

Materialwissenschaftliches Praktikum

Die Grundlagen der konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Versuch Nr. MP 06, 07

09 - 2023

Praktikum

Die Grundlagen der konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

1. Einleitung

Das konfokale Laser Scanning Mikroskop (CLSM) hat sich in den letzten Jahren zu einem etablierten und weit verbreiteten Forschungsinstrument entwickelt. In Biologie und Medizin sind fluoreszenzmikroskopische Aufgabenstellungen des CLSM vorherrschend. Es können jedoch auch herkömmliche Kontrastverfahren wie z.B. der differentielle Interferenzkontrast (DIC) realisiert werden. Die Überlagerung mit einem konfokalen Fluoreszenzbild der gleichen Probenstelle ist ebenfalls möglich. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die Materialwissenschaft. Hierbei ist insbesondere der Reflexionsmodus des CLSM einschließlich solcher Verfahren wie Polarisationskontrast gefragt. Verwendung finden konfokale Mikroskope jedoch auch in Routineanwendungen im Rahmen der industriellen Qualitätssicherung. Die konfokale Abbildung ermöglicht hier z.B. die effektive Suche nach Fehlstellen in Halbleiterschaltkreisen. Die vollständige Generierung der zweidimensionalen Objektinformation aus der Fokusebene eines konfokalen CLSM umfasst drei Verarbeitungsschritte:

1. Zeilenweises Abrastern der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl, der mittels zweier galvanometrisch betriebener Scanner in x- und y-Richtung abgelenkt wird.
2. Pixelweise Detektion, der vom jeweils abgetasteten Probenort emittierten Fluoreszenzstrahlung oder vom reflektierten Laserstrahl, über einen Sekundärelektronenvervielfacher (PMT).
3. Digitalisierung der nach dem PMT als elektrisches Signal vorliegenden Objektinformation. Die Darstellung auf dem Bildschirm erfolgt durch pixelweises Ausgeben der Bilddaten aus einem digitalen Bildspeicher.

Anders als in einem konventionellen Mikroskop wird die Abbildungsqualität in einem konfokalen CLSM nicht ausschließlich durch die Optik beeinflusst,

sondern auch durch die konfokale Blende (Pinhole), die Digitalisierung der Objektinformation (Pixelgröße) und das Rauschen des Lichts (Laserrauschen bzw. Schrotrauschen des Fluoreszenzlichts) beeinflusst. Im Hinblick auf niedriges Rauschen müssen auch signalverarbeitende, optoelektronische und elektronische Komponenten optimiert werden.

2. Das konfokale Prinzip

Im konventionellen Lichtmikroskop erfolgt die Transformation vom Objekt zum Bild für alle Objektpunkte gleichzeitig, also parallel. Dagegen wird in einem konfokalen LSM die Probe punktweise bestrahlt, und die physikalische Wechselwirkung, welche das Laserlicht in der gerade bestrahlten Objektstelle hervorruft (Reflektion oder Fluoreszenz) entsprechend punktweise gemessen. Informationen über die gesamte Probe erhält man nur dann, wenn der Laserstrahl über die Probe bewegt wird. Konfokale Systeme bezeichnet man auch als Punktscanner. Die entscheidende Besonderheit eines konfokalen LSM gegenüber einem Lichtmikroskop ist eine konfokale Blende (Pinhole), die in einer zur Zwischenbildebene und damit auch zur Objektebene des Mikroskops konjugierten Ebene angeordnet ist. Daraus ergibt sich, dass durch den Detektor (PMT) nur Licht detektiert werden kann, welches diese Blende passiert hat. Der Durchmesser der Blende ist variabel und im Idealfall unendlich klein (punktförmige Detektion). Da der beugungsbegrenzt fokussierte Laserstrahl einer punktförmigen Beleuchtung des Objekts am Brennpunkt entspricht und Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden (konjugierte Ebenen), spricht man von einem konfokalen Strahlengang (Abb. 1).

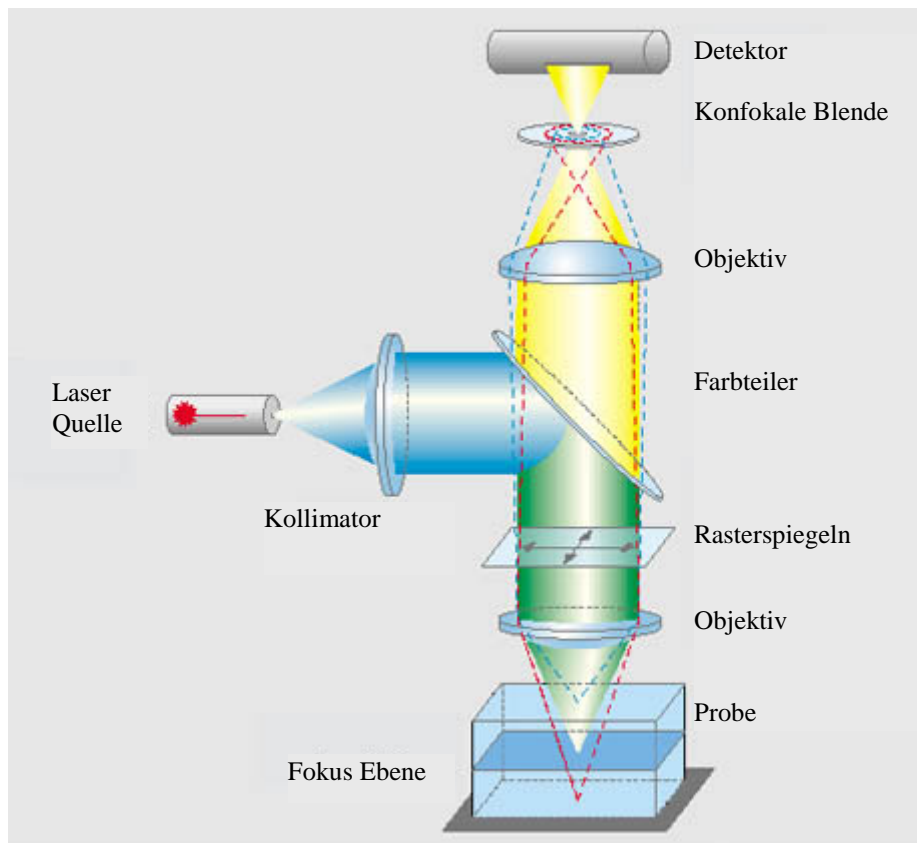


Abbildung 1: Der konfokale Strahlengang

Der Durchmesser der konfokalen Blende legt fest, in welchem Maß, Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird. Die Fähigkeit der Unterscheidung zwischen Licht aus der Fokusebene und über/unter der Fokusebene erlaubt dem konfokalen Mikroskop eine Generierung von kontrastreichen (streulichtunterdrückend), in x, y und z hochaufgelösten Abbildungen der Probe.

2.1 Theoretische Grenzen eines konfokalen Mikroskops

Wie in der konventionellen Mikroskopie, hängt auch in der konfokalen Mikroskopie die Auflösungsgrenze mit der Beugung von Licht zusammen. Das Laserlicht das in den Brennpunkt fokussiert wird sieht dadurch nicht aus wie ein Punkt, sondern wie eine Airy-Scheibe (Abb. 2).

Abbildung 2: Links: Airy-Scheibe, Rechts, Profil durch die Airy-Scheibe.

Die Größe dieser Airy-Scheibe ist von der Wellenlänge (

2.2 Neue Entwicklungen in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

Seit der Anschaffung des für die Praktikumsversuche zur Verfügung stehende „Zeiss LSM 510-Meta“ hat sich gerade in den letzten Jahren hat sich die Technik der CLSM's rasant weiterentwickelt.

Viele Hersteller bietet jetzt auf das jeweilige Anwendungsgebiet zugeschnittene Gerätekonfigurationen an.

Für materialwissenschaftliche Anwendungen

Die Firma ZEISS z. Bsp. hat neue C Epiplan-APOCHROMAT Objektive speziell für die materialwissenschaftlich konzipierten CLSMs, entwickelt. Sie minimieren die Abbildungsfehler für die bei Reflexionsmessungen genutzten 405 nm Laserwellenlänge, über das gesamte Sehfeld. Man erhält mehr so Details von der Probenoberfläche durch weniger Rauschen und weniger Artefakten.

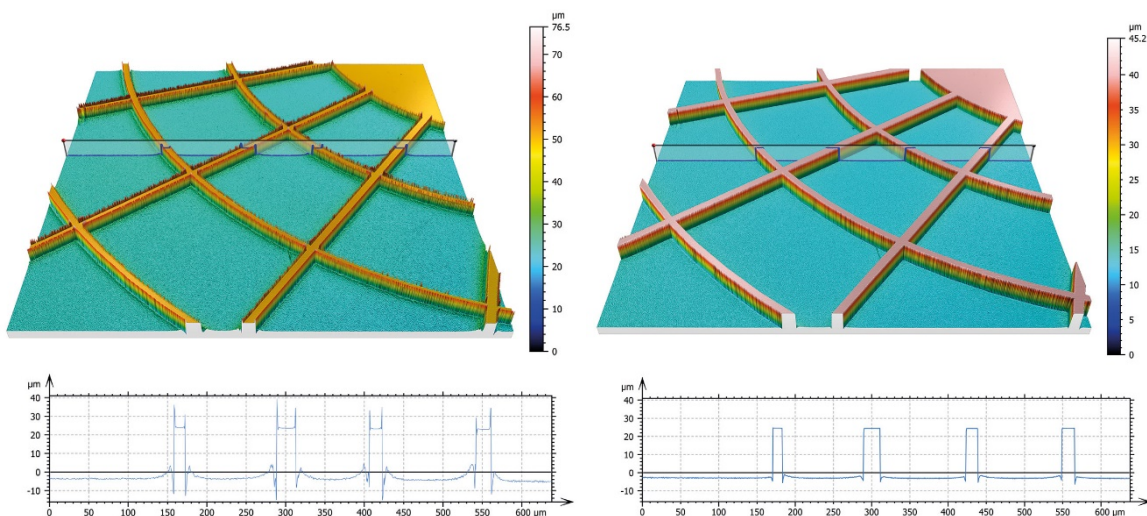


Abbildung 3: Probeaufnahme mit unkorrigierten- (links) und auf 405nm korrigierten Ovjektiv (rechts)

Auf dem linken Bild sind Artefakte an Kanten und Rauschen auf der ebenen Oberfläche deutlich zu erkennen, das rechte Bild zeigt diese Artefakte nicht.

Für den Hauptanwendungsbereich in Biologie und Medizin

wurden neue Detektoren und lichteffizienter Strahlführungen entwickelt.

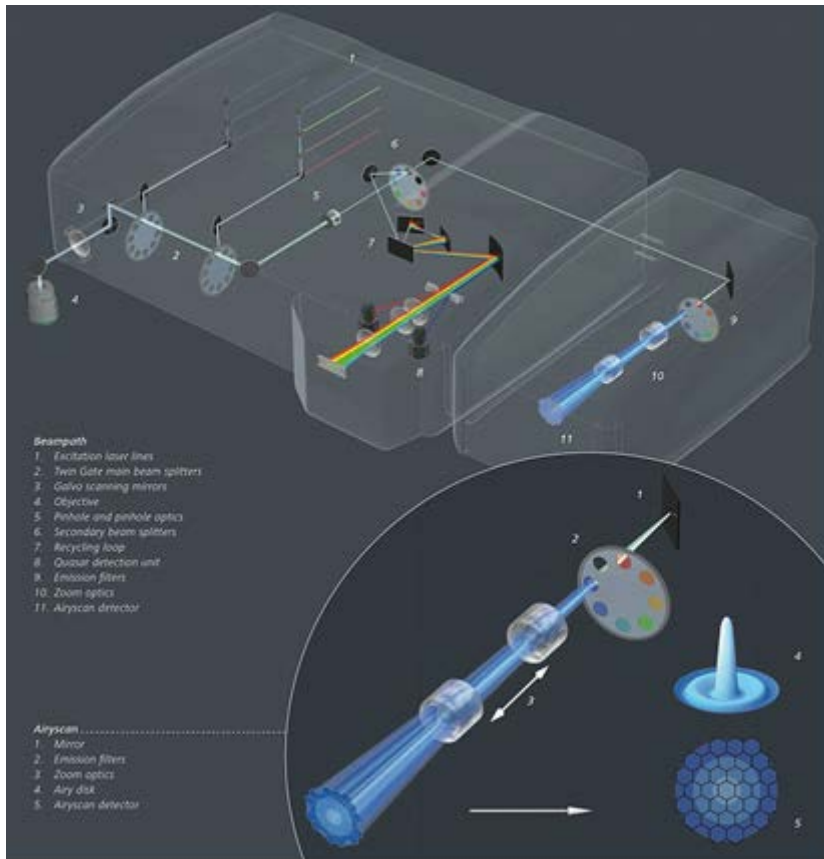


Abbildung 4: Strahlengang des LSM 880 mit Airyscan. Zunächst durchläuft das Emissionslicht den dichroitischen Hauptstrahlteiler Twin Gate. Der Teiler ermöglicht eine sehr effiziente Laserunterdrückung, um einen hohen Kontrast zu erzielen. Beim Erreichen des sekundären Strahlteilers wird das gesamte Emissionslicht entweder an eine interne spektrale Detektionseinheit (Quasar, mit bis zu 34 Kanälen) oder alternativ an den Airyscan-Detektor (rechts unten) mit GaAsP-Technologie gesendet.

Das Airyscan-Prinzip

Wie im Abschnitt 2.1 beschrieben, ergibt sich die optimale Größe der Airy-Scheibe, aus der auf die jeweilige Wellenlänge abgestimmte Pinholegröße als entscheidendes Kriterium für höchste Auflösung in der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Aber klassische breitbandige Mehrkanaldetektoren können technisch bedingt, nur eine durchschnittliche Pinholegröße nutzen.

Der neue Airyscan-Detektor nutzt bewusst den Effekt beugungsbedingter Airy-Disk Entstehung bei der Abbildung punktförmiger Objekte. Im klassischen konfokalen Mikroskop wird anschließend alles Emissionslicht von außerhalb der Fokusebene am sogenannten Pinhole zurückgewiesen. Die Größe der Öffnung des Pinholes bestimmt dabei, welcher Anteil der Airy-Disk den Detektor erreicht. Je kleiner die Öffnung des Pinholes ist, desto höher wird die Auflösung des resultierenden Bild, aber gleichzeitig sinkt die Lichtintensität, denn es erreichen weniger Photonen den Detektor.

Airyscan löst das klassische Dilemma zwischen Auflösung und Licht-Effizienz durch Abbildung der kompletten Airy-Disk auf einen konzentrisch angeordneten hexagonalen Flächendetektor. Die lichtempfindliche Detektorfläche besteht aus 32 einzelnen GaAsP-Detektorelementen, von denen jedes einzelne ein kleines Pinhole darstellt. Das klassische konfokale Pinhole im Strahlengang bleibt geöffnet und lässt alles Licht zum Detektor passieren. Die Einzelsignale aller Detektorelemente werden anschließend zu einem Bild mit höherer Auflösung und besserem Signal-Rausch-Abstand verrechnet.

Die Abbildung 4 zeigt im vergrößerten Bildteil eine schematische Darstellung der Platzierung des Airyscan 2-Detektors in der Lochblendenebene, der als eine Reihe kleiner 0,2 Airyunit (AU)-Nadelöcher fungiert, die eine verbesserte optische Auflösung mit der Aufnahmefähigkeit einer 1,25-AE-Nadelöffnung bieten.

2.3 LSM in der Materialwissenschaft

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (CLSM) , eignet sich bei entsprechender Software, sehr gut für Materialanalyse. Sie ermöglichen die Charakterisierung der Oberflächentopografie von 3D-Mikrostrukturen durch berührungslose konfokale dreidimensionale Bildgebung zur Analyse von Nanomaterialien, Metallen, Polymeren und Halbleitern

Anhand der erhaltenen Meßwerte lassen sich Entfernungen, Winkel, Flächen, Volumina und Stufenhöhen von 2D-Profilen und 3D-Oberflächen berechnen bei gleichzeitiger Bewertung der Oberflächenrauheit.

Mit dem neusten CLSM´s sind Lichtmikroskopische- und konfokale Bildgebung kombinierbar einschließlich Polarisation und Fluoreszenz im optischen Kontrast oder im Konfokalmodus.

Neben der standartmäßigen Messung topografischer Strukturen im Auflichtverfahren sind jetzt auch transparente Proben (z.B. Polymere, Dünnschliffe) im Durchlichtverfahren schichtweise charakterisierbar.

Biologische Werkstoffe und medizinische Anwendung

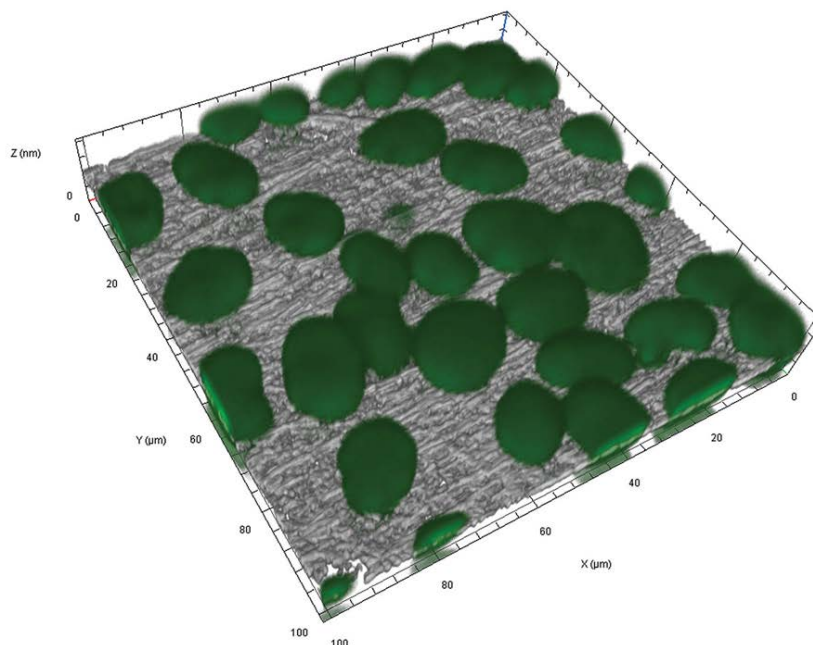


Abbildung 5: Zellverteilung auf einer Metalloberfläche, grau: Titanoberfläche; grün: Zellen Mehrkanalanalyse; Oberflächenstrukturcharakterisierung, Fluoreszenz-Imaging von Zellen

Polymere

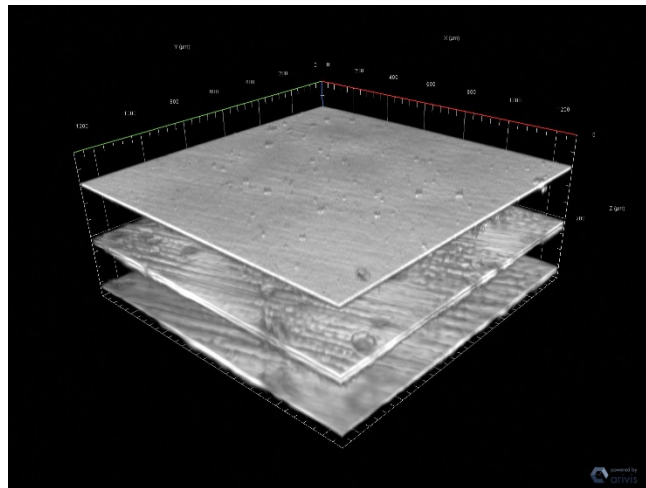


Abbildung 6: Mehrschichtiges System, zwei Schichten eines zusammengesetzten Polymerverbands, Messung von Schichtdicken mit dem ZEN Wizard im Durchlichtscan

Fehleranalyse, Verschleißmessung auf dem Bildschirm eines Mobiltelefons

(Überlagerung von Bilder der CCD-Kamera mit dem CLSM-Scan)

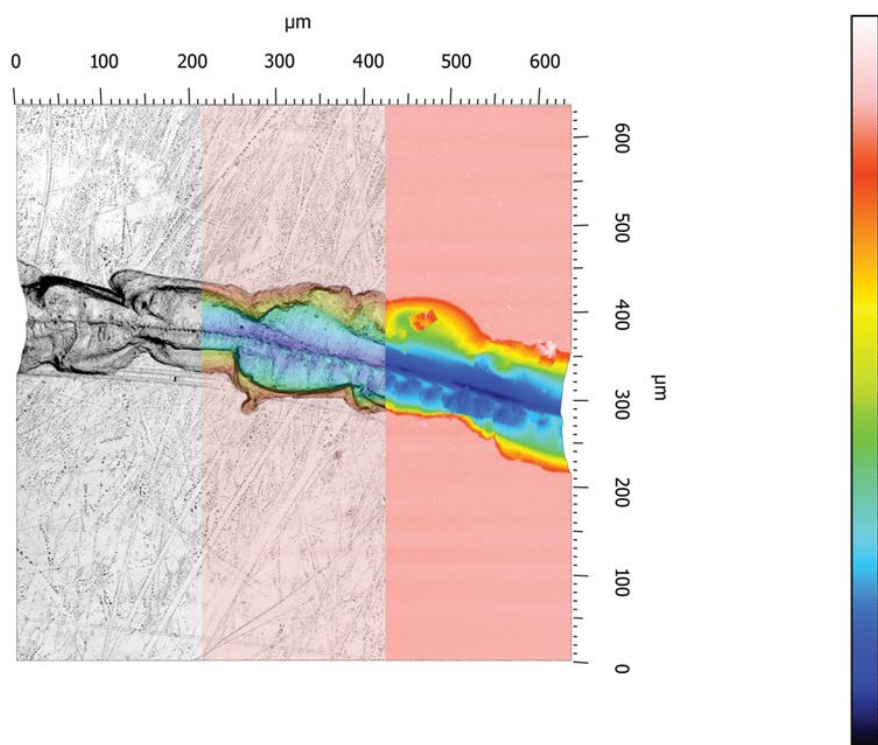


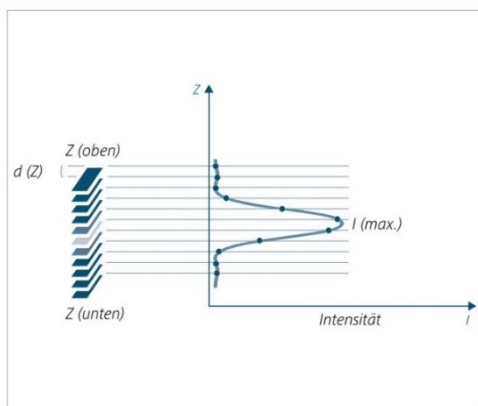
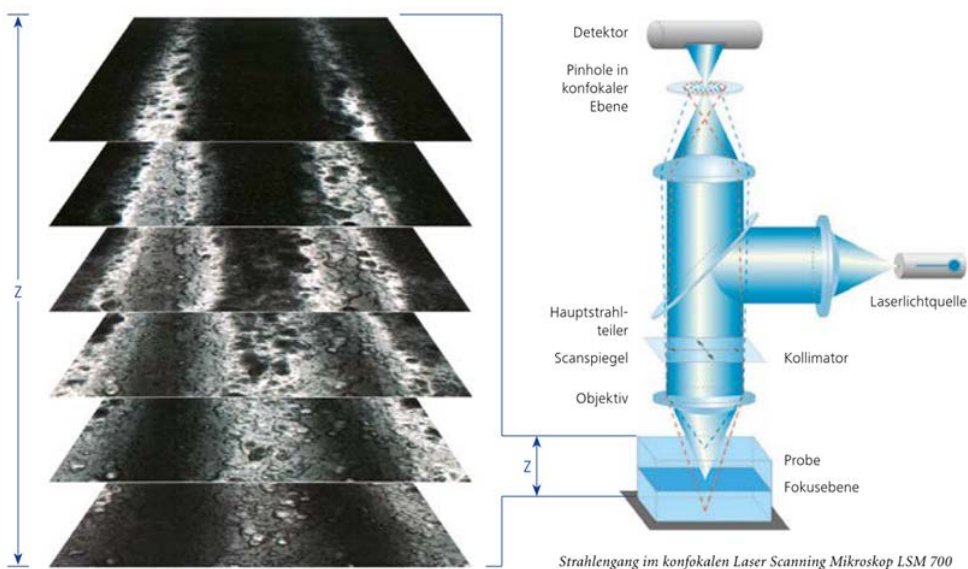
Abbildung 7: Kratzer auf dem Glas: Aus ConfoMap extrahierte 2D-Bilder zur Analyse der Oberflächenstruktur.

Links: schwarz-Weiß-Texturbild, inklusive Intensitätsprojektion. Rechts: Farbcodierte Höhenkarte.

Mitte; Überlagerung beider Bilder. Objektiv: C EPIPLAN-APOCHROMAT 20x/0,7

Konfokale- Schnitte – Bildstapel – Topografie

Der Laserstrahl wird in X- und Y-Richtung über die Probe gelenkt – Punkt für Punkt, Zeile für Zeile. Durch die Veränderung der X- und Y-Koordinaten des Laserfokus entsteht ein optischer Schnitt der Probe. Wird die Objektposition senkrecht zur optischen Achse verändert, so wird ein zweiter optischer Schnitt der Probe erzeugt. Durch sukzessive Variation der Z-Position entsteht ein dreidimensionaler Bildstapel. Er enthält die digitalisierten Helligkeitswerte für jeden Einzelpunkt mit den Laserfokuskoordinaten $X_i Y_j Z_k$. Aus diesem Datensatz lassen sich einfach und schnell Intensitätsprojektionen erweiterter Schärfentiefe, Intensitäts- oder Höhenprofile, topografische Karten oder 3D-Oberflächentopografien von Ihrer Probe berechnen. Die Anzahl der Schnitte ergibt sich aus der Tiefenschärfe des Objektivs und der eingestellten Scan-Auflösung



Intensitätsverteilung eines einzelnen Pixels über den gesamten Bildstapel hinweg.

Abbildung 8: Erzeugung eines Bildstapels

3. Das Zeiss LSM 510 Meta Konfokal Mikroskop

Im Jahre 2001 entwickelte die Firma Carl Zeiß Jena das LSM 510 META. Die griechische Vorsilbe META bezeichnet das, was über das Bisherige hinausgeht. Das LSM 510 Meta (Abb. 9) basiert auf dem Forschungsmikroskop von Zeiss: Mikroskop-Axioplan 200 und dem 510-Meta confocal Modul. Die Software erkennt automatisch die Mikroskopeinstellungen, die verwendeten Objektive und kontrolliert alle Bewegungen und Messungen, die mit dem System ausgeführt werden.

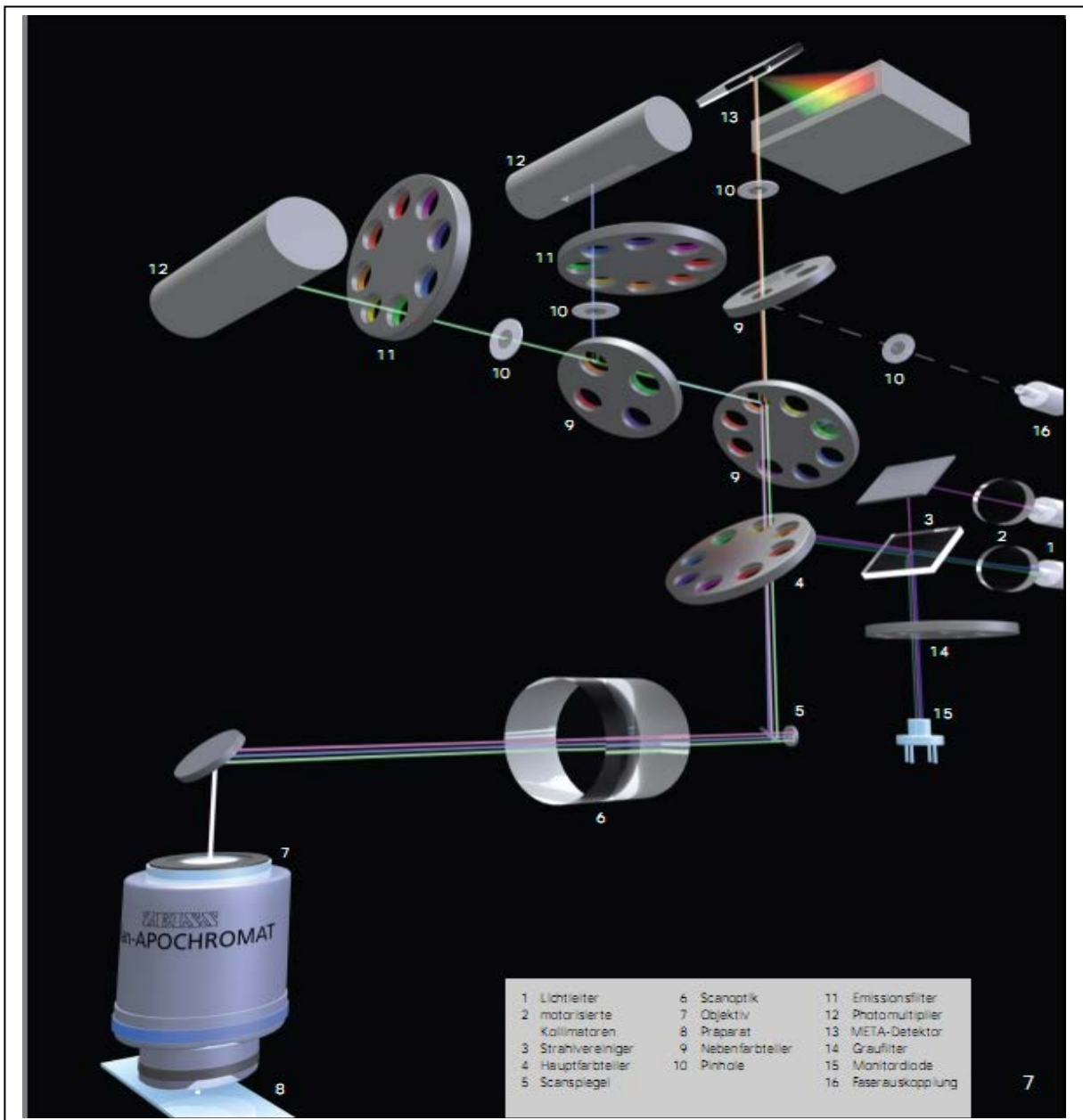


Abbildung 9: Schema des Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop

In Abbildung 9 ist der optische Strahlengang durch das LSM 510 schematisch dargestellt. Das Licht von sichtbaren-, UV- oder IR-Laser-Linien wird von dem Laser Modulen zum Raster Module durch separate optische Fasern (1) geleitet. Nachdem die justierbare Kollimatoren (2) passiert sind, werden die Laser Linien kombiniert (3) und durch die Hauptfarbteiler (4) auf das Scanmodul (5) reflektiert. Dieses Scanmodul rastert diesen Lichtstrahl in die XY-Ebene über die Probe. Dank der hochkorrigierten Rasterlinse (6) und dem Mikroskopobjektiv formt der Strahl ein, durch Brechung limitierten, Fokuspunkt. Das Licht welches durch die Probe reflektiert oder die Fluoreszenzstrahlung die emittiert wird, gelangt durch den Hauptfarbteiler (4) auf drei Nebenfärbteiler (9). Hier erfolgt die spektrale Aufteilung. Jeder konfokale Kanal hat seine eigene Blende (Pinhole/10). Der Durchmesser und die Position kann separat justiert werden. Die beiden Emissionsfilter (11) sorgen dafür dass die hochempfindlichen photo multipliertubes (PMT's) (12) nur die Photonen der gewünschten Wellenlänge detektieren. Es gibt zwei PMT's und ein Meta-Detektor (13). Dabei sind Abtastungen in 8 oder 12 Bit (256 oder 4096 Graustufen) möglich. Unser LSM 510 Meta ist mit 3 Lasern ausgestattet.

Argon Laser: 458/477/488/514 nm

Helium-Neon Laser: 543 nm

Helium-Neon Laser: 633 nm

Zur Auflichtmikroskopie stehen eine Halogenlampe und eine Hg-Lampe zur Verfügung. Lichtmikroskopische Aufnahmen können mit der hochauflösenden CCD-Kamera (Axiocam MRm) gespeichert werden.

Die Auswertung der Reflexionsmessungen, wie Darstellung, Verarbeitung und Einordnung der Informationen erfolgt mit dem Software-Modul „Topographie“. Es können sowohl 2D Oberflächenprofile als auch 3D Oberflächentopographien dargestellt werden. Folgende Verfahren und Methoden sind mit dem LSM 510 möglich:

3D-Untersuchungen im Reflexionsverfahren

Multifluoreszenz Mikroskopie

Auflichtmikroskopie

Durchlichtmikroskopie

Der Inhalt des Praktikums beschränkt sich jedoch auf die ersten beiden Punkte.

4. Fluoreszenz

Durch die Bestrahlung eines Fluorochrom mit Licht der Wellenlänge λ_{ex} werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Hier verweilen sie sehr kurz, übergeben dabei Energie an Nachbarmoleküle durch Zusammenstöße und die übrige Energie wird wieder als Licht emittiert (Abb. 10). Weil das emittierte Photon weniger Energie hat als das absorbierte, hat sich die Wellenlänge λ_{em} , hin zu längerem Licht, geändert ($E = h \cdot \nu$)

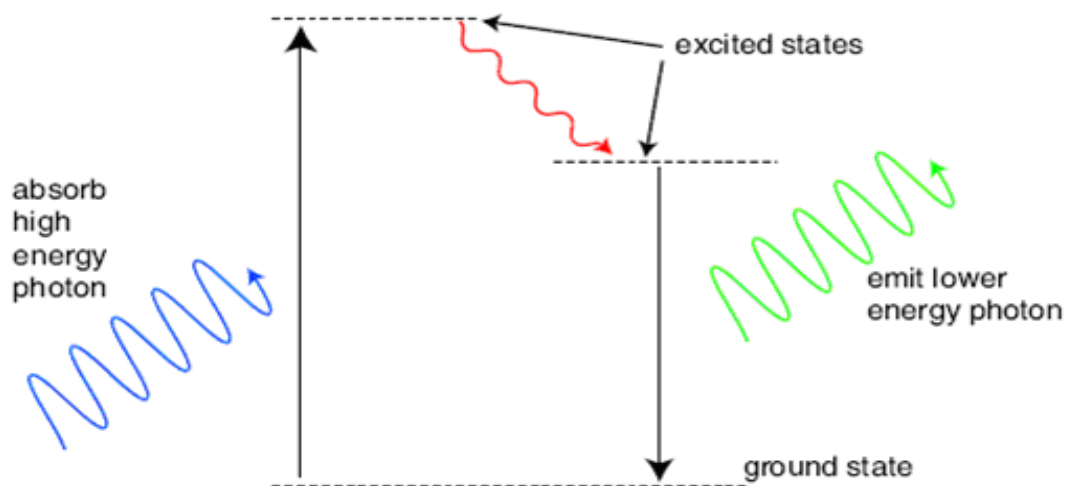


Abbildung 10: Das Fluoreszenz Prinzip

Ein Fluorochrom kann innerhalb seines Anregungsspektrums mit unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt werden und sendet daraufhin Licht über ein charakteristisches Emissionsspektrum aus (Abb. 11). Je näher das Anregungslicht an λ_{ex} ist, je höher ist die emittierte Intensität. Wenn z.B. die Anregungswellenlänge zu niedrig ist, wobei nur 50% des Lichtes absorbiert wird, dann ist die Intensität des emittierten Licht auch nur die Hälfte.

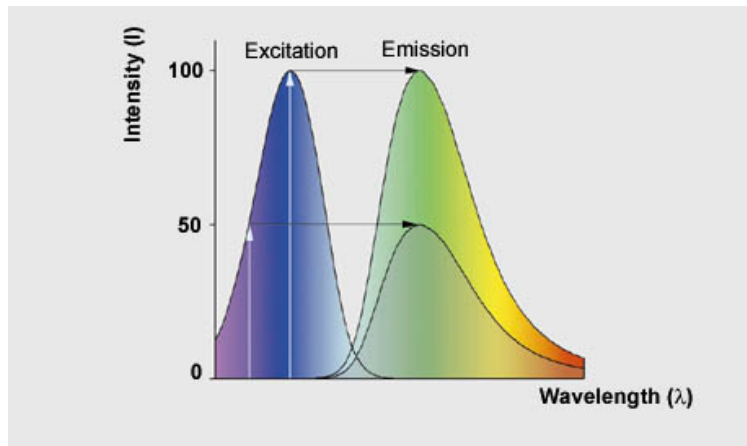


Abbildung 11: Ein Fluoreszenz Spektrum

Fluoreszenzmikroskopie hat einige Vorteile gegenüber Auf- oder Durchlichtmikroskopie. Sie ist zum Beispiel viel empfindlicher. So ist es möglich Fluorochrome an spezifischen und sehr kleinen Teilen der Probe anzuhaften, wodurch nur diese Teile sichtbar werden. Auch kann man verschiedene Fluorochrome an unterschiedliche Bestandteile der Probe haften, wodurch man diese unterscheiden kann.

Ein Nachteil von Fluoreszenz ist das irreversible Ausbleichen von Fluorochromen. Obwohl dieser Prozess noch nicht völlig verstanden wird, nimmt man an, dass die Fluorochrome mit Sauerstoff oder Sauerstoffradikalen reagieren und dabei ihre Fluoreszenz verlieren. Diese Reaktion kann stattfinden nachdem ein Fluorochrom vom Grundzustand in den angeregten Zustand übergegangen ist. Es gibt verschiedene Strategien um diese Reaktion zu vermindern. Eine Methode ist einfach die Menge von Sauerstoff, mit der Fluorochrome reagieren können, zu reduzieren. Das ist möglich indem unter einem Schutzgas wie Argon gearbeitet wird. Eine andere Möglichkeit ist das Benutzen von „free radical scavengers“ um die Sauerstoffradikale zu vermindern. Eine andere Option ist der Gebrauch von Objektiven mit hoher Numerischer Apertur und geringer Vergrößerung (da diese weniger Licht absorbieren). Mit einer empfindlichen Kamera ergibt sich so durch die elektronische Nachvergrößerung dasselbe Ergebnis, jedoch wird eine geringere Lichtintensität benötigt.

Es gibt auch Techniken welche das Ausbleichen ausnutzen. Mann kann zum Beispiel ein Teil einer Probe ausbleichen und dann die Diffusionsrate der umliegenden, nicht ausgebleichten Fluorochrome nachweisen (FRAT).

5. Abbildungsmodi

Ein modernes CLSM kann im Fluoreszenz- und im Reflexionsmodus konfokal arbeiten. Im Reflexionsmodus werden keine Wellenlängenfilter benötigt. Stattdessen reflektiert ein semitransparenter Spiegel (Abbildung 12) 20% des einfallenden Laserlichtes zur Probe (a), 80% werden transmittiert und nicht zur Anregung genutzt. Das von der Probe reflektierte Licht (b) wird zu 80% zum Detektor geführt, 20% werden abgelenkt und nicht detektiert.

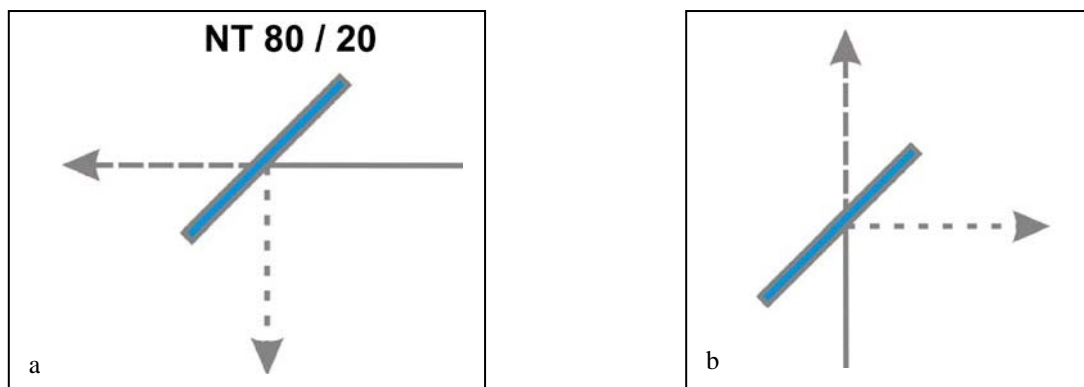


Abbildung 12: a-Excitation Situation, b-Emission Situation

Ziel ist es nicht spektral selektiv zu sein, sondern keine Verringerungen über den gesamten Spektralbereich zu erhalten. Wenn man allerdings die gleiche Anregung wie z.B. beim HFT 488 erhalten möchte, muss man die 5-fache Intensität einsetzen.

Im Fluoreszenzmodus wird zuerst die benötigte Anregungswellenlänge(n) 458/477/488/514/568/633 nm gewählt. Ein dichromatischer Spiegel wird für die Weiterleitung des Emissionsspektrums und zur Unterdrückung der Anregungswellenlänge(n) zum Detektor verwendet.

5.1 Single track, multi track und “crosstalk”

Beim Arbeiten mit Proben, die mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (z. B. Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 568), gibt es das Problem der Trennung der Emissionssignale. In Abbildung 13 kann man diesen Effekt sehen. Die Bilder mit den beiden Farbstoffen sind gleichzeitig aufgenommen worden. Im zusammengesetzten Bild ist eine Vermischung der Farben zu sehen, auch als „crosstalk“ (Abbildung 14) bezeichnet. Die Fluoreszenzen lassen sich nicht gut trennen.

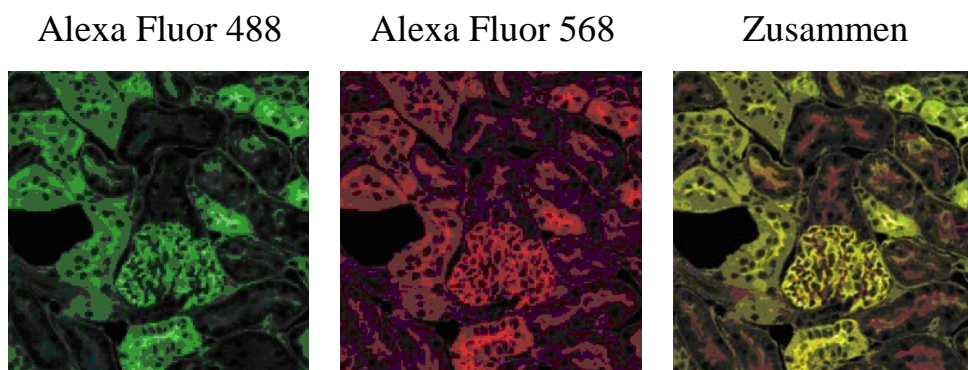


Abbildung 13: Single track Aufnahmen ergeben „crosstalk“.

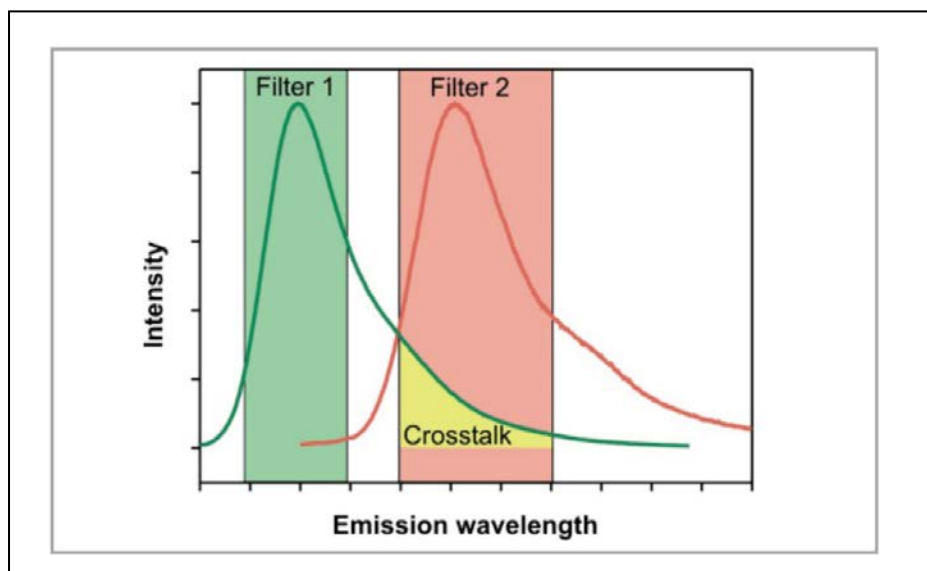


Abbildung 14: Selektion von Emissionssignalen mit konventionellen Bandpassfilterverfahren. Der gelbe Bereich kennzeichnet den Emissions-Cross-talk zwischen 2 Fluoreszenzfarbstoffen, dargestellt durch rote und grüne Emissionsspektren. Schattierte Flächen symbolisieren die zur Signaltrennung verwendeten Bandpassfilter.

Mit der Echtzeit Elektronik ist das LSM 510 in der Lage, die Einstellungen für Laser und Detektoren (Track) sehr schnell zu wechseln. So kann ein Track mit den Einstellungen für den ersten Farbstoff gescannt werden, der nächste mit den Einstellungen für den zweiten Farbstoff und so weiter. Somit ist gewährleistet das zu nur einer Anregungswellenlänge nur ein Detektor geschaltet ist. In Abb.15 kann man sehen, dass die Farben jetzt gut getrennt sind und deshalb nicht in dem zusammengesetzten Bild gemischt werden.

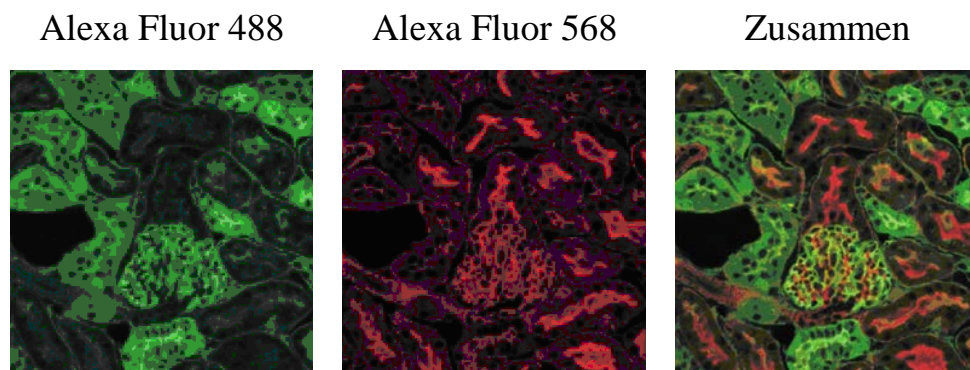


Abbildung 15: Multi track Aufnahme: gute Farbtrennung

6 Ziele und Themen

6.1 Reflektion

Das CLSM-Praktikum ist in zwei Teile untergliedert. Im ersten werden die Grundlagen der CLS-Mikroskopie im Reflexionsmodus und allgemeine Schritte des Mikroskopierens erlernt bzw. gefestigt, um im zweiten Teil Messungen im Fluoreszenz-Modus erfolgreich zu meistern. Die Oberflächen, welche zur Veranschaulichung der Funktionsweise des Mikroskops im Reflexionsmodus verwendet werden, sind:

1. Eine Geldmünze. Bestimmen Sie jeweils mit 5er, 10er und 20er Objektiv die Höhe einer ausgewählten Struktur auf der Münze. Begründe Unterschiede und erlerne die prinzipiellen Einstellungen am LSM.
2. Eine C-15 Stahlprobe mit Vickers Härteeindruck. Zu bestimmen sind hier Winkel, Diagonale und Volumen des Eindruckes.
3. C-60 Stahlprobe. Bestimme den Abstand und die Höhe der C-Lamellen. Mache Aussagen zur Genauigkeit und zum Gefügebild.
4. Vier keramische Filterelemente. Bestimme ausgewählte Rauigkeits- und Volumenwerte der Filterelemente (5er oder 10er Objektiv). Stellen Sie die Unterschiede tabellarisch dar und diskutiere diese.
5. Eine PDMS Oberfläche. Stelle die Struktur der Oberfläche mit einem sinnvoll ausgewählten Objektiv dar. Beachte beim generieren der Abbildung die Softwareeinstellungen.

6.2 Fluoreszenz

In diesem Teil werden CLSM-Messungen im Fluoreszenz-Modus durchgeführt. Als Beispiel für die CLSM-Anwendung im Bereich Biomaterialien/Medizin, wird eine Biologische Probe gemessen. Diese Zebrafisch Probe ist angefärbt mit 3 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen: Alexa Fluor 488, Cy3 und Cy5. Die Anregungs- und Emissions-Spektren kann man in Abbildung 16 sehen. Diese Probe ist nicht so stark fluoreszierend, deshalb empfiehlt sich ein Öl-Immersionsobjektiv (Immersionsöl 518F) zu benutzen.

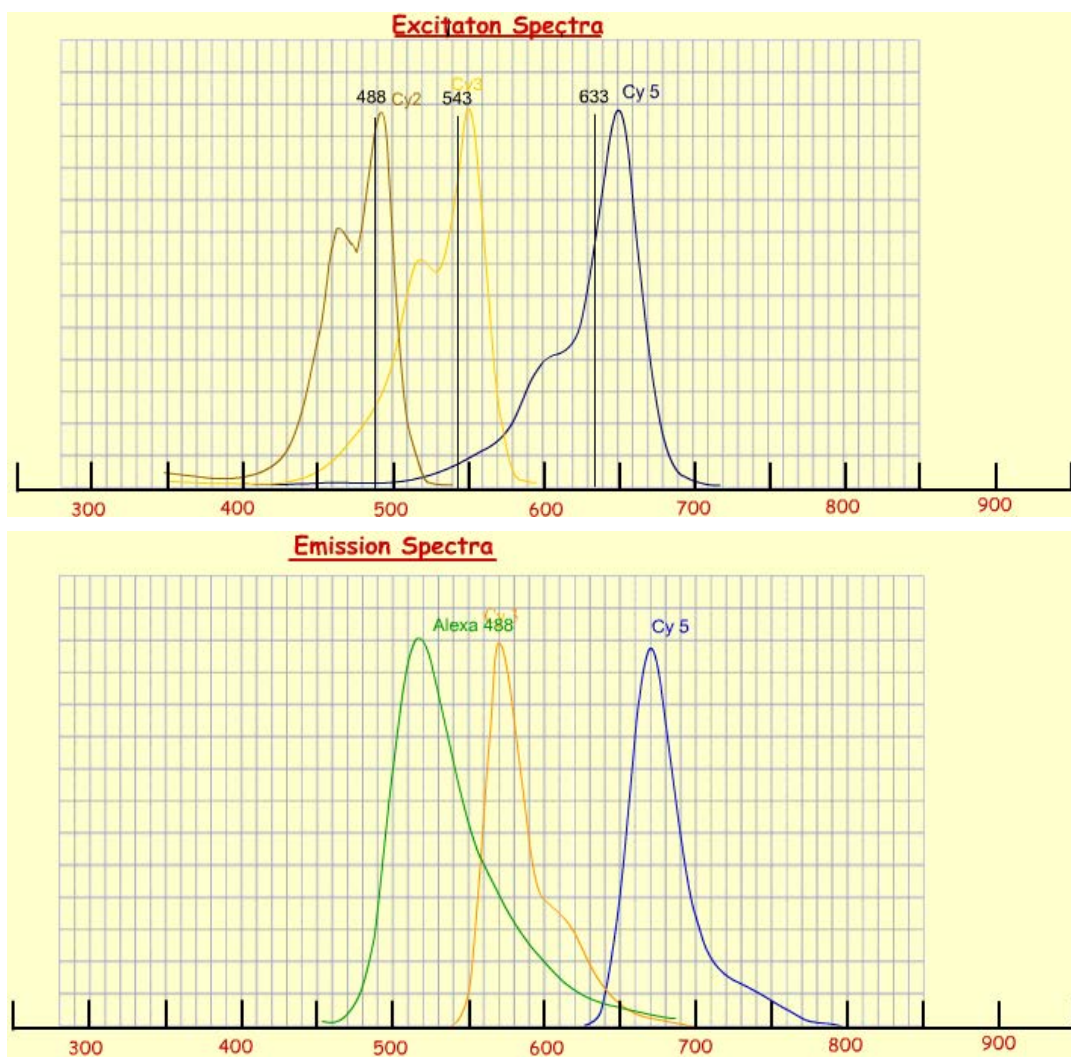


Abbildung 16: Anregungs- und Emissions-Spektrum der verschiedenen Farbstoffe in der Zebrafisch Probe: Alexa Fluor 488, Cy3 und Cy5. In dem oberen Bild werden auch die zum Anregung benutzten Laserlinien gezeigt.

1. Was ist der Vorteil vom Öl-Immersionsobjektiv im Vergleich mit den anderen Objektiven?
2. Stellen Sie Vor- und Nachteile von Lichtmikroskop, LSM, REM und AFM an ausgewählten Parametern tabellarisch zusammen.