

Wiewohl die Lichtblatt-Mikroskopie ein sehr aktuelles Thema ist – sie wurde 2014 zum „Verfahren des Jahres“ gewählt [9] – und obwohl mancher das Verfahren als „modern“ bezeichnen möchte, ist die Idee doch schon vergleichsweise alt: über 100 Jahre. Wie schon vermerkt, gehört das Verfahren nicht zu jenen, mit denen die optische Auflösung über die beugungsbegrenzte Schranke hinweg verbessert werden kann. Dennoch wurde sie erfunden, um Unsichtbares sichtbar zu machen. Ein Widerspruch?

2.1 Die Alchemisten und das rote Glas

Die Fragestellung begann um das Jahr 1680. In Berlin hatte ein umtriebiger Glas-Alchemist eine spannende Erfindung gemacht. Johann Kunkel war es gelungen, rotes Glas herzustellen [6]. Das war ein Ergebnis alchemistischer Forschung, und es wurde dabei – wie in der Alchemie üblich – jede Menge Gold verbraucht. Typisch Mensch gab es auch hier Streit um Prioritäten – und damit um Geld, Einfluss und Macht. Vor Kunkel hat JC Orschall [7] schon Rezepte beschrieben, wie man rotes Glas herstellt. Die Alchemisten jener Zeit hatten ja im Sinn, Gold aus anderen Substanzen herzustellen. Es war eine gängige Hypothese, dass man durch „Impfung“ mit einem geeigneten Mittel (dem Stein der Weisen) beliebiges Material zymologisch in Gold umsetzen könne. Als plausibilisierendes Beispiel diente etwa ein Teig, der durch Zusatz einer geringen Menge Sauerteiges in Gänze selbst in Sauerteig verwandelt würde. Da man über Bakterien und Hefen und deren Wirken noch keinerlei Vorstellung hatte, war dies eine durchaus vernünftige, logische und wissenschaftlich einwandfreie These. Erst jüngere Scharlatane haben dann die Alchemie als Trittbrett benutzt, um mit vielerlei suspekten Zeichen und geheimnisvoll klingenden Namen anderen unerwachsenen

Menschen das Geld aus der Tasche zu ziehen. Die vielerlei obskuren Heilmittel, die sie für teures Geld im Internet kaufen können, sind die heutigen Erben dieser Strategie. Die Wissenschaft selbst hat sich weiter entwickelt und heute ist die Umwandlung von anderen Elementen in Gold ein Thema der Kernphysik und der Aufwand ist um viele Größenordnungen höher als der Ertrag – es lohnt sich nicht.

Dieses oben erwähnte rote Glas, üblicherweise als „Goldrubinglas“ bezeichnet, ist eine Suspension sehr kleiner Goldkörnchen in einer festen Glas-Matrix, ein Kolloid. Wenn die Größe dieser Teilchen die beugungsbegrenzte Abbesche Auflösung [8] unterschreitet, die in der Praxis bei etwa 200 nm liegt, dann kann man die Teilchen auch im gewöhnlichen Mikroskop nicht mehr erkennen, insbesondere kann man nicht ihre Größe messen.

Auch, wenn ein Teilchen nicht mehr aufgelöst werden kann, verursacht es dennoch eine Störung, da die Lichtwellen auch an sehr kleinen Teilchen etwas „verbogen“ werden. So wird Sonnenlicht an Sauerstoffmolekülen gestreut, deshalb sehen wir den Himmel in Blau, jedenfalls tagsüber und bei klarem Wetter. Die Farbe rührt daher, dass diese Form der Streuung für blaues Licht sehr viel effektiver ist, als für größere Wellenlängen. Die kleinen Partikel aus metallischem Gold sind nicht nur gute Streu-Objekte, sondern sie absorbieren auch elektromagnetische Energie. Die äußeren Elektronen in einem Metall sind ja nicht fest an ein Atom gebunden, sondern als „Elektronenwolke“ relativ frei beweglich – das macht das Metall aus. In den kleinen Goldkörnchen kann man nun diese Elektronenwölkchen

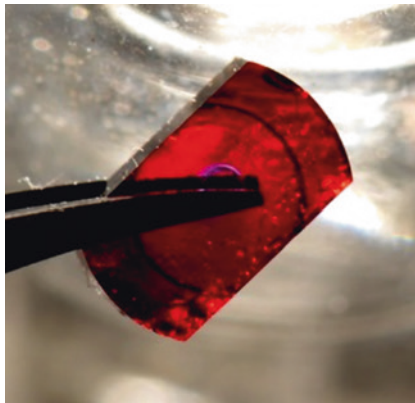


Abb. 2.1 Goldrubinglas mit der typischen roten Färbung im Durchlicht einer Schreibtischlampe. Die rote Färbung kommt durch die Absorption kurzer Wellenlängen. Rotes Licht wird nicht absorbiert, daher sieht man im Durchlicht nur noch den roten Anteil des weißen Lichtes. Herkunft des Glases: Farbglashütte Reichenbach GmbH; Reichenbach/OL. Mechanische Bearbeitung: Optische Lehrwerkstätten, Leica in Wetzlar

gegen die Atomrümpfe in Schwingungen versetzen, etwa so, wie Suppe in einem Teller hin und her schwappt, wenn man ihn von der Seite anstößt. Dabei kann die Schwingungsfrequenz nicht beliebig sein, sondern folgt quantenmechanischen Regeln. Das Partikel kann also nur Photonen von bestimmter Energie absorbieren. Durch die Absorption erhält das Elektronengas ein Energiequantum, das als Plasmon bezeichnet wird. Da die Energie der Quanten die Farbe des Lichtes bestimmt, erscheint eine Suspension sehr kleiner Goldpartikel farbig. Verwendet man Partikel von etwa 30 nm, wird Licht im blaugrünen Bereich des Spektrums absorbiert und anschließend in alle Raumrichtungen gestreut. Daher erscheint die Suspension – hier das Goldrubinglas – im Durchlicht tief rot (Abb. 2.1).

2.2 Ultramikroskopische Teilchen

Der Wunsch war nun, die Größe dieser Teilchen abzuschätzen. Da sie unter der Auflösungsgrenze liegt, sind sie in einem gewöhnlichen Mikroskop ja nicht zu erkennen.

Heute wäre es vielleicht möglich, durch Kontrast verstärkende Methoden mit Kameras auch noch in einem Durchlichtbild die Störungen sichtbar zu machen. Das Durchlichtbild zeigt nur eine ganz schwache – mit dem Auge nicht erkennbare – Modulation, fast der gesamte Bereich der Helligkeitswerte bleibt leer. Bei der Kontrastverstärkung wird dieser leere Teil des Graubereiches abgeschnitten, das geschieht im einfachsten Fall durch elektronische Verschiebung der Nulllinie. Die verbleibende geringe Modulation der Helligkeit wird dann so extrem verstärkt, dass die von den Partikeln erzeugten Beugungsfiguren sichtbar werden. Freilich ist der Hintergrund sehr stark durch unscharfe Bildanteile anderer Ebenen gestört, sodass sich kaum verwendbare Bilder erzeugen lassen. Das analoge Kontrastverfahren, die „Videomikroskopie“ [10] führte in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts zum Nachweis des Spindelapparates bei der Zellteilung und war für ein paar Jahre der „Renner“ in der biologischen Mikroskopie.

Die Antwort auf die Frage, wie groß die Teilchen im Goldrubinglas wohl sein mögen, kam aber schon im Jahr 1903 [11]. Der Kolloidforscher Richard Zsigmondy und der Physiker Henry Siedentopf entwickelten bei Carl Zeiss in Jena eine Vorrichtung, die diese Goldteilchen sichtbar machen sollte. Da im Durchlicht der Kontrast zu klein ist, im Auflicht zu viel unscharfe Information die Identifikation der Teilchen vereitelt, verwendeten sie ein Dunkelfeldverfahren. Im Dunkelfeld wird das Präparat in einem Winkel beleuchtet, der außerhalb des Kegels für die Beobachtung liegt. Abb. 2.2 links. Der extreme Fall einer solchen Dunkelfeldbeleuchtung ist ein rechter Winkel zur optischen Achse des Mikroskopes Abb. 2.2 rechts. Damit ist das Prinzip der Lichtblatt-Mikroskopie eigentlich schon fertig beschrieben.

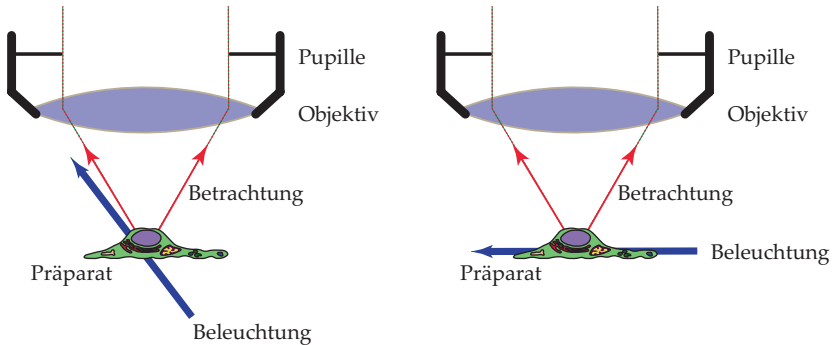


Abb. 2.2 Links: Dunkelfeld. Wird in einem Winkel beleuchtet (dicker, blauer Pfeil), der nicht in den Öffnungswinkel des Objektivs fällt (aufgespannt durch die beiden feineren, roten Pfeile), dann bleibt für den Beobachter der Hintergrund (das Feld) dunkel. Rechts: der extreme Fall ist eine Beleuchtung senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopes. Das ist bei der Lichtblatt-Mikroskopie der Fall

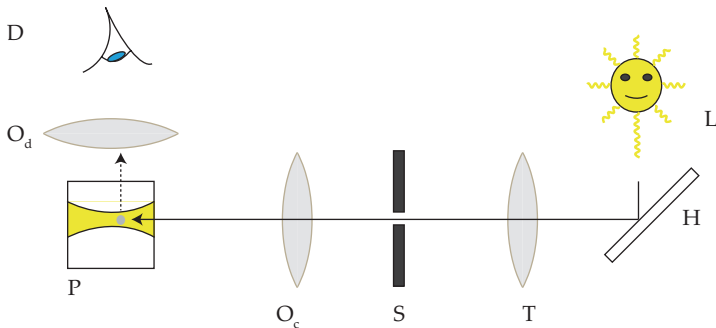


Abb. 2.3 Spalt-Ultramikroskop von Henry Siedentopf (schematisch). Die Lichtquelle L, hier die Sonne, wird über einen Heliostaten H mittels eines Teleskops T auf einen einstellbaren Spalt S abgebildet. Dieser Spalt wird anschließend mittels eines Objektivs O_c in das Präparat P übertragen. Dort wird eine in Höhe und Breite einstellbare dünne Schicht stark beleuchtet. Kleine Partikel (hier: kleine graue Kreisfläche) streuen das Licht auch senkrecht zur Beleuchtungsachse und können mit einem weiteren Objektiv O_d dem Detektor D zugeführt werden

Um solch einen Effekt im Goldrubinglas zu erzeugen, verwendeten Siedentopf und Zsigmondy eine Lichtquelle, deren Strahlung durch einen Spalt in Höhe und Breite begrenzt war; die Größe konnte mit Mikrometerschrauben eingestellt werden. Dieser Spalt wurde dann in das zu untersuchende Glas abgebildet. Im Ergebnis wird dadurch eine dünne Schicht innerhalb des Glases im Winkel von 90 Grad zur optischen Achse beleuchtet (Abb. 2.3). Die Streuung an den

Goldpartikeln führt dann im beobachtenden Teil des Mikroskops zu hellen Punkten vor einem schwarzen Hintergrund – wenn alles sorgfältig justiert und die Dichte der Partikel nicht zu hoch ist (Abb. 2.4 links).

Die Autoren nannten die Partikel, die in einem gewöhnlichen Mikroskop nicht sichtbar sind „Ultramikronen“, von lat. „ultra“ zu Deutsch „jenseits“, also jenseits der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze. „Mikronen“ wären dann Teilchen, die man im Mikroskop sehen und vermessen kann. Heute wird für die Ultramikronen die keineswegs hilfreichere Bezeichnung „Nanopartikel“ verwendet, von lat. „nanus“ der „Zwerg“ und lat. „particula“, zu Deutsch „Teilchen“. Das Mikroskop erhielt den schwungvollen Namen „Spalt-Ultramikroskop“.

Die unscharfen Anteile kann man auch in einem konfokalen Mikroskop eliminieren. Das Ergebnis ist in Abb. 2.4 rechts zu sehen. Beide Verfahren erzeugen optische Schnitte und liefern sehr ähnliche Bilder.

Fassen wir zusammen: Das Spalt-Ultramikroskop hatte folgende Eigenschaften:

1. Die Beleuchtung geschieht senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops (maximales Dunkelfeld)
2. Die Geometrie der Beleuchtung wird durch eine Spaltblende so gewählt, dass nur eine möglichst dünne Schicht im Präparat beleuchtet wird (Lichtblatt).
3. Durch Verstellung der Position des Präparates in der z-Achse („Fokussieren“) lassen sich verschiedene Ebenen im Substrat untersuchen.

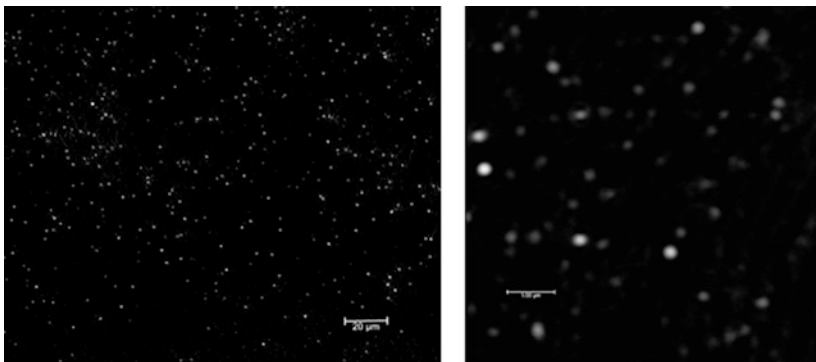


Abb. 2.4 Sterne im Glas. Das Stückchen Goldrubinglas aus Abb. 2.1 im Lichtblatt-Mikroskop (links) und im konfokalen Mikroskop (rechts). Der Unterschied ist ausschließlich im Abbildungsmaßstab und in der Größe der Beugungsscheibchen zu finden, beides wird durch die verwendete Optik bestimmt. Ein Ausschnitt aus dem Sternenhimmel bietet genau den gleichen Eindruck, da auch hier nur die Beugungsmuster weit entfernter Objekte zu sehen sind, die für uns hier nicht aufgelöst werden können, die Quellen also quasi punktförmig sind

Der Erfolg dieser Vorrichtung bestand darin, dass der Kontrast um mehrere Größenordnungen erhöht werden konnte. Kontrast ist das Verhältnis von Signal (das, was ich sehen möchte) zu Hintergrund (das, was mich nicht interessiert). Der Hintergrund im Dunkelfeldmikroskop ist schwarz. Und die Lichtblatt-Konstruktion sorgt dafür, dass auch unscharfe Hintergrundinformation aus anderen Schichten verschwindet.

Um auch flüssige Suspensionen von kolloidalem Gold untersuchen zu können, wurde später noch eine Vorrichtung entwickelt, mit der es möglich war, unterschiedliche Lösungen hintereinander ohne großen Präparationsaufwand direkt unter das Objektiv zu bringen. Das wurde durch eine Kammer erreicht, deren Zuleitung mit den verschiedenen Lösungen beschickt werden konnte. Eine frühe Perfusionseinrichtung, wie sie heute aus der Mikroskopie lebender Zellen oder Gewebe nicht mehr wegzudenken ist.

Und wie kann man nun die Größe der Partikel bestimmen, wenn man sie zwar erkennen, aber nicht ausmessen kann? Dazu haben sich die Autoren der zwei nächstliegenden Methoden bedient. Einmal konnte man ja das Volumen berechnen, in dem die Partikel sichtbar werden, das ist die Dicke des Lichtblattes multipliziert mit der Fläche des beleuchteten Sehfeldes. Wie viel Gold in den Gläsern bzw. Suspensionen vorhanden war, wurde bei der Herstellung genau vorgegeben und war darum bekannt. Damit kann man auch berechnen, welche Masse an Gold im beleuchteten Volumen vorhanden sein muss. Nun braucht man nur noch diese Masse durch die gezählte Menge der Partikel zu teilen, *e voilà* – man hat die mittlere Masse der Partikel, die unter Verwendung des spezifischen Gewichtes von Gold auf den Durchmesser der Partikel führt. Statt die Partikel zu zählen, kann man auch deren Abstände zueinander messen, woraus die Anzahl im Volumen dann auch abgeschätzt werden kann. Beide Methoden führten zu ähnlichen Ergebnissen. Dabei muss man aber stets bedenken, dass die Größe solcher Partikel um einen Mittelwert herum verteilt ist. Die Form der Verteilung lässt sich aus solchen Messungen zunächst nicht ablesen. Immerhin konnten damals Partikelgrößen bis hinunter zu 6 nm nachgewiesen werden – kleiner als 1/30 der optischen Auflösung!

An dieser Stelle soll ein weiteres Instrument erwähnt werden, das ebenfalls in Zusammenarbeit mit Carl Zeiss entwickelt wurde und dem Ultra-Spaltmikroskop sehr ähnlich ist. Das Lichtschnittverfahren von Gustav Schmaltz [18] erzeugt ebenso ein Lichtblatt mittels eines Spaltes. Beleuchtet wurden damit Oberflächen von Werkstücken aus Metall oder Keramik. Das reflektierte Licht hat die Gestalt des Profils der Oberfläche und konnte mit einer Kamera aufgezeichnet werden. So lassen sich Geometrien vermessen und Fehler an solchen Objekten nachweisen. Der Begriff „Lichtschnitt“ ist in technischen Anwendungen durchaus auch heute noch gebräuchlich, in der biologischen Mikroskopie aber nicht eingeführt worden.

Die Lichtblattmikroskopie

Biologische Strukturforschung im Querblick

Borlinghaus, R.T.

2017, XI, 45 S. 14 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-16809-4