

# BioREE

## Протокол визуализации контрастированных образцов на сканирующем электронном микроскопе (ESEM|EP)

Инструкция по настройке и применению сканирующего электронного микроскопа в режиме низкого вакуума (EP — режим, ESEM) для визуализации структуры клеток, контрастированных набором для подготовки BioREE-Ln

Док.№ BRLN002 v1.0

**Разработал:** Новиков И.А.

**Проверил:** Грибоедова И.Г.

**Дата:** 14.12.2015

**Введение:** Сканирующий электронный микроскоп изначально не рассматривался, как прибор для визуализации внутренней структуры исследуемого биологического объекта. Его применимость ограничивалась получением информации о форме его поверхности после соответствующей предварительной подготовки. Однако, после появления технологий избирательного насыщения отдельных структур клетки элементами группы лантана, стало возможным использование СЭМ для визуализации клеточной ультраструктуры. Особенно удобными для такого рода анализа являются разновидности СЭМ, имеющие режимы низкого вакуума и не требующие предварительного напыления образца образца токопроводящей пленкой. При контрастировании биологических объектов набором реактивов BioREE (или с использованием аналогичных методик) настройки микроскопа имеют ряд особенностей. Соблюдение параметров, указываемых в настоящем протоколе может увеличить Ваши шансы на получение высококачественных изображений контрастированных образцов на сканирующем электронном микроскопе.

**Объекты исследования:** Данный протокол позволяет получить контрастные изображения структурных элементов тканей и клеток, культивируемых на пластике любого типа, силикатном стекле, в том числе с покрытием, на углеродных и полимерных скаффолдах, исключая те, в основе которых лежат фосфаты.

**Внимание!** Залогом для получения хороших изображений и отсутствия досадных артефактов, является правильное проведение пробоподготовки, описанной в протоколе **BRLN001**.

**Внимание!** Напоминаем, что контрастирование структур клеток элементами группы лантана (лантанойдное контрастирование) имеет суправитальный характер. Получаемые результаты зависят от состояния клеток, активности и характера клеточного метаболизма на момент контрастирования.

### Процедуры:

1. Разместите образец на предметном столике микроскопа. Оптимальный размер исследуемого образца (вместе с подложкой) не должен превышать 8мм по кратчайшему измерению. Мы рекомендуем предварительно фрагментировать крупные образцы культурального пластика. Это требование связано с процессом перераспределения заряда на поверхности исследуемых плоских объектов.
2. Убедитесь, что микроскоп находится в режиме EP. Мы рекомендуем выбирать давление остаточной атмосферы камеры микроскопа в диапазоне 55-90Па.

3. Разместите предметный столик микроскопа в камере и снизьте давление до необходимого уровня. Если образец массивный и сильно обводненный (и если позволяет конструкция микроскопа), то проводите откачивание в несколько циклов, сочетая периоды откачки до промежуточных значений давления и вентиляции камеры. Это поможет избежать избыточной деформации образца и кристаллизации остаточных солей на его поверхности.

4. Включите высокое напряжение и установите ток. Выбор ускоряющего напряжения зависит от необходимой эффективной толщины слоя, в котором необходимо визуализировать структуры после лантаноидного контрастирования.

Таблица приблизительных значений ускоряющего напряжения для некоторых объектов

Объект исследования		Ускоряющее напряжение, кВ
Прикрепленные животные клетки на подложках. Глубина визуализации соответствует полному объему клетки.		
Отдельные «распластанные» животные клетки	на пластике	20-23
	на стекле	20-21
Отдельные «сферичные» животные клетки	на пластике	22-24
	на стекле	20-23
Прикрепленные животные клетки на подложках. Глубина визуализации соответствует поверхности клеточной мембраны.		
Все типы животных клеток на пластике или стекле с адгезивным покрытием		10-15
Все типы животных клеток на силикатном стекле без покрытия		7-11
Прочие объекты, визуализируемые после контрастирования элементами группы лантана по протоколу BRLN001		
Все типы животных клеток, осажденных из взвеси на подложку из углерода, пластика или стекла с адгезивным покрытием		23-27
Все типы растительных клеток с тонкой, искусственно истонченной или частично ферментированной клеточной стенкой		23-30
Все типы животных клеток, образовавшие в процессе культивации монослой или многослойные структуры, образцы тканей (визуализация структуры ближайших к поверхности клеток).		20-27
Бактерии, простейшие, дрожжи и т.п		20-22

5. Визуализацию проводите с использованием детектора обратно-рассеянных электронов (BSE) в режиме высокой контрастности. Для достаточного соотношения сигнал/шум на детекторе подбирайте ток пучка эмпирически (например, для микроскопа Zeiss EVO LS10 он устанавливается в пределах 440-570пА).

6. Работайте с большой апертурой пучка. Максимальное качество визуализации достигается при выборе короткого рабочего отрезка ( $WD < 6\text{мм}$ ). Однако в случае исследования объемных образцов старайтесь выбирать рабочий отрезок так, чтоб не повредить микроскоп. выступающими участками образца при перемещении столика.