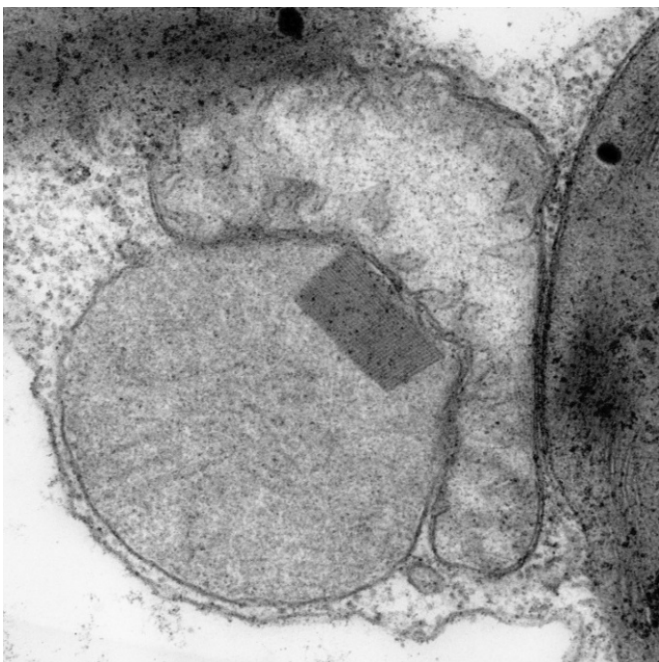


**М. М. Щербатюк
В. О. Бриков
Г. Г. Мартин**

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ РОСЛИННИХ ТКАНИН ДЛЯ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

(ТЕОРЕТИЧНІ ТА ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ)



Київ 2015

Національна академія наук України
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного

М. М. Щербатюк, В. О. Бриков, Г. Г. Мартин

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ РОСЛИННИХ ТКАНИН ДЛЯ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

(ТЕОРЕТИЧНІ ТА ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ)

Методичний посібник

Київ
"Талком"
2015

УДК 57.082.2:57.086.3:303.01

ББК 28.5

Щ61

Щербатюк М. М., Бриков В. О., Мартин Г. Г.

Щ61 Підготовка зразків рослинних тканин для електронної мікроскопії (теоретичні та практичні аспекти): метод. посіб. / М. М. Щербатюк, В. О. Бриков, Г. Г. Мартин. – Київ. : Талком, 2015. – 62 с.

ISBN 978-617-7133-90-1

У виданні узагальнено досвід роботи науковців Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, які досліджують рослинні об'єкти за допомогою трансмісійної та сканувальної електронної мікроскопії. Методи, представлені у збірнику, пройшли багаторічну апробацію. Використання наведених методичних прийомів забезпечить дослідникам-початківцям суттєву допомогу в роботі та значно заощадить їх час.

Посібник розраховано на широке коло біологів, насамперед ботаніків, фізіологів, цитологів, екологів рослин та агрономів.

Shcherbatiuk M. M., Brykov V. O., Martyn G. G.

The preparation of plant tissues for electron microscopy (theoretical and practical aspects): method. manual. / M. M. Shcherbatiuk, V. O. Brykov, G. G. Martyn. – Kyiv. : Talkom, 2015. – 62 p.

The publication summarizes the experience of scientists from the M. G. Kholodny Institute of Botany (National Academy of Sciences of Ukraine). These scientists are researching plant objects using transmission and scanning electron microscopy. The methods represented in the publication have been tested for many years. The use of the above techniques provide research beginners with substantial assistance in work and will significantly save their time.

The guidelines are for a wide range of biologists, especially botanists, physiologists, cytologists, plant ecologists and agronomists.

Відповідальні редактори: М. М. Щербатюк, В. О. Бриков

Рецензенти: д. б. н. О. М. Недуха (Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України) і д. б. н. В. В. Шевченко (Інститут фізіології рослин та генетики НАН України)

Затверджено до друку на засіданні Вченої ради Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (Протокол №14 від 10 листопада 2015 р.).

Фото на обкладинці Ю. М. Акімова: білковий кристал у пероксисомі овсяниці лугової

ISBN 978-617-7133-90-1

© Щербатюк М. М., Бриков В. О., Мартин Г. Г., 2015

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	5
ТРАНСМІСІЙНА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ	7
1. Історичні аспекти та принцип роботи трансмісійного електронного мікроскопа	7
2. Підготовка рослинних тканин для дослідження у трансмісійному електронному мікроскопі.....	12
2.1. Фіксація	14
2.2. Зневоднення зразків	17
2.3. Заливання зразків у полімерні смоли.....	18
2.4. Типова методика фіксації, зневоднення і заливання рослинного матеріалу в епоксидну смолу (експрес-метод)	20
3. Підготовка фіксованого матеріалу для дослідження ультраструктури ..	23
3.1. Підготовка блоків	23
3.2. Приготування ультратонких зрізів	23
3.3. Визначення товщини та якості ультратонких зрізів	27
3.4. Перенесення зрізів на предметні сіточки і бленди	29
3.5. Контрастування ультратонких зрізів.....	32
3.6. Приготування напівтонких зрізів та попереднє дослідження матеріалу в світловому мікроскопі	33
4. Дослідження у трансмісійному електронному мікроскопі	38
СКАНУВАЛЬНА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ	43
1. Історичні аспекти та принцип роботи сканувального електронного мікроскопа	43
2. Підготовка зразків для дослідження у сканувальному електронному мікроскопі.....	45
2.1. Спосіб підготовки діатомових водоростей для вивчення у сканувальному електронному мікроскопі.....	47
ДОДАТКИ	50
I. Розведення етилового спирту	50

II. Приготування зневодненого (абсолютного) етилового спирту	50
III. Приготування 0,1 М Na ₂ HPO ₄ – NaH ₂ PO ₄ (фосфатного) буферу; рН 5,8 – 8,0	51
IV. Приготування 0,1 М кокодилатного буферу	52
V. Приготування суміші епоксидних смол епон-аралдит	52
VI. Очищення бленд та сіточок	53
VII. Приготування формварової плівки	53
VIII. Приготування скляних ножів	56
IX. Робота з діамантовим ножем, його очищення	58
X. Приготування розчину цитрату свинцю (контрастеру для зрізів)	59

ПЕРЕДМОВА

Ми є сучасниками бурхливого розвитку нанотехнологій. Їхнє використання поширюється від космічної техніки до виготовлення новітніх медичних препаратів. Електронна мікроскопія зараз широко використовується у сфері виготовлення і контролю якості мікроелектроніки. Проте без використання електронних мікроскопів не можна уявити, як сучасну біологічну науку, так і медицину. Не зважаючи на значну вартість обладнання та досить значні вимоги до підготовки матеріалів для досліджень, методи електронної мікроскопії стали доволі звичними для науки та промислового виробництва і є невід'ємною часткою сучасної картини високотехнологічного світу.

Після винайдення світлового мікроскопа інтерес людини до пізнання мікроструктури живої матерії лише загострився. У процесі розвитку цитології та суміжних з нею дисциплін виникали запитання, відповіді на які не можна було отримати за допомогою оптичних мікроскопів, оскільки їх максимальна роздільна здатність складає 1 мкм. Через вплив оптичної аберації об'єкти менші цієї величини у світловому мікроскопі неможливо розпізнати і вивчити, навіть якщо використовувати світло ультрафіолетового діапазону.

На початку двадцятого століття завдяки вдосконаленню технології шліфування лінз оптичні системи світлових мікроскопів практично досягли своєї граничної роздільної здатності. Це століття було не тільки добою двох світових воєн, що принесли людству небувалі лихоліття, але також епохою великих наукових відкриттів, багато з яких змінили уявлення людини про навколишній світ і допомогли осягнути таємниці мікросвіту. Саме завдяки винайденню в 30-х роках двадцятого століття трансмісійного електронного мікроскопа сформувалось наше теперішнє уявлення про будову клітини, її мембранну систему та органели. Таким чином, саме електронний мікроскоп, роздільна здатність якого може досягати кількох ангстрем (\AA)¹, що значно менше одного нанометра, дозволив зробити фундаментальні відкриття у природознавстві.

У представлених рекомендаціях узагальнено досвід роботи науковців, які працюють в Інституті ботаніки імені Миколи Григоровича Холодного Національної Академії наук України і досліджують рослинні об'єкти за допомогою електронної трансмісійної та сканувальної мікроскопії. Досліднику-початківцю слід розуміти, що найважливішим етапом проведення успішного дослідження ультраструктури клітин є фіксація зразків і приготування препаратів.

¹ ангстрем не належить до міжнародної системи одиниць, однак до цього часу широко використовується у практиці електронної мікроскопії.

Тому автори акцентують увагу на основних моментах цього процесу, не оминаючи при цьому деяких дрібних нюансів, врахувавши які молоді науковці зможуть уникнути багатьох помилок у своїй майбутній роботі. Рекомендації, викладені в даному методичному посібнику, дозволять успішно проробити всю процедуру підготовки препаратів: від відбору матеріалу до отримання зрізів, готових для дослідження у трансмісійному електронному мікроскопі. Також автори не залишили без уваги методику підготовки зразків рослинних органів і тканин для сканувальної електронної мікроскопії.

Даний посібник створювався в першу чергу для студентів та аспірантів біологічних спеціальностей – цитологів, гістологів, фізіологів рослин, ботаніків. Але, оскільки немає принципової різниці в технології підготовки зразків рослинного і тваринного походження для дослідження в електронному мікроскопі, корисним він буде для студентів-медиків, а також всіх зацікавлених, чий інтереси охоплюють різні галузі біології і сучасної техніки.

ТРАНСМІСІЙНА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

1. Історичні аспекти та принцип роботи трансмісійного електронного мікроскопа

Створенню електронного мікроскопа передували значні поступові теоретичні уявлення про природу матерії. Зокрема, постульована Луїсом де Бройлем гіпотеза про корпускулярно-хвильові властивості електрону, сприяла виникненню ідеї використовувати потік електронів для формування збільшеного зображення мікрооб'єктів. Необхідною передумовою розробки електронного мікроскопу стало створення німецьким фізиком Гансом Бушем у 1926 році магнітних лінз, які здатні відхиляти потік електронів. У 1931 році в Берлінському технічному університеті почала працювати дослідницька група, що складалась із керівника Макса Кноля та кількох підлеглих, серед яких були Бодо фон Борріз і Ернст Руска. Саме Ернст Руска, тоді ще зовсім молодий аспірант, був головним ідейним фундатором створення реально діючого приладу. За його технічним рисунком було складено апаратну частину першого електронного мікроскопа, збільшення якого було набагато нижчим, ніж у оптичних мікроскопів. Однак, без сумніву, це був перший крок, що забезпечив подальшу роботу в цьому напрямку. Тим паче, що теоретичні розрахунки показували набагато вищі кратності збільшення.

У 1933 році Е. Руска створив вже другий прилад, роздільна здатність якого сягала 50 нм. Захистивши дисертацію, молодий інженер працював над вдосконаленням електронно-променевих трубок для телевізійної компанії в Берліні. Через кілька років він перейшов працювати до фірми Siemens AG, де були створені перші комерційні електронні мікроскопи, які з'явилися на ринку 1939 року. Перший екземпляр цієї серії представлений на ілюстрації (рис. 1). Поряд – сучасний прилад японської компанії JEOL (рис. 2), котрий завдяки своїм можливостям, а саме: високій прискорюючій напрузі та відмінній роздільній здатності, може бути використаним як у біологічних дослідженнях, так і у матеріалознавстві.

Саме висока роздільна здатність електронного мікроскопа є головною його перевагою над світлооптичним. Дана властивість обумовлена малою довжиною хвилі електронів, яка залежить від прискорюючої напруги і визначається за такою формулою:

$$\lambda = 12,2/\sqrt{V} (\text{Å}).$$



Рис. 1. Перший серійний трансмісійний електронний мікроскоп, виготовлений компанією Siemens AG, який використовувався для практичних досліджень. (Фото: Deutsches Museum).



Рис. 2. Сучасний трансмісійний електронний мікроскоп – JEM 2100. Прискорююча напруга – 200 кВ (Фото: www.jeol.co.jp).

Так, наприклад, при використанні прискорюючої напруги у 50 кВ, довжина хвилі електронів складає близько $0,0545 \text{ \AA}$ ($0,00545 \text{ нм}$), в той час, як довжина хвилі білого світла становить 5500 \AA (550 нм). За принципом формування зображення, електронний мікроскоп мало чим відрізняється від світлового (рис. 3). Оптичний мікроскоп має джерело світла. Зазвичай це галогенонаповнена лампочка розжарювання. В електронному мікроскопі зображення формується потоком електронів, тому тут є джерело електронів, а саме катод у вигляді вольфрамової нитки, яка, нагріваючись, випромінює електрони внаслідок явища термоелектронної емісії. Для концентрування електронів слугує спеціальний сталевий циліндр з конусоподібним краєм (циліндр Венельта). Нижче розташовуються конденсорна система (конденсорна електромагнітна лінза), об'єктив (об'єктивна електромагнітна лінза), окуляр (проміжна та проєкційна електромагнітні лінзи). Саме ж зображення формується на люмінесцентному екрані. Документують сфокусовану картинку за допомогою фотокамери (рис. 4). Під дією прискорюючої напруги електрони рухаються від розігрітого катода до анода, набуваючи величезної швидкості.

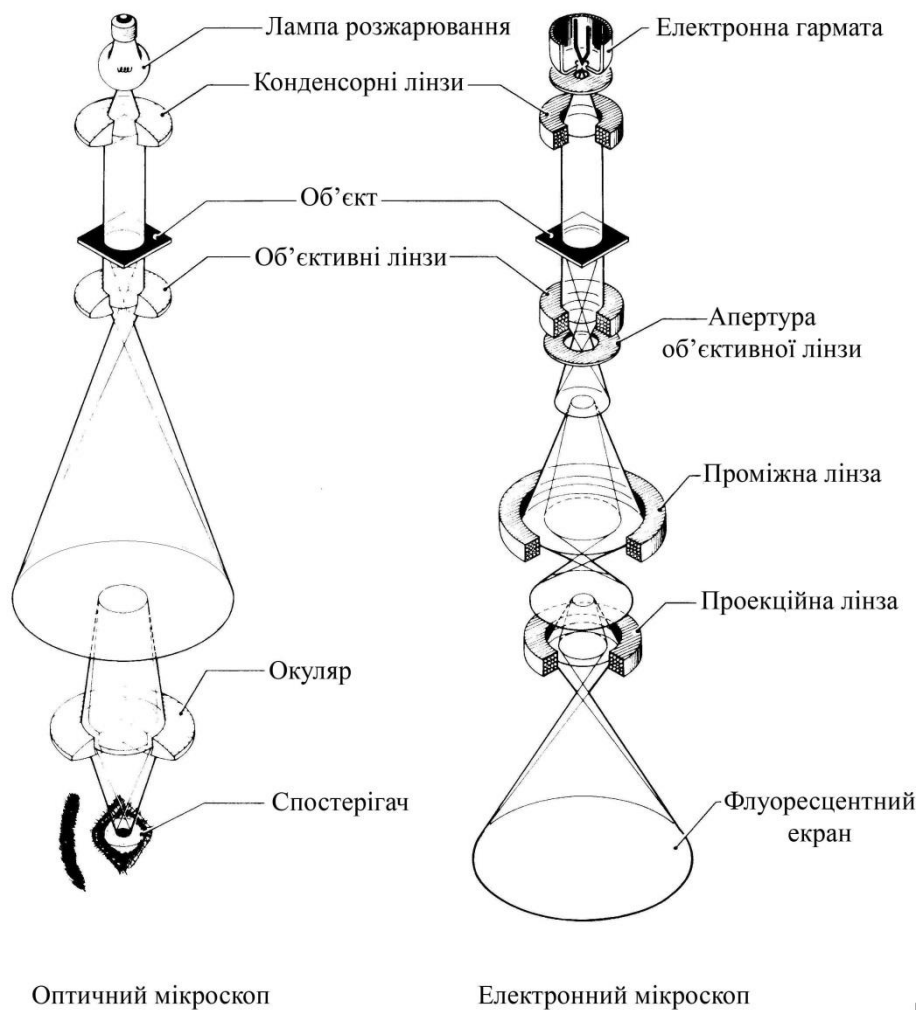


Рис. 3. Схема збільшення мікрооб'єкту в звичайному оптичному і електронному мікроскопах (Ілюстрація: JEOL Ltd).

У більшості моделей мікроскопів, орієнтованих на біологічні та медичні дослідження, прискорююча напруга може змінюватись у межах від 50 до 120 кВ. Анод електронних мікроскопів має вигляд пластини, виготовленої із спеціальної сталі з отвором у центрі, через який проходить пучок електронів, що використовується для формування зображення. Пройшовши крізь отвір анода, електрони потрапляють до конденсорної лінзи, котра їх збирає у тонкий потік і фокусує на досліджуваному об'єкті в камері зразків. У результаті взаємодії з об'єктом, частина електронів відхиляється, інша частина розсіюється або поглинається матеріалом об'єкта, ще частина проходить крізь об'єкт. Електрони, що пройшли крізь досліджуваний об'єкт, фокусуються об'єктивною лінзою, яка формує первинне збільшене зображення. Як і у світловому мікроскопі, об'єктивна лінза визначає основні показники об'єкту дослідження.

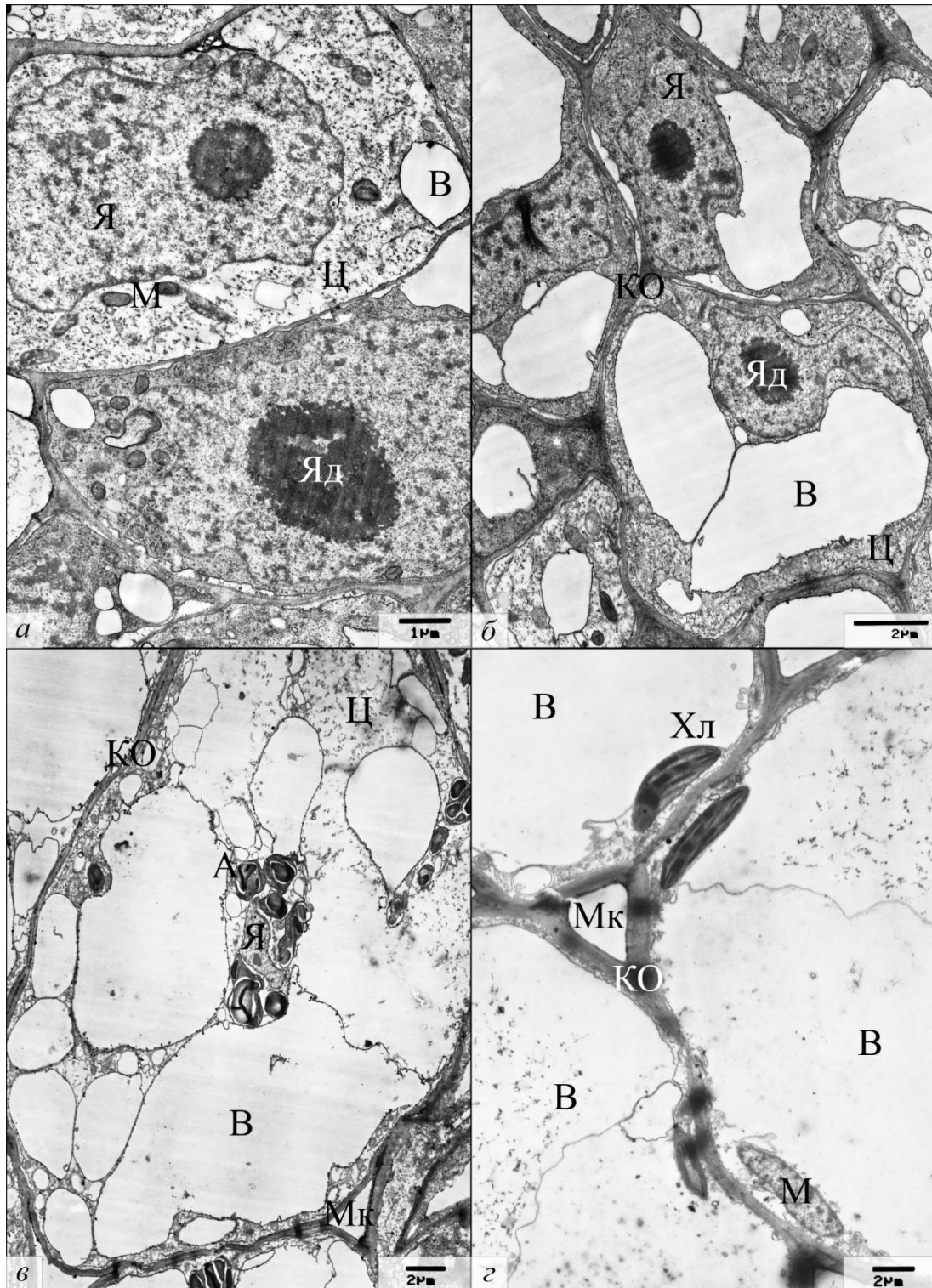


Рис. 4. Клітини міжвузля кукурудзи у трансмісійному електронному мікроскопі (на поперечних зрізах): *а* – клітини інтеркалярної меристеми; *б* – клітини із сегментів міжвузля над зоною інтеркалярної меристеми, які починають рости розтяганням; *в* – клітини, що активно ростуть у середніх сегментах міжвузля (зона розтягання); *г* – фрагменти паренхімних клітин зони диференціації. Умовні скорочення: Я – ядро, Яд – ядерце, Ц – цитоплазма, В – вакуоля, А – амілопласт, М – мітохондрія, Хл – хлоропласт, КО – клітинна оболонка, Мк – міжклітинник.

Первинне зображення збільшується проміжною та проекційною лінзами і потрапляє на проекційний екран – круглу алюмінієву пластину, вкриту сульфідом цинку (ZnS), який під дією електронів починає світитися. Таким чином, сформоване зображення сприймається зоровим апаратом людини. За необхідності люмінесцентний екран можна підіймати і проводити фотографування об'єкту як на плівку, так і за допомогою спеціальної цифрової фотокамери, приєднаної до комп'ютера. Джерело електронів, електромагнітні лінзи і система охолодження змонтовані у вигляді металевого циліндра, який зазвичай називають колоною мікроскопа. Слід зазначити, що всередині колони підтримується вакуум, або іншими словами, тиск у системі повинен бути порядку 10^{-4} Па. Для створення такого глибокого вакууму працюють два насоси: форвакуумний та масляний дифузійний. Деякі виробники замість дифузійного насосу укомплектовують свої прилади ефективнішим турбомолекулярним. У сучасних мікроскопах вакуумна система повністю автоматизована і в більшості випадків не потребує жодного втручання оператора.

Як вже зазначалось, однією з найбільш важливих характеристик будь-якого мікроскопа є його роздільна здатність. Вона вимірюється відстанню між двома точками, при якій вони зображуються як дискретні об'єкти. Теоретично роздільна здатність електронного мікроскопа за 50 кВ прискорюючої напруги повинна складати величину меншу, ніж один ангстрем. На практиці ж, внаслідок впливу сферичної аберації, котра виникає через неможливість ідеально точно виготовити вузли колони та завдяки впливу неоднорідності матеріалу магнітних лінз, вона складає від 0,2 до 0,5 нм. Майже максимальна роздільна здатність електронного мікроскопа реалізується при дослідженні металів та інших матеріалів з кристалічною структурою у високовартісних приладах.

У більшості приладів біологічного спрямування можна отримати пряме збільшення об'єктів до 600 тис. разів. Крім того, блок візуалізації колони мікроскопа обладнано оптичним біокулярним стереомікроскопом, котрий має десятикратне збільшення. Таким чином, кінцеве збільшення об'єкта може досягати 10^6 разів.

Максимальну роздільну здатність для біологічних об'єктів складно досягти через їхню низьку контрастність. На відміну від світлового мікроскопа, у якому зображення визначається ступенем непрозорості об'єкту і є результатом об'єднання таких його властивостей, як коефіцієнт поглинання і заломлення світла, у електронному мікроскопі значного поглинання електронів не відбувається. Натомість, відбувається помітне розсіювання електронів. Ступінь розсіювання електронів є функцією маси атомів. Таким чином, легші атоми

зразка будуть менше розсіювати електрони, порівняно з важкими атомами. Чим вища здатність розсіювати електрони окремих ділянок зразка, тим контрастнішими вони будуть на екрані мікроскопа. Саме у такий спосіб формується у мікроскопі зображення зразка. При цьому якість зображення буде визначатися саме його контрастом. У складі органічних речовин, а отже і у матеріалах біологічного походження, переважають атоми вуглецю, кисню, водню та азоту. Ці елементи мають низьку розсіюючу здатність. За щільністю, вони мало відрізняються від плівки підкладки і мають низький контраст. Мінімальна товщина для виявлення біологічного матеріалу з густиною близько 1 г/см^3 при вивченні в електронному мікроскопі за 50 кВ може складати 5 нм. Наприклад, віруси, розміщені на підтримуючій плівці, будуть мати вигляд безструктурних плям. Для підвищення контрасту біологічних об'єктів у електронному мікроскопі використовують обробку солями важких металів. Найбільш поширеними в практиці електронної мікроскопії контрастерами є солі свинцю, урану, осмію та марганцю, тобто металів з великою молекулярною масою, які дуже добре поглинають електрони.

2. Підготовка рослинних тканин для дослідження у трансмісійному електронному мікроскопі

Рослинні тканини складаються з атомів, що слабо поглинають електрони. Процес підготовки зразків до електронно-мікроскопічного дослідження включає в себе не лише фіксацію дією нижчих альдегідів, але і насичення зразків іонами важких металів для підвищення контрасту, отриманого у мікроскопі зображення. Потім проводять повільне зневоднення матеріалу шляхом послідовної зміни розчинів етилового чи метилового спиртів. Заключним етапом підготовки зразків є їх поступова інфільтрація компонентами полімерної смоли і формування твердих блоків.

Саме з таких блоків отримують ультратонкі зрізи (товщиною 40-60 нм), які можна досліджувати за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа. На блок-схемі (рис. 5) подано повну класичну методику підготовки зразків згідно роботи Ж.-П. Карде (1987) з незначними модифікаціями. Нижче наведено експрес-метод, процедури якого розраховані на два робочі дні до моменту перенесення зразків у середовищі смоли до термостату, де відбуватиметься її полімеризація.

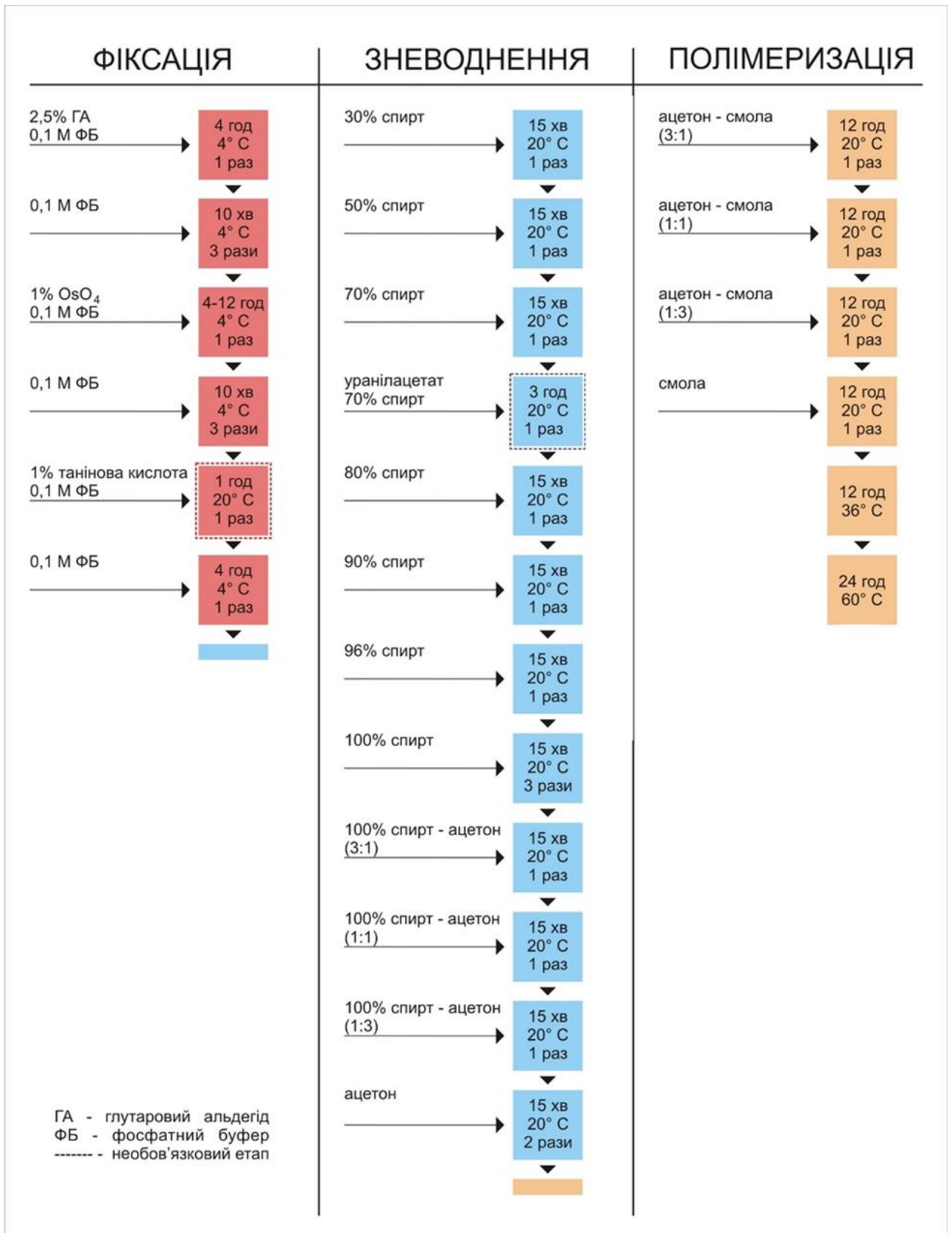


Рис. 5. Блок-схема, що зображує послідовність етапів фіксації, зневоднення та інфільтрації зразків рослинного матеріалу полімерною смолою з подальшою її полімеризацією (повний методичний цикл).

2.1. Фіксація

Дослідження структурної і функціональної організації біологічних об'єктів у більшості випадків проводять на спеціально підготовленому матеріалі. У цитології існують два основних способи вивчення клітини – дослідження живих клітин в організмі, або живих клітин, виведених з організму (прижиттєве, або вітальне дослідження) та вивчення неживих клітин, фіксованих спеціальними речовинами-фіксаторами. Одноклітинні організми, наприклад бактерії, можна вивчати, як прижиттєво, так і фіксованими.

Незважаючи на важливість і відносну простоту вітальних спостережень, більшу частину інформації про структуру та властивості клітини отримано саме з фіксованого матеріалу. Методи електронної мікроскопії також базуються майже виключно на фіксованому матеріалі. Прижиттєво можна спостерігати лише деякі типи клітин у сканувальному електронному мікроскопі, використовуючи спеціальні капсули (технологія Wet SEM), в які вносять досліджуваний матеріал.

Якщо клітину пошкодити, у ній стається ряд змін. Так само коли вона гине, відбуваються автолітичні процеси, які в кінцевому рахунку приводять до грубих структурних перетворень. Фіксацію застосовують, щоб дуже швидко припинити фізіолого-біохімічні процеси в клітині, простіше говорячи, дуже швидко її вбити, запобігаючи розпаду і втраті клітинних компонентів, забезпечуючи збереження структури клітини такою, яка б не відрізнялася від прижиттєвого стану. Деякі методи фіксації дозволяють, крім структурної організації, в значній мірі зберегти і хімічний склад клітини. На жаль, ще не знайдено такого фіксатора, який би задовольняв всі вимоги дослідників. Враховуючи надзвичайну лабільність і чутливість біологічних об'єктів до різних факторів, можна зрозуміти настільки складним і трудомістким завдання пошуку ідеальних фіксаторів. Жоден із нині відомих способів фіксації не є універсальним.

За способом дії на біологічні об'єкти, хімічні фіксатори можна розділити на дві групи. До першої відносять фіксуючі речовини, які осаджують білки (спричиняють їх коагуляцію). Це спирти, ацетон, оцтова та пікринова кислоти, солі важких металів. Такі фіксатори широко використовуються у світловій мікроскопії. До другої групи належать речовини зі стабілізуючими властивостями. Ці речовини здатні не осаджувати, а стабілізувати желеподібну структуру клітин, що дозволяє їх використовувати у електронно-мікроскопічних дослідженнях. Перш за все це альдегіди – мурашиний та глутаровий, чотириокис осмію, перманганат калію, біхромат калію. Альдегіди взаємодіючи з білками,

зшивають їх за допомогою метиленових містків. Також вони зв'язуються з пуриновими та піридиновими основами нуклеїнових кислот, стабілізуючи їх структуру. Як допоміжний фіксатор (постфіксатор) при підготовці матеріалу до електронномікроскопічних досліджень широко використовують чотириокис осмію. Поряд із здатністю добре зберігати різноманітні клітинні структури, іони осмію суттєво поліпшують контрастність біологічного матеріалу. Широкому використанню чотириокису осмію у практиці електронної мікроскопії, сприяла класична робота Паладе (1952), у якій він запропонував використовувати 1%-ний розчин чотириокису осмію (OsO_4), приготований на буфері. Завдяки використанню цього реактиву, вдавалося отримувати зображення недосяжної раніше якості. У наш час існують численні модифікації фіксатора Паладе, зокрема, модифікація Міллоніга (1962), де використовується розчин чотириокису осмію на фосфатному буфері із фізіологічним рівнем рН тканин. Лавн (1960) запропонував фіксатор на основі перманганату калію (KMnO_4), котрий дуже добре поліпшує контрастність і чудово виявляє мембранні структури цитоплазми. Як результат досліджень з оптимізації методів фіксації, Сабатіні (1963) запропонував подвійний спосіб фіксації, що полягає в застосуванні спочатку фіксаторів на основі альдегідів (глутаральдегід, формальдегід, акролеїн), а потім чотириокису осмію. Таким чином, для максимального збереження прижиттєвого стану структурних компонентів зразки спочатку витримують у альдегідному фіксаторі, а потім змінюють розчин альдегіду на розчин чотириокису осмію на буфері для підвищення контрасту досліджуваних зразків.

Дія чотириокису осмію та альдегідів переважно проявляється у формуванні поперечних зв'язків між молекулами білків, в результаті чого в тканині виникає своєрідна молекулярна сітка. Завдяки цій структурі відбувається стабілізація компонентів протопласту. Крім того, така сітка гальмує вихід низькомолекулярних речовин із клітини у фіксуючий розчин. Під дією фіксатора безумовно відбуваються й інші реакції, як, наприклад, взаємодія молекул фіксатора з небілковими компонентами клітин та клітинних стінок.

При фіксації глутаровим альдегідом структура цитоплазми зберігається значно краще, ніж при фіксації одним лише чотириокисом осмію. За здатністю стабілізувати клітинні структури глутаральдегід найкращий серед інших альдегідів, тому широко використовується у електронній мікроскопії. У водних розчинах глутаральдегід існує у формі мономерів, димерів і складніших полімерів. Крім того, розчин глутаральдегіду містить певну кількість ненасичених альдегідів, які утворюються в результаті альдольної конденсації. У

фіксації клітин може брати участь кожна з цих молекулярних фракцій, що, можливо, і пояснює високу зв'язуючу активність цього альдегіду в якості фіксатора.

В процесі фіксації біологічного матеріалу фіксуючі агенти проникають у зразки шляхом дифузії. Тому клітини поверхневих шарів фіксуються швидше порівняно з клітинами, розташованими глибше. Через це в кожному взятому для фіксації зразку тканини існує своєрідний градієнт фіксації, котрий визначається проникністю тканин для даного фіксатора і ступенем його поступового розведення вмістом клітин. Швидкість проникнення фіксатора визначається не стільки коефіцієнтом дифузії, скільки пропускнуою здатністю бар'єра із денатурованих білків, які утворюються на периферії зразка внаслідок дії фіксатора. Особливо низькою проникністю характеризуються структури, зв'язані іонами осмію. На вказані особливості фіксаторів слід зважати при розрахунку часу, протягом якого зразки будуть перебувати у фіксаторі.

При роботі із рослинним матеріалом часто виникає потреба його повної інфільтрації розчином фіксатора. Тканини із значним рівнем розвитку міжклітинників (основна та асиміляційна паренхіма, запасуючі тканини) містять велику кількість повітря, тому зразки не тонуть у розчині фіксатора. Відповідно не відбувається швидка та однорідна їх фіксація. Інфільтрація таких зразків дозволяє замінити газове середовище міжклітинників розчином, оптимізуючи процес фіксації. Процедуру інфільтрації проводять у спеціальній вакуумній шафі, або, за її відсутності, в скляному ексикаторі, приєднаному до вакуумного насосу.

Процес фіксації і наступні процедури підготовки зразків до електронно-мікроскопічного дослідження слід проводити в одному і тому ж посуді (пробірки, бюкси невеликого об'єму, поліпропіленові епіндорфи на спеціальних підставках). Це обумовлено тим, що при перенесенні матеріалу його можна легко пошкодити, або навіть втратити частину зразків.

Поряд із дослідженням субмікроскопічної організації метод електронної мікроскопії широко використовується у гістохімії. Гістохімічну обробку зразків проводять переважно після їх фіксації альдегідами. Для проведення імунологічних реакцій на ультратонких зрізах потрібно використовувати гідрофільне середовище для заливання тканини. Тобто, якщо планується проведення імунологічного дослідження, зразки слід заливати у водорозчинні полімерні смоли. Найбільш поширеним зараз є різновид акрилових смол «LR White». У даних методичних рекомендаціях спосіб приготування та полімеризації цього середовища ми не подаємо, оскільки робота з ним вимагає

великого досвіду та професіоналізму, якого звичайно бракує початківцям. Найвдалішими виявились ті гістохімічні реакції, де використовують солі тяжких металів. Їхню локалізацію у клітинах легко виявити, проводячи електронно-мікроскопічний аналіз досліджуваних зразків, що дозволяє говорити не лише про розташування конкретних компонентів, чи органел клітини, а до певної міри про метаболічну активність цих компонентів. Гістохімічні методи дозволяють виявляти кислі та лужні фосфатази, дегідрогенази, ацетилхолінестерази. Певні труднощі пов'язані з проведенням імунологічної реакції викликає вивчення субмікроскопічної локалізації нуклеїнових кислот і структурних білків, які не мають ферментативної активності.

2.2. Зневоднення зразків

Подібно до того, як і при приготуванні зрізів для світлооптичної мікроскопії, для електронно-мікроскопічного дослідження матеріал потрібно зневоднити перед тим, як помістити у тверде середовище. Спосіб обробки зразків залежить від того, у яке середовище вони будуть поміщені. Для приготування ультратонких зрізів частіше всього в якості матеріалу для заливання використовують різні епоксидні смоли, або їхні суміші, які добре змішуються з більшістю органічних розчинників, однак зовсім не змішуються з водою. Тому наступним етапом після фіксації є зневоднення зразків і переведення їх у середовище органічного розчинника.

Перед початком зневоднення зразків їх треба відмити від фіксуючої рідини. Це необхідно зробити для припинення дії фіксатора на тканини, а також щоб уникнути впливу фіксатора на процеси полімеризації смол в майбутньому. Відмивання зразків проводять, як правило, буфером, на якому готували фіксатор, або, в деяких випадках, дистильованою водою. Для цього відбирають піпеткою розчин фіксатора з пробірки чи бюкса із зразками і заливають буфером на десять хвилин. Процедуру повторюють 2-3 рази.

Для зневоднення зразків переважно використовують етиловий спирт. Можна використовувати також метиловий спирт, проте використання метанолу є доволі небезпечним. Із 96° етанолу готують батарею розведень зростаючої концентрації. Для зневоднення рослинного матеріалу оптимальною є використання розчинів спирту наступної послідовності концентрацій: 30°→50°→70°→80°→90°→96°→100°. Після абсолютного спирту зразки заливають сумішшю абсолютного спирту (спосіб приготування див. додаток) та

ацетону, потім чистим ацетоном. Далі – суміш ацетону із смолами і власне смола (рис. 5). Іноді, для гарантованого видалення води із зразків, використовують їх обробку після спирту пропіленоксидом (1,2-епокси пропаном). Час витримання зразків у розчинах кожної концентрації залежить в першу чергу від природи зразка і його розміру. В середньому час перебування матеріалу в кожному розчині складає від 15 до 30 хвилин. Основні вимоги зневоднення такі: час перебування в спиртах має бути мінімально необхідним, процес повинен відбуватися поступово, у зразках не повинно залишатися вологи. Слід зауважити, що спирт здатний вимивати із зразків різні речовини, саме тому його дію намагаються мінімалізувати. При різкій зміні концентрації розчинів спиртів, об'єм досліджуваного матеріалу може також різко змінитися, що, у свою чергу, спричинює появу різних артефактів при електронно-мікроскопічному дослідженні. Також слід пам'ятати, що існуючі процедури зневоднення матеріалу не є універсальними і тому повинні змінюватися в залежності від об'єкту дослідження і способу фіксації. Як правило дослідник, спираючись на вже існуючі методи, сам обирає оптимальні умови препаративної підготовки матеріалу.

2.3. Заливання зразків у полімерні смоли

Наступний етап підготовки зразків до електронно-мікроскопічного дослідження полягає у їх просочуванні речовинами, що використовуються для виготовлення полімерних блоків, тобто компонентами заливочної суміші. Ці речовини мають досить низьку в'язкість і здатні легко проникати у фіксований матеріал, повністю змішуючись із спиртами чи ацетоном, які є зневоднюючими агентами. Після полімеризації блоки із зануреними в них зразками можуть тривалий час зберігатись, не змінюючи свій об'єм і властивостей. Середовище, у якому знаходяться зразки для електронної мікроскопії, повинно слабо розсіювати електрони і водночас бути стійким до опромінення потоком електронів у колоні мікроскопа. Досить широкого застосування у якості середовища для заливання набули метакрилати. Головним чином використовуються ефіри метакрилової кислоти: н-бутилметакрилат та н-метилметакрилат. Ці речовини легко проникають у тканини після їх обезводнення спиртом. Як каталізатор процесу полімеризації використовують бензоїлпероксид. Зшивання мономерів у полімерну структуру відбувається за підвищеної температури (40-60°C). При полімеризації н-бутилметакрилат дає

м'які блоки, а н-метилметакрилат формує тверді блоки. Тому, змішуючи ці два компоненти у відповідних співвідношеннях, можна підібрати таку суміш, блоки із якої після полімеризації матимуть оптимальну твердість і пластичність. Слід зазначити, що через свою токсичність зараз метакрилати використовують досить рідко.

Іншим середовищем для заливання, що вже довгий час широко застосовується при підготовці зразків до електронно-мікроскопічних досліджень, є епоксидні смоли. В першу чергу використовують поліакрилові ефіри гліцерину з епоксидними групами. Епоксидні смоли мають вищу густину, порівняно з метилакрилатами. Тому інфільтрація зразків рослинних тканин відбувається трохи довше. Проте внаслідок виробничих переваг та відносно безпечності, саме епоксидні смоли зараз є найбільш доступним середовищем для підготовки рослинних та тваринних тканин до дослідження в електронному мікроскопі. При приготуванні середовища для заливання зразків використовують кілька компонентів у різних співвідношеннях, що дозволяє отримувати блоки потрібної щільності після процесу полімеризації. Найбільшого поширення набули суміші епоксидних смол на основі епону та аралдиту, як основних компонентів. Ці компоненти використовують також і окремо. Так для приготування середовища на основі аралдиту 502 Фінком (1960) було запропоноване таке співвідношення:

- аралдит 502 (araldite 502) – 10 мл;
- ущільнювач DDSA (dodecenylsuccinic anhydride, додецил бурштиновий ангідрид) – 10 мл;
- каталізатор процесу BDMA (benzyl dimethylamine, бензилдіетиламін) – 0,2 мл.

Полімеризація блоків відбувається протягом 18 годин при температурі 40°C.

На основі епоксидної смоли епон 812 також готують суміш для заливання.

Луфт (1961) запропонував такий склад:

- епон 812 (epon 812) – 10 мл;
- ущільнювач DDSA (додецил бурштиновий ангідрид) – 13,5 мл;
- каталізатор процесу DMP 30 (dimethylaminomethyl phenol, диметиламінометил фенол) – 0,2 мл.

Формування блоків відбувається у спеціальних силіконових формах, які часто називають молдами. Форми можуть мати різну кількість чарунок і добре витримують нагрівання до 70-80°C, не змінюючи свого об'єму (рис. 6). Досліджуваний матеріал розміщують ближче до вузького краю чарунки, орієнтуючи його у потрібному напрямку.

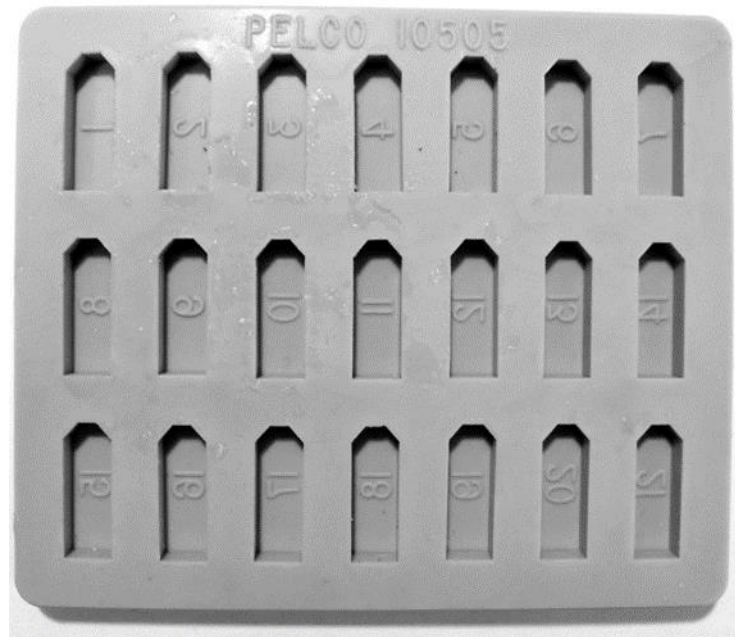


Рис. 6. Силіконова форма для заливання біологічних зразків у полімерну смолу.

Ще одним зручним середовищем для заливання зразків рослинних тканин є суміш Шпура «Spurr Kit». Це чотирьохкомпонентна полімерна смола, яка характеризується трохи нижчою густиною, порівняно з епоксидними смолами. Завдяки простоті приготування і добрій розчинності у ацетоні, а також надійності полімеризації доволі широко використовується у практиці електронної мікроскопії. Процедури використання суміш Шпура практично не відрізняються від протоколів де середовищем для заливання є суміш епону і аралдиту.

2.4. Типова методика фіксації, зневоднення і заливання рослинного матеріалу в епоксидну смолу (експрес-метод)

1. Відібрані зразки фіксують глутаровим альдегідом. Вихідний розчин глутарового альдегіду 25% (заводської фасовки), нам потрібний розчин з концентрацією від 2% до 3%. Для приготування розчину потрібної концентрації, розводимо вихідний розчин фосфатним, чи кокодилатним буфером, що має рН 7,2, якщо працюємо з тканинами кореня та рН 7,3-7,4 – з тканинами листка. Найчастіше необхідно незначний об'єм розчину фіксатору. Так, для приготування 3%-го розчину беруть 11 мл буферу і додають 1,5 мл 25%-го розчину глутарового альдегіду.

2. Нарізають матеріал шматочками шириною 1 мм і довжиною 2-3 мм і поміщають його в пробірки, бюкси або епіндорфи об'ємом 2-3 мл з фіксуючою рідиною. Ємності повинні бути пронумерованими. Важливо зважати на співвідношення об'ємів матеріалу до об'єму фіксуючої рідини. Об'єм фіксованого матеріалу не повинен бути більшим, ніж 1/10 об'єму розчину фіксатора на буфері.

3. За допомогою масляного вакуумного насосу, приєднаного до герметичної шафи, або скляного ексикатора звільняють рослинні тканини від повітря. Пробірки з матеріалом повинні знаходитись в ексикаторі до повного видалення повітря – шматочки повинні опуститися на дно. Лише матеріал, який потонув, беруть для подальших процедур. Незалежно від швидкості осідання шматочків на дно пробірок, для повної фіксації загальний час проведення цієї процедури не повинен бути меншим чотирьох годин. Інфільтрацію фіксуючим розчином у ексикаторі бажано проводити в прохолодному приміщенні. Після того, як більшість шматочків потоне, пробірки з матеріалом переносять до холодильника. Оптимальною температурою фіксації, за якої найкраще зберігається нативна структура мембран рослинних клітин, є 4°C.

4. Після інфільтрації відбирають піпеткою буферний розчин з альдегідом, промивають протягом 30-ти хвилин буферним розчином і вносять до пробірок 1%-ний розчин чотириокису осмію на буфері, після чого залишають їх на 4 години за температури 4°C.

5. Відбирають піпеткою розчин чотириокису осмію.

6. Промивають шматочки тканини в пробірках буферним розчином протягом 12 год за температури 4°C (потягом ночі у холодильнику).

7. Готують епоксидну смолу для заливання з таким складом:

- а) Епон 812 – 12 мл (смола),
- б) DDSA – 12 мл (ущільнювач),
- в) Araldit M – 9 мл (смола),
- г) MNA (methyl nadic anhydride) – 8мл (затверджувач),
- д) DMP 30 – 10 крапель (каталізатор процесу).

Компоненти суміші ретельно перемішують протягом 5-7 хвилин.

8. Заливають матеріал 30°-ним розчином спирту: додають по 1,5 – 2мл і зливають, потім знову заливають на 15 хвилин .

9. Відібравши піпеткою 30°-ний розчин спирту, заливають шматочки матеріалу 50°-ним розчином на 15 хвилин.

10. Повторюють процедуру з 70°, 80°, 96°-ними розчинами спирту.

11. Заливають зразки на 15 хвилин абсолютним спиртом.

12. Наступний етап – заливають зразки сумішшю абсолютного спирту з ацетоном в пропорції 1:1.

13. Два рази заливають зневодненим ацетоном на 10 хвилин кожного разу.

14. Змішують 2 мл смоли та 4 мл ацетону і розливають цю суміш до пробірок зі шматочками матеріалу, приблизно на одну годину. За певний час шматочки повинні опускатись на дно (час утримання у розчинах смоли в ацетоні різного співвідношення можна збільшувати до 1,5 год, залежно від об'єкту дослідження).

15. Заливають сумішшю: 3 мл смоли – 3 мл ацетону, на одну годину.

16. Відібравши піпеткою попередню суміш, заливають розчиненими 4-ма мл смоли в 2-х мл ацетону і залишають на одну годину.

17. Заливають чистою смолою. Дану процедуру проводять вже в силіконових планшетах, спочатку наповнюють смолою лунки планшету, а потім, накладають шматочки матеріалу на поверхню смоли, зорієнтувавши їх, залежно від потреби, паралельно, чи перпендикулярно осі майбутнього блоку. За допомогою препарувальної голки або зубочистки занурюють шматочки у смолу.

Переносять залиті у блоки шматочки матеріалу до термостату, де проходить полімеризація епоксидної смоли. Оптимальна температура полімеризації 50-60° С. Для кращого проникання смоли всередину тканин можна потримати зразки протягом доби за температури 37-40° С. Слід пам'ятати, що у більшості випадків для нарізання зрізів на ультрамікромомі не потрібні блоки високої твердості. На твердість блоків, крім співвідношення компонентів DDSA і MNA, суттєво впливає тривалість перебування блоків в термостаті за підвищеної температури (60° С).

Процес фіксації і полімеризації блоків зручно проводити протягом двох робочих днів. Тобто, в перший день витримують досліджуваний матеріал у глутаровому альдегіді і чотириокису осмію і залишають шматочки тканини на ніч в холодильнику у середовищі буферного розчину. Наступного дня проводять зневоднення, інфільтрацію смолою та залишають блоки у термостаті.

3. Підготовка фіксованого матеріалу для дослідження ультраструктури

3.1. Підготовка блоків

Після повного затвердіння блоків у термостаті та їх охолодження до кімнатної температури, можна почати підготовку епоксидних блоків до нарізання ультратонких зрізів. Процес підготовки полягає у так званому заточуванні полімерного блоку – наданні верхній частині блоку форми піраміди з похилими гранями, з вершини якої будуть отримані зрізи (рис. 7).

Заточування блоків проводять, як правило, за допомогою леза, інколи використовують абразивні матеріали, що зручно при видаленні шару смоли над розташуванням зразка (рис 7, 1). Для заточування полімерний блок потрібно міцно закріпити у спеціальному тримачу-підставці, яка є у комплекті інструментів до ультрамікротому. Грубе заточування можна проводити без застосування збільшувальних приладів, а наступні етапи формування пірамідки проводять під бінокулярним стереомікроскопом, або безпосередньо під бінокулярним ультрамікротома. Верхню частину блока поступово зрізують до місця залягання матеріалу (рис 7, 2), що має буре або чорне забарвлення набуте при фіксації глутаром та осмієм. В процесі формують фігуру подібну до піраміди, на вершині якої буде знаходитися трапеція, що є площиною нарізання, з якої буде отримано ультратонкі зрізи (рис. 7, 3). Формування піраміди з похилими бічними гранями дає можливість уникнути виникнення вібрації при проходженні ножа крізь матеріал блока (рис. 7, 4). Розмір площини нарізання може бути різним, але як показує практика, високоякісні зрізи отримуються з площини нарізання розміром менше 0,5 мм.

Якщо досліджуваний матеріал неоднорідний, або має особливо складну структуру, то іноді бажано для точної локалізації досліджуваної ділянки з блоків отримати спочатку напівтонкі зрізи для світлової мікроскопії. Так як технологія отримання напівтонких зрізів дещо відрізняється, то особливості підготовки блоків для їх отримання будуть розглянуті у розділі 3.6.

3.2. Приготування ультратонких зрізів

Після заточування блоки готові до нарізання на ультрамікротомі (рис. 8). Докладна інструкція з користування ультрамікротомом надається виробником конкретної моделі цього лабораторного інструменту, ми ж хочемо лише описати

загальні принципи та послідовність роботи. Працювати за ультрамікроскопом потрібно без рукавиць, попередньо вимивши руки милом. Потрібно позбутися пилу на столі та приладі, протерти спиртовим розчином всі рухомі й несучі частини приладу, робочі інструменти, щоб запобігти забрудненню ультратонких зрізів частинками пилу і жиром.

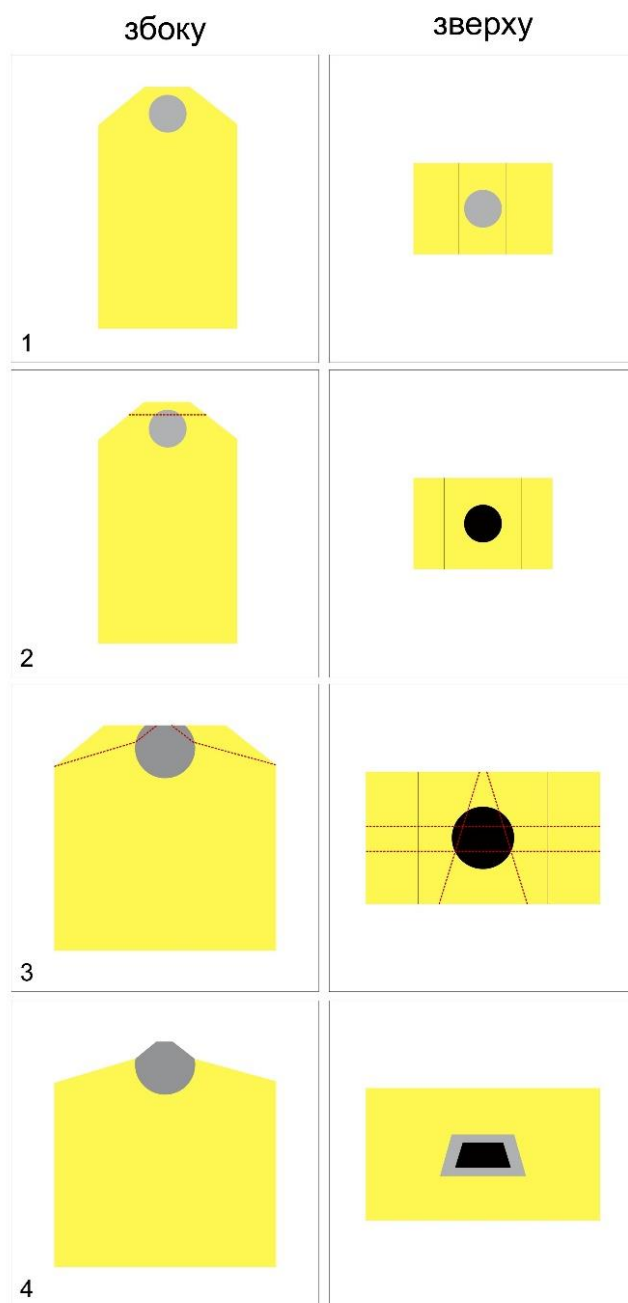


Рис. 7. Підготовка полімерного блоку до ультрамікроскопії. 1 – форма полімерного блоку зі зразком до заточування; 2 – відсікання верхньої частини блоку, що включає видалення верхівки зразка; 3 – формування пірамідки з похилими гранями, на верхівці якої знаходиться площа нарізання у формі трапеції; 4 – готовий до роботи блок.

Блоки із матеріалом та ніж повинні бути добре закріплені. Кут вертикального нахилу ножа повинен бути в межах 1 – 7°. Як правило, це 4° для скляного ножа, а кут нахилу діамантового ножа вказується виробником на упаковці. Ванночку ножа заповнюють дистильованою водою, або інколи 10%-ним р-ном ацетону для кращого розправлення зрізів на поверхні. Ванночка заповнюється з гіркою (випуклий меніск), після чого відсмоктується надлишок рідини, до тих пір поки на поверхні біля леза ножа не з'явиться відблиск від лампи освітлення.



Рис. 8. Головний та керуючий блоки ультрамікротому Reichert Ultracut (Фото: <http://www.microscopy.ou.edu>).

Процес заповнення ванночки контролюється під бінокляром ультрамікротому. Для наповнення та відбору рідини зручно користуватися шприцом об'ємом 2 мл із зігнутою голкою. Блок орієнтують так, щоб довга основа трапеції знаходилася знизу і була паралельною лезу ножа, при цьому потрібно користуватися передбаченими гвинтовими ручками на тримачі блоку та тримачі ножа. Ніж треба розмістити так, щоб трапеція знаходилася в середній частині леза. При псуванні леза в цій ділянці під час нарізання ніж переміщують у напрямку, куди підходить хвиля розлому – в ділянку, де ніж є найгострішим. Важливе значення для якості зрізів має швидкість переміщення блоку відносно ножа, як правило вона повинна бути повільною, а рух повинен бути плавним. Нарізання можна робити в ручному режимі обертаючи барабан, або ж у автоматичному, коли задаються параметри позиціонування та швидкість руху блоку відносно леза ножа. Під час підведення ножа до блоку і під час так званої прирізки блоку (нарізання блоку до тих пір, поки зрізи на поверхні рідини за

формою не будуть відповідати трапеції на вершині блоку) користуються ручним режимом нарізання та підведення ножа. Інколи після початку нарізання краплини рідини з ванночки можуть потрапляти на поверхню нарізання блоку. Тоді, їх вимочують щільним фільтрувальним папером. Всі невдалі зрізи прибираються з поверхні рідини за допомогою волосини. Якщо зрізи тонкі, то достатньо доторкнутися до їх поверхні кінчиком волосини – зрізи до неї прилипнуть. З волосини їх можна прибрати фільтрувальним папером або доторкнувшись до зовнішньої поверхні ванночки.

Надзвичайно важливим для процесу нарізання є отримання серійних зрізів, коли вони послідовно збираються у вигляді стрічки, яка подовжується із кожним робочим ходом механізму мікротома (рис. 9).

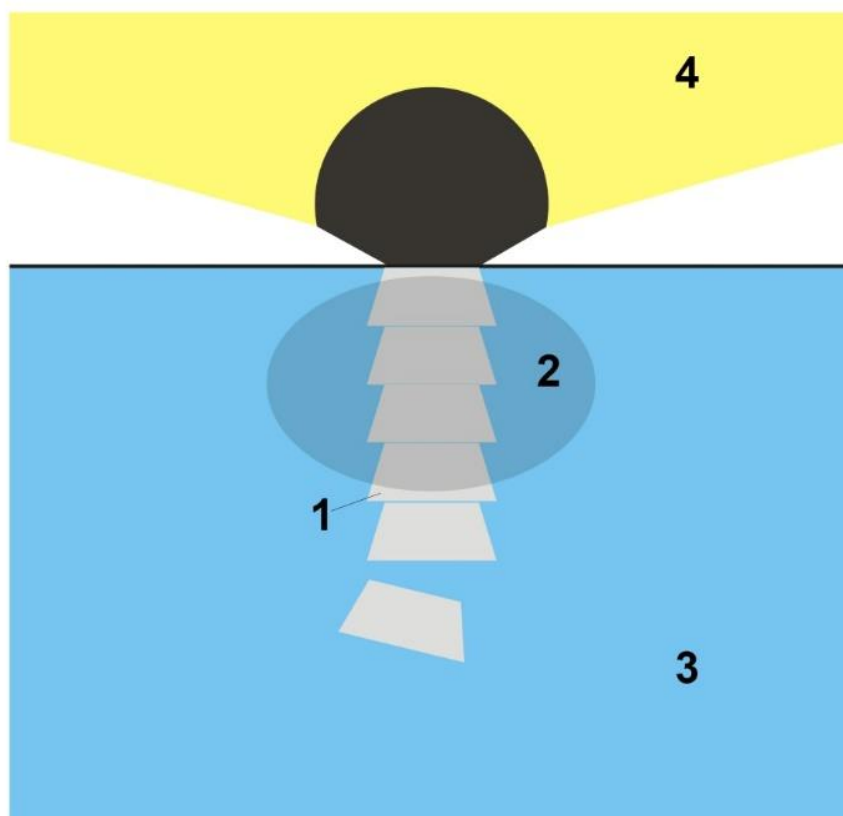


Рис. 9. Стрічка серійних зрізів на поверхні води у ванночці скляного ножа: 1 – сформована стрічка; 2 – віддзеркалення, спричинюване лампою дифузійного розсіювання ультрамікротома; 3 – поверхня води; 4 – заточений пірамідкою блок із біологічним матеріалом.

Дослідження клітин на 5–10-ти послідовних зрізах серії дозволяє робити висновки про об'ємну форму органел, яка часто відрізняється від тої, що ми спостерігаємо на одиничному зрізі. Є декілька факторів, що впливають на

формування стрічки зрізів. По-перше, довга вісь трапеції на верхівці блоку, з якої починається нарізання, повинна бути паралельною до леза ножа. Це запобігає відштовхуванню попередньо отриманого зрізу при наступному обертанні барабану. По-друге, довгу вісь трапеції при формуванні пірамідки потрібно формувати одним рухом гострої ділянки леза бритви. Рівна та гладка без подряпин поверхня посилює адгезію між зрізами у стрічці.

Інколи, внаслідок не зовсім вдалого співвідношення компонентів смол, чи певних вад ножа, на зрізах можуть утворюватися складки. Цей недолік можна частково усунути. Для цього необхідно шматок фільтрувального паперу змочити у хлороформі або ксилолі і потримати над зрізами на поверхні води. Зрізи при цьому розправляються. Також для усунення складок ванночку ножа можна наповнювати 10%-ним водним розчином ацетону замість дистильованої води.

3.3. Визначення товщини та якості ультратонких зрізів

Якість зразків як результат всіх методичних процедур з підготовки матеріалу при наявності певного досвіду можна з легкістю визначити протягом сеансу за електронним мікроскопом, про що буде йти мова пізніше (Розділ 4). Однак добре, коли контроль якості зрізів проводиться безпосередньо під час їх приготування. Зрізи низької якості видаляються, а задовільні зрізи переносяться на бленди, саме їх ультраструктуру досліджують. Яким же чином визначити якість зрізів?

У більшості сучасних моделей електронних мікроскопів, зображення хорошої якості можна отримати із зрізів товщиною 40 – 100 нм. Існує ряд методів визначення товщини зрізів під час їх приготування за допомогою ультрамікротому. У сучасних моделях ультрамікротомів передбачена система регуляції товщини отримуваних зрізів з відповідним стрілковим, або цифровим індикатором. Однак на практиці ці дані говорять про відстань, на яку переміщується вісь з тримачем блоку під час кожного обертання барабану. Ці значення не враховують властивостей полімерного блоку та флуктуацій температури у приміщенні. Дійсна товщина зрізів може відрізнятись від встановленої на приладі на більше ніж 15 нм. На практиці товщину зрізів визначають за їх забарвленням у ванночці скляного ножа (рис. 10). Наводимо залежність між кольором зрізів у ванночці скляного чи алмазного ножа та їхньою товщиною (рис. 11).

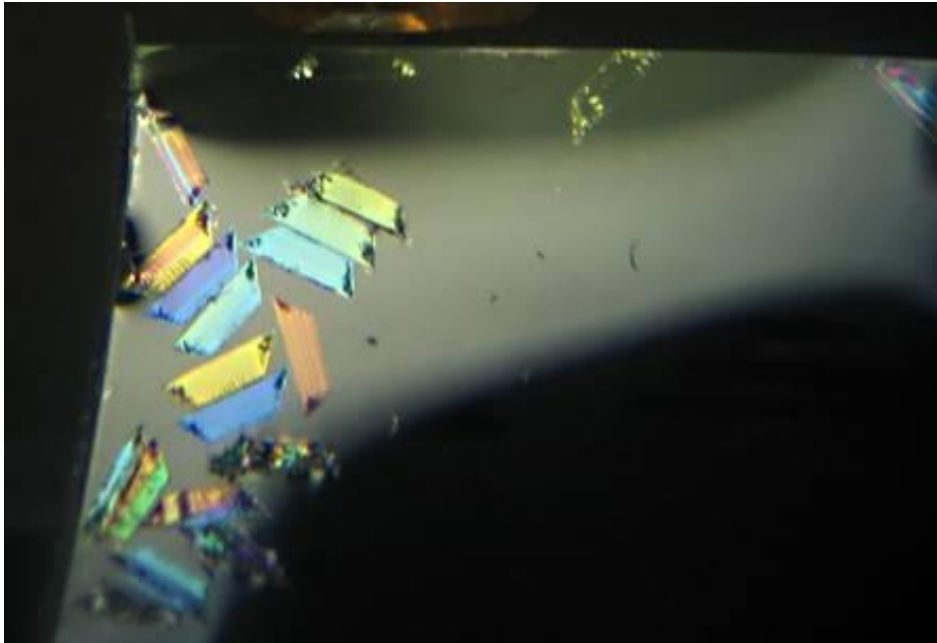


Рис. 10. Зрізи різної товщини , що відрізняються за кольором на поверхні рідини у ванночці скляного ножа (Фото: <http://www.microscopy.ou.edu>).

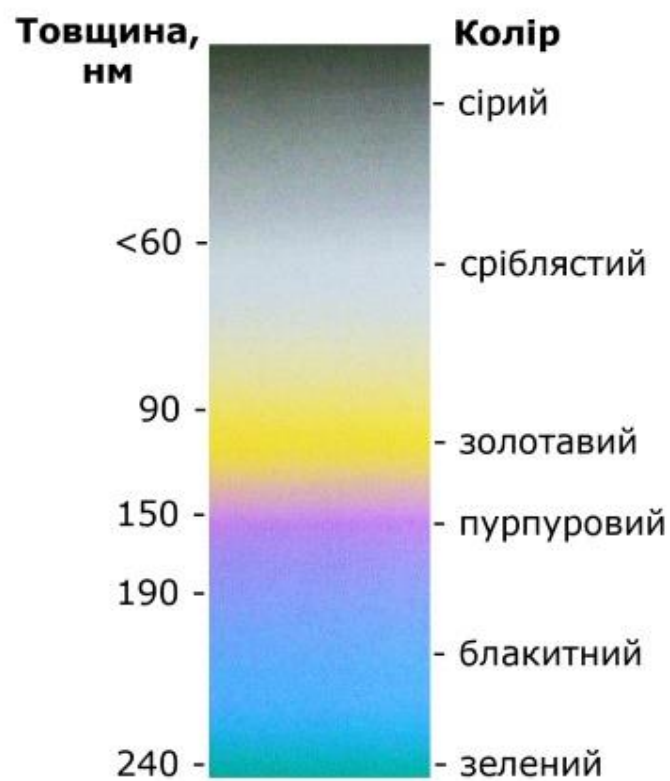
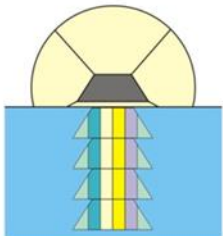
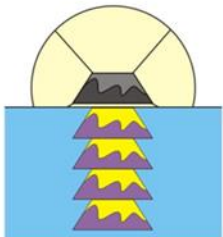
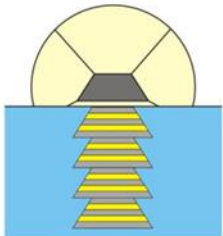


Рис. 11. Товщина зрізів та колір ультратонких зрізів при $n=1,5$ (показник заломлення), характерним для більшості епоксидних смол.

Як правило, на бленди відбирають зрізи сріблястого або злегка жовтого кольору, якщо потрібно проводити зйомку на збільшенні до 20 тис. Для отримання якісних зображень на більших збільшеннях відбирають зрізи світло-сірого кольору. Зрізи повинні бути однорідні за кольором. Часто виникають ситуації, коли зрізи мають повздовжні, хвилясті чи поперечні смуги, що відрізняються за кольором. Нижче наведено можливі проблеми, які призводять до появи різнобарвних зрізів, що отримуються протягом нарізання, та можливі шляхи їх вирішення (табл. 1).

Таблиця 1. Дефекти ультратонких зрізів, що виникають в процесі роботи, та шляхи їх усунення

<p>1</p> 	<p>Смуги різного кольору, перпендикулярні до ріжучої поверхні ножа. Причина: ріжуча поверхня ножа, на якій відбувається нарізання, є нерівномірно гострою. Потрібно змстити ніж і розпочати нарізання знову.</p>
<p>2</p> 	<p>Довільна форма ділянок різного забарвлення зразка. Причина: щільність зразка та полімерної смоли відрізняються, або щільність зразка відрізняється в різних його ділянках. Потрібно переточити блок на ділянку зразка, гомогенну за щільністю.</p>
<p>3</p> 	<p>Смуги різного кольору, паралельні до ріжучої поверхні ножа. Причина: вібрації полімерного блоку під час нарізання. Потрібно: перевірити фіксацію полімерного блоку у тримачі блоків та ножа в тримачі для ножа; зменшити швидкість нарізання; зменшити розміри площини нарізання блоку.</p>

3.4. Перенесення зрізів на предметні сіточки і бленди

Всі операції з перенесення зрізів з поверхні рідини на сіточки чи бленди проводяться під бінокляром ультрамікротома. Стрічку чи групу зрізів за допомогою волоска закріпленого на кінчику дерев'яної, чи пластикової палички

переміщують від леза скляного ножа на середину ванночки. В такий спосіб можна розмістити зрізи в певному порядку або відібрати лише певну частину з них, наприклад, за товщиною. Якщо ви працюєте з новими ще недослідженими зразками матеріалу, то краще відбирати зрізи різної товщини від світло-сріблястого до золотавого і на першому сеансі за електронним мікроскопом визначити, яка товщина зрізу є оптимальною для дослідження. Перенесення зрізів на бленди чи сіточки можна здійснити двома шляхами – підхопленням зрізів з поверхні води безпосередньо сіточкою/блендою або з використанням спеціалізованої петлі. Перший з них є достатньо простим, але не дозволяє повністю уникнути деформації зрізів в процесі їх перенесення, другий – потребує певних навиків, але є практично «нетравматичним» для зрізів.

Для перенесення зрізів безпосередньо на сіточки спеціальними пінцетом з тонким загостреними кінцями беруть сіточку так, щоб формварова плівка-підкладка (приготування, див додаток VI, VII) була знизу і підносять до вибраної групи зрізів. Важливо, щоб поверхня плівки була паралельною до поверхні рідини у місці розташування зрізів, що запобігає утворенню великої кількості складок на зрізах. Швидким і, водночас, обережним рухом сіточку притуляють до поверхні рідини зі зрізами, що липнуть на формварову плівку та за 1 – 2 с піднімають з поверхні рідини. Цей рух повинен бути плавним. Спочатку від поверхні води відривають одну сторону сіточки, а повне підняття сіточки від поверхні води проводять під кутом 90° до поверхні. При такому русі завдяки поверхневому натягу рідина повертається до ванночки, а краплину, що залишилася на краю сіточки обережно прибирають щільним фільтрувальним папером. В жодному разі не можна доторкатися фільтрувальним папером до зрізів на сіточці – це може призвести до їх забруднення чи псування, а якщо зрізи переносяться на бленди, то до пошкодження формварової плівки-підшови.

Для перенесення зрізів з використанням петлі, можна застосувати спеціалізований інструмент Perfect loop (EMS, кат. номер 70944, див. посилання на веб-ресурси), що представляє собою металевий диск, що має розмір стандартної сіточки з отвором великого діаметру. Також, замість цієї петлі можна використати бленду без формварової плівки з отвором 1×2 мм.

Процедура наступна:

- відцентрувати необхідні зрізи в середині ванночки (рис. 12, 1);
- повільно доторкнутися петлею до поверхні рідини так, щоб зрізи опинилися в отворі петлі (рис. 12, 2);
- підняти петлю з поверхні рідини, при цьому зрізи підіймуться разом з краплиною рідини в отворі петлі (рис. 12, 3);

- прикласти петлю до сіточки, яка повинна знаходитися формваровою плівкою-підложкою до верху в чашці Петрі на фільтрувальному папері (рис. 12, 4);
- петля прилипне до сіточки завдяки поверхневому натягу води принесеної петлею (рис. 12, 5);
- якщо сіточка без формварової плівки-підложки, для видалення рідини достатньо щільно притиснути петлю до сіточки (рис. 12, 6);
- якщо сіточка з формваровою плівкою-підложки, то для видалення рідини потрібно піднести шматок фільтрувального паперу до краю бленди (рис. 12, 7);
- відділити сіточку від петлі, притримуючи її волосиною або пінцетом (рис. 12, 8).

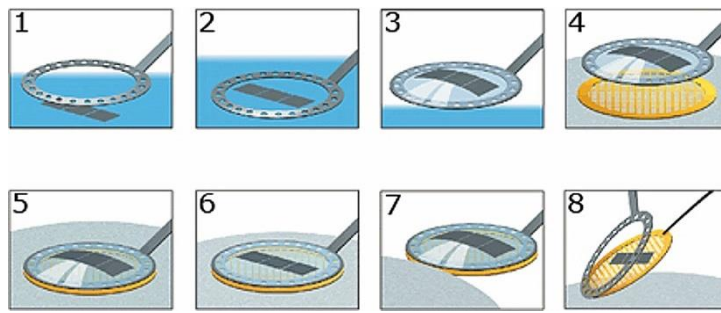


Рис. 12. Перенесення зрізів на сіточки і бленди з використанням спеціалізованої петлі «Perfect loop».



Рис. 13. Пенали різних типів для зберігання та транспортування сіточок і бленд.

Сіточки, чи бленди з отриманими зрізами переносять до спеціального пеналу, в якому всі індивідуальні комірки для бленд пронумеровані. Крім того, він досить щільно закривається, що перешкоджає забрудненню та пошкодження

матеріалу під час переміщення пеналу (рис. 13). Важливо зберігати сіточки впорядковано, стороною зі зрізами на один бік (!), оскільки перед тим, як аналізувати зрізи в мікроскопі їх додатково фарбують з метою підвищення контрасту клітинних структур (контрастування).

3.5. Контрастування ультратонких зрізів

Обробка чотириокисом осмію окрім хімічної фіксації суттєво підсилює контраст біологічного матеріалу. Крім осміювання, під час підготовки зразків до заливання у епоксидну смолу, іноді для підсилення контрасту застосовують їх витримання протягом однієї години у 1%-му розчині танінової кислоти, приготованої на буфері. Також одним зі способів контрастування під час зневоднення є обробка 0,5%-ним 70°-ним спиртовим розчином уранілацетату ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$). Проте отримані ультратонкі зрізи, як правило в електронному мікроскопі не дають зображення достатнього контрасту. Тому були розроблені різні способи імпрегнації матеріалу в зрізах іонами важких металів для посилення контрастності отриманого зображення.

Найбільш поширеним методом, що дає найкращий результат, є послідовне контрастування уранілацетатом (0,5-1%-ний водний розчин) та цитратом свинцю. Контрастування зручно проводити на дні чашки Петрі, залитому парафіном, або покритому шматком парафілму. Під час контрастування чашка Петрі повинна бути закритою. Для контрастування достатньо нанести піпеткою краплі контрастеру в чашку і помістити на них сіточки по одній на кожну краплю зрізами донизу. Контрастування уранілацетатом проводять протягом 30 – 60 хв. Після чого для відмивання контрастеру сіточки, тримаючи пінцетом, обережно занурюють декілька разів у стаканчик з 50°-им етанолом. Залишки рідини з сіточки прибирають шматочком фільтрувального паперу. Для контрастування розчином цитрату свинцю (приготування див. додаток X), обробку яким використовують і також часто і без попереднього витримання в розчині уранілацетату, на дно чашки Петрі викладають кілька кристалів гідроксиду калію для зниження рівня вуглекислого газу в чашці під час контрастування. Потім наносять краплини контрастеру на дно чашки на які і поміщають сіточки, як і у випадку з уранілацетатом. Час контрастування може варіювати від 10 до 30 хв, залежно від досліджуваного матеріалу та складу смоли. Найчастіше достатньо 15 хв. Після цієї процедури бленди потрібно відмити протягом 15-30 с у 0,02 н-ному розчині гідроксиду натрію, а потім у дистильованій воді.

Доволі сильний контраст зрізів можна досягнути використовуючи обробку розчином перманганату калію (KMnO_4), який можна ще підсилити, обробивши зрізи розчином цитрату свинцю. Використовують 1%-ний розчин перманганату калію на дистильованій воді. Після розчинення перманганату, розчин не потрібно фільтрувати. Перед використанням він повинен постояти принаймні 24 год для стабілізації. Процедура контрастування зрізів на сітках або блендах може тривати від 15 до 120 хв. Для розчинення осаду сіточки треба промити (1 краплина 5%-го розчину лимонної кислоти на 1 мл дистильованої води). Потім знову промити лише дистильованою водою і промокнути з краю фільтрувальним папером.

Іноді, під час переміщення сіточок між різними розчинами та пеналом, виникає плутанина на якому боці сіточки знаходяться зрізи. В такому разі, за допомогою лабораторного біокуляра можна легко ідентифікувати їх розміщення. Ця проста процедура дасть змогу уникнути помилки при контрастуванні зрізів, особливо якщо роботи проводить не надто досвідчений дослідник.

3.6. Приготування напівтонких зрізів та попереднє дослідження матеріалу в світловому мікроскопі

Рослинний матеріал, підготований для електронної мікроскопії, придатний також для дослідження його анатомії у світловому мікроскопі. Перш за все, фіксація глутаровим альдегідом з тетроксидом осмію забезпечує краще збереження тканини порівняно з фіксаторами, що використовуються для світової мікроскопії. А нарізання полімерних епоксидних блоків скляним ножом, як правило, є менш деструктивним для рослинного матеріалу, ніж звичайне нарізання парафінових блоків металевим ножом.

Для дослідження одноклітинних організмів, культур клітин чи різних клітинних фракцій, тобто при однорідності матеріалу в зразках, достатньо заточити полімерний блок за стандартною процедурою (див. розділ 3.1), орієнтуючись при цьому на темне забарвлення осміюваного матеріалу, після чого можна відразу отримувати ультратонкі зрізи на ультрамікротомі. Дослідження ультраструктури тканин листка, як правило, проводять на поперечних зрізах листової пластинки. Якщо товщина листової пластини менша ніж 1 мм, то можна сформувати площину нарізання через всю її товщу. Якщо товщина більша, то під біокуляром мікротомом достатньо легко ідентифікувати епідерму, палісадну та губчасту паренхіми і провідні пучки. В

такому випадку напівтонкі зрізи можна робити лише для вивчення анатомії органу. Так само і при виготовленні поперечних зрізів через корені й стебла (пагони). Якщо ж завданням є дослідити ділянку тканин на певній відстані від верхівки чи основи осьового органу, то її локалізацію можна виміряти на приготованих епоксидних блоках, використовуючи лінійку із дрібною шкалою. Проте, треба мати на увазі, що лінійні розміри ростових зон кореня, а у деяких об'єктів і кількість клітинних шарів варіюють у різних коренях і суттєво можуть змінюватися з віком та при дії зовнішніх чинників. Тому не варто завжди орієнтуватися на відстань. Іншими словами, коли існує необхідність дослідження ультраструктури тільки певної тканини, групи клітин, певної фази росту клітин, що межують з тканинами, неважливими для дослідника, то без попереднього дослідження зразка у світловому мікроскопі обійтися неможливо, оскільки визначити чітку локалізацію потрібних клітин при заточуванні матеріалу та формуванні площини нарізання у потрібному місці є завжди проблемним.

Таким чином, проміжне виготовлення напівтонких зрізів для різних типів рослинного матеріалу та попереднє дослідження їх у світловому мікроскопі є доцільними і варто детально зупинитися на послідовності методичних дій. Найскладніше заточувати та готувати до нарізання корені у повздовжній (медіальній) площині. Проте, ультраструктуру клітин повздовжніх зрізів кореня і його анатомію слід вивчати саме в медіальній площині, оскільки цей метод демонструє всі тканини кореня. В медіальній площині на повздовжніх зрізах можна правильно визначити форму та розміри клітин, кількість клітинних шарів, напрям поділу та швидкість диференціювання клітин. Слід пам'ятати, що ультраструктура клітин суттєво змінюється протягом їхнього диференціювання. Тож для вибору потрібної ділянки кореня у повздовжній площині завжди необхідні додаткові маніпуляції, які полягають у приготуванні напівтонких зрізів. Тільки в цьому випадку є висока ймовірність, що на бленди потраплять зрізи потрібних клітин у повздовжній площині і як наслідок ми матимемо якісний матеріал для дослідження ультраструктури клітин органу.

Алгоритм приготування напівтонких медіальних повздовжніх зрізів на прикладі кореневих апексів приведений на рисунку 14. На етапі розміщення рослинного матеріалу в молдах потрібно орієнтувати зразки таким чином, щоб майбутня площина зрізу була паралельною і знаходилася якнайближче до верхівки полімерного блоку (рис. 14, 1). Для полегшення роботи при заточуванні потрібно на поверхні полімерного блоку накреслити лезом медіальну лінію та відсікти блок так, щоби зріз пройшов трохи вище і паралельно цій лінії (рис. 14, 2).

На даному етапі замість леза можна використовувати абразивні матеріали. При формуванні площини зрізу потрібно максимально відсікти шматки смоли, що оточують зразок, залишивши при цьому невеликий виступ «зубець» з одного боку (рис. 14, 3). «Зубець» потрібен для того, щоб при нарізанні навантаження на ріжучу поверхню ножа збільшувалося поступово (рис. 14, 4). За нашим досвідом нарізання полімерних блоків, заточених із «зубцем», суттєво збільшує кількість зрізів, отриманих до затуплення скляного ножа.

Після закріплення підготованого блоку в тримачі ультрамікротому, встановлюють ніж та наповнюють його ванночку дистильованою водою. Після цього можна розпочинати процес нарізання. Спочатку потрібно максимально наблизити блок до ріжучої поверхні. Достатньо важко відразу зорієнтувати блок так, щоб утворювалися зрізи через всю площину нарізання. Для цього потрібно регулювати кути нахилу блоку відносно ріжучої поверхні ножа. В процесі нарізання весь зайвий матеріал у ванночці видаляється за допомогою волосини. Якщо під час нарізання вода потрапляє на поверхню блоку, то її треба прибрати фільтрувальним папером після кожного оберту барабану. Вода перестане потрапляти на поверхню блоку, після того як зрізи будуть проходити через всю площину нарізання. Утворення тонких поперечних або повздовжніх ліній на зрізах свідчить про початок псування скляного ножа. Для усунення цього, потрібно змістити ніж і розпочати нарізання на гострій ділянці, у випадку коли це вже не можливо – замінити ніж.

Після нарізання декількох зрізів, що проходять через всю площину, їх переміщують волосиною на середину ванночки. Потім зрізи з краплиною води переносять на попередньо очищене предметне скло за допомогою петлі, як у випадку приготування ультратонких зрізів. Єдина відмінність полягає у розмірах петлі. Існують готові спеціалізовані петлі для напівтонких зрізів, але можна виготовити петлю з тонкого мідного дроту або вирізати її з тонкої пластини щільного пластику. Для перенесення достатньо легким рухом доторкнутися петлею до поверхні води так, щоб зрізи опинилися всередині (рис. 14, 5). Для легкого підйому петлі зі зрізами попередньо до ванночки можна додати декілька крапель води, щоб на поверхні ванночки утворилася водяна гірка. Після підйому зрізів потрібно доторкнутися петлею зі зрізами до предметного скла і повільним рухом підняти петлю. При цьому краплина зі зрізами залишиться на предметному склі. Воду зі зрізами на склі краще підігріти до температури 50–70°C, щоб вони вирівнялися.

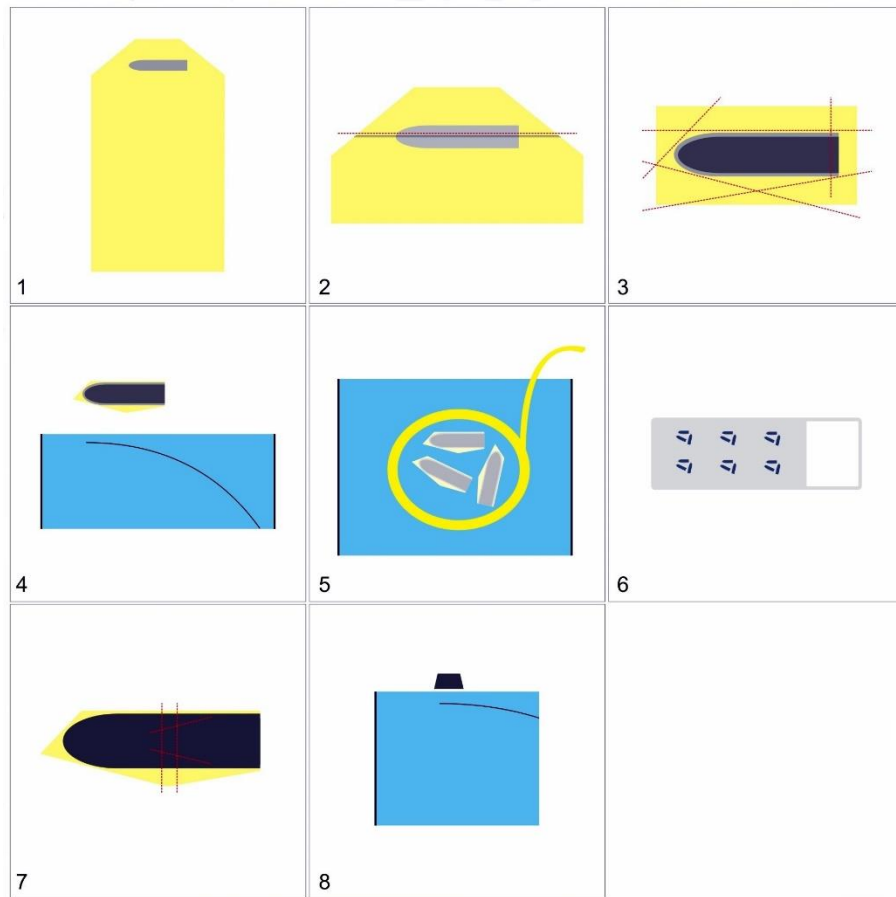


Рис. 14. Послідовні етапи приготування напівтонких медіальних зрізів корневих апексів та підготовка зразка для приготування ультратонких зрізів: 1 – орієнтація зразка у полімерному блоці; 2 – нанесення лезом медіальної лінії кореня на поверхню полімерного блоку та відсікання шматку блоку вище цієї лінії; 3 – формування площини зрізу із «зубцем»; 4 – орієнтування блоку відносно ріжучої поверхні ножа «зубцем» донизу; 5 – перенесення зрізів петлею на предметне скло; 6 – фарбування зрізів та їх перегляд у світловому мікроскопі; 7 – формування площини для приготування ультратонких зрізів (40 – 50 нм); 8 – орієнтування блоку відносно ріжучої поверхні ножа для отримання стрічки серійних ультратонких зрізів.

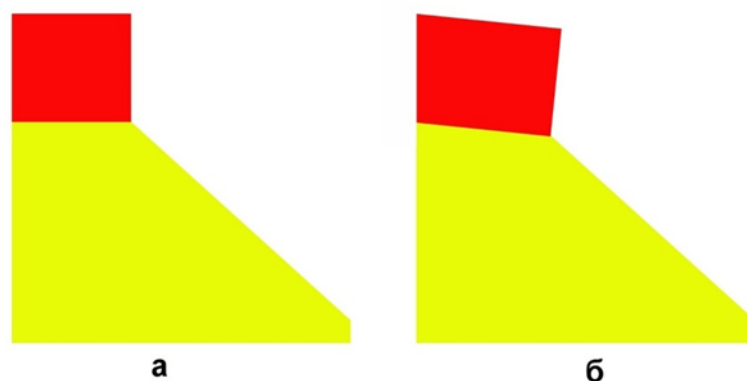


Рис. 15. Наклеювання липкої полімерної стрічки на ножі, які будуть використані для приготування ультратонких (а) па напівтонких (б) зрізів.

Робити це зручно за допомогою гістологічної плитки. Якщо її немає, предметне скло можна кілька разів провести над полум'ям пальника, слідкуючи, щоб вода не закипіла. По мірі випаровування води напівтонкі зрізи міцно прилипнуть до скла.

Для фарбування зрізів, як правило, використовують 1%-ний водний розчин метиленового синього або 0,1–1%-ний розчин толуїдинового синього у суміші з 1%-ним розчином тетраборату натрію (бури). Помістивши розчини барвника та бури в рівних об'ємах на зрізи, скло підігривають за допомогою плитки чи пальника до 70°C і витримують протягом 1 – 2 хв, після чого барвник обережно змивають під тонким струменем теплої води та сушать. Інтенсивність забарвлення зрізів може сильно варіювати і залежить від багатьох факторів: природи зразка, тривалості осміювання, товщини зрізу, концентрації барвника та тривалості забарвлення. Для отримання оптимального забарвлення потрібно підбирати товщину зрізів та тривалість фарбування. Як показує досвід, найефективнішим є відібрати три зрізи, товщиною 0,5, 1 та 1,5 мкм на окреме предметне скло та фарбувати при легкому нагріванні протягом 30 секунд. При необхідності можна повторити фарбування знову. Після цього за світловим мікроскопом можна визначити оптимальну товщину зрізу, інтенсивність і контрастність забарвлення якого є найкращими. Якщо зафарбовані зрізи є блідими або навпаки занадто забарвленими, потрібно відповідно підвищити або знизити концентрацію барвника. Після проб фарбування, можна готувати напівтонкі зрізи потрібної товщини та переносити їх на нове скло. Коли скло заповнене зрізами, їх можна фарбувати (рис. 14, б).

На основі ревізії анатомії органу під світловим мікроскопом зразки переточують на пірамідку з верхньою площиною у вигляді трапеції щонайменшого розміру так, щоб у неї увійшли саме ті клітини, ультраструктура яких цікавить дослідника (рис. 14, 7). Після цього можна готувати ультратонкі зрізи (рис. 14, 8).

Виготовлення напівтонких зрізів потребує певних навичок і досвіду. Тому необхідно надати рекомендації, що можуть допомогти в цій роботі. Теоретично на ультрамікротомі можна отримати зріз, через всю ріжучу поверхню ножа. Практично можна зробити зрізи, що не перевищують 2/3 ріжучої поверхні ножа, оскільки ніж має тупу, не придатну для нарізання ділянку з правого боку леза. Оперування великими зрізами у ванночці та їх переміщенням на скло є трудомістким. Цю процедуру можна полегшити, якщо попередньо при виготовленні скляних ножів збільшити розмір ванночки, змінивши кут наклеювання липкої стрічки, як це показано на схемі (рис. 15). Як показує

практика, найпростіше працювати з напівтонкими зрізами, що не перевищують 1/3 ріжучої поверхні ножа. Товщина зрізів, придатних для дослідження у світловому мікроскопі, може складати 0,5–5 мкм, що залежить від особливостей матеріалу та часу його осміювання. Якщо ж полімерна смола занадто тверда, то рекомендовано максимально знизити товщину зрізів, запобігаючи передчасному псуванню ножа. Швидкість нарізання напівтонких зрізів повинна бути завжди низькою.

Як правило, перед сеансом на електронному мікроскопі потрібно підготувати ультратонкі зрізи відразу декількох зразків. При цьому на проміжному етапі ревізії анатомії органу ефективним буде працювати відразу з усіма зразками. Спочатку всі зразки послідовно заточити та підготувати до етапу нарізання напівтонких зрізів. Після чого провести їх різку, знімаючи з кожного зразка по 3-5 зрізів двома перенесеннями на одне скло. Потім можна проаналізувати анатомію відразу всіх зразків. Відібрати ті зразки, зрізи яких є медіальними, інші зразки потрібно дорізати, щоб вийти на правильну медіальну площину зрізу. Цей підхід дозволяє контролювати глибину та площину різання, які важко встановити під оптичною системою ультрамікроскопа.

4. Дослідження у трансмісійному електронному мікроскопі

Основна дослідницька робота з вивчення ультраструктури клітин здійснюється саме під час сеансу за електронним мікроскопом. Сучасні прилади дозволяють проводити зйомку, як на фотоплівку, так і на цифрову камеру. Як показує практика, все відзняти неможливо і, як правило, кількість знімків при роботі на мікроскопі обмежена. Тому аналіз матеріалу здійснюється безпосередньо за мікроскопом, а фотографуються тільки характерні ділянки високої якості, що сповна описують зроблені в процесі вивчення висновки. Такі кадри краще всього знімати на фотоплівку, яка має високу роздільну здатність. Крім того, проводиться зйомка ділянок клітин для подальшого статистичного аналізу. Таку зйомку можна приводити цифровою камерою, роздільна здатність якої є нижчою, аніж зйомка на фотоплівку, але в той же час є достатньою для морфометричного аналізу. Щоб полегшити майбутні статистичні підрахунки, досліджувані структури бажано знімати на однаковому збільшенні.

Вивчення ультраструктури потребує певних професійних навичок і досвіду. Для того, щоб не робити зайвих відкриттів, ми рекомендуємо завжди консультиватися з досвідченими фахівцями. Необхідно мати загальне уявлення

про ультраструктуру тієї чи іншої тканини, перш ніж приступати до роботи за мікроскопом. Для цього потрібно попередньо попрацювати з підручниками анатомії і цитології рослин, атласами ультраструктури рослинної клітини та відповідними до об'єкту вивчення науковими публікаціями.

Починати дослідження потрібно з перегляду контрольних зразків. Відразу треба оцінити якість матеріалу та ідентифікувати тканинну приналежність всіх клітин зразка. На цьому етапі можна відразу визначити якість отриманого матеріалу, його придатність для дослідження, та при низькій якості – встановити причини методичних порушень (рис. 16, а-і). При систематичній роботі з електронним мікроскопом необхідно вести журнал. На початку роботи потрібно занотувати номер зразка, вказати його біологічну природу, зазначити якість матеріалу. Після первинного перегляду зробити короткий опис ультраструктури клітин, підкріплюючи спостереження електронними мікрофотографіями. Кожна мікрофотографія, зроблена на плівку фотокамерою мікроскопу має свій номер. Ми рекомендуємо в журналі під відповідними номерами мікрофотографій давати їх опис. При зйомці цифровою камерою, номер мікрофотографії зручно зберігати в імені файлу. Для того щоб правильно відзняти цікаві фрагменти, потрібно спочатку сфотографувати групу клітин або клітину на малих збільшеннях – ділянку, з якою можна ідентифікувати її тканинну належність, після чого вже на оптимальному збільшенні відзняти потрібний фрагмент. При наявності серійних зрізів можна провести зйомку фрагменту клітин на всій стрічці серійних зрізів, що допоможе встановити об'ємну структуру органел. Для отримання якісних знімків необхідно перед кожною зйомкою налаштувати фокус, оскільки товщина зрізів завжди відрізняється.

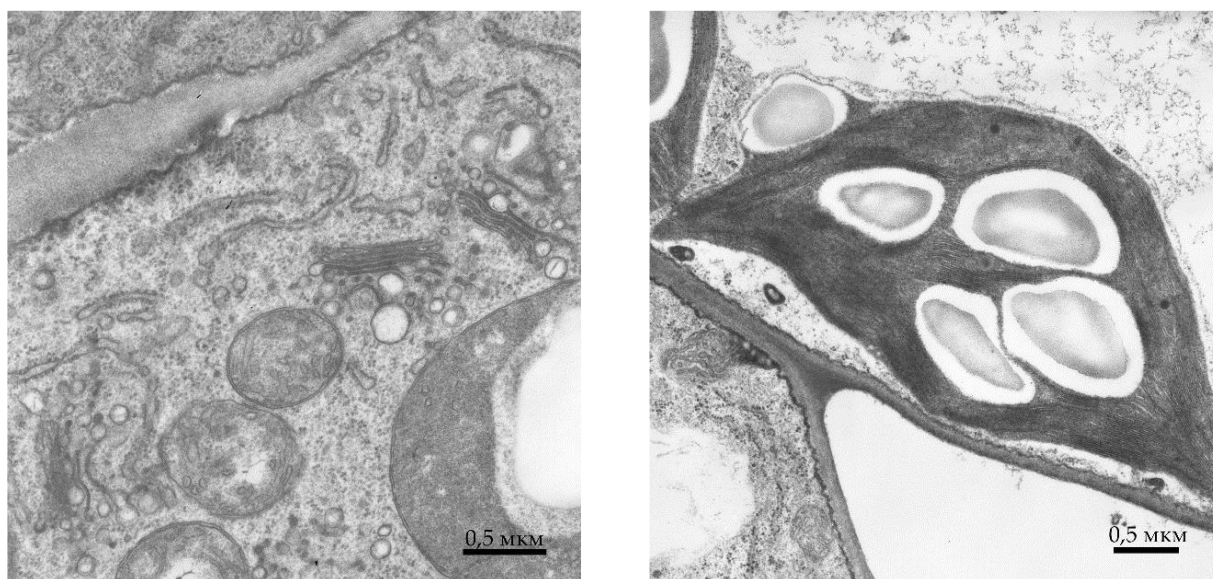


Рис. 16 а. Зразки підготовлені без методичних порушень

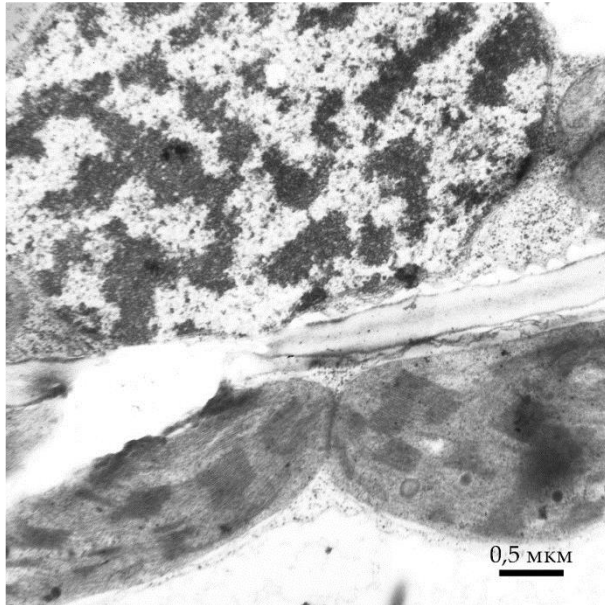


Рис. 16 б. Дефект: розриви клітинної стінки та плазмалемми.
Причина: механічні пошкодження тканини під час фіксації-дегідратації.

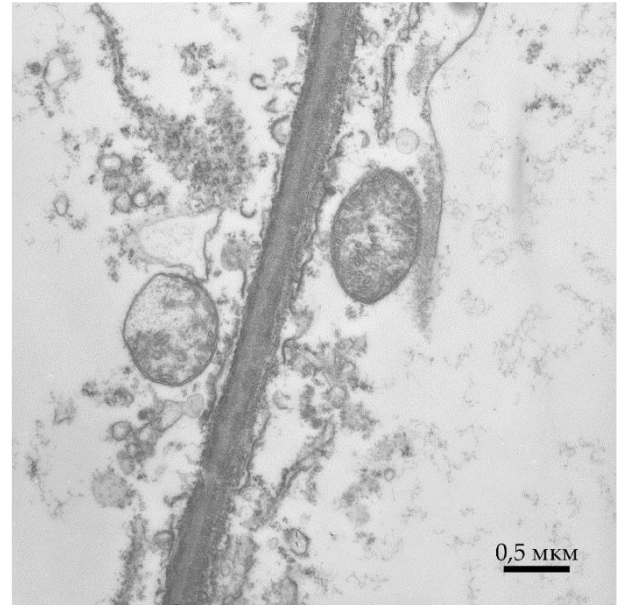


Рис. 16 в. Дефект: відсутність фрагментів тонопласту.
Причина: порушення температурного режиму під час фіксації-дегідратації, низька концентрація та/або рН буферного р-ну, використаного при фіксації.

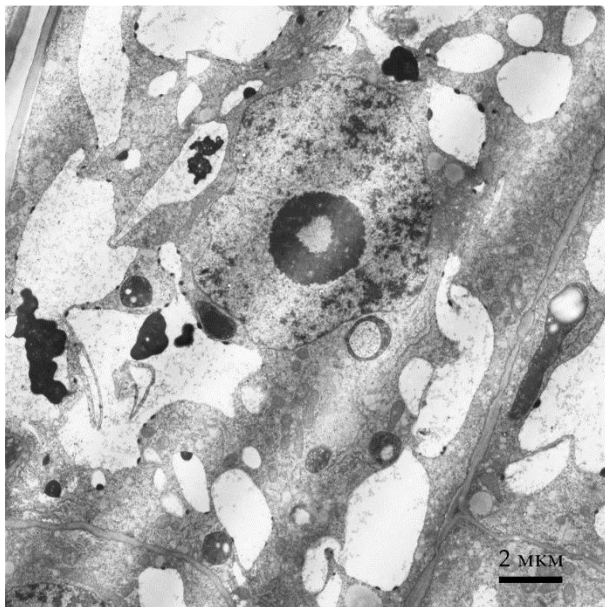


Рис. 16 г. Дефект: хвилеподібна зміна товщини зразка.
Причина: вібрація під час нарізання, занадто висока швидкість нарізання, велика площа поверхні нарізання.

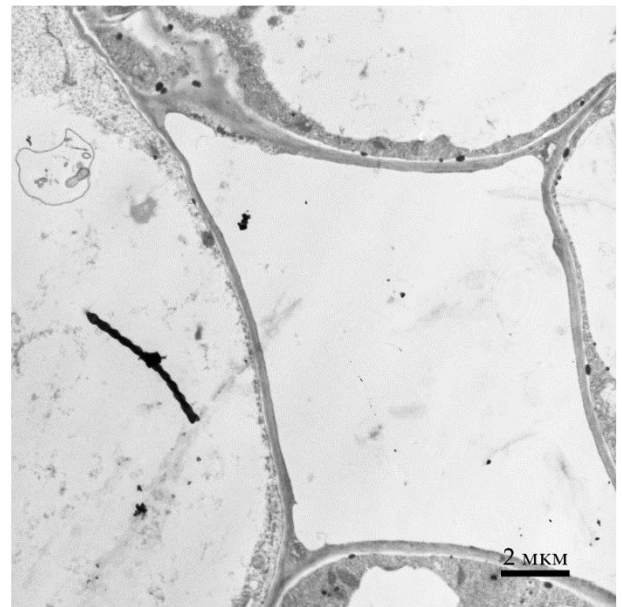


Рис. 16 г. Дефект: електронно-щільні артефакти різного розміру.
Причина: потрапляння бруду на зрізи у ванночці ножа, під час контрастування та у випадку, якщо бленди тривалий час знаходилися поза пеналом.

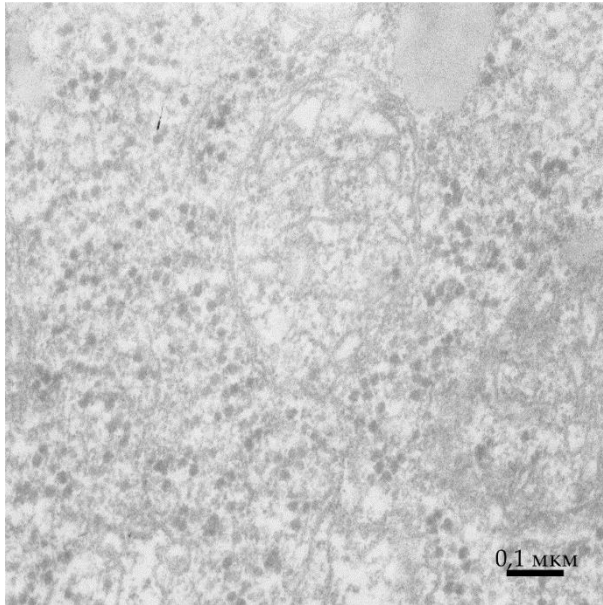


Рис. 16 д. Дефект: наявність усіх мембранних компонентів, але вони занадто низької електронної щільності. Причина: товщина зрізу менша ніж 30 нм.

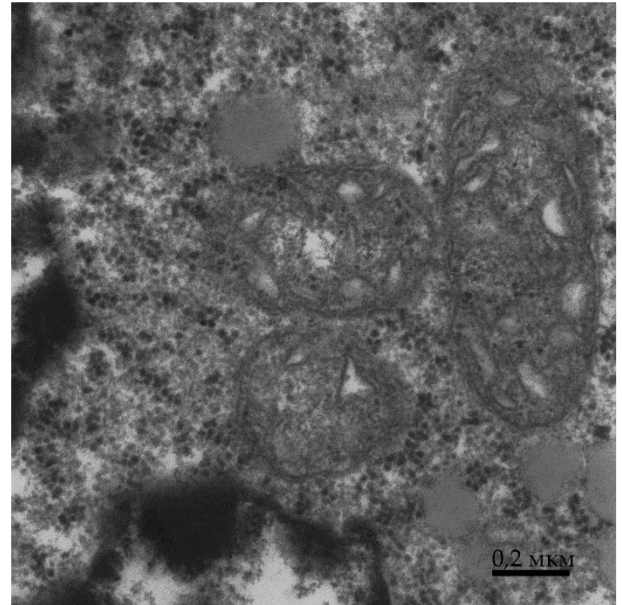


Рис. 16 е. Дефект: висока електронна щільність цитозолію та органел, відсутня різкість. Причина: товщина зрізу більша ніж 80 нм.

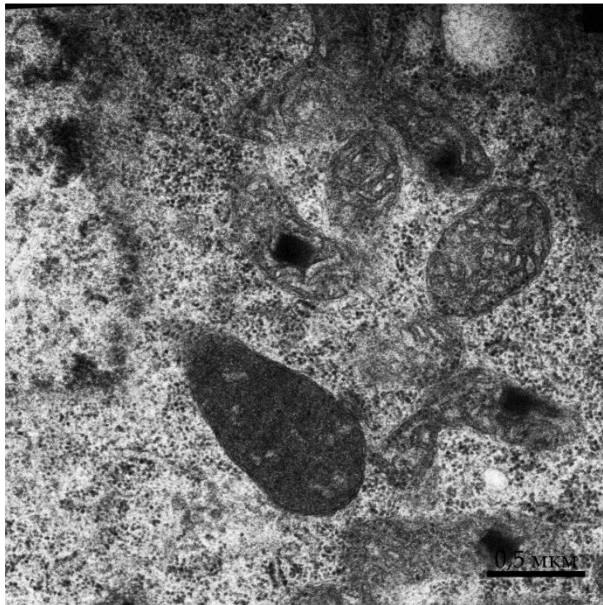


Рис 16 е. Дефект: поступова зміна електронної щільності. Причина: ділянки зрізу мають різну товщину.

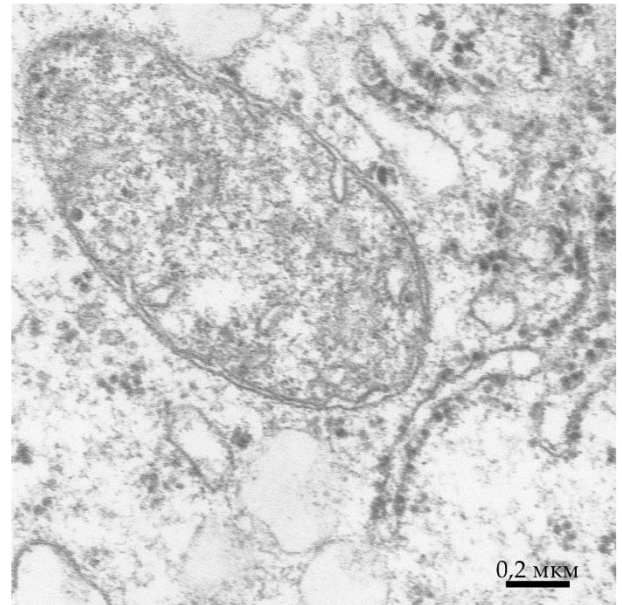


Рис 16 ж. Дефект: наявні всі мембрани, але відсутня різкість. Причина: мікроскоп не налаштований відповідним чином.

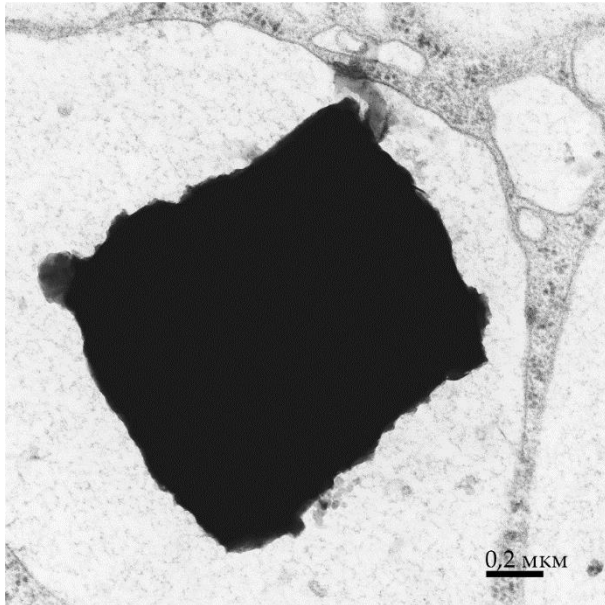


Рис. 16 з. Дефект: електронно-щільний осад свинцю.
Причина: низький рН розчину цитрату свинцю, зниження рН під час контрастування, надто тривалий час контрастування.

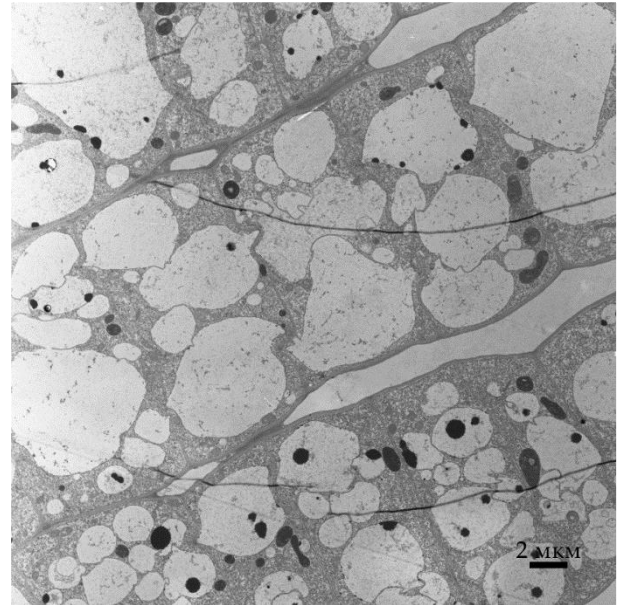


Рис. 16 и. Дефект: електронно-щільні хвилясті лінії різного розміру.
Причина: зморшки, що формуються при перенесенні зрізів на бленди.

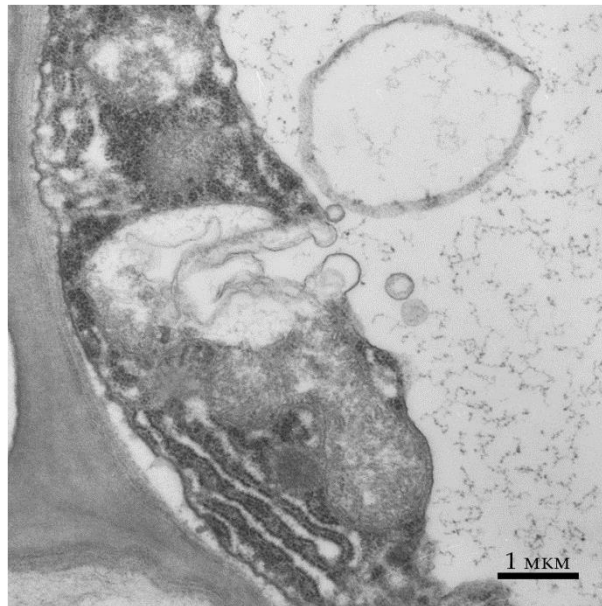


Рис. 16 і. Дефект: висока щільність цитозолу, набрякання органел, низька електронна щільність мембран (неможливо їх ідентифікувати).
Причина: порушення у процесі фіксації; низька концентрація глутарового альдегіду, псування глутарового альдегіду, короткий час фіксації.

Іноді товщина одного й того ж зрізу може бути різною. Крім того, зміна збільшення приладу може викликати відхилення у фокусній відстані. При зйомці потрібно враховувати швидкість дрейфу. Якщо швидкість плинущо зображення зразка суттєва, необхідно максимально зменшити час експозиції.

СКАНУВАЛЬНА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

1. Історичні аспекти та принцип роботи сканувального електронного мікроскопа

У шістдесятих роках минулого століття було сконструювано сканувальний, або ж растровий електронний мікроскоп, в якому також використовуються властивості пучка електронів, що рухається з великою швидкістю під дією прискорюючої напруги. Спочатку можливість створення такого аналітичного приладу була постульована теоретично Манфредом фон Арденом, який і запатентував прилад. Пізніше професор Чарльз Отлі із своїм учнем Гарі Стюартом побудували перший промисловий прототип. Таким чином, перші серійні прилади були створені у Великій Британії у 60-их роках минулого століття. Це були сканувальні електронні мікроскопи серії "Stereoscan" виготовлені фірмою Cambridge Instrument Company. Перший екземпляр цієї серії був проданий відомій хімічній корпорації DuPont.

Сканувальні електронні мікроскопи призначені для дослідження структури поверхні, як біологічних об'єктів, так і зразків небіологічного походження. Завдяки надзвичайно великій глибині різкості, сканувальний, або, як його ще називають растровий мікроскоп, дозволяє спостерігати трьохвимірне зображення досліджуваної поверхні (рис. 17).

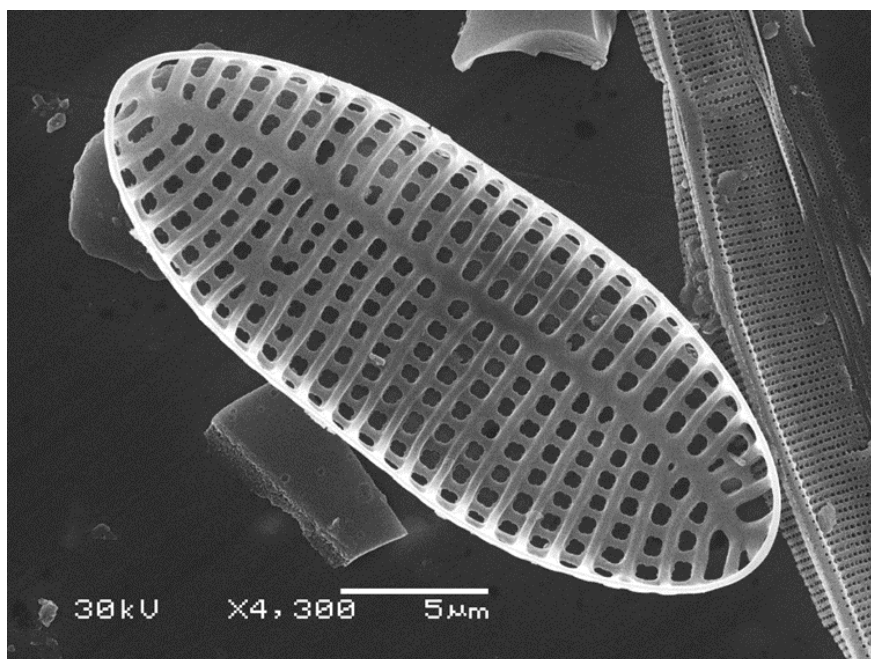


Рис. 17. Кремнеземовий панцир (тека) морської діатомової водорості у сканувальному електронному мікроскопі (SEM).

Роздільна здатність таких мікроскопів нижча, порівняно з трансмісійними електронними мікроскопами і залежить від прискорюючої напруги. Так, при напрузі 3 кВ роздільна здатність не перевищує 0,2 мкм, за робочої ж напруги у 20 кВ досягає 20 нм. У сучасних сканувальних мікроскопах, що використовуються при дослідженні геологічних зразків і в матеріалознавстві, роздільна здатність може досягати кількох нанометрів. При цьому збільшити об'єкт можна до 400 тис. разів.

Схема функціонування сканувальних мікроскопів дещо відрізняється від трансмісійних у формуванні зображення. Електрони, які завдяки явищу термоелектронної емісії продукуються катодом, під дією прискорюючої напруги з великою швидкістю рухаються до анода, формуючи електронний пучок. Конденсорна і допоміжні лінзи, що знаходиться під анодом концентрують та спрямовують цей пучок на поверхню зразка. Завдяки комп'ютеризованій системі керування магнітними лінзами пучок електронів рухається скануючи певну ділянку зразка. При цьому поверхня самого зразка стає джерелом вторинних електронів. Саме вторинні електрони потрапляють до колектора і фіксуються системою сцинтилятора-мультиплікатора (детектор типу Еверхарта-Торнлі) в якому і формується первинне зображення, яке після програмно-процесорної обробки потрапляє на екран монітора. Для фотографування раніше використовували плівку. Плівкова фотокамера фіксувала зображення на чорно-білому екрані електронно-променевої трубки високої чіткості. У сучасних мікроскопах сформована сфокусована картинка просто відображається в інтерфейсному вікні керуючої мікроскопом комп'ютерної програми і може бути збережена в будь-який момент на жорсткий диск комп'ютера або будь-який інший носій інформації (рис. 18).



Рис. 18. Сучасний сканувальний електронний мікроскоп – JSM 6060 LA, японської фірми JEOL. Прискорююча напруга – 30 кВ (Фото Д. О. Климчука).

У біології сканувальний електронний мікроскоп широко використовується для дослідження морфології вегетативних та генеративних органів рослин, зокрема для вирішення багатьох завдань систематики і флористики. Застосовують його також в альгології, для дослідження структури оболонок діатомових і золотистих водоростей. Застосовують електронні мікроскопи цього типу і в практиці фітопатології.

2. Підготовка зразків для дослідження у сканувальному електронному мікроскопі

Методика підготовки біологічних зразків для вивчення у сканувальному електронному мікроскопі, на відміну від практики підготовки зразків до перегляду трансмісійному мікроскопі, є відносно простою. Насінини, пилкові зерна, спори не потребують якоїсь спеціальної обробки для вивчення у сканувальному мікроскопі. Головним завданням процесу підготовки зразків для сканувальної мікроскопії є надання їхній поверхні провідності. Виконання цієї умови досягається шляхом іонного напилення важких інертних металів (золото, платина, срібло, палладій) в умовах розрідження, тобто неглибокого вакууму. Таким чином робота дослідника зводиться до наклеювання досліджуваного зразка на спеціальний металевий предметний столик за допомогою двосторонньої клейкої стрічки або за допомогою спеціального струмопровідного клею, наприклад торгової марки DOTITE. У більшості моделей сканувальних електронних мікроскопів предметний столик – це латунний циліндр висотою і діаметром 10 мм. За необхідності їх можна виготовити самому. Важливо слідкувати, щоб стрічка не покривала всю торцеву поверхню столика. За допомогою леза плівку треба зрізати так, щоб залишались з одного або й двох країв вільні ділянки поверхні столика для забезпечення достатньої кондуктивності (рис. 19). Підготовлені таким чином препарати у підписаній чашці Петрі віддають оператору сканувального мікроскопа для подальшого напилення металом (рис. 20, 21).

У випадку, коли об'єкти дослідження дуже дрібні й знаходяться у суспензії, наприклад, очищені від органіки теки діатомових водоростей у етиловому спирті (див. методику очищення), то на шліфовану поверхню столика просто наносять краплину суспензії, після чого залишають зразок висохнути у місці, захищеному від пилу.

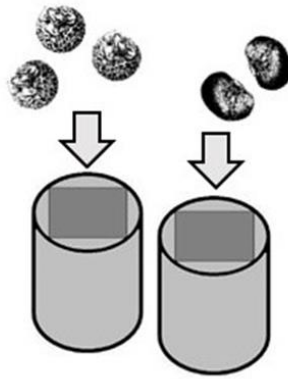


Рис. 19. Наклеювання зразків на предметні столики для дослідження мікрморфології у сканувальному електронному мікроскопі.



Рис. 20. Іонний напилювач зразків для сканувальної електронної мікроскопії JEOL JFC-1600.

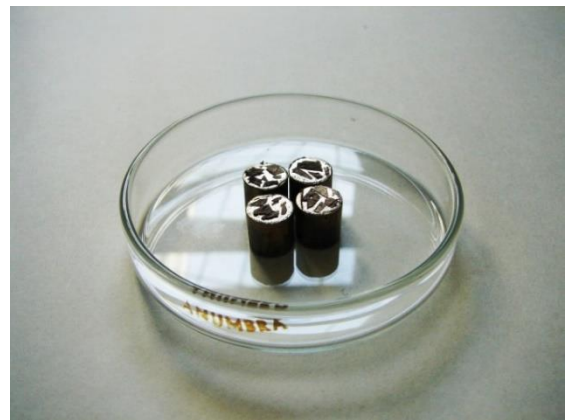


Рис. 21. Предметні столики з наклеєними і напиленими золотом біологічними зразками (фрагменти листка).

Потрібно зазначити, що гідратовані зразки, наприклад, бактеріальні плівки, фрагменти плодових тіл грибів, частини однорічних пагонів багатьох видів рослин, для збереження структури без суттєвих порушень потребують фіксації та спеціальної технології висушування. Для фіксації витримують зразок у парах чотириокису осмію. У 70-х роках минулого століття був запропонований метод висушування біологічних препаратів переходом через критичну точку рідкого вуглекислого газу, який набув досить широкого поширення. Згідно цього методу зразки фіксують глутаровим альдегідом і тетроксидом осмію, зневоднюють у серії розчинів етилового спирту зростаючої концентрації через амілацетат, переводять у рідкий вуглекислий газ і залишають нагріватися до кімнатної температури. При досягненні критичної температури близько $-78,5^{\circ}\text{C}$ (так звана критична точка) відбувається фазовий перехід вуглекислого газу із рідкого у газоподібний без морфологічних змін зразка. Висушені у такий спосіб

зразки переносять на латунні предметні столики для наплення металом і спостереження у сканувальному електронному мікроскопі.

Ще одним методом підготовки гідратованих зразків може бути ліофільне висушування. Його можна проводити, як після попередньої хімічної фіксації, так і без неї. Зразки розміщені на предметних столиках потрібно спочатку заморозити в рідкому азоті, а потім довести до повітряно-сухого стану за допомогою ліофільної сушарки. Така технологія в більшості випадків є достатньою для збереження структури поверхні зразків.

2.1. Спосіб підготовки діатомових водоростей для вивчення у сканувальному електронному мікроскопі

Діатомові водорості – специфічна група одноклітинних автотрофних організмів, головною особливістю яких є наявність панцирів, унікальних структур, що утворені полімерним опаловим кремнеземом ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$). Будова панцирів (тек) є важливою систематичною ознакою для цієї групи водоростей і традиційно використовується мікроскопістами для перевірки якості оптичних мікроскопів. Дрібні отвори панцирів діатомей, які мають рівні краї також є ідеальним об'єктом для перевірки та налаштування сканувальних електронних мікроскопів. З іншого боку, сканувальна електронна мікроскопія на сьогодні є найефективнішим методом дослідження структури панцирів цієї групи водоростей. Проте для успішного вивчення субмікроскопічної структури тек водоростей за допомогою даного методу потрібно надзвичайно добре очистити їх від сторонніх неорганічних часток, залишків клітинного вмісту і слизу, в якому знаходилась колонія водоростей. Зважаючи на те, що за допомогою сучасного сканувального мікроскопу можна досягати збільшення понад 200 тис. разів, стає зрозумілою важливість процедури ефективного очищення.

Очистка тек відбувається у кілька послідовних етапи. Перший етап – це відмивання водоростей від фіксатора (зазвичай це 4%-ний розчин формальдегіду) шляхом центрифугування при 3 тис. обертів на хвилину з наступним видаленням надосадової рідини за допомогою піпетки без підняття осаду. Після цього осаджені теки відмивають дистильованою водою, об'єм якої повинен відповідати початковому об'єму розчину фіксатора проби, відібраної для аналізу. Тобто, після центрифугування протягом п'яти хвилин і відбору фіксатора, у посуд з досліджуваним матеріалом доливають дистильованої води, добре струшують і знову центрифугують. Надосадову рідину знову відбирають.

Відмивання краще проводити у скляних бюксах (віалах), які потрібно попередньо зрівноважити. Бюкси можна поміщати у пластикові центрифужні пробірки. Найчастіше використовують по 2 мл фіксованої суспензії водоростей, яку вносять до скляного бюксу об'ємом 10 мл, виготовленого із прозорого скла.

Наступним етапом необхідно відмити із тек діатомових водоростей нерозчинні у воді вуглекислі солі кальцію та магнію, інакше при подальшому спалюванні органічної речовини сірчаною кислотою вони, взаємодіючи з нею, утворять кристали гіпсу та сульфату магнію, які, забруднять досліджуваний матеріал і заважатимуть вивченню структури. Для відмивання пробу заливають 10%-ним розчином соляної кислоти, об'єм якої повинен бути приблизно у 1,5 рази більшим, ніж об'єм суспензії (наприклад 3 мл розчину кислоти на 2 мл суспензії). Горловини бюксів вмотують парафіном, щоб запобігти зайвому випаровуванню кислоти, і поміщають їх на одну годину до термостата, попередньо прогрітого до 80°C.

Охололі проби відмивають від кислоти, осаджуючи теки при 3 тис. об. на хвилину протягом п'яти хвилин. Далі зразки відмивають від залишків соляної кислоти дистильованою водою та центрифугуванням. Процедуру повторюють мінімум три рази (по 5 хв 3 тис. об. на хвилину).

Після цього потрібно звільнити пробу від органіки. Найефективнішим способом досягти цього є обробка концентрованою сірчаною кислотою за підвищеної температури – осад у бюксах після останнього відмивання від соляної кислоти, заливають 5 мл концентрованої сірчаної кислоти. Для ефективнішого очищення можна використати ультразвукову обробку, однак ця процедура не є обов'язковою. Ми застосовували обробку протягом однієї хвилини у приладі УЗДН-А. Потужність опромінення ультразвуком не перевищувала 3/10 максимальної потужності апарату (130 Вт). Після додавання кислоти зразки поміщають на добу у термостат розігрітий до 80-90°C.

Якщо після перебування у термостаті осад не повністю втратить колір, рекомендують додати у кожний зразок по декілька кристалів біхромату калію і витримати у термостаті ще протягом кількох годин, час від часу, обережно струшуючи. Коли осад повністю втратить колір, його відмивають дистильованою водою до повного видалення слідів кислоти (3-4 зміни води). Перше центрифугування з кислотою повинно тривати не менше п'яти хвилин при 3 тис. об. на хвилину, так як кислота має значну густину, відповідно швидкість седиментації панцирів зменшується. Наступні центрифугування можуть тривати по три хвилини кожне.

Очищені панцирі зберігають у спирті або сухими у маленьких скляних баночках, ретельно закритими і підписаними. У випадку, коли дослідження планується найближчим часом, панцирі можна залишити у дистильованій воді. Об'єм залежатиме від густини суспензії, однак зазвичай досить двох мл води.

Однією з модифікацій даного методу, яка дає певний вигреш у часі, є витримання залитих концентрованою сірчаною кислотою панцирів при температурі, що перевищує 100°C. Такі умови досягаються при застосуванні електроплити або нагрівача для гістологічних робіт та бані з піском, куди поміщаються термостійкі бюкси. Дану процедуру можна проводити лише за наявності витяжної шафи.

ДОДАТКИ

I. Розведення етилового спирту

Етиловий спирт широко застосовується при виготовленні анатомічних та цитологічних препаратів, зневодненні об'єктів при їх заливанні в полімерні смоли. При виготовленні спиртів різної концентрації слід користуватися таблицею 2. В ній вказано, скільки мілілітрів спирту даної концентрації треба взяти, щоб, доливши об'єм дистильованою водою до 100 мл, отримати потрібну кінцеву концентрацію.

Таблиця 2. Розведення етилового спирту дистильованою водою (за Навашиним)

Потрібна концентрація спирту, °	Вихідна концентрація спирту, °									
	95-96	90	85	80	75	70	65	60	55	50
90	94	—	—	—	—	—	—	—	—	—
85	88	94	—	—	—	—	—	—	—	—
80	83	89	94	—	—	—	—	—	—	—
75	78	83	88	94	—	—	—	—	—	—
70	73	78	82	87	93	—	—	—	—	—
65	68	72	76	81	86	93	—	—	—	—
60	62	67	71	75	80	86	92	—	—	—
55	57	61	65	69	73	79	85	92	—	—
50	52	55	59	62	67	71	77	83	91	—
45	47	50	53	56	60	64	69	75	82	90
40	42	44	47	50	53	57	61	67	73	80
35	37	39	41	44	47	50	54	58	64	70
30	31	33	35	37	40	43	46	50	55	60
25	26	28	28	31	33	36	38	42	45	50
20	21	22	23	25	27	29	31	33	36	40
15	16	17	18	19	20	21	23	25	27	30
10	10	11	12	12	13	14	15	17	18	20

II. Приготування зневодненого (абсолютного) етилового спирту

Абсолютний етиловий спирт можна отримати з 96°-ного етилового спирту дією безводного мідного купоросу. Для отримання безводного купоросу треба прожарити в порцеляновій чашці хімічно чистий кристалічний мідний купорос у

термостаті. Прожарювання слід проводити протягом доби за температури 110-120°C.

Якщо немає термостату, прожарювання можна провести на пальнику, або електричній плитці під витяжкою за підвищеної температури протягом двох годин. Однак, у цьому випадку, нагрівати і прожарювати купорос потрібно дуже обережно, щоб не відбулося відновлення мідного купоросу до окису міді.

Прожарений мідний купорос повинен мати вигляд порошку білого кольору з незначним, ледве помітним блакитним відтінком. Пожовтіння останнього є ознакою псування реактиву. Після охолодження отриманий купорос зсипають до скляної посудини із притертою пробкою, краще об'ємом до 1000 мл. Насипати потрібно приблизно 1/3 об'єму посудини. Потім наповнюють до верху 96°-ним спиртом, закривають, струшують та дають відстоятись. Приблизно за 2-3 доби приготований таким чином абсолютний спирт можна використовувати. По мірі використання абсолютного спирту, в скляну посудину можна доливати 96°-й. Однак слід пам'ятати, що за значної зміни кольору купоросу (посиніння), його слід знову прожарити.

III. Приготування 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (фосфатного) буферу; рН 5,8 – 8,0

Беруть наважки таких солей:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $M = 178,05$; відповідно 0,2 M розчин містить 35,61 г у 1000 мл дистильованої води, або 3,56 г у 100 мл.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $M = 138,0$; відповідно 0,2 M розчин містить 27,6 г у 1000 мл дистильованої води, або 2,76 г 100 мл.

Якщо в лабораторії немає цих солей, їх можна замінити аналогічними:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, $M = 358,22$; відповідно 0,2 M розчин містить 71,64 г у 1000 мл дистильованої води, або 7,16 г у 100 мл.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $M = 156,03$; відповідно 0,2 M розчин містить 31,21 г у 1000 мл дистильованої води, або 3, 12 г 100 мл.

Приготовані вихідні розчини змішують за об'ємним співвідношенням, згідно таблиці 3, залежно який рН кінцевого буферного розчину необхідно отримати. В більшості, випадків для фіксації рослинних тканин необхідний буферний розчин з рН від 7 до 7,4.

Значення рН отриманого розчину перевіряють за допомогою рН-метра, або точного індикаторного паперу, наприклад торгової марки Рehanon з діапазоном

вимірювання від 6,0 до 8,1. За необхідності відкориговують значення рН, додаючи автосамплером або шприцом певний об'єм того чи іншого вихідного розчину. Отриману буферну суміш розводять дистильованою водою до 200 мл для досягнення 0,1 М концентрації солей.

Таблиця 3. Об'єми вихідних розчинів солей для приготування фосфатного буферу

рН	0,2 М Na ₂ HPO ₄ , мл	0,2 М NaH ₂ PO ₄ , мл
5,8	8,0	92,0
6,0	12,3	87,7
6,2	18,5	81,5
6,4	26,5	73,5
6,6	37,5	62,5
6,8	49,0	51,0
7,0	61,0	39,0
7,2	72,0	28,0
7,4	81,0	19,0
7,6	87,0	13,0
7,8	91,5	8,5
8,0	94,7	5,3

IV. Приготування 0,1 М кокодилатного буферу

Крім фосфатного буферу на практиці електронної мікроскопії також широко використовують 0,1 М кокодилатний буферний розчин. Для приготування 100 мл розчину беруть 2,14 г кокодилату натрію (Na(CH₃)₂·AsO₂·3H₂O) та розчиняють його в 50 мл дистильованої води. Використовуючи рН-метр, доводять значення рН до необхідного рівня, додаючи 0,1 н-ний розчин соляної кислоти (приблизно 12,6 мл розчину HCl – рН 7,0; 8,3 мл – рН 7,2; 5,4 мл – рН 7,4). Після чого збільшують об'єм буферного розчину дистильованою водою до 100 мл.

V. Приготування суміші епоксидних смол епон-аралдит

Існує значна кількість способів приготування заливочної суміші смол. У типовій методиці фіксації (експрес-метод, розділ 2.4.) було подано один з варіантів співвідношення компонентів. Для приготування блоків середньої твердості можна застосувати дещо інший рецепт без MNA. З приготованих таким

чином блоків успішно отримують ультратонкі зрізи. Для 10 мл суміші беруть наступні компоненти в таких об'ємах:

- 1) Epon 812 – 3мл;
- 2) DDSA – 5мл;
- 3) Araldit M – 2мл;
- 4) DMP 30 – 10 крапель.

Полімеризація суміші відбувається у термостаті при 60° С протягом 12- 24 годин. Дана суміш відзначається вищою густиною порівняно з сумішшю, наведеною в експрес-методі підготовки зразків. Тому процес насичення рослинних тканин її компонентами та ацетоном у різних співвідношеннях повинен бути тривалішим (див. класичну схему на рис. 5). Проте, незалежно від складу суміші, надзвичайно важливою передумовою формування з неї однорідних блоків є ретельне перемішування компонентів цієї суміші. У разі звичайного перемішування вручну скляною паличкою процедура повинна тривати не менше 10 хвилин. Якщо є спеціальна електрична мішалка, то достатньо змішувати 5 хвилин.

VI. Очищення бленд та сіточок

Використані сіточки та бленди поміщають у 2-4 *n*-ний НСІ на 5 хв. Можна додати декілька крапель детергенту при відмиванні сіточок, що допоможе їм потонути. Потім промити декілька разів дистильованою водою. Після цього промити ацетоном і висипати сіточки на чашку Петрі, застелену фільтрувальним папером. Для запобігання злипанню сіточок, їх обережно розділяють пінцетом по одній та залишають на зберігання.

VII. Приготування формварової плівки

В практиці електронної мікроскопії в якості підложок під зрізи використовують полімерні плівки. Раніше широко використовували нітроцелюлозу (колодій), однак через недостатню механічну міцність вона була витіснена формваром. Тонкі прозорі підложки під зрізи отримують методом відшаровування формварової плівки зі скла на воду. Потім цією плівкою

вкривають сітки або бленди (рис. 22). Потрібно зауважити, що, оскільки розміри рослинних клітин можуть досягати значних розмірів, то при дослідженні цих об'єктів частіше використовують бленди. Саме на блендах можна безперешкодно отримати зображення зрізу цілої клітини, або фрагменту тканини на малих збільшеннях мікроскопа. Бленди також краще використовувати для дослідження серійних зрізів. Коли дослідника цікавлять окремі клітинні органели, то можна використовувати сітки. За умови використання сіток зрізи можна довше розглядати в самому мікроскопі без фотографування, оскільки формварова плівка на сітці є стабільнішою, ніж плівка на бленді. Формварова плівка, нанесена на сітки, стійкіша до нагрівання потоком електронів. Відповідно менше виникає таке явище, як дрейф зображення, внаслідок теплової деформації плівки і зрізів.

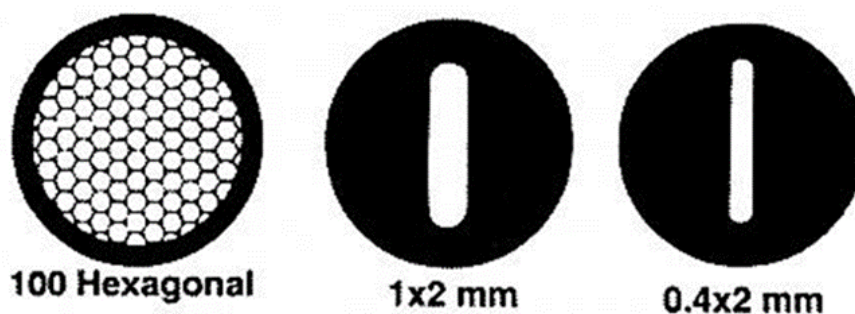


Рис. 22. Мідна сітка та бленди з отворами різних розмірів, які використовують в електронній мікроскопії для утримання ультратонких зрізів.

Для виготовлення плівки готують 0,3-1%-ний розчин формвару в дихлоретані чи хлороформі. Посудину з розчином потрібно зберігати закритою, інакше дуже леткий розчинник буде швидко випаровуватися. Концентрацію формвару можна міняти в розчині доти, поки не буде отримана плівка потрібної товщини. Важливо знайти баланс між товщиною плівки та міцністю. Тонша формварова плівка утворюється за низької концентрації формвару і, відповідно, вона менше поглинає потік електронів. З підвищенням концентрації розчину плівка буде товщою і надто інтенсивно поглинатиме та розсіюватиме електрони. Проте, як свідчить практика, з 0,5%-ного розчину формвару в дихлоретані чи хлороформі практично завжди можна отримати плівки достатньо тонкі для вивчення зрізів біологічного матеріалу у трансмісійному електронному мікроскопі.

Щоб відшарування формварової плівки від скла проходило без ускладнень, можна використовувати поверхнево активні речовини. Наприклад, невелику краплину типулу, або схожого з ним неіоногенного детергенту наносять на одну сторону предметного скла для світлового мікроскопа і розтирають пальцем по всій поверхні, щоб утворився тонкий шар цієї речовини. Надлишки детергенту видаляють чистою ганчіркою. Для приготування плівки також можна взяти половину скляної полоси для приготування ультрамікротомних ножів.

Скло занурюють в розчин формвару, виймають, дають стекти розчину на фільтрувальний папір і сушать протягом 5-10 хвилин у вертикальному положенні в захищеному від пилу місці. Лезом безпечної бритви або гострим пінцетом роблять надріз, паралельний краю скла, на тій його стороні, де під формваровою плівкою знаходиться шар детергенту (рис. 23 а).

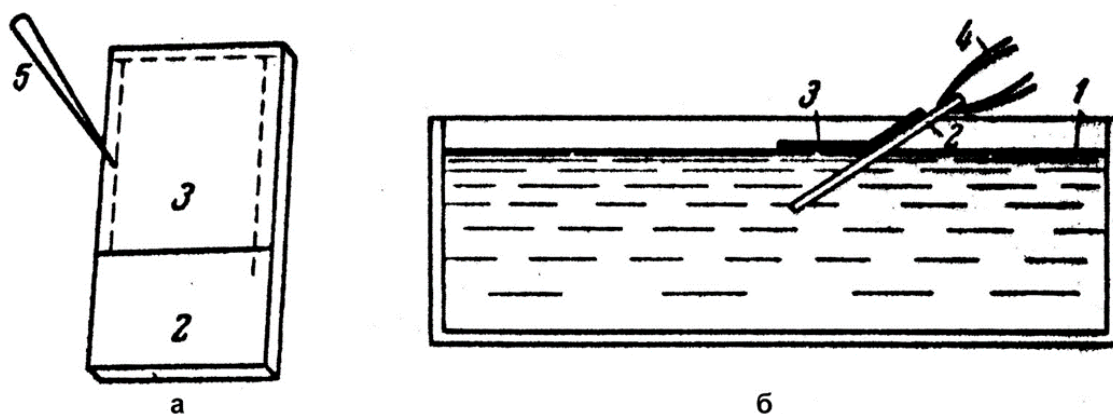


Рис. 23. Зрізання формварової плівки з країв пластини (а) і зняття плівки на поверхні води (б). 1 – вода; 2 скляна пластинка (предметне скло); 3 – формварова плівка; 4 – пінцет; 5 – лезо або гострий пінцет.

Перед зняттям плівки зі скла, поверхню дистильованої води, налітої в скляну чашку, очищають. Для цього краплю розчину формвару піпеткою наносять на поверхню води, де вона утворює тонку плівку, котра захоплює всі частинки пилу. За 2-3 хвилини, коли розчинник висохне, формварову плівку видаляють з поверхні. Після цього поверхня води готова для зняття плівки зі скла. Потрібно кілька секунд подихати на скло і, нахиливши його приблизно під кутом в 30° по відношенню до горизонтальної площини, повільно занурювати в чашку з дистильованою водою (рис. 23 б). Формварова плівка повинна відшаруватися на поверхню води. На плаваючу плівку опускають сітки або бленди. Легке натискання на кожну сітку/бленду пінцетом або голкою сприятиме утворенню якісного контакту між ними та плівкою. Прямокутний шматок щільного паперу опускають на плівку, чекають кілька секунд, а потім

перевертають, виймаючи разом з папером сітки вкриті тонкою плівкою. Непоганого результату можна досягти, використовуючи папір із перфокарт. Папір із сітками кладуть в чашку Петрі, де папір повинен підсохнути. В цій же чашці, підготовлені таким чином бленди і сітки можуть зберігатися. Їх також можна для додаткової міцності напилити вуглицем у вакуумному напилувачі.

Важливо, щоб сухий формвар, з якого готується запасний розчин, був свіжим. У випадку, якщо плівка не знімається зі скла, потрібно переконатися, чи скло не надто добре вимите. Наприклад, зі скла обробленого хромовою сумішшю для очищення плівку зняти практично неможливо. Якщо ж причина невдалої спроби приготування не в цьому, слід випробувати свіжу партію формвару. Коли в якості розчинника застосовується хлороформ, то для занурення скляної смуги краще користуватися достатньо високим циліндром. При цьому скло, занурене в розчин формвару, повинно бути просушеним у самому циліндрі перед тим, як воно буде остаточно вийнято з посудини. Саме таке просушування в атмосфері, насиченій парами хлороформу, дозволяє уникнути формування неоднорідної за товщиною плівки і нерівномірного випаровування розчинника.

VIII. Приготування скляних ножів

Для приготування ультрамікротомних ножів використовується скло, яке виготовляє ряд фірм, наприклад американська компанія Ted Pella Inc., тому його можна замовити у спеціалізованих постачальників. Найчастіше використовують скло у вигляді смуг, розміром 6,3мм×25мм×400мм. Скло для ножів повинно бути чистим, перед використанням його добре промивають мильним розчином, ретельно споліскують водою та сушать за кімнатної температури. Готують скляні ножі за допомогою спеціального механічного приладу, який дозволяє отримати шматки скла потрібного розміру та правильної форми. Першим етапом приготування ножа є розламування скляної смуги на квадрати. Другим етапом є власне розділення скляних квадратів на трикутні ножі. Перед виготовленням ножів необхідно ретельно вивчити інструкцію з експлуатації, складену виробником приладу для виготовлення ножів (найфмейкера). Як свідчить практика, саме це забезпечує 90% успіху в цій справі.

Після виготовлення ножа бажано перевірити якість його леза. Зробити це можна під бінокуляр за допомогою бічного освітлення. Якісний ніж має, як правило, прямий скол. Освітлене лезо якісного ножа під мікроскопом має вигляд прямої світлої лінії. Якщо лезо ножа має зазубрини, його відбраковують. У

більшості випадків найбільш придатною для отримання ультратонких зрізів є ділянка леза, розташована в районі виходу хвилі розлому (рис. 24, 25).

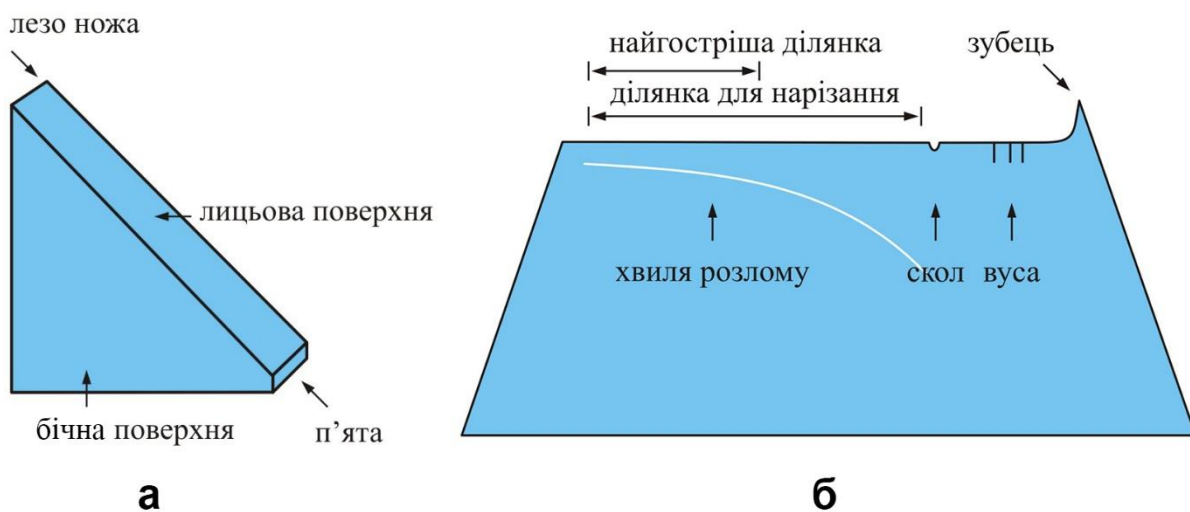


Рис. 24. Скляний ніж для нарізання зрізів в ультрамікромтомні (а) та умовна схема його леза (б) зі сторони лицьової поверхні.

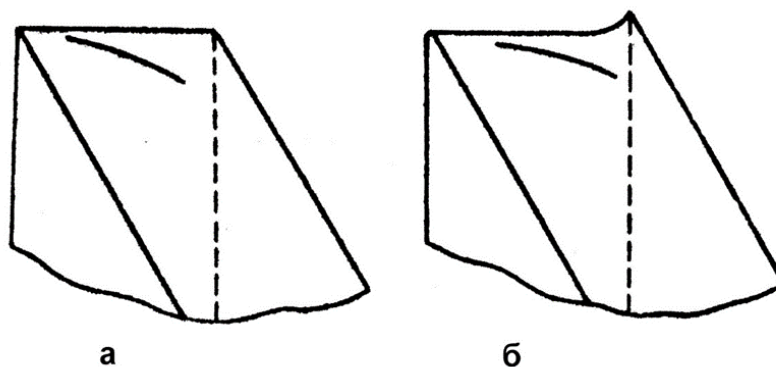


Рис. 25. Якісний ніж (а) для приготування ультратонких зрізів; неякісний ніж із «зубцем» (б), за допомогою котрого можна отримувати напівтонкі зрізи, товщиною 1 мкм і більше.

Після перевірки якості ножів на них монтують ванночки. Для цього використовують спеціальну стрічку-скоч шириною 10 мм, один бік якої є адгезивним і легко приклеюється до поверхні скла. Шматок стрічки довжиною 40-45 мм наклеюють на бічній грані ножа так, щоб верхній край стрічки був на рівні леза (рис. 26).

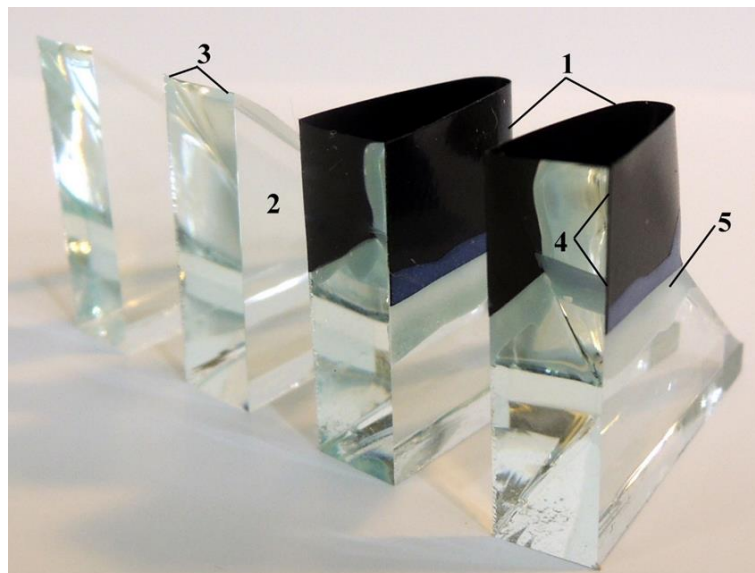


Рис. 26. Монтування ванночки на скляному ножі: 1 – полімерна стрічка; 2 – бічна поверхня ножа; 3 – лезо ножа; 4 – лінія відрізу стрічки (може співпадати з ребром ножа); 5 – парафін або лак для нігтів.

Зайві шматки стрічки, що виступають, швидким рухом зрізають за допомогою леза для безпечної бритви. Нижній край стрічки заливають акуратно у парафін за допомогою розігрітого у полум'ї пальника гістологічного шпателя, або використовують лак для нігтів без ефіроолійних компонентів. Ніж з ванночкою готовий до використання. При виготовленні ванночки, особливу увагу потрібно звертати на те, щоб не пошкодити і не забруднити лезо ножа.

ІХ. Робота з діамантовим ножем, його очищення

Крім скляних ножів для роботи в ультрамікроскопі використовують ножі, виготовлені із штучного алмазу (діаманту). За їх допомоги вдається отримати першокласні зрізи для електронної мікроскопії. На відміну від одноразових ножів, виготовлених зі скла, діамантові ножі при правильному і обережному ставленні можна використовувати протягом кількох років. Для отримання ультратонких (до 250 нм) та напівтонких (до 5 мкм) зрізів використовують різні типи ножів. В жодному разі ножем, призначеним для отримання ультратонких зрізів, не можна нарізати зрізи товстіші за 250 нм, це відразу зіпсує ніж. На гостроту ножа мало впливатиме загальна кількість отриманих з його допомогою зрізів, псування леза залежатиме головним чином від порушень правил роботи. Для того, щоб робота з діамантовим ножем для приготування ультратонких зрізів була вдалою і ніж служив протягом тривалого часу, потрібно:

- У жодному разі не доторкатися пальцями, інструментами, блендами та одягом до ріжучого леза ножа;
- Кут нахилу ножа та швидкість нарізання повинні бути такими, які вказані на виробником на упаковці;
- Зберігати ніж завжди у його боксі, котрий поставляється виробником;
- Максимально зменшувати розмір площини нарізання, що зменшує тиск на ріжучу поверхню ножа;
- Товщина зрізів м'яких полімерних блоків не повинна перевищувати 200 нм, твердих – 100 нм;
- Повторно підводити ніж до блоку при будь-яких маніпуляціях зі зміною положення та нахилу блоку та при позиціонуванні ножа.

Очистка діамантового ножа:

- Перед початком нарізання його потрібно промити 0,1%-ним розчином Triton X100 (неіоногенний детергент) у дистильованій воді. Потім промити великою кількістю дистильованої води – це видалить забруднення та покращить змочуваність леза ножа;
- Після відбору зрізів потрібно переконатися, що жодного зрізу чи його частин на залишилося біля ріжучої поверхні. При необхідності їх можна обережно видалити волосиною. Крім того, не можна відбирати рідину з ванночки діамантового ножа, якщо в ній знаходяться зрізи, це може викликати їх налипання на ріжучу поверхню ножа.
- Не можна допускати зниження рівня рідини у ванночці, це може призвести до налипання зрізів на ріжучу поверхню ножа;
- Після закінчення нарізання потрібно видалити всі зрізи з ванночки ножа. Рідину злити через задню протилежну від ріжучої поверхні стінку ванночки. Промити ніж дистильованою водою та витерти шматком тканини, не намагаючись прибрати вологу біля ріжучої поверхні.

Х. Приготування розчину цитрату свинцю (контрастеру для зрізів)

Для приготування 50 мл розчину контрастеру беруть 1,33 г нітрату свинцю ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), і 1,76 г цитрату натрію ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Заливають наважки речовин 30 мл дистильованої та дегазованої витримуванням 4 год. в термостаті при 95 °С води, або просто теплої попередньо прокип'яченої дистильованої води. Суміш час від часу струшують протягом 30 хв. За цей час утворюється осад

цитрату свинцю. Далі додають по краплинах 8 мл 1 н-го розчину гідроксиду натрію (NaOH). Після цього осад починає швидко розчинятися і розчин стає прозорим. На даному етапі є бажаним контроль рН розчину. Оптимальне значення рН 12. Якщо маємо таке значення додавши менший об'єм, ніж 8 мл 1 н-го розчину гідроксиду натрію, то більше його додавати не потрібно. Доводять об'єм до 50 мл дистильованою водою. Після повного розчинення осаду рекомендують центрифугувати отриманий розчин для повного видалення твердих нерозчинних часток. Однак ця процедура є не обов'язковою. Готовий розчин може зберігатися у холодильнику до шести місяців.

Рекомендована література та посилання на веб-ресурси

- Гайер Г. Электронная гистохимия. – Москва : Мир, 1974. – 488 с.
- Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – Москва : Мир, 1975. – 324 с.
- Хокс П. Электронная оптика и электронная микроскопия. – Москва : Мир, 1974. – 319 с.
- Ayache J., Beaunier L., Boumendil J., Ehret G., Laub D. Sample preparation. Handbook for transmission electron microscopy. – New York : Springer Science and Business Media, 2010. – 338 p.
- Carde J.-P. Electron microscopy of plant cell membranes // Methods in enzymology. – 1987. Vol. 148 (Plant cell membranes). – P. 599–625.
- Evert R. F. Esau's plant anatomy. Third edition. – Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. – 607 p.
- Newman G. R. White Embedding Medium for Colloidal Gold Methods // Methods and Applications. Vol. 2, M.A. Hayat, ed. Academic Press, Inc., New York, 1989. – P. 48–71.
- Stern K. R., Jansky S., Bidlack J. E. Introductory plant biology. – New York: McGraw-Hill, 2003. – 624 p.
- Introduction to electron microscopy for biologist. Method in cell biology: ed. T.D. Allen. – Vol. 88, 2008. – 531 p.
- Ted Pella, Inc. Microscopy Products for Science and Industry // www.tedpella.com/ – великий виробник товарів і обладнання для мікроскопії та мікроскопічних лабораторій, власник торгової марки PELCO.
- Electron microscopy sciences // www.emsdiasum.com/microscopy/default.aspx – виробник і дистриб'ютор обладнання та витратних матеріалів для мікроскопії.
- Electron microscopy sciences / Critical Point Drying Principles // www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/critical_drying.aspx – принципи підготовки зразків для СЕМ методом критичної точки вуглекислого газу.
- JEOL Products // www.jeol.co.jp/en/products/ – виробник трансмісійних і сканувальних електронних мікроскопів, іншого наукоємного обладнання.
- Tescan // www.tescan.com/en – провідний європейський виробник сканувальних електронних мікроскопів та обладнання для мікроаналізу поверхні об'єктів.
- Scanning Electron Microscope Info // www.mos.org/sln/SEM/seminfo.html.
- The Transmission Electron Microscope // nobelprize.org/educational_games/physics/microscopes/tem/index.html.
- The Virtual Electron Microscope // school.discoveryeducation.com/lessonplans/activities/electronmicroscope.
- The development of the electron microscope and of early electron microscopy (Nobel lecture, December 8, 1986, by Ernst Ruska) // ernst.ruska.de/daten_e/library/documents/999.nobellecture/lecture.html.

Наукове видання

ЩЕРБАТЮК Микола Миколайович

БРИКОВ Василь Олександрович

МАРТИН Геннадій Гнатович

**Підготовка зразків рослинних
тканин для електронної мікроскопії
(теоретичні та практичні аспекти)**

Методичний посібник

Відповідальні редактори: М. М. Щербатюк, В. О. Бриков

Редактор – Ю. К. Куцоконь

Верстка – Ю. К. Куцоконь

Підписано до друку 10.12.2015 р.

Формат 60×84/16. Умов. друк. арк. 3,6

Наклад 150 прим. Зам. № 82.12-15

Видавець і виготовлювач ТОВ «Талком»

03115, м. Київ, вул. Львівська, 23, тел./факс (044) 424-40-69, 424-56-26

E-mail: ukraina.vdk@mail.ru

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4538 від 07.05.2013



Інститут ботаніки
ім. М. Г. Холодного