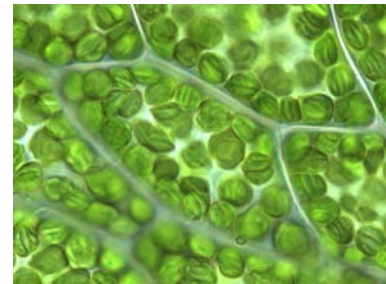


1.4 Präparation

Die richtige Präparation der Objekte ist ebenso ausschlaggebend für die Qualität der Ergebnisse wie das Mikroskop selbst.

Lebendpräparat – Dauerpräparat

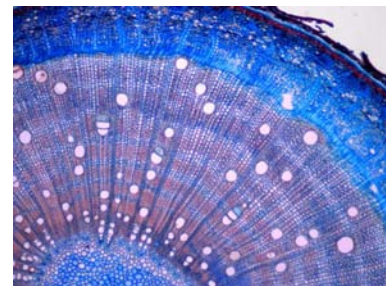
Ob ein Präparat im lebenden Zustand oder fixiert mikroskopiert wird hängt oftmals von der Fragestellung ab oder davon, ob man das Präparat für längere Zeit aufbewahren möchte.



Lebendpräparat

Zerkleinern

Kleine und dünne Präparate können meist als Ganzes mikroskopiert werden. Bei großen oder dicken Präparaten ist es notwendig das Präparat zu zerteilen oder Schnitte anzufertigen, um das Präparat im Mikroskop betrachten und auch die inneren Strukturen analysieren zu können.



gefärbtes Dauerpräparat

Fixieren und Einbetten

Für besonders dünne Schnitte oder für die Anfertigung von Dauerpräparaten müssen die Objekte fixiert werden.

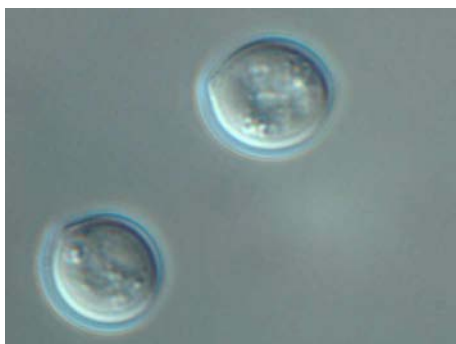
1.4.1 Lebendpräparat

Lebende Präparate ermöglichen die Analyse von dynamischen und physiologischen Prozessen. Zudem entfällt bei ihnen auch eine unter Umständen langwierige Fixierung und Einbettung.

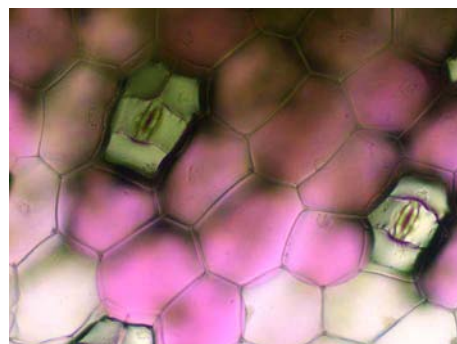
Größe des Präparates

Einzellige oder sehr kleine Präparate können ohne weitere Behandlung direkt ins Mikroskop gelegt werden.

Bei dickeren und größeren Präparaten ist es notwendig das Präparat zu zerkleinern, dabei ist jedoch darauf zu achten, dass die zu beobachtenden Zellen nicht zerstört werden. Die Schnittdicke muss daher die Zellgröße übersteigen. Für Lebenpräparate sind daher Handschnitte besonders geeignet.



einzelne Hefezellen

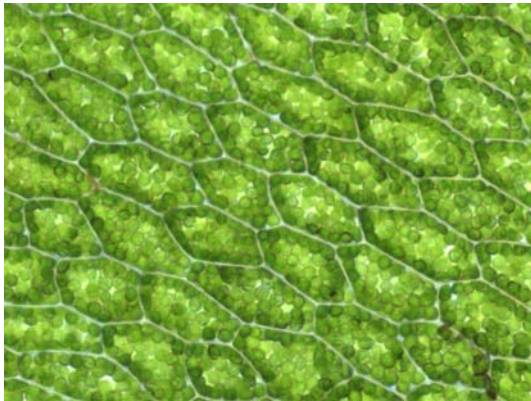


Flächenschnitt eines Blattes

Umgebungs- oder Einbettmedium

Um störende Lichtbrechungen und damit schwarze Flecken im Bild zu vermeiden muss das Präparat in ein flüssiges Medium eingebettet werden. Bei pflanzlichen Zellen genügt hier häufig Wasser, bei tierischen Zellen ist allerdings die Verwendung einer Pufferlösung erforderlich.

Tierische Zellen müssen aufgrund ihres osmotischen Wertes und der fehlenden Zellwand auf jeden Fall in einem isotonischen Medium mikroskopiert werden, ansonsten würden die Zellen platzen oder schrumpfen.



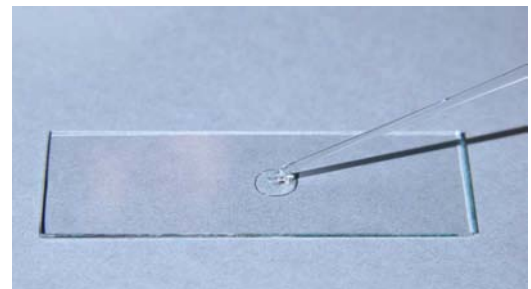
Präparat OHNE Luftblasen



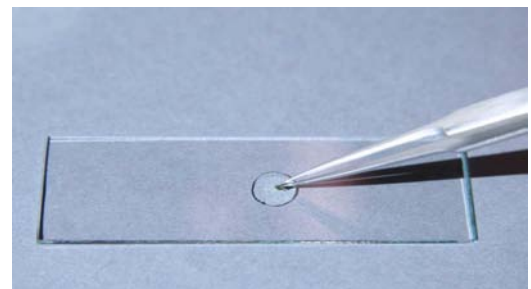
Präparat MIT Luftblasen

1.4.1.1 Herstellung eines Lebendpräparates

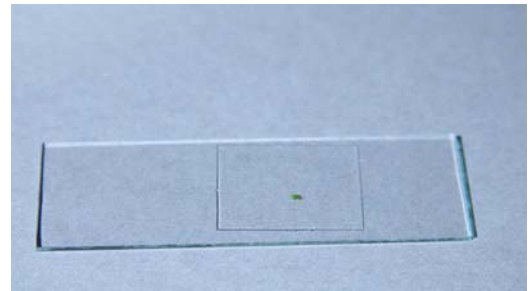
Auf einem Objektträger wird ein Tropfen Medium (Wasser oder Puffer) mittig aufgebracht.



Das Präparat wird mit einer Pinzette oder einer Präpariernadel im Medium platziert.

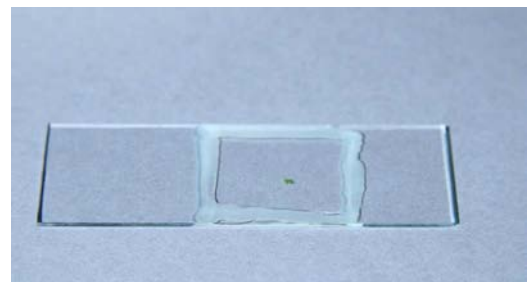
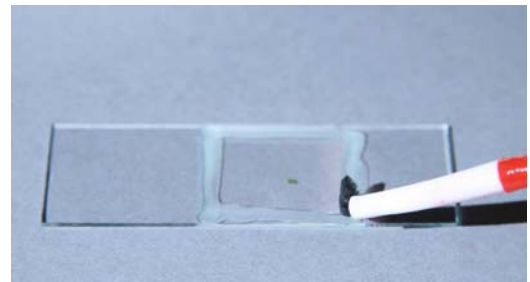


Das Deckglas wird schräg auf den Objektträger aufgesetzt; mit Hilfe einer Präpariernadel lässt man das Deckglas vorsichtig auf das Präparat gleiten. Dies soll den Einschluss von Luftblasen im Medium verhindern.



Als Verdunstungsschutz oder bei Versuchen mit giftigen Chemikalien kann man das fertige Präparat noch mit einem Vaselineering versehen.

Dazu Vaseline langsam erwärmen bis sie flüssig wird, dann mit einem Pinsel rundum das Deckglas auftragen.

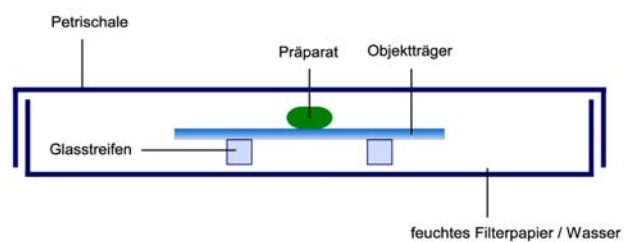
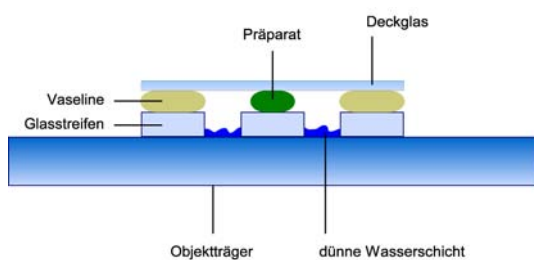
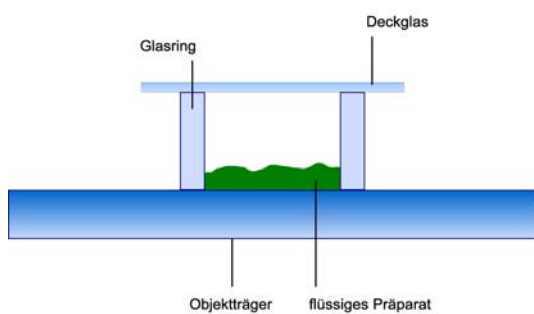
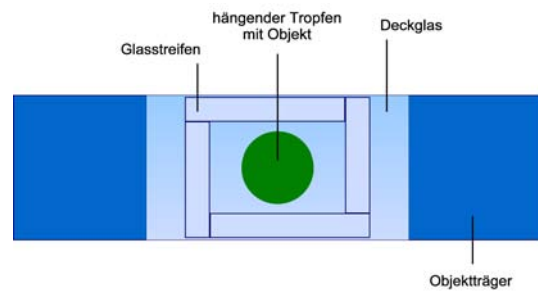
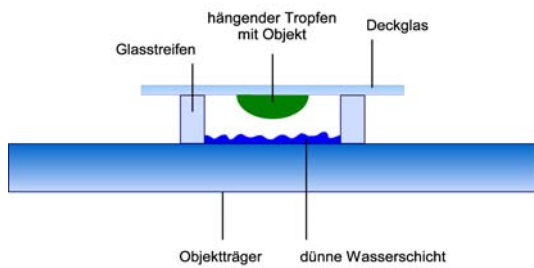
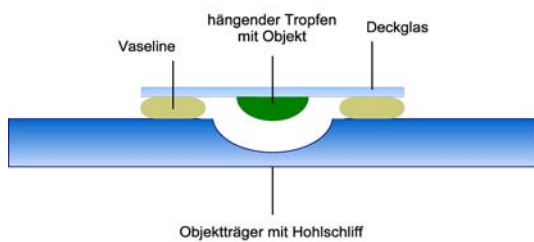


1.4.1.2 Feuchte Kammern

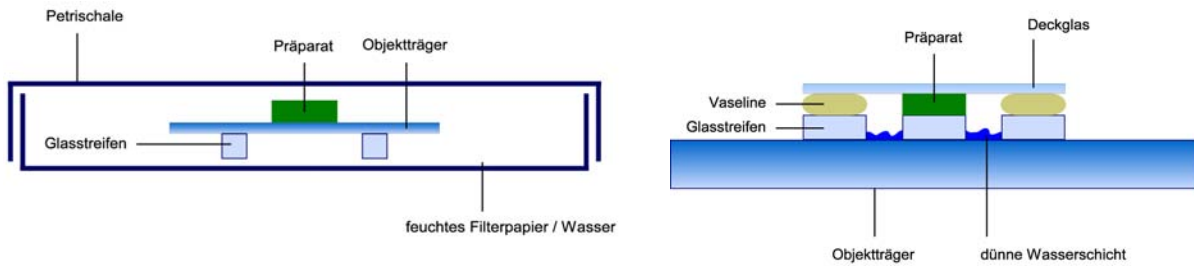
Eine weitere Methode die Verdunstung des Mediums zu verhindern ist, neben dem Verschluss des Deckglases mit Vaseline, die Verwendung von feuchten Kammern.

Für die Herstellung einer Feuchten Kammer gibt es je nach Anforderungen durch das Objekt oder den Versuch unterschiedliche Möglichkeiten.

Feuchte Kammern für flüssige Objekte



Feuchte Kammern für feste Objekte

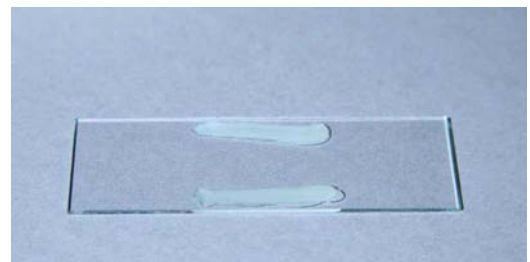


1.4.1.3 Durchflusskammern

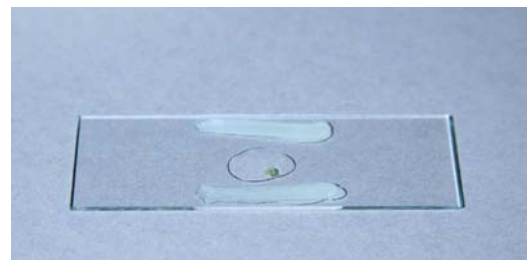
Für die längere Beobachtung von lebenden Geweben oder für spezielle Versuchsansätze ist es notwendig das Umgebungsmedium schnell und effizient wechseln zu können. Für diesen Zweck gibt es so genannte Durchflusskammern.

Einfache Durchflusskammer

Eine sehr einfache Variante einer Durchflusskammer kann man sich leicht selber machen. Dazu werden auf einem Objektträger der Länge nach zwei Abstandhalter aufgebracht. Diese können aus Vaseline, Wachsen, Parafilm, usw. bestehen.

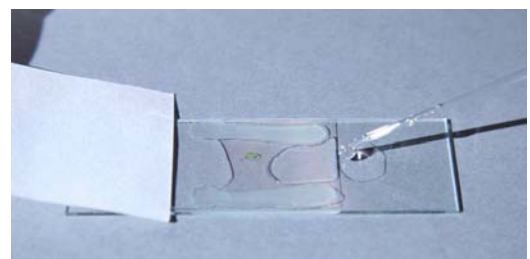


Zwischen diese beiden Streifen platziert man das Medium und das Präparat.



Zum Schluss legt man das Deckglas auf die beiden Abstandhalter über das Präparat.

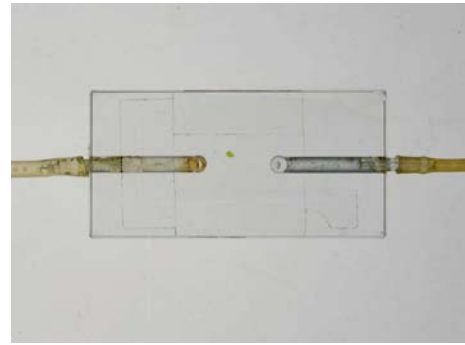
Die Flüssigkeit lässt sich nun sehr einfach und problemlos mit einem Stück Filterpapier absaugen. Neue Flüssigkeit wird auf der anderen Seite mit einer Pipette zugegeben.



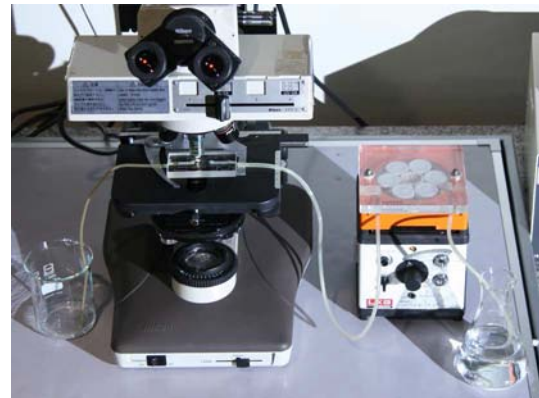
Automatische Durchflussskammer

Vor allem bei längeren Untersuchungen von Geweben muss eine konstante Qualität des Mediums und/oder ein rascher Wechsel möglich sein.

Dazu gibt es spezielle Durchflussskammern, in denen das Präparat eingespannt wird. Über Schläuche und Peristaltikpumpe kann das Medium die Kammer kontinuierlich versorgen und gleichmäßig getauscht werden.



Peristaltikpumpe



Mikroskop mit Durchflussskammer

1.4.2 Suspensionspräparat

Sehr kleine Objekte wie etwa Plankton, einzellige Algen, Einzellerkulturen, Bodenproben oder diverse Pulver können einfach in Flüssigkeit gelöst unter dem Mikroskop betrachtet werden.

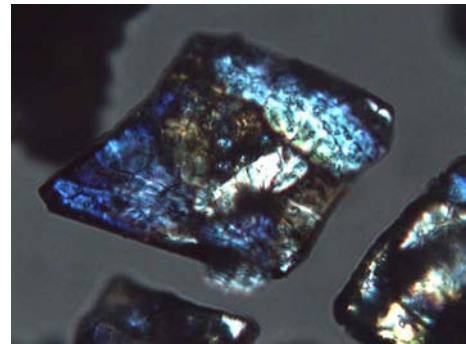
Dies ist häufig Wasser oder eine Pufferlösung.

Bei der Präparation empfiehlt sich in jedem Fall die Präparate sehr dünn zu machen, damit sich die Strukturen während des Mikroskopierens nicht ständig bewegen können.

Für die Untersuchung von wasserlöslichen Strukturen wie etwa Glucose oder Salzkristallen ist die Verwendung von **Glyzerin, Paraffin- oder Immersionsöl als Suspensionsmedium** erforderlich, um die Strukturen zu erhalten.



Chlamydomonas sp.



Glucose-Suspension in Glyzerin
Polarisationsmikroskopie

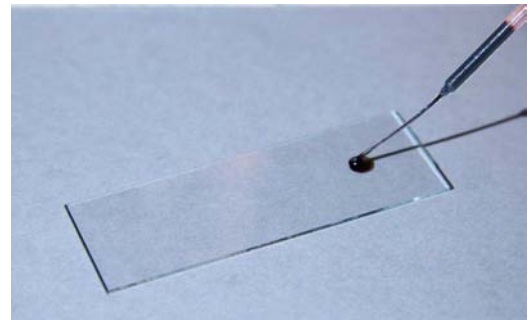
1.4.3 Ausstrichpräparat

Ein Ausstrichpräparat entspricht im wesentlichen einem Suspensionpräparat mit dem Unterschied, dass die Suspension gleichmäßig dünn aufgetragen wird.

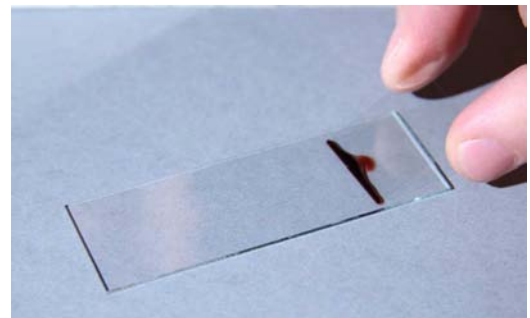
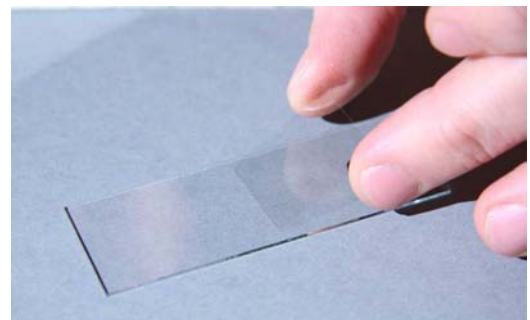
Ausstrichpräparate werden unter anderem für die Analyse von Bakterienkulturen oder Blutproben verwendet.

Zu Herstellung eines Ausstrichpräparates wird ein mit Alkohol oder Spülmittel entfetteter Objektträger benötigt. Diesen mit destilliertem Wasser gut abspülen und mit einem fusselfreiem Tuch trocknen.

An einem Ende des Objektträgers wird ein kleiner Tropfen der Suspension aufgetragen.



Ein Deckglas mit der Kante in der Mitte des Objektträgers aufsetzen und es soweit an den Probe heranführen bis es mit der Suspension Kontakt aufnimmt.



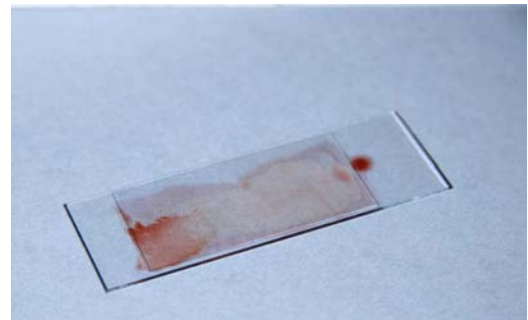
Das Deckglas nun in einem spitzen Winkel vom Tropfen weg über den Objektträger schieben; es entsteht ein dünner Film der Probe auf dem Objektträger.



Das weitere Verfahren hängt nun von der Probe und dem Versuch ab.

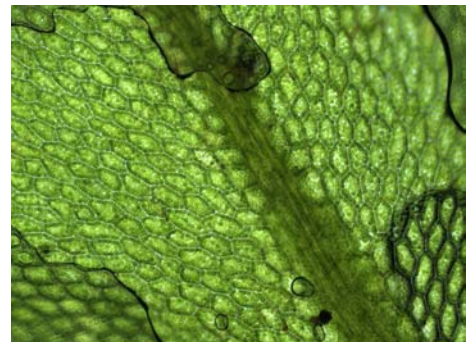
Am einfachsten legt man ein frisches Deckglas auf den Ausstrich und kann schon mikroskopieren.

Es besteht aber auch die Möglichkeit das Ausstrichpräparat trocknen zu lassen, zu färben oder daraus ein Dauerpräparat zu machen.



1.4.4 Zupfpräparat / Quetschpräparat

Die einfachste Möglichkeit ein Präparat zu zerkleinern ist ein Stück abzupfen. Zum Beispiel ein Blättchen von einem Moos, ein Stück von einer Flechte oder auch etwas tierisches Gewebe, hier empfiehlt sich eine zusätzliche Mazeration mit 10% Weinsäure für mehrere Stunden oder Tage.

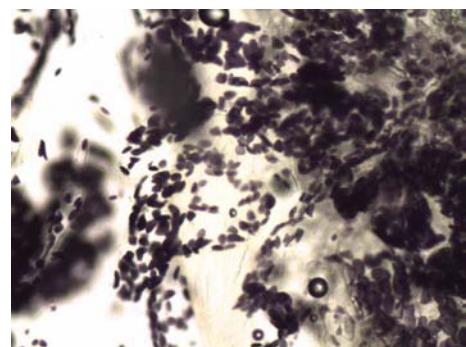


Moosblättchen

Durch Quetschen des Präparates kann dieses flacher und dünner gemacht werden, was das Mikroskopieren erleichtert.

Dazu drückt oder klopft man mit dem Griff eines Pinsels oder einer Präpariernadel leicht auf das Deckglas des fertigen Präparates. Das austretende, überschüssige Medium wird mit Filterpapier aufgesaugt.

Quetschpräparate finden zum Beispiel in der Pilzkunde zur Analyse von Strukturen des Pilzorganismus (Hyphen, Basidien oder Sporen) Anwendung oder bei der Untersuchung von Mitosestadien in Wurzelspitzen oder anderen Geweben.



Bananen-Quetschpräparat für Stärkenachweis mit Lugol

1.4.5 Mazeration

Die Mazeration (von lat. *macerare*/einweichen) ist ein chemisches Verfahren, bei dem ein Körper oder Gegenstand einige Zeit der Einwirkung einer Flüssigkeit wie zum Beispiel Wasser, Öl oder Alkohol ausgesetzt wird, wodurch bestimmte Inhaltsstoffe des Gegenstandes herausgelöst werden.

In der Biologie wird unter Mazeration das Zerfallen von pflanzlichem Gewebe in seine einzelnen Zellen durch Auflösung der Mittellamellen zwischen den Zellwänden verstanden (z.B. beim „Mehligwerden“ von Äpfeln).

In der Mikroskopie wird dieses Verfahren zur Isolierung von Gewebsanteilen verwendet. Die Mazeration erfolgt dabei natürlich durch enzymatische Prozesse oder künstlich durch Chemikalien (zB Kalilauge, Essigsäure oder Weinsäure).

1.4.6 Dünnschnittpräparat

Die Anfertigung von Schnitten ist ein sehr zentrales Thema in der Mikroskopie. Wie dick und wie groß die Schnitte sein sollen oder ob man ein Lebendpräparat schneidet oder ein fixiertes ist sehr stark vom jeweiligen Präparat und von der Fragestellung abhängig.

Nicht alle Präparate lassen sich gleich gut schneiden; störend beim Schneiden sind oft eine dicke Cuticula oder andere harte äußere Schichten. Aber auch extrem weiche und wasserreiche Objekte lassen sich nur schwer schneiden.

Grundsätzlich gibt es 2 Möglichkeiten Schnitte für die Mikroskopie anzufertigen.

- Handschnitte
- Mikrotom

1.4.6.1 Handschnitte

Handschnitte mit einer Rasierklinge anzufertigen mag altmodisch oder auch schwierig klingen, ist es aber keineswegs. Denn gute Schnitte mit dem Mikrotom herzustellen ist auch nicht einfacher aber bei weitem zeitaufwendiger und bringt nicht bei jedem Objekt ein besseres Ergebnis.

Hier liegen die Vorteile des Handschnittes:

- einfach: ohne viele Aufwand und unkompliziert herzustellen
- schnell: die angefertigten Schnitte können sofort mikroskopiert werden
→ daher besonders gut geeignet für Lebendpräparate!!!

Ein guter Handschnitt kann bis zu 30 µm dünn sein; dünner muss ein Schnitt bei pflanzlichen Geweben im allgemeinen nicht sein um einen Überblick über den Zellaufbau eines Gewebes zu geben.

Ein Handschnitt ist deshalb kein minderwertiger Ersatz für einen Mikrotomschnitt, sondern ein vollwertiges Präparat!!

Anfertigung eines Handschnittes

Handschnitte macht man am besten mit einer Rasierklinge. Diese nimmt man an einem Ende zwischen Daumen und Mittelfinger, das andere Ende fixiert man mit dem Zeigefinger.

Wichtig ist, die Klinge immer mit einem ziehendem Schnitt durch das Präparat zu führen – NICHT hin und her bewegen, dabei wird das Gewebe zerstört!!

Um ein optimales Ergebnis zu bekommen ist auch darauf zu achten, dass Klinge und Präparat **IMMER** feucht sind (Wasser oder Puffer)



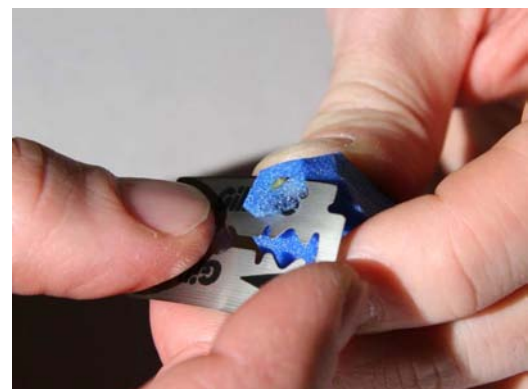
Flächenschnitte von Blättern oder Stängeln lassen sich problemlos auch ohne Einbettung vornehmen; dazu einfach das Präparat um den Finger wickeln und mit einer feuchten Rasierklinge ziehende Schnitte vornehmen.



Vor allem bei **Querschnitten** und bei **sehr kleinen oder weichen Präparaten** ist eine Einbettung notwendig um das Präparat beim Schneiden zu fixieren.

Das Präparat muss dazu vom Einbettmedium völlig umgeben sein; es soll ein etwa 5 mm dicker Mantel um das Präparat gebildet werden.

Vor dem Schneiden das Obere Ende des Einbettmediums etwas abkanten. Die Schnitte wiederum ziehend mit einer Rasierklinge anfertigen.



1.4.6.2 Mikrotomschnitte

Für die Anfertigung von gleichmäßigen und dünnen Schnitten ist die Verwendung eines Mikrotoms notwendig. Damit können Schnitte zwischen 10 und 100 μm hergestellt werden.

Anfertigung eines Mikrotomschnittes

- Für Mikrotomschnitte ist es notwendig das Objekt einzubetten.
- Das eingebettete und oben abgekantete Präparat wird in einen Objekhalter eingespannt, welcher durch einen Vorschubmechanismus mikrometergenau angehoben werden kann.
- Die Schnitte werden mit einem ebenfalls fest montierten und geführten Messer gemacht. Dabei das Messer mit einem Pinsel vor dem Schneiden mit Alkohol befeuchten!!
- Die fertigen Schnitte mit einem feinen Pinsel vom Messer abnehmen und in ein Schälchen mit destilliertem Wasser geben → Das Messer dabei **IMMER** nur von hinten nach vorne berühren!!!

Die Schnitte können auch sofort auf einen Objektträger mit einem Wasserfilm (destilliertes Wasser + Ethanol zur Reduzierung der Oberflächenspannung) gelegt werden.

Durch die verminderte Oberflächenspannung breiten sich die Schnitte von selbst darauf aus und können mit einer Präpariernadel noch orientiert werden.

Nach dem Trocknen kleben die Schnitte fest am Objektträger und können so gefärbt und anschließend sofort in Kunstharz eingebettet werden.

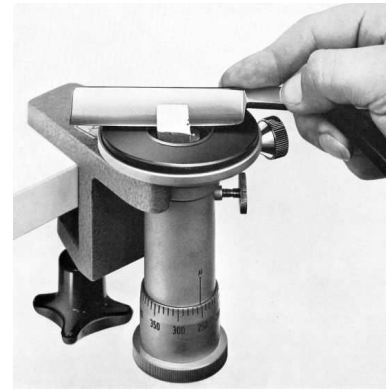
Mikrotome – Bautypen

Handmikrotom oder Tischmikrotom

Stellt die einfachste Form eines Mikrotoms dar.

Das Präparat wird in eine Halterung eingespannt und kann mit einem Objektvorschub Mikrometer genau angehoben werden.

Der Schnitt selbst erfolgt noch händisch mit einer Rasierklinge oder einem Rasiermesser.

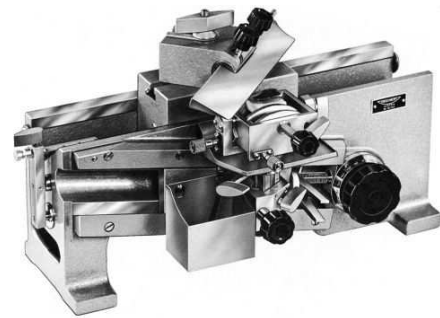


1

Schlittenmikrotom

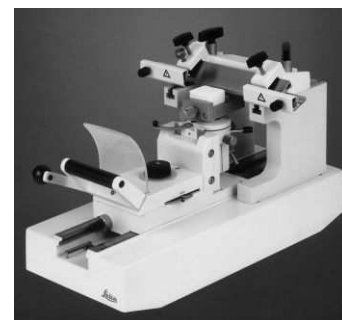
Beim Schlittenmikrotom können grundsätzlich zwei Varianten unterschieden werden.

Bei dem gängigsten ist das zu schneidende Objekt auf einem Blockträger fixiert. Das Messer ist beweglich in einem Messerschlitten montiert; dieser gleitet auf Stahlschienen vor und zurück. Durch das Ziehen des Messers über das Präparat können die Schnitte gemacht werden. Nach jedem Schnitt wird der Blockträger um die eingestellte Schnittdicke nach oben geschoben, so dass der nächste Schnitt ebenfalls die eingestellte Dicke besitzt.



2

Beim zweiten Bautyp, dem Grundschlittenmikrotom, wird nicht das Messer bewegt sondern der Blockträger. Die sonstige Funktionsweise ist gleich.



3

1 <http://www.mikroskopie-muenchen.de/handmikrotom.jpg>
2 <http://www.mikroskopie-muenchen.de/reichert-sm.jpg>
3 <http://www.mikroskopie-muenchen.de/grund-sm.jpg>

Rotationsmikrotom

Beim Rotationsmikrotom wird das eingespannte Objekt durch ein Schwungrad vertikal bewegt und so am fest montierten Messer vorbeigezogen.

Die Bewegung des Schwungrades erfolgt meistens händisch, wobei eine Umdrehung das Präparat einmal senkt und wieder anhebt und somit einen Schnitt erzeugt.

Nach jeder Umdrehung wird wie beim Schlittenmikrotom das Präparat um die eingestellte Schnittdicke nach vorne geschoben.

Das Rotationsmikrotom eignet sich besonders für die Anfertigung von Schnittserien, da die in Paraffin oder Kunstharz eingebetteten Schnitte wie ein Band zusammenhängen.

Geräte mit motorischer Bewegung eignen sich besser zum Schneiden für in härtere Kunstharze eingebettetes Material.

Der Bautyp des Rotationsmikrotoms findet sich auch bei Spezialmikrotomen wie etwa Gefrier- oder Ultramikrotomen.



4

1.4.6.3 Einbetten und Umschließen

Für die Anfertigung von Schnitten müssen die Objekte eine minimale Härte besitzen und sollten sich aus Strukturen etwa gleicher Konsistenz zusammensetzen. Dies ist allerdings nur selten der Fall, wodurch es in den meisten Fällen notwendig ist das Objekt einzubetten.

Hier muss zwischen Einbetten und Umschließen unterschieden werden:

Einbetten: Das Objekt wird vollständig mit einer Flüssigkeit (Paraffin / Kunstharz) **durchtränkt**. Anschließend wird die Flüssigkeit zum Erstarren gebracht. Auf diese Weise erhält man ein Präparat von durchgehend ziemlich homogener Festigkeit.

Für dünnere Mikrotomschnitte sind eingebettete Objekte unbedingt erforderlich.

Das Einbettmedium sollte so gewählt werden, dass es im festen Zustand die gleiche Härte besitzt oder etwas härter ist wie die härtesten Stellen im Objekt.

Je dünner die Schnitte werden sollen – desto härter muss das Einbettungsmedium sein.

- zB:
- Paraffin
 - Kunstharze (nur für Mikrotomschnitte)

4 http://www.medite.de/rotationsmikrotom_rmt_40.html

Umschließen: Das Objekt wird lediglich von einem Medium **eingehüllt!**

Umschließen eignet sich vor allem für Handschnitte beziehungsweise bei sehr homogenen oder fixierten Objekten auch für dickere Mikrotomschnitte

- zB:
- Holundermark
 - Brombeermark
 - Rüben
 - (• Styrodur)

 - NICHT geeignet: Styropor und Kork

1.4.6.4 Einbettmedien

Paraffin

Paraffin (Latein *parum affinis*, „wenig reaktionsfähig“) bezeichnet ein Gemisch aus gesättigten Kohlenwasserstoffen. Es ist geruch- und geschmacklos, ungiftig und gegenüber vielen Chemikalien reaktionsträge (inert). Zum Einbetten verwendetes Paraffin hat einen Schmelzpunkt von 60°C.



5

- Präparate, die in Paraffin eingebettet werden, muss man zuvor fixieren und in einer Ethanolreihe entwässern (Ethanol 60 % / 75% / 100% - je 15 Minuten)
- Objekte in kleinen Stücken in flüssiges Paraffin legen und für einige Stunden durchtränken lassen (im Wärmeschrank bei 60°C)
- erstarrte Paraffinblöcke zurecht schneiden und Schnitte anfertigen.

Kunstharze

Kunstharze werden durch Polymerisations-, Polyadditions- oder Polykondensationsreaktionen hergestellt. Sie bestehen in der Regel aus zwei oder mehreren Komponenten (Harz und Härter). Die Vermischung dieser Teile (Harz und Härter) ergibt eine reaktionsfähige Harzmasse (Härtung).

Während der Härtung steigt die Viskosität und nach abgeschlossener Härtung erhält man einen unschmelzbaren Kunststoff.



zB: LR White, Kulzers Technovit 7100, Epoxidharze

5 http://www.jarstore.com/assets/images/Waxes/IGI_Clean_Paraffin_Wax.jpg

- Zum Durchtränken der fixierten und speziell entwässerten Präparate werden diese für etwa 1 Tag in eine Infiltrationslösung überführt (zB Harz + Härter 1).
- Die durchtränkten Präparate werden in teflonbeschichteten Formen in flüssigem Kunstharz (zB Infiltrationslösung + Härter 2) eingebettet.
- Im Wärmeschrank härtet das Kunstharz völlig aus und man kann den Kunstharzblock aus der Form nehmen.

AUHTUNG!!

Nicht ausgehärtetes Kunstharz enthält Styrol oder andere reaktionsfähige Komponenten und ist extrem gesundheitsschädlich!!!

!!!! NUR IM ABZUG ARBEITEN !!!!

!!!!HAUTKONTAKT VERMEIDEN!!!!

Holundermark

Die Einbettung in Holundermark ist wohl eine der ältesten Methoden. Dazu wird das Mark von schwarzem Holunder (*Sambucus nigra*) verwendet.

In das runde Mark wird der Länge nach mit der Rasierklinge ein Schnitt gemacht und das Präparat darin eingeklemmt. Nun ist das Präparat optimal fixiert und es können wieder mit ziehenden Schnitten einwandfreie Querschnitte produziert werden.

Zum Sammeln von Holundermark zitiere ich am besten Rainer GERSTLE (1987) von der ehemaligen Stuttgarter Redaktion des Mikrokosmos:

"Seltsamerweise hört man immer wieder die ratlose Frage nach Bezugsquellen für Holundermark. Phywe in Göttingen liefert es; es ist aber viel zu teuer, wenn man bedenkt, dass man Holundermark an fast jedem Waldrand oder Gebüschsaum selber sammeln kann. Das Sammeln macht aber offenbar auch Schwierigkeiten. Viele Mikroskopiker versuchen, normale Holunderäste zu schälen und können daraus natürlich kein schönes, rundes, unverletztes Mark gewinnen. Man muss zur Gewinnung des Markes die vorjährigen Wasserschößlinge wählen. Das sind die geraden, nie verzweigten Triebe, die meist ein bis zwei Meter senkrecht in die Höhe ragen. Geerntet wird im Frühjahr vor dem Blattaustrieb. Dann erkennt man im Gestrüch auch gut die dünnen, abgestorbenen Wasserschößlinge."

Brombeermark

An oft zurückgeschnittenen Brombeersträuchern bilden sich mehrmals im Jahr 1cm dicke Wasserschosse, die im Innern ebenfalls ein Mark enthalten. Dieses ist etwas fester als Holundermark, aber zum Einbetten ebenfalls hervorragend geeignet.

Die Wasserschosse der Brombeere können im Gegensatz zum Holunder auch frisch verwendet werden. Dazu einfach ein Stück mit einer Gartenschere abschneiden, an allein Seiten das feste Gewebe mit einer Rasierklinge abschneiden, sodass nur mehr das Mark übrig bleibt. Die weitere Verwendung ist wie beim Holundermark.

Rüben

Auch Rüben, Karotten oder Kartoffeln eignen sich hervorragend als Einbettmedium. Sie sind billig, leicht zu bearbeiten und lassen sich auf jede Form zuschneiden. Rüben bieten dazu auch noch einen optimalen Schneidewiderstand und schonen die Klingen.

Zum Einbetten des Präparates wird die Rübe gereinigt, die äußeren Schichten abgeschnitten und das Innere auf eine passende Größe zugeschnitten.

Aufgrund der festeren Konsistenz der Rübe muss eine für das Objekt passende Aussparung aus dem Gewebe herausgeschnitten werden.

Dazu das Rübenstück in der Mitte teilen und aus jeder Hälfte eine passende Rille herausschneiden und das Präparat vorsichtig dazwischen einklemmen.

Es ist allerdings damit zu rechnen, dass Inhaltsstoffe der Rübe wie etwa Stärkekörner oder Chromoplasten das Präparat verunreinigen können. Am besten eignen sich daher weiße Kohl- oder Futterrüben, diese verursachen keine störenden rötlichen Verunreinigungen wie dies Karotten der Fall ist!!!

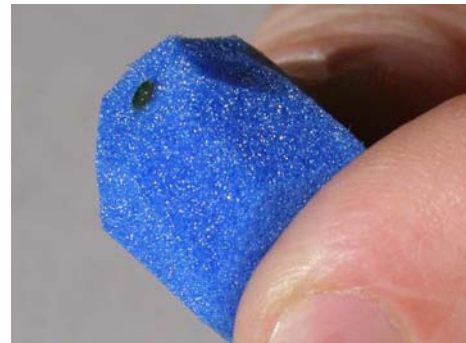
Styrodur

Ist ein extrudierter Polystyrolschaum, ähnlich Styropor nur etwas feiner und homogener.

Zum Einbetten von Schnitten ist es nur mäßig gut geeignet.

Es verursacht wie alle Polystyrole eine starke Beschädigung der Klingen. Man kann zwar auch mit einer stumpfen Klinge Schnitte anfertigen, aber schön glatt und frei von Rissen werden die Schnitte nicht werden.

Styrodur findet trotzdem häufig Verwendung in Kursen von Schulen und Universitäten. Für höhere Ansprüche sollte aber darauf verzichtet werden!!!



nicht geeignet

Von der Verwendung von **Styropor** ist dringend abzuraten, es beschädigt die Schneide der Rasierklinge schon beim ersten Schnitt gravierend.

Auch **Kork** ist wegen seiner zu festen Konsistenz und seiner harten Einschlüsse zum Einbetten von Präparaten nicht geeignet.

1.4.6.5 Messer

Rasierklingen

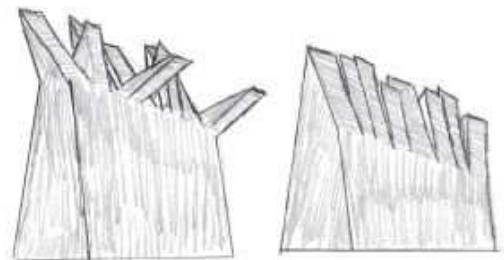
Für die Herstellung von Handschnitten sind normale im Drogeriemarkt erhältliche Rasierklingen bestens geeignet.

Wichtig ist hier allerdings die richtige Handhabung:

- Zum Schneiden nimmt man die Rasierklinge an einem Ende zwischen Daumen und Mittelfinger, das andere Ende fixiert man mit dem Zeigefinger.



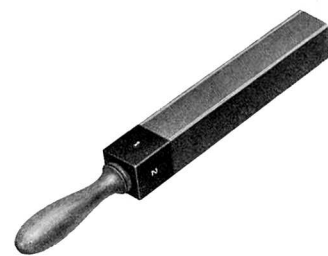
- Um mit einer Klinge längere Zeit einwandfreie Schnitte zu bekommen ist es notwendig diese jedes mal abzuziehen, denn die Schneide der Rasierklinge ist sehr dünn und die darauf befindlichen Gratzähne werden beim Schneiden in alle Richtungen verbogen.



A.E. Boon

Durch das Abziehen auf dem Leder werden diese Zähne wieder gerade ausgerichtet und somit die Qualität der Schneide wiederhergestellt.

Das Abziehleder sollte auf einen dicken unbiegsamen Holzblock auf gezogen sein. Aufgehängte Riemen wie beim Friseur sind nicht geeignet; sie erzeugen eine abgerundete Kante.



Abziehblock ⁶

- Im Gegensatz zu Klingen, die zum Rasieren verwendet werden, sollen Rasierklingen nach dem Schneiden von biologischen Präparaten sofort abgezogen werden um zu vermeiden, dass winzige Wassertropfen aus dem Präparat zwischen den verbogenen Zähnen stehen bleiben.

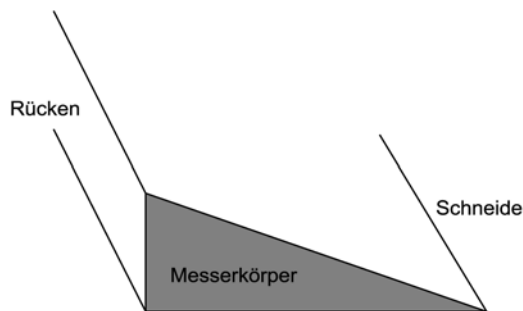
Generell empfiehlt es sich beim Schneiden immer mehrere Klingen parallel zu verwenden und diese auch vor dem Schneiden immer abzuziehen.

⁶ <http://www.mikroskopie-muenchen.de/streichriemen1.jpg>

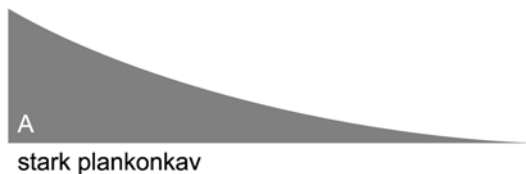
Mikrotommesser

**Mikrotommesser sind nichts für ungeschickte Hände!!!
Durch ihre enorme Schärfe und das massive Gewicht durchtrennen diese Messer mühelos Muskel und Sehnen und verursachen tiefe Schnitte.**

Verwendung von Mikrotommessern nur unter Anleitung von Profis!!!!!!



Messerprofile



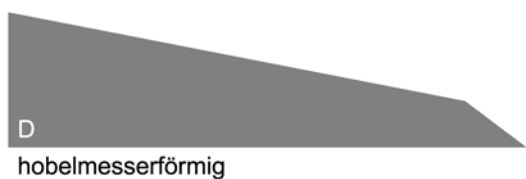
- A** Sehr scharf und sehr empfindlich
– für weiche Einbettungen und Präparate



- B** ähnlich A
– auch für etwas härteres
und frisches biologisches Material geeignet



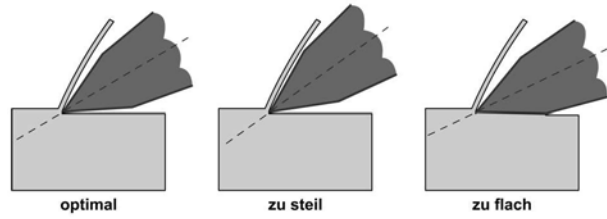
- C** wenig empfindliches Messer
– sehr universell einsetzbar



- D** sehr stabil
– für harte und große Kunstharzblöcke
sowie für industrielle Materialien

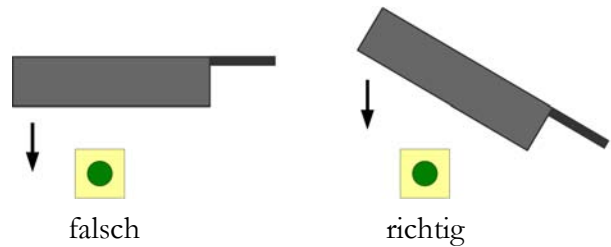
Inklination

Für einen guten Schnitt muss ein Neigungswinkel (Inklination) von cirka 13 – 15° eingestellt werden.



Deklination

Um auch beim Mikrotom einen ziehenden Schnitt zu erreichen darf das Messer nicht im rechten Winkel zum Objekt geführt werden, sondern etwa in einem Winkel von 30°.

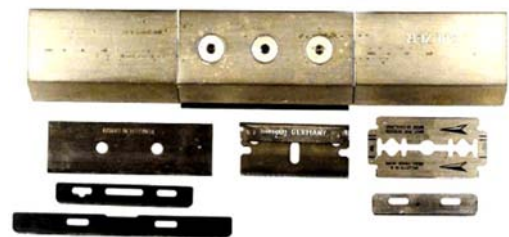


Ein planes Ansetzen des Messer würde zum Quetschen des Präparates führen.

Messerhalter

Besonders für Anfänger geeignet sind Messerhalter. In diese können normale Klagen eingespannt und dann anstelle des Mikrotommessers montiert werden.

Sie bieten den Vorteil, dass die Verletzungsgefahr etwas geringer ist als bei herkömmlichen Mikrotommessern.



Außerdem sind die Klagen unempfindlicher und nicht so teuer, was sie auch für die Verwendung bei Präparaten mit vielen Kristallen oder andern harten Einschlüssen prädestiniert.

7

Pflege

Mikrotommesser müssen ebenso wie Rasierklagen vor jedem Schneiden auf einem Abziehblock abgezogen werden. Damit aber das Profil der Klinge beim Abziehen nicht verloren geht MÜSSEN so genannte Abziehhülsen verwendet werden, in welche das Messer eingespannt wird.

Beim Abziehen selbst immer vorsichtig vorgehen damit es zu keinen Verkantungen des Messers am Anziehblock kommt; das Messer immer mit dem Rücken voran über das Leder ziehen!!!!

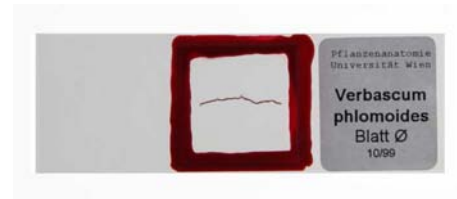
Nach jedem Gebrauch das Messer an der Unterseite von hinten nach vorne trocken wischen

7 <http://www.amuseum.de/physik/alwaze/Exponate/cut/micMesser1.jpg>

1.4.7 Dauerpräparat

Ein Dauerpräparat ist ein gefärbtes oder ungefärbtes mikroskopisches Präparat, welches zwischen Objektträger und Deckglas in einem speziellen Medium eingeschlossen und so für längere Zeit konserviert wird.

Gute Dauerpräparate halten oft jahrzehntelang, manche sogar über hundert Jahre. Daher sollte ein ordentliches Dauerpräparat auch richtig und vollständig beschriftet werden.



1.4.7.1 Herstellung

Dauerpräparate können von allen fixierten Präparaten oder getrockneten Ausstrichen hergestellt werden. Bei frischen Präparaten besteht zum einen die Gefahr dass sie durch Bakterien zerstört werden, zum anderen müssen die Präparate für die Herstellung von Kunstharz-Dauerpräparaten vollständig entwässert werden.

Dauerpräparate sind oft auch gefärbt um verschiedene Strukturen im Objekt unterscheiden zu können und auch um den Kontrast der oft dünnen und farblosen Schnitte zu verbessern.

Bei der Herstellung von Dauerpräparaten gibt es im wesentlichen 2 Möglichkeiten:

- Glyzerin-Dauerpräparate
- Kunstharz-Dauerpräparate

Fertige Kunstharz-Dauerpräparate können nach dem Aushärten des Eindeckmittels in Präparat-Kästen und Mappen waagrecht oder senkrecht gelagert werden.

Bei Glyzerin-Dauerpräparaten empfiehlt sich auch nach Trocknen des Einschlusslackes eine waagrechte Lagerung, da die Objekte sonst im Glyzerin verrutschen können.

Glyzerin-Dauerpräparat

Glyzerin ist die gebräuchliche Bezeichnung von Propantriol und stellt einen dreiwertigen Alkohol dar. Es findet als Feuchthaltemittel sehr vielseitige Anwendung in Kosmetik, Industrie und auch als Lebensmittelzusatzstoff.

Glyzerin ist ungiftig und wirkt konservierend und aufhellend, was es als Einschlussmedium in der Mikroskopie sehr interessant macht. Die in Glyzerin eingeschlossenen Objekte werden mit der Zeit etwas transparenter; daher ist allerdings eine Färbung von Glyzerin-Dauerpräparaten unbedingt notwendig. Ein weiterer Vorteil von Glyzerin ist seine Wasserlöslichkeit, daher müssen die Präparate vor dem Einschließen nicht unbedingt entwässert werden.

Zur Herstellung verwendet man mit (vergälltem) Alkohol gereinigte, staubfreie Objektträger!!!

- In die Mitte des Objektträgers einen kleinen, luftblasenfreien Tropfen eines Glycerin-Wasser Gemisches (1:1) geben und mit einer Präpariernadel das Präparat, möglichst ohne Wasser, darin platzieren und hinunterdrücken.
- Das gesäuberte Deckglas wird schräg auf den Objektträger aufgesetzt und mit Hilfe einer Präpariernadel lässt man das Deckglas vorsichtig auf das Glycerin gleiten. Dies soll den Einschluss von Luftblasen verhindern!!
- Wichtig ist, dass das Glycerin nicht unter dem Deckglas hervorquillt oder gar auf das Deckglas gelangt, da sonst der Einschlusslack nicht ordentlich abdichtet.
- Zum Schluss wird das Präparat mit Einschlusslack (Nagellack) versiegelt. Dazu zuerst die Ecken des Deckglases mit jeweils einen Tropfen Lack fixieren, erst danach die Kanten mit einem durchgehendem cirka 1,5 – 3 mm breitem Lack-Strich in einem Zug versiegeln.
- Das fertige Präparat gut trocknen lassen und auch dannach vorsichtig behandeln, damit die Lackschicht und somit die Versiegelung nicht beschädigt wird.



Glycerin-Dauerpräparat

Kunstharz-Dauerpräparat

Dauerpräparate mit Kunstharz sind im Vergleich zu Glycerin-Präparaten besser haltbar und wesentlich robuster. Obwohl die Herstellung zwar eine Entwässerung der Objekte erfordert, da die Einschlussharze wasserunverträglich sind, ist sie dennoch sehr einfach und schnell.

Vor dem Einschluss in das Kunstharz müssen die fixierten und eventuell auch gefärbten Präparate wie folgt **entwässert** werden:

30% Ethanol → 60% Ethanol* → 95% Ethanol* → Terpeniol – je ~3 Minuten
danach in NeoClear* (Xylol-Ersatz) darin können die Schnitte auch einige Zeit aufbewahrt werden.

* Schälchen mit diesen Substanzen abdecken – schädliche Dämpfe!!!

Um mehrere Schnitte gleichzeitig zu entwässern können diese in ein kleines Netz gelegt werden. Zwischen den einzelnen Entwässerungsschritten die Schnitte auf einem Stück Zellstoff kurz trockentupfen.

Die weiteren Schritte entsprechen im Wesentlichen denen zur Herstellung von Glycerinpräparaten, mit der Ausnahme, dass ein Versiegeln mit Einschluslack nicht notwendig ist.

- Die für das Dauerpräparat verwendeten Objektträger müssen zuvor wieder mit Alkohol gereinigt und trocken gerieben werden.
- Ein kleiner Tropfen Einschlussharz wird in die Mitte des Objektträgers gegeben und das entwässerte Objekt mit einer Präpariernadel darin platziert. Dabei immer darauf achten, dass sich keine Luftblasen bilden und diese gegebenenfalls mit einer Nadel aufstechen.
- Wie gehabt wird zuletzt das gesäuberte Deckglas schräg auf den Objektträger aufgesetzt und mit Hilfe einer Präpariernadel vorsichtig auf das Harz gelegt. Sobald das Harz mehr als die Hälfte des Deckglases bedeckt darf das Deckglas nicht mehr angehoben werden! Jetzt einfach die Nadel wegnehmen und das Harz verteilt sich durch das Gewicht des Deckglases von selbst.
- Zum Aushärten des Kunstharzes die Objektträger für mindestens 24 Stunden am besten aber für einige Tage in den Wärmeschrank legen.



Kunstharz-Dauerpräparat

1.4.7.2 Einschlussharze

Malinol ist ein Naturharz und besteht aus einem Gemisch verschiedener Harzsäuren. Sein Brechungsindex entspricht mit 1,52 annähernd dem von Glas, wodurch Lichtbrechungen beim Mikroskopieren vermieden werden.

Weitere Vorteile sind das ausgezeichnete Fließvermögen und die sehr gute Haftung am Glas. Kleine Luftblasen wandern während des Aushärtens zum Rand und verschwinden so.

Euparal besitzt mit 1,53 - 1,54 einen Brechungsindex nahe dem Idealwert. Die Präparate trocknen in der Regel innerhalb von 6 - 12 Stunden. Die Haltbarkeit bei säureempfindlichen Färbungen kann problematisch sein. Für Färbungen, die in schwach sauren Medien besser haltbar sind (zB Karminfärbungen) hat sich Euparal als günstiges Einschlußmittel erwiesen. Der beachtliche Schwund während des Trocknens kann durch Verwendung von eingedicktem Euparal reduziert werden.

DePeX ist als Schnelleinschlusmittel geeignet. Es besitzt ebenfalls einen für mikroskopische Zwecke günstigen Brechungsindex und ist außerdem völlig neutral, was eine nahezu unbegrenzte Haltbarkeit verspricht. Der Schwund während des Aushärtens ist zwar sehr gering, ein luftblasenfreies Einbetten ist dafür aber nur sehr schwer möglich.

1.4.7.3 Beschriftung

Bei einem Objektträger mit mattierter Schreibfläche kann dies auch mit einem schwarzen Fineliner erfolgen, ansonsten mittels zweier Etiketten.



Links vom Deckglas

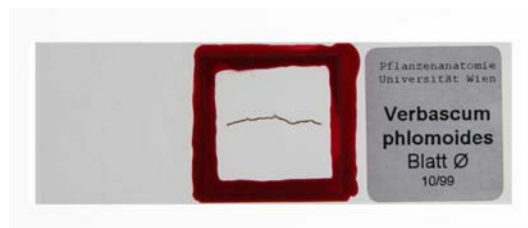
- Objektname (wiss. lateinischer Name)
- evtl. Fundort
- präparierter Teil
- evtl. zu sehende Strukturen

Rechts vom Deckglas

- eigener Name
- Datum der Herstellung
- evtl. Fixiermittel
Färbung
Einschlussmedium

Für eine kurze Beschriftung ist auch ein Etikett ausreichend. Diese muss auf jeden Fall enthalten:

- Objektname (wiss. lateinischer Name)
- präparierter Teil
- Datum



1.4.8 Fixierung

Unter Fixierung versteht die möglichst schonende Abtötung des Gewebes unter gleichzeitiger Erhaltung der Zellstruktur.

Die Fixierung eines Präparates kann aus vielen Gründen notwendig sein.

- Bewegung stoppen – Erhalten eines Zustandes
- fixierte Präparate zeigen eine stärkere Lichtbrechung und damit höheren Kontrast
- fixiertes Gewebe ist stabiler – Anfertigung von Schnitten
- Manche Färbungen sind ohne Fixierung nicht möglich
- Anfertigung eines Dauerpräparates

Methodisch kann unterschieden werden zwischen

physikalischer Fixierung: durch schnelles Einfrieren (Abkühlung von $10.000^{\circ}/\text{sec}$) um Eiskristallbildung zu vermeiden.

chemischer Fixierung: Moleküle der Zelle werden durch Chemikalien miteinander vernetzt

1.4.8.1 Probenvorbereitung

Um eine gute Fixierung zu erreichen, also ein schonendes Abtöten (Immobilisieren) der Zellen, ist sowohl die Wahl des Fixiermittels als auch die Probenvorbereitung ausschlaggebend.

- Präparate müssen vor der Fixierung voll turgeszent sein
- Fixiermittel muss möglichst schnell ins Gewebe eindringen und an die Zellen herankommen:
 - kleine Proben, möglichst $< 1 \text{ mm}^3$
 - Cuticeln oder dergleichen anstechen
 - Luft durch Anlegen von Unterdruck aus den Interzellularen und zwischen Haaren entfernen

1.4.8.2 physikalische Fixierung

Die Physikalische Fixierung erfolgt durch schnelles Einfrieren der Proben. Dabei müssen Abkühlraten von $10.000^{\circ}/\text{sec}$ erreicht werden, damit das Wasser in den Zellen zu einer amorphen Masse erstarrt.

Erfolgt die Abkühlung langsamer, so kommt es zur Eiskristallbildung im Präparat, was eine Zerstörung der Zellmembranen zur Folge hat → **Gefrierschäden**

Der Vorteil der Gefrierfixierung liegt in der extrem schnellen Abtötung der Zellen – Veränderungen während der Fixierung können so gut wie ausgeschlossen werden.

Verhindern von Gefrierschäden

- möglichst kleine Proben einfrieren
 - Wärme aus der Mitte des Präparates muss erst nach außen transportiert werden!!
- Einfrieren der Proben mit Gefrierschutzmittel
 - Gefrierpunktniedrigung durch Zugabe hoher Konzentrationen von Zucker oder Glycerin
 - keine Bildung von Eiskristallen, aber zahlreiche osmotische Effekte können auftreten.
- Verwendung eines möglichst kalten Mediums zum Einfrieren
 - zB flüssiger Stickstoff (-183°C) oder flüssiges Propan / Ethan / ...
 - Flüssiger Stickstoff wäre zwar kalt genug aber beim Eintauchen des Präparates bildet sich durch den verdampfenden Stickstoff eine isolierende Dampfschicht um das Präparat, welche die Abkühlung extrem verlangsamt (**Leidenfrost-Effekt**).
- „Slam-Freezing“
Die Probe wird auf eine durch flüssigen Stickstoff gekühlte Kupferplatte „geklatscht“
 - Verminderung des Leidenfrost-Effekts
- „Plunge-Freezing“
Die Proben werden über eine Vorrichtung extrem schnell in flüssiges Propan getaucht
 - Verminderung des Leidenfrost-Effekts, Reduktion der Eiskristallbildung
- „Jet-Freezing“
Flüssiges Propan wird von 2 Seiten und mit hohem Druck auf die Probe gespritzt
 - Verminderung des Leidenfrost-Effekts
- „High-Pressure-Freezing“
Das schnelle Einfrieren der Proben erfolgt unter einem Druck von über 2000 bar. Durch diesen starken Überdruck wird eine Volumenausdehnung der Probe durch Eiskristallwachstum während des Einfrierens verhindert.
 - ermöglicht das schadlose Einfrieren von dickeren Proben.

Weitere Probenbearbeitung

Das Problem der Eiskristallbildung entsteht auch beim Auftauen der Proben, was eine spezielle Behandlung von gefrierfixierten Proben erfordert. Im wesentlichen gibt es dabei 2 Möglichkeiten:

- Die Proben werden im gefrorenen Zustand mikroskopiert
 - dies erfordert allerdings spezielle Mikroskope mit gekühlten Objektstischen oder Kammern.
- Gefriersubstitution

Gefriersubstitution

Bei dieser Methode wird im gefrorenen Zustand das Wasser in den Zellen durch flüssiges Aceton ersetzt. Reines Aceton lässt sich auf -80°C abkühlen ohne zu gefrieren.

Die Proben werden nach der Gefrierfixierung in eine Aceton/Fixiermittel Mischung (zB Osmium) überführt. Während des langsamen Auftauens (schrittweise über mehrere Tage) löst das Aceton das Wasser aus den Zellen und das Fixiermittel sorgt gleichzeitig für eine Stabilisierung. Die aufgetauten, fixierten Proben können nun ganz normal weiter behandelt werden.

1.4.8.3 Chemische Fixierung

Bei der Chemischen Fixierung werden die Moleküle einer Zelle durch Chemikalien miteinander vernetzt, dabei kann es allerdings noch zu Veränderungen in den Zellen kommen. Ein gutes Fixiermittel sollte daher folgende Eigenschaften besitzen:

- schnell eindringen
- schnell abtöten
- gut vernetzen und stabilisieren
- nichts beeinflussen
- keine Artefakte bilden

Grundsätzlich lassen sich **4 Gruppen von Fixermitteln** unterscheiden:

- Alkohol + Essigsäure wirken Protein fällend
- Aldehyde binden an Aminogruppen
zB Formaldehyd, Glutaraldehyd, Akrolein
- starke Oxidationsmittel verbinden Lipide
zB Chromsäure, Kaliumpermanganat, Osmiumtetroxid
- Gerbstoffe binden an Aminogruppen und vernetzen Proteine

Meistens werden Mischungen mehrerer Fixiermittel verwendet um das Fixierergebnis zu optimieren. Die Menge des Fixiermittels muss in jedem Fall mindestens das 10x Probenvolumen betragen.

1.4.8.4 Chemische Fixiermittel

Auswaschen: vor Färbung oder Entwässerung muss das Fixiermittel vollständig mit Wasser oder Puffer ausgewaschen werden. Dauer 30 Minuten bis 12 Stunden.

Carnoy C

Anwendung: 3 - 6 T Ethanol 96%, 1 T Essigsäure

Fixierdauer: 1 h – 24 h

Auswaschen mit Ethanol, 96 %

Verwendung: Anatomische Präparate

Anmerkung: Für schrumpfungsempfindliche Objekte können 3 T Chloroform zugesetzt werden. Essigsäure kann durch Propionsäure ersetzt werden

Chromsäuremischungen

Anwendung: 1 % Chromsäure (**Giftig!**) in H₂O,
bei leicht schrumpfenden Objekten in ~ 1 % Essigsäure

Fixierdauer: 1 Min – 24 h

Auswaschen in H₂O

Verwendung: Universell, aber oft schlechte Färbbarkeit

Anmerkung: Für besonders hohe Fixierqualitäten sind auch Chromsäure-Essigsäure-Formaldehyd-Mischungen gebräuchlich.

Kaliumpermanganat

Anwendung: Eventuell zunächst Infiltration mit Pufferlösung
2 % – 5 % KMnO₄ in Wasser oder Puffer

Fixierdauer: 5 Min – 2h, Auswaschen mit H₂O oder Pufferlösung

Verwendung: Guter Erhalt von Membransystemen, auch in der Elektronenmikroskopie

Pfeiffers Gemisch

Anwendung: 1 T Essigsäure, 1 T Formaldehyd 37 %, 1 T Methanol

Fixierdauer: 30 Min – 24 h, auch zur längeren Aufbewahrung

Auswaschen : mit H₂O, Ethanol 40 % oder Glyzerin 10 %

Verwendung: v. a. für niedere Pflanzen und embryologische Präparate

Aldehydmischungen

Anwendung: Eventuell zunächst Infiltration mit Pufferlösung

2 % – 5 % Glutaraldehyd oder Formaldehyd oder beides zusammen in H₂O oder Puffer

Fixierdauer: 1 h, eventuell durch Eis auf 0° C kühlen

Auswaschen mit H₂O oder Pufferlösung

Verwendung: Universell, auch in der Elektronenmikroskopie

Anmerkung: Für derbe Objekte wird auch der sehr schnell eindringende Aldehyd Acrolein (**Giftig!**) nach dem gleichen Rezept verwendet.

Pikrinsäure-Formaldehyd

Anwendung: 10 ml Formaldehyd 40%, 56 ml Ethanol (100%), 0,18 g NaCl,
0,15 g Pikrinsäure (explosiv!), 34 ml destilliertes Wasser.
bei schrumpfungsempfindlichen Objekten bis zu 5% Essigsäure.
Fixierdauer: > 1 h, Auswaschen mit H₂O oder 50% Ethanol
Verwendung: vor allem in der Zytochemie

Osmiumtetroxid

Anwendung: Vorfixierung mit einer gepufferten Aldehydmischung
1 % OsO₄ (**Giftig!**) in Puffer
Fixierdauer: 1 h bei Raumtemperatur, 12 h bei 4° C (weniger störende Ausfälle)
Auswaschen: mit Pufferlösung
Verwendung: Für Elektronenmikroskopie oder höchste Ansprüche in der Lichtmikroskopie
Anmerkung: Für das Lichtmikroskop sind auch Osmiumtetroxid-Cromsäure-Essigsäuremischungen
ohne Vorfixierung in Verwendung.

1.4.8.5 Fixierpuffer

saure Fixierlösungen	gute Fixierung der Zellkerne
basische Fixierlösungen	Cytoplasma und Organellen bleiben erhalten allerdings meist schlechte Färbbarkeit der Präparate

Zytoskelettstabilisierender - Fixierpuffer

1,4-Piperazindiethansulfonsäure [100 mMol l⁻¹]
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure [10 mMol l⁻¹]
MgSO₄ [5 mMol l⁻¹]
Mit KOH auf pH 7 einstellen
Anmerkung: Stabilisiert das Zytoskelett;

Cacodylatpuffer

50 mM Cacodylsäure in H₂O, mit HCl oder NaOH auf pH 7,2 einstellen
Cacodylsäure (Giftig!): C₂H₆AsNaO₂

Anmerkung: für geringere Ansprüche reicht Natriumphosphatpuffer oder Barbituratpuffer.

!!!! Fixiermittelabfall muss gesondert als Chemikalienabfall entsorgt werden !!!!

1.4.9 Literatur

Braune W., Leman A., Taubert H.: Pflanzenanatomisches Praktikum II. Einführung in den Bau, das Fortpflanzungsgeschehen und die Ontogenie der niederen Pflanzen und die Embryologie der Spermatophyta. Gustav Fischer Verlag; Jena; 1982

Plattner H., Zingsheim H. P.: Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Ein kritischer Leitfaden zur biologischen Ultrastrukturforschung für Biologen und Mediziner. Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, New York; 1987

D. Gerlach (1977): Botanische Mikrotechnik. Thieme, Stuttgart. 311 pp.