

Waschlösung zur Perfusion:

- 100 ml 0,067 M PO₄-Puffer (0,2 M PO₄-Puffer auf 1:3 verdünnen)
- 0,8 g NaCl
- 0,8 g Saccharose
- 0,4 g Glucose
- 0,1 ml Heparin

Fixierlösung zur Perfusion:

- 1% Paraformaldehyd, 1% Glutaraldehyd
- 105 ml Aqua bidest.
- 5 g Paraformaldehyd (auf 70 °C erhitzen)
- ca. 6 Tropfen 2 N NaOH hinzugeben (bis Lösung klar)
- 125 ml Aqua bidest. zugeben
- pH mit 1 N HCl auf 7.4 einstellen
- je 100 ml 3 g Saccharose zugeben (3%)
- mit 0,2 M PO₄-Puffer auf 500 ml auffüllen
- 20 ml Glutaraldehyd kurz vor der Perfusion zugeben
- filtrieren

PO₄-Puffer (0,2 M pH 7.4):

- A:** 95 ml 0,2 M NaH₂PO₄
- B:** 405 ml 0,2 M Na₂HPO₄

Lösung B mit Lösung A auf pH 7.4 titrieren.

PBS-Puffer (0,01 M pH 7.5):

- 0,4 g Na H₂PO₄ wasserfrei
- 2,75 g Na₂HPO₄ wasserfrei
- 17,6 g NaCl
- pH auf 7.5 einstellen

TBS-Puffer (0,05 M pH 7.6):

Tris-HCl Stammlösung (0,5 M pH 7.6):

- 60,57 g Tris in 800 ml Aqua bidest. lösen
- 45 ml HCl 25%-ig dazugeben
- pH messen (mit 25%-iger HCl auf pH 7.6 nachtitrieren)
- mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

TBS (0,05 M pH7.6):

- 100 ml Tris-HCl Stammlösung
- 900 ml Aqua bidest.
- 9 g NaCl

Einbettung in Araldite

Herstellung der Fixierlösung:

a) Phosphatpuffer pH 7.2 – 7.4 0,4 M:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 12 g
- K_2HPO_4 20 g
- Aqua bidest. 500 ml
- pH messen

b) Fixans 1% Paraformaldehyd, 1% Glutaraldehyd für 500 ml, pH 7.2 – 7.4:

- Aqua bidest. 328 ml
- Paraformaldehyd 5 g
- Auf 80 °C erhitzen
- 1 - 2 Tropfen NaOH zugeben bis die Lösung klar wird
- Gefäß mit Alufolie verschließen und schnell unter laufendem Wasser kühlen
- Glutaraldehyd (25%) 20 ml
- Phosphatpuffer (0,4 M) 150 ml
- CaCl_2 (0,5%) 2 ml unter starkem Rühren sehr langsam zugeben
- pH messen, filtrieren, kühl stellen
- Gewebeblöcke 10 min in Phosphatpuffer waschen

Dehydratation (bei Zimmertemperatur):

- 25% Alkohol kurz eintauchen
- 50% Alkohol 10 min
- 70% Alkohol 10 min
- 90% Alkohol 15 min
- 100% Alkohol 4 x 15 min
- 100% Aceton 3 x 15 min

Imprägnation der Blöcke mit Araldite:

Herstellung des Einbettmediums:

- 10 g Araldite
- 8 g DDSA (Dodeceny succinic anhydrid)
- 0,3 ml DBP (Dibutylphthalat)
- 0,5 ml BDMA (Benzoldimethylamin)

Herstellung einer Araldite : Aceton Mischung im Verhältnis 1:1. Nach dem letzten Acetonschritt der Dehydratation werden die Blöcke in diese Mischung gebracht. Die Imprägnation erfolgt in verschließbaren Gefäßen und bei Zimmertemperatur für 4 Stunden. Nach ca. 3,5 h Imprägnationszeit in der 1:1 Mischung ist das Medium ohne Aceton aus dem Kühlschrank zu nehmen und verschlossen Zimmertemperatur annehmen zu lassen. Erst dann öffnen und die Blöcke übertragen. Das Ganze zurück in den Kühlschrank stellen und über Nacht dort stehen lassen. Am nächsten Morgen ungeöffnet 1 h bei Zimmertemperatur stehen lassen. Inzwischen neues Araldite ansetzen und anschließend darin 2x1 h bei 40 °C imprägnieren.

Endeinbettung:

- neues Araldite ansetzen
- Gewebeblöcke einbringen
- bei 60 °C 3 Tage aushärten lassen.