

Підготовка тканин для електронної мікроскопії (за J. Кuo, 2007).

Матеріали

1. Апарат для TBVP (total body vascular perfusion).

Апарат є простим і складається з 2-х контейнерів з розчинами (див. нижче), підвішених на відстані 90 см над твариною. Вливання розчинів під дією тиску гравітації не призводить до пошкодження інтими судин. Контейнер №1 вміщує в собі 0,9% NaCl, для очищення судин, в той час як контейнер №2 – фіксатор, чаще всього глутаровий альдегід. Трубочки з кожного контейнера з'єднуються за допомогою V-подібного перехідника, який продовжується в трубочку, що під'єднується до системи циркуляції тварини.

2. Глутаральдегід (ГА)

ГА є найбільш розповсюдженим фіксатором для електронної мікроскопії та використовується як самостійно, так і в комбінації з іншими фіксаторами, такими як формалін.

Схема приготування 3,125% розчину ГА представлена нижче:

1. 25 мл 25% ГА + 75 мг дистильованої води = 100 мл 6,25% ГА
2. 100 мл 6,125% ГА + 100 мг 0,2 М натрій фосфатного буферу = 200 мл 3,125% ГА в 0,1 М розчині натрій фосфатного буферу

3. Осмію тетроксид

За допомогою осмію проводиться вторинна фіксація зразка і деяке його контрастування. Схема приготування 1% розчину осмію наступна:

1. 1 гр кристалічного осмію розчиняється в 50 мл дистильованої води = 50 мл 2% розчину осмію
2. 10 мл 2% осмію + 10 мл 0,2 М натрій фосфатного буферу = 20 мл 1% осмію тетроксиду у 0,1 М натрій фосфатного буферу

4. Фосфатний буфер (буфер Соренсона)

Фосфатний буфер готується з розчинів А та В, які готуються безпосередньо перед приготуванням основного розчину.

1. Розчин А готується шляхом додавання 27.6 грамів NaH_2PO_4 до 1 літри води
2. Розчин В готується шляхом додавання 28.4 грамів Na_2HPO_4 до 1 літри води
3. До 500 мл розчину В поступово під контролем рН додається розчин А до отримання рН розчину 7,2-7,3. Результатом є отримання стабільного 0,2 М буферного розчину, який може зберігатися протягом тривалого часу при температурі 4°C.

5. **Розчини спиртів** можна приготувати заздалегідь. Єдиною умовою є зберігання їх при температурі 4⁰С. Абсолютний (100%) спирт необхідно готувати безпосередньо перед використанням.

6. **Пропіленоксид (PO).**

Є органічним розчинником. Використовується для розчинення смол, їх проведення в тканину та кінцевої дегідратації під час заливки в смоли.

7. **Смоли.**

Готуються за прописами виробника. Готувати необхідно перед початком експерименту через можливість полімеризації.

Методика підготування зразків.

Крок	TBVP	Звичайна проводка
Забір матеріала	Перфузія тканин анестезованої тварини первинним фіксатором	Анестезована або гуманно виведена з експерименту тварина. Хірургічне видалення тканини і порізка її на шматочки об'ємом 1 мм ³ у первинному фіксаторі
Первинна фіксація	Перфузія тканин через кровоносне русло тварини 3,125% розчином глютаральдегіду в 0,1 М буфері, рН 7,2; 5-10 ⁰ С; 1-2 год. Видалення і порізка тканини на шматочки об'ємом 1 мм ³ у первинному фіксаторі	Фіксація отриманих шматочків тканини у 2% розчині глютаральдегіду в 0,1 М буфері, рН 7,2; 5-10 ⁰ С; 1-2 год
Промивка	0,1 М буферий розчин, рН 7,2; 5-10 ⁰ С, тричі по 15-20 хвилин. При потребі зразки можуть зберігатися в даному розчині протягом 1-2 тижнів при температурі 4 ⁰ С	0,1 М буферий розчин, рН 7,2; 5-10 ⁰ С, тричі по 15-20 хвилин. При потребі зразки можуть зберігатися в даному розчині протягом 1-2 тижнів при температурі 4 ⁰ С
Постфіксація	1% розчин осмію тетраоксиду в 0,1 М буферному розчині, рН 7,2; 21 ⁰ С, 45-60 хвилин	1% розчин осмію тетраоксиду в 0,1 М буферному розчині, рН 7,2; 21 ⁰ С, 45-60 хвилин
Промивка	Дистильована вода 2-3 рази по 2-3 хвилини кожний	Дистильована вода 2-3 рази по 2-3 хвилини кожний
Дегідратація	У зростаючих концентраціях етанолу (50%, 75%, 95%, 100%,	У зростаючих концентраціях етанолу (50%, 75%, 95%, 100%,

	100%) по десять хвилин кожна при 5-10 ⁰ С	100%) по десять хвилин кожна при 5-10 ⁰ С
Інфільтрація пропіленоксидом	РО, двічі по п'ять хвилин кожний, при 5-10 ⁰ С	РО, двічі по п'ять хвилин кожний, при 5-10 ⁰ С
Інфільтрація епоксидними смолами	а) 1:1 РО/епоксидна смола, 30-45 хвилин б) епоксидна смола 6-18 годин при 21 ⁰ С	а) 1:1 РО/епоксидна смола, 30-45 хвилин б) епоксидна смола 6-18 годин при 21 ⁰ С
Переміщення зразків у капсули	Помістити зразок на дно капсули та залити епоксидною смолою	Помістити зразок на дно капсули та залити епоксидною смолою
Полімеризація	Відповідно до інструкції виробника епоксидної смоли	Відповідно до інструкції виробника епоксидної смоли

Методика подвійного контрастування ультратонких зрізів (за J. Куо, 2007)

Матеріали

1. Водний розчин ураніацетату.

20 мг ураніацетату розчинити 100 мл деіонізованої бідистильованої води. Для повного розчинення компонентів можна використовувати магнітну мішалку. рН свіжовиготовленого розчину має бути близько 4. Приготовлений розчин необхідно профільтрувати через фільтрувальний папір. Готовий розчин необхідно зберігати в темному місці.

2. Цитрат свинцю.

1,33 г нітрата свинцю та 1,76 г цитрата натрію розчинити в 30 мл бідистильованої води. При перемішуванні протягом 30 хвилин розчин набуває кольору молока. При додаванні 8 мл свіжовиготовленого 1 N NaOH відбувається просвітлення розчину. Після цього доводимо об'єм розчину до 50 мл. рН готового розчину має бути близько 12,0. Зберігати реактив необхідно в щільно закупореному посуді для запобігання контакту з вуглекислим газом атмосферного повітря.

Методика

1. Помістити декілька крапель ураніацетату у порцелянові луночки.
2. Помістити сіточки в краплю ураніацетату. Необхідно орієнтувати сіточки таким чином, щоб зрізи були знизу. Контрастувати 10-15 хвилин.
3. Промити в буферному розчині двічі по 10-15 хвилин.
4. Просушити сіточки.
5. Помістити сіточки в краплю цитрату свинцю на 10-15 хвилин.
6. Промити сіточки дистильованою водою, двічі по 5-10 хвилин.
7. Після сушки сіточки готові для перегляду на просвічуючому електронному мікроскопі.

N.B.!Протягом перебування сіточок у розчинах ураніацетату та цитрату свинцю необхідно уникати контакту зразків з повітрям та світлом.