

Abbildung selbstorganisierter Strukturen: Interpretation von TEM- und Kryo-TEM-Aufnahmen

Heiner Friedrich, Peter M. Frederik, Gijsbertus de With und
Nico A. J. M. Sommerdijk*

Kryo-TEM · Elektronentomographie · Nanostrukturen ·
Weiche Materialien · Transmissionselektronenmikro-
skopie

In der Materialchemie werden in Lösung gezüchtete Nanostrukturen oft mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Häufig werden die TEM-Proben bei der Probenvorbereitung getrocknet und kontrastiert, und bei der Bildaufnahme selbst kommt es zur Wechselwirkung zwischen der Probe und dem Elektronenstrahl. Beide Prozesse rufen zur Vorsicht bei der Interpretation der erhaltenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf. Alternativ dazu kann durch kryogene Probenpräparation und anschließende Abbildung mit kryogener Niederdosis-TEM ein beinahe nativer solvatisierter Zustand konserviert werden. In unserem Kurzaufsatz geben wir eine kritische Analyse der Probenvorbereitung und, noch wichtiger, der Datenaufnahme und Interpretation von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Übersicht soll auch Leitlinien für die Anwendung von (Kryo-)TEM als leistungsstarkes und zuverlässiges Hilfsmittel für die Analyse kolloidaler und selbstorganisierter Strukturen mit Abmessungen im Nanometerbereich bieten.

1. Einleitung

Auf den schnell wachsenden Gebieten der Nanotechnologie und der (makro)molekularen Selbstorganisation gibt es einen starken und anhaltenden Bedarf an „nanoskopischen“ Abbildungsmethoden, die erhaltene Materialien bis zu Details im Nanometerbereich wiedergeben können. Während sich Rastersondenverfahren wie Rastertunnel- (STM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) als wichtigste Verfahren zum Abbilden von Strukturen an Oberflächen etabliert haben, ist bei selbstorganisierten Strukturen und Nanostrukturen in Lösung die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) das

Verfahren der Wahl, um Struktur und Morphologie im Nanometerbereich zu untersuchen. Die Verbreitung der TEM als Charakterisierungsmethode wird in Abbildung 1 verdeutlicht, in der zu sehen ist, dass allein im ersten Vierteljahr 2010 über 2500 Arbeiten mit TEM veröffentlicht wurden.^[1]

Die aktuellen Fortschritte bei der TEM-Methodik und -Instrumentierung haben erstaunliche Möglichkeiten für die Analyse weicher Materie und selbstorganisierter Nanostrukturen eröffnet. Die zunehmende Verbreitung dieser Methoden in verschiedensten Bereichen der Forschung hat unser Verständnis der physikalischen und chemischen Kontrolle der Organisation von Materie über mehrere Größenordnungen der Längenskala wesentlich vertieft.^[2] Allerdings führte die leichte Verfügbarkeit der TEM ähnlich wie bei der AFM dazu, dass immer mehr Nichtexperten an der Interpretation elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Nanostrukturen beteiligt sind. Zusammen mit dem Umstand, dass ein Großteil der verfügbaren TEM-Methodik ursprünglich aus der biologischen Forschung oder den (anorganischen) Materialwissenschaften stammt, führt dies oft zu einer suboptimalen

[*] Dr. H. Friedrich, Dr. P. M. Frederik, Prof. Dr. G. de With,
Dr. N. A. J. M. Sommerdijk
Department of Chemical Engineering and Chemistry
Laboratory of Materials and Interface Chemistry and
Soft Matter CryoTEM Research Unit
Eindhoven University of Technology
PO Box 513, 5600 MB Eindhoven (Niederlande)
Fax: (+31) 40-245-1036
E-Mail: n.sommerdijk@tue.nl
Homepage: <http://www.cryotem.nl/>

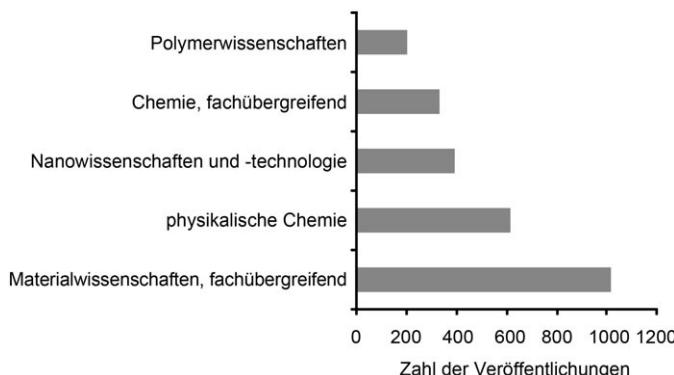


Abbildung 1. Daten aus dem ISI Web of Science, die die Bedeutung der TEM auf verschiedenen Forschungsgebieten illustrieren: Zahl der Arbeiten im ersten Vierteljahr 2010, bei denen TEM zur Charakterisierung verwendet wurde.

Probenvorbereitung und -behandlung sowie zu einer fehlerhaften Interpretation der erhaltenen Abbildungen. Wir hoffen, mit unserem Kurzaufsatz, der sich auf unsere Erfahrung mit TEM in der anorganischen (H.F.), biologischen (P.M.F.), materialwissenschaftlichen (G.d.W.) und supramolekularen Chemie (N.A.J.M.S.) stützt, Leitlinien für die Vorbereitung von TEM-Proben und die Interpretation der erhaltenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu bieten, aber ohne den Leser zur Verwendung kostspieliger und schwer zugänglicher anspruchsvoller Ausrüstung zu drängen. Ferner versuchen wir, Lücken zwischen verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen zu schließen, indem wir anregen, TEM-Methoden aus scheinbar nicht verwandten Gebieten miteinander zu kombinieren.

2. Probenvorbereitung

Für die Analyse durch herkömmliche TEM, wie seit den 1940er Jahren verwendet, werden Proben aus einer Suspension durch Trocknung auf ein Substrat aufgebracht. Das Substrat ist im Allgemeinen ein 10–30 nm dünner, von einem Metallgitter getragener Kohlenstoff- oder Polymerfilm. Bei organischen Materialien, die für den Elektronenstrahl vergleichsweise durchlässig sind, wird das Trocknen oft mit

Kontrastieren kombiniert, um die Struktur und Form des untersuchten Materials besser sichtbar zu machen.

2.1. Kontrastieren

Bei dieser Präparationsmethode^[3] wird zu der Probe, die getrocknet werden soll, eine Salzlösung einer stark elektrolytstreuenden Schwermetallverbindung zugegeben, beispielsweise Uranylacetat, um eine Art von Abguss der Probe zu erhalten (Abbildung 2 a,c).^[4] Die Sichtbarkeit von Grenz-

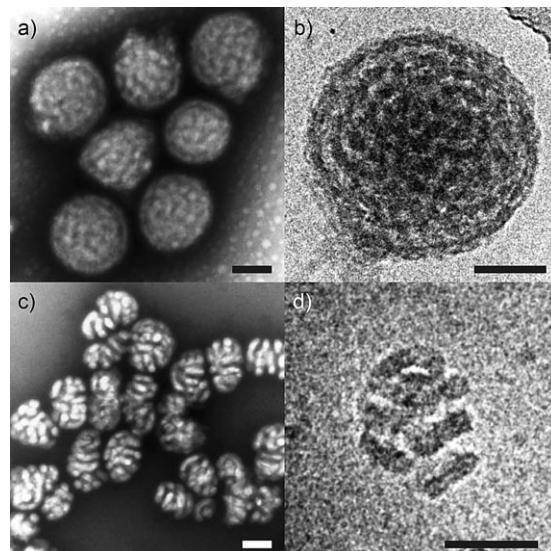


Abbildung 2. TEM-Aufnahmen von Aggregaten zweier Doppelkamm-Diblock-Copolymere auf Peptidbasis (aus Lit. [4]): a,c) Kontrastiert mit Uranylacetat; b,d) die entsprechenden kryogenen Präparate (siehe auch Abbildung 8). Nach dem Kontrastieren wird die Dichteverteilung im Bild vom Kontrastmittel dominiert. Das Kontrastmittel dringt auf unterschiedliche Weise in die Probe ein oder reagiert mit ihr; daher ist der entstandene Abguss nicht notwendigerweise mit dem Objekt identisch. Die Kryo-TEM-Bilder stellen die Dichteverteilung innerhalb der Probe dar. Obwohl der Dichteunterschied zwischen dem Kontrastmittel und der Probe größer ist als der Dichteunterschied zwischen glasartigem Wasser und der Probe, ist Kontrastierung wegen der Variationen und Unsicherheiten beim Eindringen/bei der Reaktionsfähigkeit in Bezug auf die Auflösung von Strukturdetails unterlegen. Maßstabsbalken: 100 nm.



Nico A. J. M. Sommerdijk ist Associate Professor für Material- und Grenzflächenchemie an der Eindhoven University of Technology. Er promovierte 1995 an der Universität Nijmegen (Niederlande) auf dem Gebiet der organischen und supramolekularen Chemie. Nach einem Postdoktorat über anorganische Materialien und die Selbstorganisation von Polymeren wechselte er an die Eindhoven University of Technology, an der er über die Anwendung von Kryo-TEM bei der Untersuchung von (makro)molekularen Aggregaten und die Verwendung dieser Aggregate als Template für die biomimetische Mineralisierung arbeitet.

flächen sowie Unterschiede in der Zusammensetzung können durch selektive Wechselwirkungen mit der Salzlösung oder beispielsweise mit OsO₄-Dämpfen verstärkt werden.^[5] Diese Art der Probenvorbereitung, insbesondere die Kongröße des Kontrastmittels, schließt aber im Allgemeinen eine Subnanometer-Auflösung aus, wie sie häufig bei robusten anorganischen Proben gewünscht wird. Dennoch kann unter optimalen Bedingungen und abhängig von den experimentellen Details eine Auflösung von 2 nm erzielt werden.^[6]

Die Trocknungs- und Kontrastierungsprozesse können Struktur und Morphologie der Probe beeinflussen, weshalb die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit größter Vorsicht zu interpretieren sind.^[7] So wird durch das Trocknen

der Lösungen die Materialkonzentration drastisch verändert und in manchen Fällen die Selbstorganisation gelöster Stoffe und die Zusammenlagerung bestehender Aggregate auf Nichtgleichgewichts-Reaktionswegen vorangetrieben. Genauer gesagt werden suspendierte Strukturen durch das Trocknen der Oberflächenspannung des Lösungsmittels ausgesetzt, und die sich zurückziehende Flüssigkeitsoberfläche wird sie schließlich zu Clustern zusammenschieben. Am Ende des Trocknens wird das Material konzentriert und zusammengedrückt, was zur Entstehung von (un)geordneten Ansammlungen (Abbildung 2 a,c), zum Zusammenbruch von Aggregatstrukturen und in manchen Fällen zur schrittweisen (Schicht-für-Schicht-)Zunahme der Probendicke führen kann.^[8]

Bei wässrigen Proben kann man diesen Effekten durch Zugabe von Tensiden oder organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Ethanol entgegenwirken;^[9] dadurch können aber die untersuchten Strukturen auch selbst verändert werden. Gefriertrocknen ermöglicht es, die Auswirkungen der Oberflächenspannung beim Trocknen aus einer Lösung zu verringern und das Zusammenbrechen der Struktur, zu dem es beim Entfernen des Lösungsmittels kommen könnte,^[10] zu verhindern, was letztlich zur Abscheidung des Materials, das ursprünglich in Lösung war, führt. Ferner kann die Wechselwirkung mit Kontrastmitteln sowohl die Nanostruktur als auch die Morphologie der untersuchten Objekte verändern.^[11]

2.2. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Bei der Gefrierbruch(„freeze fracture“)-Elektronenmikroskopie (EM) werden obige Artefakte vermieden.^[12] Bei diesem Verfahren wird die Probe durch schnelles Eintauchen in flüssiges Ethan oder Propan abgekühlt. Die Temperatur wird bei etwa -160°C gehalten, während das gefrorene Tröpfchen mit einem kalten „Messer“ gebrochen wird. Der Bruch folgt dem Weg des geringsten Widerstandes, also im Allgemeinen den Konturen der in der Bruchebene vorhandenen Nanostrukturen. Diese Konturen können durch Sublimieren einer dünnen Eisschicht weiter akzentuiert werden; die Merkmale der eingebetteten Objekte treten dann klarer hervor.^[13] Durch Aufdampfen einer dünnen Kohlenstoffschicht auf die Bruchebene wird eine elektronentransparente Kopie hergestellt. Der Kontrast, der zum Sichtbarmachen der Reliefstruktur der Oberfläche notwendig ist, wird durch Aufdampfen eines Metalls, beispielsweise Platin, auf den Kohlenstofffilm in einem Winkel von etwa 45° erhalten („Beschattung“). Dieses Verfahren ist zwar aufwändig, reproduziert aber amphiphile Nanostrukturen wie Vesikel und andere Doppelschichtaggregate sehr erfolgreich.^[14] Der Erfolg hängt weitgehend davon ab, wie stark die Bruchebene dazu neigt, die beiden Hälften der Lipid-Doppelschicht zu trennen und so Informationen über die innere Struktur der Objekte freizulegen. Ohne diesen Effekt können die Kopien nur die äußeren Konturen der in Eis eingebetteten Objekte reproduzieren.

2.3. Eintauchgefrieren

Mit der Einführung der kryogenen TEM (Kryo-TEM) ist es möglich geworden, suspendiertes organisches Material abzubilden (Abbildung 2 b,d).^[15] Beim Eintauchgefrieren von etwa 100 nm dicken Filmen einer (im Allgemeinen wässrigen) Lösung in einem geeigneten Kühlmittel wie flüssigem Ethan bei -183°C werden die Nanostrukturen sehr schnell in einem elektronentransparenten Film von glasartigem, amorphem Eis eingebettet.^[16] Durch Phasenkontrast-Abbildung, die in Abschnitt 4 genauer diskutiert werden soll, wird die Notwendigkeit des Kontrastierens vermieden, sodass wässrige Proben in einem beinahe nativen hydratisierten Zustand untersucht werden können. Mit modernster Ausrüstung kann Nanometer-Auflösung erzielt werden. Die Kryo-TEM ermöglicht auch die Abbildung in nichtwässrigen Lösungsmitteln;^[17] dabei sind allerdings die Bedingungen für die Probenvorbereitung und Bildaufnahme noch kritischer zu beurteilen als bei wässrigen Proben. Während des schnellen Kühlens verbleiben die untersuchten Objekte im Suspendierungsmedium, und ihre zeitliche und räumliche Anordnung zueinander bleibt erhalten. Anschließend kann die glasartige Probe bei Temperaturen untersucht werden, die tief genug sind, um Rekrystallisation des amorphen Films zu verhindern. Dennoch können bei mehreren Schritten der Kryo-TEM-Probenvorbereitung Artefakte entstehen. Die kritischen Punkte bei diesen Schritten und die damit verbundenen Probleme bei der Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen werden in diesem und in den nächsten Abschnitten genauer diskutiert.

Bei der Probenvorbereitung wird ein Mikroliter-Tropfen der Probe auf ein Trägergitter aufgetragen und anschließend durch Abtupfen mit Filterpapier auf ca. 1/5000 seines Ursprungsvolumens verringert, um einen typischerweise etwa 100 nm dicken Film zu erhalten. Das Oberfläche/Volumen-Verhältnis des dünnen Films ist sehr hoch, sodass ein schneller Wärmeaustausch und eine wirkungsvolle Glasbildung gewährleistet werden. Unter Umgebungsbedingungen führt dieses hohe Verhältnis allerdings zum schnellen Abdunsten des Lösungsmittels und damit zu einer starken Zunahme der Probenkonzentration, Absenkung der Temperatur und möglicherweise zum Zusammenbrechen der eingebetteten Nanostrukturen (Abbildung 3).^[18] So ist unter typischen Laborbedingungen (Raumtemperatur, 40 % relative Luftfeuchtigkeit) eine Verdunstungsgeschwindigkeit eines wässrigen Films von 40 nm s^{-1} zu erwarten – bei einem 100 nm dicken Film ein enormer Wert. Das Verdunsten kann nur durch Arbeiten bei nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit verhindert werden. Bei der Probenvorbereitung für die Kryo-TEM sind also Lösungsmittelsättigung der Umgebung und Temperaturkontrolle notwendig, und es wurden eigene Apparate entwickelt, die diese Bedingungen erfüllen. Am häufigsten werden das „Controlled Environment Vitrification System (CEVS)“ (Talmon et al.^[19]) und der neuere „Vitrobot“ (Frederik et al./FEI Company^[20]) verwendet.

Andere wichtige Punkte bei der Vorbereitung dünner, wässriger Filme betreffen den Probenträgerfilm. Für die Herstellung eines dünnen, kontinuierlichen Lösungsmittelfilms durch Abtupfen mit Filterpapier muss der Träger gut

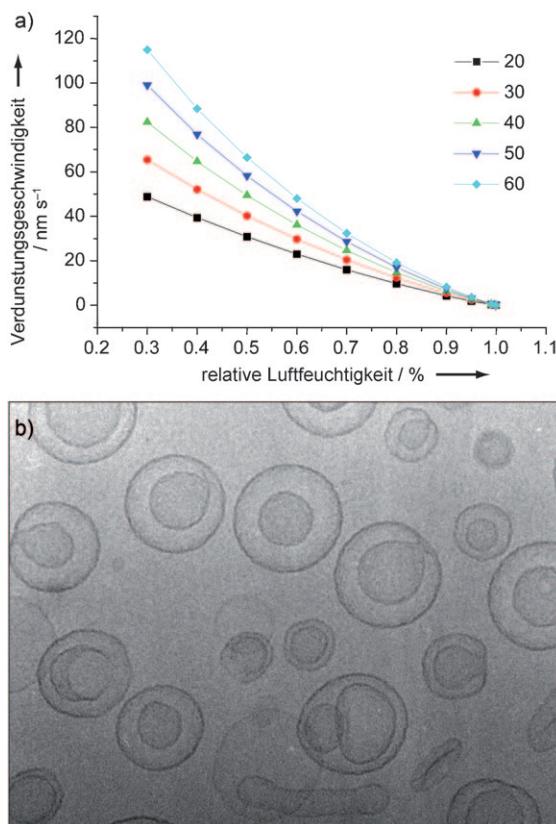


Abbildung 3. a) Verdunstungsgeschwindigkeit eines dünnen Films bei verschiedenen Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten. b) Osmotischer Zusammenbruch sphärischer Liposomen zu „vasenartigen“ Strukturen (aus Lit. [18]). Bei der Probenvorbereitung bei 25 °C und 40% relativer Luftfeuchtigkeit gingen etwa 50% des Innenvolumens der Liposomen verloren.

benetzbare sein. Für wässrige/polare Lösungsmittel wird gute Benetzbarekeit durch Behandlung mit einem Sauerstoffplasma (Glimmentladung) erzielt.^[21] Im Allgemeinen werden Träger aus amorphem Kohlenstoff mit (kreisförmigen) Löchern verwendet. Wenn Flüssigkeit auf den benetzbaren Träger aufgetragen wird, breitet sie sich über die gesamte Oberfläche aus. An den Stellen, an denen sie die Löcher überspannt, ist ihre Oberfläche leicht bikonkav; der Lösungsmittelfilm ist also in der Mitte der Löcher dünner als an den Rändern. Dieser Effekt kann zu einer Größensorierung der eingebetteten Nanostrukturen führen, bei der die kleineren Nanostrukturen in der Mitte der Löcher und die größeren an den Rändern angeordnet werden.^[8]

Das zum Abtupfen verwendete Filterpapier sollte inert sein, keine Materialien freisetzen und keine Probenkomponenten selektiv entfernen. Nach unserer Erfahrung verdient gerade die letzte (schlecht dokumentierte) Bedingung Beachtung, besonders bei Verwendung von wässrigen Dispersionen amphiphiler Blockcopolymer. Ferner kann die Flüssigkeitsströmung, die beim Abtupfen mit dem Filterpapier entsteht, zu Scherkräften in der Flüssigkeit und damit zu einer Ausrichtung der dispergierten Objekte in der Strömung – und in manchen Fällen sogar zu einer morphologischen Umordnung der selbstorganisierten Strukturen – führen.^[22] In diesen

Fällen sollte zwischen dem Abtupfen und dem Verglasen eine Wartezeit (Sekunden bis Minuten) eingeschoben werden, in der sich der Film beruhigen und die ursprüngliche Organisation wiederherstellen kann.

Das eigentliche Verglasen des dünnen Films erfolgt, indem er mit einer Geschwindigkeit von typischerweise 1.5–2 ms⁻¹ in ein Kühlmedium mit guten Wärmeaustausch-eigenschaften geschossen wird, beispielsweise flüssiges Ethan.^[23] Wenn bei wässrigen Proben die Abkühlgeschwindigkeit zu gering ist, bildet sich hexagonales Eis (Abbildungen 4a und 5a), das die Interpretation der aufgenommenen

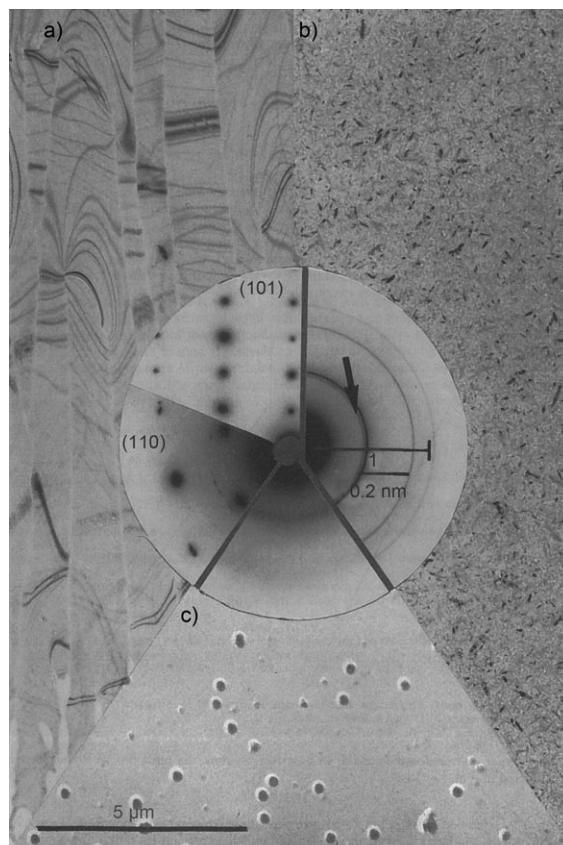


Abbildung 4. Kryo-TEM-Aufnahmen und Diffraktogramme von a) hexagonalem Eis, b) kubischem Eis und c) glasförmigem Eis und Polystyrolkugelchen (aus Lit. [16c]).

Bilder erschwert. Nach dem Verglasen sollte die Probe bei unter 133 K gehalten werden, um die Entglasung des Films und die Umwandlung in kubisches Eis (Abbildungen 4b und 5b), das für eingebettete kontrastreiche Probenobjekte gehalten werden könnte, zu verhindern. Durch schnelles Abkühlen von flüssigem Wasser oder langsames Abscheiden von Wasserdampf auf einer kalten Oberfläche entsteht amorphes/glasartiges Eis (Abbildungen 4c und 5c,d).

Ein weiterer wichtiger Punkt nach der Verglasung ist das Schützen der Probe bei der Überführung von der Vorbereitungskammer zum Kryo-TEM-Probenhalter und anschließend in das Mikroskop. Bei diesen Schritten kann sich Wasser aus der Raumluft auf dem Trägerfilm als Partikel abscheiden, im Allgemeinen als hexagonales Eis (Abbildung 5c,d). Auch

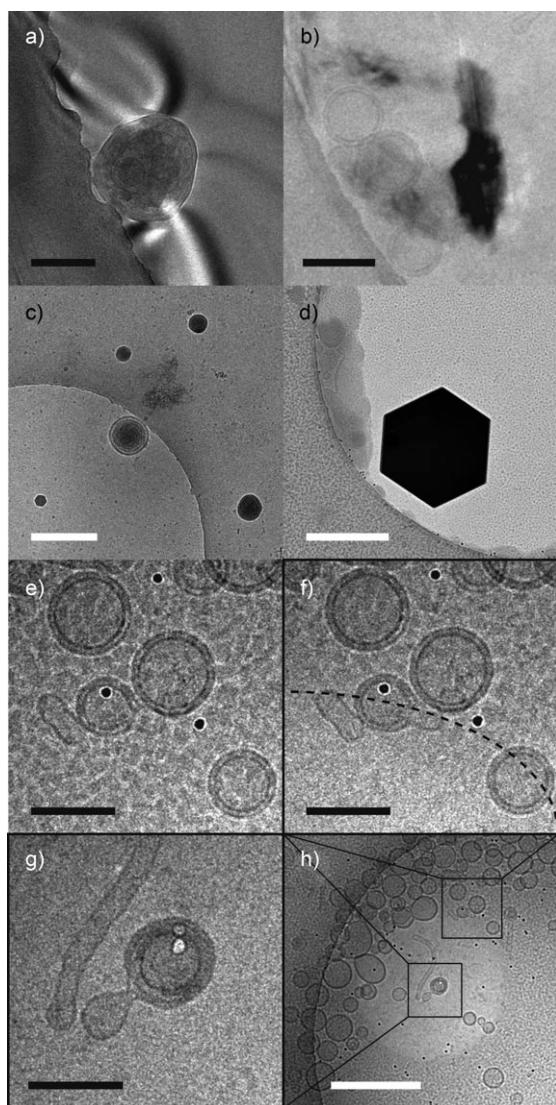


Abbildung 5. Kryo-TEM-Aufnahmen von a) einem Polymeraggregat in hexagonalem Eis; b) Lipidvesikeln in kubischem Eis; c) einem Polymeraggregat (Mitte) in glasartigem Eis mit Eisspartikeln; d) einem hexagonalen Eiskristall auf glasartigem Eis; e–h) Eiskontamination als Folge eines hohen Partialdrucks von Wasserdampf in der Mikroskopäule, vor Bestrahlung (e) und nach Bestrahlung (f–h). f) Die gestrichelte Linie zeigt den Rand des bestrahlten Bereichs. g) Lipidvesikel mit kreisförmiger Aushöhlung als Folge von Strahlenschädigung. h) Abbildung mit niedriger Auflösung; der bestrahlte Bereich erscheint als helle Scheibe. Die kleinen, dunklen Flecke sind Goldpartikel, die für die Elektronentomographie verwendet werden. Schwarze Maßstabsbalken entsprechen 100 nm, weiße 500 nm.

dies kann die Interpretation der Aufnahmen erschweren. Ähnlich kann sich eine poröse Schicht von glasartigem Eis auf der kalten Probe abscheiden, wenn der Wasserdampf-Partialdruck im Hochvakuum der Mikroskopäule zu hoch ist (Abbildung 5e). Diese Schicht kann durch vorsichtige Bestrahlung mit einem Elektronenstrahl geringer Intensität nachgewiesen und entfernt werden (Abbildung 5e–h); dabei ist darauf zu achten, dass die Integrität der darunter liegenden Probe nicht beschädigt wird.

3. Niederdosis-TEM und Kryo-TEM

Eine der wichtigsten Ursachen von Artefakten in TEM-Aufnahmen und manchmal Fehlinterpretationen davon ist die Strahlenschädigung durch Elektronenstrahlen. Alle organischen Proben, und bei hoher Auflösung auch die meisten anorganischen Proben, werden durch den Aufprall der hochenergetischen Elektronen des fokussierten Elektronenstrahls zersetzt. Die damit einhergehende Ausbreitung von Energie bewirkt chemische Reaktionen und Umordnungsprozesse, die zum Verlust von Strukturdetails während der Datenaufnahme führen. Bei organischen Materialien kann dies auch zur Schrumpfung und sogar zur Entstehung kreisförmiger Hohlräume führen (Abbildung 5g), die leicht und häufig als Innenräume von „Vesikelstrukturen“ fehlinterpretiert werden. Eine messbare Größe dieser zerstörenden Strahl-Probe-Wechselwirkungen ist das Verwaschen und Verschwinden von Beugungsreflexen in Abhängigkeit von der Dosis.^[24]

Die schädigende Wirkung von Elektronenstrahlen kann durch Absenken der Probentemperatur verringert werden, beispielsweise um einen Faktor von 3–6 zwischen Raumtemperatur und der Temperatur flüssigen Stickstoffs.^[25] Dennoch sind auch bei Kryo-TEM-Proben sowohl die eingebetteten Nanostrukturen als auch die glasartige Matrix (besonders bei organischen Lösungsmitteln) empfindlich gegen Elektronenstrahl-induzierte Veränderungen. Die Empfindlichkeit hängt von der Zusammensetzung der Probe und auch von der Abkühlgeschwindigkeit bei der Probenverglasung ab.^[9] Aus diesem Grund sollten Niederdosis-Verfahren angewendet werden, bei denen für jede Aufnahme eine „sichere“, vorbestimmte Anzahl von Elektronen pro Quadratnanometer verwendet wird. Auf diese Weise können die benötigten Informationen erhalten werden, bevor die Probe geschädigt wird.

4. Bildkontrast bei der (Kryo-)TEM

Bei der TEM tragen zwei Kontrastmechanismen zur Bildentstehung bei, Amplitudenkontrast und Phasenkontrast. Amplitudenkontrast (d.h. Dichte- und Ordnungszahl-abhängiger Streu-/Absorptionskontrast) entsteht dadurch, dass manche Bereiche der Probe Elektronen wirkungsvoller streuen als andere, sodass im entsprechenden Bereich der Abbildung weniger Elektronen nachgewiesen werden.^[26] Phasenkontrast entsteht durch kohärente Interferenz der gestreuten und ungestreuten Elektronenwelle. Durch Defokussieren der Abbildung wird die Phasenkontrast-Transferfunktion (CTF) eingestellt, um ein gegebenes Strukturdetail der Probe zu verstärken oder abzuschwächen (Abbildung 6a).^[27] Abbildung 6 zeigt auch, wie sich die Sichtbarkeit und das Raumfrequenzspektrum von kolloidalen Gold- und Siliciumoxidteilchen auf einem Kohlenstofffilm verändern, wenn die Fokuseinstellungen variiert werden. Gewöhnlich werden Bilder mit einem unterhalb der Probenebene fokussierten Elektronenstrahl aufgenommen (negative Fokuswerte), um Kontrastumkehr zu vermeiden (helle Probe auf dunklem Träger, wie in Abbildung 6b). Die direkt interpre-

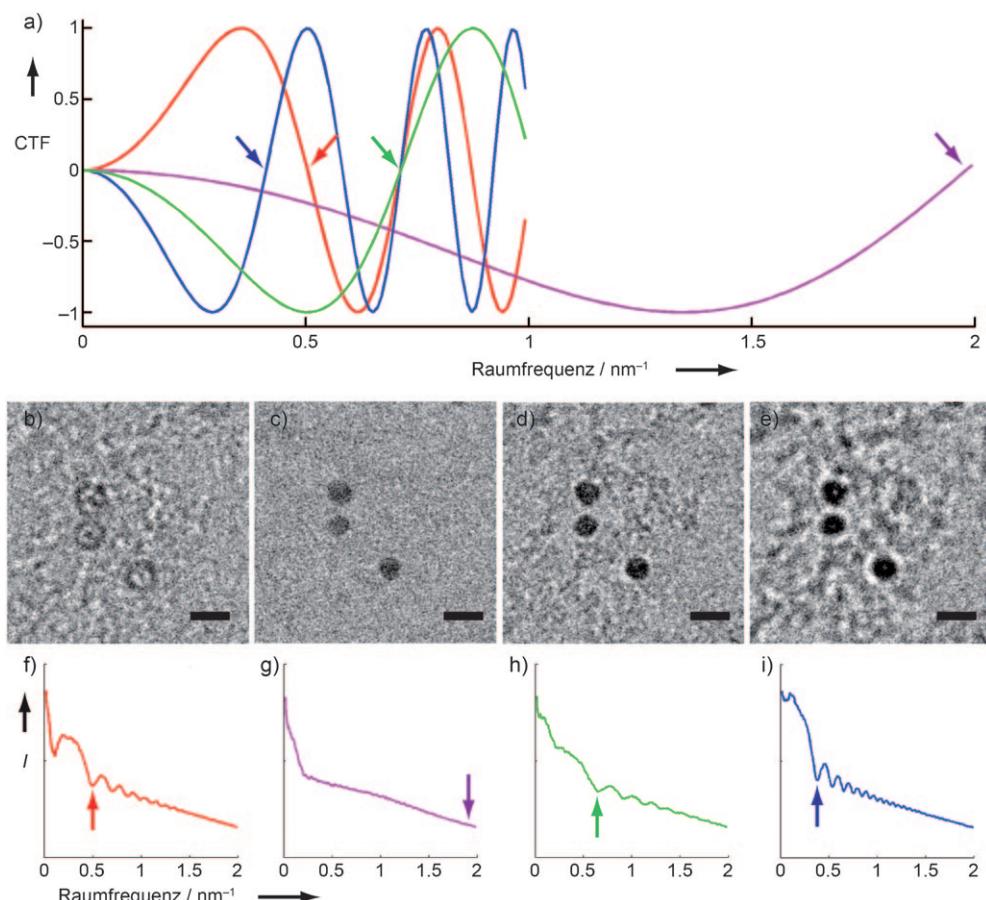


Abbildung 6. a) CTF (des cryoTITAN-Mikroskops an der TU Eindhoven), berechnet für Defokuswerte von + 2 μm (rot), -150 nm (lila), -1 μm (grün) und -3 μm (blau). Die roten, grünen und blauen Kurven sind der besseren Übersichtlichkeit wegen bei 1 nm^{-1} abgeschnitten. b–e) TEM-Aufnahmen und f–i) Raumfrequenzspektren von kolloidalen 10-nm-Goldpartikeln und 5-nm-Siliciumoxidpartikeln auf einem Kohlenstoff-Trägerfilm mit Defokuswerten von + 2 μm (b,f), -150 nm (c,g), -1 μm (d,h) und -3 μm (e,f). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 nm. Die Siliciumoxid-Partikel bildeten beim Trocknen auf dem Träger Agglomerate.

tierbare Auflösung in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme entspricht dem ersten Nulldurchgang der CTF und nimmt mit zunehmendem Defokuswert ab, wie am besten durch die Verschiebung zu tieferen Raumfrequenzen zu sehen ist (Pfeile in Abbildung 6a). Bei organischen Proben, d.h. Proben, die hauptsächlich aus Elementen mit niedrigen Ordnungszahlen bestehen, ist der Beitrag des Amplitudengleiches (der mit der Dichte und der Ordnungszahl in Beziehung steht) so klein, dass die Bildentstehung bis zu Abmessungen von mehreren zehn Nanometern ausschließlich auf Phasenkontrast beruht.^[28] Es ist daher üblich, bei der Kryo-TEM für einen besseren Kontrast eine schlechtere Auflösung in Kauf zu nehmen und große Defokuseinstellungen zu verwenden. Der Bildkontrast kann auch durch Energiefilterung verbessert werden, die das Verschwimmen der Aufnahme durch inelastisch gestreute Elektronen verringert, beispielsweise bei dicken oder gekippten Proben wie in Tomographie (siehe Abschnitt 5), aber auch bei (kryogenen) Niederdosis-Proben.^[29]

Im Prinzip sollte der Phasenkontrastmechanismus der Röntgen- und Neutronenbeugung^[30] und der Dunkelfeld-Raster-TEM^[31] hinsichtlich der Auflösung bei einer gegebenen

Dosis überlegen sein; der experimentell beobachtete Bildkontrast ist allerdings viel geringer, als durch die Physik der Elektronenstreuung vorausgesagt wird.^[32]

In seltenen Fällen kommt es zu einer beinahe perfekten Übereinstimmung der glasartigen Matrix mit den untersuchten Objekten, sodass auch bei extremen Defokuseinstellungen kein Kontrast beobachtet wird. In diesen Fällen können die Objekte durch sorgfältige Bestrahlung, die zu selektiver Strahlenschädigung führt, sichtbar gemacht werden (Abbildung 7).^[33] Bei wässrigen Proben kann der Kontrast auch durch Erhöhen oder Verringern der Dichte der glasartigen Matrix moduliert werden, beispielsweise durch Versetzen der Lösung mit Glycerol oder Methanol.^[9] Trotz der Veränderungen, die Additive bei den untersuchten Proben hervorrufen können,^[11] hat sich Kryo-Kontrastierung als Erfolg versprechend erwiesen, um die Struktur mancher Proben bis in Nanometerdetails zu konservieren.^[34] Beim Kryo-Kontrastieren wird die Probe in einen glasartigen Film eingebettet, der ein Kontrastmittel enthält (beispielsweise Ammoniummolybdat). Dabei wird der Bildkontrast gegenüber jenem, der bei nativen, wässrigen, kryogenen Präparaten beobachtet wird, wesentlich verstärkt, sodass bei der Datenaufnahme

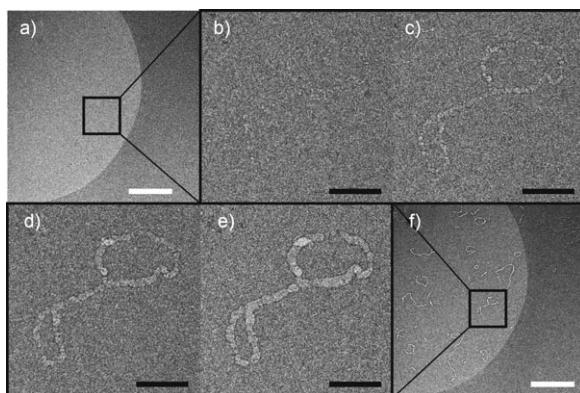


Abbildung 7. Kryo-TEM-Aufnahmen von fadenartigen Micellen des amphiphilen Dreiblock-Copolymers Pluronic 123 in einem Gemisch von Wasser und Dimethylformamid. a,f) Aufnahmen mit niedriger Auflösung ($-40 \mu\text{m}$ Defokuswert) vor (a) und nach der Kontrastierung (f) durch selektive Strahlenschädigung. b–e) Aufnahmen, die die Kontrastverbesserung mit zunehmender Elektronendosis zeigen (Zunahme von $3 \text{ e}^- \text{A}^{-2}$ pro Bild bei $-5 \mu\text{m}$ Defokuswert). Weiße Maßstabsbalken entsprechen 500 nm , schwarze 100 nm .^[51]

niedrigere Defokuseinstellungen verwendet werden können; auch die Stabilität der kryogenen Probe im Strahl wird dabei deutlich verbessert.^[34]

5. Dreidimensionale (Kryo-)TEM

Die durch (Kryo-)TEM erhaltenen Projektionsbilder liefern Informationen über die Form und innere Struktur der untersuchten Nanostrukturen. Dabei ist aber der Überlappungseffekt in der Projektion zu beachten, ähnlich dem Schattenspiel einer Hand an der Wand. Durch Kombinieren mehrerer Projektionen aus unterschiedlichen Richtungen kann die TEM-Abbildung in die dritte Dimension erweitert werden.^[35] Gegenwärtig stehen dafür zwei Methoden zur Verfügung; die passende Methode wird nach dem Grad der „strukturellen Einzigartigkeit“ der Probe ausgewählt.^[35b] Beide Methoden werden zur Analyse selbstorganisierter Strukturen in kryogenen Proben verwendet. Wenn viele strukturell identische Objekte vorhanden sind, können Informationen aus vielen „Kopien“ in vielen Orientierungen durch geeignete Mittelungsmethoden (die als „Einzelpartikel“-Methode bezeichnet werden) zu einer einzigen, dreidimensionalen (3D-)Rekonstruktion kombiniert werden. Bekannte Beispiele sind die 3D-Abbildung von gestapelten Doppelschichthelices aus amphiphilen Molekülen und von strukturell unflexiblen Micellen.^[36] Bei einer aktuellen Untersuchung der micellenartigen Anordnung von amphiphilen [3:3]-Hexakisaddukten von C₆₀ konnte durch eine Einzelpartikel-Methode die innere Organisation von nur 5 nm großen Molekülaggregaten aufgelöst werden, den kleinsten unflexiblen Micellen, die bisher nachgewiesen wurden.^[36c]

Für pleomorphe (einzigartige) Strukturen, wie sie in synthetischen Proben im Allgemeinen vorliegen, ist die Elektronen(kryo)tomographie (ET) die Methode der Wahl.^[35,37] Bei der (Kryo-)ET werden von einem einzelnen Objekt viele 2D-Projektionen aus verschiedenen Winkeln

aufgenommen und zu einem 3D-Bild kombiniert. Unsere Arbeitsgruppe^[4,38] und auch andere^[39] führten kürzlich die Verwendung der Kryo-ET an synthetischen, hydratisierten Proben ein, um die 3D-Organisation selbstorganisierter Strukturen mit Nanometerdetails aufzuklären. Bei diesen Untersuchungen wird ein gegebener Probenbereich aus vielen verschiedenen Kippwinkeln abgebildet, sodass die Verwendung von Niederdosismethoden zur Vermeidung von Strahlenschäden besonders wichtig ist. Wegen der niedrigen Dosis ist bei der Verarbeitung der Kryo-ET-Daten von der Bildausrichtung bis zur Bildauswertung besondere Sorgfalt erforderlich. In Abbildung 8 ist eine Reihe von 3D-Bildern

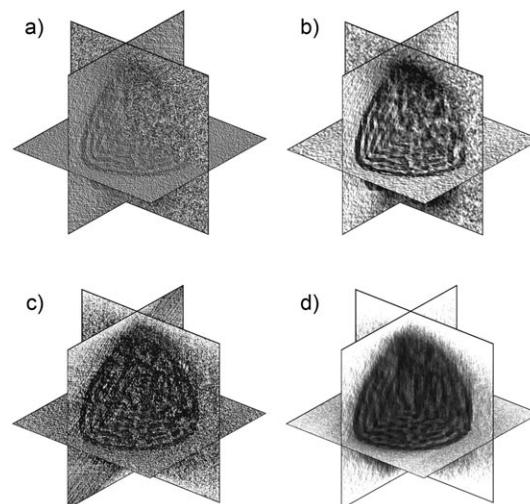


Abbildung 8. Bikontinuierliches Aggregat eines Doppelkamm-Diblock-Copolymers auf Peptidbasis, sichtbar gemacht durch drei senkrecht zu einander stehende Querschnitte von Rekonstruktionen durch: a) gewichtete Rückprojektion;^[40b] b) gewichtete Rückprojektion und Rauschunterdrückung;^[40b,c] c) das algebraische Rekonstruktionsverfahren (ART)^[41c] mit drei Iterationen; d) das sequenzielle iterative Rekonstruktionsverfahren (SIRT)^[41c] mit 20 Iterationen (Daten aus Lit. [4]).

gezeigt, die für die gleiche Probe durch verschiedene Rekonstruktions- und Rauschunterdrückungsalgorithmen erhalten wurden. Gängig ist momentan die Rekonstruktion durch gewichtete Rückprojektion, gefolgt von Rauschunterdrückung,^[40] allerdings gewinnen auch iterative^[41] und diskrete^[42] Ansätze an Bedeutung.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die aktuellen Fortschritte bei der TEM-Methodik und -Instrumentierung und – was vielleicht noch wichtiger ist – die Verbreitung und gute Annahme dieses Verfahrens in verschiedenen Wissenschaftsbereichen haben vielfältige Analysemöglichkeiten für selbstorganisierte Nanostrukturen eröffnet. Die Verwendung dieser Analysetechnik hat unser Verständnis der physikalischen und chemischen Kontrolle der Organisation von Materie über mehrere Größenordnungen der Längenskala wesentlich vertieft.^[2,37] Ein aktuelles und sehr schönes Beispiel^[43] zeigt, wie weit sich die TEM in den

letzten Jahren entwickelt hat: Durch aberrationskorrigierte TEM^[44] mit einer Beschleunigungsspannung von nur 80 kV wurden atomare Abbildungen von Metallatom-induzierter Koaleszenz von Fullererenen und von Rissen in Nanoröhren erhalten (Abbildung 9).^[43] Diese und verwandte Entwick-

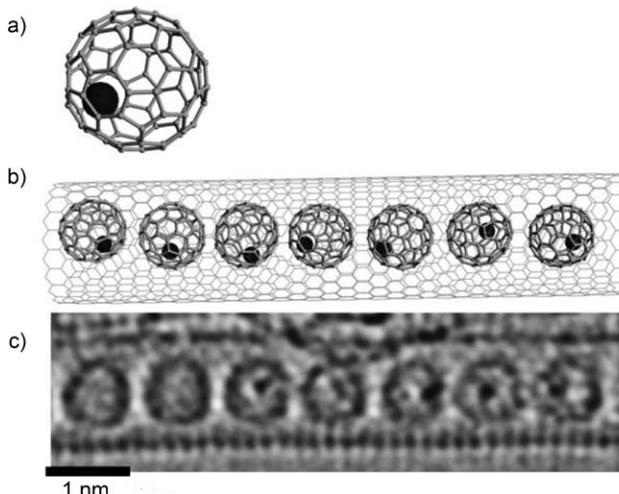


Abbildung 9. a) Modell eines im Inneren eines C₈₂-Fullerens eingeschlossenen Dysprosiumatoms. b) Modell von Fullererenen, aufgereiht in einer Kohlenstoff-Nanoröhre. c) Aberrationskorrigierte TEM-Aufnahme von Dysprosiumatomen im Inneren von C₈₂-Käfigen, die sich ihrerseits im Inneren einer Nanoröhre befinden (aus Lit. [43]).

lungen bringen uns immer näher an die Charakterisierung chemischer Stoffe und Reaktionen allein dadurch, dass man „nachsieht, wo sich die Atome befinden“.^[45]

Für die Analyse von Nanostrukturen in Lösungen, insbesondere von selbstorganisierten Systemen, gewinnt die Kryo-TEM immer mehr an Bedeutung.^[17, 18, 46] Während sich die Elektronenkryotomographie (Kryo-ET, auch als 3D-Kryo-TEM bezeichnet) aktuell zu einem wichtigen Verfahren in den Biowissenschaften entwickelt,^[47] ist ihre Anwendung bei der Untersuchung nichtbiologischer Materialien weitaus weniger fortgeschritten. Außer Kryo-ET-Untersuchungen synthetischer, hydratisierter Proben^[4, 38] ist unserer Arbeitsgruppe kürzlich auch die zeitaufgelöste Kryo-TEM-Analyse von Selbstorganisation und von biomimetischen Mineralisierungsvorgängen gelungen.^[38c, 48] Bei diesem Ansatz wurde durch Tauchgefrieren der Proben zu verschiedenen Zeitpunkten eine detaillierte Analyse aller Stufen des untersuchten Vorgangs erhalten, sowohl durch 2D- und 3D-Abbildung als auch durch Beugungsmethoden.

Wir möchten betonen, dass die Qualität der TEM-Aufnahmen zwar von der verfügbaren Ausrüstung abhängen kann – viel stärker aber von der Probenvorbereitung und den Aufnahmebedingungen. Insbesondere hängt die Zuverlässigkeit der aus den Experimenten gezogenen Schlussfolgerungen von der sorgfältigen Interpretation der Daten ab. Komplizierte Probenvorbereitung und fortgeschrittene Abbildungsverfahren müssen nicht unbedingt erforderlich sein, wenn sicher gestellt werden kann, dass die beobachteten Merkmale tatsächlich das Resultat der Chemie in Lösung sind

und nicht des Verfahrens, das zum Erzeugen der Abbildungen verwendet wurde.

Der größte Vorzug der TEM ist wohl jedoch ihr Vermögen, detaillierte Informationen über einzelne Spezies innerhalb einer Population zu liefern. Zugleich bedingt dies aber auch ihre größte Schwäche: Die TEM kann Forscher zu Schlüssen auf der Grundlage von Beobachtungen an einer beschränkten Anzahl von Objekten verleiten. Die Schlussfolgerungen sollten daher idealerweise durch Informationen aus der Gesamtpopulation ergänzt werden, die durch kollektive Ansätze wie Streu- und spektroskopische Methoden erhalten wurden.^[49] In jedem Fall führen die aktuellen Entwicklungen auf dem TEM-Gebiet zu hohen Erwartungen, besonders da nun 2D- und 3D-Kryo-TEM-Methoden mit Methoden wie der Rastertransmissions-Elektronenmikroskopie (STEM), Elektronenenergieverlust-Spektroskopie (EELS) und energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) kombiniert werden können. Damit können Ansätze, die aus dem biologischen Gebiet stammen, wirkungsvoll mit solchen aus den Materialwissenschaften kombiniert werden.^[50]

Wir danken P. H. H. Bomans für seine Unterstützung bei der Durchführung der Kryo-TEM. Die beschriebenen Forschungsarbeiten werden vom Dutch Polymer Institute (DPI) (Fördernummer 688) unterstützt.

Eingegangen am 12. März 2010,
veränderte Fassung am 19. April 2010
Online veröffentlicht am 6. September 2010

Übersetzt von Dr. Thomas Steiner, Neu-Ulm

- [1] Ausgewählte Arbeiten aus dem ersten Vierteljahr 2010, die die Bedeutung der TEM als Charakterisierungsinstrument auf den Gebieten der (makromolekularen) Selbstorganisation und der Nanotechnologie deutlich machen: a) F. Wang, Y. Han, C. S. Lim, Y. Lu, J. Wang, J. Xu, H. Chen, C. Zhang, M. Hong, X. Liu, *Nature* **2010**, *463*, 1061–1065; b) C. Kiely, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 296–297; c) C. Kisielowski, Q. M. Ramasse, L. P. Hansen, M. Brorson, A. Carlsson, A. M. Molenbroek, H. Topsøe, S. Helveg, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2768–2770; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2708–2710; d) J. Bai, X. Zhong, S. Jiang, Y. Huang, X. Duan, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 190–194; e) D. S. Kim, Y. Yang, H. Kim, A. Berger, M. Knez, U. Gösele, V. Schmidt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 215–218; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 210–212; f) A. M. Caro, S. Armini, O. Richard, G. Maes, G. Borghs, C. M. Whelan, Y. Travalys, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1125–1131; g) E. Bellido, R. de Miguel, D. Ruiz-Molina, A. Lostao, D. Maspoch, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 352–355; h) E. Pouget, N. Fay, E. Dujardin, N. Jamin, P. Berthault, L. Perrin, A. Pandit, T. Rose, C. Valéry, D. Thomas, M. Paternostre, F. Artzner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4230–4241; i) M. A. Loi, J. Gao, F. Cordella, P. Blondeau, E. Menna, B. Bártová, C. Hébert, S. Lazar, G. A. Botton, M. Milkó, C. Ambrosch-Draxl, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1635–1639; j) R. Boldt, M. Kaiser, D. Kohler, F. Krumeich, M. Ruck, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 208–210; k) Q. Chen, Y. Feng, D. Zhang, G. Zhang, Q. Fan, S. Sun, D. Zhu, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 36–42; l) A. J. Hong, C. C. Liu, Y. Wang, J. Kim, F. X. Xiu, S. X. Ji, J. Zou, P. F. Nealey, K. L. Wang, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 224–229; m) C. C. Wang, L. H. Jimison, L. Goris, I. McCulloch, M. Heeney, A. Ziegler, A. Salleo, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 697–701; n) C. Vollmer, E. Redel, K. Abu-Shandi, R. Tho-

- mann, H. Manyar, C. Hardacre, C. Janiak, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3849–3858; o) H. Yoshida, K. Kawamoto, H. Kubo, T. Tsuda, A. Fujii, S. Kuwabata, M. Ozaki, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 622–626; p) R. Chhabra, J. G. Moralez, J. Raez, T. Yamazaki, J. Y. Cho, A. J. Myles, A. Kovalenko, H. Fenniri, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 32–33; q) X. Qi, C. Xue, X. Huang, Y. Huang, X. Zhou, H. Li, D. Liu, F. Boey, Q. Yan, W. Huang, S. De Feyter, K. Müllen, H. Zhang, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 43–49; r) H. Dong, F. Yan, H. Ji, D. K. Y. Wong, H. Ju, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1173–1179; s) J. del Barrio, L. Oriol, C. Sanchez, J. L. Serrano, A. Di Cicco, P. Keller, M. H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3762–3769; t) S. Rehm, V. Stepanenko, X. Zhang, T. H. Rehm, F. Würthner, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3372–3382; u) J. K. H. Hui, P. D. Frischmann, C.-H. Tso, C. A. Michal, M. J. MacLachlan, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2453–2460; v) J. Voskuhl, M. C. A. Stuart, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2790–2796; w) A. Bernecker, R. Wieneke, R. Riedel, M. Seibt, A. Geyer, C. Steinem, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1023–1031; x) H. R. Marsden, J. W. Handgraaf, F. Nudelman, N. Sommerdijk, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2370–2377; y) C. Sachse, N. Grigorieff, M. Fändrich, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1343–1345; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1321–1323.
- [2] S. Mann, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 781–792.
- [3] a) S. Brenner, R. W. Horne, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *34*, 103–110; b) A. D. Bangham, R. W. Horne, *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660–668; c) R. W. Horne, *Lab. Invest.* **1965**, *14*, 1054–1078.
- [4] A. L. Parry, P. H. H. Bomans, S. J. Holder, N. A. J. M. Sommerdijk, S. C. G. Biagini, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8991–8994; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8859–8862.
- [5] a) H. R. Muller, *J. Ultrastruct. Res.* **1957**, *1*, 109–137; b) S. Bullivant, *Lab. Invest.* **1965**, *14*, 1178–1195; c) W. Stoeckenius, S. C. Mahr, *Lab. Invest.* **1965**, *14*, 1196–1207.
- [6] a) A. Bremer, C. Henn, A. Engel, W. Baumeister, U. Aebi, *Ultramicroscopy* **1992**, *46*, 85–111; b) J. R. Harris, R. W. Horne, *Micron* **1994**, *25*, 5–13.
- [7] Y. Talmon, *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, *93*, 366–382.
- [8] a) P. M. Frederik, M. C. A. Stuart, P. H. H. Bomans, W. M. Busing, *J. Microsc.* **1989**, *153*, 81–92; b) P. M. Frederik, M. C. A. Stuart, A. H. G. J. Schrijvers, P. H. H. Bomans, *Scanning Microsc.* **1989**, *Suppl. 3*, 277–284.
- [9] a) P. M. Frederik, P. H. H. Bomans, M. C. A. Stuart, *Scanning Microsc.* **1991**, *Suppl. 5*, S43–S52; b) P. M. Frederik, M. C. A. Stuart, P. H. H. Bomans, W. M. Busing, K. N. J. Burger, A. J. Verkleij, *J. Microsc.* **1991**, *161*, 253–262; c) P. M. Frederik, P. H. H. Bomans, M. C. A. Stuart, *Ultramicroscopy* **1993**, *48*, 107–119.
- [10] R. W. G. Wyckoff, *Science* **1946**, *104*, 36–37.
- [11] a) T. Kunitake, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3860–3861; b) C. Böttcher, C. Endisch, J.-H. Fuhrhop, C. Catterall, M. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12–17.
- [12] a) R. L. Steere, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1957**, *3*, 45–60; b) H. Moor, K. Muhlethaler, *J. Cell Biol.* **1963**, *17*, 609; c) S. Bullivant, A. Ames, *J. Cell Biol.* **1966**, *29*, 435–447.
- [13] D. W. Deamer, D. Branton, *Science* **1967**, *158*, 655–657.
- [14] a) R. Vanvenetie, J. Leunissenbijvelt, A. J. Verkleij, P. H. J. T. Ververgaert, *J. Microsc.* **1980**, *118*, 401–408; b) R. A. Parente, M. Hochli, B. R. Lentz, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1985**, *812*, 493–502; c) J. P. P. Starink, A. J. Verkleij, *J. Microsc.* **1992**, *167*, 181–196; d) N. Skalko, J. Bouwstra, F. Spies, M. Stuart, P. M. Frederik, G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, *1370*, 151–160.
- [15] K. A. Taylor, R. M. Glaeser, *Science* **1974**, *186*, 1036–1037.
- [16] a) J. Dubochet, A. W. McDowall, *J. Microsc.* **1981**, *124*, Rp3–Rp4; b) J. Dubochet, J. J. Chang, R. Freeman, J. Lepault, A. W. McDowall, *Ultramicroscopy* **1982**, *10*, 55–61; c) J. Dubochet, J. Lepault, R. Freeman, J. A. Berriman, J. C. Homo, *J. Microsc.* **1982**, *128*, 219–237.
- [17] Siehe beispielsweise: a) G. T. Oostergetel, F. J. Esselink, G. Hadzioannou, *Langmuir* **1995**, *11*, 3721–3724; b) C. Boettcher, B. Schade, J.-H. Fuhrhop, *Langmuir* **2001**, *17*, 873–877; c) K. Butter, P. H. Bomans, P. M. Frederik, G. J. Vroege, A. P. Philipse, *J. Phys. Condens. Matter* **2003**, *15*, S1451–S1470; d) H. Cui, T. K. Hodgdon, E. W. Kaler, L. Abezgauz, D. Danino, M. Lubovsky, Y. Talmon, D. J. Pochan, *Soft Matter* **2007**, *3*, 945–955; e) J. van Herrikhuyzen, S. J. George, M. R. J. Vos, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Ajayaghosh, R. A. J. Janssen, E. W. Meijer, S. C. J. Meskers, A. P. H. Schenning, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1857–1860; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1825–1828.
- [18] P. M. Frederik, D. H. W. Hubert, *Liposomes Part E* **2005**, *391*, 431–448.
- [19] J. R. Bellare, H. T. Davis, L. E. Scriven, Y. Talmon, *J. Electron Microsc. Tech.* **1988**, *10*, 87–111.
- [20] M. R. Vos, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, N. A. J. M. Sommerdijk, *Ultramicroscopy* **2008**, *108*, 1478–1483.
- [21] K. A. Taylor, R. M. Glaeser, *Rev. Sci. Instrum.* **1973**, *44*, 1546–1547.
- [22] Y. Zheng, Z. Lin, J. L. Zakin, Y. Talmon, H. T. Davis, L. E. Scriven, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5263–5271.
- [23] Für viele Proben in organischen Medien ist flüssiges Ethan ein gutes Lösungsmittel, während flüssiger Stickstoff das Kühlmittel der Wahl sein kann (siehe auch Tabelle 2 von Lit. [17d]).
- [24] a) R. M. Glaeser, *J. Ultrastruct. Res.* **1971**, *36*, 466–482; b) S. M. Salih, V. E. Cosslett, *Philos. Mag.* **1974**, *30*, 225–228; c) R. M. Glaeser, *J. Struct. Biol.* **2008**, *163*, 271–276.
- [25] W. Chiu, K. H. Downing, J. Dubochet, R. M. Glaeser, H. G. Heide, E. Knappe, D. A. Kopf, M. K. Lamvik, J. Lepault, J. D. Robertson, E. Zeitler, F. Zemlin, *J. Microsc.* **1986**, *141*, 385–391.
- [26] R. Eusemann, H. Rose, J. Dubochet, *J. Microsc.* **1982**, *128*, 239–249.
- [27] a) L. Reimer, *Transmission Electron Microscopy*, 4. Aufl., Springer, Berlin, **1997**; b) D. B. Williams, C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, 2. Aufl., Springer, Berlin, **2009**.
- [28] J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowall, P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 129–228.
- [29] R. Grimm, D. Typke, W. Baumeister, *J. Microsc.* **1998**, *190*, 339–349.
- [30] R. Henderson, *Q. Rev. Biophys.* **1995**, *28*, 171–193.
- [31] P. Rez, *Ultramicroscopy* **2003**, *96*, 117–124.
- [32] a) R. Henderson, R. M. Glaeser, *Ultramicroscopy* **1985**, *16*, 139–150; b) D. Typke, K. H. Downing, R. M. Glaeser, *Microsc. Microanal.* **2004**, *10*, 21–27.
- [33] a) K. Mortensen, Y. Talmon, *Macromolecules* **1995**, *28*, 8829–8834; b) Y. Yan, H. Hoffmann, A. Makarsky, W. Richter, Y. Talmon, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 6374–6382.
- [34] a) M. Adrian, J. Dubochet, S. D. Fuller, J. R. Harris, *Micron* **1998**, *29*, 145–160; b) H. Stahlberg, E. Kutejova, K. Suda, B. Wolpensinger, A. Lustig, G. Schatz, A. Engel, C. K. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6787–6790; c) S. De Carlo, C. El-Bez, C. Alvarez-Rúa, J. Borge, J. Dubochet, *J. Struct. Biol.* **2002**, *138*, 216–226.
- [35] a) *Electron Tomography: Methods for the Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell*, 2. Aufl. (Hrsg.: J. Frank), Springer Science + Business Media, LLC, New York, **2006**; b) *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*, 2. Aufl. (Hrsg.: J. Frank), Oxford University Press, New York, **2006**; c) *Advanced Tomographic Methods in Materials Research and Engineering* (Hrsg.: J. Banhard), Oxford University Press, New York, **2008**.
- [36] a) C. Böttcher, H. Stark, M. van Heel, *Ultramicroscopy* **1996**, *62*, 133–139; b) M. Kellermann, W. Bauer, A. Hirsch, B. Schade, K. Ludwig, C. Böttcher, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3019–3022; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2959–2962; c) B. Schade, K. Ludwig, C. Böttcher, U. Hartnagel, A. Hirsch, *Angew. Chem.*

- 2007**, **119**, 4472–4475; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, **46**, 4393–4396.
- [37] Siehe beispielsweise: a) H. Friedrich, P. E. de Jongh, A. J. Verkleij, K. P. de Jong, *Chem. Rev.* **2009**, **109**, 1613–1629; b) P. A. Midgley, R. E. Dunin-Borkowski, *Nat. Mater.* **2009**, **8**, 271–280; c) H. Friedrich, C. J. Gommes, K. Overgaag, J. D. Meeldijk, W. H. Evers, B. de Nijs, M. P. Boneschanscher, P. E. de Jongh, A. J. Verkleij, K. P. de Jong, A. van Blaaderen, D. Vanmaekelbergh, *Nano Lett.* **2009**, **9**, 2719–2724.
- [38] a) M. R. J. Vos, P. H. H. Bomans, F. de Haas, P. M. Frederik, J. A. Jansen, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, **129**, 11894–11895; b) M. R. J. Vos, M. Breurken, P. E. L. G. Leclerc, P. H. H. Bomans, F. de Haas, P. M. Frederik, J. A. Jansen, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, **130**, 12608–12609; c) E. M. Pouget, P. H. H. Bomans, J. A. C. M. Goos, P. M. Frederik, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Science* **2009**, **323**, 1455–1458; d) T. M. Hermans, M. A. C. Broeren, N. Gomopoulos, P. van der Schoot, M. H. P. van Genderen, N. A. J. M. Sommerdijk, G. Fytas, E. W. Meijer, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, **4**, 721–726; e) H. M. H. F. Sanders, G. J. Strijkers, W. J. M. Mulder, H. R. Huinink, S. J. F. Erich, O. C. G. Adan, N. A. J. M. Sommerdijk, M. Merkx, K. Nicolay, *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, **4**, 81–88; f) B. Leng, Z. Shao, P. H. H. Bomans, L. J. Brylka, N. A. J. M. Sommerdijk, G. de With, W. Ming, *Chem. Commun.* **2010**, **46**, 1703–1705.
- [39] a) Y. Chen, J. Du, M. Xiong, H. Guo, H. Jinnai, T. Kaneko, *Macromolecules* **2007**, **40**, 4389–4392; b) H. v. Berlepsch, C. Böttcher, K. Skrabania, A. Laschewsky, *Chem. Commun.* **2009**, 2290–2292.
- [40] a) M. Radermacher in *Electron Tomography: Methods for the Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell*, 2. Aufl. (Hrsg.: J. Frank), Springer Science + Business Media, LLC, New York, **2006**, S. 245–274; b) J. R. Kremer, D. N. Mastroarde, J. R. McIntosh, *J. Struct. Biol.* **1996**, **116**, 71–76; c) A. S. Frangakis, R. Hegerl, *J. Struct. Biol.* **2001**, **135**, 239–250.
- [41] a) P. A. Midgley, M. Weyland, *Ultramicroscopy* **2003**, **96**, 413–431; b) J. Tong, I. Arslan, P. Midgley, *J. Struct. Biol.* **2006**, **153**, 55–63; c) Inspect3D (FEI Company, Eindhoven, Niederlande).
- [42] K. J. Batenburg, S. Bals, J. Sijbers, C. Kubel, P. A. Midgley, J. C. Hernandez, U. Kaiser, E. R. Encina, E. A. Coronado, G. Van Tendeloo, *Ultramicroscopy* **2009**, **109**, 730–740.
- [43] A. Chuvilin, A. N. Khlobystov, D. Obergfell, M. Haluska, S. Yang, S. Roth, U. Kaiser, *Angew. Chem.* **2010**, **122**, 197–201; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, **49**, 193–196.
- [44] a) M. Haider, H. Rose, S. Uhlemann, B. Kabius, K. Urban, *J. Electron Microsc.* **1998**, **47**, 395–405; b) D. J. Smith, *Microsc. Microanal.* **2008**, **14**, 2–15; c) M. Haider, P. Hartel, H. Muller, S. Uhlemann, J. Zach, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2009**, **367**, 3665–3682.
- [45] R. P. Feynman, *Caltech J. Eng. Sci.* **1960**, **4**, 23–36.
- [46] a) K. Butter, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, G. J. Vroege, A. P. Philipse, *Nat. Mater.* **2003**, **2**, 88–91; b) Y. Y. Won, *Korean J. Chem. Eng.* **2004**, **21**, 296–302; c) M. Klokkenburg, A. J. Houpteten, R. Koole, J. W. J. de Folter, B. H. Erne, E. van Faassen, D. Vanmaekelbergh, *Nano Lett.* **2007**, **7**, 2931–2936; d) V. M. Yuwono, N. D. Burrows, J. A. Soltis, R. L. Penn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, **132**, 2163–2165.
- [47] a) R. McIntosh, D. Nicastro, D. Mastronarde, *Trends Cell Biol.* **2005**, **15**, 43–51; b) A. J. Koster, M. Barcena in *Electron Tomography: Methods for the Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell*, 2. Aufl. (Hrsg.: J. Frank), Springer Science + Business Media, LLC, New York, **2006**, S. 113–162; c) S. Nickell, C. Kofler, A. P. Leis, W. Baumeister, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, **7**, 225–230.
- [48] B. P. Pichon, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, N. A. J. M. Sommerdijk, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, **130**, 4034–4040.
- [49] a) O. Regev, Y. Cohen, E. Kehat, Y. Talmon, *Zeolites* **1994**, **14**, 314–319; b) S. Bucak, C. Cenker, I. Nasir, U. Olsson, M. Zackrisson, *Langmuir* **2009**, **25**, 4262–4265; c) C. J. Gommes, H. Friedrich, P. E. de Jongh, K. P. de Jong, *Acta Mater.* **2010**, **58**, 770–780.
- [50] A. Dey, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, **39**, 397–409.
- [51] A. G. Denkova, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, E. Mendes, unveröffentlichte Ergebnisse.