



Jun 03, 2019

Version 1

## (EN) Freezing Tissue in OCT using Isopentane - (FR) Congélation de tissus dans de l'OCT avec l'isopentane V.1

Forked from a private protocol

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.3d4gi8w>

Liz Tuck<sup>1</sup>, Heather Etchevers<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>WTSI; <sup>2</sup>Aix-Marseille Université; <sup>3</sup>INSERM

MMG MoPED



Heather Etchevers

Aix-Marseille Université, INSERM



### Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



**DOI:** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.3d4gi8w>

**Protocol Citation:** Liz Tuck, Heather Etchevers 2019. (EN) Freezing Tissue in OCT using Isopentane - (FR) Congélation de tissus dans de l'OCT avec l'isopentane. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.3d4gi8w>



**License:** This is an open access protocol distributed under the terms of the **[Creative Commons Attribution License](#)**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Protocol status:** Working

**We use this protocol in our group and it is working / Eh oui, ça marche !**

**Created:** May 27, 2019

**Last Modified:** June 03, 2019

**Protocol Integer ID:** 23708

**Keywords:** cryostat, coupes, sectioning, histology, histologie, freezing tissue in oct, freezing tissue, cooled isopentane, using isopentane, tissus ou embryons dan, des coupes cryostat, downstream cryo, oct, embryons dan, ice, tissue

## Abstract

# Introduction

This protocol describes how to freeze tissues in OCT using dry-ice cooled isopentane (for downstream cryo-sectioning).

*Ce protocole décrit comment congeler des tissus ou embryons dans du OCT / Tissue-Tek ou autre milieu de congélation pour faire des coupes cryostat*

## Materials

| Material                                    | Supplier Info                         |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| Iso-pentane                                 | ThermoFisher (10468030)               |
| 2 pairs of Forceps                          | ThermoFisher UK Ltd (15232290)        |
| Scalpel                                     | Swann-Morton Ltd (0502)               |
| Labelled Cryotubes                          | (Tubes déjà marqués)                  |
| Cryomold Biopsy 10 × 10 × 5mm (Pk100);      | Agar Scientific (AGG4581)             |
| Cryomold, disposable 7 × 7 × 5 mm (pk1000); | Simport (M475-1) (from Thermofisher). |
| OCT embedding media                         | VWR (Qpath) 00411243                  |
| Or: Tissue-Tek OCT compound                 | Sakura (4583)                         |

| Equipment                  | Traduction                                       |
|----------------------------|--------------------------------------------------|
| Polystyrene box of dry ice | Boite polystyrène de carboglace                  |
| Metal Container            | Petit contenant à vide en métal                  |
| -100°C Thermometer         | Thermomètre spécifique -100°C !                  |
| -80°C Freezer              | Congélateur -80°C avec boîte prévue              |
| Cold resistant gloves      | Gants résistants au froid, remboursés pour azote |

|                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <a href="#">Method</a>                                                                                  |
| Prior to commencing work decontaminate the work area.                                                   |
| Work with tissues from other species (e.g. mouse) should be performed in a fume hood or downflow table. |

## Safety warnings

### Chemical risks

- This protocol should be performed under a fume hood or under a ducted MSC.
- Always wear correct PPE (which includes eye protection, nitrile gloves, thermal gloves for handling Liquid Nitrogen / dry-ice cooled iso-pentane and appropriate labcoat) when handling any chemical.
- For more chemical information see the **COSHH** forms or **MSDS** for each chemical.

**Any chemicals which have specific risks and handling instructions will be outlined in the appropriate SOP method section**

---

### *Risques chimiques*

- *Ce protocol doit être fait sous hotte chimique ou sorbonne.*
- *Toujours porter des gants nitrile et blouse, ainsi que des gants pour l'azote liquide / carboglace*
- *Pour plus d'informations sur les risques chimiques, regarder les fiches COSHH ou MSDS pour chaque produit.*

## Before start

Some fixed tissues freeze better having been impregnated in 15%, then 30% sucrose in neutral buffered PBS. Particularly for embryos or brain tissues. Let equilibrate by falling to bottom of well/tube.

*Certains tissus fixés, tels les embryons ou le cerveau, ont moins d'artéfacts s'ils sont d'abord imprégnés dans 15% puis 30% sucrose dans du PBS. Laisser équilibrer en tombant au fond du tube / puits.*

- 1 Cool 1 pair of forceps in the dry ice. Keep the other pair at room temperature. If used, place labelled cryotube on dry ice.

*Refroidir une des pinces dans la carboglaces. L'autre garder à température ambiante. Si nécessaire, marquer un cryotube et la mettre à refroidir aussi sur la carboglace.*

- 2 On a downflow or fume hood: Place metal container on dry ice and half fill with isopentane.(use enough iso-pentane to completely immerse the tissue pieces).Iso-pentane is extremely flammable and may be fatal if swallowed or enters airways. To be used in a fume-hood or downflow table wearing correct PPE.

*Sous la hotte ou sorbonne : mettre le petit recipient sur carboglace et la remplir jusqu'à moins d'un centimètre du bord avec de l'iso-pentane. Il faut que le niveau soit tel que le morceau de tissu soit entièrement immergé.*

#### Safety information

L'iso-pentane est très inflammable et toxique par voie aerienne ou en l'avalant. Donc se proteger avec gants et blouse, et travailler impérativement sous la hotte.

- 3 Put lumps of dry ice into the iso-pentane and monitor with the -100°C thermometer until it measures -70°C.

*Rajouter des morceaux de carboglace doucement dans l'iso-pentane et vérifier avec le thermomètre approprié (celui qui descend à -100°C !!) qu'on atteint  -70 °C .*

- 4 Label a cryomold and foil with the sample id

*Marquer une moule et du papier d'aluminium avec l'identité de l'échantillon.*

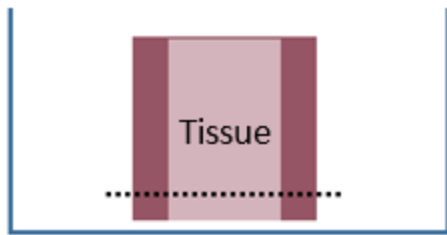
- 5 Trim the tissue into a piece small enough to fit into the cryomold, if required.

*Si nécessaire ou pertinent, tailler le tissu pour qu'il rentrera dans la moule.*

- 6 Half fill the cryomold with OCT and position the tissue in the cryomold. Note: for spatial transcriptomics use small cryomolds (maximum 10 ×10 mm). One can prepare multiple samples in this way on wet (not dry) ice, and reposition just before freezing.

*Remplir la moule à moitié avec du milieu d'inclusion (OCT, Tissue-Tek) et positionner le morceau dans la moule. Pour la transcriptomique spatiale utiliser des petites moules à*

*moins d'un centimètre carré. On peut ainsi préparer quelques échantillons et les mettre sur glace (pas carboglace) en attendant, les repositionner juste avant de les congeler.*



Ensure that the tissue is oriented correctly to achieve the desired cryosection. *E.g.* Place tissue with region of interest to section, pushed flat at the bottom of the mold. Ensure there is a thin layer of OCT at the bottom of the mold so the tissue is fully covered. Dotted line in the image above shows how cross-sections would be cut from the tissue. Sections would be generated from the bottom of the block upwards.

*Orienter le tissu pour avoir la bonne angle de coupe, c'est à dire, mettre la région d'intérêt vers la fond de la moule, à plat. S'assurer que toutefois il y a une pellicule d'OCT au fond de la moule. La ligne discontinue montre comment les coupes seraient faites à partir du bloc, du fond vers le haut en avançant.*

- 7 Add more OCT if needed to ensure the tissue is fully submerged and covered in OCT.

*Ajouter plus d'OCT / Tissue-Tek pour entièrement submerger le tissu.*

- 8 Using forceps, submerge the cryomold in the container of isopentane, chilled to -70 °C on dry ice. Only samples without OCT should be submerged entirely, otherwise float the cryomold to immerse 5 of the 6 sides. It is possible to add powdered dry ice to the top of the cryomold.

*Avec des pinces, positionner la moule dans l'isopentane préalablement refroidi à -70 °C . Ne pas immerger entièrement mais enfoncer autant que possible pour refroidir le plus rapidement possible sur 5 des 6 faces. On peut ajouter de la poudre de carboglace sur la 6e face.*

- 9 When completely frozen, wrap sample in foil (still in cryomold), and keep on dry ice. Alternatively, remove sample from cryomold and place in labelled cryotube on dry ice.

*Quand c'est entièrement figé et blanc, emballer la moule avec l'échantillon dans le papier d'aluminium et garder le tout sur carboglace à TOUT moment avant transfert au -80C. On peut également sortir l'échantillon de la moule et le garder dans un cryotube marqué au préalable.*

- 10 Transfer samples on dry ice, to labelled box in  -80 °C freezer.

*Faire le chemin entre laboratoire et  -80 °C congélateur pour y transférer les échantillons, toujours en gardant les échantillons enfouis dans la carboglace.*

- 11 If freezing more samples monitor the isopentane temperature and adjust as necessary.

*Vérifier que l'iso-pentane est bien refroidi à -70°C avant de continuer à congeler d'autres échantillons de la même manière.*

- 12 Wearing cold-resistant gloves or the wooden forceps, carefully remove the metal container of iso-pentane from the dry ice. The iso-pentane can allowed to warm to -10C, then decanted to a suitable bottle for re-use. The bottle must be labelled and kept in a fume hood/ downflow table, with the lid loosened until the iso-pentane returns to room temperature.

*Avec des gants spécifiques contre le froid de l'azote ou sinon les pinces en bois, sortir le récipient d'iso-pentane de la carboglace (sous la hotte) afin de revenir à température ambiante. Déjà à -10°C, on peut transférer à une bouteille Pyrex pour ré-utilisation, mais ne pas serrer le bouchon avant d'être revenu à température ambiante. A garder, bien marqué avec la date d'utilisation et le contenu, sous la hotte dans l'armoire chimique tout comme la bouteille stock.*