Mikroskopie in Forschung und Praxis

Horst Robenek

GIT VERLAG

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort	11
Kapitel 1	Lichtmikroskopie D. Gerlach	
1.1.	Einleitung	13
1.1.1.	Licht-Modelle	13
1.1.2.	Sammellinsen	
1.1.3.	Mikroskope	15
1.2.	Optische Teile im abbildenden Teil des Mikroskopes	17
1.2.1.	Objektive	17
1.2.1.1.	Güteklassen der Objektive	17
1.2.1.2.	Kenndaten für Objektive	
1.2.1.2.1.	Maßstabszahl	21
1.2.1.2.2.	Numerische Apertur und Deckglasdicke	21
1.2.1.2.2.1.	Trockenobjektive	21
1.2.1.2.2.2.	Immersionsobjektive	
1.2.1.2.3.	Mechanische Tubuslänge	26
1.2.1.3.	Abgleichlänge	27
1.2.1.4.	Objektive mit Federfassung	27
1.2.2.	Okulare	
1.2.2.1.	Vergrößerung des Zwischenbildes	27
1.2.2.2.	Förderliche Vergrößerung	28
1.2.2.3.	Brillenträgerokulare und Austrittspupille	29
1.2.2.4.	Okulare zur Korrektion von Bildfehlern	29
1.2.2.5.	Begrenzung des Gesichtsfeldes durch das Okular	30
1.2.2.6.	Längenmessungen mit dem Mikroskop	
1.2.2. <i>7</i> .	Eichung eines Meßokulars	31
1.2.2.8.	Verwendung eines Okulars als Lupe	32
1.3.	Optische Teile im beleuchtenden Teil des Mikroskopes	32
1.3.1.	Lichtquelle	32
1.3.1.1.	Beleuchtung des Präparates mit einem Spiegel	32
1.3.1.2.	Eingebaute künstliche Lichtquellen	32
1.3.1.2.1.	Glühlampen	
1.3.1.2.2.	Niedervolt-Glühlampen	32
1.3.2.	Kollektivlinsensystem	33
1.3.3.	Kondensor	33
1.3.3.1.	Einstellen der Kondensorblende	34
1.3.3.2.	Immersionskondensoren	
1.4.	Beleuchtung des Präparates	35
1.4.1.	Kritische Beleuchtung	36
1.4.2.	Köhlersche Beleuchtung	
	▼	

1.4.2.1. 1.4.2.2.	Einstellen der Köhlerschen Beleuchtung Vorteile der Köhlerschen Beleuchtung	3 <i>7</i>
1.5.	Bildentstehung im Mikroskop und Beugung	
1.5.1.	Beugungserscheinungen im Mikroskop	39
1.5.2.	Bedeutung der Beugungserscheinungen für die Bildentstehung	
	im Mikroskop	41
1.5.3.	Auflösung im Mikroskop	43
1.6.	Kontrast	44
1.6.1.	Amplitudenobjekte	
1.6.2.	Phasenobjekte	45
1.6.2.1.	Schließen der Kondensorblende	
1.6.2.2.	Schiefe Beleuchtung	47
1.6.2.3.	Hoffmannscher Modulationskontrast	
1.6.2.4.	Dunkelfeldmikroskopie	48
1.6.2.4.1.	Hellfeldkondensor mit Zentralblende	48
1.6.2.4.2.	Spiegelkondensoren für die Dunkelfeldmikroskopie	49
1.6.2.4.2.1.	Einstellen eines Trockendunkelfeldkondensors	50
1.6.2.4.2.2.	Immersionsdunkelfeldkondensoren	
1.6.2.4.3.	Eigenschaften des Dunkelfeldbildes	51
1.6.2.5.	Phasenkontrastmikroskopie	51
1.6.2.5.1.	Grundlagen	
1.6.2.5.2.	Ausrüstung für die Phasenkontrastmikroskopie	52
1.6.2.5.3.	Einstellen einer Phasenkontrasteinrichtung	53
1.6.2.5.4.	Besonderheiten des Phasenkontrastbildes	54
1.6.2.6.	Polarisationsmikroskop	55
1.6.2.6.1.	Natürliches und polarisiertes Licht	55
1.6.2.6.2.	Polarisationsmikroskopie	57
1.6.2.6.2.1.	Doppelbrechung	
1.6.2.6.2.2.	Differentieller Interferenzkontrast	62
1.6.2.6.2.2.1.	Einstellen des Differentiellen Interferenzkontrastes	64
1.6.2.6.2.2.2.	Amplitudenkontrast	65
1.6.2.7.	Vergleich von Hellfeld, Dunkelfeld, Phasenkontrast	
	und Differentiellem Interferenzkontrast	
1.6.3.	Reflexionskontrast	66
1.6.4.	Fluoreszenzmikroskopie	
1.6.4.1.	Fluoreszenz	68
1.6.4.2.	Grundsätzlicher Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes	69
1.6.4.3.	Die Bestandteile eines Fluoreszenzmikroskopes	
1.6.4.3.1.	Lichtquelle	71
1.6.4.3.1.1.	Quecksilberhöchstdrucklampen	
1.6.4.3.1.2.	Xenonbrenner	73
1.6.4.3.1.3.	Halogenlampen	73
1.6.4.3.2.	Filter	
1.6.4.3.3.	Objektive	
1.6.4.4.	Anwendungsmöglichkeiten eines Fluoreszenzmikroskopes	75
1.6.4.5.	Kombination eines Fluoreszenzmikroskopes mit anderen	
	Untersuchungsverfahren	76

1.7.	Mikrophotometrie	76
1.7.1.	Grundlagen der Photometrie	
1.7.2.	Ausrüstung für die Mikrophotometrie	
1.7.2.1.	Photomultiplier	
1.7.2.2.	Sonstige Ausrüstungen	77
1. <i>7</i> .3.	Mikrophotometrische Messungen und ihre Auswertung	
1.7.4.	Fehler bei mikrophotometrischen Messungen	
1.8.	Das Mikroskopstativ	80
1.8.1.	Aufrechte Mikroskope	
1.8.1.1.	Kursmikroskope	
1.8.1.2.	Labor-(Arbeits-) Mikroskope	81
1.8.1.3.	Forschungsmikroskope	
1.8.1.4.	Tuben	
1.8.2.	Inversmikroskope (Umgekehrte Mikroskope)	
1.9.	Weiterführende Literatur	84
v : 10	c. 1 1 ·	
Kapitel 2	Stereomikroskopie R. Gieseler	
2.1.	Entwicklung	87
2.2.	Dreidimensionales Sehen und Sehschärfe	88
2.2.1.	Räumliches Sehen	88
2.2.2.	Sehschärfe oder Auflösungsvermögen	90
2.2.3.	Zusammenwirken von dem 3-D-Sehen und der Stereomikroskopie	91
2.3.	Grundlagen der Stereomikroskopie	91
2.3.1.	Stereomikroskop nach GREENOUGH	92
2.3.2.	Stereomikroskop mit geimeinsamem Hauptobjektiv	
2.4.	Vergrößerung, Auflösung und Schärfentiefe	
2.4.1.	Bestimmung der Vergrößerung	
2.4.2.	Auflösungsvermögen	
2.4.3.	Förderliche Vergrößerung	97
2.4.4.	Schärfentiefe	
2.4.5.	Größe des Sehfeldes	
2.5.	Linsensysteme und ihre Korrektionsklassen	99
2.5.1.	Sphärische Aberration	99
2.5.2.	Chromatische Aberration	
2.5.3.	Chromatische Vergrößerungsdifferenz	100
2.5.4.	Astigmatismus	
2.5.5.	Bildfeldwölbung	
2.5.6.	Verzeichnung	100
2.6.	Gerätetechnischer Aufbau eines Stereomikroskopes	
2.6.1.	Objektive	
2.6.2.	Okulare	
2,6.3.	Vergrößerungswechsler	104

2.6.4. 2.6.5.	Mikroskopgehäuse, Triebkästen und Mikroskopträger	
	Tubuskonzept	
2.6.6.	Stative	
2.6.6.1.	Auflichtstative	
2.6.6.2.	Durchlichtstative	
2.6.6.3.	Tischeinsätze	
2.7. 2.7.1.	Beleuchtung	
	Objekt und Beleuchtungsart	107
2.7.2.	Methoden für Hellfeld- und Dunkelfeld-Beleuchtung	100
0.7.0.1	und Polarisation	
2.7.2.1.	Hellfeld	
2.7.2.2.	Dunkelfeld	
<i>2.7.2.3</i> .	Beleuchtung mit polarisiertem Licht	
2.7.3.	Lichtquellen und Lampenhäuser	
<i>2.7.3.</i> 1.	Separate Lampenhäuser	
<i>2.7.3.2.</i>	Eingebaute Lampen	
2.7.4.	Faseroptische Beleuchtungseinrichtungen	111
<i>2.7.4.</i> 1.	Beleuchtungs-Lichtleiter	111
2.7.4.2.	Glasfaser-Ringlicht	111
2.8.	Zubehör	
2.8.1.	Zeichentubus	113
2.8.2.	Einrichtungen zum Mitbeobachten	113
2.8.2.1.	Dikussionstubus	113
2.8.2.2.	Mitbeobachtung im Baukastensystem mit Kleinbild, Film- und Videokameras	113
2.8.3.	Ansatz für Auf- und Schrägsicht	
2.8.4.	Ansatz zum Ausrichten der optischen Achse	
	·	
2.9.	Dokumentation	
2.9.1.	Mikrophotographie	
2.9.1.1.	Mikrophotographische Einrichtungen	
2.9.1.2.	Festlegung der Belichtung mit Belichtungsmessern	
2.9.1.3.	Photoautomaten	
2.9.2.	Videotechnik	
2.9.2.1.	Videokameras	
2.9.2.2.	Videoprinter	
2.9.2.3.	Videorekorder	
2.9.3.	Dreidimensionale Darstellungen	120
2.10.	Messungen	121
2.11.	Sondergeräte	
2.11.1.	Kombistereomikroskop	121
2.11.2.	Makroskop	122
2.11.3.	Operationsmikroskop	
2.11.3.1.	Aufbau	
2.11.3.2.	Beleuchtung	
2.11.3.3.	Optische Komponenten	125
	,	

2.11.3.4.	Asepsis	125
2.11.3.5.	Stativ	
2.11.3.6.	Zubehör	126
2.12.	Literatur	127
Kapitel 3	Transmissionselektronenmikroskopie K. Zierold	
3.1.	Einleitung	129
3.2. 3.2.1. 3.2.1.2. 3.2.1.3. 3.2.2. 3.2.2.1. 3.2.2.2. 3.2.2.2. 3.2.2.4. 3.2.2.5. 3.2.2.6 3.2.3. 3.2.3.1. 3.2.3.2. 3.2.3.1.	Physik und Technik der Transmissionselektronenmikroskopie Funktion des Transmissionselektronenmikroskopes (TEM) Elektronenoptik Wechselwirkung des Elektronenstrahles mit dem Präparat Bildregistrierung Abbildende Elektronenmikroskopie Der elektronenmikroskopische Kontrast Holographie Elektronenbeugung Bildverarbeitung Tomographie Hochvoltelektronenmikroskopie (HVEM) Analytische Elektronenmikroskopie Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM) Röntgenmikroanalyse Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS)	130 135 137 139 140 142 146 146 147 147
3.2.3.4. 3.3. 3.3.1. 3.3.2. 3.3.2.1. 3.3.2.2. 3.3.3.1. 3.3.3.2. 3.3.3.3.3. 3.3.3.4. 3.3.4.1. 3.3.4.1. 3.3.4.2. 3.3.4.3.	Energiefilterelektronenmikroskopie (EFTEM) Präparation Präparatträger Chemische Präparationstechniken Präparation von Plastikschnitten Präparation von Biomolekülen Kryopräparationstechniken Kryofixierung Gefrierbruch-Replika-Technik Vitrifizierte Suspensionen Kryoultramikrotomie Tieftemperatur-Entwässerung und Einbettung Zytochemie Fällungstechniken Autoradiographie Affinitätszytochemie und Immunmarkierung	154155157160161163165166167169170
3.4. 3.4.1. 3.4.2.	Grenzen und Ausblicke Strahlenschaden Perspektiven der Elektronenmikroskopie in Biologie und Medizin	175
3.4.2. 3.5.	Literatur	

Kapitel 4	Kapitel 4 Rasterelektronenmikroskopie und Röntgenmikroar R. Reichelt		
4.1.	Einführung	185	
4.2.	Rasterelektronenmikroskopie: Physikalische und instrumentelle Grundlagen	186	
4.2.1.	Wechselwirkung der Elektronen mit der Materie	186	
4.2.1.1.	Elastische und unelastische Streuung		
4.2.1.2.	Sekundärelektronen		
4.2.1.3.	Rückgestreute Elektronen		
4.2.1.4.	Kathodolumineszenz-Strahlung	192	
4.2.1.5.	Röntgenstrahlung	193	
4.2.2.	Konventionelle Rasterelektronenmikroskopie und		
	Röntgenmikroanalyse	194	
4.2.2.1.	Rasterelektronenmikroskopie	194	
4.2.2.2.	Röntgenmikroanalyse und Elementkartierung	199	
4.2.3.	Hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie	201	
4.2.3.1.	Rasterelektronenmikroskopie bei konventionellen	201	
4.2.3.2.	Beschleunigungsspannungen		
4.2.3.2. 4.2.4.	Rasterelektronenmikroskopie an feuchten Proben	206	
<i>4.2.4. 4.2.5.</i>	Rastertransmissionselektronenmikroskopie	209	
	•		
4.3.	Präparative Verfahren in der Rasterelektronenmikroskopie	210	
4.3.1.	Dehydratation biologischer Objekte	211	
4.3.2.	Erhöhung der Leitfähigkeit und Stabilität biologischer Objekte		
4.3.3.	Immunmarkierung		
4.4.	Kurzer Ausblick auf methodische Aspekte		
<i>4.5.</i>	Literatur	213	
Kapitel 5 5.1.	Konfokale Laserscanning Mikroskopie J. Engelhardt und W. Knebel Einführung	210	
<i>5.2.</i>	Historischer Abriß der Konfokalmikroskopie		
<i>5.3</i> .	Konfokalität		
5.3.1.	Was ist Konfokalität?	221	
5.3.2.	Konsequenzen aus der Konfokalität	222	
5.3.3.	Wo sind die Grenzen der konfokalen Optik?		
5.3.4.	Realisierungsmöglichkeiten konfokaler Anordnungen		
5.3.5.	Scanverfahren		
<i>5.4.</i>	Anwendungen der konfokalen Mikroskopie		
5.4.1.	Reflexionsabbildungen	2 28	
5.4.2.	Simultane Fluoreszenzdetektion		
<i>5.4.3.</i>	Untersuchungen an lebenden Zellen	230	

5.4.4.	Quantitative Konfokalmikroskopie und 3-dimensionale Bildverarbeitung	230
<i>5.5</i> .	Zusammenfassung und Ausblick	231
5.6.	Literatur	
Kapitel 6	Rastersondenmikroskopie M. Amrein	
6.1.	Einführung	233
<i>6.2.</i>	Grundlagen und instrumentelle Aspekte der Rastersondenmikroskopien	234
6.2.1.	Das lokale Experiment	234
6.2.2.	Rastereinheit	
6.2.3. 6.2.4.	AuflösungProbenpräparation	
6.3.	Das Rastertunnelmikroskop	
6.3.1.	Tunnelstrom	
6.3.2.	Instrumentelle Aspekte und Abbildungsarten der STM	
6.3.3.	STM in der makromolekularen, biologischen Strukturforschung	241
6.4.	Das Rasterkraftmikroskop	243
6.4.1.	Kräfte in der SFM	
6.4.2. 6.4.3.	Instrumentelle Aspekte und Abbildungsarten der SFMSFM in der biologischen Anwendung	
6.5.	Optische Nahfeldmikroskopie	
6.5.1.	Licht und Materie in der SNOM	
6.5.2.	Instrumentelle Aspekte und Abbildungsarten in der SNOM	
6.5.2.1.	Verschiedene SNOM	
<i>6.5.2.2. 6.5.2.3.</i>	SondenAbstandsregelung	
<i>6.5.3.</i>	Anwendungen in der Biologie	
6.6.	Zusammenfassung und Ausblick	
6.7.	Dank	
6.8.	Literatur	256
Kapitel 7	Akustische Mikroskopie	
	J. Bereiter-Hahn	
<i>7.</i> 1.	Was dürfen wir von der akustischen Mikroskopie erwarten?	261
7.2.	Basales über Ultraschall	
7.2.1.	Eigenschaften von Schallwellen	
<i>7</i> .2.2.	Schalldämpfung	ZO/

<i>7</i> .3.	Prinzipien der Verwirklichung akustischer Mikroskopie	270
<i>7</i> .3.1.	Das Scanning-Laser-Akustomikroskop (SLAM)	
<i>7.3.2</i> .	Das Scanning-Akustomikroskop (SAM)	271
<i>7</i> .3.2.1.	Technische Realisierung eines SAM	273
<i>7</i> .3.2.1.1.	Scanner	
<i>7</i> .3.2.1.2.	Grundzüge der elektronischen Schaltkreise	276
7.3.2.1.3.	Bildspeicherung	
7.3.2.1.4.	Verbindung von SAM und Lichtmikroskop	278
7.3.2.2.	Bildentstehung im SAM	278
7.3.2.2.1.	Kontrast im SAM	
7.3.2.2.1.1.	Amplitudenkontrast	
7.3.2.2.1.2.	Beugungskontrast	
7.3.2.2.1.3.	Phasen-Kontrast	
7.3.2.2.1.4.	V(z) Kontrast	
7.3.2.2.1.5.	Interferenzkontrast	
7.3.2.2.2.	Optische (akustische) Übertragungsfunktion	
7.3.2.3.	Auflösungsvermögen des SAM	
7.3.2.3.1.	Laterale Auflösung	
7.3.2.3.2.	Einfluß der Kopplungsflüssigkeit auf das Auflösungsvermögen	204
7.0.2.0.2.	und Nicht-Linearitätsphänomene	286
<i>7</i> .3.2.3.3.	Auflösung in z-Richtung	
7.3.2.3.4.	Penetrationstiefe von SAM, Abbildung von Strukturen unter der	200
7.0.2.0.4.	Oberfläche	289
<i>7.3.2.3.5</i> .	Phasendetektion zur Verbesserung von Auflösung in z-Richtung	
7.3.2.3.6.		
7.3.2.4.	Zeitaufgelöste Ultraschallmikroskopie	293
7.3.2.4. 7.3.2.4.1.	Bildinterpretation	
7.3.2.4.1. 7.3.2.4.2.	Beispiel für eine "Mikro V(z)"Methode	
	New January 4th (See his diamondo Objekted)	200
<i>7.3.2.5</i> .	Non-Invasivität (Schädigung des Objektes)	
<i>7.3.2.6.</i>	Präparative Voraussetzungen für SAM	300
7.3.2.7.	Einfluß der Unterlage auf die Objektabbildung: Herstellung	200
7200	verschiedener Oberflächen	
7.3.2.8.	Mechanische Fixierung der Präparate	303
7.4		
7.4 .	Einfluß der Fixierung auf die akustischen Parameter von Zellen und Geweben	201
<i>7.5</i> .	Vergleich mit lichtmikroskopischen Methoden	306
7.6.	Anwendungsmöglichkeiten in Biologie und Medizin	308
7.6.1.	Lebende Einzelzellen	
7.6.1.1.	Darstellung von Einzelzellen und von Zellen in Kultur	308
<i>7</i> .6.1.2.	Qualitative Darstellung der Elastizitätsverteilung durch	
	bildanalytische Verfahren	310
7.6.1.3.	Darstellung zellulärer Bewegungsvorgänge mit SAM	
7.6.1.4.	Volumenbestimmung	
7.6.2.	Darstellung botanischer Objekte	
7.6.3.	Anwendungen in der Histologie	
7.6.4.	Ausblick	

<i>7.7.</i>	Dank	316
7.8.	Anhang	317
7.9.	Literatur	319
Kapitel 8	Automatische Bildanalyse S. Eins und K. J. Stiller	
8.1. 8.1.1. 8.1.2. 8.1.3.	Einleitung Ein Bild sagt mehr als tausend WorteAbgrenzungen und Begriffsbestimmungen Die Entwicklung seit 1950	326 32 <i>7</i>
8.2. 8.2.1. 8.2.2. 8.2.3.	Meßverfahren Visuelle Methoden Teilautomatische Methoden Automatische Methoden	332 334
8.3. 8.3.1. 8.3.2. 8.3.3.	Vorbereitung der Bildanalyse Objektpräparation Bildentstehung Eichung	339 342
8.4. 1. 8.4.1.1. 8.4.1.2. 8.4.2. 1. 8.4.2.2. 8.4.2.3. 8.4.3.1. 8.4.3.2.	Das Graubild Graubildverarbeitung Pixeloperationen Lokale Operationen Spezielle Algorithmen Ein heuristisches Programmierwerkzeug Die schnelle Fourier-Transformation Messungen am Graubild Das Grauwerthistogramm Grauwertkartierungen	349 350 355 357 358 360 362
8.5 8.5.1. 8.5.1.1. 8.5.1.2. 8.5.1.3. 8.5.2. 8.5.2.1. 8.5.2.2. 8.5.2.3. 8.5.3.3. 8.5.3.1. 8.5.3.2. 8.5.3.3.	Das Binärbild Segmentierung Grauschwellen Andere Segmentierungen Einige Bemerkungen zur Farbbildverarbeitung Binärbildverarbeitung Logische Bildverknüpfungen (Boolesche Operatoren) Morphologische Operationen Spezielle Algorithmen Weitere Verarbeitungen Geometrische Transformationen Interaktive Operationen Dreidimensionale Rekonstruktion	365 365 368 369 370 370 371 373 373 373 373
8.6.	Messungen	378

Kapitel 9	Index	393
<i>8.9.</i>	Literatur	389
8.8.	Schlußbetrachtung	386
<i>8.7.</i>	Anwendungen der automatischen Bildanalyse	384
8.6.1.3.	Densitometrie von Objekten und Phasen	384
8.6.1.2.	Objektmessungen und moderne stereologische Verfahren	381
8.6.1.1.	Feldmessungen und klassische stereologische Verfahren	379
8.6.1.	Objekte und Felder	3 <i>79</i>