



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Téma 06: Struktura pestíků a prašníků lilie B. Krájení parafinových řezů

Ke studiu detailní struktury stavby rostlinných orgánů se obvykle používají parafinové řezy připravované pomocí přístroje na získávání tenkých řezů, tzv. mikrotomů. Mikrotomy jsou konstruovány buď jako rotační nebo sáňkové. Tloušťka řezů závisí na charakteru objektu, většinou se pohybuje od 6 do 15 μm .

Rostlinný materiál: segmenty prašníků a pestíků květních pupat lilie zalitých do parafínu v roce 2011 (viz protokol 06_301_lilie_2011_postup)

- Vzorky:**
- 301.1. segmenty prašníků poupěte 5 cm dlouhého
 - 301.2. segmenty prašníků poupěte 6 cm dlouhého
 - 301.3. segmenty prašníků poupěte 9 cm dlouhého
 - 301.4. segmenty pestíku (blizna, čnělka, semeník) poupěte 5 cm dlouhého
 - 301.5. segmenty pestíku (blizna, čnělka, semeník) poupěte 6 cm dlouhého
 - 301.6. segmenty pestíku (blizna, čnělka, semeník) poupěte 9 cm dlouhého

Mikrotom Reichert, podložní skla potažená tenkou lepící vrstvou chromové želatiny, žiletka, štětce, tužka s diamantovým hrotem, nahřívací ploténka.

Příprava chromové želatiny (Pappas 1971)

- 100 ml destilované vody
- 0,5 g želatiny
- 0,05 g síranu chromito-draselného

1. V odlitém malém množství vody rozpustit kamenec (bude se přidávat až do rozpuštěné želatiny).
2. Želatinu nechat nejdříve nabobtnat, pak mírně nahřát a rozpustit (na vodní lázni) a smíchat s roztokem kamence.
3. Po vychladnutí filtrovat přes filtrační papír Whatman1.
4. Vychladlým roztokem protáhnout **dokonale odmaštěná** podložní skla, vytvoří se rovnoměrný tenký povlak želatiny. Při nedokonalém odmaštění podložních skel nedochází k adhezi želatiny na povrch skel.
5. Skla se vysušit ve svislé poloze a uložit na bezprašném místě. Mohou se i nějakou dobu skladovat (pro delší skladování je vhodnější uchování v ledničce).

Poznámka:

Roztok chromové želatiny je možno skladovat při 5°C 48 hodin.
Později již není vhodné směs používat.

Postup krájení parafinových řezů:

1. Parafinový blok s orientovanými segmenty vzorků rozdělíme naříznutím žiletkou a rozlomením napřed na pruhy s jednou řadou vzorků a následně oddělíme stejným způsobem parafinový bloček s jedním objektem.
2. Pomocí zahřátého skalpelu přitavíme parafinový bloček na dřevěný špalíček, který upevníme do svěráku Neapolské svorky sáňkového mikrotomu Reichert vybaveného držákem mikrotomových čepelí. V případě potřeby mažeme sánky mikrotomu parafinovým olejem, aby byl hladký pohyb bloku s nožem.
3. Žiletkou seřízneme (trimujeme) parafinový bloček do tvaru komolé pyramidy tak, aby vrstva parafinu kolem objektu byla přiměřená a hrany souběžné s ostřím nože mikrotomu byly rovnoběžné (parafinová páska pak bude rovná).
4. Nastavíme pozici Neapolské svorky tak, abychom získali příčné řezy objektem.
5. Nastavíme požadovanou tloušťku řezů a vhodný sklon nože.
6. Opakovaným pohybem sáňek mikrotomu s držákem mikrotomových čepelí krájíme jednotlivé řezy požadované tloušťky, které se spojují v tzv. pásku.
7. Pásku přenášíme pomocí navlhčených štětců (pozor na ostří nože mikrotomu) na tmavou podložku, kde je krájíme podle velikosti plánovaného krycího skla. Musíme počítat s tím, že páska se po nažehlení vyrovná a prodlouží. Při přenosu pásky sledujeme pořadí řezů, klademe je na sklo zleva doprava. Spodní strana řezů je lesklá.
8. Segmenty parafinové pásky přenášíme na vodní hladinu na podložním skle potaženém chromovou želatinou.
9. Na vyhřáté ploténce se voda zahřeje a parafinová páska se vyrovná. Po usušení vody jsou řezy pevně přilepené na podložním skle a je možné s nimi manipulovat v kyvetách při procesu barvení řezů. Nakrájené a vysušené řezy je možné před barvením skladovat i delší dobu v suchém a bezprašném místě.

Literatura:

1. Kiernan, J. (1981): Histological and histochemical methods: Theory and practise. 1.Ed. Oxford: Pergamon Press, 344 s.
2. Lux, A., Erdelská, O. (1998): Praktikum z anatomie a embryologie rostlin. Bratislava : Univerzita Komenského, 135 s. ISBN 80-223-1229-0.
3. Pazourková, Z. (1982): Botanická mikrotechnika. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 166 s.
4. Pappas, P.W. (1971): The use of chrome alum-gelatin (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections. Stain Technol., 46: 121-124.

<http://kfrserver.natur.cuni.cz/cz/edu/mikro/prep/tprep.htm>