Anleitung
zum
Anfertigen
und
Färben
von
Paraffinschnitten

Dr.G.Rosenfeldt

2009 (ergänzt 2020)

Inhalt

1. Geeignete Objekte **4**
1.1. Regenwurm **4**
1.2. Guppys **4**
1.3. Labormäuse **4**
1.4. Kaulquappen **4**
1.5. Junge Tintenfische (Loligo) **5**
1.6. Pflanzliches Material **5**

2. Fixierung **6**
2.1. Fixierungsrezepturen **6**
2.2. Allgemeine Hinweise **6**
2.3. Bouinsche Lösung **7**

3. Einbetten in Paraffin **8**
3.1. Entwässern **8**
3.2. Das Intermedium **9**
3.3. Paraffinieren **10**
3.4. Blöcke gießen **11**
3.5. Celloidineinbettung **11**

4. Schneiden **12**
4.1. Zurichten der Paraffinblöcke **12**
4.2. Das Mikrotom **13**
4.3. Das Messer **14**
4.4. Vorbereitung der Objektträger **15**
4.5. Schnittbänder **16**
4.6. Einzelschnitte **16**
4.7. Einige Tricks **17**

5. Verarbeiten der Schnitte **18**
5.1. Entparaffinieren **18**
5.2. Färben und Einschließen **19**
5.2.1. Progressives und regressives Färben **20**
5.2.2. Mehrfachfärbungen **20**
5.2.3. Färben mit Hämatoxylin **20**
5.2.4. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) **22**
5.2.5. Die MASSON-GOLDNER-Färbung **24**
5.2.6. Die AZAN-Färbung **25**
5.2.7. Endverarbeitung **26**
5.2.8. Einschlußmittel **26**
5.2.9. Fluoreszenzmikroskopie **27**

6. Lagerung der Präparate **27**

7. Die Präparatekartei **27**

8. Weiterführende Literatur **28**
8.1. Wirbeltiere **29**
8.2. Nervengewebe **29**
8.3. Wirbellose **29**
8.4. Pflanzliches Material **29**
8.5. Spezialfärbungen **29**

9. REZEPTUREN **30**

ANFERTIGEN UND VERARBEITEN VON PARAFFINSCHNITTEN

Wohl jeder Mikroskopiker träumt davon, einmal Paraffinschnittserien herstellen zu dürfen, aber dem steht leider eine schlechte Nachricht entgegen:

> Paraffinsschnitte lassen sich nur mit professionellen, und das heißt, mit sehr teuren Mikrotomen herstellen.

Es gibt jedoch auch vier gute Nachrichten:

1. Das Herstellen von Paraffinschnitten ist viel einfacher als man vermutet, wenn man nur schaudernd die entsprechenden Arbeitsvorschriften liest.

2. Es ist durchaus sinnvoll, zunächst eine Sammlung von Paraffinblöcken zu erstellen, die man dann später einmal schneidet.

3. Ist man Mitglied einer „Arbeitsgemeinschaft für Mikroskopie“ – und es gibt bundesweit zahlreiche solcher Arbeitsgruppen – so sollte es möglich sein, Kontakte zu Universitätsinstituten zu knüpfen, die es Mitgliedern gestatten, mit institutseigenen Mikrotomen Schnittserien herzustellen, zumal Universitätsinstitute gewöhnlich recht hilfsbereit sind, persönliche Kontakte vorausgesetzt.

4. Außerdem sollte man überlegen, ob man nicht innerhalb einer solchen Arbeitsgemeinschaft Geld zusammenlegt, um ein entsprechendes Gerät anzuschaffen. Auch „Uraltgeräte“, Baujahr 1900, vielleicht über *e-bay* beschafft, sind durchaus zu empfehlen.

Arbeitsvorschriften zu diesem Thema gibt es genug, die folgenden Ausführungen enthalten jedoch zusätzlich etliche Hinweise, Erklärungen und Tips, die es dem Anfänger ermöglichen sollen, ohne allzu viele Enttäuschungen brauchbare Schnittserien herzustellen.

Beim Töten von Tieren, insbesondere von Wirbeltieren, sind die Vorschriften des heute gültigen Tierschutzgesetzes zu beachten, ferner ggf. die „Rote Liste“! Das schonende Einschläfern von Mäusen mit Ether ist nicht mehr zulässig, desgleichen das Einwerfen von kleinsten Fischen oder Kaulquappen in die Fixierlösung, um eine rasche und schrumpfungsfreie Fixierung zu gewährleisten.

1. Geeignete Objekte

Als Amateur ist man kaum an histologischen oder gar cytologischen Untersuchungen interessiert, vielmehr möchte man gut deutbare Übersichtsschnitte anfertigen. Besonders geeignet sind die folgenden Objekte:

1.1. Regenwurm

Regenwürmer erhält man in Handlungen für Anglerbedarf (man kann sie natürlich auch im Garten ausgraben).

Man setzt einen Regenwurm in eine feuchte Petrischale und füttert ihn etwa eine Woche lang mit fein zerriebenem feuchten Filtrierpapier. Der zunächst schwarze Kot muß jeden Tag entfern werden. Auf diese Weise stellt man sicher, daß der Darm keine kleinen Sandkörner mehr enthält, die beim Schneiden sehr stören und sogar das Messer beschädigen können. Danach übergießt man den Regenwurm mit einer 5 %igen Spirituslösung, um ihn zu töten. Unmittelbar nach dem Tod zerschneidet man den Wurm mit einer Rasierklinge in kurze Stücke von maximal 1 cm Länge, die man sofort in ein Gläschen mit Fixierlösung (s.u.) wirft. Die ersten 20 Segmente fixiert man getrennt, da sich in diesem Abschnitt die interessanten Geschlechtsorgane befinden.

1.2. Guppys

Man erwirbt Guppys in einer Aquarienhandlung. Die Gräten dieser kleinen Tiere enthalten kaum Kalzium, so dass eine Entkalkung mit Trichloressigsäure entfällt.

1.3. Labormäuse

Weiße Mäuse erwirbt man in einer Zoohandlung. Nach dem Töten öffnet man die Bauchhöhle mit einer Präparierschere und entnimmt alle Organe, die man sofort in die Fixierlösung wirft. Den Darm schneidet man vorher in etwa 1 cm lange Stücke, die Leber zerlegt man mit einer Rasierklinge in Scheiben von 5 mm Dicke, den Magen schneidet man der Länge nach auf, die Nieren werden *in toto* fixiert, desgleichen die Drüsen des Geschlechtsapparates. Man kann zudem leicht das Gehirn entnehmen, da sich die dünne Schädelkapsel problemlos aufschneiden läßt. Ferner sollte man versuchen, die Augen unbeschädigt zu entnehmen.

1.4. Kaulquappen

Auch diese Objekte sind sehr gut geeignet, da das Skelett noch nicht verknöchert ist. Besonders schön sind Schnitte von Schwanzlurch-Kaulquappen, da Schwanzlurche besonders große Zellkerne besitzen.

1.5. Junge Tintenfische (Loligo)

Auch kleine Tintenfische (Loligo) von etwa 1 cm Länge sind sehr interessante Objekte (Augen!), allerdings kann man diese nur über meeresbiologische Anstalten erhalten.

1.6. Pflanzliches Material

Auch pflanzliches Material ist geeignet, sofern es sehr weich ist, keine verholzten Teile enthält und auch keine Kieselsäure (Grashalme und Grasstengel sind daher ungeeignet!). Man gibt die Pflanzenteile in die Fixierlösung und verarbeitet sie wie tierisches Gewebe.

Besonders interessant sind die Wurzelspitzen von Küchenzwiebeln, da sie Kernteilungsfiguren zeigen. Hierbei ist allerdings zu beachten, daß die meisten Küchenzwiebeln keine Wurzel treiben, da sie entsprechend chemisch vorbehandelt sind. Man verwendet „Biozwiebeln“, die man auf ein Gläschen mit Wasser legt. Haben die Wurzelspitzen das Wasser erreicht, schneidet man die Spitzen ab (ca. 1 cm) und gibt sie in die Fixierlösung. Dies sollte morgens gegen 8 Uhr geschehen, da dann besonders viele Zellteilungen erfolgen.

2. Fixierung

Bevor man Gewebe weiterverarbeiten kann, muß es derart konserviert werden, daß ohne Schrumpfungen der lebendfrische Zustand gewissermaßen chemisch eingefroren wird. Die Konservierungsflüssigkeit muß also sehr schnell eindringen, außerdem soll die Färbbarkeit erhalten bleiben. Man bezeichnet entsprechende Lösungen als „Fixierlösungen“, den Vorgang selbst als „Fixierung“. Es ist klar, daß es eine universell anwendbare Fixierlösung nicht geben kann, vielmehr benötigt man für jedes Gewebe eine spezielle Fixierlösung, und dem entsprechend ist die Zahl der empfohlenen Fixierlösungen unüberschaubar groß. Da man aber als Amateur keine histologischen oder gar cytologischen Feinuntersuchungen durchführen will, sondern an Übersichtsschnitten interessiert ist, kommt man gewöhnlich mit nur einer Fixierlösung aus. Bewährt hat sich für derartige Zwecke die BOUINSCHE LÖSUNG (s.u.).

2.1. Fixierungsrezepturen

Abgesehen von sehr speziellen Anwendungen lassen sich Fixierlösungen in zwei Gruppen einteilen: Fixiergemische auf Formaldehydbasis und Fixiergemische auf Sublimatbasis.

Formaldehyd (40%ige Lösung 1:10 verdünnen) ist eines der ältesten Fixiermittel, wird jedoch in reiner Form kaum angewendet, da Gewebsblöcke außen sehr rasch verfestigt werden und die Lösung dann nur noch sehr langsam eindringt; ferner leidet die Färbbarkeit des Materiales. Man verwendet stets Formaldehydlösungen mit verschiedenen Hilfsstoffen.

Sublimat (Quecksilber-II-chlorid) wird ebenfalls nur in Verbindung mit weiteren Zusatzstoffen angewendet. Obwohl derartige Lösungen immer wieder gelobt werden, da bestimmte Färbungen besonders brillant ausfallen, sei vor der Anwendung gewarnt: Sublimat ist nicht nur sehr giftig (davor kann man sich leicht schützen!), es besteht vielmehr bei häufiger Anwendung die Gefahr einer chronischen Quecksilbervergiftung, denn Quecksilber wird über die Nieren nur sehr langsam ausgeschieden. Außerdem greifen Sublimatlösungen Metalle stark an (Objektive!), bei Kontakt mit Bleirohren verursachen sie Lochfraß (alte Abflußrohre!).

2.2. Allgemeine Hinweise

1. Die zu fixierenden Gewebsstücke oder Organe sollen nicht dicker als 5 mm sein, damit sie rasch durchfixiert werden.

2. Man verwende stets einen großen Überschuß an Fixierlösung (ca. das 50-fache Volumen des eingebrachten Materiales).

3. Gebrauchte Lösungen sollte man nicht wieder verwenden.

4. Die Fixierdauer soll 24 Stunden nicht unter- und 48 Stunden nicht überschreiten, da sonst „Überfixierung“ eintreten kann – das Material läßt sich schlechter schneiden und färben.

5. Nach dem Fixieren beginnt man sofort mit der Entwässerung (s.u.); bestimmte Fixiermittel müssen vorher durch längeres Wässern entfernt werden.

6. Man legt auf den Boden des Fixiergefäßes etwas Glaswolle, so daß die Objekte stets von allen(!) Seiten von Fixierlösung umspült werden; außerdem schwenkt man von Zeit zu Zeit um.

2.3. BOUINSCHE LÖSUNG

150 ml gesättigte Pikrinsäurelösung
50 ml Formaldehyd 40-%ig
10 ml Eisessig

Die Lösung soll frisch angesetzt werden, ist jedoch nach meiner Erfahrung bei kühler Aufbewahrung mindestens eine Woche stabil. Nach dem Fixieren kann man gleich in Alkohol 70% überführen, besser ist jedoch mit stärker verdünntem Alkohol zu beginnen. Die letzten Reste der Pikrinsäure werden erst während der Weiterverarbeitung der Schnitte entfernt.

3. Einbetten in Paraffin

Das Einbetten erfolgt in drei Teilarbeitsgängen:

1. Schrittweises Ersetzen des Wassers durch Alkohol („Entwässern“).

2. Ersetzen des Alkoholes durch ein Lösungsmittel, das sowohl alkohol- als auch paraffinverträglich ist; derartige Lösungsmittel werden als „Intermedia“ bezeichnet.

3. Ersetzen des Intermediums durch Paraffin (Schmelzpunkt ca. 56 oC) bei 60 oC.

Jeder Einzelschritt (s.u.) erfordert 24 Stunden; längeres Verweilen der Objekte in den verschiedenen Flüssigkeiten ist unkritisch.

Natürlich möchte man, gerade als Anfänger, Ergebnisse sehen, denn man ist ja neugierig, ob alle Prozeduren tatsächlich erfolgreich waren, aber hier ist Geduld gefordert. Als Mikroskopiker hat man genug andere Beschäftigungen, und so führt man das Paraffinieren ganz entspannt „nebenher“ durch – man schwenkt die Gefäße gelegentlich um, alles andere geht ganz von selbst!

3.1. Entwässern

Zum stufenweisen Entwässern benötigt man Alkohol (Ethanol, Ethylalkohol). Heute kann man bedenkenlos handelsüblichen Brennspiritus verwenden (96%ig), da dieser nicht mehr, wie früher, mit Pyridinbasen vergällt wird. Eine derartige Vergällung erkennt man am „brenzlichen“ und zugleich „fischähnlichen“ Geruch. Besonders gut geeignet ist Alkohol, der mit Methylethylketon („MEK“) vergällt wurde. Alkohol, der mit Petrolether vergällt wurde, ist nur mit Genehmigung der staatlichen Monopolgesellschaft erhältlich, er scheidet für Privatpersonen aus.

Da Brennspiritus nicht wasserfrei ist, überführt man das Material schließlich in Isopropanol (Isopropylalkohol), der wasserfrei erhältlich ist. Man führt das fixierte Material durch die folgenden Entwässerungsstufen:

1. Ethanol 30-%ig (1 Volumen Brennspiritus, 2 Volumina Aqua dest.)
2. Ethanol 66-%ig (2 Volumina Brennspiritus, 1 Volumen Aqua dest.)
3. Ethanol 96-%ig (reiner Brennspiritus)
4. Isopropanol Stufe 1
5. Isopropanol Stufe 2

In jeder Lösung verbleibt das Material mindestens 24 Stunden lang (Boden des Gefäßes mit Glaswolle bedecken, mehrfach umschwenken).

Hat man eine Charge entwässert, gießt man „Isopropanol Stufe 1“ fort, verwendet „Isopropanol Stufe 2“ als „Isopropanol Stufe 1“ und erneuert „Isopropanol Stufe 2“; auf diese Weise spart man Lösungsmittel. Die Alkoholstufen gießt man dagegen einfach fort (geringer Preis).

3.2. Das Intermedium

Intermedien sollen gleichzeitig alkohol- und paraffinverträglich sein. Es kommen infrage:

1. Chlorkohlenwasserstoffe (z.B. Chloroform)
2. Benzol (Chronisch giftig! Leukämiegefahr!)
3. Toluol
4. Xylol
5. Dioxan (Chronisch sehr giftig!)
6. Terpineol (nicht zu verwechseln mit Terpentin!)
7. Methylbenzoat (Benzoesäuremethylester)

Tränkt man das Material mit leicht flüchtigen Lösungsmitteln und bringt es dann in Paraffin von 60 oC, so verdampft das Lösunsmittel u.U. so rasch, daß es zu Schrumpfungen kommt – deshalb ist z.B. Chloroform nur bedingt geeignet.

Viele Intermedien (z.B. Xylol) nehmen keinerlei Wasser mehr auf – ist das Material nicht einwandfrei entwässert worden, verbleiben diese geringen Wasserreste im Material und führen zu Verhärtungen – u.U. ist das Material später nicht mehr schneidbar.

Am besten geeignet sind Terpineol und Methylbenzoat, da diese Intermedien eventuell vorhandene Wasserspuren binden, allerdings müssen diese Intermedien <u>vollständig</u> durch Paraffin ersetzt werden, da die Blöcke sonst beim Schneiden „schmieren“. Beim Paraffinieren wird das Paraffin daher dreimal gewechselt.

Vorgehen:

1. Methylbenzoat Stufe 1
2. Methylbenzoat Stufe 2

jeweils 24 Stunden.

Beim Einbringen des Materiales in „Methylbenzoat Stufe 1“ schwimmt dieses zunächst auf, dann sinkt es langsam unter und wird zugleich mehr oder weniger durchsichtig. Bleibt es an einigen Stellen opak, sind zu große Wasserreste vorhanden (zurück in Isopropanol!).

Nach Durchsatz einer Charge verwendet man „Stufe 2“ als „Stufe 1“.

Hat man Zugang zu einer Destilliereinrichtung, sammelt man verbrauchtes Benzoat und läßt es später (am besten im Vacuum) redestillieren. Es kann dann erneut verwendet werden.

3.3. Paraffinieren

Nachdem das Material mit dem Intermedium durchtränkt ist, bereitet man drei Gefäße vor, die man mit je 100 g Paraffin, Schmelzpunkt ca. 56 oC, beschickt und auf ca. 60 oC erhitzt. In jedem dieser Gefäße verbleibt das Material 24 Stunden. Ein Umschwenken ist nicht erforderlich, da das austretende Intermedium aufsteigt.

Folgende Heizquellen kommen infrage:

1. Wärmeschrank (teuer)
2. Wärmeschrank, Eigenbau (sehr billig)
3. Wärmebank
4. Becherglas mit Lampenheizung

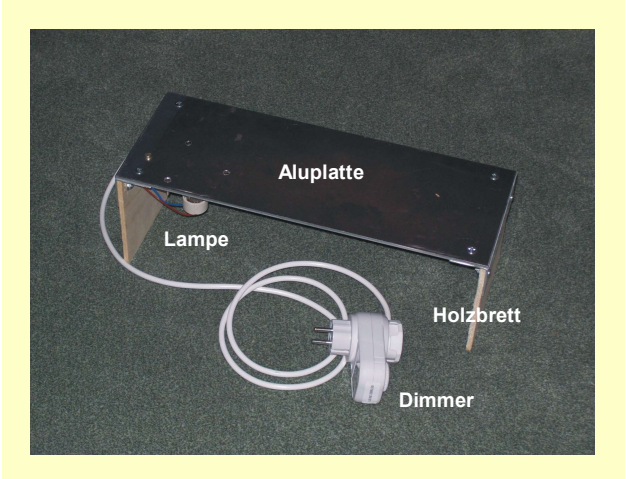


Abb.1 Wärmebank

Ein einfacher Wärmeschrank läßt sich sehr einfach basteln: An einer rechteckigen großen Blechdose wird außen ein kleiner Halogenscheinwerfer (20 W – 50 W, 230 V) befestigt, der über einen Dimmer geregelt wird. Im Inneren bringt man einen „Miniventilator“ an, wie man ihn zur Kühlung von Mikroprozessoren verwendet (Betrieb über ein entsprechendes kleines Netzteil). Den Deckel versieht man mit einer Bohrung, in die man ein Thermometer setzt. Es sollten 70 oC erreichbar sein, ggf. muß man die Blechdose mit Styroporplatten isolieren.

Da man in einer solchen Blechdose auch Präparate sehr gut trocknen kann, konstruiert man gleich einen passenden Holzrahmen (geringe Wärmeleitfähigkeit!), auf dem man ein steifes Drahtnetz befestigt.

Bringt man die heizende Lampe im Inneren an (bessere Heizwirkung), ist diese so abzuschirmen, daß das Trockengut nicht direkt angestrahlt wird, denn die Erwärmung darf nur über die warme Umluft erfolgen, nicht über die Infrarotstrahlung der Lampe.

Eine Wärmebank wird ganz ähnlich konstruiert (Abb.1), als „Füßchen“ verwendet man zwei dicke Holzbrettchen (geringe Wärmeleitfähigkeit). Man sollte stets über eine einfache Wärmebank verfügen, da man sie oft benötigt, insbesondere zum „Strecken“ der Schnitte (s.u.).

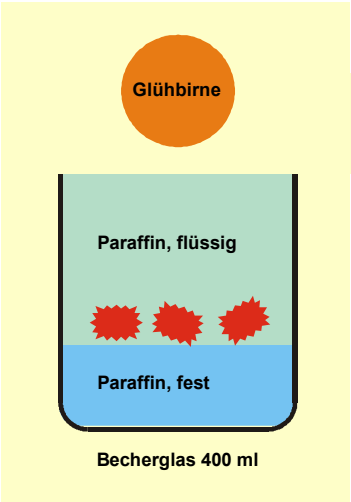


Abb.2 s.Text

Besonders einfach ist die Paraffinierung mit Hilfe einer Leselampe (Abb. 2): Man beschickt ein großes Becherglas (ca. 400 ml, weite Öffnung) mit reichlich Paraffin und bringt über diesem eine Lampe (ca. 50 W) so an, daß die oberen zwei Drittel des Paraffins schmelzen. Haben sich stabile Verhältnisse eingestellt, überträgt man das Ma-

terial in dieses Becherglas. Das Material sinkt unter und bleibt auf dem festen Paraffinboden liegen. Diese Grenzschicht hat naturgemäß gerade die Temperatur des schmelzenden Paraffins (ca. 56 oC). Nachteilig ist, daß die oberen Schichten u.U. eine sehr viel höhere Temperatur besitzen (nachmessen!).

3.4. Blöcke gießen

Nachdem man das Material durch drei Stufen Paraffin geführt hat, bereitet man ein großes Becherglas mit geschmolzenem Paraffin vor (ca. 60 oC).

Man streicht Blockschälchen mit wenig Glycerin aus, füllt sie mit Paraffin und überträgt die Objekte in diese Schälchen, wobei man sie passend orientiert. Zum Hantieren verwendet man eine Pinzette, deren Spitze man über einer Spiritusflamme erhitzt, so daß die Objekte nicht durch erkaltendes Paraffin festkleben. Sobald sich eine dickere Haut aus erkaltendem Paraffin gebildet hat, stellt man die Blockschälchen in eine große Schale mit kaltem Wasser und beläßt sie dort für etwa 15 Minuten. Durch diese „Schock-Kühlung“ wird die Schneidbarkeit verbessert, denn bei langsamen Abkühlen kann Paraffin durch teilweise Kristallisation körnig erstarren, und das ist nachteilig.

Diese „Rohblöcke“ versieht man unterseitig mit einem Etikett (Blocknummer, fortlaufend nummeriert, Objekt, Orientierung, Fixierung), welches man mit einer heißen Messerschneide derart andrückt, daß es mit Paraffin getränkt wird – ein solches Etikett haftet „bombenfest“. Danach bewahrt man die Rohblöcke in kleinen beschrifteten Schachteln auf.

Da mit der Zeit zahlreiche Blöcke anfallen, legt man sich gleich eine „Blockkartei“ an, wobei man die Karteikarten nach steigender Blocknummer sortiert und für jeden Block nicht nur das Objekt, sondern auch die Art der Fixierung und alle weiteren Arbeitsschritte (Intermedium!) nebst Verweilzeiten notiert.

Die so paraffinierten Objekte sind unbegrenzt haltbar. Ich selbst habe noch 1990 humanpathologisches Material geschnitten, das 1906 (!) paraffiniert worden war. Die Schneidbarkeit und Färbbarkeit war einwandfrei!

3.5. Celloidineinbettung

Beim Schneiden mit dem Mikrotom werden Paraffinschnitte irreversibel verformt, wobei diese Verformung auch nach dem „Strecken“ (s.u.) erhalten bleibt. Gewöhnlich stört dies nicht; will man jedoch aus einer Schnittserie ein dreidimensionales Modell rekonstruieren, sind derartige Verformungen nicht zu tolerieren. In diesem Falle tränkt man das Material mit Celloidin (mäßig nitrierte Nitrozellulose), da sich dieses Material beim Schneiden elastisch verhält und sofort wieder die alte Form annimmt. Verarbeitet werden Einzelschnitte, die in Blockschälchen gefärbt werden. Für den Amateur hat diese Methode nur Nachteile, denn schon das Tränken mit Celloidin ist schwierig, desgleichen die Weiterverarbeitung. Zudem kann man nicht so dünn schneiden, wie dies mit Paraffin möglich ist. Manche Materialien, die bei Paraffineinbettung zu hart werden, lassen sich in Celloidin allerdings besser schneiden.

4. Schneiden

4.1. Zurichten der Paraffinblöcke

Zunächst besorgt man sich ein Dutzend Holzklötzchen von ca. 2 - 3 cm Kantenlänge, möglichst aus Hartholz. Am einfachsten ist es, eine entsprechende Leiste in kleine Stücke zu zersägen. Gut geeignet sind auch Würfel aus hartem Kunststoff (z.B. PERTINAX), allerdings müssen diese an einer Seite mit zahlreichen Rillen versehen werden (einsägen). LEGO-Steine sind ungeeignet, da zu weich.

Man versieht nun die Stirnseite(!) des Holzes mit etwas geschmolzenem Paraffin und legt die heiße Schneide eines Messers auf, sodaß das Paraffin etwas in das Holz einzieht; dann läßt man erkalten.

Danach schneidet man aus den noch runden Paraffinblöcken Würfel von ca. 1,5 cm Kantenlänge, die mittig das Objekt enthalten. Ggf. muß man einen Quader schneiden, denn die Objekte müssen allseitig von Paraffin umgeben sein. Man schneidet mit einem heißen scharfen Obstmesser mit gerader Schneide.

Schließlich stellt man ein paraffiniertes Klötzchen auf die Arbeitsplatte, erhitzt die Schneide eines Obstmessers, drückt die Schneide auf das Klötzchen und drückt den Paraffinwürfel auf die Oberseite der heißen Schneide, dann zieht man die Schneide zurück und drückt den Würfel auf die Oberfläche des Klötzchens. Die beiden angeschmolzenen Flächen werden so miteinander verschweißt und der Paraffinwürfel ist mit dem Klötzchen fest verbunden.

MINOTSCHE Mikrotome besitzen einen Blockträger aus Metall, gewöhnlich ein geriffelter Teller mit Stiel, auf dem man den Paraffinblock in gleicher Weise befestigt. Leider steht meist nur ein solcher Probenhalter zur Verfügung.

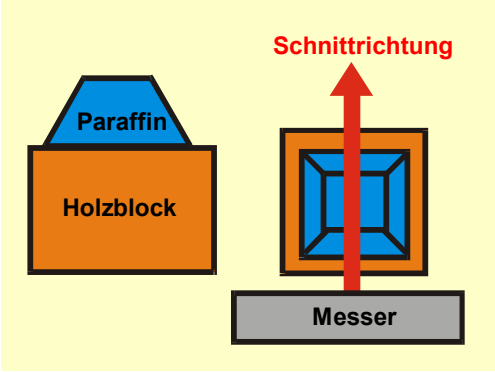


Abb.3 Zugerichteter Block

Nach 15 Minuten wird der Paraffinwürfel, wiederum mit einem heißen Obstmesser, „zugerichtet“. Man schneidet ihn so, daß eine abgestumpfte Pyramide mit einem Seitenwinkel von etwa 45 Grad entsteht. Die untere Kantenlänge soll etwa 1,5 cm betragen, die obere etwa 5 mm. Wichtig ist, daß die Seiten möglichst rechtwinklig zueinander liegen und daß die Kanten der Spitze zueinander parallel verlaufen – dies gilt insbesondere für die Anschnitt- und die Abschnittkante (Abb.3).

Schließlich spannt man den Block so in das Schlittenmikrotom ein, daß Messer und Anschnittkante exakt parallel zueinander angeordnet sind. Dann schneidet man solange Schnitte von 20 um Dicke herunter, bis das eingebettete Objekt zum Vorschein kommt. Man wartet einige Minuten, dann beginnt man mit dem eigentlichen Schneiden. Für tierisches Material ist eine Schnittdicke von 8 um bis 10 um ideal, bei pflanzlichem Material schneidet man mit einer Dicke von 20 um, da dünnere Schnitte ein sehr untypisches Bild liefern.

4.2. Das Mikrotom

Paraffinschnitte können nur mit professionellen Mikrotomen angefertigt werden, wobei auch „Uraltgeräte“ gute Dienste leisten. Man unterscheidet „Schlittenmikrotome“ und „MINOTSCHE Mikrotome“ (Abb.4 und 5). Schlittenmikrotome sind universell einsetzbar, während MINOTSCHE Mikrotome ausschließlich für Paraffinschnitte geeignet sind, da das fest stehende Messer nicht beliebig orientiert werden kann. Dafür gelingt es leichter, lange Schnittbänder herzustellen.

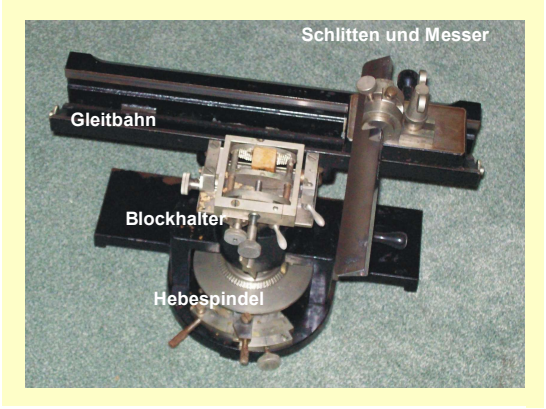


Abb.4 Schlittenmikrotom
ältere Bauart

Wurde ein Mikrotom sehr lange nicht benutzt, kann es auf den Gleitflächen zur Bildung von Flugrost kommen. Diesen entfernt man mit einem Metallpoliermittel (z.B. SIDOL), keinesfalls jedoch mit Scheuersand oder gar Schmirgelpapier! Generell lassen sich Schlittenmikrotome leicht auseinandernehmen und reinigen, MINOTSCHE Mikrotome sollte man nur demontieren, wenn man über einige feinmechanische Erfahrung verfügt und das nötige Werkzeug besitzt. Wenn bei einem solchen Gerät Lager oder Gleitflächen schwergängig sind, hilft man sich mit Gleitspray, wie man ihn bei Schlüsseldiensten erwerben kann. Es versteht sich, daß man bei beiden Mikrotomtypen die beweglichen Teile ölen muß, besonders gut geeignet sind spezielle „Mikrotomöle“.

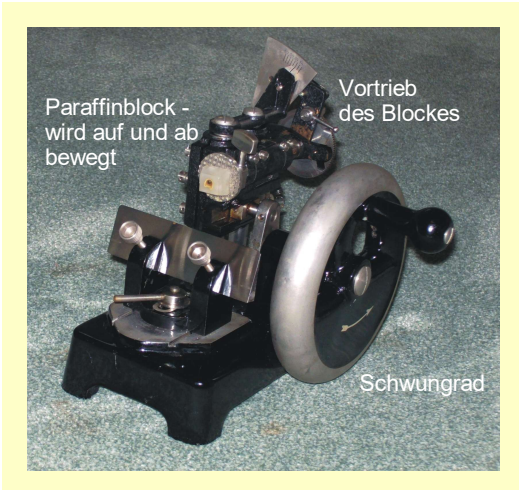


Abb.5 MINOT-Mikrotom

Verwendet man ein Schlittenmikrotom, so ist unbedingt auf eine unfallverhütende Aufstellung zu achten (Abb.6)! Das gewöhnlich recht lange Messer darf keinesfalls die Arbeitsplatte überragen, denn dann kann es „im Vorbeigehen“ sehr leicht zu Verletzungen kommen. Mikrotommesser sind so scharf, daß Schnitte gewöhnlich bis zum Knochen reichen, und dann besteht die Gefahr einer Knochenhautentzündung bis hin zu einer Amputation! Derartige Wunden müssen unbedingt von einem Arzt versorgt werden! Sehr zu empfehlen sind „Messerschützer“, die mit einem Magneten befestigt werden und den nicht benötigten Teil der Schneide abdecken; zur Not kann man auch Korken aufschieben, die man zuvor der Länge nach geschlitzt hat.

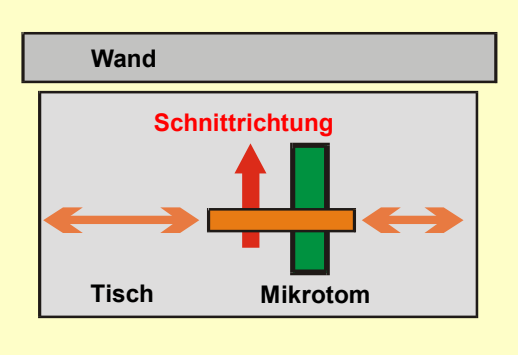


Abb.6 Sichere Aufstellung

Neben den hier genannten Mikrotomen sind noch zwei weitere in Gebrauch: Grundschlittenmikrotome und Gefrierschnittmikrotome.

Bei Grundschlittenmikrotomen ist das Messer beidseitig fest eingespannt und der Block wird auf einen Schlitten bewegt, sie dienen zum Anfertigen sehr großer Übersichtsschnitte (mehre cm Kantenlänge).

Gefrierschnittmikrotome dienen dem Schneiden unfixierten Materiales. Sehr kleine Gewebeproben werden mit Wasser bedeckt und auf einem hohlen Träger durch Einblasen von flüssigem CO2 schockgefroren. Geschnitten wird mit einem gekühlten Messer, wobei man sich die Tatsache zunutze macht, daß Eis unter hohem Druck (Schneide des Messers) lokal flüssig wird und dann nach Entlastung sofort wieder gefriert („Schlittschuh-Effekt“). Die so gewonnenen Schnitte besitzen meist keine gute Qualität, zudem sind sie nur schwierig zu verarbeiten. Man stellt Gefrierschnitte dann her, wenn man sehr rasch Ergebnisse benötigt (histoloische Diagnose während einer Operation) oder für histochemische Untersuchungen, die nur mit nativem (unfixiertem) Material gelingen.

4.3. Das Messer

Als Messer verwendet man keilförmige „Messer für Paraffinschnitte“ (sog. C-Schliff). Diese Messer werden senkrecht (nicht schief!) zur Schnittrichtung ausgerichtet (Abb.7). Die Schneide wird also durch den Block „gedrückt“, nicht „gezogen“, wie z.B. bei Celloidinschnitten.

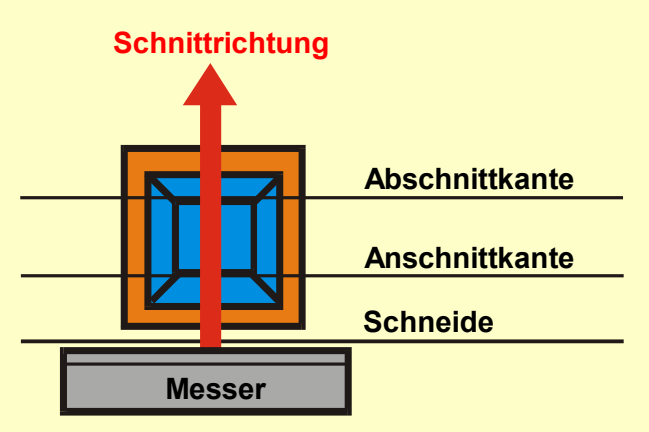


Abb.7 Ausrichtung des Messers

Alle Mikrotome besitzen eine Justiermöglichkeit zur Einstellung des Kippwinkels des Messers. Entscheidend ist hierbei die Größe des „Freiwinkels“ (Abb.8), die empirisch ermittelt werden muß (daher zunächst einen leeren Block schneiden! Schnittdicke 8 um – 10 um). Als Regel gilt:

1. Freiwinkel zu groß: Schnitte rollen sich auf.

2. Freiwinkel zu klein: Schnitte werden zu stark gestaucht.

3. Freiwinkel negativ: Nur jeder zweite oder dritte Schnitt „kommt“, die Schnittdicke schwankt zudem; das Messer schneidet nicht, sondern drückt den Block nur zusammen.

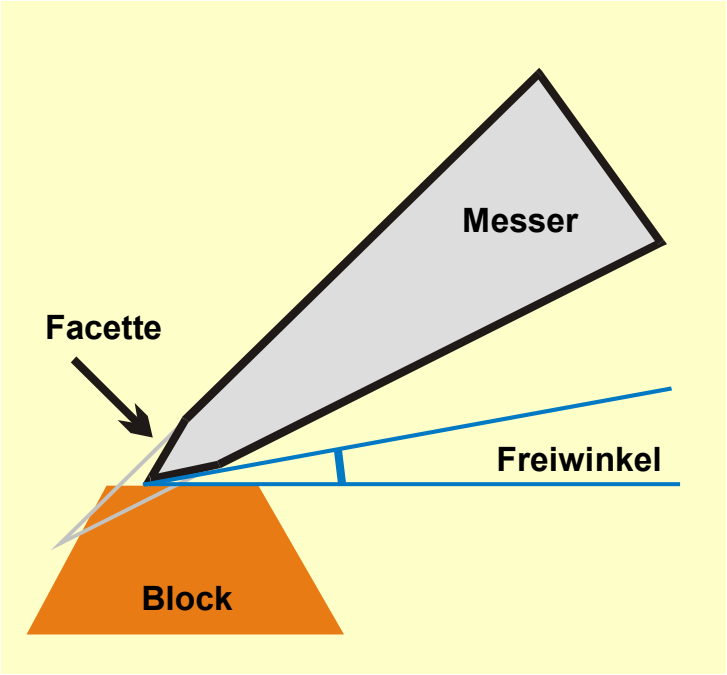


Abb.8 Der Freiwinkel

Wie aus den Abbildungen hervorgeht, besitzt ein Mikrotommesser eine definierte „Facette“. Diese Facette kann nur maschinell erzeugt werden. Es ist daher nicht möglich, ein stumpfes Messer selbst nachzuschärfen. Man bringt das Messer zu einer Handlung für Medizinbedarf, die das Messer dann einschickt (teuer!). Verfügt man über ein langes Messer, so verschiebt man dasselbe um etwa 1 cm, wenn es stumpf wird, und verwendet einen noch unbenutzten Teil der Schneide. Bei MINOTSCHEN Mikrotomen ist dies gewöhnlich nur sehr begrenzt möglich.

4.4. Vorbereitung der Objektträger

Bevor man mit dem Schneiden beginnt, stellt man mindestens 50 absolut(!) fettfreie Objektträger bereit (am besten solche mit abgeschliffenen Kanten). Schon vor der Reinigung werden die Objektträger mit einem Diamantschreiber fortlaufend durchnumeriert, wobei man diese fortlaufende Numerierung auch später beibehält (letzte Nummer notieren!). Auf diese Weise ist sichergestellt, daß jeder Objektträger individuell markiert ist, da keine Nummer doppelt vorkommt. Diese Bedingung bleibt auch dann erhalten, wenn man mißlungene Schnitte entfernt und den nun schon numerierten Objektträger wieder verwendet. Da beim Schneiden stets große Mengen beschichteter Objektträger anfallen, ist die hier beschriebene Numerierung später sehr hilfreich!

Die Reinigung erfolgt in einer handelsüblichen Geschirrspülmaschine, allerdings muß man sich ein passendes „Reinigungsgestell“ selbst basteln. Am einfachsten ist es, sich einen Präparateskasten für 100 Präparate zu besorgen, der vollständig aus Kunststoff gefertigt ist. Man entfernt den Deckel und sägt in den Boden mit einer Rundsäge mehrere große Löcher. Ein solches Gestell verträgt mit Sicherheit einen Waschgang bei 65 oC, ob der Kunststoff aber auch die Heißlufttrocknung übersteht, probiere man zunächst mit dem jetzt nutzlosen Deckel aus! Eventuell muß man die Trocknung nach wenigen Minuten abbrechen, da sich das Gestell sonst in eine futuristische Plastik verwandelt.

Die frisch(!) gereinigten Objetkträger werden nun mit <u>Einweißglycerin</u> beschichtet (fertig kaufen, Selbstherstellung lohnt nicht). Man gibt einen(!) Tropfen auf den Objektträger und verteilt diesen mit dem Handballen auf der gesamten Oberfläche. Hat man genügend Objektträger vorbereitet, beginnt man mit dem Schneiden.

4.5. Schnittbänder

Mehrere beschichtete Objektträger (s.o.) werden auf ganzer Fläche mit Aqua dest. bedeckt. Es ist zweckmäßig, dieses Wasser vorher einige Minuten zum Sieden zu erhitzen, damit gelöste Gase entweichen, sonst bilden sich später beim Trocknen unter den Paraffinschnitten Luftblasen. An diesen Stellen lösen sich die Schnitte später unweigerlich beim Färben vom der Unterlage ab. Das so vorbereitete Wasser füllt man in eine Pipettenflasche und läßt abkühlen.

Man schneidet nun mit einer Arbeitsgeschwindigkeit von etwa einem Schnitt pro Sekunde, wobei man den Schlitten des Mikrotomes sehr gleichmäßig bewegt. Hierbei kleben die Schnitte an der Schneide zusammen, und es bildet sich ein „Schnittband“, das sich über die Messerklinge schiebt. Dieses Band soll möglichst gerade sein. Ist dies nicht der Fall, wurde der Paraffinblock falsch zugerichtet. Kleben die Schnitte am Messer, wird dieses mit Xylol gereinigt.

MINOTSCHE Mikrotome sind für das Anfertigen von Schnittbändern besonders gut geeignet, da das Messer nicht bewegt wird. Manche dieser Mikrotome verfügen zusätzlich über ein Transportband, das das Schnittband bei jedem Schnitt vom Messer wegzieht.

Die so erstellten Schnittbänder sind stets runzelig. Man unterfährt das Band mit einem feuchten Pinsel (Marderhaarpinsel, keinen „Tuschebesen“!) dort, wo es an der Schneide haftet, und legt es auf den nassen Objektträger, blanke Seite nach unten(!), so daß es frei flottiert. Dann legt man den Objektträger für kurze Zeit auf eine Wärmebank, wobei sich die Schnitte sofort strecken. Hierbei darf das Paraffin auf keinen Fall schmelzen! Danach legt man den Objektträger auf die kalte Tischplatte, saugt das Wasser mit Fliespapier ab, wobei man das Band passend orientiert, schließlich läßt man an einem staubfreien Ort mindestens 48 Stunden trocknen, besser in einem Wärmeschrank bei 45 oC. So behandelt, können die Schnitte jahrelang aufbewahrt werden, sofortiges Weiterverarbeiten ist nicht erforderlich.

Mißlungene Schnittbänder werden nicht verworfen; sie dienen später für Vorversuche, z.B. zur Ermittlung der optimalen Färbezeiten.

Wegen der großen Zahl beschichteter Objektträger legt man sich eine Kartei an, wobei es genügt, für jede Objektträgergruppe die Blocknummer zu vermerken, von dem die Schnittserien stammen („Objektträgerkartei“).

4.6. Einzelschnitte

Das Verarbeiten von Einzelschnitten ist unökonomisch und zudem nicht sinnvoll, da es viel besser ist, im fertigen Präparat viele Schnitte untersuchen zu können, die zudem aufeinander folgend gewonnen wurden. Deshalb verwenden auch Wissenschaftler fast nur Schnittbänder.

Mikrolabore, die ihre Schnitte verkaufen müssen, stellen dagegen gewöhnlich Einzelschnitte her, abgedeckt mit einem runden Deckglas und mit einem schönen Lackring versehen. Hierzu werden Schnittbänder auf dünne Glimmerfolien aufgebracht und gefärbt, dann wird die Folie, nachdem sie in Xylol überführt wurde, mit einem geeigneten Messer in kleine Schnipsel zerlegt, wobei jeder Schnipsel genau einen Schnitt

trägt. Bei einem anderen Verfahren werden Einzelschnitte auf runden Deckgläschen aufgezogen und weiter verarbeitet. Dies spart Lösungsmittel, allerdings benötigt man spezielle Färbekörbchen, die nicht im Handel erhältlich sind. Für Amateure kommen diese Verfahren nicht infrage.

4.7. Einige Tricks

Erhält man beim Schneiden eines Leerblockes einwandfreie Schnittbänder, so ist das Messer richtig justiert (s.o.). Trotzdem kommt es oft vor, dass sich die Schnitte dann beim Schneiden eingebetteter Objekte derart aufrollen, dass man keine Schnittbänder erhält, nicht einmal brauchbare Einzelschnitte. In diesem Falle sollte man das Messer nicht neu justieren, vielmehr helfen oft die folgenden Vorgehensweisen:

1. Messer beidseitig mit Xylol reinigen.

2. Hilft das nicht, schneidet man zweimal und versucht dann die „Schnittrolle“ mit einem spitzen Pinsel vorsichtig teilweise zu entrollen, wobei die Rolle weiterhin an der Schneide haften bleiben soll(!). Wenn man jetzt weiter schneidet, wirkt die Rolle wie ein kleines Gewicht, das die Aufrollung der Folgeschnitte verhindert, so dass man nun ein Schnittband erhält. Dieser Trick ist bei MINOTSCHEN Mikrotomen besonders wirkungsvoll (feststehendes Messer).

Bei längerem Arbeiten ist das Mikrotom unweigerlich mit zahlreichen Fehlschnitten bedeckt. Berührt man diese, um sie zu entfernen, so kleben die Schnitte sofort am Mikrotom fest und müssen dann mühsam mit Xylol oder Toluol entfernt werden. Man reinigt das Mikrotom daher während der Arbeit von Zeit zu Zeit mit einem Staubsauger.

5. Verarbeiten der Schnitte

Die trockenen Objektträger werden nun, Schichtseite nach oben, so lange durch eine Spiritusflamme gezogen, bis das Paraffin überall gerade eben schmilzt. Hierbei gerinnt das Einweiß des Eiweißglycerins und die Schnitte haften fest an der Glasoberfläche.

Die Verarbeitung erfolgt in drei Teilarbeitsgängen, die sofort nacheinander durchgeführt werden müssen:

1. Entparaffinieren
2. Färben
3. Entwässern und Einbetten

Alle Prozeduren werden entweder in Färbezylindern durchgeführt (nehmen jeweils nur einen Objektträger auf) oder in Färbeküvetten (nehmen 6 Objektträger auf); Färbetröge mit Einsätzen für 10 und mehr Objektträger sind etwas für Profis (Abb.9).

Sicherheitshinweis: Alle verwendeten Lösungsmittel sind feuergefährlich. Es ist daher auf eine ausreichende Standsicherheit der Gefäße zu achten, ferner auf einen hinreichenden Verschluß. Färbezylinder setzt man am besten in Bohrungen einer breiten und zugleich schweren Holzleiste (Abb.10).

Abb.9 Färbegefäße

Abb.10 Standleiste für Färbezylinder

5.1. Entparaffinieren

Es ist nicht sinnvoll, alle beschichteten Objektträger weiterzuverarbeiten. Man entparaffiniert einige mißlungene Bänder für Vorversuche (Ermittlung der optimalen Färbezeiten), ferner einige gut gelungene Schnittbänder; alle weiteren beschichteten Objektträger bewahrt man für später auf.

Die Objektträger werden für je drei Minuten in die folgenden Lösungen gestellt:

1. Xylol Stufe 1
2. Xylol Stufe 2
3. Isopropanol Stufe 1
4. Isopropanol Stufe 2
5. Brennspiritus
6. Brennspiritus 70%ig + einige Tropfen Ammoniaklösung
7. Brennspiritus 30%ig
8. Brennspiritus 30%ig

Die Ammoniaklösung entfernt die letzten Reste Pikrinsäure. Die Schnitte müssen dann völlig farblos sein, da schon Spuren von Pikrinsäure mit der Zeit alle Färbungen zerstören.

Verarbeitet man Schnitte, die mit Sublimatlösungen fixiert wurden, setzt man dem 70%igen Alkohol statt Ammoniak so viel LUGOLSCHE Lösung zu, daß die Mischung die Farbe von dunklem Tee annimmt („Jodierung des Schnitte“ zur Entfernung von Quecksilbersalzresten). Nach der letzten Alkoholstufe stellt man die Objektträger in eine 1%ige Lösung von Natriumthiosulfat („Fixiersalz“), um das Jod zu entfernen. Fertig konfektionierte Fixiersalzmischungen für die Fotografie dürfen nicht verwendet werden.

Sicherheitshinweis: Niemals LUGOLSCHE Lösung und Ammoniaklösung mischen, da dann hochexplosives Jodazid entsteht (schleimiger brauner Niederschlag).

Die Entparaffinierung ist unkritisch, da die Lösungsmittel schon nach Sekunden in die dünnen Schnitte eindringen, zudem sind nun Schrumpfungen nicht mehr zu befürchten. Trotzdem sollte man langsam und schrittweise vorgehen, um Wirbelbildungen an der Oberfläche der Objektträger zu vermeiden. Solche Wirbel treten z.B. dann auf, wenn man gleich aus Alkohol in Wasser oder eine Färbelösung überträgt.

5.2. Färben und Einschließen

Während man bei botanischem Material mit wenigen Färbungen auskommt, da gewöhnlich nur die toten Zellwände angefärbt werden sollen, gibt es für zoologisches Material eine unüberschaubare Fülle von Färbungen, die alle ganz bestimmte Strukturen mehr oder weniger selektiv anfärben. Ich beschränke mich hier auf drei zuverlässige Übersichtsfärbungen:

1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung („HE-Färbung“)

2. MASSON-GOLDNER-Färbung

3. AZAN-Färbung (Azocarmin-Anilinblau)

Die Rezepturen der verschiedenen Färbe- und Hilfslösungen sind im Anhang aufgelistet.

5.2.1. Progressives und regressives Färben

Beläßt man das Material gerade solang in der Färbelösung, bis die richtige Farbintensität erreicht ist, liegt eine progressive Färbung vor. Überfärbt man dagegen stark und zieht dann einen Teil des Farbstoffes mit Hilfe einer geeigneten Lösung langsam soweit aus, daß die gewünschte Intensität erreicht wird, liegt eine regressive Färbung vor. Das langsame Ausziehen des Farbstoffes, das man gewöhnlich unter dem Mikroskop kontrolliert, bezeichnet man als „differenzieren“. Regressive Färbungen sind zwar umständlicher, liefern aber in der Regel die schärferen Ergebnisse.

5.2.2. Mehrfachfärbungen

Man unterscheidet einzeitige (simultane) und mehrzeitige (sukzessive) Färbungen.

Bei einzeitigen Färbungen erfolgt die Mehrfachfärbung progressiv in einem Schritt. Es handelt sich gewöhnlich um Schnellmethoden, die naturgemäß i.d.R. keine optimalen Ergebnisse liefern können, es sei denn, die unterschiedlichen Strukturen nehmen zufällig die unterschiedlichen Farbstoffe gerade mit der richtigen Geschwindigkeit auf. Typische einzeitige Verfahren sind die verschiedenen Färbungen für Blutausstriche. Daß diese Verfahren sehr gute Ergebnisse liefern liegt daran, daß sie eben für Blut optimiert sind. Gewöhnlich liefern mehrzeitige Verfahren die besseren Ergebnisse.

5.2.3. Färben mit Hämatoxylin

Hämatoxylin ist ein Naturprodukt, das aus dem Blauholz gewonnen wird. Der Stoff bildet gelbliche alkohollösliche Kristalle, die keinerlei Färbekraft besitzen. Durch Luftoxidation („Reifung“) oder durch chemische Oxidation (0,2 g Kaliumjodat, KJO3, pro 1 g Hämatoxylin in schwach saurer Lösung) geht Hämatoxylin in schwarzblaues Hämatein über, mit dem gefärbt wird. Die Lösungen des Hämateins werden inkorrekt als „Hämatoxylinlösungen“ bezeichnet. Da der Name eingebürgert ist, wird er auch hier verwendet werden.

Man färbt in schwach saurer (seltener in stark saurer) Lösung, wobei die Schnitte den Farbstoff aufnehmen, aber zunächst nur bräunlich angefärbt werden. Danach stellt man die Schnitte in schwach alkalisches Wasser (gewöhnlich genügt Leitungswasser), wobei die Farbe nach schwarzviolett umschlägt („Bläuung der Schnitte“).

Hinweise:

1. Nach dem Färben werden die Schnitte zunächst ganz kurz mit destilliertem Wasser abgespült, da beim Bläuen sonst überschüssiger Farbstoff ausflockt.

2. Destilliertes Wasser, Regenwasser, aber auch sehr weiches Leitungswasser bläut nicht. Ist das Leitungswasser zu weich, setzt man eine Messerspitze Natriumhydrogencarbonat zu.

3. Das Leitungswasser wird häufig gewechselt.

Reine Hämatoxylinlösungen färben recht undifferenziert alle Strukturen gleichzeitig an, dagegen gelingt es durch Zugabe verschiedener Hilfsstoffe Lösungen herzustellen, die recht selektiv nur ganz bestimmte Zell- oder Gewebsstrukturen anfärben. Es werden daher mehr als ein Dutzend Zubereitungen beschrieben, am gebräuchlichsten ist das „Hämatoxylin nach DELAFIELD“, mit dem man botanisches Material anfärbt (insbesondere unverholzte Zellwände), ferner das „Hämatoxylin nach MAYER“, das Kerne selektiv dunkelblau anfärbt. Beide Färbungen sind progressiv.

Wegen der großen Modifikationsbreite im Färbeverhalten und wegen der großen Farbechtheit ist Hämatoxylin, einer der ältesten Farbstoffe der Mikrotechnik, auch heute noch häufig in Gebrauch.

5.2.4. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die entparaffinierten Schnitte werden aus dem 30%igen Brennspiritus für je 3 min bis 5 min in die folgenden Lösungen verbracht:

1. Hämatoxylin nach MAYER
2. Aqua dest. (nur ganz kurz spülen)
3. Leitungswasser (häufig wechseln!)
4. Leitungswasser (häufig wechseln!)
5. Brennspiritus 50%ig
6. Eosinlösung
7. Isopropanol

Isopropanol verhindert, daß Eosin aus den Schnitten wieder ausgezogen wird.

Die Schnitte sind nun i.d.R. mit Eosin überfärbt, sie sehen „tintenrot“ aus. Man überträgt die Objektträger einen nach dem anderen in ein Gefäß, das wasserhaltigen Isopropanol enthält und wedelt die Objektträger vorsichtig hin und her. Hierbei wird überschüssiges Eosin langsam ausgezogen. Sind die Schnitte rosarot, unterbricht man das Differenzieren durch Einstellen in ein weiteres Gefäß mit reinem Isopropanol (Isopropanol Stufe 1).

Ergebnis: Kerne tiefblau, Plasma und Bindegewebsfibrillen (Kollagen) rosa.

Diese Färbung ist eine der ältesten in der Zoohistologie, sie ist unkritisch und gelingt auch zufriedenstellend mit ungleichmäßig dicken oder zu dicken Schnitten; die Färbung ist außerordentlich stabil.

Danach:

8. Isopropanol Stufe 2 5 min
9. Xylol oder Toluol Stufe 1 3 min
10. Xylol oder Toluol Stufe 2 5 min oder länger

Dann schließt man mit Kunstharz ein (z.B. künstlicher Canadabalsam).

Hinweise:

1. Isopropanolhaltiges Xylol vermag kleine Mengen Wasser aufzunehmen ohne trübe zu werden. Das gilt auch für Einschlußmittel, die in Xylol gelöst sind. Beim Trocknen entweicht jedoch der Isopropanol, das Wasser bleibt zurück und verdirbt das Präparat durch Tröpfchenbildung. Ein Verschleppen von Isopropanol in die Xylolgefäße ist nicht schlimm, solange dieser wasserfrei ist. Deshalb zwei Isopropanolstufen.

2. Da man ganze Schnittbänder einschließt, müssen übergroße Deckgläschen verwendet werden, die fast den gesamten Objektträger bedecken; also reichlich Einschlußmittel verwenden und dieses schon vor dem Auflegen auf ganzer Länge verteilen. Es erfordert einige Übung, Luftbläschen zu vermeiden.

3. Während des Einschließens dürfen die Schnitte keinesfalls austrocknen!

4. Man trocknet die Präparate bei 60 oC etwa eine Woche lang im Wärmeschrank oder aber man lagert sie waagerecht in einer Präparatemappe. Dann dauert das Trocknen mehrere Wochen. Aber selbst bei Verwendung eines Wärmeschrankes bleiben die Präparate wegen des großen Deckgläschens im Inneren noch viele Jahre lang weich.

Abb.11 Regenwurm quer
HE-Färbung

Die HE-Färbung ist die wohl älteste Doppelfärbung. Diese Färbung läßt sich auf viele Weisen modifizieren: Stets werden die Kerne mit einer Hämatoxylin-Zubereitung progressiv und sehr stabil angefärbt, danach erfolgt die (regressive) Gegenfärbung des Plasmas mit einem „Plasmafarbstoff“. Da es sehr viele ganz unterschiedliche Plasmafarbstoffe gibt, sind sehr viele Farbkombinationen möglich. Hiervon macht man insbesondere bei Färbungen von Wirbellosen gebrauch, falls die HE-Färbung ein ungenügend differenziertes Bild ergibt.

Abb.12 Kaulquappe, Rückenmark
HE-Färbung

Abb.13 Kaulquappe, Rückenmark
AZAN-Färbung

5.2.5. Die MASSON-GOLDNER-Färbung

Nach dem Entparaffinieren werden die Schnitte, wie unter 5.2.3. beschrieben, mit Hämatoxylin nach MAYER gefärbt und gebläut.

Dann:

1. MASSON-GOLDNER-Lösung	2 – 7 Minuten
2. Essigsäure 1%ig	kurz spülen
3. Phosphormolybdänsäuregemisch	2 – 5 Minuten, ggf. Stunden
4. Lichtgrünlösung	1 – 2 Minuten, ggf. Stunden
5. Essigsäure 1%ig	kurz spülen
6. Alkohol 94 oder 100%ig	kurz spülen
7. Isopropanol	3 Minuten
8. Isopropanol	5 Minuten
9. Xylol oder Toluol	3 Minuten
10. Xylol oder Toluol	3 Minuten oder länger
11. Einschluß in Kunstharz	

Kerne erscheinen dunkelblau, Plasma nuancenreich rosa bis rotviolett, Bindegewebe blaugrün, Erythrocyten orange.

Man beachte:

1. Die MASSON-GOLDNER-Lösung darf nicht zu lange einwirken, da rot überfärbte Schnitte die Farbe nachträglich nicht mehr abgeben, ein leichtes Überfärben ist jedoch günstig, da durch die späteren Arbeitsschritte eine geringe Aufhellung eintritt.

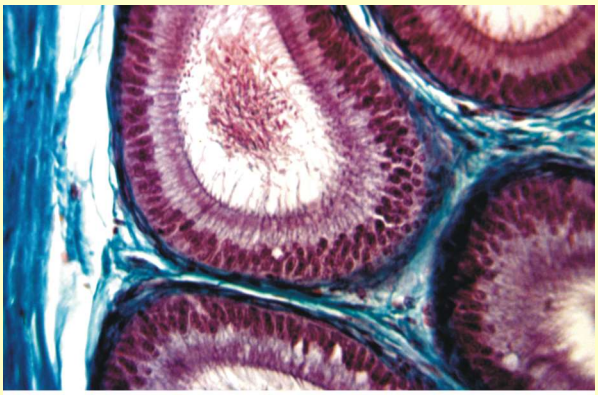
2. Erscheint Bindegewebe nicht rein blaugrün, ist nicht lange genug in der Phosphormolybdänlösung gebeizt worden.

3. Ist das Bindegewebe zu blaß, muß länger mit Lichtgrün überfärbt werden – grün überfärbte Schnitte werden mit (wasserhaltigem) Alkohol teilentfärbt. Isopropanol unterbricht diesen Vorgang.

4. Die Färbung setzt gleichmäßig dicke Schnitte von ca. 8 um voraus.

5. Für Evertebraten ist die Färbung nicht immer geeignet.

6. Die Färbezeiten müssen für jede Schnittserie durch einen Vorversuch ermittelt werden.



Nebenhoden

Abb.14 Nebenhoden der Katze
MASSON-GOLDNER

5.2.6. Die AZAN-Färbung

Die Schnitte werden, wie oben beschrieben, entparaffiniert und von Pikrinsäure befreit, danach bringt man sie aus der ammoniakhaltigen Lösung in 60%igen Alkohol, danach in folgende Lösungen:

1. Anilinalkohol 30 Minuten
2. Azokarminlösung 15 – 30 Minuten bei 60 oC
3. Anilinalkohol Teilentfärbung, bis die Schnitte dunkelrosa erscheinen.
4. Eisessig-Alkohol Teilentfärbung wird sofort unterbrochen.
5. Phosphormolybdänsäurelösung, 30 Minuten - 6 Stunden, bis das Bindegewebe farblos erscheint.
6. Wasser kurz spülen
7. AZAN-Lösung einige Minuten bis Stunden
8. Alkohol 70% solange, bis die tintenblauen Schnitte eben wieder dunkelrosa erscheinen.
9. Isopropanol 3 Minuten
10. Isopropanol 5 Minuten
11. Xylol oder Toluol 3 Minuten
12. Xylol oder Toluol 5 Minuten oder länger
13. Einschluß in Kunstharz

Kerne werden leuchtend rot gefärbt, Bindegewebe blau, Plasma schwach rosa, Erythrocyten orange. Die AZAN-Färbung ist zwar langwierig, ergibt jedoch gestochen scharfe Bilder des Bindegewebes einschließlich der feinsten Fibrillen.

Man beachte:

1. Die Schnitte müssen sehr gleichmäßig dick sein, ca. 8 um.

2. Das Teilentfärben erfordert Fingerspitzengefühl; Anfänger sind oft zu vorsichtig – dann erscheinen die Schnitte entweder „schmierig rot“ oder „schmierig violett“.

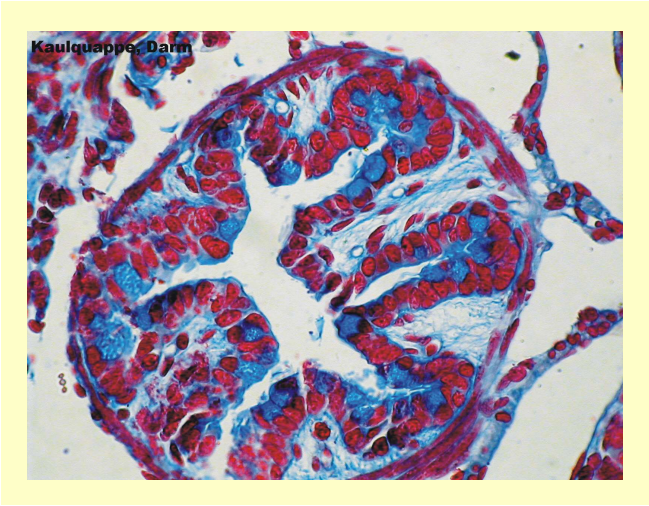


Abb.15 Darm der Kaulquappe
AZAN

3. Steht kein Wärmeschrank zur Verfügung, kann man auch mit Kernechtrotlösung färben. Die Anilinalkoholstufen entfallen dann. Die Färbung erfordert 24 Stunden, eine Überfärbung ist nicht zu befürchten („kalte AZAN-Färbung“).

4. Für Evertebraten ist die Färbung nicht immer geeignet.

5. Die Färbezeiten müssen für jede Schnittserie durch einen Vorversuch ermittelt werden.

5.2.7. Endverarbeitung

Die fertigen Präparate werden am besten in einem Wärmeschrank bei 60 oC mehrere Tage lang getrocknet, oder aber man bewahrt sie in einer Präparatemappe auf, in der das Trocknen mehrere Monate dauert.

Ein Lackring ist nicht erforderlich.

Die getrockneten Präparate versieht man mit zwei kleinen Etiketten (mehr Platz ist nicht wegen der verwendeten langen Deckgläschen), auf denen man das Objekt und die Objektträgernummer vermerkt (die zudem mit einem Diamantschreiber in den Objektträger eingeritzt ist, s.o.). Dann legt man eine Karteikarte an, auf der man die Blocknummer vermerkt (Zugriff auf die „Blockkartei“), die Fixierung und alle Details des Färbevorganges (Art der Färbung, Lösungsmittel, Färbezeiten u.s.w.). Diese Karteikarten werden nach Objektträgernummer sortiert („Präparatekartei“)

5.2.8. Einschlußmittel

Histologische Färbungen sind nur in Kunstharzen wirklich stabil (toluol- oder xylollösliche Harze). Naturprodukte (z.B. natürlicher Canadabalsam) altern und zerstören oft mit der Zeit die Färbungen.

Ein Einschlußmittel soll folgende Eigenschaften besitzen:

1. Geringes Schwinden beim Trocknen.
2. Gute Glashaftung.
3. Geeigneter Brechungsindex.
4. Geringe Dispersion.
5. Keine Eigenfluoreszenz (wichtig nur bei Arbeiten mit dem Fluoreszenzmikroskop).

Testmöglichkeiten:

1. Man stellt ein „Leerpräparat“ her und trocknet dieses bei 60 oC (Wärmeschrank oder Wärmebank). Wandern von außen Luftblasen oder Luftschläuche ein, ist der Schwund zu groß.

2. Man erhitzt eine kleine Menge des Einschlußmittels auf dem Objektträger gerade bis zum Sieden, legt ein Deckgläschen auf und läßt abkühlen; dann verbiegt man den Objektträger vorsichtig. Springt das Gläschen ab oder zeigen sich „Newtonsche Ringe“, so ist die Glashaftung mangelhaft.

3. Ein beschichteter Objektträger wird mit Xylol entparaffiniert, dann wird gleich eingeschlossen und getrocknet. Je strukturloser („unsichtbarer“) der ungefärbte Schnitt nach dem Trocknen erscheint, desto günstiger das Einschlußmittel (Unterdrückung des „Brechungsbildes“).

4. Zeigt das wie unter 3. beschrieben hergestellte Präparat an scharfen Kanten des Schnittes ein deutliches Farbenspiel, ist die Dispersion des Einschlußmittels zu hoch.

Ältere Mikroskopiker hüten noch heute CAEDAX wie einen Schatz, aber dieses hervorragende Einschlußmittel ist schon seit Jahrzehnten nicht mehr im Handel (PCB-Gehalt).

5.2.9. Fluoreszenzmikroskopie

Wegen der sehr eindrucksvollen Bilder, insbesondere von fluorochromierten Pflanzenschnitten, sei hier anhangsweise kurz auf diese Untersuchungsmethode eingegangen:

Ein einfaches Fluoreszenzmikroskop erhält man, indem man in den Filterhalter ein sehr dunkles (fast schwarzes) Blaufiler einlegt und auf die Innenblende des Okulares ein Orangefilter. Die Lichtquelle muß einen hohen Blauanteil besitzen (helle Halogenlampe, „blaue“ Autoscheinwerferbirne, Quecksilberdampflampe). Bei richtiger Wahl der Filter soll der Hintergrund völlig schwarz erscheinen.

Man färbt die Schnitte mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Acridinorange) in sehr starker Verdünnung (1:10000), danach spült man die überschüssige Lösung gründlich ab. Die Strukturen erscheinen hell leuchtend vor schwarzem Hintergrund. Die hier beschriebene „direkte Fluorochromierung“ liefert, von speziellen Fällen einmal abgesehen, keine neuen Erkenntnisse, da die Schnitte gewöhnlich wenig selektiv angefärbt werden.

Bei der „indirekten Fluorochromierung“ behandelt man, sehr stark vereinfachend erklärt, Gefrierschnitte mit monoklonalen Antikörpern, die gleichzeitig mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen werden. Auf diese Weise ist es möglich, Proteinstrukturen (z.B. das Cytoskelett von Zellen), aber auch Bakterien, hochselektiv anzufärben. Wegen der geringen lokalen Anreicherung des Farbstoffes sind derartige Färbungen im Durchlicht unsichtbar, im Fluoreszenzmikroskop (schwarzer Hintergrund!) leuchten sie jedoch brillant auf. Für Amateure kommt diese Methode natürlich nicht infrage.

6. Lagerung der Präparate

Präparate werden grundsätzlich waagerecht gelagert, denn auch sorgfältig getrocknete Präparate bleiben im Inneren jahrelang weich! Man lagert sie entweder in Präparatemappen oder in Präparatekästen, die man hochkant stellt, und zwar so, daß die Deckgläschen aufliegen und nicht hängen. Schon mancher Mikroskopiker hat nach Jahren eine herbe Überraschung erlebt, wenn er feststellen mußte, daß bei vielen Präparaten die Deckgläschen herunter gerutscht waren!

7. Die Präparatekartei

Dem Anfänger mag das Führen einer Kartei als „bürokratischer Unsinn“ erscheinen, wegen der großen Menge an Blöcken, Objektträgern und Präparaten, die unweigerlich anfallen, ist das Anlegen einer Kartei jedoch zwingend erforderlich: Nur so kann man aus Fehlern lernen, zudem erleichtert eine solche Kartei langfristig das Arbeiten

ganz erheblich, denn sie gibt rasch Hinweise auf günstige Methoden und die erforderlichen Färbezeiten.

Wie schon weiter oben gesagt, besteht die Kartei aus drei Teilkarteien:

1. Blockkartei (geordnet nach Blocknummern)
2. Objektträgerkartei (geordnet nach Objektträgernummern)
3. Präparatekartei (geordnet nach Objektträgernummern)

Die Blockkartei enthält alle Informationen über Objekt, Fixierung und Entwässerung.

Die Objektträgerkartei verweist auf den Block, von dem geschnitten wurde.

Die Präparatekartei nennt Objekt und Fixierung, verweist auf den Block, von dem geschnitten wurde und enthält alle Einzelheiten (Färbezeiten!) der angewandten Färbung.

Im Zeitalter des Computers erscheint eine Kartei recht altertümlich, man bedenke aber, daß nicht nur ein Computer, sondern auch eine Festplatte „abschmieren“ kann, und zwar so gründlich, daß alle Informationen verloren gehen – mit einer Kartei kann dies nicht geschehen! Außerdem hat man am Arbeitsplatz nur selten einen Computer zur Hand, während das Ausfüllen einer (nicht zu kleinen) Karteikarte rasch nebenher erfolgen kann. Natürlich ist es sinnvoll, zusätzlich auch noch eine digitalisierte Kartei zu führen, auf die man mit Suchfunktionen zugreifen kann.

Da alle Objektträger eine individuelle Nummer tragen, kann man die Präparate beliebig ordnen – über die Nummer läßt sich stets rasch auf die entsprechende Karteikarte zugreifen.

8. Weiterführende Literatur

Zunächst eine Warnung: Hat man noch nie mit einem Mikrotom gearbeitet und liest dann eine entsprechende Methodensammlung, so ist man von der Fülle der Methoden und den vielen Einzelheiten, die zu beachten sind, mit Sicherheit derartig „erschlagen“, daß man entmutigt gar nicht erst anfängt!

Tatsächlich ist das Anfertigen von Paraffinschnitten keine „Haupt- und Staatsaktion“, sondern eine ganz gewöhnliche mikrotechnische Arbeitsmethode. Hat man nach einem Dutzend Blöcken und einigen hundert Objektträgern erst einmal ein Gefühl für die tatsächlichen Schwierigkeiten und für den tatsächlichen Zeitaufwand der Teilschritte entwickelt, kann man entsprechende Werke „ganz entspannt“ lesen und auch abschätzen, ob ein empfohlenes Verfahren nur kompliziert klingt oder tatsächlich sehr aufwändig ist.

Auf keinen Fall sollte man nur ein Objekt „liebevoll“ bis zum fertigen Präparat verarbeiten, denn das ist nicht nur unökonomisch, es birgt auch die Gefahr der Enttäuschung. Richtig ist, sich zunächst eine Sammlung zahlreicher Blöcke anzulegen, dann, zu einem späteren Zeitpunkt, eine große Menge von Objektträgern zu beschichten und erst danach Schnitte zu färben.

8.1. Wirbeltiere

Hier ist „der ROMEIS“ auch heute noch das Standardwerk (ROMEIS „Mikroskopische Technik“). Das Werk hat sehr viele Auflagen erlebt; es ist sowohl antiquarisch als auch als Reprint erhältlich. ROMEIS hat seinerzeit offenbar alle Methoden noch selbst überprüft oder überprüfen lassen, die Methoden sind außerordentlich verläßlich.

8.2. Nervengewebe

Übliche Färbeverfahren färben nur die Kerne der Nervenzellen an, die feinen Verästelungen (Dendriten) bleiben unsichtbar. Hier helfen nur Spezialmethoden, insbesondere Silberimpregnationen. Näheres s. ROMEIS.

8.3. Wirbellose

Die HE-Färbung oder eine ihrer Modifikationen gelingt immer, nicht immer dagegen die oben angegebenen Mehrfachfärbungen, da sich das Evertebratenkollagen bei einigen Gruppen färbetechnisch erheblich von dem der Vertebraten unterscheidet. Gewöhnlich hilft auch hier der ROMEIS, sonst muß man auf Spezialveröffentlichungen zurückgreifen.

8.4. Pflanzliches Material

Die hier angegebenen Färbungen versagen bei pflanzlichem Material. Die anzuwendenden Methoden findet man in SCHÖMMERs „Kryptogamenpraktikum“. Der Name des Werkes ist ein wenig irreführend, tatsächlich ist es eine Methodensammlung für das Bearbeiten von Bakterien, Algen und höheren Pflanzen bis hin zu den Farnen (die sich färbetechnisch wie Blütenpflanzen verhalten). Auch dieser Autor hat offenbar alle Methoden selbst erprobt – welcher Autor hätte heute noch diese Zeit? Das Werk, das nur einmal (1949) aufgelegt wurde, ist gelegentlich antiquarisch erhältlich, ferner auf CD, mit neuem Layout versehen, bei der „Mikrobiologischen Vereinigung Hamburg“ (www.mikrohamburg.de).

8.5. Spezialfärbungen

Wird im ROMEIS oder im SCHÖMMER ein Färbeverfahren angegeben, das eine ganz bestimmte Struktur selektiv anfärbt, so kann man davon ausgehen, daß dies auch tatsächlich der Fall ist. Findet man dagegen in einer Veröffentlichung ein ungebräuchliches Färbeverfahren, so darf man zwar annehmen, daß dieses gute Dienste leistet, es ist jedoch durchaus möglich, daß dieses Färbeverfahren nur deshalb zur Anwendung kam, weil zufällig der entsprechende Farbstoff zur Verfügung stand oder weil das Verfahren im betreffenden Institut aus ganz anderen Gründen üblich und daher erprobt ist. Heute hat kein Wissenschaftler mehr die Zeit, zahlreiche Färbeverfahren zu untersuchen, um dann das günstigste auszuwählen! Man sollte daher zunächst ausprobieren, ob nicht auch ein „gängiges“ Verfahren ganz ähnliche Ergebnisse liefert.

9. REZEPTUREN

BOUINSCHE LÖSUNG

150 ml gesättigte Pikrinsäurelösung
50 ml Formaldehyd 40-%ig
10 ml Eisessig

HÄMATOXYLIN NACH MAYER

1g	Hämatoxylin	
50g	Kalialaun	
		in 1 ltr. Destilliertem Wasser lösen. Dann
0.2 g	Kaliumjodat	
		zusetzen. Die nun schwarzblaue Lösung mit
50g	Chloralhydrat	
		und
1 g	Zitronensäure	
		versetzen.

EOSINLÖSUNG

0,2g Eosin (besser: Eosin „bläulich“) in 100 ml Alkohol lösen.

MASSON-GOLDNER-LÖSUNG

Stammlösung A

0,5 g Azophloxin in 100 ml Wasser plus 0.2 ml Eisessig.

Stammlösung B

1 g Säurefuchsin in 100 ml Wasser plus 1 ml Eisessig.

Stammlösung C

1 g Ponceau de Xylidine in 100 ml Wasser plus 1 ml Eisessig.

2 ml A + 3 ml B + 7 ml C mit 0.2 %iger Essigsäure auf 100 ml auffüllen.

PHOSPHORMOLYBDÄNSÄUREGEMISCH (MASSON-GOLDNER)

3 g Molybdatophosphorsäue und 2 g Orange G in 100 ml Wasser lösen.

LICHTGRÜNLÖSUNG (MASSON-GOLDNER)

0,1 g Lichtgrün in 100 ml 0,2%iger Essigsäure lösen.

AZOKARMINLÖSUNG (AZAN)

0,1 g Azokarmin in 100 ml Wasser zum Sieden erhitzen, dann 1 ml Eisessig zusetzen.

PHOSPHORMOLYBDÄNSÄURELÖSUNG (AZAN)

5 g Molybdatophosphorsäure in 100 ml Wasser lösen.

AZANLÖSUNG

0,5 g Anilinblau „wasserlöslich“ und 2 g Orange G in 100 ml Wasser lösen, 8 ml Eisessig zusetzen.

ANILINALKOHOL (AZAN)

100 ml Alkohol 90%ig mit 0,1 ml Anilin versetzen.

KERNECHTROTLÖSUNG (AZAN)

0,1 g Kernechtrot und 5 g Aluminiumsulfat in 100 ml Wasser eintragen und zum Sieden erhitzen; ggf. nach dem Abkühlen filtrieren.

EISESSIG-ALKOHOL (AZAN)

100 ml Alkohol 96%ig mit 1 ml Eisessig versetzen. Diese Lösung ist wegen Esterbildung instabil, sie muß alle 24 Stunden neu angesetzt werden.