

SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 41

MORFOLOGIA (CITOLOGIA – ISTOLOGIA – ZOOLOGIA) – MORFOLOGY (CITOLOGY – HISTOLOGY – ZOOLOGY)

Settori Scientifico-Disciplinari di riferimento: BIO/06, BIO/05

Responsabile: MARIA M. DI FIORE, CLAUDIA PINELLI

RADoR: MARIA M. DI FIORE, CLAUDIA PINELLI, GABRIELLA CHIEFFI, ALESSANDRA SANTILLO

Tipologia: CHIMICO

Gruppi afferenti: CITOLOGIA E ISTOLOGIA, ZOOLOGIA, BIOLOGIA CELLULARE

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- piano RIALZATO del corpo A del DiSTABiF (locale 5A); dimensioni: 17,8 m².
- n. 2 postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

1. Allestimento preparati in paraffina per microscopia ottica
2. Inclusione in resina per microscopia elettronica
3. Colorazioni istologiche e istochimiche
4. Colorazioni immunoistochimiche
5. Visione preparati al microscopio

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DEL CICLO DI LAVORO E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. Allestimento preparati in paraffina per microscopia ottica
Lavorare sotto la cappa e indossare i dispositivi di protezione individuale (DPI) necessari, come guanti, occhiali di protezione e camice da laboratorio. I campioni da processare vengono rimossi dal fissativo (Bouin, paraformaldeide, Zamboni, ecc.) e subiscono una serie di passaggi, inclusa la deidratazione in alcol crescente, l'immersione nel solvente del mezzo di inclusione appropriato (xilene, CitriSolv, Istosol, ecc.), la diafanizzazione e successivamente l'immersione in paraffina liquefatta a 60°C in una stufa. I campioni, immersi nella paraffina ancora liquida, vengono collocati in contenitori o stampi dedicati. Il blocco di tessuto solidificato viene quindi fissato al microtomo, dotato di una lama affilata, che comunque si aziona con un meccanismo di sicurezza. Si procede al sezionamento di fettine sottili (5-10 µm) e continue del tessuto. Queste sezioni vengono successivamente raccolte su vetrini, dove possono essere trattate, colorate e analizzate al microscopio. N.B. I passaggi che richiedono l'utilizzo della cappa aspirante vengono eseguiti nel laboratorio adiacente di Biologia Cellulare
2. Inclusione in resina per microscopia elettronica
Lavorare sotto cappa chimica e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, guanti di protezione, camice da laboratorio). I campioni vengono fissati con agenti chimici come la formaldeide o la glutaraldeide e post-fissati con tetrossido di osmio per preservarne la struttura. Successivamente, si procede alla deidratazione attraverso una serie graduale di soluzioni di alcol o acetone per rimuovere l'acqua e in ossido di propilene per preparare il campione per l'infiltrazione con resina

epossidica. Il campione viene quindi immerso in una miscela di resina epossidica (come l'Epon o l'Embed 812) e un agente indurente (solitamente DMP-30). Il campione impregnato di resina viene collocato in stampi appropriati e la resina viene fatta indurire, spesso attraverso l'uso di temperature controllate. N.B. I passaggi che richiedono l'utilizzo della cappa aspirante vengono eseguiti nel laboratorio adiacente di Biologia Cellulare.

3. Colorazioni istologiche e istochimiche

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio, guanti, visiera per liquidi criogenici).

Prima della colorazione i vetrini con sezioni in paraffina devono essere immersi in xilene per far sciogliere la paraffina (quelli con sezioni al criostato vengono direttamente posti in H₂O_d). Segue la reidratazione in una serie decrescente di etanolo fino all'H₂O e successiva colorazione del preparato con coloranti acquosi (ematossilina, eosina, blu di toluidina, etc.). Dopo vari risciacqui segue la disidratazione in serie crescente di alcol e passaggi in xilene prima della chiusura dei vetrini con mezzo montate (balsamo del Canada, gel di glicerolo, mezzi acquosi, resine sintetiche (DPX, PMMA)). N.B. I passaggi che richiedono l'utilizzo della cappa aspirante vengono eseguiti nel laboratorio adiacente di Biologia Cellulare

4. Colorazioni immunoistochimiche

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio, camice da laboratorio).

Le sezioni in acqua possono essere sottoposte a trattamenti preliminari (termici o enzimatici) per migliorare l'accessibilità degli epitopi. Successivamente vengono trattate con un bloccante non specifico (siero normale). Le sezioni vengono quindi incubate con specifici anticorpi primari per le proteine bersaglio, Seguite da lavaggi in tampone. Segue l'incubazione con un anticorpo secondario coniugato a un marcatore visibile (HRP, fluorocromi, etc.). Nuovamente, le sezioni vengono lavate e, se necessario, viene aggiunto un substrato cromogeno o fluorogeno che reagisce con l'anticorpo secondario per generare un segnale visibile o fluorescente. Le sezioni possono essere successivamente essere controcolorate con coloranti e seguire il processamento del punto 4. N.B. I passaggi che richiedono l'utilizzo della cappa aspirante vengono eseguiti nel laboratorio adiacente di Biologia Cellulare.

5. Osservazione al microscopio

Prima di iniziare l'osservazione, il microscopio viene regolato (messa a fuoco, l'illuminazione e la scelta delle lenti obiettivo in base alle necessità di ingrandimento). Dopo la regolazione, l'operatore inizia l'osservazione del campione. In questa fase, vengono acquisite immagini o dati rilevanti utilizzando la fotografia microscopica, la microscopia digitale o sistemi di acquisizione di immagini. Le informazioni ottenute durante l'osservazione al microscopio vengono archiviate su supporti digitali.

Lista delle attrezzature presenti:

- Microscopi ottici n. 4
- Microtomo
- Piastra per istologia
- Frigorifero/freezer

Lista dei Dispositivi di Protezione Generale (DPG)

- Armadio per liquidi infiammabili

Lista dei Dispositivi di Protezione Individuali (DPI) ad uso personale degli operatori

- Occhiali di protezione
- Guanti in nitrile e in lattice (varie misure)
- Visiera

Categorie ISI WEB di riferimento

Cell Biology, Reproductive Biology, Endocrinology & Metabolism, Biochemistry & Molecular Biology, Neurosciences & Neurology, Zoology.

Categorie ERC di riferimento

- LS3_1 Cell cycle, cell division and growth
- LS3_2 Cell senescence, cell death, autophagy, cell ageing
- LS3_6 Organelle biology and trafficking
- LS3_9 Cell differentiation, formation of tissues and organs
- LS5 Neuroscience and Disorders of the Nervous System
- LS5_1 Neuronal cells
- LS5_4 Neural networks and plasticity