

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра клеточной биологии и гистологии

Занятие 2.

Электронная

микроскопия

Доронина Татьяна Валерьевна

2019 год

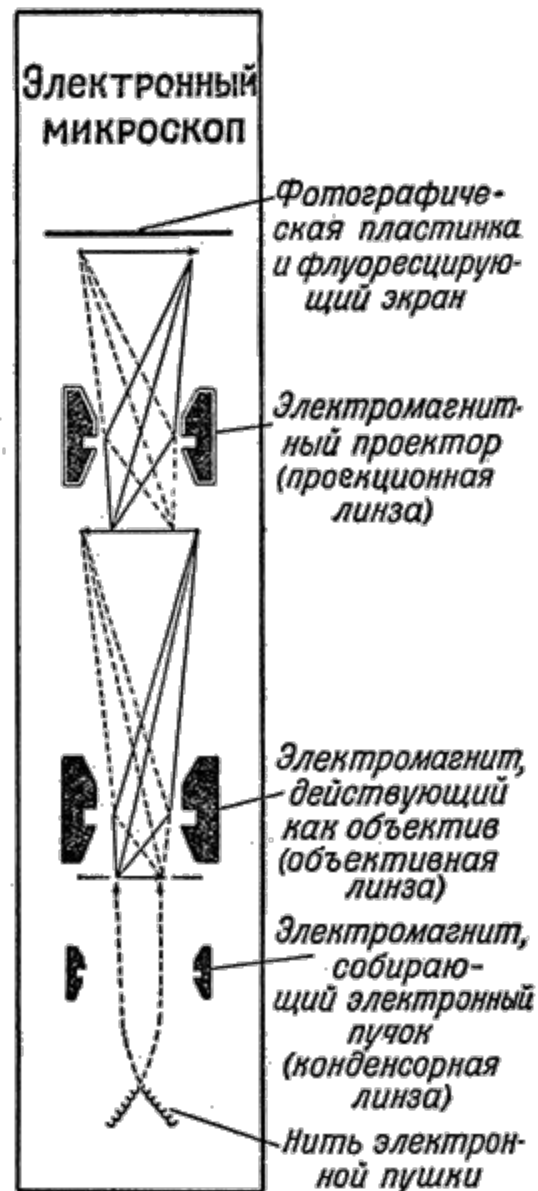
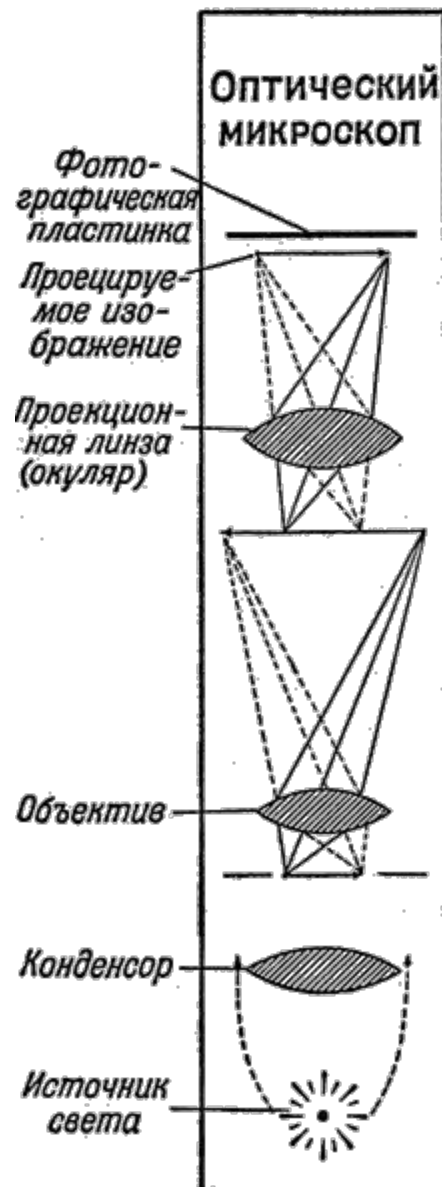
Предел разрешения светового микроскопа:

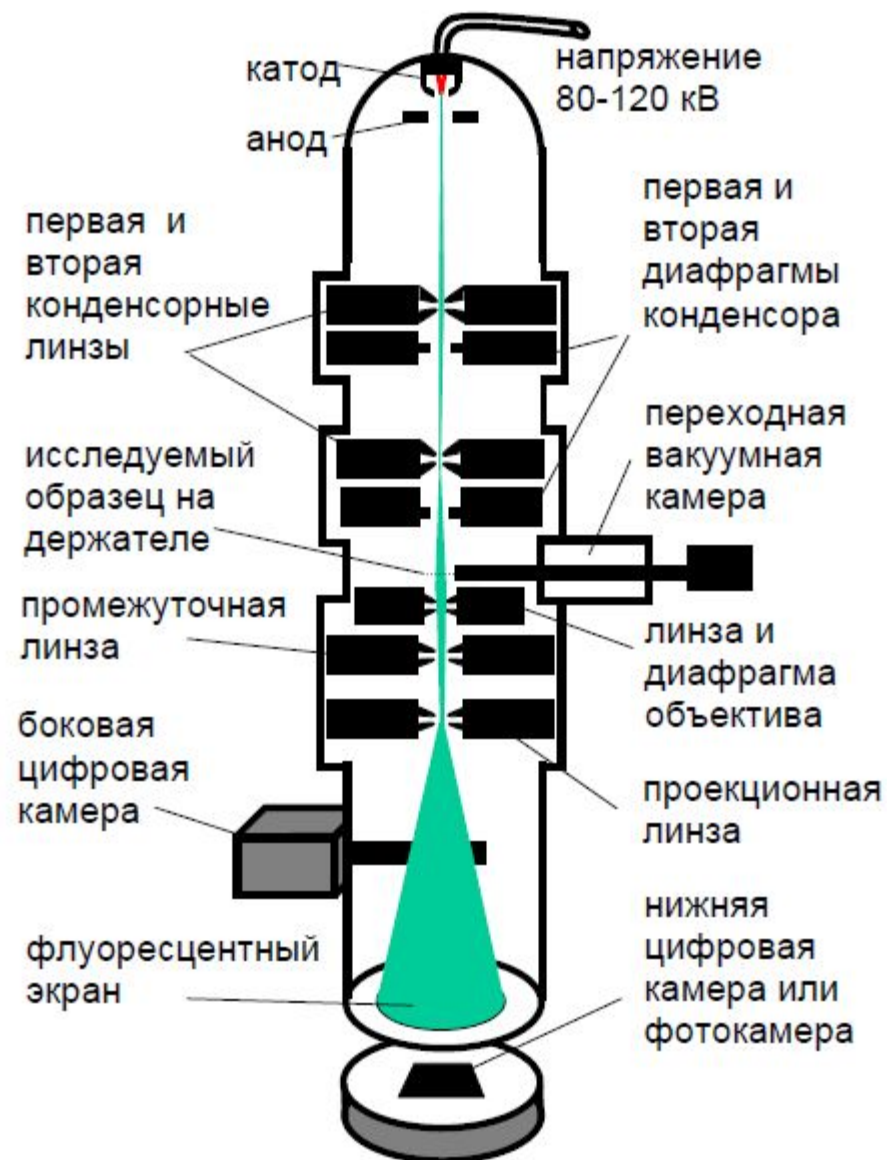
- 200-300 нм (0,2 – 0,3 мкм)
- 130-140 нм (0,13 – 0,14 мкм) – при использовании УФ света

Предел разрешения электронного микроскопа:

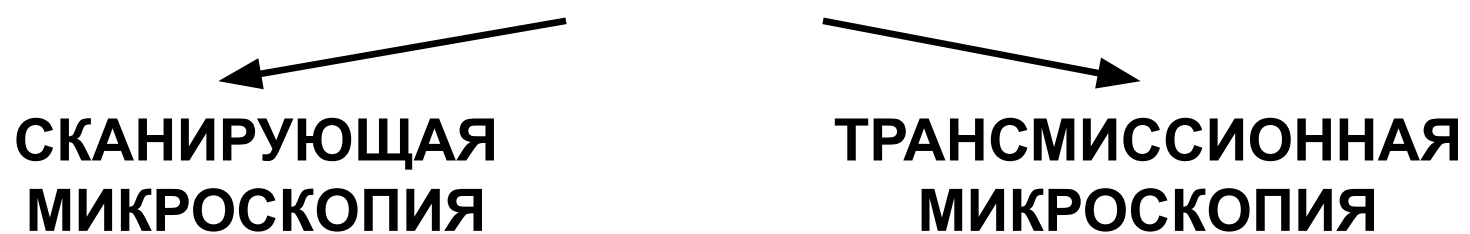
- $1\text{\AA}$ (0,1 нм)

$$1\text{ мкм} = 10^{-6}\text{ м}; 1\text{ нм} = 10^{-9}\text{ м}; 1\text{\AA} = 10^{-10}\text{ м}$$





ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

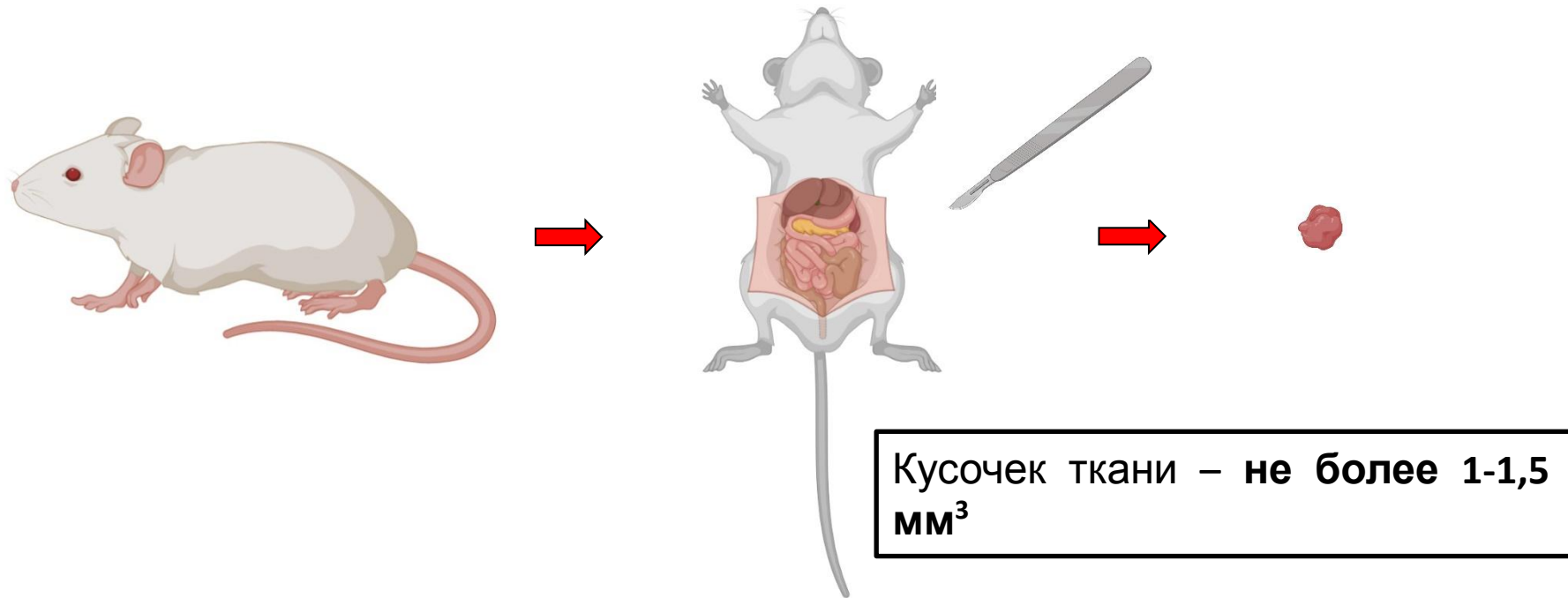


```
graph TD; A[ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ] --> B[СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ]; A --> C[ТРАНСМИССИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ];
```

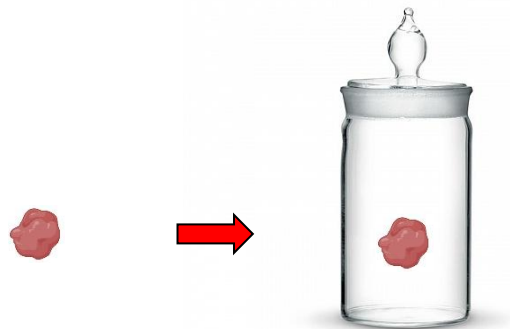
**СКАНИРУЮЩАЯ
МИКРОСКОПИЯ**

**ТРАНСМИССИОННАЯ
МИКРОСКОПИЯ**

1. Забор материала



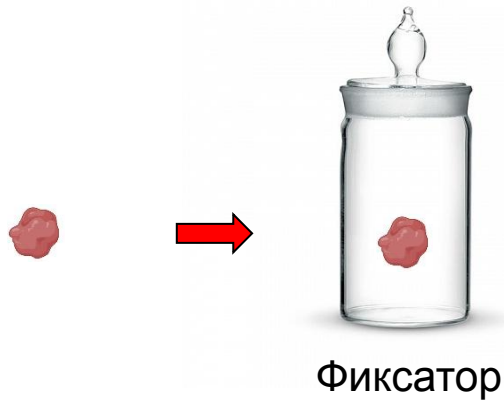
2. Фиксация



- 2,5% глутаровый альдегид
- Альдегиды «сшивают» клеточные белки
- Глутаровый альдегид обеспечивает лучшую сохранность тонких структур + относительно быстро проникает в ткани.
- Буферы – Зоренсена, какоделатный pH 7,2-7,4

3.

Постфиксация.



При альдегидной фиксации ненасыщенные липиды и фосфолипиды не стабилизируются – нужна дополнительная фиксация («постфиксация»).

- 1% раствор тетраоксида осмия (OsO_4) - взаимодействует с липидами и белками по месту двойных связей.

4.

Обезвоживание



5. Позитивное контрастирование

6. Пропитывание ткани заливочной смесью

ацетон/эпон=3:1 → ацетон/эпон=1:1 → ацетон/эпон=1:3

7. Заливка материала

Эпоксидные смолы, эпон

капсулы с заливочным эпоном →

термостат 37° С → термостат в 60 ° С (полимеризация)

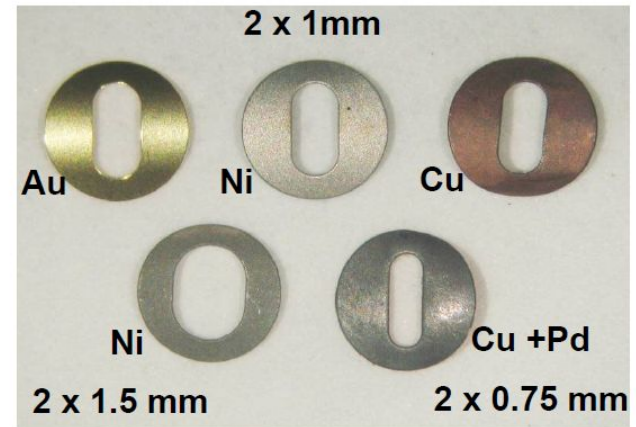
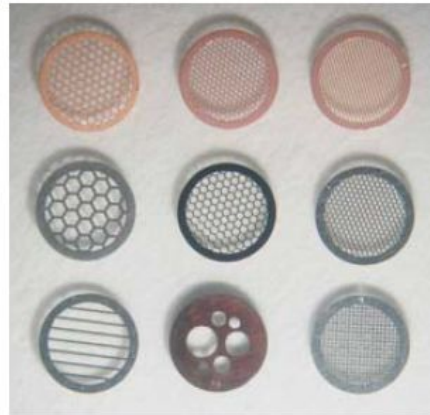
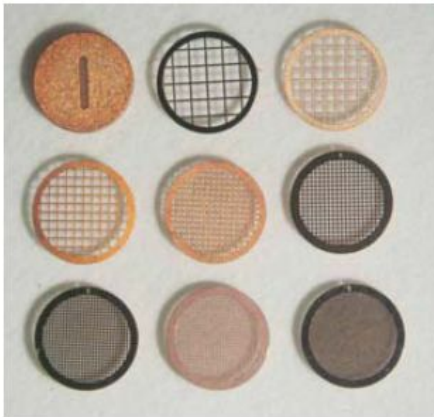
8. Резка материала на ультратоме



- 1) электронный пучок не проникает сквозь срезы, толщина которых значительно превышает 100 нм;
- 2) в толстом срезе компоненты перекрывают друг друга и видны менее четко.

→ тонкие срезы 50-100 нм

Помещение срезов на сеточки и бленды



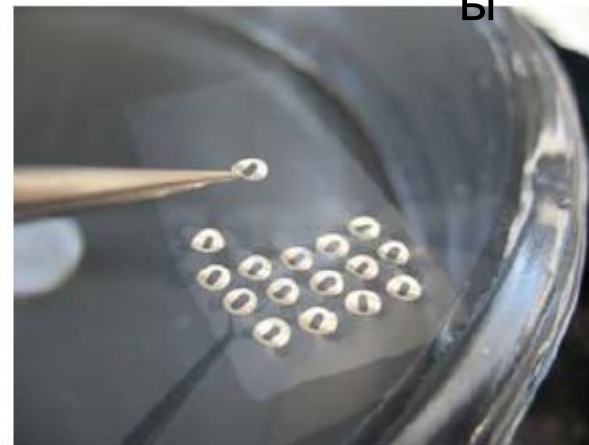
сеточк

и



бленд

ы



9. Контрастирование (уранилацетат, затем цитрат свинца по методу Рейнольдса)

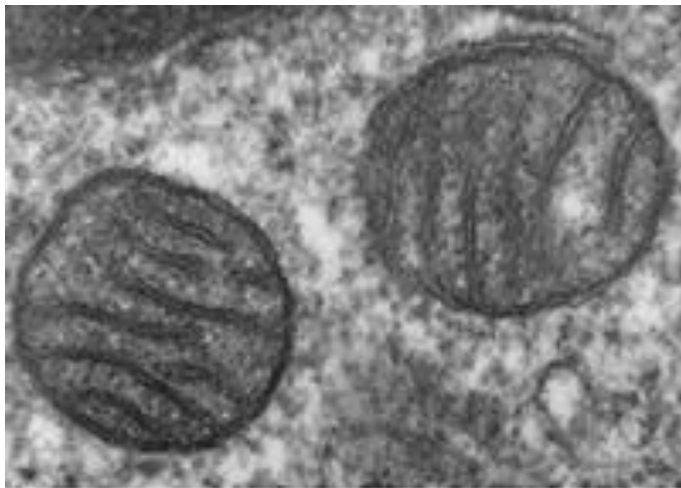
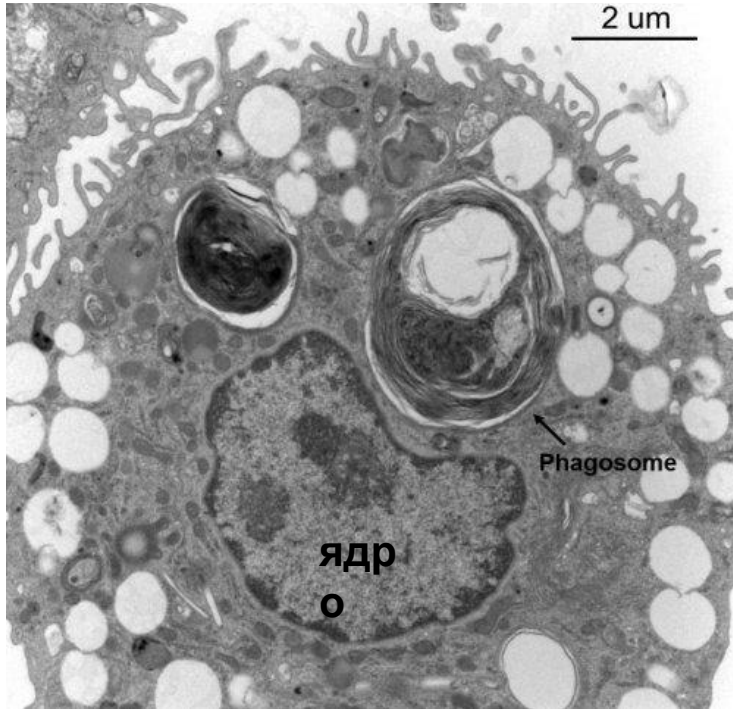
Трансмиссионная электронная

1. фиксация глутаральдегидом – дает отличную сохранность тканей;
микроскопия

2. промывка буфером;
3. дофиксация четырехокисью осмия (+контрастирование);
4. 50° спирт;
5. 60° спирт;
6. 70° спирт с уранилацетатом;
7. 80° спирт;
8. 96° спирт;
9. 100° спирт;
10. ацетон;
11. ацетон:эпон=3:1;
12. ацетон:эпон=1:1;
13. ацетон:эпон=1:3;
14. эпон (эпоксидная смола);
15. 37°;
16. 60°;
17. затачивание пирамидки;
18. изготовление ультратонких срезов 60-80 нм на ультрамикротоме;
19. помещение срезов на бленды или сеточки с формваром;

Трансмиссионная электронная

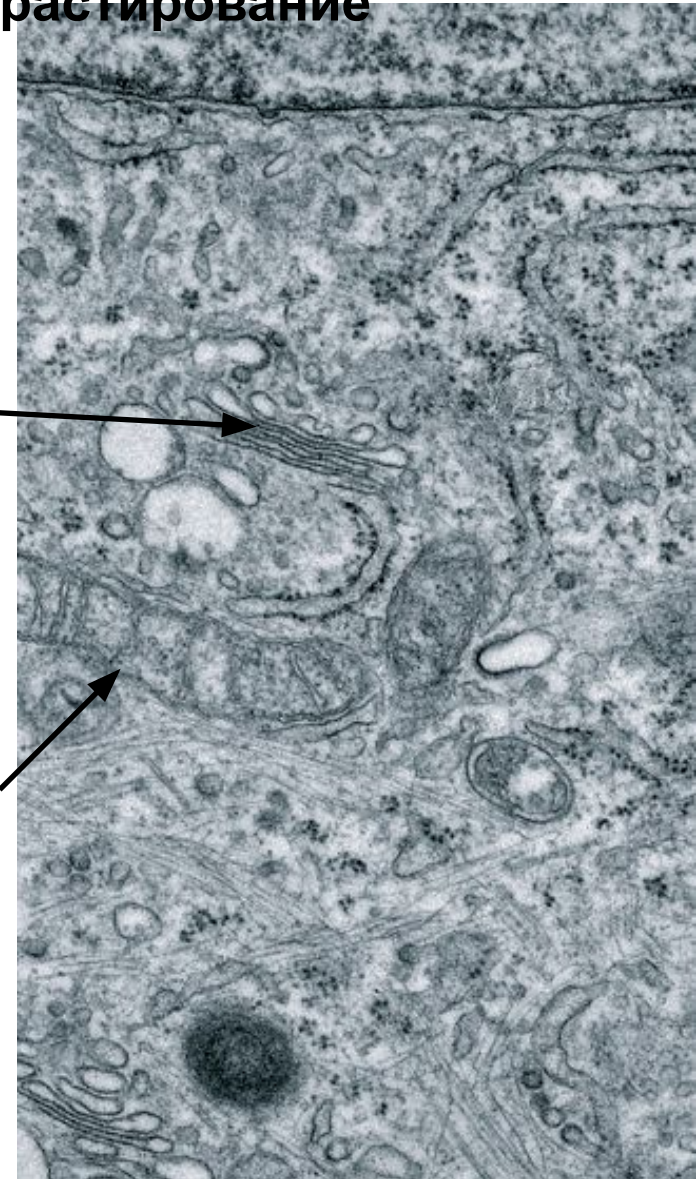
микроскопия позитивное
контрастирование



митохондрии

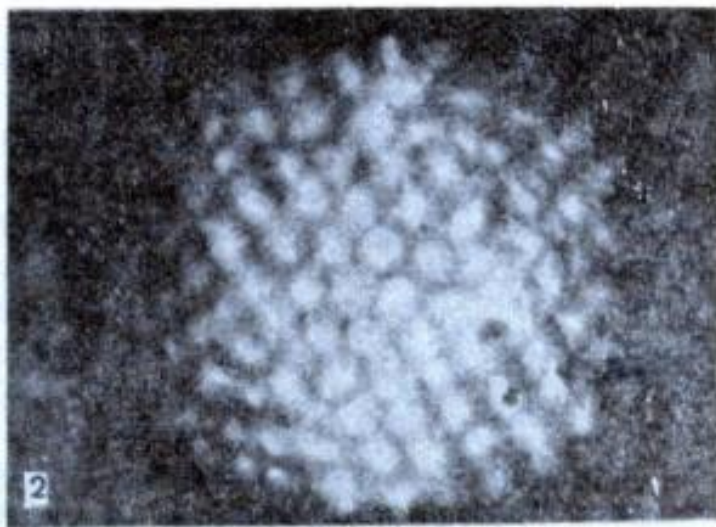
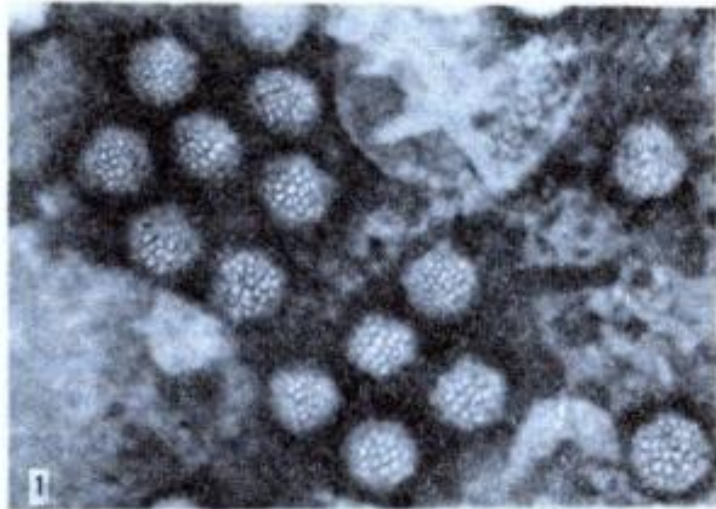
митохондрия

А
Г



Трансмиссионная электронная микроскопия

Негативное

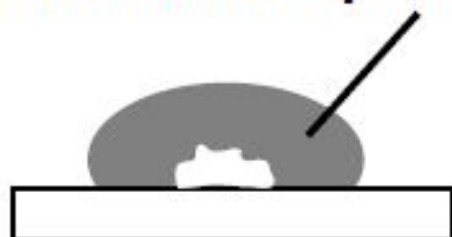


Контрастирование
напылением
металла

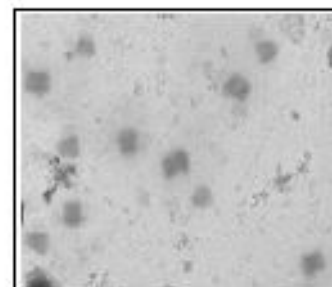
крово
е

под
углом

капля контрастирующей жидкости



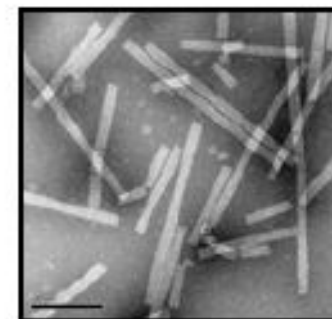
ПОЗИТИВНЫЙ
КОНТРАСТ



образец



НЕГАТИВНЫЙ
КОНТРАСТ



Негативное контрастирование

- Используют растворы солей тяжелых металлов (уранилацетата, молибденокислый аммоний, фосфорно-вольфрамовая кислота – электронноплотные вещества)
- Объекты выглядят светлыми пятнами на темном фоне

Плюсы

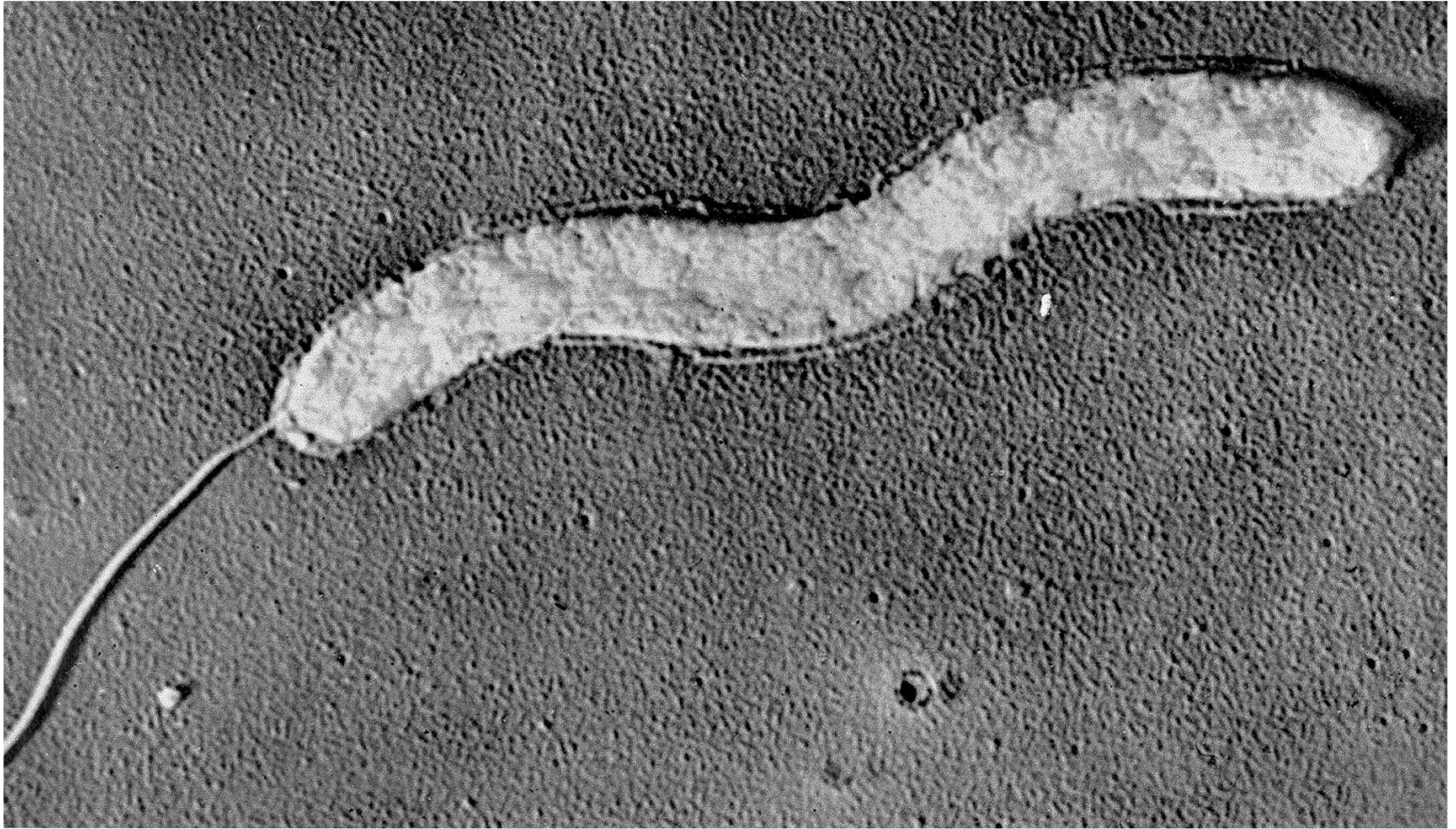
- Можно проникать вглубь объекта, выявлять дополнительные детали

Минусы

- Плохо выявляются нитчатые молекулы из-за малой толщины

Метод напыления

- Для напыления используют металлы, характеризующиеся низкой степенью окисления, и их сплавы (золото, медь, алюминий, платина).
- Напыление производят в специальной вакуумной камере путем нагрева и испарения металла в вакууме или «выбивания» атомов металла в результате действия ионов инертного газа.
- Атомы испаряющегося металла покрывают тонкой пленкой поверхность образца.
- Если объект имеет сложную конфигурацию, и металл не проникает во все углубления, контрастирование производят путем напыления углерода.
- Напыленный на ткань металл называется **репликой**.



Холерный вибрион

Оттенивание металлами

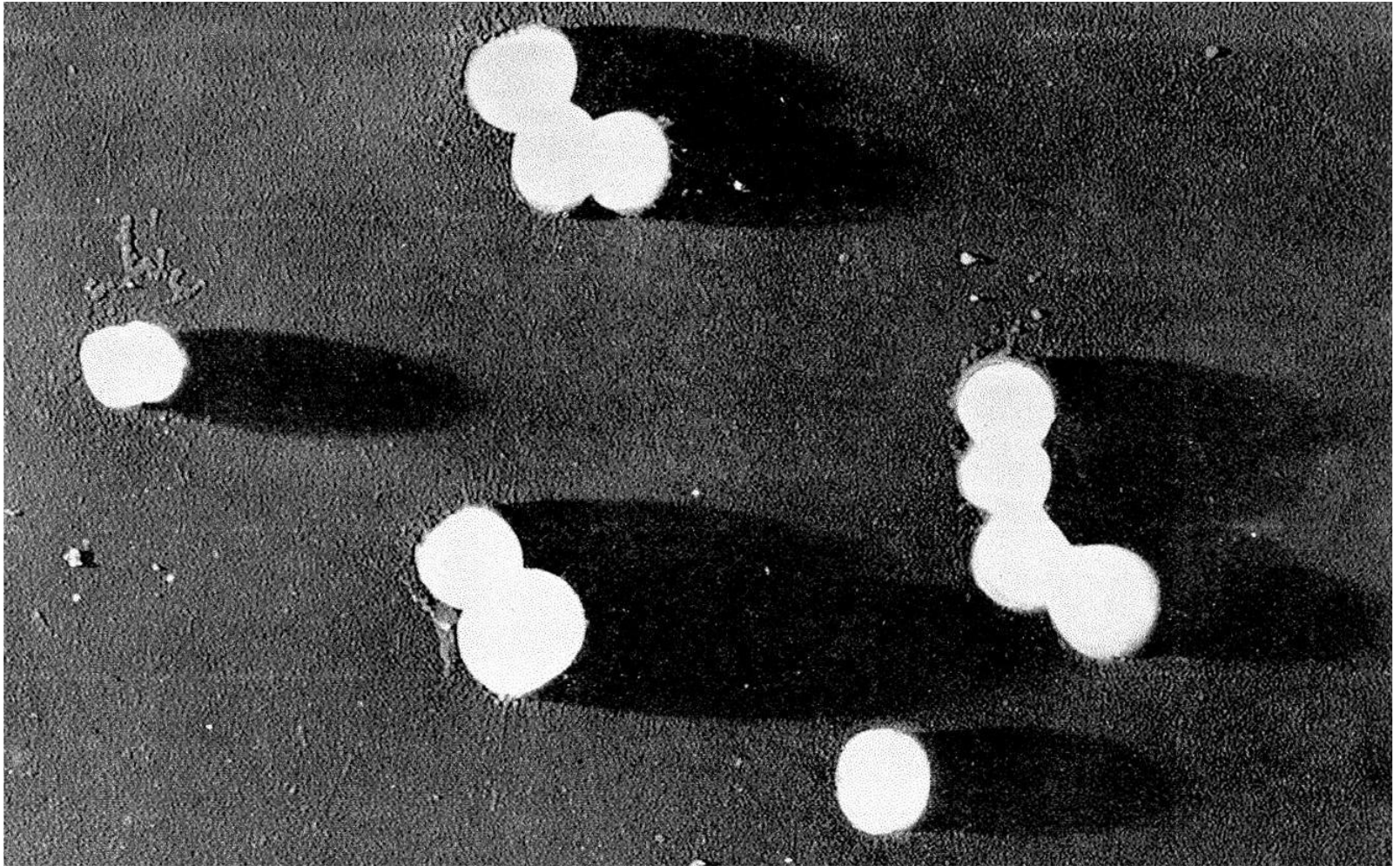
- Контраст реплике можно создать, напыляя под острым углом электронноплотное вещество, например, тяжелый металл.
- Термическое испарение металла металла
- Атомы металла встречаются с объектом и осаждаются на нем в виде слоя
- Там, где объект экранирует пучок частиц – «тень»

$$h = l \times \tan \theta$$

θ - угол напыления, l - длина тени, h - высота объекта

Минусы:

- Увеличение размеров объекта на толщину напыленного слоя
- Дает представление только о внешнем виде и форме частиц



Микрококки

Сканирующая электронная микроскопия (SEM – scanning electron microscopy)

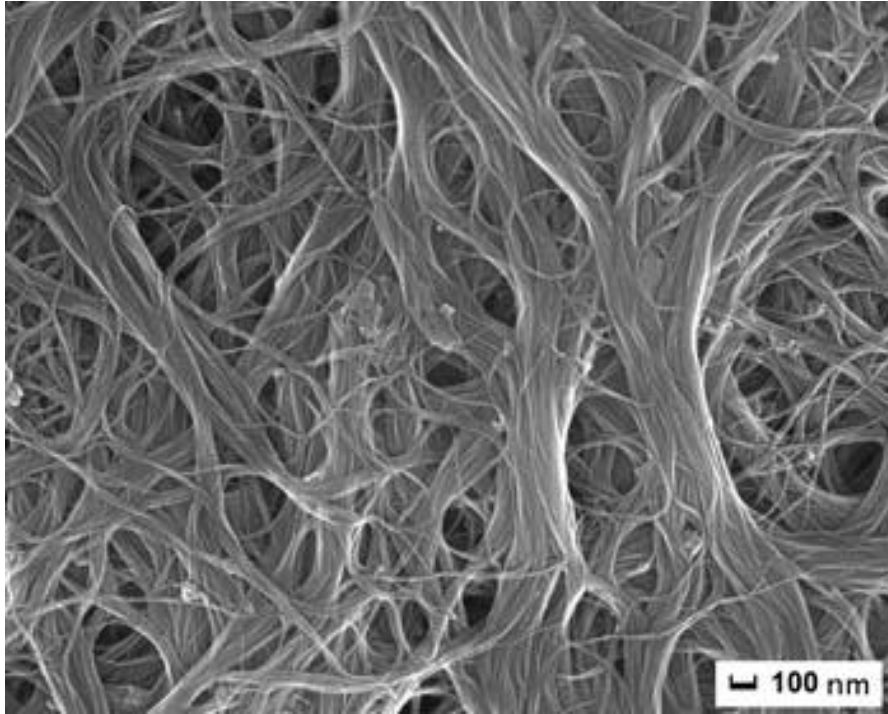


Принципиальная схема СЭМ

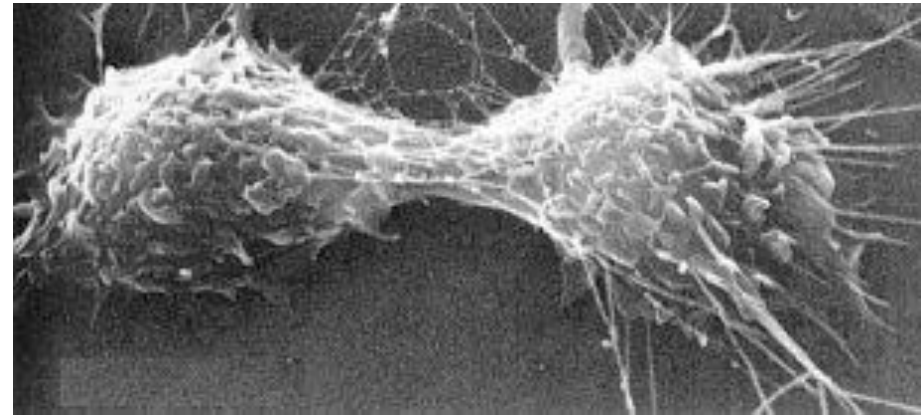
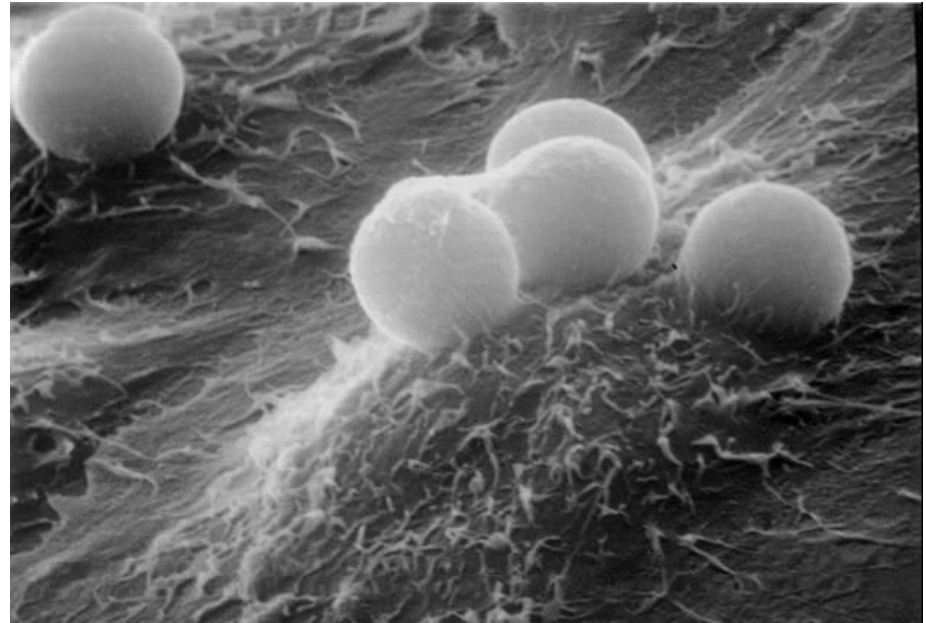
Сканирующая электронная микроскопия

1. фиксация глутаровым альдегидом;
2. промывка буфером;
3. 30° спирт;
4. 50° спирт;
5. 70° спирт;
6. 80° спирт;
7. 96° спирт;
8. 100° спирт;
9. 96° спирт:ацетон =3:1;
10. 96° спирт:ацетон =1:1;
11. 96° спирт:ацетон =1:3;
12. ацетон;
13. высушивание в критической точке;
14. приклеивание образца к металлическому столику (лаком для ногтей);
15. напыление (смесью Au-Pd (золото – палладий)).

Сканирующая электронная микроскопия

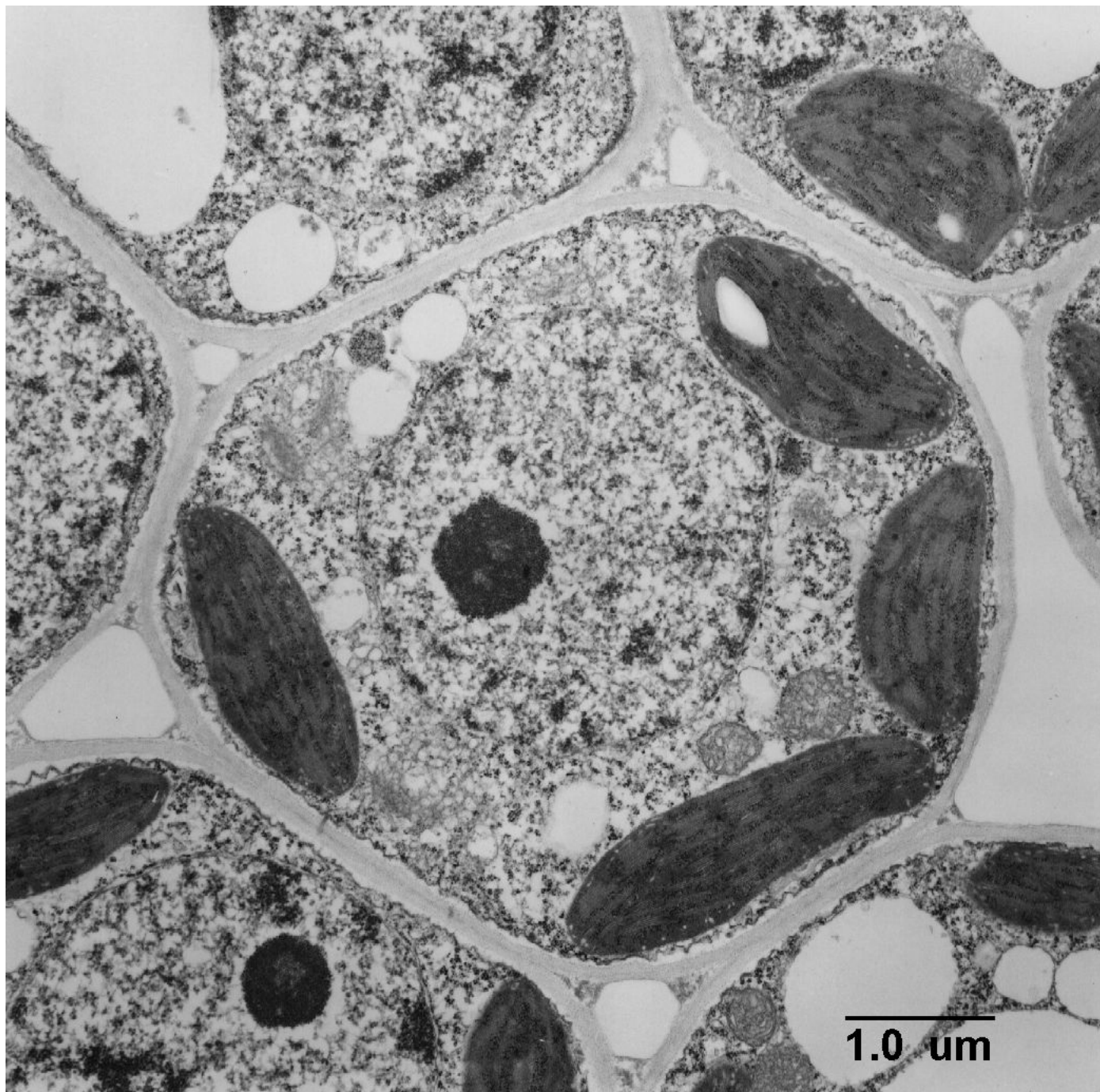


*Чистый продукт однослойных
углеродных нанотрубок.*



Замораживание-скалывание (травление)

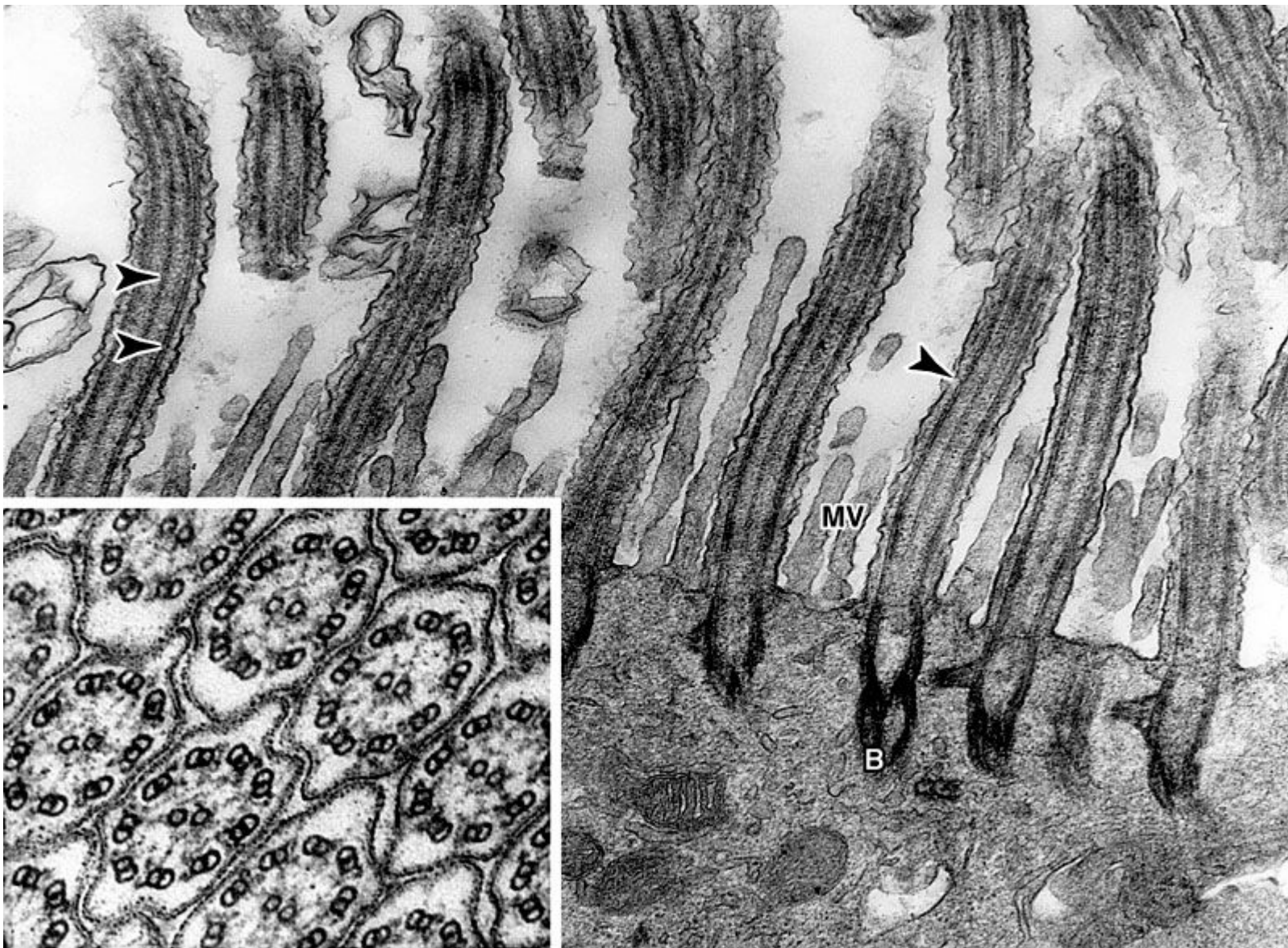
- Пропитывание ткани криопротектором (глицерин, ацетон, спирт, диметилсульфоксид, сахара, поливинилпирролидон, полиэтиленоксид)
- Ткань подвергается быстрому замораживанию жидким азотом (-196°C)
- Скол охлажденным ножом в специальной вакуумной установке
- В вакууме часть воды, перешедшей в стекловидную форму, возгоняется («травление»), а поверхность скола покрывается тонким слоем углерода, а затем металла (Au, Cu, Pd)
- При комнатной температуре ткань растворяют в кислотах, а реплика остается, ее смотрят в СЭМ



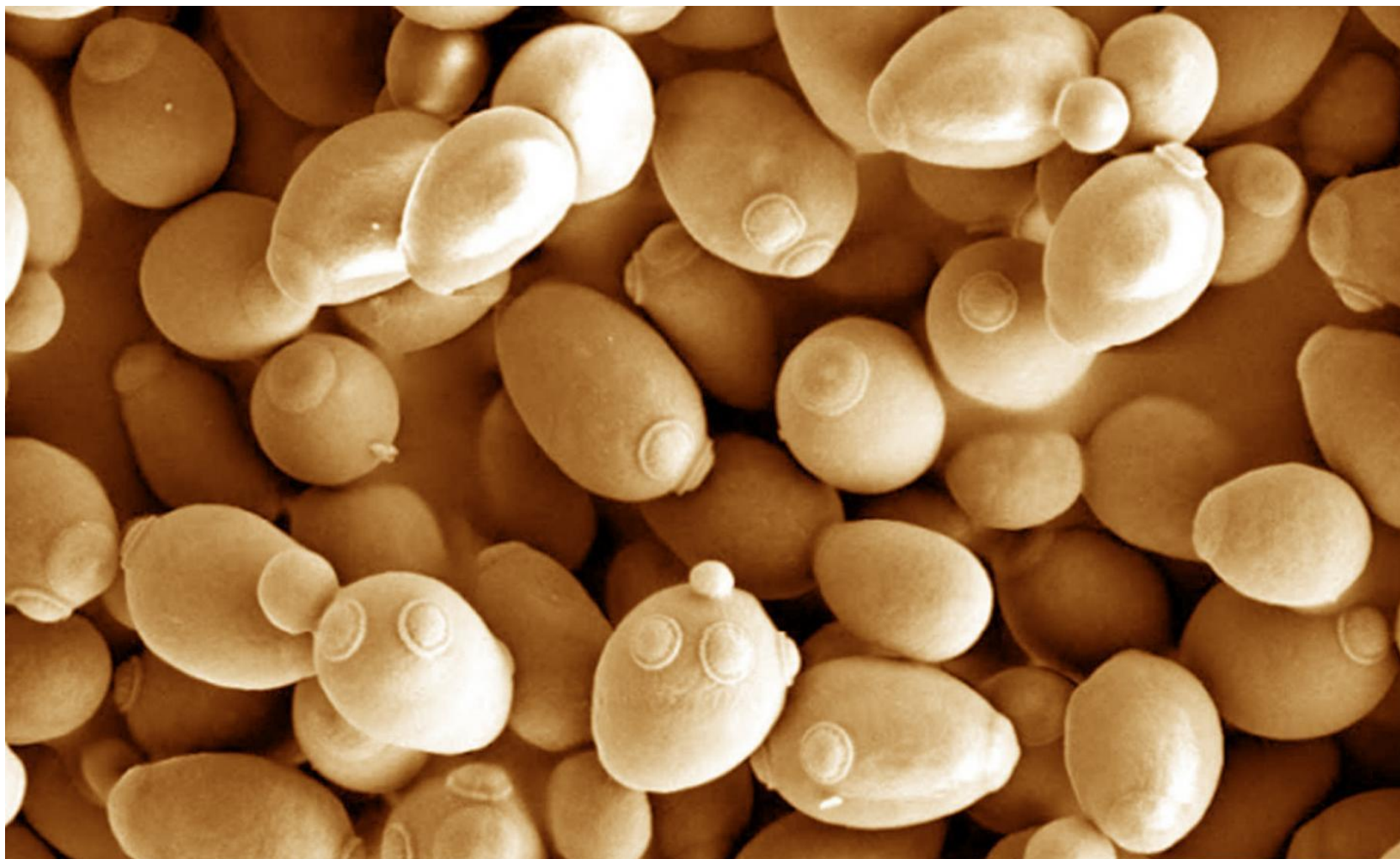
ТЭМ



СЭМ



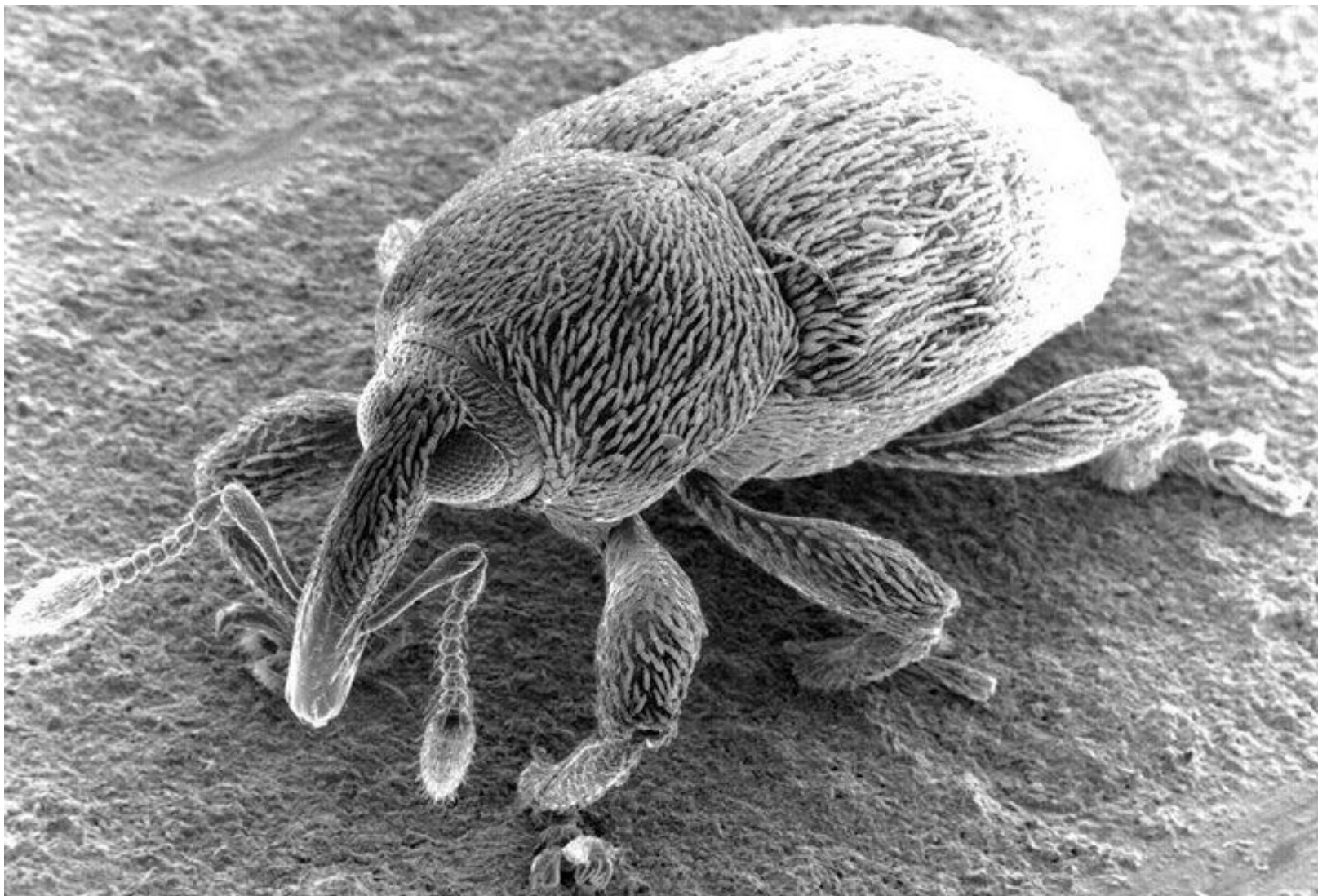
TEM



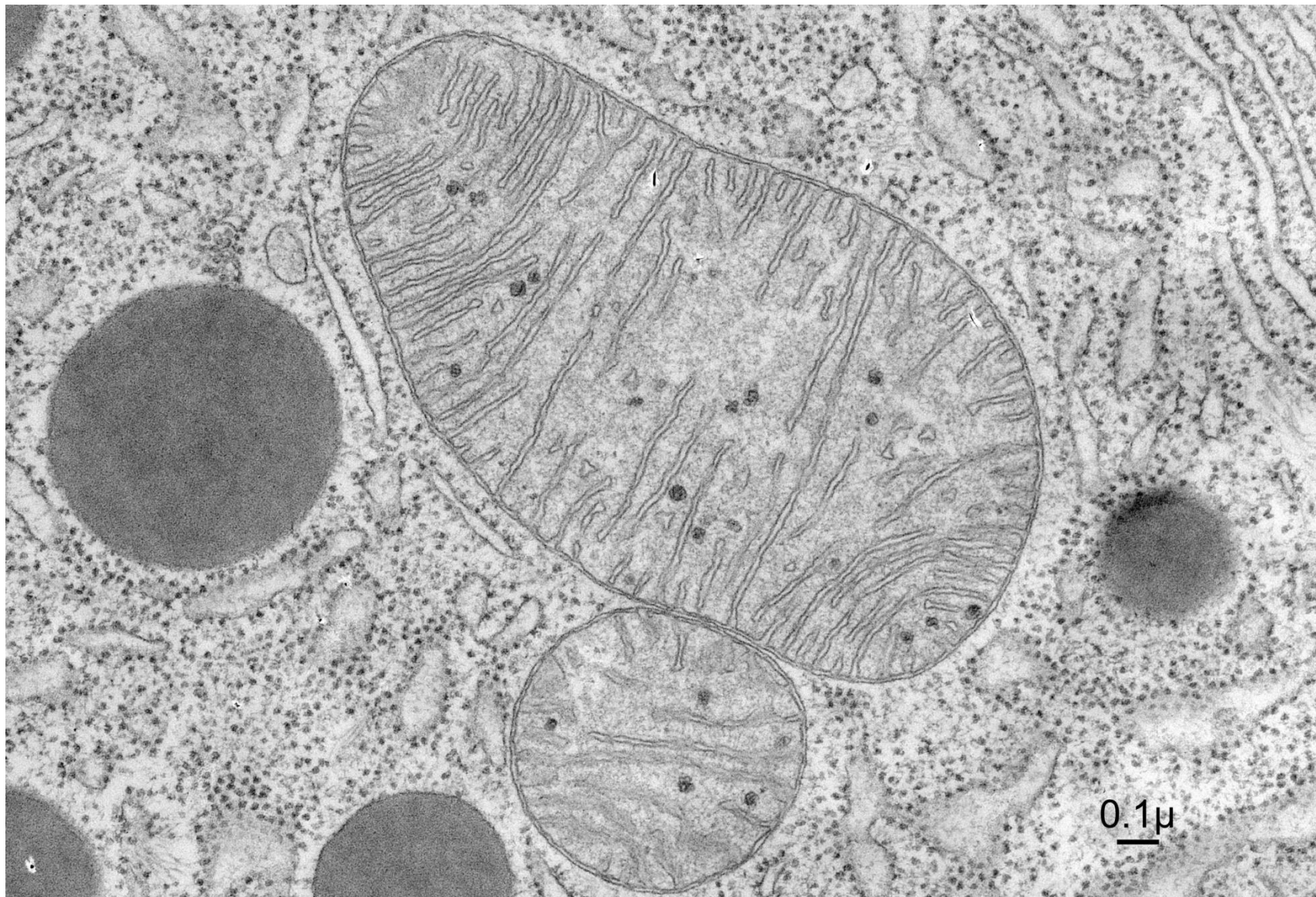
СЭМ



**Замораживание-
скалывание**



СЭМ



ТЭМ



**Замораживание-
скалывание**



**Фазовый контраст –
СВЕТОВАЯ**