

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung in die Elektronenmikroskopie (EM)	1
1.1	Elektronenmikroskopische Abbildungsverfahren	1
1.1.1	Konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	1
1.1.1.1	Elektronenmikroskopische Hellfeldtechnik	1
1.1.1.2	EM unter geringer Strahlenbelastung	2
1.1.1.3	Elektronenmikroskopische Dunkelfeldtechnik	3
1.1.2	Konventionelle Rasterelektronenmikroskopie (REM)	5
1.1.2.1	Abbildung mit Sekundär- und RückstreuElektronen	5
1.1.2.2	Arbeiten unter geringer Strahlenbelastung	9
1.2	Präparationsverfahren für die TEM	11
1.2.1	Überblick	11
1.2.2	Strukterhaltung bei der Fixierung, Entwässerung und Einbettung biologischer Proben für die EM	12
1.3	Probleme bei der Abbildbarkeit	14
1.3.1	Zur Interpretation von TEM-Abbildungen	14
1.3.2	Zur Interpretation von REM-Abbildungen	17
1.4	Trägerfolientechnologie	17
1.4.1	TEM-Trägernetzchen und ihre Vorbehandlung	17
1.4.2	Formvarfolien	18
1.4.3	Kollodiumfolien	19
1.4.4	Hydrophilisierung von Trägerfolien	19
1.4.5	Lochfolien	20
1.4.6	Kohleträgerfilme	20
2	Methoden für die TEM	23
2.1	Fixierung, Entwässerung und Einbettung	23
2.1.1	Chemische Fixierung	23
2.1.1.1	Allgemeines	23
2.1.1.2	Fixationsmittel: Eigenschaften und Vorbereitung	24
2.1.1.3	Zusammensetzung der Fixationslösung	27
2.1.1.4	Fixierung tierischer Organismen	31
2.1.1.5	Fixierung von Pflanzen und Mikroorganismen	39
2.1.1.6	Fixierung isolierter Organellen	42
2.1.2	Entwässerung	43

2.1.3	Einbettung	43
2.1.3.1	Kunstharzkomponenten, Durchtränkung und Polymerisation	44
2.1.3.2	Formgießen und Probenorientierung	49
2.1.3.3	Einbettung von Monolayer-Zellkulturen	50
2.2	Ultramikrotomie	51
2.2.1	„Trimmen“ der Blöcke	51
2.2.1.1	Allgemeines	51
2.2.1.2	Gezieltes Trimmen: Herstellung und Färbung von Semidünnsschnitten	53
2.2.2	Herstellung von Glasmessern	54
2.2.2.1	Vorbereitung der Glasstreifen	54
2.2.2.2	Brechen der Quadrate	55
2.2.2.3	Brechen der Messer	56
2.2.2.4	Beurteilung der Messerqualität	57
2.2.2.5	Anbringen der Tröge	57
2.2.2.6	Aufbewahrung von Glasmessern	58
2.2.3	Diamantmesser und ihre Pflege	59
2.2.4	Schneiden	60
2.2.4.1	Trogflüssigkeiten	60
2.2.4.2	Umgang mit dem Ultramikrotom	60
2.2.4.3	Beurteilung der Schnittdicke	61
2.2.4.4	Aufnehmen der Schnittbänder auf Grids	62
2.2.4.5	Probleme beim Schneiden	64
2.2.5	Kontrastierung von Schnitten	64
2.2.5.1	Kontrastierungslösungen	64
2.2.5.2	Kontrastierung von Schnittpräparaten	68
2.2.5.3	Kontrastierung der Schnitte von tieftemperatureingebettetem Material	69
2.2.5.4	Blockkontrastierung	70
2.3	Makromolekulare EM	71
2.3.1	Isolierte Proteine und Proteinaggregate	71
2.3.1.1	Probenvorbereitung	71
2.3.1.2	Verfahren der Negativkontrastierung	72
2.3.1.3	Verfahren der hochauflösenden Metallschrägbedampfung	77
2.3.1.4	Herstellung und Abbildung von zweidimensionalen Proteinkristallen	79
2.3.1.5	Herstellung von „Kippserien“	81
2.3.2	Isolierte Nukleinsäuren	82
2.3.2.1	Problemstellungen	82
2.3.2.2	Probenvorbereitung	84
2.3.2.3	Spreitungs- und Diffusionstechniken unter Verwendung von Cytochrom c	85
2.3.2.4	„BAC-Technik“	88
2.3.2.5	Partielle Denaturierung, Heteroduplex- und R-loop-Techniken	89
2.3.3	Nukleinsäure-Protein-Komplexe	93
2.3.3.1	Vorbereitung der Probenkomponenten	93
2.3.3.2	Herstellung und Kontrastierung von Nukleinsäure-Protein-Komplexen	94

2.4	Immunelektronenmikroskopie (IEM)	95
2.4.1	Voraussetzungen	95
2.4.1.1	Antigene	95
2.4.1.2	Antikörper	95
2.4.2	Markierung von Antigenen in Zellaufschlüssen und Zellen	97
2.4.2.1	Markierung mit der Ferritinteknik	97
2.4.2.2	Markierung mit der Protein-A-Gold-Technik	98
2.4.3	Lokalisierung von Proteinuntereinheiten mit spezifischen IgG-Antikörpern	101
2.4.3.1	Herstellung und Abbildung der Protein-Antikörper-Komplexe	102
2.5	Autoradiographie	102
2.5.1	Physikalische und chemische Grundlagen	102
2.5.1.1	Physikalische Grundlagen	103
2.5.1.2	Chemische Grundlagen	105
2.5.2	Auswahl und Dosierung radioaktiv markierter Verbindungen	108
2.5.2.1	Auswahl radioaktiv markierter Verbindungen	108
2.5.2.2	Dosierung radioaktiv markierter Substanzen	110
2.5.3	Strahlenschutz	112
2.5.4	Gewebevorbereitung	113
2.5.5	Umgang mit Photoemulsionen in der Autoradiographie	115
2.5.5.1	Räumliche und instrumentelle Voraussetzungen zur Durchführung der Autoradiographie	115
2.5.5.2	Auswahl der Photoemulsionen, Bedeutung für das Auflösungsvermögen	117
2.5.5.3	Herstellung der Gewebeschnitte	119
2.5.5.4	Technik der lichtmikroskopischen Autoradiographie	120
2.5.5.5	Technik der Beschichtung von Präparaten mit Photoemulsion	122
2.5.6	Exposition, Entwicklung und Fixierung	128
2.5.6.1	Exposition	128
2.5.6.2	Entwicklung und Fixierung	130
2.5.6.3	Ausblick auf neue Techniken	132
2.6	Gefrier-(bruch-)ätztechnik	134
2.6.1	Einleitung	134
2.6.2	Einfrieren	134
2.6.2.1	Theoretische Hintergründe	134
2.6.2.2	Anwendung von Frostschutzmitteln	135
2.6.2.3	Objektträger	136
2.6.2.4	Gefriermittel und Gefriermethoden	138
2.6.2.5	Probenaufbewahrung	140
2.6.3	Aufbrechen	140
2.6.3.1	Überführung des Objekts in die Vakuumanlage	140
2.6.3.2	Erzeugung von Bruchflächen	142
2.6.3.3	Bruchflächen in biologischem Material	143
2.6.4	Ätzen	145
2.6.4.1	Zweck des Ätzens	145
2.6.4.2	Theorie und Praxis	145

2.6.5	Bedampfen	147
2.6.5.1	Widerstandsverdampfer	148
2.6.5.2	Elektronenstrahlverdampfer	148
2.6.5.3	Schichtdickenmessung	149
2.6.6	Reinigung des Abdrucks	150
2.6.7	Präparationsfehler bei der Gefrierätzung	150
2.6.8	Ablauf eines Gefrierätzungsgangs	151
3	Methoden für die REM	155
3.1	Konventionelle Präparation	156
3.2	Materialhandhabung, Freilegen der Oberfläche und Vorreinigung	158
3.3	Stabilisierung	162
3.3.1	Chemische Fixation	162
3.3.2	Kryofixation	166
3.4	Entwässerung	167
3.5	Trocknung	168
3.5.1	Kritische-Punkt-Trocknung	170
3.5.2	Gefriertrocknung	174
3.6	Präparatmontage	175
3.7	Erhöhung der Leitfähigkeit	177
3.7.1	Kathodenzerstäubung („Sputtern“)	178
3.7.2	Bedampfung	179
3.8	Präparataufbewahrung	180
3.9	Darstellung von Oberflächen durch Abdruck- und Ausgußverfahren	180
3.10	Darstellung von Innenstrukturen durch Sprödbruch- und Anschnittverfahren	182
3.11	Materialanalyse	183
4	Methoden für die Bildauswertung	189
4.1	Bestimmungen von Linien, Flächen und Volumina	189
4.1.1	Problemstellung	189
4.1.2	Allgemeine Hinweise zu Messungen	190
4.1.3	Hinweise zur stereologischen Analyse	190
4.1.4	Meßwerterhebung, Auswertung und statistische Behandlung	191
4.2	Mittelungs- und Bildrekonstruktionsverfahren	193
4.2.1	Problemstellung	193
4.2.2	Markham-Rotation	194
4.2.3	Prinzip der lichtoptischen Diffraktion	194
4.2.4	Prinzipien der Computerbildrekonstruktion	195
Appendix: Puffer in der EM		199
Sachverzeichnis		201