



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206872
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 08 06 79

(21) (PV 3946-79)

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 01 06 84

(51) Int. Cl.³
G 01 N 1/00

(75)

Autor vynálezu

JANDEJSEK JAN RNDr. a SPOHR PAVEL RNDr. PhDr., Praha

(54) Způsob přípravy preparátů pro elektronovou i světelnou mikroskopii buněk z kultur in vitro, tělesných tekutin a ze všech buněčných typů nevytvářejících pevnou tkáň

Vynález se týká způsobu přípravy preparátů pro elektronovou i světelnou mikroskopii buněk z kultur in vitro, tělesných tekutin a ze všech buněčných typů nevytvářejících pevnou tkáň.

Obtížnost zhotovení kvalitního preparátu pro ultrastrukturální studie buněk z kultur in vitro nebo z buněčných typů nevytvářejících pevnou tkáň, např. krve, lymfy apod., spočívá v tom, že sledované buňky je nutno inkorporovat do inertního media, umožňujícího krájení ultratenkých řezů na mikrotomu. Pro účely elektronové mikroskopie buněk rostoucích v monolayeru na plastických miskách byly vypracovány metody umožňující zalití buněk in situ do akrylátů a syntetických prýskyřic (např. Epon). Tuto metodu nelze použít pro přípravu řezů z buněk rostoucích ve skleněných nádobách nebo v suspenzi. Preparáty pro elektronovou mikroskopii z těchto kultur jsou nejčastěji připravovány metodou peletizace buněk anebo méně častou zalitím do agaru. Společnou nevýhodou těchto postupů je, že jsou technicky náročné, vyžadují značnou zkušenost a hlavně velké množství buněk, které nemusí být vždy k dispozici (např. při rychlé diagnostice). Případně zatěžují buňky vysokými tepelnými změnami. Dále není při nich možné současné zpracování řezů pro světelnou mikroskopii.

Tyto nedostatky odstraňuje způsob přípravy

preparátů buněk pro elektronovou i světelnou mikroskopii podle vynálezu, jehož podstatou je, že buňky určené pro mikroskopii jsou inkorporovány do fibrinového koagula, které vzniklo reakcí 0,1 až 100 ml fibrinogenu o koncentraci 1,0 až 100,0 $\mu\text{g/ml}$ a 0,01 až 10,0 ml trombinu o koncentraci 0,5 až 500 U. I. při pH 6 až 8 v pufru, při teplotě 25° až 40 °C po dobu 20 až 60 minut.

Tato metoda umožňuje standardizaci postupu přípravy řezů z různých typů buněk. Další výhodou způsobu podle vynálezu je, že se nemusí pracovat s velkým množstvím buněk, jako např. při peletizaci (10^8 buněk), ale stačí pouhých $7,5 \times 10^5$ buněk. Při menších počtech buněk vzrůstá pracnost při výběru vhodných řezů k dalšímu zpracování. Způsob podle vynálezu je možno jednoduchým postupem využít k současné přípravě preparátů řezů z buněk tkáňových, buněčných, suspenzních kultur nebo jednotlivých izolovaných buněk. Tím se ušetří na kultivaci buněk včetně pomocných látek a přístrojů nutných pro kultivaci velkého množství buněk. Při diagnostice stačí odběr malého množství zkoumané tkáně. Další výhodou způsobu podle vynálezu je, že se následná doba potřebná pro přípravu preparátu zkrátí na 1/3 proti klasickým způsobům a tím dojde ke značným úsporám elektrické energie.

Zařízení k provádění přípravy preparátů podle

vynálezu je k dispozici v každé běžné biologické laboratoři.

Dále je uveden příklad způsobu přípravy preparátu podle vynálezu.

Příklad.

Lidská buněčná linie ES-1, derivovaná z histologicky diagnostikovaného Ewingova sarkomu, byla užita k přípravě preparátů mezi 13 až 15 pasáží. Kultivace buněk probíhala ve skleněných 50 ml lahvičkách (Müllerovy lahvičky) do saturační hustoty 1×10^4 buněk na 1 cm^2 za 7 až 10 dní. Po spočítání buněk byly tyto pasážovány v poměru 1 : 2. Kultivace se prováděla v Eaglově minimálním esenciálním mediu s hankovým solným roztokem doplněným neesenciálními aminokyselinami a 10-ti hmot. % hovězího fetálního séra a antibiotiky (100 U. I. penicilínu a 100 μg streptomycinu na 1 ml).

Hovězí fibrinogen byl rozpuštěn v pufru (TRIS)

o pH 7,2 do konečné koncentrace 10 $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$ a do použití se uchovával zmražený při -25°C .

Trombin byl rozpuštěn ve fosfátovém balancovaném roztoku (PBS) do finální koncentrace 50 U. I./1 ml a do použití skladován v zatavených ampulích v kapalném dusíku.

Buňky narostlé ve skleněné lahvičce byly opakovane opláchnuty vytemperovaným pufrům (TRIS) o pH 7,2, opatrně seškrábány a centrifugovány v konické kyvetě při 800 otáčkách za minutu, po dobu 10 minut. Výtěžek $7,5 \times 10^5$ byl resuspendován v 0,25 ml roztoku fibrogenu. Konverze ve fibrin byla provedena pomocí 0,02 ml čerstvého roztoku trombinu a směs byla koagulována 45 min. při 37°C . Přesrážení bylo 2 $\times$ opakováno.

Fibrinový bloček s obsahem buněk byl přenesen do zkumavky a dále zpracován jednak pro potřeby světelné a jednak pro potřeby elektronové mikroskopie.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy preparátů pro elektronovou i světelnou mikroskopii buněk z kultur in vitro, tělesných tekutin a všech buněčných typů nevytvářejících pevnou tkáň, vyznačený tím, že buňky určené pro mikroskopii jsou inkorporovány do

fibrinového koagula, které vzniklo reakcí 0,1 až 100,0 ml fibrinogenu o koncentraci 1,0 až 100,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 0,01 ml až 10,0 ml trombinu o koncentraci 0,5 až 500,0 U. I. při pH 6 až 8 v pufru, při teplotě 25 až 40°C po dobu 20 až 60 minut.