

## Elektronenmikroskopische Autoradiogramme: Unterschiedliche Empfindlichkeit von Photoemulsionen gegenüber Tritium

Autoradiography with the Electron Microscope: Differential Sensitivity  
of Photographic Emulsions for Tritium

DIETER F. HÜLSER u. MANFRED F. RAJEWSKY

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung physikalische Biologie, Tübingen

(Z. Naturforsch. 26 b, 125—128 [1971]; eingegangen am 6. Juli 1970)

*Herrn Prof. Dr. FRIEDRICH-FREKSA zum 65. Geburtstag gewidmet*

The sensitivity of the photographic emulsion is an important factor in the resolution of autoradiographs at the electron microscopic level. In a number of recent publications, single hit processes have been considered sufficient for the production of developable latent images by tritium electrons. However, since the absorbed energy required for latent image formation in AgBr crystals of commercially available emulsions is of the order of 800 eV, only low energy tritium electrons (up to 3 keV) will produce latent images by single hit processes in small AgBr crystals of about 400 Å diameter. In emulsions with larger AgBr crystals (about 1000 Å diameter), electrons with an energy of up to about 6 keV can be registered by single hit processes. Evidently, latent image formation may also result from multiple hits by electrons of higher energy. Since the energy absorption required for latent image formation is constant, the sensitivity of photographic emulsions must be considered proportional to the diameter of the respective AgBr crystals, unless methods become available for specific sensitization of emulsions with small AgBr crystals.

In den letzten Jahren wurden in zunehmendem Maße Arbeiten publiziert, die sich mit der Anwendung der Autoradiographie in der Elektromikroskopie befassen. Im Zusammenhang mit dem Auflösungsvermögen elektronenmikroskopischer Autoradiogramme wurde dabei besonders auch die Empfindlichkeit der verwendeten photographischen Emulsionen ausführlich diskutiert<sup>1-11</sup>. Dabei wurden Abschätzungen der zur Erzeugung eines latenden Bild-

keimes notwendigen absorbierten Energie pro AgBr-Korn fast ausschließlich unter Zuhilfenahme der Daten von PELC<sup>12</sup> und PELC et al.<sup>13</sup> durchgeführt und daher stets Eintreffer-Prozesse als ausreichend angesehen, obwohl die genannten Autoren auch die Möglichkeit von Zweitreffern-Prozessen nicht ausgeschlossen hatten.

Die Angaben über die Höhe der benötigten Energie bei Photonenbelichtung schwanken mit den An-

Sonderdruckanforderungen an Dr. D. F. HÜLSER, MPI f. Virusforschung, Abt. physiol. Biologie, D-7400 Tübingen, Spemannstraße.

<sup>1</sup> L. BACHMANN u. M. M. SALPETER, *Lab. Invest.* 14, 303 [1965].

<sup>2</sup> L. BACHMANN u. M. M. SALPETER, *J. Cell Biol.* 33, 299 [1967].

<sup>3</sup> L. BACHMANN, M. M. SALPETER u. E. E. SALPETER, *Histochemie* 15, 234 [1968].

<sup>4</sup> L. G. CARO, *J. Cell Biol.* 15, 189 [1962].

<sup>5</sup> L. G. CARO u. M. SCHNÖS, *Science* 149, 60 [1965].

<sup>6</sup> H. G. FROMME, *Acta histochem.* [Jena] 33, 135 [1969].

<sup>7</sup> D. F. HÜLSER u. M. F. RAJEWSKY, *Biophysik* 3, 123 [1966].

<sup>8</sup> D. F. HÜLSER u. M. F. RAJEWSKY, in: *Methods in Cell Physiology* III, p. 293. Ed.: D. M. PRESCOTT, Academic Press, New York, London 1968.

<sup>9</sup> D. NEUMANN, *Acta histochem.* [Jena] 33, Teil I: 191, Teil II: 217 [1969].

<sup>10</sup> M. M. SALPETER u. L. BACHMANN, *J. Cell Biol.* 22, 469 [1964].

<sup>11</sup> M. M. SALPETER, L. BACHMANN u. E. E. SALPETER, *J. Cell Biol.* 41, 1 [1969].

<sup>12</sup> S. R. PELC, *J. Roy. Microscop. Soc.* 81, 131 [1963].

<sup>13</sup> S. R. PELC, J. D. COOMBES u. G. U. BUDD, *Exp. Cell Res.* 24, 192 [1961].

nahmen, die bezüglich der zur Erzeugung eines entwickelbaren latenten Bildkeimes benötigten minimalen Anzahl von Ag-Atomen gemacht werden. Hinzu kommt, daß nicht alle auf die Emulsion auftreffenden Photonen unbedingt an diesem sogenannten „Elementarprozeß“ teilnehmen müssen<sup>14</sup>, sondern entweder gestreut oder in Wärme umgewandelt werden können. Ein einziges Ag-Atom kann schon von einem Photon mit der Energie von 2,8 eV ( $\lambda$  ca. 4000 Å) freigesetzt werden<sup>15</sup>. Bei AgBr-Kristallen werden einem entwickelbaren latenten Bildkeim mindestens 3 Ag-Atome<sup>14,16</sup> zugeordnet. Häufig werden jedoch etwa 10–12 Ag-Atome pro latentem Bildkeim gerechnet<sup>12,17</sup>, so daß sich für seine Entstehung dann eine absorbierte Energie von etwa 35 eV ergibt.

Es besteht Grund zu der Annahme, daß die zur Entstehung eines latenten Bildkeimes nötige Energieabsorption nicht unverändert bleibt, wenn die Photoemulsion anstelle von Photonen mit energiereichen Partikeln bestrahlt wird. Wir haben daher Daten aus der Literatur und aus eigenen Experimenten zusammengestellt, die diese Annahme stützen und darüber hinaus zeigen, daß der Energiebedarf bei feinkristallinen Emulsionen u. U. so hoch werden kann, daß er nur durch Mehrtreffer-Prozesse zu decken ist. Damit ist eine Unterscheidung zwischen Eintreffer- und Mehrtreffer-Prozessen von Bedeutung, wenn die Empfindlichkeit und damit auch das Auflösungsvermögen photographischer Emulsionen diskutiert werden soll.

MALINOVSKI et al.<sup>17</sup> haben für Röntgenstrahlen gezeigt, daß mehrere 100 eV absorbierter Energie erforderlich sind, um in AgBr-Kristallen einen entwickelbaren latenten Bildkeim zu erzeugen. Dabei soll jedoch nur ein geringer Teil dieser absorbierten Energie – etwa 10–25% – zur Erzeugung des latenten Bildkeimes tatsächlich nötig sein. Die Verfasser geben weiter an, daß von der Arbeitsgruppe BOGOMOLOV bei Exposition mit langsamen Elektronen ebenfalls eine absorbierte Gesamtenergie von mehreren 100 eV gefunden wurde. Nach ANGERER und JOOS<sup>15</sup> gehen bei Röntgenstrahlen etwa 90% der absorbierten (kinetischen) Energie als Wärme

verloren und tragen somit nicht zur Bildung von latenten Bildkeimen bei.

Wie wir gezeigt haben<sup>7,8</sup>, können monoenergetische Elektronen einer Energie von 5,7 keV (= mittlere Energie von Tritium) nur in Emulsionen, deren AgBr-Kristalldurchmesser größer ist als 1000 Å (z. B. Ilford L4), durch einen Eintrefferprozeß ein entwickelbares latentes Bild erzeugen. Solche AgBr-Kristalle absorbieren dabei im Durchschnitt etwa 800 eV, wenn sie von einem Elektron der Energie 5,7 keV durchlaufen werden. Emulsionen mit kleineren AgBr-Kristallen benötigen dagegen mehrere Treffer dieser 5,7 keV-Elektronen, um ein entwickelbares latentes Bild zu erzeugen (z. B. Gevaert NUC 307 ca. 2 Elektronen, Kodak NTE ca. 4 Elektronen, AgBr-Kristalldurchmesser in beiden untersuchten Chargen ca. 400 Å). Eine Abschätzung ergab, daß bei der Emulsion Gevaert NUC 307 ebenfalls etwa 800 eV pro AgBr-Kristall und in der Emulsion Kodak NTE etwa 1300 eV pro AgBr-Kristall absorbiert werden müssen, bevor ein entwickelbarer latenter Bildkeim entsteht. BACHMANN und SALPETER<sup>2</sup> geben an, daß die Kodak-NTE-Emulsion in ihrer Empfindlichkeit von Charge zu Charge schwanken kann. Unterstellt man, daß von uns eine relativ unempfindliche Charge der Emulsion untersucht wurde, die Empfindlichkeit der Emulsion jedoch im allgemeinen höher ist, dann ergibt sich, daß die zur Erzeugung eines latenten Bildkeimes nötige absorbierte Energie auch bei der Kodak-NTE-Emulsion in der Größenordnung von 800 eV liegen könnte.

Tritium, das für die elektronenoptische Autoradiographie meistbenutzte Radionuklid, besitzt ein Energiespektrum von 0 bis 18 keV. Langsame Elektronen haben eine höhere Ionisationsdichte als schnelle Elektronen. Daher ist klar, daß bei Durchgang eines langsamen Elektrons, d. h. eines Elektrons aus dem niederenergetischen Bereich des Spektrums, auch in einem kleinen AgBr-Kristall die notwendige Energie von etwa 800 eV absorbiert werden kann. Wenn es gelingt, die experimentellen Bedingungen so zu wählen, daß z. B. kleine AgBr-Kristalle (ca. 400 Å  $\phi$ ) mit hoher Wahrscheinlichkeit

<sup>14</sup> H. DETERMANN, M. OTT u. H. WOLTER, *Optica Acta* **11**, 223 [1964].

<sup>15</sup> E. v. ANGERER u. G. JOOS, *Wissenschaftliche Photographie*, Akad. Verlagsges. Geest & Portig, Leipzig 1959.

<sup>16</sup> G. JOOS u. E. SCHOPPER, *Grundriß der Photographie und ihre Anwendungen besonders in der Atomphysik*, Akad. Verlagsges. Frankfurt/Main 1958.

<sup>17</sup> I. MALINOVSKI, M. TODOROVA u. M. DJAMBAZOVA, in: *Photographie Corpusculaire III*, Ed. PIERRE DEMERS, Les Presses Universitaires de Montréal 1964.

nur von einem Elektron getroffen werden, so kann nur in etwa 20% der getroffenen AgBr-Kristalle ein entwickelbarer latenter Bildkeim erzeugt werden. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß nur 22% der von Tritium emittierten Elektronen in dem niedrigen Energiebereich von 0 bis 3 keV liegen<sup>18</sup> und damit die nötige Ionisationsdichte besitzen, um in AgBr-Kristallen von einem Durchmesser um 400 Å entwickelbare latente Bildkeime zu erzeugen. Gerade dies wurde durch Experimente von BACHMANN und SALPETER<sup>2</sup> (s. insbesondere l. c.<sup>11</sup>, Fußnote 2) bestätigt, die ergaben, daß bei der Kodak-NTE-Emulsion nach einem Eintrefferprozeß nur etwa 20% der getroffenen AgBr-Kristalle entwickelbar waren. Dieser Befund bestätigt darüber hinaus die Richtigkeit der Annahme, daß zur Erzeugung eines entwickelbaren latenten Bildkeimes eine Energie von etwa 800 eV absorbiert werden muß. Eine Proportionalität zwischen der Empfindlichkeit und dem Durchmesser der AgBr-Kristalle bei den Emulsionen Ilford L4 und Gevaert NUC 307 wurde auch von VRENSSEN<sup>19</sup> gezeigt. Das ermittelte Empfindlichkeitsverhältnis (Ilford: Gevaert  $\approx 2,5$ ) läßt sich auch aus der unterschiedlichen Energieabsorption der AgBr-Kristalle dieser beiden Emulsionen ableiten.

Voraussetzung für die Erzeugung eines entwickelbaren latenten Bildkeimes in AgBr-Kristallen unterschiedlicher Größe ist das Erreichen eines Schwellenwertes für die absorbierte Energie. Für niederenergetische Elektronen scheint diese bei einem Wert von etwa 800 eV zu liegen. Damit ist nicht ausgesagt, daß in diesem Falle die gesamte absorbierte Energie ausschließlich der Entstehung eines latenten Bildkeimes dient, sondern es kann angenommen werden, daß auch hier der größte Teil der absorbierten Energie nach Umwandlung in Wärme verloren geht.

Bei länger dauernder Exposition einer photographischen Emulsion nimmt die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung entwickelbarer latenter Bilder infolge von Mehrfach-Treffern zu. BACHMANN und SALPETER<sup>1, 2, 10</sup> haben in früheren Arbeiten deutlich gezeigt, daß die zur Erzeugung eines entwickelbaren latenten Bildkeimes nötige Energie durch Mehrfach-Treffer akkumuliert werden kann. Die Autoren konnten bei gleicher Emul-

sion, Emulsionsschichtdicke und Expositionsdauer durch eine der Entwicklung vorgeschaltete „Goldlatensifikation“ die Ausbeute an entwickelten Körnern um mindestens den Faktor 3 steigern. (Unter „Goldlatensifikation“ versteht man eine Ablagerung von Au an metallischem Ag bevor diese „Bildkeime“ in der herkömmlichen Art entwickelt werden.) Diese Befunde können mit der Existenz von sogenannten Subkeimen<sup>15, 16</sup> bei der Entstehung des latenten Bildes erklärt werden. Man kann annehmen, daß in diesen Fällen zwar mehrere AgBr-Kristalle von einem oder mehreren Elektronen getroffen wurden, aber nur wenige von ihnen die zur Erzeugung eines entwickelbaren latenten Bildkeimes nötige Energie absorbiert haben.

Die übrigen getroffenen AgBr-Kristalle haben entweder stabile oder instabile, nicht entwickelbare Vorkeime gebildet. Durch die Anwendung der „Goldlatensifikation“ werden stabile Vorkeime in entwickelbare latente Bildkeime umgewandelt. Die Tatsache, daß die „Goldlatensifikation“ eine mindestens verdreifachte Ausbeute an entwickelten Körnern ergibt<sup>1, 2, 10</sup>, zeigt, daß mehr AgBr-Kristalle getroffen worden sind und diese Treffer auch registriert haben, als durch eine Entwicklung ohne vorherige „Goldlatensifikation“ angezeigt wird.

Nach dem bisher Gesagten lassen sich zwei Möglichkeiten angeben, die Empfindlichkeit einer Emulsion für den Tritiumnachweis zu definieren:

1. Die Empfindlichkeit einer Emulsion ist um so höher, je größer der Anteil an Elektronen aus dem Tritiumspektrum ist, der durch einen Eintreffer-Prozeß nachgewiesen wird.
2. Die Empfindlichkeit einer Emulsion ist um so höher, je geringer die zur Erzeugung eines entwickelbaren latenten Bildkeimes notwendige absorbierte Energie ist.

Zur Zeit kommt nur der ersten Definition praktische Bedeutung zu, da die benötigte absorbierte Energie bei den für die elektronenmikroskopische Autoradiographie heute handelsüblichen Emulsionen etwa gleich groß zu sein scheint. Solange es nicht gelingt, auch diese feinkörnigen Emulsionen speziell zu sensibilisieren, ist die Empfindlichkeit von der Größe der AgBr-Kristalle abhängig: Emulsionen mit größeren AgBr-Kristalldurchmessern registrie-

<sup>18</sup> R. P. PERRY, in: *Methods in Cell Physiology* I, p. 304. Ed. D. M. PRESCOTT, Academic Press, New York, London 1964.

<sup>19</sup> G. F. J. M. VRENSSEN, *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 278 [1970].

ren einen größeren Anteil der Elektronen aus dem Tritiumspektrum durch einen Eintreffer-Prozeß als Emulsionen mit kleinem AgBr-Kristalldurchmesser. Wie bereits erwähnt, liegt dieser Anteil für die Emulsion Kodak NTE bei etwa 20 Prozent. Für die Emulsion Ilford L 4 berechnet man ca. 50% und für die von uns untersuchte Charge der Emulsion Gevaert NUC 307 liegt dieser Anteil ebenfalls bei etwa 20 Prozent. Diese Abhängigkeit der Empfindlichkeit von dem AgBr-Kristalldurchmesser ist bei Abschätzungen des Auflösungsvermögens zu berücksichtigen.

Bei Autoradiogrammen biologischer Präparate liegen nie „Punktquellen“ vor, sondern nur mehr oder weniger große markierte Flächen. Benötigt ein AgBr-Korn mehrere Elektronen zur Erzeugung eines entwickelbaren latenten Bildes, dann muß der Einzugsbereich dieser Elektronen mit in Rechnung gestellt werden. Dieser Einzugsbereich bedingt, daß bei unempfindlichen, feinkristallinen Emulsionen unter Umständen Elektronen aus verschiedenen Richtungen zur Erzeugung des latenten Bildkeimes

beigetragen haben. Damit ist aber für das einzelne entwickelte Korn der feinkristallinen, unempfindlichen Emulsion keine bessere Zuordnung möglich, als für das einzelne entwickelte Korn einer grobkristallinen aber empfindlichen Emulsion. Denn mit der für die letzteren Emulsionen wesentlich kürzeren minimalen Expositionszeit verringert sich auch die Wahrscheinlichkeit für Treffer von Elektronen, die nicht in unmittelbarer Nähe des AgBr-Kristalls emittiert wurden. „Linienquellen“, wie z. B. markierte Membranen, kann man durch Mehrtreffer-Prozesse dagegen besser auflösen als durch Eintreffer-Prozesse, da es nur um die Darstellung der markierten Linie geht und nicht um die Quelle des einzelnen emittierten Elektrons.

Manche Unstimmigkeiten bei der Auswertung verschiedener, mit Emulsionen des gleichen Typs durchgeführter Experimente<sup>3-5, 11</sup> können vermieden werden, wenn bei der Analyse des Auflösungsvermögens neben dem Energiespektrum von Tritium auch die unterschiedlichen Anteile an Eintreffer-Prozessen berücksichtigt werden.