



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

07A_Příprava trvalých preparátů

Histologická technika parafinových řezů

FIXACE: fixační směs FAA, cca. 24 hodin (podle druhu a velikosti objektu)

OPLACH FIXÁŽE: ve stejné koncentraci ethanolu, která byla použita ve fixační směsi

DEHYDRATAČE – butanolová řada (postupná výměna vody směsí ethanolu a butanolu až do 100% butanolu)

PROSYCOVÁNÍ PARAFÍNEM (Paraplast Plus®, teplota tání 56°C)

- postupná výměna směsi parafínu s butanolem za čistý parafín

Zhotovení bločků:

vylítí tekutého parafínu s objekty do papírové krabičky, orientace objektů zahřátou jehlou, vychlazení ve studené vodní lázni. Po dostatečném utužení parafínu vyjímáme bločky z vody a po jejich usušení je vyjmeme z papírové krabičky a uložíme do obalu, aby byly chráněny před prachem.

Výsledek: Získáme tak **bločky parafínu**, ve kterých jsou v řadách orientovány jednotlivé objekty.

Mikrotom Reichert, podložní skla potažená tenkou lepící vrstvou chromové želatiny, žiletky, 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 rozpustěné želatiny).

2. Želatinu nechat nejdříve nabobtnat, pak mírně nahřát na vodní lázni (nesmí vařit) a rozpustit
3. Rozpuštěnou želatinu smíchat s roztokem kamence.
4. Po vychladnutí filtrovat přes filtrační papír Whatman1.
5. 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.
6. Skla se vysušit ve svislé poloze a uložit na bezprašném místě. Mohou se i nějakou dobu skladovat (pro delší skladování je vhodnější uchování v lednici).

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 pohyb bloku s nožem hladký.
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.
10. Před barvením jsou řezy odparafinovány ve 100% xylénu (2x: 1 hodina + přes noc). Poté jsou řezy hydratovány v sestupné ethanolové řadě (buď až do vody nebo do koncentrace ethanolu, která odpovídá koncentraci roztoku rozpuštěné barvičky).