

Produit

Kit de Tecnovit 7100 de chez Heraeus Kulzer. Il comprend un flacon de 500 ml de GMA liquide ; 5 x 1g de durcisseur I (à garder au frigo) et 40 ml de durcisseur II.

Le Technovit 7100 est un milieu d'enrobage basé sur le 2 – hydroxéthyl metacrylate (GMA). Le glycol methacrylate est utilisé en histologie pour l'enrobage de divers tissus (animaux, végétaux) en vue d'études au microscope optique. Il permet de réaliser des coupes de 2 microns d'épaisseur.



Etapes du protocole

1. Fixation

2. Lavages

3. Déshydratation : éthanol Fluka 100% (Fluka 02860)

- Ethanol 50% 2 x 20 min
- Ethanol 70% 2 x 20 min
- Ethanol 90% 2 x 20 min
- Ethanol 100% 2 x 30 min pour ces deux dernières étapes les échantillons sont mis sous vide. Les flacons sont disposés dans un dessiccateur reliés à une pompe à vide. On fait le vide pendant 5 min et on garde les échantillons sous vide jusqu'à l'étape suivante.

4. Infiltration par le Technovit

4.a. Préparation du milieu d'infiltration: 100ml du liquide de la bouteille de Technovit 7100

- verser le contenu d'un sachet de durcisseur I
- mettre sur agitateur magnétique pendant 15 min en agitation douce pour éviter les bulles.
- stocker à 4°C, dans un flacon de verre bien fermé à l'abri de l'humidité (silicablué). jusqu'à l'utilisation. Ce milieu d'infiltration se garde 1 à 2 mois.

4.b. Infiltration:

- éthanol - milieu d'infiltration (50 - 50 ; V/V) - 30 min
- éthanol - milieu d'infiltration (25 - 75 ; V/V) - 30 min
- milieu d'infiltration seul : 30 min à 2h t° labo ; ensuite 4° C toute la nuit

5. Polymérisation :

- préparation du mélange « milieu d'infiltration - durcisseur II » dans les proportions 1/11, en prévoyant peu de milieu : 880 µl de milieu d'infiltration et 80 µl de hardener II en eppendorf. Homogénéiser avec l'embout d'une gilson.
- Ajouter aussitôt dans les moules en plastiques ou en silicone. Pas besoin d'utiliser les moules histoformes en téflon commercialisés, car coûteux.

- Positionner les échantillons avec indications de la série (pas de pince métallique)
- Laisser polymériser 30- 40 min à t° labo puis 30 min à 60°C

6. Garder les échantillons enrobés dans le Technovit à l'abri de l'humidité, dans un flacon de verre fermé, à t° ambiante à l'abri de l'humidité.

7. Réalisation de coupes avec des lames de rasoir jetables. Il existe des couteaux spéciaux mais fort coûteux. Il ne se forme pas un ruban de coupes. On récolte les coupes une par une avec une pince à bouts fins et on les dépose directement dans une goutte d'eau disposée sur une lame porte – objet. On laisse sécher sur une plaque chauffante (environ 40°C)

Commentaire : protocole utilisé pour l'enrobage de racines d'*Arabidopsis* mais également pour des échantillons de bourgeons floraux ou des pièces florales de palmiers.