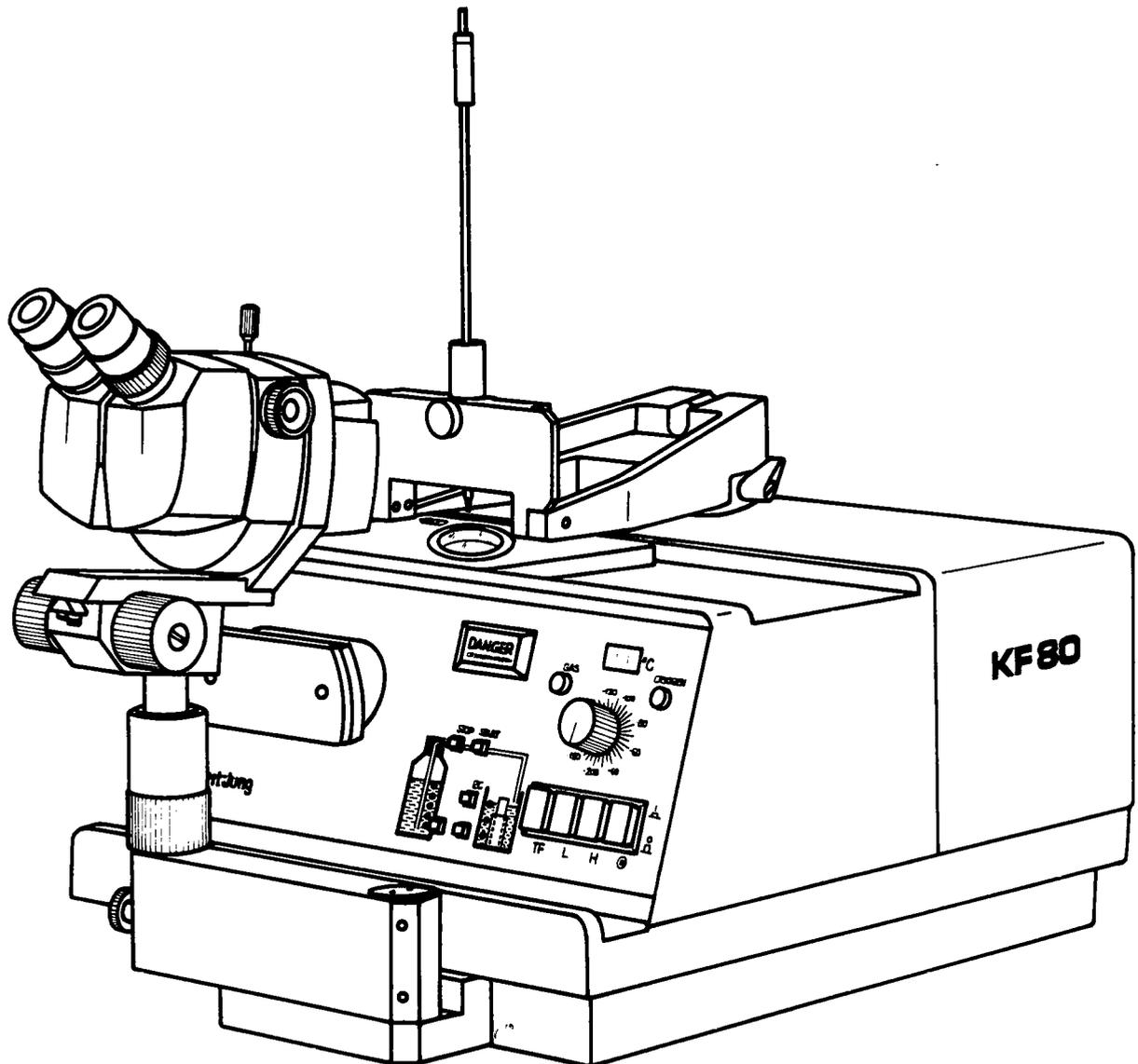


Reichert-Jung

KF 80

Immersions-Kryofixations-System

Gebrauchsanweisung



K. NEUMANN and H. SITTE
Fachrichtung 3.5 Medizinische Biologie der
Universität des Saarlandes
D-6650 Homburg-Saar (FRG)

INHALTSVERZEICHNIS

	VORSICHTSMASSNAHMEN.....	5
1	AUFSTELLEN UND INBETRIEBNAHME.....	11
1.1	BASISGERÄT.....	11
1.2	INJEKTOR-TRÄGER.....	11
1.2.1	INJEKTOR-TRÄGER SH (13) FÜR PRÄPARAT-STIFTE.....	11
1.2.2	INJEKTOR-TRÄGER BG (22) FÜR PINZETTE.....	12
1.2.3	MONTAGE DER INJEKTOR-TRÄGER.....	12
1.3	ZUBEHÖR.....	13
1.3.1	STEREOMIKROSKOP.....	13
1.3.2	KRYOTRANSFER-EINRICHTUNG.....	14
2	IMMERSIONS-KRYOFIXATION (plunge freezing).....	14
2.1	VORBEREITEN DES GERÄTES.....	14
2.1.1	ERSTES AUSHEIZEN.....	14
2.1.2	HERUNTERKÜHLEN DES GERÄTES.....	16
2.1.2.1	AUTOMATISCHES NACHFÜLLEN VON LN2 UND KRYOGENVERFLÜSSIGUNG.....	16
2.1.2.2	MANUELLES NACHFÜLLEN VON LN2 UND KRYOGENVERFLÜSSUNG.....	20
2.1.3	ENTSORGEN DES VERFLÜSSIGTEN KRYOGENS.....	21
2.1.3.1	ENTSORGEN VON PROPAN.....	21
2.1.3.2	ENTSORGEN VON ÄTHAN UND HALOGENIERTEN KOHLENWASSERSTOFFE.....	22
2.1.3.3	VERWENDUNG DES SPEZIAL-ENTSORGUNGSBEHÄLTERS.....	23
2.2	VERWENDUNG DES INJEKTORS SH (13) FÜR PRÄPARAT-STIFTE.....	24
2.3	VERWENDUNG DES PINZETTEN-INJEKTORS BG (22) (bare grid).....	26
2.4	ABSCHLUSS DER KRYO-ARBEIT.....	28
3	LISTE DER BAU-ELEMENTE.....	29
4	ELEKTRISCHER SCHALTPLAN.....	31

A C H T U N G

**WENN SIE PROPAN, ÄTHAN ODER ANDERE BRENNBARE SEKUNDÄRE KRYOGENE VERWENDEN
UND SICH DIESE IM FLÜSSIGEN ODER GASFÖRMIGEN ZUSTAND IM RAUM BEFINDEN,
BEACHTEN SIE BITTE FOLGENDES:**

RAUCHEN SIE GRUNDSÄTZLICH NICHT

VERWENDEN SIE KEIN OFFENES FEUER ODER LICHT.

**LESEN UND BEACHTEN SIE DIE
SICHERHEITS-ANWEISUNGEN
AUF SEITE 5 ff.**

**OBWOHL DIESES GERÄT ALLE BEKANNTEN SICHERHEITSVORSCHRIFTEN ERFÜLLT, SETZEN
SIE SICH VOR DER ERSTEN INBETRIEBNAHME BITTE MIT IHREM ZUSTÄNDIGEN SICHER-
HEITSINGENIEUR IN VERBINDUNG.**

Wir sind dauernd bemüht, unsere Erzeugnisse immer weiter zu vervollkommen, um den Ansprüchen der modernsten Untersuchungstechniken gerecht zu werden und neuen Methoden die Wege zu weisen. Dieses Bestreben bedingt fallweise Änderungen am mechanischen und optischen Aufbau. Alle Beschreibungen und Abbildungen in Katalogen und Gebrauchsanweisungen, wie alle zahlenmäßigen Angaben über den mechanischen Aufbau und über die optischen Daten unserer Instrumente sind daher unverbindlich.

VORSICHTSMASSNAHMEN BEI DER KRYOPRÄPARATION

Bei der Beachtung der wesentlichen Vorsichtsmaßnahmen sowie bei der Verwendung des heute üblichen Instrumentariums besteht kein Sicherheitsrisiko bei der Ausführung von Kryopräparationen. Achten Sie jedoch darauf, daß die wenigen entscheidenden Regeln, die nachfolgend zusammengestellt sind, von allen mit der Kryofixationseinrichtung KF 80 sowie mit den dazu notwendigen Kryopräparationen Befähigten bei der Arbeit beachtet und eingehalten werden.

BEI DER ARBEIT MIT FLÜSSIGEM STICKSTOFF (LN₂) IST ZU BEACHTEN

1. LN₂ ist extrem kalt und siedet bei -196°C. Stickstoffgas (GN₂) entweicht daher ebenfalls mit sehr niederen Temperaturen aus dem siedenden LN₂. Beachten Sie, daß sowohl LN₂ und GN₂ wie Gegenstände, die mit LN₂ oder kaltem GN₂ in Kontakt stehen (z.B. Rohrverbindungen, Ventile, Schläuche, Behälter oder Stopfen), schwere Kälteschäden hervorrufen können, z.B. Frostblasen und Verbrennungen auf der Haut und Augen.
2. LN₂ dehnt sich beim Verdampfen etwa im Verhältnis 1 : 700 aus. Aus 1 Liter entsteht demnach fast 1 m³ Stickstoffgas (GN₂). Achten Sie daher darauf, daß beim Verdampfen größerer Stickstoffmengen (z.B. beim Umfüllen von LN₂) der Raum stets gut belüftet ist. LN₂-Reste dürfen aus Behältern nur im Freien entfernt werden: Zweckmäßig ist ein Ausgießen in eine mit Kies gefüllte Grube oder in einen mit Kies gefüllten Behälter, wo LN₂ rasch und gefahrlos verdampft.
3. Stickstoffgas (GN₂) ist geruchlos und geschmacklos und unterscheidet sich daher beim Einatmen nicht von Luft. GN₂ selbst ist nicht gesundheitsschädigend. Trotzdem reduziert ein höherer GN₂-Gehalt der Luft (Normalgehalt etwa 78 % GN₂ neben 21 % Sauerstoff) den Sauerstoffgehalt und bewirkt dadurch ohne vorangehende Symptome (z.B. Schwindelgefühl, Benommensein) unmittelbar Ohnmacht und tiefe Bewußtlosigkeit: Soweit Unklarheit über den Sauerstoffanteil der Luft besteht, wird die Anwendung eines Gasanalysators mit einem Anzeigebereich von 0 bis 25 % Sauerstoff empfohlen. Eine Gefahr besteht, wenn der Sauerstoffgehalt unter 18 % absinkt. Verbleibt eine bewußtlose Person in der sauerstoffarmen Umgebung, so kann der Tod eintreten.

IM ERNSTFALL SOFORT ARZT UND KRANKENWAGEN VERSTÄNDIGEN!

BEI AUSETZEN DER ATMUNG SOFORT KÜNSTLICH BEATMEN!

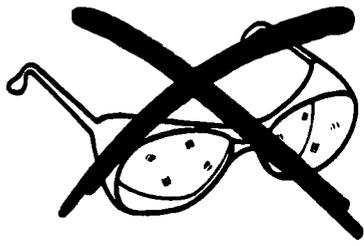
4. Stellen Sie den LN₂-Behälter aus den dargelegten Gründen niemals in geschlossene Abstellräume oder Kammern. Die Abdampftrate von Dewargefäßen kann bei Defekten infolge unsachgemäßer Handhabung (Stoß oder mechanische Beschädigung) sowie durch natürlichen Verschleiß bei langjährigem Gebrauch auf mehrer Liter/Tag ansteigen und in geschlossenen Räumen zu einer gefährlichen Reduktion des Sauerstoffanteils der Luft führen.
5. Bedenken Sie, daß vom KF 80-System bei normalem Betrieb ca. 1 Liter LN₂ pro Stunde verdampft werden. Diese Menge entspricht etwa 1 m³ GN₂/h. Halten Sie den Arbeitsraum deshalb stets gut belüftet und beachten sie die Hinweise der vorangehenden Punkte 2 und 3.

6. Üben Sie größte Vorsicht, wenn Sie raumwarme Gegenstände mit LN₂ in Berührung bringen. Es bildet sich hierbei zunächst eine isolierende Gasschicht aus, die einen größeren Wärmetransfer ausschließt. In dieser Periode verdampft vergleichsweise wenig LN₂. Sowie sich jedoch der eingebrachte Gegenstand abgekühlt hat, tritt ein oftmals nicht mehr erwartetes starkes Sieden und Verspritzen von LN₂ auf.
7. Vermeiden Sie beim Hantieren mit LN₂ Schutzbrillen wie (a), Stiefel wie (c), geschlossenes Schuhwerk wie (e) und Schutzhandschuhe wie (g), aus denen eingetretener LN₂ nicht sofort wieder entweichen kann. Der durch Verspritzen in eine geschlossene Schutzbrille wie (a) eingedrungene LN₂ verdampft augenblicklich und führt zu starken Verbrennungen, bevor ein Abnehmen oder Ziehen gelingt. Verwenden Sie daher stets ausschließlich oben und insbesondere UNTEN OFFENE SCHUTZBRILLEN wie (b) MIT SEITLICHER ABDECKUNG, aus denen LN₂ sofort wieder austreten kann. Verwenden Sie Stiefeln nur, wenn lange lockere (NICHT ENGE) Hosen DARÜBER sitzen wie (d) und diesen Spalt komplett abdecken. Tragen Sie im Labor nur offene Slipper wie (f), keine geschlossene Halbschuhe oder Pumps. Tragen Sie zu den offenen Sandalen ausschließlich Hosen, die ohne Umschlag glatt enden, so daß verspritzter LN₂ glatt ablaufen kann. Nehmen Sie beim Umgießen von LN₂ oder beim Einbringen des Dewarkopfes in den Dewar keinesfalls Schutzhandschuhe, sondern höchstens ein offenes Flanelltuch (h), das Ihre Hände gegen Kaltteile isoliert. Asbesthandschuhe sind ausschließlich zum Angreifen trockener kalter Teile, nicht zum Hantieren mit LN₂ geeignet.
8. Spülen Sie bei Verbrennungen durch verspritzendes LN₂ sofort die betroffenen Hautpartien ausgiebig mit körperwarmen Wasser. Suchen Sie bei stärkeren Verbrennungen sofort danach einen Hautarzt auf.

SUCHEN SIE BEI LN₂-EINWIRKUNG AUF EIN AUGESOFORT EINEN AUGENARZT AUF, NACH-
DEM SIE DAS AUGES VORHER AUSGIEBIG MIT HANDWARMEN WASSER GESPÜLT HABEN!

9. Verwenden Sie nach Möglichkeit im Laborbetrieb keine DewargefäÙe aus Glas, insbesondere keine Glasdewars mit einem Inhalt über 1 l. Glasdewars bersten oft ohne ersichtlichen Grund oder bei unbeabsichtigt unsachgemäÙer Handhabung, die nicht immer ausgeschlossen werden kann (Berührung mit Metallinstrumenten etc.). Arbeiten Sie nicht ohne eine OFFENE Schutzbrille mit LN₂ in einem Glasdewar. Ersetzen Sie nach Möglichkeit Glasdewars durch Metallbehälter. Achten Sie darauf, daß derartige MetallgefäÙe speziell als Vorratsbehälter für LN₂ gekennzeichnet sind, da nur diese Behälter eine risikofreie Aufbewahrung von LN₂ gewährleisten. Für die täglichen Präparationsarbeiten sind Metallwannen (1 cm Styropor-Isolation), Styroporbehälter oder Kunststoffwannen +) ausgezeichnet geeignet und ermöglichen eine vollkommen risikolose Präparation.
10. Überprüfen Sie regelmäßig in jedem Quartal die Abdampfrate Ihrer Metall-DewargefäÙe und vergleichen Sie die gemessenen Abdampfraten mit den von der Firma angegebenen Werten. Die Abdampfrate eines intakten Metalldewars liegt bei einwandfreier Beschaffenheit erheblich unter 1 Liter LN₂/Tag. Defekte GefäÙe mit höherer Abdampfrate sind ein Sicherheitsrisiko und sollten daher entweder aussortiert oder repariert werden.

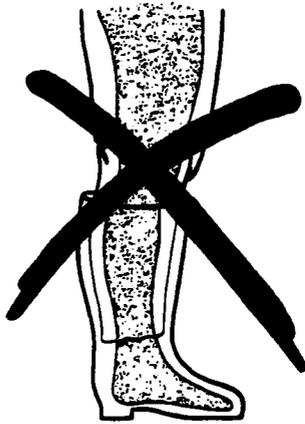
+)Kunststoffwannen für LN₂-Präparationen liefert in unterschiedlichen Dimensionen und Ausführungen sowie nach Maßgabe der Firma Kurt Migge GmbH., Am Taubenfeld 31, D-6900 Heidelberg-Wieblingen.



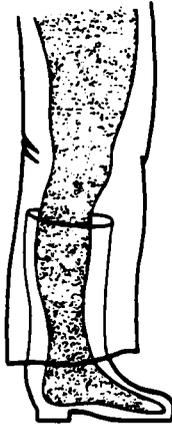
a



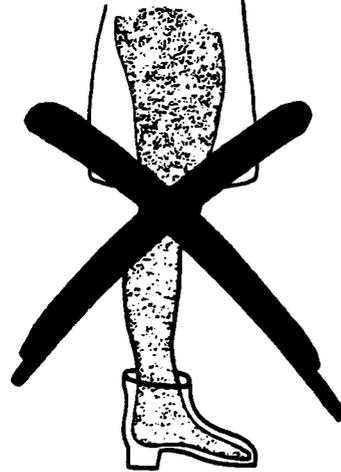
b



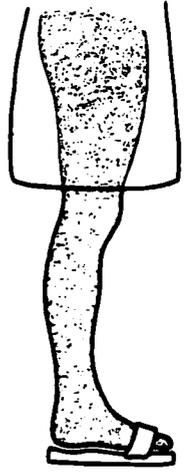
c



d



e



f



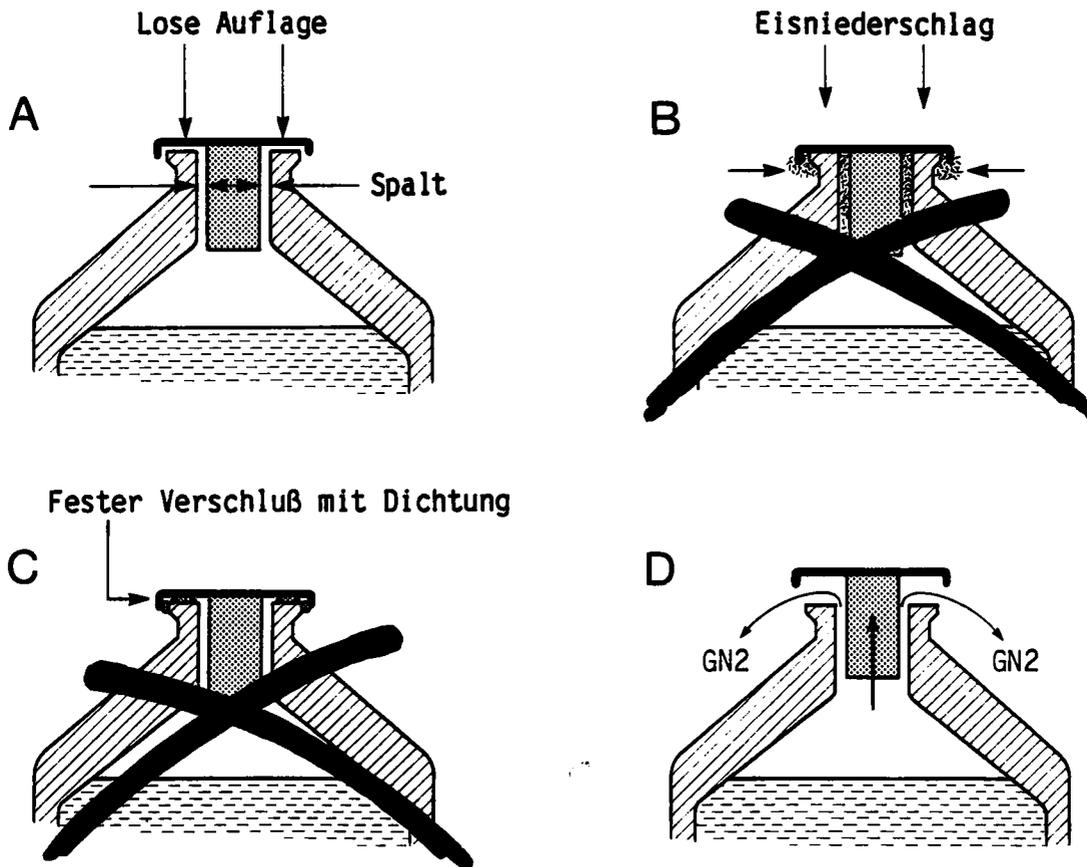
g



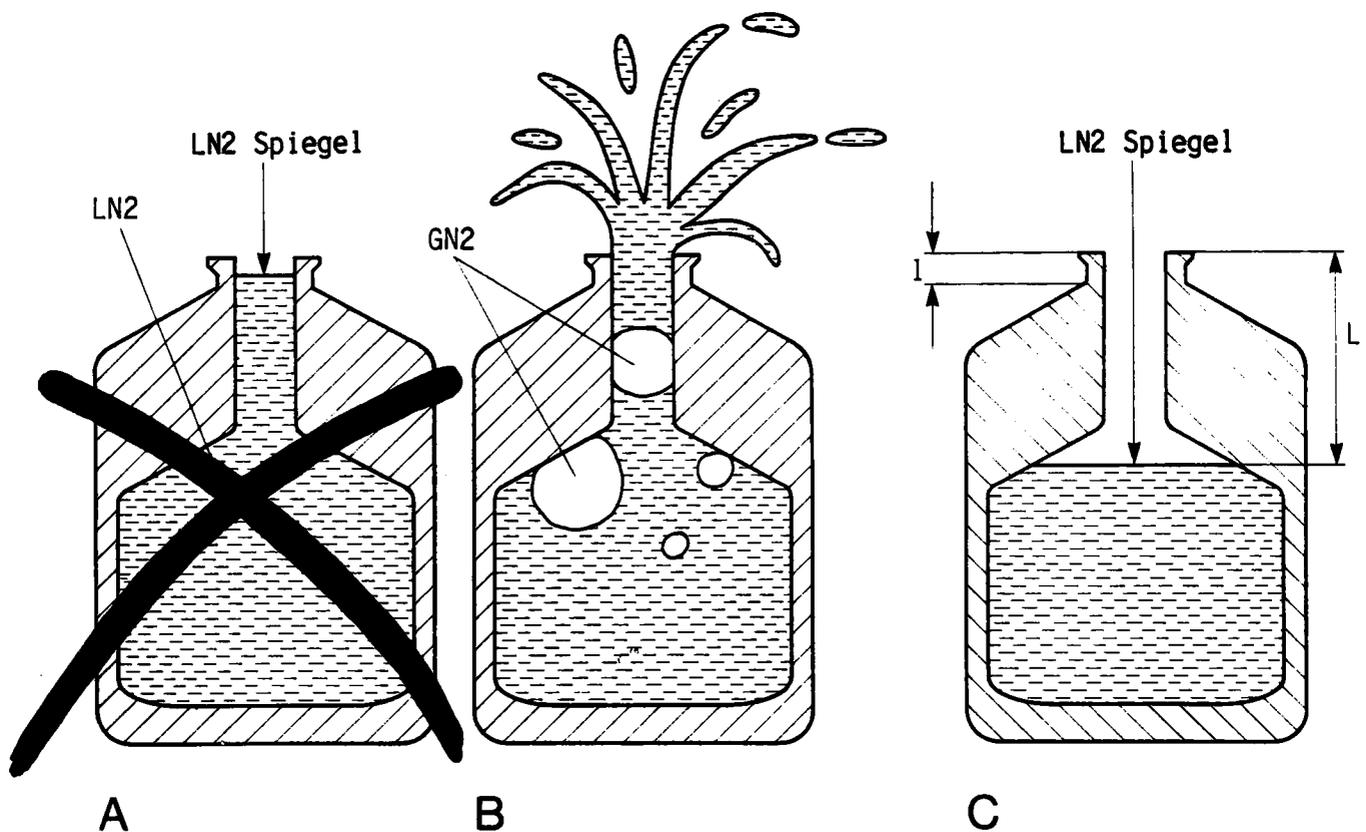
h

11. Normale DewargefäÙe wie der Metalldewar 25 LD des KF 80-Systems sind keine Druckbehälter: Verschließen Sie daher derartige DewargefäÙe ausschließlich mit den hierfür vorgesehenen Stopfen (Skizze A, unten), welche einen hinreichend großen Spalt zum plötzlichen Abdampfen von GN2 aufweisen und locker auf dem Dewarhals aufliegen. Achten Sie durch laufende Kontrollen, daß sich der Stopfen nicht durch Eisniederschläge festsetzt (Skizze B). Verschließen Sie niemals ein DewargefäÙ durch selbst hergestellte Verschlüsse (Skizze C). Ein gasdicht verschlossenes DewargefäÙ kann bei Erschütterungen oder beim Bewegen (Transport) explosionsartig GN2 freisetzen und dabei platzen. Hierbei wird dann (u.U. in einem Fahrzeug) auf einmal der gesamte LN2 verdampft (25 Liter LN2 = 20 m³ GN2!). Ein sachgerechter Stopfen "steigt" bei einem Bewegen des Dewars und dem dadurch hervorgerufene plötzlichen Verdampfen einer größeren LN2-Menge im Hals hoch und gibt den Weg für die entsprechenden GN2-Mengen frei (Skizze D). Die hierbei eventuell mit austretende geringe LN2-Menge stellt kein wesentliches Sicherheitsrisiko dar.

HINWEIS: Der Verschluß des DewargefäÙes mit dem Dewarkopf der Nachfüllautomatik der KF 80 ist im Hinblick auf die doppelte Sicherung durch die Steigleitung mit stromlos-offenem Magnetventil und das auf einen Druck von 35 bar eingestellte Überdruckventil amtlich gestattet. Der Aufbau eines schädlichen Drucks im Dewar wird durch die beiden Maßnahmen praktisch ausgeschlossen.

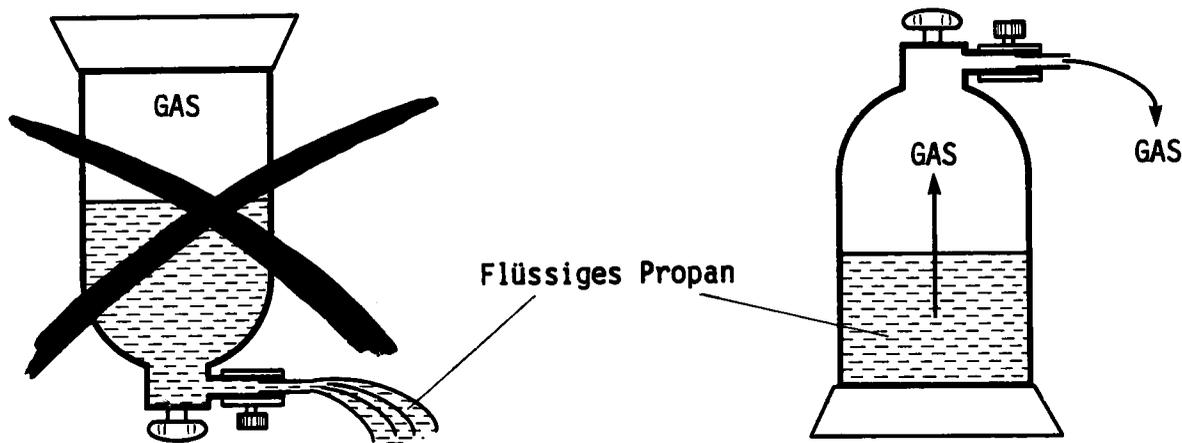


12. Lassen Sie LN2 nicht in offenen Gefäßen im Austausch mit der Raumatmosphäre stehen. Der Siedepunkt von LN2 (-196°C) liegt tiefer als der Siedepunkt von verflüssigtem Sauerstoff (-183°C). Bei hinreichenden Austauschflächen wird Sauerstoff aus der Luft im Austausch gegen Stickstoff aufgenommen. LN2 mit einem hohen Flüssig-Sauerstoff-Gehalt bekommt eine schwach bläuliche Farbe. In diesem Fall ist Vorsicht geboten, weil angereicherter Flüssig-Sauerstoff heftige Verbrennungsprozesse begünstigt.
13. Achten sie darauf, daß in Ihr Dewargefäß ausschließlich LN2 eingefüllt wird. Bringen Sie bei der Befüllung in einer zentralen Verteilerstelle deutlich sichtbar die Beschriftung "NUR FLÜSSIGSTICKSTOFF" oder dergleichen an. Achten Sie auf die Farbe des Kryogens: EINE BLÄULICHE FÄRBUNG ZEIGT EINEN ERHEBLICHEN SAUERSTOFFANTEIL AN (vgl. vorangehenden Punkt) Flüssig-Sauerstoff reichert sich bei längerer Lagerung an, da er mit -183°C einen höheren Siedepunkt als LN2 (196°C) aufweist.
14. Füllen Sie ein Dewargefäß niemals bis zum Hals mit LN2 (Skizze A). Im Fall eines Siedeverzugs besteht die Gefahr, daß die sich sehr rasch vergrößernden Gasblasen den im Hals befindlichen LN2 herausschleudern (Skizze B). Achten Sie daher, daß der LN2-Spiegel stets unterhalb des Halsabschnitts liegt (Skizze C). Beachten Sie dabei, daß meistens die Länge L der Verschalung von der Länge L des Dewarhalses abweicht!



BEI DER ARBEIT MIT PROPAN IST ZUSÄTZLICH ZU DEN BEHÖRDLICHEN SICHERHEITSVORSCHRIFTEN +) FOLGENDES ZU BEACHTEN

15. Gasförmiges Propan ist schwerer als Luft, sinkt daher zu Boden und bildet im Kellerräumen explosive Propan/Luft-Gemische. Die Anwendung von Propan in Kellerräumen ist daher untersagt. Liegen die Arbeitsräume im Erdgeschoß oder in einem Obergeschoß, so fließen kleine Propangasmengen durch die Türritzen ab und stellen keine Gefahr dar.
16. Beim Verflüssigen von Propan mit LN₂ darf kein offenes Feuer (Bunsenbrenner) im Raum unterhalten werden, da sich Propandämpfe rasch entzünden und Propan im verflüssigten Zustand auch bei tiefen Temperatur (-190°C) leicht entzündlich ist und mit hoher Stichflamme brennt.
17. Propangasflaschen niemals zur Entnahme flüssigen Propans auf den Kopf stellen. Entweichendes flüssiges Propan verdampft in diesem Fall bei Raumtemperatur in erheblichem Umfang. Das entstehende Propan/Luft-Gemisch ist hochexplosiv und kann durch einen kleinen Funken eines Elektrogeräts (z.B. Schalter) gezündet werden.



18. Schützen Sie sich sorgfältig vor verspritzten Propan bei der Immersions-Kryofixation: Propan erzeugt durch seinen relativ geringen Dampfdruck auf der Haut, insbesondere aber an den Augen, erheblich stärkere Verbrennungen als LN₂, das sofort verdampft. Verwenden Sie stets ein Schutzschild bei der Immersions-Kryofixation. Setzen Sie zusätzlich eine Schutzbrille auf. Soweit tiefgekühltes Propan auf die Haut oder auf die Augen trifft, betroffene Körperpartie sofort ausgiebig mit körperwarmem Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

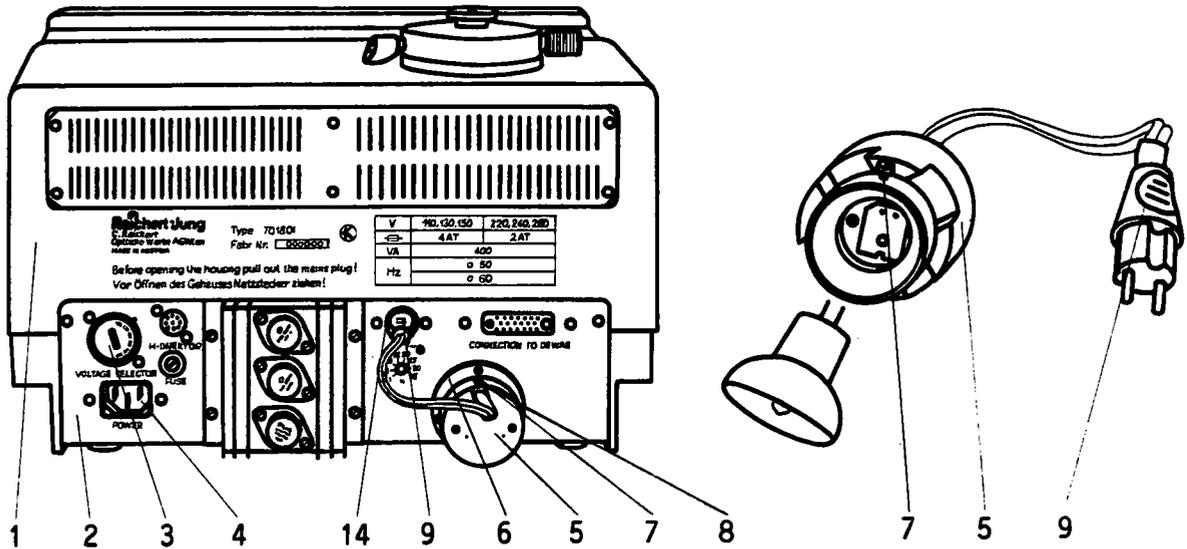
+)Nachdem für verschiedene Länder unterschiedliche Sicherheitsvorschriften gelten und die gegebenen Vorschriften von verschiedenen Institutionen unterschiedlich gehandhabt werden, empfehlen wir vor dem Gebrauch von Propan dringend eine Anfrage beim zuständigen Sicherheitsingenieur.

1 AUFSTELLEN UND INBETRIEBNAHME

1.1 BASISGERÄT (1)

Vor dem Anschließen des Basisgeräts (1) an die elektrische Spannung (4) kontrollieren Sie die Spannungsangabe des Spannungswahlschalters (3) an der Geräte-Rückwand (2).

Setzen Sie den Lampenhalter (5) so in die Fassung (6) ein, daß die Inbusschraube (7) in die Orientierungsnut (8) paßt. Fixieren Sie die Inbusschraube (7) mit einem 2 mm Inbusschlüssel und verbinden Sie den Stecker (9) mit dem Sockel (14).

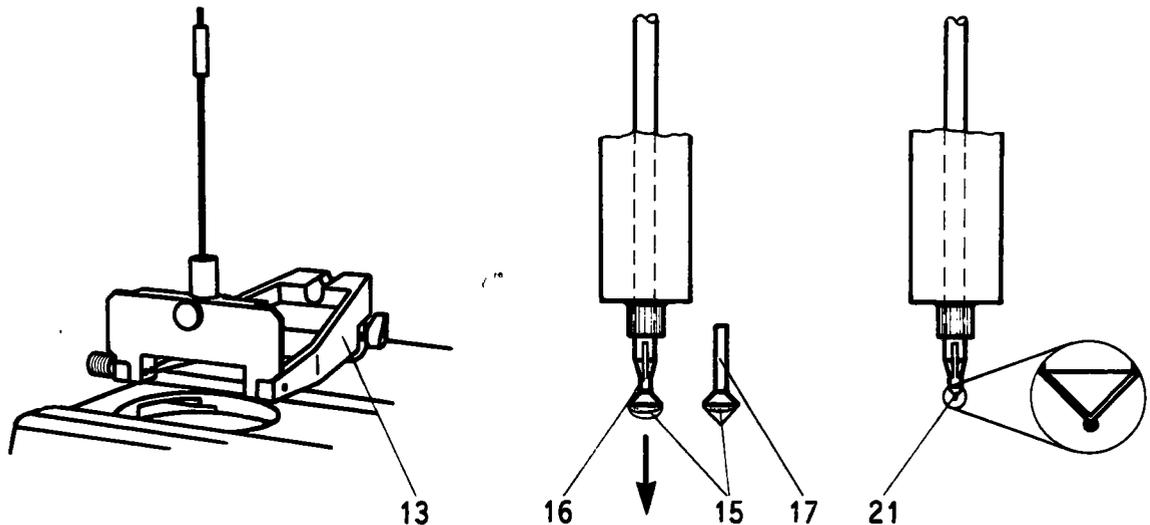


1.2 INJEKTOR-TRÄGER

Wählen Sie den geeigneten Injektor-Träger aus.

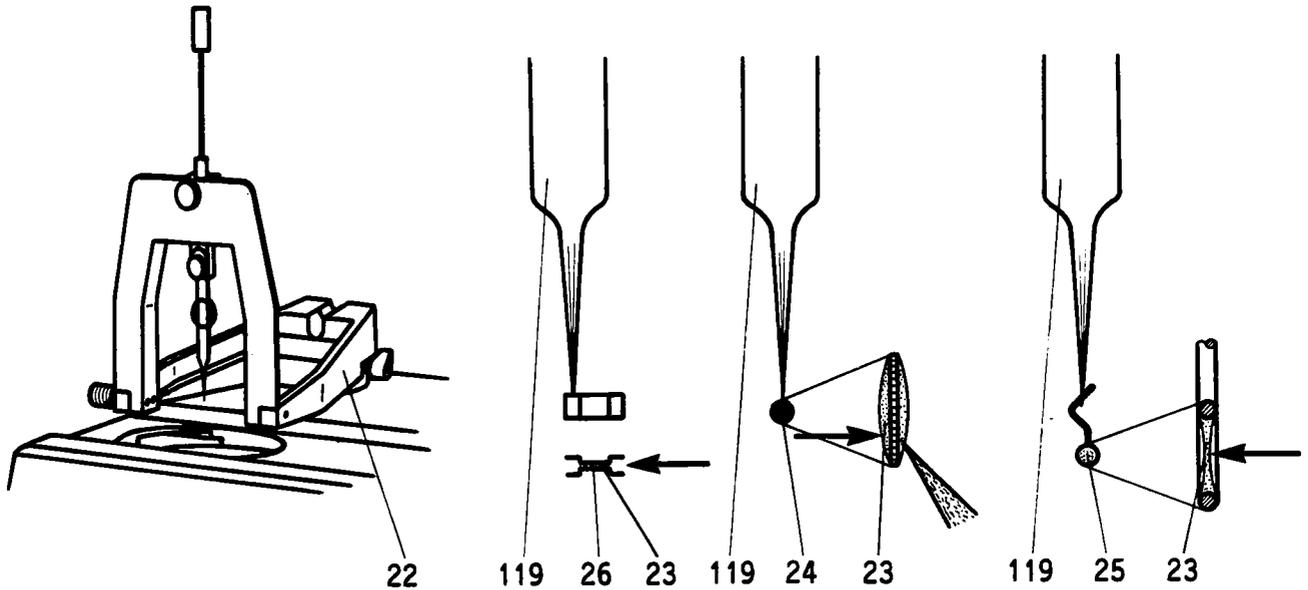
1.2.1 INJEKTOR-TRÄGER SH (13) FÜR PRÄPARAT-STIFTE

Dieser Träger wird zur Immersions-Kryofixation von Präparat-Blöckchen (15) auf Präparat-Stiften (16,17) und (21) für Suspensions-Mikrotropfen verwendet.



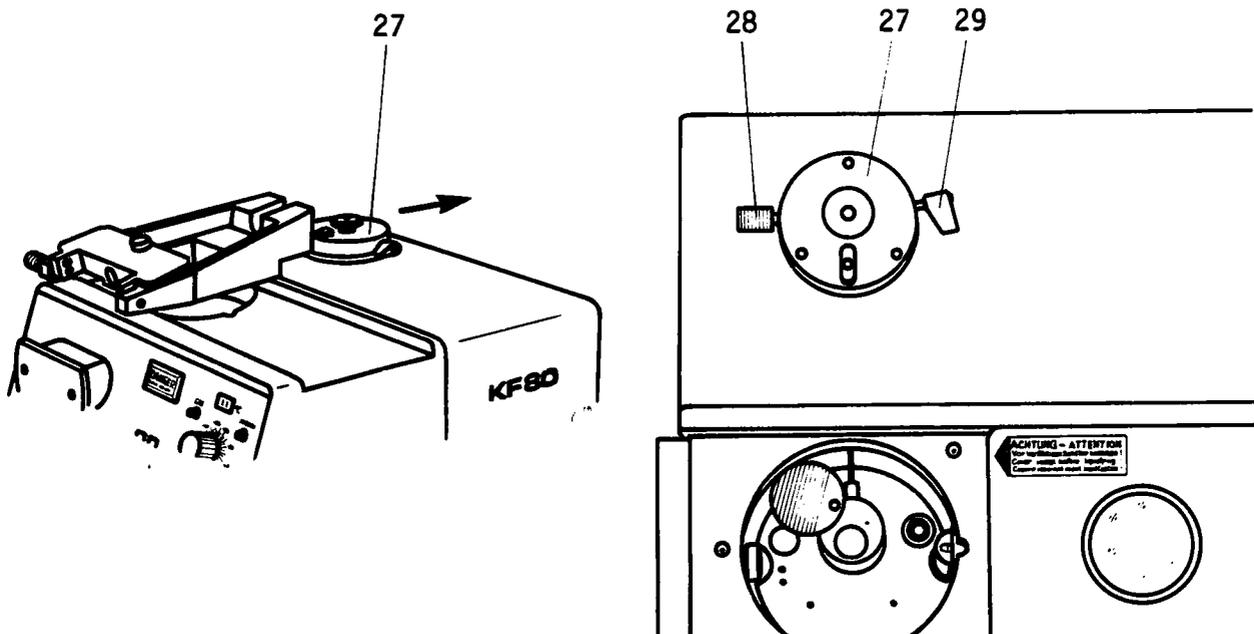
1.2.2 INJEKTOR-TRÄGER BG (22) (bare grid) FÜR PINZETTE

Dieser Injektor-Träger wird für die Injektion von Suspensionen (23) auf einem unbefilmten Netz (24), in einer Drahtöse (25) oder als Sandwich-Präparat (26) verwendet.



1.2.3 MONTAGE DER INJEKTOR-TRÄGER

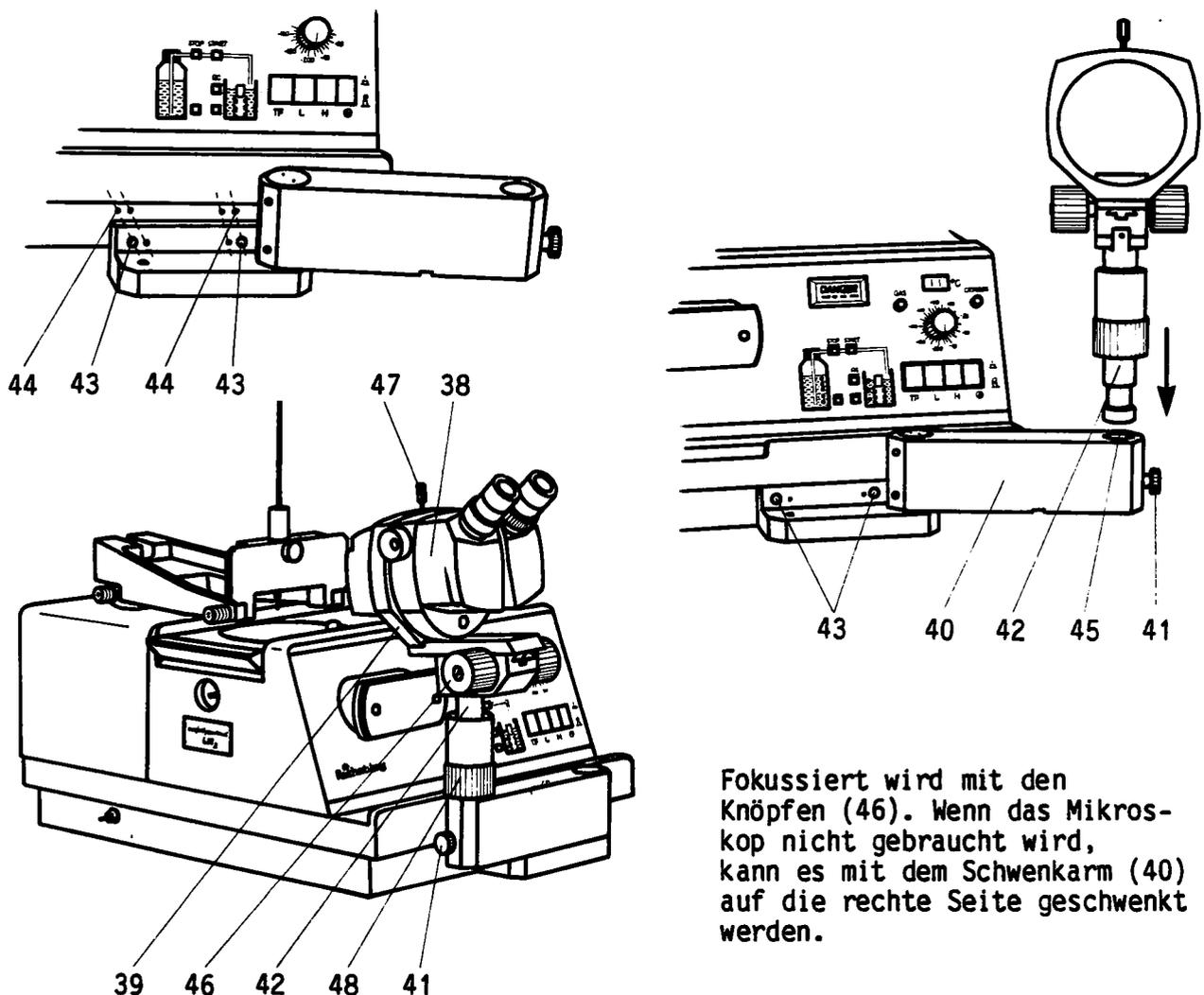
Drehen Sie die Montage-Platte (27) in die Arbeitsposition, d.h. der gefederte Entriegelungsknopf (28) zeigt nach links, der Klemmhebel (29) nach rechts. Schieben Sie den ausgewählten Injektor-Träger von vorn bis zum Endanschlag auf die Montageplatte und fixieren Sie diese durch Drehen des Klemmhebels (29) im Uhrzeigersinn.



1.3 ZUBEHÖR

1.3.1 STEREOMIKROSKOP

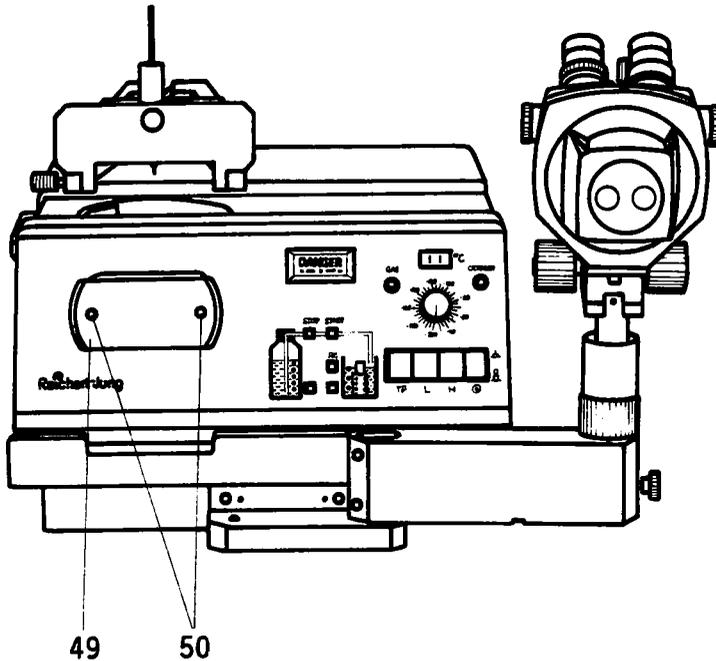
Wenn nötig (z.B. für die bare-grid-Methode), kann ein STEREOSTAR-Mikroskop (38) mittels des Mikroskop-Trägers (39) und des Schwenkarms (40) am Basisgerät (1) montiert werden. Dazu lösen Sie zunächst die Schrauben (41) und trennen den Mikroskop-Träger (39) vom Schwenkarm (40), indem Sie die Achse (42) aus dem Schwenkarm (40) herausziehen. Öffnen Sie das Gelenk des Schwenkarms (40) so, daß der Arm gerade ist (180°). Setzen Sie die beiden Inbusschrauben (43) ein und schrauben Sie diese in die beiden Gewindebohrungen (44) am Sockel des Basisgerätes fest. Schließen Sie den Schwenkarm, indem Sie den Oberteil von rechts nach links bewegen und setzen Sie die Achse (42) des Mikroskop-Trägers so in die Öffnung (45) ein, daß die Fokussierknöpfe zum Benutzer weisen. Setzen Sie das Mikroskop so in den Träger ein, daß die Okulare nach oben zeigen und befestigen Sie es mit der Schraube (47). Die Höhe des Mikroskops wird bei geöffneter Schraube (41) mit der Rändelhülse (48) eingestellt. Fixieren Sie die Schraube (41) wieder. Bei der Arbeit läßt sich die Höhe des Mikroskop durch Schwenken den Trägers (39) gegen seine Achse(42) justieren.



Fokussiert wird mit den Knöpfen (46). Wenn das Mikroskop nicht gebraucht wird, kann es mit dem Schwenkarm (40) auf die rechte Seite geschwenkt werden.

1.3.2 KYROTRANSFER-EINRICHTUNG

Für die "bare-grid"-Methode wird eine Kryotransfer-Einrichtung benötigt. Sie wird nach Lösen der Schrauben (50) und Entfernen des Deckels (49) an der Schleusenöffnung des Basisgeräts befestigt. Weitere Informationen erhalten Sie von den Herstellern der Kryotransfer-Einrichtung.



2 IMMERSIONS-KRYOFIXATION (plunge freezing)

2.1 VORBEREITUNG DES GERÄTES

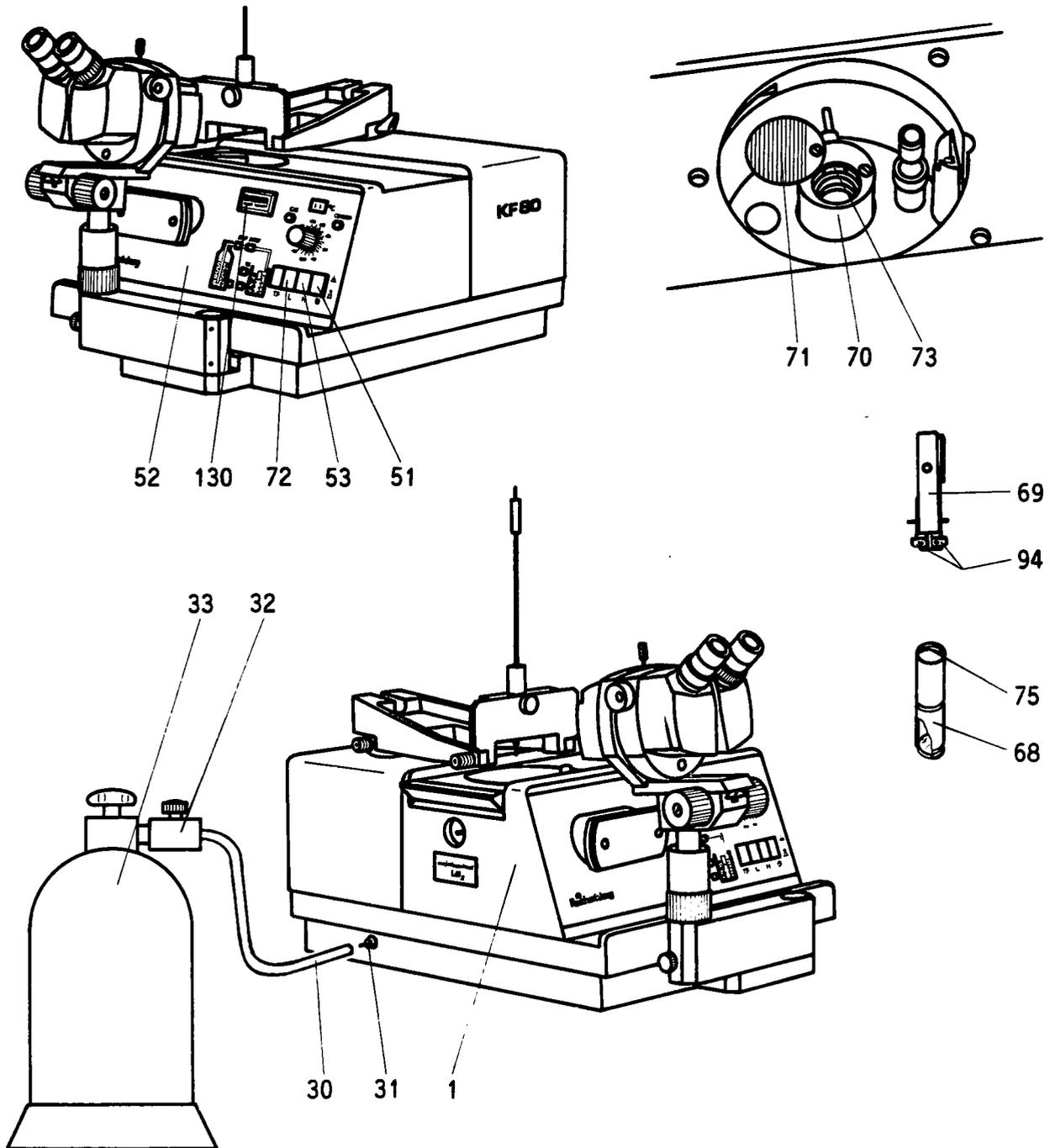
WICHTIG: Vor dem Herunterkühlen des Gerätes soll ein kurzes Ausheizen durchgeführt werden, um alle Restfeuchtigkeit im Gerät zu verdampfen. Wenn dieses erste Ausheizen ausgelassen wird, ist unter Umständen keine Kryogen-Verflüssigung möglich. In diesem Fall ist ein vollständiger Ausheiz-Zyklus notwendig (ca. 2 Stunden mit automatischer Endabschaltung; siehe auch Abschnitt 2.4 ABSCHLUSS DER KRYO-ARBEIT).

2.1.1 ERSTES AUSHEIZEN

Drücken Sie den grünen Hauptschalter (51) auf der Bedienungs-Frontplatte (52). Drücken Sie die Heize Taste H (53) und schalten Sie das akustische Signal mit dem großen Anzeigen-Schalter (130) aus. Warten Sie 5 Minuten. Stellen Sie den Kryogen-Behälter (33) auf der linken Seite des Basisgerätes (1) unter oder vor die Arbeitsfläche. Verbinden Sie den Kryogen-Einlaß-Stutzen (31) des Basisgerätes und das Reduzier-Ventil (32) des Kryogen-Behälters (33) mit dem flexiblen Silikon-Schlauch (30). Öffnen Sie das Reduzierventil, spülen kurz mit trockenem warmen Kryogengas und schließen Sie das Ventil wieder.

Schalten Sie die Heizung durch Drücken des Hauptschalters (51) aus. (Der Schalter H (53) springt beim Drücken des Hauptschalters (51) heraus!) Öffnen Sie den schwarzen Deckel (71) des Verflüssigers nach links mit einem Holzstäbchen (95). Schalten Sie das Licht mit dem Schalter L (72) ein. Setzen Sie das Kryogen-Röhrchen (68) mit dem Manipulator (69) in die Öffnung des Verflüssigers (70) ein.

ACHTUNG: Der Manipulator (69) steht unter Federvorspannung und öffnet sich, wenn die beiden geriffelten Griffe zusammengedrückt werden, und schließt sich beim Loslassen.



Die beiden blanken Metallplättchen (94) werden in die Rille des Behälters (68) eingeführt, indem die beiden Arme des Manipulators zusammengedrückt werden. Beim Loslassen rasten die beiden Metallarme in der Rille (75) ein. Nach Drehung um 90° wird der Manipulator (69) mit dem Kryogenbehälter (68) an den festen, nicht geriffelten Seiten festgehalten und der Behälter (68) bis zum Anschlag in die Öffnung des Verflüssigers (70) eingeschoben. Wenn der Schlitz (73) über dem oberen Rand des Behälters sichtbar wird, ist er korrekt eingesetzt. Der Manipulator (69) wird nach Zusammendrücken der Arme herausgezogen.

2.1.2 HERUNTERKÜHLEN DES GERÄTES

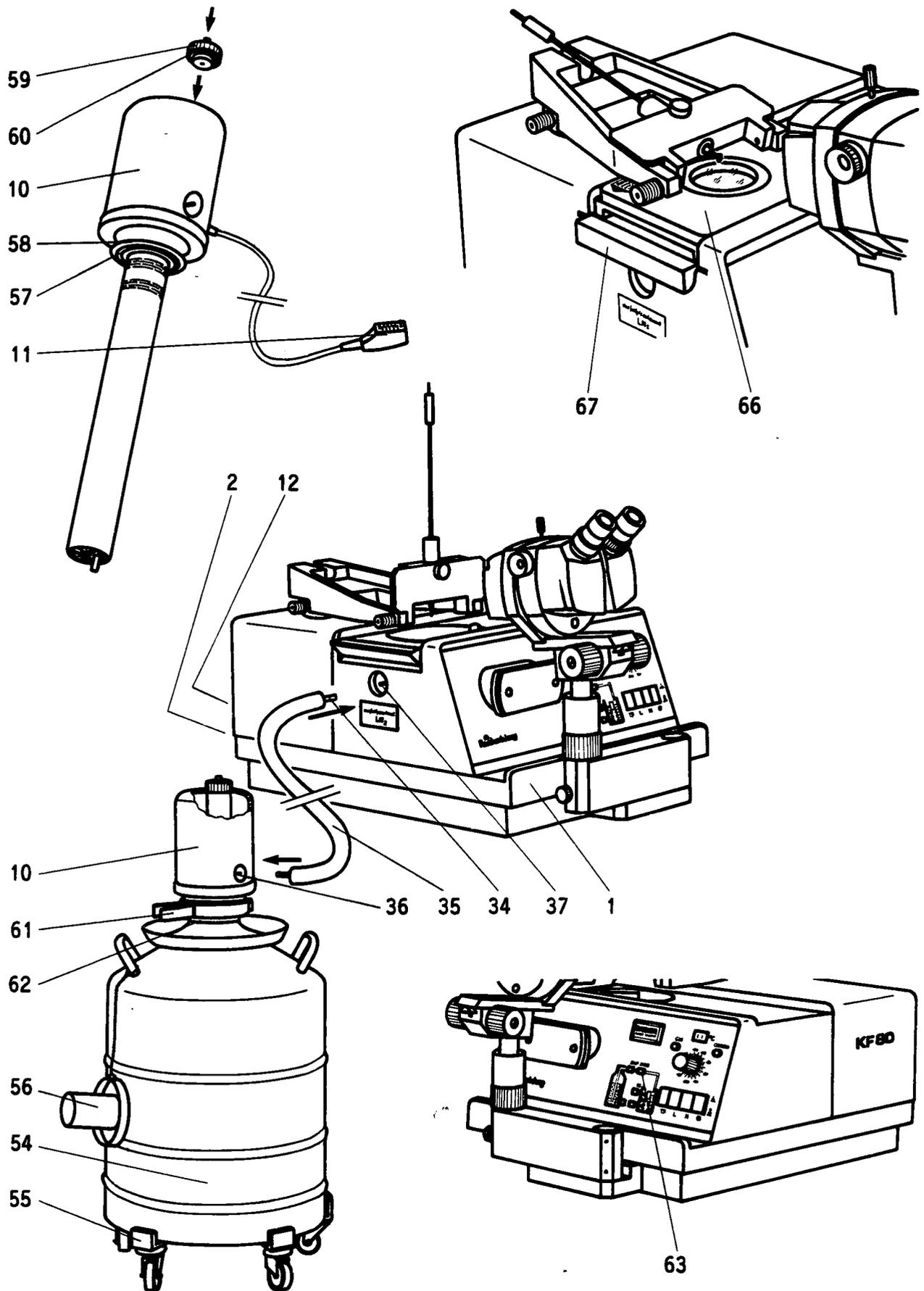
2.1.2.1 AUTOMATISCHES NACHFÜLLEN VON LN₂ UND KRYOGENVERFLÜSSIGUNG

Als Zusatz zum Basisgerät (1) ist eine automatische Nachfülleinrichtung (10) erhältlich. Wenn zum Betrieb der KF 80 eine bereits vorhandene Nachfülleinrichtung von einem REICHERT-JUNG Gefrierschneidsystem FC 4 verwendet werden soll, so muß zunächst eine gedruckte elektrische Karte vom autorisierten Service in das Basisgerät (1) eingebaut werden. Bei Verwendung der automatischen Nachfülleinrichtung wird das Basisgerät am besten so am linken Rand eines Arbeitstisches aufgestellt, daß noch genügend Platz für das Dewargefäß (54) neben dem Tisch bleibt. Wenn der Platz neben dem Tisch nicht für das Dewargefäß ausreicht, so kann dieses auch vor dem Tisch in der Nähe der linken Seite des Basisgeräts (1) aufgestellt werden. Stellen Sie das Dewargefäß (54) auf den Rolluntersatz (55) und öffnen Sie den Deckel (56). Füllen Sie den Dewar (54) bis etwa 15 cm unter den oberen Rand mit flüssigem Stickstoff (LN₂). Setzen Sie die Nachfülleinrichtung (10) erst in den Dewar (54) ein, nachdem Sie sich davon überzeugt haben, daß der Dichtungsring (57) richtig an der Unterseite des Flansches (58) sitzt und daß der Schraubdeckel (59) mit dem dazugehörigen Dichtungsring (60) vollständig geschlossen ist.

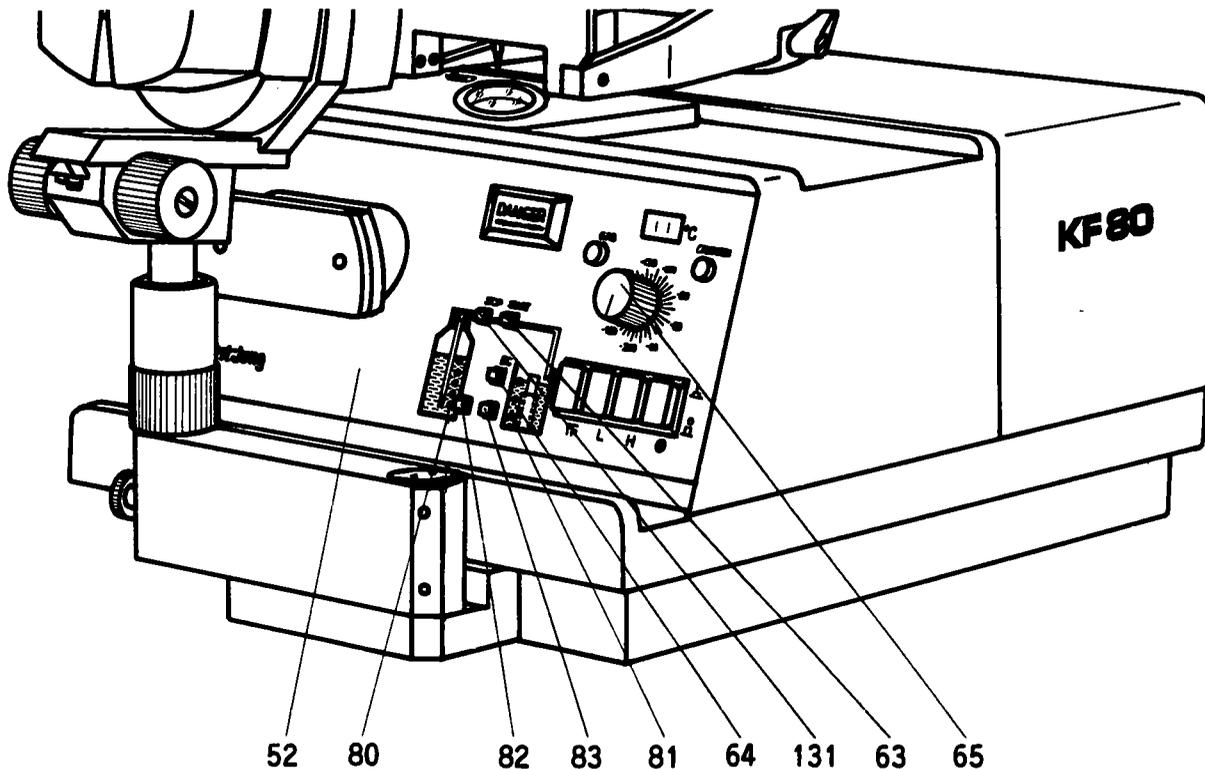
Stecken Sie den Vielfachstecker (11) in die Buchse (12) an der Gehäus-Rückwand (2) des Basisgeräts (1). Verbinden Sie den LN₂-Auslaß (36) der Nachfülleinrichtung (10) und den LN₂-Einlaß (37) des Basisgeräts (1) mit dem steifen Poliamid-Schlauch (34) in der ARMAFLEX-Isolierung.

Bei Beginn des Füllvorganges sollen sowohl der Schiebedeckel mit Glasfenster (66) als auch die Klappe (67) auf der linken Seite des Geräts geöffnet sein.

Führen Sie nun die Nachfülleinrichtung (10) sehr vorsichtig und so langsam in das gefüllte Dewargefäß (54) ein, daß kein LN₂ überkocht. Beim Überkochen von LN₂ heben Sie die Nachfülleinrichtung sofort wieder an und unterbrechen so VOLLSTÄNDIG den Kontakt zwischen Nachfülleinrichtung (10) und flüssigem Stickstoff (LN₂). Danach führen Sie die Nachfülleinrichtung noch einmal sehr langsam ein. Die beiden Flansch-Hälften (58, 62) werden mit der Klemmzange (61) zusammengedrückt und der Dewar druckverschlossen. Das abdampfende Stickstoff-Gas (GN₂) entweicht durch ein offenes Magnetventil aus der Nachfülleinrichtung, bis der START-Knopf (63) gedrückt wird und/oder der Vielfachstecker (11) in die Buchse (12) der Geräterückwand (2) des Basisgeräts (1) gesteckt ist. Mit etwas Übung läßt sich der erste Füllvorgang durch eine rasche Ausführung dieser Schritte abkürzen.



Das Schaubild auf der Bedienungsfrontplatte (52) zeigt nun die Füllstände des Dewargefäßes (80) und beim Verflüssiger (81) an. Je ein Hup- und Blink-Signal warnen den Benutzer, wenn der flüssige Stickstoff im Dewargefäß (82) oder beim Verflüssiger (83) verbraucht ist. Das Hup-Signal kann durch Drücken der Taste (82) oder (83) ausgeschaltet werden, während das zugehörige Lämpchen blinkt, bis LN₂ nachgefüllt wird.



Wenn der Dewar (54) nachgefüllt werden muß, nachdem die KF 80 bereits herunter gekühlt ist, drücken Sie die STOP-Taste (131) und öffnen Sie den Schraubdeckel (59). Nach dem Füllen des Dewars durch diese Öffnung schließen Sie den Schraubendeckel wieder und drücken die START-Taste (63).

Zum schnellen Herunterkühlen (rapid-cooling) drücken Sie die RC-(64) und die START-Taste (63). Wählen Sie mit dem Drehknopf (65) eine Temperatur etwas über dem Gefrierpunkt des verwendeten Kryogens nach der folgenden Tabelle:

GEFRIERPUNKTE VON KRYOGENEN

PROPAN (Haushalts-)	- 187°C +)
Äthan	- 171°C
FREON 13 / FRIGEN 13	- 185°C
FREON 22 / FRIGEN 22	- 155°C
FREON 12 / FRIGEN 12	- 152°C

+) Propan kann Wasser enthalten. Der Gefrierpunkt liegt dann deutlich höher.

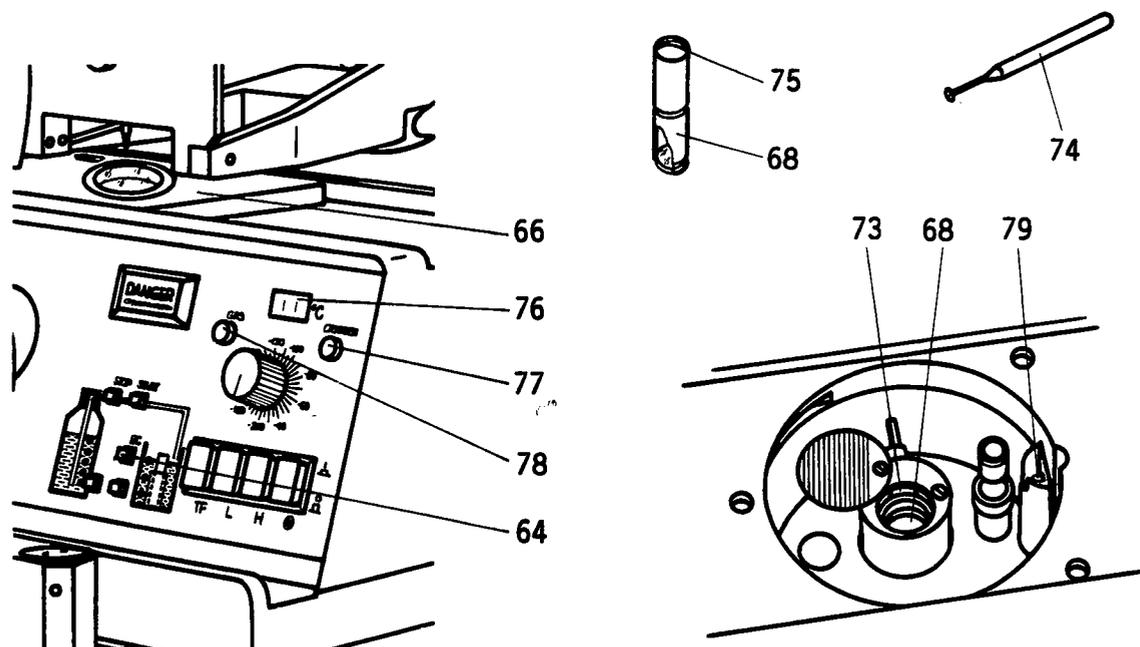
Im allgemeinen ist Propan das am besten geeignete Kryogen. Nur zum anschließenden Gefrierschneiden bei sehr tiefen Temperaturen (-150°C bis -190°C) sollte Äthan wegen seines höheren Dampfdrucks in diesem Temperaturbereich als Kryogen verwendet werden. Bei diesen Temperaturen verdampft Propan nicht vom Präparat. Dies resultiert in einem Schmieren an der Messerschneide, wodurch ein reproduzierbares Schneiden verhindert wird.

Warten Sie, bis die gewünschte Temperatur erreicht ist. Die Temperatur des Verflüssigers wird durch die Digital-Anzeige (76) angegeben, wenn der Knopf CRYOGEN (77) gedrückt und beleuchtet ist. Mit dem Knopf GAS (78) wird die Temperaturmessung zu einem Sensor (79) im gasförmigen Stickstoff oberhalb des Verflüssigers umgeschaltet. Schalten Sie den RC-Knopf (64) wieder aus.

WICHTIG: Überzeugen Sie sich, daß der Kryogen-Behälter mit Glasboden (68) so tief in den Verflüssiger eingesetzt ist, daß der Schlitz (73) über dem Behälter (68) sichtbar ist. Ist der Schlitz (73) nicht sichtbar, so ist der Behälter (68) nicht tief genug eingesetzt. In diesem Fall muß der Behälter (68) **VORSICHTIG** mit dem Manipulator (74) bis auf den Boden des Verflüssigers gedrückt werden, bis der Schlitz (73) sichtbar ist.

Schließen Sie den Deckel mit Glasfenster (66). Dieser Deckel dient als Schutz vor möglichen Kryogen-Spritzern und sollte deshalb beim Verflüssigen immer geschlossen sein. Um ein Beschlagen des Glasfensters zu verhindern bzw. zu beseitigen, verwenden Sie das mitgelieferte Anti-Beschlagatuch. Öffnen Sie das Kryogen-Reduzierventil (32) **LANGSAM**. Nach ca. 10 sec. kann man das verflüssigte Kryogen aus dem Schlitz (73) über dem Kryogenbehälter (68) in diesen hineinlaufen sehen.

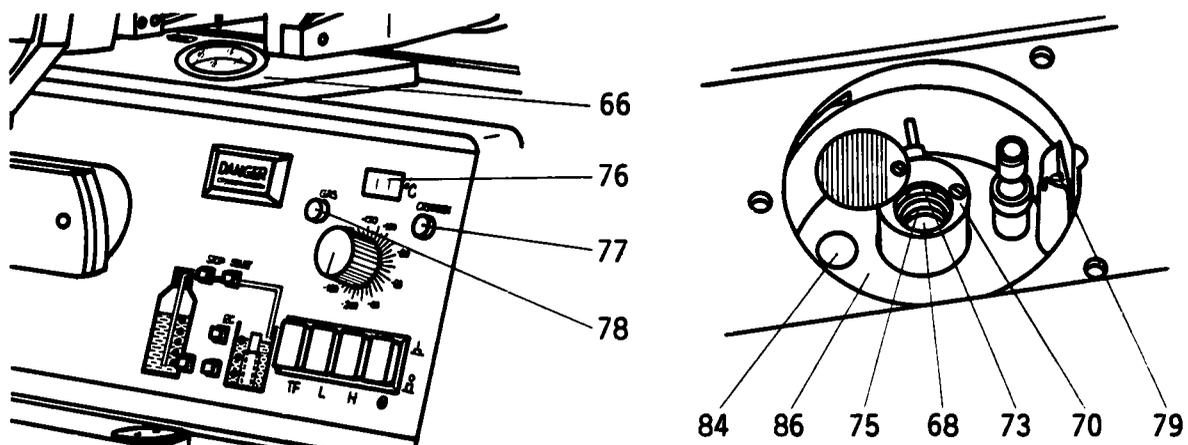
Schließen Sie das Kryogen-Ventil, sobald das flüssige Kryogen die Rille (75) am oberen Ende des Kryogenbehälters (68) erreicht hat. Die Temperatur des Verflüssigers kann durch das einströmende warme Gas so erhöht werden, daß sie beträchtlich über dem Gefrierpunkt des Kryogens liegen kann. In diesem Fall drücken Sie den RC-Knopf (64) noch einmal, bis die gewünschte Temperatur wieder erreicht ist und schalten Sie den RC-Betrieb dann wieder aus.



2.1.2.2 MANUELLES NACHFÜLLEN VON LN2 UND KRYOGENVERFLÜSSIGUNG

Die KF 80 kann ohne die als Zubehör erhältliche automatische Nachfülleinrichtung (10) mit einer 4 bis 5 l Dewar-Kanne wie folgt gefüllt werden:

Gehen Sie zunächst nach den Punkten 2.1 bis 2.1.1 vor. Wählen Sie mit dem Knopf (65) die gewünschte Kryotemperatur. Entfernen Sie den Deckel (133) und stecken den Trichter (19) in die Öffnung (84). Gießen Sie vorsichtig flüssigen Stickstoff (LN2) aus der Dewar-Kanne (85) in den Trichter, bis der LN2-Spiegel gerade die Metallplatte (86) erreicht. Wiederholen Sie dies bis die gewünschte Temperatur erreicht ist. Die Temperatur des Verflüssigers (70) wird auf der Digital-Anzeige (76) angegeben, wenn der Knopf CRYOGEN (77) gedrückt und beleuchtet ist. Mit dem Knopf GAS (78) wird die Temperaturmessung zu einem Sensor (79) im gasförmigen Stickstoff oberhalb des Verflüssigers umgeschaltet. Entfernen Sie den Trichter (19) und schließen Sie den Verflüssiger mit dem Deckel mit dem Glasfenster (66). Dieser Deckel dient als Schutz vor möglichen Spritzern von flüssigen Kryogen und sollte deshalb beim Verflüssigen immer geschlossen bleiben. Um ein Beschlagen des Glasfensters zu verhindern bzw. beseitigen, verwenden Sie das mitgelieferte Anti-Beschlag Tuch (18). Öffnen Sie das Kryogen-Reduzierventil (32) LANGSAM. Nach ca. 10 sec. kann man das verflüssigte Kryogen aus dem Schlitz (73) über dem Kryogenbehälter (68) in diesen hineinlaufen sehen. Schließen Sie das Kryogen-Ventil, sobald das flüssige Kryogen die Rille (75) am oberen Rand des Behälters (68) erreicht. Die Temperatur des Verflüssigers kann durch das einströmende warme Gas so erhöht werden, daß sie beträchtlich über dem Gefrierpunkt des Kryogens liegen kann. In diesem Fall setzen Sie den Trichter (19) nochmals ein und gießen LN2 aus der Dewar-Kanne hinein, bis der LN2-Spiegel gerade die Metallplatte erreicht.



Es steht nun genügend Zeit zur Verfügung (ca. 30 min.), um verschiedene Präparate einzufrieren, bevor ein optisches und akustisches Signal (83) anzeigt, daß LN2 nachgefüllt werden muß. Von nun an wird LN2 NUR durch den Trichter eingefüllt, bis das mittlere Anzeigelämpchen (81) aufleuchtet.

ACHTUNG: Wenn der LN2-Vorrat beim Verflüssiger verbraucht ist, steigt die Temperatur des Kryogens allmählich an. Bei einer Kryogen-Temperatur von -70°C beginnt deshalb ein lauter Hupton, und der große Anzeigenschalter "DANGER CRYOGEN EVAPORATION" (130) blinkt. Der Hupton kann durch Drücken des blinkenden Schalters (130) ausgeschaltet werden. Gehen Sie dann nach dem folgenden Punkt 2.1.3 vor.

2.1.3. ENTSORGEN DES VERFLÜSSIGTEN KRYOGENS

Um mögliche Risiken auszuschalten, muß das verflüssigte Kryogen nach Abschluß der Kryopräparation, oder wenn der LN2-Vorrat verbraucht ist, entsorgt werden.

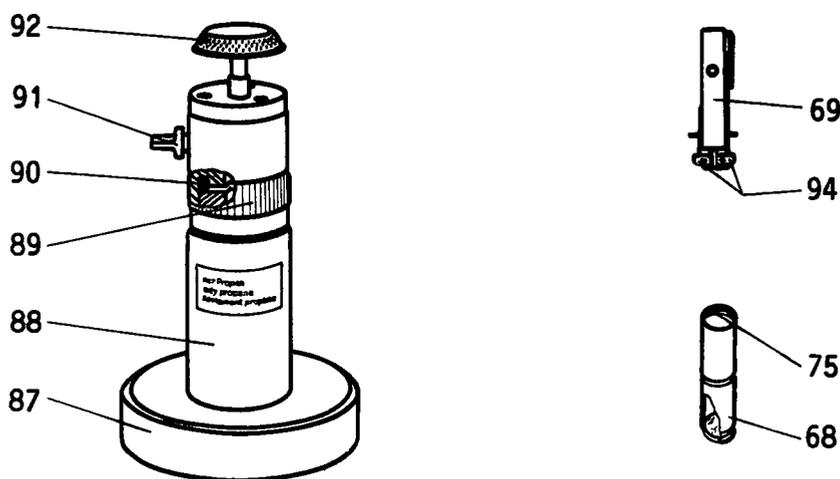
2.1.3.1 ENTSORGEN VON PROPAN

Propan kann gefahrlos mit dem als Zubehör erhältlichen Propanbrenner (87) beseitigt werden, der aus einem Basiszylinder (88) und einem Deckel mit Gewinde (89) besteht.

ACHTUNG: Der Behälter mit diesem Deckel dient AUSSCHLIESSLICH zum Verbrennen von Propan. FÜLLEN SIE NIEMALS IRGEND EIN ANDERES FLÜSSIGES KYROGEN, INSBESONDERE NICHT ÄTHAN, IN DIESEN BRENNER.

ÜBERZEUGEN SIE SICH ZUERST, DASS KEIN PROPAN IM BRENNER IST!
Öffnen Sie dazu LANGSAM das Ventil (91) um zu prüfen, ob Sie GAS ausströmen hören. Wenn dies der Fall ist zünden Sie das Gas an und warten, bis es vollständig verbrannt ist.

öffnen Sie den Schraubdeckel (89) gegen den Uhrzeigersinn und nehmen Sie den eventuell darin befindlichen Kryogen-Behälter (68) heraus. Prüfen Sie, ob der Dichtungsring (90) an seinem Platz und das Ventil (91) geschlossen



ist. Prüfen Sie auch gelegentlich bei abgekühlten Brenner, ob der Brennerkopf (92) fest auf dem Schraubdeckel (89) aufgeschraubt ist (im Uhrzeigersinn!).

Es wird empfohlen, das Übertragen des Propans zunächst mit einem leeren Kryogenbehälter (68) bei Zimmertemperatur zu üben.

ACHTUNG: Der Manipulator (69) steht unter Feder-Vorspannung. Er öffnet, wenn die beiden Arme zusammengedrückt werden und schließt beim Loslassen.

Die beiden blanken Metallplättchen (94) werden in die Rille (75) eingeführt, indem die beiden Arme des Manipulators (69) zusammengedrückt werden. Beim Loslassen schnappen die Plättchen in die Rille (75). Drehen Sie nun den Manipulator um 90°, halten ihn an den nicht beweglichen glatten Seiten und heben Sie den Kryogenbehälter so aus dem Verflüssiger. Stellen Sie den Behälter in den offenen Propan-Brenner und nehmen Sie den Manipulator (69) heraus, indem Sie dessen Arme zusammendrücken.

Falls versehentlich kein Behälter (68) in den Verflüssiger eingesetzt wurde, oder falls er sich nicht herausziehen läßt, gehen Sie weiter vor nach Punkt 2.1.3.3 VERWENDUNG DES SPEZIAL-ENTSORGUNGSBEHÄLTERS und setzen Sie anschließend hier fort.

Prüfen Sie, ob der Dichtungsring (90) eingesetzt und das Ventil (91) geschlossen ist. Schließen Sie den Deckel im Uhrzeigersinn. Lassen Sie das Propan ca. 10 min. aufwärmen, öffnen Sie das Ventil (91) und entzünden Sie das ausströmende Gas. Je nachdem, wie weit das Ventil (91) geöffnet ist, verbrennt das Propan innerhalb von 10 bis 20 min. vollständig.

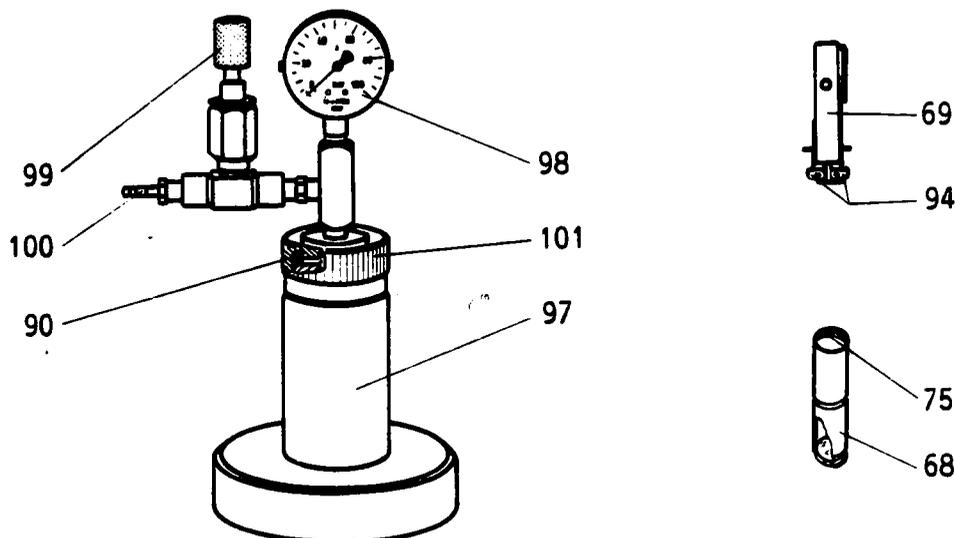
Wenn das Propan aus dem Verflüssiger entfernt ist, vergewissern Sie sich bitte, daß das Kryogen-Reduzierventil vollständig geschlossen ist und setzen Sie bei Punkt 2.4 ABSCHLUSS DER KRYO-ARBEIT fort.

2.1.3.2 ENTSORGUNG VON ÄTHAN UND HALOGENIERTEN KOHLENWASSERSTOFFEN

Äthan und halogenierte Kohlenwasserstoffe (FREON/FRIGEN) werden wie in Punkt 2.1.3.1 beschrieben in den Entsorgungsbehälter (97) überführt. Der Deckel (101) darf nur geöffnet werden (gegen den Uhrzeigersinn), wenn das Manometer (98) keinen Druck anzeigt. Sollte Druck angezeigt werden, so kann das Kryogen entweder wieder verflüssigt oder der Entsorgungsbehälter wird in einen Abzug gebracht und das Ventil (99) geöffnet werden, bis das Manometer keinen Druck mehr anzeigt. Zur Wiederverflüssigung stecken Sie den flexiblen Silikon Schlauch (30) auf den Auslaßstutzen (100) und kühlen die KF80 herunter wie in Punkt 2.1.2 beschrieben. Öffnen Sie dann LANGSAM das Ventil (99).

WICHTIG: Wenn das verflüssigte Kryogen bei eingeschalteter Beleuchtung im Verflüssiger nicht absolut klar erscheint, sondern milchig-trübe, enthält es zuviel Feuchtigkeit und sollte nicht mehr für die Kryofixation verwendet werden.

Nur wenn das Manometer (98) keinen Druck anzeigt, darf der Deckel (101) gegen den Uhrzeigersinn abgeschraubt werden. Falls bereits ein Kryogenbehälter (68) eingesetzt ist, nehmen Sie ihn heraus. Überprüfen Sie den richtigen Sitz des Dichtungsringes (90). Es wird empfohlen, das Übertragen von Äthan oder halogenierten Kohlenwasserstoffen zunächst mit einem leeren Behälter (68) zu üben.

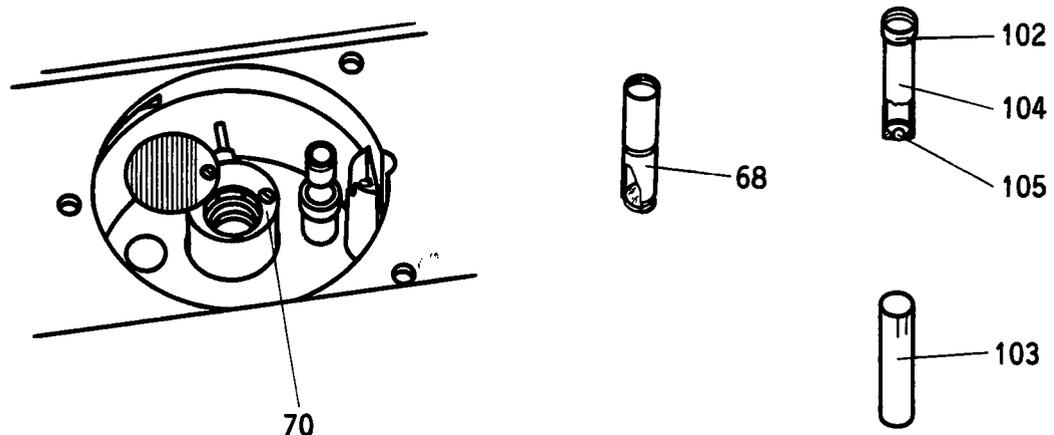


ACHTUNG: Der Manipulator (69) steht unter Feder-Vorspannung. Er öffnet, wenn die beiden Arme zusammengedrückt werden und schließt beim Loslassen. Die beiden blanken Metallplättchen (94) werden in die Rille (75) eingeführt, indem die beiden Arme des Manipulators (69) zusammengedrückt werden. Beim Loslassen schnappen die Plättchen in die Rille (75). Drehen Sie nun den Manipulator um 90°, halten ihn an den nicht beweglichen glatten Seiten und heben Sie den Kryogenbehälter so aus dem Verflüssiger. Stellen Sie den Behälter in den offenen Propan-Brenner und nehmen Sie den Manipulator (69) heraus, indem Sie dessen Arme zusammendrücken. Falls versehentlich kein Behälter (68) in den Verflüssiger eingesetzt wurde, oder falls er sich nicht herausziehen läßt, gehen Sie weiter vor nach Punkt 2.1.3.3 VERWENDUNG DES SPEZIAL-ENTSORGUNGSBEHÄLTERS und setzen Sie anschließend hier fort. Schließen Sie den Deckel (101) um Uhrzeigersinn und das Ventil (99). Stellen Sie den Entsorgungsbehälter in einen Abzug und öffnen Sie das Ventil (99) oder heben Sie das Kryogen zur späteren Wiederverflüssigung auf.

2.1.3.3 VERWENDUNG DES SPEZIAL-ENTSORGUNGSBEHÄLTERS

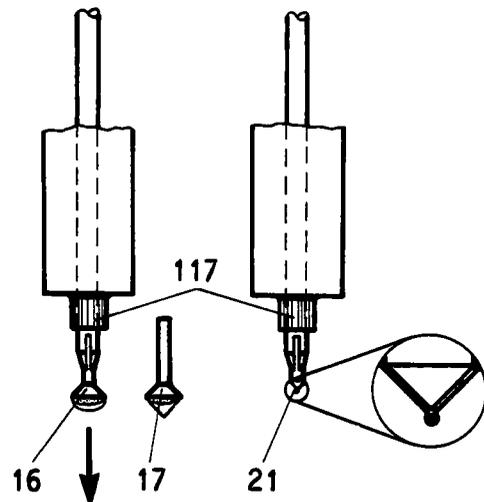
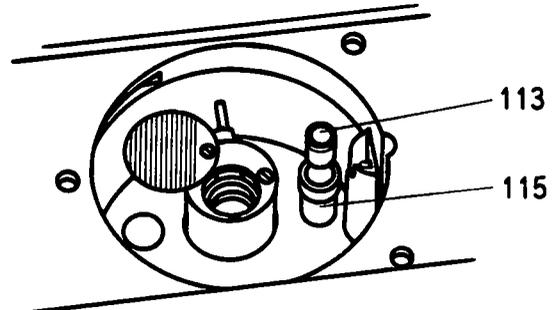
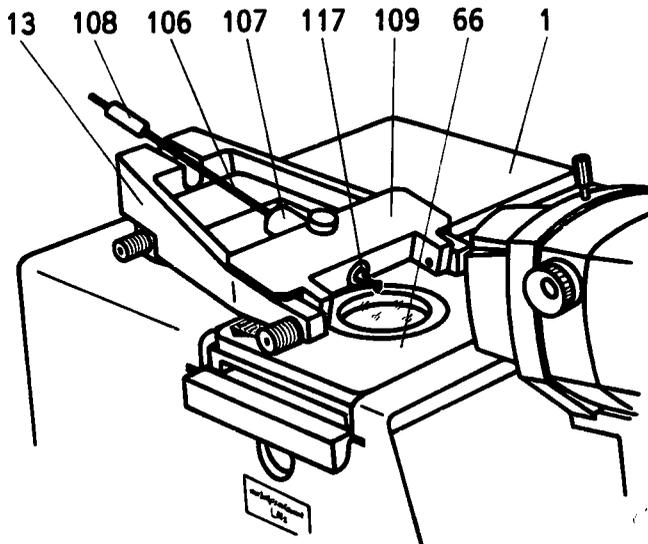
Der Spezial-Entsorgungsbehälter (102) wird benötigt, wenn:

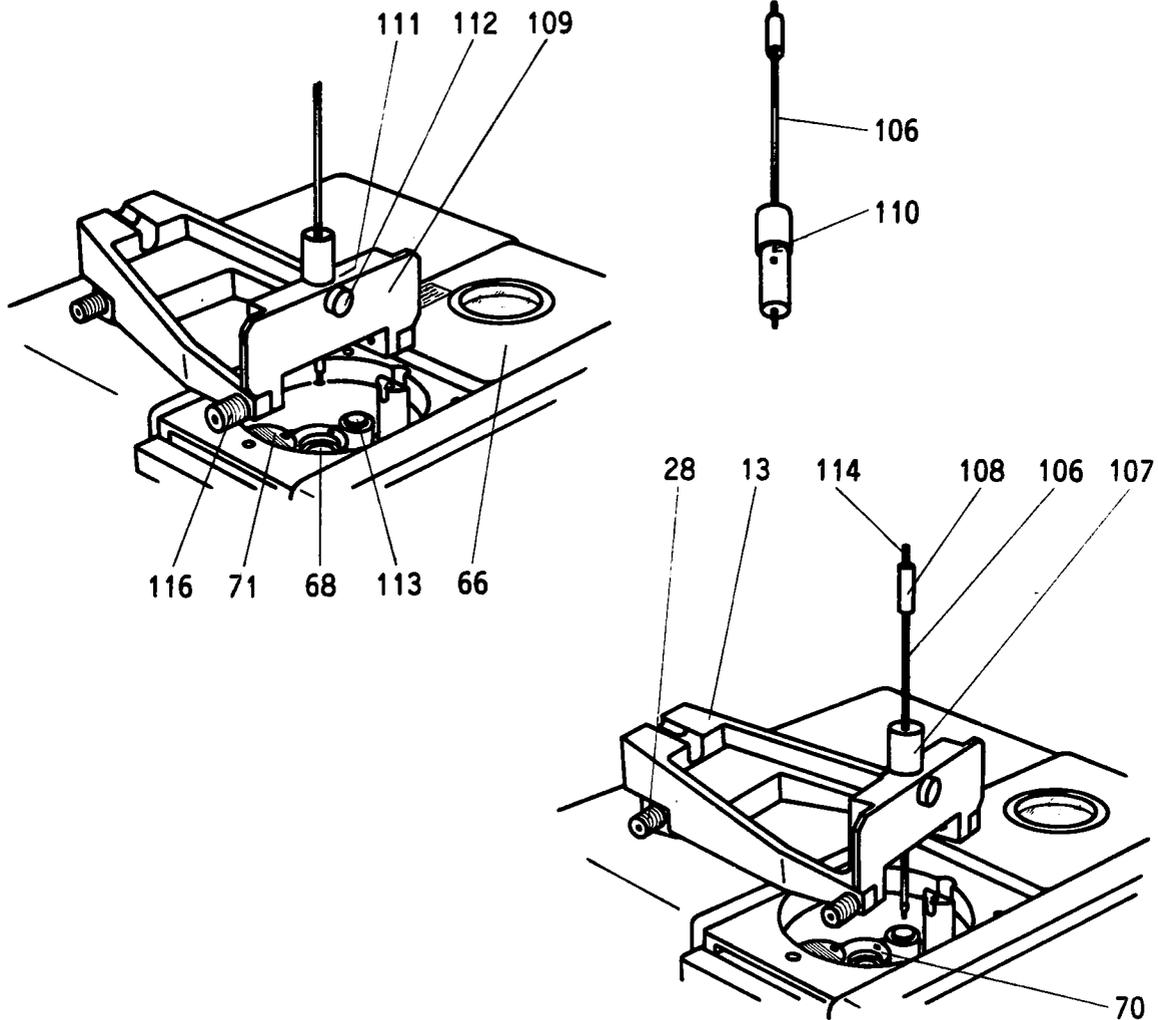
- a. vergessen wurde, den Behälter (68) vor dem Verflüssigen nach 2.1.2 einzusetzen. In diesem Fall wird der komplette Behälter (102), bestehend aus zwei konzentrischen Röhrchen mit einem Kugelventil am Boden, mit dem Manipulator (69) in den Verflüssiger eingesetzt. Drücken Sie den Behälter fest zum Boden des Verflüssigers (70), damit sich das Kugelventil (105) am Boden öffnet und das Kryogen in den Behälter fließt. Mit Propan verfahren Sie weiter nach 2.1.3.1, mit anderen Kryogenen nach 2.1.3.2.
- b. der Behälter (68) im Verflüssiger (70) festgefroren ist und sich nicht herausziehen läßt. Dies kann vorkommen, wenn das Gerät vor dem Verflüssigen nicht ausgeheizt wurde. In diesem Fall entfernen Sie die äußere Hülse (103) des Spezialbehälters (102) von der inneren Hülse (104). Setzen Sie die innere Hülse in den Behälter (68) im Verflüssiger (70) ein, und drücken Sie ihn bis auf den Boden des Verflüssigers. Dabei öffnet sich das Kugelventil (105), und das Kryogen strömt in dem Spezialbehälter. Nehmen Sie den Spezialbehälter nun wieder aus dem Verflüssiger heraus. Mit Propan verfahren Sie weiter nach 2.1.3.1. mit anderen Kryogenen nach 2.1.3.2.



2.2 VERWENDUNG DES INJEKTORS SH (13) FÜR PRÄPARATSTIFTE

Zur Immersions-Kryofixation von Präparaten auf Stiften für die anschließende Kryo-Ultramikrotomie (REICHERT-JUNG Gefrierschneide-EINRICHTUNG FC F 4 D) oder zur Entwässerung bei tiefen Temperaturen (cryo dehydration) d.h. Gefriersubstitution (REICHERT-JUNG Kryosubstitutionsgerät CS-auto) oder Gefriertrocknung, wird der Injektorträger SH (13) nach 2.2.3 am Basisgerät (1) befestigt. Setzen Sie den Transferbehälter (113) mit einer Pinzette in die Öffnung (115) und füllen Sie ihn mit LN₂, indem Sie ihn mit einem Holzstäbchen (95) nach unten drücken. Prüfen Sie, ob sich verflüssigtes Kryogen im Behälter (68) befindet. Spannen Sie die Feder des Injektors, indem Sie die weiße Hülse (107) mit einer Hand halten und mit der anderen am schwarzen Kunststoffgriff (108) ziehen, bis Sie ein Klicken hören und die Federkraft nicht mehr spüren. Heben Sie den Rahmen (109) des Injektorträgers (13) aus der horizontalen Lage an, bis er in der vertikalen Position einrastet. Setzen Sie den Injektorstab (106) mit dem Orientierungsbolzen (110) nach vorn in die Öffnung des Rahmens (109) so ein, daß der Bolzen (110) in die zugehörige Nute (111) paßt. Ziehen Sie den Entriegelungsknopf (116) heraus und kippen den Rahmen (109) wieder in die horizontale Lage. Kleinere Präparate können auf den Stift (16) aufgebracht werden. Der Stift (21) dient zum Einfrieren von Suspensions-Mikrotropfen und kann NUR in Verbindung mit den neuen FC 4 D-Spannzangen-Halter verwendet werden, die ab 1986 ausgeliefert werden. Größere Präparatblöckchen mit Durchmesser bis zu 3 mm werden auf den Stift (17) gegeben, die Bohrung in diesem Stift ist zur Aufnahme von Fasern vorgesehen. Um die Haftung der Präparate auf den Stiften beim Einfrieren zu verbessern, sollte ein geeigneter Kryo-Klebstoff (20) (z.B. TISSUE-Tek, Saccharose, Gelatine oder Blut-Plasma) verwendet werden. Stecken Sie den Präparatträger-Stift mit der Pinzette (118) in die Aufnahmebohrung (117) des Injektorstabes (106) und halten Sie dabei die weiße Kunststoffhülse (107) fest.

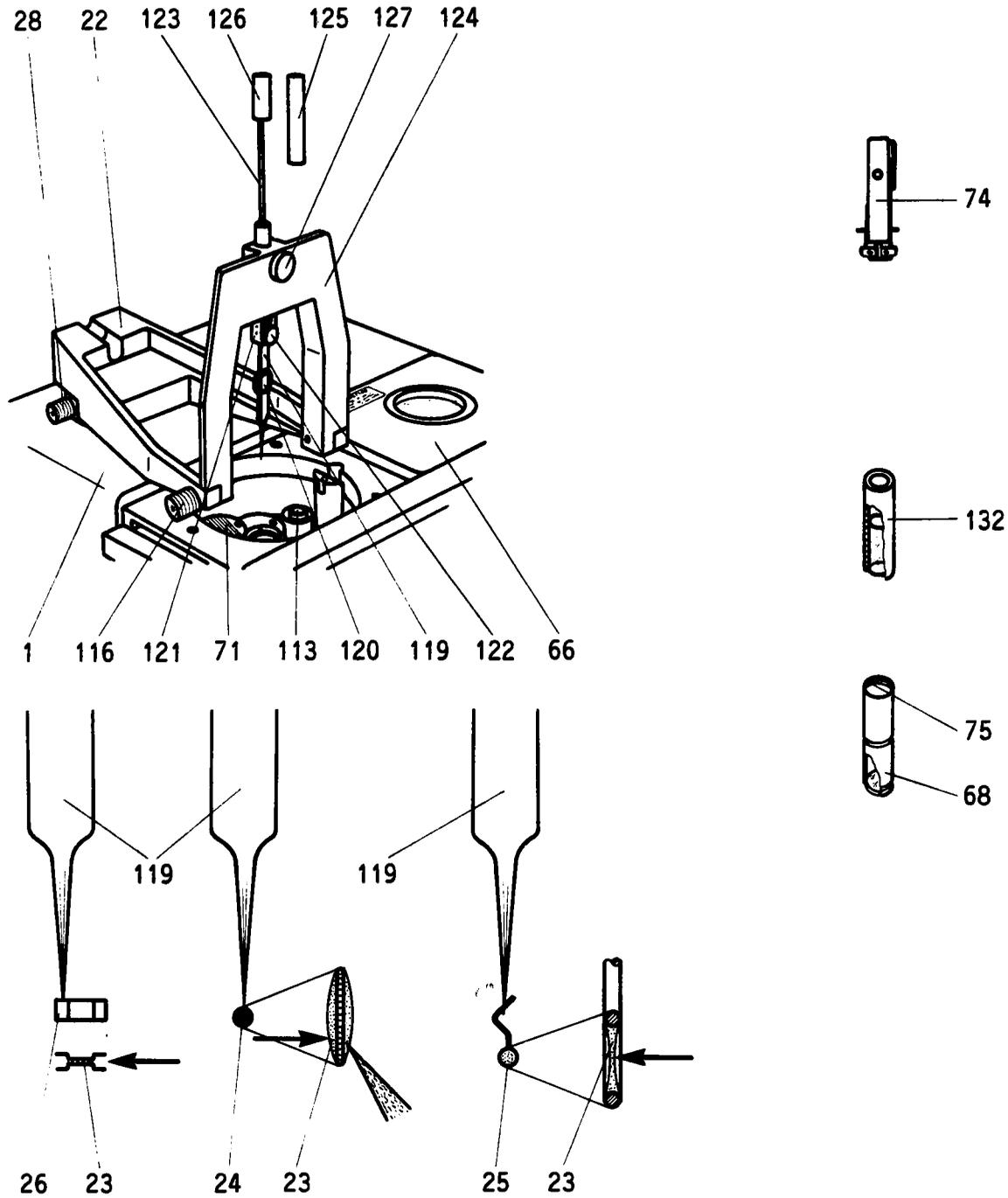




Prüfen Sie, ob der schwarze Deckel (71) geöffnet, d.h. das Licht durch das Kryogen sichtbar ist. Heben Sie den Rahmen (109) des Injektorträgers von der horizontalen Lage an, bis er in der vertikalen Position einrastet. Legen Sie eine Hand auf den Deckel mit Glasfenster (66) und den Daumen der anderen Hand auf den Auslöseknopf (112). Schieben Sie nun den Deckel auf die rechte Seite des Instruments und drücken Sie den Auslöseknopf (112), sobald der Deckel (66) den Injektionsweg freigibt. Wenn der Transferbehälter (113) noch nicht mit LN₂ gefüllt ist, drücken Sie ihn mit dem Holzstäbchen (95) nach unten. Halten Sie die weiße Hülse (107) mit einer Hand, ziehen Sie den Injektorstab (106) nach oben, bis die Spitze des Präparats sich gerade über dem Verflüssiger (70) befindet. Ziehen Sie den Entriegelungsknopf (28) heraus und schwenken Sie den Injektorträger (13) so nach rechts, bis der Injektorstab (106) über dem Transferbehälter (113) steht. Halten Sie den schwarzen Kunststoffbehälter (108) zwischen Mittel- und Zeigefinger und drücken Sie mit dem Daumen auf den Ausstoßer (114). Der Stift mit dem gefrorenen Präparat fällt nun in den Transferbehälter (113). Der Behälter (113) mit dem Präparat im LN₂ kann nun mit einer Pinzette zur Anschlußpräparation gebracht werden. Legen Sie den vorderen metallischen Teil des Injektorstabs (106) zum Aufwärmen und Trocknen auf eine Heizplatte. Schieben Sie den Deckel (66) nach links über den Verflüssiger, schwenken Sie den Injektorträger (13) zurück nach links, bis er einrastet und verwenden Sie den zweiten Injektor für die nächste Kryofixation. Nach Abschluß der Kryo-Arbeit beseitigen Sie das Kryogen nach 2.1.3.

2.3 VERWENDEN DES PINZETTEN-INJEKTORS BG (22) (bare grid)

Zur Immersionsfixation von Suspensionen (23) wird der Injektorträger BG (22) wie in 2.2.4 beschrieben am Basisgerät montiert. Weil Äthan das teuerste sekundäre Kryogen ist, kann das zur Kryofixation mit dem Pinzetteninjektor benötigte Volumen vor dem Verflüssigen mit dem Verdrängungskörper (132) auf 3 ml reduziert werden. Um das Vorkühlen des Präparates durch kaltes Gas minimal zu halten, wird der Kryogenbehälter (68) kurz vor der eigentlichen Injektion mit dem Manipulator (74) in der Rille (75) bis knapp unter den Deckel mit Glasfenster (66) angehoben.



Damit die Pinzette (119) bei der Injektion nicht auf den Boden des Kryogenbehälters aufschlägt, muß der Injektionsweg verkürzt werden, wenn der Kryogenbehälter (68) angehoben ist. Dies wird bei Verwendung des langen (7 cm) Handgriffs (125) am Ende des Injektors (123) erreicht. Wenn der Behälter bei der Kryofixation nicht angehoben wird, muß der kurze (3cm) Handgriff (126) auf das Ende des Injektors (123) geschraubt werden, sonst taucht das Präparat bei der Injektion nicht ins Kryogen ein. Wählen Sie nun einen für Ihr Präparat geeigneten Träger.

- 2.3.1 Zur Kryofixation von Suspensionen und anschließender Untersuchung im Kryoelektronenmikroskop werden unbefilmte Netze mit Lochfolie nach AKIRA und ADACHI +) verwendet. In beiden Fällen sollten die Netze vor dem Aufbringen der Suspension durch Beglimmen hydrophil gemacht werden.
- 2.3.2 Suspensionstropfen, die in kleinen selbstgemachten Drahtösen (25) eingefroren wurden, können anschließend kryo-substituiert werden.
- 2.3.3 Für Gefrierbruch und Gefrierätzung wird das Präparat zwischen zwei Metallträgerplättchen (z.B. BALZERS BUO 12054 T und BUO 12056 T) gebracht. Ein Plättchen wird mit der Pinzette (119) und den Schieber (120) fixiert, das zweite wird aufgelegt und hält durch Adhäsion.
- 2.3.4 KRYOFIXATION

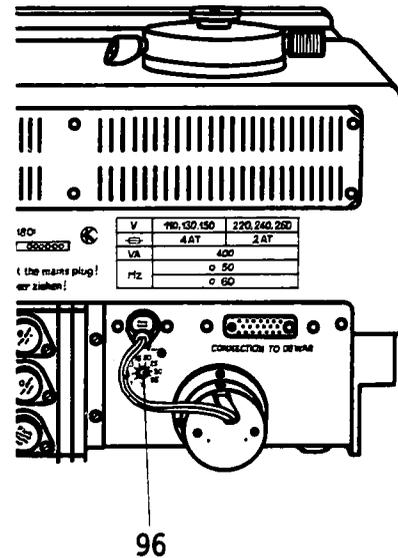
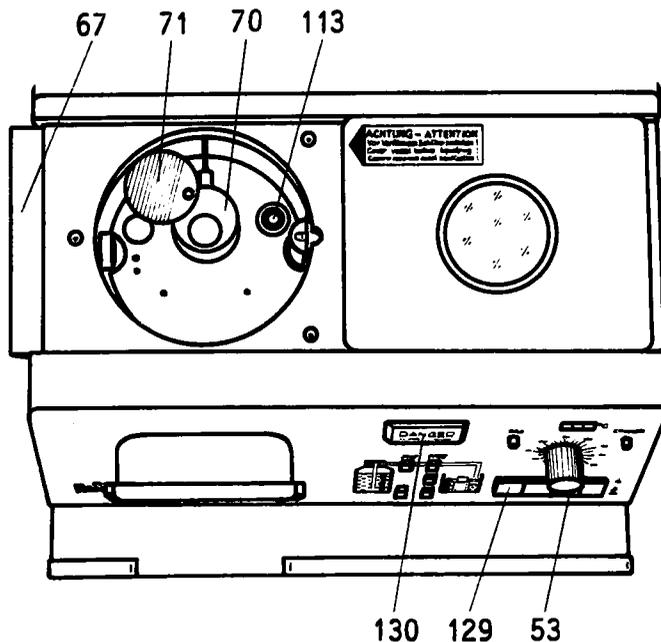
Spannen Sie die Feder des Injektors durch Ziehen am Handgriff (125) bzw. (126). Setzen Sie einen Objektträger (24,25,26) in die Pinzette BG (119) ein und klemmen ihn mit dem Schieber (120) fest. Bringen Sie nun die Pinzette BG (119) horizontaler Injektorbrücke (124) in die Führung (121) des Injektors (123) und drehen Sie die Rändelschraube (122) fest. Ziehen Sie den Entriegelungsknopf (28) heraus und schwenken den Injektorträger (22) nach rechts. Prüfen Sie, ob das Kryogen nach 2.1.2.1 oder 2.1.2.2 verflüssigt wurde und die angezeigte Temperatur knapp über dem Gefrierpunkt des Kryogen liegt. Vergewissern Sie sich, daß der lange Handgriff (125) am Ende des Injektors (123) befestigt ist. Heben Sie den Kryogenbehälter (68) mit dem Manipulator (74) in der Rille (75) an, bis er etwa auf halber Höhe einrastet. In dieser Position liegt der obere Rand des Behälters (68) gerade unter dem Deckel mit Glasfenster (66). Legen Sie ein kleines Stück Filterpapier auf den schwarzen Deckel (71) und schieben Sie den Deckel (66) über den Verflüssiger.

Schwenken Sie nun den Injektorträger (22) nach links, bis er einrastet. Bringen Sie den Suspensions-Mikrotropfen (ca 5 µl) auf den Objektträger und ziehen überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier ab. Heben Sie die Injektorbrücke (124) bis zur vertikalen Position an. Legen Sie eine Hand auf den Deckel und Daumen der anderen Hand auf den Auslöseknopf (127).

Schieben Sie den Deckel (66) nach rechts und drücken Sie den Auslöseknopf, sobald der Deckel (66) den Injektionsweg freigibt. Schließen Sie die Klappe (67) und schalten Sie die Zusatzkühlung für den Kryotransfer mit der Taste TF (129) und "GAS" (78) ein. Drücken Sie den Kryogenbehälter mit dem Manipulator (74) ganz nach unten. Prüfen Sie, ob das gefrorene Präparat so hoch über dem Verflüssiger steht, daß der schwarze Deckel (71) mit dem Holzstäbchen (95) geschlossen werden kann, ohne das Präparat zu berühren. Nehmen Sie den Halter (125) oder (126) mit einer Hand und drücken Sie mit dem Manipulator (74) den

+)Fukami AKIRA und Koiche ADACHI:
Journal of Electron Microscopy, Vol 14, No. 2, 112-119 (1965)

Schieber (120) nach oben, bis sich die Pinzette öffnet und das Präparat auf das Filterpapier auf den schwarzen Deckel (71) fällt. Überschüssiges Kryogen wird durch das Filterpapier abgesaugt. Spannen Sie die Feder des Injektors durch Ziehen am Handgriff (125) oder (126). Ziehen Sie den Entriegelungsknopf (116) und bringen Sie die Injektorbrücke (124) in die horizontale Position. Ziehen Sie den Entriegelungsknopf (28) heraus und schwenken Sie den Injekorträger nach rechts. Das Präparat kann nach den Anweisungen der Hersteller von Kryotransfer-Einrichtungen transferiert werden. Schalten Sie nach dem Kryotransfer die Taste (129) wieder aus und öffnen Sie die Klappe (67). Öffnen Sie die Rändelschraube (122) und nehmen Sie die Pinzette (119) heraus, um sie für die nächste Injektion zu wärmen und zu trocknen. Sandwich-Präparate und Präparate in Drahtösen werden unter LN₂ im Transferbehälter (113) übertragen. Dieser Behälter wird zunächst mit einem Holzstäbchen (95) nach unten gedrückt und so mit LN₂ gefüllt. Sandwich-Präparate oder Drahtösen werden mit einer vorgekühlten Pinzette in den Transferbehälter (113) gegeben und können nun zur Anschlußpräparation transferiert werden.



2.4. ABSCHLUSS DER KRYO-ARBEIT

Nach Abschluß der Kryo-Arbeit wird das Kryogen nach 2.1.3. entsorgt und das Gerät durch Drücken der Taste H (53) ausgeheizt. Schalten Sie den Hupton durch Drücken des großen Anzeigenschalters (130) aus. Die Temperatur des Verflüssigers (70) steigt nun langsam an. Bei -70°C beginnt das Hup-Signal noch einmal und der große Anzeigen-Schalter (130) DANGER CRYOGEN EVAPORATION blinkt. Der Hup-Ton zeigt an, daß das Kryogen spätestens jetzt entsorgt werden muß; er läßt sich durch Drücken des großen Anzeigen-Schalters (130) ausschalten. Vergewissern Sie sich, daß das Kryogen-Reduzierventil am Kryogenbehälter fest geschlossen ist. Die Heizung des Geräts schaltet sich automatisch nach zwei Stunden ab. Die Dauer des Ausheizvorgangs läßt sich mit einem Schraubendreher am Potentiometer (96) der Rückwand (2) einstellen.

Falls die automatische Nachfüllungseinrichtung (10) benutzt wurde, heben Sie diese aus dem Dewar (54) heraus und setzen den Stopfen (56) wieder ein.

3. LISTE DER BAUELEMENTE

(1) Basisgerät	(51) Hauptschalter
(2) Rückwand	(52) Frontplatte
(3) Spannungswahlschalter	(53) Heizeaste
(4) elektrische Spannung	(54) Dewargefäß
(5) Lampenhalter	(55) Rollenuntersatz
(6) Fassung	(56) Deckel
(7) Inbusschraube	(57) Dichtungsring
(8) Orientierungsnut	(58) Flansch
(9) Stecker	(59) Schraubdeckel
(10) automatische Nachfülleinrichtung	(60) Dichtungsring
(11) Vielfachstecker	(61) Klemmzange
(12) Buchse	(62) Flansch
(13) Injektorträger SH	(63) START-Taste
(14) Sockel	(64) RC-Taste
(15) Präparat Block	(65) Drehknopf
(16) Präparat Stift	(66) Glasfenster
(17) Präparat Stift	(67) Klappe
(18) Anti-Beschlag Tuch	(68) Kryogen-Röhrchen
(19) Trichter	(69) Manipulator
(20) Kryo-Klebstoff	(70) Verflüssiger
(21) Suspension-Mikrotropfen	(71) Schwarzer Deckel
(22) Injektorträger BG	(72) Schalter L
(23) Suspension	(73) Schlitz
(24) Netz	(74) Manipulator
(25) Drahtöse	(75) Rille
(26) Sandwich-Präparat	(76) Digital-Anzeige
(27) Montage-Platte	(77) Knopf KRYOGEN
(28) Entriegelungsknopf	(78) Knopf GAS
(29) Klemmhebel	(79) Sensor
(30) Silikon-Schlauch	(80) Füllstandsanzeige Dewar
(31) Kryogen-Einlaß-Stutzen	(81) Füllstandsanzeige Verflüssiger
(32) Reduzier-Ventil	(82) AUS-Taste Hup-Signal DEWAR
(33) Kryogen-Behälter	(83) AUS-Taste Hup-Signal Verflüssiger
(34) Polyamid-Schlauch	(84) Öffnung
(35) ARMAFLEX-Isolierung	(85) Dewar-Kanne
(36) LN2-Auslaß	(86) Metallplatte
(37) LN2-Einlaß	(87) Propanbrenner
(38) STEREOSTAR Mikroskop	(88) Basiszylinder
(39) Mikroskopträger	(89) Schraubdeckel
(40) Schwenkarm	(90) Dichtungsring
(41) Schraube	(91) Ventil
(42) Achse	(92) Brennerkopf
(43) Inbusschraube	(93)
(44) Gewindebohrung	(94) Metallplättchen
(45) Öffnung	(95) Holzstäbchen
(46) Fokussierknopf	(96) Potentiometer
(47) Schraube	(97) Entsorgungsbehälter
(48) Rändelhülse	(98) Manometer
(49) Deckel	(99) Ventil
(50) Schraube	(100) Auslaß-Stutzen

- (101) Deckel
- (102) Spezialbehälter
- (103) Äußere Hülse
- (104) Innere Hülse
- (105) Kugelventil
- (106) Injektorstab
- (107) Hülse
- (108) Kunststoffgriff
- (109) Rahmen
- (110) Orientierungsbolzen
- (111) Nut
- (112) Auslöseknopf
- (113) Transferbehälter
- (114) Ausstoßer
- (115) Öffnung
- (116) Entriegelungsknopf
- (117) Aufnahmebohrung
- (118) Pinzette
- (119) Pinzette BG
- (120) Schieber
- (121) Führung
- (122) Rändelschraube
- (123) Injektor
- (124) Injektorbrücke
- (125) Handgriff lang
- (126) Handgriff kurz
- (127) Auslöseknopf
- (128)
- (129) TF-Taste
- (130) Anzeige Schalter
- (131) STOP-Taste
- (132) Verdrängungskörper