Zeitschrift: Jahrbuch der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft. Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Annuaire de la Société Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative

Herausgeber: Schweizerische Naturforschende Gesellschaft

Band: 159 (1979)

Artikel: Elektronenmikroskopische Techniken auf der Basis der Gefrierfixation

Autor: Müller, Martin

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-90767

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Elektronenmikroskopische Techniken auf der Basis der Gefrierfixation

Martin Müller

Das häufigste Ziel einer elektronenmikroskopischen Untersuchung biologischer Objekte ist die Beschreibung von Strukturen im Hinblick auf deren Funktion. Im Bereiche der Zellbiologie geht es z. B. um die Frage, wieweit man aus dem elektronenmikroskopischen Bild eines Zellorganelles auf seinen momentanen Funktionszustand schliessen darf.

Die strukturelle Beschreibung von Zellen und Geweben ist als Basis für Struktur/Funktionsbeziehungen um so wertvoller, je genauer, je absoluter die Strukturen beschrieben werden können. Ziel elektronenmikroskopischer präparativer Weiterentwicklung muss deshalb die Suche nach Wegen sein, die Objekte möglichst detailreich und unverfälscht darzustellen.

Der erste Schritt dazu besteht im Abstoppen der physiologischen Prozesse sowie in der Stabilisierung der Strukturen, also in der Fixation. Bei den konventionellen Verfahren wird die Fixation auf chemischem Wege mit Hilfe von Aldehyden und Osmiumtetroxid durchgeführt. Im Hinblick auf die oben erwähnten Ziele ergeben sich daraus einige limitierende Probleme: Die Fixation verläuft relativ langsam und nicht überall in der Zelle gleichzeitig. Durch Veränderungen der Permeabilität der Membranen entstehen neue osmotische Verhältnisse, welche die Strukturen beeinflussen. Zudem können die Membranen diffusible Ionen und Makromoleküle nicht mehr in ihren ursprünglichen Zellkompartimenten zurückhalten. Zellorganelle, wie Mikrotobuli und andere Makromoleküle, werden unter dem Einfluss der Fixationsmittel depolymerisiert.

Im Laufe der Zeit haben die Wissenschaftler gelernt, die chemischen Fixationsbedingungen einigen Fragestellungen optimal anzupassen.

Gefrierfixation

Als Alternative zur chemischen Fixation bietet die Gefrierfixation einige Vorteile, da sie die ursprüngliche Organisation der Zellkomponenten beibehält und da sie sehr schnell erfolgt, also keine strukturellen und funktionellen Änderungen während der Fixation stattfinden. Die strukturelle Integrität wird jedoch nur dann aufrechterhalten, wenn es gelingt, das biologische Material so schnell einzufrieren, dass dabei nur Mikroeiskristalle (vitrifiziertes Eis) in der Grösse von 10–15 nm gebildet werden. Langsameres Einfrieren führt zu grösseren Eiskristallen, während deren Bildung sich die wässrige Phase von den darin gelösten Stoffen abtrennt: Kleinere Zellorganelle, Makromoleküle, Salze u. ä. werden an die Peripherie der Eiskristalle gedrängt und dort konzentriert, kleinere Zellorganelle werden unkenntlich gemacht, grössere deformiert.

Die notwendigen hohen Einfriergeschwindigkeiten (5000 bis 10000 °C/sec.) können nur unter bestimmten Bedingungen erreicht werden. Die Wärme kann der Probe nur durch die Oberfläche entzogen werden. An der Oberfläche ist die Gefriergeschwindigkeit zwar sehr hoch, die schlechte Wärmeleitfähigkeit des Wassers reduziert jedoch die Zone, in der die zur Erstarrung im mikrokristallinen Zustand notwendige Gefriergeschwindigkeit erreicht werden kann, auf 3–5 µm. Unter optimalen Bedingungen (Präparatform, verwendetes Kühlmittel, Masse der Objektträger, Instrumentation) kann diese Schicht auf etwa das Fünf- bis Zehnfache erweitert werden. Grössere Proben (z. B. Gewebe) können nur gefrierfixiert werden, wenn die physikalischen Eigenschaften des Wassers verändert werden. Dies kann man durch Zugabe von Gefrierschutzmitteln (Glycerin, Ethylenglycol, Dimethylsulfoxid, Methanol u. ä.) erreichen (Moor und Müh-

lethaler 1963). Es kann jedoch gezeigt werden, dass die Zugabe von Gefrierschutzmitteln z.B. zur Umorganisation von Intramembranpartikeln führen kann (Niedermeier und Moor 1976). Bei Mitochondrien kann schon bei geringen (7%) Zugaben von Glycerin ein Absinken der Atmungsrate festgestellt werden, und das elektronenmikroskopische Bild zeigt, dass sich die innere und die äussere Mitochondrienmembran vollständig voneinander getrennt haben (Marti 1977). Derartige Einflüsse der Gefrierschutzmittel lassen sich teilweise durch chemische Vorfixierung (mit Glutaraldehyd) verhindern (Edelmann und Morgenstern 1979). Dabei führt man jedoch wieder die eingangs erwähnten, unerwünschten Strukturveränderungen ein.

Eine andere, rein physikalische Methode zur Veränderung der Eigenschaften des Wassers besteht im Einfrieren der Proben unter hohem Druck (2000 bar) (Moor 1971). Dadurch wird der gleiche Effekt erzielt wie durch die Zugabe von etwa 20% Glycerin. Bis zu 300 µm dicke Proben können so vitrifiziert werden.

Zur Herstellung optimal gefrorener Präparate von biologischem Material, das als dünne Schicht (10–40 µm) präpariert werden kann (Einzelzellen, Mikroorganismen, Zellorganelle, Membranvesikel etc.), haben wir die Propan-jet-Gefrierapparatur entwickelt (Müller et al. 1980). Dabei wird eine Suspension als dünne Schicht zwischen zwei sehr leichte Kupferobjektträger gebracht. Dieses Sandwich (Fig. 1) wird sodann zwischen die Düsen des Propan-jet-Gefrierers gebracht und gleichzeitig von beiden Seiten mit flüssigem Propan (−185 °C) beschossen. Dadurch werden Abkühlgeschwindigkeiten von ~10000 °C/sec. erreicht, was mit hoher Reproduzierbarkeit zu vitrifizierten Präparaten führt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden: Biologisches Material kann durch einfaches Eintauchen in ein flüssiges Kältemittel maximal 5 µm von der Oberfläche objekteinwärts mikrokristallin eingefroren werden. Durch optimierte Instrumentation (Propan-jet-Gefrierer) kann diese dünne Schicht auf ca. 50 µm ausgedehnt werden. Für grössere Objekte müssen durch hohen Druck während des Gefriervorganges die physikalischen Eigenschaften des Wassers verändert werden.

Solcherart gefrorene Proben können mit Hilfe der Gefrierätzung, sowie der Gefriersubstitution für die Analyse im Elektronenmikroskop vorbereitet werden.

Gefrierätzung

Bricht man die gefrorenen Sandwiches (Fig. 2) bei tiefen Temperaturen im Hochvakuum auf, so verläuft der Bruch durch die spröde, wässrige Schicht auf eine energetisch möglichst günstige Weise, am häufigsten durch den hydrophoben Teil der Membranen. Durch Beschattung und Replikation kann wichtige Information über den Bau der Membranen erhalten werden. Die Gefrierätztechnik kann als rein physikalische Technik angesehen werden. Sie spielt deshalb

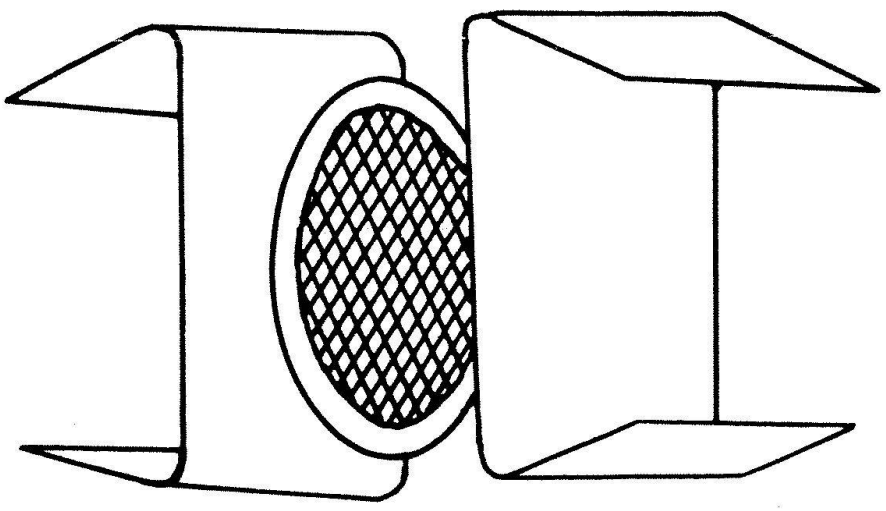


Fig. 1 zeigt, wie die Präparate zum Einfrieren im Propan-jet-Gefrierer vorbereitet werden. Ein normales Objektträgernetzchen (Ø 2,3 mm) wird in die zu untersuchende Suspension eingetaucht und zwischen zwei Kupferplättchen (0,08 mm dick) gebracht. Es werden ca. 1–2 µl Suspension benötigt. Das Objektträgernetzchen dient als Abstandhalter zwischen den Kupferplättchen, so dass immer eine wässrige Schicht konstanter Dicke eingefroren werden kann (Fig. 2).

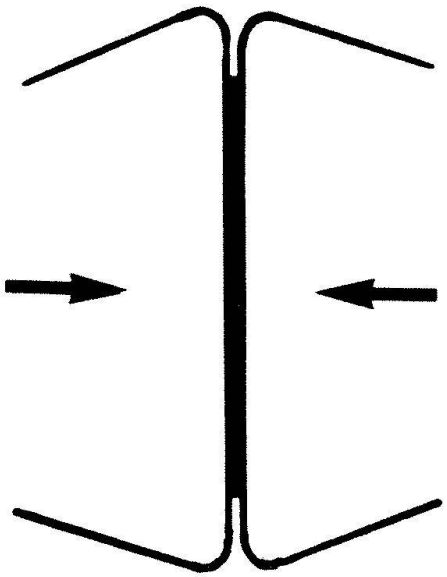


Fig. 2 zeigt das Präparatsandwich, das, zwischen die Düsen des Propan-jet-Gefrierers gebracht, beidseitig mit flüssigem Propan (−185°C) beschossen wird (Pfeil). Werden die beiden Sandwichhälften im Hochvakuum aufgebrochen, können die Objekte mit Hilfe der Gefrierätztechnik analysiert werden. Im Substitutionsmedium aufgebrochen, können die Proben mit Hilfe der Gefriersubstitution für die Dünnschnittechnik vorbereitet werden.

eine besonders wichtige Rolle als Kontrolltechnik bei der Ausarbeitung neuer Untersuchungsmethoden. Die Durchführung einer Gefrierätzung sowie der aktuelle Stand der Technik wurden anschaulich beschrieben von W. Niedermeier (1977).

Gefriersubstitution

Auf rein physikalische Art gefrierfixierte Proben können mit Hilfe der Gefriersubstitution zur Einbettung in Epoxidharze und damit zur Verarbeitung mit der Dünnschnitttechnik vorbereitet werden. Bei tiefen Temperaturen wird dabei das Eis unter gleichzeitiger chemischer Fixierung der unterkühlten Strukturen durch ein organisches Lösungsmittel aufgelöst, also entwässert und zur Einbettung in die hydrophoben Epoxidharze vorbereitet. Die Gefriersubstitution, eine alte, aus der Lichtmikroskopie stammende Technik, gewinnt seit dem Zurverfügungstehen verbesserter Gefrierfixationstechniken zunehmend an Bedeutung. Die erfolgreiche Durchführung einer Gefriersubstitution hängt vom Erfüllen folgender Bedingungen ab:

Die Substitutionstemperatur muss so tief sein, dass keine Rekristallisation, kein Eiskristallwachstum in der ursprünglich mikrokristallin gefrorenen Probe stattfindet. Diese kritische Temperatur (Rekristallisationstemperatur) liegt bei biologischen Objekten im allgemeinen bei −80°C bis −95°C (Moor et al. 1973).

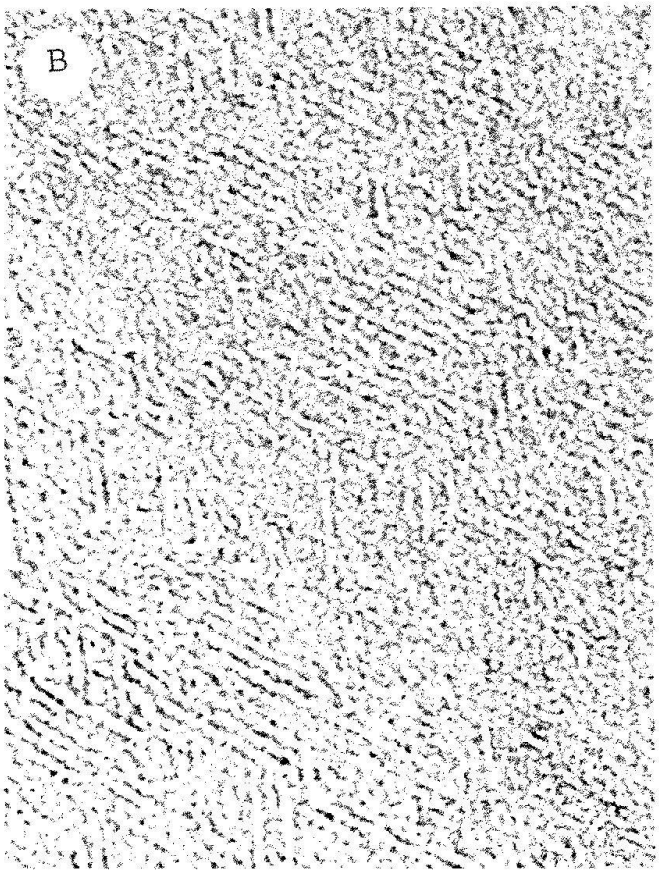
Das Substitutionsmedium muss als Basis ein organisches Lösungsmittel haben, das bei diesen tiefen Temperaturen Eis auflösen kann. Aceton, das meistens verwendet wird, kann bei −80°C innerhalb zwei Tagen etwa 2% Wasser aufnehmen (Van Harreveld et al. 1965). Die Substitution eines normalen Präparates kann 1–2 Wochen dauern, was bei der Verwendung von Methanol bei derselben Temperatur nur einige Stunden dauert. Die Substitution in Aceton kann praktisch nicht vollständig bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden. Sie wird meistens vollendet durch Erwärmen der Proben auf Raumtemperatur. Bei dieser Temperatur löst Aceton etliche Membranlipide heraus. Im Gegensatz dazu kann die Substitution mit Methanol bei tiefsten Temperaturen vollständig durchgeführt werden, so dass die Proben mit Ausnahme des Einbettungsvorganges immer unter ca. −20°C bleiben.

Durch Zusätze von Aldehyden, Osmiumtetroxid und Uranylionen können die Strukturen weiter stabilisiert werden. Während die Uranylionen vermutlich schon bei tiefen Temperaturen wirksam sind, reagiert Osmiumtetroxid mit ungesättigten Lipiden bei −30°C erst langsam. Die Einbettung ist das momentan noch grösste Problem, da während der Infiltration des Plastiks und der Polymerisation Temperaturen über 0°C angewendet werden müssen. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch Möglichkeiten der Polymerisation bei −30°C (Carlemalm et al. 1980).

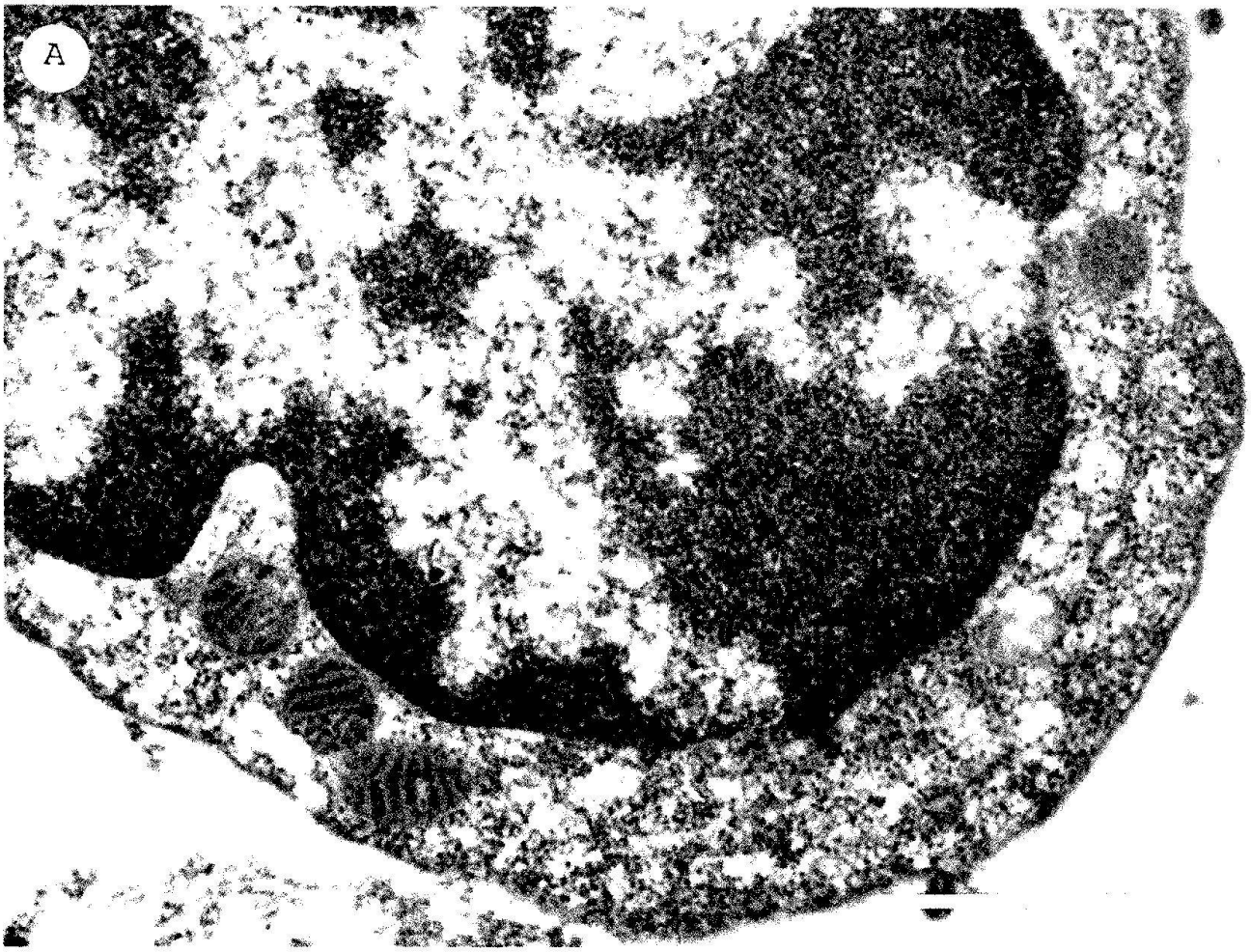
Seit zwei Jahren haben wir mit dem nachfolgenden Rezept gute Ergebnisse mit Geweben, Mikroorganismen, Liposomen und Zellorganellen erzielt. Das Substitutionsmedium

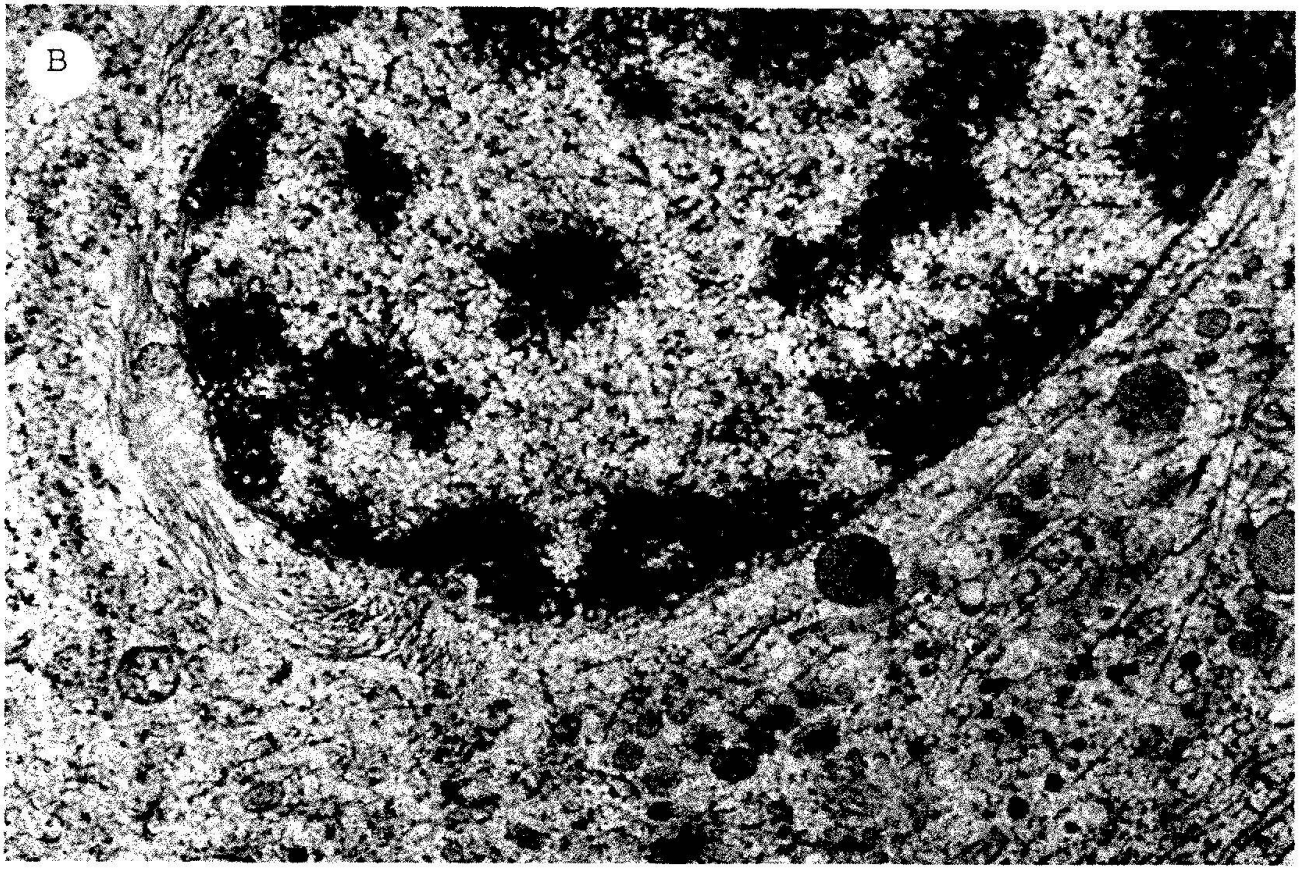
Fig. 3. A zeigt die Gefrierätzung einer Bacillusspore. Die Gefrierbruchaufnahme (1B) zeigt, dass die den Sporenkern umgebenden Membranen eine periodische Struktur aufweisen. Dank der Gefriersubstitution kann diese Periodizität auch im Querschnitt (1C) analysiert werden. Die Balken entsprechen 200 nm.

A


B

C


A


B

besteht aus Methanol (Merck, p.a.) enthaltend 0,5% Uranylacetat, 3% Glutaraldehyd und 1% Osmiumtetroxid. Die schnellgefrorenen Proben (~2 µl) wurden in 1 ml Substitutionsmedium bei −85°C bis −95°C gebracht und da 6 bis 8 Stunden inkubiert. Sodann wurde die Temperatur für 6 bis 8 Stunden auf −60°C erhöht. Nach weiteren 6 bis 8 Stunden bei −30°C wurde das Substitutionsmedium durch kaltes (−30°C) wasserfreies Aceton ersetzt. Das Aceton wurde bei −30°C durch 30% Araldit/Epon in Aceton ersetzt und zur Impregnation in den Kühlschrank (−4°C) gebracht. Die Polymerisation erfolgte bei 60°C. Um die Gefriersubstitution als Routinemethode einzusetzen, haben wir einen Substitutionsautomaten gebaut, der für drei frei wählbare Temperaturen während frei wählbaren Zeiten von 1–10000 Minuten vorprogrammiert werden kann.

Fig. 3 und 4 zeigen einige Ergebnisse auf der Basis der Gefrierfixation.

Der Vorteil der Gefriersubstitution liegt darin, dass jede Probe identisch verarbeitet werden kann. Auf der Basis der Gefrierfixation entfällt die Notwendigkeit, die Osmolarität des verwendeten Fixationsgemisches den individuellen Objekten anzupassen. Zudem können identisch fixierte Proben mit Gefrierätzung und Gefriersubstitution vergleichend analysiert werden.

Fig. 4 vergleicht konventionell chemisch fixierte Lymphocyten (A) mit Lymphocyten, die im Propanstrahl gefroren und anschliessend gefriersubstituiert (B) wurden. Auffallend ist die stark verbesserte Strukturerhaltung der Cytoplasmakomponenten im Falle der gefriersubstituierten Lymphocyten. Die Balken entsprechen 1 µm.

Literatur

Moor H. und Mühlethaler K. 1963: J. Cell. Biol. 17, 609–628.

Niedermeier W. und Moor H. 1976: 6th Europ. Congr. E.M., Jerusalem, P. 108.

Marti Th. 1977: Diplomarbeit ETH-Zürich, Inst. f. Zellbiologie.

Edelmann L. und Morgenstern E. 1979: Mikroskopie (Wien) 35.

Moor H. 1971: Phil. Trans. Roy. Soc. London 261. 121.

Müller M., Meister N. und Moor H. 1980: Balzers Report BB 800 011 DE.

Niedermeier W. 1977: Biologie in unserer Zeit 6. 178.

Moor H. 1973: In E.L. Benedetti und P. Favard Ed., Paris, 11.

Van Harreveld A., Crowell J. und Malhotra S.K. 1965: J. Cell. Biol. 25, 117.

Carlemalm E., Villiger W. und Acetarin J.D. 1980: USGEB-Tagung.

Anschrift des Verfassers:

Dr. M. Müller
Labor für Elektronenmikroskopie I ETH Zürich
Universitätsstrasse 2
CH-8092 Zürich