

VOORSCHRIFTEN:

Laboratorium voor

ELECTRONEN MICROSCOPIE

=====

- 1 = Het uitnemen van weefsels voor E.M. fixatie
- 2 = Fixatieven voor electronen microscopie
- 3 = Dehydreren en inbedden na fixatie met OsO_4
- 4 = Fixatie met Glutaaraldehyde + Paraformaldehyde vlg's Karnovsky
- 5 = Als het materiaal gedehydrerd, ingebed en gepolymeriseerd is
- 6 = PASM kleur techniek voor E.M.

Het uitnemen van weefsels voor E.M. fixatie

Het weefsel moet vers zijn.

d.w.z. niet later dan ca 3 minuten na het afsluiten van de bloedtoevoer moet het weefsel gefixeerd worden.

Als dit toch langer duurt dient men er rekening mee te houden dat er structuur veranderingen optreden, die bij het beoordelen van de coupes met het electronen microscoop een onjuist beeld kunnen geven.

Op een strookje dun karton brengt men een schone pasteurse pipet een druppeltje fixatief.

Hier wordt het stukje weefsel in opgevangen.

Met een vetvrij en scherp scheermesje snijdt men het weefsel eerst in dunne reepjes en daarna in blokjes van maximaal 1x1x1 mm (ca 20 blokjes)

Breng deze stukjes zo snel mogelijk in het fixatief.

Fixatieven voor electronen microscopie

OsO_4 fixatief wordt in het algemeen alleen gebruikt voor het behandelen van weefsels die na het uitnemen en fixeren onmiddellijk afgewerkt kunnen worden.

Het is nl. bij deze methode zeer belangrijk dat alle handelingen niet langer duren dan de daarvoor aangegeven tijd.

Is dit door bepaalde omstandigheden niet mogelijk, verdient het aanbeveling om in overleg met de afdeling E.M., een ander fixatief te nemen.

Osmium-tetraoxide vlgs Millonig

Een ampul met 100 mg OsO_4 wordt schoongemaakt met bichromaat-zwavelzuur en daarna goed gespoeld met aq.bidest.

Raak de ampul niet meer aan met de vingers.

Gebruik hiervoor een schoon en vetvrij pincet!

Kras de ampul, op een schone onderlaag, aan met een capsule-zaagje.

Spoel het glaspoeder weg met aq.bidest, en breng de ampul in een goed afsluitbaar flesje.

Pipetteer in dit flesje:

7,4 ml	NaH_2PO_4	2,56%
1,6 ml	NaOH	2,52%
1,0 ml	glucose	5,40%

Sluit het flesje goed af en schud tot de ampul gebroken is.

Laat de oplossing minimaal 12 uur bij $+4^\circ\text{C}$ staan, voordat men deze gebruikt, zodat alle OsO_4 volledig is opgelost.

De fixatie tijd is 1 à $1\frac{1}{2}$ uur bij $+4^\circ\text{C}$.

Dehydreren en inbedden na fixatie met OsO_4

=====

Nadat de blokjes weefsel 1 à 1½ uur bij $+4^\circ\text{C}$ gefixeerd zijn, wordt het weefsel gedehydrerd in de volgende alcohol reeks:

2 x	1	minuut	in alcohol	50%	bij $+4^\circ\text{C}$	
2 x	5	"	"	70%	"	*
	5	"	"	80%	"	"
	5	"	"	90%	"	"
	30	"	"		absoluut, en hierin op kamertemperatuur laten komen.	
2 x	15	"	"		absoluut bij kamertemperatuur.	

* Het weefsel kan in de alcohol 70% maximaal 24 uur blijven staan.

Tijdens het dehydreren moet de Epon (inbedmedium) zeer goed gemengd worden.

Dit mengsel bestaat uit:

	16	delen	Epikote 812
	10	"	Dodeceny Succinic Anhydride (DDSA)
	9	"	Methylnadic Anhydride (MNA)

Na de laatste keer alcohol absoluut blijven de weefsel stukjes gedurende 1 uur staan in een 1:1 mengsel van Epon en Propyleen Oxide. Aan de rest van de Epon wordt nu per 20 ml, 0,3 ml DMP 30 (accelerator) toegevoegd, en weer zeer goed gemengd.

Na 1 uur in Epon + Propyleen Oxide, blijft het nog een uur staan in het Epon DMP 30 mengsel. In beide gevallen bij voorkeur onder voortdurende beweging (schudmachine).

Het weefsel is nu zo ver dat het kan worden ingesloten in Epon + DMP 30. Dit gebeurt in Lilly gelatine capsules no. 3.

Een weefsel blokje wordt op de bodem van een gelatine capsule gelegd, deze wordt gevuld met het inbedmedium en voorzien van een administratienummer.

Het geheel wordt weggezet bij 60°C om gedurende minstens 24 uur te polymeriseren.

Fixatie met Glutaar Aldehyde + Paraformaldehyde vlgs Karnovsky
=====

Deze methode heeft als voordeel dat de fixatietijd aanzienlijk meer speling biedt dan met OsO_4 .

Dit kan variëren tussen 2- en 5 uur bij kamertemperatuur, hierna kan het bij $+4^\circ\text{C}$ enige dagen blijven staan.

Dit laatste echter alleen indien niet anders mogelijk.

Het fixatief bestaat uit:

2 g Paraformaldehyde, onder goed roeren en verwarming tot 60 à 70°C , oplossen in 25 ml aq.bidest.

Als alle stof opgelost is hebben we een melkwitte vloeistof, die na toevoegen van 1-3 druppels 1n NaOH, onder roeren zonder verwarming, helder wordt.

Na afkoelen wordt aan deze oplossing 10 ml Glutaar aldehyde 25% toegevoegd.

De Glutaar aldehyde wordt van te voren ontdaan van eventueel in de oplossing ontstaan glutaarzuur, door toevoeging van BaCO_3 , en dit geheel weer te filtreren.

De Paraformaldehyde + Glutaaraldehyde oplossing wordt tot 50 ml aangevuld met 0,2 M fosfaatbuffer (pH 7,4 - 7,6)

De weefselblokjes worden na het fixeren enige uren gewassen in 0,1 M fosfaatbuffer bij $+4^\circ\text{C}$.

Na het spoelen moet het weefsel worden nagefixeerd met de OsO_4 oplossing vlgs Millonig gedurende 1 à 2 uur.

De behandeling is verder identiek aan die van de OsO_4 fixatie.

Als het Materiaal gedehydriseerd, ingebed en gepolymeriseerd is
 =====

Na polymeriseren kan het materiaal op het ultra microtoom gesneden worden.

Om zeker te zijn of de coupes die cellen bevatten, die we later in het electronen microscoop willen zien, wordt eerst een dikke coupe (0,5 μ) gesneden en gekleurd met toluidine blauw.

Als dit het geval is, worden een aantal ultra dunne coupes gesneden (200 - 400 \AA) en opgevangen op kopergaasjes (grids)

Deze coupes worden gedurende 20 minuten gekleurd in een verzadigde oplossing van Uranylacetaat (6 g/ 100 ml) welke voor gebruik gecentrifugeerd wordt. (10 min. 2000 rpm)

Na deze kleuring moet zeer zorgvuldig worden gespoeld met CO_2 - vrije aq.bidest.

Na het drogen van de coupes wordt in een petrieschaal met NaOH pellets 10 minuten gekleurd in een loodhydroxide oplossing vlgs Millonig.

Dit bestaat uit:

1 g KNatartraat
 20 g NaOH
 50 ml aq.bidest

Dit kan bij $+4^{\circ}\text{C}$ gedurende lange tijd worden bewaard. (stockopl.)

Voor de eigenlijke kleuroplossing wordt 5 ml 20% loodacetaat gemaakt, waar men 1 ml van de stockoplossing bij pipetteerd.

Het neerslag dat ontstaat wordt 5 à 10 x verdund met aq.bidest en gefiltreerd door een glazen IG5 kroes.

Deze oplossing is, mits in een goed gesloten fles en bij $+4^{\circ}\text{C}$, enige weken houdbaar.

Voor het gebruik moet deze oplossing 10 minuten bij 2000 rpm gecentrifugeerd worden.

Ook na deze kleuring is het van groot belang dat er zorgvuldig met CO_2 vrije aq.bidest gespoeld wordt.

De preparaten kunnen nu met behulp van het opdampapparaat van een koolvlies worden voorzien, om het weefsel tegen verbranding door de electronenbundel, te beschermen.

Na deze behandelingen is het materiaal zo ver dat het kan worden bekeken in het electronen microscoop.

PASM kleur techniek voor E.M.

====

Doel: aantonen van basale membranen.

Het is noodzakelijk dat het weefsel met OsO₄ gefixeerd wordt.

De zilver oplossing zal nl. ook reageren met de aldehyde groepen die in het weefsel achter blijven na een fixatie met paraformaldehyde of glutaraaldehyde houdende fixatieven.

De te gebruiken coupes zijn ca 800 Å dik.

De coupes worden eerst gedurende 30 minuten geoxydeerd met een 1% perjood-zuur oplossing. (free floating in een petrischaal)

Vervolgens enige uren spoelen in aqua bidest.

Na het spoelen worden de coupes gekleurd bij 60°C in een zilver oplossing bevattende:

50 ml 3% Hexamethyleentetramine
3 ml 5% Borax
2 ml 10% AgNO₃

Alle stoffen worden opgelost in aqua bidest en op bovenstaande volgorde bij elkaar gevoegd.

Aangezien een juiste kleurtijd niet aan te geven is, moeten de coupes regelmatig gecontroleerd worden op hun kleur.

Is de kleur van de coupes goud-bruin dan mag men aannemen dat de kleuring ver genoeg is.

Hierna + 30 minuten spoelen in aqua bidest en de coupes op grids brengen.

Het komt wel voor dat zich over het preparaat een storende, diffuse zilver massa heeft afgezet.

Deze laag is met de in de fotografie gebruikelijke fixeër (b.v. Tetanal-Superfix) te verwijderen.

Dit moet echter wel kort gebeuren.

Niet langer dan + 10 sec. in deze oplossing.

Vervolgens goed spoelen met bidest, drogen en opdampen met koolstof.