



OSPEDALE Casa Sollievo della Sofferenza

ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO
OPERA DI SAN PIO DA PIETRELCINA

Viale Cappuccini snc - SAN GIOVANNI ROTONDO (FG)

PROTOCOLLO DI RICERCA

Progetto PNC-E3-2022-23683269 PNC-HLS-TA
codice commessa RPNC22UPTA01,
CUP I23C22000870001

PROTOCOLLO DI RICERCA

COLORAZIONE AZAN TRICROMICA

04-001802 Azan tricromica 100 test

Reattivi:

- A) Azocarminio secondo Heidenhain 100 ml
- B) Alcool-anilina 30 ml
- C) Alcool acidulato (soluzione d'arresto) 30 ml
- D) Acido fosfowolframico soluzione 30 ml
- F) Miscela policroma secondo Mallory 30 ml

Metodo:

- 1) Portare la sezione all'acqua distillata.
- 2) Incubare la sezione nel reattivo A in stufa a 56°C per 30 minuti, estrarre dalla stufa ed attendere 5 minuti. Recuperare il colorante nel flacone A senza filtrarlo.
- 3) Lavare in acqua distillata.
- 4) Porre sulla sezione 10 gocce della soluzione B: lasciare agire 1 minuto.
- 5) Sgocciolare su carta da filtro, quindi porre sulla sezione 10 gocce del reattivo C: lasciare agire 1 minuto.
- 6) Sgocciolare su carta da filtro, quindi porre sulla sezione 10 gocce del reattivo D: lasciare agire 30 minuti.
- 7) Sgocciolare su carta da filtro e senza lavare, porre sulla sezione 10 gocce del reattivo E: lasciare agire 30 minuti.
- 8) Lavare velocemente in etanolo 95°. Disidratare nella serie ascendente degli alcol; xilene e balsamo.



OSPEDALE Casa Sollievo della Sofferenza

ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO
OPERA DI SAN PIO DA PIETRELCINA

Viale Cappuccini snc - SAN GIOVANNI ROTONDO (FG)

PROTOCOLLO DI RICERCA

Progetto PNC-E3-2022-23683269 PNC-HLS-TA
codice commessa RPNC22UPTA01,
CUP I23C22000870001

PROTOCOLLO DI RICERCA

IN VITRO PROTOCOL – PFA FIXATION

- Remove culture medium
- Wash PBS 1X 5min
- Add PFA 2% w/v and incubate at RT for 10minutes
- Remove PFA 2% w/v
- Add PFA 4% w/v and incubate at RT for 10 minutes
- Remove PFA 4% w/v
- Wash PBS 1X 10 minutes
- Wash PBS 1X 5minutes
- Add PBS 1X and store at 4°C

IN VIVO PROTOCOL – PFA FIXATION

- Add PFA 4% w/v and incubate overnight at 4°C
- Remove PFA 4% w/v
- Add sucrose 30% w/v in PBS 1X and incubate overnight at 4°C
- Remove sucrose, embedded samples in OCT compound (Bio-Optica S.p.A.) and cryopreserve at -20°C

NB. In vivo protocol was used for tissues, 3D cell culture organoids and microchannels

San Giovanni Rotondo,

Il Responsabile del Progetto

Dott. Ing. Fabrizio Gelain