

Verhältnis der aufgenommenen zur durchgehenden Ladung ebenfalls $J_a/J_s = \alpha_0 \cdot x$. Um eine negative Aufladung des Objektes gegen seine Umgebung und damit Bildstörungen zu verhindern, ist es daher nötig, daß die durchgehenden Elektronen im Objekt durch Sekundäremission denselben geringen Bruchteil $\alpha_0 \cdot x$ auslösen.

Eine so geringe Sekundärausbeute der Größenordnung 10^{-2} bis 10^{-4} scheint immer vorhanden zu sein, so daß Bildstörungen, die auf eine Aufladung der Objekte schließen ließen, bisher nicht beobachtet wurden.

Die das Objekt haltenden Blenden und die Objektpatrone absorbieren natürlich fast alle auftreffenden Elektronen. Die Aufladung dieser Teile kann aber, da sie leitend sind, durch konstruktive Maßnahmen am Übermikroskop vermieden werden, so daß auch dadurch eine Erschwerung des Mikroskopierens nicht eintritt. Ebenso ist es natürlich notwendig, diese Patrone in gutem Wärmekontakt mit den gekühlten Teilen des Gerätes zu halten.

Zusammenfassung.

Das übermikroskopische Bild entsteht durch Fokussierung sehr schmaler Strahlenbündel mittels eines Objektivs großen Öffnungsfehlers. Die Apertur der abbildenden Bündel liegt etwa bei $1/1000$ und ist praktisch gegeben durch die Kondensorapertur, vermehrt durch die im Objekt entstehenden Beugungswinkel erster Ordnung. Die Kontraste entstehen dadurch, daß mit steigender Massendicke der Objektpunkte die Zahl der das Objekt unbeeinflusst in unveränderter Richtung verlassenden und dadurch das Bild erzeugenden Elektronen ab- und der diffus gestreute, zum Bild nicht beitragende Anteil entsprechend zunimmt. Bildsäume, die an den Konturen übermikroskopischer Bilder häufig auftreten, können aus dem Öffnungsfehler der Linse erklärt werden. Für die vom Objekt infolge Absorption der Elektronen aufgenommene Wärme und elektrische Ladung werden quantitative Angaben gemacht; es wird erläutert, warum beide unschädlich bleiben.

Übermikroskopische Untersuchungstechnik.*

Von H. RUSKA, Berlin-Nikolassee.

Durch die Entwicklung und die technische Durchbildung des Übermikroskopes sind die Voraussetzungen für eine bildliche Wiedergabe von Teilchen bis zu 5μ Durchmesser (Gitterkonstante $10 \mu\mu$) geschaffen worden^{1, 2}. Die übermikroskopischen Bilder geben dabei die Massenverteilung in den Objekten wieder³ und nicht andere, sekundäre Eigenschaften wie die lichtmikroskopischen Bilder. Da die Elektronenstrahlen, die diesen Fortschritt in der optischen Auflösung ermöglicht haben, jedoch ein sehr beschränktes Massendurchdringungsvermögen besitzen, und eine Auflichtmikroskopie aus anderen Gründen große Schwierigkeiten bietet, kann man die für die Lichtmikroskopie entwickelten Untersuchungsverfahren in der Übermikroskopie nicht ohne weiteres übernehmen. Objektträger, Deckgläser und selbst Schichten von der Dicke dünnster Mikrotomschnitte ($> 1 \mu$) sind für die Durchstrahlung mit Elektronen zu dick.

1. Anforderungen an übermikroskopische Objektträger.

Gut durchstrahlbare Schichten dürfen nur eine Dicke von kolloiden Dimensionen besitzen, d. h., es müssen Gebilde sein, die der Kolloidchemiker als Filme bezeichnet. Diese können entweder selbst Gegenstand der Untersuchung werden, oder als Träger für andere Objekte dienen. Von Objektträgerfilmen müssen die folgenden Bedingungen erfüllt sein, wenn sichere Aussagen über die Massen-

verteilung in den Objekten gemacht werden sollen: Der Trägerfilm muß im Elektronenstrahl durchsichtig erscheinen wie der Objektträger und das Deckglas im Lichtmikroskop. Er muß von einheitlicher Dicke sein und frei von jeder sonstigen elektronenoptisch sichtbaren Eigenstruktur. Er darf beim Aufbringen der Objekte und bei der Durchstrahlung mit Elektronen nicht zerreißen. Die aufgebrachten Objekte müssen auf ihm festhaften, und schließlich muß man eine Untersuchung des Films im Übermikroskop durchführen können, bevor er mit dem Objekt beschießt wird. Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, so können Täuschungen durch zufällig entstehende Kunstprodukte und dem Film anhaftende, objektfremde Bestandteile eintreten. Aus der Lichtmikroskopie bekannte Objekte wird man auf solchen Trägern auch dann wieder erkennen, wenn diese Forderungen nur in mäßigem Umfang erfüllt sind. Handelt es sich aber darum, auf derartigen Filmen Objekte zu betrachten, die wegen ihrer Kleinheit einer lichtoptischen Abbildung unzugänglich sind, und bei denen indirekte Meßverfahren zu teilweise widerspruchsvollen Ansichten über Gestalt und Größe geführt haben, wie es vielfach in dem Gebiet der Virusforschung⁴ der Fall ist, so sollte von den aufgestellten Bedingungen keinesfalls abgewichen werden. Sie sind nicht zuletzt auch zu stellen, um die Bedenken bei der Beurteilung übermikroskopischer Bilder zu zerstreuen, die dort auftauchen können, wo zwar einerseits mit dem jeweils untersuchten Gegenstand Vertrautheit herrscht, wo andererseits aber noch die Möglichkeit fehlt, Erfahrungen mit dem Übermikroskop selbst zu

* Mitteilung aus der I. Medizinischen Universitätsklinik der Charité und dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A.G.

¹ E. RUSKA, Z. Physik 87, 580 (1934).

² B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Wiss. Veröff. Siemens 17, 99 (1938).

³ B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Naturwiss. 27, 281 (1939).

⁴ Näheres s. in der folgenden Arbeit von G. A. KAUSCHE, E. PFANKUCH u. H. RUSKA, Naturwiss. 27, 292 (1939).

sammeln. Tatsächlich sind die Fragen der Untersuchungstechnik, nachdem das Gerät selbst eine hinreichende Durchbildung erreicht hat, als ein Hauptproblem der angewandten Übermikroskopie anzusehen.

2. Die grundsätzlichen Möglichkeiten der übermikroskopischen Betrachtung beliebiger Objekte.

Die Untersuchungsgegenstände befinden sich im Vakuum und können darin 1. freischwebend, 2. in Trägerfilmen eingebettet oder 3. an diesen

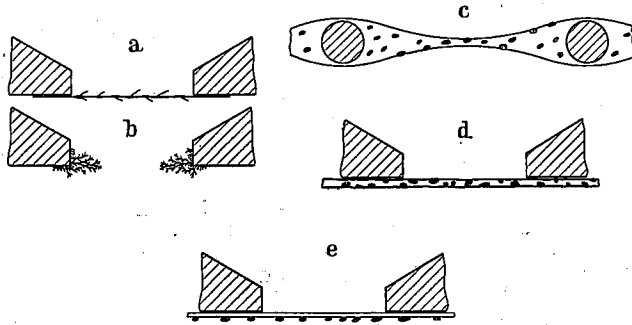


Fig. 1. Arten des übermikroskopischen Präparates. a) Den Strahlengang frei überquerendes Objekt. b) In den Strahlengang frei hineinragendes Objekt. c) Zwischen den Drähten eines Netzes in Trägerhaut eingebettete Objekte. d) Im Trägerfilm eingebettete Objekte. e) Am Trägerfilm haftende Objekte.

haftend untersucht werden. Eine schematische Darstellung dieser Möglichkeiten ist in Fig. 1 wiedergegeben. Das erste Verfahren kann angewendet werden, wenn die Objekte an einer oder an mehreren Seiten gestützt den Strahlengang überqueren oder in ihn hineinragen (1a und b). Die beiden folgenden Verfahren erlauben die Unter-

suchung beliebiger Einzelteilchen und sind deshalb allgemeiner anwendbar. Als mechanische Stütze für den Trägerfilm dient ein Drahtnetz (1c) oder besser eine kleine runde Metallscheibe (Goldplatin) von etwa 4 mm Durchmesser und 0,5 mm Dicke mit feiner zentraler Bohrung (0,3—0,03 mm Durchmesser) in Richtung des Strahlenganges (Fig. 1d und e und Fig. 3c). Um einen langen, zu Reflexionserscheinungen und damit zu Bildstörungen Anlaß gebenden Bohrungskanal zu vermeiden, erweitert man die Bohrung auf der Eintrittsseite des Strahls

trichterförmig, wie es Fig. 1 im Schnitt des zentralen Teiles der Blende zeigt. Wir nennen das unter 1a und b gezeigte Vorgehen die Betrachtung „freier Objekte“. Diese ist von E. RUSKA¹ und später von MARTON⁵, DRIEST und MÜLLER⁶, KRAUSE⁷ und BEISCHER und KRAUSE⁸ angewendet worden. Als besonders widerstandsfähige Objekte, die in dieser Weise betrachtet werden können und leicht zugänglich sind, seien Chitinobjekte (Fliegenflügel) und Ruß genannt (s. Fig. 3 der vorstehenden Arbeit⁹). Der Vorteil der Betrachtung freier Objekte liegt in der Vermeidung jeglicher objektfremder Bestandteile, wie sie die Trägerfilme immerhin darstellen, und die, da die Massenverteilung im übermikroskopischen Bild zur Abbildung gelangt, stets mit abgebildet werden. Dieses Verfahren

ist anwendbar, auch wenn es sich um die Betrachtung von nicht nur flächenhaft, sondern auch räumlich ausgedehnten Gebilden handelt, da die Tiefenschärfe des Übermikropes das 100fache der noch auflösbaren Einzelheiten, also etwa 10 μ beträgt.

Die Abbildung von Aluminiumfolien führten 1933 B. v. BORRIES und E. RUSKA⁹ durch. Das unter 1c und d gezeigte Verfahren der Betrachtung von in Folien eingebetteten Objekten stammt von BEISCHER und KRAUSE^{7,8}. Es hat den Vorteil, daß die eingebetteten Teile nach Fertigstellung der Trägerhaut ziemlich gleichmäßig verteilt sind und völlig festliegen, während bei einer nachträglichen Aufbringung der Teile auf einen vorgegebenen Film diese mitunter Zusammenlagerungen und einseitige Ausrichtung erfahren können. Der Nachteil des Verfahrens liegt darin, daß die oben aufgestellte

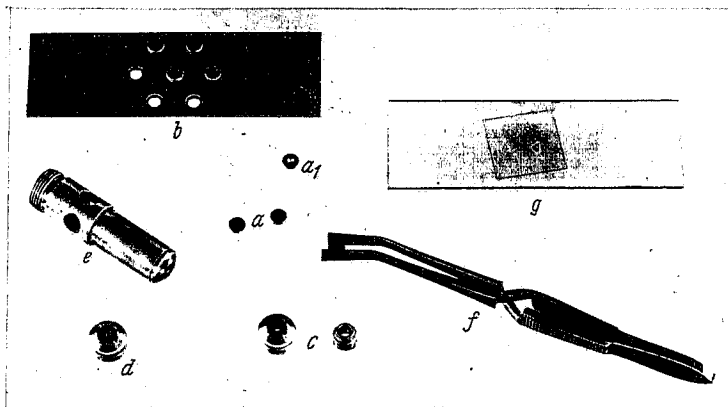


Fig. 2. Halterung und Handhabung der Objektträgerblenden. a) Objektträgerblende (a_1 von Strahlenseite gesehen). b) Objektträgerblenden auf Trägerplatte (zur Filmherstellung, Beschickung und lichtmikroskopischen Untersuchung). c) Patronenkopf mit Mutter zur Festhaltung der Objektträgerblende. d) Patronenkopf mit eingesetzter Objektträgerblende. e) Objektpatrone mit Patronenkopf. f) Pinzette mit Objektträgerblende. g) Lichtmikroskopischer Objektträger mit Deckglas (als Vergleichsmaßstab).

⁵ L. MARTON, Bull. Acad. Belg. Cl. d. Sc. 20, 439 (1934).

⁶ E. DRIEST u. H. O. MÜLLER, Z. Mikrosk. 52, 53 (1935).

⁷ F. KRAUSE, Z. Physik 102, 417 (1936) und Naturwiss. 25, 817 (1937).

⁸ D. BEISCHER u. F. KRAUSE, Naturwiss. 25, 825 (1937).

⁹ B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Z. Physik 83, 187 (1933).

Forderung einer Leerbetrachtung desselben Films vor seiner Beschickung mit Objekten unmöglich ist. Werden solche Häutchen nicht gleichmäßig dick hergestellt (KRAUSE¹⁰) so treten weitere Nachteile auf. Als Grundsubstanz der Trägerhaut haben Boraxglas für die Untersuchung von kolloidalem Gold und Gelatine zur Untersuchung von Bakterien und Vaccine Verwendung gefunden. MARTON¹¹ hat für seine Versuche der Bakteriendarstellung Zaponlackfilme als Objektträger benutzt und auf diesen die Bakterien aufgetrocknet, er hat also „dem Film anhaftende Objekte“ untersucht (Fig. 1e). Über die Belastbarkeit der MARTONschen Filme läßt sich nichts aussagen, da

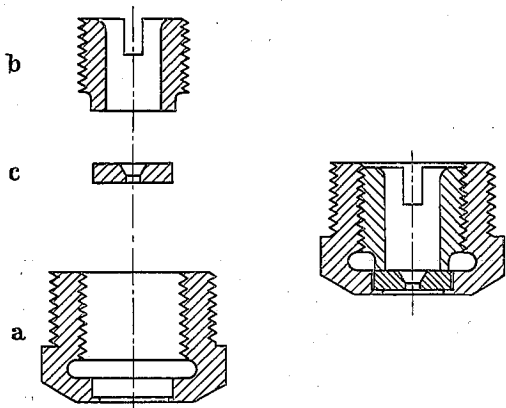


Fig. 3. Objektpatronenkopf *a* mit Befestigungsschraube *b* und Objektträgerblende *c*.

er geringe Vergrößerungen anwandte (meist unter 700 fach elektronenoptisch) und Blindaufnahmen mit sehr kurzer Bestrahlungszeit machte. Die Technik der Filmherstellung hat MARTON nicht beschrieben. Sie ist aber entscheidend für die Haltbarkeit der Präparate während der Untersuchung.

3. Herstellung von Objektträgerfilmen und ihre Beschickung mit Objekten.

Beim Übermikroskop werden die mit Filmen versehenen Objektträgerblenden in einen Patronenkopf festgeschraubt, der seinerseits an einer Patrone befestigt und mit dieser in das Gerät eingeschleust wird. Die Einzelteile der Objekthalterung sind in Fig. 2 dargestellt, ein Schnitt durch den Objektpatronenkopf und seine Teile in Fig. 3.

Wir wollen unser Verfahren der Herstellung von Filmen aus Kollodium bzw. Agfa-Zaponlack Z 116 schildern, jedoch nicht, weil wir glauben, damit eine für alle Zwecke ideale Lösung zu besitzen, sondern weil mit unseren Filmen wenigstens das erreichbar ist, was zur Zeit unbedingt gefordert werden muß. Das Verfahren zur Herstellung dünner Kollodiumschichten ist von TRENKROG¹² ausgearbeitet worden und in den „Physikalischen Kunstgriffen“

von v. ANGERER ausführlich beschrieben¹³; schon von TRENKROG wird Agfa-Zaponlack Z 116 empfohlen; auch MARTON¹¹ benutzte, wie erwähnt, beim Elektronenmikroskop bereits Zaponlackfilme. Im September 1937 machte uns M. v. ARDENNE* auf das bei v. ANGERER beschriebene Verfahren aufmerksam und übermittelte ein Rezept, das wir aber inzwischen verlassen mußten, weil die danach hergestellten Filme nicht dünn genug ausfielen und der notwendigen Belastung nicht standhielten.

Heute arbeiten wir nach folgender Vorschrift: Man gibt in Amylacetat gelöstes Kollodium in Tropfenform auf die Oberfläche eines mit Amylacetat gesättigten Wasserbades. Auf dieser Oberfläche breitet sich der Tropfen infolge seiner geringen Oberflächenspannung gegen Wasser rasch und dünn aus. Nach dem Abdunsten des Amylacetats schwimmt auf dem Wasser eine Kollodiumhaut. Wir verwenden eine Lösung von 1,5 g Coll. in 100 g Amylacetat oder entsprechend mit Amylacetat verdünnten Zaponlack. Bei der Herstellung der Filme ist peinlich darauf zu achten, daß das Wasser, auf dem sich die Kollodiumlösung ausbreitet, völlig unbewegt, staubfrei und frei von kleinen Gasperlen ist. Man benötigt von der Lösung nur einen Tropfen von etwa 0,005—0,01 g, dessen Größe durch Abfließenlassen an Glasstäben von verschiedenem Durchmesser verändert werden kann. Dabei darf der Tropfen, um Wellenbewegungen zu vermeiden, nicht auf die Wasseroberfläche fallen, sondern er muß, mit dem Glasstab der Wasseroberfläche genähert werden und sie schließlich berührend, ohne jede Erschütterung in diese abfließen. So entstehen auf einem hinreichend großen Wasserspiegel freischwimmende Filme, die eine etwa kreisförmige Außenbegrenzung haben. Beachtet man die beschriebenen Vorsichtsmaßregeln nicht, so erhält man leicht eine unregelmäßige und zerrissene Begrenzung oder schon mit unbewaffnetem Auge sichtbare Löcher und dergl.

Sofort nach der völligen Ausbreitung des Tropfens erkennt man die Farben dünner Plättchen auf der Wasseroberfläche. Der Film selbst zeigt nach dem Abdunsten des Amylacetats keine Farben mehr, da seine Dicke fast nur den hundertsten Teil derjenigen beträgt, die kurz nach dem Ausbreiten des Tropfens vorhanden war. Die Dicke unserer dünnsten Filme berechnet sich auf 10 μ . Sie sind demnach dünner als die mittlere Länge der sie zusammensetzenden Kollodiummolekel; diese müssen daher flach in der Filmebene gelagert sein. Es hat sich im Laufe der Versuche als sehr wichtig erwiesen, das Wasser, auf dem der Film gegossen wird, vorher mit Amylacetat zu sättigen, um eine Diffusion des aufgetropften Amylacetats in das

¹³ E. v. ANGERER, Technische Kunstgriffe bei physikalischen Untersuchungen. Braunschweig: Verlag Vieweg 1924 und 1936.

* Herr v. ARDENNE übermittelte seinerzeit auch eine Formel, mit der aus den Mengen und spezifischen Gewichten von Collodium und Amylacetat und aus der Größe der Haut auf der Wasseroberfläche durch einfache Rechnung die Dicke des Films bestimmt wird.

¹⁰ F. KRAUSE, Radiologica 3 (1938).

¹¹ L. MARTON, Bull. Acad. Belg. Cl. d. Sc. 22, 1336 (1936); 23, 672 (1937).

¹² W. TRENKROG, Dr.-Diss., Kiel 1923.

Wasser zu vermeiden. Der Film wird erst dadurch gleichmäßig genügend frei von Spannungen und gegen die Durchstrahlung mit Elektronen ausreichend beständig. Ist das Amylacetat der Collodiumlösung abgedunstet, so erkennt man den Film an dem deutlichen Seidenglanz der Oberfläche des Wasserbades und an seinem zart gekräuselten Rand.

Die Anordnung zur Herstellung der Trägerfilme zeigt Fig. 4. Da ein Film nur einmal mit einem

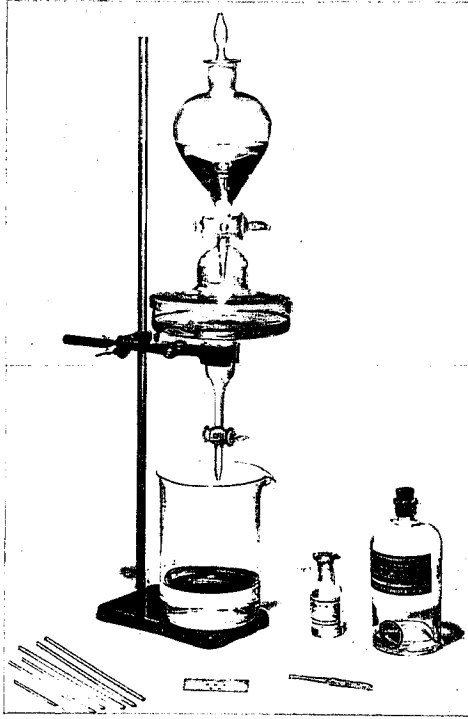


Fig. 4. Gerät zur Herstellung der Objektträgerfilme.

Objekt beschickt werden kann, wird sich der Mikroskopierende die Filme in einer solchen Anordnung selbst herstellen und sie auf die Objektträgerblende aufbringen. Destilliertes Wasser, das mit einem Überschuß von Amylacetat versetzt ist, wird aus

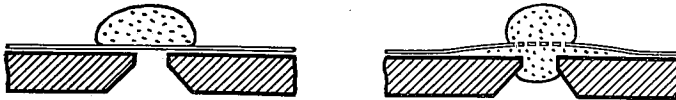


Fig. 5. Beschickung der Objektträgerfilme mit suspendierten Objekten.
Links: Film ohne Löcher; rechts: Film mit Löchern.

dem Scheidetrichter in das Wasserbad abgelassen. Vorher wird auf einen Einsatz des Wasserbades eine Metallplatte von der Größe lichtoptischer Objektträger gelegt, die eine größere Zahl von Objektträgerblenden, wie sie im Übermikroskop Verwendung finden, in entsprechenden Vertiefungen trägt (vgl. Fig. 2b). Während kurzen Abnehmens des Scheidetrichters wird der Zaponlacktropfen auf

die Wasseroberfläche gebracht. Die Anordnung erlaubt weitgehend steriles und staubfreies Arbeiten. Nach der Fertigstellung des Films wird der Inhalt des Wasserbades durch den am Boden befindlichen Hahn abgelassen oder der Einsatz im Wasserbad wird herausgehoben. Dabei senkt sich der Film auf den Träger und haftet nach dem Trocknen an der Luft oder über Schwefelsäure und Calciumoxyd vollkommen fest.

Mit einer Platinöse, wie sie in der Bakteriologie gebräuchlich ist, kann man die in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel oder in Wasser aufgeschwemmten Objekte vorsichtig als Tropfen aufbringen (vgl. Fig. 5 links), ohne mit dem Draht selbst den über die Bohrung freigespannten Teil des Films zu berühren. Nur dieser Teil kann lichtoptisch und elektronenoptisch untersucht werden. Hat man es mit Untersuchungsobjekten zu tun, die im Lichtmikroskop noch sichtbar sind, so kann die Dichte der Lagerung auf dem Film während des Eintrocknens des Tropfens beobachtet werden, und wenn die Lagerung der Teile zu dicht werden sollte, so kann man mit der Ecke eines Stückchens Filtrierpapier den Tropfen teilweise wegsaugen, bis die gewünschte Anordnung erreicht ist. Da Kollodiumfilme mit Wasser schlecht benetzbar sind, können bei einem völligen Wegsaugen des Tropfens alle Objekte vom Film entfernt werden. Oft kommt es beim Verdunsten der letzten Spuren des Suspensionsmittels noch zur Zusammenlagerung vorher getrennt schwebender Teilchen, doch glückt es immer bei der Anfertigung mehrerer Präparate, eine genügende Anzahl der interessierenden Objekte auch in getrennter Lagerung zu erhalten. Handelt es sich um Teilchen, die lichtoptisch unsichtbar sind, so kann über die Brauchbarkeit der Präparate oder einer zur Untersuchung angefertigten Suspension erst die übermikroskopische Beobachtung entscheiden. Die Objekte haften in der Regel auf dem Film, ebenso wie dieser auf seinem Träger, ohne besonderes Befestigungsmittel.

Weist der Film feine Löcher auf, so tritt mitunter der aufgebrauchte Tropfen teilweise auf dessen Unterseite und kann in den kapillaren Spalt zwischen Film und Trägerblende eindringen (Fig. 5 rechts), insbesondere dann, wenn es sich um ein gut benetzendes Suspensionsmittel handelt. Man erkennt diesen Vorgang an der ungewöhnlichen Oberfläche des Präparates, welche das Bild zweier aufeinanderstehender und nicht zusammenfließender Tropfen bietet. Trotz der teilweisen Ablösung des Filmes kann nach dem Wegtrocknen der Flüssigkeit eine übermikroskopische Untersuchung vorgenommen werden.

Nachdem die Objekte auf die beschriebene Weise hergestellt sind, lassen sie sich sorgfältig vor Staub geschützt aufbewahren und sich auch wie lichtmikroskopische Präparate versenden.

4. Verhalten der Trägerfilme bei der Durchstrahlung mit Elektronen.

Das Ein- und Ausschleusen des Präparates von Luft in Vakuum und umgekehrt bedeutet keine Gefährdung der Filme, da durch bauliche Maßnahmen am Übermikroskop dafür gesorgt ist, daß keine hohen Druckdifferenzen auf den beiden Seiten der Objektträgerblende beim Ein- und Ausschleusen eintreten können. Dagegen kann der Film bei zu großer Belastung mit Elektronenstrahlen (über 10^{-3} A/mm² bei 60—80 kV)³ einreißen. Da die Zahl der Elektronen, welche im Objekt absorbiert werden und damit eine Zerstörung verursachen können (Wärme, chem. Veränderung), um so größer ist, je geringer ihre Geschwindigkeit ist, darf die Emission der Kathode erst erfolgen, nachdem die volle Spannung zwischen Kathode und Anode herrscht. Ferner muß vermieden werden, daß das vom Kondensator erzeugte Bild des engsten, sich vor der Kathode ausbildenden Strahlquerschnitts durch das Objekt wandert und so eine plötzliche, zu hohe Belastung des Objektträgerfilms zustande kommt.

Eine Bestrahlungsdichte von etwa 0,1—1 mA pro mm², wie sie zur Erhaltung eines hellen Bildes bei 20 000—30 000facher Vergrößerung erforderlich ist, zerstört den Film nicht, wenn die Bestrahlungsdichte bei genügend hoher Strahlspannung (60 bis 80 kV) langsam (2—5 Sekunden) durch Verkürzung der Brennweite des Kondensors auf den genannten Wert gesteigert wird. Dicke Objekte von 1—10 μ können infolge ihrer starken Energieaufnahme durch völligen und teilweisen Geschwindigkeitsverlust der Elektronen den Trägerfilm zum Einreißen bringen. Diese Gefahr ist erfahrungsgemäß um so geringer, je kleiner der Durchmesser der Trägerblende gewählt wird. Filme auf Blenden von 0,3 mm Durchmesser können unter sonst günstigen Verhältnissen halten, solche von 0,1 bis 0,03 mm Durchmesser halten bei richtiger Behandlung so gut wie regelmäßig.

Die nach unseren Angaben hergestellten Filme sind übermikroskopisch betrachtet strukturlos, sie können aber einzelne oder zahlreiche Löcher in der Größe von Ultrafilterporen haben, die häufig schon von der Herstellung her stammen. Reißt ein Film unter der Bestrahlung, so rollt sich der Rand ein, wodurch im Bild eine Doppellinie entsprechend der durchstrahlten Massendicke entsteht, und vorher runde Löcher nehmen infolge einer Zusammenziehung des Films längliche ovale Gestalt an. Fig. 6 zeigt im Schema Fehler und Einrißformen, wie sie bei mangelhafter Filmherstellung oder falscher Behandlung entstehen. Radiale und unregelmäßige Risse kommen meist bei übermäßig mit Objekten beschickten Filmen vor. Der Vorgang des Einreißen läßt sich beobachten und durch starke Konzentration des Strahls auf das Objekt mittels

der Kondensorspule beschleunigen. Fig. 7 zeigt die Aufnahme eines guten, nicht mit Objekten beschickten Films, Fig. 8 die eines ebenfalls unbeschickten, schlechten und durch Staub ver-

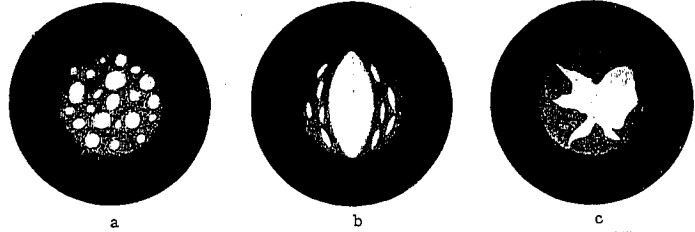
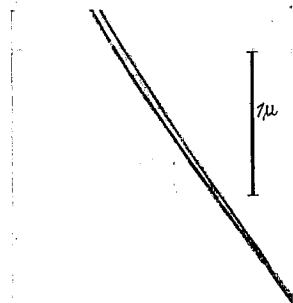


Fig. 6. Schematische Darstellung fehlerhafter Objektträgerfilme. a) Film mit bei der Herstellung oder im Elektronenstrahl entstandenen Löchern. b) Im Elektronenstrahl infolge falscher Herstellung oder zu großen Blendendurchmessers gerissener Film mit ovalen Löchern. c) Im Elektronenstrahl infolge zu dichter Beschickung gerissener Film.

unreinigten Films. Es ist aus Fig. 7 zu ersehen, daß die zu Anfang aufgestellten Forderungen der



II 262/38.

Fig. 7. Unbeschickter Objektträgerfilm. Links Film, rechts keine Masse im Strahlengang; der Filmrand ist zu einem Röllchen aufgewickelt. el.opt. 19000 : 1.



II 214/38.

Fig. 8. Durch Staub bei der Herstellung verunreinigter, unbeschickter Objektträgerfilm. el.opt. 24000 : 1.

völligen „Durchsichtigkeit“ und Strukturlosigkeit von den nach der gegebenen Vorschrift hergestellten Filmen erfüllt werden.

5. Verfahren zur Scharfeinstellung kontrastarmer Objekte.

Die klare Darstellung feinsten organischer Teilchen, um die es sich bei der Aufnahme kleiner Virusarten handelt, verlangt außer einem Fehlen jeglicher Struktur der Trägerhaut eine so weit getriebene Dünne derselben über ein genügend großes Gesichtsfeld, daß ihre Massendicke nicht groß ist gegenüber der Massendicke der feinsten Objekte.



II 378/38.

Fig. 9. Kolloidales Gold zur Scharfeinstellung der Aggregate des Tabakmosaikvirus. el.opt. 20000 : 1. Gesamtvergr. 50000 : 1.

Nur dann kann der Elektronenstrahl, der ein Bild der Massenverteilung des Objekts gibt, diese Objekte mit Kontrast gegenüber dem Untergrund des Trägerfilms abbilden. Die auf dem Leuchtschirm scharf eingestellten Bilder sind bei der sehr großen Tiefenschärfe auf der um nur wenige Millimeter tiefer liegenden photographischen Platte ebenfalls scharf. Der Leuchtschirm gibt aber die im Strahlenbild bestehenden Intensitätsunterschiede weniger kontrastreich wieder als die Photoplatte. Diese Tatsache erschwert die genaue Scharfeinstellung, die auf bequeme Weise nur durch Beobachtung des sichtbaren Bildes mit dem Auge oder durch eine Lupe erfolgen kann. Die Helligkeit des Leucht-

schirms ist für die laufende Betrachtung und für die Scharfeinstellung durchaus genügend.

Ein einfaches Verfahren für die Scharfeinstellung des Bildes auf dem Leuchtschirm bei ungenügendem Kontrast des Objekts ist der Zusatz von Metallkolloidteilchen, die infolge ihrer größeren Dichte sehr viel besser zu sehen sind als gleichgroße Teilchen organischer Natur. Die dazu verwendeten Lösungen von kolloidalem Metall dürfen keine Schutzkolloide und keine Salze enthalten. Fig. 9 zeigt einen Film mit kolloidalen Goldteilchen von 20–40 $m\mu$ Durchmesser*; daneben erkennt man zarte, fadenförmige Gebilde, welche, wie in der folgenden Mitteilung ausführlich auseinandergesetzt wird, Tabakmosaikvirus darstellen. Damit hat sich die früher von uns ausgesprochene Vermutung, daß das Übermikroskop die bildliche Darstellung von lichtoptisch unsichtbarem Virus ermöglichen wird, in vollem Umfang bestätigt¹⁴.

Die übermikroskopische Untersuchung erscheint gleichzeitig als das empfindlichste Verfahren, um die Einheitlichkeit und den Reinheitsgrad von Viruspräparaten zu prüfen, da es bei einem Auflösungsvermögen von 10 $m\mu$ (Einzelteilgröße 5 $m\mu$) noch Teilchen von der Größenordnung von 10^{-19} g darstellt, was vergleichsweise 5000 Kohlenstoffatomen entspricht.

Zusammenfassung.

Die Möglichkeiten der übermikroskopischen Betrachtung beliebiger Objekte werden aufgezeigt und die Forderungen besprochen, die man an Objektträger in der Übermikroskopie stellen muß. Die praktische Herstellung solcher Objektträger und ihre Behandlung beim Beschicken mit Objekten und beim Mikroskopieren wird beschrieben. Schließlich wird ein Verfahren angegeben, um eine Scharfeinstellung des Bildes bei kontrastarmen Objekten zu ermöglichen.

* Die verwendeten Goldsole waren Präparate der Firma Imhausen & Co., Witten a. d. Ruhr. Sie enthielten 66 mg metallisches Gold und 125 mg Elektrolyt im Liter, dagegen kein Schutzkolloid. G. A. KAUSCHE hat durch Dialyse bzw. Elektrodialyse gegen reines Wasser die Leitfähigkeit von $\kappa = 2,5 \cdot 10^{-8}$ Siemens/cm auf $\kappa = 1,5 \cdot 10^{-8}$ Siemens/cm gebracht

¹⁴ B. V. BORRIES, E. RUSKA u. H. RUSKA, Klin. Wschr. 1938, 921.

Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop.*

Von G. A. KAUSCHE, E. PFANKUCH u. H. RUSKA.

Ziel der Arbeit.

Der überraschende Befund STANLEYS^{1,2}, daß es sich bei dem „Erreger“ der Tabakmosaikkrankheit um einen hochmolekularen Eiweißkörper handelt, hat in den letzten Jahren zu Unter-

* Mitteilung aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft und dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A.G.

¹ W. M. STANLEY, Science (N. Y.) 81, 644 (1935).

² W. M. STANLEY, J. of biol. Chem. 115, 673 (1936).

suchungen über die vermutliche Form, die Teilchengröße der letzten infektiösen Einheit und das Molekulargewicht dieses Virusproteins geführt. An diesen Arbeiten haben entsprechend der bisherigen Beteiligung an der physiko-chemischen Seite des Problems der phytopathogenen Viren bis auf BECHHOLD und SCHLESINGER^{3,4} hauptsächlich

³ H. BECHHOLD u. M. SCHLESINGER, Biochem. Z. 236, 392 (1931).

⁴ H. BECHHOLD, Phytopath. Z. 6, 342 (1933).