

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

*Wissenschaftlicher Film C 1190/1976*

**Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden  
Herstellung einer Kohleträgerfolie**

Begleitveröffentlichung von

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

GÖTTINGEN 1976

Film C 1190

## **Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Herstellung einer Kohleträgerfolie**

E. SPIESS und F. MAYER, Göttingen

### **Allgemeine Vorbemerkungen<sup>1</sup>**

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-

<sup>1</sup> Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 8 u. 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**

In der Regel sind Ultradünnschnitte nicht ausreichend stabil, um die Öffnungen von elektronenmikroskopischen Objektträgersnetzen, auf die sie aufgebracht werden müssen, dauerhaft zu überspannen. Sehr viele andere Objekte können überhaupt nicht freitragend präpariert werden, da sie kleiner als die Öffnungen der Trägernetze sind. Die Einführung eines stützenden Trägerfilms zwischen Objekt und Trägernetz ist deshalb notwendig.

An die Qualität solcher Filme oder Folien werden folgende Anforderungen gestellt: 1. Sie müssen eine geringe Massendicke haben, 2. sie müssen mechanisch, z. T. auch chemisch und thermisch stabil sein, 3. sie dürfen keine Eigenstruktur aufweisen, 4. sie sollten sich unter der Einwirkung des Elektronenstrahls nicht oder nur geringfügig verändern und 5. sie sollten hydrophil sein.

Diesen Anforderungen werden dünne Schichten gerecht, die aus Kunststoffen wie Kollodium (auch Parlodium genannt), einer Nitrocellulose, oder Formvar, einem Polyvinylformaldehyd, oder auch aus Kohle, Siliciumoxyd oder Siliziumdioxyd hergestellt werden.

### **Die Herstellung der Filme oder Folien**

#### **I. Kunststofffilme:**

##### **Kollodium.**

Von den aufgezählten Substanzen ist Kollodium diejenige, die unter dem Elektronenstrahl die stärksten Veränderungen erfährt. Durch eine Bedampfung mit einer dünnen Kohleschicht (etwa 5 nm) gewinnt sie jedoch an Stabilität. Kollodium wird in Amylacetat oder Butylacetat gelöst.

Formvar.

Auch Formvar verändert sich unter der Einwirkung des Elektronenstrahls; Kohlebedampfung wirkt stabilisierend. Formvar wird in Chloroform, Dioxan oder Dichloräthan gelöst.

Bei der Herstellung von Kunststofffilmen muß auf höchste Sauberkeit geachtet werden. Es ist notwendig, absolut wasserfreie Lösungsmittel und Gefäße zu verwenden, da Wasserreste zu Löchern in den Kunststofffilmen führen.

Die Herstellung eines Films kann nach folgenden Verfahren erfolgen:

#### 1. Die Auftropfmethode.

Sie ist nur bei Kollodiumlösungen anwendbar. Ein Tropfen der Kollodiumlösung wird auf eine Wasseroberfläche gegeben, die Lösung breitet sich darauf aus; nach dem Verdunsten des Lösungsmittels bleibt ein Kollodiumfilm zurück, mit dem die Objektträgernetze befilmt werden können.

#### 2. Die Eintauchmethode.

Ein Glasobjektträger wird in die Kunststofflösung eingetaucht. Am herausgezogenen Objektträger verbleibt ein Film der Lösung, aus dem nach Verdunsten des Lösungsmittels ein Kunststofffilm entsteht. Dieser Film muß dann auf eine Wasseroberfläche abflottiert werden, um Objektträgernetze befilmern zu können.

#### 3. Die Ablaufmethode (im Film vorgeführt).

Ein Glasobjektträger wird in die Kunststofflösung eingestellt oder eingehängt. Man läßt die Lösung abfließen; es entsteht dann wie bei der Eintauchmethode ein Kunststofffilm auf dem Glasobjektträger. Die Ablaufmethode ergibt die besten Ergebnisse. Sie kann in zahlreichen, mehr oder weniger komplizierten Varianten praktiziert werden. Diese Varianten wurden zur Vermeidung von Verschmutzung durch Staub oder Wasser und zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit entwickelt. (Das im Film vorgeführte Verfahren ist aus didaktischen Gründen bewußt auf das Prinzipielle der Methode reduziert worden.)

Die Ablösung der Kunststofffilme vom Glasobjektträger kann problematisch sein. Ein feiner Detergenzfilm auf dem Glasobjektträger, vor der Befilmung mit Kunststofflösung durch Waschen mit Kernseife oder Abreiben mit einem Kleenex-Papiertuch aufgebracht, oder das Anhauchen des Kunststofffilms kurz vor dem Abflottieren, können diese Schwierigkeit beseitigen.

## II. Kohlefilme:

Zur Herstellung von Kohlefilmen bringt man Graphit im Hochvakuum durch Widerstandsheizung (etwa 5 Volt — 200 Ampère) zum Sublimieren

und läßt den Dampf auf einer glatten strukturfreien Fläche kondensieren. Die optimale Unterlage hierfür ist frisch gespaltener Glimmer, aber auch Glasflächen können geeignet sein.

Eine andere Methode ist die Bildung von Kohlefilmen aus einer Glimmentladung. Man zersetzt dazu ein kohlenstoffreiches Gas (z.B. Benzol, Amylamin) in einem dynamischen Vakuum durch eine Glimmentladung. Die auf diese Weise erzeugten Filme sind hydrophiler als die nach der Bedampfungsmethode erzeugten. Da die Glimmentladungsmethode aber sehr zeitaufwendig ist, wird sie vorwiegend zur Hydrophilisierung schon vorgebildeter Kohleschichten oder zur Bildung dünner Hüllabdrücke verwendet.

Die Spannweite reiner Kohlefilme ist nicht so hoch wie die der Kunststofffilme.

Auch bei den Kohlefilmen kann das Ablösen des Films von der Unterlage problematisch sein.

### III. Filme aus anderen Materialien:

Filme aus den anderen Materialien werden analog den Kohlefilmen hergestellt.

#### Die Trägernetze

Es steht heute eine Vielzahl unterschiedlicher Trägernetze zur Verfügung. Typ, bestimmt durch Maschenweite und -form, und Material werden je nach Präparatbeschaffenheit und Präparationsgang ausgewählt.

Das Aufbringen der Filme auf die Trägernetze oder -blenden kann nach zwei Methoden vorgenommen werden:

1. Der schwimmende Film wird mit zahlreichen Trägernetzen belegt; die rauhe Seite der Netze sollte dabei Kontakt mit dem Film haben. Mit einem rauhen Papier nimmt man die befilmten Trägernetze von der Wasseroberfläche ab.

2. Die Trägernetze werden auf einem Sieb am Boden der Schale, in die der Film abflottiert wird, plaziert. Wenn der Film auf der Wasseroberfläche schwimmt, senkt man den Wasserspiegel langsam ab, bis der Film die Trägernetze bedeckt.

Sollen nur einzelne Trägerblenden oder -netze befilmt werden, so zerschneidet man den Kunststoff- oder Kohlefilm vor dem Abflottieren in kleine Stücke, die etwa die Größe der zu befilmenden Flächen haben. Die nach dem Abflottieren frei schwimmenden Filmstückchen werden dann am besten von unten mit den Objektträgern aufgenommen.

Um den Kontakt zwischen Film und Trägernetzen zu verbessern, kann man die Stege der Trägernetze mit einer klebenden Schicht (Neopren, Gummierung von Klebefilmen, beides in Toluol gelöst) überziehen.

## Erläuterungen zum Film<sup>1</sup>

Biologische Objekte in der Größe isolierter Zellbestandteile oder Bakterienzellen bis in die Dimensionsbereiche von Makromolekülen müssen für die direkte elektronenmikroskopische Untersuchung auf eine Unterlage gebracht werden. Für diesen Zweck geeignete Unterlagen sind Kohlefilme, die durch Sublimation von Graphit im Hochvakuum hergestellt werden.

In einem Verdampfer werden zwei Graphitstäbe aufeinander justiert. Ihre Spitzen stehen sich frei gegenüber. Die Sublimation von Kohle im Hochvakuum tritt ein, wenn die Graphitstäbe Kontakt miteinander bekommen und durchfließender elektrischer Strom sie aufheizt. Der Kontakt wird durch einen Bewegungsmechanismus im Flansch hergestellt.

Über den Verdampfer wird eine Schutzkappe gestülpt. Sie verhindert ein rasches Verschmutzen des Rezipienten-Innenraumes durch Kohle.

Der Kohleträgerfilm soll sich auf einer frisch gespaltenen Glimmerplatte von vollkommen glatter Oberfläche niederschlagen. Eine solche Glimmerplatte wird auf einem Blindflansch festgeklebt.

Ein Stück vergoldete Aluminiumfolie wird neben die Glimmerplatte geklebt. Schlägt sich die Kohle darauf nieder, so verfärbt sich die Folie in charakteristischer Weise und gibt so Auskunft über die ungefähre Schichtdicke der aufgedampften Kohleschicht.

Der Rezipient, in dem die Verdampfung stattfinden soll, wird wieder belüftet.

Der Flansch mit der Glimmerplatte und die Verdampfungseinrichtung werden an sich gegenüberliegenden Armen des Rezipienten angebracht. Der Abstand zwischen beiden beträgt etwa 20 cm.

Die Bedampfungseinrichtung wird mit dem Transformator, welcher den für die Verdampfung notwendigen Strom liefert, verbunden.

Der Rezipient wird evakuiert, bis ein Vakuum zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  Torr erreicht ist. Der Meßwert wird hier auf der mittleren Skala angezeigt.

Der Transformator wird eingeschaltet. — Verdampft wird mit einer Stromstärke von 100 Ampère.

Die Graphitstäbe werden mehrmals in kurzen Impulsen aufeinandergedrückt. Kohle verdampft.

Die Verfärbung der vergoldeten Folie zeigt die niedergeschlagene Schichtdicke an. Hier wird eine relativ dicke Kohleschicht von etwa 30 nm Stärke hergestellt.

Nach beendeter Bedampfung wird der Rezipient belüftet.

Der Flansch mit der Glimmerplatte wird abgenommen. Der Unterschied zwischen beschichtetem und unbedampft gebliebenem Teil der vergoldeten Folie tritt deutlich hervor. Die Oberfläche des Kohlefilms weist keine dem Auge sichtbaren Unreinheiten auf.

Die Glimmerplatte wird vom Flansch abgelöst und in eine Petrischale eingeklebt.

Ein Stück Glimmer wird abgeschnitten, um prüfen zu können, ob und wie sich der Kohlefilm von der Glimmerplatte trennen läßt.

<sup>1</sup> Wortlaut des gesprochenen Kommentars.

Beim Eintauchen in Wasser muß sich der Kohlefilm von der Glimmerplatte ablösen und in großen Stücken auf die Wasseroberfläche abschwimmen. Dieser Kohlefilm ist ausreichend mechanisch stabil; er ist für den Elektronenstrahl transparent, homogen und strukturarm. Er besitzt außerdem die Eigenschaft, aus wässrigen Suspensionen heraus biologische Objekte adsorbieren zu können.

### Literatur

- [1] BRADLEY, D. E.: The Preparation of Specimen Support Films. In: KAY, D. (ed.): Techniques for Electron Microscopy, Blackwell Scientific Publ. Ltd., Oxford 1965, 58—74.
- [2] MAHL, H., und K. MÖLDER: Herstellung von Formvar-Objektträgerfilmen nach dem Eintauchverfahren. In: SCHIMMEL, G., und W. VOGELL (eds.): Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1971, 1. 3.
- [3] REIMER, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1967.

---

#### *Anschrift der Verfasser:*

Dr. E. SPIESS, Insitut 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, 54 m, 5 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 beschreibt die Herstellung eines Kohleträgerfilms durch Bedampfen einer Glimmerplatte. Die Vorbereitung der Bedampfungsanlage (Leybold-Heraeus EPA 100), der Bedampfungsvorgang und die Kontrolle der Schichtdicke des entstehenden Kohlefilms über Interferenzfarben auf einer Goldfolie, sowie das Ablösen des fertigen Kohleträgerfilms von der Unterlage werden gezeigt.

### **Summary of the Film**

This film sequence describes the preparation of a carbon support film by depositing carbon onto a mica sheet.

The preliminary steps of the high vacuum evaporation plant (Leybold-Heraeus EPA 100), the evaporation of carbon itself and the control of deposited layer-thickness by interference colours on a gold foil are demonstrated. A small part of the carbon support film is stripped on a water surface to demonstrate its property.

### **Résumé du Film**

Ce film décrit la préparation d'un film de carbone évaporé sur une surface de mica. L'appareil d'évaporation (de la marque Leybold-Heraeus, EPA 100) est préparé et l'évaporation proprement dite réalisée. L'épaisseur du film de carbone ainsi préparé, est contrôlée en observant les couleurs d'interférence que présente une feuille d'or évaporée dans les mêmes conditions. Le film de carbone est ensuite "décollé" de son support pour contrôler sa qualité.



**Film C 1190 Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden  
Herstellung einer Kohleträgerfolie**

Ergänzung der Begleitveröffentlichung, Ausgabe 1976

---

**English Version of the Spoken Commentary**

Biological specimens as minute as individual cell organelles or bacterial cells or particles down to macromolecular dimensions must be mounted on a substrate for direct imaging with the electron microscope. For this purpose we choose a carbon film prepared by sublimation of graphite in a high vacuum.

Two graphite rods are adjusted in a vacuum coating unit so that their tips face but do not touch one another. Sublimation of carbon in a high vacuum occurs when the electrodes make contact and are heated up by the electric current passing through them. Contact is established by the advancing mechanism in the flange.

The evaporating unit is sheathed to prevent the interior of the recipient from being quickly contaminated with carbon.

The carbon film is deposited on the surface of a freshly split mica sheet, which is absolutely smooth. One of these sheets is stuck on to a blind flange.

A fragment of gold-plated aluminium foil is stuck close beside the mica sheet. Carbon deposited on it changes the colour of the foil in a characteristic way, thereby indicating the approximate thickness of the carbon coating.

The recipient in which the evaporation will take place is re-ventilated.

The flange with the mica sheet and the evaporating unit are fixed to opposite arms of the recipient. The distance between them is about 20 cm.

The evaporator is now connected to the transformer which supplies the current necessary for evaporation.

The recipient is evacuated until a vacuum in the region of  $10^{-4}$  or  $10^{-5}$  torrs is achieved. This value is indicated on the centre scale.

The transformer is switched on. – Sublimation is effected by a 100 amp current.

The graphite rods make contact in several short pulses. Carbon sublimates.

The colour change of the gold-plated foil is an indicator of the coating's thickness. In this case a relatively thick layer of about 30 nanometres has been deposited.

The recipient is re-ventilated on conclusion of vacuum coating.

The flange with the mica sheet is removed. The difference between the coated and uncoated parts of the gold-plated foil is clearly evident. No impurities can be detected on the surface of the carbon film with the unaided eye.

C 1190

The mica sheet is peeled off the flange and stuck on to a Petri dish.

A piece of mica is cut off the sheet to ascertain whether and how the carbon film can be separated from it.

When the mica sheet is immersed in water, the carbon film should separate from it and float away in large pieces on the surface of the water. This carbon film possesses sufficient mechanical stability; it is transparent to the electron beam as well as being homogeneous and lacking in structure. It is also capable of absorbing biological objects from aqueous solutions.