

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Wissenschaftlicher Film C 1192/1976

**Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden
Kontrastierung durch Metall-Schrägbedampfung**

Begleitveröffentlichung von

Dr. E. SPIESS und Prof. Dr. F. MAYER, Göttingen

Mit 1 Abbildung

GÖTTINGEN 1976

Film C 1192

Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Kontrastierung durch Metall-Schrägbedampfung

E. SPIESS und F. MAYER, Göttingen

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Die Erforschung von Struktur und Funktion der Lebewesen und ihrer Komponenten bis hinunter in den molekularen Bereich erfordert eine Vielzahl spezialisierter Analysemethoden aus Chemie, Physik, Biologie, Biochemie, Genetik und anderen Wissenschaften. Der Beitrag, den die Elektronenmikroskopie geleistet hat und mit klassischen und modernsten Methoden auch weiterhin leistet, ist nicht mehr wegzudenken. Häufig ist sie das einzige Verfahren, um eine Reihe von Einzelbefunden aus anderen Untersuchungen wirklich zu verstehen, denn nur sie ist in der Lage, feinste Strukturdetails der Organismen, an denen die Befunde erstellt wurden, anschaulich zu zeigen. Man muß sich allerdings im klaren darüber sein, daß auch die Elektronenmikroskopie — und sie sogar besonders — mit dem Auftreten einer ganzen Reihe von Artefakten rechnen muß, die oft die Aussagekraft stark einschränken.

Ein elektronenmikroskopischer Befund ist nur so gut wie das untersuchte Präparat. Da biologische Objekte in der Regel sehr wasserreich sind, die Beobachtung jedoch im Hochvakuum erfolgt, ist die Voraussetzung für eine aussagekräftige Untersuchung die Präparation unter möglichst guter Strukturhaltung. Da zudem beim Einsatz der Hellfeld-Transmissionselektronenmikroskopie der Eigenkontrast der untersuchten biologischen Objekte meist nicht zur Beobachtung ausreicht, müssen Kontrastierungen durch Einbringen von Schwermetallen durch-

¹ Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 9.

geführt werden. Fixation und Kontrastierung sind deshalb neben der Probenvorbereitung und der Herstellung geeigneter Objektträger zwei der wesentlichsten Schritte bei der Präparation biologischer Objekte. Die Filmreihe „Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden“ versucht, einige der heute üblichen Präparationsverfahren in der biologischen Elektronenmikroskopie anschaulich wiederzugeben. Die Reihe enthält folgende Filme:

- Herstellung einer Kunststoffträgerfolie
- Herstellung einer Kohleträgerfolie
- Kontrastierung durch Metall-Schrägbedampfung
- Negativkontrastierung
- Spreitungstechnik zur Präparation isolierter DNA
- Gefrierätzung.

Einleitung

Schrägbedampfungen werden bei biologischen Objekten zur direkten oder indirekten Abbildung von Oberflächenstrukturen und zur Bestimmung der 3. Dimension der Objekte verwendet.

Durch die Schrägbedampfung wird eine Beschattung des Objektes erreicht, die auch die feinsten Details der Objektoberfläche wiedergeben soll. Schichtdickenunterschiede des aufgedampften Materials, durch die Beschattung erzeugt, ergeben den Kontrast. Als Kontrastmittel sind Materialien mit hoher Dichte geeignet, da sie den Elektronenstrahl stark streuen.

Das Auflösungsvermögen der Methode wird durch die Schichtdicke und am wesentlichsten durch die Eigenstruktur des aufgedampften Kontrastmittels bestimmt. Es wird deshalb angestrebt, möglichst dünne, feinkristalline oder amorphe Schichten zu erzeugen. Die Schichtdicke soll weit unter 5 nm liegen. Die durch das Material bedingte Auflösungsgrenze liegt dann, je nach verwendetem Material, zwischen 1 und 9 nm. Höhenbestimmungen an Objekten haben aus Gründen der Bedampfungsgeometrie und der Schichtdicke bei etwa 10 nm ihre Untergrenze.

Eigenschaften von Beschattungsfilmen

Die folgende Aufstellung gibt eine Übersicht der wichtigsten Bedampfungsmaterialien und ihrer Eigenschaften.

Material	Cr	Au	Pd	Pt	Mo	Ir	Ta	W	C
Dichte g/cm ³	6,9	19,3	11,4	21,4	10,2	22,4	16,6	19,3	~ 2
Schmelzpunkt bei 1 at, °C	1900	1063	1555	1774	2622	2454	2996	3382	> 3700

Ein Beschattungsfilm ist um so feinkörniger, je höher der Schmelzpunkt des verdampften Materials liegt. Ein Nachteil der höchstschmelzenden Materialien ist die auftretende hohe Wärmebelastung des Präparats, die zu Artefakten führen kann.

Pt, bzw. Legierungen von Pt/Pd und Pd/Ir ergeben relativ grobe, aber noch brauchbare Schichten, die chemisch sehr stabil sind. Verdampft man Pt, bzw. die angeführten Legierungen zusammen mit Kohle, so wird die Schicht wesentlich feinkörniger als bei der reinen Metallverdampfung, da bei der Schichtentstehung die Beweglichkeit der Metallatome geringer geworden ist. Es ist jedoch schwierig, das richtige Mischungsverhältnis zwischen Metall und Kohle zu treffen, bzw. es zu reproduzieren.

Schichten aus den hochschmelzenden Kontrastmitteln wie Ir, Ta und W sind wesentlich feinkörniger, jedoch, soweit es sich nicht um Edelmetall handelt, chemisch wenig stabil; W-Schichten sind sogar wasserempfindlich.

Zur Entstehung des Bedampfungsfilms

Die nach der Verdampfung auf das Präparat auftreffenden Atome des Kontrastmittels wandern zunächst auf der Präparatoberfläche. Treffen mehrere Atome zusammen, so entsteht über einen Keim ein Kristallit. Die Verteilung dieser Kristallite ist statistisch, ihre Form typisch für die verdampfte Substanz. Beides zusammen ergibt die Eigenstruktur der aufgedampften Schicht. Dekorationseffekte können die statistische Verteilung der Kristallite stören.

Beschattungsverfahren

1. Widerstandsverdampfung.

Die Widerstandsverdampfung ist wegen ihrer Einfachheit das gebräuchlichste Bedampfungsverfahren.

Das zu verdampfende Metall wird auf einen hochschmelzenden Träger aufgewickelt oder in Schiffchen aus solchem Material eingelegt. Bei Spannungen zwischen 5 und 20 Volt und Stromstärken bis 200 Ampère wird der selbst nicht verdampfende Träger aufgeheizt und solange beheizt, bis das Verdampfungsgut vollkommen verdampft ist.

Der Druck in der Hochvakuumanlage sollte während der Bedampfung besser als 10^{-4} Torr sein.

Die Verdampfungsquelle soll nahezu punktförmig sein. Man kann dies erreichen, indem man dem Träger eine geeignete Form gibt, eine Blende direkt vor die Verdampfungsquelle setzt oder den Abstand zwischen Verdampfungsquelle und zu bedampfender Fläche auf über 15 cm ausdehnt.

Da eine Widerstandsverdampfung von Ir, Ta, Mo und W zu einer zu hohen Temperaturbelastung der Präparate führen würde, ist sie nur mit Cr, Au, Pd und Pt sowie den Legierungen von Pt/Pd und Pt/Ir durchführbar.

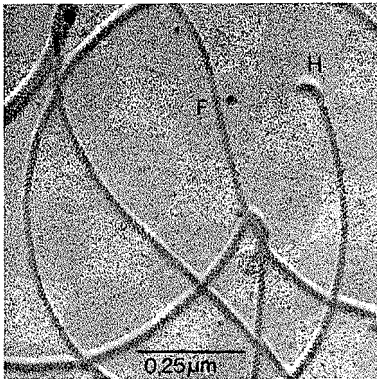
2. Elektronenstrahlverdampfung.

Sie ist technisch aufwendiger als die Widerstandsverdampfung und wird deshalb in der Regel nur verwendet, wenn die höchstschmelzenden Metalle zur Beschattung benötigt werden.

Das zu verdampfende Metall wird als Anode eines Diodensystems geschaltet. Durch punktförmigen Elektronenbeschuß wird das Anodenmaterial so aufgeheizt, daß es verdampft.

Der Bedampfungswinkel

Der Bedampfungswinkel richtet sich nach der Höhe der abzubildenden Strukturen. Er kann zwischen 5 und 50 Grad variiert werden. Je niedriger ein Objekt ist, desto flacher ist der Bedampfungswinkel zu wählen, um einen ausreichend breiten oder langen Schatten zu erzielen.



Metall-Schrägbedampfung isolierter Geißeln des Bodenbakteriums *Rhizobium lupini*. Die Ansatzregion einer Geißel (H, „Hook“) und der schraubige Feinbau der Geißelfilamente (F) sind deutlich zu erkennen.

Aus: R. SCHMITT, I. BAMBERGER, G. ACKER und F. MAYER, Arch. Mikrobiol. 100, (1974), 145.

Die Schichtdickenkontrolle

Da die Dicke der aufgedampften Schicht bedeutsam für Kontrastverhältnisse und Auflösungsvermögen der Methode ist, wird ihre Zunahme während der Bedampfung kontrolliert. Dies kann nach folgenden Verfahren geschehen: 1. Messung mit einem Schwingquarz, 2. Kontrolle von Bedampfungszeit und -strom, 3. Limitierung der Menge des Bedampfungsgutes, 4. durch Interferenzfarben, die auf einer Goldfolie während der Bedampfung entstehen.

Die Bestimmung der 3. Dimension von Objekten

Die Bestimmung der Objekthöhe ist nach der folgenden Formel möglich:

$$h = l \times \operatorname{tg}(90 - \beta)$$

(h = gesuchte Objekthöhe, l = Schattenlänge, β = Bedampfungswinkel)

Zwei Gründe machen solche Bestimmungen aber sehr problematisch:

1. Die Bestimmung der Schattengrenzen kann schwierig sein,
2. da der Trägerfilm nicht absolut eben ist, kann der Bedampfungswinkel nicht über das ganze Präparat hinweg konstant sein.

Auf die untere Meßgrenze wurde in der Einleitung schon hingewiesen.

Erläuterungen zum Film¹

Schrägbedampfung mit Metallen zur Kontrastierung von Untersuchungsobjekten sind wichtige Verfahren bei der Untersuchung quantitativer und qualitativer Parameter biologischer Strukturen.

Von einer Reihe möglicher Verfahren zur Präparation der zu untersuchenden Objekte wird die Adsorptionmethode demonstriert.

Die Objektsuspension und Wasser als Waschflüssigkeit werden in kleine Kunststoffgefäße gefüllt.

Als elektronenmikroskopischer Objektträger dient ein Kohlefilm, der im Hochvakuum auf eine Glimmerplatte aufgedampft wurde.

Mit der in Petroläther gereinigten Pinzette wird das vorgeschchnittene Glimmerstück abgebrochen.

Beim Eintauchen in die Objektsuspension löst sich der Kohlefilm vom Glimmer und schwimmt auf der Oberfläche. Aus der Suspension diffundiert Untersuchungsmaterial an die Unterseite des Kohlefilms und wird adsorbiert. Im Wasser werden anschließend die löslichen Bestandteile aus der Objektsuspension, die sich zwischen Glimmer und Kohlefilm befinden, ausgewaschen.

Der Kohlefilm wird nun mit einem engmaschigen Objektträgernetz belegt.

Das Trägernetz wird festgedrückt, überstehender Kohlefilm abgestoßen, — schließlich das Präparat zur Seite weggenommen und umgedreht, so daß die Untersuchungsobjekte nun auf der Oberseite liegen.

Das Präparat wird getrocknet und dann in einer Petrischale verwahrt.

Auf diese Weise werden mehrere Präparate hergestellt.

Die Schrägbedampfung muß in einer Hochvakuum-Bedampfungsanlage ausgeführt werden. Rechts: Der Pumpstand mit dem darauf montierten Glasrezipienten; daneben: Der Transformator und ein Kühlgerät für den Pumpstand.

In den Metallverdampfer wird das Verdampfungsgut eingebracht: Auf ein Wolframstäbchen, das die Elektroden verbindet, ist der zu verdampfende Platindraht aufgewickelt. Seine Menge ist auf den Abstand zwischen Ver-

¹ Wortlaut des gesprochenen Kommentars.

dampfungsquelle und Präparaten sowie auf den Bedampfungswinkel abzustimmen.

Die Schutzkappe wird über den Verdampfer gestülpt.

An den belüfteten Rezipienten wird der Verdampfer am unteren Arm angeflanscht.

Der Verdampfer wird an den Transformator, der den für die Verdampfung des Platins notwendigen Strom liefert, angeschlossen.

Präparate werden auf einen Träger montiert.

Durch zwei Federklauen kann jedes Präparat auf der Unterlage festgehalten werden.

Der Träger mit den Präparaten wird im Manipulator befestigt: Diese Vorrichtung ermöglicht die Orientierung der Präparate zur Verdampfungsquelle im Rezipienten.

Der Manipulator wird am Rezipienten angeflanscht.

Das Zentrum des Präparatträgers wird auf das Zentrum der Verdampferquelle justiert. Die Objektträgerfläche steht zunächst senkrecht über der Verdampferquelle und wird dann um den gewünschten Bedampfungswinkel gekippt.

Der Winkelbetrag muß in Abhängigkeit von der Höhe der Objekte zwischen 5° und 50° variiert werden.

Der Rezipient wird auf ein Vakuum von 10^{-5} Torr evakuiert. Dieser Druck wird hier auf der mittleren Skala angezeigt.

Nun kann die Bedampfung ausgeführt werden. Durch Strom wird der Wolframstab aufgeheizt, das Platin schmilzt und verdampft. Ein Teil trifft unter dem Bedampfungswinkel auf die Präparate, kondensiert und erzeugt Schatten bei Objektstrukturen, die quer zur Bedampfungsrichtung liegen.

Dem wieder belüfteten Rezipienten wird der Manipulator entnommen.

Die Präparate werden aus der Haltevorrichtung entfernt und bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung staubfrei verwahrt.

Dieses elektronenoptische Bild zeigt isolierte Geißeln des Bakteriums *Rhizobium lupini* nach einer Schrägbedampfung mit Platin. Helle Schatten hinter den Geißeln treten dort auf, wo diese etwa quer zur Bedampfungsrichtung liegen. An Geißelabschnitten, die in Richtung der Bedampfung liegen, ist die Substruktur der Geißeln, eine periodische Schrägstreifung, zu erkennen. Der tatsächliche Geißeldurchmesser beträgt etwa 16 nm

Literatur

- [1] BRADLEY, D. E.: Replica and Shadowing Techniques. In: KAY, D. (ed.) Techniques for Electron Microscopy, Blackwell Scientific Publ., Oxford 1967, 96—152.
- [2] HAYEK, K.: Hochauflösende Beschattung. In: SCHIMMEL, G., und W. VOGEL (eds.): Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1973, 3.1.2.5.
- [3] REIMER, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1967.

Anschrift der Verfasser:

Dr. E. SPIESS, Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen, Abteilung Mikromorphologie, Grisebachstr. 8, D-3400 Göttingen.

Prof. Dr. F. MAYER, Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen, Abteilung Mikromorphologie, Grisebachstr. 8, D-3400 Göttingen.

Angaben zum Film

Der Film wurde 1976 veröffentlicht und ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Tonfilm, 16 mm, farbig, 71 m, 6½ min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1975. Veröffentlichung aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen, Abteilung Mikromorphologie, Dr. E. SPIESS, Prof. Dr. F. MAYER, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. H.-K. GALLE; Aufnahme: H. WITTMANN, J. WEISS; Schnitt: H. WITTMANN.

Inhalt des Films

Der Film zeigt die Herstellung eines biologischen Präparates nach der Adsorptionsmethode. Das Objekt wird durch Metallschrägbedampfung kontrastiert: Das Vorbereiten der Bedampfungsanlage (Leybold-Heraeus EPA 100) und der Bedampfungsvorgang werden vorgeführt. Als Ergebnis wird das elektronenmikroskopische Bild von Geißeln des Bakteriums *Rhizobium lupini* nach Metallschrägbedampfung gezeigt.

Summary of the Film

This film sequence describes the preparation of a biological specimen for shadow casting using the "adsorption" method. The preliminary steps within the high vacuum evaporation plant (Leybold-Heraeus EPA 100) and the coating process itself are demonstrated. As a result of shadow casting, the electron micrography of flagella of the bacterium *Rhizobium lupini* is shown.

Résumé du Film

Ce film présente la préparation d'un spécimen biologique d'après la méthode d'adsorption. Nous y voyons tout d'abord la préparation de l'appareil d'évaporation, puis la réalisation de l'évaporation proprement dite, enfin le résultat de cette expérience sous forme d'une micrographie électronique représentant de flagelles de la bactérie *Rhizobium lupini*.