

Příprava vzorků pro histologická vyšetření

- Biologický materiál
 - odběr, zpracování
- Příprava vzorku
 - fixace, zalévání, krájení
- Barvení
 - histologická, IHC, ISH

Josef Jaroš, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie
LF MU Brno

Druhy biologického materiálu

- K laboratorním vyšetřením se odebírají tělní tekutiny, tělesné sekrety, exkrementy a tkáně

Tělesné tekutiny	Krev, mozkomíšniční mok, žaludeční a duodenální
Tělesné sekrety	Z chorobných ložisek, punktát, poševní sekret
Tělesné exkrementy	Moč, stolice, pot, zvratky, sputum
Tkáně orgánů	Jater, ledvin, sliznice močového měchýře, žaludku, tkáně patologických útvarů – nádory;

Tkáň

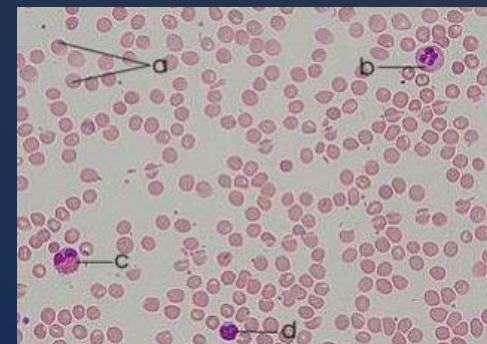
- Soubor morfoloicky podobných buněk, které plní určitou funkci
- Buňky tvořící tkáň mohou být stejného typu, nebo jsou tkáně tvořené buňkami tvarově i funkčně rozdílnými

Typy tkání

- Epitelová (krycí)
- Pojivová
 - Vazivo
 - Kost
 - Chrupavka
- Svalová
 - Hladká
 - Příčně pruhovaná
- Nervová
 - Neurony
 - Neuroglie
- Tekutá (trofická)
 - Krev
 - Míza
 - Krvomíza



kost



krev

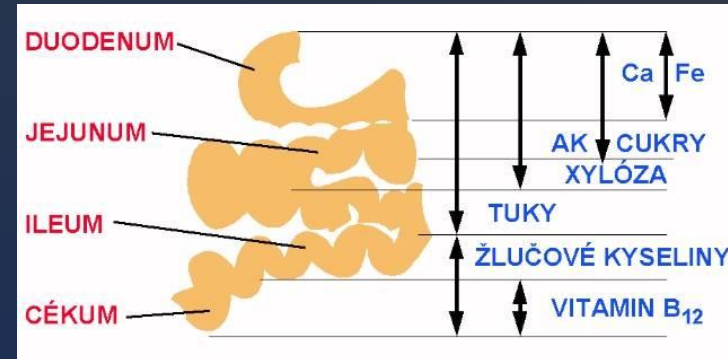
Druhy vyšetření biologického materiálu

- **Histologická vyšetření**
 - Vyšetřují se části tkání, e.g. kůže, svaly, pojivo, mízní uzliny etc.
- **Cytologická vyšetření**
 - Vyšetřují se buňky získané ze sputa, kostní dřeně, apod.

Druhy vyšetření biologického materiálu

- **Biochemická vyšetření**

- Určují obsah organických a anorganických látek materiálu – bílkoviny, tuky, glukóza, minerály, hormony, enzymy, vitamíny, léky
- Ukazují, jaké metabolické a biochemické změny se v organismu dějí
- Stanovují obsah a množství cizorodých látek v organismu



Druhy vyšetření biologického materiálu

- **Mikrobiologická vyšetření**
 - Bakteriologické, virologické, mykologické, parazitologické
 - Určují přítomnost patogenního původce – bakterie v krvi, v moči, ve sputu, v mozkomíšním moku
 - Určují přítomnost parazita ve stolici a v krvi (nejčastěji roupy, škrkavky, tasemnice)



Odběry materiálu

Excize

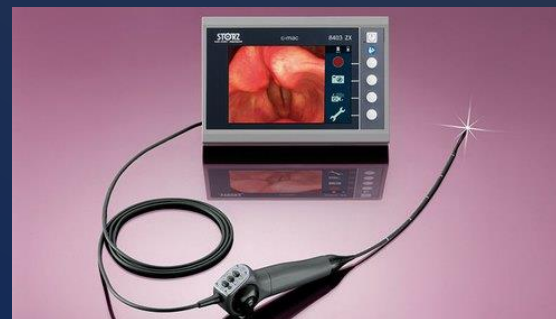
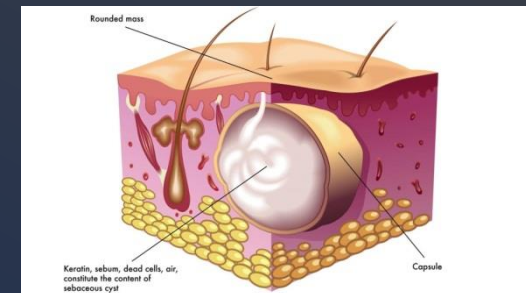
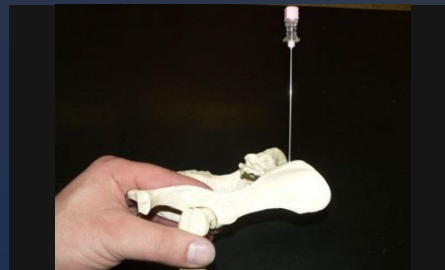
Punkce

Kyretáž / Mikroabraze

Stěr, nátěr

Endoskopický odběr, laparoskopie

Cytologické odběry



NEKROPSIE

(řec. *Necros* – mrtvý, *opsis* – zrak)

Nekropsie = AUTOPSIE = PITVA

Zkoumání chorobných změn v mrtvém těle a mikroskopické vyšetření vzorků tkání odebraných při pitvě.



Nicolas Tulp 1632



Počátek 21. století

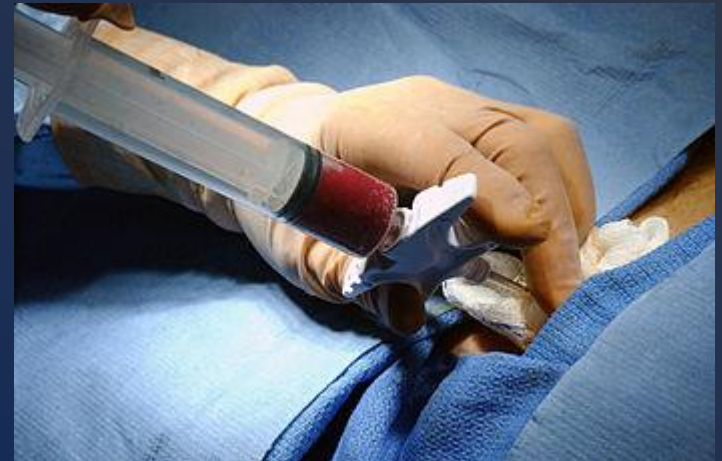
BIOPTICKÉ VYŠETŘENÍ

(řec. *bios* – živý, *opsis* – zrak)

Diagnostická metoda odběru živé tkáně, nebo buněk.

Navazuje na metody prebiptické (ultrazvuková diagnostika, endoskopie, aj.) a zpravidla je prováděna za kontroly vizuální (např. excize tkáně při operaci)

- Biopsie
 - peroperační
 - endoskopická
 - cytologická
- Kožní excize
- Lymfatické uzliny
- Trepanobiopsie, Endoskopické biopsie, ...



Odběr embryonální tkáně

Embryonální tkáň lze odebírat z různých vývojových stadií různými metodami. Volba metody závisí na typu tkáně a vývojovém stadiu embrya.

- Zygota
- Preimplantační embryo
- Postimplantační embryo
- Tkáň plodu
- Placenta
- Embryonální kmenové buňky
- Plodová voda

Disekce, mikrodisekce, výplach, punkce

Odběr embryonální tkáně

důležité etické otázky použití tkání, u nichž nebyl dán souhlas a u nichž není známo, kdo je dárce (například nevyzvednutá těla, archeologické tkáně a mumie).

- Mnoho sbírek lidských embryí a plodů. Staří, shromážděny před zavedením současných standardů informovaného souhlasu.
- O jedincích existuje jen malá nebo žádná dokumentace, včetně toho, zda byly získány legálně nebo eticky.
- Potřebná péče (výměna konzervačních prostředků, aktualizované označení).
- Podrobný historický výzkum, např. výzkum sbírky embryí na univerzitě v Göttingenu / Německo, která vznikla během druhé světové války.
- Otázky: Prozkoumat původ? Uložení? Zpopelnění? Centralizovaný program?



FIXACE

Princip fixace:

Rychlá a šetrná denaturace/síťování proteinů, která zabrání autolýze.

Požadavky na fixaci:

Rychlá penetrace

Zachování struktury tkání

Zachování barvitelnosti tkání

Podmínky

- Vzorky musí být přiměřeně velké – max. 1cm³
- Objem fixativa ku vzorku min 20x
- Nesmí se vzorek lepit ke dnu ani plavat - přístup
- Vhodná nádoba
- Správně označit vzorek, žádanka na histologické vyšetření



DRUHY FIXACE

CHEMICKÁ - pro běžné účely - jemná a šetrná denaturace enzymů

1. Aldehydy (formaldehyd, glutaraldehyd)
2. Jiné organické látky (kyseliny, etylalkohol, metylalkohol, aceton)
3. Sloučeniny těžkých kovů (oxid osmičelý – EM)
4. Směsi – e.g. Davidsonova, Bouinova tekutina

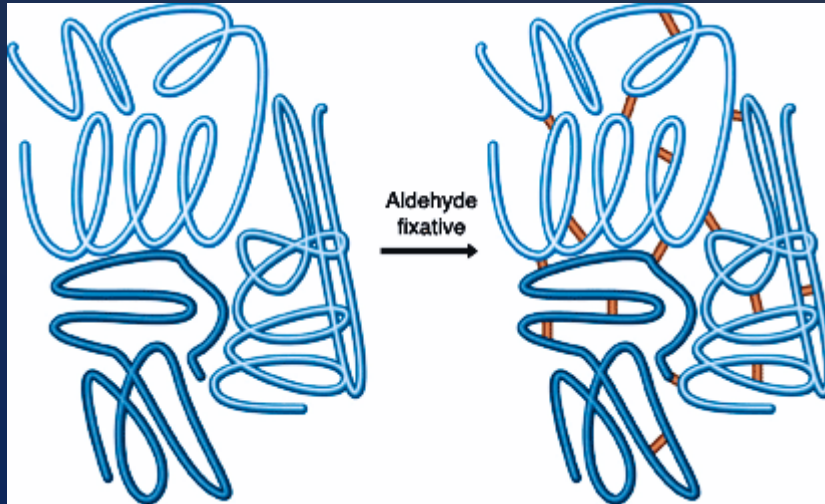
FYZIKÁLNÍ

Ovlivňuje transportní funkci vody a tím naruší enzymaticky katalyzované reakce v buňkách

1. Působení nízké teploty – rychlé zmrazení
2. Lyofilizace a mrazová substituce (histochemie a imunohistochemie) – aceton+OsO₄+GA
3. Fixace suchým teplem, fixace varem, mikrovlnka (rychlé zhotovení preparátů z biopsií)

Ne - koagulační

Formaldehyd – reverzibilní
Glutaraldehyd – ireverzibilní



Síťování proteinů

Koagulační

Alkohol
Kyseliny
Zvýšená teplota

Denaturation



reducing agents

C. Ophardt, c. 2003

Denaturace -> Vysrážení

Koagulace bilku



Koagulace bilku



Koagulace bilku



Fixační prostředky – Formol

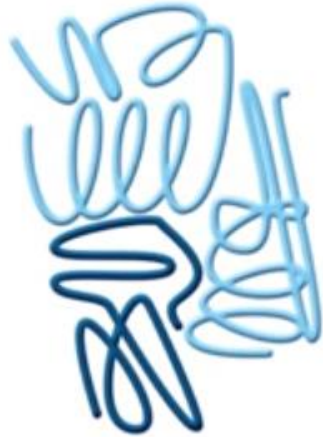
- Formalín (formol) - formaldehyd - *paraformaldehyd* (1859)

nasycený roztok: 100% formol = 40% formaldehyd

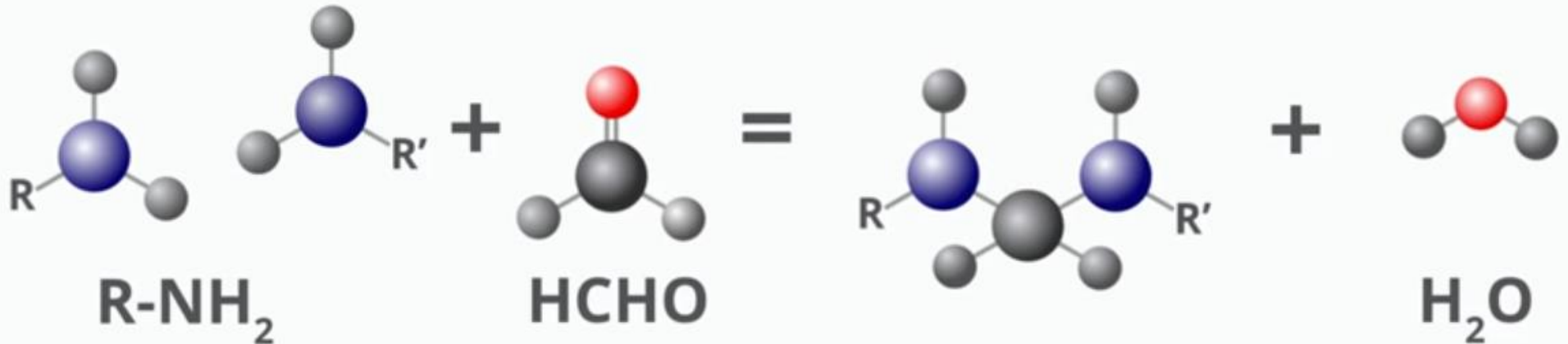
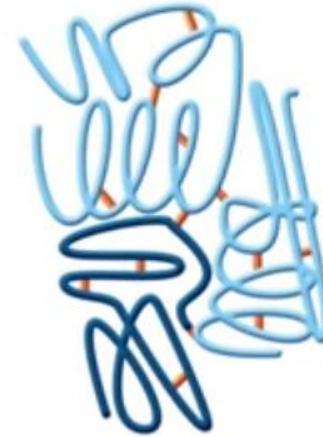
**Pracovní koncentrace nejčastěji
10% formol = 4% formaldehyd**

- Nejpoužívanější, dostupný, relativně levný
- Rychle prostupuje tkání a uchovává strukturu
- Síťování epitopů dvojná vazba (GA – trojná)
- Nesmí “zmrznout” $<8^{\circ}\text{C}$ - polymerizace
- Tmavá láhev, oxidace – vede k produkci kys. mravenčí, proto stabilizace MeOH nebo pufr.

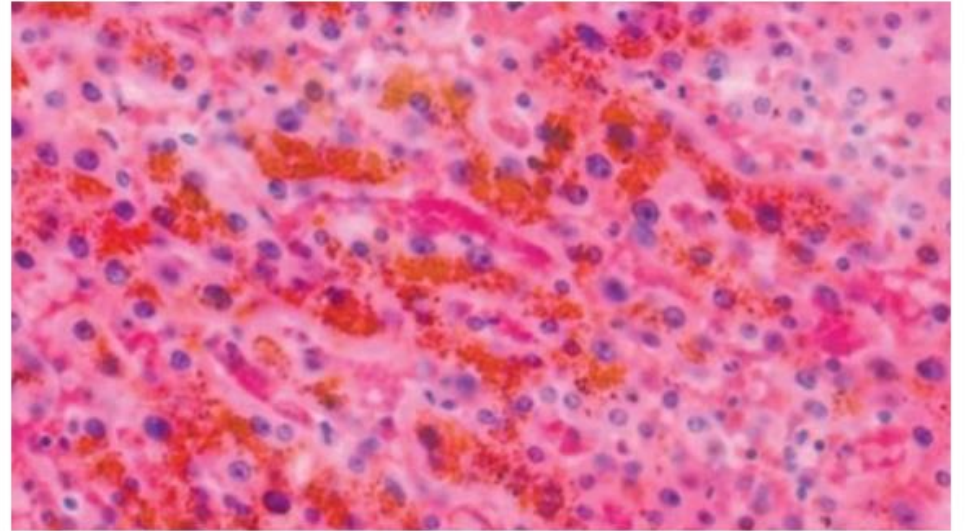
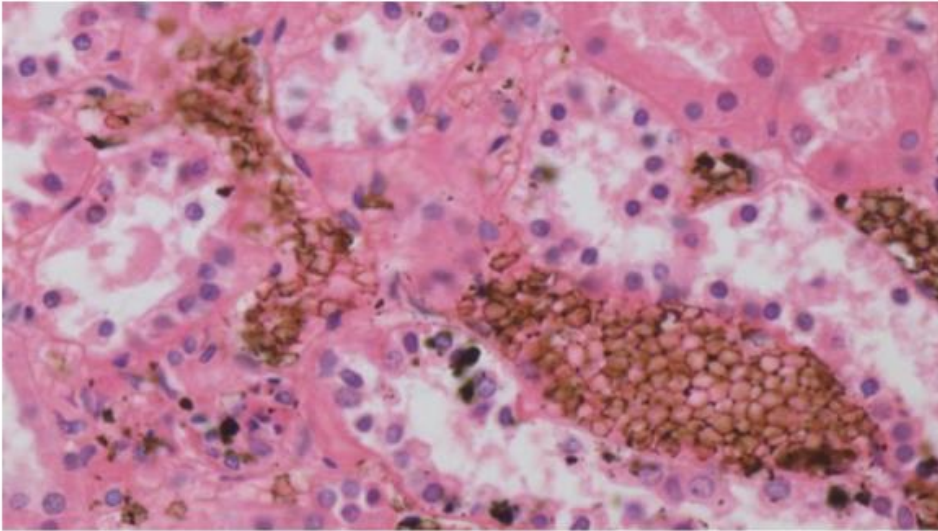
Proteiny a vazby



Methylenové můstky



Formalinový pigment

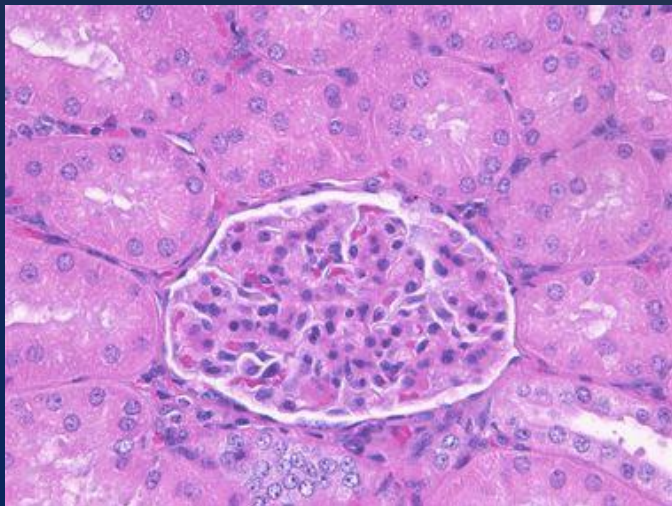


Řešení pufovaný formol

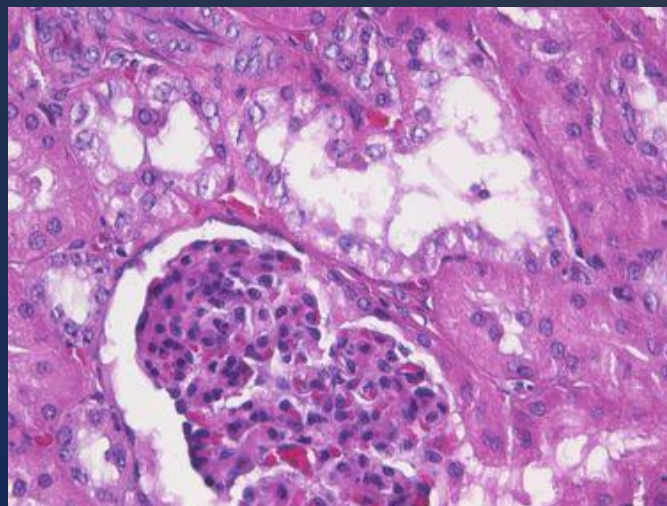
Formol pH 3-4 vs pH tkání 7.6 - 7.8

Neutralizace - přidáním solí

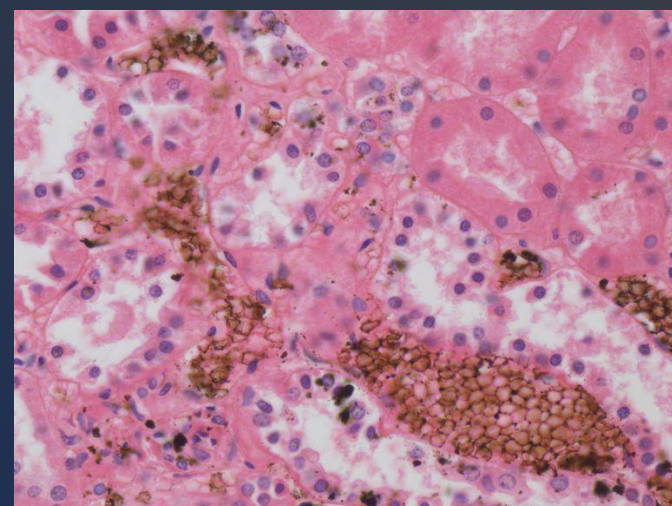
Ledviny



Správná fixace



Krátká fixace



Dlouhá fixace
- Pigment na RBC
(formalinový hematin)

Etanol, aceton

- Rychlý prostup
- Nepoužívá u krvetvorných tkání – degradace
- Ne pro lipidy – rozpouští
- Smrstění
- Dehydratace, extrahují se tuky – zvýraznění komplexů granulárního endoplazmatického retikula
- Zejména v neurohistologii Nisslova substance – část nerv. tkáně

- Aceton (0-4°C) – enzymová histochemie, (e.g. amputace)

Fyzikální – nativní tkáně

- Zmražení – tekutý vzduch, dusík-isopentan
 - rychlé, pomalé, proměnné – pokles 0,3-10 °C/min)
- Vitrifikace (1 500 -30 000°C/min)
 - Vysoké koncentrace kryoprotektiv, zejména v IVF
- kryoprotekce –
 - sacharóza (OCT, tissue-tek), DMSO, ethylenglykol

Zmrazení živých tkání

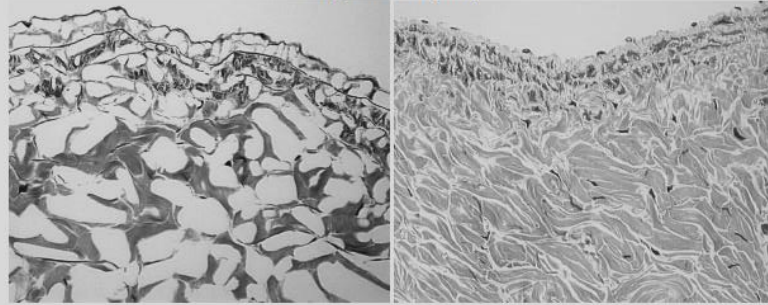
Pozitiva

- Nejrychlejší ze všech technik.
- Vynikající pro IHC, IF, ISH. Není třeba odkrývání antigenů, jelikož nedochází ke „kros-linkování“.
- Často snadno krájitelné – závisí na typu tkáně. (e.g.tuky, neuro)

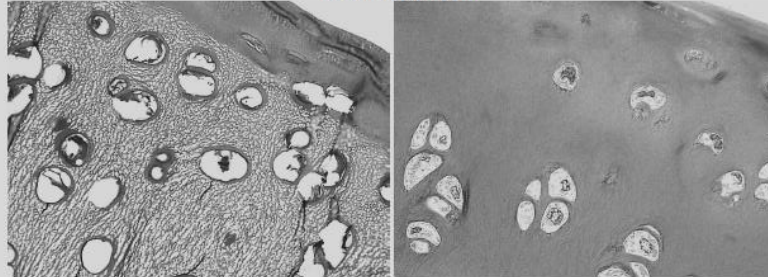
Negativa

- Náchylné k špatnému zachování morfologie.
- Mrazové artefakty – nezbytné okamžité a hluboké promražení
- ISH integrita – nutné pracovat v extrémně čistých podmínkách – degradace RNA.

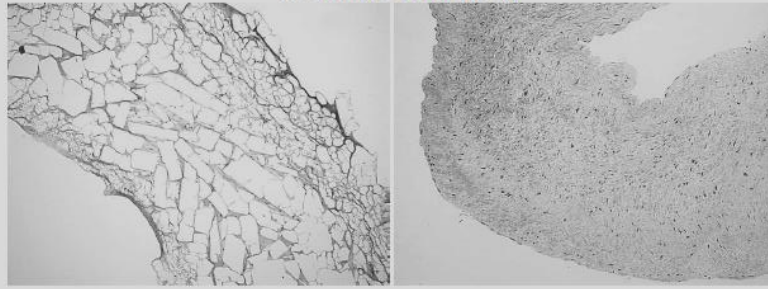
Jugular Vein (40x)



Cartilage (100x)



Heart Valve Leaflet (20x)



Porušení
struktury



Zřejmá
krystalizace
ledu

Vitrifikace

Při fixaci jde o Kompromis

- v zachování morfologie,
- stanovení proteinů,
- histologickému barvení tkání,
- či možnosti extrahovat RNA/DNA,

tudíž volba fixativa a způsobu se vztahuje k

požadovanému výsledku.

Zalévání tkání do médií

Pro vznik velmi tenkých a kvalitních řezů je nutné tkáň zalít do média, které jí zpevní.

Cílem je získat homogenní blok, který lze krájet na tenké řezy.

Pro světelné mikroskopické pozorování řezy **5-10** μm
Pro elektronmikroskopickou analýzu **50-100** nm.



ZALÉVÁNÍ TKÁNÍ

1. DO MÉDIÍ NEROZPUSTNÝCH VE VODĚ

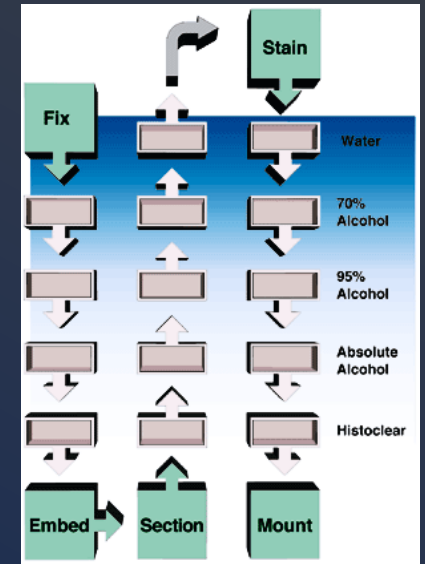
- PARAFÍN - základní - nejrozšířenější použití
- PARAPLAST - zkvalitněný parafín
při teplotě 58 °C
- Pryskyřice – elektron mikroskopie

2. DO MÉDIÍ ROZPUSTNÝCH VE VODĚ

Želatina, agaróza,...

Zalévání řídkých struktur – placenta, sliznice střeva, ad.

Zalévání buněčných suspenzí, hydrogelů, obtížně uchopitelných vzorků



Parafín - výhody, nevýhody, zalití

- Tenké řezy, které lze barvit všemi metodami
- Uchování na neomezenou dobu
- Možnost kdykoliv nakrájet další řezy

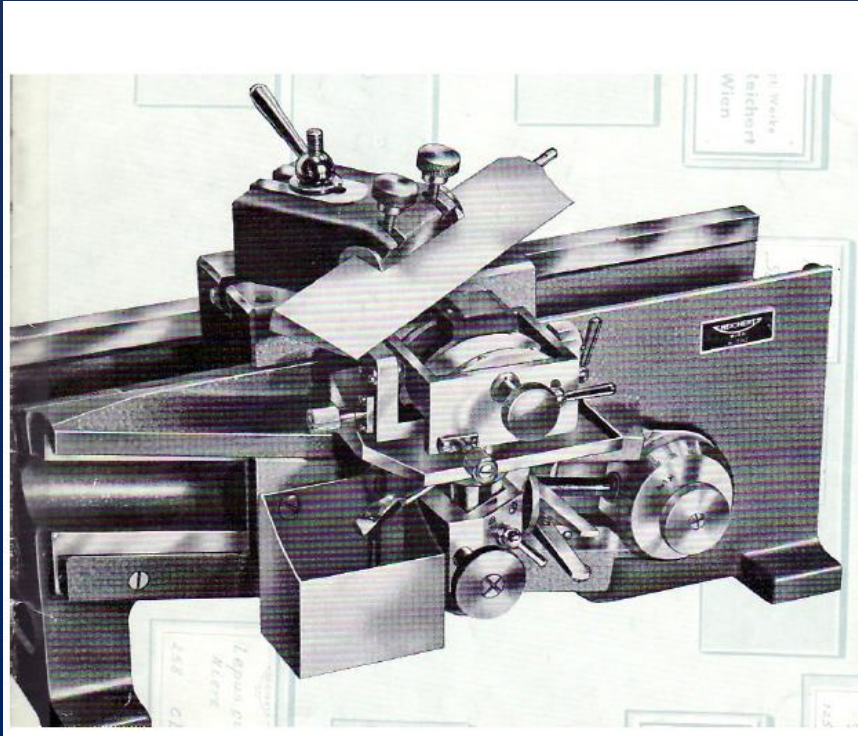
- Alkohol řada i zalití do parafinu ničí enzymy a způsobuje vyluhování tuků
- Odvodňováním může dojít ke smrštění tkáně a vzniku artefaktů

- Po prosycení – zalití parafinem do bloku



MIKROTOMY

Sáňkový mikrotom Reichert



Rotační mikrotom Leitz



Světelná mikroskopie 4-8 μm

MIKROTOMY

KRYOKAT



Světelná mikroskopie – řezy 5 μm

Ultramikrotom



Elektron mikroskopie řezy 50 nm

HISTOLOGICKÉ BARVENÍ

PROČ:

Zobrazit buněčné struktury a/nebo chemickou povahu tkání

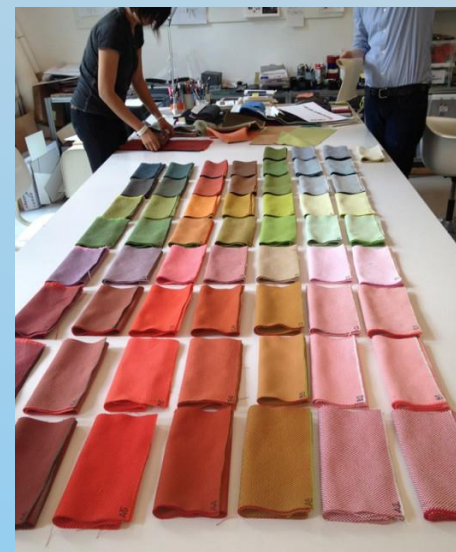
HISTOLOGICKÉ BARVENÍ

PRINCIP:

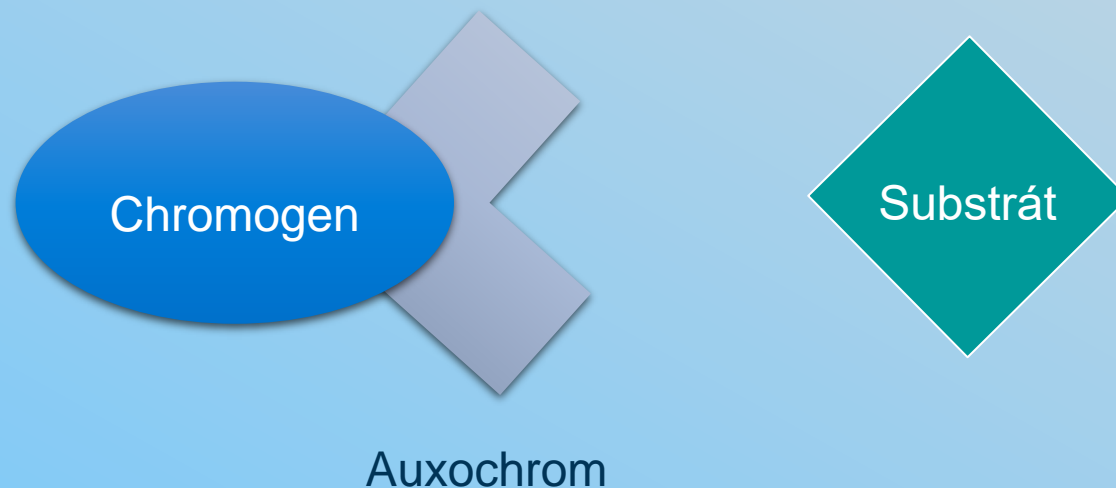
Diferenciace jednotlivých buněk a tkání, jejich afinity k různým barvivům a zřetelné rozlišení ve světelném mikroskopu.

- **Přehledná barvení** – všeobecné informace o celém preparátu (HE, Van Gieson, Masson Trichromy)
- **Specifické (selektivní) barvení** – pro jednu určitou tkáňovou složku (Orcein, Alcian blue, Olejová červeň)

TECHNOLOGIE BARVENÍ



PRINCIP BARVENÍ



Barvivo je barevná složka, která se váže na substrát.

BARVIVA PODLE NÁBOJE

➤ **Bazická – kladný náboj** – barevný kationt se váže na aniont substrát, barví jaderný chromatin – např. hematoxylin, jádrová červeň

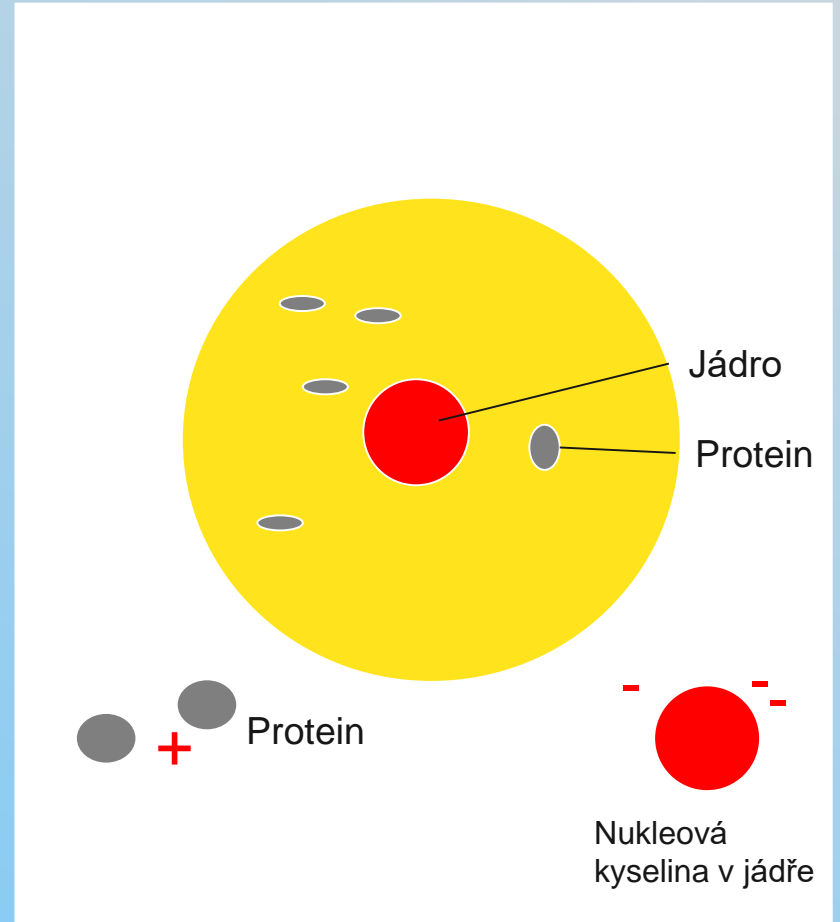


➤ **Kyselá – záporný náboj** - plazmatická – aniont na kationt substrát, barví cytoplazmu buněk – např. eosin



➤ **Neutrální** – pH 7, váže na bazo- i acidofilní struktury

➤ **Amfoterická** – v molekule kladné i záporné – reakce závisí na pH

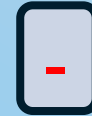


BARVIVA PODLE NÁBOJE

➤ **Bazická – kladný náboj** – barevný kationt se váže na aniont substrát, barví jaderný chromatin – např. hematoxylin, jádrová červeň

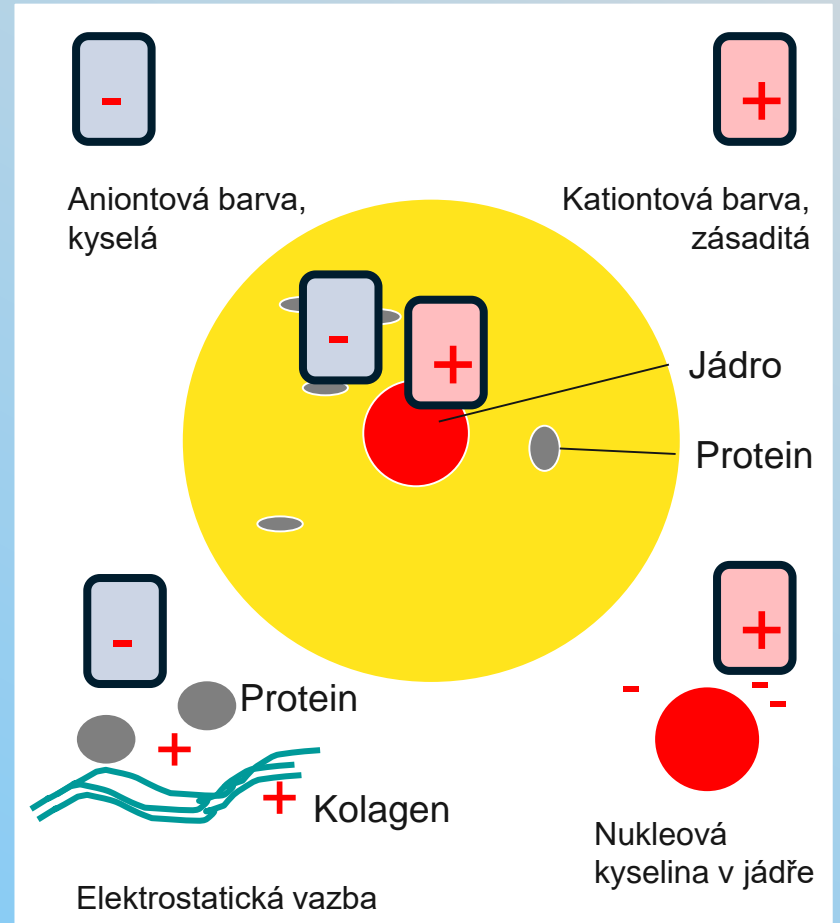


➤ **Kyselá – záporný náboj** - plazmatická – aniont na kationt substrát, barví cytoplazmu buněk – např. eosin



➤ **Neutrální** – pH 7, váže na bazo- i acidofilní struktury

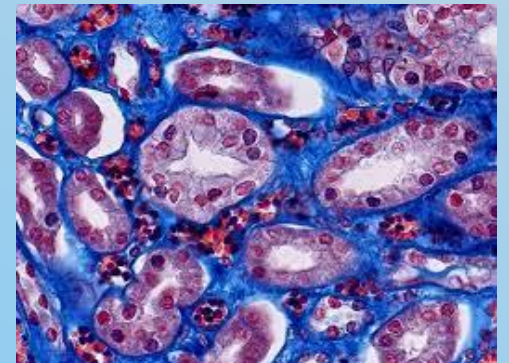
➤ **Amfoterická** – v molekule kladné i záporné – reakce závisí na pH



BARVIVA PODLE PŮVODU



- PŘÍRODNÍ – extrakty rostlinného nebo živočišného původu (hematoxylin, orcein, šafrán, karmín)
- SYNTETICKÁ – umělá (anilinová modř a všechna ostatní)



Interakce mezi tkání a barvívem

FYZIKÁLNÍ

- barvivo se rozpouští ve složce, absorbuje na povrch tkáň struktury, nebo dochází k precipitaci.
- (e.g. Tuky – Olejová červeň)



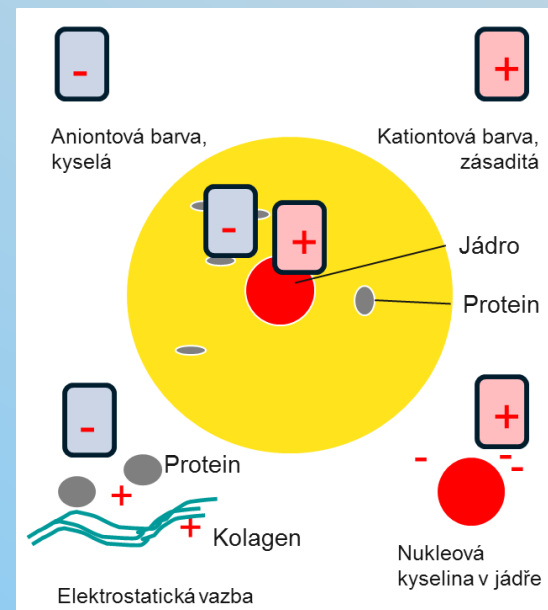
PŘEHLEDNÉ BARVENÍ

ZÁKLADNÍ METODA

HEMATOXYLIN-EOSIN

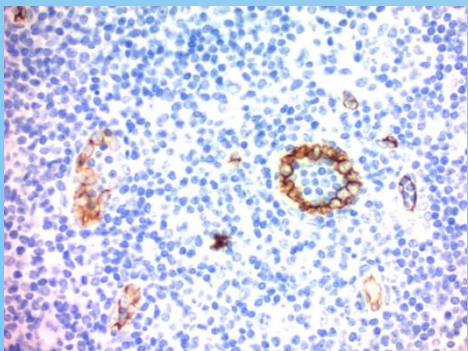
PRINCIP:

- zásaditým hematoxylinem vazba mezi DNA a RNA
- kyselým eosinem Y vazba k cytoplasmě
-
- Barvení H&E se používá k vizualizaci a analýze architektury a morfologie tkáně.

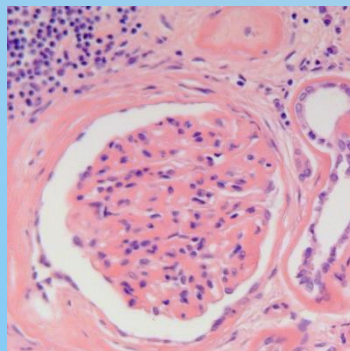


název	oxidační činidlo	mořidlo
Mayerův hematoxylin	jodid sodný	síran hlinitodraselný
Harrisův hematoxylin	oxid rtuťnatý nebo jodid sodný (příp. draselný)	síran hlinitoamonný
Ehrlichův hematoxylin	přirozená oxidace (2 měsíce)	síran hlinitodraselný
Weigertův hematoxylin	chlorid železitý	

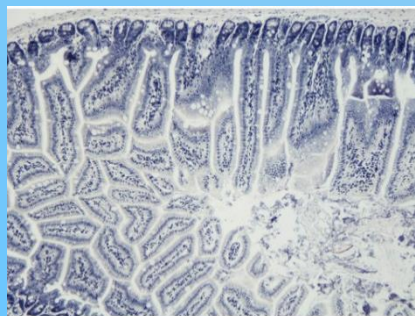
MH



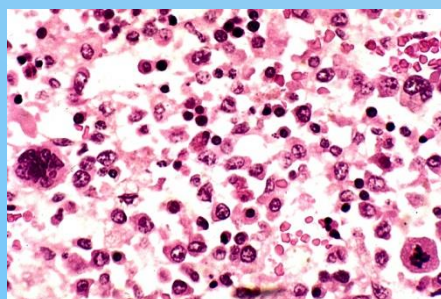
HH



WH



WH



Typy hlinitých hematoxylinů

- Ehrlich's haematoxylin
- Mayer's haematoxylin.
- Harris's haematoxylin.
- Gill's haematoxylin.
- Cole's haematoxylin
- Delafield's haematoxylin.
- Carazzi's haematoxylin

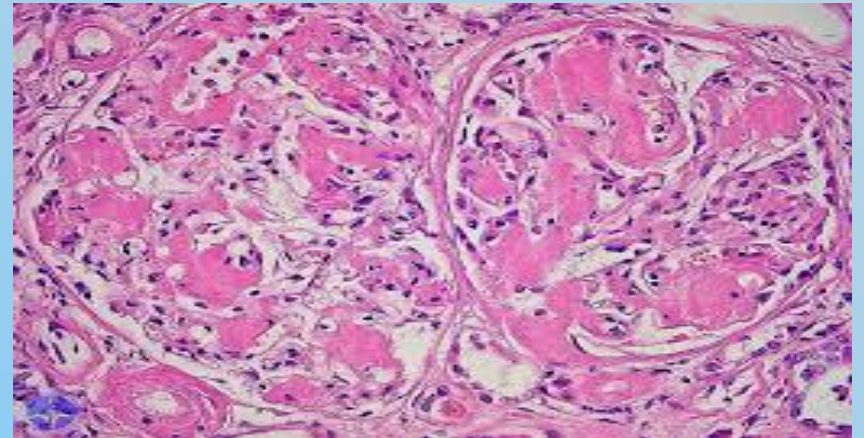
EOSIN – syntetizovaný z fluoresceinu – syntetický produkt.
Užíváno v kosmetice



EOSIN – syntetizovaný z fluoresceinu – syntetický produkt.

- Kyselé (záporně nabitě) “protibarvivo” k hematoxylinu
- Váže se na amino kyseliny a většinu buněčných komponent (cytoplasma, ECM)
- Barví růžově

Bromeosiny – žlutý, červený, nejčastěji 0,1-0,5% vodný roztok
Jódeosiny – stejné použití



PŘEHLEDNÉ BARVENÍ

HEMATOXYLINY

Kamencové – rozpustné ve vodě – Mayerův HE, Heidenhein

Železité – rozpustné v alkoholu – Weigert, Harris

EOSINY

Bromeosiny – žlutý, červený, nejčastěji 0,1-0,5% vodný roztok

Jódeosiny – stejné použití

VÝSLEDEK BARVENÍ:

Jádra – modrofialová, cytoplazma – růžová

POJIVOVÁ TKÁŇ

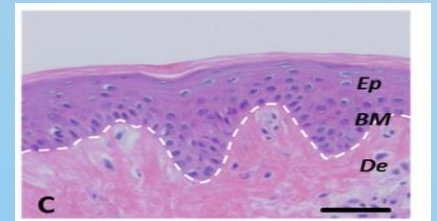


POJIVOVÁ TKÁŇ

VAZIVO – tkáň mezenchymového původu, tvořeno buňkami a mezibuněčnou hmotou. Jejím základem jsou vazivová vlákna a kyselé mukopolysacharidy.

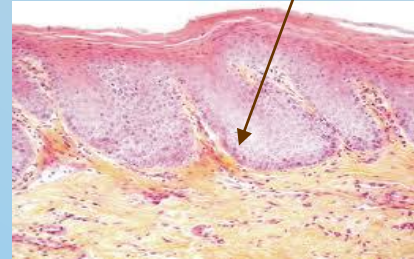
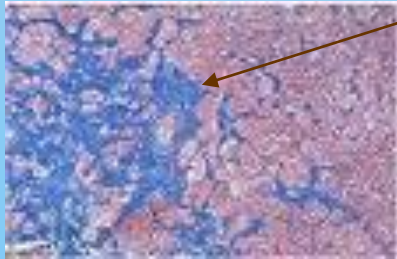
Vazivová vlákna rozlišujeme na:

- KOLAGENNÍ - jsou nejobtímnější složkou pojivových tkání. Jsou pevná, ohebná,
- ELASTICKÁ - se vyskytují společně s vlákny kolagenními, ale je jich mnohem méně. schopna protažení až na dvojnásobek své původní délky.
- RETIKULÁRNÍ – síť, složena z kolagenu typu III, v kostní dřeni a lymfatických orgánech.

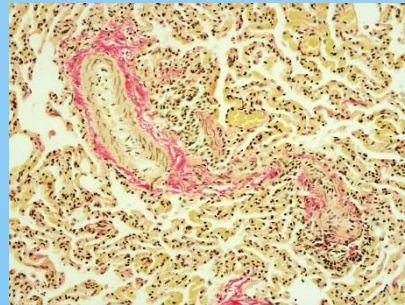


PŘEHLEDNÁ - VAZIVOVÁ VLÁKNA KOLAGENNÍ

- **Massonovy trichromy** – kolagen modrý, zelený a žlutý
- + Hematoxylin



- **Van Gieson** – kolagen červený



BARVICÍ METODA	JÁDRO	CYTO PLAZ.	VAZ.	SVALY	ERYT ROC YTY	BARVIVA
H-E						
ŽLUTÝ TRICHOM						šafrán
MODRÝ TRICHOM						hematoxylin, anilínová modř, kyselý fuchsin
ZELENÝ TRICHOM						hematoxylin, kyselý fuchsin, světlá zeleň, oranž G
AZAN (HEIDENHAIN)						<u>azokarmín</u> , oranž G, anilínová modř
WEIGERT VAN GIESON						železitý hematoxylin, <u>pikrofuchsin</u>

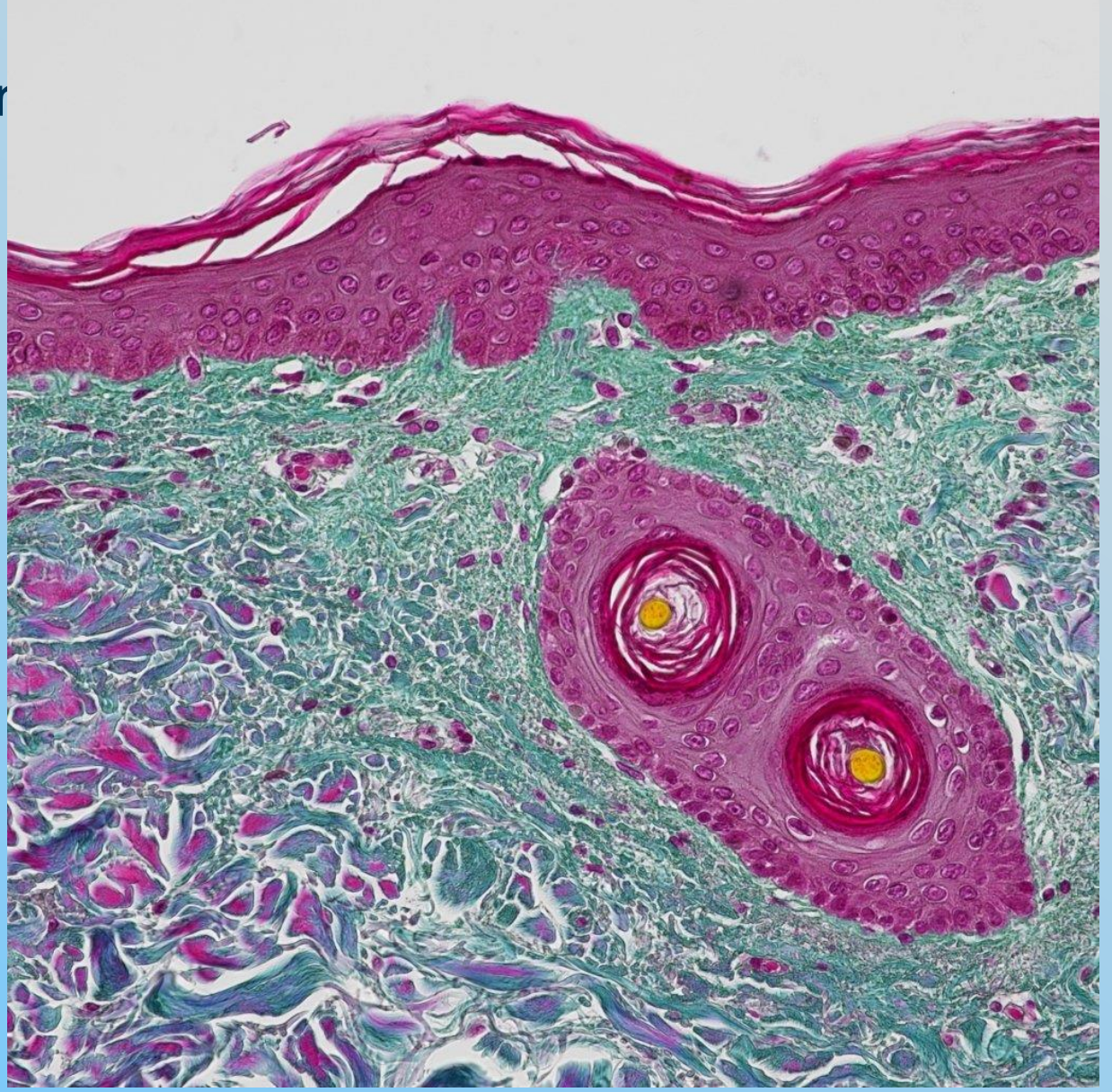
Masson Trichrome - zeler

Kolagen = barvivo s velkými molekulami

Svalstvo - fuchsin

ery = barvivo s malými molekulami

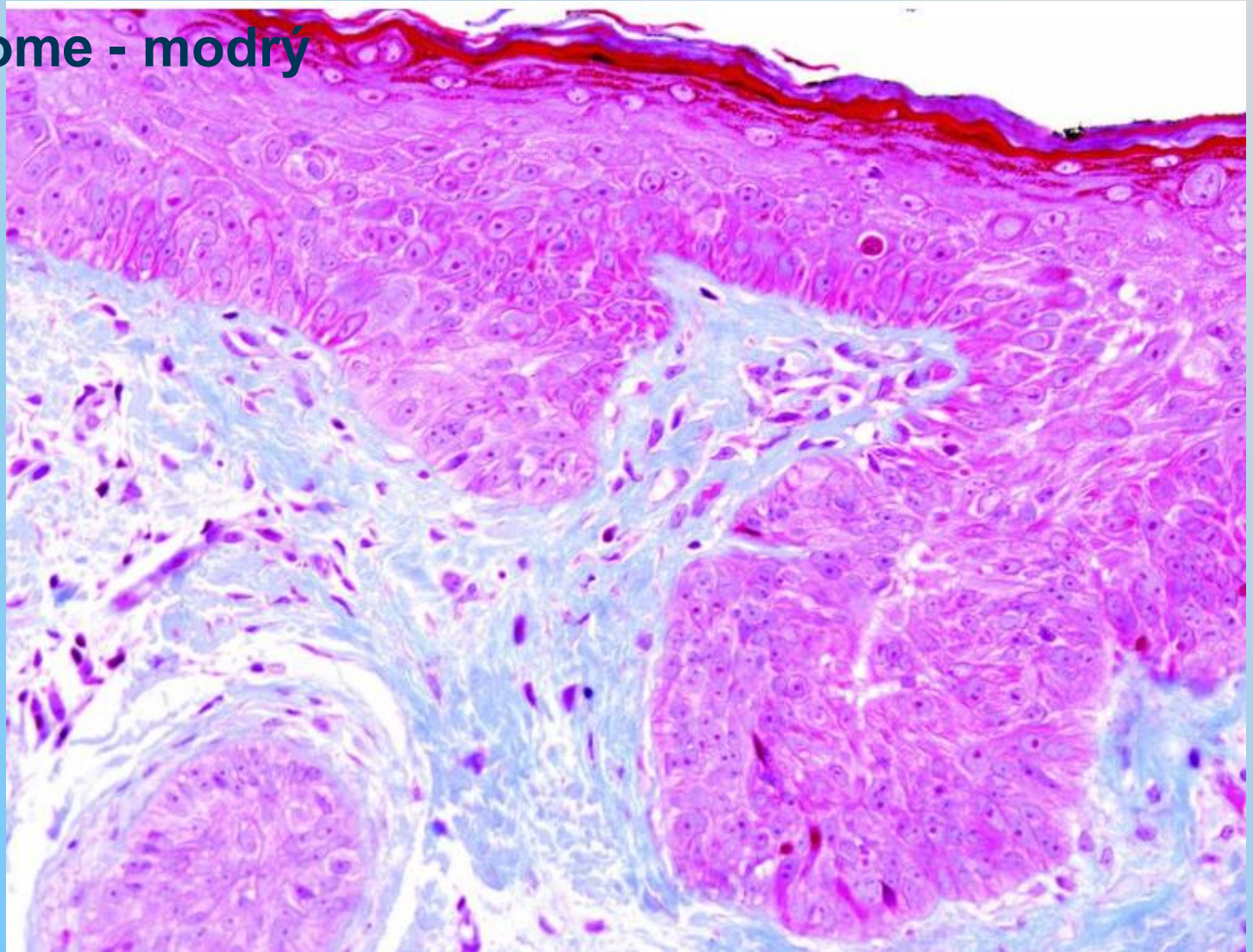
Jádra = WH



Masson Trichrome - modrý

Kůže

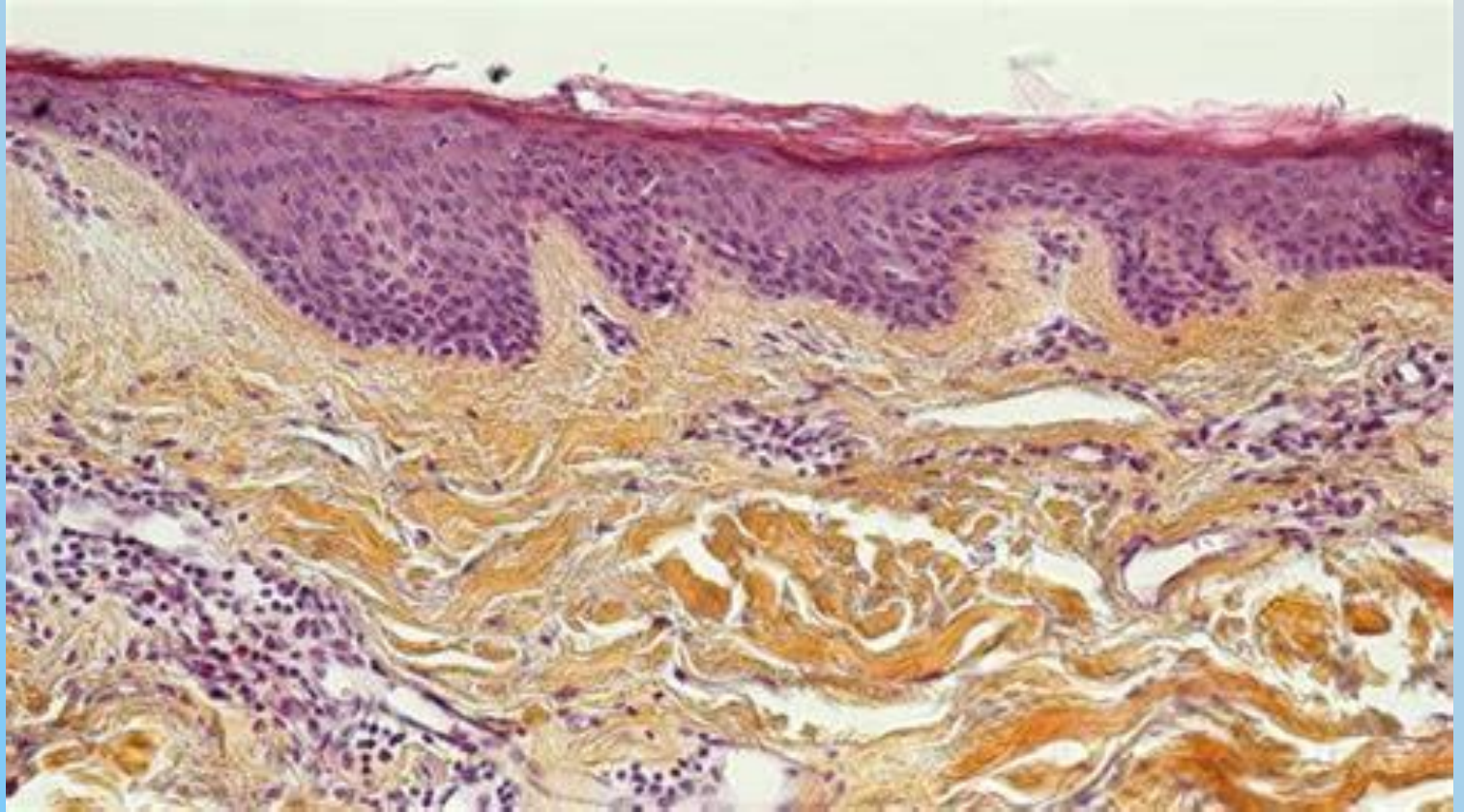
Kolagen – anilin blue
Cytoplasma, ery
jádra



Masson Trichrome - žlutý

Kůže

Kolagen = šafrán
Cytoplasma, ery
jádra

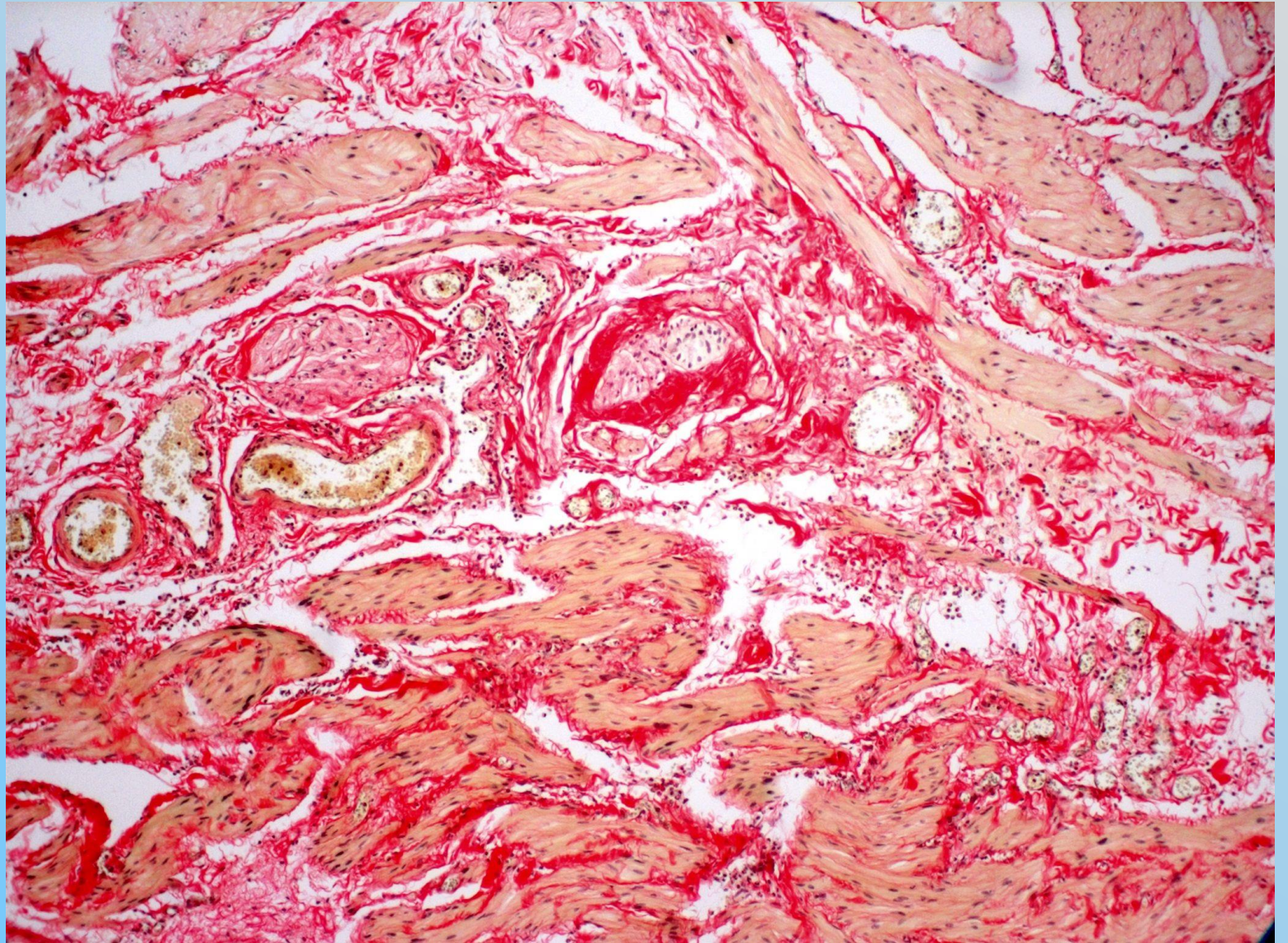


Van Gieson

Žaludek

Kolagen
Svaly,
erytrocyty
jádra

Kys pikrová
Kys fuchsin



SELEKTIVNÍ BARVENÍ

V preparátu se značí pouze některé struktury.

Přehled o přítomnosti retikulárních či elastických vláken, určit přítomnost kyselých mukopolysacharidů nebo glykogenu.

VAZIVOVÁ VLÁKNA ELASTICKÁ

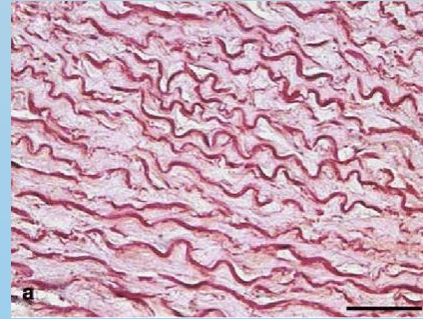
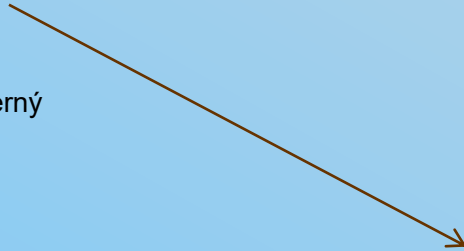
Elastin

Zajišťují pružnost. Pro vývoj několika orgánů např. plíce, cévy a kůže.

Orcein - hnědočervený

Aldehydfuchsin fialový

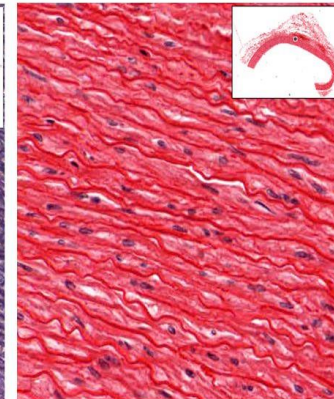
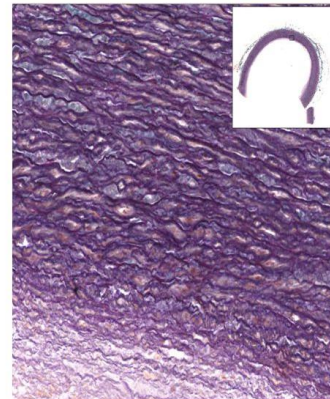
Resorcinfuchsin - modročerný



aorta

Slide #36, aorta, aldehyde fuchsin

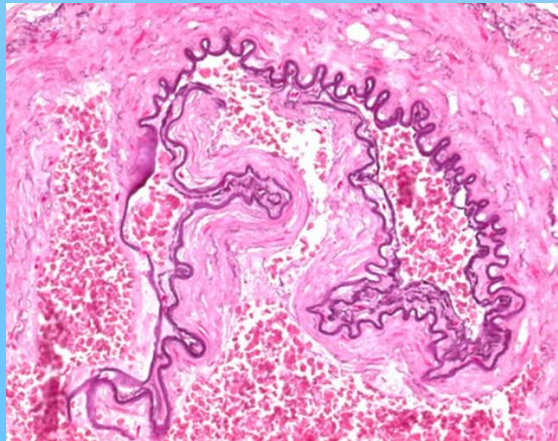
Slide 88, aorta, H & E



aorta

Resorcin-Fuchsin
Weigertův HE
Van Gieson

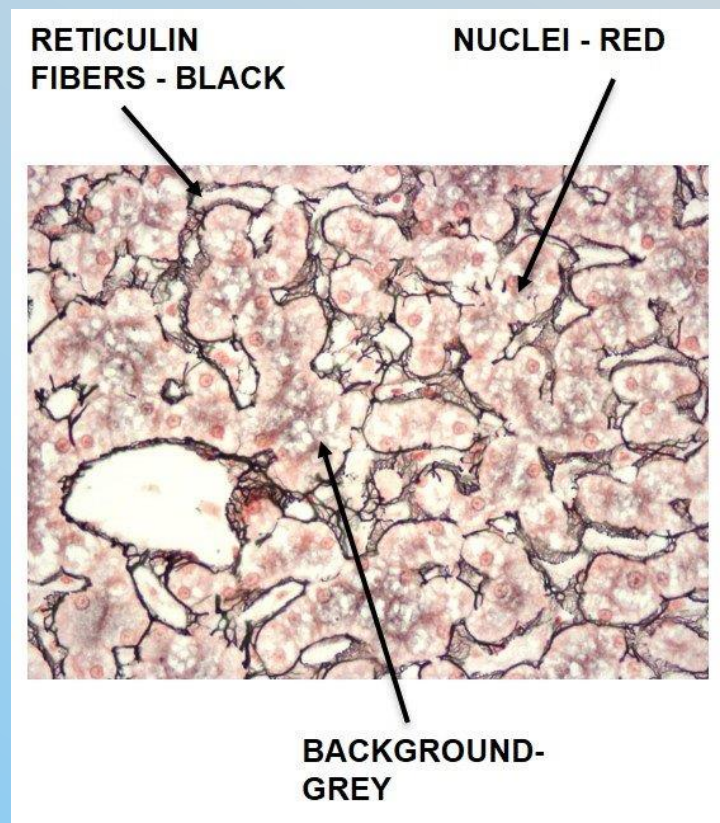
duodenum



VAZIVOVÁ VLÁKNA RETIKULÁRNÍ

jemné spleťité síť, ve VŠECH orgánech.

obklopuje bb, hladkou i příčně pruh. svalovinu, tvoří síť pod epitelem, je součástí bazálních membrán., je to trámčina lymfatických a krvetvorných tkání



VAZIVOVÁ VLÁKNA RETIKULÁRNÍ

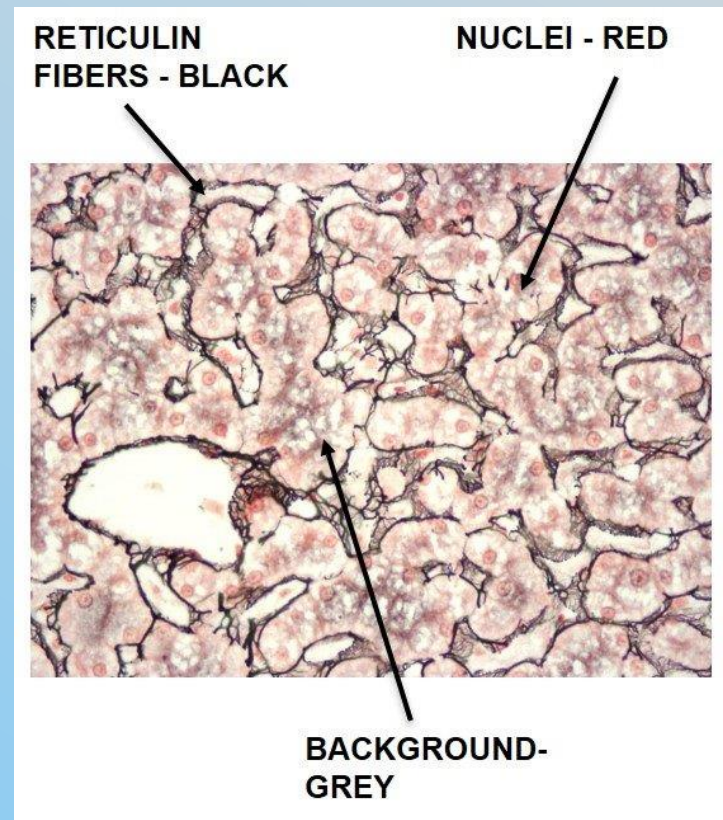
Průkaz: impregnačními metodami (**Gömöri**, Jones)

Princip:

- Impregnace solemi těžkých kovů (AgNO_3)
- Polysacharidy na ret vlákních redukuje soli stříbra

Výsledek: retikulin černý
(retikulin = kolagen III)

Gömöri



HISTOCHEMIE

Alciánová modř

- mukopolysacharidy. Značení chrupavky a vývoje kostí

PAS

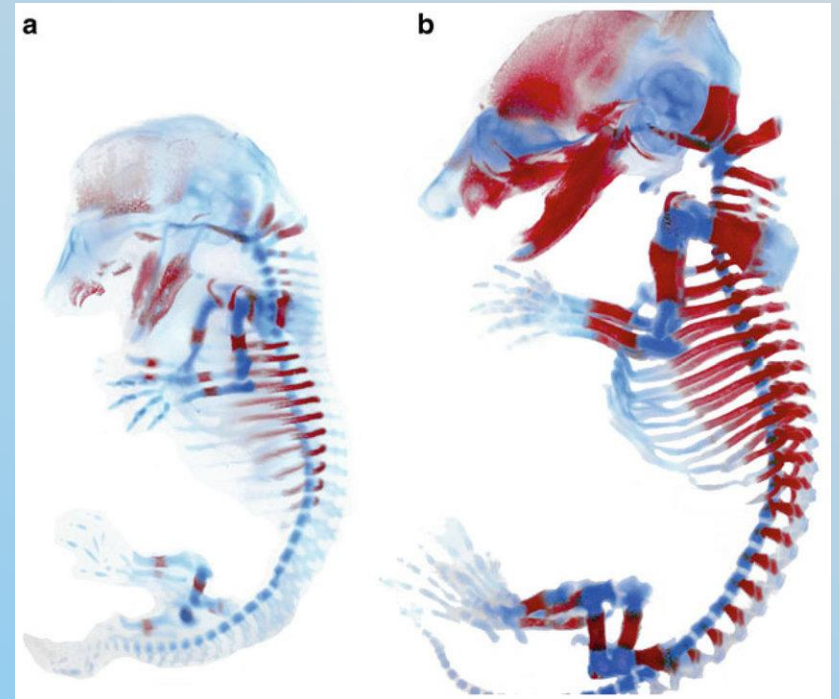
- karbohydráty a glykoproteiny. Značení jater a pankreatu v embryologii

Olejevá červeň

Tuky. Značení tukové tkáně

Průkazy anorganických iontů a sloučenin

Katalytická histochemie – enzymatická aktivita



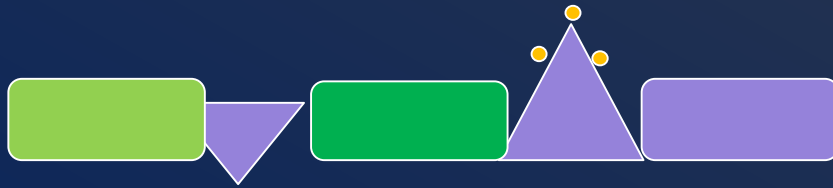
Alciánová modř, Alizarin red
Myš E14.5, 16.5

https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-989-5_9

IMUNOHISTOCHEMIE

Princip:

detekce specifických antigenních molekul (nebo jejich částí) s využitím imunologické vazby **ANTIGEN-PROTILÁTKA**

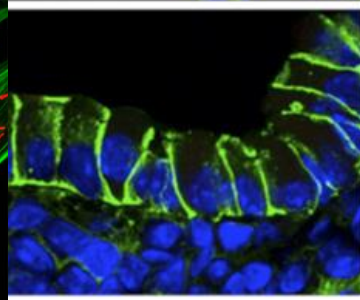
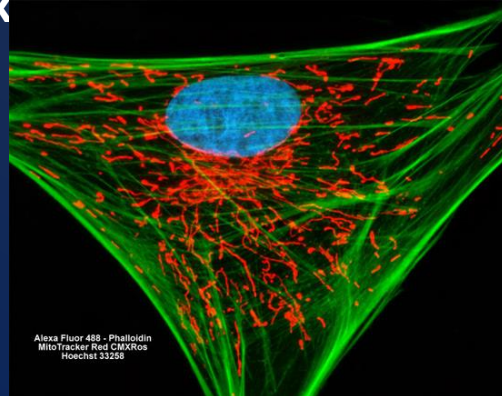
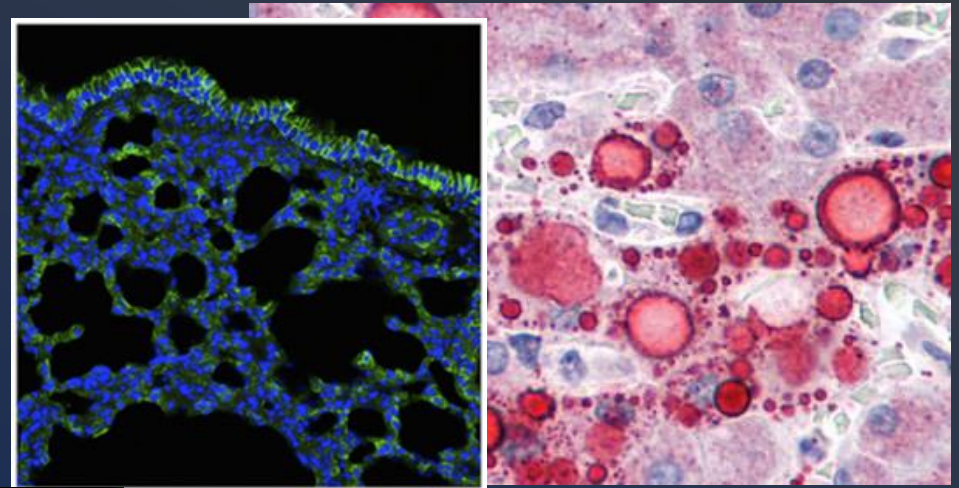


IMUNOHISTOCHEMIE

- **Protilátky se váží k antigenu** vysoce specificky
- Poskytuje informaci o **lokalizaci v „prostoru“** tkáně
- Lze využít k lokalizaci konkrétních **buněk či proteinů**
- Lze použít k detekci některých **buněčných procesů** – e.g. dělení, apoptóza

Které buněčné části lze „cílit“

- Jádru
- Cytoplasma
- Buněčná membrána
- Extracelulární matrix
- Proteiny
- Sacharidy



<http://www.abcam.com/ab76020.html>

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/galleries/static/cells/>

<https://www.mybiosource.com/PLIN2-ADFP-Adipophilin/>

Značky k vizualizaci protilátek

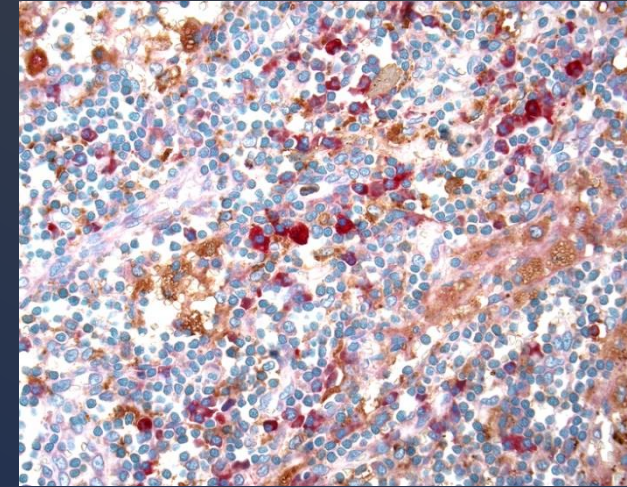
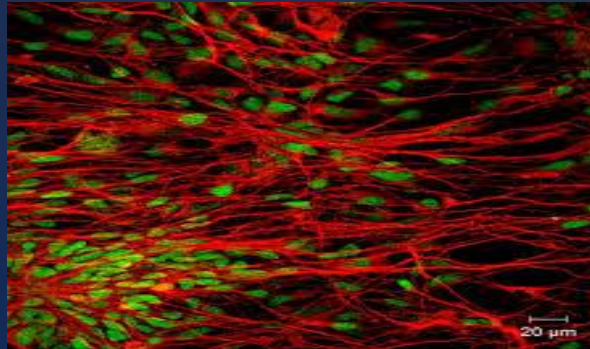
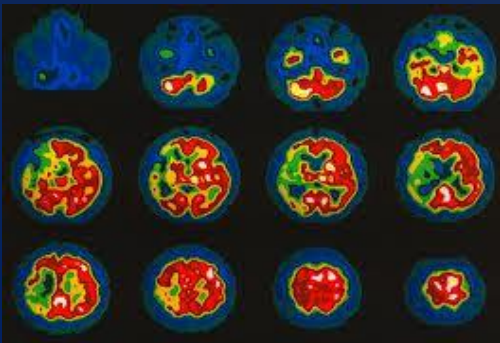
- **Světelná**

- ENZYMY
- AVIDIN-BIOTINOVÝ KOMPLEX

- **Fluorescenční**

- FLUOROCHROMY

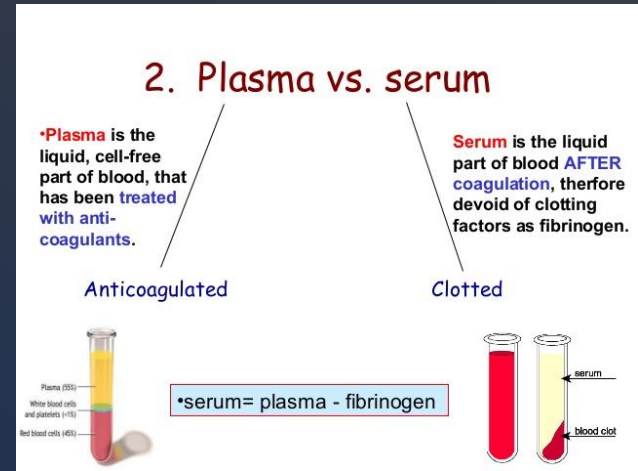
- **Autoradiografie**



Human lymph node
Dual AP/HRP

Možnosti u protilátek – které ovlivňují výsledek

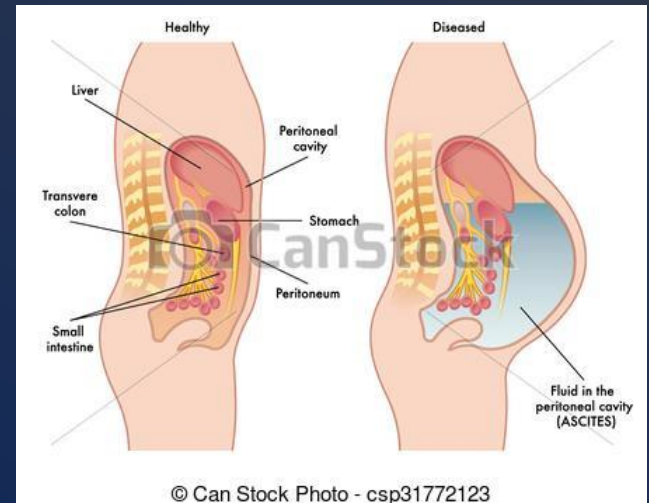
- Monoklonální vs polyklonální
- Tvořená proti celé molekule, N-konec, C-konec, specifické aminokyseliny
- Ascites, supernatant, serum



Serum, plasma



Supernatant



Ascites

Monoklonální vs. polyklonální

Monoklonální

- Myš nebo králík hybridom
- Jsou „čistější“
- Velmi konzistentní batch-to-batch
- Spíše vychází falešně negativní

Polyklonální

- Více rozdílných druhů
- Nespecifická reaktivita
- Rozdílná afinita batch-to-batch
- Úspěšnější při neověřených aplikacích

Ujistěte se, že máte protilátky specifické pro danou aplikaci

IF = imunofluorescence

ICC = imunocytochemie

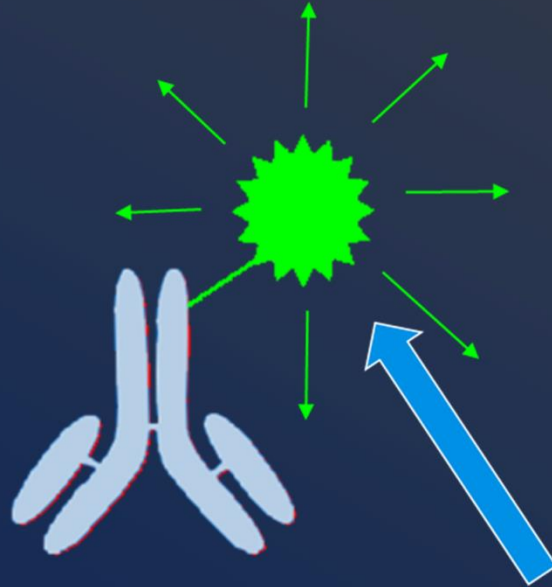
IHC-Fr = imunohistochemie ze zmražené tkáně (cryocut)

IHC-P = imunohistochemie z parafinového bloku

WB, IP apod.

Značky – fluorochromy

Excitace fluorochromu světlem o vyšší energii, než kterou fluorochrom emituje.
- Fluorescenční mikroskopie

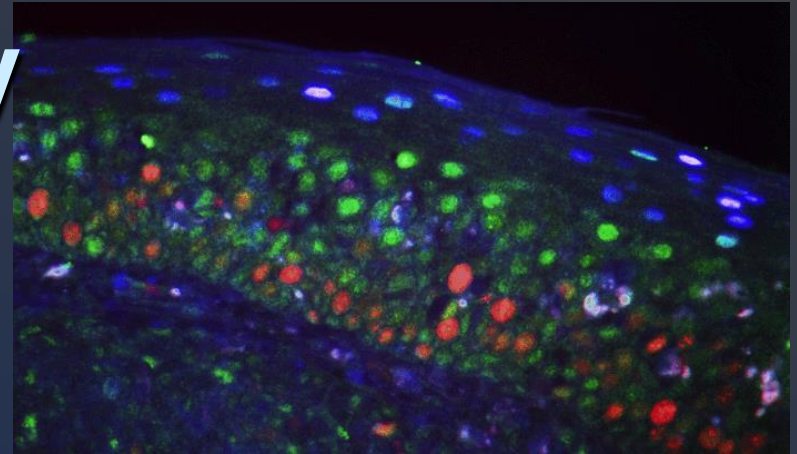


Značky – fluorchromy

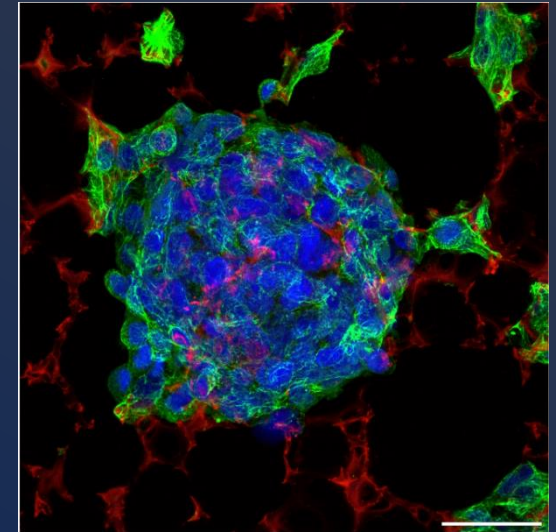
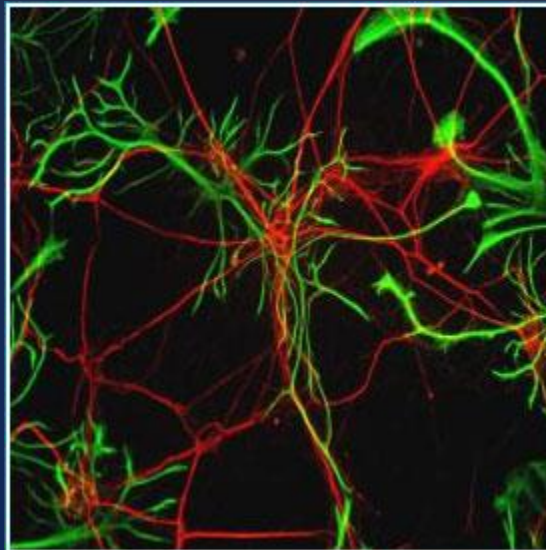
Fluorophore	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fast Blue	360	440
Alexa Fluor® 350	346	445
AMCA	350	450
Bisbenzamide	360	461
Aequorin	Ca ²⁺ photoprotein	469
Hoechst 33258	360	470
ACMA UV	412, 430	471, 474
Hoechst 33342	343	483
Cy2	489	506
GFP Wild type Non UV ex.	475	509
GFP Wild type UV ex.	395	509
Alexa Fluor® 488	494	517
Calcein	496	517
Fluorescein (FITC/DTAF)	495	520
Fluoro-Jade® B	480	525
Lucifer yellow	425	528
JC-1	514	529
Fluoro-Gold (Hydroxystilbamide)	361	536
Alexa Fluor® 430	430	545
Eosin	524	545
6-JOE UV	520	548
Alexa Fluor® 532	530	555
Cy3	548	562
Alexa Fluor® 546	554	570
Alexa Fluor® 555	555	571
TRITC	547	572
B-phycoerythrin	545, 565	575
R-phycoerythrin	480, 545, 565	578
Rhodamine	539, 574	602
Alexa Fluor® 568	578	602
Texas Red®	589	615
Alexa Fluor® 594	590	617
Propidium Iodide (PI)	536	617
Ethidium Bromide	493	620
Feulgen (Pararosaniline)	570	625
Acid Fuchsin	540	630
Alexa Fluor® 633	621	639
Alexa Fluor® 647	649	666
Cy5	650	670
PE-Cy5 conjugates	480, 565, 650	670
Alexa Fluor® 660	668	698
Alexa Fluor® 680	684	707
PE-Cy7 conjugates	480, 565, 743	767
Cy7	743	767

UltraViolet

Infrared



Dvojité značení IF: BCL6 and Ki-67 (MIB 1)



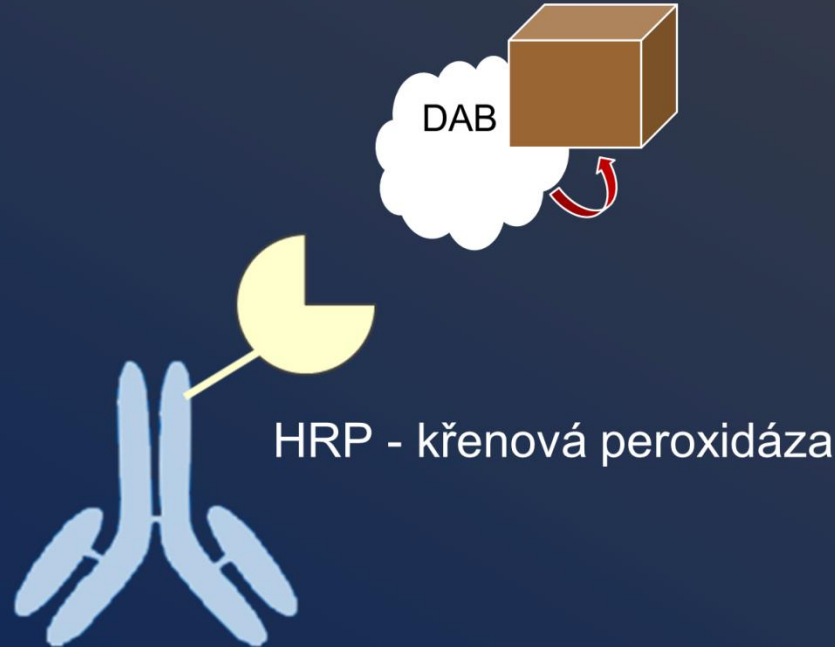
Cytoskelet

Značky – enzymy

Substrát DiAminoBenzidin

Označení místa, kde je protilátka vázaná se provede přidáním substrátu k enzymu - vzniká reakční produkt = změna barvy

světelná mikroskopie -
běžné užíváno v IHC



Postup při ImunoHistoChemickém značení tkáně

Postup při IHC značení tkáně

Fixace

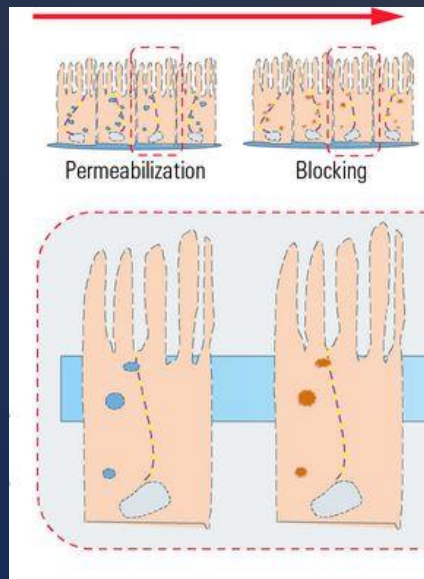
Zalití - Parafin - Deparafin

Krájení

Odkrývání antigenů

Permeabilizace

Blokování



Postup při IHC značení tkáně

Fixace

Zalití - Parafin - Deparafin

Krájení

Odkrývání antigenů

Permeabilizace

Blokování

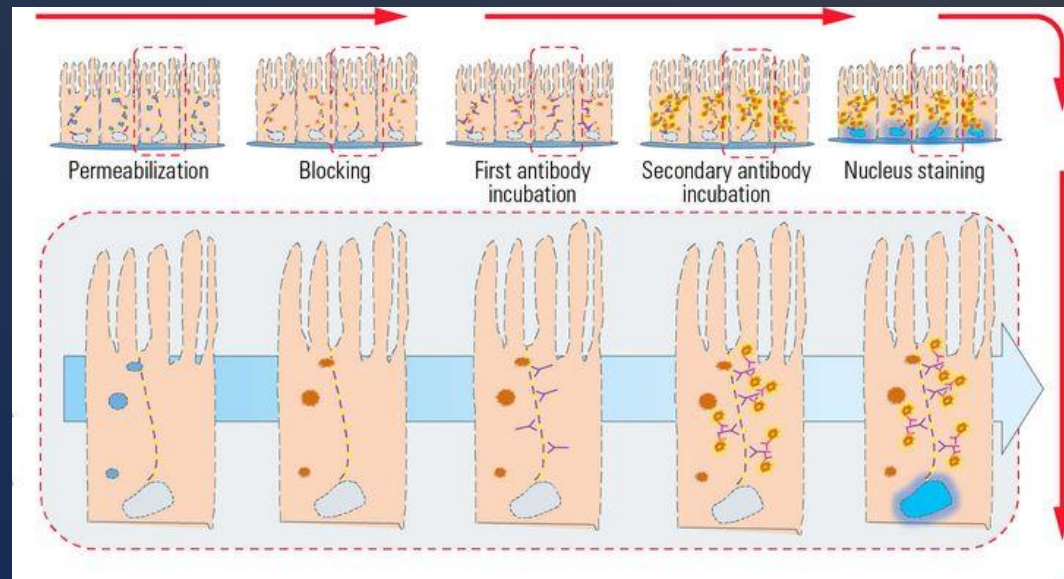
Prim protilátka

Oplach

Sekundar

Oplach

Značení jader DAPI/Hoechst



Postup při IHC značení tkáně

Fixace

Zalití - Parafin - Deparafin

Krájení

Odkrývání antigenů

Permeabilizace

Blokování

Prim protilátka

Oplach

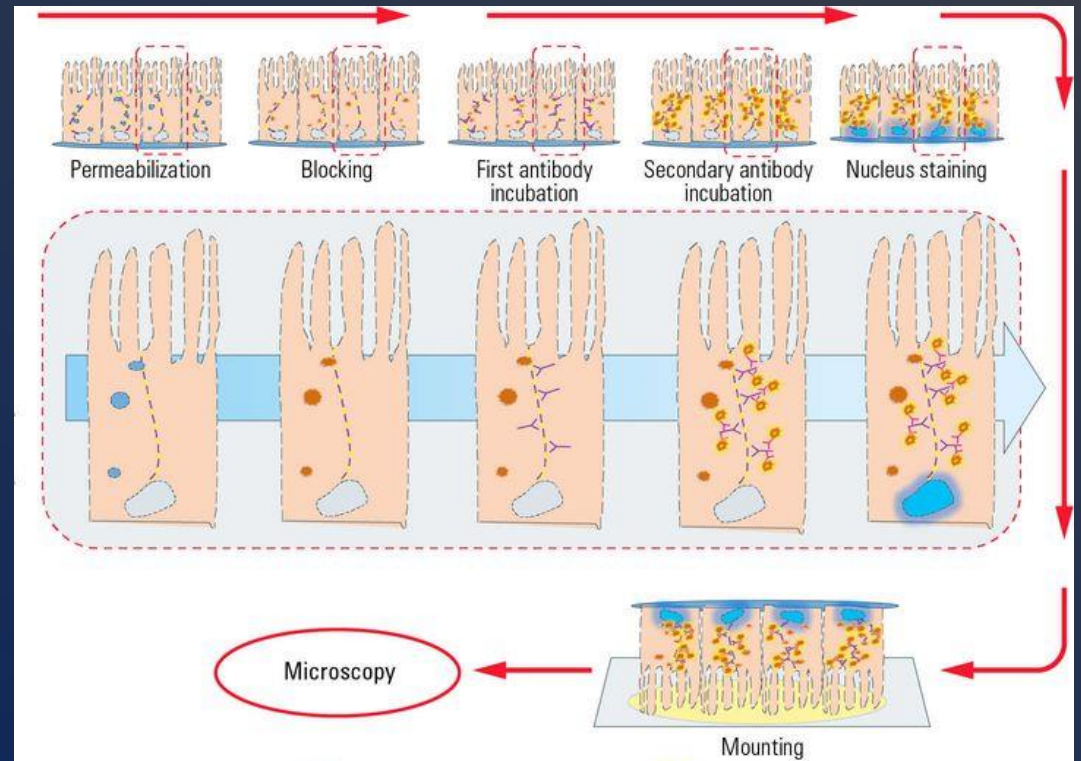
Sekundar

Oplach

Značení jader DAPI/Hoechst

Montáž

Mikroskopie



IMUNOHISTOCHEMIE - metody

- **PŘÍMÁ** – reakce antigen + značená primární protilátka

- **NEPŘÍMÁ**

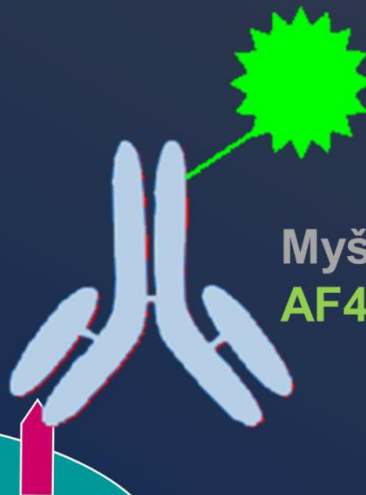
- **DVOJSTUPŇOVÉ** – reakce antigen + primární protilátka + značená sekundární protilátka – vyšší citlivost reakce
- **TROJSTUPŇOVÉ** - sekundární protilátka značená biotinem na sebe váže avidin nebo avidinbiotinový komplex (ABC).

Vícebarevné - Přímé značení

Myší anti-vimentin značený
AF594 fluorochromem



Myší anti-actin značený
AF488 fluorochromem



Nezáleží na původu protilátky

Vícebarevné - Nepřímá metoda značení

Oslí anti-koza značený

AF594



Kozí anti-vim

Králičí anti-myš
značená AF488

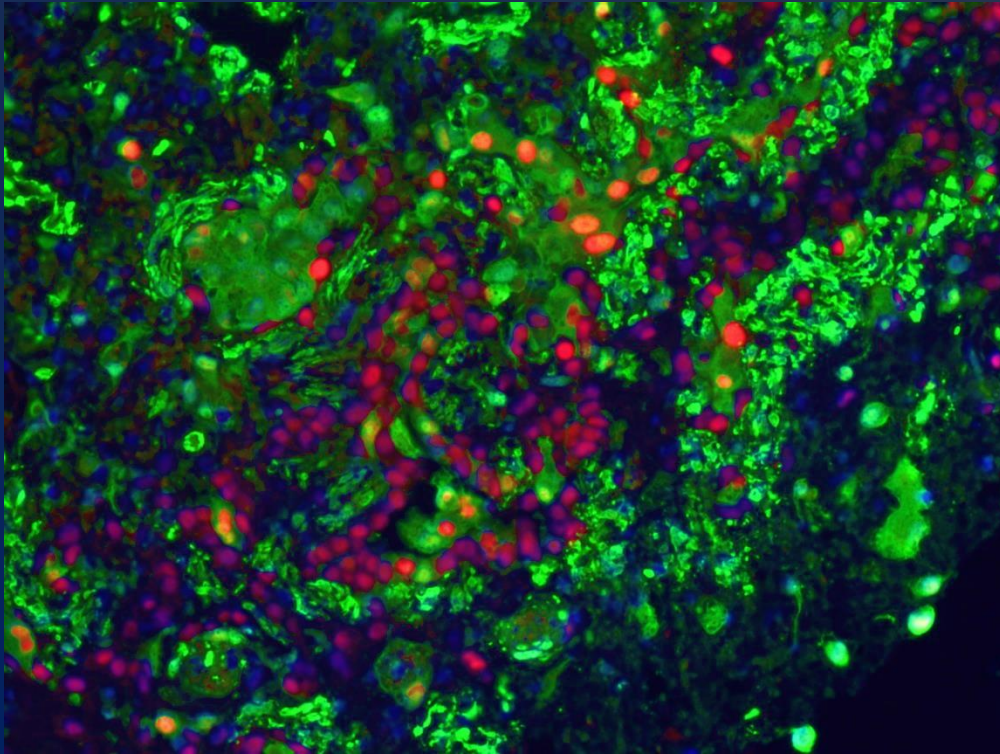
Myší anti-actin



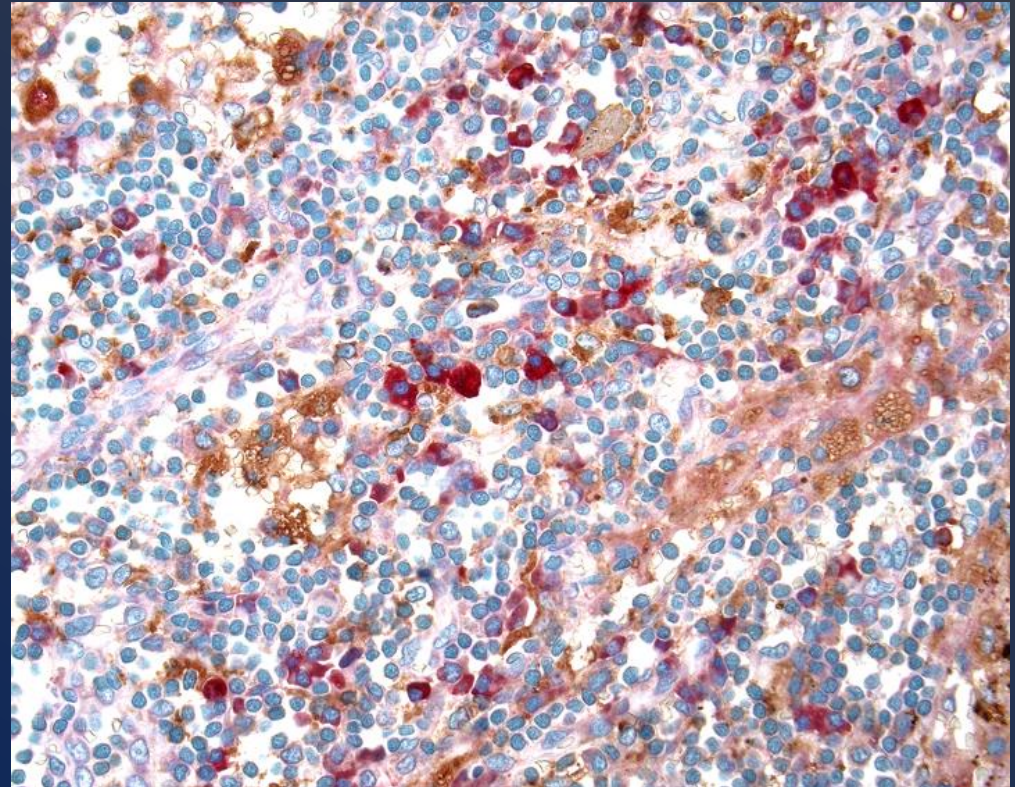
Původ prim protilátky
velmi důležité

Vícebarevné značení

Značka fluorescenční



Značka enzymy **DAB** a **AP**

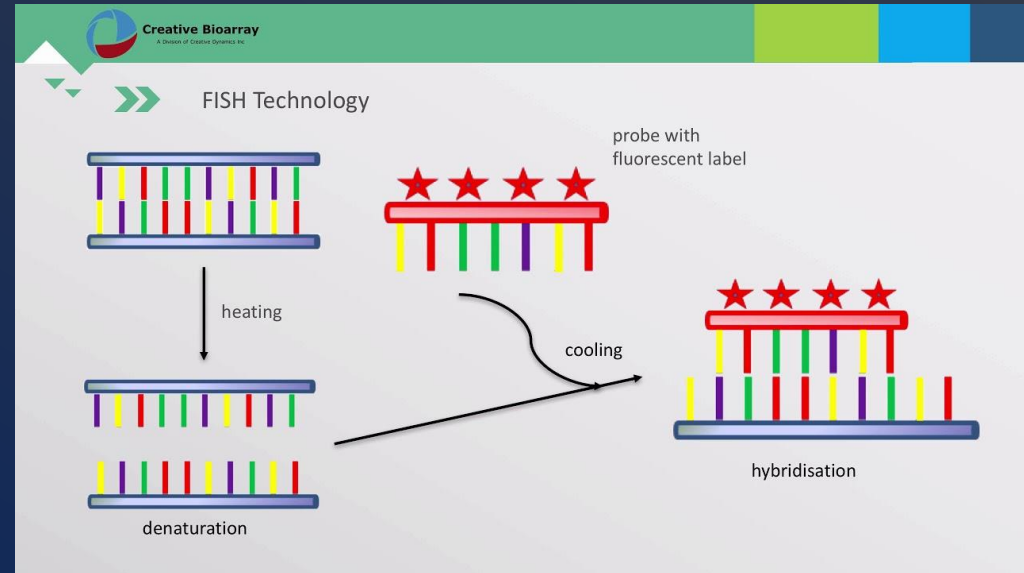


IN SITU HYBRIDIZACE

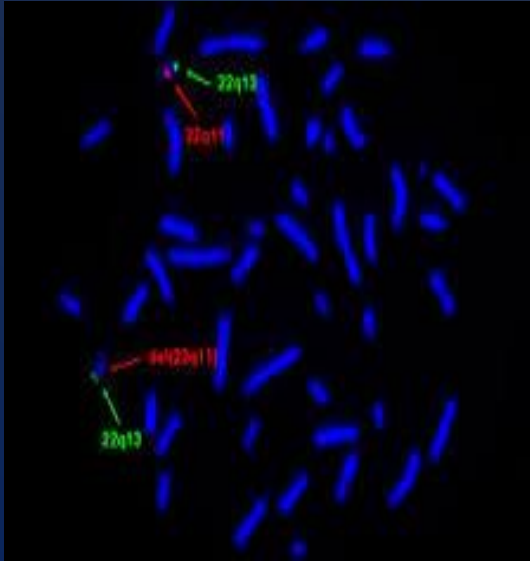
Molekulárně cytogenetická metoda k lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v DNA, popř. RNA

Postup:

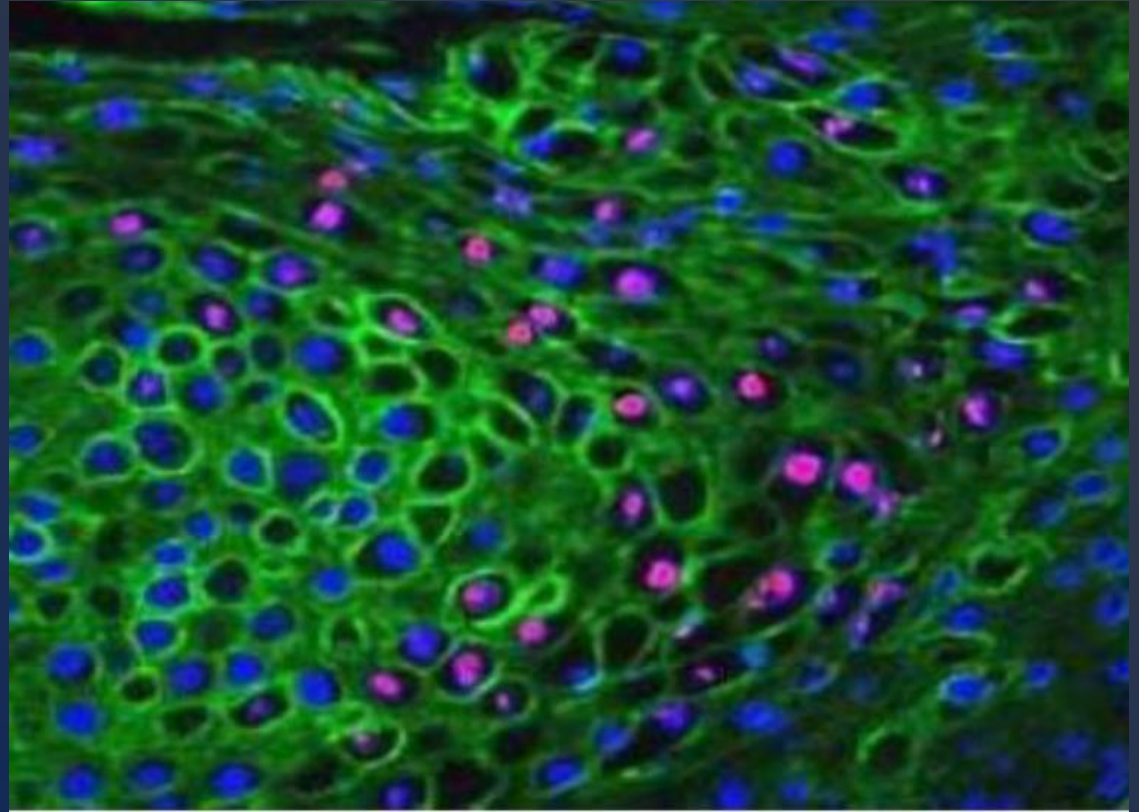
- Příprava materiálu (chromozomy v metafázi, buňky)
- Denaturace sondy a cílové DNA
- Hybridizace sondy a cílové DNA
- Odstranění nespecifických signálů
- Fluorescenční barvení jader



FISH = fluorescence in situ hybridization - Aplikace



Genetika



Diagnostika - HPV, jadra, cytokeratin