

# Cryofixation of Tissue without Cryoprotectants

W. Buchheim

Institut für Physik der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel

A major problem during freeze-etching preparation of systems with high water content arises from the fact that without cryoprotective pretreatment a vitrification of the specimens is generally not achievable by use of conventional freezing methods. Since both cryoprotectants and chemical fixatives may introduce structural changes, methods for vitrifying tissue in its natural state are needed. Several attempts have been made to obtain at least a vitrification (without cryoprotectants) of dilute systems including dispersed cellular organelles and single cells and of very thin biological objects [1–5].

Since the above mentioned methods either proved unsuitable for routine application for tissue or have not yet been tested for this purpose, the oil-emulsion technique [1] for cryofixation of histological objects was tried.

Fresh pieces of tissue (total volume 0.5–1 ml) are transferred into viscous paraffin containing an emulsifying agent (e.g., 5% glyceryl monooleate). The oil/tissue ratio of volume may be taken as 10:1. By use of a laboratory homogenizer (e.g., Ultra-Turrax) the tissue is disintegrated into a fine and stable emulsion, homogenization time being less than 5 s. Droplets of the emulsion are transferred onto normal object holders (Balzers) and frozen by immersion into liquid Freon 22 (–160 °C). The time between dissecting out the tissue and freezing the homogenized system may be limited to less than 1 min.

The freeze-etch replicas show that the tissue material is distributed in the oil phase in more or less globular form. In tissue droplets up to at least 30 µm diameter artifacts due to freezing damage were absent or at most minimal. Obviously one cannot expect that the homogenization procedure preserves the original tissue organization, but the results so far obtained indicate that at least the disruption of cellular organelles is minimal and that all important cellular components such as different types of membrane, myelin sheaths of nerve-cell processes, and various cellular organelles show satisfying structural preservation (Fig. 1). Especially in larger tissue droplets complete cells may be detected.

There are good reasons to assume that a high portion of tissue droplets is formed

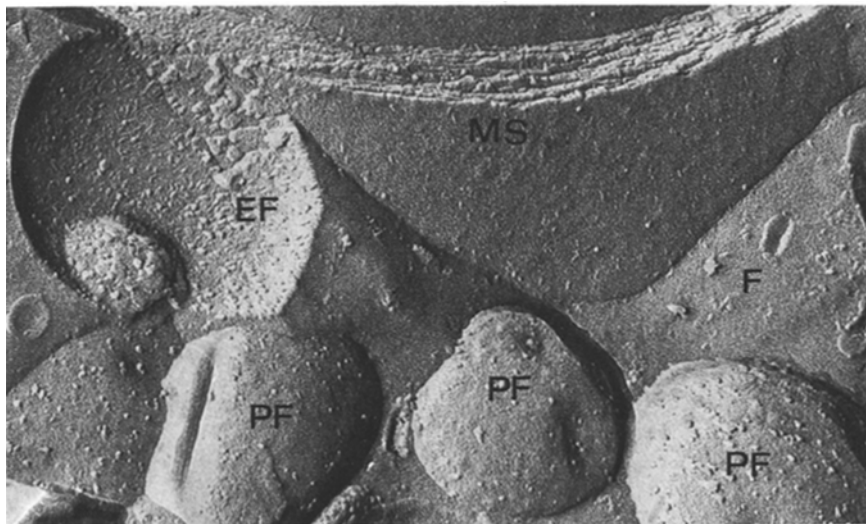


Fig. 1. Freeze-fractured brain tissue of the rat. *MS* myelin sheath; *EF*, *PF* fracture faces of split membranes of unmyelinated axons; *F* fluid in the intercellular space. 70000:1

during the initial stage of disruption and remains isolated and stable due to the emulsifying agent added. It seems likely that gradual improvement of structural preservation by suitable variation of homogenization parameters can be achieved. The author thanks Prof. U. Welsch, Anatomisches Institut der Universität Kiel, for helpful discussions and for providing tissue samples.

Received February 4, 1977

1. Buchheim, W.: *Naturwissenschaften* 59, 121 (1972)
2. Riehle, U., Hoechli, M., in: *Freeze-Etching. Techniques and Applications*, p. 31 (eds. E.L. Benedetti, P. Favard). Paris: Société Française de Microscopie Electronique 1973
3. Bachmann, L., Schmitt-Fumian, W.W.: *ibid.*, p. 63
4. Plattner, H., Schmitt-Fumian, W.W., Bachmann, L.: *ibid.*, p. 81
5. Moor, H., Kistler, J., Müller, M.: *Experientia* 32, 805 (1976)

## Phasenbreiten bei $Tl_2O_3$ und $Tl_4O_3$

H. Sabrowsky and J. Mirza

Lehrstuhl für Anorganische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum, Arbeitsgruppe Festkörperchemie

In einer früheren Mitteilung [1] wurde erstmals über Einkristalle von  $Tl_2O$  und  $Tl_4O_3$  berichtet. Beide Strukturen sind inzwischen gelöst [2, 3]. Bei dem aber weiterhin bestehenden Interesse am System Thallium-Sauerstoff haben wir uns erneut auch mit  $Tl_2O_3$  befaßt.

Überraschend zerfällt durch Oxydation mit  $O_2$  aus  $Tl_2O$  dargestelltes  $Tl_2O_3$ , das gegenüber der Literatur ( $a=10,543$  Å) [4] eine kleinere Gitterkonstante ( $a=10,49$  Å/25 °C) aufweist, beim Erhitzen nicht in  $Tl_2O$  und  $O_2$ , was für  $Tl_2O_3$  zu erwarten

ist [5, 6]. Thermoanalytische und massenspektroskopische Untersuchungen sowie erstmalige Guinier-Aufnahmen ( $CuK_{\alpha 1}$ ) der thermischen Abbauprodukte zeigen, daß  $Tl_2O_3$  ab 400 °C im Vakuum ( $p=10^{-5}$  Torr) zunächst in  $Tl_2O_{3-\delta}$  ( $\delta \approx 0,05$ ;  $a=10,58$  Å/25 °C) übergeht, wofür gegenüber der Grenzphase  $Tl_2O_3$  eine Gitteraufweitung von 2,6% vorliegt. Aus  $Tl_2O_{3-\delta}$  bildet sich dann ab 533 °C vornehmlich  $Tl_4O_3$  mit den hierfür typischen Gitterkonstanten ( $a=10,88$ ,  $b=3,451$ ,  $c=7,618$  Å,  $\beta=109,5^\circ$ ). Daneben treten weitere, noch

unbekannte Thalliumoxide auf, die einschließlich  $\text{Ti}_4\text{O}_3$  sämtlich ab 620 °C sublimieren. Für unter  $\text{O}_2$  ( $p=1$  atm) erhitztes  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  spielt ab 760 °C die Bildung von  $\text{Ti}_4\text{O}_{3+\delta}$  ( $\delta \approx 0,06$ ;  $a=10,95$ ,  $b=3,483$ ,  $c=7,650$  Å,  $\beta=109,5^\circ$ ) eine wesentliche Rolle. Auch hierfür wird gegenüber der Grenzphase eine Gitteraufweitung ( $\Delta V=2,0\%$  im vorliegenden Fall) beobachtet. Das Auftreten von  $\text{Ti}_2\text{O}_{3-\delta}$  und  $\text{Ti}_4\text{O}_{3+\delta}$  steht in Übereinstimmung mit Dotierungsversuchen an  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  und  $\text{Ti}_4\text{O}_3$  mit  $\text{Ti}_2\text{O}$  bzw.  $\text{Ti}_2\text{O}_3$ . Hierüber und über die beim Erhitzen von  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  außerdem sich neu bildenden Thalliumoxide werden wir ausführlich an anderer Stelle berichten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung mit Sachmitteln.

Eingegangen am 15. Februar 1977

1. Sabrowsky, H.: Naturwissenschaften 56, 414 (1969)
2. Sabrowsky, H.: Z. Anorg. Allg. Chem. 381, 266 (1971)
3. Marchand, R., Tournoux, M.: C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. C 277, 863 (1973)
4. Papamantellos, P.: Z. Krist. 126, 143 (1968)
5. Cubicciotti, D., Keneshea, F.J.: J. Phys. Chem. 71, 808 (1967)
6. Karkhanavala, M.D., Daroowalla, S.H.: J. Indian Chem. Soc. 46, 1112 (1969)

$\text{Na}^+$  besetzt. Jedes der vier  $\text{Na}^+$  ist von fünf  $\text{O}^{2-}$  unterschiedlicher Abstände (Abstände  $\text{Na}-\text{O}$ : 2,27–2,77 Å) umgeben. Die Ähnlichkeit zum strukturell verwandten  $\beta\text{-Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$  [7] mit gleicher Raumgruppe ist deutlich, die Analogie solcher Oxoferate (III) mit Silicaten erneut belegt. Der Maderung-Anteil der Gitterenergie, MAPLE [8], von  $\text{Na}_4\text{Fe}_2\text{O}_5$  (5561 kcal/Mol) stimmt gut mit der Summe der MAPLE-Werte der binären Oxide überein ( $2\text{Na}_2\text{O} + \text{Fe}_2\text{O}_3 = 5510$  kcal/Mol,  $\Delta=0,9\%$ ).

Herr Dr. M. Jansen führte die Messung am 4-Kreisdiffraktometer durch, Frau E. Adam half bei der präparativen Arbeit.

Eingegangen am 28. Februar 1977

1. Teil der Dissertation G. Brachtel, Universität Gießen
2. Brachtel, G., Hoppe, R.: Naturwissenschaften 62, 138 (1975)

## Das erste Oxoferat(III) mit Blattstruktur: $\text{Na}_4\text{Fe}_2\text{O}_5$

G. Brachtel [1] und R. Hoppe

Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Gießen

Die Neuuntersuchung des Systems  $\text{Na}_2\text{O}/\text{Fe}_2\text{O}_3$  hat zu bislang unbekanntem  $\text{Na}_3\text{FeO}_4$  [2] mit Inselstruktur und  $\text{Na}_{14}[\text{Fe}_6\text{O}_{16}]$  mit Zweierdoppelkette geführt. Diese Analogie zu Silicaten findet man auch bei dem neuen  $\text{Na}_8\text{Fe}_2\text{O}_7$  [4] (nach Einkristalldaten  $a=8,72$ ,  $b=11,02$ ,  $c=10,10$  Å,  $\beta=107,7^\circ$ ), das isotyp mit  $\text{Na}_8\text{Ga}_2\text{O}_7$  [5] ist.

Überraschend finden wir nun auf der Suche nach  $\text{Na}_3\text{FeO}_3$  (inzwischen als gelbe Kristalle mit  $a=13,37$ ,  $b=10,70$ ,  $c=6,13$  Å,  $\beta=117,8^\circ$  erhalten) als weitere Phase  $\text{Na}_4\text{Fe}_2\text{O}_5$  ( $2\text{Na}_2\text{O} + 1\text{FeO}$ , 600 °C, 6d, Ni-Bömbchen) in transparent gelben, plättchenförmigen Einkristallen (Diffraktometerdaten):

$a=11,87_2$ ,  $b=5,67_9$ ,  
 $c=9,17_8$  Å,  $\beta=104,5^\circ$ ,

Raumgruppe  $P2_1/n$ ,  $d_{\text{r0}}=3,15$  g/cm<sup>3</sup>.

Nach der Strukturaufklärung [6] (4-Kreisdiffraktometer Philips PW 1100, Mo- $K_\alpha$ , 1053 unabhängige Reflexe; z.Zt.  $R=10,5\%$ , weitere Verfeinerung im Gange) liegt das erste „Phylloferat“ vor (Tabelle 1, Fig. 1).

**Primärstruktur:** Praktisch tetraedrische  $\text{FeO}_4$ -Gruppen [Abstände  $\text{Fe}-\text{O}=1,82$  (1×, terminal) und 1,89 Å (3×, Brücke)].

**Sekundärstruktur:** gemäß  $[\text{Fe}_2\text{O}_{2/1}\text{O}_{6/2}]$ . Verknüpfung zum gewellten Blatt, das  $\text{Fe}_6$ -Ringe (Sesselform) zeigt.

**Tertiärstruktur:** Stapelung der Blätter als Zweier-Einfachschicht parallel (100); die Lücken zwischen den Schichten sind durch

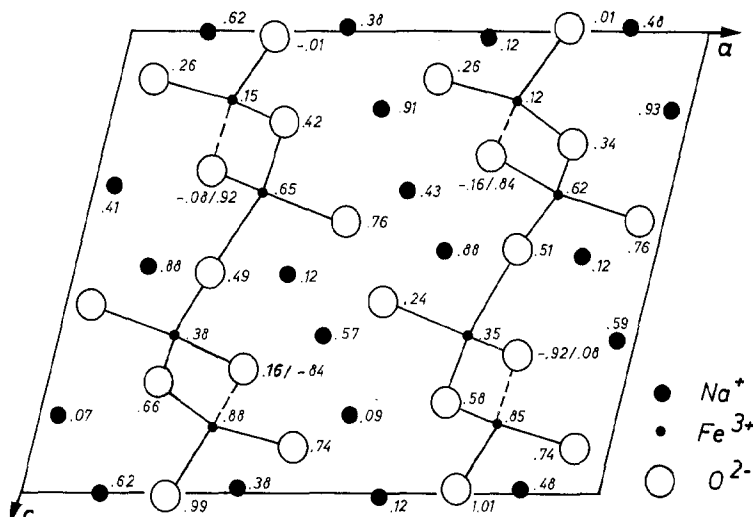


Fig. 1. Projektion der Kristallstruktur von  $\text{Na}_4\text{Fe}_2\text{O}_5$  nach [010]

Tabelle 1. Vorläufige Lageparameter und isotrope Temperaturparameter (beide  $\times 10^4$ ) von  $\text{Na}_4\text{Fe}_2\text{O}_5$  (Standardabweichungen in Klammern)

	x	y	z	$U^a$
Na (1)	1257 (1)	8838(11)	5166 (7)	90(13)
Na (2)	3679 (6)	1202(12)	4908 (7)	115(14)
Na (3)	4621 (6)	9132(12)	1634 (7)	133(15)
Na (4)	5351 (6)	4280(13)	3373 (8)	154(15)
Fe (1)	6992 (2)	1200 (4)	1564 (2)	9 (6)
Fe (2)	2015 (2)	1512 (4)	1569 (2)	13 (6)
O (1)	5568 (9)	2600(20)	1039(12)	68(22)
O (2)	4466 (9)	7604(20)	4120(12)	86(23)
O (3)	8174 (9)	3409(20)	2364(12)	96(23)
O (4)	7427(10)	102(21)	9878(13)	117(24)
O (5)	2996 (9)	4165(20)	1978(12)	81(22)

<sup>a</sup> Der isotrope Temperaturfaktor besitzt die Form  $T_{\text{iso}} = \exp(-8\pi^2 U \cdot \sin^2 \theta / \lambda^2)$