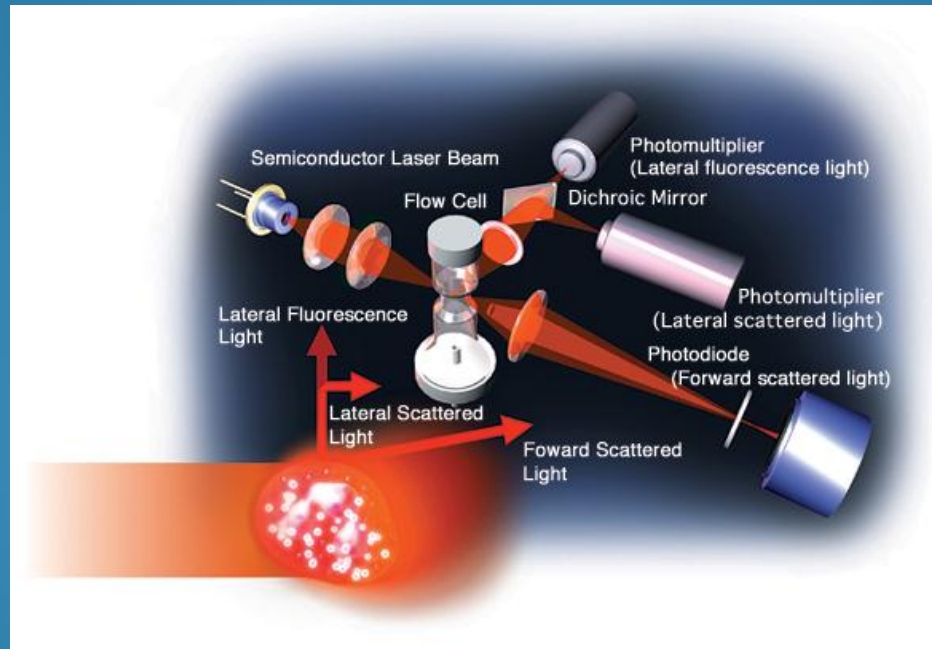
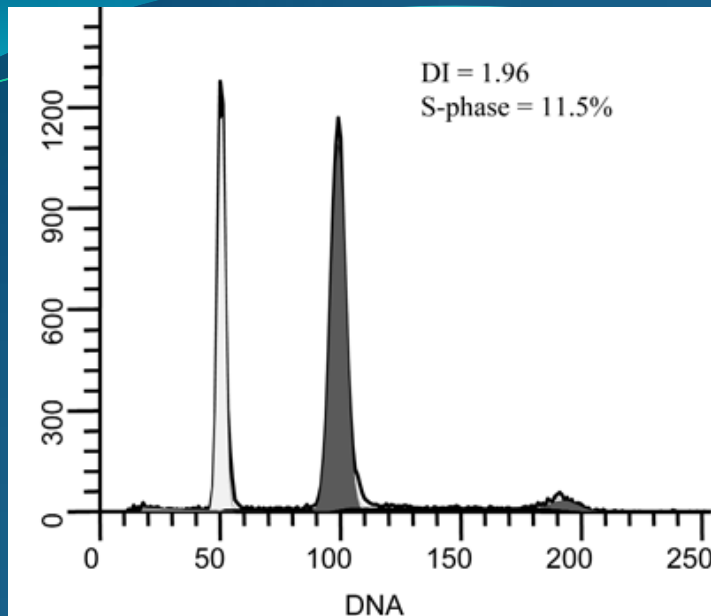


Συμπαγείς ιστοί-προετοιμασία για κυτταρομετρία ροής

ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ Μ. ΒΙΟΛΟΓΟΣ PhD





DNA-PLOIDY

- ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ
- ΕΥΡΕΙΑΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΤΟΥΣ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ
- ΠΟΛΛΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΩΣ ΕΝΤΕΡΟΥ



ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΤΙ ΕΙΔΟΥΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ;

- ΙΣΤΟΙ ΛΗΦΘΕΝΤΕΣ ΑΠΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΞΑΙΡΕΣΕΙΣ-FNA
- ΙΣΤΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ
- ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΙ ΙΣΤΟΙ
- ΙΣΤΟΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΙ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ

*ΣΚΟΠΟΣ Η ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΜΑΤΟΣ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΚΕΙΜΕΝΟΥ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΔΥΝΑΤΗ Η ΔΙΟΔΟΣ
ΑΠΟ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ*



➤ ΙΣΤΟΙ ΛΗΦΘΕΝΤΕΣ ΑΠΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΞΑΙΡΕΣΕΙΣ-FNA

Ο ΦΡΕΣΚΟΣ ΙΣΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΤΙΣ ΕΞΗΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ:

- ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΘΕΙ ΕΝΑ ΜΕΣΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΥΧΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΧΡΙ ΝΑ ΦΤΑΣΕΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ (ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟ ΜΕΣΟ, ΟΡΟΣ ΒΟΟΣ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ)
- Η ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΙΝΕΤΑΙ ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (GEL WRAP, ENVELOPE FOIL)
- ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΜΕΤΑΦΕΡΘΕΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΔΥΝΑΤΟ ΧΡΟΝΟ (ΕΝΤΟΣ 24 ΩΡΩΝ Ή ΚΑΙ ΛΙΓΟΤΕΡΟ)
- ΔΕΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΣΥΝΤΗΡΗΘΕΙ ΓΙΑ ΜΕΓΑΛΟ ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ (ΚΡΙΝΕΤΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΑΜΕΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ)



➤ ΙΣΤΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Ο ΙΣΤΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΤΙΣ ΕΞΗΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ:

- ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΘΕΙ ΕΝΑ ΜΕΣΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΥΧΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΧΡΙ ΝΑ ΦΤΑΣΕΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ (ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟ ΜΕΣΟ, ΟΡΟΣ ΒΟΟΣ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ
- ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΜΕΤΑΦΕΡΘΕΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΔΥΝΑΤΟ ΧΡΟΝΟ (ΕΝΤΟΣ 24 ΩΡΩΝ)
- ΔΕΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΣΥΝΤΗΡΗΘΕΙ ΓΙΑ ΜΕΓΑΛΟ ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ (ΚΡΙΝΕΤΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΑΜΕΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ)
- ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΑ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΠΙΟ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΘΩΣ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΤΟΥΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΑ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
- ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΥΤΑ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΦΕΡΟΥΝ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΥΠΑΡΧΕΙ ΙΔΑΙΤΕΡΗ ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ



ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΙ ΙΣΤΟΙ ΙΣΤΟΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΟΙ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ



- *ΙΣΤΟΙ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΙ ΚΑΤΑ ΑΠΑΙΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΗ*
- *ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ*
- *ΠΟΙΚΙΛΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΤΑ ΑΠΑΙΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΗ*
- *ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΙΣΤΟΥ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΤΑΧΕΙΑ ΑΠΟΨΥΞΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (ΧΡΗΣΗ ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟΥ 37°C)*
- *ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΕΙΝΑΙ Η ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΕ ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΚΑΙ Η ΕΜΠΟΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟ, ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΑ Η ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ ΤΟΥ*

ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΡΑ ΤΙ ΚΑΝΟΥΜΕ??????



➤ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ: ΧΡΟΝΟΒΟΡΟΣ, ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ
ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΓΙΑ ΕΠΙΤΕΥΧΘΕΙ Η ΟΛΙΚΗ ΔΙΑΛΥΣΗ
ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ



TISSUE MECHANICAL PESTLE (e.g. Sigma-Aldrich)
➤ ΠΑΡΕΧΕΙ ΕΝΑ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΤΡΟΠΟ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
➤ ΕΙΝΑΙ ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΧΡΟΝΟΒΟΡΟΣ
➤ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΤΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΝ ΟΓΚΟ ΤΟΥ
ΙΣΤΟΥ ΠΟΥ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΕΙ ΤΗ ΦΟΡΑ

ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΡΑ ΤΙ ΚΑΝΟΥΜΕ??????



TISSUE MEDIMACHINE (BD)

- ΠΑΡΕΧΕΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΤΡΟΠΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
- ΕΙΝΑΙ ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΧΡΟΝΟΒΟΡΟΣ
- ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΤΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΝ ΟΓΚΟ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΠΟΥ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΤΕΙ ΤΗ ΦΟΡΑ
- ΥΠΑΡΞΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΕΓΚΑΘΙΔΡΥΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ (π.χ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ)
- ΔΙΑΘΕΤΕΙ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΕΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ ΤΟΥ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
- ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΘΕΙ ΕΝΑ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΡΑ ΤΙ ΚΑΝΟΥΜΕ??????

ENZYMATIKH EΠEΞEPΓASIA

➤ΔΙΑΦΟΡΑ ENZYMA ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΣΤΟ ΕΜΠΟΡΙΟ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΙΣ ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΥΝΔΕΣΕΙΣ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΟΥΝ:

- DISPASE
- TRYPSIN
- COLLAGENASE
 - Dnase
- HYALURODINASE

ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ:

- ΤΑ ENZYMA ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΚΑΙ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΓΥΡΩΝ ΔΕΝ ΣΥΝΙΣΤΑΝΤΑΙ ΕΚΤΟΣ ΑΠΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ
 - ΧΡΟΝΟΒΟΡΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Acetone

-20°C για 5-10 λεπτά

- Δεν χρειάζεται να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη

2. Methanol

• -20°C για 5-10 λεπτά

- Δεν χρειάζεται να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη

3. Ethanol

- Παγωμένη 95% ethanol και 5% glacial acetic acid για 5-10 λεπτά

4. Methanol-Acetone

- Παγωμένη methanol, 10 λεπτά στους -20 °C.

- Διάτρηση κυτταρικής μεμβράνης με acetone για 1 λεπτό στους -20 °C

5. Methanol-Acetone Mix

- 1:1 methanol and acetone

- Παρασκευασμένο φρέσκο στους -20 C για 5-10 λεπτά

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

6. Methanol-Ethanol Mix

- 1:1 methanol and ethanol mixture
- Παρασκευασμένο φρέσκο στους -20 C για 5-10 λεπτά

7. Formalin

- 10% για 5-10 λεπτά
- Καλό ξέπλυμα με PBS
- Διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη με 0.5% Triton X-100 για 10 λεπτά

8. Paraformaldehyde-Triton

- 3-4% paraformaldehyde για 10-20 λεπτά
- Καλό ξέπλυμα με PBS
- Διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη με 0.5% Triton X-100 για 10 λεπτά

9. Paraformaldehyde-Methanol

- 4% paraformaldehyde για 10-20 λεπτά
- Καλό ξέπλυμα με PBS
- Διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη με methanol για 5-10 λεπτά στους -20 °C

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΕΤΟΙΜΑ FIX/PERM SOLUTIONS (π.χ. Invitrogen)

➤ ΔΙΕΥΚΟΛΥΝΕΙ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

➤ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

➤ ΜΕΙΩΜΕΝΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ

➤ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΛΑΘΟΥΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

➤ ΥΨΗΛΟΤΕΡΟ ΚΟΣΤΟΣ

ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Triton X-100

Methanol

Aceton

ΔΥΣΚΟΛΙΕς:

- ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΧΡΟΝΩΝ ΕΠΩΑΣΗΣ
- ΑΠΟΦΥΓΗ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΙΣΤΟΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

➤ Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ
ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΙΣΤΟΥΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΠΟΛΛΑ ΣΤΑΔΙΑ

➤ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΝΑ ΕΛΕΧΘΕΙ ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ

➤ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΝΑ ΕΚΤΙΜΗΘΕΙ Η ΣΩΣΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ
ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΠΟΙΟΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΙ ΕΠΙΤΟΠΟΙ ΘΑ
ΜΕΛΕΤΗΘΟΥΝ

➤ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΕΞΟΙΚΙΩΣΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

➤ ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΙΣΤΟΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

➤ ΔΗΜΙΟΥΡΓΕΙΤΑΙ ΜΙΑ ΚΑΙΝΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΜΙΑΣ ΚΑΙ ΕΩΣ ΣΗΜΕΡΑ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ Η ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΗΤΑΝ ΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

