

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

*Wissenschaftlicher Film C 1189/1976*

**Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden  
Herstellung einer Kunststoffträgerfolie**

Begleitveröffentlichung von

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

GÖTTINGEN 1976

Film C 1189

## **Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Herstellung einer Kunststoffträgerfolie**

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,

---

<sup>1</sup> Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 9 u. 10.

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. 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 Objektträgernetzen, 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 Siliziumdioxid 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 Kolloidumlösungen anwendbar. Ein Tropfen der Kolloidumlösung wird auf eine Wasserfläche gegeben, die Lösung breitet sich darauf aus; nach dem Verdunsten des Lösungsmittels bleibt ein Kolloidumfilm 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 Wasserfläche abflottiert werden, um Objektträgernetze befilmen 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 Hüllabdruicke 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 Wasserfläche 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 Objekträgern 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>

Als elektronenmikroskopische Objektträger sind kohleverstärkte Kunststoffolien auf Trägernetzen oder -blenden vielfach verwendbar. Die Folien werden durch Kunststofflösungen auf einem Glasobjektträger gebildet. Die zur Herstellung der Folien verwendeten Gefäße und die organischen Lösungsmittel müssen absolut trocken und sauber sein.

Der die Folie bildende Kunststoff wird in Konzentrationen von 0,2 bis 2% im Lösungsmittel gelöst. Dieser Ansatz wird in einen Tropftrichter gegossen. Ein sauberer Objektträger wird über einer Heizplatte getrocknet und noch warm in die Lösung im Tropftrichter eingestellt.

Beim Abkühlen des Objektträgers wird die Lösung inhomogen. Das Umrühren beseitigt diese Ungleichheiten in der Lösung.

Nach Öffnen des Hahns fließt die Lösung ab. Auf dem Glasobjektträger verbleibt ein Film. Aus ihm entsteht beim Verdunsten des Lösungsmittels die Kunststoffolie. Drei Parameter bestimmen ihre Stärke. Sie wird um so dicker: 1. je höher die Kunststoffkonzentration der Lösung ist; 2. je schneller die Ausflußgeschwindigkeit der Lösung ist, weil mehr Lösung am Objektträger haften bleibt; und 3. je kürzer die Verweilzeit im leeren Tropftrichter ist, da weniger von der am Objektträger verbliebenen Lösung abfließen kann. Der Glasobjektträger wird herausgenommen, über der Heizplatte getrocknet und in einem Becherglas verwahrt.

Auf eine Wasseroberfläche soll die Folie abflottiert werden. Diese Oberfläche wird gereinigt.

Ein Objektträger mit ausgehärteter Kunststoffolie wird dem Becherglas entnommen.

Mit dem in Petroläther gereinigten Messer werden auf beiden Seiten des Glasobjektträgers rechteckige Folienstücke ausgeschnitten. Die Ablösung der Folien von der Glasunterlage wird dadurch erleichtert.

Vorsichtig wird nun der Objektträger ins Wasser eingetaucht. Bekommt er Kontakt mit der Wasseroberfläche, so springt der Meniskus hoch und kriecht an den Schnittstellen zwischen das Glas und die beiden Kunststoffolien.

Beim weiteren Eintauchen schwimmen schließlich die Kunststoffolien auf die Wasseroberfläche ab.

Zur Veranschaulichung wird der Vorgang wiederholt. Dabei werden störende Reflexe von der Wasseroberfläche durch ein Polarisationsfilter unterdrückt. — Die Wasseroberfläche erscheint deshalb dunkel. Interferenzfarben geben Auskunft über die Schichtdicken der Folien.

Hier wird eine zu dicke, goldgelbe — unbrauchbare — Folie mit einer graufarbenen — guten — verglichen. Die Dicke der graufarbenen Folie beträgt etwa 25 nm.

Nach dem vorgesehenen Verwendungszweck der Folie wählt man aus einer Vielzahl von Trägerblenden und -netzen den passenden Typ aus. Materialien für diese Träger sind z.B. Platin, Gold, Nickel und am gebräuchlichsten Kupfer. Die Trägernetze haben eine glatte und eine aufgeraute Seite.

Die Folie soll nun mit Trägernetzen belegt werden. Aus einem Vorratsgefäß entnimmt man dafür eine Anzahl von Trägernetzen. Die Pinzette wird im Petroläther gereinigt.

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

Mit ihr greift man ein Trägernetz und legt es mit seiner rauhen Seite auf die Folie. Zunächst werden die vier Ecken der Folien belegt, um sie auf der Wasseroberfläche zu markieren.

Die Zwischenräume werden danach ausgefüllt, bis die Folie mit Trägernetzen belegt ist.

Ein Stück rauhes Papier wird durch Abklopfen staubfrei gemacht.

Bedeckt man mit diesem Papier die Folie mit den Objektträgern, so haften sie am Papier fest, sobald die Luft dazwischen verdrängt ist.

Dieses „Sandwich“ wird von der Wasseroberfläche abgenommen und umgedreht. Die Folie liegt nun auf den Trägernetzen; das Papier dient als Unterlage. Der mit befilmten Objektträgernetzen überzogene Papierstreifen wird zum Trocknen ausgelegt.

In einer Bedampfungsanlage wird dann auf die Kunststoffolie ein dünner Kohlefilm aufgedampft. Er stabilisiert die Folie und erhöht ihre Wärmeleitfähigkeit; dadurch werden unerwünschte lokale Ausdehnungen der Folie unter der Einwirkung des Elektronenstrahls im Mikroskop verringert.

Zwei Graphitstäbe werden in einer Verdampfungseinrichtung aufeinander justiert.

Bringt man im Hochvakuum die unter Spannung stehenden Graphitstäbe zum Kontakt, so werden sie aufgeheizt; Kohle sublimiert dann.

Eine Schutzkappe soll ein schnelles Verschmutzen des Rezipienten mit Kohle verhindern.

Auf einem Blindflansch wird das trockene Papier mit den Objektträgern festgeklebt.

Der Rezipient der Bedampfungsanlage wird belüftet.

Der Blindflansch mit den Objektträgern und der Verdampfer werden an sich gegenüberstehenden Armen des Rezipienten angebracht. Der Abstand der beiden voneinander beträgt etwa 20 cm.

Über diese Kabel wird der Verdampfer an den Transformator angeschlossen.

Der Rezipient wird auf einen Druck zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  Torr evakuiert; der Wert wird hier auf der mittleren Skala angezeigt.

Der Transformator wird eingeschaltet. Ein Strom von 100 Ampère fließt eine Sekunde lang bei jedem Kontakt der Graphitstäbe: Kohle verdampft. Auf der Kunststoffolie soll ein Kohlefilm von etwa 5 nm Dicke entstehen. Hierfür werden etwa 5 Verdampfungsimpulse benötigt.

Nach abgeschlossener Bedampfung wird der Rezipient belüftet.

Der Blindflansch mit den Objektträgern wurde vom Rezipienten abgenommen. Das Ergebnis der Bedampfung ist sichtbar, wenn ein befilmtes Trägernetz von der Papierunterlage abgenommen wird.

Die Objektträger werden in einer Petrischale bis zur Benutzung staubfrei verwahrt.

### 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, Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen, Abteilung Mikromorphologie, Grisebachstr. 8, 3400 Göttingen.

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

---

### **Angaben zum Film**

Der Film wurde 1976 veröffentlicht und ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Tonfilm, 16 mm, farbig, 103 m, 9 ½ 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 hat die Herstellung einer Formvarfolie nach der Ablaufmethode zum Thema. Die Herstellung der Folie, das Abflottieren der Folie auf Wasser, die Beurteilung ihrer Qualität, das Belegen der Folie mit Objektträgernetzen und das Abnehmen der befilmten Objektträgernetze von der Wasseroberfläche werden gezeigt. Verschiedene Objektträgernetztypen werden vorgeführt. Der Formvarfilm wird durch Aufdampfen von Kohle verstärkt: Die Vorbereitung der Bedampfungsanlage (Leybold-Heraeus EPA 100), der Bedampfungsvorgang sowie die Demonstration des Ergebnisses werden gezeigt.

### **Summary of the Film**

This film sequence shows the preparation of formvar plastic films on glass slides using the "flow out" method.

The stripping of the films on a water surface, the evaluation of quality by interference colours and the coating of support grids with such a plastic film are demonstrated.

Examples for support grids are shown.

For stabilization the formvar film on the grids is coated with carbon: the preliminary steps of the high vacuum evaporation plant (Leybold-Heraeus EPA 100) and the coating process itself are shown. A demonstration of the result is given.



### **Résumé du Film**

Le film montre la préparation d'un film de formvar par la méthode "d'écoulement". Nous voyons ensuite le film de support flottant à la surface de l'eau, puis comment la qualité d'un tel film peut être évaluée. Après quoi, des grilles de support sont déposées sur ce film de formvar, puis retirées: le film de formvar adhère alors à la surface de la grille.

Différentes grilles de support sont présentées.

Le film de support subit ensuite une évaporation au carbone qui a pour but de le stabiliser. Les dernières séquences du film montrent enfin la préparation de l'appareil d'évaporation (de la marque Leybold-Heraeus, EPA 100), l'évaporation proprement dite ainsi que le résultat de cette évaporation.

**Film C 1189 Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden  
Herstellung einer Kunststoffträgerfolie**

Ergänzung der Begleitveröffentlichung, Ausgabe 1976

---

**English Version of the Spoken Commentary**

Specimen holders for electron microscopy are carbon reinforced carrier films on grids or diaphragms. The films are made by coating a glass slide with a plastic suspension. The vessels for preparing the films and the organic solvents must be absolutely clean and free of water.

The plastic for making the film is dissolved in 0.2 to 2% solvent. This solution is poured into a dropping funnel. A clean slide is dried over a hot plate and while still warm it is immersed in the solution in the dropping funnel.

As the slide cools, the solution becomes inhomogeneous. Stirring will restore the uniformity of the solution again.

When the stopcock is opened, the solution flows out. A film remains behind on the slide. This plastic coating forms the carrier film after the solvent evaporates. Three factors determine its thickness: firstly, the concentration of the solution; secondly, the speed with which the solution flows out – the faster the thicker; and thirdly, the length of time spent in the empty dropping funnel – the shorter, the less solution can run off. The slide is taken out and dried over the hot plate. It is then stored in a beaker.

The film is to be floated off on the water surface. First this must be thoroughly freed from dust particles.

A slide with the hardened coating is taken out of the beaker.

A scalpel cleaned with petroleum ether is used to cut out rectangular sheets of film on either side of the slide. This makes it easier to separate the film from the glass mount.

The slide is now carefully lowered into the water. On contacting the surface, the glass attracts the meniscus, which creeps up at the cut edges between the slide and the two plastic films.

When the slide is immersed still further, the films finally float away on the surface of the water.

For the sake of clarity the procedure is repeated. Extraneous reflections on the water surface have been reduced by using a polarizing filter. – This is why the water surface appears dark. Interference colouring provides an indicator of the thickness of the films.

In this case a golden yellow, too thick and therefore useless film is compared with a grey one, which is acceptable. The thickness of the grey coloured film is about 25 nm.

According to the proposed application of the film, the appropriate diaphragms or grids are selected from the wide variety available. They may be made of platinum, gold, nickel, or most commonly, copper. The grids have a smooth and a rough side.

The film will now be covered with grids, a supply of which is first taken out of a storage phial. The tweezers are cleaned in petroleum ether.

They are used to pick up a grid and lay it with its rough side downwards on the film. The four corners of the film are covered first in order to mark its position on the water surface.

Then the intervening spaces are filled in, until the entire film is covered with grids.

A small strip of filter paper is freed from dust by tapping it.

The paper is laid on top of the film with the grids and, as soon as the air has been displaced, it adheres to the film.

This "sandwich" is now lifted off the water surface and turned over. The film now lies on top of the grids, the paper serving as a support. The strip of paper with the filmed grids is now laid aside to dry.

A thin coating of carbon will now be evaporated on to the plastic film in the vacuum coating unit. It strengthens the film as well as increasing its thermal conductivity. This helps to reduce the occurrence of unwanted local distortion of the film from the effects of the electron beam in the microscope.

Two graphite rods are adjusted to each other in the vacuum coating unit.

When voltage is applied to the electrodes and they make contact in a high vacuum, they heat up and carbon sublimates from them.

The electrodes are sheathed to prevent the recipient from being rapidly contaminated with carbon deposits.

The dried paper with the grids is stuck on to a blind flange.

The recipient of the vacuum coating unit is now ventilated.

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

The evaporating unit is now connected to the transformer by cable.

The recipient is evacuated to a pressure of between ten to the minus four and ten to the minus five torrs. This value is indicated on the centre scale.

The transformer is switched on. A current of 100 amps flows during each of the one-second-long contact pulses. Carbon sublimates. It is supposed to form a coating approximately 5 nm thick on the plastic film. About five pulses are required for this.

The recipient is ventilated after the coating process is over.

The blind flange with the grids is removed from the recipient. The results of evaporation coating are visible when a filmed grid is lifted off the paper backing. The grids are stored in a Petri dish dust-free until required.