

# Gefrieraufbewahrung: Neue Präparationstechnik für die Rasterelektronenmikroskopie am Institut für Forstschutz

## Abstract

*The cryotrans system is an integral unit to a scanning electron microscope. The system stabilises low melting point materials and also avoids shrinkage, distortion, water loss, and collapse of structures when viewing biological samples.*

## Gefrieraufbewahrung, Vor- und Nachteile

Probestücke aus der Natur verlieren bei Raumtemperatur kontinuierlich Wasser.

Durch die Dehydratation kommt es zu Trocknungseffekten und damit verbunden zu Formveränderungen in den wasserhaltigen Zellen, die nicht mehr reversibel sind und dadurch naturgetreuen Darstellungen nicht mehr entsprechen. Bisher war eine chemische Fixierung, z.B. mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxyd zur Erhaltung von Zellstrukturen unumgänglich. In der Folge wird die Präparation durch Gefriertrocknung oder Kritisch-Punkt-Trocknung abgeschlossen. Das heißt allerdings nicht, daß durch diese Präparationsmöglichkeiten das Auftreten von Artefakten ausgeschlossen wird. Die seit ca. 1990 bestehende und äußerst erfolgreich angewandte Gefrieraufbewahrung, läuft ohne vorherige chemische Fixierung unter Vakuum, bei bis zu -196 Grad Celsius ab. Der Zeitaufwand von mehreren Stunden für die Präparation wird auf ca. 45 min. reduziert.

Mit der Methode der Gefrieraufbewahrung wird einerseits die Probe in einem stabilen Medium (Eis) gehalten, andererseits bleibt das Wachstum von Eiskristallen konstant. Damit werden Schäden die durch Hydratation und damit verbundenen Formveränderungen am Objekt auftreten können minimiert.

Auf jeder Probeoberfläche befindet sich in kleinen Mengen Wasser, das man durch Absenkung der Temperatur auf ca. -80 Grad Celsius wegsublimieren kann. Es ist dann auf dem Vi-

deoschirm sehr gut mitzuverfolgen, wie die Wassertropfen verschwinden. Das führt dazu, daß interne Strukturen eines Präparats herausgehoben werden und eine stärkere Kontrastierung der Probe hervortritt.

## Aufbau des Gerätes

### Präparationskammer

Die Kryo-Sputteranlage der Firma Oxford, die am Institut für Forstschutz zum Einsatz kommt, besteht im wesentlichen aus der Präparationskammer mit einem Einfülldeklar für flüssigen Stickstoff. In der Präparationskammer selbst befindet sich ein Probenkühlschisch, die Sputter-(Beschichtungs)anlage sowie die Gefrierbruch- und Schneideeinrichtung.

Die Aufbewahrung der eingebrachten Probe im System erfolgt immer unter Vakuum und bei kontrollierten Temperaturen unter -150 Grad Celsius. Die Präparations- (Kryo)kammer ist am REM (Rasterelektronenmikroskop) durch einen Flansch fix mit der Mikroskopierkammer verbunden. Durch ein drehbares Ventil kann man den Probentransfer von der Kryokammer in die Mikroskopierkammer durchführen. Durch das Drehventil wird außerdem ein Interlock geschaltet, der eine Emission von Röntgenstrahlen verhindert.

Die Beobachtung der Probe bei einem Gefrierbruch oder bei der Beschichtung mit einer Gold-Palladium Legierung erfolgt mit einem aufgesetzten Mikroskop.

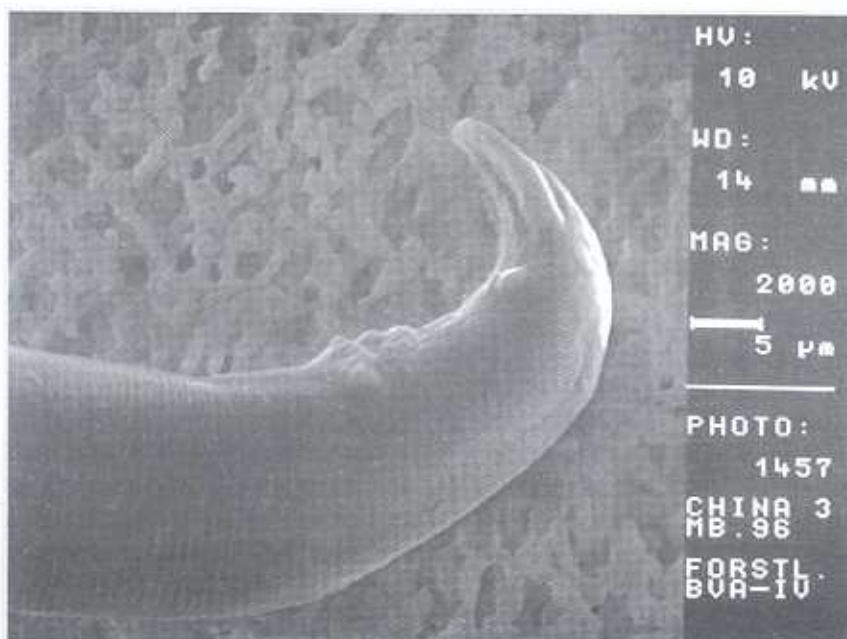


Abb 1:  
*Bursapheluchus xylophilus* aus China;  
REM-Aufnahme (Brandstetter) eines ♂-  
Schwanzteiles

## Mikroskopierkammer

Die Mikroskopierkammer hat einen eigenen Stickstoffdewar(-behälter) zum Vorkühlen der Mikroskopierstufe.

Der euzentrische Probenstisch wurde als Kühltisch adaptiert. Der Nachteil dabei ist, daß er in seiner Rotationsbewegung durch Kühlschläuche eingeschränkt ist und die Probe durch Drehung nicht mehr von verschiedenen Seiten beobachtet werden kann.

Oberhalb des Kühltisches (vor dem Ausgang des Strahlenganges) befindet sich der Antikontaminator, der die Aufgabe hat, leicht flüchtige Stoffe wie z.B. Kohlenwasserstoffe an sich zu binden, um Kontaminationen am Probestück zu verhindern.

## Slush

Die Slush-Kammer dient zur Schockgefrierung einer Probe unter Vakuum.

In den Slush wird flüssiger Stickstoff eingefüllt und die vorbereitete Probe eingetaucht und gefroren. Außerdem kann der Slush als kurzzeitiges Zwischenlager für Proben verwendet werden.

## Controller

Es gibt zwei verschiedene Controller. Einer dient zur Überprüfung der Temperatur für die Kryokammer, für den Antikontaminator und für den Kühltisch in der Mikroskopierkammer, der zweite Controller zur Einstellung und Überprüfung der Sputteranlage (Beschichtungszeit, Beschichtungsstärke, Argoneinlaß) sowie der verschiedenen Ventile.

## Der Weg einer Probe bis zur Untersuchung

### Probenahme

Die Probenahme soll sorgfältig und zerstörungsfrei durchgeführt werden, so wie es auch bei anderen Präparationsvorgängen die Voraussetzung ist, um naturgetreue Abbildungen für die Rasterelektronenmikroskopie zu erhalten.

Das Probenmaterial soll kühl und feucht gehalten werden, um die Austrocknung so gering wie möglich zu halten. Anschließend sollte die Probe sofort bearbeitet werden, indem sie in den Slush eingebracht und dabei stabilisiert wird, wenn kein Lagerungsdewar vorhanden ist.

### Vorbereitung und Präparation für die Gefrier Aufbewahrung

Ist die Gefrier Aufbewahrung längere Zeit nicht in Verwendung gestanden, sollte die Kammer vor der Inbetriebnahme ordentlich mit Stickstoff durchspült werden,

um unter Vakuum das Restwasser abzusaugen. So kann es durch Restwasser zu keiner Vereisung in den Kammern kommen und die Durchflutung des Stickstoffkreislaufes zur Kühlung bleibt aufrecht.

Nach der Spülung kann begonnen werden, den Präparatdewar mit flüssigem Stickstoff aufzufüllen, um damit die Präparationskammer abzukühlen.

In Folge wird auch der Dewar der Mikroskopierkammer gefüllt und die Temperatur abgesenkt. Die Temperatur des in der Mikroskopierkammer befindlichen Antikontaminators muß im Minimum  $-150^{\circ}\text{Celsius}$  erreichen und immer um  $10^{\circ}\text{Celsius}$  kälter sein als der Probenteller, um die leicht flüchtigen Stoffe binden zu können.

Ist die Temperatur auf ca.  $-180^{\circ}\text{Celsius}$  heruntergekühlt, kann man mit dem Rasterelektronenmikroskop eine halbe Stunde lang arbeiten, ohne daß man die Dewars wieder mit Stickstoff abkühlen muß.

Währenddessen kann man bereits die Probe auf den Probenhalter aufbringen und den Slush einschalten, um die Luft zu evakuieren. Die Probe muß dabei feucht gehalten werden, um Austrocknung zu vermeiden. Der Probenteller befindet sich nun auf der Transferstange mit dem Transferbehälter, und wird auf die Slushkammer aufgesetzt und die Probe tiefgefroren. Anschließend wird die Probe in eine Kammer, die sich im Transferbehälter befindet, zurückgezogen und mit einem Deckel verschlossen, in der die Probe gekühlt und unter Vakuum bleibt. Die Kryokammer wird geflutet und der Transferbehälter auf die Kryokammer aufgesetzt.

Während der ganzen Präparationszeit ist die Probe gekühlt und ein müheloses Transportieren zwischen den einzelnen Kammern gesichert. Anschließend wird die Probe von der Kryokammer durch die Schleuse in die Mikroskopierkammer eingebracht, wo man bei geringer Spannung, da sie noch nicht beschichtet ist, die Probe begutachtet und anschließend entschieden wird, ob Wasser von der Oberfläche wegsублиmiert werden soll. Die Probe wird noch einmal in die Kryokammer zurückgezogen und mit einem feinen Film von Gold-Palladium für die Leitfähigkeit des Elektronenstrahls beschichtet und ist für weitere Untersuchungen vollständig präpariert.

M. Brandstetter

## Literatur

OXFORD INSTRUMENTS; 1991; *Instruction Manual for electron microscope. Cryo preparation system CT 1500.*