

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Wissenschaftlicher Film C 1194/1976

**Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden
Gefrierätzung**

Begleitveröffentlichung von

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

Mit 1 Abbildung

GÖTTINGEN 1976

Film C 1194

Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Gefrierätzung

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 durchgeführt werden. Fixation und Kontrastierung sind deshalb neben der Probenvorbereitung und der Herstellung geeigneter Objektträger zwei der wesentlichsten Schritte bei der Präparation biologischer Objekte.

¹ Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 15 u. 16.

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.

Zur Entstehung der Methode Gefrierätzung

Die Untersuchung der Ultrastruktur von Organismen im Elektronenmikroskop erfordert eine Fixierung und Entwässerung und oberhalb einer bestimmten Dimensionsgrenze auch eine Zerlegung der Untersuchungsobjekte.

Bei der für die Ultramikrotomie notwendigen chemischen Fixierung, der Entwässerung durch organische Lösungsmittel, der Einbettung in den schneidbaren Kunststoff und bei der Ultramikrotomie selbst kommt es zu Artefakten, deren Ausmaß nur schwer abzuschätzen und zu beurteilen ist.

Bei der Suche nach Methoden zur Lösung dieser Artefaktprobleme stieß STEERE auf die Gefrierätzung (HALL [2]): Die Information über das Objekt wird nach einem Bruch und einem Sublimationsprozeß, die das Innere des Objekts freilegen, über einen kontrastreichen Abdruck (Replica) von dem Bruch- und Ätzprofil gewonnen. STEERE [8] adaptierte die Methode an biologische Objekte: Durch Schockgefrieren, eine physikalische Fixierung, werden die Objekte in den Zustand latenten Lebens überführt; dann wird die Information über die Ultrastruktur nach der beschriebenen Methode gewonnen. Er hatte aber zunächst wenig Erfolg. Von MOOR und Mitarbeitern (MOOR et al. [3], MOOR [4]) wurde die Methode zur Laboratoriumsreife entwickelt und so einem großen Kreis von Benutzern und für die unterschiedlichsten Objekte zugänglich gemacht. Eine Verfeinerung erfuhr die Methode, als Vorrichtungen zur Erzeugung korrespondierender Abdrücke (Doppelbruch) entwickelt worden waren (SLEYTR [7], STEERE and MOSELEY [9], WEHRLI et al. [10]).

Grundlagen und Durchführung der Methode

Die Methode der Gefrierätzung gliedert sich in sechs Abschnitte:

1. Die Vorbereitung der Objekte,
2. das Einfrieren der Objekte,

3. das Brechen der Objekte,
4. Das Ätzen der Bruchflächen,
5. die Herstellung des kontrastreichen Abdrucks,
6. das Reinigen des Abdrucks.

1. Die Vorbereitung der Objekte

Das Objekt muß auf ein Volumen von weniger als 1 mm^3 gebracht werden.

Die Frostresistenz des Objekts bedarf in der Regel einer Verbesserung. Dies geschieht durch eine Verminderung des Gehalts an freiem Wasser im Präparat. Diese Verminderung führt zu einer Gefrierpunkterniedrigung bei gleichzeitiger Anhebung der Temperatur des Rekristallisationspunktes der wässrigen Phasen im Objekt. Der Temperaturbereich, in dem eine Kristallbildung dann noch möglich ist, wird dadurch sehr eingeengt. Soweit die Objekte nicht selbst eine Frostresistenz aufbauen können, werden sie mit Frostschutzmitteln wie Glycerin, Äthylenglykol, Dimethylsulfoxyd oder Glukose behandelt. Es ist dabei zu bedenken, daß diese Behandlung zu Adaptionerscheinungen und Artefakten führen kann. Die Vorbereitung pflanzlicher Objekte besteht zusätzlich oft in einer kurzen, schonenden Fixierung durch Glutaraldehyd oder Acrolein, um die Permeabilität der Membranen für das Frostschutzmittel zu erhöhen.

2. Das Einfrieren der Objekte

Zum artefaktfreien Einfrieren der vorbehandelten Objekte sind Abkühlgeschwindigkeiten von rund 100°C/s notwendig. Das ist etwa 100mal langsamer, als es bei unbehandelten nicht frostresistenten Objekten notwendig wäre.

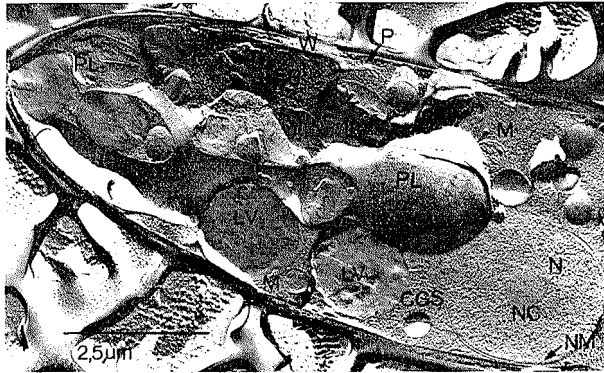
Das Einfrieren muß zu einem glasartigen, amorphen oder zumindest mikrokristallinen Zustand der wässrigen Phasen des Objekts führen. Dieser Vorgang wird als Vitrifikation, der erreichte Zustand als vitrös bezeichnet. Der vitröse Zustand ist über längere Zeit stabil, wenn das Objekt bei Temperaturen unterhalb des Rekristallisationspunktes, der bei etwa -70°C liegt, gehalten wird.

Beim Einfrieren ist das LEIDENFROSTSche Phänomen zu beachten. Um dieses Phänomen zu umgehen, muß sich das Kühlmittel im Zustand des Schmelzens befinden. Die Kühlmittel zeichnen sich durch einen tiefen Schmelzpunkt, eine hohe Wärmeleitfähigkeit und eine hohe spezifische Wärme aus. Gebräuchliche Einfrieremittel sind FREON 22, Isopentan, Propan und Stickstoff. Die ersten drei können durch flüssigen Stickstoff verfestigt werden; Stickstoff selbst kann im Vakuum verfestigt werden.

Vor dem Einfrieren werden die Objekte auf Präparateträger, die meist eine flache Vertiefung zur Aufnahme des Objekts haben, aufgebracht,

und dann mit diesen zusammen eingefroren. Die erreichte Endtemperatur beim Einfrieren hängt vom verwendeten Einfrieremittel ab; sie liegt zwischen -160 und -205°C . Aufbewahrt werden die eingefrorenen Präparate im flüssigen Stickstoff bei rund -190°C .

Zwei andere Verfahren erlauben das Einfrieren der Objekte ohne Vorbehandlung: a) Hoher hydrostatischer Druck (rund 2000 bar) kann das Frostschutzmittel ersetzen (Gefrieren unter hohem Druck, RIEHLE and HOECHLI [6]). Diese Methode setzt aber einen großen technischen Auf-



Grünalgen-Zelle nach Gefrierätzung. Abdruck einer längs angebrochenen Zelle der Grünalge *Ankistrodesmus braunii*, präpariert mit Hilfe der Gefrierätztechnik. Die Zelle erscheint mit dieser Präparationsmethode plastisch und zeigt eine Vielzahl von Organellen

W: Zellwand (mehrschichtig); P: Plasmalemma; N: Zellkern; NC: Nucleolus; NM: Kerndoppelmembran; PL: Chloroplast mit Thylakoiden; M: Mitochondrien; LV: Lipidvakuolen; V: Vakuole; ER: Endoplasmatisches Retikulum; CGS: Cytoplasmatische Grundsubstanz

(Aus: MAYER, F., J. Ultrastruct. Research **23**, (1969), 102)

wand voraus. b) Die Objektsuspension wird mit einem Sprühgerät vernebelt und so in das Einfrieremittel eingeschossen. Das Frostschutzmittel wird dadurch überflüssig. (Sprühgefrieren BACHMANN and SCHMITT-FUMLAN [1].) Diese Methode ist nur bei suspendierbaren Objekten anwendbar.

Es ist das Ziel der physikalischen Fixierung durch Einfrieren, das Objekt in den Zustand des latenten Lebens zu versetzen. Ist dies erreicht, so kann die durch die Gefrierätzmethode gewonnene Information über das Objekt als dem lebenden Zustand entsprechend interpretiert werden. Der Beweis, der zeigt, daß dieser latente Lebenszustand tatsächlich vorlag, ist dann erbracht, wenn es gelingt, ein gleich behandeltes, aber

nicht aufgebrochenes Objekt in den Zustand aktiven Lebens zurückzuführen. Ein solcher Beweis wurde bei Hefezellen von MOOR [5] erbracht.

3. Das Brechen der Objekte

Das Aufbrechen des gefrorenen Präparats muß in der Gefrierätzanlage erfolgen. Es kann nach zwei Methoden vorgenommen werden. a) Beim ursprünglichen Verfahren wird das Objekt mit einem kalten Ultramikrotom zunächst mit groben, dann mit feinen Schnitten bearbeitet; auf diese Weise wird eine Oberfläche freigelegt. Das Präparat befindet sich bei diesem Bruchvorgang in der Regel bei -100°C , das Mikrotom bei -160°C , der Rezipient auf Ätzvakuum. b) In den später entwickelten Doppelbruchverfahren wird ein Doppelpräparat bei Ätzvakuum und -100°C auseinandergebrochen. Es entstehen so zwei korrespondierende Bruchflächen. Um sich entsprechende Punkte auf den beiden Abdrücken orten zu können, müssen ins Präparat Indikatoren eingeführt werden. Man verwendet hierzu entweder aufeinanderjustierte, beim Bruch auseinanderklappende Indikator-Objekträgeretze, oder man mischt dem Objekt in einer geringen Konzentration wesentlich größeres Zellmaterial bei. Es ist zu bedenken, daß die beiden Hälften nur nach dem Bruch, jedoch nicht auch nach der Ätzung vollkommen korrespondierend sein werden, da durch die Ätzung neue Details freigelegt werden können und eine leichte Veränderung der Dimensionsverhältnisse eintritt.

4. Das Ätzen der Bruchflächen

Die beim Aufbrechen entstandenen Flächen geben bereits zahlreiche Details der Ultrastruktur des Objekts wieder. Durch den folgenden Ätzprozeß werden weitere und vor allem feinere Details, die im Eis verborgen waren, freigelegt. Der Ätzprozeß setzt im Moment des Bruches ein.

Physikalisch gesehen ist der Ätzprozeß eine Vakuumsublimation. Die Sublimationsrate ist abhängig von Druck, Temperatur und den Bedingungen des Objekts (Wassergehalt, Diffusionswiderstand). Bei -100°C und zwischen 10^{-5} und 10^{-6} Torr, den üblicherweise angewendeten Ätzbedingungen, werden in einer Minute im Objekt Ätztiefen von etwa 40 bis 50 nm erreicht. Da eine Veränderung der Temperatur um 10°C die Sublimationsrate etwa um den Faktor 10 verändert, ist es erforderlich, die Temperatur während des Ätzprozesses auf etwa $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ konstant zu halten, wenn die Ergebnisse reproduzierbar sein sollen.

Um eine Rückkondensation von Wasserdampf auf die freigelegten Objektflächen zu vermeiden, muß in Objektnähe eine Kühlfalle angebracht sein.

Die Ätzzeiten richten sich nach dem Versuchszweck. Sie liegen zwischen wenigen Sekunden (praktisch keine Ätzung, nur das Bruchprofil wird

abgebildet) und einigen Minuten (Tiefenätzung). Lange Ätzzeiten bergen die Gefahr der Kontamination der freigelegten Flächen durch Kondensation von Wasserdampf oder Treibmitteldämpfen aus den Pumpen. Die Verwendung von Turbomolekularpumpen schließt die letztere Artefaktgefahr aus. Aus dem Ätzvorgang selbst können keine Artefakte entstehen.

5. Die Herstellung des kontrastreichen Abdrucks

Der Ätzprozeß wird durch die Beschattung des entstandenen Reliefs beendet. Diese Beschattung ist eine Schrägbedampfung unter einem Winkel von gewöhnlich 45° , die ein detailgenaues Bild des Bruch — und Ätzreliefs wiedergeben soll. Dies kann erreicht werden, wenn sich das zu verdampfende Material amorph niederschlagen läßt. Die besten Ergebnisse sind mit Mischbedampfungen von Platin-Iridium-Legierung und Graphit zu erzielen. Die durch die Bedampfung gegebene Auflösungsgrenze der Methode liegt bei etwa 3 nm.

Eine weite Bedampfung wird ausschließlich mit Graphit als Kegelbedampfung ausgeführt. Sie dient der Stabilisierung des ersten Abdrucks.

Bei den Bedampfungen kann es durch Aufheizen des Präparats zu Artefakten kommen. Ein Anstieg der Präparattemperatur um etwa 30°C würde wegen der eintretenden starken Sublimation die Kondensation des aufzudampfenden Materials unmöglich machen. Ein Mindestabstand von 15 cm zwischen Verdampfer und Präparat ist empfehlenswert, um diese Artefakte auszuschließen.

6. Das Reinigen des Abdrucks

Abdruck und Präparat werden durch Abflottieren des ersteren auf Wasser voneinander getrennt. Die dann noch am Abdruck haftenden Objektreste werden durch aggressive Agenzien abgelöst. Man verwendet 70%ige Schwefelsäure und Chlorbleichlauge oder 40%ige Chromsäure. Eine mildere, aber langwierigere Methode ist der Abbau der organischen Reste durch Enzyme. Organische Lösungsmittel sind als Reinigungsmittel bei Objekten mit hohem Lipidgehalt geeignet.

Die Reinigungsmittel dürfen weder Schrumpfungen der Abdrücke verursachen, noch zur Auflösung der Kontrastmittel führen.

Die gereinigten Abdrücke werden am besten auf kunststoffbeschichtete Objektträgernetze aufgenommen.

Die Gefrierätzapparatur

Es gibt inzwischen zahlreiche Apparaturen, mit denen eine Gefrierätzung durchgeführt werden kann. Diese Apparate können in ihrer Konstruktionsweise sehr unterschiedlich sein. Sie enthalten aber immer folgende Bauelemente:

1. Ein Pumpsystem, das Drucke bis wenigstens 10^{-6} Torr erzeugen kann. Es besteht aus einer Drehschieberpumpe für das Vorvakuum und einer Diffusionspumpe oder einer Turbomolekularpumpe, die das Endvakuum erzeugt, Druckmeßeinrichtungen sowie einem Ventilblock, der halb- oder vollautomatisch gesteuert sein kann.
2. Den Rezipienten. Er enthält die Vorrichtungen zum Aufnehmen der Präparate, die Temperatureinrichtung, die Bruchvorrichtung sowie die Verdampfungsquellen.
3. Einen Niedervolttransformator zur Erzeugung des Stroms für die Bedampfungen.
4. Geräte zur Versorgung und Steuerung des Temperiersystems.

Erläuterungen zum Film¹

Beschreibung der verwendeten Gefrierätzanlage: In diesem Film wird mit der Gefrierätzausführung der EPA 100, LEYBOLD-HERÆUS, Köln, gearbeitet:

Halbautomatischer Pumpstand, d.h. die Ventile werden über einen zentralen Knopf vom Experimentator geschaltet.

Rezipient aus Glas, ausgestattet mit Verdampfereinrichtung (Mischbedampfung 4 V/200 A, Kohlebedampfung 10 V/100 A, Abstand Präparat—Verdampfer: 15 cm), Manipulator (Vorrichtung zum Aufnehmen, Kippen und Drehen der Bruchvorrichtung), Heizvorrichtung und Kühlfinger (gekühlt mit flüssigem Stickstoff).

Doppelbruchvorrichtung: Temperaturmessung, sie erfolgt über ein Kupfer-Konstantan-Thermoelement in der Basisplatte der Bruchvorrichtung. Die Thermospannung wird auf einem Digitalvoltmeter angezeigt.

Transportzange, ein Greifer zum Transport des gekühlten Bruchmechanismus, der am Rezipienten angeflanscht werden kann.

Für die Gefrierätzung werden biologische Objekte durch Einfrieren fixiert. In diesem Zustand werden sie im Hochvakuum aufgebrochen. Ein Sublimationsprozeß, Ätzung genannt, legt weitere Oberflächen am Objekt frei. Von den entstandenen Flächen wird ein Abdruck hergestellt, der ein indirektes Bild vom Objekt liefert.

Hier wird das Zellenmaterial einer Hefekultur durch Zentrifugation angereichert und so für die physikalische Fixierung durch Einfrieren vorbereitet.

Zugesetzte Frostschutzmittel, wie Glycerin, verbessern die Einfriereigenschaften. Es können dadurch jedoch physiologische Schäden am Objekt hervorgerufen werden.

Für eine Untersuchung durch Gefrierätzung sind außer suspendierbaren Objekten — wie der verwendeten Hefe — auch Gewebe geeignet.

¹ Die kleingedruckten Abschnitte geben den Wortlaut des im Film gesprochenen Kommentars wieder.

Den Einfrierprozeß soll das Objekt im Zustand latenten Lebens überstehen. Eine Voraussetzung hierfür sind hohe Einfriergeschwindigkeiten.

Zum Einfrieren werden kalte Flüssigkeiten, z.B. Freon, Propan oder wie hier Stickstoff verwendet.

Bei Atmosphärendruck liegt die Temperatur des flüssigen Stickstoffs im Bereich seines Siedepunktes. Taucht man ein wärmeres Objekt ein, so bilden sich an seiner Oberfläche ständig Gasblasen. Dadurch wird das schnelle Abkühlen des Objektes verhindert. Diese Erscheinung wird LEIDENFROST'sches Phänomen genannt.

Stickstoff läßt sich im Vakuum verfestigen: Beim Leerpumpen des Exsikkators tritt eine sehr starke Gasbildung ein.

Die für die Gasentwicklung notwendige Energie wird dem noch flüssigen Stickstoff entzogen: Er kühlt ab und erstarrt schließlich.

Wird nach dem Belüften des Exsikkators in den nun schmelzenden Stickstoff ein Objekt eingetaucht, unterbleibt die Gasbildung. Das Objekt kühlt sofort auf die Temperatur des Einfriermittels ab. Das LEIDENFROST'sche Phänomen tritt also nicht auf.

Zum Einfrieren, Brechen und Ätzen der Objekte können verschiedene Objektträgertypen verwendet werden.

Diese Doppel-T-förmigen Objektträger sind aus Kupfer. Ihre obere Fläche ist vertieft, um die Objekte aufnehmen zu können.

Ein Tropfen der vorbereiteten Hefesuspension wird in diese Vertiefung eingefüllt.

Die beiden Objektträger werden aufeinander gestellt.

Sie werden mit einer Umkehrpinzette ergriffen und dann fest zusammengedrückt.

Dieses Präparat kann eingefroren werden.

In den etwa -205°C kalten, schmelzenden Stickstoff wird das Präparat eingetaucht. Die Objektstrukturen erstarren, Zellwasser und extrazelluläres Wasser vitrifizieren, das heißt, sie verfestigen sich zu einer glasartigen, amorphen Masse.

Um den vitrifizierten Zustand des Präparates zu erhalten, wird es in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. So eingefrorene und verwahrte Objekte verbleiben im Zustand latenten Lebens.

Ein anderer Typ von Objektträger weist keine Vertiefung auf.

Die Objektsuspension wird aufgestrichen.

Zwischen die beiden Objektträger werden zwei gleiche, aufeinander justierte Indikatorträgernetze gebracht.

Die Felder dieser Trägernetze sind durch Buchstaben und Zahlen markiert. Die Suspension durchdringt die Felder des Netzwerkes. Nach einem Bruch verbleibt auf jedem Objektträger ein Trägernetz. Über die Markierungen in den Netzen können später korrespondierende Bruchstellen im Elektronenmikroskop leicht gefunden werden.

Objekt, Indikatornetze und Objektträger werden zusammen eingefroren.

In der Gesamtansicht der Gefrierätzeinrichtung erkennt man links die Einheit von Transformator, Meß- und Steuerteil. Rechts der Hochvakuumpumpstand mit dem gläsernen Rezipienten. Vom belüfteten Rezipienten wird die Verdampfeinrichtung abgenommen.

Von der nach Bruch und Ätzung entstandenen Präparatfläche wird durch Bedampfung mit Kohle und Metall ein Abdruck hergestellt.

Wenn dieses Graphittiegelchen im Hochvakuum durch elektrischen Strom aufgeheizt wird, sublimiert dabei Kohle.

Gleichzeitig verdampft das hinzugegebene Stückchen der Metall-Legierung aus Platin-Iridium.

Der entstandene Abdruck, Replica genannt, ist zerbrechlich. Durch eine Kegelbedampfung mit reiner Kohle wird die Replica deshalb stabilisiert. Für diese Bedampfung werden Graphitstäbe an zwei anderen Elektroden des Verdampfers befestigt.

Kohle sublimiert, wenn im Hochvakuum diese Stäbe über einen Bewegungsmechanismus im Verdampferflansch aufeinandergedrückt werden und durchfließender elektrischer Strom sie aufheizt.

Eine Schutzkappe über den Verdampfungsquellen verhindert das rasche Beschlagen des Rezipienten durch die Verdampfungsmaterialien.

Der beschickte Verdampfer wird wieder am Rezipienten angeflanscht.

Der Rezipient wird nun evakuiert.

Der Transformator mit den Meßinstrumenten für die Mischverdampfung von Kohle und Metall und die reine Kohleverdampfung wird mit dem Verdampfer verbunden.

Flüssiger Stickstoff wird über einen Trichter eingefüllt und kühlt den rohrförmigen Kühlfinger auf die Temperatur des Stickstoffs ab.

Die Präparate werden am Kühlfinger weitergekühlt; außerdem wirkt dieser als Kühlfalle, weil er den Wasserdampf im Rezipienten bindet.

Im Bruchmechanismus werden die hergestellten Präparate aufgebrochen. Er besteht aus einem Scharnier, dessen Flügel Aussparungen für die Präparate haben. Durch eine Feder im Gelenk wird das Scharnier gespannt. Ein Arretierstift fixiert diese Position.

Für eine Überprüfung der Funktion des Bruchmechanismus wird ein Demonstrationspräparat eingebracht.

Beim Bruchvorgang sichert dieses Fangblech die obere Präparathälfte.

Durch Lösen des Arretierstiftes tritt der Bruch ein. Es sind so zwei korrespondierende Bruchhälften entstanden.

Für das Experiment in der Gefrierätzanlage wurde der Bruchmechanismus neu gespannt.

Er wird in ein Isoliergefäß gestellt und mit flüssigem Stickstoff abgekühlt.

Dem Aufbewahrungsgefäß wird eines der vorbereiteten Präparate entnommen.

Auf dem kürzesten Weg wird es in den Bruchmechanismus gestellt und darin befestigt.

Mit der kalten Transportzange wird der Bruchmechanismus ergriffen und später mit ihr zusammen in die Gefrierätzanlage eingebracht.

Der Rezipient der Anlage wird mit trockenem Stickstoffgas geflutet, bis Atmosphärendruck erreicht ist.

Der Bruchmechanismus kann jetzt in die Haltevorrichtung im Manipulator eingefahren werden.

Der Bruchmechanismus läßt sich mit dem Manipulator in alle Raumlagen kippen und auf der waagerechten Achse des Rezipienten verschieben. Der

Präparateteller hat sich bei diesem Vorgang nur wenig erwärmt, er trifft nun auf den kalten Kühlfinger.

Mit einem Thermoelement an der Rückseite des Präparatetellers kann die Temperatur bestimmt werden. Dieser Thermospannung entspricht eine Temperatur von etwa -175°C .

Der Rezipient wird nun wieder evakuiert. Eine Rotationspumpe erzeugt zunächst ein Vorräumvakuum von etwa 8×10^{-2} Torr. Die obere Skala zeigt diesen Wert an.

Nach dem Umstellen der Ventile evakuiert die Diffusionspumpe auf einen Arbeitsdruck von etwa 10^{-6} Torr. Die mittlere Skala zeigt diesen Wert an.

Während des Pumpvorganges verblieb der Bruchmechanismus am Kühlfinger. Bruch- und Ätzzvorgang sollen bei -100°C durchgeführt werden.

Ein Heizbacken wird an den Bruchmechanismus seitlich angelegt und dadurch werden Präparat und Bruchmechanismus von -175° auf -100°C aufgeheizt. Am Voltmeter wird der Aufheizvorgang verfolgt. Die gewünschte Temperatur ist erreicht bei $-4,2$ mV Thermospannung.

Der Heizbacken wird abgezogen. Der Bruch des Präparates, mit dem die Ätzzeit beginnt, kann ausgelöst werden. Die Ätzzeit richtet sich bei gegebenen Druck- und Temperaturbedingungen nach der gewünschten Ätztiefe. Ein Metallfinger löst den Arretierstift im Bruchmechanismus.

Der Bruch wird jetzt vollzogen. Danach wird der Auslösefinger zurückgenommen.

Während des Ätzzvorgangs werden die Präparate mit dem Manipulator auf die Kohle-Metall-Bedampfungsquelle orientiert. Der Bedampfungswinkel wird eingestellt. Unter diesem Winkel treffen Kohle und Metall zur Schattenerzeugung auf die Präparate. Der Bedampfungswinkel beträgt maximal 45° . Der Ätzzvorgang wird durch die Metall-Kohle-Bedampfung beendet.

Die entstandene Replica wird durch die folgende Kohlebedampfung stabilisiert. Die Präparate werden auf den Kohleverdampfer justiert. Der Bedampfungswinkel soll 90° betragen. Die Präparate rotieren während der Bedampfung. Es wird also eine Kegelbedampfung ausgeführt.

In einer schematischen Darstellung sollen die Vorgänge bei Bruch, Ätzung und Bedampfung veranschaulicht werden.

Man sieht im Längsschnitt die beiden Präparateträger und die zwischen ihnen eingefrorene Objektsuspension.

Die Präparateträger werden auseinandergespalten. Durch den Bruch entstehen zwei einander entsprechende Bruchflächen. Ein Ausschnitt einer der Bruchflächen soll unter stärkerer Vergrößerung betrachtet werden. Dieses Objekt ist in der Mitte gespalten worden. Innerhalb des Objektes ist links eine Substruktur durchgebrochen worden. An dem kugelförmigen Element rechts ist der Bruch außen entlang verlaufen, so daß es über die Bruchfläche hinausragt.

Der Ätzzvorgang setzt unmittelbar nach Beendigung des Bruches ein.

Mit unterschiedlicher Rate sublimierte Eis von der freien Fläche ab und auch aus dem Objekt heraus. Es sank das Niveau der Flächen ab. Dadurch wurden weitere Teile des Objektes freigelegt: wie die äußere Begrenzung, die Begrenzung der durchbrochenen Substruktur und zusätzliche Oberfläche von dem aus dem Eis herausragenden Strukturelement.

Durch die Schrägbedampfung mit Platin-Iridium und Kohle wird der Ätzvorgang beendet. Eine dünne Schicht aus diesen Materialien bedeckt als Abdruck die Eisfläche und die Objektstrukturen. Da ein Profil bedampft wurde, ist die aufgedampfte Schicht ungleichmäßig dick geworden. An den aus dem Eis herausragenden Stellen wurde mehr Bedampfungsmaterial abgelagert als auf den ebenen Flächen. Hinter den erhabenen Strukturen verblieben unbedampfte Stellen als Schatten.

Durch die von oben kommende Kegelbedampfung mit Kohle wird der Abdruck stabilisiert. Die Kohle bedeckt in nahezu gleichmäßiger Stärke das Profil.

Zum Herausnehmen wird der Präparateteller mit dem Manipulator auf das Zentrum des Rezipienten justiert und dann gedreht.

Der Rezipient wird belüftet.

Mit der Transportzange wird der Präparateteller aus dem Rezipienten herausgeholt.

Die beiden Abdrücke müssen nun von den Präparateträgern gelöst werden.

Beim Eintauchen des Trägers in Wasser löst sich der Abdruck und schwimmt auf die Wasserfläche ab.

In gleicher Weise wird mit der zweiten Bruchhälfte verfahren.

Noch haften jedoch Reste der Präparatesuspension an den Abdrücken.

Diese organischen Reste werden durch oxydierende Säuren, wie Chromsäure oder Schwefelsäure, und bleichende Agenzien entfernt.

Mit einer Platinöse werden die Abdrücke in das Reinigungsbad überführt.

Im Chromsäurebad dauert die Reinigung der Abdrücke einige Stunden.

Nach Ablauf dieser Zeit wird dann die Chromsäure in mehreren Wasserbädern ausgewaschen.

Aus dem letzten Wasserbad werden die Abdrücke auf ein Objektträgernetz aufgenommen.

Das an Pinzette und Objektträger haftende Wasser wird abgesaugt.

Dieses Präparat kann nun im Elektronenmikroskop untersucht werden.

Bis dahin wird es in einem Präparatespeicher verwahrt.

In gleicher Weise wird bei dem anderen Präparatetyp verfahren: Er enthielt zwischen den Objektträgern zwei Indikatornetze. Auch er wurde gebrochen, geätzt und zur Herstellung der Replicas bedampft. Die Indikatornetze werden auf die Wasserfläche abflottiert.

Reinigung und Wässerung schließen sich an.

Aus dem letzten Wasserbad werden die Trägernetze mit der Pinzette entnommen, auf Fließpapier getrocknet und bis zur Untersuchung im Präparatespeicher verwahrt.

Dieses elektronenoptische Bild zeigt den Gefrierätzabdruck eines längs aufgebrochenen Zellausschnittes der Grünalge *Ankistrodesmus braunii*. In der von einer Eis-Glycerin-Mischung umgebenen Zelle sind die ins Grundplasma eingebetteten Organellen zu sehen. Hier sind auch die unterschiedlichen Bruchmöglichkeiten zu erkennen, wie Durchbruch von Organellen, Bruch entlang äußerer Organellmembranen und der Flächenbruch in Membranen.

Literatur

- [1] BACHMANN, L., and W. W. SCHMIDT-FUMIAN: Spray freezing and freeze-etching. In: BENEDETTI, E. L., and P. FAVARD (eds): Freeze Etching, Techniques and Application. p. 73—80. Société Française de Microscopie Electronique, Paris 1973.
- [2] HALL, C. E.: A low temperature replica method for electron microscopy. *J. appl. Phys.* **21** (1950), 61—62.
- [3] MOOR, H., K. MÜHLETHALER, H. WALDNER and A. FREY-WYSSLING: A new freezing-ultramicrotome. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10** (1961), 1—13.
- [4] MOOR, H.: Die Gefrierfixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* **62** (1964), 546—580.
- [5] MOOR, H.: Freeze Etching. Balzers High Vacuum Report No. 2, Balzers AG, Liechtenstein 1965.
- [6] RIEHLE, U., and M. HOECHLI: Theory and techniques of high pressure freezing. In: BENEDETTI, E. L., and P. FAVARD (eds): Freeze Etching Techniques and Application. p. 31—61. Société Française de Microscopie Electronique, Paris 1973.
- [7] SLEYTER, U.: Die Gefrierätzung korrespondierender Bruchhälften: ein neuer Weg zur Aufklärung von Membranstrukturen. *Protoplasma* **70** (1970), 101—117.
- [8] STEERE, R. L.: Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3** (1957), 45—60.
- [9] STEERE, R. L., and M. MOSELEY: *Proc. EMSA*, 202—203. Baton Rouge Claitor Publ. Div. 1969.
- [10] WEHRLI, E., K. MÜHLETHALER, and H. MOOR: Membrane structure as seen with a double replica method for freeze fracturing. *Exptl. Cell Res.* **59** (1970), 336—339.

Weiterführende Literatur

- [11] BOULIVANT, S.: Freeze Etching and Freeze Fracturing. In: KOEHLER, J. K. (ed): Advanced techniques in biological electron microscopy. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1973, 67—112.
- [12] MOOR, H.: Die Gefrierätztechnik. In: SCHIMMEL, G., und W. VOGEL (eds): Methodensammlung der Elektronenmikroskopie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1970.
- [13] MOOR, H.: Freeze Etching. *Int. Rev. Cytol.* **25** (1969), 391—412.
- [14] 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, 235 m, 21 1/2 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 Gefrierätzabdruckes und als Resultat das elektronenmikroskopische Bild eines solchen Abdruckes. Der Ablauf der Präparation ist in folgende Stationen gegliedert:

1. Die Vorbereitung des Objekts durch Glycerinbehandlung und Zentrifugation.
2. Das Einfrieren der Präparate. Das LEIDENFROSTSche Phänomen und die Möglichkeit, es auszuschließen, werden demonstriert.
3. Die Vorbereitung der Gefrierätzanlage (Leybold-Heraeus EPA 100).
4. Den Ablauf von Gefrierbruch, Ätzung und die Herstellung des Abdrucks durch Metall-Kohle-Schrägbedampfung und Kegelbedampfung mit Kohle. Diese zentralen Präparationsschritte werden im natürlichen Ablauf und als schematische Darstellung gezeigt.
5. Die Reinigung der Abdrücke und das Aufnehmen der Abdrücke auf Objektträgernetze.

Das Resultat: Gefrierätzabdruck eines Längsbruches durch eine Zelle der Grünalge *Ankistrodesmus braunii*.

Summary of the Film

This film sequence shows the process of freeze-fracturing and freeze-etching. The preparation process is sequenced in the following steps:

1. The preparation of the specimen by glycerol treatment and centrifugation.
2. The freezing of the specimen in melting nitrogen. A demonstration of the phenomenon of LEIDENFROST and how to avoid it, is given.
3. The preliminary steps of the high vacuum preparation plant (Leybold-Heraeus EPA 100).
4. The fracturing of the specimen with a fracturing device, the etching, the bias shadowing with platinum-iridium and carbon, and the coating with carbon for stabilizing the replica. This sequence is shown as a real film and as a cartoon film to give a better understanding of this very important part in freeze-etching.
5. Cleaning of the replicas and mounting of them on support grids.

The result of freeze-fracturing and freeze-etching is demonstrated by an electron micrograph of a longitudinally fractured cell of the green alga *Ankistrodesmus braunii*.

Résumé du Film

Le film montre la préparation d'une réplique réalisée par cryodécapage, ainsi que la micrographie électronique qui en résulte. Les cinq phases suivantes sont nécessaires à la réalisation d'une telle réplique:

1. La préparation du spécimen qui est traité avec de la glycérine puis centrifugé.
2. La congélation du spécimen dans de l'azote en fusion; le film montre le phénomène de LEIDENFROST ainsi que le moyen d'éviter ce phénomène.
3. La préparation de l'appareil de cryodécapage (Leybold-Heraeus, EPA 100).
4. La fracture du spécimen, le cryodécapage ainsi que l'évaporation au mélange platine-iridium-carbone. Pour une meilleure compréhension de cette importante phase, le film montre cette séquence aussi bien en naturel que sous forme de dessin animé.
5. Le nettoyage de la réplique ainsi que sa prise sur une grille de support. Le film montre enfin le résultat de l'expérience c. a. d. le cryodécapage d'une cellule de l'algue verte *Ankistrodesmus braunii* fracturée longitudinalement.

Film C 1194 Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Gefrierätzung

Ergänzung der Begleitveröffentlichung, Ausgabe 1976

English Version of the Spoken Commentary

In the procedure known as freeze-etching, the biological specimen is fixed by freezing. In this state it is fractured in a high vacuum. A sublimation process known as etching reveals further surface features of the specimen. A replica is made of the surface thus treated, and so an indirect image of the specimen is obtained.

Cellular material from a yeast culture is being enriched by centrifugation and thus prepared for physical fixation by freezing.

Added anti-freezing agents—such as glycerol—improve the freezing properties. But they can also cause physiological damage to the preparation.

Apart from suspensions of objects, such as yeast, tissues can also be prepared for examination by means of freeze-etching.

The specimen should survive the freezing process in a condition of latent viability. One of the prerequisites for this is a rapid rate of freezing.

For freezing, cryogenic liquids are used, such as freon, propane, or, as in this case, nitrogen.

At atmospheric pressure, the temperature of liquid nitrogen is in the region of its boiling point. If a warmer specimen is immersed in it, bubbles are continually formed on its surface. This effect prevents the rapid cooling of the specimen, an occurrence known as the phenomenon of LEIDENFROST.

Nitrogen solidifies in a vacuum. When the desiccator is evacuated, there is considerable formation of gas.

The energy required for gas formation is derived from the liquid nitrogen, which cools and finally solidifies.

If, upon ventilation of the desiccator, an object is immersed in the now melting nitrogen, bubble formation does not occur. The object cools immediately to the temperature of the coolant. So the phenomenon of LEIDENFROST does not apply.

For freezing, fracturing and etching of the specimens, various object-mounts can be used.

These broad-flange object-mounts are made of copper. Their upper surface has a depression to receive the specimen.

A drop of the prepared yeast suspension is introduced into the depression.

The two loaded object-mounts are placed on top of one another. They are grasped with a pair of forceps and then pressed tightly together. This preparation can now be frozen. The preparation is immersed in melting nitrogen at a temperature of about -205°C . The structures of the specimen are maintained, cell fluid and extra-cellular water vitrify, that is, they solidify to a glass-like, amorphous mass. To retain the vitrified state, the preparation is kept immersed in liquid nitrogen. Specimens frozen and preserved in this way remain in a state of latent viability.

Another type of object-mount has no depression in it. The suspension is smeared on. Between the two object-mounts two identical and correspondingly adjusted indicator support grids are positioned. The squares of the support grids are marked with letters and numbers. The suspension penetrates the grid squares. After fracturing, a grid remains behind on each object-mount. By means of the markings on the grids, the corresponding fracture surfaces can easily be identified later under the electron microscope. The specimen, the indicator grids and the object-mounts are frozen as an integral unit.

In this overview of the freeze-etching apparatus, the integral transformer, measuring and control units can be seen on the left. On the right, the high-vacuum pump stand with the glass recipient. The vapour-coating unit is removed from the ventilated recipient. After fracturing and etching the surface of the preparation, a replica of it is made by depositing metal and carbon on it. When this graphite crucible is heated in a vacuum by electric current, carbon sublimates from it. The added fragment of an alloy of platinum and iridium also vaporizes at the same time. The replica is fragile, so it is stabilized by coating it with pure carbon. To this end, graphite rods are connected to two other electrodes in the coating plant. Carbon sublimates when these rods are mechanically pressed together under high vacuum on the coating flange and then heated by allowing current to flow through them. A protective cap over the sources of vaporization prevents the sublimation material settling quickly on the walls of the recipient. The charged vapour-coating unit is again flanged to the recipient. Now the recipient is exhausted. The transformer with the instruments for monitoring the combined carbon and metallic vapour-coating and the pure carbon deposition are connected up to the vapour-coating unit. Liquid nitrogen is funneled in and cools the tube-like cooling finger to its own temperature. The preparations are cooled further at the cooling finger, which also functions as a refrigerated trap by absorbing the water vapour in the recipient. The ready-made preparations are fractured in the fracturing device. It consists of a hinge on the wings of which there are spaces for the prepara-

tions. The hinge is set by means of a spring at the joint. A locking pin holds it in this position.

To test the functioning of the fracturing device, a demonstration preparation is positioned.

During fracturing, the upper half of the preparation is protected by this baffle sheet.

The fracture is effected by releasing the locking pin. Two corresponding halves have thus been made.

For the experiment in the freeze-etching plant, the fracturing mechanism was again set.

It is placed in an insulating container and cooled with liquid nitrogen.

One of the prepared specimens is taken out of the storage container.

Taking the shortest possible route, it is positioned in the fracturing device and locked in place.

The cold conveyor tongs grasp the fracturing device, and are later also used to bring it to the freeze-etching plant.

The recipient is flooded with dry gaseous nitrogen until atmospheric pressure is reached.

The fracturing device can now be introduced into the holder of the manipulator.

The fracturing device can be turned in any direction by the manipulator and also be moved along the horizontal axis of the recipient. The preparation plate has warmed up only slightly during these operations, and now it comes into contact with the coloring finger.

The temperature can be controlled by a thermocouple element on the reverse side of the preparation plate. The thermoelectric voltage corresponds with a temperature of about -175°C .

The recipient is again evacuated. A rotary pump creates a pre-vacuum of 8×10^{-2} Torr. This value is indicated on the upper scale.

After adjusting the valves, the diffusion pump increases the vacuum to a working pressure of 10^{-6} Torr. This value appears on the middle scale.

During the evacuating procedure, the fracturing device remained at the cooling finger. Fracturing and etching are to take place at -100°C .

A heating plate is positioned adjacent to the fracturing device, and this then warms the preparation and the fracturing device from -175°C to -100°C . The heating process can be monitored on the voltmeter. The required temperature is achieved at -4.2 thermoelectric millivolts.

The heating plate is withdrawn. The fracturing of the preparation, which initiates the etching period, can now take place. The etching depth is a function of the etching period at uniform pressure and temperature. A metal catch releases the locking pin of the fracturing device.

The fracture is accomplished. Then the release catch is withdrawn.

During the etching process, the preparations are orientated towards the metal/carbon vaporization source by means of the manipulator. The bias-shadowing angle is set. This is the angle at which carbon and metal vapour impinges on the preparation to shadow it. The shadowing angle should not exceed 45° .

The etching process is terminated by the metal/carbon vapour coating.

The replica thus formed will be stabilized by the ensuing carbon coating. The preparations are now orientated towards the carbon vaporizer, The coating angle is now 90°. The preparations are rotated during carbon vaporization, enabling a conical beam coating to be effected.

This animated sequence schematizes the processes of fracturing, etching and coating.

Here is a longitudinal section through the pair of object-mounts and the suspension preparation frozen between them.

The object-mounts are broken apart. The fracture gives rise to two corresponding surfaces. Let us look at one of the fracture surfaces . . . under higher magnification. This specimen has been fractured across the middle. Within the specimen, a substructure—left—has also been fractured. The fracture follows the outer contours of the spherical element—right—so that it stands proud of the fractured surface.

The etching process starts immediately after fracturing is completed.

Ice has been sublimated at varying rates from the exposed surfaces and from the interior of the specimen. The level of the surface has sunk. This has exposed further layers of the object, such as the periphery, the edges of the fractured substructure and additional textures of the structure projecting from the ice.

The etching process is terminated by bias shadowing with platinum/iridium and carbon. A thin layer of these materials now covers the ice surface and the object structures like a relief impression. As the surfaces were covered at an angle, the layer of sublimated material is of varying thickness.

More material was deposited on the raised surface than on the level ice. Behind the raised areas, parts not covered by the metal have remained as shadows.

The replica is stabilized by carbon beam coating from above. The carbon covers the contours in almost uniform thickness.

For removal, the preparation plate is manipulated to the centre of the recipient and then turned.

The recipient is ventilated.

The preparation is taken out of the recipient by means of tongs.

The two replicas must now be severed from the object-mounts.

On immersing the mount in water, the replica detaches itself and floats on the surface of the liquid.

The same applies to the second fractured half.

Some residues from the suspension still cling to the replicas.

These organic residues are cleaned off by oxidising agents such as chromic acid or sulphuric acid and bleaching agents.

With a platinum loop the replicas are transferred to the cleaning bath. In the chromic acid bath the cleaning of the replicas takes several hours.

When this time is up, the chromic acid is washed out in a succession of water baths.

From the final water bath the replicas are transferred to a support grid.

The water clinging to the object-mount and the tweezers is dried off.

This preparation can now be examined under the electron microscope. Until such time comes, it will be stored in a preparation container.

The other type of preparation was treated in the same way: It was provided with two indicator grids between the objectmounts. It, too, was fractured, etched and coated to produce the replicas. The indicator grids are floated off on the surface of the water.

Cleaning and washing follow suit.

The support grids are removed from the final water bath with tweezers, dried on filter paper and kept in storage containers until required for examination.

The electron micrograph shows the replica of a freeze-etched detail of a longitudinally fractured cell of the green alga *Ankistrodesmus braunii*. The cell is surrounded by an ice/glycerol medium and the organelles embedded in its basic cytoplasm are clearly visible. The various different types of fracture can also be recognized; for instance, the medial fracture of an organelle, the fracture along an external organelle membrane, and the surface fracture in membranes.