

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
Факультет естественных наук

**ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ
В ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Методическое пособие

К.Н. Морозова

Новосибирск
2013

ББК

УДК [57.086.3, 57.086.1, 576.31]

Д

Электронная микроскопия в цитологических исследованиях: методическое пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2013. 85 с.

(«Большой цитологический практикум»)

Методическое пособие предназначено для студентов 4-го курса биологического отделения Факультета естественных наук, проходящих практикум по электронной микроскопии в рамках «Большого цитологического практикума». Методическое пособие состоит из вводной части, освещающей историю возникновения и основные принципы электронной микроскопии; основной части, содержащей иллюстрированный обзор методик и подробные протоколы пробоподготовки различных биологических объектов, и заключительной части с общими рекомендациями и списком литературы, в том числе перечнем Интернет-ресурсов, посвященных электронной микроскопии. Методическое пособие рекомендовано всем специалистам, начинающим заниматься электронно-микроскопическими исследованиями биологических объектов.

Методическое пособие разработано в рамках реализации Программы развития НИУ НГУ.

© Новосибирский государственный университет, 2013

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1.1. История электронной микроскопии.....	8
1.2. Принципы электронной микроскопии.....	12
1.3. Применение электронных микроскопов	17
1.3.1. Просвечивающий электронный микроскоп Libra 120	18
2. МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	20
2.1. Сетки.....	21
2.2.1. Приготовление формварных пленок для сеточек ...	22
2.2. Негативное окрашивание	26
2.3. Заключение в смолу	29
2.3.1. Химическая фиксация	29
2.3.2. Постфиксация	31
2.3.3. Дегидратация и заключение в смолу	33
2.3.4. Подготовка ооцитов шпорцевой лягушки <i>Xenopus laevis</i> для электронно-микроскопического анализа	35
2.3.5. Заточка блоков с образцом	36
2.3.6. Приготовление ножей	36
2.3.7. Получение ультратонких срезов	40
2.4. Контрастирование срезов	47
2.5. Иммуноэлектронное мечение.....	49
2.5.1. Иммуномечение золотом на срезах	50
2.6. Криоэлектронная микроскопия	55
2.6.1. Метод криосрезов.....	57

2.6.2.	Замораживание-замещение.....	57
2.6.3.	Замораживание-скальвание (метод реплики).....	58
2.6.4.	Оттенивание тяжелыми металлами	60
2.7.	Меры безопасности при подготовке электронно-микроскопических образцов	62
2.8.	Визуализация в электронном микроскопе	63
2.9.	Электронно-микроскопическая томография.....	64
2.10.	Сканирующая электронная микроскопия	67
2.10.1.	Подготовка объектов для сканирующей электронной микроскопии.....	70
2.10.2.	Элементный микроанализ.....	71
2.11.	Стереология.....	71
2.12.	Коррелятивная световая и электронная микроскопия	80
2.13.	Интерпретация в электронной микроскопии	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		83
Интернет-ресурсы по электронной микроскопии		84
Список литературы.....		84

ВВЕДЕНИЕ

Спектр электронно-микроскопических методов, применяемых в цитологии и клеточной биологии, крайне широк. Большинство методов технически достаточно трудоемки. Данное методическое пособие раскрывает основы электронной микроскопии и покрывает все основные ее методы, применяемые в цитологических исследованиях. Основной упор делается на приготовление образцов, на пояснение принципа действия каждого из методов и на его основное применение. Для наглядности приводятся электронно-микроскопические фотографии.

Все методы приготовления образцов для просвечивающей электронной микроскопии условно разделены на два фундаментальных блока – методы химической обработки и методы криофиксации. Также рассказывается о методах посвящен сканирующей электронной микроскопии. Подробно описан метод детектирования антигенов посредством иммуномечения.

Отдельный раздел посвящен подготовке сеточек, на которые помещаются образцы для анализа в электронном микроскопе. Также пособие знакомит читателя с достаточно новым направлением – электронной томографией, позволяющей воссоздавать трехмерные модели из серии наклоненных под разными углами изображений.

Большой раздел занимает стереология, которая позволяет оценить количественные параметры клеточных структур по срезам.

В заключении освещена проблема интерпретации ультратонких срезов и дано краткое руководство, какие техники предпочтительнее для каких объектов и задач, а также приводится список рекомендованной литературы и интернет-ресурсов..

Большинство органелл, открытых после 1945 года, были впервые увидены под электронным микроскопом на тонких срезах залитых в смолу клеток. С этого времени и сами электронные микроскопы, и приборы для подготовки образцов значительно эволюционировали совместными усилиями физиков, инженеров и биологов. Современные методы позволяют цитологам и клеточным биологам визуализировать самые недоступные клеточные структуры во всех измерениях, начиная от атомного разрешения, в случае одиночных молекул и макромолекулярных комплексов, и заканчивая крупными органеллами. Электронная микроскопия позволяет получить разрешение, на несколько порядков превосходящее максимальное разрешение лучших световых микроскопов.

Электронная микроскопия незаменима в цитологии и клеточной биологии, поскольку предоставляет невероятные возможности для анализа ультраструктуры клеток и их компонентов. Методы электронной микроскопии позволяют покрыть весьма широкий спектр объектов. Ниже представлена сравнительная шкала размеров, из которой виден диапазон объектов, которые можно исследовать в электронном микроскопе.

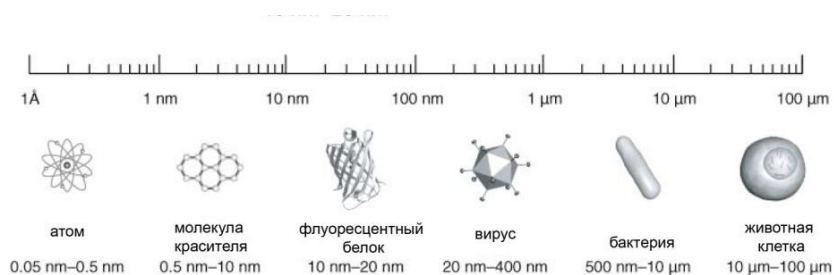


Рис. 1. Шкала размеров объектов, изучаемых в электронном микроскопе

Световая микроскопия, несмотря на все свои достоинства, имеет ограничения. Теоретически разрешающая способность микроскопа составляет примерно половину длины волны луча, применяемого для освещения объекта. Длины волн видимой области спектра находятся в пределах от 400 до 700 нм. Следовательно, наилучшее разрешение, которого можно достичь с помощью светового микроскопа, равно приблизительно 200 нм и даже наиболее мощные оптические микроскопы не могут обеспечить наблюдение деталей с размером менее 0.2 мкм.

Для электронного микроскопа длина волны электрона выражается формулой

$$\lambda = h / mv$$

Применительно к электрону, ускоренному благодаря разнице потенциалов

$$\lambda = \frac{12.25}{\sqrt{U}} \left(1 - 0.489 \cdot 10^{-6} U \right)$$

Для биологических объектов обычно работа с микроскопом идет при напряжении 80-100 кВ, тогда для $U=100\text{kV}$ $\lambda=0.039\text{\AA}$, разрешение $\approx 0.02\text{\AA}$ (теоретически). Таким образом, теоретически разрешение электронного микроскопа может составлять всего 0.002 нм. При помощи просвечивающего электронного микроскопа впервые было получено наглядное изображение отдельных атомов.

Оба метода, и световая, и электронная микроскопия безусловно, предоставляют важную информацию, но на разных, взаимодополняющих уровнях. Световая микроскопия позволяет увидеть картину целиком, в том числе понаблюдать за живыми клетками, а электронная микроскопия позволяет разглядеть

мельчайшие детали внутриклеточной организации. На ультратонких срезах можно выявить огромное количество деталей, разглядеть все структуры, будь то мембранные структуры, филаменты или рибосомы. При мечении антителами в случае иммуноэлектронной микроскопии на срезах можно определить локализацию искомым структур с точность от 8 до 20 нм.

Методы электронной микроскопии находятся в постоянном развитии, и лишь немногие лаборатории в мире способны постоянно поддерживать на высочайшем уровне электронно-микроскопические исследования.

1.1. История электронной микроскопии

В основе теории электронной микроскопии лежат работы выдающихся физиков, лауреатов Нобелевской премии Томсона, открывшего в 1898 году электрон; Э. Резерфорда, создателя планетарной модели атома; и Луи де Бройля, установившего в начале 1920-х годов волновую природу электронного пучка. Хронология событий, ставших предпосылкой для создания электронного микроскопа, представлена в таблице.

В 1931 году, то есть менее чем через десятилетие после открытия волновой природы электронов, М. Кноль и Е. Руска в Германии сконструировали и построили первый электронный микроскоп с магнитными линзами и получили первые изображения (рис. 2). Хотя этот микроскоп был примитивным и не подходил для практических нужд, он был способен увеличивать объекты в 400 раз. Вскоре были получены и первые электронные микрофотографии биологических объектов. В 1939 году фирма «Сименс» в Германии выпустила первую промышленную модель просвечивающего электронного микроскопа с высоким разрешением (20 нм), разработанную Б. Боррисом и Е. Руской (рис. 3). Во время Второй мировой войны установка была уничтожена и работы по электронной микроскопии прекращены.

Дата	Имя	Событие
1897	Дж. Томпсон	Открыл электрон
1911	Н. Бор, Резерфорд	Создали планетарную модель атома
1924	Луи де Бройль	<p>Установил длину волны движущихся электронов</p> $\lambda = h/mv$ <p>λ – длина волны h – постоянная Планка m – масса v – скорость (при 60 кВ $\lambda = 0.005$ нм)</p>
1926	Х. Буш	Создал первую электромагнитную линзу, фокусирующую электронные лучи
1931	М. Кноль, Е. Руска	Сконструировали первый электронный микроскоп
1931	Дэвиссон, Кларк	Описали свойства электростатических линз
1934	Драйст, Мюллер	Превзошли разрешение световых микроскопов
1939	Б. Боррис, Е. Руска	Первый коммерческий электронный микроскоп (Siemens) – разрешение 20 нм
1942	СССР	Первый советский электронный микроскоп, увеличение 10000 раз.



Рис. 2. Первый электронный микроскоп, созданный М. Кнолем и Е. Руской в 1931 г. в Германии.

В это же время в Советском Союзе, в осажденном Ленинграде создавался отечественный электронный микроскоп. Курировало и финансировало эти работы министерство оборонной промышленности. Первый отечественный микроскоп с электромагнитной оптикой был принципиально новым и давал увеличение до 10000 раз. Работа над ним не прекращалась даже в тяжелейшие годы войны и блокады, что позволило уже в 1943 году построить вторую, более совершенную модель электронного микроскопа с увеличением в 25000 раз, приспособленную для проведения серийных электронно-микроскопических исследований. Уже позднее производство микроскопов поставили на поток. Лучшими отечественными электронными микроскопами были СУМы производства Сумского завода электроприборов.

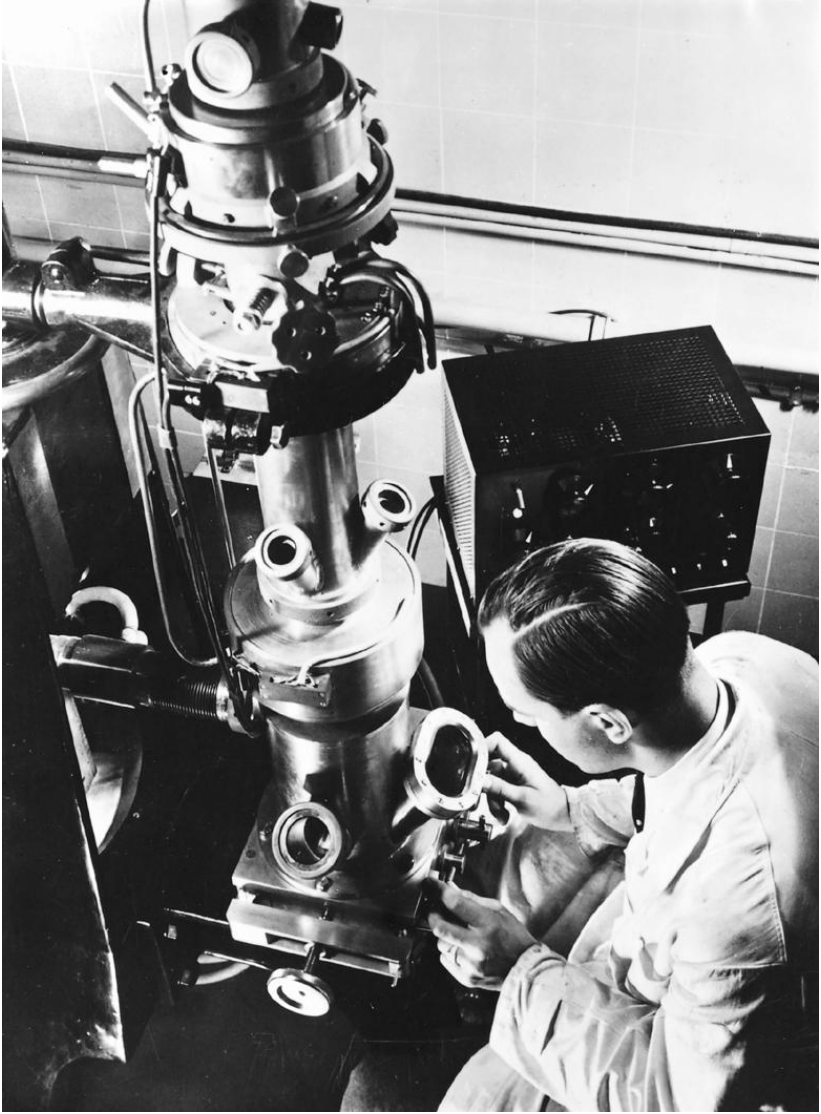


Рис. 3. Первый коммерческий электронный микроскоп (фирмы Siemens, 1939 год).

Первые микроскопы давали очень сильное электромагнитное излучение, поэтому при работе с ними приходилось ставить защитные свинцовые экраны. В современных электронных микроскопах свинцовая броня зашита в колонну микроскопа.

На сегодняшний день основными производителями электронных микроскопов являются фирмы JEOL, HITACHI, американская компания FEI и немецкий концерн Carl ZEISS. Хотя современные электронные микроскопы могут увеличивать объект до 2 млн раз, все они построены по прототипу микроскопа Руски.

1.2. Принципы электронной микроскопии

Электронный микроскоп – это электронно-оптический прибор, в котором электроны с энергией в мегавольты образуют пучки, давая увеличенное изображение микроскопического объекта на флуоресцентном экране. Просвечивающий электронный микроскоп во многом подобен световому микроскопу, но в отличие от светового микроскопа, для освещения образцов в нем используют не свет, т.е. поток фотонов, а потоки электронов, а вместо стеклянных линз – электромагнитные. Электронное изображение формируется электрическими и магнитными полями примерно так же, как световое – оптическими линзами.

Схема просвечивающего электронного микроскопа представлена на рисунке 4, сравнение светового и электронного микроскопа – на рисунке 5.

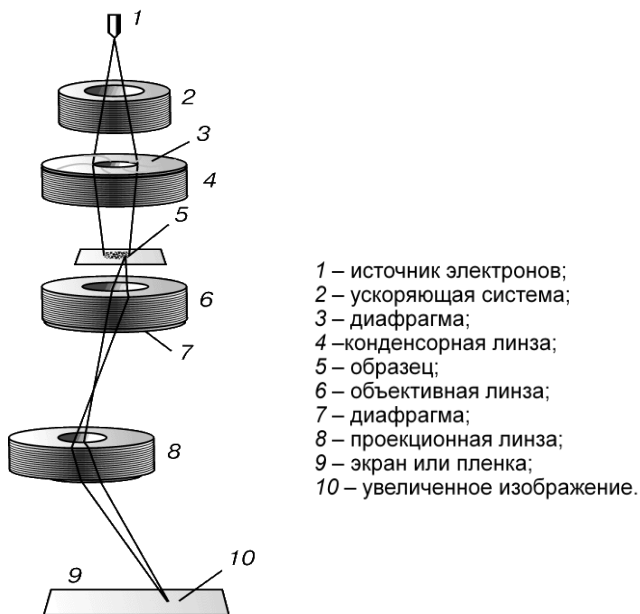


Рис. 4. Схема просвечивающего электронного микроскопа.

В просвечивающем электронном микроскопе имеются электронный прожектор, ряд конденсорных линз, объективная линза и проекционная система, которая соответствует окуляру, но проецирует действительное изображение на люминесцентный экран. Источником электронов обычно служит нагреваемый катод из вольфрама или гексаборида лантана. Катод электрически изолирован от остальной части прибора, и электроны ускоряются сильным электрическим полем. Для создания такого поля катод поддерживают под напряжением порядка 100 кВ относительно других электродов, фокусирующих электроны в узкий пучок. Эта часть прибора называется электронным прожектором. Поскольку электроны сильно рассеиваются веществом, в колонне микроскопа, где движутся электроны, должен быть вакуум. Здесь

поддерживается давление, не превышающее одной миллиардной атмосферного.

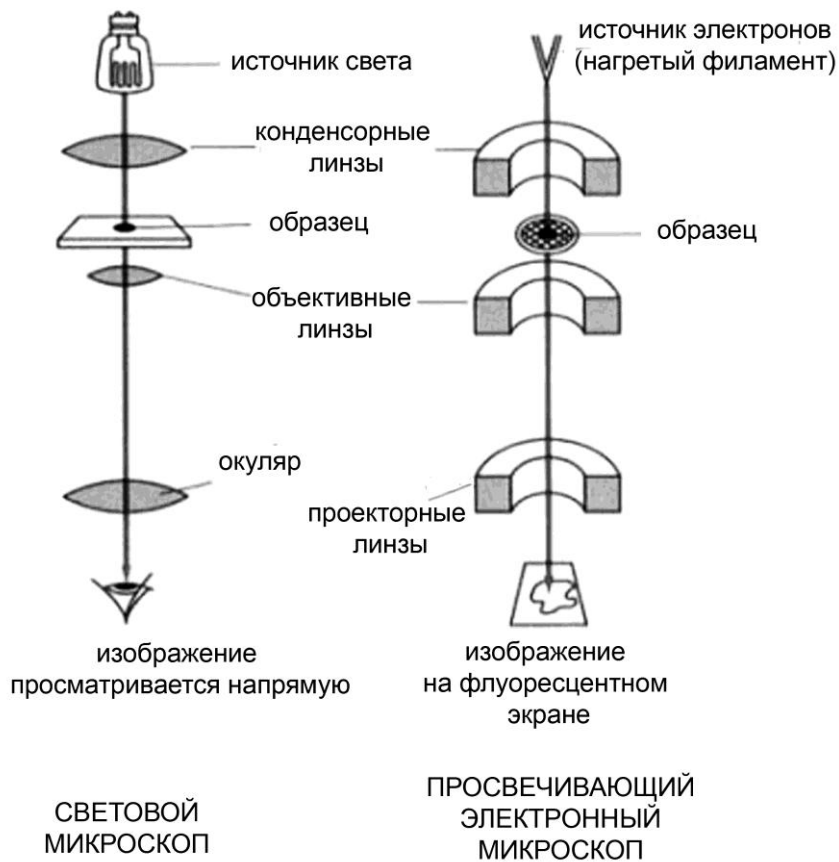


Рис. 5. Световой и просвечивающий электронный микроскопы: сравнение.

Электромагнитная линза представляет из себя несколько тысяч витков проволоки, по которым проходит ток, создавая магнитное поле, которое отклоняет и фокусирует пучок электронов так же, как стеклянная линза фокусирует световой пучок (рис 6).

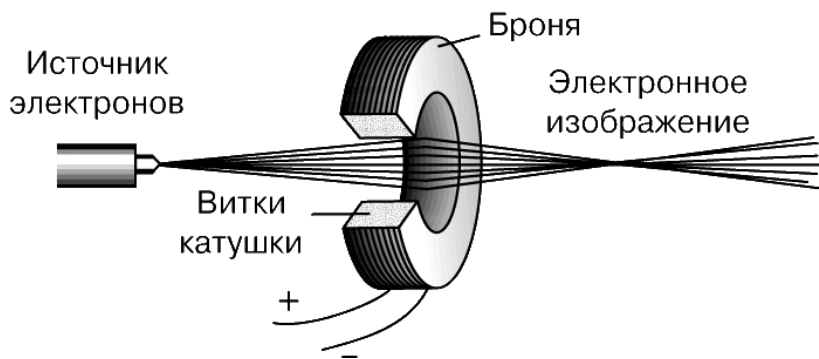


Рис. 6. Электромагнитная линза.

Магнитное поле, создаваемое витками катушки, по которой проходит ток, действует как собирающая линза, фокусное расстояние которой можно изменять, меняя ток. Поскольку оптическая сила такой линзы, т.е. способность фокусировать электроны, зависит от напряженности магнитного поля вблизи оси, для ее увеличения желательно сконцентрировать магнитное поле в минимально возможном объеме. Практически это достигается тем, что катушку почти полностью закрывают магнитной «броней» из специального никель-кобальтового сплава, оставляя лишь узкий зазор в ее внутренней части. Создаваемое таким образом магнитное поле может быть в 10-100 тыс. раз более сильным, чем магнитное поле Земли на земной поверхности.

Ряд конденсорных линз (на схеме показана лишь последняя) фокусирует электронный пучок на образце. Обычно первая из них создает неувеличенное изображение источника электронов,

а последняя контролирует размер освещаемого участка на образце. Диафрагмой последней конденсорной линзы определяется ширина пучка в плоскости объекта. Образец помещается в магнитном поле объективной линзы с большой оптической силой – самой важной линзы просвечивающего электронного микроскопа, которой определяется предельное возможное разрешение прибора. Аберрации объективной линзы ограничиваются ее диафрагмой так же, как это происходит в фотоаппарате или световом микроскопе. Объективная линза дает увеличенное изображение объекта (обычно с увеличением порядка 100), дополнительное увеличение, вносимое промежуточными и проекционной линзами, лежит в пределах величин от несколько меньшей 10 до несколько большей 1000. Таким образом, максимальное увеличение, которое можно получить в современных просвечивающих микроскопах, составляет порядка 1000000 раз.

Электроны ускоряются, а затем фокусируются магнитными линзами. Увеличенное изображение, создаваемое электронами, которые проходят через диафрагму объектива, преобразуется люминесцентным экраном в видимое или регистрируется на фотопластинке.

Контраст изображения в просвечивающем электронном микроскопе обусловлен рассеянием электронов при прохождении электронного пучка через образец. Проходя через образец, одни электроны пролетают беспрепятственно сквозь него, другие рассеиваются. Степень рассеяния зависит от толщины образца, его плотности и средней атомной массы в данной точке. Участки повышенной плотности, увеличенной толщины, места расположения тяжелых атомов выглядят на изображении как темные зоны на светлом фоне. Окончательное увеличенное электронное изображение преобразуется в видимое посредством люминесцентного экрана, который светится под действием электронной бомбардировки. Это изображение, как правило, рассматривают через бинокуляр. Окончательное изображение регистрируется на фотопластинке или на мониторе компьютера. В последнем случае используется чувствительная

CCD камера, отображающая картину в живом времени на мониторе.

1.3. Применение электронных микроскопов

В настоящее время электронные микроскопы являются немаловажной составляющей многих передовых лабораторий. Их используют для исследования биологических образцов, мельчайших микроорганизмов, молекул, клинических препаратов, кристаллических структур и для характеристики различных поверхностей. Также электронные микроскопы широко используются для обследования технического соответствия и анализа дефектов и неисправностей в индустрии, к примеру, при производстве полупроводников. Способность определять положение отдельных атомов внутри материала делает электронные микроскопы незаменимыми в нанотехнологиях.

Что касается биологических исследований, электронная микроскопия незаменима в цитологии, клеточной биологии, ботанике, энтомологии, молекулярной биологии и микробиологии. С развитием иммуноэлектронной микроскопии появилась возможность локализовать интересующую молекулу с точностью до нескольких нанометров. В медицине электронно-микроскопический анализ применяется в токсикологии, гематологии, для диагностики, определения элементного состава тканей, выявления инородных веществ, в патоморфологии, а также для фармацевтического контроля качества и т.д.

1.3.1. Просвечивающий электронный микроскоп Libra 120

Имеющийся в распоряжении ФЕН НГУ просвечивающий электронный микроскоп Libra 120 (ZEISS, Germany) относится к новому поколению просвечивающих электронных микроскопов. Это современный аналитический просвечивающий электронный микроскоп с энергетическим Омега-фильтром, предназначенный для проведения рутинных и научных исследований в естественных, в частности биологических, науках, а также в материаловедении и др.

Схема электронного микроскопа Libra 120 представлена на рисунке 7.

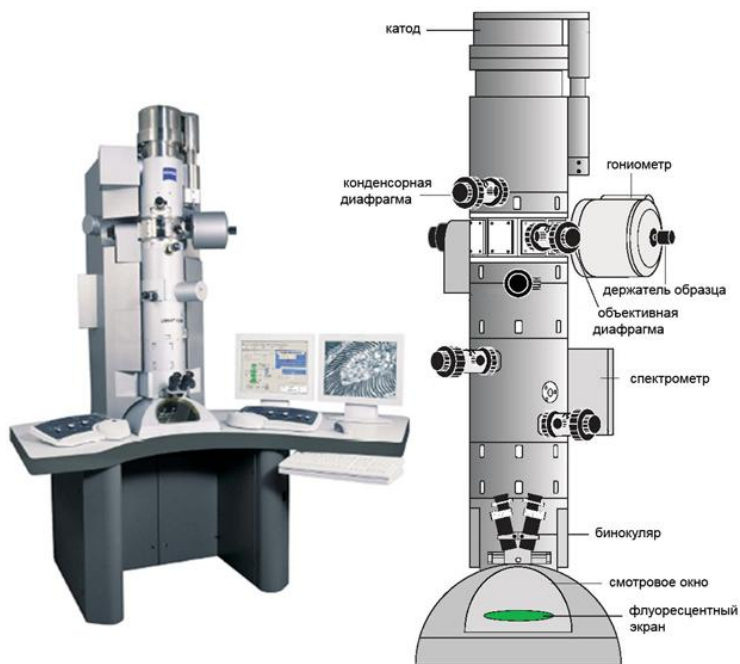


Рис. 7. Просвечивающий электронный микроскоп Libra 120 (Zeiss).

Во всех просвечивающих электронных микроскопах серии Libra используется встроенный в колонну энергетический ОМЕГА-фильтра (запатентован Carl Zeiss SMT), позволяющий получать превосходное изображение даже на самых трудных образцах, управлять контрастом изображения, проводить химический анализ с чувствительностью до 1,5 эВ и строить карты распределения химических элементов. Применение ОМЕГА-фильтра позволяет избегать дополнительного контрастирования образцов солями свинца, которые утолщают мембранные структуры, а зачастую еще и выпадают пятнами на срезах. Конструктивной особенностью встроенного в колонну энергетического ОМЕГА-фильтра является еще и то, что фильтр не требует никакой пользовательской юстировки и не накладывает ограничений на параметры систем получения изображения (фото, цифровые, ТВ и медленного сканирования камеры) в отличие от конкурентных моделей.

Наличие семи линз обеспечивает более точную фокусировку и, соответственно, более точное изображение.

В просвечивающих электронных микроскопах серии Libra используется также высокоэффективная система освещения по Кёлеру строго параллельным пучком (запатентовано Carl Zeiss SMT), что в сочетании с безабберационной оптикой гарантирует пользователю получение истинного изображения.

Разрешение электронного микроскопа Libra 120 составляет всего 0.34 нм, а диапазон увеличений – от 8 до 630000 раз. Применение уникальных режимов микроскопа гарантирует наилучшее качество изображения и полный объем информации об образце.

2. МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Основополагающим в электронной микроскопии является приготовление образцов. Существует огромное количество методов, позволяющих успешно визуализировать в электронном микроскопе самые различные образцы.

Чтобы образец можно было посмотреть в просвечивающий электронный микроскоп, он должен соответствовать следующим критериям: быть твердым, контрастным, прозрачным для прохождения электронов, сухим, устойчивым к высокому вакууму и электромагнитному излучению. Кроме того, образец должен быть очень тонким (не более 100 нм), чтобы пучок электронов мог пройти сквозь него. Чтобы выполнялось это условие, образец должен быть либо небольшой частицей, либо быть предварительно залит в заливочную смолу и порезан на ультратонкие срезы.

Как понятно из перечисленных выше требований к образцу, он должен быть соответствующим образом подготовлен.

Методика варьирует каждый раз в зависимости от образца, но основные принципы можно обозначить так:

- ✓ фиксация (захватить объект на нужной стадии в его нативном состоянии)
- ✓ дегидратация – замещение воды органическими растворителями (этиловым спиртом, ацетоном)
- ✓ заключение в смолу (пропитка материала эпоксидной смолой для придания ему твердости для облегчения нарезки срезов)
- ✓ получение ультратонких срезов образца, полупрозрачных для пучка электронов
- ✓ окраска срезов солями тяжелых металлов, такими как свинец, уран, непрозрачными для пучка электронов, с целью получения контрастного изображения.

Ниже будут подробно рассмотрены методы подготовки образца для электронно-микроскопического анализа.

2.1. Сеточки

Независимо от выбранного метода, для помещения в просвечивающий электронный микроскоп образец необходимо поместить на сеточку. Сеточками называют тонкие металлические диски диаметром 3 мм и толщиной 0.01 мм с очень мелкой регулярной решеткой. Разные типы сеточек представлены на рисунке 8.

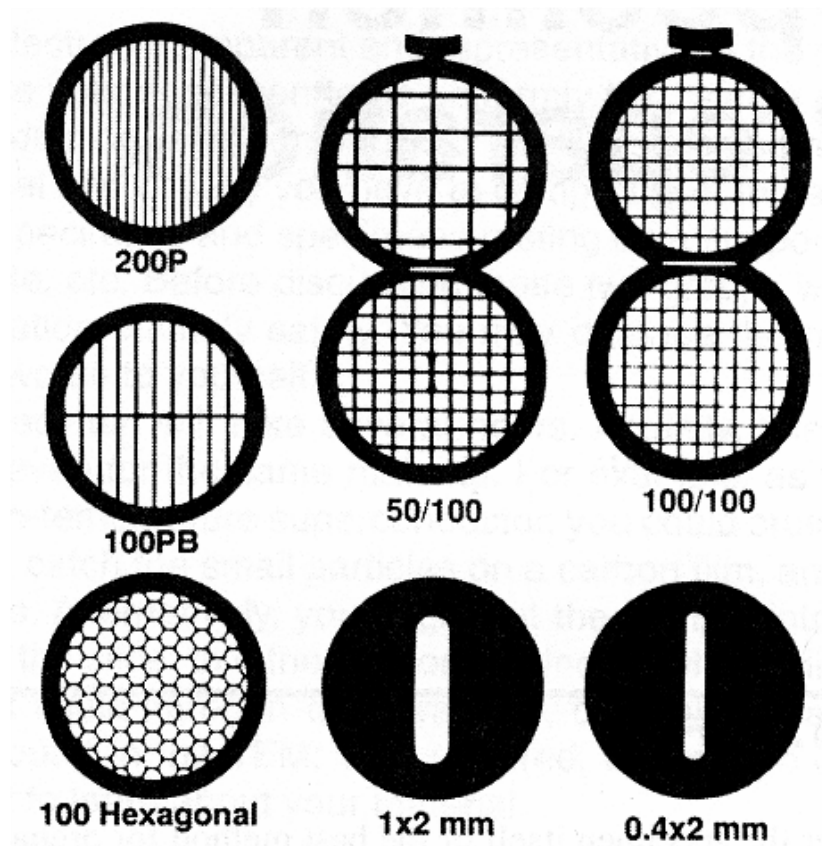


Рис. 8. Электронно-микроскопические сеточки

Обычно для просвечивающей электронной микроскопии используют медные сеточки, в случае иммуноэлектронной микроскопии – никелевые или золотые. Образец помещают на сеточку и вставляют в держатель электронного микроскопа.

Та часть образца, которая располагается на ячейках между решетками сеточки, и будет видна под электронным микроскопом. Сама решетка сетки, изготовленная из меди либо никеля (иногда золота), соответственно, непроходима для пучка электронов).

2.2.1. Приготовление формварных пленок для сеточек

Чаще всего для хранения срезов используются медные сеточки, покрытые формварной пленкой. Также могут быть использованы золотые или никелевые сеточки, более инертные по отношению к химическим веществам, таким как фосфатный буфер. Однако, если формварная пленка целая, без дырок, прямого контакта фосфатного буфера с медной сеткой удастся избежать, и проблема возникает только при длительном хранении сеточек.

Для приготовления формварной пленки необходимо взять два бюкса на 50 мл с плотно притертыми крышками. Бюксы тщательно вымыть ацетоном и хлороформом (ЧДА) и высушить. В каждый бюкс налить по 20 мл хлороформа, затем в один из них добавить 50 мкг формвара и аккуратно перемешать. Оба бюкса плотно закрыть и оставить на ночь в темном месте. Наутро можно приступить к приготовлению формварной пленки.

Сеточки необходимо предварительно очистить. Для новых сеточек из фабричной упаковки достаточно промывки ацетоном и высушивания в термостате при 37°C. Если сеточки не новые, их помещают в стеклянную пробирку (не более 200 штук на пробирку объемом 15 мл), добавляют дистиллированную воду и 25%-ный NH_4OH и промывают пипетированием вверх-вниз, пока раствор не станет слегка синим. Далее раствор аммиака сливается, сеточки промываются несколько раз (до 10) дистиллированной водой, чтобы не осталось никаких следов

аммиака, дающих коричневые пятна на сеточках. Наконец, сеточки промываются дважды в ацетоне и высушиваются на фильтровальной бумаге в термостате при 37°C. Альтернативным методом является очистка сеточек 1%-ным раствором серной кислоты на вортексе в течение 10 секунд с последующей обильной промывкой в дистиллированной воде. При более длительной выдержке в серной кислоте сеточки начинают растворяться.

Формварные пленки делают на предметных стеклах. Поверхность стекла должна быть чистой и ровной, любые трещинки или неровности на поверхности стекла будут вызывать дырки в формварной пленке. Чтобы не осталось частиц пыли, стекло следует протереть бумагой для протирки объективов,

Весь процесс приготовления формварных пленок представлен на рисунке 9. Чистое стекло опускается в бюкс с хлороформом на 30 секунд, затем вытаскивается, вытирается нижним ребром о фильтровальную бумагу и тем же концом погружается в раствор формвара в хлороформе на 30 секунд. При этом нельзя трясти бюкс, иначе пленка получится неровной. Стекло аккуратно вытаскивается. Пленку формвара на нем можно увидеть, если подышать на стекло. Теперь следует соскоблить формварную пленку по краям стекла, срезав скальпелем или острым лезвием по 3-5 мм с краев, которые погружались в раствор формвара. Данная процедура облегчает отсоединение пленки от стекла, поскольку иначе пленка цепляется за острые края и может не отойти или порваться.

Тем же концом предметное стекло с пленкой медленно погружается под углом примерно 45° в широкую емкость (стакан), наполненную дистиллированной водой. При медленном погружении стекла пленка постепенно сползает на воду. Чтобы лучше ее видеть, можно подложить черную бумагу и использовать яркую лампу. Толщина пленки обычно около 70 нм, на поверхности воды она будет в виде серебристо-белого прямоугольника. На эту пленку аккуратно выкладываются электронно-микроскопические сеточки (желательно одинаковой, например, блестящей стороной кверху).

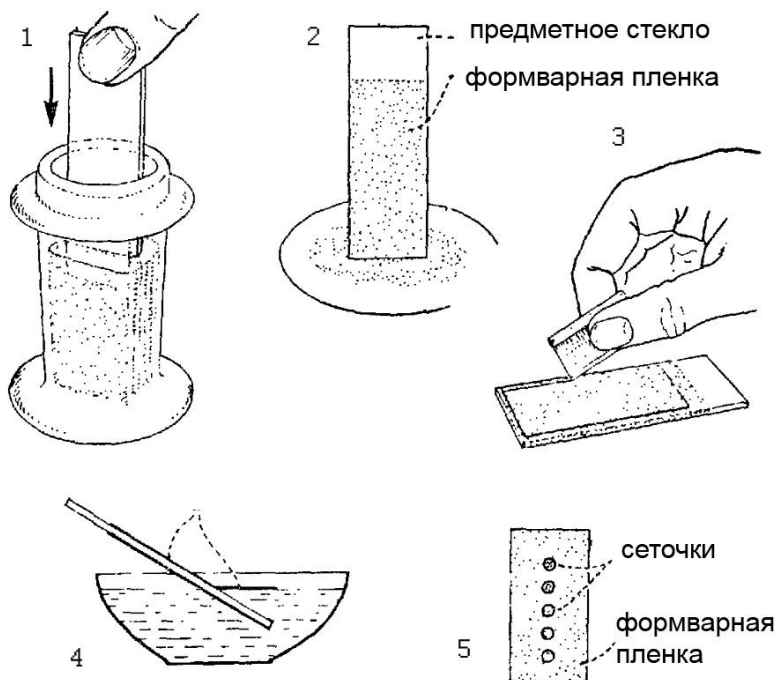


Рис. 9. Приготовление формварных пленок-подложек. 1- предметное стекло погружается в раствор формвара; 2 – стекло вытирается нижним ребром о фильтровальную бумагу; 3 – края пленки срезаются со стекла острым лезвием; 4 – пленка снимается на поверхность воды; 5 – на пленку размещаются электронно-микроскопические сеточки.

Следует оставлять небольшой зазор между соседними сеточками и избегать наложения сеточек друг на друга, что может привести к разрыву формварной пленки. Когда вся пленка покрыта сеточками, сверху аккуратно накладывается кусочек ламинированной бумаги, пленка с сетками прилипает к нему и весь «сэндвич» вытаскивается из воды, помещается в

чистую чашку Петри бумагой вниз. Подсохнув, сеточки с пленкой готовы к использованию.

Качество полученной формварной пленки можно проверить под микроскопом на небольших увеличениях. Хорошая пленка должна быть без разрывов и грязи и не должна рваться под сфокусированным пучком электронов при вытаскиваемой объективной диафрагме.

Для усиления электростатических и гидрофильных свойств формварную пленку можно напылить тонким слоем углерода в специальной вакуумной напыляющей установке для более надежного прикрепления образца и уменьшения поверхностного заряда.

Существует два альтернативных способа помещения образца на сеточку, речь о которых пойдет в следующих разделах. Если образец представляет из себя частицу размером не более 500 нм, его можно помещать на сеточку целиком (см. раздел 2.2.). Также напрямую можно визуализировать тонкие участки целых клеток, выращенных сразу на сеточках, применяя методы криоэлектронной микроскопии. Однако, если структура крупнее 500 нм или в задачи исследования входит анализ структур внутри органелл/клеток/тканей, образец следует предварительно заполимеризовать и порезать на ультратонкие (толщиной 50-100 нм) срезы (раздел 2.3). Альтернативным методом является метод замораживания-скальвания для анализа поверхности (раздел 2.6). Такие образцы можно смотреть и на просвечивающем, и на сканирующем электронном микроскопе. Ключевым моментом в анализе любых клеточных структур на любом уровне – это фиксация, будь то химическое связывание или физическая заморозка.

Химические фиксаторы успешно применяются с самого зарождения электронной микроскопии в 40х годах прошлого века. Замораживание образца за миллисекунды путем витрификации – достаточно инновационное направление в электронной микроскопии.

Исходный биологический материал крайне хрупок и чувствителен к излучению электронов, поэтому методы пробоподготовки постоянно развиваются и модифицируются.

2.2. Негативное окрашивание

Самая простая и наиболее быстрая методика в электронной микроскопии – это негативное окрашивание. Метод заключается в обработке микрочастиц или макромолекул на пленке-подложке растворами соединений тяжелых металлов (например, урана), в результате чего частицы будут видны как светлые пятна на темном фоне (схематически метод представлен на рис. 10).

Данный метод пригоден для вирусов, небольших бактерий, белков, макромолекулярных комплексов и фракций изолированных органелл. Частицы адсорбируются на поверхности электронно-микроскопических сеточек, покрытых формварной пленкой и напыленным тонким слоем углерода.

Сеточки плавают на поверхности раствора образца в буфере (на капле объемом 3-5 мкл) несколько секунд, за это время материал адсорбируется на сеточке. Затем сеточки с прикрепившимися к ним частицами быстро промываются водой и помещаются на несколько секунд (до 1 минуты) на капли 1–5% раствора красителя (солей тяжелых металлов, например, уранилацетата или молибдата аммония). Далее сеточки снимаются с помощью пинцета и излишек красителя убирается фильтровальной бумагой. Вокруг образца остается слой красителя толщиной 100-300 нм. Такое окрашивание называется «негативным», поскольку краситель заполняет пространство вокруг образца, которое представляется очерченным в негативном контрасте. На рисунке 11 можно видеть вирус оспы и бактериофаг, приготовленные методом негативного контрастирования.

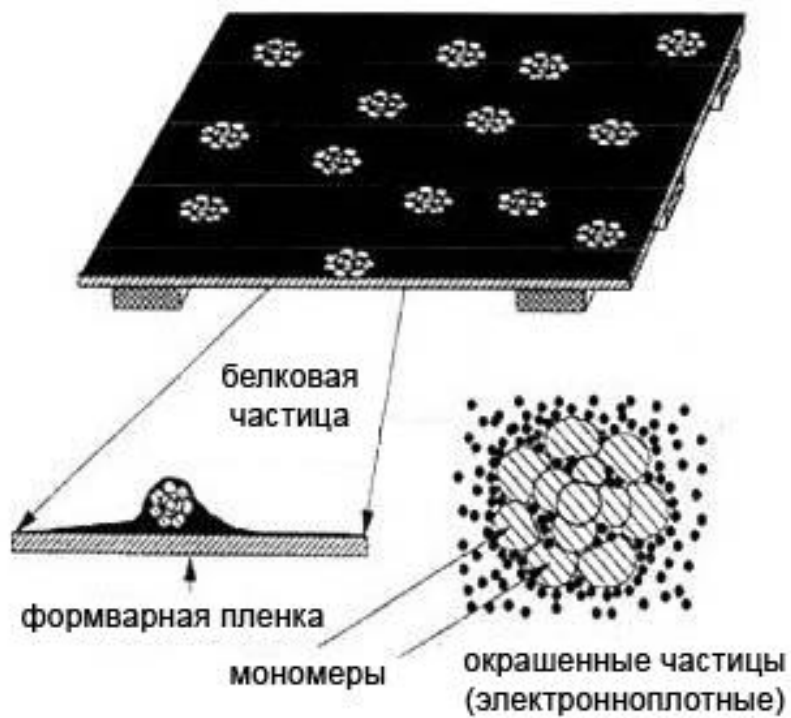


Рис. 10. Схема методики негативного окрашивания

Хотя этот способ является самым тривиальным, в руках специалиста он позволяет получить изображение относительно высокого уровня разрешения

Этот подход легко совместим с иммуномечением. Одним из ограничений является то, что только антигены, находящиеся на поверхности частиц, могут быть маркированы.

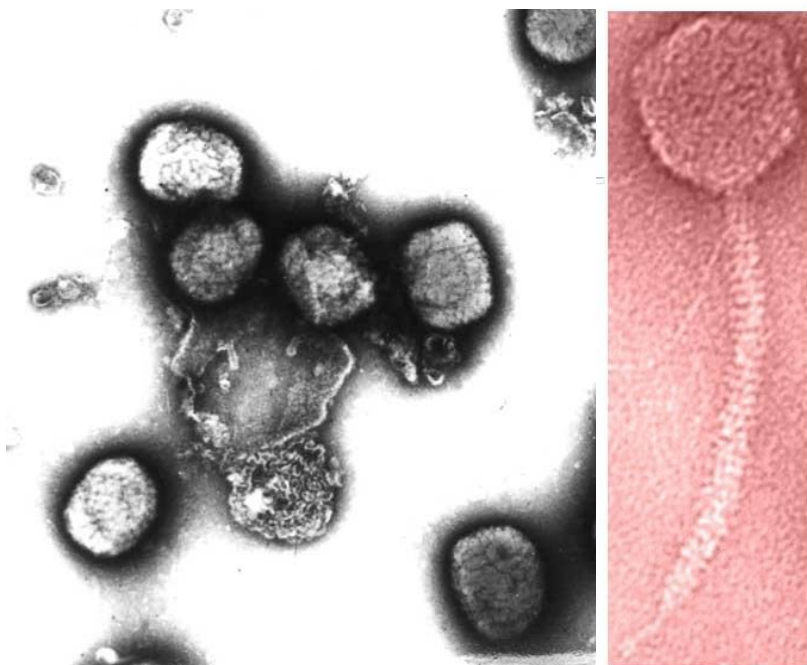


Рис. 11. Вирус оспы (слева) и бактериофаг (справа), приготовленные методом негативного контрастирования.

2.3. Заключение в смолу

Наиболее наиболее широко используемым методом анализа ультраструктуры был и остается метод подготовки образца при комнатной температуре с применением химических фиксаторов, прежде всего, глутаральдегида, и заливкой в эпоксидную смолу. Методика заключения в смолу – это эмпирически выведенная последовательность действий по преобразованию свежей ткани/клетки/ изолированных органелл в тонкие срезы. Хотя рецептов по подготовке таких срезов множество, основной принцип общий для всех. Он описан ниже:

- химическая фиксация
- дегидратация
- заливка в смолу
- получение ультратонких срезов

2.3.1. Химическая фиксация

Суть химической фиксации в том, чтобы остановить посмертные изменения и сохранить ткань в нативном состоянии – максимально близком прижизненному. Глутаральдегид является основным вариантом химических фиксаторов, используемых для сохранения структуры при рутинной электронной микроскопии. Внедрение этого фиксатора было, без сомнения, революционной инновацией для электронной микроскопии в клеточной биологии. Ряд органелл, таких как микротрубочки, были впервые увидены только после того, как они были сохранены с этим реагентом. Это мощный сшивающий агент аминогрупп, особенно в белках и аминоклипидах. Хотя химия этого процесса очень сложна, и еще более усложняется тем, что сшивание совпадает с процессом гибели клеток, на практике фиксатор очень прост в применении к любой «открытой» клеточной системе, т.е. к клеткам, которые являются доступными для раствора без барьеров в виде клеточной стенки или кутикулы, блокирующих доступ фиксатора.

Если клетки выращены в культуре, наилучшие результаты обычно достигаются путем добавления фиксатора

непосредственно в питательную среду, в первые несколько минут, а затем переносом в фиксатор на буфере. Любой барьер для растворов, к примеру, клеточные стенки, в каждом конкретном случае преодолевается своим специфическим способом. Если в задачах исследования значится фиксация ткани на животных *n situ*, лучшей процедурой будет перфузия, нетривиальная хирургическая операция. Одним из главных правил гласит, что для достижения оптимального результата размер образца не должен превышать 1 мм во всех измерениях, чтобы обеспечить хорошее и равномерное проникновение реагентов.

Оптимальное время, необходимое для фиксации, варьирует в зависимости от типа ткани, времени, прошедшего с момента взятия ткани и до момента попадания ее в фиксатор, размера кусочка, концентрации фиксатора и применяемого буферного раствора. Как правило, pH в течение фиксации поддерживают на физиологическом уровне (7,3-7,4).

Качество фиксации в значительной степени зависит от чистоты применяемого альдегида. Формальдегидные фиксаторы необходимо готовить свежими из порошкообразного параформальдегида; глутаральдегидные фиксаторы готовят из специально стабилизированных растворов, предназначенных для электронной микроскопии («E.M. grade»).

Когда помимо чисто структурного анализа требуется провести иммуноэлектронное исследование образца, интенсивное связывание глутаральдегидом будет стерически препятствовать доступу антител к антигенам. Для таких целей используется более слабое связывание, т.е. фиксация глутаральдегидом меньшей концентрации (0.1- 0.2%) в сочетании с формальдегидом, либо 4% формальдегидом в подходящем буфере.

Различные варианты фиксаторов для иммуноэлектронной микроскопии:

- 1) 2% формальдегид в 0.1 М фосфатном буфере, 2-96 часа.
- 2) Формальдегид возрастающей концентрации (2>4>6>8%, 10 мин в каждом) в 0.1 М фосфатном буфере, 1 час.

- 3) 1% акролеин + 0.1% глутаральдегид в 0.1 М фосфатном буфере, 1 час.
- 4) 2% формальдегид + 1% акролеин в 0.1 М фосфатном буфере, 1-48 часов.
- 5) 2% формальдегид + 0.2% глутаральдегид в 0.1 М фосфатном буфере, 1-2 часа.
- 6) 2% формальдегид + 0.5% глутаральдегид в 0.1 М фосфатном буфере, 1-2 часа.
- 7) 1% глутаральдегид в 0.1 М фосфатном буфере, 1-48 часов.

Фосфатный буфер во всех вариантах имеет pH 7.4 (вместо фосфатного буфера допустимо использовать 0.1M PIPES или HEPES буфер).

2.3.2. Постфиксация

Для ультраструктурных исследований фиксированные глутаральдегидом ткани далее постфиксируют в 0,5-1% растворе тетраоксида осмия (OsO_4). Дополнительная фиксация тетраоксидом осмия стабилизирует некоторые нейтральные липиды и большую часть фосфолипидов. Одна из первых электронно-микроскопических фотографий, полученных с использованием этого тяжелого металла, показана на рис. 11.

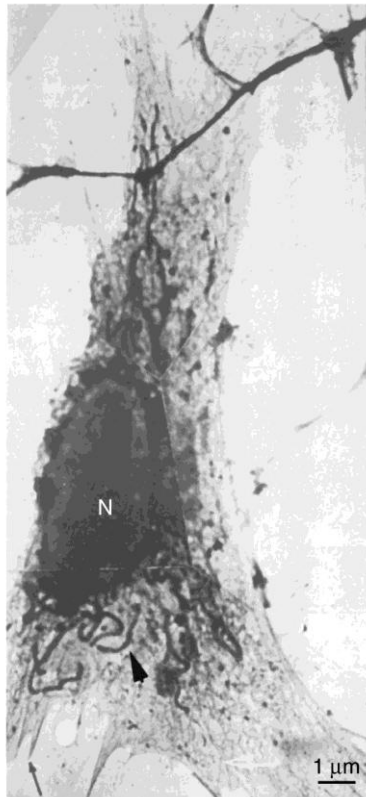


Рис. 11. Одна из первых электронно-микроскопических фотографий (Porter, Claude, Fullam, 1945). Целый фибробласт, выращенный на электронно-микроскопической сеточке, фиксированный тетраоксидом осмия и высушенный на воздухе. Видно ядро, червеобразные митохондрии и тонкая сеть ЭПР.

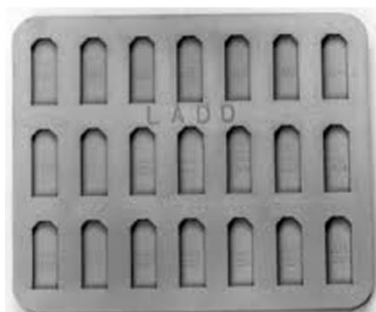
Тетраоксид осмия может связывать липиды и белки и добавляет общий контраст большинству органелл, особенно мембранам (усиливает их двух- или трехслойный вид). После осмиевой фиксации образцы выдерживаются в 1% растворе уранилацетата, который связывается с негативно заряженными

фосфатными группами в фосфолипидах и является прекрасным стабилизатором липидов. Ткани оставляют в водном растворе уранилацетата на час при комнатной температуре или на ночь в холодильнике.

2.3.3. Дегидратация и заключение в смолу

Дальнейшая обработка сводится к дегидратации и пропитке ткани заливочным материалом, который сделает ткань твердой, будет ее поддерживать и позволит получить тонкие срезы.

Среды для заливки, наиболее часто применяемые в электронной микроскопии (Эпон, Спурр, Аралдит и др.) гидрофобны и не смешиваются с водой. Следовательно, чтобы ткани полностью пропитались заливочной средой, вода в ткани должна быть замещена каким-либо веществом, способным смешиваться с заливочной средой. Для этого идеально подходит этиловый спирт, однако обезвоживание нужно проводить быстро, чтобы избежать вымывания липидсодержащих компонентов клетки. Если ткань сразу из фиксатора перенести в 100 %-ный этанол, из-за изменения поверхностного натяжения могут возникнуть механические повреждения. Поэтому ткань проводят по спиртам возрастающей концентрации, от 30 % до 100 % этилового спирта, по 5-10 минут в каждом растворе. После 100%-ного этанола образец переносят в чистый ацетон, а после ацетона материал на несколько часов помещается в смесь эпоксидной смолы с ацетоном. Эта процедура повторяется несколько раз, каждый раз соотношение смолы и ацетона сдвигается в сторону смолы. Затем смесь заменяется чистой смолой. Образец помещается в специальные заливочные формы (рис. 12) и заливается чистой смолой.



формы для плоской заливки



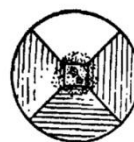
формы для вертикальной заливки



блоки с материалом внутри



вид сбоку



вид сверху

Рис. 12. Формы для заливки и заполимеризованные блоки.

В таком виде образец остается на ночь при комнатной температуре для полной инфильтрации смолой, а затем полимеризуется в течение двух суток в термостате при 60°C . После полимеризации образец готов к дальнейшей нарезке на ультратонкие срезы.

2.3.4. Подготовка ооцитов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* для электронно-микроскопического анализа

Рассмотрим подробнее процедуру рутинной подготовки образцов для электронной микроскопии на примере ооцитов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Ооциты фиксировать 2,5 %-ным раствором глутарового альдегида в 0.1 М Хепес-буфере в течение 1 часа при комнатной температуре, затем дофиксировать в 1 %-ном растворе тетроксид осмия на Хепес-буфере в течение одного часа при +4 °С. После фиксации образцы отмыть в трех сменах дистиллированной воды и дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, затем в ацетоне:

30 %-ный этиловый спирт – 5 мин,

50 %-ный этиловый спирт – 5 мин,

70 %-ный этиловый спирт – 10 мин,

96 %-ный этиловый спирт – 10 мин,

100 %-ный этиловый спирт – 2 смены по 10 мин

ацетон ОСЧ – 10 мин.

Дегидратированные образцы пропитать смесью эпоксидной смолы Агар-100 (Agar Scientific, Англия) с ацетоном по следующей схеме:

Агар:ацетон=1:2 – 1 час;

Агар:ацетон=1:1 – 2 часа;

Агар:ацетон=2:1 – 2 часа;

чистый Агар – 1 час.

Все пропитки проводить на шейкере при непрерывном перемешивании. Затем образцы перенести в свежую порцию

чистой эпоксидной смолы при помощи препаровальной иглы, разложить по пластиковым формам и выдерживать в течение ночи в эксикаторе, содержащем осушитель CaCl₂ (безводный) при комнатной температуре. На следующий день формы с залитыми образцами поместить в термостат и полимеризовать при 60° С в течение 2-х суток.

2.3.5. Заточка блоков с образцом

Образцы, залитые в смолу и заполимеризованные, представляют из себя небольшие блоки, которые должны быть заточены в виде пирамиды с прямоугольником или трапецией на конце (Рис. 12). Это можно сделать вручную с помощью бритвенных лезвий, либо с использованием коммерчески доступных триммеров с металлическими лезвиями. Блок необходимо заточить в форме четырехгранной пирамиды с плоской вершиной, которая и будет служить поверхностью для резки. Сама пирамида будет широкой опорой для срезаемой поверхности, предохраняющей блок от вибрации в процессе резки.

Заточенные блоки с образцом внутри помещаются в ультрамикротом и нарезаются стеклянными или алмазными ножами. Резка ткани является наиболее трудоемким этапом в подготовке электронно-микроскопического образца. Помимо навыков работы с ультрамикротомом и терпения, исследователю необходимы качественные ножи. Современные ультрамикротомы в сочетании с качественными алмазными ножами позволяют легко получать срезы толщиной всего 20 нм.

2.3.6. Приготовление ножей

Необходимым условием для получения качественных ультратонких срезов является наличие хороших ножей. Это могут быть коммерческие алмазные ножи или приготовленные вручную стеклянные ножи. Алмазные ножи значительно

дороже, но долговечнее, острее и прочнее. Свою высокую стоимость они оправдывают за счет экономии времени, нервов и нарезаемого материала при нарезке ультратонких срезов. При условии бережного обращения высокое качество резки сохраняется алмазным ножом длительное время. Стекло тупится быстрее и является одноразовыми, т.е. после каждого цикла нарезки их приходится заменять на новые, но при этом хорошо сделанный стеклянный нож может давать превосходные срезы не хуже алмазного, пусть и не так долго.

Для приготовления стеклянных ножей используются специальные полоски толстого стекла толщиной 4 мм. Стекло должно быть ровным, одинаковой плотности. Перед изготовлением ножей каждая полоска стекла проверяется по размеру, качеству, отсутствию трещин, пузырьков и др. Не допускается перекосов боковой поверхности стекла. Чтобы очистить стекло от жира и пыли, которые могут загрязнять срезы во время резки, его тщательно моют в детергенте, споласкивают горячей водой и сушат на воздухе. Стекло нельзя протирать, так как в результате этого образуется электрический заряд и на стекле скапливается пыль. Нарезка ножей происходит в специальном приборе для изготовления ножей, который называется knifemaker. Каждая полоска стекла разламывается на две равные части, каждая из них делится еще на две части, затем опять пополам и так далее, до тех пор, пока не получатся квадраты размером 2,5 x 2,5 см. Эти квадраты ломаются по диагонали на два прямоугольных треугольника, которые и будут ножами (рис. 13).

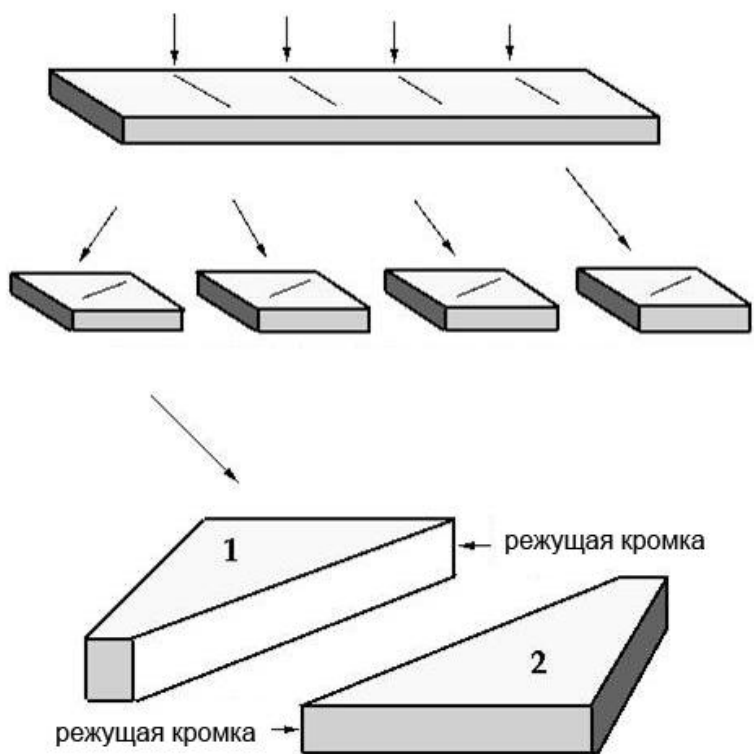


Рис. 13. Приготовление стеклянных ножей из полоски стекла

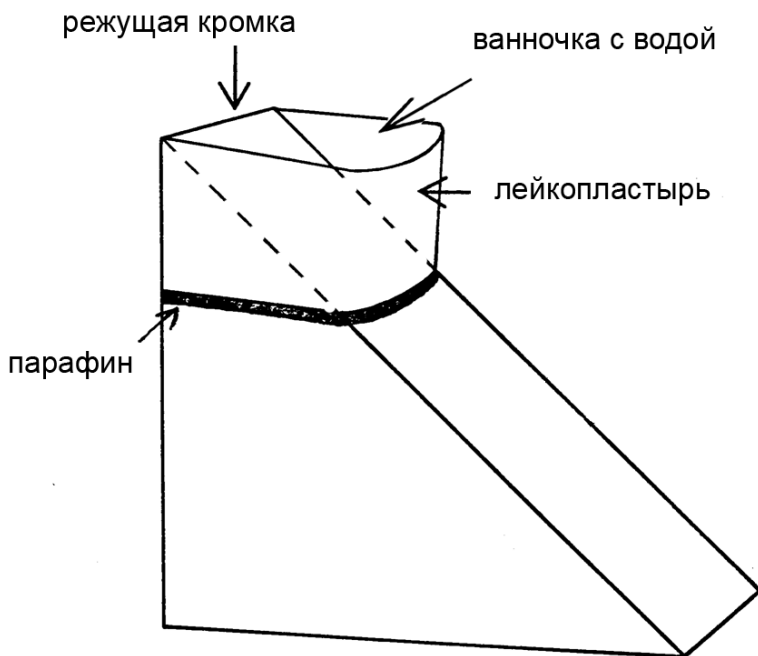


Рис. 14. Стекланный нож с ванночкой

Если разлом прошел строго по диагонали квадрата, ножи будут острыми. Кроме того, разлом должен проходить строго перпендикулярно верхней поверхности квадрата. На верху полученного треугольника расположена режущая кромка ножа – самая острая его часть, которой и будут нарезаться срезы. Режущая кромка должна быть тонкой, ровной, без зазубрин или неровностей. Готовые стеклянные ножи не рекомендуется хранить долго, так как со временем режущий край постепенно оплывает и становится тупым.

Следующим этапом к ножу прикрепляется ванночка, в которой будут собираться свежие срезы. Ванночка наполняется водой, одновременно выполняющей функцию смазки при ультрамикротомировании и резервуара для хранения и расправления срезов.

Ванночки могут быть фабричными пластиковыми, либо изготовленными самостоятельно из тканевого лейкопластыря. Лейкопластырь нарезается на небольшие полоски (толщиной не более 1 см и длиной 2,5-3 см), оборачивается вокруг ножа с трех сторон (режущая кромка остается наверху), лишние концы отрезаются и весь лейкопластырь пропитывается расплавленным парафином, чтобы сделать его водонепроницаемым (рис. 14).

С готовыми ножами следует обращаться крайне бережно, чтобы не повредить режущий край. Их следует ставить в специальные держатели для ножей, снабженные крышками. Вся подготовка алмазного ножа заключается в чистке его режущей кромки специальной мягкой деревянной или пенополистирольной палочкой после каждого использования. Затупившийся со временем алмазный нож можно отправить на повторную заточку производителю.

2.3.7. Получение ультратонких срезов

Конечный этап приготовления образца – получение ультратонких срезов толщиной 50-70 нм.

Необходимый материал для нарезки ультратонких срезов:

1. стеклянные (или алмазные) ножи
2. шприц с дистиллированной водой для наполнения ванночки ножа
3. чистые предметные стекла
4. гистологическая плитка или спиртовка
5. 1 %-ный раствор метиленового синего в 1 %-ном растворе буры
6. Ресничка, прикрепленная к деревянной палочке, для передвижения срезов по ванночке
7. Электронно-микроскопический пинцет
8. Чистая чашка Петри с фильтровальной бумагой для размещения сеточек
9. Электронно-микроскопические сеточки, покрытые формварной пленкой-подложкой.
10. Контейнер для хранения сеточек.

Блоки с залитым материалом внутри помещаются в специальный держатель и вставляются в ультрамикротом (рис. 15). Нож ставится в ультрамикротом таким образом, чтобы его режущий край был направлен вверх.

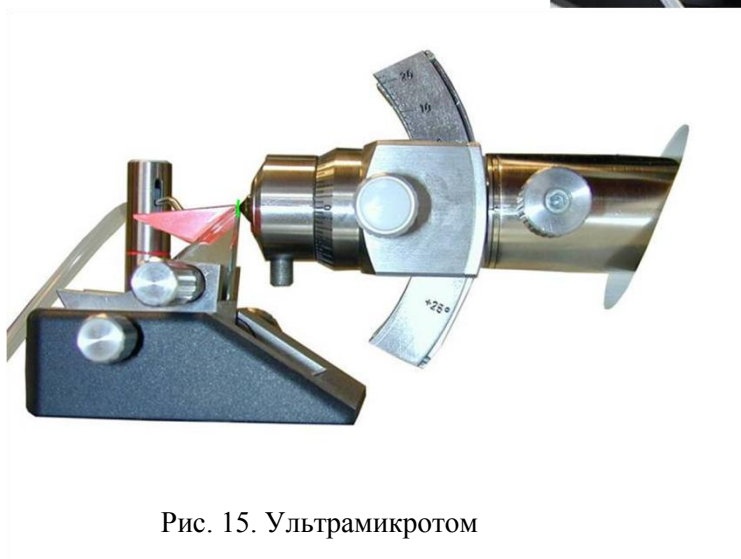


рис. 15. Ультрамикротом

Ванночку наполняют дистиллированной водой. Первые срезы толщиной 0,5 мкм (полутонкие срезы) собирают с поверхности воды при помощи реснички, помещают в каплю дистиллированной воды на предметное стекло, высушивают на гистологической плитке (при температуре 60-70°C) или над пламенем спиртовки и окрашивают 1 %-ным раствором метиленового синего, приготовленным на 1%-ном тетраборате натрия и отфильтрованном через 0.2 м фильтр. Важно не допускать закипания краски! Избыток красителя отмывают через 3-4 мин. дистиллированной водой. Полученные препараты полутонких срезов исследуют в световом микроскопе, выбирая нужный участок для последующего получения ультратонких срезов.

Затем лишняя ткань на блоке отрезается острым лезвием бритвы, остается только выбранный участок (рис. 16). Таким образом, все последующие ультратонкие срезы будут содержать только участок, предназначенный для исследования.

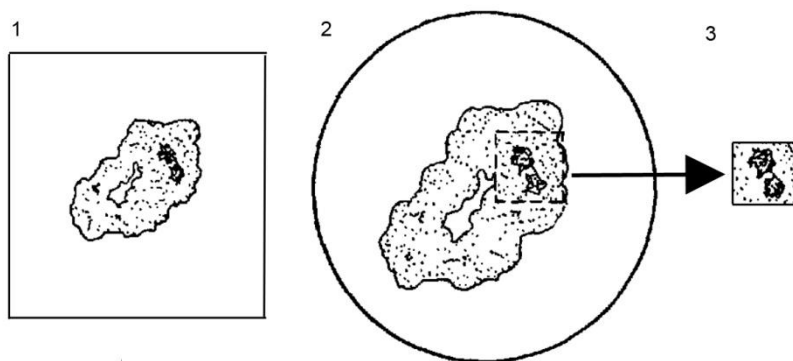


Рис. 16. Выбор участка ткани для ультратонких срезов. 1- поверхность блока с материалом внутри; 2 – полутонкий срез материала под световым микроскопом, выбирается нужный участок; 3 – поверхность блока, обрезанная до размеров интересующего участка.

Овладение мастерством резки на ультрамикротоме приходит с опытом и требует значительной усидчивости. Начинать резку следует с большой осторожностью, так как слишком толстый первый отрезанный кусок может повредить и нож, и, что гораздо хуже, сам материал. При резке происходит сжатие срезов, которое усиливается, если нож тупой или неправильно ориентирован. На поверхности воды в ванночке срезы расправляются обратно. После того, как срезы расправятся, можно приблизительно определить их толщину по цвету. Шкала соответствия толщины среза и его цвета представлена на рисунке 17. Серебристо-серые срезы имеют толщину 50-60 нм, именно такие срезы подходят для анализа в электронном микроскопе, золотистые срезы толще (90-120 нм), зеленые, фиолетовые срезы имеют толщину 160-190 нм, зеленые срезы самые толстые (250 нм).

Получив на поверхности воды в ванночке ленту срезов, их вылавливают на сеточку (рис. 18). Для этого электронно-микроскопическую сеточку захватывают пинцетом и аккуратно опускают на срезы формварной пленкой вниз. Срезы вместе с каплей воды прилипают к сеточке. Сеточку переносят в чистую чашку Петри каплей вверх. Когда капля высохнет, срезы распластаются по сеточке, тесно к ней приклеившись (рис. 19).

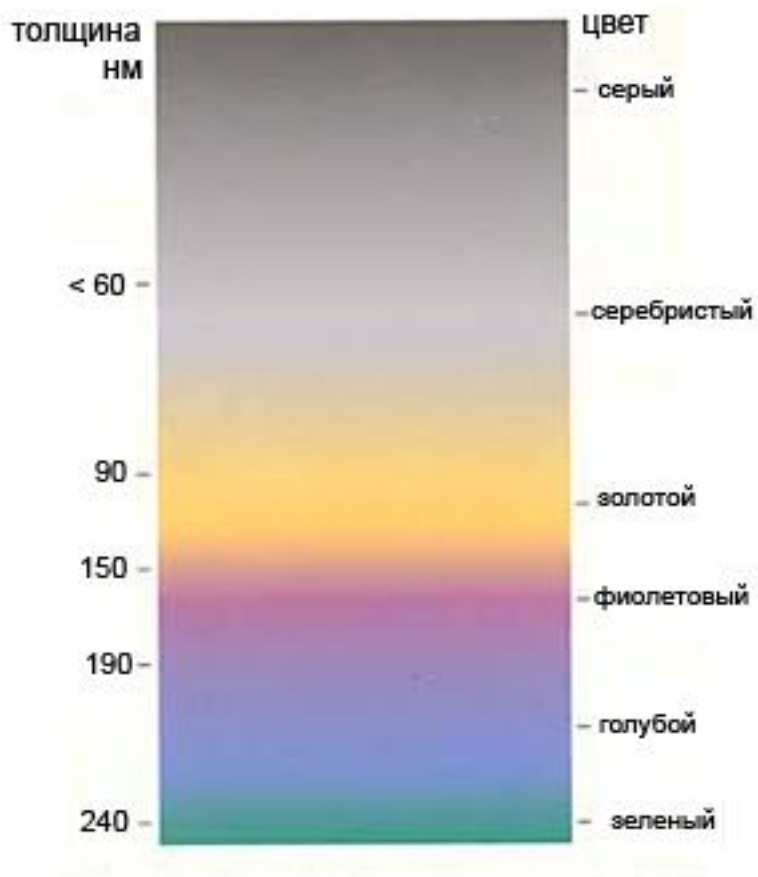


Рис. 17. Шкала соответствия толщины ультратонкого среза и его цвета



Рис. 18. Блок с образцом вставляется в ультрамикротом, стеклянный нож срезает с блока тонкие срезы, которые собираются на сеточку.

Как показано на рисунке (рис. 19), в процессе нарезки залитого в смолу материала ультратонкие срезы плавают в специальных ванночках на поверхности чистой дистиллированной воды, откуда их вылавливают с помощью ресничек и помещают на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваром.

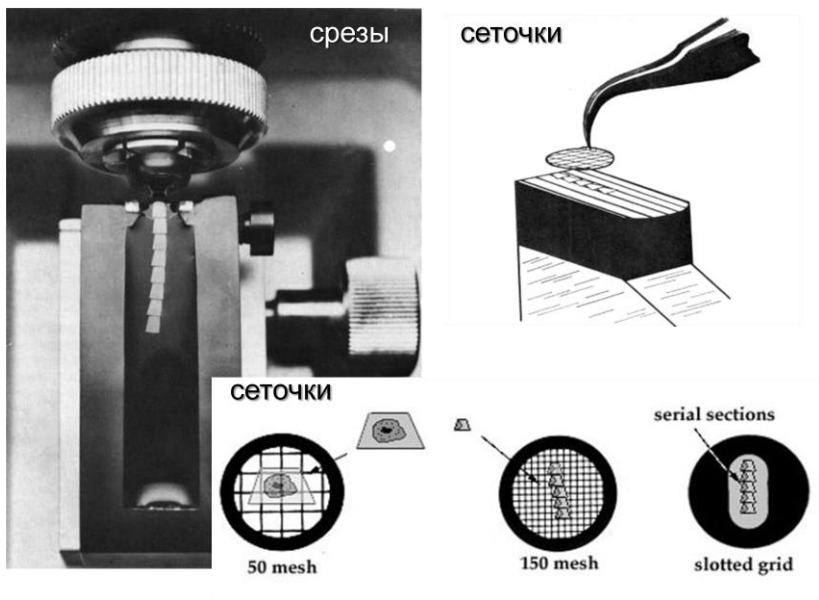


Рис. 19. Получение ультратонких срезов и их захват сеточкой.

2.4. Контрастирование срезов

Сеточки с прикрепленными к ним срезами окрашивают в растворах уранилацетата и цитрата свинца (по Рейнольдсу) для усиления контраста. Контрастирующие растворы предварительно центрифугируют (5 мин., $\times 10000$) Методика окраски:

- 1) окраска уранилацетатом натрия (3 мин);
- 2) промывка дистиллированной водой (30 секунд под струей воды);
- 3) окраска цитратом свинца (4 мин);
- 4) отмывка под струей дистиллированной воды.

Окрашивание проводят на каплях раствора красителя, помещая сеточки на капли срезами вниз. Сеточки держат пинцетом за самый край, чтобы контрастирующий агент не скапливался под пинцетом. Снимают сеточку, проталкивая ее кусочком фильтровальной бумаги между браншами пинцета (рис. 20). Для предотвращения выпадения свинца окраску проводят на капле цитрата свинца, которую помещают на пленку Parafilm под чашку Петри и обкладывают гранулами чистого NaOH.

После промывки дистиллированной водой и высушивания сеточки готовы к анализу в электронном микроскопе.

Для иммуноэлектронной микроскопии окраску тяжелыми металлами проводят после иммуномечения золотом. Преимуществом этого метода в том, что срезы на сеточках могут храниться долгое время и все еще быть пригодными для дальнейшего иммуномечения. Более того, на этих срезах можно проводить иммунофлуоресцентный анализ.

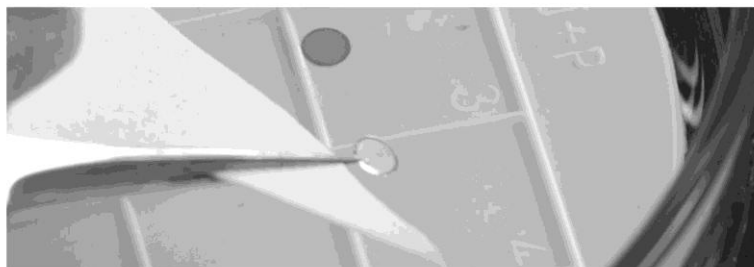
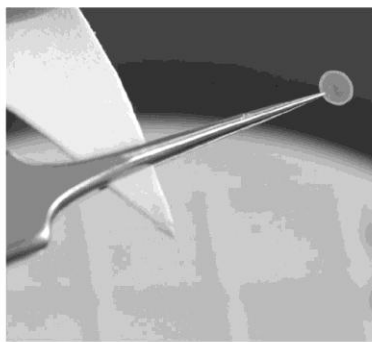
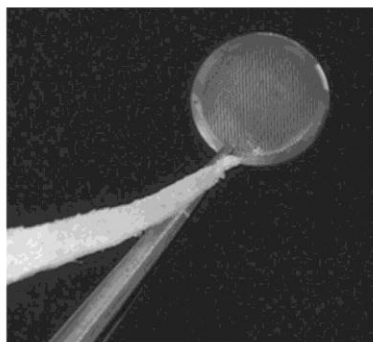
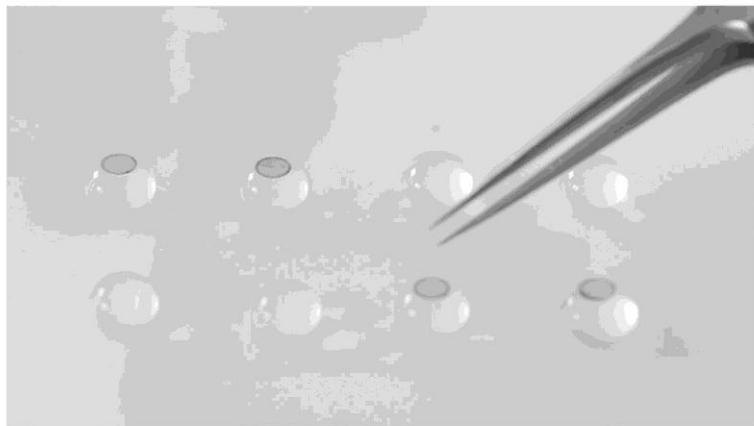


Рис. 20. Контрастирование срезов цитратом свинца. Сетки помещаются в чашку Петри на капли свинца срезами вниз на 3 минуты, затем промываются и аккуратно снимаются с пинцета кусочком фильтровальной бумаги.

2.5. Иммуноэлектронное мечение

Иммуноэлектронное мечение – это визуализация антигенов на срезах или на поверхности изолированных частиц с использованием первичных антител, которые впоследствии распознаются вторичными антителами, содержащими легко детектирующиеся под микроскопом частицы золота.

Основные задачи иммуноэлектронной микроскопии:

- не изменить морфологию ультраструктур
- не допустить потери или артефактного перераспределения антигенов
- добиться высокого разрешения
- получить возможность полного доступа к антигенам

Соответственно, более жесткие требования предъявляются к методам пробоподготовки. В процессе фиксации и заливки должны максимально сохраниться антигены. Поэтому для иммуноэлектронной микроскопии применяют смолы на метакрилатной основе. Первыми, в 80-е годы прошлого столетия были разработаны Ловикрилы – более гидрофильный Lowicryl K4M и более гидрофобный HM20. Уже первые публикации показали их высокий потенциал для иммуномечения золотом. Заливка в метакрилатные смолы схожа со стандартной заливкой в эпоксидные, с той разницей, что полимеризация проходит при облучении ультрафиолетом и не требует высокой температуры. Более того, эти смолы могут использоваться не только при комнатной температуре, но и при низких температурах. К примеру, в методе прогрессивного понижения температуры (PLT – progressive lowering of temperature) начиная со стадии дегидратации температура постепенно снижается до $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ и полимеризация проходит при до $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ под ультрафиолетом. Образец полимеризуется от одного до трех дней, а затем еще «дозревает» при комнатной температуре и при солнечном свете. Ловикрил HM23 может полимеризоваться даже при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, что делает его незаменимым в методе замораживания-замещения (см. раздел 2.6.2). Альтернативой ловикрилу являются смолы LR white и LR gold. Их применение совместимо с обработкой тетраоксидом осмия и

позволяет сочетать иммуномечение с хорошей ссохранностью структур.

Все смолы, используемые в электронной микроскопии, потенциально токсичны, в особенности ловикрилы, и при работе с ними следует соблюдать правила техники безопасности, работать в вытяжном шкафу и в резиновых перчатках.

2.5.1. Иммуномечение золотом на срезах

Метод иммуномечения золотом позволяет проводить локализацию специфических антигенов на ультратонких срезах и широко применяется в молекулярной и клеточной биологии.

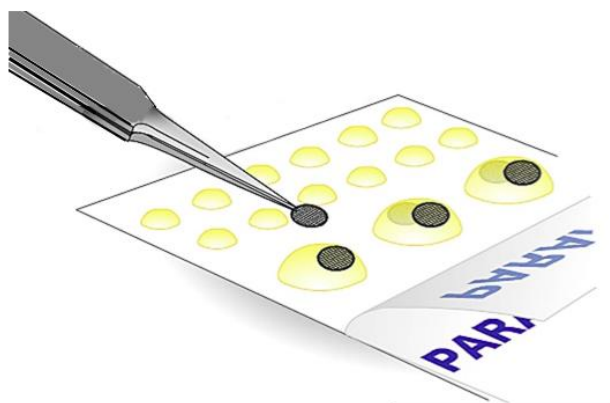


Рис. 21. Иммуномечение на срезах. Сеточки последовательно помещают на капли блокирующего раствора, первичных и вторичных антител с промежуточной отмывкой в буфере.

Суть метода иммуномечения одинакова для всех процедур как на световом уровне, так и на уровне электронной микроскопии. Однако использование ультратонких срезов избавляет от необходимости проводить пермеабиллизацию.

Впоследствии для иммуноэлектронной микроскопии требуется как минимум три стадии инкубации, не считая промывки.

Стадия 1 – Блокировка.

Первый шаг заключается в блокировании неспецифических сайтов связывания. Блокировка проводится помещением сеточки со срезами на каплю подходящего для белка раствора на несколько минут. Различные лаборатории для этой цели используют разные виды сыворотки (например, козья сыворотка или бычий сывороточный альбумин). Какая бы сыворотка не использовалась, рекомендуется разбавлять антитела и золото в этом же растворе на последующих этапах иммуномечения. Всю процедуру наиболее удобно проводить на поверхности парафильма.

Стадия 2 – Мечение антителами

Второй шаг – мечение антителами. Сеточки, плавающие на поверхности блокирующего раствора, переносятся в каплю разведенных блокирующим раствором антител объемом 5-10 мкл на 30-60 минут во влажной камере на поверхности парафильма (рис. 21). Проблему специфического связывания антител следует очень внимательно рассматривать при анализе в электронном микроскопе. Важно отметить, что очевидное доказательство специфичности при иммуноцитохимическом подходе, такие как вестерн-блотт анализ, не обязательно является доказательством специфичности в случае поверхности ультратонкого среза, поскольку условия, в которых находится антиген, сильно различаются. Кроме того, важно понимать, что количество антигенов, доступных на поверхности тонких срезов может быть обманчиво низким. Очень важно подобрать оптимальную концентрацию антител для лучшего соотношения сигнал-шум. Простейший способ – эмпирически определить самую высокую концентрацию антител, при которой не маркируются структуры, предполагаемо свободные от антигенов.

В зависимости от используемого реагента с золотом определяются вторичные антитела. Например, если используют белок А с золотом (protein-A gold) и начинают с мышинных антител, то на промежуточном этапе перед белком А требуются, к примеру, кроличьи антитела rabbit anti-mouse. До и после такого шага необходимо провести серию промываний на каплях фосфатного буфера от 10 до 15 мин.

В качестве альтернативы можно использовать вторичные антитела, конъюгированные с золотом (см. ниже).

Стадия 3 – Мечение золотом

После стадии антител сеточки со срезами переносят на капли белка А с золотом или конъюгированного с золотом иммуноглобулина IgG. При отсутствии предварительной информации оптимальная концентрация золотого реагента – это самая высокая концентрация, которая дает незначительную маркировку при отсутствии первичных антител на сеточках, которые были выдержаны в блокирующем растворе. Коллоидные частицы золота состоят из чистого золота, полученного путем восстановления хлорида золота ($\text{HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Простая процедура с участием цитрата и танниновой позволяет получить однородные сферические частицы любого размера в интервале от 3 до 17 нм. Используя коллоидное золото разных размеров можно проводить одновременную локализацию до трех различных белков (рис. 22).

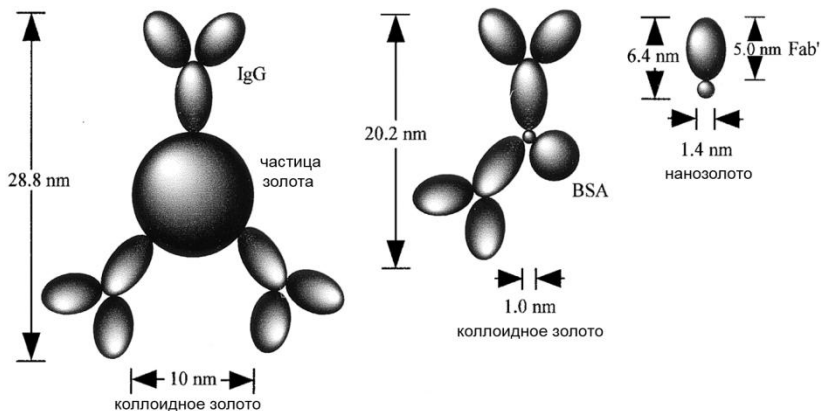


Рис. 22. Вторичные антитела, меченые золотом.

После инкубации с золотом срезы нужно хорошо отмыть дистиллированной водой (2-3 раза, 15-20 мин) и далее контрастировать уранилацетатом и цитратом свинца (см. раздел 2.4.).

Следует также отметить, что пометить антителами можно любой материал, адсорбированный на сеточки, но локализуются только антигены с внешней, доступной для растворителя поверхности. Пример можно видеть на рисунке 23 вторичные антитела с золотом, представленные на фотографии в виде небольших черных точек правильной округлой формы и одинакового размера метят белок ретикулон на мембранных пузырьках в ооцитах шпорцевой лягушки.

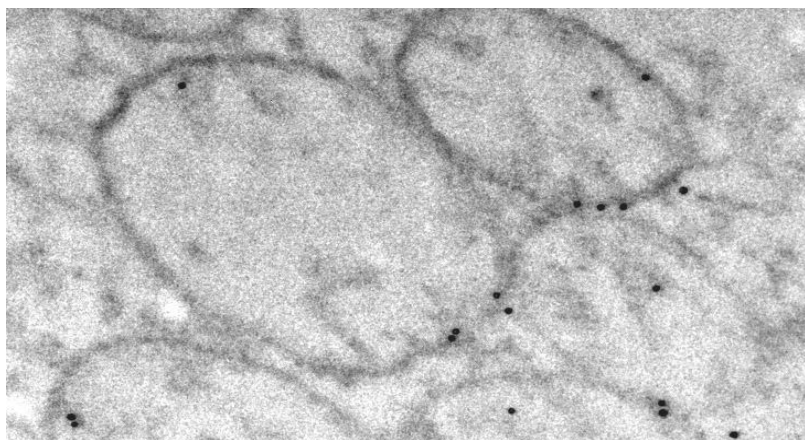


Рис. 23. Схема иммуномечения золотом (сверху); меченый антителами с золотом белок-ретикулон на мембранных пузырьках ЭПР в ооцитах ксенопуса (внизу). Фотография предоставлена Киселевой Е.В.

2.6. Криоэлектронная микроскопия

Наряду с методами химической фиксации образца при комнатной температуре применяются методы криоэлектронной микроскопии. Метод криофиксации состоит всего из трех этапов:

- криопротекция и быстрое замораживание (в жидком азоте)
- лиофилизация
- получение замороженных срезов на ультрамикротоме с криокамерой

Преимущества криофиксации в более быстром приготовлении образцов, доступности реактивов, экономичности, большей сохранности клеточных структур за счет отсутствия химического воздействия и максимальной доступности антигенов. С другой стороны, возникают проблемы хранения образцов, компрессии срезов и проблемы глубокой заморозки клеток без повреждения.

Во избежание разрыва клетки вследствие кристаллизации внутриклеточной жидкости необходимо провести процедуру витрификации. **Витрификацией** называется процесс, при котором жидкость охлаждается настолько стремительно, что молекулы воды затвердевают без кристаллизации, формируя аморфный (или vitreous) лед (рис. 24). Про такой образец говорят, что он был криоиммобилизован и затвердел в состоянии *in vivo*.

Такая быстрая заморозка возможна лишь в условиях высокого давления. Существуют специальные приборы для заморозки при высоком давлении, которые позволяют в сотые доли секунд заморозить образец на глубину в несколько сотен микрометров без образования кристаллов льда. Наиболее эффективно криофиксация проходит на небольших объектах, поэтому лучше всего она подходит для вирусов, суспензий клеток, небольших фрагментов тканей и очищенных макромолекул.

Основные методы криоэлектронной микроскопии – это замораживание-замещение, метод криосрезов, метод реплики и крио-сканирующая электронная микроскопия.

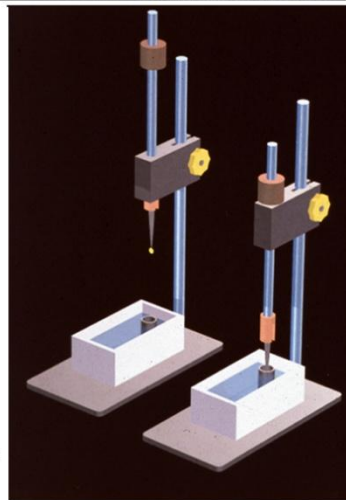
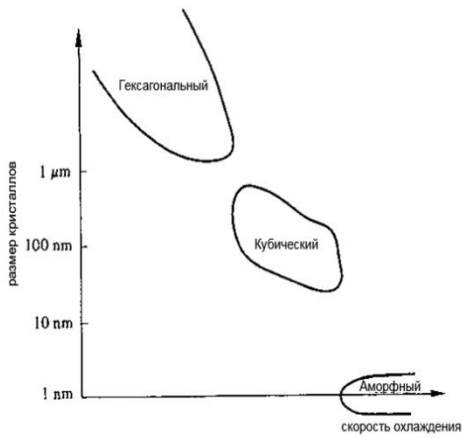
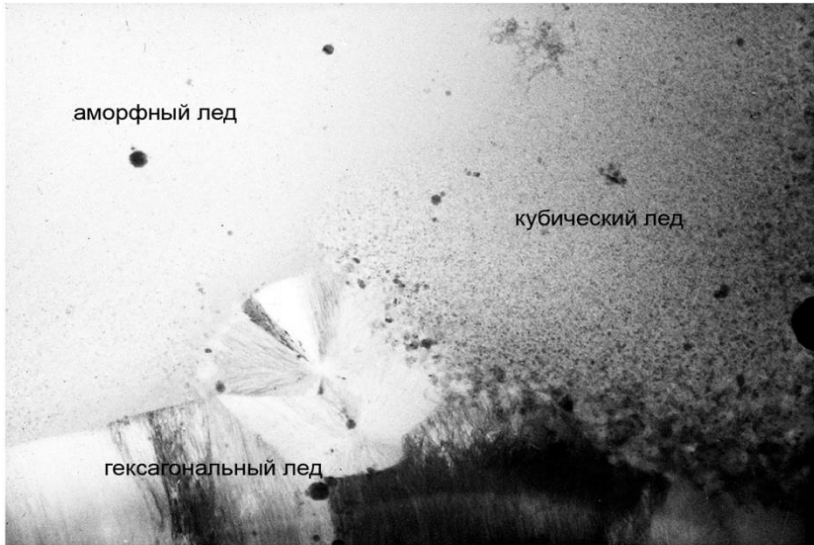


Рис. 24. Получение аморфного льда быстрым замораживанием при высоком давлении.

2.6.1. Метод криосрезов

Приготовление криосрезов, т.е. срезов витрифицированного материала проводят на ультрамикротоме, снабженном криокамерой в атмосфере жидкого азота. Криосрезы хранятся на сеточках при температуре ниже $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ и помещаются в электронный микроскоп с криоприставкой при тех же температурах, чтобы не допустить девитрификации. Такой метод позволяет напрямую визуализировать нативную структуру без какого-либо химического воздействия. Однако метод этот является затратным и сложным, требует дорогостоящего оборудования и, кроме прочего, до 50% срезов теряются из-за компрессии (в случае рутинной ультратомии эта проблема решается ванночкой, в которой срезы расправляются на поверхности воды).

2.6.2. Замораживание-замещение

Более простым и доступным методом является замораживание-замещение.

Данный метод обеспечивает относительно хорошую сохранность структур и дает возможность проводить иммуномечение золотом на срезах.

После витрификации образцы пропитываются при низких температурах ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ниже) специальными растворами, обычно с контрастирующими тяжелыми металлами, такими как тетраоксид осмия и уранилацетат. Пропитка идет несколько часов и даже дней. За этим следует пропитка заливочной смолой при низкой температуре и полимеризация ультрафиолетом при температуре ниже $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Вариации метода допускают повышение температуры образца до комнатной и рутинную заливку в эпоксидную смолу. Если необходимо пометить антигены, образец не подвергается химической фиксации и заливается в специальные метакрилатные смолы (ловикрил) и полимеризуется под ультрафиолетом.

2.6.3. Замораживание-скалывание (метод реплики)

Метод замораживания-скалывания – это метод физического воздействия, исключая химическую фиксацию. Замороженный при высоком давлении образец помещают на охлажденный столик и разламывают острым лезвием, при этом клетки расщепляются по естественным поверхностям. Поверхность разлома подвергается воздействию высокого вакуума (10^{-6} - 10^{-7} мм рт. ст.). Вода, перешедшая в стекловидную форму, возгоняется и поверхность разлома «протравливается», так что на ней рельефно проступают органеллы. Поверхность покрывается (напыляется) тонким слоем металла (платины, палладия или вольфрама). Далее биологический материал вымывается, а полученная реплика дополнительно укрепляется за счет перпендикулярного напыления на ее поверхность слоя углерода. Такая реплика, отражающая все детали поверхности исследуемого образца, складывается на сеточку и помещается в электронный микроскоп. Схематически метод замораживания-скалывания представлен на рисунке 25.

Для небольших частиц и макромолекулярных комплексов реплика получается оттением тяжелыми металлами без предварительного замораживания.

Этот метод особенно хорош для изучения мембран, он позволяет раскрыть мембрану и рассмотреть ее изнутри. Преимущество данного метода в том, что поверхность разлома обнаруживает детали, не выявляемые никакими другими методами. Разлом, следуя по линии наименьшего сопротивления, проходит по естественным поверхностям внутри клетки – например, по мембранам ядра, митохондрий, аппарата Гольджи, и появляется уникальная возможность для изучения этих органелл.

Интересный подход был разработан для проведения иммунопомечивания на реплике: биологический материал вымывается не полностью, а частично растворяется в SDS, при этом остаются интегральные мембранные белки, чьи цитоплазматические домены доступны для иммунопомечивания.

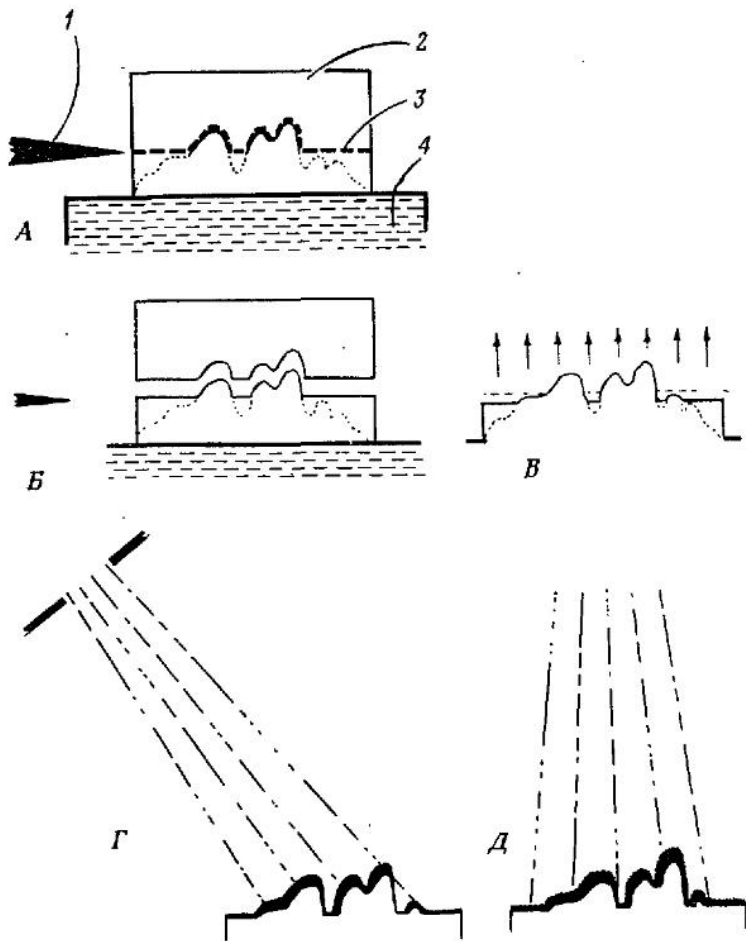


Рис. 25. Метод замораживания-скальвания. А – разлом замороженного материала бритвенным лезвием; Б – ткань расщепляется вдоль естественных поверхностей; В – ткань протравливается, вода сублимируется; Г- полученная реплика оттеняется платиной под острым углом; Д – реплика укрепляется напылением углерода под прямым углом. 1 – лезвие бритвы; 2 – блок ткани; 3 – линия разлома; 4 – замораживающий столик.

2.6.4. Оттенивание тяжелыми металлами

Оттенивание – физическое контрастирование микрочастиц, макромолекул, вирусов, напылением на образец в вакуумной установке тонкой пленки металла под определенным углом. «Тени» (ненапыленные участки) прорисовывают контуры частиц и позволяют измерять их высоту.

Оттенивание тяжелыми металлами – один из самых простых методов с самого зарождения электронной микроскопии, позволяющий рассмотреть любую изолированную частицу. Частицы высушиваются и напыляются тяжелыми металлами в определенном направлении и под определенным углом. На рисунке представлена упаковка нити ДНК в хромосоме дрозофилы (рис. 26, сверху) и сопряженный процесс транскрипции и трансляции у *E. Coli* (рис. 26, снизу).

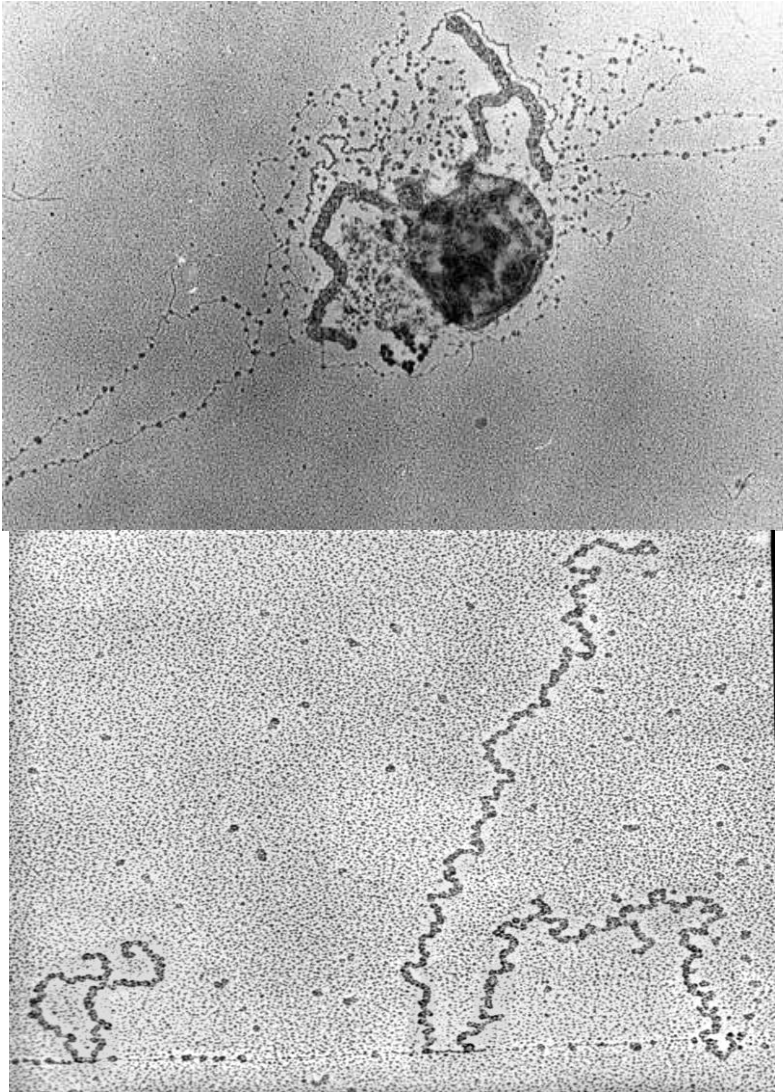


Рис. 26. Макромолекулы, приготовленные методом оттенения (сверху – упаковка нити ДНК в хромосоме дрозофилы; снизу – сопряженный процесс транскрипции и трансляции у *E. Coli*). Фотографии предоставлены Киселевой Е.В.

2.7. Меры безопасности при подготовке электронно-микроскопических образцов

Работая с электронным микроскопом, следует соблюдать правила техники безопасности. Большинство реагентов, применяемых в электронной микроскопии, ядовиты, и обращаться с ними надо с осторожностью. Всю пробододготовку проводить в халате и резиновых перчатках.

Тетраоксид осмия токсичен и очень летуч, работать с ним разрешается только в вытяжном шкафу. Пары тетраоксида осмия раздражают дыхательные пути и могут вызвать тяжелые поражения глаз. Раствор едкий и вызывает ожоги. При попадании на кожу необходимо немедленно смыть проточной водой.

Глутаральдегид менее токсичен и летуч, но при попадании на кожу может вызывать дерматит.

Ацетон легко воспламеняется, с ним нельзя работать возле открытого пламени. При длительном вдыхании может вызывать поражение печени.

Эпоксидные смолы, применяемые для заливки (эпон, Агар) токсичны и могут вызывать дерматит. В экспериментах на животных показано, что эти вещества обладают канцерогенными свойствами. Работать только в перчатках!

Метакрилаты летучи и легко воспламеняются, работать только в вытяжном шкафу.

Свинец, содержащийся в используемом для контрастирования срезов цитрате свинца, способен проникать через неповрежденную кожу. Если цитрат свинца разливается и высыхает, свинец вместе с пылью попадает в дыхательные пути. До и после работы с ним следует тщательно вытирать стол и мыть руки.

2.8. Визуализация в электронном микроскопе

Все электронные микроскопы – сложные и дорогостоящие приборы. К работе с ними допускают только после предварительного обучения.

Перенос электронов происходит в условиях высокого вакуума. Для сохранения этого вакуума сеточки с держателем образца сначала помещают в шлюзовой отсек, где откачивается занесенный снаружи воздух. Затем сеточки аккуратно сдвигают в центр объективной электромагнитной линзы. Вверху колонны электронного микроскопа располагается источник электронов – катод, выполненный в виде вольфрамовой нити или кристалла гексаборида лантана. Образец исследуется при ускоряющем напряжении 80-120 кВ в обычных микроскопах и до 1000000 В в специальных высоковольтных микроскопах (в биологических исследованиях не используемых).

Электронно-плотный материал (биологический материал, окрашенный тяжелыми металлами) отражает электроны, а электронно-прозрачный пропускает. Таким образом, электроны проходят через колонну, через объективную и проекторные линзы и так формируется изображение, которое можно наблюдать глазами на фосфофлуоресцентном экране, а затем запечатлеть на пленке или зарегистрировать ССD камерой и сохранить в цифровом виде.

Достигая флуоресцентного экрана, электроны возбуждают сигнал, который воспринимается человеческим глазом как зеленый свет с силуэтом покрашенных структур на нем.

Сдвинув флуоресцентный экран, мы направляем поток электронов на фотопленку, где изображение детектируется на фотоэмульсии, либо, в современных микроскопах, захват изображения осуществляет ССD камера.

2.9. Электронно-микроскопическая томография

Раньше для воссоздания трехмерного изображения искомой структуры требовалось делать серийные срезы, нарезая и располагая в строгом порядке сотни ультратонких срезов, что было крайне проблематично и удавалось лишь лучшим специалистам. В последние годы появился революционный метод, облегчивший задачу – электронно-микроскопическая томография. Электронно-микроскопическая томография – это процедура, при которой накапливается коллекция множественных изображений среза образца (или небольшой частицы) под разными углами и обрабатывается, проводя томографическую реконструкцию и создавая компьютерную трехмерную модель структуры.

Томография позволяет на отдельных частицах и даже на относительно толстых срезах получать трехмерную реконструкцию интересующей структуры. Для этого используется специальное приспособление – гониометр, позволяющее наклонять сеточку под разными углами относительно потока электронов, от $+70^\circ$ до -70° . Все проекции с интервалом $1-2^\circ$ собираются и записываются. Далее, используя компьютерный алгоритм, методом обратной проекции реконструируется оригинальная трехмерная картинка (рис. 27).

Когда речь идет о сложных структурах, можно достичь еще лучшего результата, если делать томографию срезов образца в разной ориентации.

Такой метод позволяет воссоздать трехмерное изображение как отдельных частиц, например, рибосом, так и сложных структур, таких как митохондрии и аппарат Гольджи, и целых дрожжевых клеток. Пример – на рисунке 28.

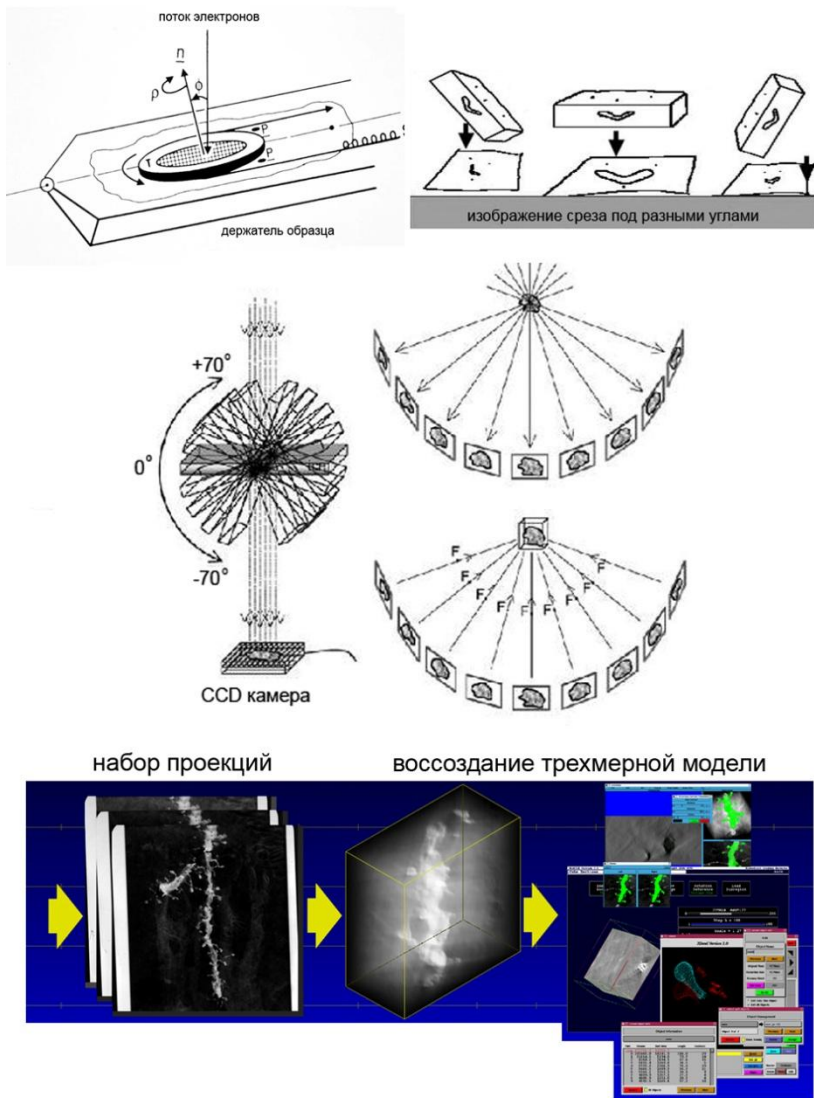


Рис. 27. Электронная томография. Держатель образца поворачивается под разными углами, все проекции среза образца собираются, анализируются и восстанавливается трехмерное изображение структуры.

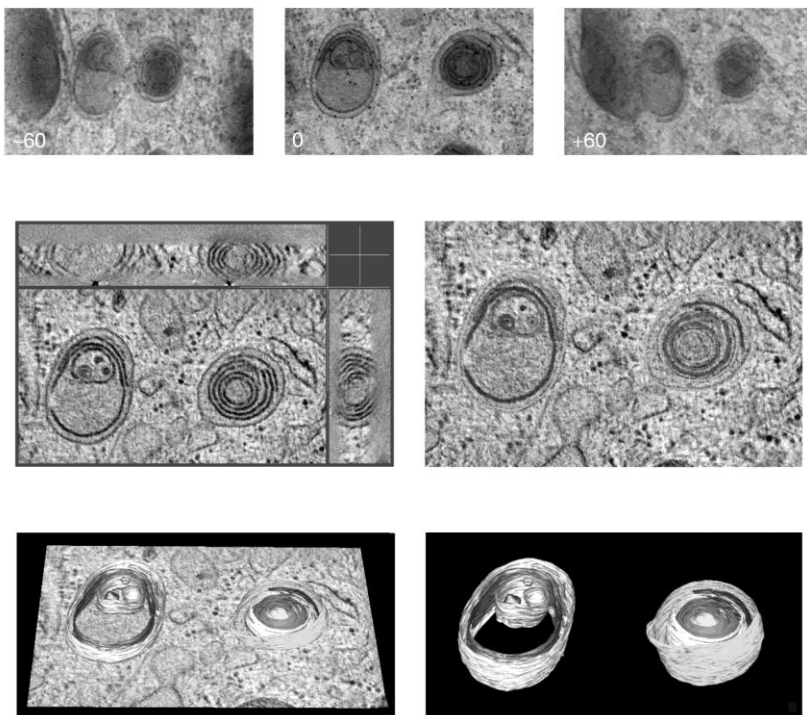
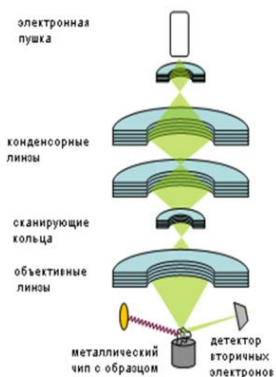
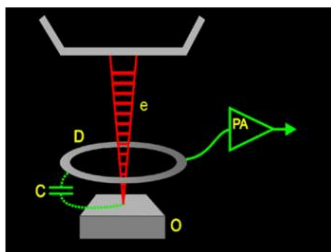


Рис. 28. Применение электронно-микроскопической томографии для реконструкции трехмерного изображения эндоцитозных пузырьков.

2.10. Сканирующая электронная микроскопия

Принцип действия сканирующего микроскопа заключается в сканирование поверхности образца сфокусированным электронным пучком с последующим анализом отраженных от поверхности частиц и возникающего в результате взаимодействия электронов с веществом рентгеновского излучения. Сканирующий электронный микроскоп используется для получения изображения поверхности объекта, позволяет получать информацию о рельефе поверхности, о фазовом различии и кристаллической структуре приповерхностных слоёв.

Сканирующая электронная микроскопия



Электронный зонд сканирует поверхность образца. Металлическое кольцо служит датчиком сигнала, на нем электронами наводится поверхностный потенциал, который через усилитель поступает на дисплей компьютера.

Рис. 29. Сканирующая электронная микроскопия – метод анализа поверхностной структуры микрообъекта путем анализа отраженного «электронного изображения»

Схема сканирующего электронного микроскопа представлена на рисунке 29. Электронный луч, сжатый магнитными линзами в тонкий (1-10 нм) зонд, сканирует поверхность образца, формируя на ней растр из нескольких тысяч параллельных линий. Возникающие при электронной бомбардировке поверхности вторичные излучения регистрируются детекторами и преобразуются в видеосигналы, модулирующие электронный луч. На экране появляется изображение, представляющее собой картину распределения интенсивности одного из вторичных излучений по сканируемой площади объекта.

Анализ образца в сканирующем микроскопе позволяет получать информацию о рельефе поверхности, о фазовом различии и кристаллической структуре приповерхностных слоёв. Анализ рентгеновского излучения, возникающего в процессе взаимодействия пучка электронов с образцом дает возможность качественно и количественно охарактеризовать химический состав приповерхностных слоёв.

Современный сканирующий электронный микроскоп позволяет работать в широком диапазоне увеличений приблизительно от 10 крат (то есть эквивалентно увеличению сильной ручной линзы) до 1 000 000 крат, что приблизительно в 500 раз превышает предел увеличения лучших оптических микроскопов.

Сегодня возможности сканирующей электронной микроскопии используются практически во всех областях науки и промышленности от биологии до наук о материалах. Существует огромное число выпускаемых десятками фирм разнообразных конструкций и типов электронных микроскопов.

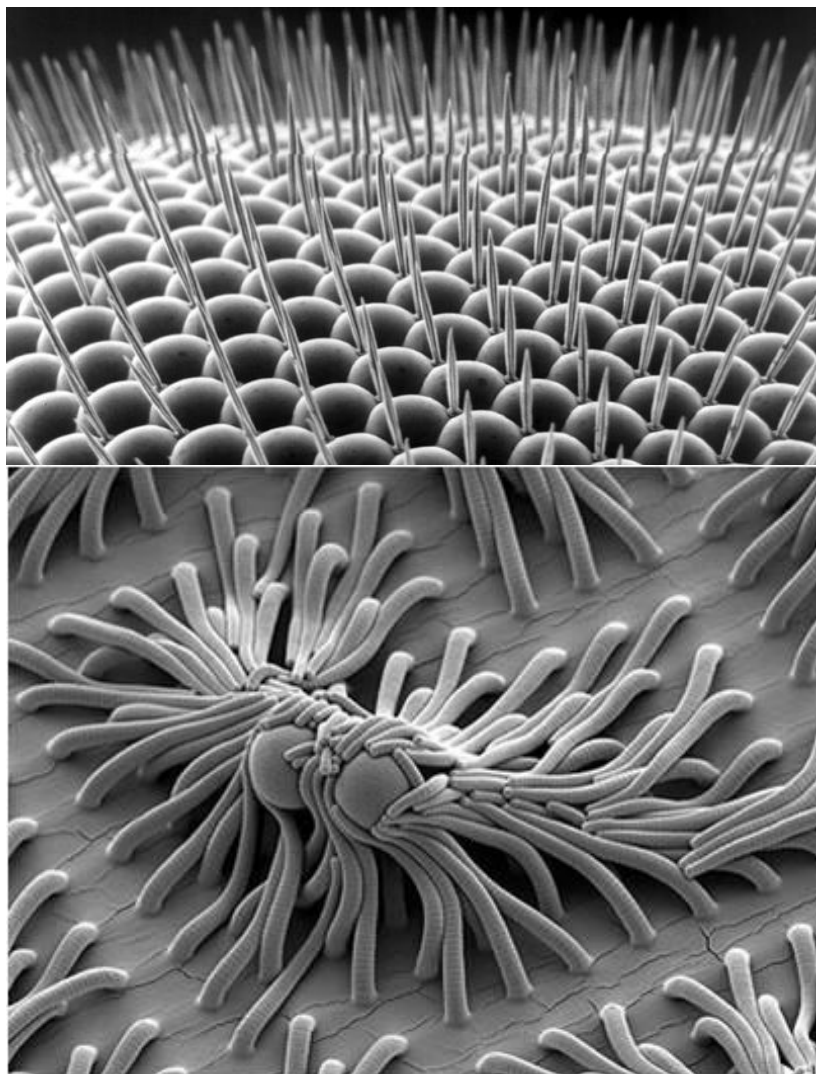


Рис. 30. Фасетчатый глаз дрозофилы (сверху) и нанонитиловушки (снизу). Фотографии получены на сканирующем электронном микроскопе.

Из-за очень узкого электронного луча сканирующие электронные микроскопы обладают очень большой глубиной резкости (0.6-0.8 мм), что на два порядка выше, чем у оптического микроскопа и позволяет получать четкие микрофотографии с характерным трехмерным эффектом для объектов со сложным рельефом (рис. 30). Это свойство крайне полезно для понимания поверхностной структуры образца. Микрофотография кусочка глаза дрозофилы на рисунке 30 демонстрирует возможности сканирующего электронного микроскопа.

2.10.1. Подготовка объектов для сканирующей электронной микроскопии

Наиболее распространенным методом подготовки образца для сканирующей электронной микроскопии является химическая фиксация с последующим высушиванием в критической точке.

Образец фиксируют, затем помещают в раствор этанола, после этого переносят в жидкий CO_2 под давление в специальный прибор и медленно нагревают. Давление поднимается. Когда давление и температура вместе проходят «критическую точку» (31 °C и 74 бара), давление уменьшают. Таким образом, образец высушивается без каких-либо повреждений, минуя фазовый переход жидкость-газ. Далее образец напыляют тонким (от 1 нм) слоем металла, например, платины, палладия или вольфрама, чтобы усилить проводимость и добавить механической прочности образцу, а также локализовать сигнал на поверхности образца.

2.10.2. Элементный микроанализ

Рентгеновский микроанализ биологического материала можно проводить двумя способами. Низкоразрешающий микроанализ обычно проводят на сканирующем электронном микроскопе, снабженном детектором рентгеновских лучей. Таким образом можно выявлять включения в виде небольших частиц в клетках или тканях или смотреть накопление тяжелых металлов в определенных типах клеток. Также можно проводить рентгеновское исследование на просвечивающем электронном микроскопе с рентгеновской приставкой.

2.11. Стереология

Показано, что изменение функции органелл как в норме, так и при патологии часто сопровождается морфологическими изменениями и увеличением/уменьшением их количества. Выявить корреляцию биохимических и физиологических данных с данными морфологии позволяют стереологические и морфометрические методы.

Морфометрия — использование количественных данных при описании структурных признаков.

Стереология — количественный анализ трехмерных структур по их двумерным срезам (физическим/ оптическим/ хирургическим).

Имея дело со срезами, мы переходим от трехмерного объекта к его двумерным срезам. Соответственно, меняются и величины, с которыми мы оперируем при количественных подсчетах.

3D	2D
Объем, V	площадь, S
Площадь поверхности, S	периметр, L
Периметр, L	количество точек, N

Используя статистический подход и большое число срезов, можно составить представление о трехмерных характеристиках органеллы. Чтобы результаты были достоверны, исследуемые образцы должны быть получены методом случайной выборки. Если подготовка изображения – многостадийный процесс, то выборка должна быть случайной на каждой стадии. Беспристрастный отбор проб должен соблюдаться на всех уровнях подготовки образца и обработки изображений: каждый образец (например, орган, ткань, клетка), и каждая часть этого образца (срезы в разной ориентации, разные сеточки со срезами, разные срезы на сеточке и разные участки одного среза) должны иметь равные шансы быть выбранными (см. рис 31). Такой непредвзятый подход является неременным условием стереологии.).

Совокупность стереологических методов, основанных на теории вероятности, позволяют с высокой точностью оценить относительные и абсолютные трехмерные характеристики различных структур (включая объем, площадь поверхности, длину, количество) и их пространственных взаимоотношения, исходя из двумерных изображений срезов образца. Методы эти просты и эффективны.

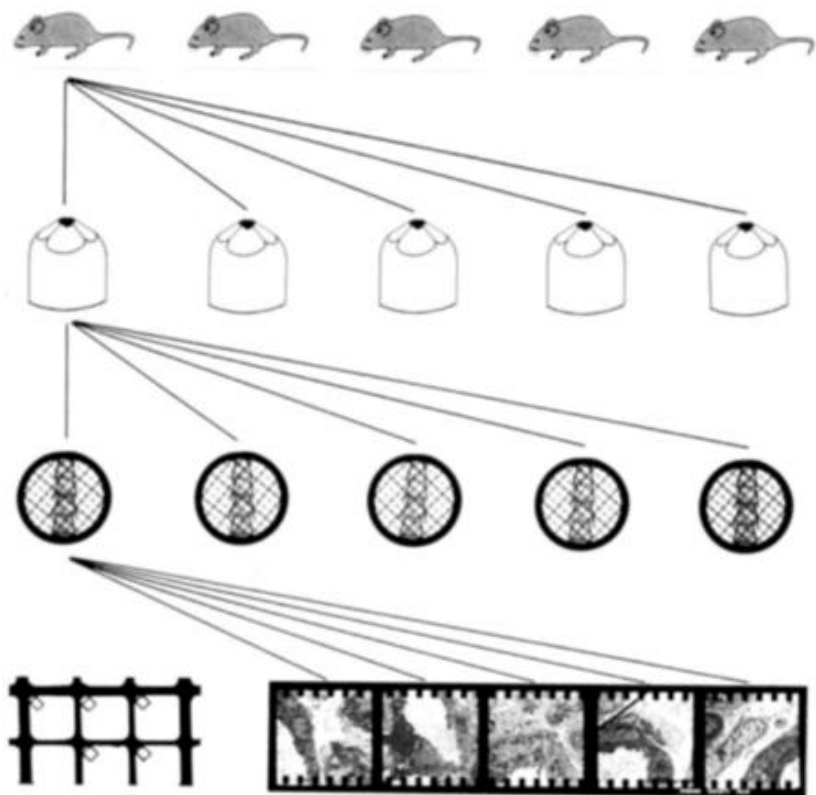
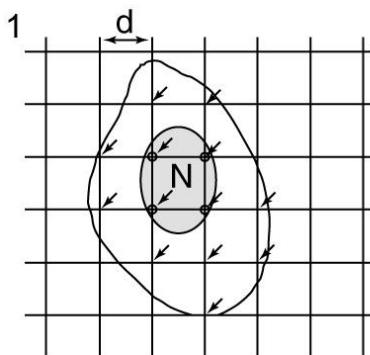
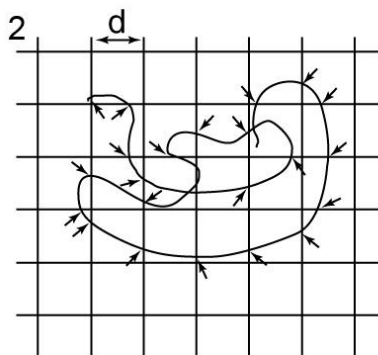


Рис. 31. Непременное условие стереологии – случайность выборки на каждом этапе подготовки изображения.

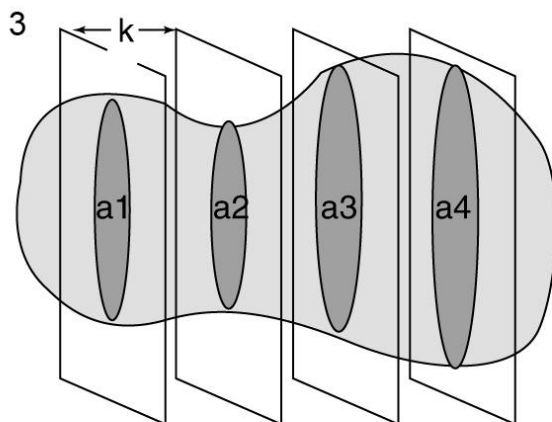
Рассмотрим метод определения абсолютного объема любой структуры и два стандартных метода определения относительной площади поверхности и относительного объема. Когда известен абсолютный объем (например, ядра или клетки), можно рассчитать абсолютную общую площадь поверхности и объем любого клеточного компартмента, используя оценку их относительного объема и относительной площади поверхности.



подсчет узлов
тестовой решетки



подсчет пересечений
с линиями тестовой решетки



оценка абсолютного объема $V=k(a_1+a_2+a_3+a_4)$

Рис. 32. Стереологический метод оценки площади структуры на срезе (1); периметра структуры (2) и объема структуры (3).

2.12.1. Относительная площадь и объем

Для того чтобы оценить площадь различных структур на срезах, на электронно-микроскопическое изображение с помощью специальной компьютерной программы накладывается прозрачный слой с множеством упорядоченных точек («тестовые точки») (см. рис. 32, 1). Так как каждая точка соответствует определенной области, то суммарная площадь поперечного сечения любой структуры прямо пропорциональна среднему числу точек, попадающих на эту структуру. Для нескольких изображений одного образца тестовые точки суммируются и усредняются. Относительное количество тестовых точек, попадающих на различные структуры внутри образца, дает объективную оценку относительных площадей этих структур. Общее количество точек (и относительная площадь) может быть преобразовано в относительный объем (объемную плотность, объемные доли или объемные пропорции).

Если электронно-микроскопические изображения сами по себе представляют множество, полученное из случайно расположенных мест по всему образцу, относительное число тестовых точек на каждой структуре дает оценку не только их относительной площади, но и относительного объема в образце. Этот простой и эффективный метод подсчета точек позволяет количественно охарактеризовать клетки по содержанию митохондрий, комплекса Гольджи и любых других интересующих компартментов.

2.12.2. Относительный периметр и площадь поверхности

Существует простой, но точный метод оценки периметра структуры (линии, ограничивающей структуру на срезе), независимо от ее формы или ориентации. Тестовую решетку с параллельными вертикальными и горизонтальными линиями случайным образом накладывают на интересующую структуру (рис. 32, 2).

Длина линии, ограничивающей нужную структуру, определяется простым и объективным подсчетом пересечений этой линии с тестовыми линиями (находящихся друг от друга на равном расстоянии d) по формуле $\pi / 4 \times I \times d$, где I – это число пересечений, d – расстояние между линиями сетки (Рис. 32, 2).

По аналогии подсчитывается относительная площадь поверхности, то есть поверхность мембраны на единицу объема эталонного пространства. Для этого на случайно ориентированных срезах через клетку и клеточные органеллы подсчитывается число пересечений между тестовыми линиями и мембранами различных органелл (или плазматической мембраной самой клетки). Этот простой и эффективный подход подсчета пересечений позволяет охарактеризовать клетки по поверхностной площади их различных мембран.

2.12.3. Абсолютный объем

Для оценки абсолютного объема вся структура полностью делится на набор случайных срезов (рис. 32, 3), далее выбирается подмножество (например, 1 из 5) срезов. На каждом выбранном срезе оценивается площадь, затем объединенная площадь всех срезов умножается на среднее расстояние между выбранными срезами, что дает оценку объема. Такой метод подходит для любых структур, в масштабах от лизосом до целого человеческого мозга, и дает высокую точность.

2.12.4. Поверхности и объемы на практике

Вышеописанные методы позволяют оценить площадь поверхности или объем любой клеточной структуры, если она больше средней толщины среза.

На рисунке 32 (рис. 32, 1) показан принцип оценки площади образца с использованием тестовой решетки. Прозрачная решетка случайным образом накладывается на изображение

структуры (в данном случае, схематическое изображение среза гипотетической клетки с ядром N посередине). Линии решетки пересекаются, образуя узлы решетки. Подсчитываются все узлы решетки, которые попадают на интересующую структуру. В данном случае на клетку приходится 13 узлов (из них 4 на ядро). То есть ядро занимает $4/13 = 30.7\%$ от объема клетки. Собрав и усреднив информацию с нескольких срезов одной и той же клетки, мы получим более точную цифру. Число узлов решетки (P), умноженное на квадрат длины отрезка в решетке (d) отражает площадь каждой структуры на фотографии $P \times d^2$. Второй фрагмент этого рисунка (Рис. 32, 2) демонстрирует принцип подсчета пересечений для оценки длины границы поверхности (т.е. периметра). В этом примере сетка случайным образом накладывается на изображение и подсчитываются все точки, в которых линия, ограничивающая нужную структуру, пересекается с линиями тестовой решетки. Периметр структуры при этом вычисляется как $\pi/4 \times I \times d$, где I – число пересечений, d – расстояние между линиями тестовой решетки. Этот принцип позволяет оценить длину любого профиля, и может быть преобразован в площадь поверхности. В этом примере, если d = 1 см, и число пересечений I равно 21, то периметр структуры $\pi (3,142) / 4 \times 21$ (пересечения) $\times 1$ см = 16,495 см. Рисунок 32, 3 показывает другой стереологический прием: трехмерный объект разделяют на серию равноотстоящих срезов (в этом примере выполнено четыре среза, a1-a4), а затем объем определяется как сумма площадей на всех срезах, где есть искомый объект, помноженная на объект на расстояние (k) между срезами (на толщину среза для серийных срезов). Этот метод широко используется для различных органов, тканей, клеток и органелл.

В качестве еще одного примера рассмотрим ядерно-цитоплазматическое отношение. Ядерно-цитоплазматическое соотношение показывает относительный объем ядра по отношению к объему всей клетки, на срезе оно рассчитывается как отношение площади ядра к площади всей клетки на срезе.

Используя компьютерную программу (например, Analysis 2.0) мы можем точно подсчитать площадь ядра и площадь всей клетки на срезе и поделить первое на второе (рис. 33).

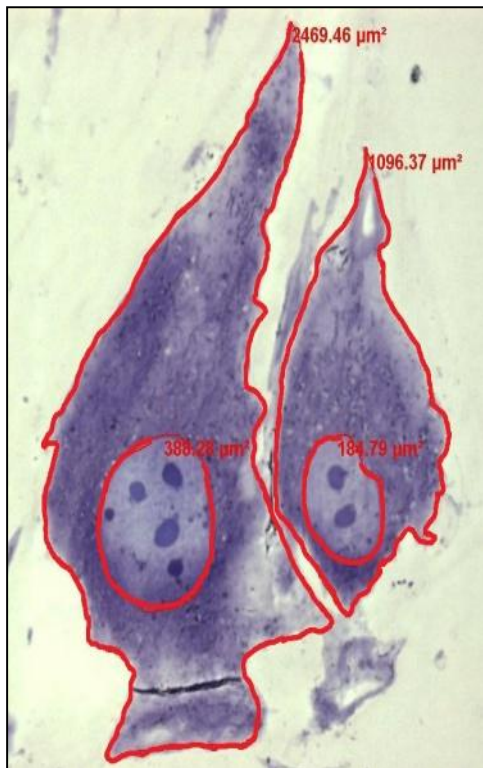


Рис. 33. Оценка ядерно-цитоплазматического отношения – отношения площади ядра к площади всей клетки на срезе.

Другой вариант – использование тестовой решетки. На небольшом увеличении (чтобы влезла вся клетка целиком) на изображение клетки накладывается тестовая решетка. Если на ядро попадает 40 точек, а на цитоплазму 160, то ядро занимает $40/200=20\%$ от объема клетки.

Схожим образом можно оценить поверхностно-объемное соотношение (S_v) любой интересующей структуры, поделив количество тестовых точек, попадающих на структуру, на количество точек, выпадающих на всю клетку.

Рисунок 34 демонстрирует пример наложения тестовой решетки на срез клетки с ядром для определения поверхностно-объемного отношения ядра ($S_{я}/V_{я}$ – отношение площади поверхности ядра к его объему). Для оценки площади поверхности ядра ($S_{я}$) подсчитывается количество пересечений тестовой решетки с ядерной оболочкой. Для оценки объема ядра ($V_{я}$) подсчитывается количество узловых точек (пересечение тестовых линий), попавших внутрь ядра. Поделив $S_{я}$ на $V_{я}$ мы и получаем поверхностно-объемное соотношение ядра (в данном случае $S_{я}/V_{я}=23/27=0.85$).

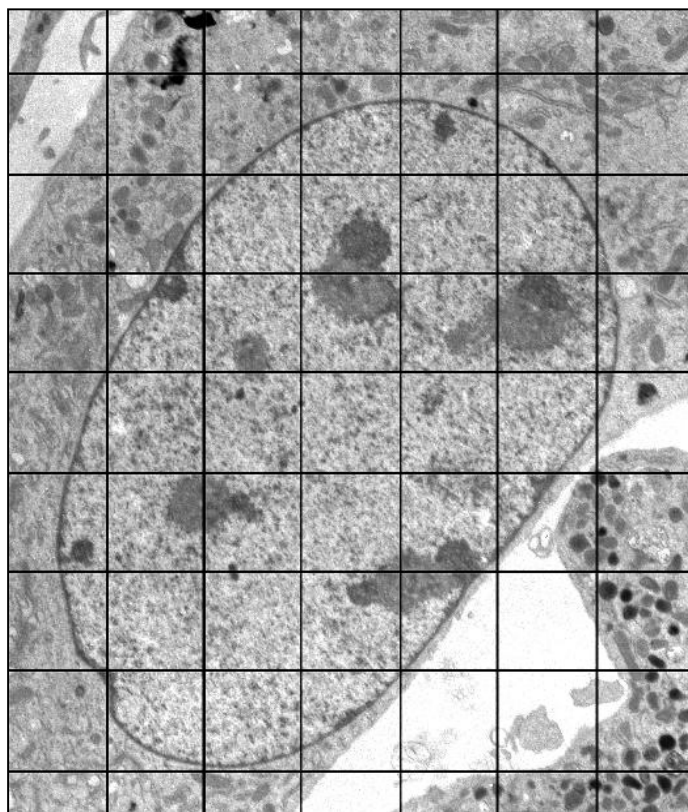


Рис. 34. Пример наложения тестовой решетки на срез клетки для определения поверхностно-объемного отношения ядра.

2.12. Коррелятивная световая и электронная микроскопия

Еще одним преимуществом электронной микроскопии является возможность использовать ультратонкие срезы для мечения на световом уровне. Поскольку мечение в данном случае ограничивается одним тонким слоем на поверхности среза, разрешение значительно превосходит стандартное разрешение при конфокальной микроскопии. Более того, возможно проводить множественное мечение различными флуоресцентными антителами на серийных ультратонких срезах. Поскольку каждый срез будет помечен независимо от другого, не возникает ограничений по использованию комбинации антител.

Недавно был разработан изящный метод прижизненного анализа GFP-меченых структур с последующей визуализацией в электронном микроскопе (рис. 35). Такой метод называется коррелятивной световой и электронной микроскопией – прижизненная конфокальная микроскопия иммуноэлектронной микроскопии для одной и той же живой клетки. Схема эксперимента представлена на рисунке 35.

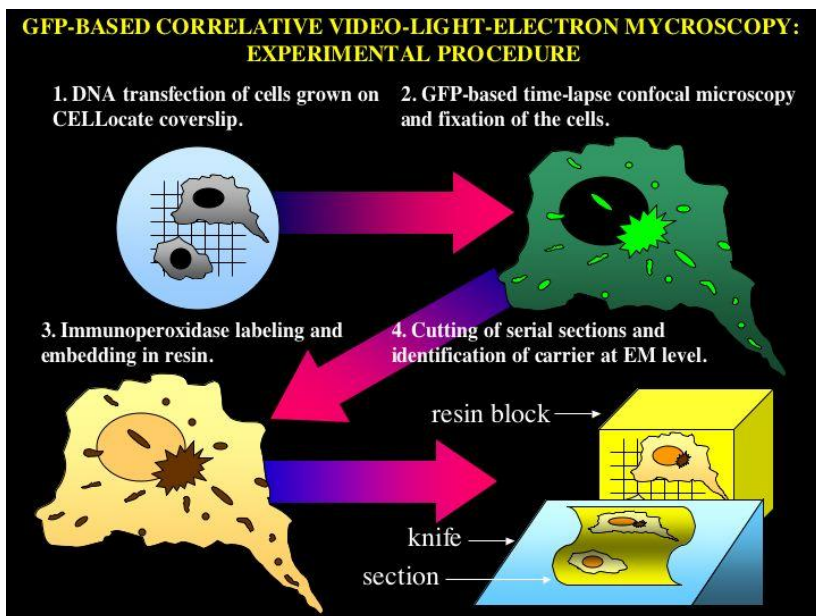


Рис. 35. Коррелятивная световая и электронная микроскопия – прижизненный анализ клетки с последующей ее фиксацией для электронной микроскопии.

2.13. Интерпретация в электронной микроскопии

Интерпретировать двумерное изображение срезов в электронном микроскопе достаточно сложно. То, что очевидно для опытного электронного микроскописта, совершенно непонятно и невидно для новичка.

Не стоит забывать и об артефактах. Сложная и многостадийная процедура подготовки образцов дает проблему артефактов, которые могут возникнуть практически на каждом этапе воздействия на объект. В результате возникает проблема, весьма существенная для биологических исследований, как отличить артефакты от нативного состояния, насколько то, что мы видим в микроскопе, соответствует действительности. Наиболее адекватным методом проверки является сравнение

структуры одного и того же объекта, подготовленного разными способами. Если при варьировании большого количества методик результат воспроизводится, можно предположить, что изображение, регистрируемое электронным микроскопом, коррелирует с реальным строением живой клетки. При этом необходимо учитывать, что очень многое зависит от разрешения электронного микроскопа. При недостаточном разрешении можно просто не увидеть некоторые детали, или неправильно их интерпретировать.

Следующая сложность заключается в том, что структуры на срезе представлены очень тонким слоем, т.е. практически имеют всего 2 измерения. Потеря третьего измерения – серьезная проблема.

На схеме (рис. 36) представлен ряд фигур, каждая из которых в поперечном сечении имеет одинаковый вид – окружность.

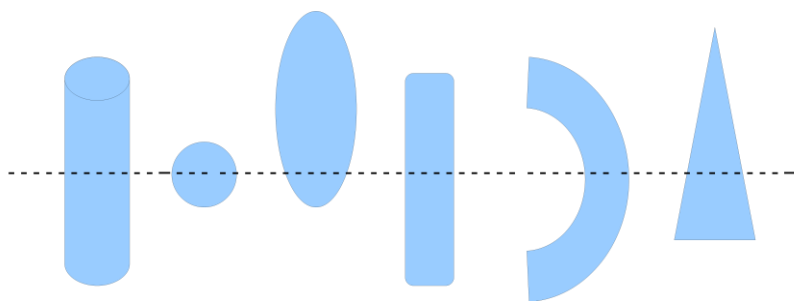


Рис. 36. Фигуры, поперечное сечение которых представляет окружность.

То же самое происходит и на срезах клетки. Округлый пузырек может оказаться срезом длинной трубочки, и т.д. Другая проблема – как усреднить информацию со множества срезов одной клетки, если каждый из них уникален. Срезы одной и той же клетки, снятые на разном уровне, могут сильно отличаться. Чтобы получить представление об истинном строении объекта нужно проанализировать побольше срезов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начиная электронно-микроскопическое исследование и столкнувшись со всем множеством методов, бывает трудно решить, какой именно метод выбрать для того или иного объекта. Многие зависят от масштаба, является ли образец изолированной частицей, клеткой, тканью, органом, или целым организмом. Образец размером более 1 мм следует порезать на небольшие фрагменты перед началом пробоподготовки. Образцы толщиной менее 0.3-0.5 мкм можно смотреть целиком, используя метод негативного окрашивания, все, что крупнее необходимо заподимеризовать и порезать на ультратонкие срезы. Чтобы посмотреть внутренние детали мембран рекомендуется метод замораживания-скальвания. Подавляющее число электронно-микроскопических исследований проводится на ультратонких срезах, позволяющих в деталях рассмотреть ультраструктуру клетки. Если в задачу входит локализация антигенов, вместо рутинной заливки в смолу проводится заливка в специальные смолы с последующим иммуномечением на срезах. Для сочетания иммунолокализации и приемлемой морфологии структур используют метод замораживания – замещения.

Методы электронной микроскопии достаточно сложны и трудоемки, и чтобы овладеть искусством электронной микроскопии, требуется значительное время и средства на покупку дорогостоящего оборудования, поэтому в мире не так много групп, занимающихся электронной микроскопией на высоком уровне.

Ниже представлен перечень интернет-ресурсов и список литературных источников, крайне полезных для начинающих заниматься электронной микроскопией.

Интернет-ресурсы по электронной микроскопии

- Учебник по основам просвечивающей электронной микроскопии <http://www.matter.org.uk/tem/>
- Электронный курс по просвечивающей электронной микроскопии <http://em-outreach.sdsc.edu/web-course/toc.html>
- Атлас световой и электронной микроскопии Биоцентра Базельского университета
<http://www.biozentrum.unibas.ch/~izmb/atlas/htm/index2.htm>
- <http://www.mih.unibas.ch/Booklet/Overview.html>
- Протоколы приготовления образцов для просвечивающей электронной микроскопии и оптической микроскопии
<http://www.hei.org/research/depts/aemi/tec.htm>
- Микроскопия в клеточной биологии
- http://vlib.org/Science/Cell_Biology/microscopy.shtml
- Виртуальная библиотека клеточной биологии
http://vlib.org/Science/Cell_Biology/

Список литературы

1. Груздев А.Д. Применение стереологических методов в цитологии. Новосибирск, «Наука», 1974.
2. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. Москва, "Мир", 1975, 324 с.
3. Bhatnagar R. Immunogold labeling. Part I. Microscopy Research and Technique, 1998, V. 42.
4. Bozzolla JJ, Russell LD. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. 2nd ed. Jones and Bartlett Publ., Boston, 1999.
5. Celis JE. Cell Biology: A Laboratory Handbook 2nd ed. Academic Press, San Diego, 1997, V. 3.
6. Griffiths G. Fine structure immunocytochemistry. Springer-Verlag, Berlin. 1993.
7. Griffiths G. The Use of Electron Microscopy in Cell Biology. MCB, 2004, 68 p.

8. Hajibagheri N. Electron microscopy methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* Humana Press, 1999, V. 117:
9. Hayat MA. Colloidal Gold. Principles, Methods, and Applications, Academic Press, San Diego. 1989, V. 1-3.
10. Javois LC. Immunocytochemical methods and protocols. Humana Press, *Methods in Molecular Biology*, 1999, V. 115:
11. Maunsbach AB, Afzelius BA. Biomedical Electron Microscopy: Illustrated Methods and Interpretations. Academic Press, San Diego, 1999.
12. Reimer L. Transmission Electron Microscopy. Physics of Image Formation and Microanalysis. 4th ed. Springer-Verlag, Heidelberg, 1997.
13. Robards AW, Sleytr UB. Low temperature methods in biological electron microscopy, in *Practical Methods in Electron Microscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1985, V. 10.
14. Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, V. 1-3.