

# De wereld onder de microscoop



Home

Histologie

Materialen

Preparaten

Fotogaleri

Downloads

Links

Sitemap

Contact

## Coupes snijden en bevestigen op voorwerpglas

Paraplast krimpt vrij sterk en daarom ontstaat een krimpdal in de cassette. Dit is prima. Na ongeveer een kwartier is alles uitgehard. Omdat de paraplast gekrompen is zal hij heel makkelijk uit de gietmal vallen. Nu kan het blok worden afgewerkt. Gietuitlopers wegsnijden en eventueel het blok verkleinen. Niet noodzakelijk, maar wel praktisch. De paraplast kan weer worden hergebruikt en alle paraplast die in een snede zit moet later weer worden opgelost in xyleen. Er moet wel voldoende paraplast om het weefsel blijven zitten om het geheel stevig genoeg te houden. De blokken nummeren en archiveren. Ze kunnen jaren worden bewaard.



## 5. Coupes snijden op microtoom

Een microtoom is een stuk gereedschap dat speciaal ontworpen is om zeer dunne plakjes weefsel (coupes) te snijden. Een histologische coupe heeft een dikte van  $1\mu\text{m}$  tot ongeveer  $7\mu\text{m}$  ( $1\mu\text{m} = 1/1000\text{mm}$ ). Er zijn diverse soorten microtomen. Op de pagina 'microtomen' worden verschillende soorten microtomen uitgebreid beschreven. Op de 'download'-pagina is een handleiding van het A&O 820 en LKB 2218 Historange in .pdf formaat te downloaden.





Klik op één van de onderstaande links om een (youtube)-video te bekijken van het microtoomsnijden op een A&O 820 en een LKB 2218 Historange microtoom.

<http://www.youtube.com/watch?v=qGyE4p9XanA>

<http://www.youtube.com/watch?v=6ZBHveyKENI>



Bronvermelding:

1. Theorie: Prof. Dr. Peter Böck (1989, 17., neubearbeitete auflage), *Romeis Mikroskopische Technik*, München. Verleger Urban & Schwarzenberg. Hoofdstuk 7, 'Aufziehen der Schnitte und Vorbereitung zur Färbung' blz 168, 169 en 170.

## 6. Coupes bevestigen op voorwerpglas

Nadat de coupes op een microtoom zijn gesneden moeten ze worden aangebracht op een absoluut schoon voorwerpglas. De minste verontreiniging gaat gepaard met gedeeltelijk of zelfs geheel loslaten van de coupes bij de verdere ontwaterings- of kleursteps. Wanneer voorwerpglaasjes gekocht worden die zijn voorgereinigd zal blijken dat ook deze niet voldoende schoon zijn. De voorwerpglaasjes kunnen gereinigd worden in een mengsel van etheralcohol of benzol-alcohol (mengverhouding 1:1)<sup>1</sup>. Een goedkoop alternatief is aceton-alcohol (mengverhouding 1:1). Een goede methode van reinigen is om een voorraadje glaasjes te plaatsen in een kleurbakje die daar een paar uur in de aceton-alcohol mogen blijven staan (weken van onreinigheden). Vlak voordat het glaasje daadwerkelijk gebruikt wordt deze uit de vloeistof nemen en goed afvegen met bijv. pluisvrije tissues.



De schone voorwerpglaasjes even laten drogen op een warmteplaat om het laatste filmpje aceton te laten verdampen. Nu pas zijn de glaasjes schoon genoeg.

Voor het bevestigen van paraffinecoupes op voorwerpglaasjes zijn diverse methoden ontwikkeld. Een goede methode is gebruik te maken van een warmwater strekbad. Gewoon leidingwater is niet aan te raden vanwege de vele onreinheden die meegenomen worden tussen coupe en glas. Gedemineraliseerd of gedestilleerd water is beter. Het water moet op een constante temperatuur blijven tussen 35-40°C. Wanneer het water te koud is strekt met name een grote coupe zich niet goed. Water dat te warm is zal de coupe doen uitdrijven (de paraffine wordt te zacht en het weefsel begint te deformeren). Weefsel dat gefixeerd is met picrinezuur (Bouin) of trichloorazijn mag niet te lang in het warme water zwemmen omdat anders het bindweefsel in de coupe begint te zwellen<sup>1</sup>.

De coupes kunnen met bijv. een pincet op het warme water gegooid worden. Zeer belangrijk is dat de glanzende zijde van de coupe (dit is de zijde die naar het mes toe heeft geweest) op het water komt te liggen<sup>1</sup>. Dit vereist enige handigheid. De kunst is om de coupe te laten strekken zonder storende vouwen. Na een paar seconden heeft de coupe zich gestrekt en kan op een schoon voorwerpglaasje worden opgenomen. Dit opnemen moet veelvuldig geoefend worden voor een goed resultaat. Klik op onderstaande afbeelding om een filmpje te laden die het opnemen van coupes laat zien. Het kan in de mediaplayer worden afgespeeld. Na het opnemen moet het voorwerpglas met coupe goed drogen. Dit kan op een warmteplaat of droogkast bij 42-45°C gebeuren. Droogtijd is enkele uren maar langer mag en is niet schadelijk<sup>1</sup>. Een alternatief is drogen op een warme plek in bijv. een petrischaaltje of preparatenmap. Na het drogen moet de coupe aan glaszijde mat zijn. Glanzende delen wijzen op lucht dat zich tussen de paraffine en glas bevindt. De kans is groot dat de coupe bij het deparaffineren of hydrateren gedeeltelijk loslaat of zelfs helemaal van het voorwerpglas afzwemt. Bij verreweg de meeste coupes is deze methode van adhesie-lijmen afdoende voor een goed resultaat echter zijn er weefsels die snel de neiging hebben tot loslaten of weefsels die zijn gefixeerd met bijv. kaliumbichromaat houdende oplossingen kunnen ook makkelijk loslaten<sup>1</sup>. Een goede oplossing hiervoor is gebruik te maken van eiwitglycerine. In diverse literatuur is te lezen dat het eiwit op het voorwerpglas dient te worden opgebracht. Ervaringen van de auteur zijn echter minder goed omdat er snel teveel wordt aangebracht wat later bij het kleuren nadelig is. Bijvoorbeeld de kleurstof eosine heeft snel de neiging om zich aan het eiwit te hechten. Een goede beproefde methode is om een paar druppels eiwitglycerine te mengen door het warme strekwater. Zo wordt bij de opname een weinig eiwit opgenomen dat juist genoeg is om de coupe goed aan het glas te laten hechten.

Eiwitglycerine kan kant en klaar gekocht worden maar is ook goed zelf te maken. Benodigd: Een ei, glycerine en tijm (conserveermiddel). De glycerine (enkele ml hoogstens) wordt in een reageerbuis of evt. grote lepel verhit met wat tijm erbij (één of twee mespunten). Stop zodra de glycerine gaat koken. Filtreer en vang de heldere gelige of bruinige vloeistof op. Breek een ei en laat wat van het zeer vloeibare eiwit in een kopje of schaalje lopen. Absoluut geen spatje dooier en liever ook niet het taaiere eiwitdeel. Dit gaat heel gemakkelijk door het ei in een theezeeffje te doen. Het zeer vloeibare eiwit druppelt er dan doorheen. Meng nu één deel afgekoelde glycerine met drie delen eiwit en kluts dit goed door elkaar (bijv. 6 ml eiwit met 2 ml glycerine). Er zal schuim verschijnen. Filtreer het mengsel opnieuw. Het gedeelte dat er snel doorloopt is geschikt. Deze eiwitglycerine, kan een paar weken in de koelkast bewaard kan worden. Als er troebeling optreedt (even schudden) moet het worden vervangen door verse. De geur zal vrij snel onaangenaam worden (natte hondenlucht), maar dat is geen probleem.



Video van coupes strekken op warm water (youtube): <http://www.youtube.com/watch?v=cbQnZr0wx0I>

Stretching tissue in warm water.

RONALDSCHULTE 7 v060's Abonneren





*Om het preparaat te kunnen.....*

[Back](#)   [Top](#)   [Next](#)