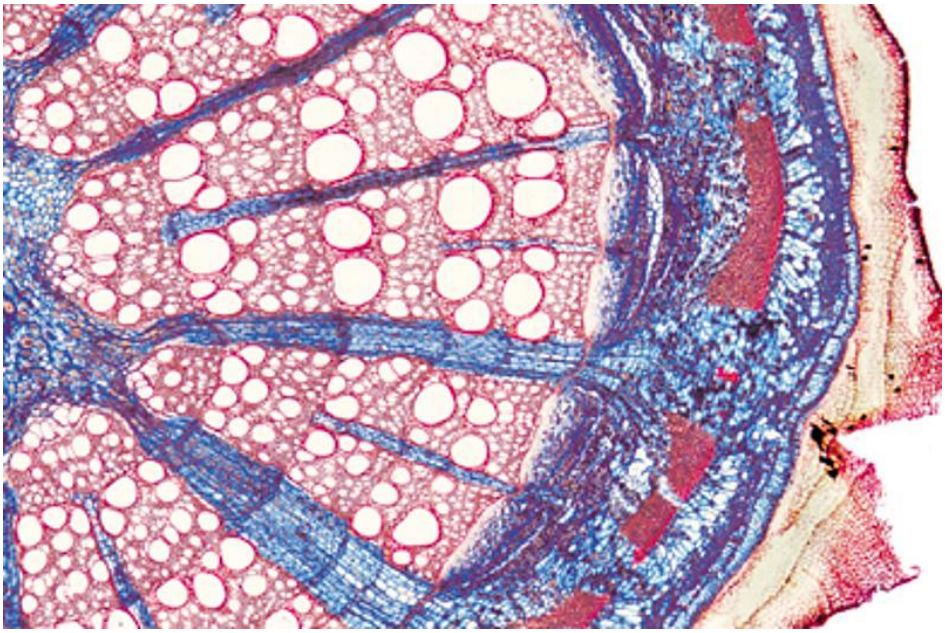
Do-It-Yourself Dauerpräparate

Teil 2 von 3:

Färbung von Dünnschnitten: Pflanzen und histologische Schnitte



Klassenstufe	Thema	Niveau	Vorbereitungszeit
Sek I + II	Mikroskopie, Botanik	• • •	• •

Inhalt dieser Anleitung

In Teil 1 lernten Sie eine einfache Herstellung von Dauerpräparaten und eine Einfachfärbung mit Safranin kennen (Arbeitspläne Nr. 1 und Nr. 2).

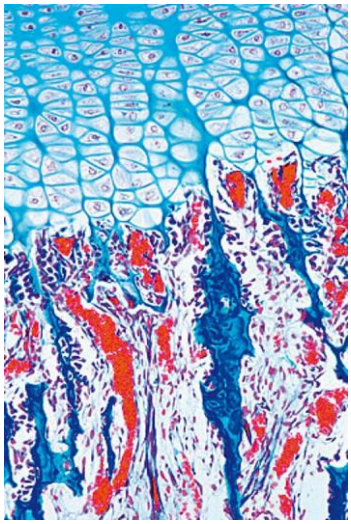
In dieser Anleitung vertiefen wir die Grundlagen und erweitern den Fundus um Dünnschnitte und legen einen Fokus auf Mehrfachfärbungen. Lehrkräfte sowie Ihre Schülerinnen und Schüler lernen die Doppelfärbung mit Astrablau / Safranin für Pflanzenschnitte kennen. Zusätzlich bieten wir auch eine Einführung in die Doppelfärbung histologischer Schnitte mit Hämatoxylin / Eosin (H-E Färbung) für die Lehrkraft.

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

Einleitung

Für die Betrachtung einzelner Zellen ist das Erstellen von Dünnschnitten unerlässlich. Hinzu kommt die Färbung des Gewebes, um Strukturen sichtbar zu machen und zu differenzieren. Mit einfachen Methoden ist ein Dünnschnitt mit Handelsüblichen Rasierklingen per Hand möglich. Die klassische Unterscheidung zwischen lignifizierten und unlignifizierten Zellen mittels Doppelfärbung bietet sich für eine solche Färbung und die anschließende Weiterverarbeitung zum Dauerpräparat an. Eine weitere, anspruchsvolle Methode ist die Verwendung eines Handmikrotoms für paraffinierte histologische Dünnschnitte.

Achtung!



Wegen des nötigen Arbeitsschrittes mit stark gesundheitsschädlichen Stoffen (Xylol sowie Xylol-Ersatzprodukte) wird darauf verwiesen, die histologischen Paraffinschritte nicht mit Schülerinnen und Schülern um Unterrichtsversuch durchzuführen.

Bitte informieren Sie sich vorab über die Bestimmungen Ihres Landes bzw. Bundeslandes bezüglich der Gefahrstoffverordnung und den Erwerb der Chemikalien für Ihre Institution, sollten Sie histologische Präparate für Ihre Biologiesammlung selbst herstellen wollen.

Wir möchten Ihnen dennoch diese Methodik zusätzlich vorstellen, um eine Möglichkeit zu bieten sich eigene histologische Dauerpräparate für Ihre Sammlung anzufertigen.

Die vorgestellten Dünnschnitte mit Pflanzenmaterial sind hingegen mit Schülerinnen und Schülern im Unterricht durchführbar.

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

Durchführung

Material:

- Holundermark oder Kork. Alternativ: Eine Karotte.

- Alkohol 96%ig - Brennspiritus

- Alkohol 70%ig - diesen kann man sich aus einer Mischung von 3 Teilen Brennspiritus und 1 Teil destilliertem Wasser selbst herstellen.

- Alkohol 100%ig - Isopropylalkohol

- Destilliertes Wasser (auch demineralisiertes Wasser).

- Salzsaurer Alkohol (auf 50 ml 70%igen Alkohol kommen einige Tropfen Salzsäure).

- Präparategläser um Präparate in die Chemikalien einzulegen. Gut ersetzbar durch Petrischalen oder ähnlichen, flachen Schälchen.

- Eindeckmedium: Glyzeringelatine.

- Safraninlösung und Astrablaulösung 1% zur Färbung der Präparate.

- Rasierklinge

- Präparationsbesteck

- Objektträger und Deckgläschen

- Feuerzeug oder Spiritusbrenner, um die Glyzeringelatine zu schmelzen. Alternative: In einem Becherglas im heißen Wasserbad. Hierzu werden zusätzlich Pipetten benötigt.

- Lack zum Abdichten des Deckgläschens. Hier genügt handelsüblicher klarer Nagellack.

Für histologische Schnitte benötigen Sie zusätzlich:

- Ein kleines Handmikrotom

- Paraffin

- Eosinlösung und Hämatoxylinlösung

- Xylol oder Xylol-Ersatz

- Einbettmittel: Kunst oder Naturharze. Beispielsweise Entellan (Enthält Xylol).

- Färbetröge nach Hellendahl

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

Allgemeines zur Präparation:

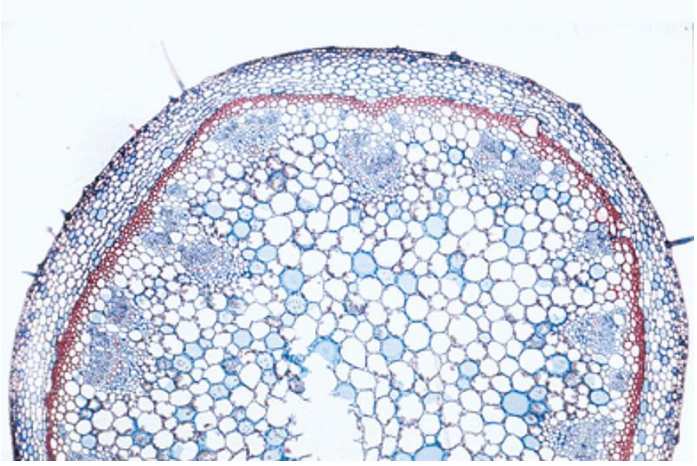
- Von Vorteil ist, wenn das Präparateglas, in dem sich das Objekt gerade befindet, während der Behandlungsdauer von Zeit zu Zeit leicht bewegt wird (nicht schütteln!). Dadurch wird eine schnellere Durchdringung des Objektes mit der jeweiligen Flüssigkeit erreicht.

- Prinzipiell sollten alle Flüssigkeiten nur einmal verwendet werden. Lediglich die Farblösungen können, falls sie nicht verdünnt werden mussten, in die Vorratsflaschen zurückgegossen werden. Verdünnte Farblösungen nicht in die Vorratsflaschen zurückgießen! Besser ist immer die Verwendung neuer, ungebrauchter Farblösungen.

- Es lohnt sich, die Objektträger, kurz vor der Einbettung, mit Alkohol zu desinfizieren. Dies vermeidet den Miteinschluss von Bakterien und Pilzsporen, welche die Haltbarkeit der Präparate beeinträchtigen.

Allgemeines zur Anfertigung von Dünnschnitten:

- Handschnitte von Pflanzenteilen können leicht selbst angefertigt werden. Besonders geeignet sind Teile des Stängels, die zur Erzielung einer schneidfähigen Konsistenz einige Tage vorher in starken Alkohol (Brennspiritus) gelegt wurden.



Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

Arbeitsplan Nr. 3

Dünnschnitte von Pflanzenteilen, Doppelfärbung mit Astrablau-Safranin (Holz-Zellulose Färbung) Beispiele:
Schnitte durch Stengel, Wurzeln, Blätter, Blüten, Früchte usw. Die in der botanischen Mikrotechnik beliebte Astrablau-Safranin-Färbung eignet sich vorzüglich dazu, zwei Grundbausteine pflanzlicher Gewebe, Holz und Zellulose, verschiedenfarbig darzustellen.

Vorbereitung:

- Es werden 3 separate Präparategläser mit 70%igen salzsauren Alkohol, 96%igen Alkohol und 100%igen Alkohol gefüllt.

- Es werden 3 separate Präparategläser mit Astrablaulösung, Safraninlösung (1:5 verdünnt) und Destilliertem Wasser gefüllt.

Anfertigung des Dünnschnittes:

- Stücke von Holundermark, Kork oder gar einer Karotte werden längs bis maximal zu Hälfte eingeschnitten. Ggf. werden die Schnitte ausgehöhlt - an den Durchmesser des Objekts angepasst, sodass es hineinpasst aber noch fest eingespannt bleibt.

- Das Objekt wird in die Stücke eingeklemmt, ein Zerquetschen ist zu vermeiden.

- Mit einer Rasierklinge wird nun, mit ziehendem Schnitt, ein möglichst dünner Schnitt hergestellt. Die zur Verfügung stehende Messerschneide wird möglichst in ihrer ganzen Länge ausgenutzt. Messer und zu schneidendes Objekt sollten beim Schneiden immer mit Alkohol feucht gehalten werden: die Schnittfläche darf keinesfalls austrocknen.

- Die Schnitte werden mit einer Pinzette oder einem feinen Pinsel vom Messer abgenommen. Sollte man mehrere Schnitte vor der Weiterverarbeitung sammeln, lohnt sich die Aufbewahrung in einem Schälchen Wasser.

Die Färbung in den Präparategläsern:

- Die Dünnschnitte werden in die Astrablaulösung überführt (5 min).

- Die Dünnschnitte werden in Destilliertes Wasser überführt, zum Auswaschen (2 min).

- Zur Zweitfärbung werden die Dünnschnitte in die Safraninlösung überführt (10 min oder länger).

- Die Dünnschnitte werden erneut in Destilliertes Wasser überführt, zum Auswaschen überschüssiger Zweitfärbung (2 min).

- Zur Differenzierung werden die Dünnschnitte nun in 70%igen salzsauren Alkohol gelegt. Zur Überprüfung des Färbegrads kann von Zeit zu Zeit das Objekt auf einen Objektträger

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

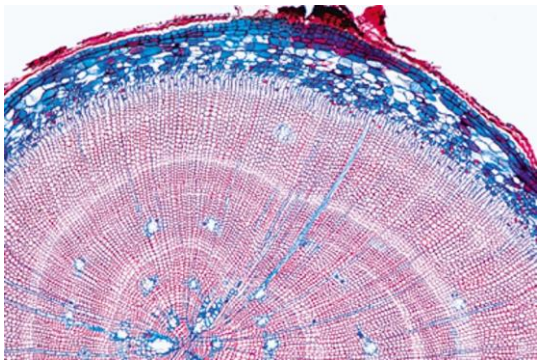
in 70%igen Alkohol überführt und der Grad der gewünschten Färbung unter einem Mikroskop oder einer Streolupe überprüft werden (Zeit individuell).

Hinweis: Falls sich bei der Betrachtung herausstellt, dass die Differenzierung schon zu weit fortgeschritten ist, dem Gewebe also schon zu viel Farbe entzogen worden ist, kann der Färbevorgang ohne weiteres ab dem Präparateglas 1 wiederholt werden.

- Ist das gewünschte Maß erreicht, wird der Dünnschnitt in das nächste Präparateglas überführt, welches 96%igen Alkohol enthält und in dem die Differenzierung bald zum Stillstand kommt (5 min).

- Der Dünnschnitt wird in 100%igen Alkohol überführt (5 min).

Die Einbettung:



- Die Glyzeringelatine wird vorbereitet. Verwendet wird ein Stück in der Größe einer halben Erbse. Entweder wird das Stück direkt auf dem Objektträger vorsichtig über einer Feuerzeug-Flamme geschmolzen (Methode 1) oder eine größere Menge in einem heißen Wasserbad (Methode 2). Sie schmilzt ab 60°C. Nicht kochen!

- Mit der Pinzette wird das Objekt in die flüssige, abkühlende Glyzeringelatine auf dem Objektträger (Methode 1) gelegt - Bzw. nach Ablage auf den Objektträger mittels Pipette mit Glyzeringelatine eingedeckt (Methode 2).

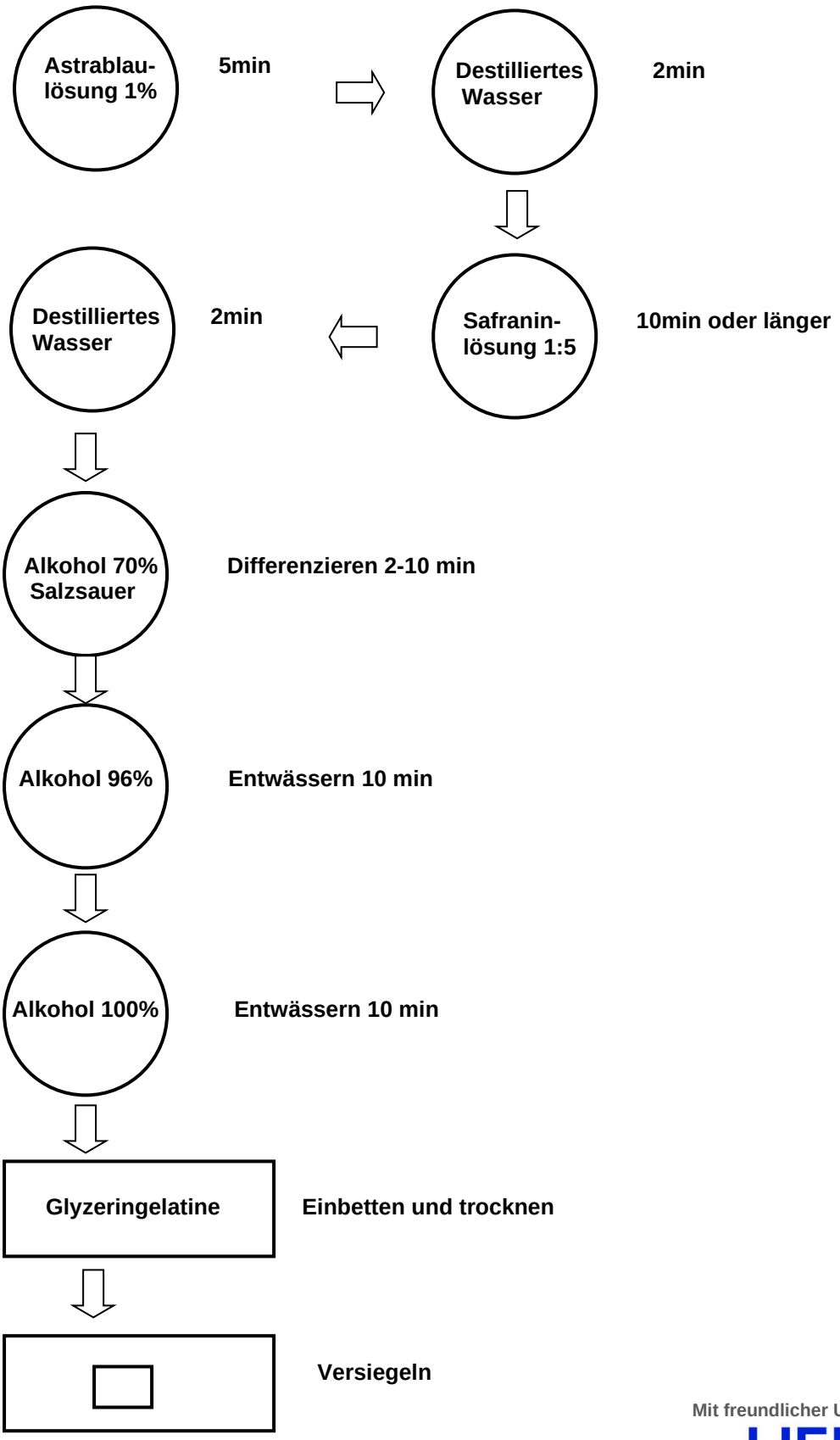
- Ein sauberes, steriles Deckgläschen wird mit der Pinzette langsam auf das Objekt gelegt. Bläschenbildung vermeiden. Die Glyzeringelatine sollte den gesamten Raum unter dem Deckgläschen füllen, sie darf an den Rändern austreten.

- Die Präparate werden waagerecht (!) einige Minuten an der Luft getrocknet, bis die Glyzeringelatine erstarrt.

- Überstehende Reste werden mit einer Rasierklinge vorsichtig von Objektträger entfernt.

- Das Deckgläschen wird an seinem Rand mit Lack versiegelt.

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de



Mit freundlicher Unterstützung von
LIEDER
MADE IN GERMANY

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

Arbeitsplan Nr. 4

Histologische Dünnschnitte aus Zoologie und Botanik. Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Kern-Plasmafärbung). Beispielsweise mit einem Regenwurm.

Sollte man keine Tiere finden, die eines natürlichen Todes starben, gibt es die Möglichkeit, Regenwürmer beim Anglerbedarf oder auch als Kompostwürmer in Baumärkten kaufen. Man tötet sie, indem man Ethylacetat auf ein Stofftuch im geschlossenen Sammelgefäß träufelt. Die Tiere werden binnen Minuten betäubt und sterben innerhalb von 2- 3 Stunden.

Die Herstellung solcher Schnitte gelingt am besten mithilfe eines speziellen Schneidegeräts (Mikrotom). Die Dicke dieser Schnitte liegt bei 10 µm, sie sind daher außerordentlich zart und können nur auf einer stabilen Unterlage weiterbehandelt werden.

Hierzu werden die Schnitte nach dem Schneiden und vor der Behandlung auf die Objektträger übertragen und in Färbetrögen weiterverarbeitet. Die Objektträger werden nur mit der Pinzette berührt, bewegt und auf einem stabilen Untergrund eingebettet. Eine Kontamination des Tisches oder der Hände/Kleidung mit Xylol ist zu vermeiden.

Fixieren:

- Das Objekt wird über 24h in Formalinlösung eingelegt – alternativ kann hierzu 70%iger Alkohol verwendet werden. Es empfiehlt sich, keine Objekte über 5 -7 mm Dicke zu verwenden, da die Durchtränkung für die Fixierung sonst deutlich länger dauert. Eine Überfixierung ist ebenso zu vermeiden – das Objekt sollte nicht länger als 48h in der Lösung verbringen.

Entwässern:

- Das Objekt wird in aufsteigender Alkoholreihe (96%ig und 100%ig) entwässert (je 5 min).

- das Objekt wird in Xylol oder Xylol-Ersatz inkubiert (10 min).

Paraffinieren:

- Aus Pappe oder Aluminium lassen sich rechteckige Schälchen formen, in denen das Objekt mit Paraffin umschlossen werden kann. Die Maße werden abgestimmt auf die Möglichkeiten, die Blöcke in ein Mikrotom zu spannen.

- Das Paraffin wird über einer Flamme oder im Wasserbad geschmolzen. Um die 60°C

- Man füllt zunächst etwas Paraffin in den Boden, um anschließend das Objekt darauf zu platzieren. In der gewünschten Orientierung, um beim späteren Schnitt zu wissen, welche Schnittebenen man vor sich hat.

- Das Objekt wird ganz mit Paraffin umschlossen. Blasenfrei

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

- Nun stellt man das Schälchen in ein flaches, kaltes Wasserbad um die Abkühlung zu beschleunigen. Die Blöcke sind nach Abkühlung bereit für den Schnitt.

- Man kann die Blöcke etikettieren oder beschriften und später verarbeiten. Fixierte und paraffinierte Gewebe sind theoretisch unbegrenzt haltbar.

Vorbereitung:

- Es werden Färbetröge wie folgend befüllt: Xylol (Xylol- Ersatz), 100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol, 70%iger Alkohol, destilliertes Wasser, Eosinlösung 1:10 mit destilliertem Wasser, Leitungswasser, Hämatoxylinlösung.

Schnitte mit dem Mikrotom:

Es gibt günstige Handmikrotome, welche mit handelsüblichen Rasierklingen Schnitte von 10 µm Dicke anfertigen. Diese lassen sich an Tischrändern fixieren. Bitte beachten Sie die Gebrauchsanweisungen der Geräte, Verletzungsgefahr!

- Mit Pinsel oder Pinzette werden die Schnitte vorsichtig auf den Objektträger übertragen. Oftmals genügt es bereits den Objektträger leicht an die Schnitte zu drücken, sodass diese darauf haften bleiben.

- Mit einer Flamme wird das Präparat auf dem Objektträger kurz und vorsichtig unter Schwenken erwärmt. Das Paraffin schmilzt und das Eiweiß des Präparats haftet am Objektträger – ein Ablösen des Präparats wird hierdurch unwahrscheinlicher.

Färbung:

- Zuerst wird der Objektträger in Xylol oder Xylol-Ersatz gegeben, das Paraffin dadurch entfernt (5 min).

- Die Präparate werden in absteigender Reihenfolge in 100%igen, 96%igen und 70%igen Alkohol gewaschen, um das Xylol zu entfernen (jeweils 3 min).

- Die Präparate werden in destilliertem Wasser gewaschen (3 min).

- Erste Färbung: Hämatoxylinlösung (5 min).

- Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs in destilliertem Wasser (2 min).

- Bläuen: Dreimalig mit Leitungswasser waschen – Wasser nach jeder Waschung wechseln (je 15 min). Die rote Färbung schlägt nach Blau um – es empfiehlt sich, den Erfolg unter einem Mikroskop zu kontrollieren.

- Zweite Färbung: Eosinlösung 1:10 mit destilliertem Wasser (5 min).

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de

- Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs in destilliertem Wasser (2 min).

- Differenzieren: Alkohol 70%ig (2 - 5 min).

- Entwässern mit 96%igen Alkohol (3 min).

- Entwässern mit 100%igen Alkohol (5 min).

- Inkubation in Xylol oder Xylol-Ersatz (5 min) – entfällt bei Schnelleindeckmitteln wie z.B. Entellan.

Einschluss in Harze:

- Es ist darauf zu achten, dass nicht allzu viel Xylol oder ein Ersatzprodukt aus dem Färbetrog mitgenommen wird. Man lässt es einige Zeit abtropfen.

- Der Objektträger mit dem Präparat wird auf einen stabilen Untergrund gelegt.

- Auf das gefärbte Präparat auf dem Objektträger wird ein kleiner Tropfen des Harzes gegeben. Hierzu eignet sich eine Pipette.

- Ein sauberes Deckgläschen wird an seiner Kante aufgesetzt und mit der Pinzette vorsichtig auf das Präparat herabgelassen.

- Der Raum unter dem Deckgläschen sollte komplett ausgefüllt sein. Die Ränder des Deckgläschens können mit geringen Mengen des Harzes ausgebessert werden. Es darf über die Kante übertreten.

- Das Präparat wird noch einige Tage gut belüftet gelagert, sodass Reste des Xylols verdunsten können. Die Lagerung erfolgt hierfür waagerecht. Nach Aushärtung des Harzes können sie in einem Präparatekasten auch senkrecht gelagert werden.

Datenanalyse

Auswertung der Ergebnisse:

Die Doppelfärbung Safranin / Astrablau eignet sich bestens um die verholzen Teile bei Pflanzen hervorzuheben. Insbesondere in Leitgeweben und im Querschnitt durch Leitbündel, bietet diese Färbung einen großen didaktischen Wert. Xylem, Phloem, Sklerenchym können sichtbar gemacht werden.
Im Längsschnitt sind die Siebröhren des Xylems gut zu betrachten und erweitern das Verständnis der Struktur.
Obwohl die histologischen Schnitte einen großen Aufwand und Sicherheitsmaßnahmen benötigen, bieten sie eine gute Methode um gezielt Strukturen und Organismen auszuwählen. Allerdings begrenz hier die Beschaffenheit des Materials die Möglichkeiten. Knochen müssten entkalkt werden, um schneidbar zu sein. Chitin von Insekten ist oftmals zu robust für einen guten Schnitt. Der Artenschutz muss beachtet werden. Tiere, die eines natürlichen Todes starben, sind eventuell schwierig aufzutreiben.

Dr. G. Schuchardt
Institut für wissenschaftliche Lehrmittel
info@schuchardt-lehrmittel.de
www.schuchardt-lehrmittel.de