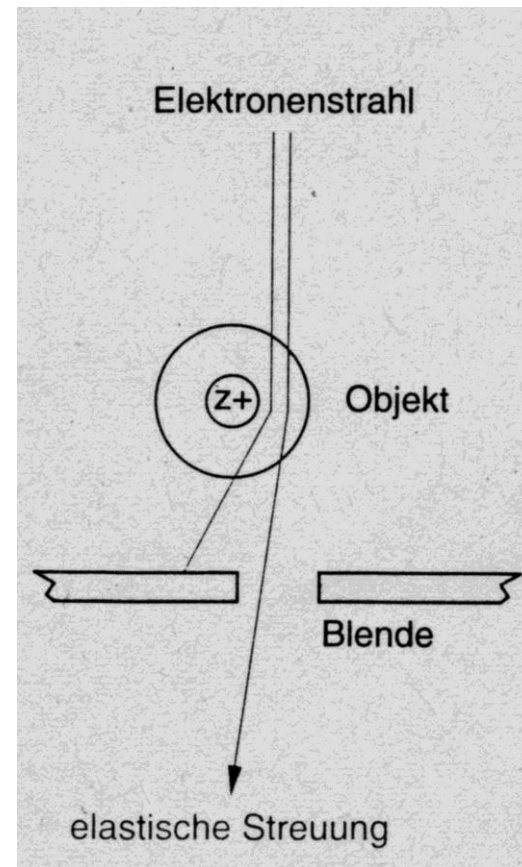
Elektronen durchdringen das Präparat und werden abgelenkt, es entstehen elastische Elektronen, die ein kontrastreiches Bild ergeben. Inelastische Elektronen verschlechtern im Normalfall die Abbildung; etwa am EM902 (Zeiss) können sie hilfreich verwendet werden... (Energieverlust)

- Für das TEM benötigen wir Ultradünnschnitte, die bei ausreichendem Kontrast die Zellstrukturen in aller Klarheit zeigen.
- Die TEM-Proben müssen mit viel Sorgfalt und unter längeren Präparationsbedingungen erstellt werden.



Der Elektronenstrahl durchdringt das Objekt am TEM

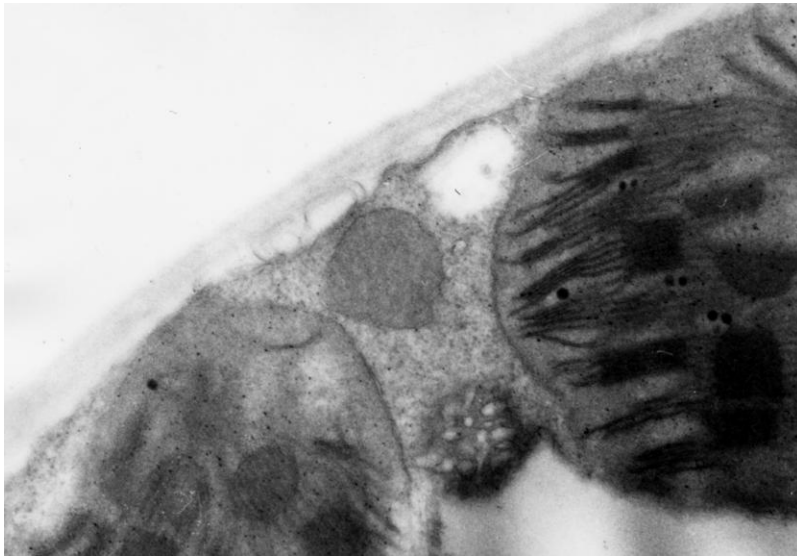
- **Biologische Proben werden bevorzugt mit Schwermetallen (Osmiumtetroxid) fixiert. *Osmiumsäure* wird am häufigsten verwendet, denn es ist mit einer hohen *Kontraststeigerung* zu rechnen, noch zumal außer den Proteinen (durch die Aldehyd-Fixierung) auch noch die Lipide gebunden werden. Besonders gut „gefärbt“ erscheinen die Membranen.**



TEM: Stets notwendige *chemische Präparation* *biologischer Proben*

- Jede Probe die am TEM mit ultradünnen Schnitten untersucht werden soll, muss zuvor chemisch fixiert werden: Die Feinstrukturen sollten optimal dem Bild der Natur oder dem des Laborversuchs entsprechen. Etwaige Störungen gelten grundsätzlich als Artefakte (ungewollt künstlich erzeugte Strukturen). Angenommen, wir halten eine Pflanze in Dauerlicht - mehr als zehn Stunden -, so wird diese überreichlich Stärke produzieren. Die Chloroplasten werden das deutlich zeigen. Oder: wird die gleiche Pflanze bewusst in Dunkelheit belassen, so wird sie etiolieren (vergeilen). Die Thylakoide werden dann rückgebildet und erscheinen nur noch als schwache Membranreste.
- Gewöhnlich ist eine Fixierung in einem schwachprozentigen (1-5 %) Glutardialdehyd für die Proteine ausreichend, dann aber folgt ein weiterer Gang mit Osmiumsäure zur Lipidfixierung. Die Aldehyde kontrastieren kaum, das Osmiumtetroxid, etwa 1%, dagegen bestens, es zeichnet die Membranen dunkel durch. Die verwendeten aggressiven Säuren müssen in Lösungen gepuffert werden, aber auch der pH-Wert ist zu beachten und u.U. die Osmolarität.
- Die *ideale Fixierung* ist nicht immer erreichbar, da selbst in einem Blattgewebe in den verschiedenen Zonen, Gefäßen, dem „Parenchym“, unterschiedliche Osmolaritäten vorherrschen können. Gerade auch an die meist großen Vakuolen ist hier zu denken. Selbst durch die Kutikula der Epidermis dringt oft das chemische Fixans schwer in das Gewebe ein, dagegen an den für das Präparat angeschnittenen Kanten der Blattstücke rasch.

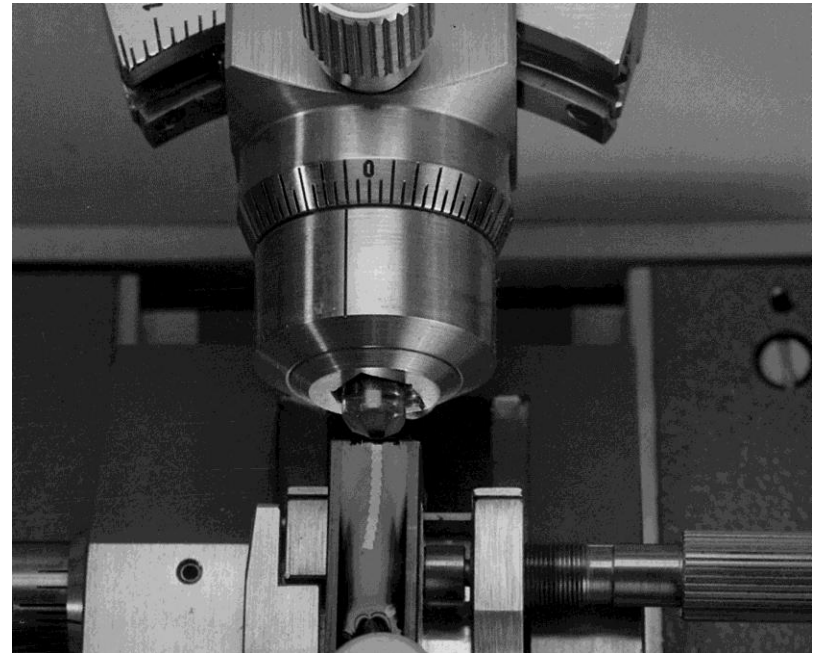
Transmissions- Elektronenmikroskopische Arbeitsweise (Arbeit am TEM)



- Die ultradünnen Schnitte werden am TEM durchgemustert und interessante Ergebnisse sogleich fotografiert.
- Untersucht werden etwa physiologisch unterschiedlich angezogene Pflanzen einer Art oder eines „Typs“.; diese zeigen erwartungsgemäß in der Feinstruktur Veränderungen an ihren Zellorganellen. Dazu muss grundsätzlich eine Kontrollpflanze mit einbezogen werden.
- TEM-Foto.: Die zwei Spitzen eines gut ausgebildeten Chloroplasten zeigen im dazwischen befindlichen Plasma ein Mitochondrium (unten) und ein Dictyosom (oben).

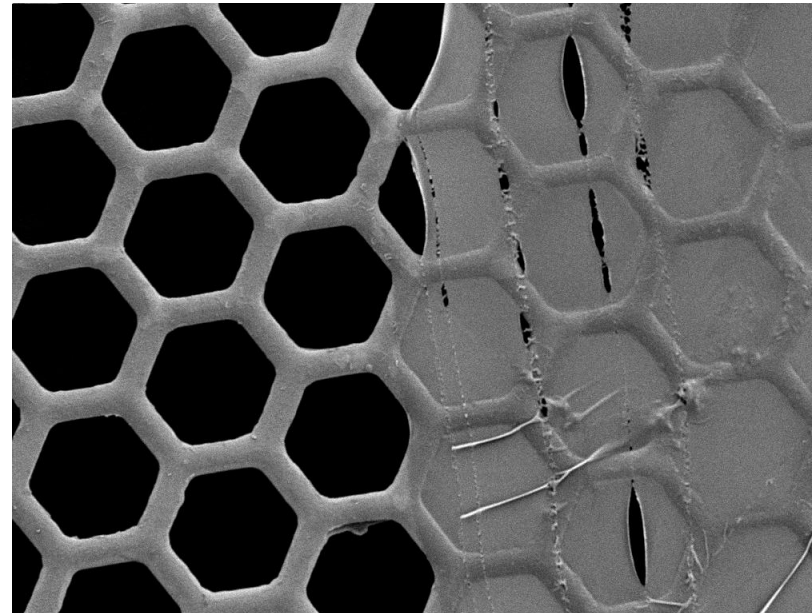
Die Ultra-Mikrotomie (1)

- Blattstückchen, als Beispiel, werden chemisch fixiert und kontrastiert. Anschließend einer Entwässerung mit Aceton unterzogen und in einen flüssigen Kunststoff überführt. Die dann auspolymerisierten Kunststoffe sind „knochenhart“; die Kapseln (mit den Präparaten in deren Spitze) werden nun getrimmt. Am *Ultramikrotom* werden sie in ca. 50 *Nanometer* dicke, feinste Schnitte zerlegt. Tausend mal eine Zeitungsseite dünn...



Die Ultra-Mikrotomie (2)

- Die Ultradünnschnitte variieren in ihrer Dicke; erkennen kann man die Schnittdicke im Interferenzlicht.
- Es gibt Schwankungen von hellgrau (Silber), ca. 10-20 nm, bis goldgelb (50 nm) und lila-blau (von 100 nm). Letztere sind zu dick, um vom TEM-Strahl gut durchdrungen zu werden. Nebenstehendes Foto zeigt einen Teil eines Trägernetzes mit Schnitten (am REM fotografiert).

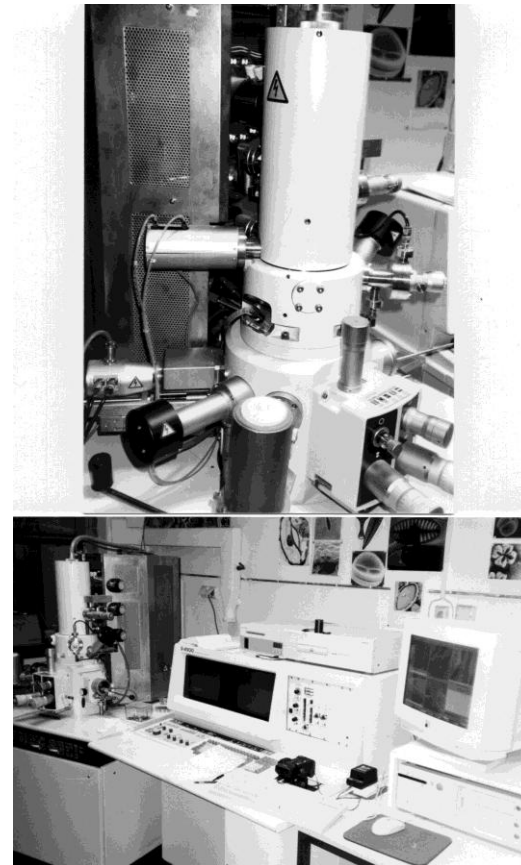


Netz mit Schnitt (Quercus robur jung)

50 μm

Das Raster- Elektronenmikroskop:

- Dieses REM ist ein Hochleistungs-Gerät der Firma Hitachi, S 4500
- Es ist mit einer Feld-Emissions-Kathode bestückt und hat viele Einsatzmöglichkeiten über zwei verschiedene Detektoren, die in der biologischen Forschung wechselweise zum Einsatz kommen. Wir können plastische Bilder für die Übersichten erstellen, sowie leicht und zuverlässig scharfe Fotos erzeugen, die aber auch in einen Hochauflösungsbereich hineingehen, wo herkömmliche Geräte nicht mehr mitmachen.



Das Raster-Elektronenmikroskop (technisch)

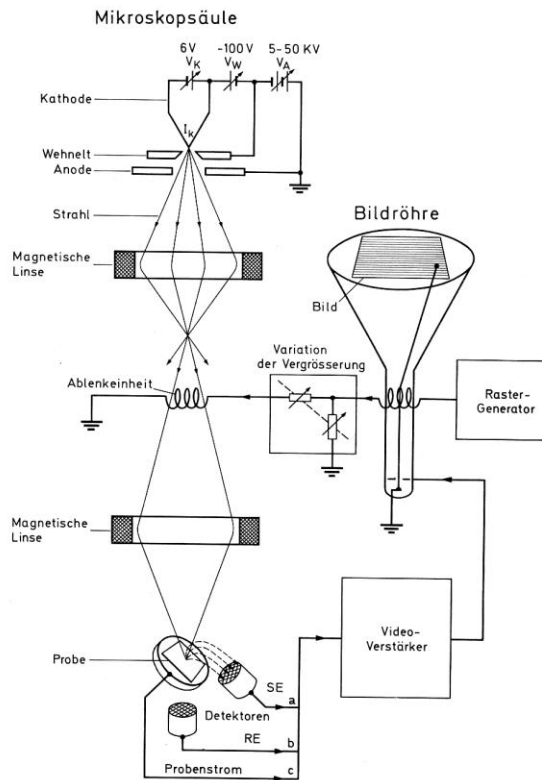
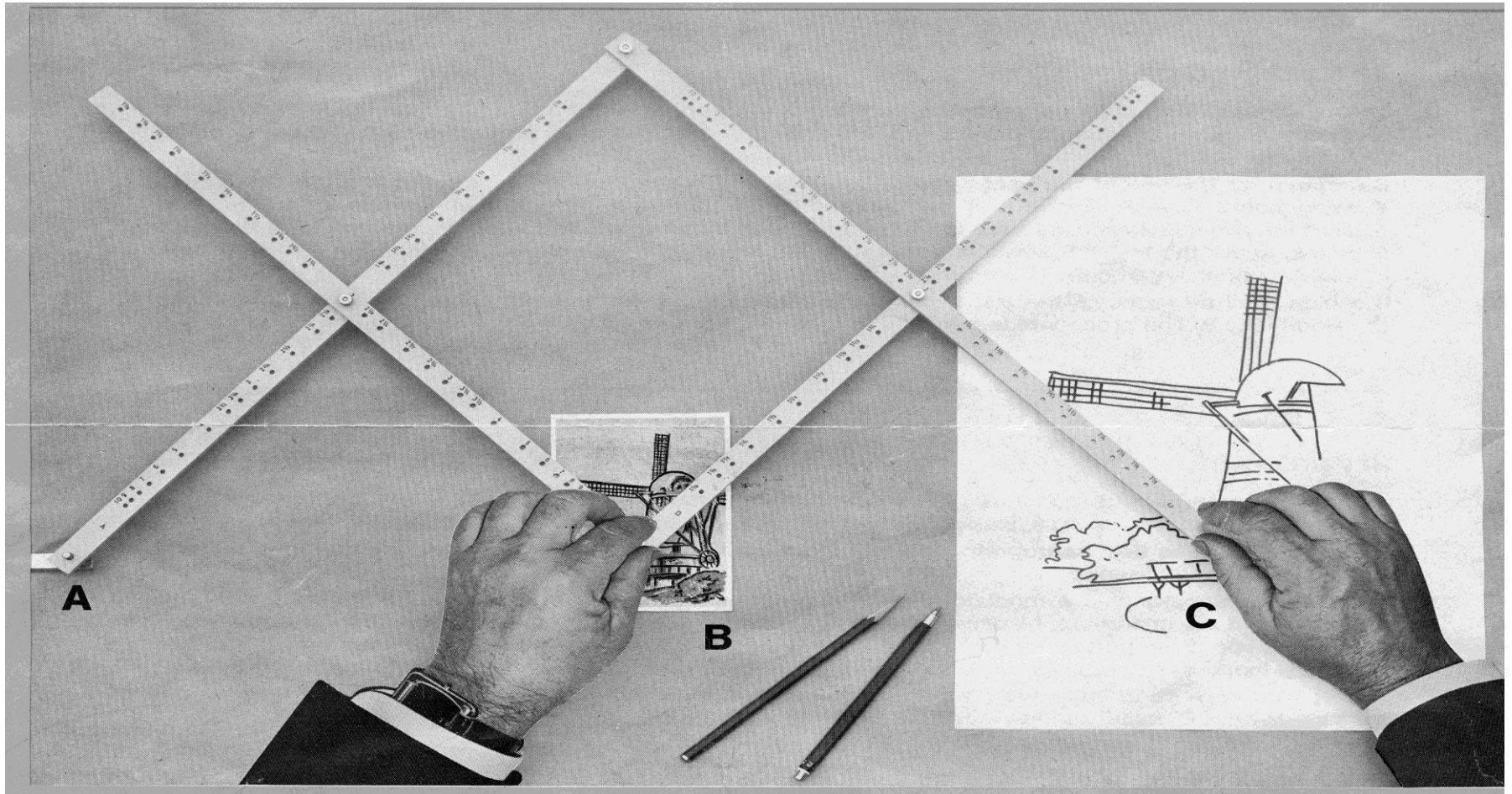


Abb. 1.1. Prinzipieller Aufbau und Wirkungsweise des Raster-Elektronenmikroskopes

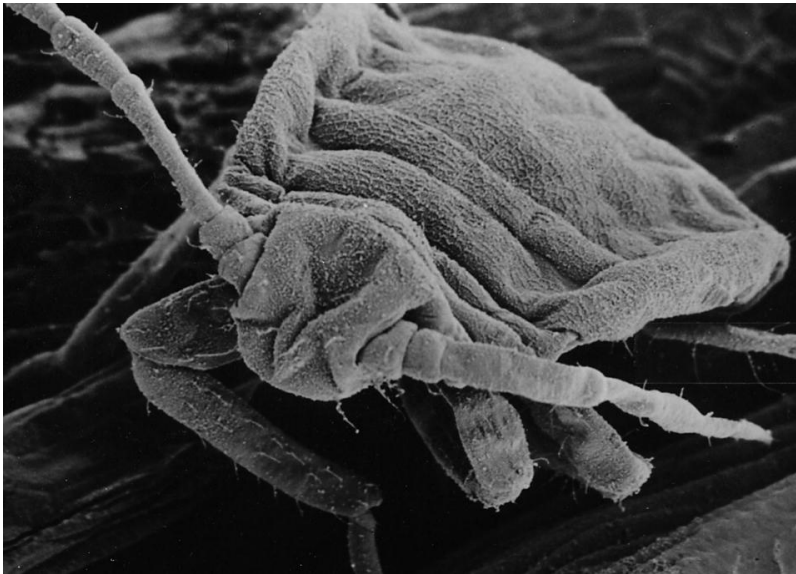
- Das Raster-EM hat einen ähnlichen Aufbau wie ein Transmissions-EM. Beide Mikroskope arbeiten mit einem Strahl aus Elektronen und müssen demnach unter einem sehr hohen Vakuum stehen.
- Beim REM trifft der gebündelte Elektronenstrahl aber auf die Probe auf und die reflektierten „Sekundärelektronen“ werden als „Signale“ (Höhen und Tiefen eines Objektes abtastend) von einem Detektor gesammelt und über einen TV-Monitor als Strahl gezeichnet (abgerastert). Diese Sekundärelektronen zeigen demnach die Oberflächenstrukturen des Objektes und erzeugen das plastische Bild mit der typischen *Schärfentiefe* des Raster-Elektronenmikroskops.
- Abb. aus REIMER&PFEFFERKORN (1973)

Der Raster-Elektronenstrahl zeichnet die Oberflächenstruktur wie ein Pantograph



Probenbearbeitung für das REM

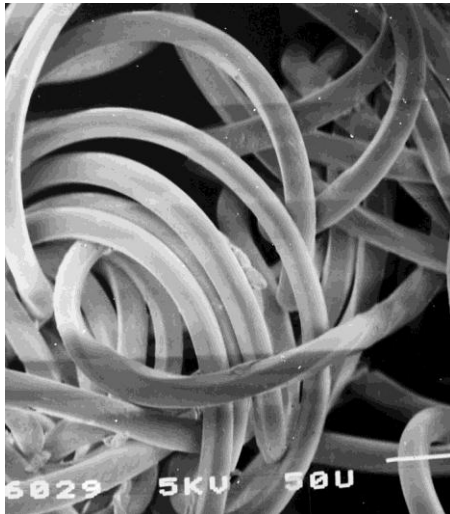
Trocken und leitfähig --- Beispiel 1: die geschrumpfte Blattlaus



- Biologische Proben müssen wegen ihrer "Wasserhaltigkeit"
- einem schonenden Prozess des Trocknens ausgesetzt werden:
- denn sie schrumpfen durch den Verlust von Wasser im Vakuum.
- Wasser hat eine hohe Oberflächenspannung; bei der Gefriertrocknung (mit vorherigem „Schockgefrieren“) kann es dennoch zu Eiskristallen kommen, die die Probe zerstören.
- Bildung von Artefakten...

Probenbearbeitung für das REM

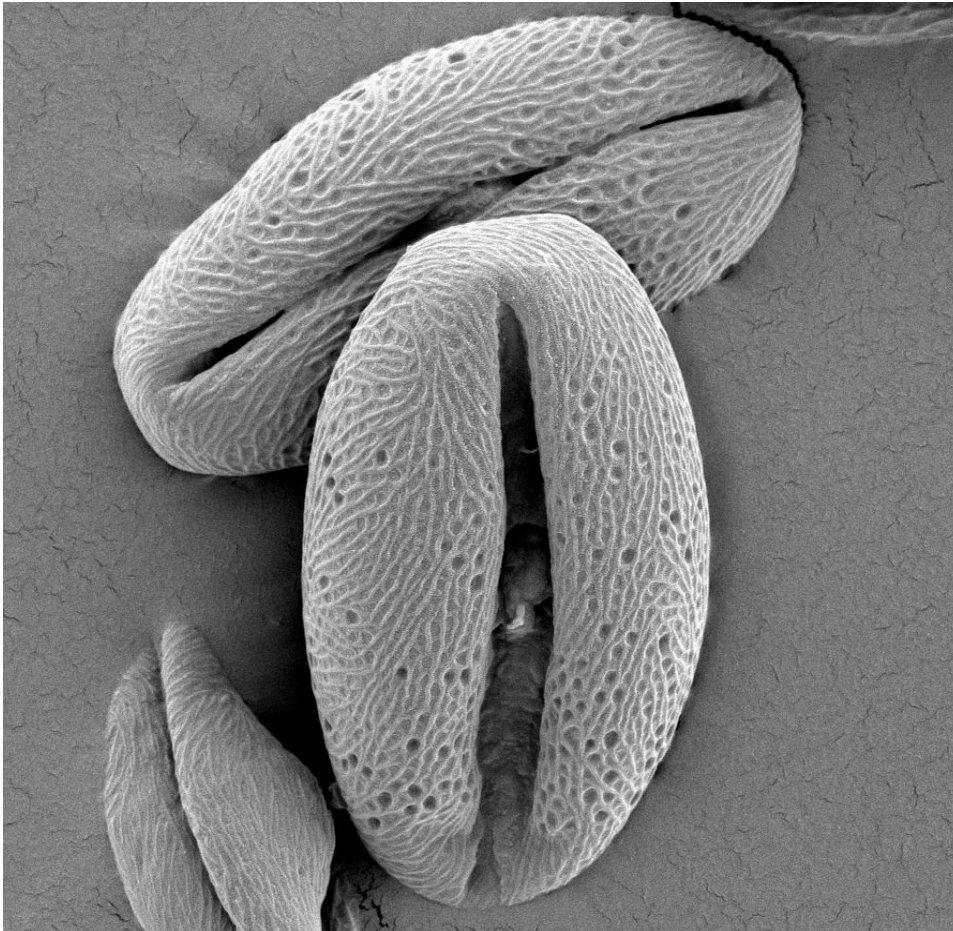
Trocken und leitfähig ---- Beispiel 2: Aufladungen entstehen
(Nylonstrumpf)



- Die meist verwendete Methode ist die chemische Fixierung mit Glutardialdehyd und der nachfolgenden Entwässerung mit Aceton oder Alkohol. Jetzt kann man die Präparate entweder mit „Silan“ trocknen
- (*Silan verdampft anschließend langsam*) - oder
- die „Kritisch-Punkt-Trocknung“ verwenden (*Überführen in noch flüssiges Kohlendioxid und langsames Aufheben der Phasengrenzen zwischen Aceton und dem CO₂ am „kritischen Punkt“*).

Probenbearbeitung für das REM

Trocken und leitfähig ---- das gilt für alle Präparate !

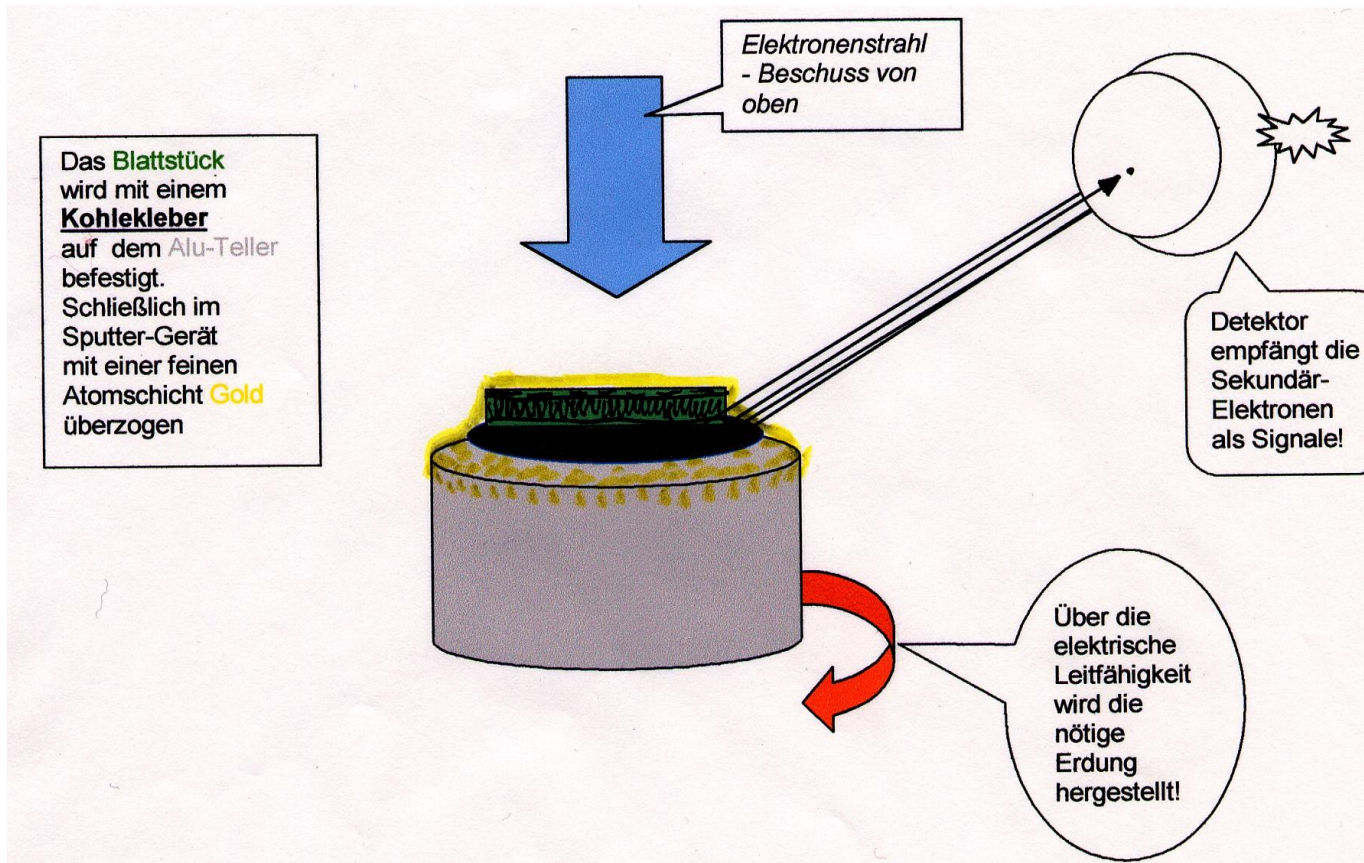


Aesculus parviflora NA

10µm

- Pollen von der Blüte direkt nehmen; Artefakte durch Schrumpfung möglich;
- Kieselalgen nach dem Auskochen auftropfen;
- Blätter (Behaarung usw.) mit N₂ *Schock-Gefrieren* und *Gefriertrocknen*;
- Zellstrukturen oder Insektenstücke mit chem. Lösung fixieren und *Silan-Trocknung* vollziehen oder mit *Kritisch-Punkt* bearbeiten.

Raster-EM: Probenteller wie/was?

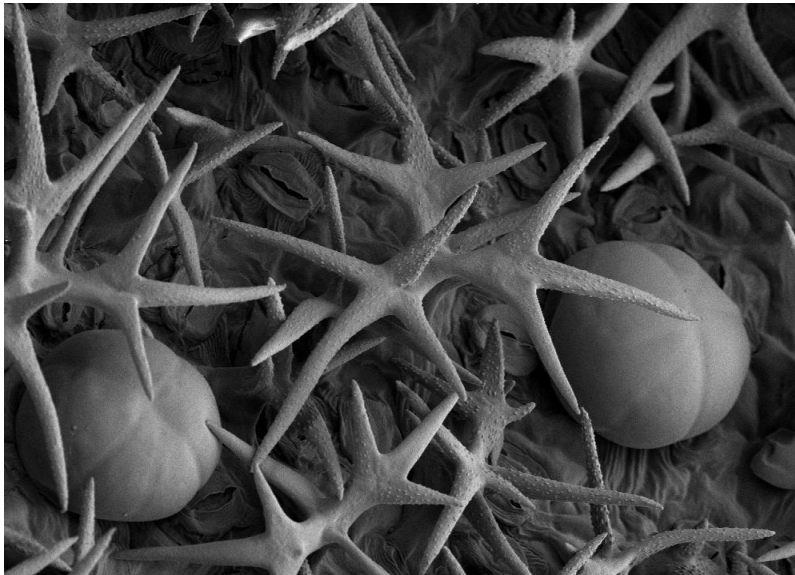


„Sputtern“ mit Gold

- Die Proben für das REM werden auf Aluminiumteller aufgebracht und meist mit Kohlekleber befestigt, so erhalten selbst die biologischen Proben eine Untergrund-Leitfähigkeit. Leider reicht die nicht aus, und aus diesem Grunde werden die Präparateteller als Ganzes in ein Vakuum verbracht und mit einer hauchdünnen Atomschicht aus reinstem Gold überzogen. Diesen Vorgang nennt man „sputtern“, etwa *Umsprudeln*.
- So kann der „störende Probenstrom“ gut abgeleitet werden!
- Zu sehen ist „die Goldwolke“: Restgas leuchtet im UV-Licht!



Der Lavendel unter dem Elektronenmikroskop



Lavendelblatt

60 µm

In Südfrankreich bedecken ganze lilablau Areale des „Echten Lavendels“ die Landschaft und begeistern die Durchreisenden durch ihre Farbenpracht.

Die Arzneipflanze **Lavandula angustifolia** ist ein Lippenblütler, die ursprünglich aus dem Mittelmeerraum stammt und heute als Gartenpflanze weit verbreitet ist.

Sie enthält ein **ätherisches Öl**, eine Mischung aromatischer Substanzen, die sie in vielerlei Hinsicht zur Drogenproduzentin verschiedener Arzneimittel macht und darüber hinaus auch noch die Kosmetik- und Parfümindustrie beliefert.

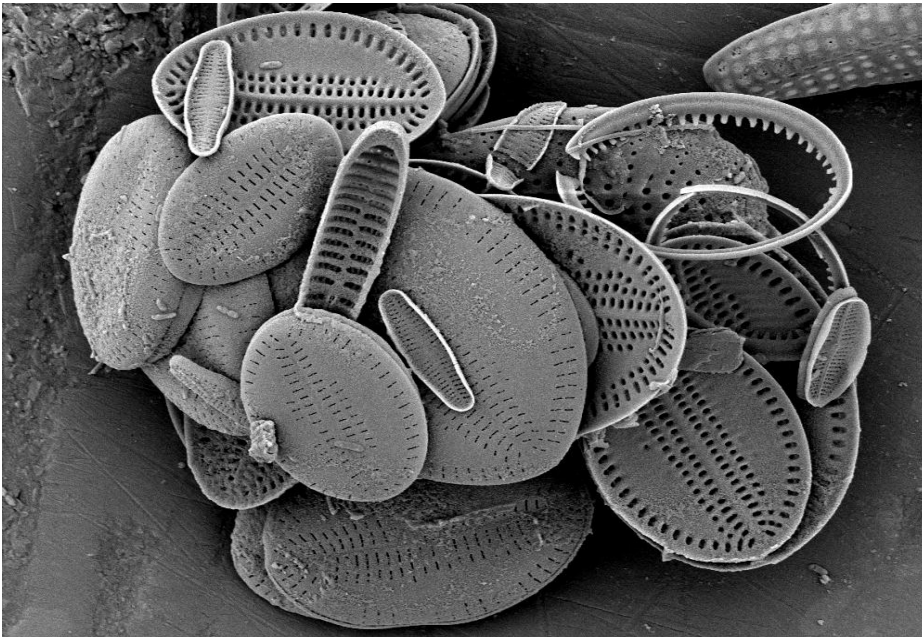
Auf unserem Bild sehen wir eine plastische, unbekannte Welt auftauchen, die nichts anderes darstellt, als die Blattunterseite mit ihrer Epidermis, aus der Spaltöffnungen und die als Austrocknungsschutz dienenden Blatthaare hervortreten. Die kugeligen Gebilde selbst sind die Drüsenbälle, die die ätherischen Öle beinhalten und bei Reibung den charakteristischen Geruch des Lavendels offenbaren.

Wie sieht es auf dem Grunde eines Süßwassersees aus?



- **Myriaden von Kieselalgen (Diatomeen) bedecken den Boden eines Sees. Diese sitzen in ganzen Kolonien auf den Steinen und bilden einen schleimigen Überzug.** Natürlich besteht der Seegrund aus verwesenden Materialien, zum großen Teil aber aus anorganischen Stoffen: Schluffen, Tonen, Sanden...
- Abgestorbene *Organismen* sinken und bilden ein Substrat, der bakteriellen Zersetzung ausgesetzt. Aber überall dort, wo noch Licht hindringen kann, wachsen Algen.

Aus dem Bereich der Kieselalgen-Forschung :



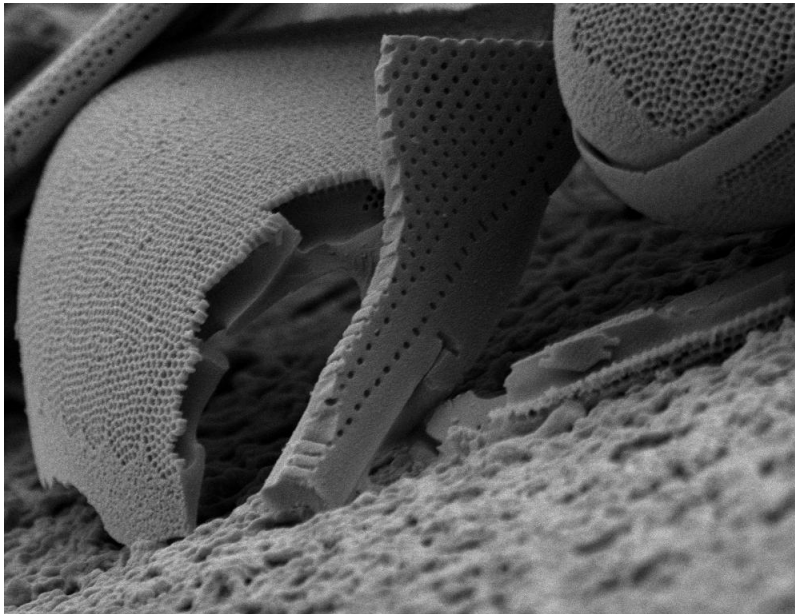
Gi CSIR Durban B45 620

— 10 µm —

**Durch die hohe
Auflösung am Raster-
EM können
Wissenschaftler*
die Feinstrukturen der
Schalen besser
erkennen, die für die
Bestimmung der
Arten wichtig sind.**

** Prof.H.Lange-Bertalot, ehem. Botanisches Institut
und Prof.A.Witkowski (Stettin, Polen)*

Kieselalgenschalen besitzen Öffnungen: *Löcher – Poren - Areolen*



Panama

— 3 µm —

- Aufgebrochene Schalen zeigen, dass die verkieselten „Zellwände“ von Diatomeen Öffnungen besitzen. Diese ermöglichen den Stoff- bzw. Gasaustausch (der Prozess der Photosynthese muss ablaufen können) zwischen dem wässrigen Medium (See, Fluss, Bach, Meer...) und dem plasmatischen Zellinnern. Stoffe können so aufgenommen und abgegeben werden.