

Diss. ETH Nr. 7647

BEITRÄGE ZUR VERBESSERUNG  
DER OBERFLÄCHENINFORMATION  
IN DER RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE  
BIOLOGISCHER OBJEKTE

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines

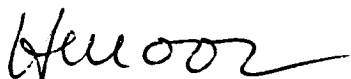
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Paul Walther  
dipl. Natw. ETH  
geboren am 2. März 1956  
von Oberentfelden (AG)



Prof. Dr. H. Moor, Referent  
Dr. M. Müller, Korreferent

1984

## ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von Gefrierpräparationen und mit Immunmarkierung wurden Wege gesucht, um die Oberflächeninformation in der hochauflösenden Rasterelektronenmikroskopie biologischer Objekte zu verbessern.

Die Probleme von Gefrierfixation und Gefriertrocknung wurden an verschiedenen Objekten untersucht: Es konnte gezeigt werden, dass schlechte Einfrierraten zu den gleichen Artefakten führen, wie sie aus Gefrierätzung und Gefriersubstitution bekannt sind. Die Schrumpfungsartefakte während der Gefriertrocknung konnten reduziert werden, wenn die Präparate vor dem Trocknen gefriergebrochen wurden.

Mit einer optimierten Gefriertrocknung konnten bei den untersuchten Proben (Hefezellen und liposomenmarkierte Erythrozyten) die Oberflächenstrukturen wesentlich besser erhalten werden als mit Trocknung über dem kritischen Punkt, wobei die schonendere Entfernung des Wassers eine entscheidende Rolle spielte.

Die Immunmarkierung ermöglicht die Lokalisation von Makromolekülen im Elektronenmikroskop. Zur Markierung der Antikörper wurde die Protein-A-Gold-Methode angewandt. Dabei stand die Frage im Zentrum, wie die Erkennbarkeit der Goldkolloide auf Oberflächen von ganzen Zellen verbessert werden kann. Die besten Resultate erhielten wir, wenn zur Lokalisierung der 15 nm Goldpartikel ein materialabhängiges Rückstreusignal und zur hochauflösenden Darstellung der Oberflächenstrukturen das stark topographieabhängige Sekundärelektronensignal verwendet wurde. Zur Detektion der rückgestreuten Elektronen wurde ein hochempfindlicher Einkristalldetektor aus Yttrium-Aluminium-Granat (Aurata, 1978) verwendet. Wenn man bei der Präparation auf die Einführung von zusätzlichen Schwermetallen verzichtete und das Präparat zur Erhöhung der Leitfähigkeit mit Kohle bedampfte, konnten bei guter Oberflächenauflösung 15 nm Goldpartikel quantitativ erfasst werden.

Die entwickelten Methoden wurden an biologischen Fragestellungen erprobt.

-Mit Gefrierpräparationen konnten auf der Zelloberfläche von Schizosaccharomyces pombe und Candida tropicalis Veränderungen

der harchenartigen Strukturen als Funktion von Medium und Wachstumsphase dargestellt werden.

-Mit Hilfe der Immunmarkierung gelang es, Acetylcholinesterase - ein Protein, das auf der Erythrozytenoberflache in nur geringer Konzentration vorliegt - zu lokalisieren.

-Auf Schizosacharomyces pombe wurde die saure Phosphatase markiert, wobei mit der presentierten Methode, trotz der stark strukturierten Oberflache, eine einwandfreie Erfassung der 15 nm Goldpartikel bei guter topographischer Auflosung moglich war.

## SUMMARY

The goal of this work was to improve the surface information of biological specimens using the scanning electron microscope. This was achieved by freeze-preparation methods and by immunolabelling.

Some aspects of cryofixation and freeze-drying were investigated on different specimens. It was shown that insufficient freezing rates lead to the same artifacts as known by freeze-etching and freeze-substitution. The volume changes during freeze drying were reduced when cryofractured samples were used.

Yeasts and red blood cells, labelled with liposomes, were freeze-dried according to an optimized method. The surface structures revealed better biological information compared to critical point dried samples.

Immunolabelling allowed the localization of macromolecules in the electron microscope. We used the protein A gold method to visualize the antibodies. The most important point was an unambiguous and quantitative detection of the small 15 nm gold particles on the surface of whole cells in the SEM. In the secondary electron mode a distinction between the gold particles and organic structures was hardly possible; this mode however gave a good surface information. Because of the material dependent signal preferentially backscattered electrons were used to identify individual gold particles in the SEM. We used a YAG (cerium doped yttrium aluminum garnet) single crystal annular scintillator mounted directly below the objective pole piece. No heavy metals beside the gold particles were introduced during specimen preparation. Thus the combination of the high resolution surface image and the material dependent backscattered electron image provided an accurate localization of the surface antigens.

This approach was applied on several specimens:

-The cell wall of Schizosaccharomyces pombe and Candida tropicalis showed hair-like structures when it was prepared by freeze-preparation methods. This hair-like structures changed as a function of medium condition and growth-phase.

-Acetylcholinesterase, a membrane protein of very rare occurrence was labelled on the surface of red blood cells.

-In order to localize individual gold marker also on cells with a more complex surface, we labelled the cell surface of Schizosaccharomyces pombe with an antibody specific against the protein moiety of the highly glycosylated cell surface acid phosphatase.

#### ABKUERZUNGEN

ACHE	Acetylcholinesterase
BSE	rückgestreute Elektronen
C	Celsius
eV	Elektronenvolt
keV	Kiloelektronenvolt
kV	Kilovolt
mbar	Millibar (1 mbar = 0.75 Torr)
nm	Nanometer (1 nm = $10^{-9}$ m)
Pa	Pascal (1 Pa = $7.5 \times 10^{-3}$ Torr)
PBS	phosphate-buffered saline
SE	Sekundärelektronen
SEM	Rasterelektronenmikroskop
STEM	Rastertransmissionselektronenmikroskop
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
V	Volt
$\mu$ m	Mikrometer (1 $\mu$ m = $10^{-6}$ m)