

Embedding of *Oxyrrhis marina* for TEM (by Erhard Rhiel)

Day 1

- harvest the cells from 800–1000 ml of culture medium by centrifugation (we use an Eppendorf 5810R refrigerating centrifuge equipped with an A-4-62 swinging bucket rotor, and centrifuge for 10 min at 100×g)
- fix the cells for 2 h at room temperature using either 4 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M Na–K phosphate buffer (pH 7) containing 0.05 % (w/v) ruthenium red or 4 % (v/v) glutaraldehyde in f/2 medium containing 20 mM Na–K phosphate buffer (pH 7) and 0.05 % (w/v) ruthenium red
- wash the cells four/five times with 0.1 M Na–K phosphate buffer (pH 7); centrifuge them in between (we use a rather old table top centrifuge equipped with a swinging bucket rotor, and centrifuge for 5 min at 1000 rpm)
- perform a post-fixation step for 1.5–2 h in 1 % (v/v) OsO₄
- wash the cells four/five times with 0.1 M Na–K phosphate buffer (pH 7); centrifuge them in between
- dehydrate the cells in a graded ethanol series. Note: you can add 2 % (w/v) uranyl acetate during the 50 % ethanol step
- 30 min., 30 % EtOH
- 60 min., 50 % EtOH with 2% Uranylacetat
- 30 min., 70 % EtOH
- over night, 70 % EtOH

Day 2

- 30 min., 80 % EtOH
- 30 min., 90 % EtOH
- 30 min., 100 % EtOH
- 1 h, 100 % EtOH
- 1 h, EtOH:Spurr (2:1)
- 2 h, EtOH:Spurr (1:1)
- 2 h, EtOH:Spurr (1:2)
- 2 h, Spurr resin (pure)
- Incubate over night in fresh Spurr resin (pure) at room temperature and under the hood

Day 3 (Embedding of the samples in epoxy resin according to Spurr)

- centrifuge for 10 min and at 1400 rpm
- resuspend in fresh Spurr in small cups
- spin down the cells to the bottom by centrifugation
- incubate 2h at 40 °C followed by 70 °C over night

Literature:

Spurr AR, 1969: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26:31–43

TEM-Einbettung von *Oxyrrhis marina* (Protokoll von Erhard Rhiel)

Tag 1

- ca. 800-1000 ml Gesamtvolumen einer Kultur
- die Kultur abzentrifugieren, 15 min., 2000-3000 rpm
- die Zellen von den Zentrifugenbechern vereinen (ca. 2-4 ml)
- mit 20 ml Fixierlösung versetzen

Fixierlösung	
0.2 M Na/K-PP, pH 7.2	2 ml
f/2 Medium	ad 20 ml
25 % GA	3.2 ml (4 % final)
Rutheniumrot (0,01g/ml dest.Wasser)	0.5 ml
final volume	20 ml

Merke: für 0.2 M
NaH₂PO₄/K₂HPO₄ Posphatpuffer:
5.52 g NaH₂PO₄ x 1H₂O / 200 ml,
bzw. 9.12 g K₂HPO₄ x 3H₂O / 200
ml ansetzen. Base vorgeben und
mit Säure den pH einstellen

- Fixierung: 2h; in 2 Pyrex-Reagenzgläsern; jeweils ca. 12 ml pro Röhrchen
- waschen in 0.1 M Na/K-PP pH 7.5; 5 x waschen; jeweils ca. 8 ml Puffer pro Reagenzglas; jeweils ca. 15 min. in Puffer belassen; dann zentrifugieren für 8 min., bei 30 % (ca. 1000 rpm)
- OsO₄-Nachkontrastierung: 2h; 1 % OsO₄ (in dest.Wasser)
- waschen in 0.1 M Na/K-PP; 4 x waschen; jeweils ca. 5-7 ml Puffer pro Reagenzglas; jeweils ca. 15 min. in Puffer belassen; dann zentrifugieren für 5 min., bei 30 % (ca. 1000 rpm)
- 30 min., 30 % EtOH
- 60 min., 50 % EtOH mit 2% Uranylacetat
- 30 min., 70 % EtOH
- über Nacht, 70 % EtOH

Merke: alle Zentrifugationen jeweils
für 5 min. bei 30 % (ca. 1000 rpm)

Tag 2

- 30 min., 80 % EtOH
- 30 min., 90 % EtOH
- 30 min., 100 % EtOH
- 1 h, 100 % EtOH
- 1 h, EtOH:Spurr (2:1)
- 2 h, EtOH:Spurr (1:1)
- 2 h, EtOH:Spurr (1:2)
- 2 h, Spurr (pur)
- über Nacht, Spurr (pur), bei R.T. unter dem Abzug

Merke: bis zum EtOH:Spurr 1:2
wird jeweils für 5 min. bei 30 %
(1000 rpm) zentrifugiert. Ab reinem
Spurr dann 10 min bei ca. 35 %
(1200 rpm). Für das Spurr (über
Nacht) wird schließlich 2x10 min.
bei 35 % (1200 rpm) zentrifugiert

Tag 3

- zentrifugieren ca. 10 min. bei ca. 35 % (1400 rpm)
- mit frischem Spurr in kleine Cups einfüllen
- kleine Cups in Eppendorf-Cups stellen und diese dann in kleiner Tischzentrifuge (5000 rpm) zentrifugieren
- dabei jeweils ca. 1 min. zentrifugieren, die Cups dann um 90 ° drehen und erneut zentrifugieren; dadurch kommen die Zellpellets gut in die Spitzen der kleinen Cups
- ca. 2 h bei 40 °C inkubieren
- aushärten bei 70 °C über Nacht