



Doctoral Thesis

Kryo-Ultramikrotomie hochdruckgefrorener pflanzlicher und mikrobieller Proben ein Vergleich mit konventionellen Kryo-Präparationsverfahren

Author(s):

Michel, Martin

Publication Date:

1991

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000617562> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

9. Dez. 1991

Diss. ETH Nr. 9548

**Kryo-Ultramikrotomie hochdruckgefrorener pflanzlicher
und mikrobieller Proben; ein Vergleich mit
konventionellen Kryo-Präparationsverfahren**

Abhandlung zur Erlangung des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von:

Martin Michel
dipl. Natw. ETH
geboren am 12. Juni 1960
von Brienz (BE)

Angenommen auf Antrag von:

Referent:

Prof. Dr. H. Moor

Korreferenten:

Prof. Dr. J. Dubochet

Dr. M. Müller

1991

Projekt und Leitung:

Dr. M. Müller

Zusammenfassung

Das Einfrieren von zellulärem Wasser in amorphem Zustand (Vitrifikation) ist ideal zur Darstellung wässriger Proben für die Elektronenmikroskopie, da der Charakter der flüssigen Phase auch im Festkörper erhalten bleibt. Ist dies nicht der Fall, bilden sich Eiskristalle und es findet eine Trennung (Segregation) der Zellflüssigkeit in reines Eis und gelöste Zellinhaltsstoffe statt; die ursprüngliche Zellstruktur wird dadurch zerstört. Die Möglichkeit, dicke Proben eiskristallfrei einzufrieren, ergab sich durch die Anwendung der Hochdruckeinfrieremethode. Zur Optimierung des Druck- und Kältetransfers wurden die Objekte mit 1-Hexadecen, einem osmotisch inaktiven Paraffinöl mit hoher Viskosität (im Vergleich zu Wasser) und niedriger Oberflächenspannung umgeben. Derart hochdruckeingefrorene Proben wurden mittels der Gefriersubstitution, der Gefrierbruchmethode und der Direktabbildung von Kryoschnitten im Elektronenmikroskop analysiert.

Mit Hilfe der Gefriersubstitution, welche die Vorteile der Gefrierfixation (Entwässerung in Aceton bei tiefen Temperaturen und gleichzeitige chemische Fixation mit Osmiumtetroxid) mit denen des Dünnschneidens kombiniert (Einbettung in Epon/Araldit bei 277 K), wurden hochdruckgefrorene "Golden delicious" Apfelblätter, Gerstenprotoplasten, *Venturia inaequalis*, Hefen, und *Escherichia coli* untersucht. Alle Proben wiesen eine gute Strukturhaltung ohne sichtbare Segregationsmuster auf. Mit gefrier-substituierten Apfelblättern wurden ebenfalls gute Resultate bei nachfolgender Einbettung in Lowicryle bei tiefen Temperaturen (243 K) erzielt.

Mögliche strukturelle Veränderungen während der Gefriersubstitution, verursacht durch chemische Fixantien, Lösungs- und Einbettungsmittel, konnten nicht ausgeschlossen werden. Die Ueberprüfung der Einfrierqualität wurde daher mit rein physikalischen Methoden durchgeführt; mittels Gefrierbruch bei sehr tiefen Temperaturen (zur Vermeidung der Rekristallisation bei vitrifizierten Proben) konnte eine gute Strukturhaltung von Apfelblättern nachgewiesen werden. Die Gefrierbruchmethode hat aber den Nachteil, dass die Bruchfläche willkürlich verläuft, und Schädigungen der Zellstrukturen durch kleinste Eiskristalle nicht erkannt werden können.

Mit Hilfe der Direktabbildung von Gefrierschnitten im Elektronenmikroskop liess sich bei Apfelblatt sowohl die Ultrastruktur als auch der Zustand

des verfestigten Zellwassers eindeutig bestimmen. Diese Methode eignete sich daher als Referenzverfahren zur Bestimmung von Veränderungen, welche während des Einfrierens oder durch Lösungs- und Einbettungsmittel während der Gefriersubstitution entstehen. Gute Kryoschnitte wurden durch die Optimierung der Schnittbedingungen (Temperatur, Schnittgeschwindigkeit, Probenfixierung) und die Reduktion der elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen dem Schnitt und der Messeroberfläche erhalten. Bei Glasmessern wurde dazu die Messeroberfläche mit einer dünnen Eisschicht überzogen. Bedeutend dünnere Schnitte liessen sich mit 45-Grad-Kryo-Diamantmessern und dem Einsatz einer Ionisationselektrode herstellen. Das Ionisationsgerät mit einer Nenn-Ausgangsspannung von 8 kV erzeugt mittels einer Elektrode positiv und negativ geladene Ionen. Diese Ionen neutralisieren die elektrostatischen Kräfte zwischen dem Schnitt und der Messeroberfläche. So liessen sich bei ultradünnen Kryoschnitten die Artefakte wie "Crevasses" und Messermarken vollständig vermeiden. Die Kompression konnte durch die Verwendung eines 30-Grad-Kryo-Diamantmessers reduziert werden.

Der Gebrauch eines Zeiss EM 902 Energiefiltermikroskops erlaubte die Abbildung mit nur elastisch gestreuten Elektronen und verstärkte daher vor allem bei dicken Gefrierschnitten den Probenkontrast. Der sichtbare Strahlenschaden konnte aufgrund der minimalen Dicke der Schnitte erheblich reduziert werden. Elektronenbeugungsexperimente an Gefrierschnitten von Apfelblattgewebe ergaben immer ein für vitrifiziertes Wasser typisches Diffraktogramm mit diffusen Ringen.

Summary

Vitrification of cellular water is an ideal preparation method for morphological studies since the character of the liquid phase is maintained. If the cells are frozen in a non-vitreous state segregation of the cellular liquid into ice and cellular components takes place due to ice crystal growth and the native ultrastructure of the cell is thereby destroyed. Vitrification of thick specimens was made possible by the application of high pressure freezing. The transfer of cold and pressure to the specimen is optimized by immersion of the samples in 1-hexadecene, a chemically inert, hydrophobic, and highly viscous (compared to water) paraffin oil with a low surface tension. High pressure frozen specimens can be further processed for electron microscopic analysis by freeze-substitution, freeze-fracturing and cryomicroscopy of frozen-hydrated sections.

Freeze-substitution combines the advantages of cryofixation (dehydration in acetone at low temperatures and simultaneous chemical fixation with osmium tetroxide) with those of conventional thin sectioning at room temperature (embedding in epon/araldite at 277 K) and is suitable for routine work. A very high yield of adequately frozen specimens - in which no visible segregation patterns are apparent - was achieved with "golden delicious" apple leaves, barley protoplasts, *Venturia inaequalis*, yeasts and *Escherichia coli*. Good results were obtained with apple leaves after low temperature embedding in Lowicryls. Possible structural changes during freeze-substitution caused by fixatives, solvents, or the embedding media cannot be excluded. The freezing quality was therefore judged by purely physical methods. It was possible to achieve good structural preservation of apple leaves by means of freeze-fracturing at low temperatures (to avoid recrystallisation). Freeze-fracturing has, however, the disadvantage that the fracture plane proceeds at will and small ice-crystal damages cannot be detected without etching.

Low temperature electron microscopy, in concert with electron diffraction of frozen hydrated sections, provides information on the quality of structural preservation and the state of solidified cellular water in cryoimmobilized specimens. Frozen hydrated sections can therefore serve as a reference by which possible structural alterations, introduced either during cryoimmobilization i. e. ice-crystal growth or freeze-substitution, can be gauged.

"Golden delicious" apple leaves frozen at high pressure were cryosectioned at low temperature using either glass or diamond knives. Good cryosections are obtained by optimizing the cutting-parameters i. e. sectioning temperature, fixation of the sample, sectioning-velocity. Cutting artefacts were minimized by reducing the electrostatic interactions between the knife surface and the cryosection. The reduction of electrostatic forces on glass knives is accomplished by covering the knife surface with a very thin layer of frozen water. A higher yield of thin cryosections can be obtained with diamond knives by sectioning the sample in the presence of an ionisation electrode. The electrode, with a field strength of 8 kV, produces positively and negatively charged nitrogen ions which neutralize the surface-charges of the knife and the section. This minimizes the friction on the knife surface and results in very thin sections without crevasses or knife marks. Compression can be minimized by reducing the knife angle to 30 degrees.

Improved contrast of the frozen hydrated sections was obtained with the Zeiss EM 902 energy-filter microscope operated in the zero-loss mode. Visible beam damage (i. e. mass-loss and bubbling) was reduced due to very thin sectioning which permits imaging with very low electron doses. All sections of high pressure frozen apple leaf tissue exhibited the characteristic electron diffraction pattern of vitrified water.