

Abb. 2. Eindringen von äthanolischer Sudan-Schwarz-Lösung in ein Aralditblöckchen. A: Rand des Aralditbläuchens. B: Sudanschwarz (+ Äthanol + Araldit). C: Grenze Sudan-schwarz (+ Äthanol + Araldit) und Äthanol (+ Araldit). D: Grenze Äthanol (+ Araldit) und Araldit. E: Inneres des Aralditblöckchens.





## Der Einfluß der Diffusion bei der Kontrastierung von Schnitten für die Elektronenmikroskopie

The Influence of Diffusion on the Change of Contrast in Sections for Electron Microscopy

Werner Lippert

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.

(Z. Naturforsch. **28 c**, 413–416 [1973]; eingegangen am 18. April 1973)

Electron microscopy, contrasting of biological sections, diffusion

The influence of diffusion on the site of biological objects in sections is estimated. In experiments it is shown that the penetration of fluid in the embedding material depends on the fluid, the embedding material, the temperature, and the time. The hardness of the embedding material becomes smaller by the fluid.

Die Eindringtiefe bei der Kontrastierung von Schnitten für die Elektronenmikroskopie ist der Gegenstand einiger Arbeiten<sup>1–5</sup>. Sie ist in zwei Extremfällen besonders interessant: Als „Oberflächenkontrastierung“ gewissermaßen zur Verringerung der Schnittdicke und gleichmäßige Volumkontrastierung des gesamten Schnitts („Tiefenkontrastierung“) z. B. zur Ermittlung der gegenseitigen Lage von biologischen Strukturen. Man kann diese Arbeiten von einem Standpunkt aus qualitativ betrachten, wenn man die Diffusion und deren Änderungen in den einzelnen Arbeiten als Grundlage nimmt. In den folgenden Ausführungen soll dargelegt werden, inwieweit die Diffusion auch quantitativ für den Kontrastierungsvorgang verantwortlich sein kann.

Ein elektronenmikroskopischer Schnitt habe in unserer Betrachtung eine Dicke von größenordnungsmäßig 100 nm. Der Abstand von benachbarten Wassermolekülen in Wasser beträgt 0,3 nm. In einer 2-proz. wäßrigen Lösung von Uranylacetat, wie sie oft zum Kontrastieren benutzt wird, ist der Abstand benachbarter Uranylmoleküle (oder Uranatome) im Mittel ungefähr 3 nm. In die Einbettungskunststoffe dringen die Lösungsmittel, wenn überhaupt, zu ungefähr 20% des Volumens ein. Wenn wir mit einfacher Verdünnung rechnen dürfen, sind die Uranatomabstände dort ungefähr 5 nm. Da wir in unseren biologischen Schnitten nicht einzelne Uranatome sondern größere Aggregate sehen, müssen die Ura-

nylacetatmoleküle an die biologischen Strukturen wandern. Wenn wir davon ausgehen, daß ein Uranatom zur Kontrastierung beiträgt, wenn es ein Zielgebiet vom Radius  $R$  erreicht, so beträgt die Zeit  $t$  dafür im Mittel  $t = x^3/4 \pi D R$ . Dabei bedeutet  $x$  den Abstand benachbarter Uranatome in der Lösung und  $D$  die zunächst nur unzureichend bekannte Diffusionskonstante. Für wäßrige Lösungen, die uns im Augenblick interessieren sollen, liegt  $D$  in der Größenordnung von  $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ; setzen wir das noch zu diskutierende  $R$  gleich  $b \cdot x$ , so wird mit genügender Genauigkeit

$$t \approx x^2/12 D b \approx 0,75 \cdot 10^{-9} (1/b) \text{ s}.$$

Wenn wir annehmen, daß es sich beim Zielobjekt um ein offen an der Schnittfläche liegendes Atom handelt, so wird  $b$  nicht kleiner als  $10^{-2}$ ,  $t$  nicht größer als ungefähr  $10^{-7} \text{ s}$  sein. Die Formel berücksichtigt nur ein einziges isoliertes Zielgebiet. Tatsächlich sind aber sehr viele benachbarte vorhanden. Außerdem kann sowohl das diffundierende Teilchen als auch das Zielgebiet von unwirksamen Teilchen mehr oder weniger abgeschirmt sein. Auch sterische Verhältnisse können eine Rolle spielen. Diese Effekte führen wohl im wesentlichen zu einer Verlängerung der Kontrastierungszeit. Die Kontrastierung dürfte aber trotzdem in einer für die üblichen Experimente kurzen Zeit abgeschlossen sein.

Nun gibt es in bezug auf ihre Lage im Schnitt 3 Arten von biologischen Komplexen. Die einen liegen direkt an der Oberfläche und werden also durch Diffusion im reinen Lösungsmittel sehr rasch kontrastiert. Andere liegen zwar bereits im Innern,

stehen aber noch über eine Mischung von biologischem Material und Einbettungsmedium mit der Oberfläche in Verbindung. Diese Bezirke sind sehr undefiniert, da sich z. B. das Mischungsverhältnis biologisches Material zu Einbettungsmittel von Stelle zu Stelle ändert. Wir wissen jedoch aus Experimenten, daß manche biologischen Komplexe, die im Schnitt, aber in der Nähe der Oberfläche, liegen, fast immer gleichzeitig mit denen an der Oberfläche kontrastiert sind. Die Diffusionskonstante wird hier also ähnlich oder nur wenig geringer als in der freien Flüssigkeit sein. Die Komplexe dritter Art liegen tiefer und sind allseits von Einbettungsmittel umgeben. Sie können nur kontrastiert werden, wenn das Lösungsmittel in das Einbettungsmittel eindringt, und zwar so, daß es das Kontrastierungsmittel noch in ausreichender Konzentration enthält. Diese Vorgänge sind dem Experiment in vereinfachter Form einigermaßen zugänglich.

### Experimentelles

Es wurden 2 Arten von Versuchen ausgeführt. Bei der ersten Versuchsgruppe wurden zylindrische Einbettungsblöckchen aus Araldit (Dichte 1,104), Epon 50/50 (1,210) und Vestopal W (1,270) benutzt. Die beiden Kuppen waren geebnet, die Länge betrug 14,9 mm, der Durchmesser 5,5 mm (Oberfläche  $3,0 \text{ cm}^2$ ). Alle Teile der Oberfläche wurden als gleichwertig angesehen. Die Blöckchen wurden vor Versuchsbeginn einzeln gewogen. Dann wurden sie für eine bestimmte Zeit bei definierter Temperatur in verschiedene Flüssigkeiten gegeben. Nach dem Versuch wurde nach kurzem Abtrocknen wieder gewogen. Ein Drittel der Massendifferenz (Eindringen der Flüssigkeit pro  $\text{cm}^2$ ) ist in Abb. 1 als Funktion von Flüssigkeit und Temperatur aufgetragen. Meistens wurden Zeiten von 15 min oder einer Stunde benutzt. Die Flüssigkeitsmengen verhielten sich innerhalb der Meßgenauigkeit dann wie 1 : 2, das  $\sqrt{t}$ -Gesetz war also gültig. Die eingedrungenen Flüssigkeiten trockneten sehr langsam aus, einige Flüssigkeiten waren auch bei dauernder Erwärmung der Blöckchen auf  $60^\circ \text{C}$  nach Tagen noch nicht ganz verschwunden. Die Meßgenauigkeit einer Wägung betrug  $0,05 \text{ mg}$ , die Eindringtiefe/ $\text{cm}^2$  ist also auf  $0,03 \text{ mg/cm}^2$  genau. Das Volumen/ $\text{cm}^2$  der eingedrungenen Flüssigkeit ist auch numerisch gleich ihrer „minimalen Eindringtiefe“. Bei der Dichte 1 kann sie auf  $300 \text{ nm}$  genau bestimmt werden. Dieses ist noch ein Vielfaches der Schnittdicke.

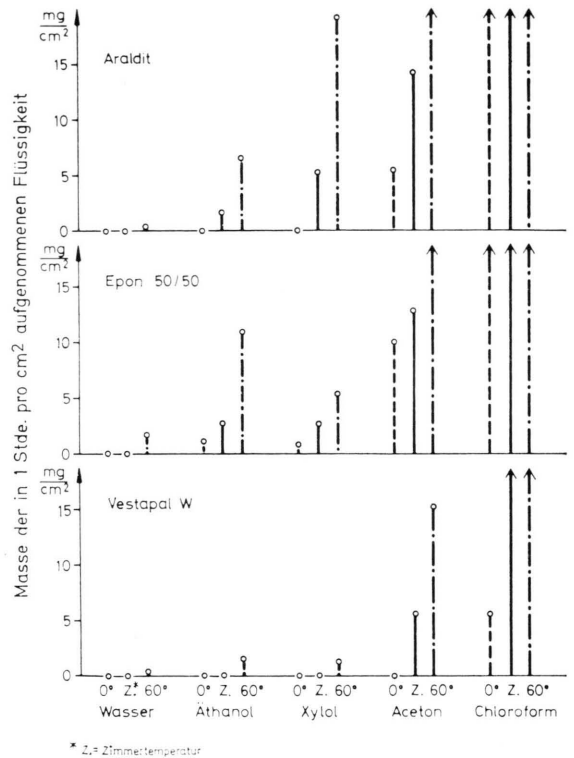


Abb. 1. Masse der in 1 Stdn. pro  $\text{cm}^2$  aufgenommenen Flüssigkeit bei verschiedenen Einbettungsmitteln.

Die Messungen ergaben Folgendes:

1. Die Blöckchen wurden beim Trocknen nie leichter als sie zu Beginn des Versuchs waren. Die Flüssigkeiten haben also aus den Blöckchen meßbar nichts herausgelöst.
2. Bei allen Flüssigkeiten zeigt sich mit höherer Temperatur eine stärkere Massenzunahme der Probe. Die Zunahme ist aber nach Einbettungsmittel und Flüssigkeit verschieden.
3. Wasser bedingt stets die geringste, Chloroform stets die stärkste Massenzunahme. Bei  $0^\circ \text{C}$  und Zimmertemperatur zeigt Wasser als einzige Flüssigkeit bei allen Einbettungsmitteln keine Erhöhung der Masse der Probe.
4. Äthanol und Xylol geben nur bei Epon 50/50 auch bei  $0^\circ \text{C}$  eine durchaus meßbare Massenerhöhung der Probe.

Bei anderen Versuchen wurden die Einbettungsblöckchen ohne Wiegen in die Flüssigkeiten, in denen bei Bedarf irgendwelche Stoffe gelöst waren, für eine bestimmte Zeit bei definierter Temperatur gegeben. Nach dem Versuch wurden nach kurzem Abtrocknen rasch die beiden Enden der Blöckchen

entfernt. In Längsrichtung wurden dann die Blöckchen unter einem Mikroskop beobachtet. Zwischen reinem Einbettungsmittel und Einbettungsmittel mit Flüssigkeit zeigte sich eine scharfe Grenze, die sich einmal durch verschiedene Härten (das Einbettungsmittel mit Flüssigkeit war stets wesentlich weicher) und zum anderen optisch durch verschiedene Helligkeiten bemerkbar machte (Abb. 2 \*). Dabei ist weder bekannt, ob die beiden Grenzen (die mechanische und die optische) wirklich streng zusammenfallen, noch was diese Grenze eigentlich bedeutet (z. B. Gehalt an Flüssigkeit). Die Meßgenauigkeit betrug um  $5\text{ }\mu\text{m}$ . Mindestens alle Flüssigkeiten, die einen Meßeffect zeigten, durchdringen also auch die elektronenmikroskopischen Schnitte. Bei Lösungen von farbigen Substanzen, z. B. histologischen Farbstoffen, ergaben sich 2 Grenzen, die der farbigen Substanz und die des Lösungsmittels. Aber auch bei farblosen Lösungen ließ sich das Eindringen oft messen: Es zeigten sich zwei farblose Grenzen, die immer dem Lösungsmittel und dem gelösten Stoff zugeordnet werden konnten. Für reine Lösungsmittel gilt bezüglich der Eindringtiefe für unsere Zwecke das  $\sqrt{t}$ -Gesetz, d. h. bei einer Stunde ist die Eindringtiefe doppelt so groß wie bei 15 min. In Abb. 3 sind

Bei weiteren Untersuchungen ergab sich folgendes:

1. Wie zu erwarten, sind die Ergebnisse temperaturabhängig. Soweit geprüft, stiegen die Saumbreiten stets mit wachsender Temperatur an.

2. Bei Lösungen sind in den allermeisten Fällen die Grenzen von gelöstem Stoff und Lösungsmittel getrennt.

3. Bei vielen Lösungen (z. B. von vielen histologischen Farbstoffen) ist die Saumbreite des Lösungsmittels gleich der, die man erhält, wenn man das Kunststoffblöckchen in das reine Lösungsmittel bringt.

4. Wenn die Saumbreite des Lösungsmittels gleich der des reinen Lösungsmittels ist, scheint die Saumbreite des gelösten Stoffs von der Konzentration der Lösung unabhängig zu sein, nicht aber die Konzentration des Farbstoffs im gefärbten Saum. Für sehr kleine Konzentrationen scheint also die Saumbreite des gelösten Stoffs nicht gegen die des reinen Lösungsmittels zu gehen.

5. Vor allem bei alkoholischen Lösungen (wäßrige Lösungen zeigen bei Zimmertemperatur keinen Effekt) kann die Breite des Alkoholsaums vom gelösten Stoff (z. B.  $\text{CdBr}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) abhängen. Die Saumbreite des Alkohols war dann stets beachtlich (um ein Drittel bis die Hälfte des normalen Äthanolsaums) geringer.

6. Bei Mischungen von Wasser mit Äthanol oder Aceton (ohne gelösten Stoff) tritt nur eine Grenze in Erscheinung, und zwar wird die Saumbreite geringer, wenn die Äthanol- oder die Acetonkonzentration sinkt. Bei Extrapolation auf die Konzentration Null (reines Wasser) erhält man auch hier eine nicht meßbar kleine Saumbreite.

7. Komplizierte, vor allem nicht reproduzierbare Verhältnisse treten auf, wenn das Einbettungsblöckchen vorher mit einer Flüssigkeit angequollen wurde.

Wie schon gesagt, ist die genaue Bedeutung des Saumes nicht bekannt. Setzt man die Saumbreite  $x \approx \sqrt{tD}$ , so erhält man bei einer Saumbreite von  $100\text{ }\mu\text{m}$  in 1 Stde. eine Diffusionskonstante  $D$  von  $1/3 \cdot 10^{-7}\text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ . Sie ist damit schon um über 2 Zehnerpotenzen kleiner als in reinem Wasser. Da aber bei Wasser als Lösungsmittel die Saumbreite bei Zimmertemperatur unter der Beobachtungsgrenze von  $5\text{ }\mu\text{m}$  liegt, ist die Diffusionskonstante für Wasser und wäßrige Lösungen in den Einbettungsmedien sicher noch wesentlich kleiner.

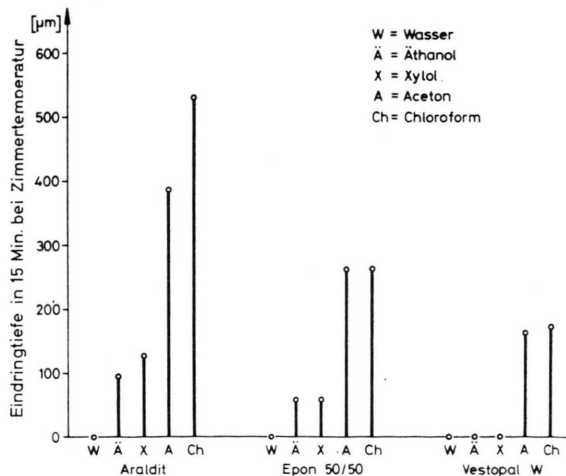


Abb. 3. Eindringtiefe (Saumbreite) in 15 min von verschiedenen Flüssigkeiten bei Zimmertemperatur für verschiedene Einbettungsmittel.

die Eindringtiefen (Saumbreiten) in 15 min bei Zimmertemperatur von verschiedenen reinen Flüssigkeiten bei den schon genannten Einbettungsmitteln dargestellt.

\* Abb. 2 siehe Tafel auf Seite 412 a.



Mit diesen Vorstellungen läßt sich, wie in Arbeiten berichtet, erklären, daß

1. wäßrige Kontrastierungslösungen bei Zimmertemperatur, besonders bei Vestopal W, nur Oberflächenkontrastierungen ergeben;

2. alkoholische Kontrastierungslösungen, besonders bei erhöhter Temperatur, Tiefenkontrastierungen bewirken;

3. Kontrastierungen allgemein dazu neigen, die Oberflächenkomplexe stärker zu kontrastieren als das Innere.

Die Kontrastierungslösungen müssen das Einbettungsmittel mehr oder weniger erweichen. Dadurch besteht die Gefahr, daß sich Lagebeziehungen verändern. Schon die Anlagerung von Schwermetallatomen kann im Prinzip zu einer kleinen Lageveränderung führen.

<sup>1</sup> G. B. Haydon, *J. Microscopy* **90**, 1 [1969].

<sup>2</sup> M. Locke u. N. Krishnan, *J. Cell Biol.* **50**, 550 [1971].

<sup>3</sup> A. B. Maunsbach, *Electron Microscopy of Cells and Tissues*, vol. 1, (F. S. Sjöstrand), Academic Press, New York 1967.

<sup>4</sup> A. Peters, P. L. Hinds u. J. E. Vaughn, *J. Ultrastructure Res.* **36**, 37 [1971].

<sup>5</sup> T. A. Shalla, T. W. Carroll u. G. A. DeZoeten, *Stain Technol.* **39**, 257 [1964].

## Vacuolar Membranes: Isolation from Yeast Cells

W. van der Wilden \*, Ph. Matile, M. Schellenberg, J. Meyer, and A. Wiemken

Department of General Botany, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland

(*Z. Naturforsch.* **28 c**, 416–421 [1973]; received March 14, 1973)

Isolation, vacuolar membrane, yeast

$\alpha$ -Mannosidase was found associated with the vacuolar membranes of yeast. The vacuoles were isolated by flotation from osmotically disrupted spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. The enzyme was used as marker for isolating vacuolar membrane fragments directly from whole cells which were mechanically disintegrated. Over 90% of the total  $\alpha$ -mannosidase was recovered in the particulate fraction. The enzyme was present in all of the fractions obtained upon differential centrifugation. Density gradient centrifugation in Urografin (5–20% w/v) of preparations obtained by differential centrifugation between 20 000 and 50 000  $\times g$  did not result in density equilibrium of the membrane. An isolation procedure involving a sedimentation velocity cut in Urografin gradients has, therefore, been worked out.

The vacuolar membrane (tonoplast) represents the boundary between vacuolar fluid (cell sap) and cytoplasmic matrix. Its possible functions are suggested by some unique properties of the cell sap. On the one hand it contains a number of hydrolases in a concentrated form; preparations of isolated vacuoles from baker's yeast contain high specific activities of proteases, RNase, esterase,  $\beta$ -glucosidase and other hydrolases<sup>1,2</sup>, indicating a lysosomal function of this organelle. An important property of the tonoplast is, therefore, that it resists the attack of lytic enzymes present in the cell sap. On the other hand the cell sap contains a variety of com-

pounds that are temporarily removed from metabolism, *e.g.* purines<sup>3</sup> and S-adenosylmethionin<sup>4</sup>. Recently Wiemken and Nurse<sup>5</sup> have been able to demonstrate that storage pools of amino acids are localized in the vacuoles of the yeast *Candida utilis*. Although these compounds are very slowly metabolized they are in dynamic equilibrium with the sites of amino acid metabolism. Hence, an important function of the tonoplast is the mediation and control of exchange of metabolites between the cytoplasmic matrix and the cell sap. A difference between the tonoplast and the plasmalemma is indicated by the differential behaviour of these membranes in the presence of basic proteins that have been used for the stepwise extraction of yeast cells<sup>5,6</sup>; the plasmalemma is disrupted whereas the tonoplast remains intact and impermeable for the micromolecules present in the cell sap<sup>7</sup>. These and

Requests for reprints should be sent to Ph. Matile, Department of General Botany, Swiss Federal Institute of Technology, Universitätsstr. 2, CH-8006 Zürich.

\* Present address: Laboratory of Plant Physiology, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.