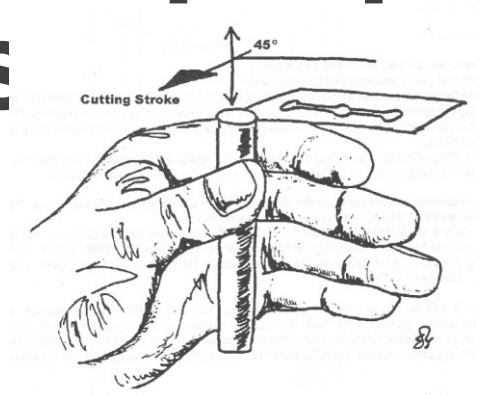
Příprava histologických preparátů

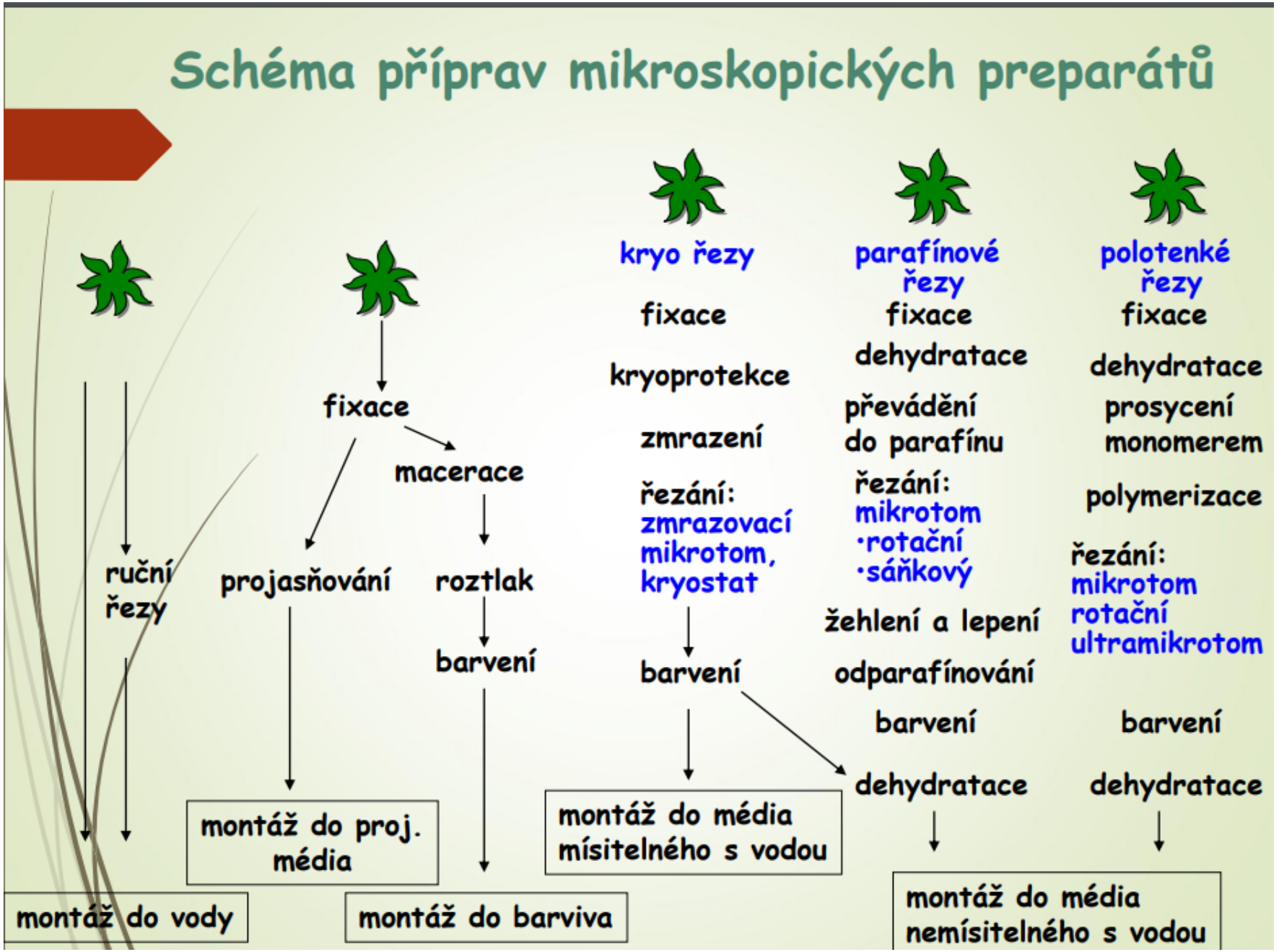
Příprava preparátů pro světelnou mikros



- projasnění
- otisky
- roztlak
- ruční řezy (žiletka, ruční mikrotom)
- řezy pomocí mikrotomu
  - řezání při normální teplotě: prosycení a zalití do parafínu, Steedmanova vosku…
  - vibratom: zalití do agarózy
  - řezání při nízkých teplotách (kryořezy): kryoprotektiva, zalití do speciálního média (např. O.C.T.)
  - ultramikrotom: polotenké řezy (prosycení a zalití do pryskyřice, vhodné i pro transmisní elektronovou mikroskopii)

Obvyklá tloušťka řezů:
Parafín/vosk 5 – 20 μm
Kryořezy 20 – 40 μm
Vibratom 40 – 100 μm (i více)
Ultramikrotom 0,5 – 2 μm (polotentké),
méně než 0,5 μm (ultratenké)

Schéma příprav mikroskopických preparátů



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 reagenciích, se kterými přijdou v průběhu celého procesu do styku
- perfektní fixace = jen teoretická

- fyzikální
  - vysoká teplota - koagulace bílkovin, tání tuků
  - chladová
    - „freeze drying" (mrazové vysoušení, lyofilizace)
    - „freeze substitution" (nahrazování krystalků ledu rozpouštědlem za mrazových teplot)
- chemická
  - fixativa koagulující - koagulace cytoplazmatických proteinů ničí strukturu organel (např. mitochondrie)
  - fixativa nekoagulující - zachovávají organely (pro EM)

Fixační činidla

- **Formaldehyd** – nekoagulující, tvorba můstků mezi bílkovinami, reaguje zřejmě i s fosfolipidy, fenolickými látkami
- **Glutaraldehyd** – dobře zachovává jemné cytologické struktury, silnější než formaldehyd (nevhodný pro sledování enzymatické aktivity), pomalé pronikání
- **Ethanol** – 50-70% roztok, koagulující, ale nechává funkční skupiny bílkovin ve značné míře v původ. stavu
- **Kys. octová** – častá složka fix. směsí, kompenzuje srážení pletiva nebo „prezervativum"
- **Oxid osmičelý** – velmi pomalý, ale jeden z mála efektivních fixativ lipidů

Fixační směsi – FAA (FPA)

Formaldehyde-Acetic (Propionic) acid – Aethanol

50% nebo 70% ethanol	90 ml
ledová kyselina octová	5 ml
37 – 40% formaldehyd	5 ml

fixáž koagulující

stálá

rychle proniká

pro anatomické účely

Kryořezy

Kryotom

Lze vynechat

(fixace) – (kryoprotekce) – zalití do média – rychlé zmražení - řezání

kryoprotekce: inkubace v roztocích sacharózy (zabránění tvorby velkých krystalů)

médium vhodné pro řezání za nízkých teplot – **O**ptimal **C**utting **T**emperature (OCT) (SLOŽENÍ: polyethylen glykol+polyvinyl alkohol)

Pracovní prostor v kryotomu

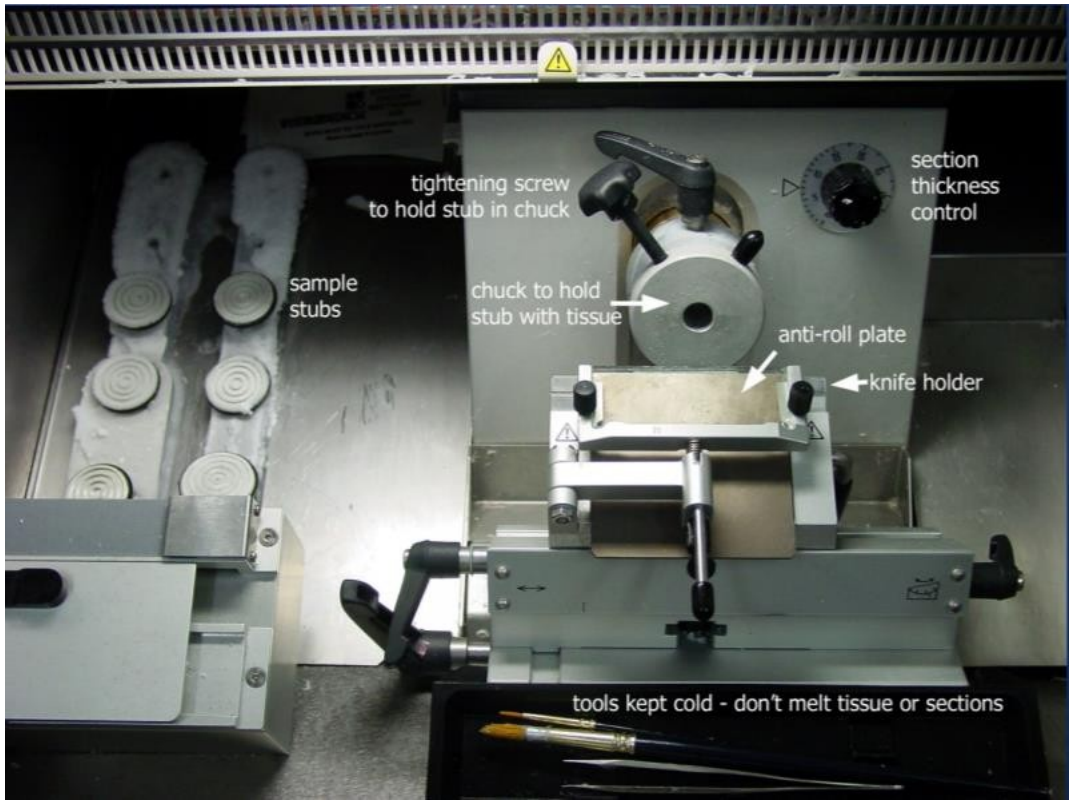
Kryo řezy

Příprava:

- Kryoprotekce
- Zamražení v – 80°C
- Krájení v kryostatu v cca. – 20°C

- Výhody kryořezů:
  - Rychlá příprava řezů
  - Zachování enzymatické aktivity i antigenicity
  - Zachycení látek, které by se standardní technikou rozpustily (lipidy)
  - Zachování buněčné morfologie
  - Na fixovaných i nefixovaných vzorcích

- Nevýhoda – nižší kvalita preparátů (tlustší, riziko poškození krystaly)



Ultratenké (polotenké) řezy

tloušťka řezů 500 nm až 2 μm (vhodné pro TEM)

Příprava

- fixace glutaraldehydem nebo osmiem
- odvodnění alkoholová řada + aceton
- infiltrace a zalití do **pryskyřice**
- epoxidová pryskyřice polymeruje při 60°C, akrylátová působením UV
- krájení na ultramikrotomu

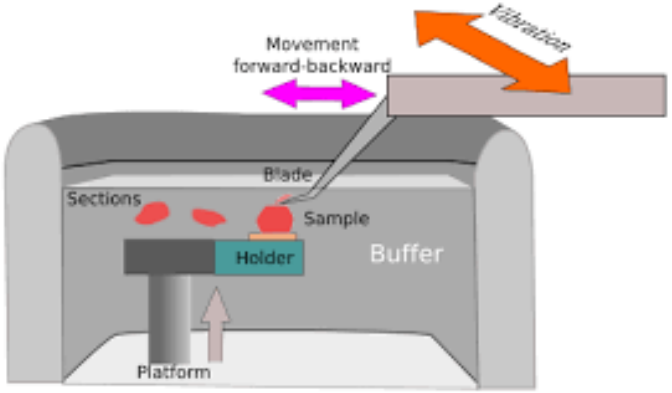
TEM: umístění řezu na speciální síťku

Vedle nože je vanička na vodu, na jejíž hladinu se splaví řezy

© 2001 < Jana Nebesářová>

E-book:
http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/index.html

Vibratom



Leica Biosystems

- vibrující čepel

- fixovaný nebo čerstvý materiál zalitý v agaróze

- bloček připevněn ke kovovému bloku a řezání probíhá pod vodou nebo pufrem

Výhody:

- Bez dehydratace materiálu, rozpouštění parafínu a rehydratace řezů
- žádné vysoké teploty ani chemické zásahy (zachována aktivita enzymů, stabilita antigenů)
- snížení autofluorescence (formaldehyd a parafín zvyšují)
- nejsou strukturální změny vlivem dehydratace nebo nízkých teplot

Nevýhody:

- pouze jeden řez
- větší tloušťka řezu (nevadí u konfokálního mikroskopu)
- problémy s lepením řezů na sklíčko díky jejich tloušťce

A Comparative Study of Sample Preparation for Staining
and
Immunodetection of Plant Cell Walls by Light Microscopy
(Verhertbruggen et al., 2017)

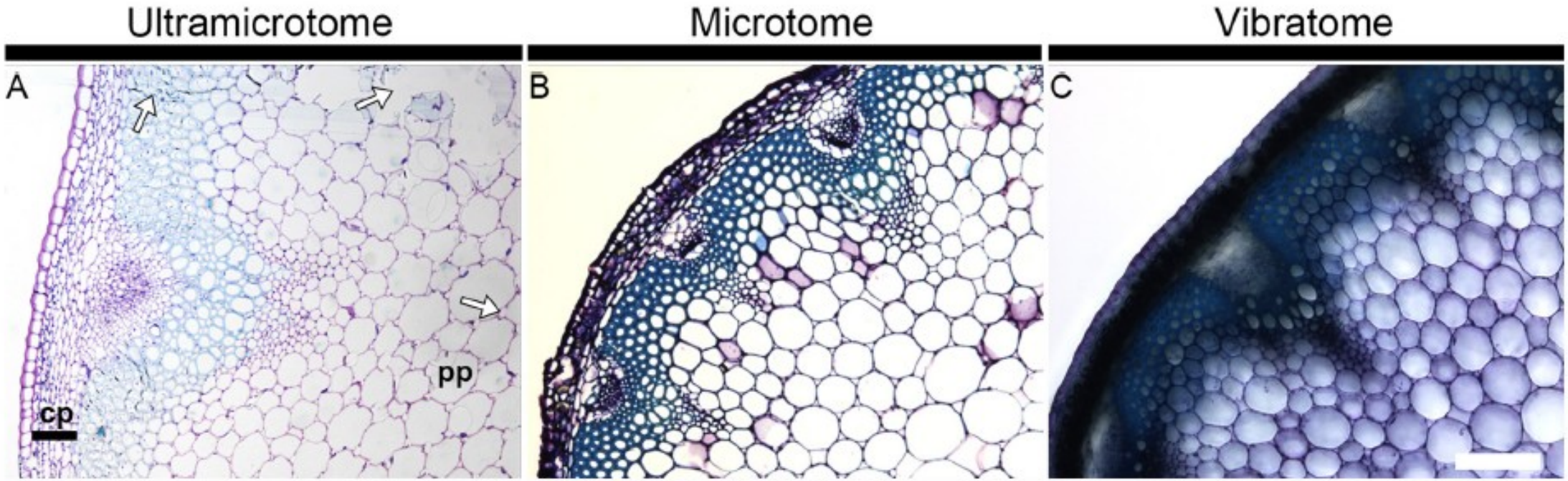


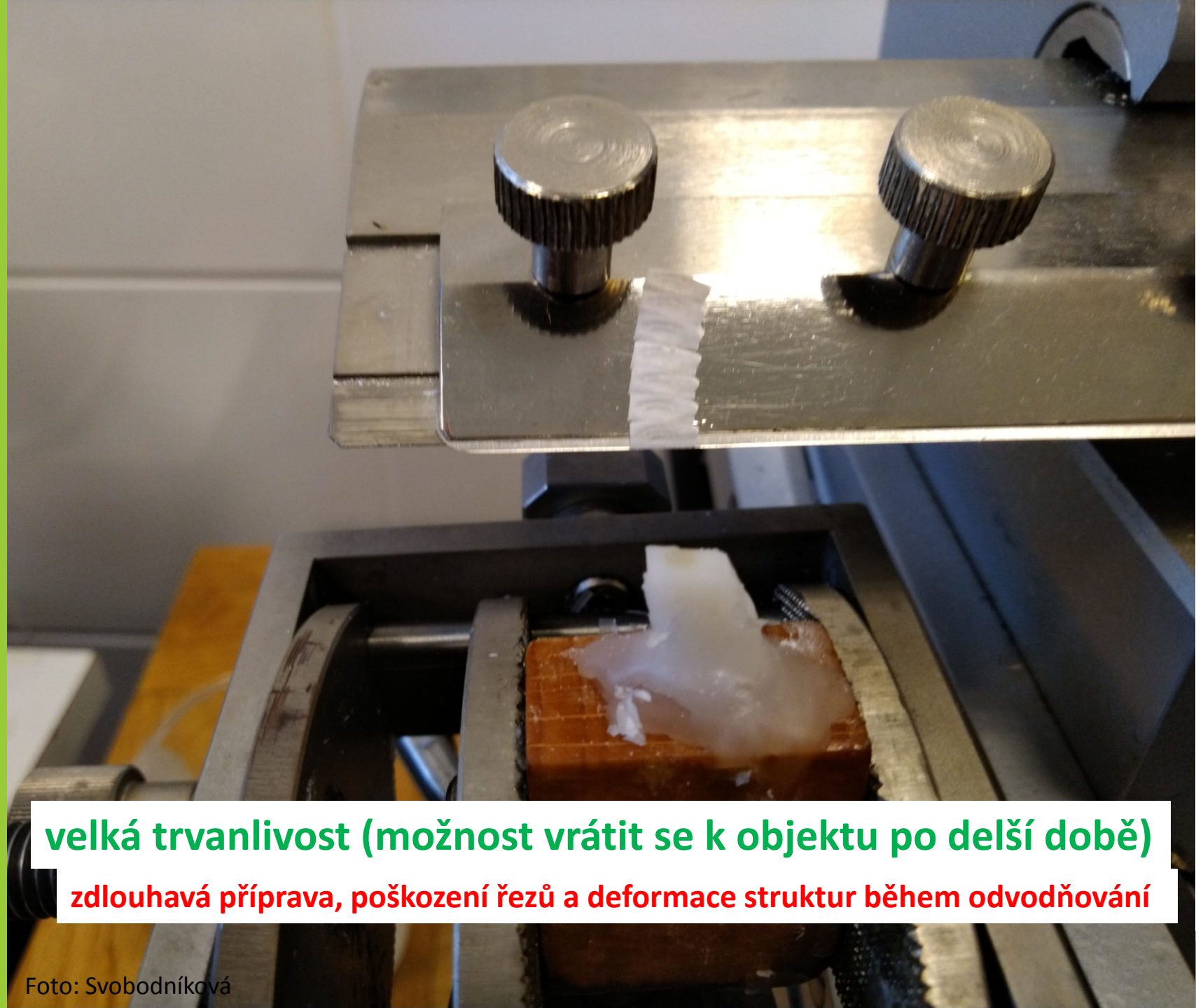
FIGURE 1 | Section quality and tissue integrity of plant material depend of the sample preparation. The micrographs show transverse *A. thaliana* stem sections obtained with an ultramicrotome **(A)**, a microtome **(B)** and a vibratome **(C)** and stained with toluidine blue. The thickness of the sections is 0.5, 12, and 60 μm, respectively. The staining with toluidine blue highlights how the image definition depends on the thickness of the section and how tissue integrity depends on the method of sectioning and its corresponding mode of embedding. The arrows in micrograph A highlight regions where the tissue integrity has been affected by the procedure of resin embedding. Note that equivalent alterations can occur when sections are embedded in wax. cp, cortical parenchyma; pp, pith parenchyma. Scale bar: 200 μm.

Obecný postup přípravy tenkých řezů

1) Příprava a fixace objektů
2) Zalévání objektů do vosku
3) Zhotovení mikrotomových řezů
4) Odvoskování a barvení řezů
5) Pozorování ve světelném/ fluorescenčním mikroskopu

Nebo

6) odvodnění a uzavření do média nemísitelného s vodou **(kanadský balzám, Eukitt®, Entelan, DPX)** a přikrytí krycím sklem



velká trvanlivost (možnost vrátit se k objektu po delší době)

zdlouhavá příprava, poškození řezů a deformace struktur během odvodňování

Foto: Svobodníková

Příprava materiálu

- zpracováváme čerstvý, čistý a nepoškozený materiál
- velikost rostlinného segmentu přizpůsobíme zalévacímu médiu (větší orgány rozřežeme na menší části)

Fixace

- usmrcení a stabilizace živých pletiv
- dlouhodobé uchovávání- konzervace vzorků
- výběr fixační směsi > musí se přizpůsobit fixovanému objektu i mikroskopické analýze
- fixační činidlo > zachovat strukturu, rychle prostoupit pletiva a neovlivňovat výsledek barvení
- fixace probíhá v nádobách s dobrým uzávěrem, objem fixáže má být 20ti až 50ti násobný oproti objemu fixovaného objektu> fixaci můžeme urychlit vakuovou infiltrací

Stonkové a kořenové vrcholy, pupeny bylin	NAVAŠIN, CRAF I, II, III
Listové pupeny dřevin	FAA, FPA
Mladé stonky a kořeny	CRAF II, III
Dřevnaté stonky a kořeny	CRAF IV, V, FAA, FPA
Starší listy	FAA, FPA
Dužnaté listy sukulentů	CRAF I
Květní pupeny	CRAF III, FAA, FPA
Tyčinky	CARNOY, CRAF III, FAA
Semeníky	CARNOY, CRAF III
Embrya	CRAF III
Mladé plody	CRAF I, II
Staré plody	CRAF III, FAA, FPA

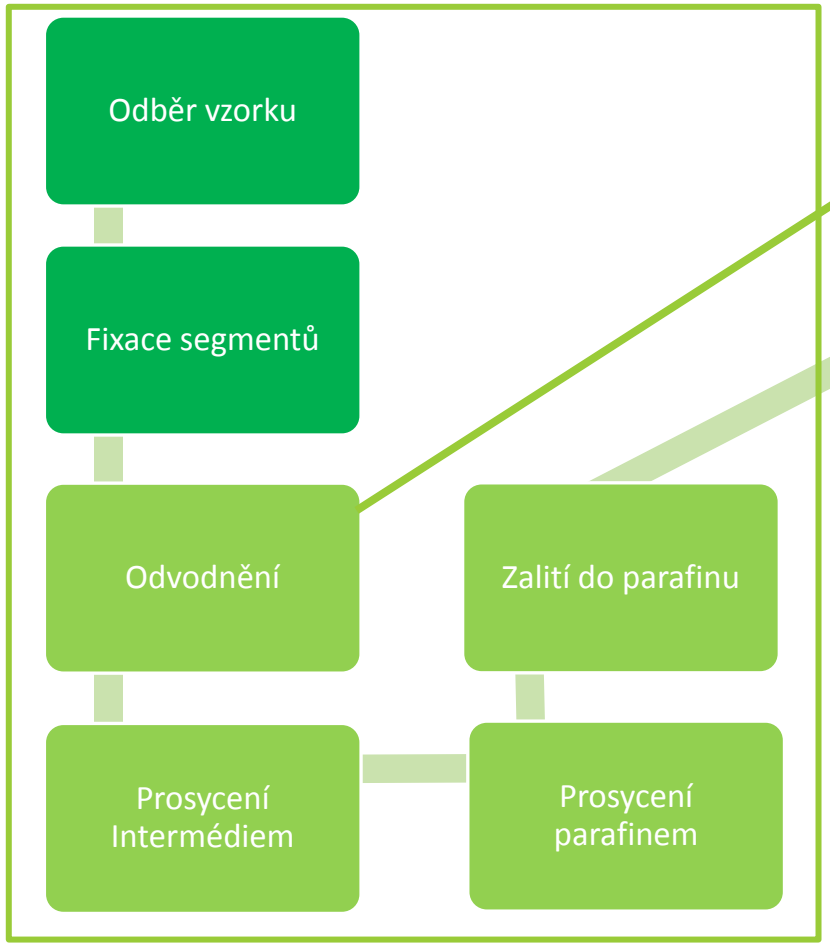
(Převzato a upraveno Lux et al., 1998)

FAA (formaldehyd-acetic acid-etyl alcohol)

- nejčastěji používaný fixační roztok
- stálá, rychle pronikající fixáž, vhodná pro anatomické účely
- fixace 6-24h
- dobré konzervační vlastnosti- dlouhodobé uchovávání

50-70% etanol	**90 ml**
Konc. Kyselina octová	5 ml
37-40% formaldehyd	5 ml

Obecné schéma parafinové metody



Proč vzorky musíme dehydratovat než je můžeme prosytit voskem?

Protože vosk je hydrofobní. Tudíž nejprve musíme vzorek odvodnit a prosytit intermédiem (látka, která se mísí s odvodňujícím i zalévacím médiem). Teprve pak prosycujeme zalévacím médiem (parafinem).

Zalévání segmentů

Steedmanův vosk

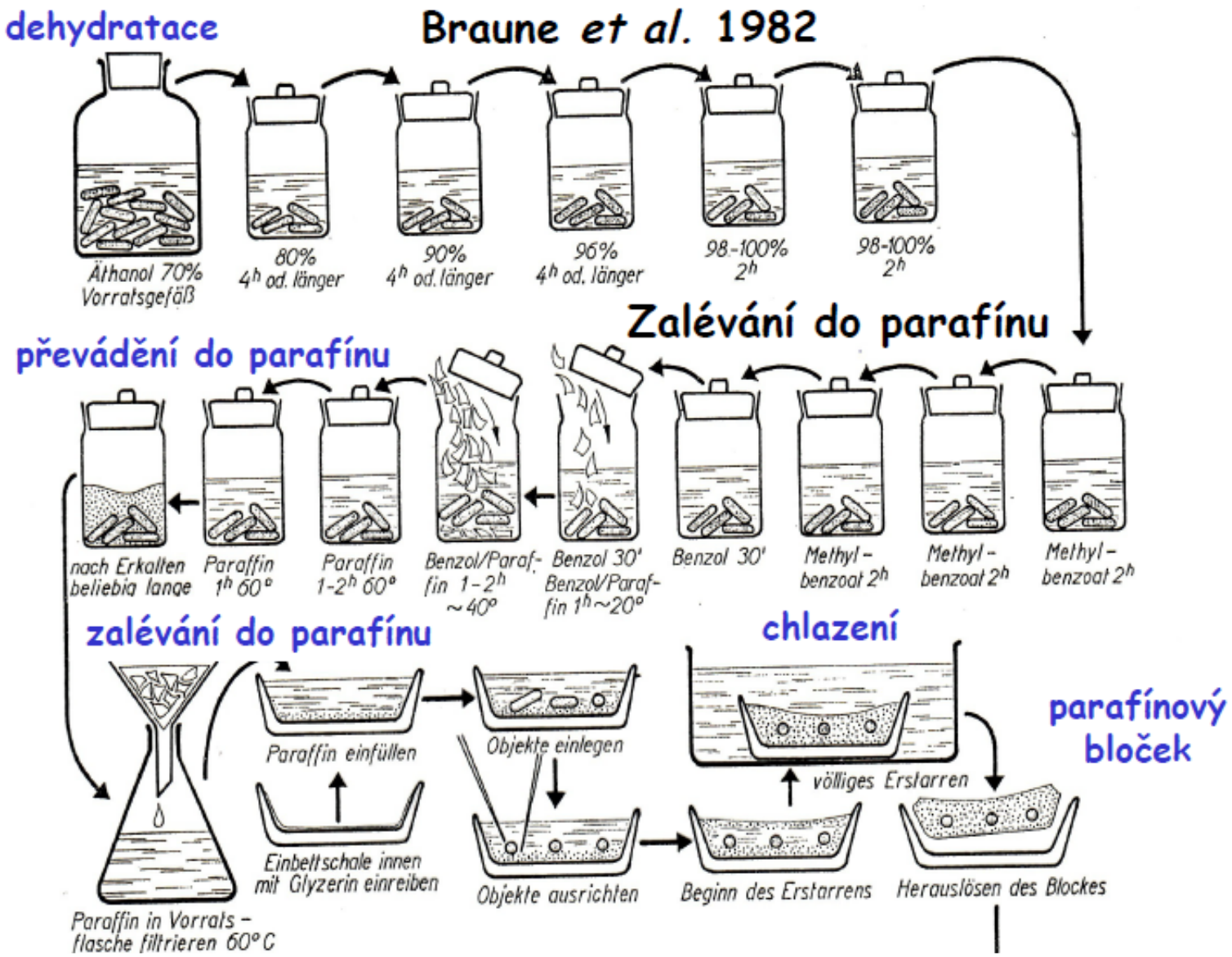
Krok	Směs	Doba trvání
Fixace	FAA	
Oplach	PBS	30min
Dehydratace	30% EtOH v PBS	30 min
	50% EtOH v PBS	30 min
	70% EtOH v PBS	30 min
	90% EtOH v PBS	30 min
	96% EtOH v PBS	30 min
	(0,5% toluidinová modř v EtOH)	10 min
Zalévání vzorků	96% EtOH v PBS, t= 37°C	10 min
	Vosk + EtOH (1:1), t= 37°C	Přes noc
	100% vosk t= 37°C	1h
	100% vosk t= 37°C	1h
	Zalévání do formiček	

(Převzato a upraveno Vitha et al., 2000)

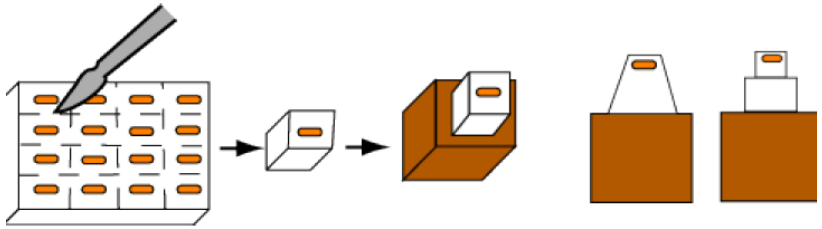
Parafin

krok	den	roztok	Doba trvání
Fixace	Pondělí	FAA	
Oplach		50% EtOH	1h
Odvodnění	Úterý	I (10ml TBA+ 40 ml 95% EtOH+ 50ml H_2O)	2h
		II (20ml TBA+ 50 ml 95% EtOH+ 30ml H_2O)	2h
		III (35ml TBA+ 50 ml 95% EtOH+ 15ml H_2O)	2h
		IV (55ml TBA+ 45 ml 95% EtOH)	2h
		V (75ml TBA+ 25 ml 100%EtOH)	Přes noc
Infiltrace parafinem	Středa	TBA I	2h
		TBA II	2h
		TBA III	3h
		Vzorky i s TBA přelijeme do misky s parafinem, t=28°C	Přes noc
	Čtvrtek	t= 40°C	3h
		t= 60°C	3h
		Odlití vrchní vrstvy, doplnění čistým parafinem	2h
		Odlití vrchní vrstvy, doplnění čistým parafinem	Přes noc
Zalití do parafinu	Pátek	Výměna celého roztoku	3h
		Výměna celého roztoku	3h
		Příprava parafinových bločků	

(Převzato a upraveno Lux et al., 1998)



Příprava bločku ke krájení



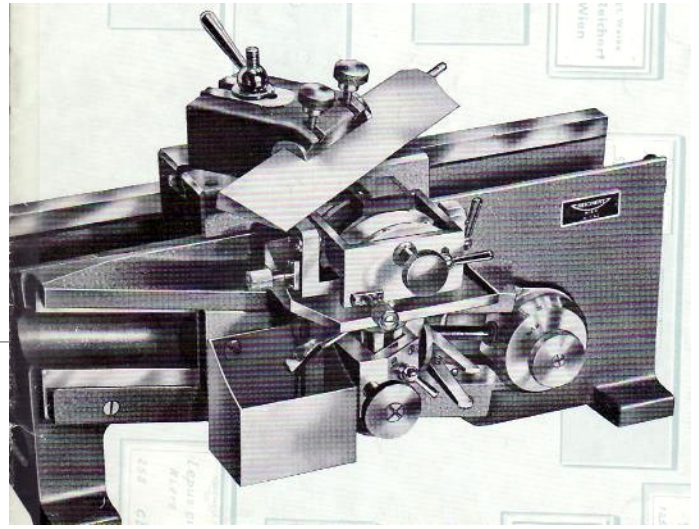
dělení bloku parafínu | izolovaný bloček parafínu | přitavení bločku parafínu na dřevěný špalík | trimování bločku parafínu

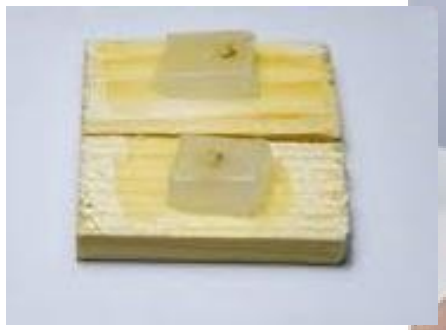
Zalévání do parafinu

(Převzato a upraveno dle doktorky Dubové)

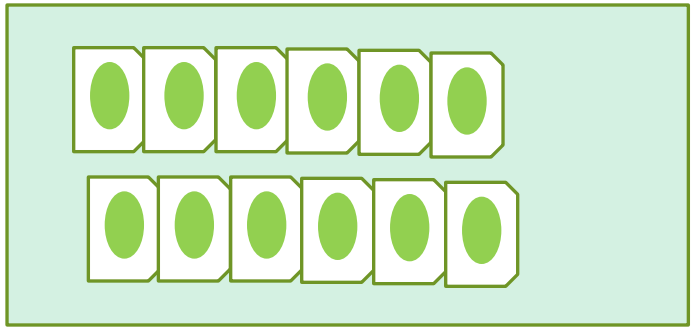
https://www.bamed.cz/material.php?zaznam=19

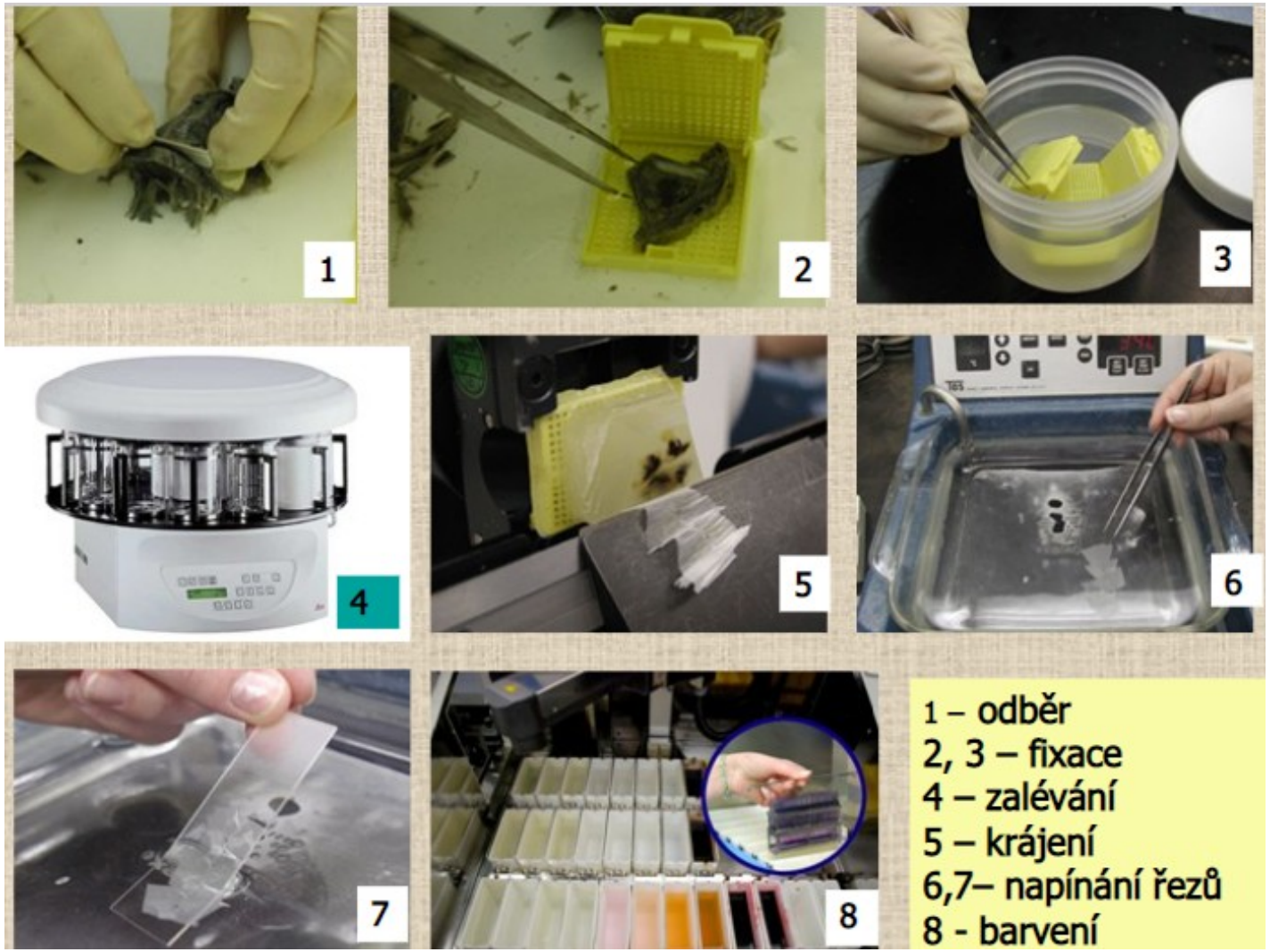
Řezání na mikrotomu





Microtome Sectioning





Ukázka z lékařské fakulty

Odkazy

- Vitha S., Baluška F., Jasik J., Volkmann D., Barlow P.W. (2000) Steedman's Wax for F-Actin Visualization. In: Staiger C.J., Baluška F., Volkmann D., Barlow P.W. (eds) Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 89. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9460-8_35
- LUX, Alexander, Oľga ERDELSKÁ. Praktikum z anatómie a embryológie rastlín. Bratislava: Univerzita Komenského, 1998. ISBN 80-223-1229-0.
- https://www.bamed.cz/material.php?zaznam=19