

Arbeitsanleitung  
Histologie  
(Paraplast, Parafex S)

Vorbereitung:

Ich schnitt max. 1 cm lange Stücke (auf Länge achten, wegen des Eintauchens in den Paraplastblock) eines Präparates.  
Zur Fixierung liegt ein Pflanzenstiel in AFE.  
und tierisches Gewebe, z.B. Regenwurm, liegt in 10%-Formalin.



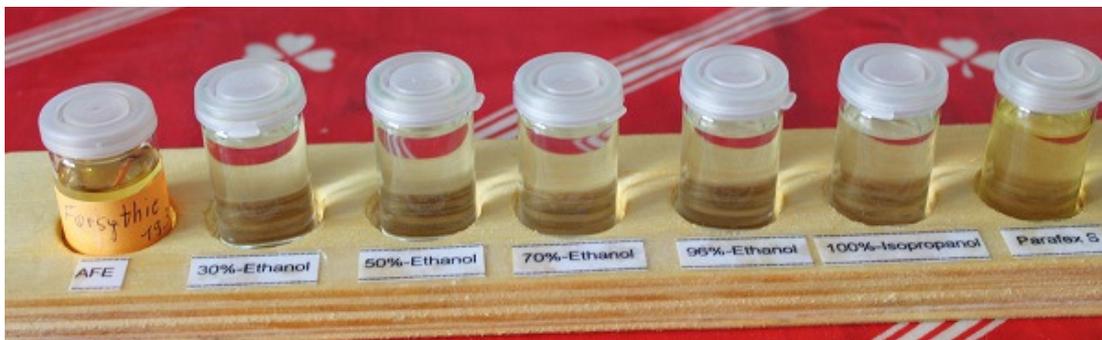
Der Durchmesser des Präparates sollte max. 5mm betragen.  
Volumen eines Präparatstückes ist somit: ca. 200 mm<sup>3</sup>

Entwässern:

Das Fixiermittel wurde mit dest. Wasser gründlich ausgewaschen. Mehrmals Wasser wechseln, max. je 15 Minuten verbleib im Wasser.



Für die folgenden Bäder sollte die Flüssigkeitsmenge das 50fache Volumen des pflanzlichen oder tierischen Präparates haben.  
Also  $200\text{mm}^3 \times 50 = 10000\text{mm}^3 = 10\text{cm}^3 = 10\text{ml}$ .  
Ich verwende als Behälter Schnappdeckelgläser.



Das Präparat sollte je Millimeter Objektdicke mindestens ca. 30 Minuten in jedem Bad verbleiben. Ich wähle 8 Stunden wegen des Tagesverlaufes.  
Vor dem Einbetten in Paraffin muss das Präparat entwässert werden. Dies erfolgte über 50%-, 70%-, 96%-Ethanol. Das Präparat blieb für je 8 Stunden in jedem Bad. (Ich verwende BIO-Ethanol 96% aus einem Baumarkt und mische das 50% und 70%ige selber).  
Anschließend noch 2 mal in 100% Isopropanol (aus Apotheke) für 12 Stunden.  
Zum Schluss wurde in PARAFEX S bei Zimmertemperatur ca. 20°C (einem Xylol-Ersatz von CHEMLAB als Intermedium) überführt. Das Präparat bleibt für 12 Stunden in dem Bad.

Arbeitsanleitung  
Histologie  
(Paraplast, Parafex S)

Infiltrieren:

Es wurde frisches PARAFEX S im Wärmeschrank auf 45 °C erwärmt und das z.B. Pflanzenstück 2 Stunden hinein gegeben.

Ich mischte Paraplast und Parafex S im Verhältnis 1:1 und erwärmte dies auf ca. 60 °C im Wärmeschrank, mittleres Regal. Das Präparat lag darin für 4 Stunden.

Mit einer frischen Mischung erfolgte der Vorgang ein zweites Mal.



Danach legte ich das Präparat noch einmal für 4 Stunden (60 °C) in reines Paraplast. Auch diesen Vorgang gab es ein zweites Mal, mit frischem Paraplast.

Als Schmelztiegel verwendete ich alte Kaffeemilch-Becherchen. Die Becherchen haben ein Volumen von ca. 14ml. Für den Transport der z.B. Pflanzenstiele benutzte ich eine vorgewärmte Pinzette. Für den Guss schmolz ich eine Stunde vorher das Paraplast.

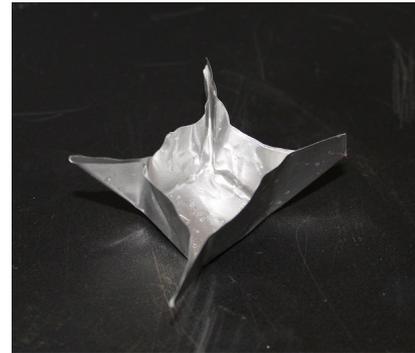


**Achtung: Paraplast darf nicht wärmer als 62 °C werden.**

Arbeitsanleitung  
Histologie  
(Paraplast, Parafex S)

Gießen des Blockes:

Ich bastelte mir aus Prägefolie eine Form (20 x 20 x 20 mm = 8cm<sup>3</sup> = 8 ml). Die Innenseiten der Form wurden mit Glycerin bestrichen.



Ich schmolz Paraplast im Wärmeschrank. Ich goss das flüssige Paraplast in die Form und wartete einen Moment bis sich am Boden eine Haut bildete; dann stellte ich ein warmes Präparat (z.B. Pflanzenstiel) senkrecht in die Mitte der Form. Vorgewärmte Pinzette benutzen. Der Boden des Blockes ist die Schnittkante für das Mikrotom.

Man bläst auf die Oberfläche des Paraplast, bis sich eine dicke Haut bildet. Anschließend tauchte ich die Form in kaltes Wasser, bis das Paraplast vollständig erstarrt war (Dauer ca. 30Minuten). Der Paraplastblock muss vor allen Dingen schnell erstarren. Die Oberseite des Blockes bildet einen Trichter aus, so dass ein Teil des Präparats im Freien liegen kann, wenn er zu lang ist.

Der Block sollte mindestens 24 Stunden auskühlen bevor geschnitten wird.

Arbeitsanleitung  
Histologie  
(Paraplast, Parafex S)

Vorbereiten zum Schneiden:

Der Paraplastblock wurde so zurechtgeschnitten (mit dem erwärmten Messer), dass das eingebettete Objekt ringsherum noch eine Paraplastummantelung von ca. 10mm behält (trapezförmig angeschnitten, so dass eine Schnittkante von ca. 5mm entsteht). Anschließend wird der Block auf einen Holzklötz aufgeklebt, durch erwärmtes Paraplast auf dem Holzklötz. Die Seite mit dem Trichter im Block wird flach abgeschnitten und ist die Klebefläche.



Schneiden des Paraplastblockes:

Das Ergebnis eines guten Schnittes wird von der Schnittfestigkeit des Blockes, Raumtemperatur, Infiltration des Objekts, Anstellwinkel des Messers und Schnittgeschwindigkeit bestimmt.

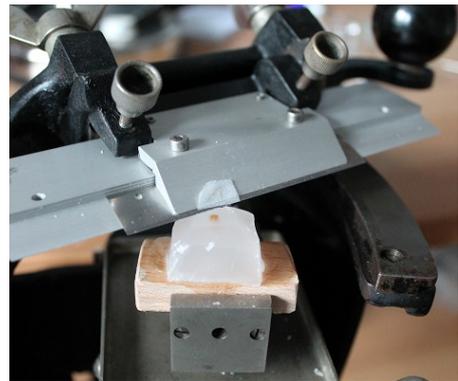
Die Schnittdicke beträgt hier ca. 20µm (Pflanzenpräparat). Bei tierischem Gewebe ist die Schnittdicke ca. 5 - 10µm.

Die Klinge befeuchtete ich vor dem Schneiden mit 30%-Ethanol.

Wenn die Schnitte nicht gerade bleiben, sondern sich auf dem Messer rollen, sind entweder die Schnitte zu dick, oder der Anstellwinkel des Messers ist nicht richtig.

Es genügt manchmal schon, den

Anstellwinkel um 2° flacher zu stellen. Ist der Anstellwinkel zu flach entsteht eine Stauchung des Schnittes. Der Schnittwinkel sollte ca. 15° sein.



Einzelsschnitte:

Der am Messer hängende Schnitt wurde mit Pinsel und Schnittfänger abgenommen.

Die Oberfläche eines jeden Schnittes ist matt, während die dem Messer zugewandte Seite glänzt.

Die Glanzseite muss stets dem Objektträger zugewandt sein.



## Vorbereitung des Objektträgers:

- Objektträger mit 96%-Ethanol entfetten und gut trocknen.

Um den Schnitt auf dem Objektträger fest zu kleben, bestrich ich den OT mit Eiweißglycerin.

Damit der Film möglichst dünn und gleichmäßig ist, benützt man zum Auftragen ein nicht fuselndes Tuch (Leinentaschentuch oder Kosmetiktuch), auf das man einen Tropfen Eiweißglycerin gibt.

## Strecken des Schnittes:

Zum Strecken des Schnittes gibt man ihn in ein Wasserbad (35 °C), mit etwas Spiritus oder 96%-Ethanol. Unmittelbar danach wurde der Schnitt mit dem Schnittfänger herausgefischt und mit einem Pinsel auf den OT abgelegt



## Aufkleben des Schnittes:

Anschließend lag der Schnitt für eine Stunde auf der Wärmebank (35 °C) und trocknete (denaturieren des Eiweißglycerin). Die Objektträger werden mit Bleistift beschriftet. Filzstifte sind ungeeignet. Der Alkohol löst die Schrift auf



## Paraffin entfernen:

Man benötigt 10 Küvetten:

Es wurden je 2 OT (Rücken an Rücken) mit den aufgeklebten Schnitten in die Küvette hinein gegeben und mit einer Klammer festgehalten.

1. Parafex S 1      10 Stunden bei 20°C (Raumtemperatur); über Nacht  
ODER  
Im Wärmeschrank werden OT bei  
50°C für 1/2 Stunde behandelt.  
Sie bleiben nur solange im Parafex S bis sich das  
Paraplast aufgelöst hat.  
Parafex S arbeitet bei höheren Temperaturen  
schneller.  
Das Parafex S wird nach Verwendung  
von ca. 50 Objektträgern entsorgt.  
Der Paraplastschnitt hat dabei die  
Maße ca. 10 x 10mm x 20µm Dicke.
2. Parafex S 2      Nachbehandlung:  
4 Stunden bei 20°C (Raumtemperatur);  
ODER  
Im Wärmeschrank werden OT bei  
50°C für 15 Minuten behandelt.  
Wenn die Küvette 1 „Parafex S 1“ entsorgt wird,  
wird die Küvette 2 zur Küvette 1 und die Küvette 2  
erhält frisches Parafex S.

Nach einer Auskunft von H.Heim

100ml Parafex S    lösen      5 Gramm Paraffin.

Eine 30ml-Küvette löst somit    1,5 Gramm.

Bei einer Anreicherung des Parafex S mit Paraplast wird das Parafex S trüb und sollte spätestens dann entsorgt werden.

Mit einer 30ml-Küvette Parafex S können sicher ca. 50 Objektträger mit Paraplast entparaffiniert werden.

Jeder Schnitt enthält ca. 10 x 10mm x 20µm Dicke = 2 mm<sup>3</sup> Paraplast.  
Bei 50 Schnitten sind das 100 mm<sup>3</sup> = 0,1 cm<sup>3</sup> = ca. 0,1 Gramm.

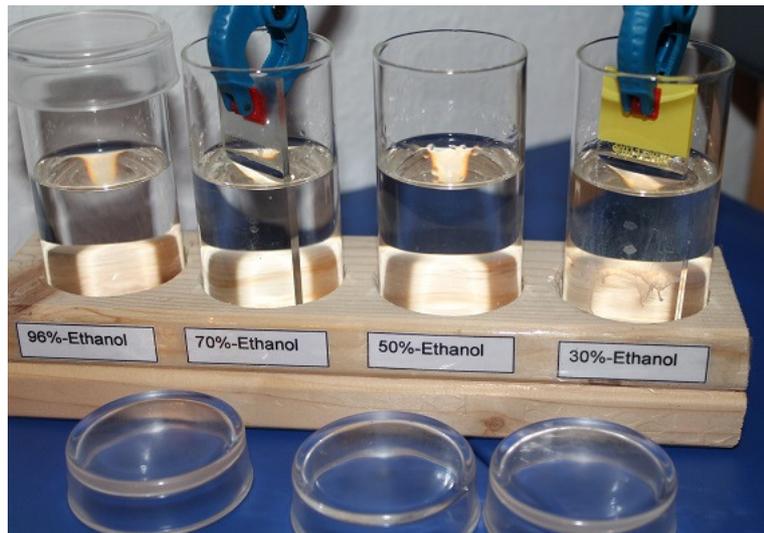
Arbeitsanleitung  
Histologie  
(Paraplast, Parafex S)

3. Isopropanol 1  
5 Minuten
4. Isopropanol 2  
5 Minuten



Die Küvette 3 (Isopropanol 1) sollte nach der Bearbeitung von 10 Objektträgern entsorgt werden. Die Küvette 4 (Isopropanol 2) wird dann zur Küvette 3 und die Küvette „Isopropanol 2“ erhält frisches Isopropanol

5. 96% Ethanol  
5 Minuten
6. 70%-Ethanol  
5 Minuten
7. 50%-Ethanol  
5 Minuten
8. 30%-Ethanol  
5 Minuten



Das Ethanol sollte nach der Behandlung von ca. 25 Objektträgern komplett ersetzt werden

9. dest. Wasser  
5 Minuten
10. dest. Wasser  
5 Minuten

Das dest. Wasser sollte bei jeder Behandlung frisch sein.

Arbeitsanleitung  
Histologie  
(Paraplast, Parafex S)

Die Lagerung, bis zur Färbung, erfolgt in einem Färbetrog mit dest. Wasser.



## Färben und Einschließen:

Als Beispiel:

Pflanzliches Präparat: z.B. Wacker ASim II (Acriflavin/ Acridinrot/ Alcianblau)

Tierisches Präparat: z.B. Kernecht-Kombinationsfärbung

1. Den Objektträger in die Färbeschale legen und mit ASim II gut bedecken.  
15 - 30 Minuten einwirken lassen.  
(Raumtemperatur)
2. Dreimaliges Abspülen des Farbstoffes mit Aqua dest.
3. Entfernen des Wassers, so das die Schnitte nur noch feucht sind und nicht nassfeucht. Durch Absaugen des Wasser mit Löschpapier.  
Achtung: Den Schnitt nicht mit dem Löschpapier berühren
4. Die Schnitte mit 100%-Isopropanol entwässern.
  1. Stufe für 30 Sekunde den OT bedecken, dann Isopropanol abgießen,
  2. Stufe für 3 Minuten den OT bedecken, dann Isopropanol abgießen
  3. Stufe für 5 Minuten den OT bedecken, dann Isopropanol abgießen,
  4. Absaugen des Isopropanols mit Löschpapier den Schnitt nicht mit dem Löschpapier berühren.
5. Mit dem Glasstab ein Tropfen Euparal auf den Schnitt verbringen, ein Deckglas auflegen und leicht angedrückt.
6. Die Objektträger lagen für 2 Tage zum Trocknen auf einer Wärmebank bei ca. 30°C.



Literatur:

Angewandte Mikroskopie von Aribert Jung

Romeis Mikroskopische Technik

diverse Veröffentlichungen von Klaus Henkel

diverse Veröffentlichungen des mikroskopischen Kollegiums Bonn

Histokurs von Roland Schulte

Chemikalien:

Klaus Herrmann

Apotheke

biologie-bedarf.de