

De wereld onder de microscoop

Home
Histologie
Materialen
Preparaten
Fotogalerij
Downloads
Links
Sitemap
Contact

Dehydrateren en inbedden in paraffine

3. Dehydrateren

Na het fixeren moet het fixatief uit het weefsel worden gespoeld. Was bij het weefsel uitnemen leidingwater of aqua dest. absoluut te vermijden, nu het weefsel gefixeerd is is dit niet meer belangrijk. In diverse literatuur is te lezen dat het spoelen net zo lang moet duren dan het fixeren. Bij de meeste fixatieven moet gespoeld worden met leidingwater maar soms, zoals bij Bouin, komt het weefsel rechtstreeks in de 70% ethanol.

Bronvermelding:

1. Theorie: Prof. Dr. Peter Böck (1989, 17., neubearbeitete auflage), *Romeis Mikroskopische Technik, München*. Verleger Urban & Schwarzenberg. Hoofdstuk 5, 'Auswaschen der Präparate' blz 114 .

Auswaschen der Präparate

Das Auswaschen der Präparate erfolgt je nach Art der Fixierung in Leitungswasser oder in Alkohol verschiedener Konzentration. Als allgemeine Regel gibt Romeis264 an, daß nach Fixierung in formol, chrom- oder osmiumhaltigen Lösungen in Leitungswasser gewaschen wird; nach Behandlung in chromfreien Sublimat- oder Trichloressigsäuregemischen in 90-96%igen Alkohol. Präparate, die für elektronenmikroskopische Untersuchungen vorbereitet werden, wäscht man in Pufferlösungen, im allgemeinen im gleichen Puffer, der schon zum Ansetzen der Fixierlösung Verwendung fand.

Für die Dauer des Auswaschens gilt als Faustregel, daß das Waschen der Präparate genauso lange wie das Fixieren dauern soll. Bei der gewöhnlichen Formalinfixierung kann man das Auswaschen beschleunigen, indem man in niedrigprozentigem Alkohol wäscht. Hat man daher zu kurz in fließendem Wasser gewaschen, setzt sich der Prozeß einfach auf die ersten Schritte der Entwässerung fort. Der Zusatz von einigen Tropfen Ammoniak zur Spülflüssigkeit beschleunigt das Auswaschens des Formols. Die Anwesenheit von Formalin kann man durch den Zusatz eines Tropfens Schiff'schen Reagens prüfen; wir haben uns bei unseren Untersuchungen darauf beschränkt, die Präparate für 24 Stunden in fließendem Leitungswasser zu waschen.

Zoals eerder beschreven moet het weefsel worden ingegoten in paraffine om het goed te kunnen snijden. Om de paraffine tot op celniveau in het weefsel te krijgen zal eerst al het water uit het weefsel gehaald moeten worden. Dit ontwateren (dehydrateren) gebeurt in een stijgende alcoholreeks. De reeks is noodzakelijk om het water geleidelijk uit het weefsel te verdrijven, gaat het te snel dan tast het de weefselstructuur aan. Er zijn vele soorten alcoholreeksen ontwikkeld die allen voldoen. De door de auteur gebruikte reeks is gebaseerd op het makkelijk te verkrijgen ethanol en isopropanol. De reeks is: 50%, 70%, 85%, 95% en 100%. Met name de absolute ethanol is vrij duur in aanschaf en is hygroscopisch. De absolute isopropanol is goedkoper en voldoet prima. Het weefsel verblijft 12 -24 uur in elk bad afhankelijk van de grootte.



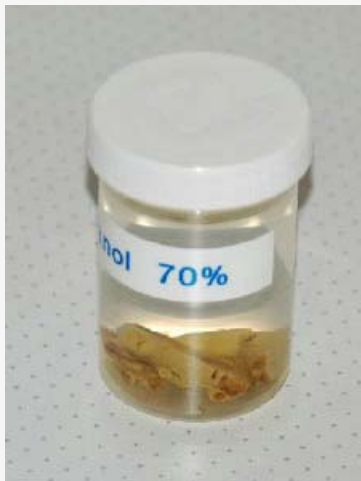
Spoelen in 70% ethanol



Spoelen in 70% ethanol. Gele wolken picrinezuur drijven uit.



Stijgende alcoholreeks ten behoeve van dehydrateren



Muizen ontwateren in 70% ethanol



Grote hoeveelheid 1 dag oude muizen ontwateren in 85% ethanol



Cassette met muis embryo in 100% isopropanol

Bronvermelding:

1. Theorie: Prof. Dr. Peter Böck (1989, 17., neubearbeitete auflage), *Romeis Mikroskopische Technik*, München. Verleger Urban & Schwarzenberg. Hoofdstuk 5, 'Paraffineinbettung' blz 121, 123 en 124.

Nadat alle water in de stap 100% isopropanol uit het weefsel is verdwenen wordt het weefsel ingegoten in paraffine. Voordat dit mogelijk is moet er nog een tussenstap (intermedium) worden gemaakt omdat isopropanol niet in paraffine wil oplossen. Deze stap kan worden gemaakt met xyleen of xylol. Er bestaan meerdere stoffen die als intermedium dienst kunnen doen zoals: aniline, benzol, chloroform, isobutylalcohol (butanol), tetraline, toluol, trichloorethyleen, xylol et cetera¹. Al deze stoffen lossen zowel in isopropanol als in paraffine op. Op de linkpagina zijn bedrijven genoemd waar de stoffen kunnen worden besteld. Het weefsel moet voor kleine stukjes 12 uur en grotere stukken 24 uur in de xyleen verblijven. De stukken weefsel zullen na deze stap er wat glazig uit zien (dit is normaal). Na de intermediumstap volgt een stap met een verwarmde oplossing van 50% xyleen en 50% paraffine. Deze stap moet voor kleine stukjes 24 uur en grotere stukken 48 uur duren.

Paraffine zijn mengsels van verzadigde koolwaterstoffen met de algemene formule C_nH_{n+2} . Voor routine Histologie gebruikt men paraffine met een smeltpunt tussen de 56-58°C. Moderne "Paraffine voor de Histologie" bevat verschillende plastische polymeren die de snijbaarheid verbeteren en een hoog indringingsvermogen bezitten¹. De auteur werkt veel met "Paraplast plus". Perfect snijbaar met een hoog indringingsvermogen echter mag niet boven de 62°C worden verwarmd. Al het water is nu bijna uit het weefsel verdwenen. Het laatste restje xyleen wordt verwijderd in 2 paraplast-stappen. De bekervullen en langzaam verwarmen totdat de paraffine net is gesmolten (let op dat paraplast niet boven de 62°C komt). In de eerste stap verblijft het weefsel 24 uur voor kleine stukjes en 48 uur voor grotere stukken. Aan het eind van deze stap zal er boven de warme paraplast een lichte geur van xyleen waar te nemen zijn. De weefsels komen nu in de tweede beker schone paraplast voor wederom 24 of 48 uur. Aan het eind van deze stap mag geen geur van xyleen meer waar te nemen zijn. Bij twijfel mag nog een nieuwe stap



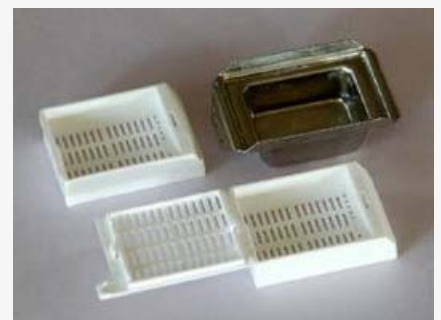
50% xyleen en 50% paraplast op warmteplaat

met schone paraplast genomen worden. Een langer verblijf van weefsel in warme paraplast heeft geen schadelijke gevolgen¹. Een slechte snijbaarheid op het microtoom is veelvuldig te wijten aan een slechte doordringing met paraplast wat vaak een gevolg is van een niet volledige ontwatering¹.



4. Inbedden in paraffine

De weefsels zijn nu gereed om te worden uitgegoten tot blokken. Een ouderwetse, maar nog steeds veelvuldig toegepaste methode is het gieten in een ring aluminium waarna het blok met een warm mes op een blokje hout wordt geplakt. Op deze site zal slechts gebruik worden gemaakt van roestvaststalen gietvormen waar de cassettes zoals hiervoor beschreven precies op passen. omdat paraffine snel stolt moeten alle materialen voor gebruik gereed liggen. Het in te gieten weefsel kan het best in een warm horlogeglas klaar worden gelegd. De gietmal wordt geplaatst op een plaat staal. Dit om de paraplast snel te laten afkoelen. Giet een laagje paraplast in de mal. Positioneer snel het weefsel in de al stollende paraplast. Er is hier slechts een paar seconden tijd om uit te richten. Een warm pincet kan hier voordelig zijn. De mal wordt gevuld met vloeibare paraplast tot aan de eerste rand. De cassette op de mal plaatsen en volgieten met paraplast. Al snel zal de paraplast beginnen te stollen. Breng bij voorkeur de warme mal in een koude omgeving (koelkast). Hoe sneller de paraplast afkoelt hoe kleiner de paraffine-kristallen zijn, wat de snijbaarheid ten goede komt.





Paraplast krimpt vrij sterk.....

[Back](#) [Top](#) [Next](#)