

Protokoll zu GMA (Glycol Methacrylat) wasserlösliches Einbettmedium

SKU #E14200

GMA ist ein Einbettmedium für Ultrastrukturstudien in der Elektronenmikroskopie. Eine verbesserte Einbettmethode wurde von Leduc & Bernhard (1967) beschrieben. Diese Methode ermöglicht eine verbesserte Ultrastrukturpräservierung von Geweben.

Protokoll – Empfohlene Durchführung

ACHTUNG: Alle Fixierungs-, Dehydrierungs- und Infiltrationsschritte sowie Einbettung und Polymerisation bei 4°C im Kühlraum oder auf Eis ausführen!!!

Herstellung der Mixturen:

- *Mix I*: 97% GMA + 3% bidest. H₂O (Gewichts-%)
- *Mix II*: 98% Butylmethacrylate + 2% Benzoylperoxid (Gewichts-%)

Finaler Mix (partiell polymerisiert):

1. 70ml *Mix I* + 29.4ml *Mix II* + 0.6g Benzoylperoxid
2. Partielle Polymerisation durch sanftes Erhitzen des finalen Mixes in einem verschlossenen Glaskolben bis zum Kochen
3. Sofortiges Abkühlen des Kolbens in Eiswasser
4. Wiederholen der Schritte 2 und 3, bis die Lösung die Viskosität von Ahornsirup erreicht (ca. 2-4 Mal)

Partiell polymerisierten Mix kann auf unbestimmte Zeit bei -20°C gelagert werden.

Partielle Polymerisation wird empfohlen, um die die Bildung von Artefakte zu minimieren.

Fixierung

1. Gewebefixierung mit 1.25% Glutaraldehyd in 0.1M Natriumkakodylat oder Phosphat-Puffer, pH 7,2 für 1 Std.
2. Spülen in gewähltem Puffer für 1 Std. oder über Nacht

Dehydrierung & Infiltration

1. Überschüssigen Puffer entfernen
2. Inkubation für 15min mit Gemisch von 80% GMA und 20% bidest. H₂O (Gewichts-%) > Medium verwerfen
3. Inkubation für 15min mit 100% GMA > Medium verwerfen
4. 3x Wiederholung von Schritt 3
5. Inkubation in *Mix II* für 1 Std. > Medium verwerfen
6. Inkubation in *Mix II* für 1 Std. > Medium verwerfen
7. Inkubation in Finaler Mix (teilweise polymerisiert) über Nacht

Einbettung & Polymerisation

NUR Polyethylen-freie Einbettformen verwenden! z.B. Gelatine-Kapseln

1. Einbettform mit vorpolymerisiertem Medium befüllen
2. Einbettform verschließen, Lufteinschlüsse vermeiden
3. Einbettform aufrecht positionieren und eine maximale Beleuchtung mit UV Licht (365nm) ermöglichen
4. Polymerisation mittels UV Licht für 24-48 Std
Je nach Lichtintensität, Wellenlänge, Viskosität der vorpolymerisierten Medium, zugesetzten Akzelerator!

Ultradünn-Schnitte sollten ausschließlich auf befilmte TEM Grids aufgenommen werden. Nachkontrastierung mit Uranylacetat, Ersatzstoffe (UranylLess) und/oder Bleicitrat.

Literatur

Leduc, E. & Bernhard, W.(1967), *Ultrastructure Research 4*, 196-199.

Rosenberg, M., Part, L.P., and Lesko, JR.(1960), *Ultrastructure Research 4*, 298.