

Pflichtqualifikationseinheit lfd. Nr. 11.2

„Durchführen diagnostischer Arbeiten I, histologische Arbeiten“

Laut Ausbildungsrahmenplan zu vermittelnde Fertigkeiten und Kenntnisse:

- a) Gewebe und Gewebeproben von Organismen entnehmen, fixieren und einbetten
- b) Gewebeschnitte herstellen, färben und eindecken
- c) Histologische Präparate mikroskopieren und identifizieren
- d) Objekte in histologischen Präparaten mikroskopisch vermessen

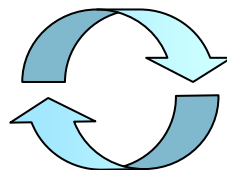
Beispiele für eine betriebliche Umsetzung

Die folgenden Versuche sind Beispiele für die Umsetzung der Pflichtqualifikationseinheit Nr. 11.2 mit pflanzlichem Material (Quelle: www.histonet.de, 1.07.05, Adresse nicht mehr gültig)

- Herstellen von Handschnitten aus pflanzlichem Gewebe
- Astrablau-Safranin-Färbung
- FSA-Sudan-Färbung nach Etzold

Betrieb

Ausbildungsrahmenplan
Nr. 11.2



Berufsschule

Rahmenlehrplan Lernfeld 8

I. Herstellen von Handschnitten mit pflanzlichem Gewebe

1. Prinzip:

Um pflanzliche Zellverbände in ihrem Zusammenhang mikroskopisch untersuchen zu können, ist es nötig, Schnitte von ca. 20 bis 30 µm Dicke herzustellen. Da diese Objekte oft zu weich sind, muss man sich Hilfsmitteln bedienen.

Im Praktikum wenden wir die Handschneidetechnik an.

Die Objekte werden zwischen Holundermark oder Styropor[®] zur Stabilisierung eingeklemmt. Holundermark ist der Vorzug zu geben, da er die Klingen besser schont. Dabei ist zu beachten, dass wir Pflanzenmaterial und nicht die Hilfsmittel untersuchen wollen, diese also nur so dick wählen, wie es nötig ist, damit sie ihren Zweck erfüllen.

Es gibt Handmikrotome, bei denen man die gewünschte Schnittdicke exakt einstellen kann.

2. Material:

Holundermark oder Styropor[®]
Blätter und Stengel (eingelegt in Ethanol-Glycerin-Gemisch)
Rasierklingen
Klebefolie (Tesa[®])
Blockschälchen mit Wasser
Pinsel
Mikroskop
Objektträger, Deckgläser
Zeichenmaterial

3. Anfertigen von Blattquerschnitten:

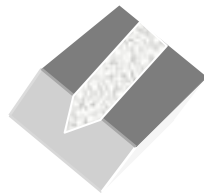
- Zwischen zwei Hälften Holundermark oder Styropor[®] klemmt man vorsichtig ein Blatt, ohne es zu zerquetschen. (Wie eine Salamischeibe zwischen zwei Brotscheiben) Bei der Wahl des Blattstückes darauf achten, dass keine großen Blattrippen dabei sind.
- Mit einer Rasierklinge, bei der eine Schneide mit Klebefolie abgeklebt ist, damit man sich nicht schneidet, wird vorsichtig ein ganz flacher Keil des Gewebes geschnitten. Dabei schneidet man Blatt und Hilfsmittel. Die ganze Klingenslänge benutzen!
- Die Klinge durch das Objekt ziehen, nicht drücken, da sonst die Schnitte nicht gelingen!
- Die Schnitte werden mit einem Pinsel abgenommen und in einem Blockschälchen mit Wasser eingebracht.
- Stellen sie zunächst ca. 10 bis 20 Schnitte her und untersuchen Sie diese mikroskopisch.
- Dazu werden die Schnitte mit einem Pinsel auf ein Objektträger gebracht. Die Schnitte müssen dazu in einem kleinen Wassertropfen feucht bleiben.

4. Anfertigen von Spross- und Wurzelquerschnitten:

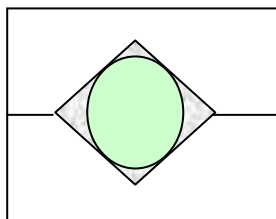
- Bei runden Objekten stellt man sich zunächst ein rechteckiges Styropor[®]-Stück mit ca. 1 cm Kantenlänge her und spaltet es der Länge nach.



- Dann wird eine Kerbe geschnitten, in die das Objekt hineinpasst, ohne zu wackeln.



- Zwischen die zwei Hälften wird das Objekt eingeklemmt und auf die gleiche Länge geschnitten wie das Styropor[®]-Stück.



Ansicht von oben

- Dann werden Schnitte durch den gesamten Querschnitt des Objektes angefertigt. Man schneidet Styropor[®] und Objekt gleichermaßen.

5. Zu verwendende Pflanzen:

Blattquerschnitte:

- Flieder (*Syringa vulgaris*), Stechpalme (*Ilex aquifolia*) oder Liguster.

Sprossquerschnitte:

- Kriechender Hahnenfuß (*Ranunculus repens*) – dikotyle Pflanze
- Weißwurz (*Polygonatum multiflorum*) – monokotyle Pflanze
- Tannenholz (Streichholz) zur Darstellung von Tracheen

Wurzelquerschnitte:

- Küchenzwiebel, Hyazinthe oder Saubohne

6. Protokoll:

Zeichnungen auf DIN-A-4-Blättern, ca. 5 cm bis 7 cm Größe

1. Blattquerschnitt, nativ
2. Sprossquerschnitte monokotyl und dikotyl, gefärbt
Dikotyles Leitbündel, gefärbt
3. Tracheen und Wurzelquerschnitt

Alle Zeichnungen müssen enthalten:

- Name
- Datum
- Biologisches Objekt
- Präparateform (nativ, Färbung, Eindeckmittel bei Dauerpräparaten)
- Beschriftung
- Größenangaben

Bei den nachfolgenden Versuchen wird mit Gefahrstoffen gearbeitet.



Erstellen Sie erst Sicherheitsdatenblätter, bevor Sie mit den Färbungen beginnen und beachten Sie die Hinweise.

II. Astrablau-Safranin-Färbung

1. Prinzip:

Zur besseren optischen Abgrenzung von Geweben oder Zellbestandteilen macht man sich die Eigenschaft verschiedener Zellstrukturen zunutze, bestimmte Farbstoffe unterschiedlich stark anzulagern. Dadurch können bestimmte Gewebetypen voneinander unterschieden werden.

2. Färbereagenzien:

Astrablau-Lösung: 0,5 g Astrablau FM ad 100 mL wässriger Weinsäurelösung (β (Weinsäure) = 20 g/L)

Safranin-Lösung: β (Safranin, aq.) = 1 g/100 mL

Ethanol: δ (Ethanol, aq.) = 0,7

Ethanol: δ (Ethanol, aq.) = 0,96

Propanol-2: δ (Propanol-2) = 1

Salzsäure-Ethanol: 0,5 mL Salzsäurelsg. w(HCl) = 0,36 ad 100 mL Ethanol δ (Ethanol, aq.) = 0,7

Xylol oder Rotihistol[®]

Histokitt[®]

Erstellen Sie Sicherheitsdatenblätter, bevor Sie mit den Versuchen beginnen und beachten Sie die Hinweise!

3. Material:

Blockschälchen zur Färbung

Pinsel

Objektträger

Deckgläser 24 mm * 36 mm

Etiketten

| 4. Färbevorschrift: | Zeiten: | Vorgang: |
|----------------------------------|-----------------|--|
| • Astrablau-Lösung | 3 min | } FÄRBen |
| • Aqua demin. | 5 min | |
| • Safranin-Lösung | 10 min | |
| • Aqua demin. | kurz abspülen | |
| • δ (Ethanol, aq.) = 0,7 | 3 min | ⇒ mikroskopische Kontrolle |
| • Salzsäure-Ethanol | ggf. 5 bis 10 s | DIFFERENZIEREN |
| • δ (Ethanol, aq.) = 0,96 | 3 min | ⇒ mikroskopische Kontrolle |
| • Propanol-2 | 5 min | } ENTWÄSSERN |
| • Propanol-2 | 5 min | |
| • Propanol-2 | 5 min | |
| • Xylol oder Rotihistol® | 5 min | } ENTSPRITEN |
| • Xylol oder Rotihistol® | 5 min | |
| • Eindecken in Histokitt® | | |

** auswaschen überschüssiger Färbelösung bis zum Erreichen des besten Ergebnisses*

5. Eindeckvorschrift:

- Auf einen sauberen Objektträger mit Glasstab 1 gtt (gutta, der Tropfen) Histokitt® geben
- Xylolfeuchten Schnitt mit einem Pinsel in den Tropfen legen
- Mit einem Deckglas abdecken
- Waagrecht staubfrei lagern bis das Histokitt® ausgehärtet ist (über Nacht)
- Etikettieren und ZEICHNEN!

6. Färbeergebnis:

blaue Zellen: Lebende Zellen, Grundgewebe

rote Zellen: Tote Zellen, Stützgewebe, Sklerenchym

7. Entsorgung:

Organische Lösemittel Lösemittelabfälle, Rasierklingen in scharfkantige Abfälle

III. FSA-Sudan- Färbung nach Etzold

1. Färbereagenzien Stammlösungen:

| | | | |
|-------------------|--------------------|---|--------------|
| Astrablau-Lösung: | β (Astrablau, aq.) | = | 2 g / 100 mL |
| Safranin-Lösung: | β (Safranin, aq.) | = | 2 g / 100 mL |
| Fuchsin-Lösung: | β (Fuchsin, aq.) | = | 2 g / 100 mL |

Erstellen Sie erst Sicherheitsdatenblätter, bevor Sie mit der Arbeit beginnen und beachten Sie die Hinweise!

Fuchsin muss, wenn es nicht in gelöster Form vorliegt, im heißen Wasserbad gelöst und dann kalt filtriert werden. Fuchsin ist kanzerogen, deshalb sollte nicht mit der Pulverform gearbeitet werden.

Fuchsin ist kanzerogen

2. Gebrauchslösungen:

- Gemisch im Wasserbad unter kurzem Aufkochen lösen.
- Kalt filtrieren
- Gleiches Volumen Glycerin zusetzen.
- Färbelösung ist in Glasflaschen unbegrenzt haltbar.

FSA-Lösung: 100 mL Aqua demin.
+ 2 mL Essigsäure, w(Essigsäure) = 0,99
+ 10 mL Astrablaustammlösung
+ 2 mL Safraninstammlösung
+ 0,5 mL Fuchsinammlösung

Sudangelb-Lösung: β (Sudangelb, in Propanol-2) = 0,8 g/100 mL

3. Färbevorschrift:

- Schnitt in Hohlsliffobjektträger in 100 µL Aqua demin. legen.
- 100 µL Sudan-Färbelösung zugeben
- Mit Deckglas abdecken und in einer Petrischale in der Mikrowelle für 10s bei voller Leistung und dann ca. 1 Minute bei 150 Watt erhitzen
- Färbelösung mit Filterpapier absaugen und durch Aqua demin. ersetzen
- Schnitt 2 bis 4 min in FSA-Färbelösung (im Blockschälchen) unter Schwenken färben
- Präparat feucht untersuchen.

Ggf. kann ein Dauerpräparat in Phytohistol angefertigt werden.

- Präparat auf einem Objektträger mit einem Tropfen Phytohistol einbringen.
- Mit einem Deckglas abdecken.
- 1 bis 2 Wochen im nicht evakuierten Exsikkator über Trocknungsmittel trocknen.
- Dann mit Deckglaslack oder Histokitt[®] umranden, um Austrocknung zu verhindern.

4. Entsorgung:

Siehe Vorversuch