

Inhalt:

- Vorwort.....S.3
- Wofür Seifeneinbettung ?.....S.4
- Die Arbeitsschritte.....ab S.5
 - Fixierung.....S.5
 - Entwässern.....S.6
 - Infiltration 1.....S.6
 - Infiltration 2.....S.8
 - Gießen..... S.8-9
 - Einbettungsvorgänge Überblick.....S.10
 - Aufbewahrung.....S.10
- Weiterverarbeitung der Blöcke.....S.11
 - Aufkleben der Blöcke.....S.11-14
 - Schneiden der Proben.....S.14-16
 - Sammeln der Schnitte.....S.17

Vorwort

Auf den folgenden Seiten wird die Seifeneinbettung sehr praxisnah und anfängerfreundlich beschrieben. Vorausgesetzt wird aber ein brauchbares Schlittenmikrotom mit verstellbarem Messer. Es wäre vielleicht auch mit einem Handmikrotom möglich, habe aber damit keine Erfahrung.

Was außerdem verlangt wird, ist der sachgemäße Umgang mit den Chemikalien sowie ein gehöriger Respekt vor dem scharfen Mikrotommesser. Das Messer muss immer mit Vorsicht und höchster Aufmerksamkeit verwendet werden !

Ich versuche auf den folgenden Seiten möglichst viele Tipps und Tricks zur Methode zu verraten damit sie auch garantiert gelingt.

Was ich noch dazusagen will, ist, dass ich nicht der Entwickler dieser Methode bin sondern sie lediglich durch diese PDF-Datei ein wenig bekannter machen möchte.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr bei meinem "Lehrer" Bodo Braunstorfinger bedanken, der mir die Methode vorgeführt hat.

Ein weiterer Dank gilt der Mikroskopischen Vereinigung München für das Schlittenmikrotom und der Unterstützung der vielen Mitglieder des Mikroskopie-Forums.

Wofür Seifeneinbettung ?

Die Seifeneinbettung dient, wie alle anderen Einbettungsverfahren auch, zur Festigung des Gewebes für das Schneiden mit einem Mikrotom.

Die Seifeneinbettung ist vor allem für kompakte und sogar mäßig verholzte Pflanzenstücke gut geeignet. Gerade Nadeln lassen sich mit diesem Verfahren leicht schneiden. Was sich nur schlecht oder gar nicht mit dieser Methode schneiden lässt, sind sehr weiche, zusammenhanglose oder stark löchrige Gewebe. Also Blüten, Staubblätter und Ähnliches. Für solches Gewebe muss dann das Paraffinverfahren angewandt werden.

Ein großer Vorteil der Seifeneinbettung ist, dass sie weniger aufwändig als das bekannte Paraffinverfahren ist. Die Einwirkzeiten bei der Seifenmethode sind um einiges kürzer und die Nachbearbeitung erstaunlich gering. Außerdem sind die Schrumpfungen wesentlich geringer, da man nicht vollständig entwässern muss, was beim Paraffin der Fall ist.

Was man als Nachteil ansehen könnte, ist, dass man nicht so dünn schneiden kann. Das Minimum an Schnittdicke fängt bei ca. 25 µm an. Das kommt aber ganz auf das Material an. Bei weicherem Gewebe muss man die Schnittdicke nämlich erhöhen. Ich empfinde das allerdings weniger als Nachteil, da man bei dickeren Schnitten besser die räumliche Struktur studieren kann und die Farben wesentlich schöner ausfallen.

Die Arbeitsschritte: Fixierung

Die genommenen Pflanzenproben werden in einem Gemisch Namens AFE fixiert. Es besteht aus 90 Teilen 70% Ethanol , 5 Teilen konzentrierter Essigsäure und 5 Teilen Formaldehyd. Die zu fixierenden Proben sollten eine Länge von 5 mm nicht überschreiten ,da sonst die Einwirkzeiten bei der Fixierung und der Einbettung zu lange sind.

Die Proben bleiben für 1 Woche in diesem Gemisch. Gegebenenfalls wechseln. Mit Fixierungen von nur einem Tag habe ich schlechte Erfahrungen gemacht. Das Gemisch in einem Kanister lagern und dann bei der Gemeinde als Lösungsmittelgemisch abgeben. Nicht in den Abfluss geben !

Während die Proben im AFE sind, empfiehlt es sich , die Proben mittels Vakuum zu entlüften. Dadurch geht die Luft aus dem Gewebe und gleichzeitig dringt das Fixiergemisch schneller ein . Dafür braucht man keinen teuren Exikator, eine Spritze genügt:

Man besorgt sich eine Einwegspritze mit Kanüle und ein kleines Schnappdeckgläschen mit passendem Gummistopfen. Die Luft wird mit der Spritze herausgesaugt und die Spritze mit einem Stift fixiert.

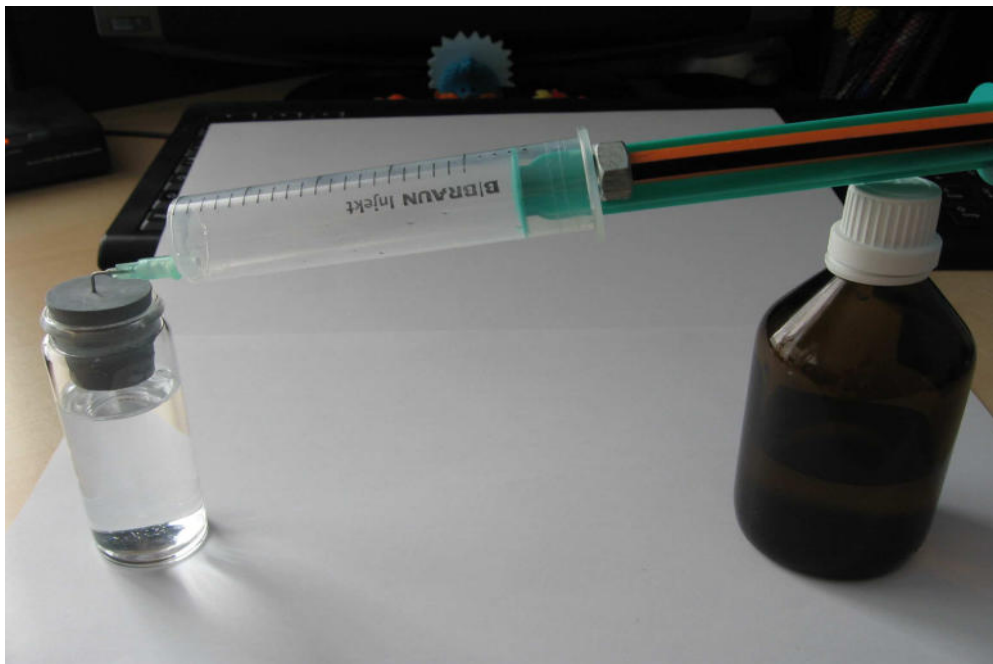


Abbildung 1: Mini-Vakuumpumpe

Entwässern:

Auch bei der Seifeneinbettung findet eine Entwässerung statt, allerdings nur mit 30 % Ethanol ,da die Seife im Gegensatz zum Paraffin relativ wasserverträglich ist. Im Ethanol bleiben die Proben dann für ca.10-18 Stunden. Je nach Größe der Proben.

Infiltration 1:

Die Proben werden nun aus dem 30 % Ethanol in ein Gemisch aus Glycerinseife und Glycerin gebracht. Glycerinseife und Glycerin werden im Verhältnis 1:1 gemischt. Bevor man die Proben in dieses Gemisch gibt, muss man das Gemisch auf ca.58 °C erwärmen damit es flüssig wird. Man sollte darauf achten ,dass die Temperatur 60 °C nicht übersteigt , da die Seife sonst anfängt zu "schwitzen". Das bedeutet,dass der Wasseranteil der Seife verdunstet und sie somit zäh wird. Sollte dies einmal doch passieren, einfach ein wenig destilliertes Wasser hinzugeben bis die Konsistenz wieder stimmt.

Um das Seife-Glycerin-Gemisch auf die vorgegebene Temperatur zu bringen und diese auch zu halten, benötigt man keinen teuren Wärmeschränk. Hierzu verwendet man einfache Babyflaschenwärmer. In diese Babyflaschenwärmer passen leere Babybreigläser die mit dem Gemisch gefüllt werden. In den Zwischenraum, also zwischen Außenwand der Gläser und Innenwand der Wärmer, kommt Wasser ,da das Gemisch sonst viel zu lange braucht bis es schmilzt.

Die Proben verweilen in diesem Gemisch für ca. 6-8 Stunden. Die Proben nicht zu lange im Gemisch behalten, da durch die Wärmeeinwirkung und durch die Seife Schrumpfung entstehen.

Zur Überprüfung der Temperatur wird ein Einstich-Bratenthermometer verwendet. Es wird ein Loch in eine kleines Stück Holz gebohrt und das Thermometer hineingesteckt damit es nicht in der Seife ertrinkt.
(Abbildung 3)



Abbildung 2: 2 Babyflaschenwärmer für Infiltrationsstufe 1 und 2



Abbildung 3: Babyflaschenwärmer mit Bratenthermometer

Hinweis:

Bei der Infiltrationsstufe 1 kann man relativ gut beobachten wie weit die Seife schon in die Probe eingedrungen ist. Manchmal ist es so ,dass die Seife nicht vollständig durchdringt und in der Mitte der Probe noch ein schmaler Streifen ist, an dem die Seife noch nicht war.

Erfahrungen haben gezeigt , dass die Seife dann oft nicht weiter vordringt, selbst wenn sie noch viele weitere Stunden im Seife-Glycerin-Gemisch ist. Das macht der Probe aber überhaupt nichts. Es ist besser wenn noch ein schmaler Streifen da ist als, dass man die Probe zu lange drin hat. Die Proben sind trotzdem fest genug zum Schneiden und können auch mit einem schmalen Streifen in die Infiltrationsstufe 2 gehen.

Infiltration 2:

Nach dem Bad im Glycerinseife-Glycerin-Gemisch kommen die Proben nun in reine Seife also ohne Glycerinzusatz. In diesem Gemisch bleiben die Proben wesentlich kürzer als im Glycerinseife-Glycerin-Gemisch, da die reine Seife aggressiv ist und die Proben bei längerem Aufenthalt mazeriert ! In der reinen Seife behalte ich die Proben für ca. 3-4 Stunden.

Hinweis:

Manche weichere Proben verschrumpeln und verändern ihre komplette Form während der Infiltration. Sobald man die Schnitte aber nach dem Schneiden ins Destillierte Wasser gibt, entfalten sie sich wieder !

Gießen:

Nachdem die Proben infiltriert wurden, werden sie in eine Form gegossen. Hierfür verwendet man ganz gewöhnliche Kaffeesahnebehälter. Die Kaffeesahnebehälter ,die dafür am besten geeignet sind, kommen von der Marke "JA" (Rewe) oder von "Tip" (Edeka). Diese haben den glattesten Boden und sind somit sehr gut geeignet.

Um die Proben in die Form zu gießen verwendet man einen Kaffeesahnebehälter, der mit einem Schaschlikspieß verbunden ist. Der Schaschlikspieß wird mittels 2 Komponentenkleber an dem Kaffeesahnebehälter angebracht. (Abbildung 4)



Abbildung 4: Gieß-Kelle und Kaffeesahnebehälter

Mit der Kelle werden die Proben und die flüssige Seife herausgenommen und in den Kaffeesahnebehälter gegossen. Gegebenenfalls noch ein wenig flüssige Seife hin zugießen. Danach richtet man die Proben mit zwei Präpariernadeln aus. Die Präpariernadeln immer wieder während des Ausrichtens über einem Spiritusbrenner oder behelfsweise auch mit einem Teelicht warmmachen.

Tipp:

Es kann sich oft als schwierig erweisen Pflanzenstücke für Querschnitte auszurichten. Es dauert ziemlich lange ,da man die Proben ständig mit den Präpariernadeln stabilisieren muss damit sie nicht umkippen. Damit die ganze Prozedur schneller geht, empfiehlt es sich unter den Kaffeesahnebehälter einen Kühlakku zu legen. Dadurch muss man die Proben nicht mehr so lange stabilisieren , da die Seife unten durch die Kälte schneller hart wird.

Einbettungsvorgänge Überblick:

Hier sind nochmal alle Einbettungsvorgänge im Überblick.

1. Fixierung in AFE für 1 Woche
2. Entwässerung in 30% Ethanol 10-18 Stunden
3. Infiltration 1: Glycerinseife+Glycerin 1:1 bei 60° C für 6-8 Stunden
4. Infiltration 2: Reine Glycerinseife bei 60° C für 3-4 Stunden
5. Gießen der Blöcke

Aufbewahrung:

Die fertigen Blöcke können nahezu unbegrenzt lange aufbewahrt werden. Wichtig ist, dass man die Blöcke luftdicht aufbewahrt, da die Seife hygroskopisch (wasseranziehend) ist. Gefrierbeutel sind für die Aufbewahrung gut geeignet.

Weiterverarbeitung der Blöcke: Aufkleben

Um die Blöcke in ein Mikrotom einzuspannen und somit zu schneiden, werden sie auf einen Holzklotz aufgeklebt. Auch hier wird man keine teure Ausrüstung brauchen. Manche Dinge ,die man dafür benötigt, findet man vielleicht sogar im eigenen Werkzeugkoffer.

So wird der Block aufgeklebt:

Zuerst schneidet man die Basis des Blockes an. Hierfür verwendet man ein gewöhnliches Teppichmesser. Einen Teil der Seifenschnipsel, die man durch das Anschneiden erhält, legt man auf den Holzblock, der andere Teil kann wieder eingeschmolzen werden.

Nun nimmt man eine schmale Spachtel, die möglichst biegsam ist und erhitzt sie mit einem Spiritusbrenner. Mit der heißen Spachtel lässt man die Seifenschnipsel schmelzen ,die auf dem Holzblock liegen.
(Abbildung 6)

Tipp:

Damit man beide Hände frei hat und sich der Holzblock nicht bewegt, spannt man den Holzblock ein. Hierfür verwende ich einen kleinen selbstgemachten Schraubstock aus Holz. Als Alternative kann man auch eine kleine Schraubzwinde verwenden.

Nachdem die Seifenschnipsel geschmolzen sind ,erhitzt man die Spachtel erneut. Am besten von beiden Seiten. Nun nimmt man den Block, legt die Spachtel auf den Holzblock mit den Seifenschnipseln und legt den Block oben auf die Spachtel. Man wartet ein wenig, damit die Seife schmilzt und zieht die Spachtel langsam heraus während man den Block gut festhält.(Abbildung 7)

Der Block ist nun mit dem Holzklotz verklebt. Bevor man fortfährt, wartet man noch bis die Seife abgekühlt ist.

Nachdem der Block abgekühlt ist,schneidet man den Block pyramidenförmig zu.(Abbildung 9). Nun kann man den Holzklotz mit der Probe ins Mikrotom einspannen.



Abbildung 5: Schraubstock mit eingespanntem Holzklötz und aufgelegten Seifenschnipseln



Abbildung 6: Schmelzen der Seifenschnipsel mit heißer Spachtel

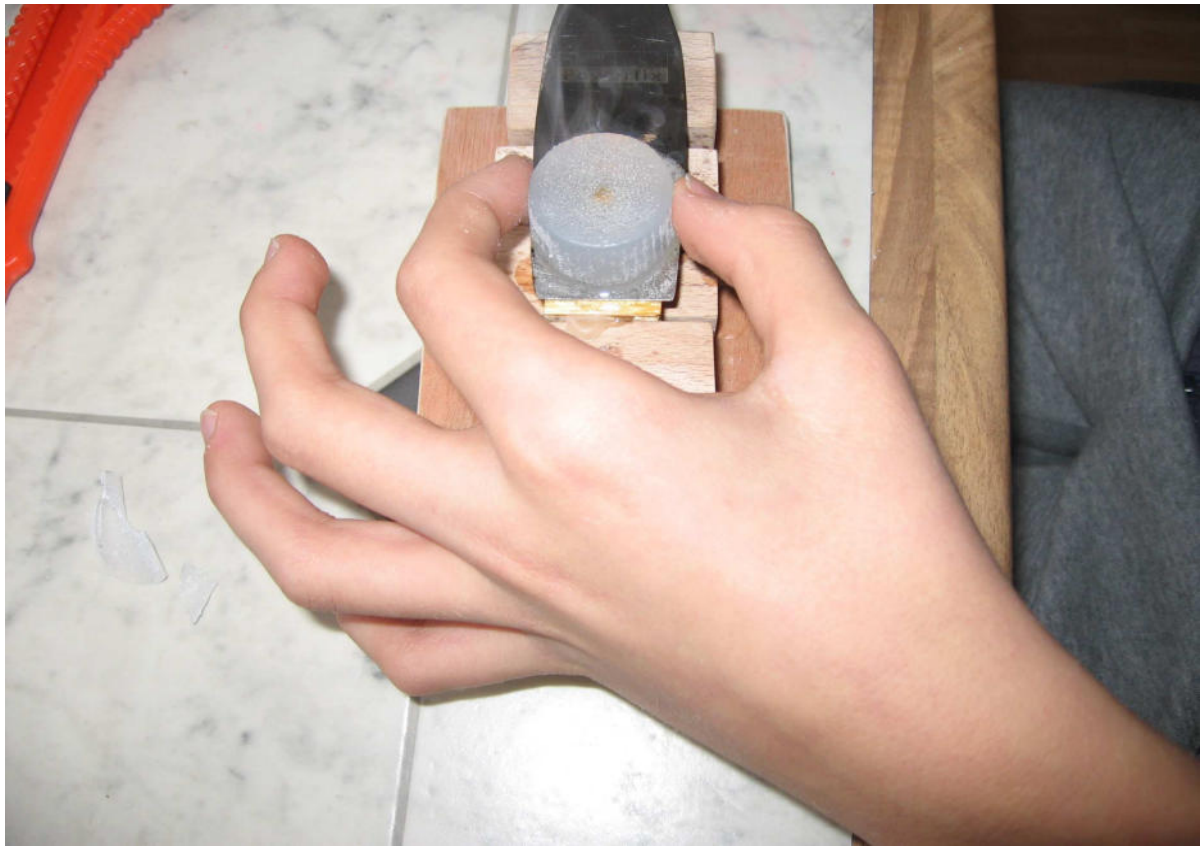


Abbildung 7: Aufkleben des Blockes



Abbildung 8: Fertig aufgeklebter Block

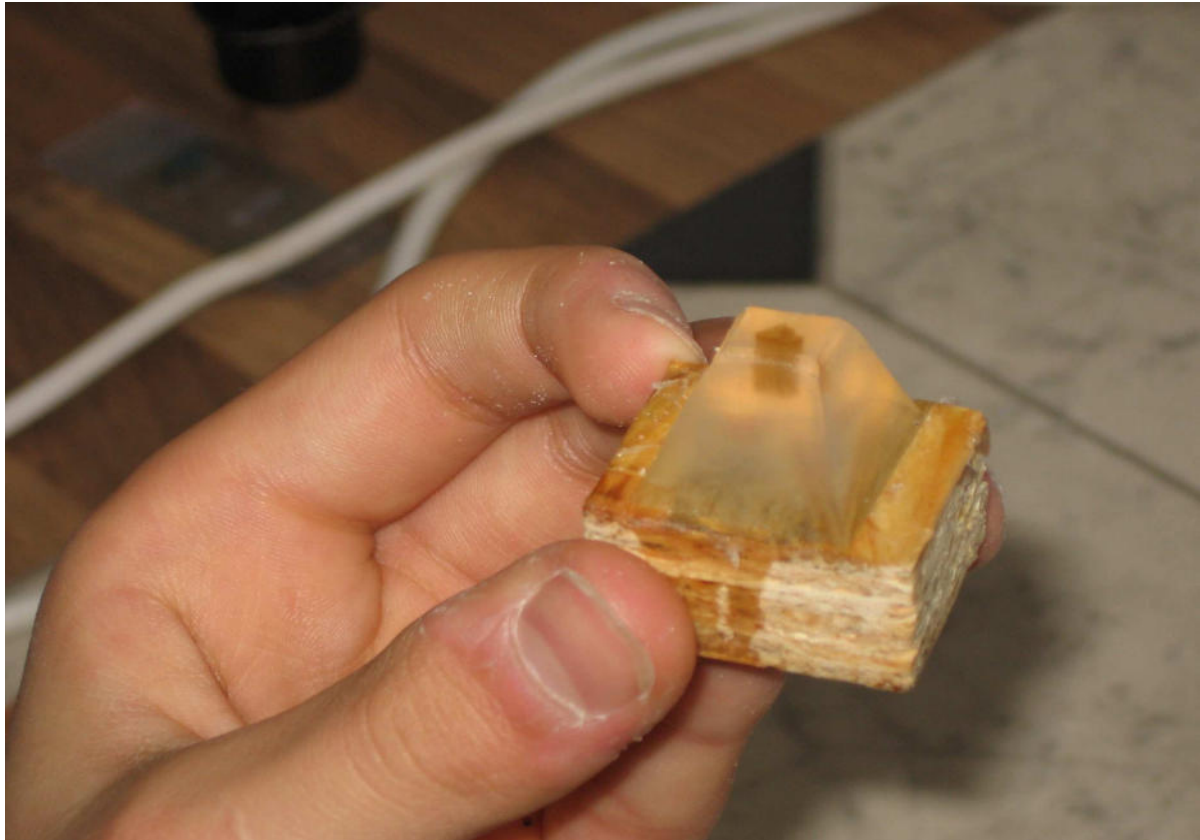


Abbildung 9: Pyramidenförmig zugeschnittener Block

Schneiden der Proben:

Der Holzklotz mit dem aufgeklebtem Block wird nun in ein Mikrotom eingespannt. Es wird mit einem schräg eingespanntem Messer geschnitten. Der Klingenwinkel beträgt ca. 35° . Ich schneide mit einem Sartorius Doppelzylinder Mikrotom Nr.32.

Um beste Resultate zu erhalten, ist es wichtig immer gleichmäßig und nicht zu schnell zu schneiden.

Die Schnitte, die man erhält, werden mit einem Pinsel abgenommen und in eine kleine Schüssel mit destilliertem Wasser gegeben. Als Schüssel dient ein leerer Schweinesülze-Behälter. Um die Schnitte vom Pinsel in das Wasser zu bekommen, schlägt man mit dem Pinsel gegen den Rand der Schüssel. Es ist wichtig, dass man den Pinsel nicht ins Wasser taucht, da die Schnitte sonst am Pinsel festkleben. Die Seife löst sich im destilliertem Wasser auf und übrig bleiben die sauberen Schnitte.



Abbildung 10: Sartorius Doppelzylinder Mikrotom Nr.32



Abbildung 11: Eingespannter Block und schräg eingespanntes Messer

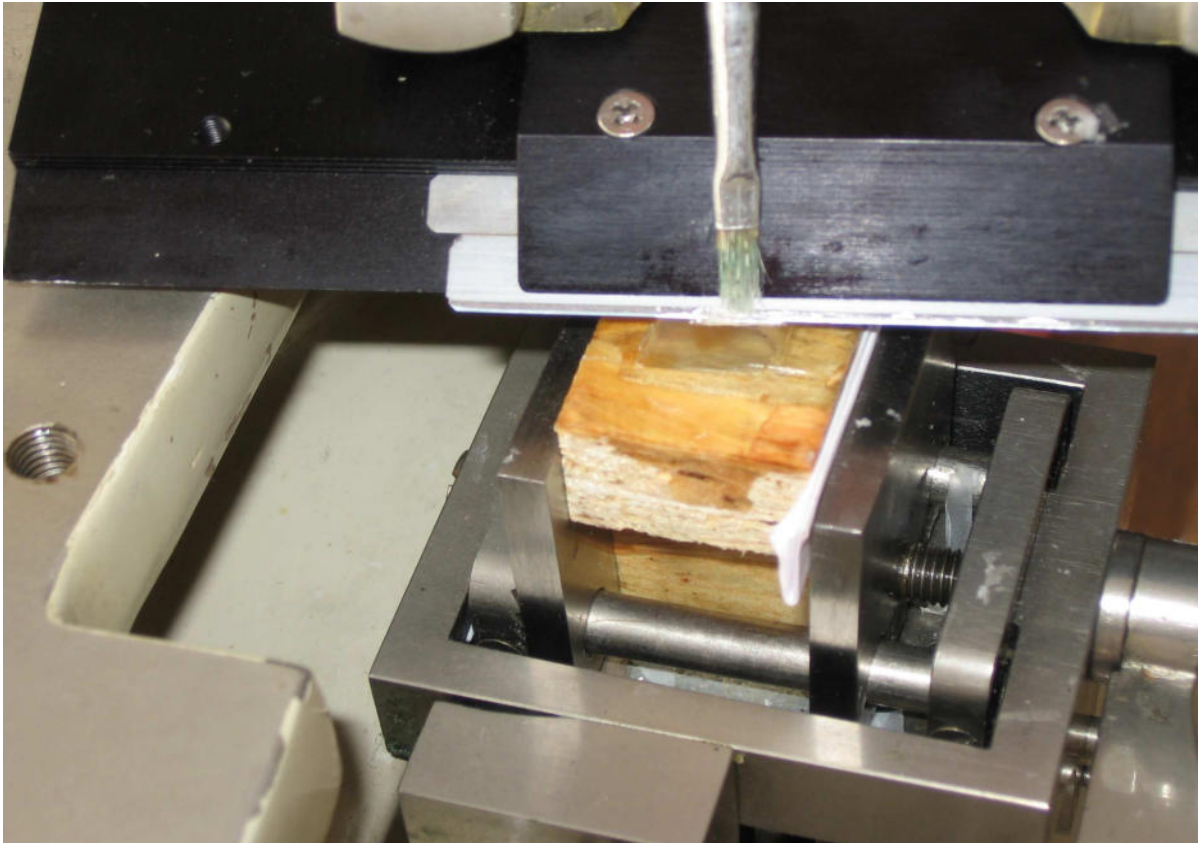


Abbildung 12: Abnehmen der Schnitte mit einem Pinsel

Mögliche Fehler beim Schneiden:

Manchmal zerreißen die Schnitte, weil das Gewebe weich ist. Hier hilft oft die Schnittdicke zu erhöhen.

Während des Schneidens sammeln sich unter der Klinge auch noch Seifenstücke, die den Schnitt negativ beeinflussen. Die Seife dann vorsichtig mit einem Stück Küchenpapier entfernen. Um die Unterseite der Klinge leichter zu kontrollieren verwendet man einen Zahnarztspiegel mit gebogenem Kopf.

Schlechte Schnitte können auch die Folge von einer zu alten Klinge sein, die bereits oft benutzt wurde. Einfach die alte Klinge gegen eine neue wechseln.

Oft sieht man kleinere Ausrisse im Gewebe erst unter dem Mikroskop. Diese können die Folge von einer zu kurzen Infiltration sein.

Sammeln der Schnitte:

Um die Schnitte aus der Schüssel von Wasser in ein Glas zu überführen, verwendet man eine Pipette, bei der man vorne die Spitze abschneidet. Nun kann man alle Schnitte bequem einsaugen und in ein Schnappdeckglas geben. Dies macht man so lange bis alle Schnitte im Schnappdeckglas sind. Nun nimmt man eine normale Pipette, mit der man das Seifenwasser herausaugt. Dabei muss man vorsichtig sein um nicht die Schnitte mit heraus zu saugen.

Sobald man das ganze Seifenwasser entfernt hat, gibt man 70 % Ethanol ins Schnappdeckglas. Diesen saugt man nochmal heraus damit keine Seifenreste im Schnappdeckglas bleiben. Danach kann man mit 70 % Ethanol auffüllen. Die Prozedur ist nun fertig und die Schnitte können Jahre lang aufbewahrt werden. Jetzt würde normalerweise das Färben anstehen aber dazu hat Jörg Weiss aus dem Mikroforum bereits eine ausgezeichnete PDF-Datei erstellt.



Abbildung 13: Absaugen der Schnitte mit abgeschnittener Pipette

Bezugsquelle:

-Glycerinseife:

<http://www.seifenstube.de/eshop/seifen-kosmetikrohstoffe-rohseife-glycerinseife-industirelle-glycerinrohseife-glycerinseiferohseife-transparent-1000g-p-422.html>

Ich bedanke mich für's Lesen
David Kubon