

BioREE

Протокол лантаноидного контрастирования биологических образцов для последующего исследования на сканирующем электронном микроскопе (ESEM|EP)

Инструкция по пробоподготовке образцов для исследования на сканирующем электронном микроскопе (ESEM|EP) с визуализацией внутренней структуры клеток

Док.№ BRLN002 v1.0

Разработан: Суббот А.М.

Проверен: Федоровым А.А.

Дата: 14.12.2015

Введение: Технология насыщения отдельных структур клетки элементами группы лантана, и, следовательно, увеличения их контрастности в режиме детекции обратно-рассеянных электронов, делает возможным использование СЭМ для визуализации клеточной ультраструктуры.

В невысоких концентрациях не происходит мгновенной гибели исследуемых клеток, а постепенно «выключаются» энергозависимые процессы, что позволяет отнести метод к суправитальным. Мы отметили, что локализация контрастных зон постоянна во всех типах клеток.

Накопление лантаноидов в структурах клетки обусловлено несколькими механизмами:

- лантаноиды связываются с РНК (что делает яркими ядрышки)
- лантаноиды замещают кальций в белках типа кадгерина (что маркирует зоны межклеточных контактов)
- парный транспорт двух ионов кальция замещается трехвалентным ионом лантаноида в паре с щелочным металлом (что в большой степени соответствует расположению кальциевых насосов)
- фосфатные остатки, образующиеся при протекании энергозатратных процессов например, сборке микротрубочек, выпадают с лантаноидами в нерастворимые формы (и мы видим следы сборки цитоскелета)

Объекты: Контрастирование целесообразно проводить для живых (не фиксированных) клеток, так как в противном случае информативность получаемых изображений несравнимо ниже. Протокол был опробован для контрастирования структурных элементов тонких тканевых проб (соскобов толщиной до 1мм) и клеток, культивируемых или первично полученных, на пластике любого типа, силикатном стекле, в том числе с покрытием, на углеродных и полимерных скаффолдах, исключая те, в основе которых лежат фосфаты.

Принцип работы набора: Во время первой промывки удаляются компоненты ростовых сред и жидкости основного вещества ткани, сорбировавшейся на поверхность образца.

Последующая выдержка в растворе редкоземельного элемента приводит к его избирательному накоплению на тропных клеточных структурах. Вторая промывка удаляет излишки контрастирующего вещества.

Реагенты:

- промывочный раствор – изотонический раствор хлорида натрия;
- раствор контрастирующего вещества, $NdCl_3+NaCl$;
- раствор для финальной промывки образца – дистиллированная вода.

Таблица приблизительных значений времени выдержки в контрастирующем растворе для некоторых объектов

<i>Объект исследования</i>	<i>Время выдержки мин</i>
Прикрепленные клетки на подложках	
Отдельные клетки на пластике или стекле с адгезивным покрытием	15
Монослой клеток на пластике или стекле с адгезивным покрытием	30
Тканеинженерная конструкция, 3D скаффолд	30
Нативная ткань	45
Суспензионные культуры	
Суспензия клеток	15
Клетки осажденные на мембрану	15
Бактерии, простейшие, дрожжи и т.п	15

Проведение контрастирования прикрепленных клеток на подложках и образцов ткани:

- 1) Образец промывают в изотоническом растворе NaCl, иначе часть РЗЭ, будучи тропными к фосфатам, могут образовать нерастворимые соединения с компонентами ростовых сред и жидкостью основного вещества ткани, сорбировавшимися на поверхность образца, что может мешать дальнейшим наблюдениям.
- 2) Образец размещают в емкости с водным изотоническим раствором контрастирующего вещества и экспонируют в растворе указанное время.
- 3) Образцы промывают в дистиллированной воде (1-10 сек) для удаления излишков контрастирующего вещества, остатки влаги можно удалить, подсушив образец «воздушной кистью».
- 4) Подготовленные объекты размещают на предметном столике микроскопа.

Наилучшие результаты удается получить, если объект исследования во время процедуры окрашивания находится в условиях, максимально приближенных к физиологическим, что достигается термостатированием образца и помещением его в ротационный шейкер с небольшой частотой.

Проведение контрастирования суспензии клеток:

- 1) Образец центрифугируют, убирают супернатант и добавляют промывочный раствор. Встряхивают на вортексе. Центрифугируют, убирают супернатант, оставляя 1 мл. Встряхивают на вортексе для удаления конгломератов.
- 2) К клеточному осадку добавляют водный изотонический раствор контрастирующего вещества и экспонируют в растворе указанное время.
- 3) Осаждают клетки на мембрану шприцевого фильтра.
- 4) Промывают кассету мембранного фильтра дистиллированной водой для удаления излишков контрастирующего вещества и извлекают мембрану с осажденными клетками из кассеты.
- 5) Подготовленный объект размещают на предметном столике микроскопа.