

**Praktische Ratschläge**

**und**

**Sicherheitshinweise**

**zur**

**CHROMA-Schrift**

***Ausgewählte Färbemethoden***

***für***

***Botanik, Parasitologie, Zoologie***

**Dr.G.Rosenfeldt 2015**

## Ergänzende Hinweise

### Stückfixierung

1. Bei Stückfixierung von Geweben dürfen die Stücke nicht dicker als ca. 5 mm sein, damit die Fixierlösung das Stück rasch durchdringen kann.
2. Die Fixierlösung ist reichlich zu bemessen: Man rechnet 50 ccm Lösung pro 1 ccm Gewebe.
3. Man bedeckt den Boden des Fixiergefäßes mit etwas Glaswolle, damit die Fixierlösung von allen Seiten eindringen kann. Ferner schwenkt man von Zeit zu Zeit um.
4. Die angegebenen Fixierzeiten sollten nicht wesentlich überschritten werden, da dies nicht nur später die Schneidbarkeit beeinträchtigt sondern auch die Färbbarkeit negativ beeinflusst („Überfixierung“).
5. Am besten bettet man das fixierte Material sofort nach der Fixierung ein. In Paraffin ist das Material dann buchstäblich unbegrenzt haltbar.

### Einbettung

Zur Einbettung in Paraffin oder Celloidin müssen die fixierten Gewebeblöckchen schrittweise entwässert werden. Ist man bei pflanzlichem Material nur an der Darstellung der Zellwände interessiert, genügt 50%-iger Alkohol und Isopropanol, sonst muß man schonender vorgehen, um Schrumpfungen zu vermeiden (20 – 40 – 60 – 80%-iger Alkohol, Isopropanol, Isopropanol). Man beläßt die Gewebeblöckchen gewöhnlich über Nacht in den Alkoholstufen.

Für die wässrigen Alkoholstufen kann man heute bedenkenlos Brennspritus verwenden, da dieser mit Methy-ethyl-eton vergällt ist und nicht mehr mit Pyridinbasen. Den teuren absoluten Alkohol ersetzt man durch Isopropanol (zwei Stufen).

*Bei der Verarbeitung von Blutaussstrichen kann man nicht immer auf den wasserfreien Alkohol verzichten (ausprobieren!).*

Da Alkohole mit Paraffin nicht mischbar sind, muß ein „Intermedium“ zwischengeschaltet werden (zwei Stufen). Bewährt haben sich Terpeneol (nicht zu verwechseln mit Terpentinöl !!) oder Methylbenzoat (zwei Stufen).

Die genannten Intermedien sind nicht flüchtig. Da sie die Schneidbarkeit der Blöcke negativ beeinflussen oder gar unmöglich machen, dürfen sie nicht in das Paraffin der Blöcke gelangen. Man muß das geschmolzene Paraffin daher mindestens einmal wechseln, besser zweimal!

Es ist sinnvoll, die Intermedien mit Sudan III schwach rot zu färben. Die letzte Paraffinstufe darf dann keinerlei Rötung mehr zeigen. Tritt nach einiger Zeit eine Rötung auf, verwirft man das Paraffin der Stufe 1, verwendet das Paraffin der Stufe 2 als Stu-

fe 1, das Paraffin der Stufe 3 als Paraffin der Stufe 2 und verwendet für die Stufe 3 neues Paraffin.

Üblich sind Paraffinschnitte (8 µm). Man verwendet ein Messer mit „C-Schliff“, das im rechten Winkel zur Schnittrichtung eingespannt wird. „Bänderschneiden“ ist möglich. Mit Rotationsmikrotomen („Minotsche Mikrotome“) können ausschließlich Paraffinblöcke geschnitten werden.

Celloidinblöcke können nur auf einem Schlittenmikrotom geschnitten werden. Man benötigt ein spezielles Messer (Plan-Hohlschliff), das sehr schräg zur Schnittrichtung eingespannt werden muß. Die Schnittdicke liegt höher, Schnittbänder sind nicht möglich, die Schnitte müssen als Einzelschnitte verarbeitet werden. Die Celloidineinbettung ist nur dann sinnvoll, wenn die Schnitte nicht verformt werden dürfen, denn Celloidinschnitte „schnippen“ nach dem Schneiden in ihre alte Form zurück.

Polyethylenglycol („Carbowachs“) besticht durch seine Wasserverträglichkeit und durch seine osmotische Indifferenz (keine Schrumpfungen), allerdings ist die Schneidbarkeit der Blöcke oft sehr schlecht, da Carbowachs beim Abkühlen zur Rekristallisation neigt (bröcklige Blöcke). Vielleicht hilft eine wie auch immer geartete „Schockabkühlung“. Zum Nachweis von Fetten muß man auf Carbowachs zurückgreifen oder auf Gefrierschnitte, da spätestens das Intermedium die Fette aus dem Material herauslöst.

### **Reinigen der Objektträger**

Entscheidend für ein sicheres Haften der Schnitte sind absolut fettfreie Objektträger!

Man zerlegt einen Präparatekasten, entnimmt die geschlitzten Holzleisten und befestigt diese auf einem Metallrahmen, so daß man zwei Fünzfziger-Gestelle erhält. Einfacher ist es, einen Kunststoff-Präparatekasten zu verwenden: Man entfernt den Deckel und schneidet mit einer Ringsäge mehrere Löcher in den Boden.

Die Reinigung der Objektträger erfolgt in einer Geschirrspülmaschine. Nach dem Trocknungsgang läßt man die Objektträger noch einen Tag lang an einem staubfreien Ort stehen. Legt man sie früher zusammen, kleben sie durch Adhäsionskräfte aneinander. Bei Verwendung eines Kunststoffgestelles ist zu beachten, daß nicht jeder Kunststoff den Trocknungsgang aushält.

### **Aufziehen der Schnitte**

Objektträger mit einem Tropfen Eiweißglycerin versehen, den man mit dem Handballen auf dem OT verteilt. Reichlich destilliertes Wasser auftropfen und Paraffinschnitte bzw. Schnittbänder, glatte Seite unten, auflegen. OT auf eine Wärmebank legen, wobei sich die Schnitte strecken. Hierbei darf das Paraffin unter keinen Umständen schmelzen! Überschüssiges Wasser mit Filtrierpapier absaugen, dann 48 Stunden trocknen lassen oder über Nacht in einem Wärmeschrank. Schließlich zieht man die OTs, Schichtseite oben, kurz durch eine Spiritusflamme, so daß das Paraffin gerade eben schmilzt. Hierbei gerinnt das Eiweißglycerin und die Schnitte haften fest am OT.

## Entwässern der Schnitte

Bevor die Schnitte zu Dauerpräparaten verarbeitet werden können, müssen sie entwässert werden. Hierzu führt man sie durch die „aufsteigende Alkoholreihe“: Alkohol 50%-ig, Alkohol 96%-ig, Isopropanol, Isopropanol, Xylol, Xylol. Da Alkohol viele Farbstoffe auszieht, beläßt man die Schnitte nur so lange in der Lösung, wie Schlieren der vorherigen Stufe abgehen (OT leicht schwenken). In wasserfreiem Isopropanol sind alle Färbungen stabil, erst recht in Xylol.

Wird wasserfreier (!) Isopropanol in kleinen Mengen in das nachgeschaltete Xylol verschleppt, ist dies *per se* nicht schlimm, allerdings wird das Xylol dann „wasserfreundlich“ und kann zusätzlich geringe Mengen Wasser ohne warnende Trübung aufnehmen. Beim Trocknen von in Harz eingeschlossenen Schnitten bildet dieses Wasser dann häßliche Wassertröpfchen, die das Präparat verderben. Daher sollten immer zwei Stufen Isopropanol und zwei Stufen Xylol verwendet werden (öfters wechseln!).

Der in vielen Rezepten angegebene teure absolute Alkohol kann beim Entwässern unbedenklich durch Isopropanol ersetzt werden, nicht jedoch beim Färben selbst, denn Alkohol löst Farbstoffe wesentlich besser als Isopropanol. Man wird allerdings meist auf Brennspritus ausweichen können (96%-ig, gewöhnlich mit Methyl-ethylketon vergällt).

## Hämatoxylinfärbungen

Mit Hämatoxylinlösungen gefärbte Schnitte sehen zunächst bräunlich aus, der Farbstoff wird von destilliertem Wasser sehr rasch wieder ausgezogen. Eine stabile Färbung erhält man erst, wenn die Schnitte in nicht zu weiches Leitungswasser (!) eingestellt werden. Hierbei schlägt die Farbe nach blauviolett oder schwarz um („Bläuung“ der Schnitte). Überfärbte Schnitte „rettet“ man durch Einstellen in 1-5%-ige Essigsäure, danach muß abermals gebläut werden. Gelingt die Bläuung nicht, setzt man dem Leitungswasser etwas Natriumhydrogencarbonat zu.

Um unschöne Farbniederschläge durch überschüssige Hämatoxylinlösung zu vermeiden, taucht man den gefärbten Schnitt kurz (!) in destilliertes Wasser, danach wird sofort mehrere Minuten gebläut (Leitungswasser mindestens einmal wechseln).

## Einschlußmittel

Gewöhnlich bettet man in xylolhaltige Harze ein (künstl. CANADABALSAM, MALINOL). Besonders geeignet war der schon lange nicht mehr erhältliche CAEDAX (ältere Mikroskopiker hüten noch heute ihren CAEDAX wie einen Schatz!). Eingebettet in Kunstharz sind alle Färbungen unbegrenzt haltbar, vorausgesetzt die Schnitte enthalten keine Spuren von Salzsäure oder Pikrinsäure. Nachteilig ist das sehr langsame Aushärten (Wochen bis Monate). Am besten beläßt man die Präparate etwa eine Woche lang bei 60 °C in einem Trockenschrank. Ein Lackring ist nicht erforderlich.

Einfacher ist der Einschluß in EUPARAL, da dieses Einschlußmittel isopropanolverträglich ist, die Xylolstufen entfallen daher; außerdem härten die Präparate schneller

aus. Nicht alle Färbungen sind in diesem Einschlußmittel langzeitstabil, sie bluten aus (ausprobieren!). Auch hier ist kein Lackring erforderlich.

Glyceringelatine („GG“) wird nur ausnahmsweise verwendet, da die meisten Färbungen ausbluten, stabil sind nur Sudanfärbungen (Fettfärbungen, Cutinfärbungen) und Färbungen mit BECHER-Farben (Alizarinviridin-Chromalaun, Kernechtrot-Aluminiumsulfat). Vorteilhaft ist, daß der Quellungsgrad pflanzlicher Zellwände weitgehend erhalten bleibt. GG-Präparate werden grundsätzlich mit runden Deckgläschen angefertigt (Lackring!).

Da GG beim Trocknen u.U. stark schwindet, verwendet man reichlich GG. Dann läßt man mindestens 4 Wochen bei Raumtemperatur trocknen (nicht im Wärmeschrank!). Danach entfernt man überstehendes Einschlußmittel, säubert den OT sorgfältig (!) Mit Alkohol und umgibt das Präparat mit einem mehrschichtigen Lackring. Dieser soll das Verpilzen verhindern.

## **Sicherheitshinweise**

### **Pikrinsäure**

Trockene Pikrinsäurekristalle sind explosibel (Verpuffung!). Handelsüblich sind Kristalle, die mit 20% Wasser benetzt sind. Es empfiehlt sich, diesen Kristallen soviel destilliertes Wasser zuzusetzen, daß ein dicker Brei entsteht (mit einem Glasstab umrühren, so daß auch am Boden des Gefäßes ein Brei entsteht!). Beim Einwiegen bringt man den Brei zwischen Fliespapier, preßt die Flüssigkeit weitgehend ab und schlägt bei der Einwaage 20% zu (also 1,2 g feuchte Pikrinsäure auf 100 ccm Wasser, um eine 1%-ige Lösung zu erhalten).

Pikrinsäurelösungen dürfen nicht mit Lösungen von Schwermetallsalzen (Kupfer, Blei, Quecksilber u.s.w.) vermischt werden, da die ausfallenden Schwermetallpikrate explosiv sind, u.U. sogar in wässriger Suspension!

### **Sublimathaltige Fixierlösungen**

Gelegentlicher Umgang mit giftigen Sublimatlösungen ist unbedenklich, sofern man die selbstverständlichen Vorsichtsmaßnahmen beachtet. Bei monatelangem oder jahrelangem Umgang mit derartigen Lösungen stellt jedoch die Anhäufung selbst kleinster Quecksilbersalzmengen im Körper eine ernste Gefahr dar, denn Quecksilberionen werden nur sehr langsam ausgeschieden. Es empfiehlt sich dann, auf unbedenklichere Fixierlösungen auszuweichen. Gewöhnlich ist bei tierischem Gewebe die Bouinsche Lösung das Mittel der Wahl.

### **Osmiumtetroxid („Osmiumsäure“)**

Osmiumtetroxid ist eine flüchtige Verbindung, und auch dessen Lösungen setzen Osmiumtetroxid frei (Chlorgeruch). Diese Dämpfe sind äußerst giftig, selbst Spuren, über einen längeren Zeitraum aufgenommen, führen zu schwersten Hirnschäden (Symptome ähnlich denen einer chronischen Quecksilbervergiftung). Mit diesem Stoff darf nur unter einem gut ziehenden Abzug gearbeitet werden, die Lösungen müssen

in einem Absaugschrank aufbewahrt werden. **Osmiumtetroxid gehört nicht in die Hände von Amateuren!**

### **Ammoniakalische Silbernitratlösung**

Bei der „Versilberung“ von Nervengewebe kommt oft „ammoniakalische Silbernitratlösung“ zum Einsatz. Diese Lösung muß stets frisch bereitet werden, sie darf nur wenige Stunden aufbewahrt werden! Mit der Zeit bildet sich auf der Oberfläche Bertholletsches Knallsilber, das schon bei geringster Erschütterung heftig explodiert! Eine „Entschärfung“ ist dann nicht mehr möglich! Bevor man die Lösung fortschüttet, säuert man sie mit Salzsäure an (pH-Papier!), wobei weißes Silberchlorid ausfällt.