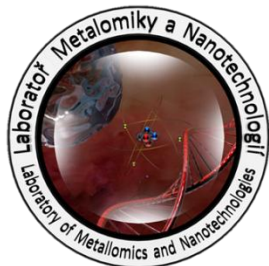


Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Příprava nanočástic metodami syntézy v žířalách, charakterizace

- Imunohistochemické barvení

Vyučující: Mgr. Bc. Markéta Komínková

Postup imunohistochemického barvení (detekce metallothioneinu)

Deparafinace a zavodnění

- Xylol 1. 10 min
- Xylol 2. 10 min
- Aceton 2 min
- 2-propanol 1. 1 min
- 2-propanol 2. 1 min
- 2-propanol 3. 1 min
- 2-propanol 4. 1 min

Blokování endogenních peroxidáz

- Voda oplach
- 3% H₂O₂ 15 min
- Voda oplach

Teplotně indukované odhalení epitopů

- V elektronickém tlakovém hrnci zvolíme program na rýži (nutné je udržení konstantní teploty 100 °C) a vzorky ponoříme do 10 mM citrátového pufru pH 6 ((2,1 g citric acid (C₆H₈O₇·xH₂O) + 29,4 g Tri-Sodium-Citrate-Hidrate (C₆H₅Na₃x2H₂O) do 1 l) 20 min



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „in vivo“ zobrazovacích technik

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/



- Ochlazování na lab teplotu 10 min
- Voda 5 min
- Voda 5 min

Imunohistochemické barvení

- PBS 1. 5 min
- PBS 2. 5 min
- PBS 3. 5 min
- Primární protilátky 1:50 v PBS 1 hod
- PBS 4. 5 min
- PBS 5. 5 min
- PBS 6. 5 min
- Sekundární protilátky 15 min
- PBS 7. 5 min
- PBS 8. 5 min
- PBS 9. 5 min
- Detekční barviva AEC, DAB

Kontrastní barvení

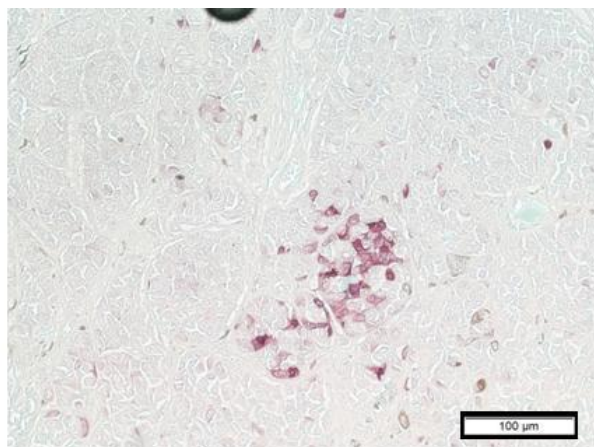
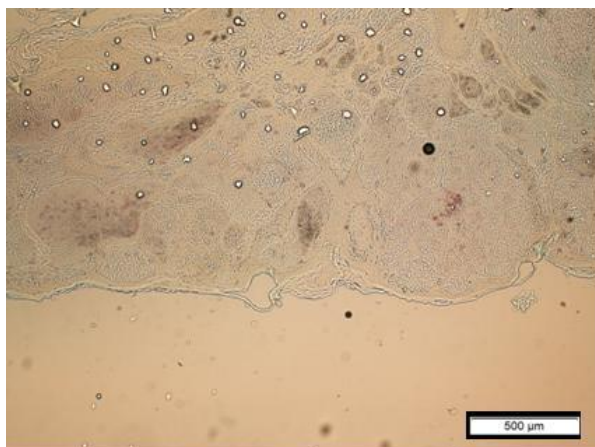
- Methyl-Green

Dehydratace

- Termostat 56 °C

Krytí

- Xylol 5 min
- Nanesení montovacího média a položení krycího sklíčka

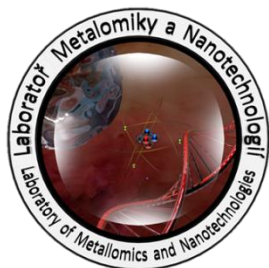


Obr. 1 Identifikace metallothioneinu v tkáni (metallothionein je obsažen v buňkách s fialovou barvou)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Příprava nanočástic metodami syntézy v žířalách, charakterizace

- Příprava histologického preparátu

Vyučující: Mgr. Bc. Markéta Komínková

Postup přípravy histologického preparátu:

- Vzorek tkáně umístíme histologické kazety



Obr. 1 Histologická kazeta

- Vzorek v kazetě vložíme do 10% formalínu minimálně na 24 h
- odvodnění vzorků – vzestupná alkoholová řada
 - vypírání formalínu vodou 15 min
 - alkohol 50% 60 min
 - alkohol 60% 60 min
 - alkohol 70% 60 min
 - alkohol 80% minimálně 2 hod



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- alkohol 96% 60 min
- připravíme si 100% ethanol (smísíme s vyžíhanou modrou skalicí a následně přefiltrujeme)
- alkohol 100% 2 hod
- xylén 3x lázeň (po 20 min)

• Zalévání

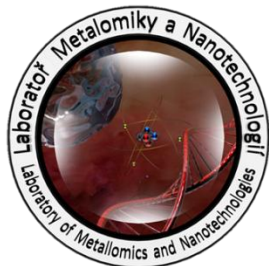
- Před vlastním zalitím máčíme v parafínu (vypírání parafín – vyplnění všech prostor vzorku parafínem) 62 °C 1 hodina
- Přesunutí do druhé parafínové lázně 62 °C 1 hodina
- Nerezovou zalévací formičku si položíme na vyhřívaný stolek (60 °C), a nalejeme malé množství rozeřátého parafínu
- Vzorek vyjmeme z kazety a vložíme do připravené zalévací formičky, kterou umístíme na vyhřívaný stolek
- K manipulaci a směřování vzorku využíváme vyhřívanou pinzetu
- Při připravené vhodné orientaci vzorku zalévací formičku zvedneme z vyhřívaného vzorku a dno lehce přiložíme k chladné vodní hladině, čímž dojde k zafixování vzorku
- Do formičky přilejeme parafín pod okraj formičky
- Na formičku přiložíme dříve odlomenou část histologické kazety a pevně přitiskneme prsty
- Přes kazetu doplníme parafín
- Dáme do ledničky chladit minimálně 1 hod
- Po zchlazení vyndáme parafínový bloček z formičky a můžeme připravit histologické řezy



Obr. 2 Zalévací formičky



Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Příprava nanočástic metodami syntézy v žížalách, charakterizace

- Histologické řezy

Vyučující: Mgr. Bc. Markéta Komínková

Postup přípravy histologického preparátu:

- Parafinový bloček vložíme do mikrotomu a uchytíme
- Odstraníme krytku čepele a dle potřeby čepel vyměníme
- Držák s čepelí posuneme tak, aby kraj čepele byl v úrovni parafinového bločku (posouváme dle ztupení čepele)
- Nastavíme požadovanou tloušťku řezu
- Odblokujeme ruční kolo a přidržíme páčku pro zdvojnásobení řezů
- Otáčíme ručním kolem, a necháváme odpadat parafinové řezy, dokud nedosáhneme vzorku
- Ruční kolo zablokujeme a očistíme řeznou plochu štětcem, případně potřeme vodou pro snadnější a šetrnější řezání
- Uvolníme ruční kolo a uděláme sérii několika řezů (2-10 řezů z bločku dle velikosti preparátu)
- Ruční kolo opět zablokujeme
- Vybereme vhodné řezy a ty opatrně pomocí pinzety, či jehly přesuneme na studenou vodní hladinu
- Připravíme si podložní sklíčko, které potřeme bovinním sérovým albuminem (z důvodu zlepšení přilnavosti preparátu)
- Použijeme další (pomocné) podložní sklíčko pro nabrání parafinového řezu z vodní hladiny a umístíme řez na teplou vodní hladinu (40°C)
- Do teplé vody vsuneme podložní sklíčko s BSA a řez na něj opatrně umístíme



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



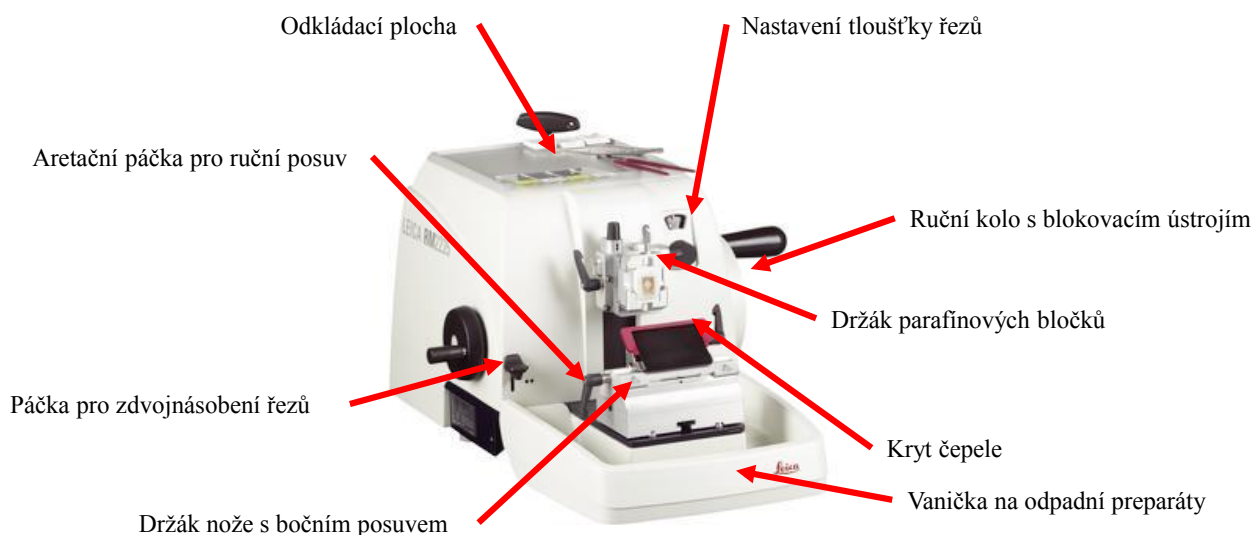
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- Preparát lehce osušíme a popíšeme
- Připravené preparáty vložíme do sušárny (minimálně na 20 minut, nejlépe přes noc)
- Takto připravené preparáty lze dále barvit



Obr. 1 Popis mikrotomu