

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Wissenschaftlicher Film C 1193/1976

**Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden
Spreitungstechnik zur Präparation isolierter DNA**

Begleitveröffentlichung von

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

Mit 1 Abbildung

GÖTTINGEN 1976

Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden Spreitungstechnik zur Präparation isolierter DNA

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 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. 11.

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

Die Nucleinsäuren DNA und RNA haben für Genetik und Stoffwechsel aller lebenden Systeme eine zentrale Bedeutung. Deshalb werden alle verfügbaren Methoden eingesetzt, um die verschiedensten Parameter dieser Stoffgruppe zu messen. Neben chemischen, biochemischen und genetischen Verfahren ist die Elektronenmikroskopie eine der wichtigsten Techniken zur Charakterisierung von Nucleinsäuren geworden. Im Gegensatz zu allen anderen Methoden ist es mit der Elektronenmikroskopie möglich, biophysikalische und biochemische Eigenschaften einzelner Moleküle zu messen. Die elektronenmikroskopischen Präparationstechniken für Nucleinsäuren erlauben die Beantwortung einer Reihe von Fragen: Neben der Bestimmung der Form isolierter Moleküle (linear, circular) lassen sich mit Hilfe von Längenmessungen Molekulargewichtbestimmungen der fraglichen Nucleinsäuren durchführen, da man voraussetzen kann, daß zwischen Länge und Molekulargewicht ein nahezu linearer Zusammenhang besteht. Weiterhin ermöglicht es die Elektronenmikroskopie, mit Hilfe der partiellen Denaturierung doppelsträngiger Nucleinsäuren Aussagen über die Verteilung der verschiedenen Basen entlang dem Molekül zu machen. Schließlich ist ein immer wichtiger werdendes Gebiet der Anwendung der Elektronenmikroskopie von Nucleinsäuren der Problembereich der Hybridisierungsversuche, d. h. der Untersuchung von Nucleinsäuren verschiedenen Ursprungs auf Basensequenzhomologien. Die Kombination dieser Techniken mit anderen Methoden ermöglicht inzwischen Aussagen über die Lokalisation von Genen auf bestimmten Nucleinsäuremolekülen.

Präparationsmethoden für Nucleinsäuren

Isolierte Nucleinsäuren sind anfällig auf Scherkräfte, denn es handelt sich bei ihnen um Moleküle, die im Verhältnis zu ihrer Länge extrem dünn sind. Diese Eigenschaft bringt es mit sich, daß Nucleinsäuren, wenn sie für die Elektronenmikroskopie nicht sachgerecht präpariert sind,

sehr starke Längenveränderungen erleiden können. Diese und ähnliche Artefaktbildungen konnten mit Hilfe der Proteinfilmtechnik, auch Kleinschmidt-Technik genannt, weitgehend ausgeschaltet werden. Das Prinzip dieser Präparationsmethode beruht darauf, daß die in Lösung vorliegenden Nucleinsäure-Moleküle nicht einfach aus einem Tropfen auf einem Objektträger eingetrocknet werden, wie das z. B. bei Bakterien gemacht werden kann, sondern daß sie durch Adsorption an einen monomolekularen Proteinfilm vor mechanischen Schädigungen geschützt werden. Anschließend werden sie unter Erhaltung dieses Zustands zusammen mit dem Proteinfilm auf einen geeigneten Präparateträger aufgebracht. Es gibt inzwischen mehrere Variationen dieser Proteinfilmtechnik, die im folgenden kurz besprochen werden. Nur eine dieser Methoden, nämlich die Spreitungsmethode, wird im Film gezeigt.

a. Spreitungsmethode

Auf einer gepufferten Salzlösung wird eine Mischung einer Lösung des Proteins Cytochrom c und der zu untersuchenden Nucleinsäure gespreitet. Zu diesem Zweck läßt man einen kleinen Tropfen der Mischung an einem schräg in die Salzlösung eingetauchten Glasobjektträger herunterlaufen. Sobald dieser Tropfen die Oberfläche der Salzlösung berührt, spreiten Cytochrom c und Nucleinsäure gleichzeitig. Anschließend wird ein kleiner Bereich des entstandenen Mischfilms durch Auf tupfen auf einen befilmten Objektträger übertragen. Die Nucleinsäure wird kontrastiert und ist anschließend im Elektronenmikroskop abbildbar.

b. Diffusionsmethode

Auf der Oberfläche einer Salzlösung, welche die zu präparierende Nucleinsäure enthält, wird ein monomolekularer Proteinfilm erzeugt. Zu diesem Zweck wird ein pulverisiertes basisches Protein, in der Regel Cytochrom c, mit Hilfe einer Nadelspitze mit der Lösungsoberfläche in Berührung gebracht. Das Protein spreitet sofort zu einem Film und denaturiert dabei. Als Richtwert für die einzusetzende Menge Cytochrom c gilt, daß 1 mg Protein eine Fläche von 1 μm^2 mit einem monomolekularen Film bedeckt. Nachdem dieser Film gebildet ist, können in der Lösung diffundierende Nucleinsäuremoleküle durch Adsorption an den Proteinfilm „eingefangen“ werden. Die anschließenden Schritte entsprechen denen der Spreitungsmethode.

c. Tröpfchenmethode

Diese Technik ist eine Mikroversion der Diffusionsmethode. Ihr Vorteil ist darin zu sehen, daß geringste Mengen von Nucleinsäuren (ca. 10^{-10} bis 10^{-11} Gramm) ausreichen, um aussagekräftige und reproduzierbare Meßwerte zu erhalten. Die Methode hat ihre Bezeichnung daher, daß

man kleine Tröpfchen (Volumen ca. 0,04 ml) auf eine wasserabstoßende Oberfläche, z.B. eine Teflonschicht, setzt. Diese Tröpfchen enthalten neben der zu präparierenden Nucleinsäure auch Cytochrom c und Formaldehyd und sind durch Lösen eines geeigneten Salzes auf eine bestimmte Ionenstärke eingestellt. Nucleinsäure und Cytochrom c diffundieren in diesem Tröpfchen gleichzeitig. Dabei wird Cytochrom c, das an die Tröpfchen-Oberfläche gelangt, denaturiert und bildet einen Proteinfilm, an den Nucleinsäuremoleküle adsorbieren können. Da Nucleinsäure und Protein entgegengesetzte Ladungen aufweisen, ist anzunehmen, daß die Nucleinsäure im Tröpfchen bereits mit Cytochrom c „besetzt“ ist, d.h. daß Nucleinsäure-Protein-Komplexe präpariert werden, die eine wesentlich größere Dicke als die reine Nucleinsäure haben. Die abschließenden Präparationsabschritte entsprechen denen der anderen Methoden.

Andere Nucleinsäure-Präparationsmethoden verzichten auf die Anwendung von Proteinen. Das ist vor allem dann wichtig, wenn spezifische Komplexe aus Nucleinsäure und daran anhaftenden Proteinen, z.B. Enzymen, abgebildet werden sollen. Diese Proteine würden sonst vom Cytochrom c überdeckt und nicht als individuelle Makromoleküle klar erkennbar sein.

Trägerfilme

Die zu verwendenden Objektträgerfilme müssen einige Voraussetzungen erfüllen: Sie müssen mechanisch ausreichend stabil sein; sie müssen so dünn sein, daß sie im Elektronenstrahl keine wesentliche Minderung des Kontrasts bewirken und sie müssen die optimale Adsorption des Protein-Nucleinsäure-Mischfilms erlauben. Diese Bedingungen werden erfüllt von dünnen Kohlefilmen und von Trägerfolien aus Kolloidium oder Formvar, die u.U. durch eine sehr dünne Kohlebedampfung verstärkt werden. Diese dünnen Filme werden vor der Benützung auf Metallträger (Platinblenden oder Kupfer-„Netzchen“) aufgebracht.

Kontrastierung

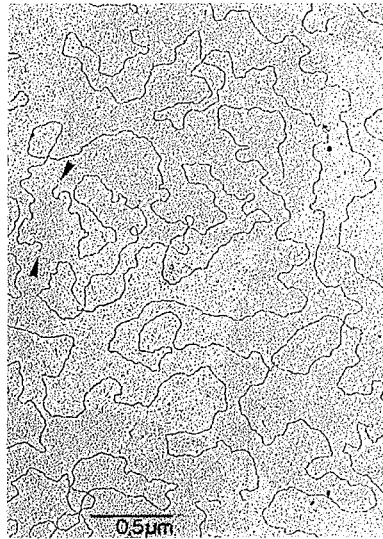
Nucleinsäuren haben wie die Mehrzahl biologischer Moleküle die Eigenschaft, im normalen Durchstrahlungselektronenmikroskop erst nach „Kontrastierung“ mit Schwermetallen deutlich sichtbar zu werden. Nur solche zusätzlich in das Präparat eingebrachte Schwermetalle streuen die im Elektronenmikroskop zur Abbildung benützten Elektronen in einem für die Kontrastentstehung gegenüber dem Untergrund nötigen Maß. Eine solche Kontrastierung von Nucleinsäuren kann durch eine Anfärbung mit gelösten Schwermetallionen oder durch Schwermetallbedampfung erreicht werden. Eine Metallbedampfung wird in der Regel unter sehr flachem Winkel (ca. 5—7°) entweder einseitig, von zwei in einem rechten Winkel zueinander stehenden Richtungen oder als „Rota-

tionsbedampfung“ im Hochvakuum durchgeführt. Im Film wird eine Rotationsbedampfung demonstriert. Zu diesem Zweck rotiert der Präparateträger, die Verdampfungsquelle steht still.

Da bei den beschriebenen Präparationstechniken wegen der Verwendung des Proteins Cytochrom c nicht die reinen Nucleinsäuren, sondern Nucleinsäure-Protein-Komplexe kontrastiert werden, erscheint naturgemäß die Nucleinsäure nicht als feine dünne Linie mit ca. 20—25 Å Dicke entsprechend dem Durchmesser doppelsträngiger DNA, sondern durch die Mitkontrastierung des rundum gebundenen Proteins wesentlich dicker. Daher kann die elektronenmikroskopische Auswertung bei relativ geringen Primärvergrößerungen (ca. 5000× bis 10000×) erfolgen.

Bildauswertung

Ob ein Nucleinsäuremolekül linear oder circular vorliegt, geht direkt aus der elektronenmikroskopischen Abbildung hervor. Bezüglich der Längenbestimmung und der Molekulargewichtsberechnung solcher Makro-



KLEINSCHMIDT-Spreitung isolierter DNA-Moleküle aus dem Bakteriophagen μ des Bakteriums *Escherichia coli*. Ein Molekül ist in seiner vollen Länge zu erkennen. Die Pfeile markieren die beiden Molekülenden.

moleküle darf angenommen werden, daß beide Parameter in einem nahezu linearen Zusammenhang stehen. Voraussetzung dafür ist selbstverständlich, daß die ausgemessenen Moleküle unter Bedingungen präpariert wurden, die keine lokalen Längenänderungen entlang dem Nuclein-

säuremolekül verursachen. Diese Voraussetzung ist bei den beschriebenen Präparationsmethoden weitgehend erfüllt. Der Faktor des Verhältnisses der gemessenen Länge zum Molekulargewicht ist abhängig von der Ionenstärke der Lösung, aus welcher die Nucleinsäure präpariert wurde. Aus systematischen Versuchen ist bekannt, daß z.B. bei Anwendung der Tröpfchenmethode bei einer Ionenstärke von $I = 0,2$ unter Verwendung von Ammoniumacetat die Länge von $1 \mu\text{m}$ doppelsträngiger DNA einem Molekulargewicht von $2,07 \times 10^6$ dalton entspricht. Aus ähnlichen Untersuchungen einsträngiger DNA geht hervor, daß DNA in dieser Form wesentlich empfindlicher auf Änderungen der Ionenstärke ist als doppelsträngige DNA.

Die Bestimmung der Länge eines abgebildeten Nucleinsäuremoleküls kann auf mehreren Wegen erfolgen. Da ein solches Molekül auf dem Bild nicht als gerader Strich, sondern als vielfach gewundene Linie zu erkennen ist, muß die Auswertungsmethode die genaue Erfassung der Länge einer solchen Linie ermöglichen. Man kann z.B. das elektronenmikroskopische Negativ stark vergrößert auf eine an der Wand befestigte Papierfläche projizieren, die Nucleinsäure nachzeichnen und dann mit einem Kartenmeßrädchen ausmessen. Andere Verfahren benutzen einen mit einem Computer gekoppelten Projektionstisch, auf dem mit einem „elektronischen Stift“ die Kontur des Nucleinsäuremoleküls nachgefahren wird. Der Rechner gibt bei entsprechender Programmierung in ausgedruckter Form die absolute Länge der gemessenen Moleküle an. Wegen nicht ganz vermeidbarer, methodisch bedingter Störungen in der an sich nötigen verzerrungsfreien Wiedergabe der Moleküllänge werden bei jeder Messung so viele Einzelmoleküle erfaßt, daß eine statistische Absicherung des Ergebnisses möglich ist.

Erläuterungen zum Film¹

In Lösung befindliche, isolierte DNA-Moleküle liegen als lineare oder circuläre, geknäuelte Makromoleküle vor. Um solche Moleküle einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zugänglich zu machen, werden sie in einem Spreitungsprozeß aus dem geknäuelten Zustand in eine Form übergeführt, die eine Messung ihrer natürlichen Längen erlaubt. Basisches Protein unterstützt diese Spreitung und stabilisiert ihr Ergebnis. Diese Spreitungstechnik wird Kleinschmidt-Spreitung genannt.

In ein Kunststoffröhrchen wurden Ammoniumacetatpuffer, das basische Protein Cytochrom c, DNA-Lösung und schließlich Wasser bis zur Einstellung definierter Konzentrationsverhältnisse einpipettiert. Dieser Ansatz wird vorsichtig gemischt.

Die Spreitung wird in einem teflonbeschichteten, massiven Aluminiumtrog ausgeführt. Der Trog wird mit Ammoniumacetatpuffer gefüllt. Die Ionenstärke dieses Puffers ist geringer als die des Spreitungsgemisches.

¹ Wortlaut des gesprochenen Kommentars.

Die Oberfläche der Pufferlösung im Trog muß vollkommen sauber sein. Zur Reinigung wird mit einem teflonbeschichteten Metallstab mehrfach abgezogen.

Ein fettfreier, sauberer Glasobjektträger wird in den Trog gestellt; er dient als Ablauframpe für die Spreitungsmischung.

Mit Talkum wird die Zone vor dem Objektträger dünn bestäubt. Der Spreitungsvorgang kann dann leicht verfolgt werden und das Gebiet mit gespreitem Material ist gut zu erkennen.

In eine Pipette wird Spreitungsgemisch aufgesaugt. Beim Ausfließen entsteht ein Tropfen an der Pipettenspitze. — Auf die Ablauframpe gebracht, läuft dieser Tropfen auf die Oberfläche der Pufferlösung im Trog ab. Es soll sich dabei ein gleichmäßiges, halbkreisförmiges Spreitungsfeld ausbilden, das mehrere Minuten erhalten bleibt.

Mit einer in Petroläther gereinigten Pinzette wird ein Objektträger aufgenommen. Als Objektträger werden bevorzugt perforierte Platinnäpfchen, die Siebenlochblenden heißen, verwendet. Ihre plane Seite ist mit kohleverstärkter Kollodiumfolie überzogen.

Das Spreitungsfeld wird an beliebiger Stelle mit dem Objektträger betupft. Dabei heften sich Proteinfilm und DNA dieser Stelle an den Objektträger an.

Der am Objektträger hängende Puffertropfen wird in Wasser entfernt. — Danach wird das Präparat in Alkohol entwässert. — Zum Entfernen des Alkohols wird es auf Fließpapier gelegt.

Auf diese Weise werden mehrere Präparate hergestellt. — Sie sollten von verschiedenen Stellen des Spreitungsfeldes stammen, weil bei jedem Abtupfen der Proteinfilm verletzt wird und außerdem die Flächenbedeckung der DNA und auch ihr Spreitungszustand nicht überall optimal sind.

Die für die elektronenmikroskopische Beobachtung benötigte Kontrastierung soll durch eine Rotationsbedampfung mit Platin-Iridium in einer Bedampfanlage vorgenommen werden.

Im elektro-thermischen Verdampfer werden die Elektroden durch einen Wolframstab verbunden. — Auf diesen Wolframstab wurde eine bestimmte Menge des zu verdampfenden Drahtes aus Platin-Iridium-Legierung aufgewickelt.

Nach dem Arretieren des Wolframstabes wird der Verdampfer mit einer Schutzkappe bedeckt.

Der Rezipient der Verdampfanlage wird belüftet und der Verdampfer am unteren Arm des Rezipienten angeflanscht.

Der Transformator, der den Verdampfungsstrom liefern soll, wird angeschlossen.

Die getrockneten Präparate werden mit Hilfe einer Doppelklebefolie auf einen Träger befestigt.

Der Präparateträger wird in den Manipulator gesteckt. Diese Vorrichtung erlaubt das Neigen des Präparatetellers in jeden gewünschten Winkel zur Verdampfungsquelle im Rezipienten. Darüber hinaus kann man den Präparateträger rotieren lassen.

Nach dem Anflanschen werden die Zentren von Präparateträger und Verdampfungsquelle aufeinander justiert.

Der Motor für die Rotation des Präparatetellers wird an die Stromversorgung angeschlossen.

Der über dem Verdampfer stehende Präparateträger wird um 5—7° gekippt. Dieser flache Bedampfungswinkel ist für die Kontrastierung der DNA-Moleküle notwendig, da sie sich nur sehr wenig über den Untergrund erheben.

Der Rezipient wird auf ein Vakuum von 10^5 Torr evakuiert.

Der Motor für die Rotation des Präparateträgers wird eingeschaltet.

Durch elektrischen Strom wird der Wolframstab aufgeheizt. Die Platin-Iridium-Legierung schmilzt und verdampft. Ein Teil des verdampften Materials trifft unter dem Bedampfungswinkel auf die Präparate und kondensiert an den DNA-Molekülen.

Aus dem belüfteten Rezipienten wird der Manipulator entnommen. Die Präparate werden vom Träger abgenommen und bis zur Untersuchung im Elektronenmikroskop in einer Petrischale staubfrei verwahrt.

Dieses elektronenoptische Bild zeigt isolierte Nucleinsäuren des Bacteriophagen *mu* von *Escherichia coli*. Die Länge solcher ungezerrter Moleküle ist auf einfache Weise meßbar; ihre durchschnittliche Länge beträgt 12,6 μm , das entspricht einem Molekulargewicht von etwa 26×10^6 dalton.

Literatur

- [1] BUJARD, H.: Electron microscopy of single-stranded DNA. *J. Molec. Biol.* **49** (1970), 125—137.
- [2] INMAN, R. B., and M. SCHNÖS: Partial denaturation of thymine- and 5-bromuracil-containing lambda DNA in alkali. *J. Molec. Biol.* **49** (1970), 93—98.
- [3] KLEINSCHMIDT, A. K., D. LANG, D. JACHERTS und R. K. ZAHN: Darstellung und Längenmessung des gesamten Desoxyribonucleinsäure-Inhaltes von T₂-Bacteriophagen. *Biochem. Biophys. Acta* **61** (1962), 857—864.
- [4] LANG, D., H. BUJARD, B. WOLFF and D. RUSSELL: Electron microscopy of size and shape of viral DNA in solutions of different ionic strength. *J. Molec. Biol.* **23** (1967), 163—181.
- [5] MAYER, F.: Elektronenmikroskopie von Nucleinsäuren. *Biologie in unserer Zeit* **5** (1972), 133—139.

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, 90 m, 8 1/2 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 elektronenmikroskopische Präparation isolierter DNA mit Hilfe der Spreitungsmethode und die Kontrastierung durch Metall-Rotationsbedampfung.

Die DNA wird mit Salzlösung und Cytochrom c gemischt und auf einen schräg stehenden Glasobjektträger gebracht. Cytochrom c und DNA spreiten auf der Oberfläche einer Salzlösung in einem teflonbeschichteten Trog, sobald das ablaufende Spreitungsgemisch die Salzlösung berührt. Mit Objektträgern wird das Spreitungsfeld an verschiedenen Stellen betupft. Dabei heften sich Proteinfilm und DNA dieser Region an den Objektträger an. Die Kontrastierung erfolgt im Hochvakuum unter sehr flachem Winkel durch eine Metall-Rotationsbedampfung.

Summary of the Film

The film shows the electron microscopic preparation of isolated DNA by the spreading technique followed by rotary shadowing.

DNA is mixed with salt solution and cytochrome c and applied to a tilted glass slide. Protein and DNA running down the glass slide are spreading at their contact with a salt solution in a teflon coated trough. The resulting protein-DNA film is picked up with grids. Rotary shadowing provides the contrast necessary for examination under the electron microscope.

Résumé du Film

Le film montre tout d'abord la préparation, par la méthode d'étalement, de molécules isolées de DNA, en vue de leur étude au microscope électronique, puis la réalisation de l'ombrage en rotation. Le DNA est mélangé à une solution saline et du cytochrome c, puis déposé sur une lame de verre maintenue inclinée. Dès que le mélange, s'écoulant le long de la lame de verre, vient en contact avec une solution saline contenue dans une cuve en téflon, le cytochrome c et le DNA s'étaient sur la surface de cette solution saline. Une fois le film protéine-DNA formé et occupant une surface adéquate, on le touche légèrement à différents endroits avec quelques grilles: le film adhère alors à la grille de support. L'ombrage est réalisé enfin par évaporation au métal sous incidence rasante et sous vide tout en faisant tourner la préparation sur elle-même.