

Mit dieser Dokumentation soll die Herstellung eines Histologiepräparates vom Regenwurm gezeigt werden.

Allgemeines zum Regenwurm:

Regenwürmer haben keine Nase und keine Lunge. Sie atmen über ihre Haut. Das funktioniert aber nur, wenn die Haut feucht ist. Deshalb fühlen sich Regenwürmer immer ein bisschen schleimig an. An der Schleimschicht bleibt der Sauerstoff sozusagen hängen. Man sagt auch: Er wird dort gebunden. Dann dringt der Sauerstoff durch die Haut in den Körper und wird durch sehr feine Adern überall verteilt.

Vorbereitung:

Der Darm des gefangenen Regenwurms enthält in der Regel Erde. Da Erde nicht schneidbar ist muss dafür gesorgt werden, dass der Regenwurm die im Darm vorhandene Erde ausscheidet. Das Messer des Mikrotoms kann sonst beschädigt werden. Dazu gibt man in ein Becherglas angefeuchtete Papierschnitzel (z.B. Filterpapier, Tempotaschentücher) und legt den Regenwurm für eine Woche in dieses Becherglas. Der Regenwurm frisst das Papier und scheidet die Erde mit dem Kot aus. Das Becherglas wird mit einem Uhrglas abgedeckt. Die Sauerstoffzufuhr erfolgt durch die offen bleibende Ausgießöffnung.

Tötung:

Der Regenwurm wird für 30 Minuten in 10%-Ethanol mit etwas Chloroform gelegt (laut Kükenthal).

Der Regenwurm wird in 10mm große Stücke zerlegt.

Fixierung:

Die Stücke für 2 Tage in 10% Formalin legen.

Danach wird das Fixiermittel mit Aqua dest. ausgewaschen.

3 mal wechseln und für je 2 Stunden in Aqua dest. belassen.

Entwässern:

Vor dem Einbetten in Paraffin muss das Präparat entwässert werden. Dies erfolgt über 30%-, 50%-, 70%-, 85%- und 96%-Ethanol. Anschließend noch in 100% Isopropanol überführt. Das Präparat bleibt für je 12 Stunden in jedem Bad. Schlappdeckelgläser 10ml verwenden.

Zum Schluss wird das Präparat in PARAFEX S (einem Xylol-Ersatz von CHEMLAB) bei 50°C im Wärmeschrank für 12 Stunden gelegt.

Regenwurm / Lumbricus terrestris Herstellung eines Histologiepräparates

Infiltrieren und Gießen muss an einem Tag durchgeführt werden. Am Vortag ist alles für den Einsatz des Wärmeschrankes vorzubereiten. Am frühen Morgen wird der Wärmeschrank eingeschaltet und benötigt ca. 1,5 Stunden um die Temperatur zu erreichen. Es entsteht so ein 14 Stunden Arbeitstag. Die Temperatur ist regelmäßig, ca. jede Stunde zu kontrollieren.

Infiltrieren:

Es wird eine warme Mischung (max. 58°C im Wärmeschrank) von Paraplast und Parafex S im Verhältnis 1:1 erstellt. Das Präparat wird darin eingelegt und verbleibt dort für 5 Stunden.

Anschließend kommt das Präparat in reines flüssiges Paraplast (ca. 58°C im Wärmeschrank) für 7 Stunden.

Gießen des Blockes:

Ich bastel mir aus Alu-Folie eine Form für einen Block von 20x20x20mm Kantenlänge als Gussform. Die Innenseiten bestreiche ich mit Glycerin.

Ich schmelze Paraplast im Wärmeschrank (max. 58°C). Das flüssige Paraplast wird in die Form gegossen und das warme Präparat in die Mitte des Blockes gestellt. Vorgewärmte Pinzette benutzen. Das alles muss schnell gehen weil das Paraplast schnell fest wird. Man bläst auf die Oberfläche des Paraplast, bis sich eine dicke Haut bildet. Anschließend wird die Form in kaltes Wasser getaucht, bis das Paraplast vollständig erstarrt ist.

Schnitte herstellen:

Von dem erstarrten und abgekühlten Paraplastblock wird die Alu-Folie vorsichtig entfernt und der Block mit einem Messer, passend für den Schraubstock des Mikrotoms, zurechtgeschnitten. Mit dem Mikrotom erstelle ich möglichst dünne Schnitte. Mir gelingen, mit meinen Möglichkeiten, Schnitte mit einer Dicke von 20µm und dicker. Durch anfeuchten der Schnittfläche besteht die Möglichkeit ein zu starkes Aufrollen der Schnitte zu verhindern. Mit einer Pinzette und einem Schnitffänger werden die Schnitte in ein Bad, bestehend aus 9 Teilen Wasser und 1 Teil 96%igem Ethanol gelegt. Dadurch kann sich ein zusammen gerollter Schnitt wieder strecken.

Objektträger bestücken:

Mit gründlich gereinigten Objektträgern werden die Schnitte, einer nach dem andern, aus dem Bad herausgefischt und auf dem Objektträger platziert.

Entfernen des Paraplasts:

Die Objektträger mit den Schnitten werden in eine Petrischale mit Parafex S gelegt und für eine Stunde bei max 58°C erwärmt. Dadurch löst sich das Paraplast, welches sich an dem Schnitt befindet, auf.

Regenwurm / Lumbricus terrestris Herstellung eines Histologiepräparates

Absteigende Alkoholreihe:

Das Parafex S wird aus der Petrischale abgesaugt und der Objektträger mit dem Schnitt nach und nach einer absteigenden Alkoholreihe ausgesetzt. Beginn mit 100% Isopropanol und danach 96%-, 85%-, 70%-, 50%-, 30%-Ethanol für jeweils 0,5 Stunden. Zum Schluss wird der restliche Alkohol durch dest. Wasser ersetzt.

Färben der Schnitte:

Ich habe die Möglichkeit eine Kernechtkombinationsfärbung durchzuführen. Dazu wird das dest. Wasser aus der Petrischale gesaugt und der Farbstoff für ca. 15 Minuten auf den Schnitt gegeben. Danach wird der Farbstoff abgesaugt und dreimal mit dest. Wasser gespült. Nach einer ersten Kontrolle des Färbeergebnisses kann eventuell mit 70%-Ethanol differenziert werden. Zum Schluss wieder mit dest. Wasser spülen.

Eindecken des Schnittes:

Der Schnitt wird nun für 30 Sekunden 100%-Isopropanol ausgesetzt. Das Isopropanol wird wieder abgesaugt und 3 Minuten 100%-Isopropanol erneut aufgebracht, wieder abgesaugt und für 5 Minuten 100%-Isopropanol aufgebracht und wieder abgesaugt. Danach wird mit einem Glasstab ein Tropfen Euparal auf den Schnitt gegeben und mit einem Deckglas eingedeckt. Der Objektträger mit dem Schnitt wird aus der Petrischale entnommen und auf eine Wärmebank (ca. 40 °C) gelegt, wobei das Deckglas mit einer M8-Mutter beschwert wird.

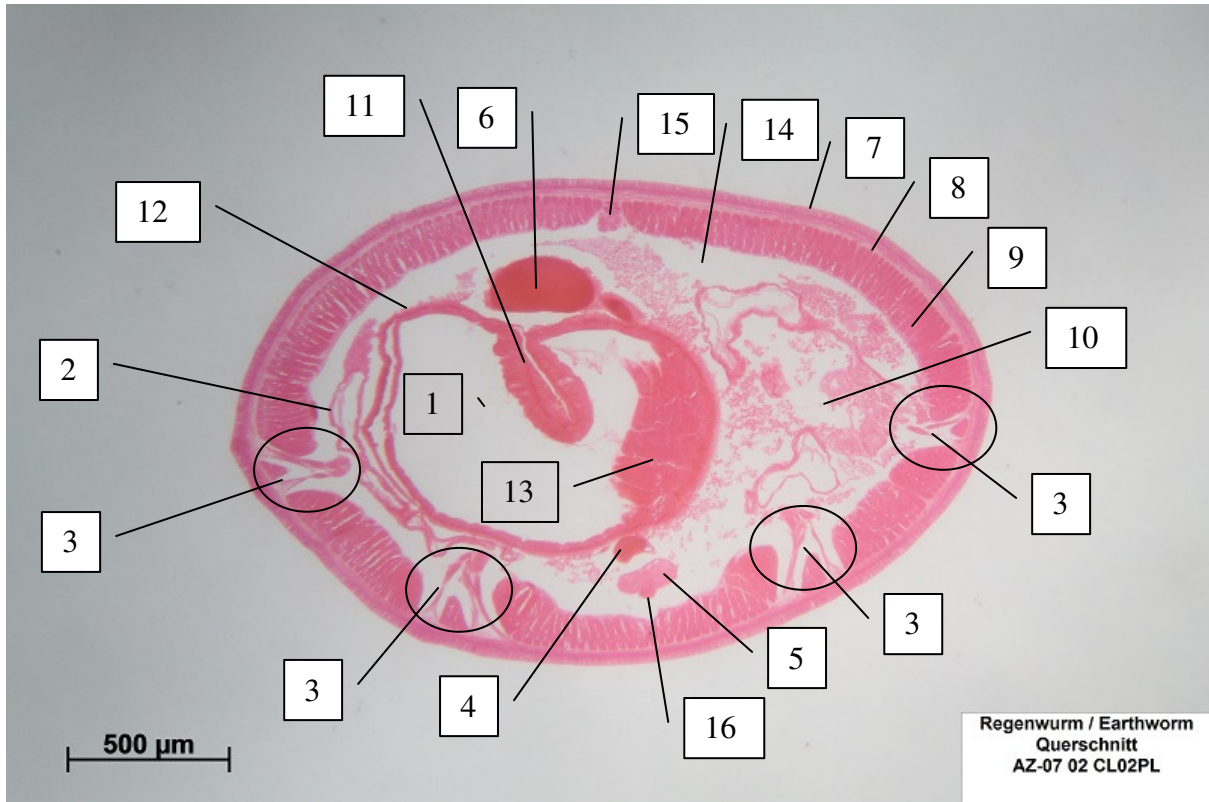
Nach einer Trocknungszeit von ca. 2 Tagen ist das Dauerpräparat fertig.

Literatur:

Kükenthal Zoologisches Praktikum
Histokurs Teil 1+2 von Ronald Schulte.
Angewandte Mikroskopie von Aribert Jung
Anleitung zum Anfertigen und Färben von Paraffinschnitten von Dr.G.Rosenfeld
Histologie für Jedermann von Otto Zach

Die nachfolgenden Fotos zeigen ein gekauftes Fertigpräparat, wobei die zu sehenden verschiedenen Organe des Regenwurms benannt wurden.

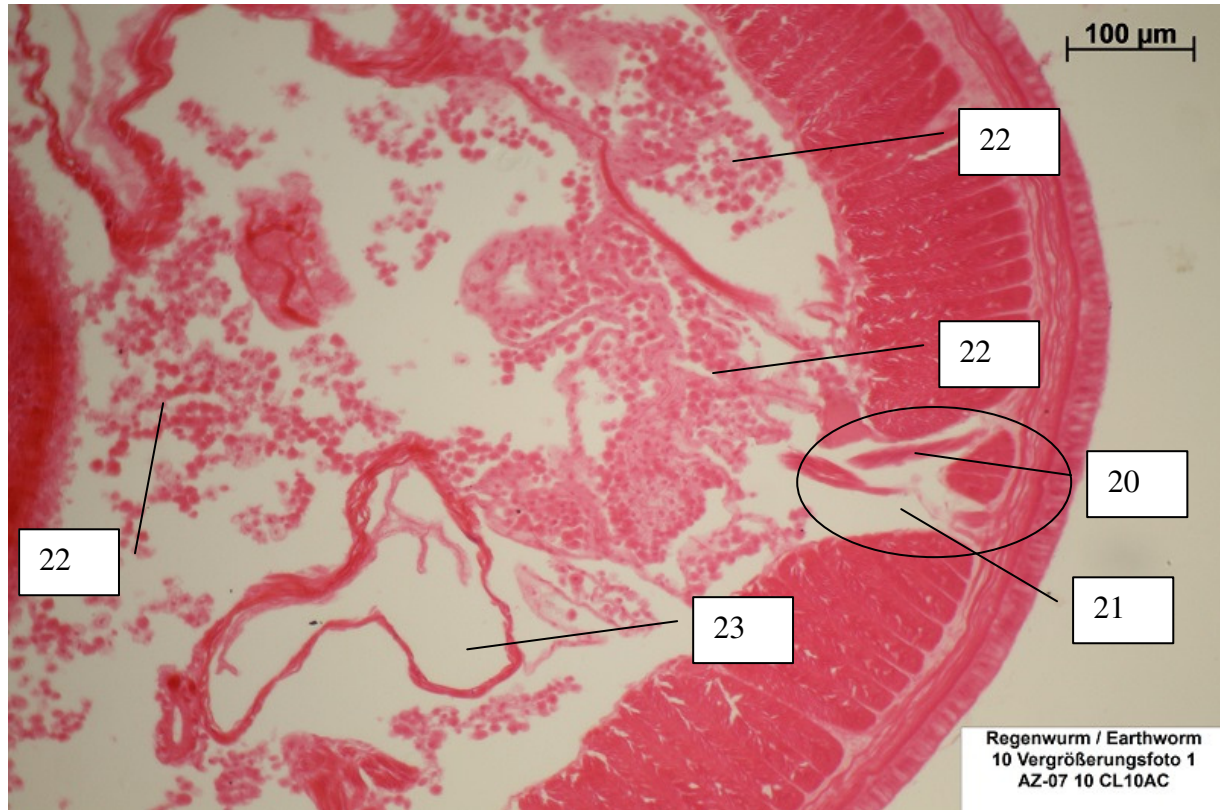
Bild 1



- 1 Darm, Darmlumen (Lumen = Innenraum)
- 2 Ausscheidungsgefäß, Nephridium
- 3 Borstensäckchen (Fortbewegung), gesamte Region
- 4 Bauchgefäß, Ventralgefäß
- 5 Bauchmark
- 6 Rückengefäß (Dorsalgefäß)
- 7 Epidermis und darüber Cuticula
- 8 Ringmuskel
- 9 Längsmuskel
- 10 siehe Vergrößerungsfoto 1, Bild 2
- 11 Typhlosolis
- 12 Darmwand
- 13 evtl. schräg angeschnittene Darmwand
- 14 Körperhöhle, Coelom
- 15 Lymphocyten
- 16 Subneuralgefäß

Regenwurm / Lumbricus terrestris
Herstellung eines Histologiepräparates

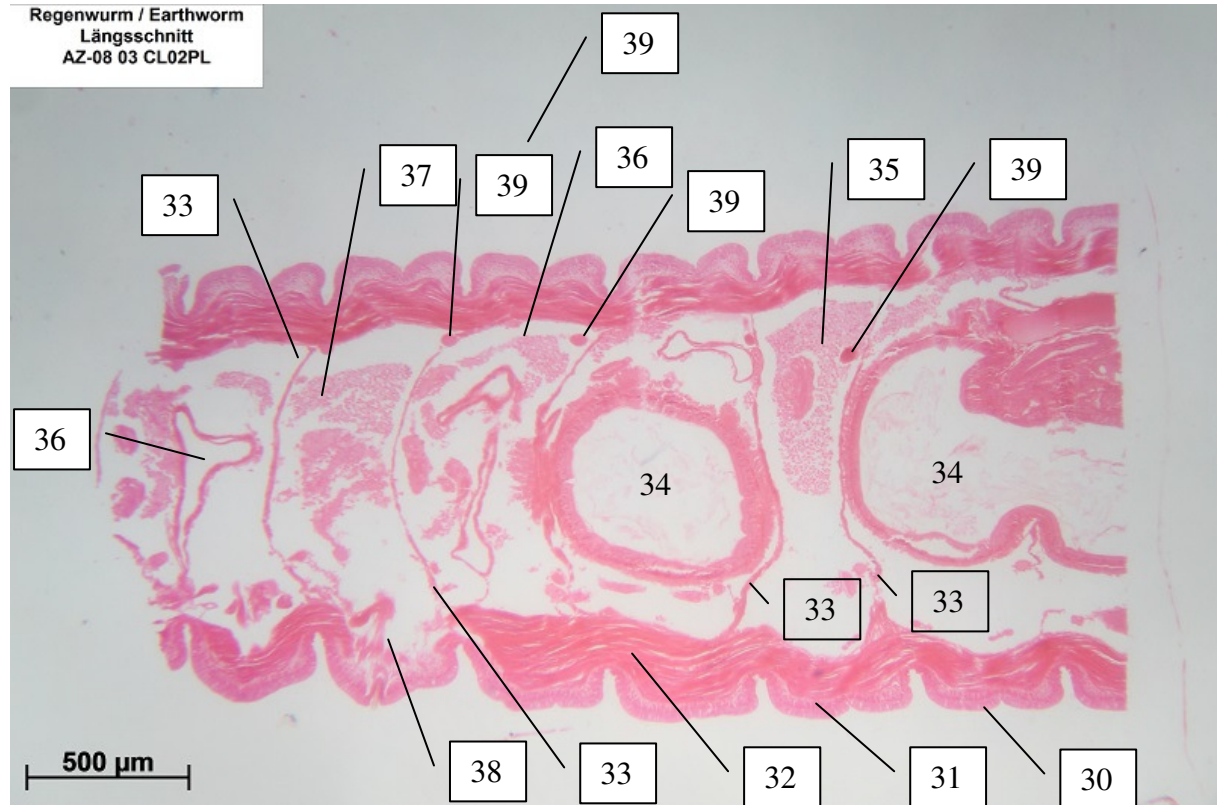
Bild 2



- 20 wahrscheinlich Borstenmuskel
- 21 Borstensäckchen, eingekreiste Region
- 22 evtl. Chloragogzellen oder Coelomocyten
- 23 evtl. Nephridium, Ausscheidungsorgan, Harnblase,

Regenwurm / Lumbricus terrestris
Herstellung eines Histologiepräparates

Bild 3



- 30 Epidermis und Cuticula
- 31 Ringmuskel
- 32 Längsmuskel
- 33 Querwand, Dissepiment, Septum
- 34 Darmlumen
- 35 siehe Vergrößerungsfoto 2, Bild 4
- 36 Ausscheidungsorgan, Nephridium
- 37 siehe Vergrößerungsfoto 3, Bild 5
- 38 Borstensäckchen
- 39 evtl. quer angeschnittenes Ringgefäß, Dorsoparietalgefäß

Regenwurm / Lumbricus terrestris
Herstellung eines Histologiepräparates

Bild 4



- | | | | |
|----|-----------------|----|--------------------------------|
| 40 | Ringgefäß? | 42 | Ausscheidungsorgan, Nephridium |
| 41 | Chloragogzellen | 43 | Querwand |

Bild 5

