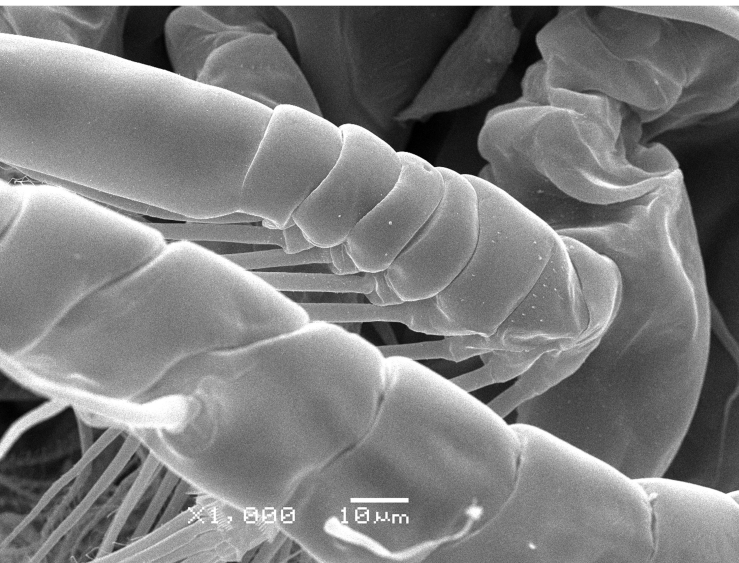


Н.М. БИСЕРОВА, М.М. САЛЬНИКОВА

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ЗООЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМАТИКИ



КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Н.М. БИСЕРОВА, М.М. САЛЬНИКОВА

**СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ
ДЛЯ ЗООЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМАТИКИ**

Учебно-методическое пособие

**КАЗАНЬ
2024**

Н.М. Бисерова

УДК 591(075.8)

ББК 28.6я73

Б65

*Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета,
кафедры зоологии и общей биологии
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета*

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор **А.И. Голубев**;
кандидат биологических наук, доцент **А.Г. Порфирьев**

Бисерова Н.М.

Б65 Сканирующая электронная микроскопия для зоологической систематики: учебно-методическое пособие / Н.М. Бисерова, М.М. Сальникова. – Казань: Издательство Казанского университета, 2024. – 44 с.

Учебно-методическое пособие посвящено применению растровой электронной микроскопии в зоологии; является практическим руководством для зоологов, изучающих морских и пресноводных беспозвоночных животных, добытых в природных условиях. Учебное издание содержит практические рекомендации по сохранению прижизненной морфологии, необходимой для изучения разных видов животных, содержит протоколы фиксации и дальнейшей обработки животных для изучения ультраструктуры поверхности и получения объемных изображений.

Предназначено для студентов, магистров, аспирантов и преподавателей биологических специальностей, исследователей в области зоологической систематики, морфологии и таксономии.

УДК 591(075.8)

ББК 28.6я73

© Бисерова Н.М., Сальникова М.М., 2024

© Издательство Казанского университета, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие

Часть 1. Введение

Часть 2. Что важно понимать, приступая к исследованию зоологического объекта с помощью СЭМ?

 Фиксация, этап первый

 Свойства фиксаторов

 Осмотическое давление

 Значения осмолярности часто используемых растворов

 Дегидратация, этап второй

Часть 3. Сканирующая электронная микроскопия, или как получить объемное изображение животного и его поверхности, важных для систематики

 Сканирующий электронный микроскоп

 Подготовка животных для исследования

 Высушивание методом обхода критической точки

 Монтировка на столик-держатель

 Придание электропроводности или напыление

Часть 4. Рецептурный справочник

Рекомендованная литература

Предисловие

Мир зоологии бесконечно разнообразен, и никто из самых великих зоологов не может изучить его до конца или в полной мере. Современная зоология все больше и больше переходит на изучение самых разных аспектов зоологической науки на модельных объектах. Это очень удобно и действительно помогает понять самые разные процессы и закономерности развития животных. Но что делать, если вы полевой зоолог и вам интересны не лабораторные *си эллеганс*, а те, кто живет в море, реке, озере, в горах или пустынях? А если вы изучаете животных внутри других животных, если вас интересуют паразиты и их структурные взаимодействия с животным-хозяином? Для всех зоологов, работающих на природных объектах, особенно на паразитических животных, я написала это пособие по сканирующей электронной микроскопии.

Основной проблемой при исследовании редких и охраняемых видов является малое, часто единичное, число экземпляров животных, доступных для изучения. В этой связи, сканирующая электронная микроскопия является тем методом, который позволяет наиболее полно составить описание внешнего вида животного, промерить необходимые параметры и определить соотношение частей, а кроме того, обнаружить те структуры, которые отделяют строение одного вида животного от другого с максимальной детализацией.

Н.М. Бисерова

Современная систематика и описание новых видов животных непредставимы без фотографий животных, сделанных на сканирующем электронном микроскопе. Методы подготовки животных к исследованию на СЭМ требуют специальных знаний и навыков, которые в кратком изложении представлены в данном учебно-методическом пособии.

Часть 1. Введение

Изучение биологических объектов под микроскопом привело к образованию понятия «микроскопирование» и «микроструктуры», т.е. такие структуры, которые можно было различить только при значительных увеличениях оптического микроскопа, с использованием объективов 60х, 100х, иммерсии, фазового контраста, и контраста по Номарскому (DIC). Таким образом, размеры микроструктур можно описать размерным диапазоном от 1 до 1000 микрон.

При этом, чаще всего речь идет лишь о визуализации наличия структуры, никаких характеристик строения микроструктур размером меньше 2-3 мкм различить на светооптическом микроскопе не удастся.

Введение в практику биологических исследований электронных микроскопов привело к понятию ультраструктур, поскольку оказалось, что известные ранее микроструктуры имеют весьма сложное строение. Таким образом, визуализация ультраструктур привела к пониманию ультратонкого строения клеток и организмов. Понятие «ультраструктуры» не задается исключительно размерными характеристиками, а во многом связано со способом визуализации. Например, мембраны покрывают непрерывным слоем клетки, видимые в световой микроскоп, и их поверхность огромна, однако строение биологической мембраны невозможно увидеть на оптическом приборе, т.к. ее толщина составляет 7-8 нм, причем имеет трехслойную

структуру. Долгое время ультраструктуры измеряли в ангстремах (\AA), один ангстрем равен 10^{-10} метра.

После перехода на международную систему измерений (СИ), стали использовать единицу измерения нанометр, 1 нм равен 10 \AA или 10^{-9} м. Таким образом, сформировалось понятие наноструктур, т.е. структур, размер которых варьирует от 1 нм до 1000 нм, что соответствует 1 микрону.

Сканирующие электронные микроскопы (СЭМ) нового поколения часто сочетают в себе многие возможности микроскопии высокого разрешения. Новые технологии, создаваемые различными фирмами-изготовителями, обеспечивают работу микроскопа в разных режимах. В некоторых моделях используется чрезвычайно удобная в управлении и настройке система сканирования образца, которая, гарантирует пользователям получение хороших результатов на любых образцах, в том числе на толстых срезах и образцах без фиксации.

Современные микроскопы снабжены так называемым «вакуумным буфером» – устройством, которое не только оберегает микроскоп, но и позволяет отключать потенциальные источники вибрационных помех на время проведения исследований на высоких увеличениях.

Большой выбор дополнительных детекторов, сканирующие приставки, крио- и термодержатели, томографический блок, дополнительные спектрометры, цифровые сканирующие

и телевизионные камеры, фотоприставки делают работу на электронном микроскопе очень интересной и продуктивной.

Часть 2. Что важно понимать, приступая к исследованию зоологического объекта с помощью СЭМ?

Живые биологические объекты гидратированы, т.е. содержат большое количество воды, подвижные белковые молекулы, липиды, сахара, множество мелких молекул и ионов. Все это биохимическое разнообразие заключено в биологические полупроницаемые мембраны, которые, собственно, и определяют тонкое строение зоологического объекта. В зависимости от поставленной задачи, исследователь стремится увидеть нормальную структуру объекта, соответствующую его прижизненному состоянию; или напротив, выявить патологию, результат экспериментального воздействия на животный организм. Все животные обитают в их природной среде, которая, собственно, и определяет особенности внешнего строения поверхности живого организма. Строение поверхности морских организмов отличается от пресноводных, или от обитателей влажной почвы или сухих пустынь. Ленточные черви, паразиты, не имеющие кишечника, имеют покровы, внешне во многом напоминающие структуру кишечного эпителия хозяина.

Для изучения тонкого строения объекта в норме необходимо:

А) Зафиксировать объект в его прижизненном физиологическом состоянии, т.е. не допустить сжатия, разбухания, разрушения поверхностных структур и вымывания подвижных молекул и ионов.

Б) Обезводить объект, не вызвав разрушения мембранных структур, заменив воду на другие переходные жидкости.

В) Не повреждая поверхностные тонкие структуры, заменить легкие жидкости на жидкости, легко переходящие в газ и высушить объект без разрушительного давления сил поверхностного натяжения.

Г) Придать объекту электропроводность для формирования качественного изображения в процессе сканирования

Давайте вкратце рассмотрим важные моменты подготовки для каждого этапа.

Фиксация, этап первый

Что важно понимать до начала фиксации? Ультраструктура определяется конфигурацией весьма подвижных живых молекул, поэтому перенос объекта в фиксатор должен быть быстрым; от момента извлечения животного из среды обитания (или его части, органа) должно пройти минимально короткое время. Фиксировать следует только свежие образцы, если вы не поставили цель изучить посмертную патологию клетки.

Фиксатор убивает клетки и организмы, что в свою очередь может вызвать значительные стрессовые изменения ультраструк-

туры. Поэтому, исходя из гуманных соображений и норм международного кодекса работы с животными, перед фиксацией необходимо использовать обезболивающие препараты. Для беспозвоночных и низших позвоночных животных лучшим средством обезболивания и снятия стресса в момент фиксации является охлаждение объекта до температуры близкой к нулю. Важным достоинством этого способа является отсутствие патологии, быстрое охлаждение не вызывает изменений ультраструктуры, в отличие от введения наркотиков. Для теплокровных животных используют наркоз.

Для сохранения органов в живом состоянии до переноса в фиксатор, охлажденных во льду (но не замороженных!) животных следует препарировать и разрезать на части в холодном физиологическом растворе, который соответствует тоничности внутренней среды изучаемого животного. Размер кусочков для дальнейших исследований должен быть маленьким настолько, чтобы фиксаторы успели проникнуть в ткань раньше, чем наступят посмертные изменения ультраструктур. Скорость проникновения фиксирующих растворов в ткань зависит как от самого фиксатора, так и от плотности ткани. Альдегиды считаются быстрыми фиксаторами, тогда как скорость проникновения осмиевого фиксатора в концентрации 1% на дистиллированной воде составляет 0,75мм/час. Скорости проникновения фиксаторов падают при добавлении буферных солей и сахарозы. Поэтому первые этапы фиксации обычно проводят в холо-

дильнике, при температуре 4°C. Оптимальный размер кусочков составляет 1-2 мм³.

Свойства фиксаторов

Разные фиксаторы действуют на разные группы молекул. Альдегиды образуют многочисленные связи с аминогруппами белков, нуклеиновых кислот (пурины и пиримидины) и фосфолипидов (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин). Другие липиды и фосфолипиды, а также углеводы (сахариды) не стабилизируются альдегидными фиксаторами.

Формальдегид вступает в реакцию с молекулами белков последовательно, сначала образуя связи с аминогруппами, затем получившийся продукт реакции может далее вступать в реакцию с другими молекулами за счет формирования метиленовых мостиков, и т.д. Чем дольше вы держите ткань в формальдегидном фиксаторе, тем более деформируются белковые молекулы. Формальдегид плохо сохраняет ультраструктуры, но полезен для гистохимии ферментов и иммуногистохимии, т.к. сохраняет активность ферментов и антигенов при относительно кратковременной фиксации. Кроме того, при отмывании фиксатора в буфере, происходит обратное «раскручивание» белковых молекул.

Глутаровый альдегид относится к диальдегидам, т.е. содержит две альдегидные группы на обоих концах молекулы, в результате чего он обладает двойной реакционной способно-

стью. Глутаровый альдегид может существовать в растворе в виде мономера, димера и тримера (в последнем альдегидные группы замкнуты сами на себя, поэтому он совершенно не активен и не может использоваться как фиксатор). Альдегидные группы связываются с аминогруппами различных биологических молекул и, таким образом, обеспечивают их высоко специфическую фиксацию на разных пространственных уровнях. Длина фиксирующей молекулы глутаральдегида довольно большая и составляет примерно 8.5 и 17 Å, соответственно, в мономере и димере, (размер складывается из срединной 5-ти и 10-ти членной углеводородной цепи и двух С=О групп по концам). При взаимодействии с молекулами субстрата, содержащими аминогруппы, молекулы глутаральдегида необратимо сшивают их друг с другом в пределах указанных расстояний, сохраняя, таким образом, молекулярные ансамбли во всем объеме клетки в их прижизненной конформации и топографии. При этом каждая молекула фиксатора способна скреплять две находящиеся друг от друга на расстоянии 8.5 и 17 Å соседние аминогруппы, которые могут принадлежать одной и той же молекуле клеточного субстрата, так и разным молекулам. По способности сохранять тонкие клеточные структуры глутаровый альдегид превосходит все другие альдегиды.

Качество альдегидных фиксаторов сильно зависит от чистоты раствора. Их необходимо готовить непосредственно перед началом работ. Формальдегидный фиксатор готовят из порошкового параформа, глутаровый – из специальных стабили-

зированных концентрированных 25% или 50% растворов. Маточный раствор глутарового альдегида следует хранить в морозилке, если в аннотации не указано иного. Порошок параформа – в холодильнике.

Альдегиды токсичны, летучи, вызывают дерматит при попадании на кожу, при постоянном контакте вызывают болезни печени, поэтому работа с ними требует особой осторожности, следует использовать защитные перчатки, маски и работать под вытяжным шкафом.

Осмиевый фиксатор представляет собой раствор четырехоксида осмия, летучее и высокотоксичное соединение. Взаимодействует с липидами по месту двойных связей. С белками взаимодействует частично, видимо с аминогруппами и сульфидными группами. Нуклеиновые кислоты и углеводы не взаимодействуют с OsO_4 и удерживаются за счет белков частично, так же как частицы агрегированного гликогена. Малые молекулы вымываются.

Четырехокись осмия при комнатной температуре находится в твердом состоянии в виде светлых зеленовато-желтых кристаллов, запаянных в герметичные ампулы. Кристаллы тают и превращаются в жидкость при температуре выше 37 градусов. Для хранения готовят маточный раствор (4%) на дистиллированной воде, для фиксации используют 1% или 2% раствор на буфере. Приготовление растворов осмия требует полного отсутствия органических загрязнений на стеклянной посуде, очень плотную пробку и дополнительный слой или посуду для

хранения. Ампулу с твердой четырехокисью осмия сначала тщательно моют, надламывают или разбивают на чистом пергаменте и мгновенно высыпают все, вместе с осколками в колбу с дистиллированной водой. Если в запаянной ампуле кристаллы растеклись по всему стеклу, не лежат компактно в одном месте, ее можно подержать в теплой воде, чтобы кристаллы превратились в жидкость и стекли по стенке. Растворение четырехокси осмия в воде идет медленно, нужны сутки, или больше, чтобы маточный раствор был готов.

Для работы необходимы вытяжной шкаф, очки, маска или противогаз, резиновые перчатки. Пары осмия действуют на сетчатку глаз, нервные структуры, сжигают слизистые и кожу, раствор испаряется при любой температуре выше нуля.

Маточный раствор:

4% OsO₄ на дист. H₂O

Хранить в плотно укупоренной колбе, в темноте, под вытяжным шкафом или в специальном холодильнике. Для долгого хранения можно добавить следы желтой кровяной соли, а лучше – немного бихромата калия.

На сегодняшний день фирмы предлагают 4% раствор OsO₄ на дистиллированной воде в запаянных ампулах по 1 мл, 2 мл, 5 мл, и.т.д. Такую ампулу надо тщательно вымыть от загрязнений органического характера и, откусив носик, быстро перелить содержимое в подготовленную посуду с буфером. Если носик слишком тонкий, раствор плохо выливается из узкого отверстия ампулы. Ни в коем случае *нельзя использовать ме-*

таллическую иглу шприца для забора раствора. Следует взять (ЗАРАНЕЕ ПРИГОТОВИТЬ!) чистую Пастеровскую пипетку с грушей. Вскрытую ампулу с маточным раствором осмия **хранить нельзя**, следует использовать весь объем для приготовления фиксатора.

Двойная фиксация с использованием альдегидов и четырехокси осмия считается на сегодняшний день лучшим сочетанием для сохранения ультраструктур клетки. Глутар-осмиевая фиксация сочетает преимущества обоих фиксаторов: сохраняется больше белков, стабилизируются нейтральные липиды и фосфолипиды. В научной литературе существуют прописи других фиксирующих смесей, например фиксатор по Колфилдду, или фиксатор на основе перманганата калия. Однако, 99% практических задач по исследованию ультраструктур могут быть решены с помощью двойной глутар-осмиевой фиксации биологических объектов.

Для приготовления фиксаторов используют буферные смеси, которые поддерживают необходимую рН среды и осмотическое давление раствора.

Осмотическое давление

Осмотическое давление возникает при давлении молекул раствора на полупроницаемую мембрану.

Полупроницаемой называют мембрану, хорошо проницаемую для растворителя и плохо проницаемую для растворенных веществ (или некоторых из них). Осмотическое давление создают только те вещества, которые не проходят через мембрану. Вещества, создающие осмотическое давление, называются *осмотически активными* веществами. *Биологические мембраны* являются полупроницаемыми; они сравнительно хорошо проницаемы для воды и плохо для ионов и водорастворимых (гидрофильных) веществ. Большая часть водорастворимых веществ в живой клетке обладает осмотической активностью. Молярная концентрация вещества вовсе не обязательно равна молярной концентрации осмотически активных частиц.

Осмолярность раствора (или *осмотическая концентрация*) это концентрация осмотически активных частиц вещества в растворе. Соли, такие как NaCl или KCl, в водном растворе полностью диссоциируют, и их осмотическая концентрация в два раза превышает молярную концентрацию. Молекула CaCl₂ диссоциирует в водном растворе на *три* частицы, поэтому её осмотическая концентрация будет превышать молярную в *три* раза. Вообще, *осмотическая концентрация превышает молярную в такое число раз, на сколько частиц распадается молекула при электрической диссоциации*. Осмотическую концентра-

цию, чтобы не путать с молярной, выражают в не в молях, а в *осмолях* (Осм, Osm) и в производных от этой величины (мОсм, mOsm). Это удобно, когда осмотическое давление создаётся раствором, состоящим из смеси нескольких веществ. Так, например, раствор 100 мМ NaCl + 50 мМ сахарозы будет иметь осмотическую концентрацию $2 \times 100 + 50 = 250$ мОсм.

Определяемая химическими методами концентрация вещества в клетке или других биологических системах может отличаться от осмотической концентрации и по другой причине, кроме электролитической диссоциации, а именно по причине связывания части молекул или ионов белками и другими макромолекулами, или субклеточными структурами. Связанные ионы не диффундируют и не создают осмотического давления. Осмотической активностью обладает только та часть вещества, которая находится в свободном, а не связанном с большими структурами состоянии.

Осмотическое давление – важный фактор сохранения прижизненного внешнего вида животных и клеток. При недостаточном давлении, использовании гипотоничного раствора, в клетке образуется большое количество вакуолей, т.к. происходит «насосывание» воды; клетки и мелкие животные могут разбухать в гипотоническом растворе. Гипертоничный раствор вызывает обратный процесс, клетки уплотняются, теряя воду, животные сморщиваются. Для получения наилучшего результата фиксатор должен обладать физиологическими значениями осмолярности, характерными для исследуемого объекта. Осмо-

тическое давление плазмы крови составляет около 300 mOsm. Для большинства клеток млекопитающих такое давление раствора является изотоническим. Такую же осмолярность имеет 0.16 M раствор хлористого натрия (0,9% физиологический раствор).

Пресноводные, морские и паразитические беспозвоночные имеют разное значение осмотического давления внутренней среды (тканей). Осмотическое давление морских свободноживущих беспозвоночных близко к значениям солености воды в районе обитания (сбора материала). У паразитов надёжным критерием служит осмолярность крови хозяина. Сложнее всего фиксировать пресноводных животных. Осмотическое давление тканей пресноводных никогда не может быть равно давлению воды, в которой они обитают. Если нет никакой справочной информации по вашему объекту, для начала можно использовать значение тоничности физиологического раствора для крови пресноводных холоднокровных.

При фиксации альдегидами следует учитывать общую осмолярность раствора фиксатора и буфера, при необходимости повышая ее с помощью сахарозы или солей, например CaCl_2 . При фиксации четырёхокисью осмия следует приготовить изотоничный для вашего объекта буфер, т.к. именно ионы буферных солей первыми входят в клетку; тяжелые ионы осмия медленно проникают сквозь мембраны. Это особенно важно учитывать при одношаговой фиксации OsO_4 . Кроме того,

важно выдерживать изотоничность буфера (необходимую осмолярность) при промывке ткани между этапами фиксации.

Значения осмолярности часто используемых растворов

Какодилатный буфер:

0.05M - 100-110 мОсм

0.1M – 200-220 мОсм

0.2M – 380-420 мОсм

Фосфатный буфер Зеренсона:

0.05 M - 100 мОсм

0.1M – 200-210 мОсм

0.2M – 350-400 мОсм

Раствор четырёхокси осмия:

1% OsO₄ /0,04M/ – 45 мОсм

2% OsO₄ /0,08M/ – 75 мОсм

Глутаровый альдегид:

1% /0.1M/ – 100 мОсм

2% /0.2 M/ – 170 мОсм

2.5% /0.25M/ – 250 мОсм

3% /0.3M/ – 300 мОсм

4% /0.4M/ – 400 мОсм

CaCl₂

0.001M – 2 мОсм

0.00127M – 3.81 мОсм

Н.М. Бисерова

0.05M – 11 мОсм

0.1M – 250 мОсм

NaCl

0.1M – 200 мОсм

0.16M – 300 мОсм (изотоничен плазме крови человека,
0.9% р-р)

KCl

0.001M – 2.23 мОсм

0.00335M – 6.7 мОсм

0.01M – 22.3 мОсм

0.1M – 220 мОсм

Дегидратация, этап второй

Как дегидратировать или обезводить объект? Поскольку живые ткани и клетки состоят из воды больше чем на 50%, проблема корректного мягкого удаления воды прямо связана с сохранностью ультраструктур. При обезвоживании биологических объектов исследователь должен выбрать замещающую жидкость, отвечающую его задачам и потребностям. Чаще всего обезвоживание проводят в этаноле или ацетоне, приготовив серию растворов повышающейся концентрации от 30% до 100%. Этанол более физиологичен для животных тканей, действует мягче, чем ацетон, что немаловажно для СЭМ всякого рода личинок или других нежных объектов. В то же время, необходимо учитывать растворяющие свойства дегидратиру-

ющих жидкостей, которые кроме замещения воды, могут растворять и вымывать большую часть свободных липидов, пигментов и многие другие компоненты клеток и тканей. Иногда это полезный фактор, иногда его следует избегать. Особенно важны последние этапы дегидратации, когда важно удалить следы воды перед окончательным высушиванием объекта. Поэтому, на последних этапах дегидратации часто используют химически чистый ацетон с маркировкой «для электронной микроскопии».

Другим важным моментом, часто затрудняющим процесс дегидратации, является слишком малый размер и небольшое число образцов, проводка которых идет под бинокляром. В спирте, и тем более ацетоне, объекты становятся очень подвижными, «бегают по поверхности» спиртовой капли, которая к тому же мгновенно испаряется. В этот момент могут произойти необратимые изменения в организме: в результате значительного давления, возникающего на границе раздела сред, объект может быть 1) разрушен частично или полностью; 2) на поверхности образуется воздушная пробка; 3) объект может быть просто утерян, «отскочив» за пределы видимости; и т.д.

Чтобы избежать таких катастрофических последствий, дегидратировать мелких животных, число которых ограничено, следует в специальных камерах. Это также полезно для объектов, которые не тонут, а находятся на поверхности или в толще жидкости. В отсутствии фирменных камер, которые часто не подходят для изучаемого животного, я предлагаю готовить ка-

меры для дегидратации из эпендорфов. Эпендорф надо обрезать снизу и затянуть планктонным газом, приклеив снаружи колечко, вырезанное из другого эпендорфа. С другого конца надо проделать отверстие в крышке эпендорфа и также затянуть его планктонным газом. Таким образом получается проницаемая с двух сторон камера, в которую легко поместить объект благодаря плотной крышечке эпендорфа. Ацетон легко входит в такую камеру, а животные не теряются. Такое устройство помогает исследовать штучные образцы и единичных животных, выделенных из проб, которые нельзя собрать повторно.

Каждая ступень дегидратации повторяется дважды (например: 30%,50%,70% - 2 раза по 15мин), чтобы во второй смене достичь нужной концентрации этанола; при этом важно не забывать о пробочке, закрывающей емкость с объектами: капля воды, оставшаяся на ней, может испортить последние этапы обезвоживания перед заключением объекта в эпоксидную смолу.

Часть 3. Сканирующая электронная микроскопия.

Как получить объемное изображение животного и его поверхности важных для систематики

При работе с мелкими и микронными объектами часто не хватает общей картины всего объекта, которую никак не удастся получить под световым микроскопом в силу технических при-

чин. С другой стороны, поверхность любого биологического объекта представляет собой сложный комплекс самых разнообразных структур и их конгломератов. Расположение тонких структур на поверхности часто носит закономерный характер, трудно выявляемый на срезах. Формы структур и молекул свидетельствуют о функциональных особенностях, и часто перед исследователем стоит задача определить эту форму. Решить такие задачи помогает сканирующий (или растровый) электронный микроскоп.

Сканирующий электронный микроскоп

Сканирующий электронный микроскоп это прибор, в котором используется принцип сканирования поверхности образца тонко сфокусированным электронным лучом для получения изображения поверхности. Точно неизвестно кто первый предложил этот принцип, однако первое опубликованное описание вышло в 1935 г. в статье немецкого физика доктора Макс Колля.

Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) имеет электронную оптическую колонну, вакуумную систему и электронный блок управления. Высота колонны сканирующего электронного микроскопа значительно меньше по сравнению с просвечивающим электронным микроскопом. Колонна небольшой высоты, т.к. имеется только 3 линзы для фокусирования электронов в точке на поверхности образца, линзы ниже образца отсутствуют. Тем не менее, в колонне поддерживается высокий вакуум, поэто-

му исследуемые объекты не должны содержать воды, которая будет испаряться при откачке воздуха и разрушит образец. Камера для размещения образцов достаточно большая, поэтому гораздо меньше ограничений по размеру исследуемых объектов. Наиболее важные отличия сканирующего микроскопа от просвечивающего следующие: а) луч не статичен, он двигается с помощью электромагнитных полей, создаваемых магнитными катушками, линия за линией по очень маленькому участку поверхности образца; б) ускоряющее напряжение составляет 200-30000 вольт, что намного ниже, чем в трансмиссионном электронном микроскопе, поскольку электронам не нужно проникать через объект.

Подготовка животных для исследования

Особенностью подготовки животных для сканирующего электронного микроскопа и получения высококачественных фотографий является сохранение естественного вида поверхности образца, недопустимость обнажения поверхности биологического объекта из раствора на различных этапах подготовки. В то же время, поверхность живых организмов часто загрязнена и покрыта большим количеством слизи и инородных частиц. Для удаления артефактов, водные объекты первоначально следует промыть в физиологическом растворе, изотоничном к природной среде обитания. После фиксации объекты можно очищать ультразвуком, моющими средствами и т.д., в зависимости от фантазии исследователя и поставленных задач. Очистить внут-

ренние поверхности тканей или полостей можно с помощью специальных ферментов.

Этапы подготовки водного животного для изучения поверхностных ультраструктур

1. Очищение поверхности
2. Фиксация
3. Дегидратация
4. Высушивание методом критической точки
5. Монтировка на столик-держатель
6. Придание электропроводности или напыление

Особенности фиксации объектов для сканирующего электронного микроскопа состоят в первую очередь в необходимости корректного подбора осмолярности фиксирующего раствора, поскольку гипер- и гипотоничные смеси приводят к образованию артефактов на поверхности – сморщиванию объекта или образованию выпуклостей, связанных с вакуолизацией клеток и разбуханием органов.

Я обычно рекомендую модификацию глутар-осмиевой методики фиксации, которая отличается постепенным замещением растворов. Постепенное замещение позволяет менять растворы, не обнажая поверхности объекта, что очень важно при изучении структуры поверхности. После фиксации в глутаральдегиде объекты можно промыть в буфере с добавлением моющих средств (1 капля раствора «Фэрри»), если поверхность значи-

тельно загрязнена. Затем следует промыть слабым раствором буфера и дофиксировать раствором четырехокси осмия на дистиллированной воде. Использование осмия полезно не только для сохранения липидных и липопротеиновых структур, но и для придания образцу некоторых электропроводных свойств, поскольку осмий – металл. Для многих мягких беспозвоночных животных полезно применять расслабляющие растворы хлористого магния.

Дегидратацию нежных или слишком мелких объектов необходимо проводить особенно внимательно, чтобы не допустить высыхания и обнажения поверхности, которая не должна оказаться на границе раздела сред, в зоне высокого давления, способного разрушить ультраструктуры. Этиловый спирт предпочтительнее ацетона, особенно на первых этапах; на последних этапах следует сначала смешать спирт с ацетоном в соотношении 1:1, чтобы избежать слишком жесткого воздействия на поверхность объекта. Дегидратацию проводят в спиртах и ацетоне также путем постепенного повышения концентрации и замещения на чистый ацетон.

Высушивание биологических объектов методом критической точки

Как уже было сказано, исследуемый объект не должен содержать воды, которая испаряясь в вакууме, может его разрушить. Тем не менее, многие объекты обладают достаточной твердо-

стью, например, диатомовые водоросли или споры растений могут быть высушены на воздухе без каких-либо заметных разрушений. Давление, создаваемое на границе раздела сред во время испарения очень велико, и зависит от свойств испаряющихся жидкостей. Поэтому, поверхность высушенных на воздухе гидратированных объектов имеет вид, сходный с аквариумом, из которого слили воду, а все растения распластались бессильно по дну и стенкам. Чтобы избежать подобного эффекта и изучать поверхностные ультраструктуры в их естественном виде, применяют метод высушивания в критической точке. *Критическая точка* – это точка на диаграмме состояния веществ, соответствующая критическому состоянию, в котором две (или более) фазы, находящиеся в термодинамическом равновесии, становятся тождественными по своим свойствам. В частности, с приближением к критическому состоянию различия в плотности, составе и других свойствах сосуществующих фаз, а также теплота фазового перехода и межфазное поверхностное натяжение уменьшаются, а в критической точке равны нулю.

Таким образом, метод основан на некоем феномене, когда весь объем жидкости в замкнутом объеме скачкообразно переходит в газообразное состояние без испарения. Давление и температура, при которой происходит этот феноменальный переход и называется критической точкой. Для разных жидкостей параметры температуры и давления значительно различаются. Для гидратированных биологических объектов в качестве переход-

ной жидкости чаще всего используется углекислота, или сжиженный углекислый газ. Для высушивания методом критической точки объекты, находящиеся в ацетоне (или другой промежуточной жидкости) в специальных проницаемых сетчатых корзинках, помещают в камеру с толстыми стенками, в которой замещают ацетон на сжиженный CO₂ путем нескольких промывок, и затем постепенно повышают температуру и давление в закрытой камере. В определенный момент времени жидкость, заполняющая весь объем камеры, превращается в газ, который медленно стравливают. Высушенные таким образом животные или ткани не испытывают разрушающего действия давления, возникающего на линии раздела жидкость-газ и сохраняют естественный вид тонких структур поверхности.

С некоторыми сложностями в использовании метода сталкиваются исследователи редких и охраняемых видов, число экземпляров которых всегда ограничено, поэтому особенно важно не потерять имеющийся образец. Мелкие объекты проходят сквозь металлическую сетку корзиночки и могут потеряться во время заполнения камеры раствором углекислоты, которая обычно сильно бурлит. Для того, чтобы избежать потерь животных во время дегидратации и сушки, я предлагаю делать специальные камеры из эпиндорфов. Узкое коническое дно эпиндорфа срезается и на него наклеивается планктонный газ, который можно дополнительно закрепить кольцом. Получается камера с проницаемым дном, из которой животные не выплывают, и можно сушить даже один мелкий экземпляр без риска

потерять образец. Такое простое приспособление существенно снижает риск потерять драгоценный объект.

Монтировка на столик-держатель

Перед просмотром на сканирующем микроскопе объекты необходимо смонтировать на предметные металлические столики, которые затем помещаются в камеру колонны микроскопа. Высушенные объекты обладают высокой электростатикой и иногда отскакивают от иглочки, поэтому для переноса лучше использовать деревянные зубочистки. На чистый столик-держатель сначала приклеивают двусторонний электропроводный скотч, а на него осторожно помещают высушенных животных. Если у вас нет такого удобного двустороннего скотча, можно использовать электропроводный клей или просто лак для ногтей.

Придание электропроводности, или напыление

Электропроводность объекта - один из важных моментов подготовки материала. При сканировании объекта лучом электронов, на поверхности появляется заряд, который мешает формированию четкого изображения, появляются артефакты, которые в данном случае называются чарджинг. Для того, чтобы избежать формирования заряда на поверхности объекта, накапливающиеся электроны должны стекать с поверхности на металлический столик. Для этого объект покрывают тонкой металлической пленкой, напыляют золотом или платиной. Напылять

сложно структурированный объект так, чтобы пленка была одинаковой толщины на всех участках поверхности довольно затруднительно.

В современных лабораториях используют напылительные установки с тлеющим разрядом, когда атомы испаренного металла, сталкиваясь с атомами нейтрального газа, меняют свою траекторию и хаотично оседают на вращающийся объект, что приводит к образованию равномерного металлического слоя на поверхности объекта. Этот слой позволяет заряду стекать с поверхности образца на подложку и столик.

После придания объекту необходимой электропроводности, ваш материал готов к исследованию на сканирующем электронном микроскопе. Современные цифровые модели сканирующих электронных микроскопов позволяют занести исчерпывающую информацию на снимок, однако, по неопытности начинающий исследователь часто просто нумерует снимки как в бытовом фотоаппарате. Запомните: на каждом снимке должен быть масштаб, название образца и дата.

Хорошо приготовленный образец неизменно вызывает восхищение исследователя своей неожиданной красотой и новыми неизвестными ранее деталями в строении. Именно эти тонкие структуры, незаметные при использовании бинокля и оптического микроскопа становятся основой для описания новых видов в зоологии. Новых открытий в зоологической систематике!

Часть 4. Рецептурный справочник

БУФЕРНЫЕ СМЕСИ

Протокол приготовления 0.05M натрий-какодилатного буфера, pH 5.0-7.4 (Na-cacodilate buffer)



Мол.вес. = 214.05 g/mol

Маточный раствор: 0.1 M какодилат натрия

Для получения 1000 мл 0.1M раствора необходимо взять 21.4 г навески сухого Na-какодилата и довести дистиллированной водой до объема 1000 мл.

Для получения буфера заданной кислотности необходимо добавить определенное количество соляной кислоты в соответствии с таблицей:

100 мл маточного раствора + X мл 0.1N HCl проверить pH и довести до 200мл дист. H₂O для получения 0.05M буфера

pH	0.1N HCl
pH 7.0	12.6 мл
pH 7.2	8.3 мл
pH 7.4	5.4 мл

Осмолярность:

0.1M какодилатный буфер = 200 мосм

0.05M - « - = 100 мосм

Протокол приготовления

0.1М натрий-какодилатного буфера, рН7.2

1 этап

Приготовить 0.2N HCl 100 мл :

1.66мл конц. HCl аккуратно влить в колбу с водой и довести до 100 мл

2 этап

Приготовление маточного 0.2М раствора буфера

$\text{NaC}_2\text{H}_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, (М.в. 214 г/моль)

Для получения 500 мл 0.2М раствора необходимо взять 21.4 г сухого Na-какодилата и довести водой до объема 500 мл.

3 этап

Взять 100 мл 0.2М Na-какодилата, прибавить 5.6 мл 0.2N HCl для получения рН7.2 и довести дист. водой до 200 мл

Протокол приготовления

0.1М Na-Na фосфатного буфера, рН 7.4

МАТОЧНЫЕ РАСТВОРЫ

А) 0.2 М раствор $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (27.58 г/1000 мл)

Б) 0.2 М раствор Na_2HPO_4 (28.38 г/1000 мл)

Для получения необходимой рН буфера следует смешать

x мл раствора А + y мл раствора Б

и довести полученный раствор до 200 мл дистиллированной водой

1 этап

Приготовить 100 мл раствора А:

2.758 г сухого $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ растворить в 50-70 мл дист. воды, затем довести до объёма 100 мл.

2 этап

Приготовить 100 мл раствора Б:

2.838 г сухого Na_2HPO_4 растворить в 50-70 мл дист. воды, затем довести до объёма 100 мл.

3 этап

Для получения буфера рН 7.4 необходимо смешать

19.0 мл раствора А + 81.0 мл раствора Б.

Измерить рН

Для увеличения рН используется **раствор Б**; для уменьшения рН – **раствор А**. Довести полученный объём до 200 мл дистиллированной водой.

ФИКСАТОРЫ

Глутаровый альдегид на фосфатном или какодилатном буфере

Образует многочисленные связи с белками, ненасыщенные липиды и фосфолипиды не стабилизируются. Для фиксации чаще всего используют 1%, 2%, 2.5% глутаровый альдегид на 0.05M (или на 0.1M) какодилатном буфере, (pH 7.2) или на 0.1M фосфатном буфере (pH7.2-7.4).

Маточный раствор: 25% глутаровый альдегид, разморозить при комнатной температуре, не встряхивая. Лучше покупать мелко фасованный препарат, ампулы по 1-2мл и использовать ее целиком, разводя в 10 раз буфером. Другой вариант: стерильным шприцом через резиновую пробку забрать необходимое количество концентрированного глутаральдегида и развести буфером. Остаток снова заморозить.

Количество готового фиксатора рассчитывается исходя из объема фиксируемого объекта в соотношении 3ч. фиксатора на 1ч. ткани

Протокол приготовления

20 мл 2.5 % глутаральдегида

на 0.1 М фосфатном буфере, pH7.4

Дано:

25% глутаральдегид – маточный раствор,

0.1 М фосфатный буфер рН7.4;

Взять 2 мл 25% глутаральдегида и довести объём до 20 мл путём добавления 18 мл 0.1 М фосфатного буфера рН7,4.

Полученный раствор будет:

2.5% глутаральдегид на 0.1 М фосфатном буфере рН7,4

При необходимости повысить осмомолярность фиксатора, в буфер следует добавить 0.1М сахарозы из расчета на весь объём фиксатора.

Для фиксации использовать свежеприготовленный раствор.

При необходимости фиксатор можно хранить в холодильнике, при 4°C, в плотно закупоренной посуде.

Формальдегидный фиксатор на 0.1М фосфатном буфере, рН 7.4

Формальдегид вступает в реакцию с молекулами белков последовательно, сначала образуя связи с аминогруппами, затем получившийся продукт реакции может далее вступать в реакцию с другими молекулами за счет формирования метиленовых мостиков, и т.д. Чем дольше вы держите ткань в формальдегидном фиксаторе, тем более деформируются белковые молекулы.

Формальдегид плохо сохраняет ультраструктуры, но полезен для гистохимии ферментов и иммуногистохимии, т.к. сохраняет активность ферментов и антигенов при относительно кратковременной фиксации. Кроме того, при отмывании фиксатора в буфере, происходит обратное «раскручивание» белковых молекул.

Протокол приготовления

20 мл 4% параформа

на 0.1М фосфатном буфере, рН 7.4:

Дано:

- Параформ, или сухой параформальдегид, порошок белого цвета, хранить в холодильнике.

- 0.1 М фосфатный буфер рН7.4

Взвесить 0.8г сухого параформа

Н.М. Бисерова

Полученную навеску поместить в подходящую чистую и сухую емкость, довести объем до 20мл 0.1М фосфатным буфером и перемешать на магнитной мешалке с постепенным подогревом до 60 градусов в течение 1 часа.

ИЛИ: полученную смесь параформа поместить в термостат, 37°C на 1 сут.; или 1 час при 60°C

Полученный раствор будет:

4% параформ на 0.1М фосфатном буфере, рН 7.4

Фиксатор хранить в холодильнике, для получения хороших результатов – не более 14 сут.

Осмиевый фиксатор

Четырехокись осмия на фосфатном или какодилатном буфере

Используется для стабилизации липидов по месту двойных связей, с белками взаимодействует частично, стабилизирует аминокислотные и сульфидные группы. Для фиксации обычно используют 1% или 2% раствор OsO_4 на 0.05M (или 0.1M) какодилатном буфере (pH 7.2-7.4); или на 0.1M фосфатном буфере (pH 7.2-7.4). Если вы используете одноступенчатую фиксацию четырехокисью осмия, в буфер следует добавить сахарозу (0.1 M) или соль для повышения осмолярности фиксатора в соответствии с тоничностью ткани объекта. Количество фиксатора рассчитывается исходя из объема фиксируемого объекта в соотношении 3 части фиксатора на 1 часть ткани.

Меры предосторожности. Маточный раствор очень токсичен, работать в перчатках и в маске под вытяжным шкафом. Фиксатор не стабилен, следует избегать соприкосновения с металлами, липидными и белковыми загрязнениями, воздухом. Хранить в отдельном герметичном боксе, в специальной посуде с непроницаемой крышкой, без доступа воздуха, в темноте. Использованный фиксатор нельзя сливать в канализацию, его следует собирать в специальную прочную тару с плотной герметичной крышкой.

Н.М. Бисерова

Протокол приготовления

10 мл 1% OsO₄ на 0.1М фосфатном буфере, рН 7.4

Дано:

маточный раствор: 4% OsO₄ на дист. воде

0.1 М фосфатный буфер рН7,4

Взять 2.5 мл 4% OsO₄ и довести объём до 10 мл, путём добавления 7.5 мл 0.1 М фосфатного буфера рН7.4.

Полученный раствор будет:

1% OsO₄ на 0.1 М фосфатном буфере рН7.4

Раствор использовать сразу, желательно не хранить.

ПОЛНЫЙ ПРОТОКОЛ ПОДГОТОВКИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕГО ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

1. Предфиксационная подготовка:

Поверхность образца (в случае загрязнения) необходимо очистить. Для этого можно использовать слабый раствор моющих средств, проточную воду, ультразвуковую ванну т.п.

При подготовке животного образца к изучению под сканирующим микроскопом нельзя допускать воздействие на образец сил поверхностного натяжения. Для этого на всех этапах образец должен находиться в жидкой среде, никогда не обнажая поверхность.

2. Фиксация:

2.5% глутаральдегид на 0.05М какодилатном буфере (от 1 часа)

3. Промывка:

0.05М какодилатном буфере (pH 7,2)

4. Постфиксация:

OsO₄ 1% на 0.05М какодилатном буфере (pH 7,2), 30 мин -1 час

5. Дегидратация:

C₂H₅OH 10% (2 раза по 10 мин)

C₂H₅OH 30% (2 раза по 10 мин)

Н.М. Бисерова

C₂H₅OH 50% (2 раза по 10 мин)

C₂H₅OH 70% (2 раза по 10 мин, можно хранить в холодильнике)

C₂H₅OH 96% (2 раза по 15 минут)

Спирт чист. + Ацетон (1:1) (1 раз – 15 мин)

Чистый ацетон (2 раза по 20 мин)

6. Сушка в критической точке:

Объект переложить в корзинку для сушки не вынимая из ацетона. Быстро поставить корзинку в камеру с сжиженным CO₂, ацетон отмыть несколько раз, сливая CO₂, закрыть клапаны и включить нагрев. $p = 100\text{атм}$, $t = 40^\circ\text{C}$ Образовавшийся газ стравливать медленно, не допуская конденсации.

7. Монтирование объекта на столик-держатель:

Для этого можно использовать специальный электропроводный клей, двусторонний металлизированный скотч или лак для ногтей

8. Напыление металлом:

Au/Pt в камере ионного напыления

РЕКОМЕНДОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Бисерова Н.М. Методы визуализации биологических ультраструктур. Подготовка биологических объектов для изучения с помощью электронных и конфокальных лазерных микроскопов. Практическое руководство для биологов // М. Изд. КМК. – 2013. 110 с.

Давыдов О.Н. К осмотической регуляции некоторых цестод рыб // Гидробиологический журнал. – 1975. - Т. 4. № 5. С. 75- .

Луппа Х. Основы гистохимии // М. “Мир”. – 1980. 343 с.

Миронов А.А., Комиссарчек Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: Методическое руководство // СПб.: Наука. – 1994. 400 с.

Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток // Медицина. – 1979. 151 с.

Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих // Изд. «Мир». – 1975. 324с.

Bozzola J.J., Russell L.D. Electron Microscopy // 2nd Ed. Jones & Bartlett Pub. Inc. Sudbury. MA. – 1999. 670 p.

Maunsbach A.B., Afzelius B.A. Biomedical Electron Microscopy: illustrated methods and interpretation // Academic Press. USA. – 1999. 548 p.

Nixon W.C. Scanning Electron Microscopy // Contemp. Phys. - 1969, V. 10. No 1, pp. 71-96.

Н.М. Бисерова

Учебное издание

**Бисерова Наталья Михайловна
Сальникова Марина Михайловна**

**СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ
ДЛЯ ЗООЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМАТИКИ**

Учебно-методическое пособие

Компьютерная верстка

Дизайн обложки

Подписано в печать 2024.
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Times New Roman».
Усл. печ. л. Уч.-изд. л. Тираж экз. Заказ

Отпечатано в типографии
Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужина, 1/37
тел. (843) 206-52-14 (1704), 206-52-14 (1705)