



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia

bmz

Projekt PO IG, działanie 2.1.

Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



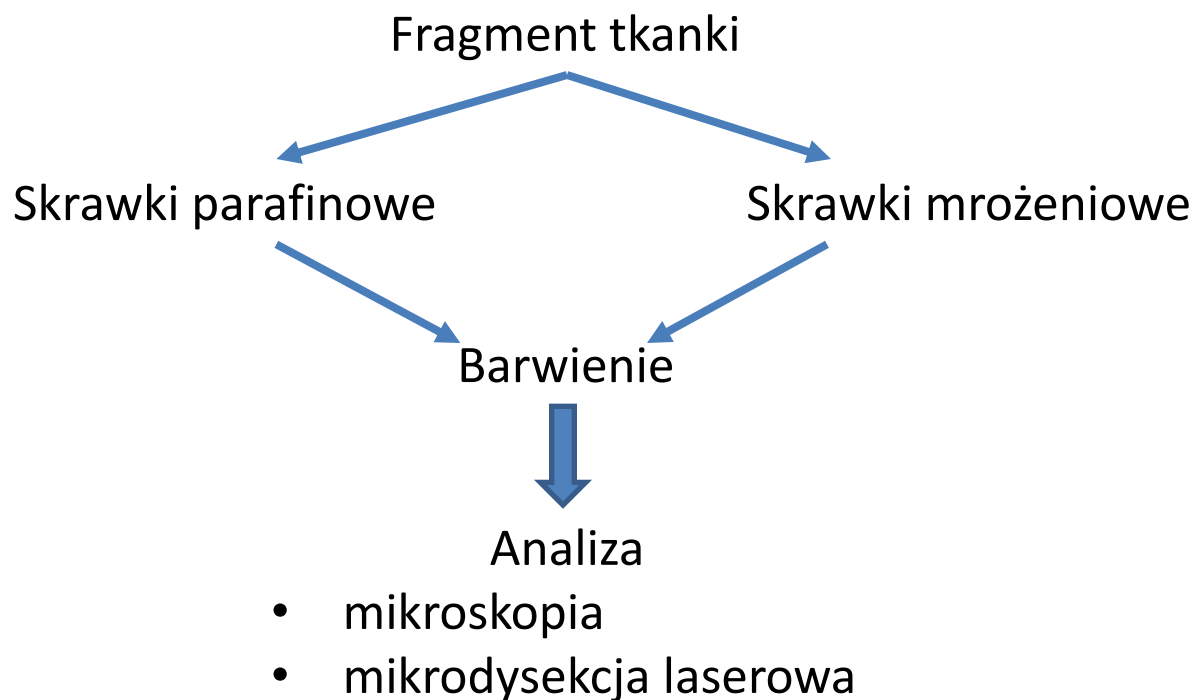
UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Nowoczesna pracownia histologiczna

Agata Szade

Histologia (z gr. *histos* – tkanka, *logos* – wiedza, nauka)
– nauka o budowie i czynności tkanek.



Wojciech Sawicki, *Histologia*

Preparaty mrożeniowe

- Jakość preparatów mrożeniowych jest często niższej jakości niż preparatów parafinowych, jednak ich wykonanie jest nieporównywalnie szybsze.
- Technika mrożeniowa pozwala na lepsze zachowanie kwasów nukleinowych i białek, pozwalając na ich dalszą analizę (mikrodysekcja laserowa).

Przygotowanie preparatu mrożeniowego:

1. Zamrożenie fragmentu tkanki w odpowiednim medium (np. OCT – zaw. m. in. alkohol poliwinylowy i glikol polietylenowy).
2. Cięcie skrawków za pomocą kriostatu.
3. Utrwalanie.
4. Barwienie.

Wojciech Sawicki, *Histologia*

Przygotowanie preparatu histologicznego (parafinowego)

1. Utrwalenie
2. Odwodnienie
3. Zatopienie w parafinie
4. Cięcie
5. Uwodnienie
6. Barwienie
7. Odwodnienie



Przygotowanie preparatu histologicznego

1. Utrwalenie – 10% r-r formaliny
2. Odwodnienie – stopniowo, poprzez przeprowadzenie tkanki przez roztwory odwadniające, a następnie prześwietlające

Odczynniki odwadniające	Odczynniki prześwietlające
Alkohol etylowy	Ksylen
Alkohol izopropylowy	Metylobenzen
Alkohol metylowy	Substytut ksylenu

Procesor tkankowy

Shandon Excelsior ES® Thermo Scientific
- automatyczny procesor tkankowy

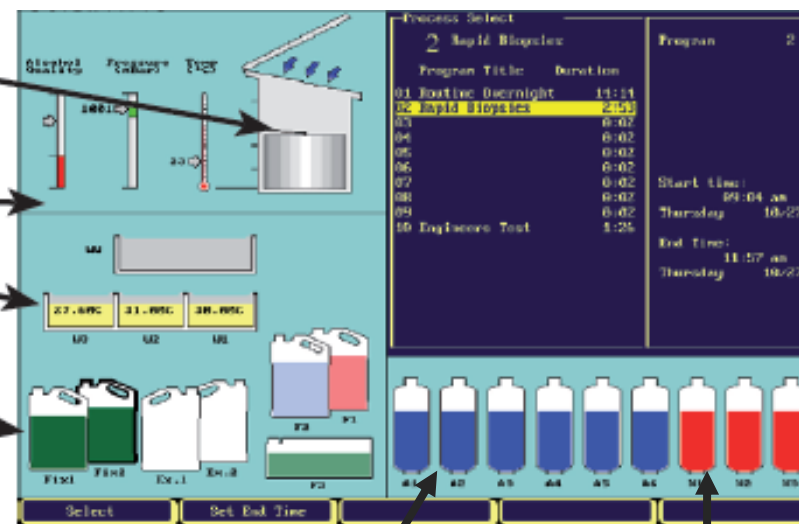


Komora reakcyjna

Jakość alkoholu

Parafina

Odczynniki
utrwalające



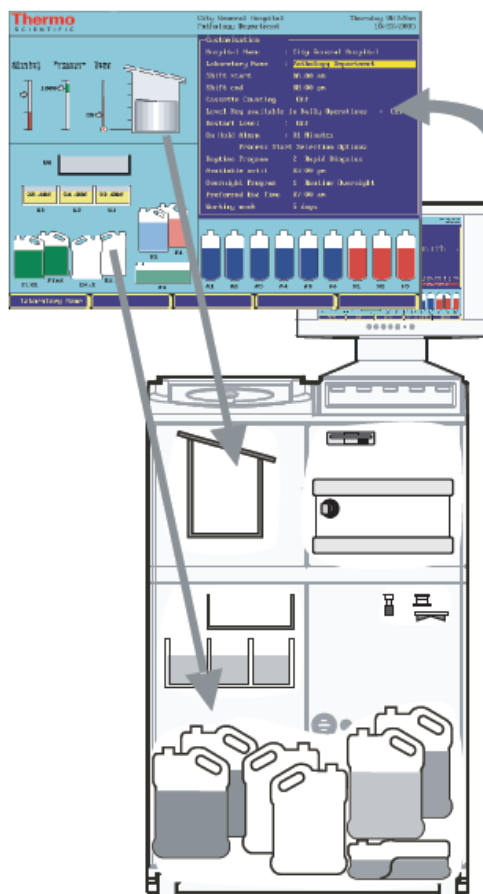
Odczynniki
odwadniające

Odczynniki
prześwietlające

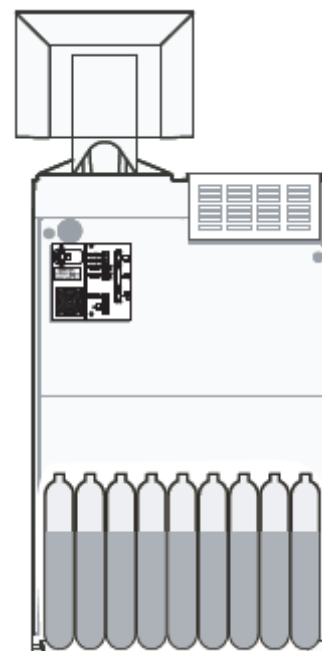
Źródło: Shandon Excelsior ES® Operator Guide



Budowa procesora tkankowego



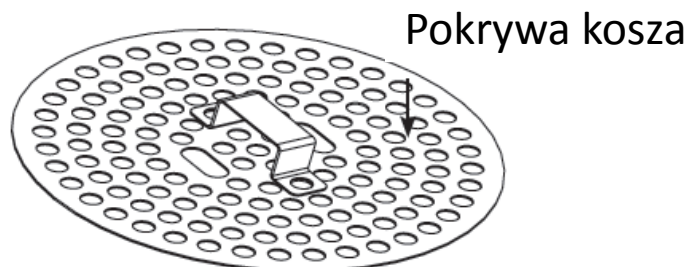
Widok z przodu



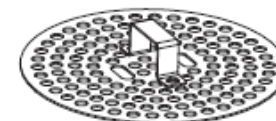
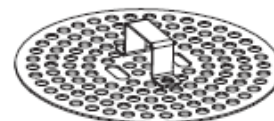
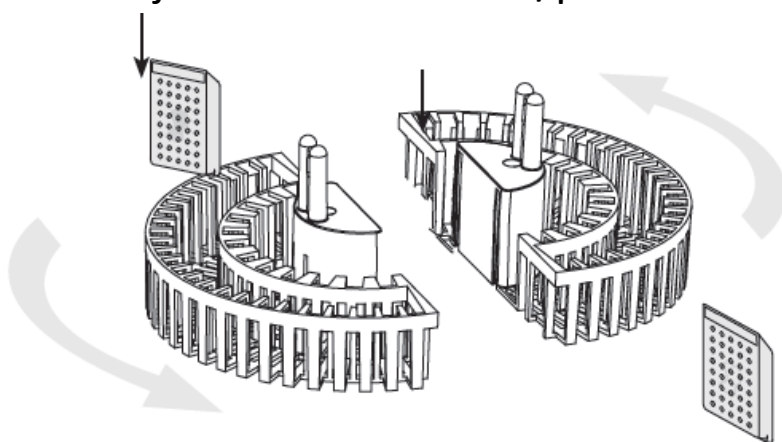
Widok z tyłu

Źródło: Shandon Excelsior ES® Operator Guide

Umieszczenie preparatów w procesorze



Pojemność- 74 kasetki/poziom



Kosze uporządkowane



Kosz swobodny



Źródło: Shandon Excelsior ES® Operator Guide

System bezksylenowy

Odczynnik odwadniający:

Ottix Shaper

30% - 40% etanol

Błękit metylenowy

Odczynnik prześwietlający:

Ottix Plus

60% - 70% mieszanina węglowodorów

30% - 40% etanol

10% - 12.5% izopropanol

Tank N°	Reagent	Time (min)	Temperature (°C)	Vacuum Pressure
1	Formalin 4%	/	Room temp.	No
2	Washing in water	10 Min.	Room temp.	No
3	Ottix Shaper	30 Min.	Room temp.	No
4	Ottix Plus	1 h	35-37°C	Yes-low
5	Ottix Plus	1 h	35-37°C	Yes-low
6	Ottix Plus	1 h	35-37°C	Yes-low
7	Ottix Plus	2 h	35-37°C	Yes-low
Paraffin 1	Paraffin	1-1.30 h	58-60°C	Yes-pushed
Paraffin 2	Paraffin	1.30-2 h	58-60°C	Yes-pushed
Paraffin 3	Paraffin	1.30-2 h	58-60°C	Yes-pushed



Przygotowanie preparatu histologicznego

1. Utrwalenie
2. Odwodnienie
3. Zatopienie w parafinie
4. Cięcie
5. Uwodnienie
6. Barwienie
7. Odwodnienie



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

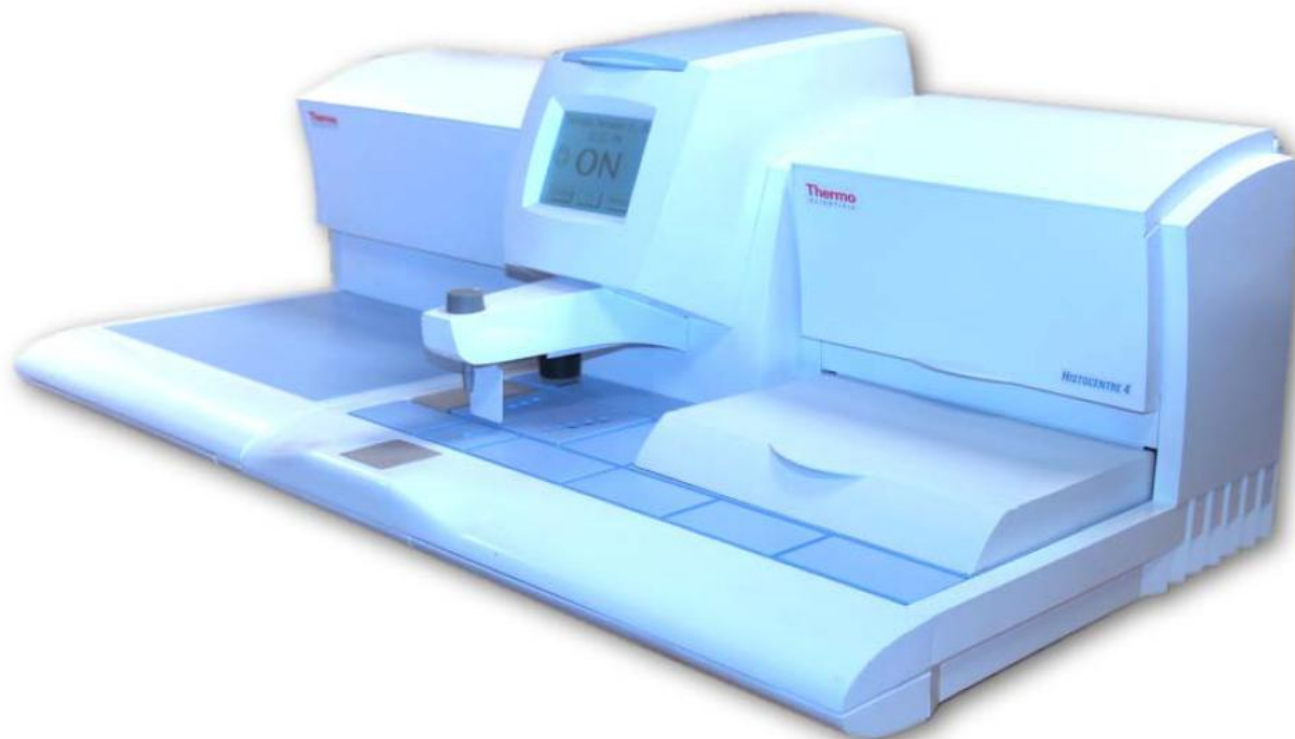


UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

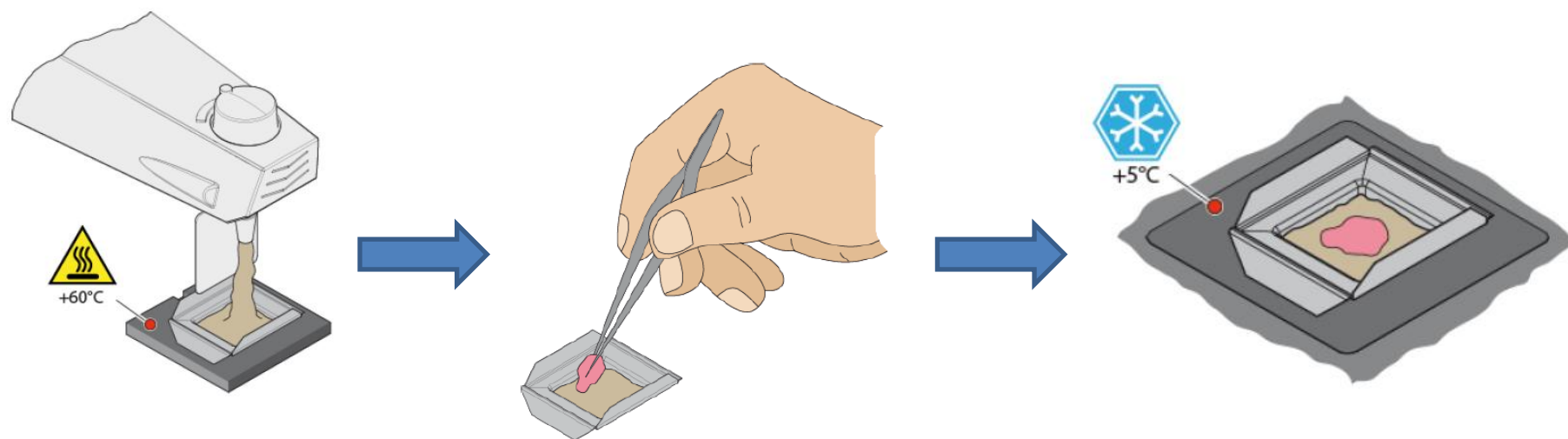


Zatapiarka

Zatapiarka Thermo Scientific
HistoStar

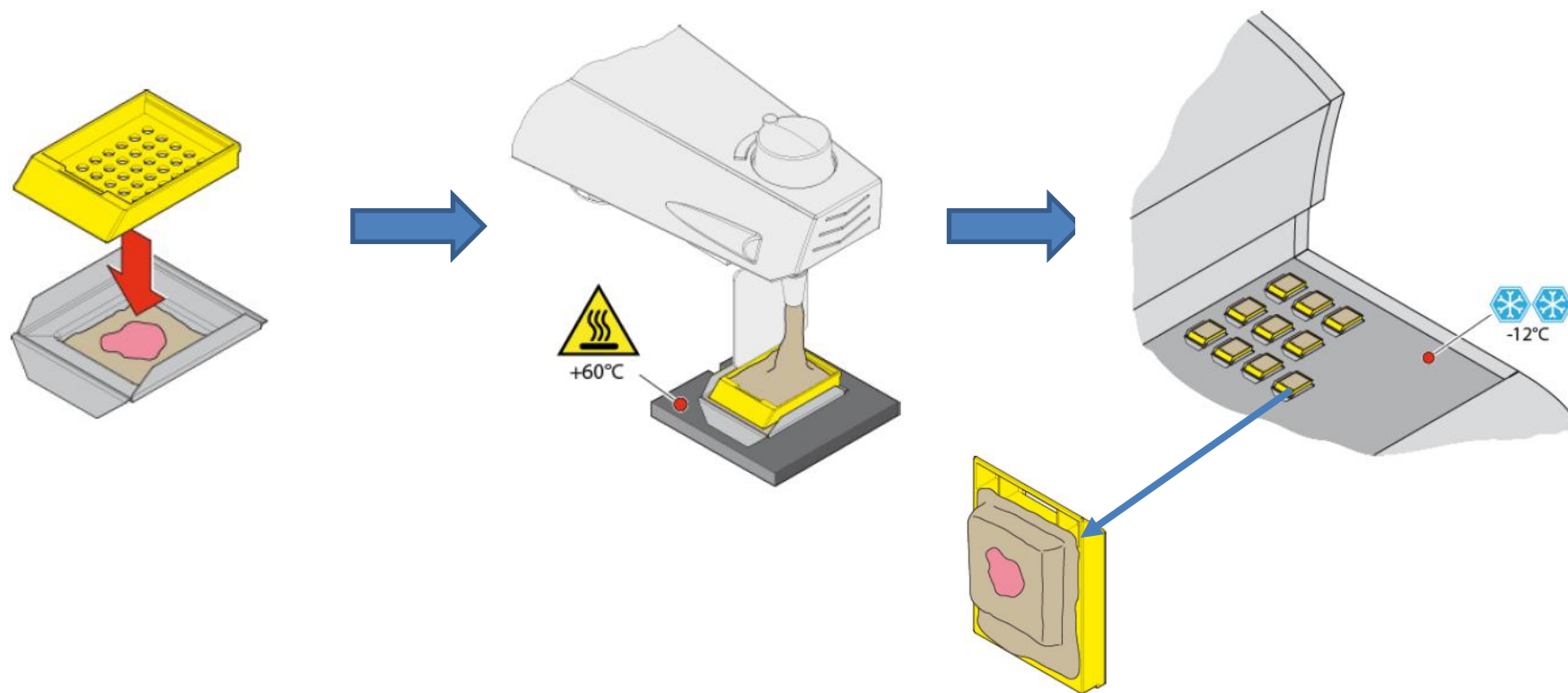


Technika zatapiania



Źródło: Thermo Scientific HistoStar™ Operator Guide

Technika zatapiania



Źródło: Thermo Scientific HistoStar™ Operator Guide



Przygotowanie preparatu histologicznego

1. Utrwalenie
2. Odwodnienie
3. Zatopienie w parafinie
4. Cięcie
5. Uwodnienie
6. Barwienie
7. Odwodnienie



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



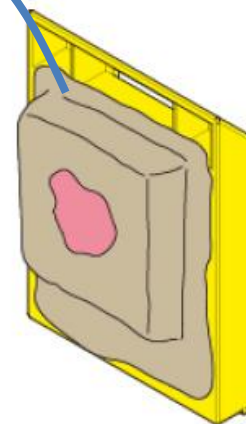
UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrotom

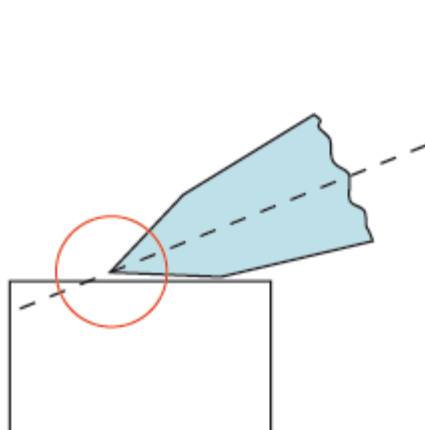


Mikrotom rotacyjny 355S
Thermo Scientific Microm

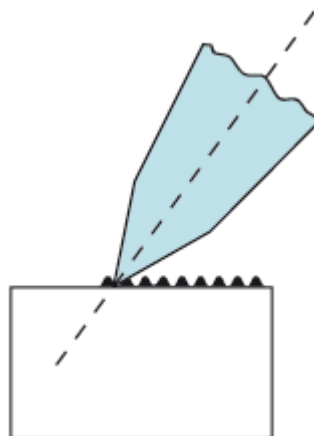


Źródło: Microm HM355S Rotary Microtome Operation Manual

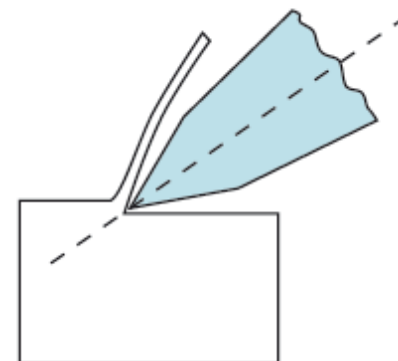
Technika cięcia



Zbyt mały kąt nachylenia
noża do preparatu



Zbyt duży kąt nachylenia
noża do preparatu



Prawidłowy kąt nachylenia
noża do preparatu

Źródło: Microm HM355S Rotary Microtome Operation Manual

Mikrotom – dodatkowe wyposażenie



System chłodzenia Cool-Cut

Ścieżka wodna
Thermo Scientific Microm STS
Section Transfer-System

Źródło: <http://www.microm-online.com/>



Przygotowanie preparatu histologicznego

1. Utrwalenie
2. Odwodnienie
3. Zatopienie w parafinie
4. Cięcie
5. Uwodnienie
6. Barwienie
7. Odwodnienie

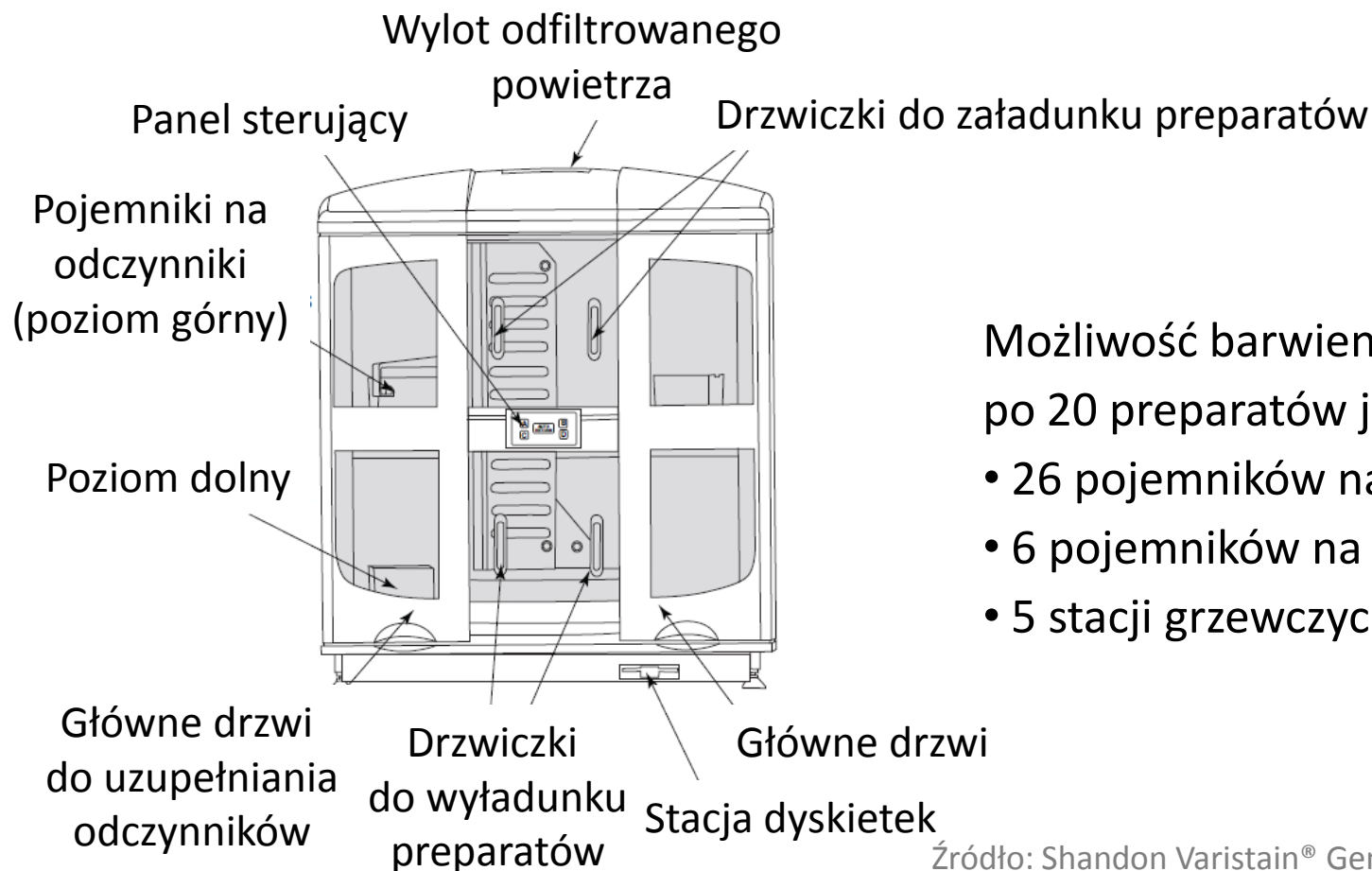
Barwiarka

Komputerowy automat
do barwienia Thermo Scientific
Shandon Varistain® Gemini ES



Źródło: Shandon Varistain® Gemini ES Operator Guide

Barwiarka



Możliwość barwienia kilku serii po 20 preparatów jednocześnie

- 26 pojemników na odczynniki
- 6 pojemników na wodę bieżącą
- 5 stacji grzewczych

Źródło: Shandon Varistain® Gemini ES Operator Guide

Procedura barwienia

Varistain Gemini ES

Define Protocol 30/10/2006 15:26

Protocol no. 1 - H&E -

Step	Reagent	Conc. %	set uses	Time/ Limit	Agitate	
1	Dry Storage	0	00:00	No Maximum	Initial	
2	Citri 3	0	02:00	No Maximum	Initial	
3	Citri 3	0	01:00	No Maximum	Initial	
4	Citri 3	0	01:00	No Maximum	Initial	
5	Ethanol	100	0	01:00	No Maximum	Initial
6	Ethanol	100	0	01:00	No Maximum	Initial
7	Ethanol	100	0	01:00	No Maximum	Initial
8	Running Water Wash	0	01:00	No Maximum	Initial	
9	Haematoxylin	0	04:00	Standard	Initial	
10	Running Water wash	0	01:00	Standard	Initial	
11	Acid Alcohol	0	00:15	Standard	Initial	
12	Running Water Wash	0	01:00	No Maximum	Initial	
13	Alcoholic Eosin	0	01:00	Standard	Initial	
14	Running Water Wash	0	01:00	No Maximum	Initial	
15	Aqueous Eosin	0	01:00	Standard	Initial	
16	Running Water Wash	0	01:00	Standard	Initial	
17	Jenner Stain	100	0	01:00	No Maximum	Initial
18	Jenner Stain	100	0	01:00	No Maximum	Initial
19	Jenner Stain	100	0	01:00	No Maximum	Initial
20	Xylene	0	01:00	No Maximum	Initial	
21	Xylene	0	01:00	No Maximum	Initial	
22	Xylene	0	01:00	No Maximum	Initial	
23	Xylene	0	00:00	No Maximum	Initial	

Change reagent, insert or delete steps.

Insert After Copy Change Reagent

Załadunek

Barwienie wstępne

Barwienie

Barwienie końcowe

Rozładunek

Źródło: Shandon Varistain® Gemini ES Operator Guide



Rozkład odczynników

Reagent Load and Monitoring 30/10/2006 15:26

UPPER LEVEL REAGENTS

A 21 22 23 W1 W2 W3 H1 H2 H3 H4 H5 W4 W5 W6 24 25 26 D

LOWER LEVEL REAGENTS

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 D

Pot	UPPER LEVEL REAGENTS	Reagent	Conc. %	Pot	LOWER LEVEL REAGENTS	Reagent	Conc. %
A	>	Dry Storage	-	C	>	Xylene	-
21	>	Haematoxylin	-	1	>	Xylene	-
22	>	Blueing Reagent	-	2	>	Xylene	-
23	>	Acid Alcohol	-	3	>	Xylene	-
W1	>	Running Water Wash	-	4	>	Alcohol	100
W2	>	Running Water Wash	-	5	>	Alcohol	100
W3	>	Running Water Wash	-	6	>	Alcohol	100
H1	>	Dry Storage	-	7			
H2	>	Dry Storage	-	8			
H3	>	Dry Storage	-	9			
H4	>	Dry Storage	-	10			
H5	>	Dry Storage	-	11			
W4	>	Running Water Wash	-	12			
W5	>	Running Water Wash	-	13			
W6	>	Running Water Wash	-	14			
24	>	Aqueous Eosin	-	15	>	Alcohol	100
25	>		-	16	>	Alcohol	100
26	>		-	17	>	Alcohol	100
B	>		-	18	>	Xylene	-
				19	>	Xylene	-
				20	>	Xylene	-
				D			

Batches	PROTOCOL
Name /Day	Notes or Staining Steps
1 H&E	0 Step(s) : 2

HARDWARE QUALITY COUNTS		
	Limit	Count
Charcoal Filter Replacement	17	0

Load All Confirm Loaded Stop Batch Monitoring

Źródło: Shandon Varistain® Gemini ES Operator Guide



Podstawowe rodzaje barwień

- Hematoksylina/eozyna
- Wg Massona
- May-Grunwald-Giemsa
- Van Giesona
- Wg Mallory'ego
- Orceiną
- Immunohistochemia

<http://www.histology-world.com/stains/stains.htm>

Hematoksylina/eozyna

- Najpopularniejszy rodzaj barwienia;
- Zasadowa hematoksyлина wiąże się on z kwaśnymi (zasachłonnymi) strukturami, barwiąc je na niebiesko/fioletowo.
- Kwaśna eozyna wiąże struktury ujemnie naładowane struktury, takich jak kationowych grup aminowych w białkach, nadając im różowy kolor.

jądro – **niebieskie/fioletowe**

cytoplazma – **bladoróżowa**

włókna kolagenowe – **ciemnoróżowe**

śluz – **bladoróżowy**

krwinki czerwone - **ceglastoczerwone**

<http://www.histology-world.com/stains/stains.htm>

http://www.umed.pl/pl/dydaktyka/doc/patomorfologia/CWICZENIE_1c_III_rs.pdf



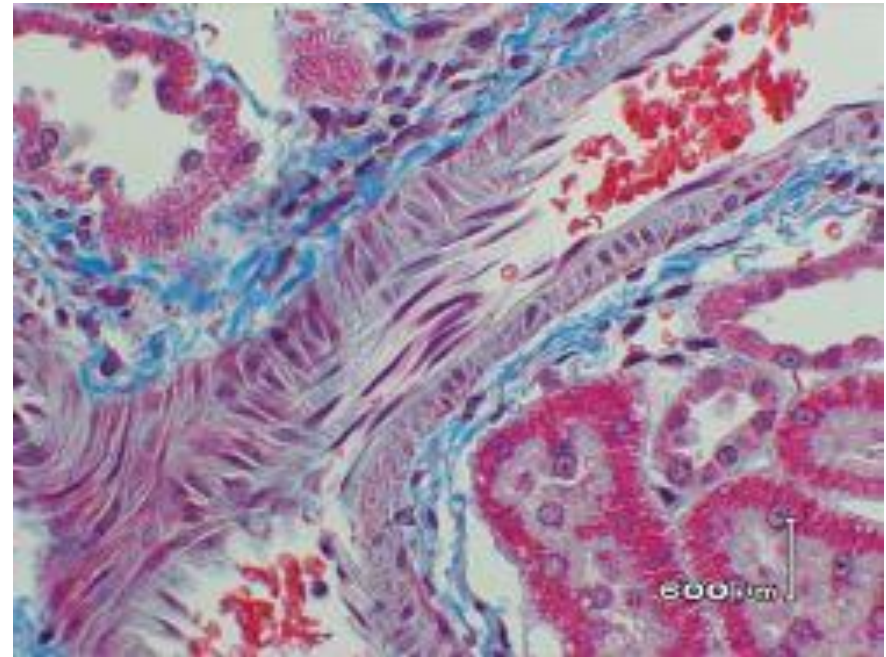
Barwienie Massona

- Barwienie z wykorzystaniem trzech barwników (hematoksylina, kwaśna fuksyna, błękit anilinowy).
- Wykrywanie i różnicowanie włókien kolagenowych.

jądro – **czarne**

cytoplazma – **ceglastoczerwona**

włókna kolagenowe – **niebieskie**



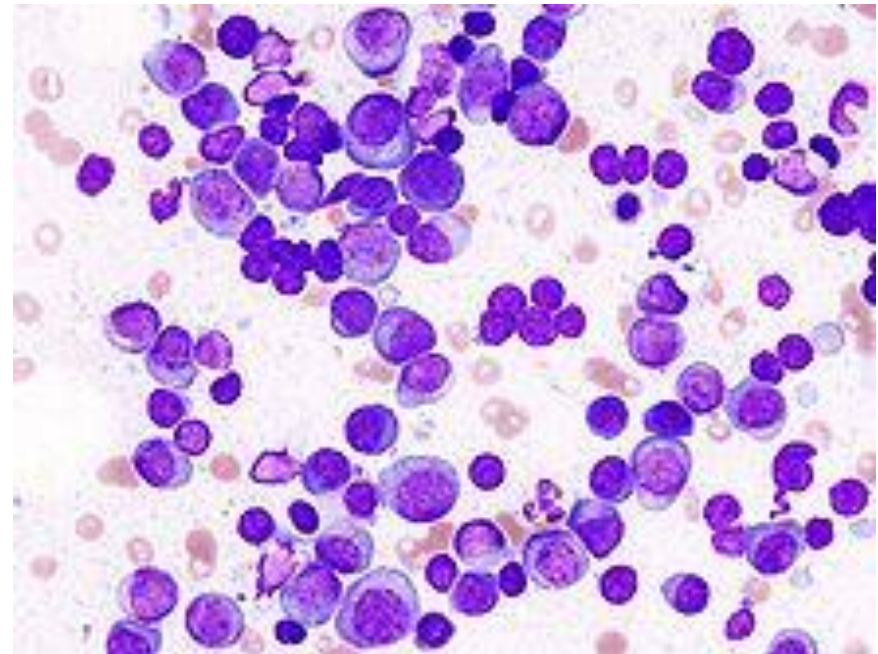
Nerka (szczur)

<http://www.medicine.virginia.edu/research/cores/histology/services-page>



May-Grunwald-Giemsa

- Barwienie ziarnistości i substancji wewnątrzkomórkowych.
krwinki czerwone i komórki nabłonkowe – **pomarańczowe**
ziarnistości w eozynofilach – **czerwone**
chromatyna – **czerwono-fioletowa**
jądro – **ciemnoniebieskie**



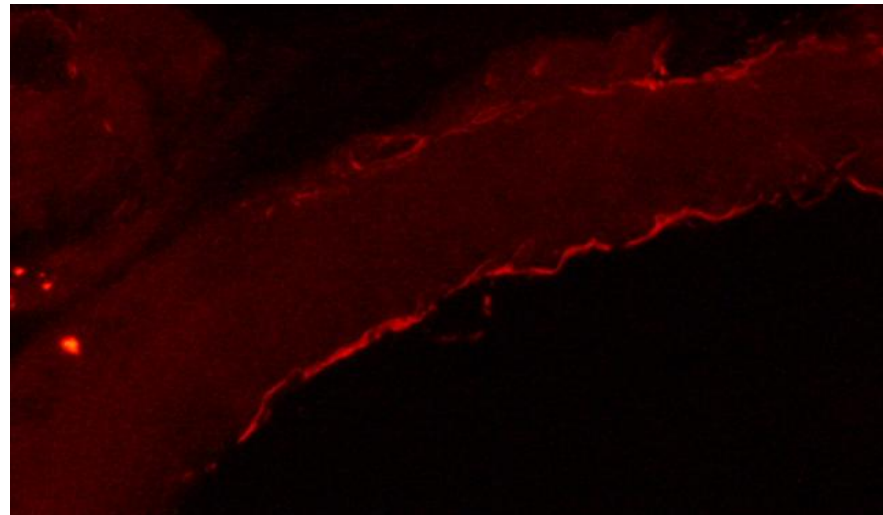
Szpiczak mnogi

http://pl.wikipedia.org/wiki/Szpiczak_mnogi



Immunohistochemia

- Wykrywanie antygenów za pomocą specyficznych przeciwciał
- Wizualizacja związanego przeciwciała:
 - enzymy (HRP, AP)
 - fluorochromy



Aorta (mysz)



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia

bmz

Projekt PO IG, działanie 2.1.

Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Dlaczego mikrodysekcja laserowa ?



Agnieszka Łoboda

Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Kraków



Mikrodysekcja laserowa

- ❑ szybka metoda izolacji komórek z preparatów zamrożonych lub skrawków tkanek utrwalonych formaliną i zatopionych w parafinie
- ❑ metoda szczególnie przeznaczona do wycinania małej liczby komórek (→ dokładna, nie powodująca zanieczyszczeń)
- ❑ system umożliwia separację i transport żywych komórek
- ❑ duże zastosowanie w przypadku tkanek roślinnych





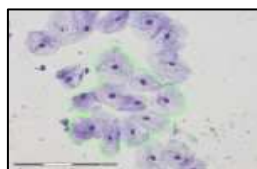
**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



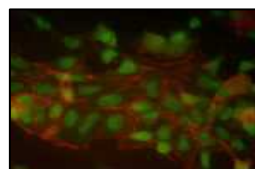
UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



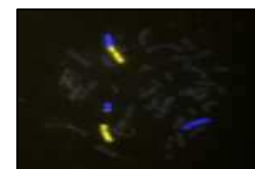
Różnorodność materiału użytego do mikrodysekcji laserowej i możliwe zastosowania



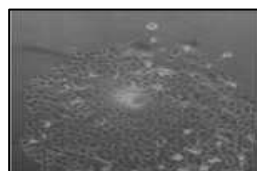
**Kultury
komórkowe**



**Komórki
macierzyste**



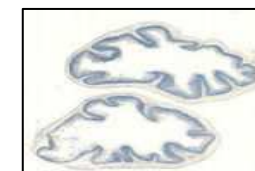
Chromosomy



**Biologia
komórki**



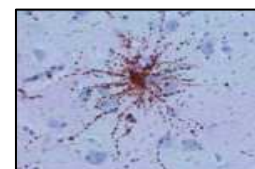
**Badania
roślin**



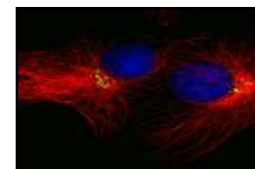
Diagnostyka



**Kontrast
fazowy**



Histochemia



Fluorescencja



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Na naszym Wydziale... Leica LMD7000 - najnowszy model





Przygotowanie preparatów do mikrodyskcji

☐ Preparaty mrożeniowe

Tkanki **MUSZĄ** być zamrożone szybko po pobraniu w celu ograniczenia ewentualnej degradacji RNA czy białek. Po cięciu na kriostacie na specjalne szkiełka, **NIE NALEŻY** wysuszać tkanek

☐ Preparaty parafinowe

Należy używać świeżo przygotowanych rozpuszczalników/barwników w bardzo małej ilości - kilka kropel bezpośrednio na tkankę

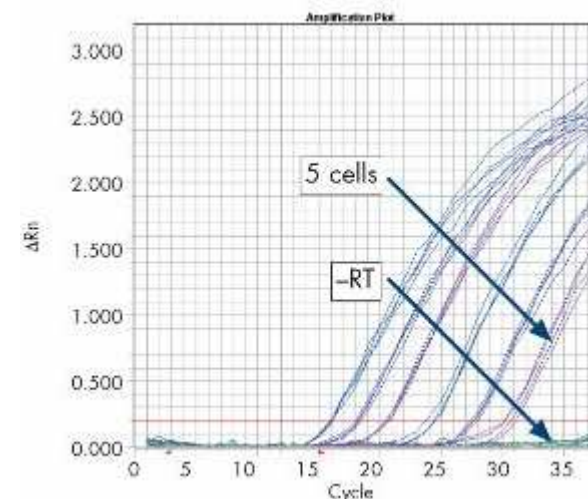
Preparaty muszą być w pełni odwodnione (sekwencja etanolu i ksylenu)

Następne kroki po wycięciu – izolacja RNA

□ najlepiej używać specjalnych zestawów, np. RNeasy Micro Kit, RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen),

Izolacja do 45 μ g całkowitego RNA z komórek i tkanek z użyciem kolumn eliminujących genomowe DNA

- wykorzystanie specjalnych kolumn pozwala na wyeliminowanie kroku trawienia DNazą
- bardzo wydajne usunięcie genomowego DNA
- uzyskuje się powtarzalne wyniki
- test szybki



Sprawdzenie jakości RNA



Bioanalyzer 2100
Agilent Technologies

analiza 10-12 próbek w 30-40 minut

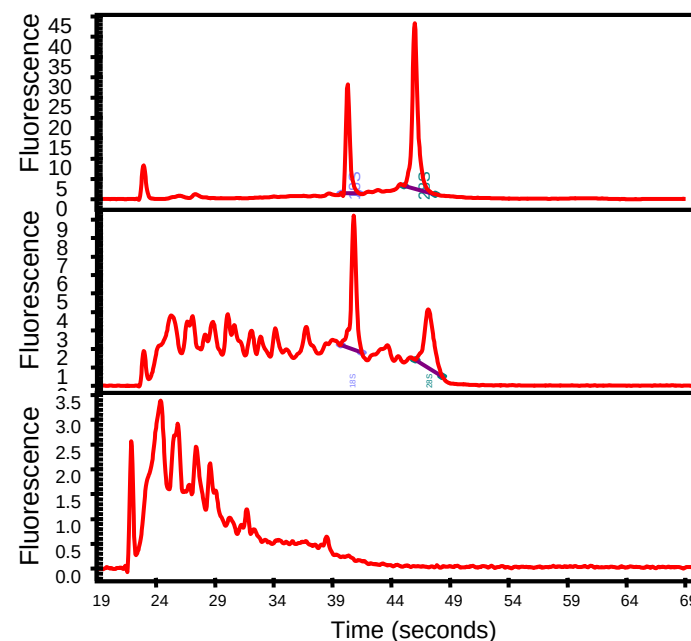
RIN - RNA
Integrity
Number <0-10>



RIN = 10

RIN = 5

RIN = 3





INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

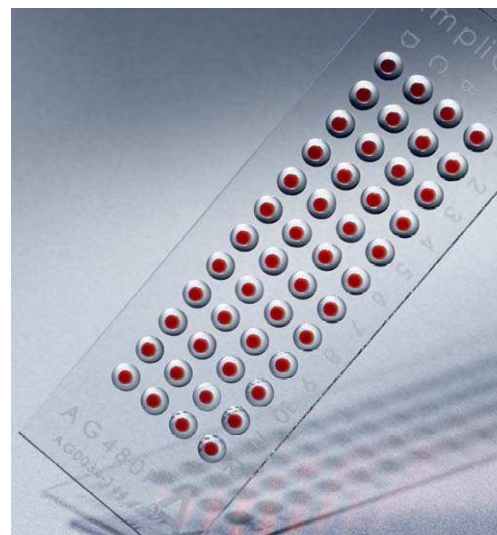


AmpliSpeed - RT-PCR z jednej komórki



AmpliSpeed
Beckman Coulter

48 możliwych reakcji
jedna komórka - jedna reakcja
1 μ l mieszaniny reakcyjnej - 1 dołek





INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Różne możliwości barwień

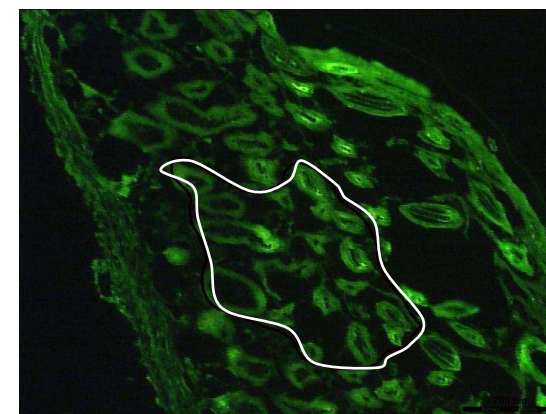
Hematoksylina/eozyna



Fiolet krezyłu



Oranż akrydyny





**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrodysekcja laserowa - przykłady

Przed wycięciem



Podczas wycinania



Po wycięciu



Fragment w wieczku eppendorfa



*skrawki mrożeniowe
barwienie hematoksyliną*



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

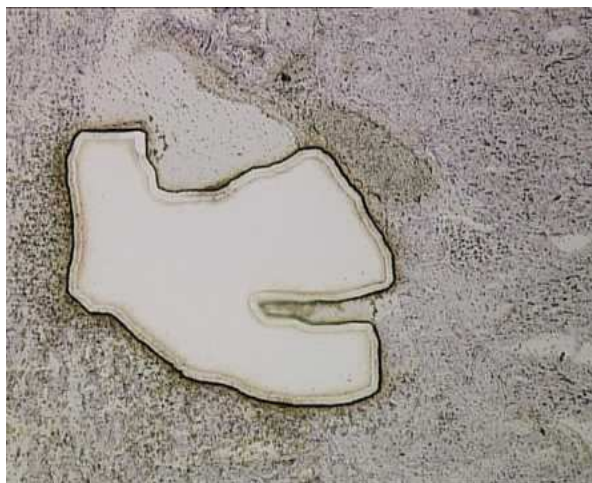


UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrodysekcja laserowa - przykłady

Po wycięciu



Fragment w wieczku eppendorfa



*skrawki mrożeniowe
barwienie hematoksyliną*



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

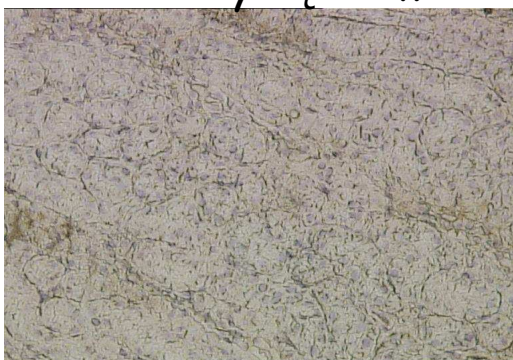


UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

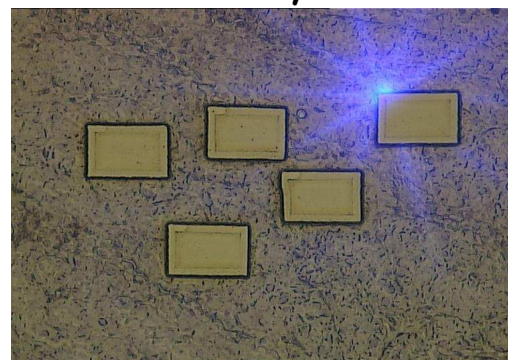


Mikrodysekcja laserowa - przykłady

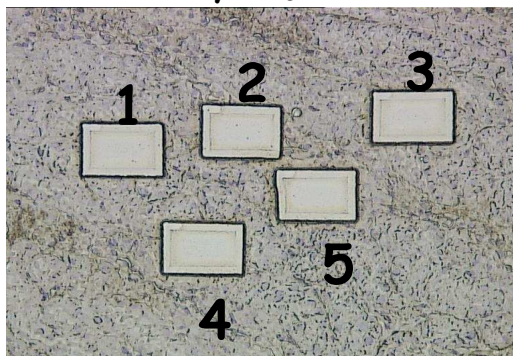
Przed wycięciem



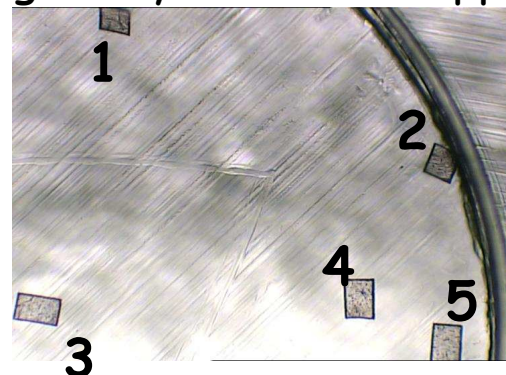
Podczas wycinania



Po wycięciu



Fragmenty w wieczku eppendorfa



*skrawki mrożeniowe
barwienie hematoksyliną*



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

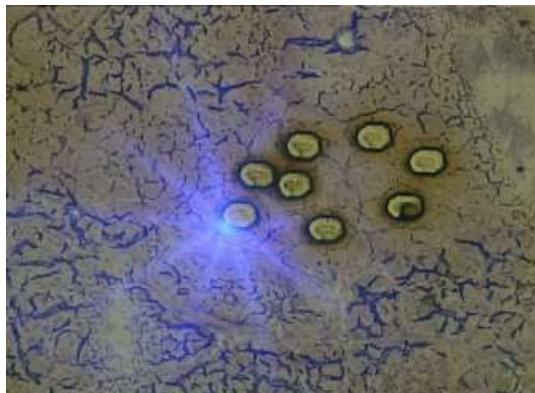


Mikrodysekcja laserowa - przykłady

Przed wycięciem



Podczas wycinania



Niektóre obiekty
w wieczku eppendorfa



*skrawki mrożeniowe
barwienie hematoksyliną*



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

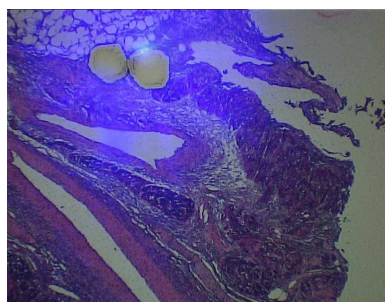


Mikrodysekcja laserowa - przykłady

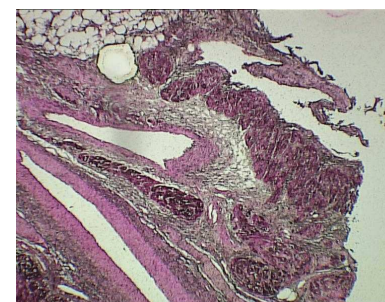
Przed wycięciem



Podczas wycinania



Po wycięciu



Przed wycięciem



Podczas wycinania



*skrawki parafinowe
barwienie hematoksylina*



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

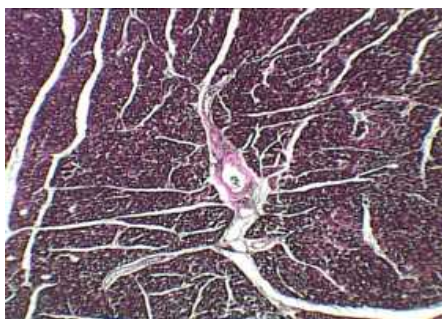


UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

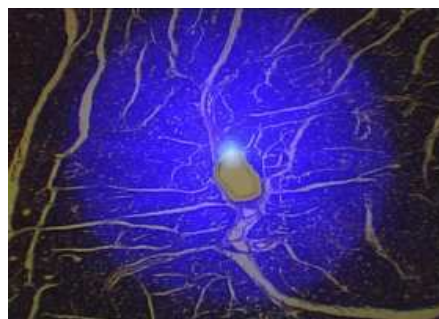


Mikrodysekcja laserowa - przykłady

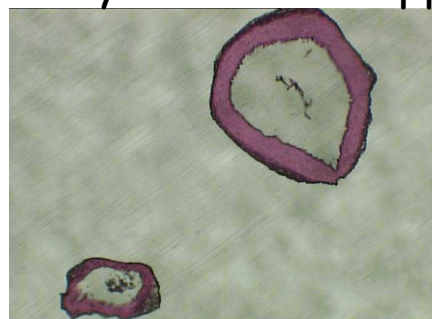
Przed wycięciem



Podczas wycinania



Obiekty w wieczku eppendorfa



*skrawki parafinowe
barwienie hematoksylina*



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

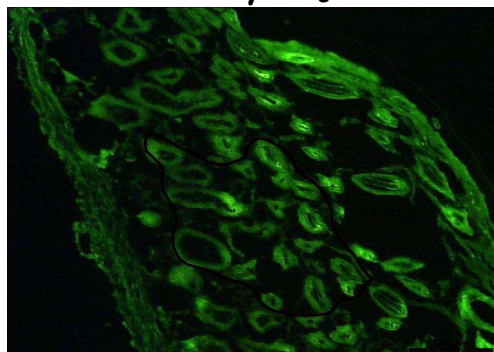


UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrodysekcja laserowa - przykłady

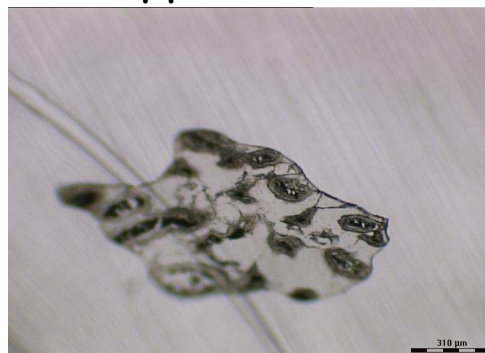
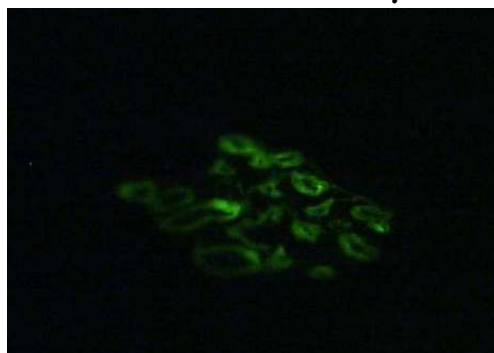
Przed wycięciem



Podczas wycinania



Obiekty w wieczku eppendorfa



*skrawki mrożeniowe
barwienie hematoksylina*



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrodysekcja laserowa żywych komórek

- ❑ hodowla wyizolowanych komórek
- ❑ brak zmian w tempie wzrostu komórek/morfologii

Przed
wycięciem



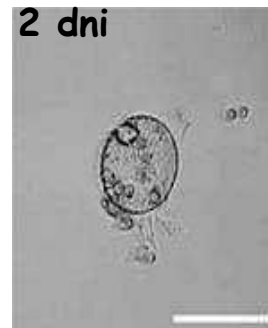
Po
wycięciu



hodowla



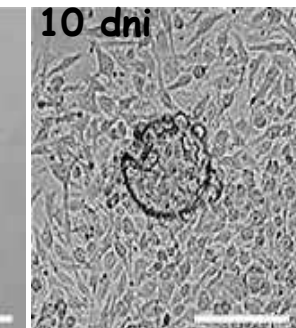
2 dni



6 dni



10 dni



Proliferacja wyizolowanych komórek



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Korzyści „MembraneRings”

- ☐ Mikrodysekcja prowadzona w całkowicie sterylnych warunkach
- ☐ Pozwala wycinać zarówno pojedyncze komórki jak i większe skupiska/kolonie komórek
- ☐ Wilgotność w komorze zbudowanej z dwóch pierścieni chroni przed szybkim wysychaniem komórek



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



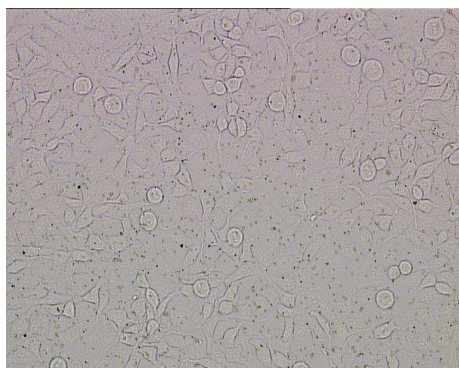
UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



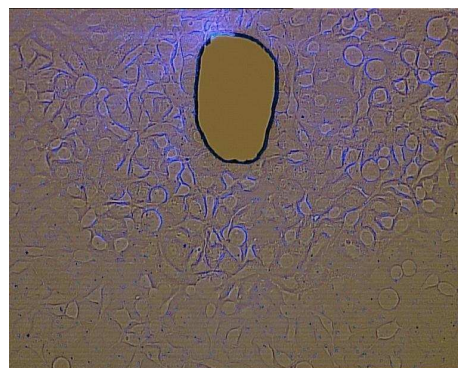
Mikrodysekcja laserowa żywych komórek

Komórki NIH3T3 hodowane w tzw. „membrane rings”

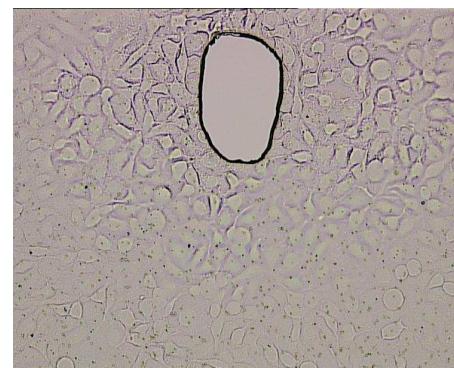
przed wycięciem



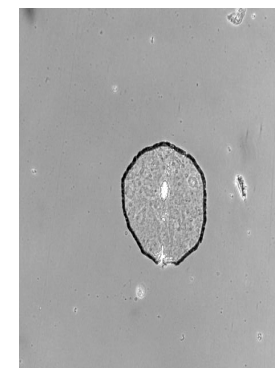
podczas wycięcia



po wycięciu



komórki po wycięciu w
nowej szalce





**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Podsumowanie

**Mikrodysekcja laserowa jest nowoczesną
techniką separacji komórek/tkanek**

Więcej na części praktycznej☺

Podziękowania

Krzysztof Szade, Zakład Biotechnologii Medycznej, WBBB, UJ
Bartosz Pilecki, Zakład Biotechnologii Medycznej, WBBB, UJ