

Спецкурс по электронной и конфокальной микроскопии. Отчетная презентация

Преподаватель:

Д.б.н. Наталья Михайловна Бисерова

*Подготовили и выполнили
студенты 302 группы:*

Виноградов Дмитрий

Голованева Мария

Емельяненко Вера

Иванова Ольга

Куликов Никита

Лифшиц Татьяна

Петрова Мария

Хромова Мария

Шапкина Анна

Якушев Александр

Москва, 2017

Что мы делали

На занятиях мы зафиксировали, подготовили к исследованию на электронных микроскопах любимых беспозвоночных; изготовили полутонкие и ультратонкие срезы, окрасили и посмотрели объекты на трансмиссионном (JEOL JEM1011) и сканирующем (JSM35S JEOL) электронных микроскопах.

Для освоения лазерной конфокальной микроскопии провели окрашивание готовых срезов флуоресцентными красителями DAPI (на ядра) и Phalloidin TRITC (фибриллярный актин мышц) и посмотрели препараты на конфокальном микроскопе Nikon.

Наши объекты:

- *Phoxochilidium femoratum*, протонимфоны *Nymphon grossypes*, (Pycnogonida)
- Эфиры *Aurelia aurita*, (Scyphozoa)
- *Grillotia erinaceus*, *Dollfusiella aculeata*, (Cestoda)
- *Julida sp.* (Diplopoda)
- *Pedicellina sp.* (Kamptozoa)
- *Marimermis maritima uv.* (Enopla)

Электронная микроскопия

Приготовление буферов

0,05M какодилатный буфер, pH 7,2

На 200мл

- Навеска кристаллического Na-какодилата 2,14г
- Довели до 100мл дистиллированной водой
- По каплям добавляя 0,М HCl довели до необходимого значения pH
- Довели дистиллированной водой до конечного объема в 200мл

0,1M какодилатный буфер, pH 7,2

На 200мл

- Навеска кристаллического Na-какодилата 21,4 г
- Довели дистиллированной водой до 500 мл
- К 100 мл маточного раствора прибавили по каплям 0,2М HCl до pH=7,2,
- Довели до 200 мл дистиллятом

0,1M фосфатный буфер, pH 7,4

На 100 мл

- Маточный раствор А: навеску 2,758 г кристаллического дигидрофосфата натрия растворили в 70 мл дистиллированной воды, довели объем до 100 мл.
- Маточный раствор Б: навеску 2,838 г сухого гидрофосфата натрия растворили в 70 мл дистиллированной воды, довели объем до 100 мл.
- Для получения буфера pH 7,4 смешали 19 мл раствора А и 81 мл раствора Б
- Измерили pH, довели до необходимого pH добавлением раствора Б по капле.

Электронная микроскопия

Фиксация материала

- Фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом на 0,1М какодилатном или фосфатном буфере в течении часа. При необходимости фиксатор доводили до требуемой осмолярности, добавляя сахарозу или смешивая буфер с морской водой (1:1).
- Отмывали 2 раза по 7 минут буфером, на котором был сделан фиксатор
- Дофиксировали 1% OsO_4 , на том же буфере в течении часа.
- Отмывали 30° этиловым спиртом 2 раза по 10 минут



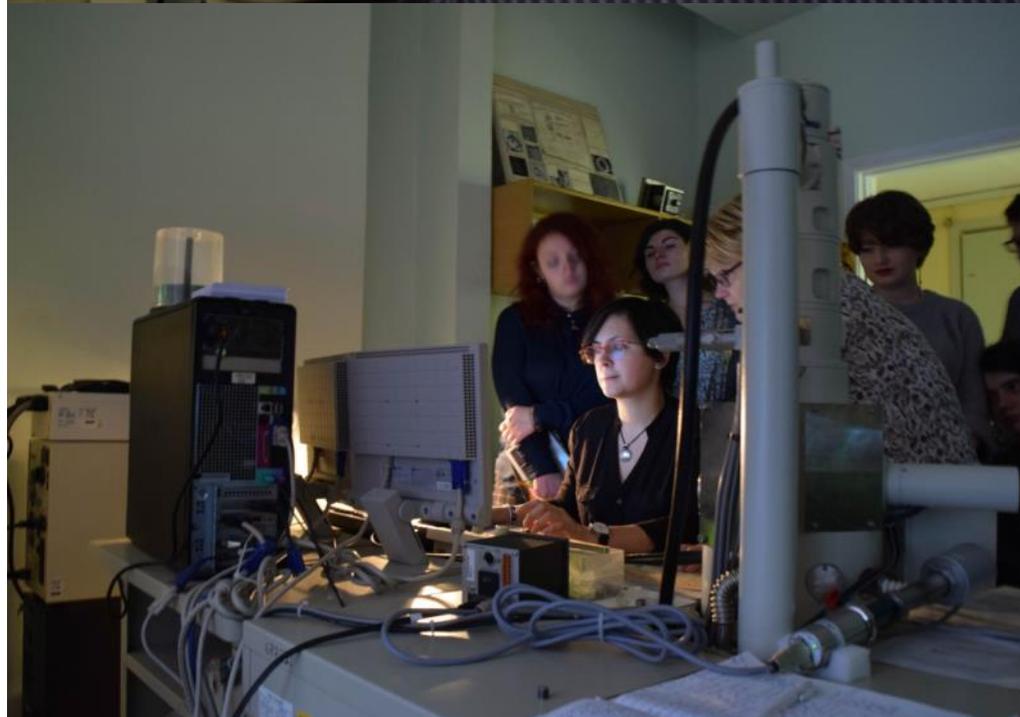
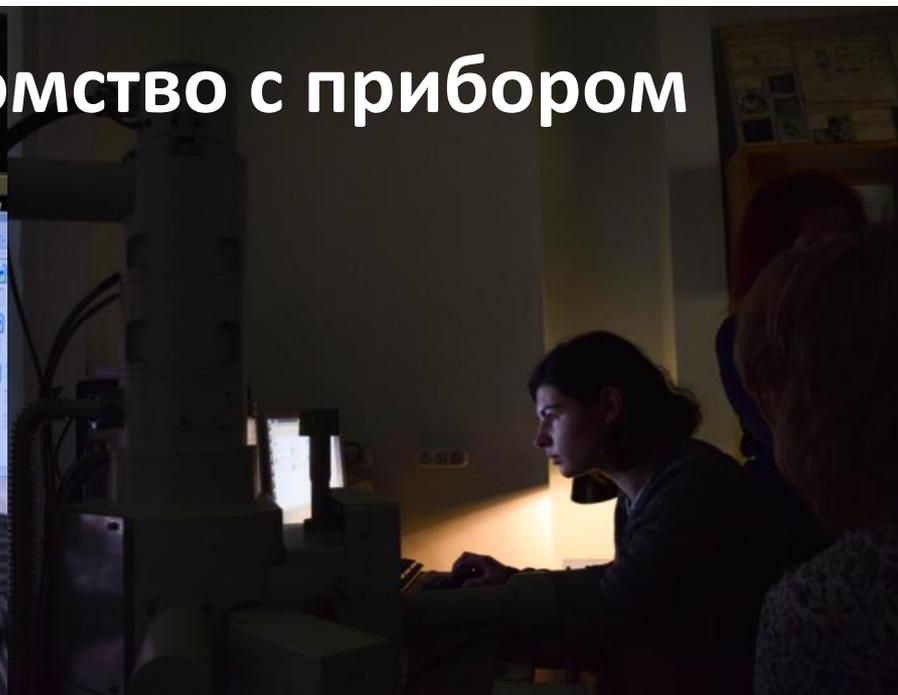
СЭМ

Подготовка материала

- Дегидратация
 - *EtOH 70° 10 мин*
 - *EtOH 70° 15 мин*
 - *EtOH 70° на неделю*
 - *EtOH 96° 2 раза по 15 мин*
 - *EtOH с ацетоном 1:1 4 часа*
 - *Ацетон 2 раза по 15 мин, после чего в чистом ацетоне понесли на сушку*
- Сушка в критической точке
- Напыление металлом



Работа на СЭМ: знакомство с прибором



СЭМ: навыки работы по фокусировке и астигматизму при малых увеличениях

Результаты:

Ротовой аппарат Julida sp.

X190 100µm 0015



СЭМ: навыки работы по фокусировке и астигматизму при малых увеличениях

Результаты:

Кутикула с вентральной части основания проподуса Ph. femoratum

X1,100 10µm 0012



СЭМ: навыки работы по фокусировке и астигматизму при средних увеличениях

Результаты:

Реснички на аборальной поверхности эфiry Aurelia aurita

X5,000 5µm 0006



СЭМ: навыки работы по фокусировке и астигматизму при больших увеличениях

Результаты:

*Полимикротрихии и микроворсинки
на поверхности ботрии цестоды
*Grillotia erinaceus**

X25,000 1 μm 0017

Подготовка объектов для ТЭМ

➤ Дегидратация

- *EtOH 70⁰ 10 мин*
- *EtOH 70⁰ 15 мин*
- *EtOH 70⁰ на неделю*
- *EtOH 82⁰ 2 раза по 15 мин*
- *EtOH 96⁰ 2 раза по 20 мин*
- *EtOH 96⁰ с ацетоном 2:1 15 мин*
- *EtOH 96⁰ с ацетоном 1:й 15 мин*
- *EtOH 96⁰ с ацетоном 1:2 15 мин*
- *Ацетон 2 раза по 20 минут*

➤ Заливка в Епон

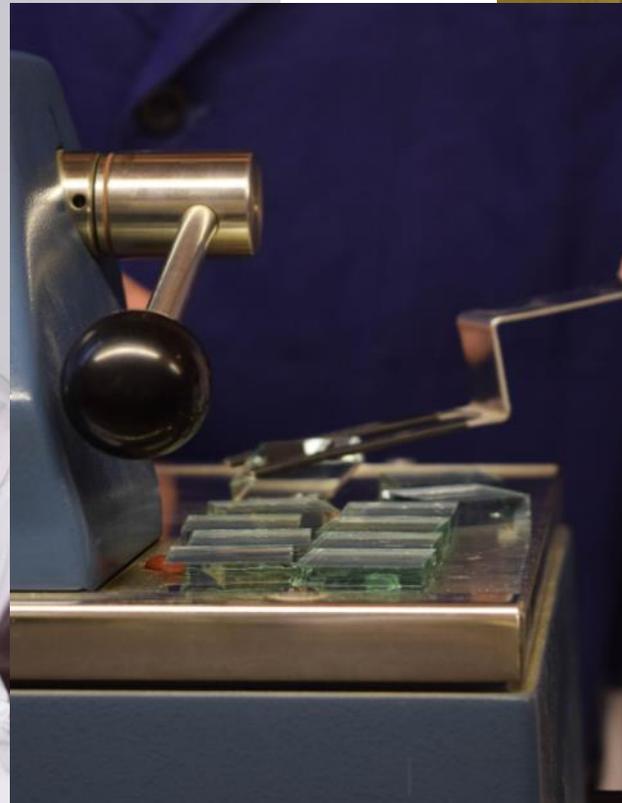
- *«Каша» 3:1 23 часа*
- *«Каша» 1:1 26 часов*
- *«Каша» 1:3 23 часа*
- *Епон при комнатной температуре 7 часов*
- *Епон 37⁰С 22 часа*

➤ Полимеризация при 60⁰С двое суток



Приготовление полутонких и ультратонких срезов

- Изготовление стеклянных ножей



Приготовление полутонких и ультратонких срезов

- Изготовление стеклянных ножей и наклеивание на них ванночек



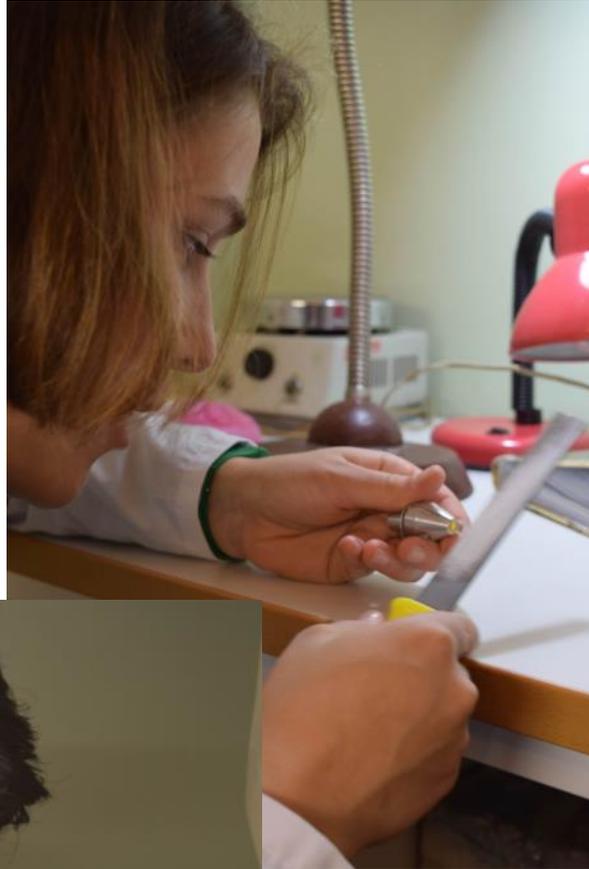
Приготовление полутонких и ультратонких срезов

Онтогенез ножа



Приготовление полутонких и ультратонких срезов

- Затачивание блоков в пирамидки и закрепление на держателях



Приготовление полутонких срезов

- Резка блоков на микротоме LKB на срезы толщиной 1мкм
- Окрашивание метиленовым синим на термо-столике при 60°C. Время окрашивания выбирали исходя из особенностей объекта

Приготовление 1% метиленового синего

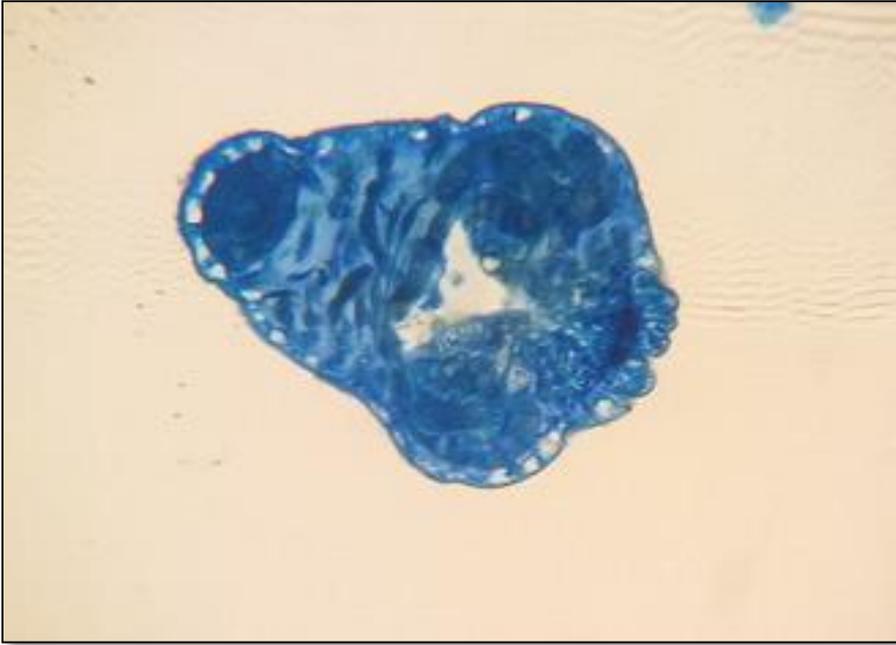
- 1г кристаллического метиленового синего
 - 1 г NaHCO_3
 - 50 г сахарозы
- довели до 100 мл дистиллированной водой при постоянном помешивании, до полного растворения компонентов.



Полутонкие срезы

Результаты

*Олиа камптозоя Увеличение 10*40*



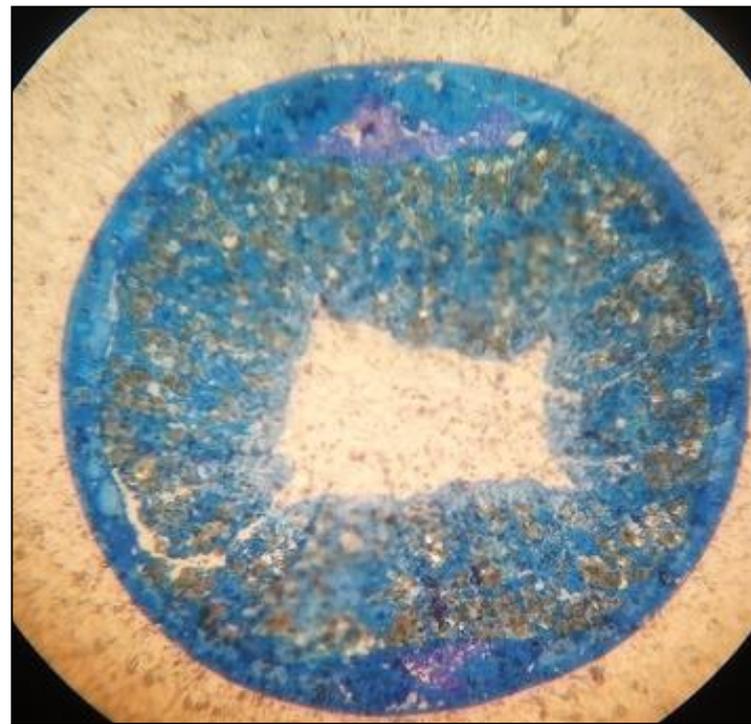
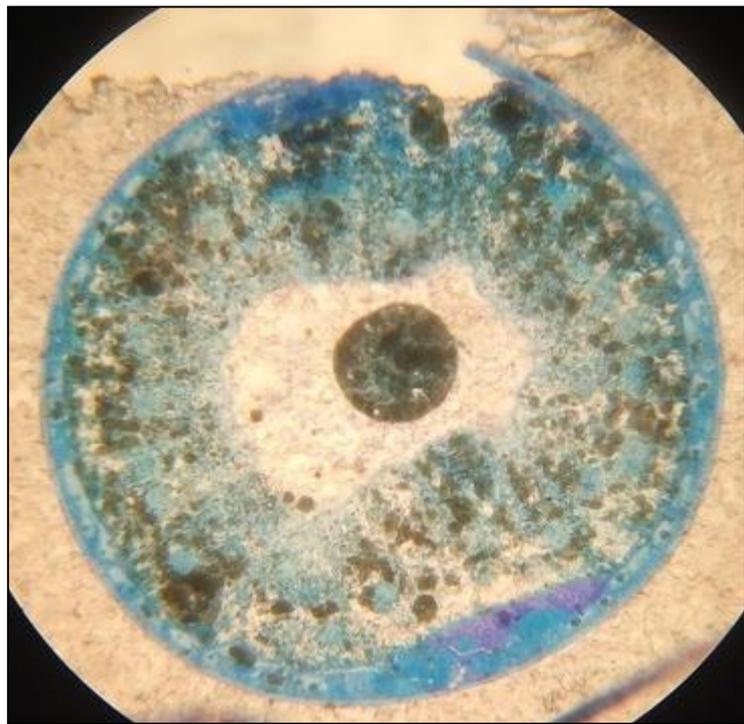
*Протонимфон N. grossipes.
Сагитальный срез через середину
хелифоры. Увеличение 10*10*



Полутонкие срезы

Результаты

Marimermis maritima. Поперечный срез через головной конец. Увеличение 20*40.



ТЭМ

Подготовка бленд и контрастирование срезов, ультратонкая резка

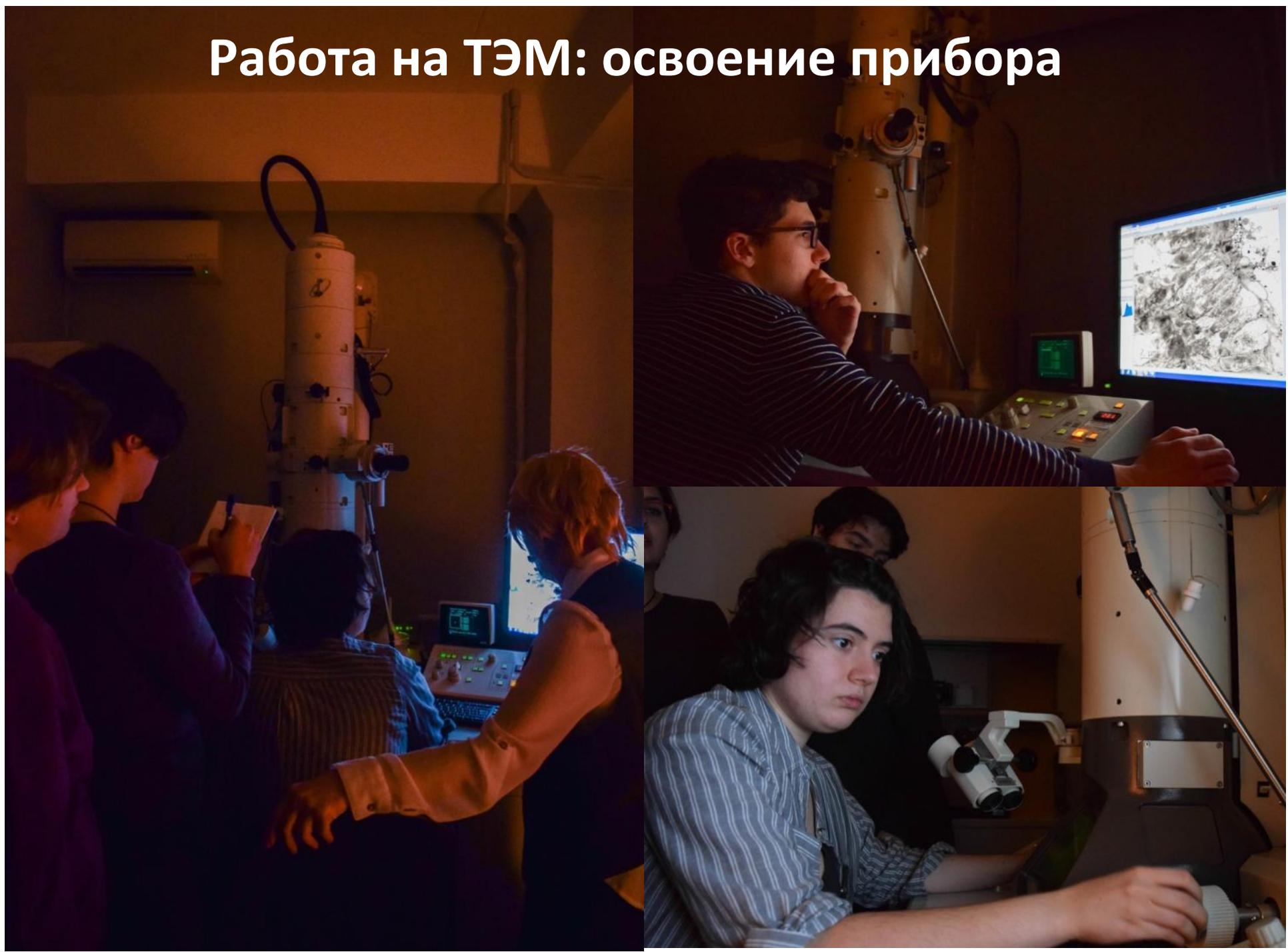
- Плёнки для бленд готовили из 1% формвара на диоксане.
- Срезы 70 нм делали на ультрамикротоме Leica III
- Контрастирование у/т срезов проводили 4% водным уранилацетатом при $t=37^{\circ}\text{C}$, 40 мин; и 0,4% цитратом свинца, 5 мин при комнатной температуре

Приготовление раствора цитрата свинца

- 14 мл дистиллированной воды прокипятили в течение 20 минут в закрытом стакане, остудили до 40°C
- Добавили 56 мг сухого цитрата свинца, мешали до растворения на шейкере, ок. 30 мин.
- Приготовили 10N NaOH – 4 г NaOH на 10 мл дистиллированной воды
- Добавили 140 μl NaOH в раствор цитрата свинца, перемешали.
- Оставили на сутки в холодильнике.



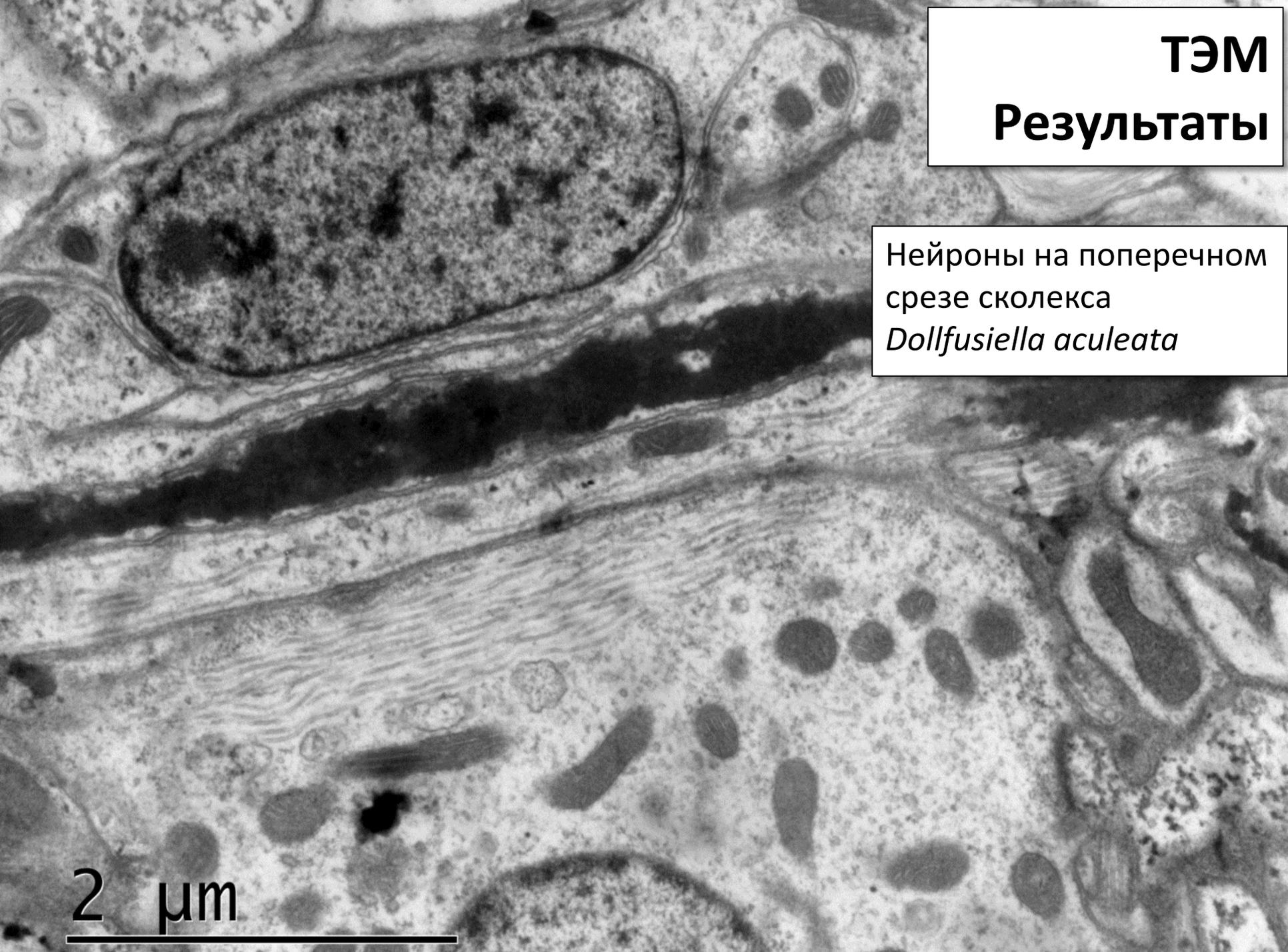
Работа на ТЭМ: освоение прибора



ТЭМ Результаты

Нейроны на поперечном
срезе сколекса
Dollfusiella aculeata

2 μm



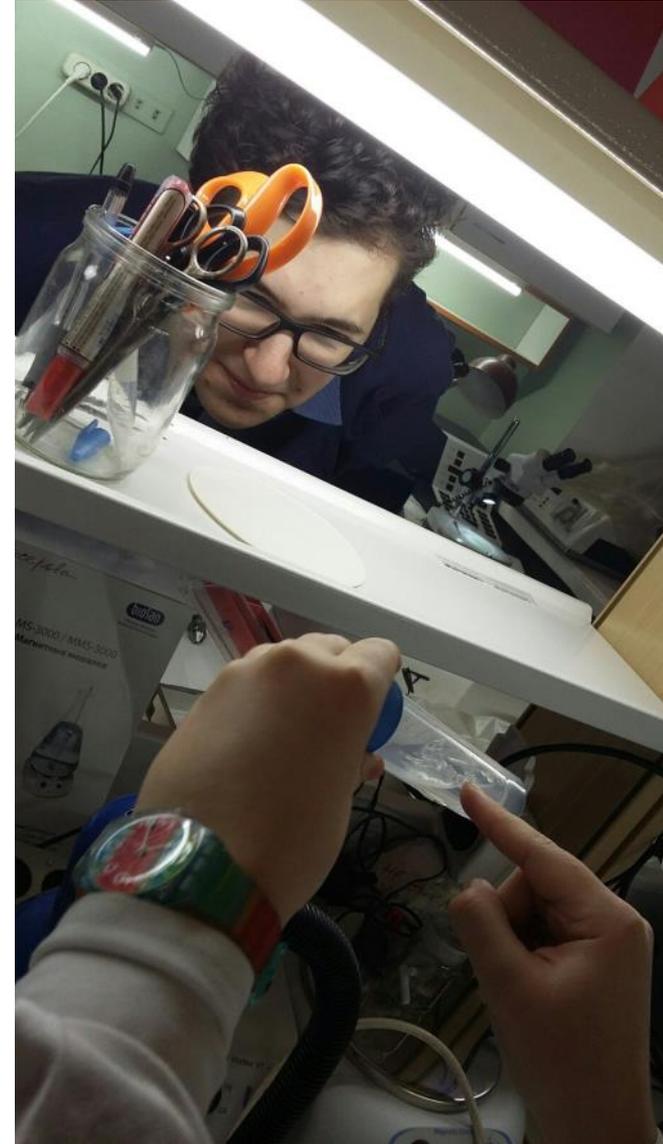
Конфокальная микроскопия

Окрашивание DAPI и фаллоидином

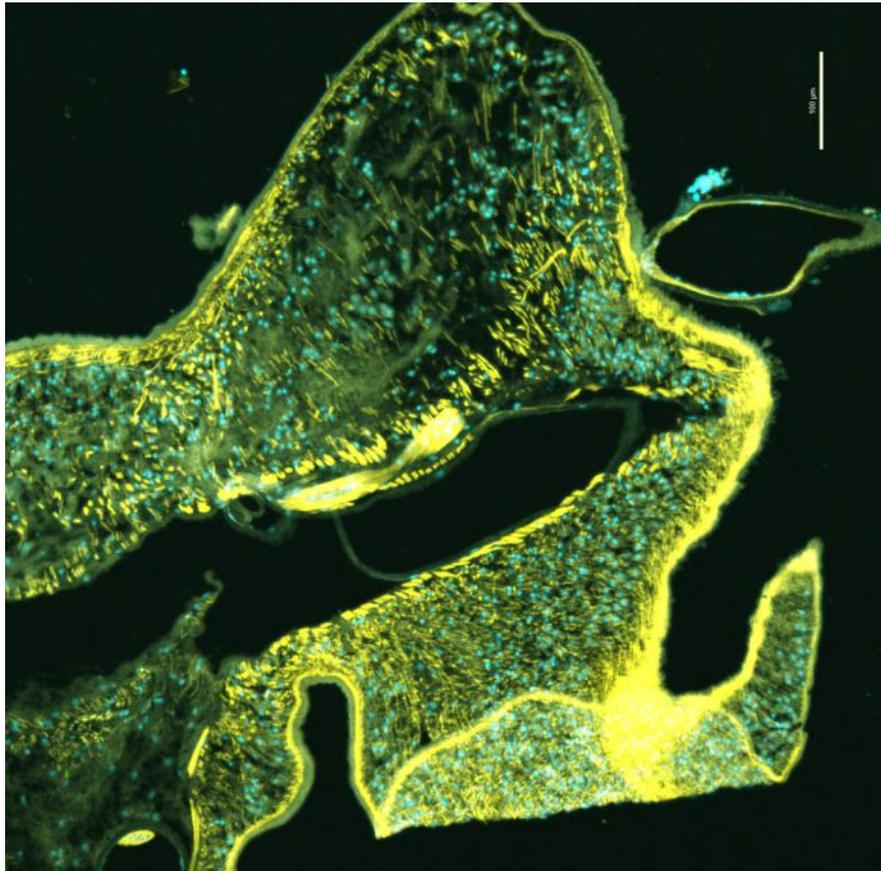
Все операции производили на горизонтальном шейкере при охлаждении под хладо-элементом.

Стекла со срезами обвели гидрофобным маркером, разместили в чашках Петри и капали раствор на срезы.

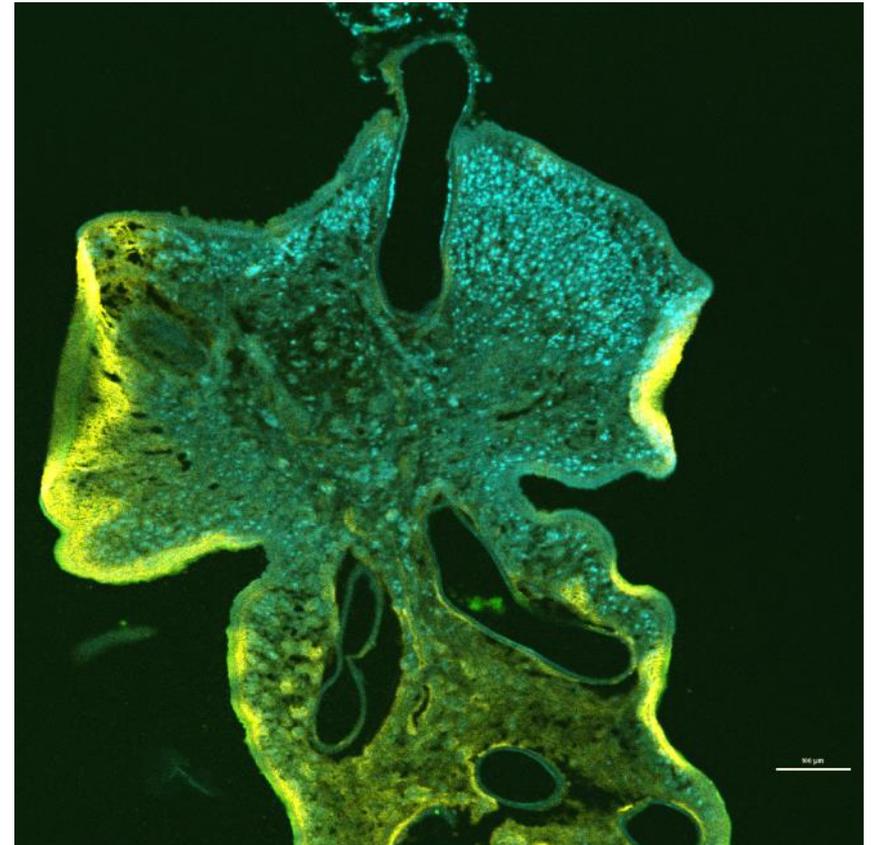
- Преинкубация в 0,01 М PBS + 1% Triton X100 + 0,03% NaN₃ 3x15 мин
- Инкубация в DAPI 1:100, Phalloidin TRITC 1:1000 на 0,1 М PBS + 1% Triton X100 30 мин
- Отмывка 0,1 М PBS + 1% Triton X100 5x15 мин
- Финальная отмывка 0,1 М PBS 15 мин
- Заключение в глицерин: 0.1М PBS, 1:1



Конфокальная микроскопия: Результаты



Объект: *Grillotia erinaceus*
Срезы готовили на крио-микротоме, раскладывали на стекла, сушили, хранили в замороженном состоянии, затем окрашивали DAPI 1:100, Phalloidin TRITC 1:1000 на 0,1 М PBS



Мышечные тяжи – желтый;

Ядра клеток – циан

CLSM Nikon

3-й курс 2017-2018 г.г. группа 302

