

REZANJE TKIVA KRIOSTATOM

TEORIJSKE POSTAVKE: Ova metoda koristi se za izradu smrznutih (krio) rezova koji se mogu obojati standardnim histološkim metodama bojenja ili se upotrijebiti za razne imunohistokemijske i molekularno biološke reakcije.

MATERIJALI:

ljepilo za tkivo¹
fini kistovi
britvice²
silanizirana stakla
pamučne rukavice

INSTRUMENT:

kriostat

POSTUPAK:

1. Uključiti kriostat nekoliko sati prije rada (ukoliko se uređaj gasi) te podesiti temperaturu rezanja u komorici³. U komoricu postaviti nož⁴ i sav potreban pribor (osim ljepila i stakala) kako bi se ohladio usporedno s komoricom.
2. Preporučuje se rezati svježi uzorak tkiva čije dimenzije nisu veće od 3 mm². Ukoliko dotično tkivo ne možete rezati odmah, pohranite ga u hladnjak na -80° C. Nakon pohrane, tkivo treba dovesti do temperature rezanja.
3. Na nosač staviti kapljicu ljepila za tkivo.
4. Uroniti tkivo u kapljicu. Nadopuniti ljepilo da prekrije u potpunosti komadić tkiva. Paziti da nema mjehurića.
5. Nosač sa tkivom prebaciti do komorice za rezanje. Kad ljepilo oko tkiva pobijeli (nakon cca. 30 min.) tkivo je spremno za rezanje.
6. Nosač sa tkivom staviti u držač bloka. Podesiti debljinu reza⁵.
7. Približiti blok nožu (noviji uređaji imaju motorizirano pomicanje držača tkiva/bloka koje može biti grubo i fino).
8. Odstraniti suvišak ljepila koje okružuje tkivo odzgora okretanjem ručice. Ručica je obično spojena s glavom držača bloka (princip rotacijskog mikrotoma). Okretanjem ručice blok se približava nožu te se odstranjuje suvišak ljepila.
9. Rezati tkivo okretanjem ručice. Rezovi se rasprostiru po metalnoj pločici pomoću hladnog kista. Moguće je iznad pločice položiti zaštitno staklo (koje se mora zasebno namjestiti i prilagoditi nožu). Time se postiže da rezovi ulaze između stakla i metalne pločice i ravnaju se. Ovisno o potrebama, može se načiniti odmah

nekoliko rezova koji se postavljaju na silanizirana predmetna stakla⁶.

10. Postavljanje rezova na predmetno staklo. Predmetno staklo se postavi na rez/rezove i lagano prisloni. Rez ili više njih prijanjaju na toplo staklo. Predmetno se staklo potom okrene tako da rez gleda prema gore. Rezovi se ostave u komorici dok ne pobijele. U tom trenutku su spremni za bojanje ili ih možemo pohraniti na -20°C . U slučaju pohranjivanja, preporučuje se da se rezovi zaštite omatanjem pomoću alufolije.



Prikaz rezanja tkiva kriostatom te postavljanje rezova na premetno staklo.

PROBLEM	MOGUĆI UZROCI	PREPORUKA
Tkivo se nije zalijepilo	Neodgovarajuća količina ljepila	Obilnije nakapati ljepilo
Nož ne reže	Blok s tkivom udaljen	Finom regulacijom približiti blok
Rezovi su nejednake debljine	Tupa ili neodgovarajuća britvica	Zamijeniti britvicu

¹ Ljepilo za tkivo, npr. Tissue Freezing Medium Jung, „order number“ 0201 06926

² Kao britvice mogu se koristiti npr. Disposable Microtome Blades, Leica, model 818 ili Microtome Blade, Feather, R35.

³ Temperatura ovisi o vrsti tkiva, uobičajena temperatura: -20°C .

⁴ Noviji uređaji imaju nosač sa britvicama.

⁵ Prosječna debljina je $10\ \mu\text{m}$, a raspon od $1\text{--}60\ \mu\text{m}$.

⁶ Stakla se do trenutka postavljanja rezova drže na sobnoj temperaturi.

PRIPREMIO: Dr. sc. Davor Ježek