

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Wissenschaftlicher Film C 1191/1976

**Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden
Negativkontrastierung**

Begleitveröffentlichung von

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

Mit 1 Abbildung

GÖTTINGEN 1976

Film C 1191

Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Negativkontrastierung

F. MAYER und E. SPIESS, 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. 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

Im Transmissions-Elektronenmikroskop entsteht das Bild eines Objekts in Form von Helligkeitsunterschieden zwischen Objekteinheiten bzw. Untergrund. Dieser Schwärzungsunterschied spiegelt eine bestimmte „Elektronendichte“-Verteilung im Präparat wider.

Das Bild eines durchstrahlten Objekts entsteht durch Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Objekt, und zwar im Wesentlichen durch „elastische“ Stöße zwischen Elektronen und Atomkernen. Durch diese Stöße werden die Elektronen im Objekt gestreut, d.h. sie ändern ihre Richtung in unterschiedlichem Ausmaß. Das Bild entsteht durch die schwach gestreuten Elektronen; stark gestreute Elektronen werden ausgeblendet und tragen nicht zur Bildentstehung bei. Objektstellen mit starker Elektronenstreuung erscheinen auf dem Bild also dunkler als ihre Umgebung. Diese Schwärzungsunterschiede sind der Kontrast.

Atome mit hoher Ordnungszahl (d.h. mit hoher positiver Ladung des Atomkerns) streuen Elektronen stärker als solche mit niedriger Ordnungszahl. Da „biologische“ Atome (wie C, O, H, N, S, P) den Elektronenstrahl nur sehr wenig streuen, reicht der objektteigene Kontrast meist nicht aus, um die Feinstrukturierung des Objekts erkennen zu lassen. Man ist daher gezwungen, den Kontrast künstlich durch Einführen von Atomen mit hoher Ordnungszahl zu erhöhen. Solche Atome sind z.B. Os, Mn, U, Pb, Pt, W und viele andere. Die Einführung solcher Atome kann auf dem Weg einer u.U. nötigen Objektfixation oder durch einen separaten Kontrastierungsschritt erfolgen. Werden die Schwermetalle in gelöster Form in das biologische Objekt eingebracht und dort gebunden oder ausgefällt, spricht man von Positiv-Kontrastierung. Negativ-Kontrastierung liegt dann vor, wenn das Kontrastmittel das Objekt umgibt, aber nicht mit ihm reagiert und nicht eindringt. Damit bleibt das Objekt selbst durchstrahlbar und erscheint als helle Stelle in einer dunkleren Umgebung.

Untersuchungsobjekte

Der Größenbereich der mit Negativkontrastierung untersuchbaren Objekte erstreckt sich von den Bakterien bis zu einzelnen Makromolekülen, wie z. B. Enzymmolekülen.

Negativkontrastierungsmittel

Als Negativkontrastierungsmittel werden wäßrige Lösungen von Schwermetallsalzen wie z. B. Uranylacetat und Wolframsalze (K- oder Na-Salze von Phosphorwolframsäure) in Konzentrationen zwischen 0,5 und 5% bei pH-Werten zwischen 4 und 7 angewandt. Die Lösungen müssen durch vorheriges Filtrieren gereinigt werden.

Trägerfolien

Als Trägerfolien kommen dünne Kohlefilme oder Formvar- oder Kolloidumfilme in Frage, die zur Stabilisierung mit einer dünnen Kohleschicht bedampft sein können. In der Regel werden diese Trägerfilme auf Kupfer-„Trägernetzchen“ aufgebracht.

Negativkontrastierungsmethoden

Ziel aller Negativkontrastierungsmethoden ist es, das Objekt hell und durchstrahlbar vor einem dunkleren Hintergrund zu sehen. Feine Objektdetails sollen erkennbar sein, d. h., die Negativkontrastierungslösung muß alle Regionen der Objektoberfläche, auch Vertiefungen und feine Spalten, benetzen. Es gibt mehrere Verfahren, um dieses Ziel zu erreichen. Z. B. kann man eine Objektsuspension mit Negativkontrastierungslösung mischen, auf einen Trägerfilm überführen und dort eintrocknen lassen. Oder man kann einen Tropfen der Objektsuspension auf den Trägerfilm bringen, nach Anheften der Objekte die überstehende Flüssigkeit absaugen, mit Wasser oder Puffer nachwaschen und schließlich einen Tropfen Negativkontrastierungslösung auf den Trägerfilm setzen und nach kurzer Zeit absaugen. Im Film wird eine weitere Variante gezeigt: Die Objektpartikel diffundieren in einer Suspension oder Lösung, auf deren Oberfläche für kurze Zeit ein dünner Kohlefilm flottiert. Nach Anheftung einer ausreichenden Zahl von Objektpartikeln wird der Kohlefilm abgenommen, u. U. auf einer Wasser- oder Pufferoberfläche gewaschen und auf die Negativkontrastierungslösung überführt. Wasser oder Puffer werden dabei durch die Negativkontrastierungslösung ersetzt. Nach kurzer Zeit wird der Kohlefilm mit Hilfe eines Kupfer-Trägernetzchens aufgetupft und ist nach einem kurzen Trocknungsschritt im Elektronenmikroskop untersuchbar. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß durch die Flottierdauer der Kohlefolie auf der Objektsuspension die Partikeldichte auf der Kohlefolie optimal ein-

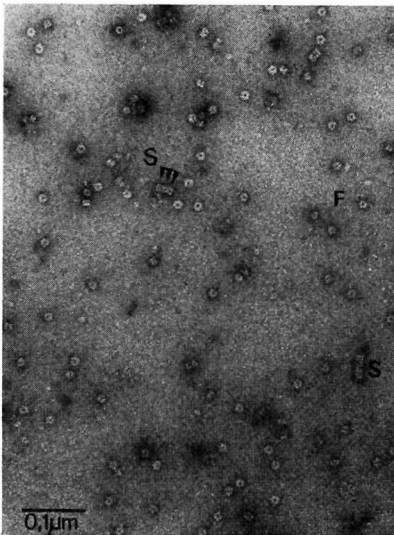
gestellt werden kann: Proteinkonzentrationen von ca. 500 Mikrogramm pro ml verlangen eine Flottierdauer von nur ca. 5—10 s, Proteinkonzentrationen von 50 Mikrogramm pro ml Zeiten von 35 bis 50 s (Erfahrungswerte mit Enzymmolekülen).

Fotografie negativkontrastierter Präparate

Negativkontrastierte Präparate liefern bei Anwendung der konventionellen Transmissions-Elektronenmikroskopie im Vergleich mit anderen Kontrastierungsverfahren die höchste Auflösung, d. h. die beste Beobachtbarkeit kleinster Strukturdetails im Objekt. Um diesen möglichen Informationsgehalt auszuschöpfen, werden negativkontrastierte Objekte meist nicht nur in der Übersicht, sondern auch bei höheren Primärvergrößerungen (ca. 40000 \times bis 80000 \times) fotografiert. Solche Negative erlauben bei 10facher Nachvergrößerung im Vergrößerungsgerät eine direkte Ausmessung feinsten Objektdetails an der methodisch bedingten Auflösungsgrenze mit einer Meßlupe.

Bildinterpretation

Bilder negativkontrastierter Objekte stellen den Betrachter vor eine methodisch bedingte Schwierigkeit. Da das Objekt beim Eintrocknen der Negativkontrastierungslösung allseitig kontrastiert wird, rührt natürlich der im elektronenmikroskopischen Bild beobachtete Kontrast von „Ober“- und „Unter“-Seite des Objekts her, stellt also das Ergebnis einer Überlagerung der Einzelkontraste zweier u. U. völlig unterschied-



Negativ-kontrastierte, isolierte Moleküle des Enzyms Glutamin-Synthetase aus dem Bakterium *Escherichia coli*. Jedes Enzymmolekül besteht aus 12 gleichen Untereinheiten, die zu je 6 zu einem Ring vereinigt sind. Jeweils 2 solcher Ringe bauen ein Enzymmolekül auf. Die Abbildung zeigt Enzymmoleküle in Flächenansicht (F) in Form von Ringen und in Seitenansicht (S) in Form von Scheibchen, die jeweils deutlich zu Zweiergruppen zusammengefaßt sind (Pfeile). (Originalaufnahme F. MAYER)

lich geformter Objektoberflächen dar. Aus diesem Grund muß die Bildanalyse sehr sorgfältig und, wenn möglich, unter Anwendung optischer Analyseverfahren wie lichtoptischer Diffraktion oder Densimetrie erfolgen.

Außerdem sind artifizielle, ebenfalls methodisch bedingte Objektveränderungen in Betracht zu ziehen. Z.B. kann die freiliegende Seite des Objekts durch den Trocknungsvorgang verformt werden (Wasserverlust), oder es können durch hohe lokale Salzkonzentrationen während der letzten Sekunden vor dem völligen Austrocknen des Objekts Deformationen des Objekts hervorgerufen werden. Schließlich ist mit einem Masseverlust des Objekts während der Betrachtung im Elektronenmikroskop zu rechnen.

Erläuterungen zum Film¹

Es gibt mehrere Methoden, die in elektronenmikroskopischen Präparaten zu einer Negativkontrastierung führen. Hier soll die Technik nach VALENTINE demonstriert werden. Objekte, bei denen eine Negativkontrastierung möglich ist, sind z.B. Aufschlüsse verschiedener Zellen, ganze Bakterien, Phagen oder Makromoleküle.

In kleine Plastikgefäße werden getrennt einpipettiert: die Objektsuspension, Wasser und Negativ-Kontrastierungslösung.

Negativ-Kontrastierungsmittel sind Uranylacetat, Phosphor-Wolframsäure und wäßrige Lösungen ähnlicher Schwermetallsalze.

Als Objektträger werden Kohlefilme verwendet, die im Hochvakuum durch Niederschlagen sublimierter Kohle auf einer Glimmerplatte entstanden sind.

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

Beim Eintauchen des Glimmerstücks in die Objektsuspension löst sich der Kohlefilm vom Glimmer ab. Gleichzeitig adsorbiert er die zu untersuchenden Objektpartikeln aus der Suspension.

Die Adsorptionszeit bestimmt die Partikelkonzentration und sollte mindestens 15 Sekunden dauern, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Überschüssige Suspension wird abgesaugt. — Die nicht adsorbierten Bestandteile der Suspension werden durch Wasser ausgewaschen.

Nachdem überschüssiges Wasser entfernt wurde, wird der Kohlefilm auf die Negativ-Kontrastierungslösung völlig abflottiert.

Mit der gereinigten Pinzette wird ein Objektträger aufgenommen und mit seiner rauhen Seite auf den Kohlefilm gelegt.

Das Trägernetz wird festgedrückt und überstehendes Kohlefilmmaterial abgestoßen.

Nun wird das Präparat mit der Pinzette zur Seite weggezogen, umgedreht und die Negativ-Kontrastierungslösung zwischen den Spitzen der Pinzette abgesaugt.

¹ Wortlaut des gesprochenen Kommentars.

Beim Anpressen des Präparates auf Fließpapier soll der größte Teil des Kontrastmittels gleichmäßig und konzentrisch abfließen.

Als Rest verbleibt ein dünner Film der Negativ-Kontrastierungslösung auf dem Objektträger. Trocknet sie mit dem Objekt zusammen ein, so entsteht der gewünschte Negativ-Kontrast, d.h. eine Dunkelfärbung des Untergrundes, während die abzubildenden Objektpartikeln im Elektronenmikroskop hell erscheinen.

Dieses elektronenoptische Bild zeigt Partikeln des isolierten Enzyms Glutamin-Synthetase aus *Escherichia coli* in zwei verschiedenen Projektionen: Die kreisförmigen Gebilde sind Enzympartikeln in Aufsicht, die zu Reihen aggregierten Strukturen sind Enzyme in Seitenansicht.

Literatur

- [1] ROBARDS, A. W.: Ultrastruktur der pflanzlichen Zelle. Thieme, Stuttgart 1974.
- [2] VALENTINE, R. C., B. M. SHAPIRO, and E. R. STADTMAN: Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *E. coli*. *Biochemistry* 7 (1968), 2143—2152.

Anschrift der Verfasser:

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

Dr. E. SPIESS, 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, 48 m, 4 ½ min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1975. Veröffentlichung aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen, Abteilung Mikromorphologie, Prof. Dr. F. MAYER, Dr. E. SPIESS, 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 Negativkontrastierung eines biologischen Objekts mit Uranylacetat.

Ein Kohleträgerfilm wird auf der Oberfläche einer Objektsuspension abflottiert. Die Objektpartikeln heften sich an seiner Unterseite an, werden durch Überführen des Kohlefilms auf Wasser gewaschen und anschließend

durch Flottieren des Films auf wässriger Uranylacetat-Lösung negativkontrastiert. Nach einem Trocknungsschritt kann der mit einem Kupferträgernetzchen aufgenommene Kohlefilm elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Summary of the Film

The film shows negative staining of a biological specimen by uranyl acetate. Specimen particles adsorb to the lower surface of a carbon support film floating on the specimen suspension. The adsorbed particles are washed by floating the carbon film on water. Negative staining of the adsorbed particles is performed by floating the support film on aqueous uranyl acetate solution followed by plotting dry the carbon support film now mounted on a copper grid.

Résumé du Film

Le film montre la coloration négative à l'acétate d'uranyle d'un spécimen biologique.

Sur la surface d'une suspension de particules on laisse flotter un film de support de carbone; les particules adhèrent au côté intérieur de ce film. Le film de carbone est ensuite déposé tout d'abord sur une surface aqueuse pour rincer les particules, puis sur une solution aqueuse d'acétate d'uranyle pour la coloration de ces mêmes particules. Après séchage, le film de carbone ramassé sur une grille de support de cuivre peut être examiné au microscope électronique.

Film C 1191 Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Negativkontrastierung

Ergänzung der Begleitveröffentlichung, Ausgabe 1976

English Version of the Spoken Commentary

There are several techniques for negative staining of electron microscopic specimens. The one demonstrated here was developed by VALENTINE. Specimens in which negative staining is feasible are: various cell contents, whole bacteria, phages or macromolecules. –

The following substances are pipetted separately into small plastic vessels: the sample suspension, water, and the negative staining solution.

Some examples of negative stains are: uranyl acetate, phosphotungstic acid, as well as aqueous solutions of related heavy metal salts.

Carbon films serve as specimen carriers. They are made by depositing carbon on to mica sheets in a high vacuum.

A piece of pre-cut mica is broken off with tweezers cleaned in petroleum ether.

On immersing the piece of mica in the sample suspension, the carbon film floats off. Simultaneously the film adsorbs the particles to be investigated.

The adsorption duration determines the concentration of particles, and it should last at least 15 seconds to achieve reproducible results. Superfluous suspension is soaked up. The particles of the suspension remaining unadsorbed are washed off with water.

After removal of surplus water, the carbon film floats freely on the surface of the negative staining solution.

With a clean pair of tweezers a grid is picked up and placed, rough side down, on the carbon film.

The grid is pressed firmly home and surplus carbon film broken off.

Now the specimen is pulled off sideways using the tweezers, – turned over, – and the surplus negative stain between the points of the tweezers is soaked up.

When pressing the preparation on to filter paper the majority of the contrast medium should be made to flow off evenly and concentrically.

A thin film of negative stain solution remains behind on the grid. If this is then dried with the specimen, the desired negative contrast stain is achieved, that is: a darkening of the background against which the particles of the sample appear in sharp contrast when imaged in the electron microscope.

This electron micrograph shows particles of the enzyme glutamine synthetase isolated from *Escherichia coli* in two different aspects. The circular bodies are enzyme particles seen end on; the elongated aggregations are the same viewed from the side.