

Jun 03, 2019 Version 2

(EN) Freezing Tissue in OCT using Isopentane - (FR) Congélation de tissus dans de l'OCT avec l'isopentane V.2

Forked from a private protocol

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.3nigmce

Liz Tuck¹, Heather Etchevers^{2,3}

¹WTSI; ²Aix-Marseille Université; ³INSERM

MMG MoPED



Heather Etchevers

Aix-Marseille Université, INSERM



OPEN  ACCESS



DOI: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.3nigmce

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.3nigmce](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.3nigmce)

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), 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 toujours !

Created: June 03, 2019

Last Modified: June 03, 2019

Protocol Integer ID: 23978

Keywords: cryostat, coupes, sectioning, histology, histologie



Abstract

Introduction

This protocol describes how to freeze tissues in OCT using dry-ice cooled isopentane (for downstream cryo-sectioning). In this new version we add that it is also possible to use liquid nitrogen to cool the isopentane, but it's more complicated.

Ce protocole décrit comment congeler des tissus ou embryons dans du OCT / Tissue-Tek ou autre milieu de congélation pour faire des coupes cryostat. Dans cette version, on ajoute qu'on peut également refroidir l'isopentane dans de l'azote liquide mais il y a plus de contraintes.

Guidelines

Safety information

Liquid nitrogen is very dangerous! Appropriate handling training is necessary.

L'azote liquide peut être très dangereux ! Quiconque manipule, entrepose ou transfère des liquides cryogéniques doit recevoir de la formation sur les pratiques de manipulation sécuritaires. Cette formation devrait porter spécifiquement sur les sujets suivants :

- propriétés du liquide cryogénique tant à l'état liquide qu'à l'état gazeux
- instructions sur l'équipement utilisé, incluant les dispositifs de sécurité
- matériaux approuvés compatibles avec le liquide cryogénique
- **sélection et utilisation d'équipement et de vêtements de protection**
- **premiers soins, incluant auto traitement**
- **interventions d'urgence** : feux, fuites et déversements
- bonnes pratiques d'entretien des locaux.

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 x 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, rembourés pour azote

Method
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. This step and dry ice remains useful, even when cooling the isopentane in liquid nitrogen.

Refroidir une des pinces dans la carboglace. L'autre garder à température ambiante. Si nécessaire, marquer un cryotube et la mettre à refroidir aussi sur la carboglace. Toujours utile même si on travaille avec de l'azote liquide.

- 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).


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

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.

L'iso-pentane est très inflammable et toxique par voie aeriennne 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. OR : immerge

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

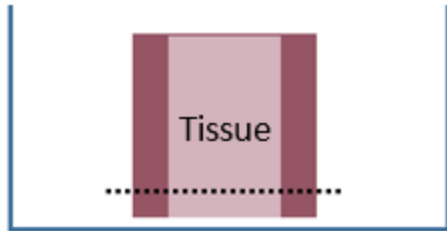
Marquer une moule et du papier d'aluminium avec l'identité de l'échantillon.

- 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.