

Aus der I. med. Universitätsklinik der Charité, Berlin und dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A. G., Berlin-Siemensstadt.

Die Bedeutung der Übermikroskopie für die Virusforschung.

Von

Helmut Ruska, Bodo v. Borries und Ernst Ruska, Berlin.

Mit 14 Abbildungen.

1. Ziel der Arbeit.

Unter den Methoden der Virusforschung nehmen diejenigen eine hervorragende Stellung ein, die der Erschließung kleinster Dimensionen dienen. Dabei lassen sich unschwer zwei Hauptgruppen unterscheiden, deren eine sich indirekter Meßverfahren bedient, vorwiegend der Zentrifugierung und Filtration, und deren zweite die direkte Beobachtung mit abbildenden optischen Methoden anwendet. Die zweite Gruppe war bisher nach dem Bereich der erfaßbaren Dimensionen begrenzt, da das Auflösungsvermögen des Licht- und Ultraviolett-mikroskops bei schiefer Beleuchtung nur bis 200 bzw. 100 $m\mu$ reicht. Dort, wo man diese Grenze mittels der Ultramikroskopie und auch der Fluoreszenzmikroskopie zu durchbrechen versuchte, tat man es unter Verzicht auf die Gewinnung geometrisch ähnlicher Vergrößerungen der Objekte. Unmöglich blieb daher die exakte Erkennung von Größe und Form. Diese Grenze wurde erst überschreitbar, als man den gewohnten Weg, für mikroskopische Abbildungen Licht anzuwenden, verließ und mit Elektronenstrahlen und Magnetfeldern hochvergrößernde und hochauflösende Abbildungsgeräte (Übermikroskope) schuf,^{1 2} deren Auflösungsvermögen im Augenblick bei 10 $m\mu$ liegt.

Es würde über den Rahmen dieses Aufsatzes hinausgehen, wollten wir auf die Entwicklungsgeschichte und die sonstige Anwendbarkeit des Übermikroskops ausführlich eingehen oder bereits jetzt genaue Angaben über das Arbeiten mit diesem Gerät machen. Wir wollen aber das Übermikroskop und seine Wirkungsweise kurz beschreiben, die Unterschiede gegenüber dem Lichtmikroskop herausarbeiten und die bisher auf dem Gebiet der Virusforschung erzielten Ergebnisse darstellen.

2. Das Mikroskop und seine Wirkungsweise.

Das Übermikroskop verwendet zur Abbildung der zu untersuchenden Objekte nicht Lichtstrahlen, wie das gewöhnliche Mikroskop, sondern

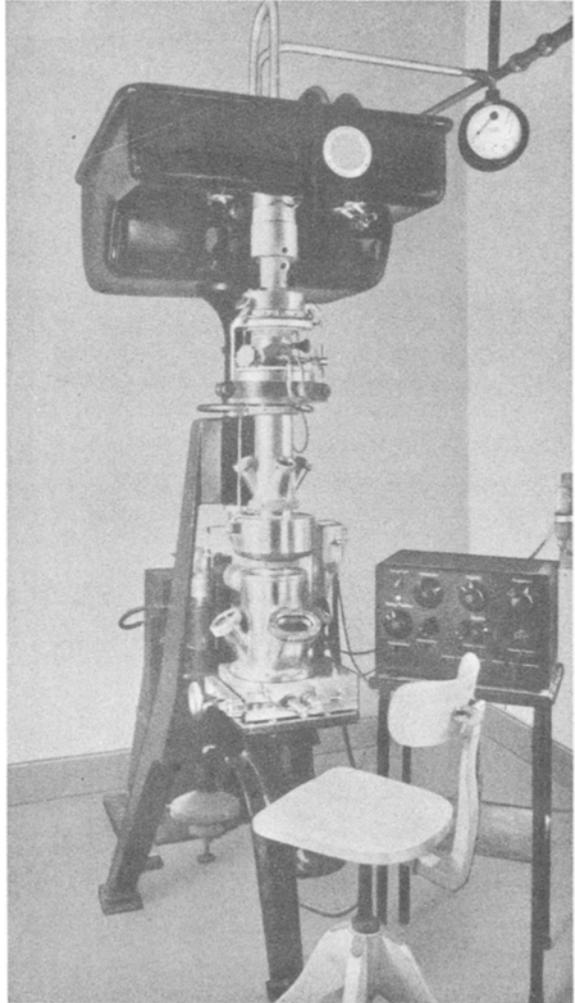
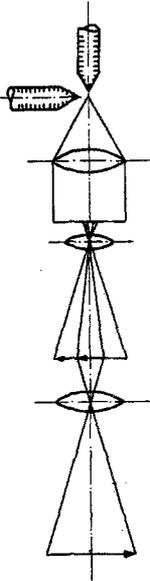


Abb. 1. Übermikroskop. Mit Strahlengang eines entsprechend aufgestellten Lichtmikroskops.

Elektronenstrahlen. Als Linsen benutzt man keine geschliffenen Glaskörper, sondern geeignet geformte Magnetfelder.

Abb. 1 zeigt die Ansicht des Gerätes mit einem daneben dargestellten schematischen Strahlengang, wie er in einem entsprechenden Lichtmikro-

skop mit Photoeinrichtung verlaufen würde. Die Elektronen treten oben aus einer Glühkathode aus und werden durch eine Gleichspannung U_s von 60000—80000 V auf etwa halbe Lichtgeschwindigkeit beschleunigt. Damit sie sich innerhalb des Gerätes quasi-optisch, d. h. geradlinig, fortpflanzen, muß im Gerät ein Vakuum von etwa 10^{-4} mm Hg herrschen; dieses Vakuum wird durch eine dauernd laufende Diffusionspumpe aufrecht erhalten. In den Gang der Elektronen sind drei Linsen gebracht:

1. Die Kondensorlinse, welche die von der Glühkathode divergent ausgehenden Elektronen auf das Objekt richtet;
2. die Objektivlinse, welche von dem Objekt in etwa 15—90facher Vergrößerung auf den Zwischenbildleuchtschirm das Zwischenbild wirft, das durch Fenster beobachtbar ist;
3. die Projektionslinse, welche den jeweils durch ein Loch des Zwischenbildleuchtschirms durchfallenden Teil des Zwischenbildes nochmals bis 330fach zum endgültigen Bild weitervergrößert.

Dieses endgültige Bild kann man bei 1000—30000facher Vergrößerung auf einem Leuchtschirm betrachten, der unter dem Aufprall der Elektronen ähnlich aufleuchtet wie ein Röntgenschirm. Statt auf einen Leuchtschirm kann man das Bild auch direkt auf eine photographische Platte fallen lassen und auf diese Weise festhalten. Die Expositionszeit beträgt etwa 1 Sekunde.

Der Strahlengang im Übermikroskop und der Aufbau der Linsen sind in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die drei Linsen bestehen aus runden, um die Gerätachse konzentrischen, von Gleichstrom I in vielen Windungen N durchflossenen Spulen. Diese sind mit einer Eisenkapselung versehen, die sich beim Objektiv und bei der Projektionslinse in Polschuhe fortsetzt, die einander und der Achse sehr weit genähert sind.

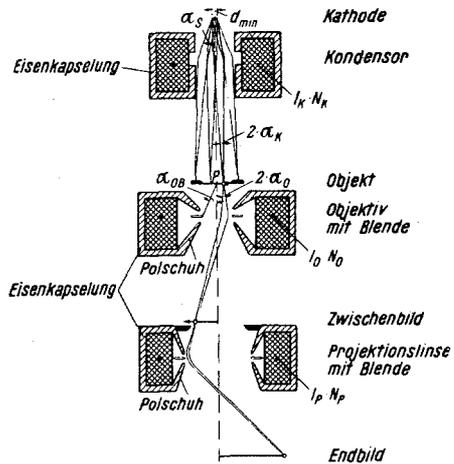


Abb. 2. Strahlengang im Übermikroskop. Abbildung durch enge Bündel.

Der eine Polschuh wird dadurch zum magnetischen Nordpol, der andere zum Südpol; zwischen beiden bildet sich ein sehr kurzes, starkes, rotations-symmetrisches Magnetfeld aus. Jedes Magnetfeld übt auf ein fliegendes Elektron, das eine Ladung transportiert und dadurch einen elektrischen Strom darstellt, eine Kraft aus und beeinflusst so die Bahn des Elektrons. Die Tatsache, daß ein Magnetfeld auf einen Strom eine Kraft ausübt, ist vom Elektromotor her allgemein bekannt. In unserem Falle ist nun die

Wechselwirkung zwischen Magnetfeld und fliegendem Elektron im einzelnen recht verwickelt; insgesamt wirkt aber das Feld auf die Gesamtheit aller Elektronen so, wie eine Sammellinse auf Lichtstrahlen wirkt. Da durch die in Polschuhen endigende Eisenkapselung das magnetische Feld sowohl kurz als sehr stark ist, gelingt es, auch für schnelle Elektronen Brennweiten von wenigen Millimetern zu erzielen, so daß bei mäßiger Länge der Apparatur in jeder Stufe die oben angegebenen hohen Vergrößerungen erzielt werden können.

Das Objekt ist kurz vor der Mittelebene des Objektivs angebracht. Die vom Kondensator kommenden Elektronen treffen auf das Objekt unter einem sehr kleinen Winkel $2 \cdot \alpha_K$. In Abb. 2 sind aus der ganzen Schar der Elektronen 4 Bündel herausgezeichnet, die 4 Punkte der Objektebene treffen. In Wirklichkeit wird *jeder* Punkt der Objektebene von einem entsprechend schmalen Bündel bestrahlt. Von den 4 gezeichneten Bündeln in Abb. 2 treffen zwei den eigentlichen Objektbereich, 2 andere die Trägerblende. Darin, daß die Objektpunkte von *engen* Bündeln bestrahlt werden, liegt ein wesentlicher Unterschied zur Lichtmikroskopie, bei der bekanntlich ein Kondensator das Objekt mit einem *weiten* Strahlenbündel beleuchtet und um so besser ist, je größer seine Apertur ist, je größer also die Neigung der das Objekt erreichenden Strahlen gegeneinander ist. Praktisch liegt die geometrische Apertur der besten Lichtmikroskopkondensoren bei 0,95 (numerische Apertur = 1,4), beim Übermikroskop bei 0,001.

Vom Objekt an sind in Abb. 2 nur noch die Elektronenstrahlen verfolgt, die von *einem* Objektpunkt ausgehen; entsprechende Überlegungen gelten auch für die von den anderen Objektpunkten ausgehenden Elektronen. — Die vom Kondensator kommenden, auf das Objekt treffenden Elektronen werden je nach der am einzelnen Objektpunkt vorhandenen Massendicke* (spezifisches Gewicht $\gamma \times$ Dicke x) zu einem größeren oder kleineren Teil ihrer ursprünglichen Intensität aus ihrer ursprünglichen Richtung abgestreut. Ist das Objekt an dem betreffenden Punkt dick oder dicht, so werden relativ viel Elektronen um Winkel abgestreut, die groß sind gegen die Objektivblendenapertur: α_{OB} ; diese Elektronen fallen dann nicht mehr durch die Objektivblende hindurch und können zur Bildentstehung nicht beitragen; entsprechend bleiben bei den dicken oder dichten Objektstellen nur wenig Elektronen in einem gegen den ursprünglichen Winkel $2 \cdot \alpha_K$ nur wenig vergrößerten Winkel $2 \cdot \alpha_O$ enthalten,³ dieser, von nennenswerter Strahlungsdichte erfüllte Winkel α_O entspricht optisch der *Objektivapertur*, nicht aber der durch die Objektivblende gegebenen Winkel α_{OB} , den wir daher oben mit

* Es ist möglich, daß bei den allein betrachteten dünnen Schichten auch die mittlere Ordnungszahl Z der das Objekt bildenden chemischen Elemente auf das Maß der Abstreuerung von Einfluß ist.

Objektivblendenapertur eingeführt haben.⁴ Während wir vom Lichtmikroskop gewohnt sind, daß in die ganze Öffnung der Objektivlinse von jedem Objektpunkt her Licht einfällt, das dann auf dem Bildpunkt focussiert wird, ist es hier nach Abb. 2 so, daß nur ein kleiner Bereich der Objektivöffnung von Strahlung wesentlicher Intensität erfüllt ist. Bei den praktischen Verhältnissen ist die von Strahlung erfüllte Objektivapertur α_0 etwa 0,001, während die Objektivblendenapertur $\alpha_{0B} = 0,01$, also linear 10mal größer ist.

Da nun infolge des Öffnungsfehlers der Linse nur der Teil der Strahlung zum Bildpunkt focussiert wird, der sich innerhalb des kleinen Winkels $2\alpha_0$ befindet, und dieser Anteil mit steigender Massendicke des Objektes abnimmt, wird der einem dicken oder dichten Objektpunkt entsprechende Bildpunkt auf dem Leuchtschirm dunkel sein. Ein relativ dünner oder wenig dichter Objektpunkt wird nur wenig Elektronen abstreuen; im Kernstrahl der Apertur α_0 werden also relativ viel Elektronen erhalten geblieben sein, so daß der diesem Objektpunkt entsprechende Bildpunkt auf dem Leuchtschirm relativ hell ist.

Während man beim Lichtmikroskop bekanntlich dadurch scharf einstellt, daß man den Abstand des Objektivs vom Objekt mittels mechanischer Verschiebung ändert, bietet die Elektronenoptik die Möglichkeit, die Brennweite der Linsen selbst zu ändern, indem man die Beschleunigungsspannung U_s der Elektronen oder den Linsenstrom I ändert. Die Brennweite f einer Magnetlinse ist nämlich in erster Näherung gegeben durch

$$f = C \cdot d \cdot \frac{U_s}{I^2 \cdot N^2},$$

worin C eine Konstante und d der Durchmesser der Polschuhe der Linse bedeutet. Die Beziehung läßt erkennen, daß eine Erhöhung der Beschleunigungsspannung U_s der Elektronen die Brennweite erhöht und eine Vergrößerung der Stromstärke I der Linsenspule die Brennweite verkürzt und umgekehrt.

Durch Drehen eines im Kreis der Kondenserspule liegenden Widerstandes kann man nun den Grad der Konzentration des Strahls auf dem Objekt und damit die Bildhelligkeit ändern. Durch Betätigen der Objektivwiderstände stellt man das Bild scharf und durch Änderung des Projektionsspulenwiderstandes erreicht man die gewünschte Sekundärvergrößerung. Jedoch besteht auch wie beim Lichtmikroskop die Möglichkeit, den Abstand zwischen Objekt und Objektiv zu ändern und damit die Vergrößerung in erster Stufe zu variieren.

Die Abhängigkeit zwischen Brennweite, Strahlspannung und Spulenstrom zeigt, daß die Strahlspannung U_s und der Spulenstrom I sich nicht ändern dürfen, wenn die Brennweite der Linsen und damit der optische Zustand des Bildes sich nicht ändern soll. Dieser Umstand erfordert, daß

man die Spulenströme kräftigen Akkumulatoren entnimmt und für die Erzeugung der Hochspannung zwischen das normale Kraftnetz, das stets starken Spannungsschwankungen unterworfen ist, und den Hochspannungstransformator sehr exakt arbeitende Regler setzt. Zu einer Übermikroskopanlage gehört daher außer dem eigentlichen Gerät noch eine größere Akkumulatorenatterie, eine Hochspannungsanlage mit Transformator, Gleichrichterventil und Beruhigungskondensatoren, eine Regulierung mit Schalttafeln, eine Vakuumanlage, bestehend aus rotierender Ölpumpe und Hauptpumpe (Diffusionspumpe).

Die Schwierigkeiten, die dadurch gegenüber dem Lichtmikroskop gegeben sind, daß sowohl das Objekt als auch die photographische Platte in das Vakuum hinein- und wieder herausgebracht werden müssen, ohne daß dadurch wesentlicher Zeitverlust entsteht, sind dadurch behoben, daß für beide Zwecke Schleusen vorgesehen sind. Man ist daher nicht genötigt, jeweils in die Apparatur Luft einzulassen, sondern läßt nur die kleinen, dem Schleusenvolumen entsprechenden Luftmengen eintreten, die von der Pumpe aus der Schleuse schnell abgesaugt werden. Die Auswechslung eines Objekts kann man auf diese Weise in 1 Minute, die der Platte in 2 Minuten bewerkstelligen, Zeiten, die kaum die entsprechenden Zeiten beim Lichtmikroskop übertreffen, und jedenfalls im Verhältnis zu den durch die Präparation und die übermikroskopische Beobachtung erforderlichen Zeiten ganz unbedeutend sind.

Da das Übermikroskop durchweg im Durchstrahlungsverfahren arbeitet, hat der Objektträger die Form eines runden Metallscheibchens von etwa 4 mm Durchmesser und $\frac{1}{2}$ mm Dicke, das in der Mitte eine Bohrung trägt. Dieses Scheibchen nennen wir die Objektträgerblende. Sie wird an einer Patrone befestigt und mit dieser so eingeschleust, daß ihre Bohrung vor das Objektiv kommt und von den Elektronen durchstrahlt wird. Der Bereich der Blendenbohrung stellt das der Untersuchung zugängliche Objektfeld dar. Das Feld wird überdeckt mit einem etwa $0,01 \mu$ dicken Kollodiumfilm, der die Untersuchungsobjekte trägt.

Der kleinste der im Übermikroskop verwendeten Objektblendendurchmesser beträgt 0,03 mm. Dieses Maß legt das beobachtbare Objektfeld fest; es entspricht bei maximaler lichtoptischer Vergrößerung noch nicht dem ganzen Bildfeld eines Okulars. Bei 27000facher Vergrößerung würde dem Objektfeld von 0,03 mm ein Bildfeld von 80 cm entsprechen. Da das Format der verwendeten Platte nur $6\frac{1}{2} \times 9$ cm ist, war es nötig, eine Verschiebung des Objekts gegen das Objektiv vorzusehen. Diese Anordnung arbeitet ähnlich wie ein Kreuztisch des Lichtmikroskops und erlaubt es, während der Beobachtung das gesamte Präparat abzusuchen. Diese Möglichkeit besteht auch dann noch, wenn eine Objektblende von 0,3 mm Durchmesser verwendet wird, wenn das Präparat also den 10fachen Durchmesser und so ein Bildfeld von 8 m hat.

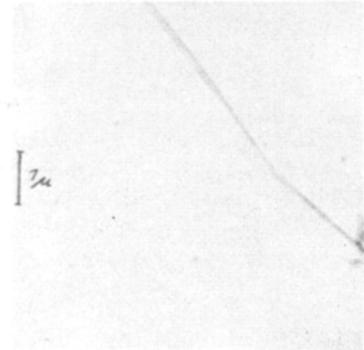
3. Das übermikroskopische Präparat und die Deutung seiner Bilder.

Für die praktische Anwendung der Übermikroskopie sind zwei Besonderheiten der zur Bilderzeugung angewandten Strahlen bestimmend: erstens kann der Elektronenstrahl nur sehr dünne Objektschichten durchdringen, und zweitens gibt er in diesen dünnen Schichten die Massenverteilung wieder.

Daraus ergeben sich neuartige Forderungen an die einzuschlagenden Präparationsverfahren und an die Auswahl der Untersuchungsobjekte.

Zunächst darf der Objektträger nicht ein dickes Glasplättchen sein, sondern er muß aus einer äußerst dünnen Haut bestehen. Wie man solche Objektträgerfilme, deren Dicke nur $\frac{1}{200}$ dünnster Mikrotomschnitte beträgt ($10\text{ m}\mu$), aus Kollodium oder Zaponlack herstellt und auf die Objektträgerblende bringt, ist vor kurzem genau beschrieben worden.⁵ Abb. 3 zeigt das übermikroskopische Bild eines derartigen Objektträgers, eines Films aus Zaponlack, der sich als vollkommen durchstrahlbar und strukturlos erweist. Trocknet man auf ihm irgendwelche Untersuchungsobjekte auf, so kann man sicher sein, daß jede sichtbare Struktur dem aufgebrachtten Material angehört. Damit sind alle Objekte der Untersuchung zugänglich, die aus einzelnen kleinen Teilchen bestehen. Schwieriger gestaltet sich jedoch die Strukturanalyse größerer Gebilde. Mit der Entwicklung der Übermikroskope, die bezüglich der optischen Auflösung das 20fache der Lichtmikroskope leisten, hat eine entsprechende Entwicklung leistungsfähigerer Mikrotome noch nicht Schritt gehalten, wenn auch erfolgversprechende Ansätze in dieser Richtung zu verzeichnen sind.⁶ Der Forderung nach dünnen Objekten muß deshalb in anderer Weise Rechnung getragen werden. Am einfachsten untersucht man zunächst flächenhafte Objekte, die von Natur aus dünner sind als Mikrotomschnitte. Derartige Untersuchungen sind an Blutplättchen gemeinsam mit *C. H. Wolpers* sehr eingehend vorgenommen worden und sollen an anderer Stelle mitgeteilt werden. Weiter sind als geeignete Objekte Kapillarendothelien, Lungenalveolen u. dgl. anzusehen, sowie Objekte von schwamm- oder wabenartiger Struktur, bei denen nicht die ganze Dicke eines Mikrotomschnitts von der Substanz des Präparats erfüllt ist.

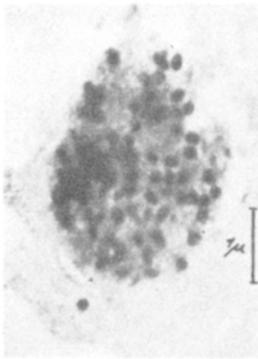
Bei dickeren Gebilden, wie sie Zellen und Mikrotomschnitte der bisher üblichen Dicke aus kompaktem Gewebe darstellen, ist die Entwicklung



(II 546/38)

Abb. 3. Zaponlackfilm. Elektronenoptisch 7000:1. Rechts oben befindet sich kein Film im Strahlengang.

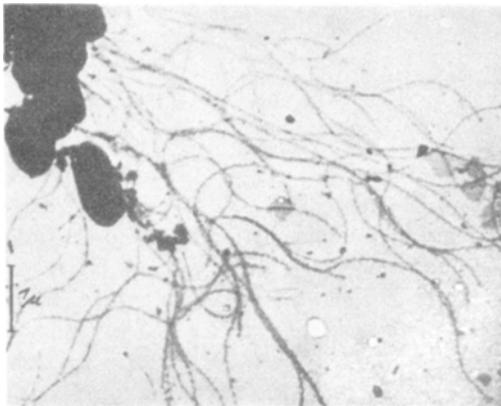
von Differenzierungsverfahren durchzuführen. Diese können darauf hinarbeiten, durch Metallimprägnation die Dichte einzelner Objektteile zu erhöhen. Wichtiger wird es jedoch sein, die Dichte oder Dicke durch verschiedenartige Verfahren herabzusetzen.



(II 81/39)

Abb. 4. Blutplättchen. Elektronenoptisch 10 000 : 1.

(Abb. 4); dabei können jetzt die eine Viruskolonie aufbauenden Elementarkörper sehr viel kleiner sein als diejenigen, welche bisher im Lichtmikroskop gesehen wurden. Elementarkörper erscheinen nicht nur



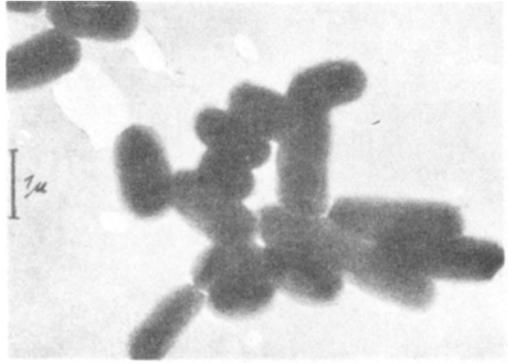
(II 102/39)

Abb. 5. Proteusbakterien. Elektronenoptisch 9 000 : 1.

als Beugungsscheibchen und infolgedessen auch nicht stets rund, sondern in ihrer tatsächlichen Form. Die Granulationen in Abb. 4, welche zum Teil deutlich die Form plumper Stäbchen haben, illustrieren diesen Vorteil einer Betrachtung mit höherem Auflösungsvermögen. Die Abmessungen der Granulationen betragen 100 bis 150 $m\mu$ auf 200—250 $m\mu$, also teilweise nur so viel wie der mittlere Durchmesser des Virus der In-

fluenza oder der vesiculären Stomatitis. Die Granulationen sind im Dunkel-
feld des Lichtmikroskops mit dem Kardioidkondensor von Zeiß noch als leuchtende Pünktchen zu erkennen. An biologischen Objekten läßt sich außer an den hier dargestellten Granulationen das hohe Auflösungsvermögen des Übermikroskops auch an ungefärbten Bakteriengeißeln zeigen⁷ (Abb. 5).

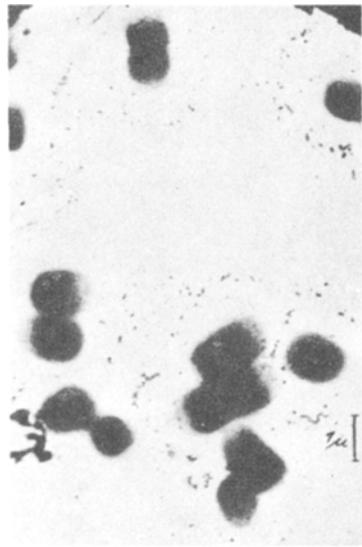
Die Schwierigkeiten, dünne Schichten zur Untersuchung zu erhalten, werden um so geringer, je kleiner die Objekte selbst gewählt werden, d. h. für die Biologie, wenn man nicht Zellkomplexe, sondern einzelne Bakterien, Elementarkörper oder schließlich Virusproteine wählt. Haben wir durch geeignete Auswahl Objekte gefunden, die durchstrahlbar sind, so kann es trotzdem vorkommen, daß eine lichtoptisch bekannte Struktur im elektronenoptischen Bild fehlt oder umgekehrt. Der Grund solcher Erscheinungen ist



(11 105/39)

darin zu sehen, daß einem Unterschied im lichtoptischen Brechungsindex oder in der Lichtabsorption kein Unterschied in der Massendicke entsprechen muß. So zeigt Abb. 6

das elektronenoptische Bild von Colibacillen, in denen sich nach *G. Piekarski*⁸ mit der Nuclealreaktion von *Feulgen* Nucleoide nachweisen lassen. Diese heben sich jedoch im Bild der Massenverteilung nicht in der erwarteten Weise ab. Man könnte bei der großen Dichte der Bakterien vermuten, daß die Durchdringung mit Elektronenstrahlen ungenügend wäre. Dies trifft jedoch nicht in jedem Falle zu. Neben den in Abb. 7 dargestellten *Prodigiosusbakterien* liegen sehr viel kleinere, nahezu punktförmige Gebilde auf dem Trägerfilm, Begleitkörper, deren Natur noch unbekannt ist. Diese sind, wenn man die photographische Platte daraufhin genau ansieht, auch in den von dichten Bakterienteilen bedeckten Bereichen zu sehen und werden durch ein geeignetes Kopierverfahren in der vergrößerten Reproduktion wiedergegeben (Abb. 8). Die Punkte wurden somit durch die Bakterien hindurch noch abgebildet. Leichter sieht man den gleichen Effekt



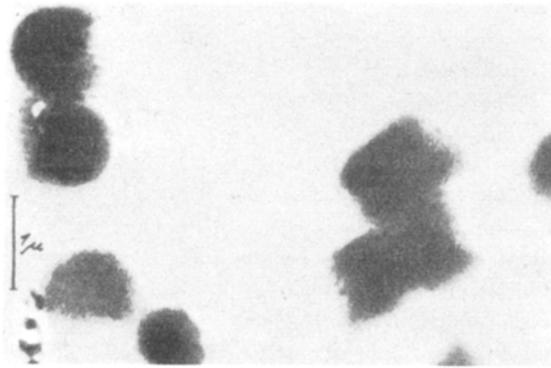
(11 616/38)

Abb. 7. *Prodigiosusbakterien*. Elektronenoptisch 6000 : 1.

Die Punkte wurden somit durch die Bakterien hindurch noch abgebildet. Leichter sieht man den gleichen Effekt

in den weniger dichten Teilen, wie es Abb. 7, ein Kontaktabzug der Platte von Abb. 8, und auch Abb. 9 erkennen läßt. Wenn also die von *Piekarski* nachgewiesenen „Nucleoide“ gegen ihre Umgebung auch nur einen Massendicken-Unterschied hätten, der dem der Begleitkörper gegen die Folie entspricht, so müßte sich dieser Unterschied in Abb. 6 der Colibakterien abzeichnen. Da dies nicht der Fall ist, kann man bei dem hier vorliegenden Stamm und der untersuchten Altersstufe der Kultur auf Gleichheit der Massendicke von Kernbezirk (Nucleoid) und Umgebung schließen.

Auch im Hinblick auf das verschiedene Verhalten im Licht- bzw. Ultraviolettlicht haben wir die Abb. 7—9 von *Bacillus prodigiosus* gezeigt,



(II 616/38)

Abb. 8. Prodigiosusbakterien. Elektronenoptisch 6000 : 1, Gesamtvergr. 12000 : 1.

weil hier ein gewisser Vergleich mit den Dunkelfeld-Ultraviolettaufnahmen von *I. E. Barnard*⁹ und den Hellfeld-Ultraviolettaufnahmen von *G. Piekarski*¹⁰ möglich ist. Auf den Abbildungen beider Autoren sind die Umrisse länglich gestreckter und in Teilung begriffener Formen zu sehen; außerdem erkennt man an einigen Keimen im Dunkelfeld stark leuchtende polare Enden und an anderen leuchtende, im Innern liegende Punkte.

Im Hellfeld sind infolge der spezifischen Absorption des ultravioletten Lichts durch die Thymonucleinsäuren die „Nucleoide“ als dunklere Zellteile zu sehen. Vergleichen wir die Bilder von *Barnard* und *Piekarski* mit unseren elektronen optischen, so fällt sofort auf, daß auch wir an den im Ultraviolettmikroskop hervortretenden Orten Besonderheiten der Struktur erkennen. Die polaren Enden erscheinen häufig bei Bakterien aus jungen Kulturen hell, die sich teilende Mittelzone dunkel (Abb. 7). Bei älteren Kulturen (Abb. 9) sehen wir einige Bakterien, die zwei dunkle, kernartige Gebilde im Innern erkennen lassen. Bei anderen Keimen beobachten wir noch die bereits aus der jungen Kultur bekannte

polare Aufhellung. Wie die Beziehung zwischen den im Ultraviolett-
mikroskop und im Übermikroskop sichtbaren Strukturen sind, und wie
weit sie als Kernäquivalente gedeutet werden können, wird in Gemein-
schaft mit *G. PiekarSKI* ausführlich erörtert werden. Zweifellos läßt sich
im Übermikroskop wegen des höheren Auflösungsvermögens eine genauere
Aussage über die örtliche Lagerung und die Form der dichten Gebiete
innerhalb des Bacteriums machen. In einer weiteren Beziehung vermag
das Übermikroskop ebenso noch mehr darzustellen, indem es in der Um-
gebung der Bakterien Begleitkörper von 15—50 $m\mu$ Durchmesser zeigt,
die, wie wir aus einem großen Untersuchungsmaterial wissen, gerade
bei *Prodigiosusbakterien* besonders charakteristisch sind.

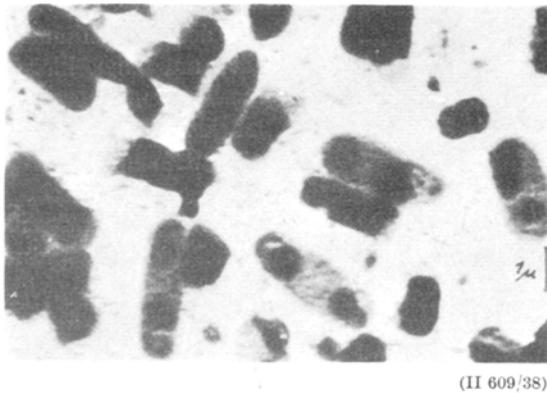


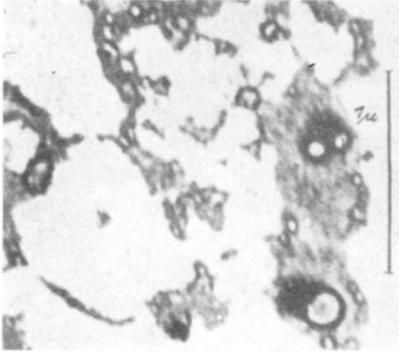
Abb. 9. *Prodigiosusbakterien*. Elektronenoptisch 6000 : 1.

Der Vergleich mit dem Ultraviolett-
mikroskop wäre nicht vollständig,
wollten wir nicht auf die biologische Wirkung beider Strahlenarten hin-
weisen. Seit den Untersuchungen von *M. Knorr* und *H. Ruj*¹¹ wissen
wir, daß Elektronenstrahlen die Bakterien schnell abtöten. Eine Form-
änderung oder Änderung der Struktur konnten wir bei diesem Vorgang
bisher nicht feststellen, doch nehmen die Zellen bei längerer Bestrahlung
eine zarte bräunliche Farbe an. Im ultravioletten Licht sterben die
Bakterien ebenfalls, wenn auch langsamer, ab (vgl. *PiekarSKI*¹⁰, Abb. 2).

4. Die Virusforschung.

Bereits bei der Ultraviolett-
mikroskopie wird es von *Barnard* als er-
wünscht betrachtet, bei der Darstellung von Elementarkörpern das
Gewebeeisweiß möglichst zu entfernen. In sehr viel höherem Ausmaß
tritt diese Forderung bei der übermikroskopischen Untersuchung auf.
Hier ist es, wenn man Bilder größter Klarheit und Schärfe erhalten will,
notwendig, außer dem Gewebeisweiß auch jeden Salzgehalt zu beseitigen.¹²

Stellt man eine Suspension von Elementarkörpern der Vaccine nach *Parker* und *Rivers*¹³ in 0,004 molarem Zitronensäure-Phosphatpuffer her und prüft das Präparat durch Färbung nach *Herzberg* oder *Morosow*, so kommt man nach einiger Übung zu einem Reinheitsgrad, der demjenigen der Abbildungen von *Parker* und *Rivers* oder auch von *Smadel* und *Wall*¹⁴ entspricht.

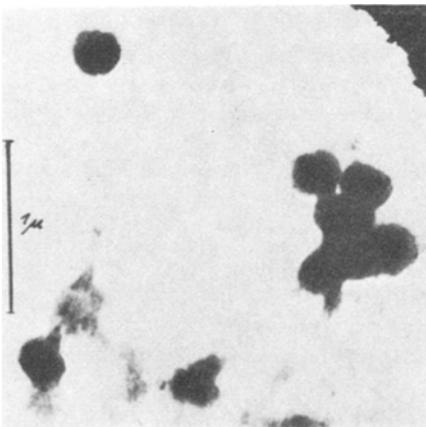


(II 888/38)

Abb. 10. 0,004 molare Dinatriumphosphatlösung, als Tropfen aufgetrocknet, Elektronenoptisch 27 000 : 1.

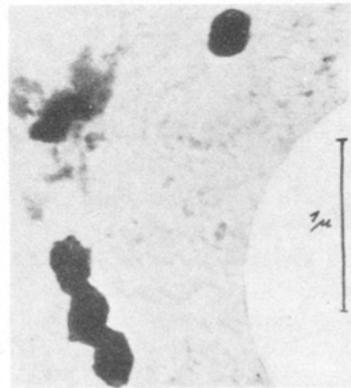
sieren¹² oder auch ohne erkennbare charakteristische Kristallform den Trägerfilm bedecken. Abb. 10 zeigt eine Auftrocknung von 0,004 molarem Dinatriumphosphat ohne Virus. Nach Entfernung der Salze

In der übermikroskopischen Abbildung genügt jedoch die geringe Menge von Puffersubstanz, welche mit dem Viruspräparat auf dem Kollodiumfilm aufgetrocknet, um eine klare Beurteilung der Elementarkörper unmöglich zu machen. Die Salze können um die Elementarkörper auskristallisieren



(II 38/39)

Abb. 11. Elementarkörper der Pocken, Elektronenoptisch 23 000 : 1.



(II 36/39)

Abb. 12. Elementarkörper der Pocken, Elektronenoptisch 23 000 : 1.

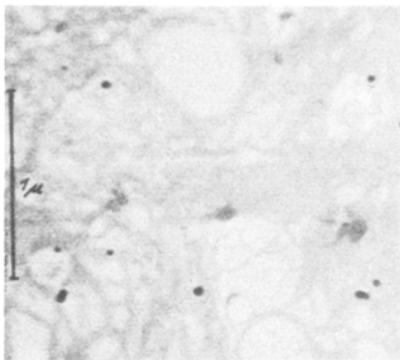
durch Dialyse der Suspension oder Waschen in destilliertem Wasser sieht man die Elementarkörper der Vaccine einzeln oder zu Gruppen zusammengelagert aufgetrocknet auf dem Film liegen. Bei den Abb. 11 und 12 ist hervorzuheben, daß die einzelnen Elementarkörper keineswegs

immer vollkommen rund bzw. kugelig sind. Ferner fällt auf, daß der Reinheitsgrad der Präparate bei der strengen Prüfung, die mit dem Übermikroskop möglich ist, in 3 Punkten noch nicht befriedigt. Der Trägerfilm zeigt erstens zwischen den *Paschenschen* Körperchen nicht die völlige Strukturlosigkeit des unbeschickten Films von Abb. 3. Zweitens zeigen sich neben den Elementarkörperchen noch etwa gleichgroße, verwaschene Gebilde, wahrscheinlich Zelltrümmer, die man nicht als Virus ansprechen kann, und schließlich sind die Elementarkörper häufig aggregiert. Am leichtesten dürften bei weiterer Verbesserung der Präparationsverfahren die kleinsten Beimengungen zur Virussuspension zu beseitigen sein; schwieriger wird sich die Beseitigung der Zelltrümmer von Virusgrößen erweisen und die Gewinnung von Suspensionen oder Auftrocknungen, in denen keine Aggregate vorliegen. Die Zusammenlagerung mehrerer Elementarkörper kann noch aus der intracellulären Viruskolonie stammen, sie kann aber auch sekundär bei der Behandlung mit destilliertem Wasser entstanden sein, dessen aggregierende Wirkung bekannt ist, oder erst beim Auftrocknen erfolgen. Bis jetzt haben sich Anhaltspunkte zur Entscheidung dieser Frage nicht ergeben. Nicht alle Präparate zeigen die Neigung zu aggregieren in gleich starker Weise.

Von *Krause*¹⁵ sind Teilungsformen von Vaccinekörperchen nach elektronenoptischen Bildern *gezeichnet* worden, die wir allerdings nie finden konnten.¹⁶ Die Frage, ob solche Teilungsformen sich mit Sicherheit werden erkennen lassen, und ob sie Beziehungen zu Teilungsformen der Bakterien haben, ist von entscheidender Wichtigkeit für die Stellung der großen Virusarten im System der Mikroorganismen. Die Arbeiten, welche zur völligen Reindarstellung der ganzen Größenskala der Elementarkörper noch erforderlich sein werden, gewinnen über die Klärung der Morphologie hinaus Interesse, weil gute Reinpräparate die sicherste Unterlage bilden für Untersuchungen der Chemie der Elementarkörper, ihrer Empfindlichkeit gegen chemische und physikalische Einflüsse und ihrer serologischen Eigenschaften. Sie bilden *eine* der Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, wenn wir dem Wesen des Virus näherkommen wollen. Mit keiner Methode ist jedoch der Reinheitsgrad eines Viruspräparats besser zu beurteilen als durch die Übermikroskopie.

Betrachten wir die Größen der heute bekannten Virusarten¹⁷ unter der Voraussetzung, daß die indirekten Größenbestimmungen durch Ultrazentrifuge und Ultrafilter richtig sind, so zeigt sich, daß keine Größen vorliegen, die wesentlich unter 10μ reichen. Dieses Maß ist auch das zur Zeit erreichte Auflösungsvermögen des Übermikroskops, wobei hinzu-zufügen ist, daß als einzelner Punkt oder Faden noch Gebilde erkannt werden, welche die Hälfte des Auflösungsvermögens betragen. Für die Virusforschung bedeutet diese Tatsache, daß *der Begriff des ultravisiblen Virus nicht mehr zu Recht besteht.*

Kleinste Virusarten (Virusproteine) müssen zur sicheren übermikroskopischen Darstellung in noch höherem Maße als große im Reinpräparat



(II 675/38)

Abb. 13. Kartoffel-X-Virus. Elektronenoptisch
25 000 : 1.

vorliegen. Diese Reindarstellung ist seit *W. M. Stanley*¹⁸ beim Tabakmosaikvirus möglich und jetzt durch die Arbeiten von *E. Pfankuch* und *G. A. Kausche*¹⁹ noch verbessert worden. Mit diesen gemeinsam²⁰ konnte das Virus der Tabakmosaikkrankheit und das Kartoffel-X-Virus einer genauen Strukturanalyse unterworfen werden; dabei erweitert sich die elektronenoptische Betrachtung der einzelnen Viruselemente infolge der Eigenart des übermikroskopischen Präparats zu einer Analyse des Virustrockengels, da nach dem Auftrocknen der Viruslösung (Sol) auf dem



(II 371 38)

Abb. 14. Tabakmosaikvirus. Elektronenoptisch
20 000 : 1.

Objektträgerfilm je nach der vorliegenden Viruskonzentration nicht Einzelelemente, sondern zusammenhängende, gerichtete Strukturen den Film bedecken. Eine solche Gelstruktur vom Kartoffel-X-Virus zeigt Abb. 13 und einzelne Virusfäden vom Tabakmosaikvirus Abb. 14. Der Elementarkörper des aktiven Tabakmosaikvirus konnte in der genannten Arbeit von *Kausche*, *Pfankuch* und *H. Ruska*²⁰ als ein langgestreckter Körper von etwa 15 $m\mu$ Durchmesser und 300 bzw. 150 $m\mu$ Länge bestimmt werden. Bezüglich der Einzelheiten dieser Untersuchungen sei auf die Originalarbeit verwiesen.

Dem Direktor der I. Medizinischen Klinik der Charité, Herrn Prof. Dr. *R. Siebeck* danken wir für sein vorausschauendes Eintreten für die Anwendung des Übermikroskops auf dem Gebiet der Biologie.

Zusammenfassung.

Es wird die Stellung der Übermikroskopie zu den bisherigen Ver-

fahren der Virusforschung besprochen. Das Gerät, die Grundzüge seiner Optik und der Vorgang der Bildentstehung werden geschildert. Aus den physikalischen Bedingungen der Bildentstehung werden Anforderungen an das übermikroskopische Präparat abgeleitet und Methoden erörtert,

welche diese Anforderungen zu erfüllen gestatten. An Hand neuer übermikroskopischer Bilder von Bakterien mit inneren Strukturen wird ein Vergleich mit Bildern der Ultraviolett-mikroskopie durchgeführt. Als Anwendung des Geräts auf die Virusforschung werden neue Bilder vom Pockenvirus sowie vom Virus der Kartoffel-X- und der Tabakmosaikkrankheit gezeigt. Damit sind Virusproteine sichtbar gemacht, so daß der Begriff des *ultravisiblen* Virus nicht mehr länger berechtigt ist.

Literatur.

- ¹ *Ruska, E.*: Z. Physik **87**, 580 (1934). — ² *Borries, B. v. u. E. Ruska*: Wiss. Veröff. Siemens-Werke **17**, 99 (1938). — ³ *Borries, B. v. u. E. Ruska*: Z. techn. Physik **19**, 402 (1938). — ⁴ *Borries, B. v. u. E. Ruska*: Naturw. (1939); erscheint demnächst. — ⁵ *Ruska, H.*: Naturw. (1939); erscheint demnächst. — ⁶ *Ardenne, M. v.*: Z. wiss. Mikroskopie mikroskop. Techn.; erscheint demnächst. — ⁷ *Piekarski, G. u. H. Ruska*: Klin. Wschr. **18**, 338 (1939). — ⁸ *Piekarski, G.*: Arch. Mikrobiol. **8**, 428 (1937). — ⁹ *Barnard, J. E. u. W. J. Elford*: Proc. roy. Soc., Lond., Ser. B: Biol. Sci. **109**, 360 (1931); vgl. auch *W. J. Elford*: Handbuch der Virusforschung, S. 189. Wien: Julius Springer, 1938. — ¹⁰ *Piekarski, G.*: Z. Bakter. usw., Abt. I **142**, 69 (1938). — ¹¹ *Knorr, M. u. H. Ruf*: Arch. Hyg. u. Bakter. **113**, 92 (1934). — ¹² *Borries, B. v., E. Ruska u. H. Ruska*: Klin. Wschr. **17**, 921 (1938). — ¹³ *Parker, R. F. u. T. M. Rivers*: J. exper. Med. (Am.) **62**, 65 (1935). — ¹⁴ *Smadel, J. E. u. M. J. Wall*: J. exper. Med. (Am.) **66**, 325 (1937). — ¹⁵ *Krause, F.*: Naturw. **26**, 122 (1938). — ¹⁶ *Ruska, H.*: Dtsch. med. Wschr. **64**, 1203 (1938). — ¹⁷ *Stanley, W. M.*: Handbuch der Virusforschung, S. 536. Wien: Julius Springer, 1938. — ¹⁸ *Stanley, W. M.*: Science **81**, 644 (1935). — ¹⁹ *Pfankuch, E. u. G. A. Kausche*: Naturw. **26**, 382 (1938); Biochem. Z. **299**, 334 (1938). — ²⁰ *Kausche, G. A., E. Pfankuch u. H. Ruska*: Naturw. (1939); erscheint demnächst.