

Histochemické techniky u rostlin

Fixace
Zalévání
Krájení řezů
Inkubace řezů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Histologie a histochemie

- původ názvu = **z řečtiny:**
 - histos = tkáň**
 - logos = slovo, nauka**
- **histologie** - vědní disciplína, která se zabývá studiem mikroskopické stavby živočišných tkání a rostlinných pletiv
- **histochemie** – chemické reakce na úrovni živočišných tkání a rostlinných pletiv
- používají speciální techniky přípravy preparátů a mikroskop

Fixace

fyzikální

- vymrazování

chemická

- **fixativa koagulující** (**alkoholy, kyselina octová, kyselina chrómová, osmium** - koagulace cytoplazmatických proteinů ničí jejich aktivitu a strukturu organel (např. mitochondrie))
- **fixativa nekoagulující** – **formaldehyd, glutaraldehyd** - zachovávají aktivitu proteinů i organely (pro histochemii a EM)

Fixace

- zachování buněk a pletiv ve stavu co nejbližšímu k živému stavu
- snížení strukturálních změn a změn chemického složení
- strukturální proteiny a jiné sloučeniny se musí změnit na nerozpustné ve všech reagensích, se kterými přijdou v průběhu celého procesu do styku
- perfektní fixace = jen teoretická

Histochemie

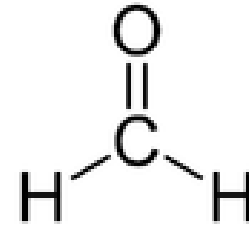
histologická metoda užívaná k průkazu různých látek přímo v pletivech a buňkách

- látkové složení
- katalytická histochemie
- imunohistochemie
- lektinová histochemie
- *in situ* hybridizace (ISH)

Odběr materiálu

- rychlý
- pokud je nutná preparace – raději **již ve fixáži**
- velikost vzorků přiměřená – pro rychlý průnik fixáže do celého objektu
- volba segmentů podle plánovaného studia

Formaldehyd



- je plyn s bodem varu -21°C
- používá se jako
 - vodný roztok plynu (37- 40%) **formalín** nebo
 - pevný polymer - **paraformaldehyd**
- během skladování se zhoršuje kvalita formalínu vlivem tzv. **Canizariho reakce**, kdy vzniká kyselina mravenčí = **prudké snížení pH** – neutralizace, pufrý
- po primární vazbě na různé funkční skupiny se vytvářejí křížové vazby („kroslinky“) - dochází k zesíťování molekul proteinů = **nekoagulační fixace**

Glutaraldehyd



- bezbarvá kapalina štiplavého zápachu
- je **toxický** a způsobuje vážné podráždění očí, nosu, krku a plic, bolesti hlavy, ospalost a závratě – pracovat v digestoři, **dodržovat zásady práce s toxickými látkami!**
- používá se samostatně nebo ve směsi s formaldehydem
- zesíťování bílkovin pletiva po fixáži GA je mnohem pevnější - způsobuje větší tvrdost pletiv

Fixační směsi – FA (PFA)

4% formalín v 0,1M TRIS / HCl pufro, pH 7,2

(4 ml 36% formaldehydu +32 ml pufro)

- pufro pH 7,2:

0,2M TRIS 25 ml

0,1N HCl 45 ml

doplnit destil. vodou do 100 ml

- **Doba fixace** 2 hod. (u citlivějšího materiálu 0,5 hod. na ledu při 0°C)
- **Propírání fixáže a kryoprezervace**
7,5 % sacharózou ve stejném pufro

Kryostat – příprava řezů



Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

Barvení *in toto*

barvení celých objektů před zalitím a krájením řezů

Barvení řezů

řezy volné („free floating sections“)

řezy přilepené na podložním skle

Lepení řezů

- 1890 – Mayer: glycerol – bílek + fenol (thymol)
 - chromová želatina („gelatin and chrome alum“)
 - poly-L-lysin
 - podložní skla SuperFrost Ultra Plus® - není nutno používat adheziva
-
- sušení na teplé ploténce

Látkové složení

- ionty (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+})
- organické funkční skupiny
- cukry, polysacharidy (škrob, celulóza, kalóza)
- tuky
- DNA, RNA
- lignin

Průkaz tuků

- barví se barvivy rozpustnými v tucích
- **Sudan IV**, sudanová čerň, olejová červeň, nilská modř
- užívá se zpravidla fixace zmražením s následným krájením v kryostatu

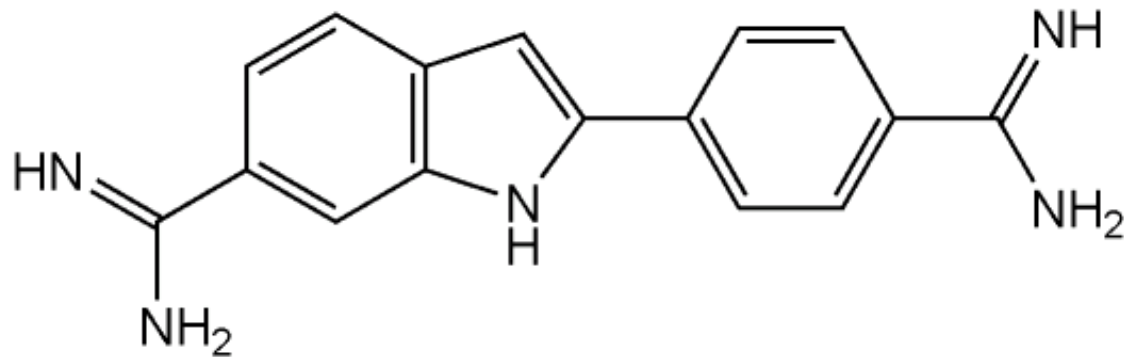
Důkaz DNA - Feulgenova reakce

- hydrolýza 1N HCl
 - RNA se rozpustí
 - DNA hydrolyzuje částečně (odstraní se báze)
- vznik aldehydových skupin
- jejich následná reakce se **Schiffovým reagens**

výsledek = nerozpustný červený reakční produkt

Fluorescenční vizualizace DNA

DAPI = 4',6-diamidino-2-fenylindol



fluorescenční barvivo, které se silně váže na DNA
může procházet přes intaktní membrány (= je toxické a mutagenní) -
může být použito pro barvení živých i fixovaných buněk

často se používá pro barvení jader, detekci mykoplazmat a virové DNA
v buněčných kulturách

Důkaz RNA

- organely obsahující RNA se barví bazickými barvivy
- např.: toluidinovou modří, methylenovou modří
- RNA však není jedinou bazofilní látkou v pletivech tkáních - nezbytná **negativní kontrola** = kontrolní preparát inkubovaná ribonukleázou

Cukry

PAS (Periodic Acid – Schiff) - pozitivní látky:

- polysacharidy(škrob, celulóza, kalóza, glykogen)
- glykosaminoglykany/ mukopolysacharidy/
(hyaluronová kys., chondroitinsulfát)
- proteoglykany
- glykoproteiny(thyreoglobulin, kolagen)
- glykolipidy(lipofuscin)

Katalytická histochemie – lokalizace aktivity enzymů

enzymy jsou katalyzátory většiny biochemických reakcí

- zpravidla fixace zmražením nebo aldehydy

Princip:

- **první reakce** (histochemická):
 - enzym + substrát → reakční produkt
- **druhá reakce** (vizualizační):
 - tvorba barevného nebo elektrondensního reakčního produktu

Vždy nutnost **kontrolních řezů** (inaktivace, bez substrátu...)

Katalytická histochemie

– vizualizační reakce

- precipitace s kationty kovů (Gomori)
 - vznik barevné nerozpustné soli Pb, Co
- simultánní azokopulace
 - reakční produkt I. reakce (naftol) se převede na azobarvivo
- indigogenní reakce
 - štěpení substrátu na indoxyl a jeho dimerace a oxidace na indigo
- tetrazoliová metoda
 - redukce tetrazoliové soli na barevný formazan
- spřažená peroxidázová reakce
 - oxidace DAB

Klasifikace enzymů

1. hydrolytické enzymy (hydrolázy)

- fosfatázy (hydrolyzují estery a amidy kyseliny fosforečné)
 - alkalické fosfatázy
 - **kyselé fosfatázy**
 - glukoso-6-fosfatázy
 - adenosin trifosfatázy
- karboxylester-hydrolázy
 - **nespecifické esterázy**
 - lipázy
 - cholinesterázy
- glykosidázy
 - kyselé α -glukosidázy
 - β -glukosidázy**
 - α -galaktosidázy
 - kyselé- β -galaktosidázy
 - β -glukuronidázy**
 - disacharidázy
- peptidázy
- sulfatázy

Klasifikace enzymů

2. transferázy

3. oxidoreduktázy

a. oxidázy

i. cytochrom c oxidáza

ii. peroxidázy

b. dehydrogenázy

i. koenzym-independentní dehydrogenázy

1. sukcinát dehydrogenáza

2. glycerol-3-fosfát-dehydrogenáza

ii. tetrazolium reduktázy

iii. koenzym-dependentní dehydrogenázy

např. glutamát dehydrogenáza, malát dehydrogenáza, laktát dehydrogenáza...

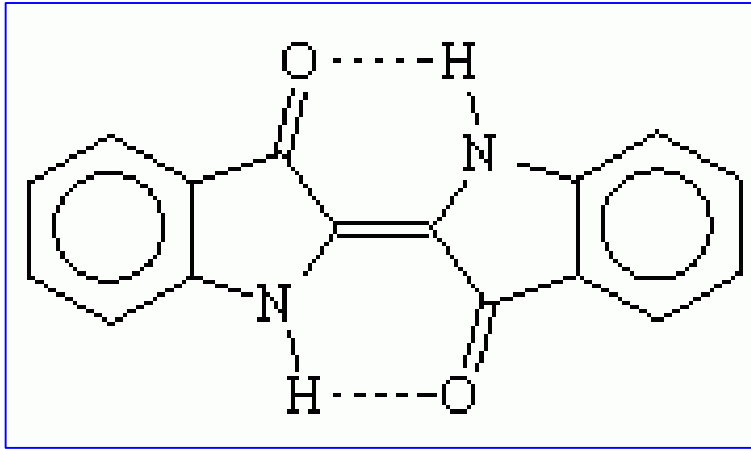
4. lyázy

Gomoriho průkaz aktivity kyselého fosfatázy (precipitace s kationty kovů)

- řez pletivem + inkubační médium se substrátem štěpeným enzymem (např. glycerofosfát sodný)
- uvolnění fosfátových iontů
- jejich reakce s dusičnanem olovnatým

výsledek: elektrodenní precipitát $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$

Indigo



Indigofera tinctoria
Indigofera sumatrana
Isatis tinctoria

dnes již vyráběné
synteticky

pro vlastní barvení řezů se nepoužívá, ale v histochemii jsou často používány tzv. **indigogenní metody**, při kterých je indigo výsledným produktem reakce

Indigogenní metoda

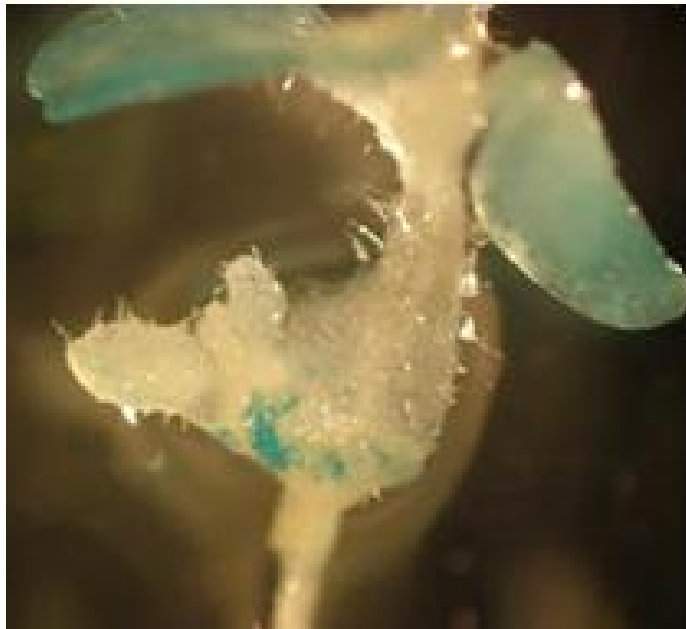


1. krok = štěpení substrátu enzymem
2. krok = dimerace a oxidace na indigo

detekce aktivity β -glukosidasy: substrátem pro enzym je
5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glukopyranosid

Indigogenní metoda histochemické lokalizace aktivity β -glukosidasy Zm-p60.1

inkubace celé rostlinky, kultivace 28 DAS na MS s *t*-Z



transgenní tabák se *Zm-p60.1*



netransgenní kontrola

substrát:

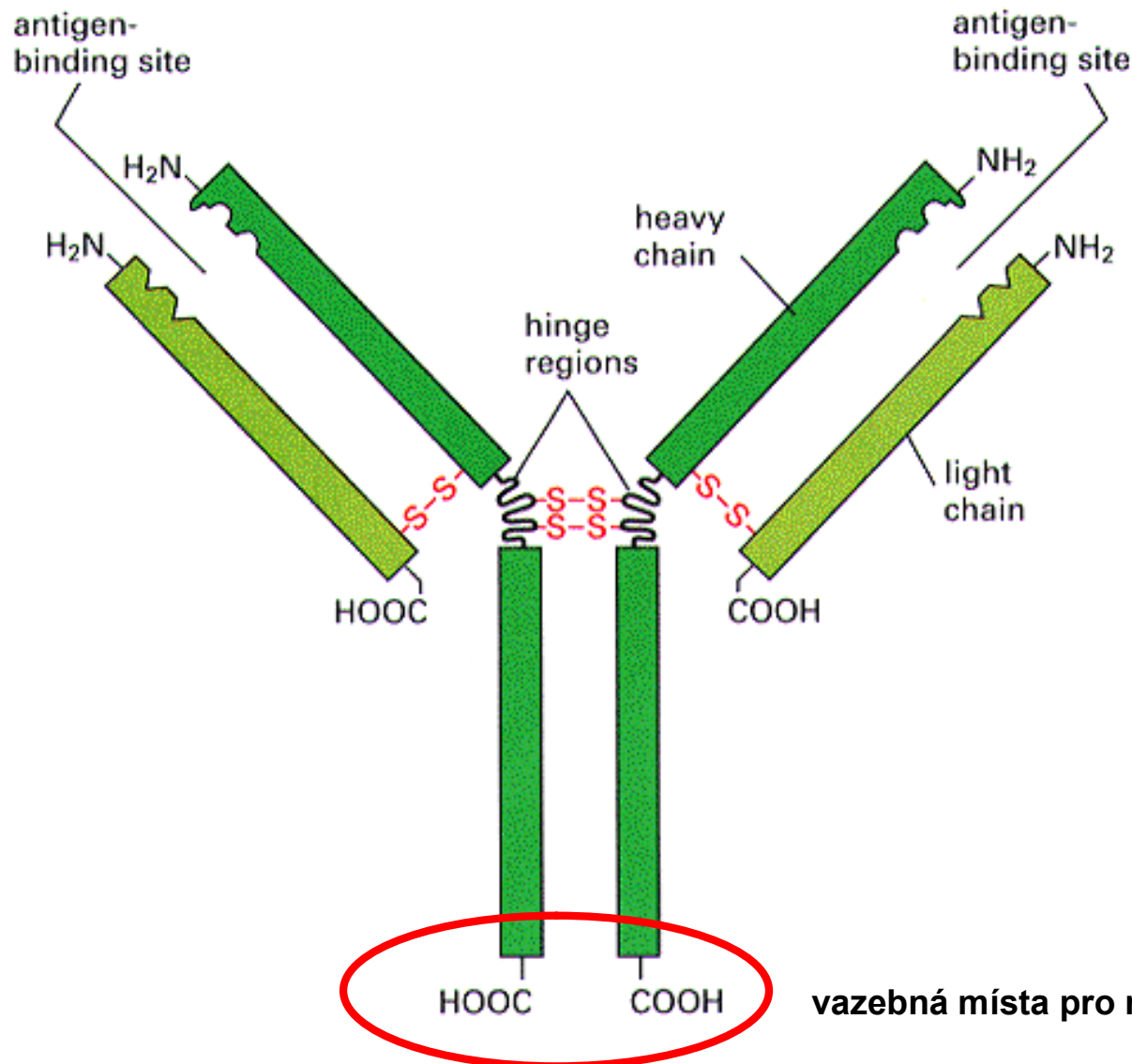
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukopyranosid

Chmelík *et al.* 2010

Imunohistochemie

- slouží k průkazu tkáňových či buněčných antigenů pomocí vazby mezi antigenem a protilátkou
- **antigeny** = proteiny, glykoproteiny, proteoglykany
- **protilátky** = sérové proteiny – imunoglobuliny (jsou vytvářeny plazmatickými buňkami)
- v imunohistochemii se nejčastěji používá třída IgG

Protilátka – imunoglobulin IgG



skládá se ze čtyř
polypeptidových
řetězců spojených
disulfidickými můstky:

2 identických **lehkých**
řetězců

a

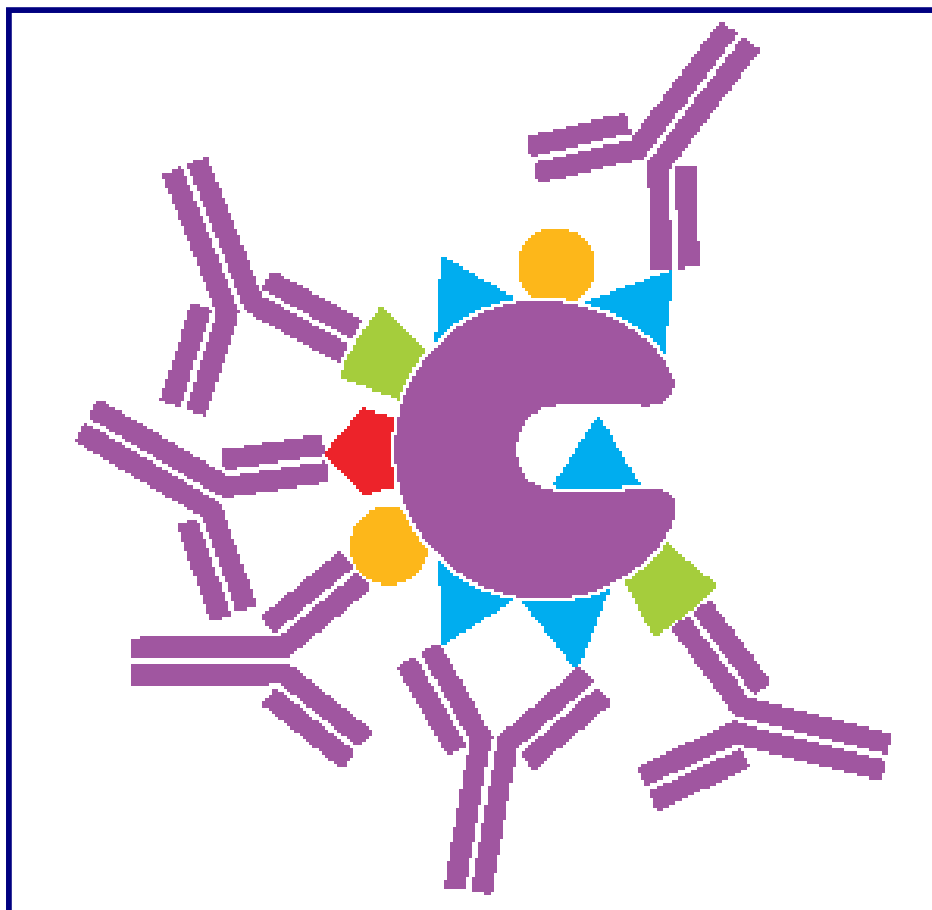
2 identických **těžkých**
řetězců

vazebná místa pro receptory

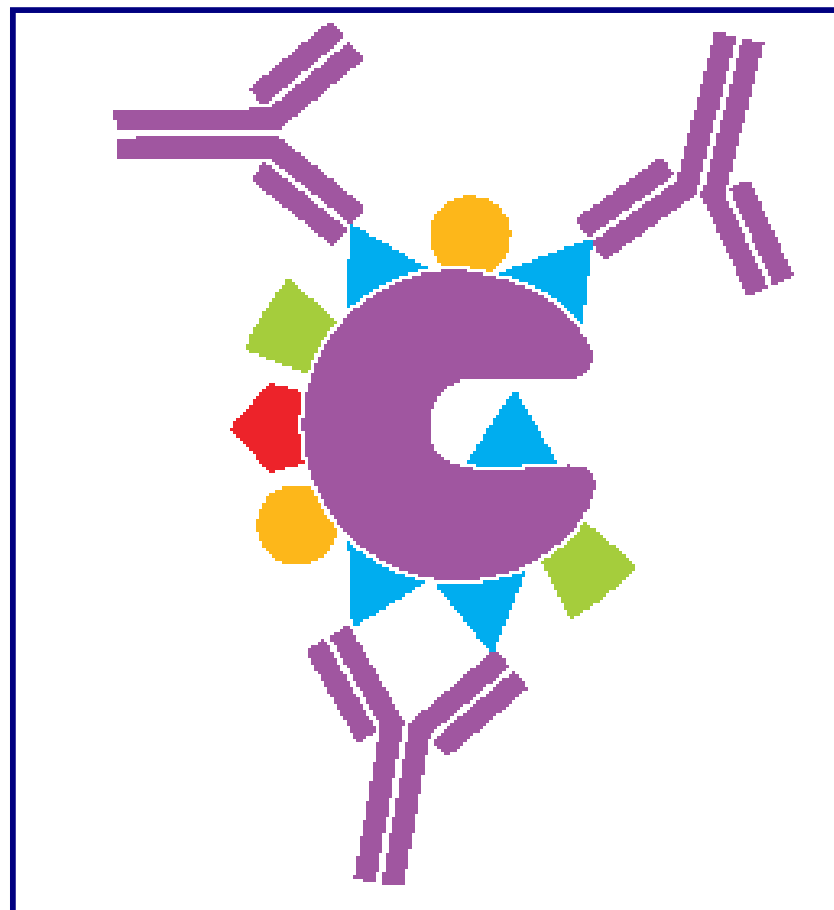
Epitopy

- = specifické místo antigenu, na které se váže protilátka, (antigenní determinanta)
- většina antigenů má **více epitopů**, které vyvolávají při imunizaci vznik skupiny různých protilátek (**polyklonálních**), namířených proti jednotlivým epitopům

Polyklonální protilátka



Monoklonální protilátka



Přímá metoda

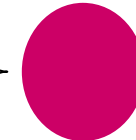
Ab

epitop



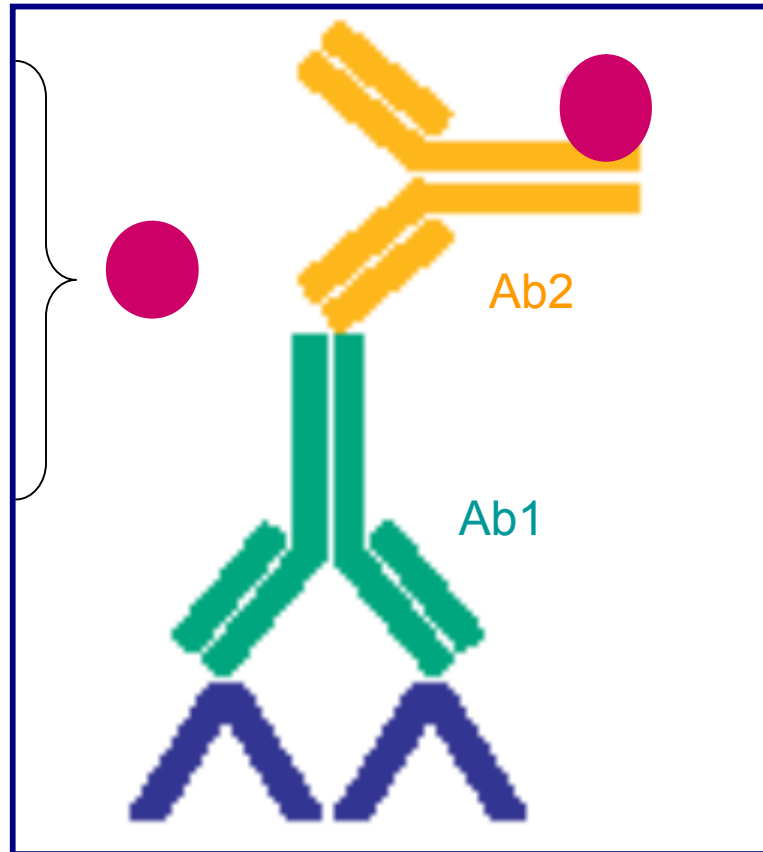
značení protilátky

FITC
TRITC
Texas Red
Cy3
Cy5
phycoeryt.
HRP
ALPase



Nepřímá 2-stupňová metoda

FITC
TRITC
Texas Red
Cy3
Cy5
phycoeryt.
HRP
ALPase



univerzálnější (různé primární protilátky (Ab1) reagují s jednou sekundární protilátkou (Ab2))

citlivější

Montáž řezů

- nabarvené řezy je ještě potřeba zakonzervovat na podložním skle - říkáme „zamontovat“
- 1844 - **J.E. Purkyně** roku a jeho žák **Oschatz** popsali svoji metodu montování tak, že nabarvený řez prostě potřeli lakem. Užívali tzv. **kopálovou pryskyřici**, získanou z tropických stromů, ale znali již i **kanadský balzám**. Jejich preparáty z té doby jsou stále v dobrém stavu.
- kanadský balzám se užívá dodnes, ale používají se i **syntetické pryskyřice**

Odkazy na zajímavé stránky

<http://www.bristol.ac.uk/vetpath/cpl/histmeth.htm>

[protokoly imunohistochemie](#)

http://www.ihcworld.com/antibody_staining.htm

[protokoly barvení pro pletiva zalitá v pryskyřici](#)

<http://www.ebsciences.com/staining/orcein.htm>

[encyklopedie](#)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Staining>