

» Verschiedene Techniken sind notwendig, um unsere Objekte für die Mikroskopie zu präparieren. »

FIXIERUNG DER PROBEN

Frische Proben können fixiert werden um ihre Struktur und Elementverteilung bestmöglich zu erhalten. Für Licht- und Elektronenmikroskopie gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Standardmethode ist die chemische Fixierung. Dabei haben sich Aldehyde (wie Paraformaldehyd und Glutaraldehyd) in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen als am wirkungsvollsten erwiesen. Die chemische Fixierung geht aber langsam vor sich und lässt den Zellen Zeit zu Veränderungen. Daher hat sich in neuerer Zeit eine weitere Methode etabliert, die Gefrierfixierung.

TROCKNUNG DER PROBEN

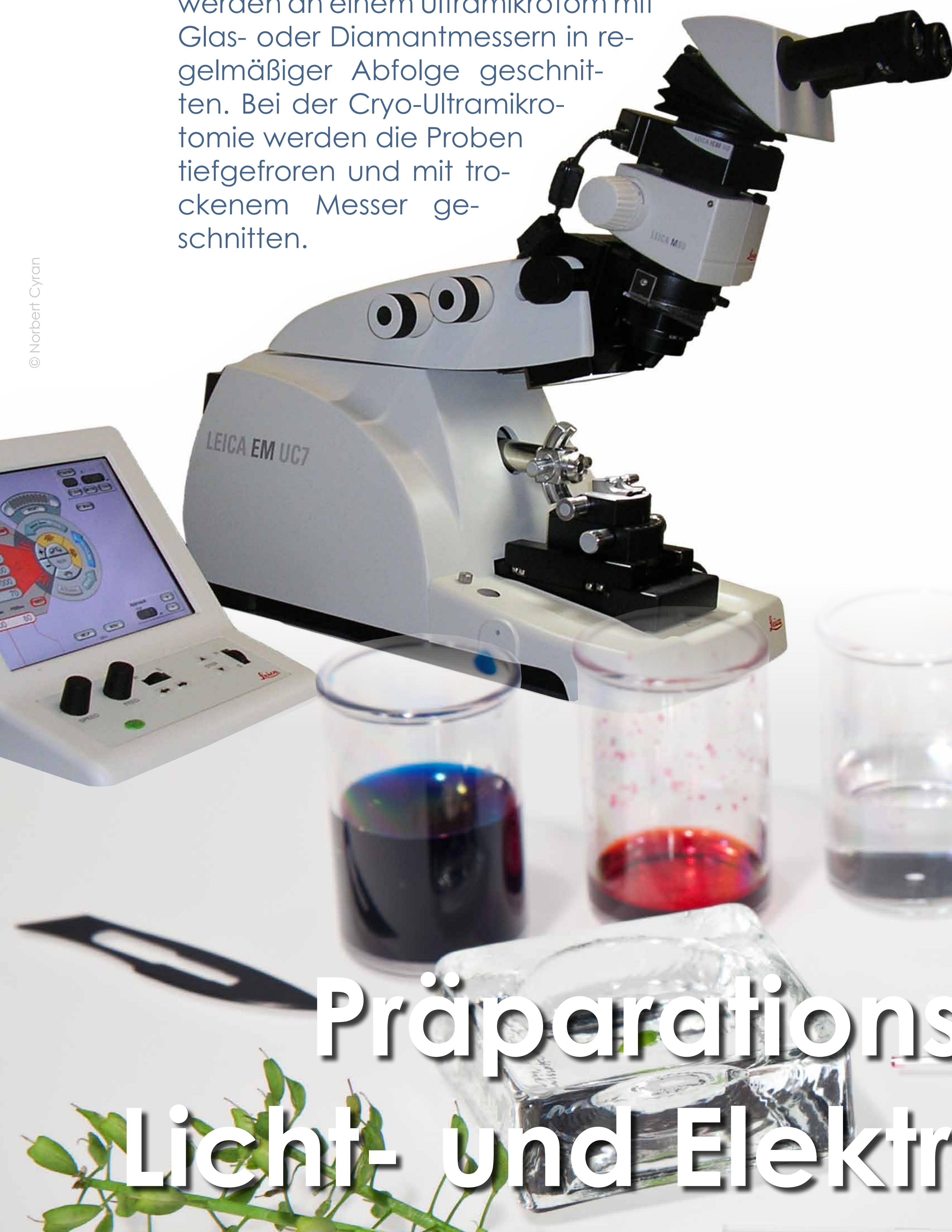
Besonders in der Elektronenmikroskopie ist die Trocknung der Proben von großer Wichtigkeit, da der Elektronenstrahl nur im Hochvakuum auf die Proben beschleunigt werden kann und das Wasser dabei im Mikroskop verdampfen würde. Eine sehr gute Strukturhaltung erzielt die Kritisch-Punkt-Trocknung, wobei durch Umgehung des Kritischen Punktes zwischen gasförmiger, fester und flüssiger Phase Oberflächenspannungen während des Trocknens vermieden werden.

EINBETTUNG DER PROBEN

Bevor Schnitte für das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) hergestellt werden können, müssen die Proben entwässert und in Kunstharz eingebettet werden.

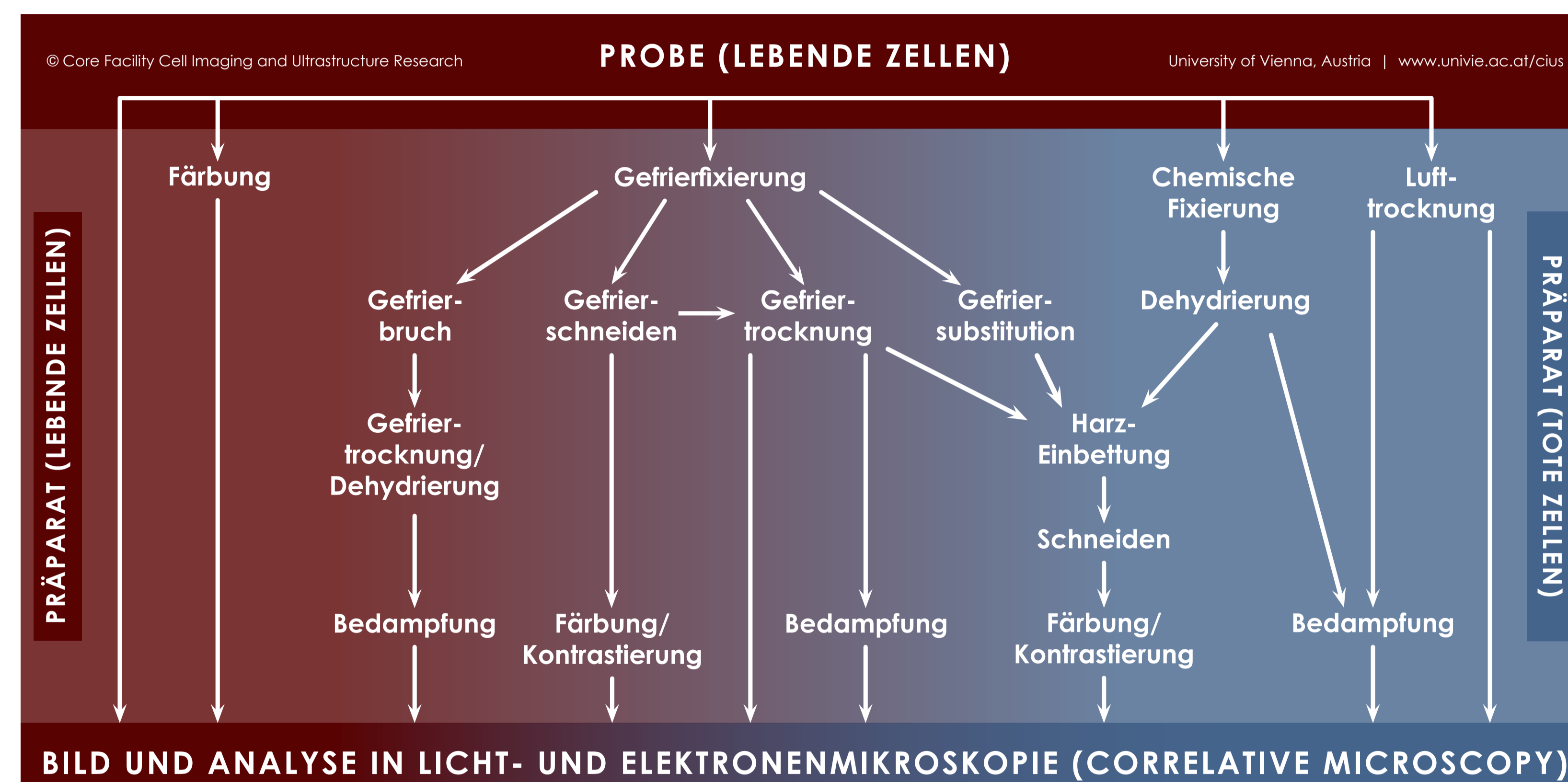
ULTRAMIKROTOMIE

Ultradünne Schnitte von 50 – 100 nm Schnittstärke sind notwendig, um ein Bild davon im TEM zu erzeugen. Sie werden an einem Ultramikrotom mit Glas- oder Diamantmessern in regelmäßiger Abfolge geschnitten. Bei der Cryo-Ultramikrotomie werden die Proben tiefgefroren und mit trockenem Messer geschnitten.



BESCHICHTUNG VON PROBEN

Besonders in der Raster-Elektronenmikroskopie, wo Oberflächen abgebildet werden, ist es wichtig, eine leitende Schicht aufzutragen; sie leitet Elektronen ab und verhindert Aufladung der Proben im Mikroskop. Für beste Auflösung der Bildgebung wird mit Gold beschichtet. Bestmögliche Analyse der Elemente wird durch Kohlebedampfung erreicht.

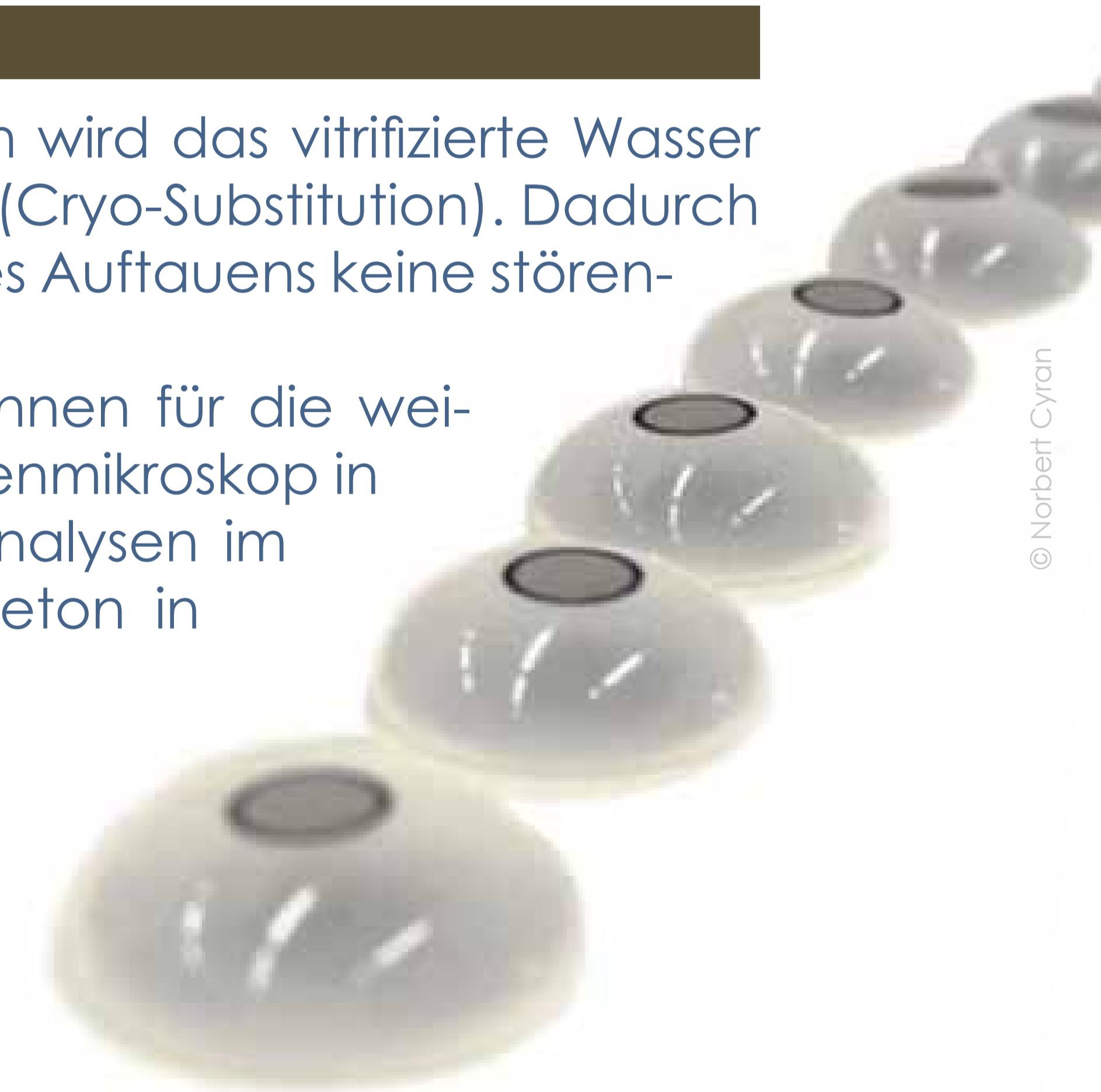


GEFRIER-FIXIERUNG

Alternativ zu chemischer Fixierung können Proben bei -180°C kryofixiert werden. Dazu wird Gewebe entweder in flüssiges Propan getaucht (Plunge Freezing) oder es wird flüssiger Stickstoff mit möglichst hohem Druck auf die Probe geschossen (High Pressure Freezing). Je schneller die Probe einfriert, desto geringer ist die Gefahr, dass sich störende Eiskristalle im Gewebe bilden.

GEFRIER-SUBSTITUTION

In den tiefgefrorenen Proben wird das vitrifizierte Wasser durch Aceton ausgetauscht (Cryo-Substitution). Dadurch bilden sich auch während des Auftauens keine störenden Eiskristalle. Die substituierten Proben können für die weitere Bearbeitung im Elektronenmikroskop in Harz eingebettet oder für Analysen im Lichtmikroskop aus dem Aceton in Wasser überführt werden.



Präparationsmethoden für Licht- und Elektronenmikroskopie

© Norbert Cyran

© Norbert Cyran

© Gregor Eder