



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58290 (13) U
(51) МПК
G01N 1/28 (2011.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ КОНТРАСТУВАННЯ УЛЬТРАТОНКИХ ЗРІЗІВ ДЛЯ ТРАНСМІСІЙНОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТА КЛІНІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

1

2

(21) u201010736

(22) 06.09.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ПОГОРЕЛОВ МАКСИМ ВОЛОДИМИРОВИЧ,
ВОЛКОГОН АНДРІЙ ДМИТРОВИЧ, БОНЧЕВ СЕРГІЙ
ДМИТРОВИЧ, ТКАЧ ГЕННАДІЙ ФЕДОРОВИЧ
(73) СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб контрастування ультратонких зрізів для трансмісійної електронної мікроскопії при проведенні експериментальних та клінічних досліджень, що включає обробку електронномікроскопічних сіточок із зразками препарату шляхом нанесення на них барвників, промивку електронномікроскопічних сіточок з наступним їх висушуванням, який **відрізняється** тим, що обробку електронномікроскопічних сіточок проводять в чотири етапи, для чого використовують щонайменше чотири непрозорих контейнери, ємність з тримачами для електронномікроскопічних сіточок, як ємність застосовують кришку, в верхній частині якої виконані щонайменше чотири пази для вертикально розташованих тримачів із електронномікроскопічними сіточками, при цьому кришка щільно прилягає до кожного із контейнерів, на першому етапі електронномікроскопічні сіточки поміщають в пази тримачів на кришці, фіксують їх в цих пазах і занурюють кришку з тримачами, де знаходяться електронномікроскопічні сіточки, в перший контейнер,

обробляють їх протягом 30-60 хвилин першим барвником, за який використовують 2 % розчин ураїнілу ацетату, після чого кришку з тримачами, де знаходяться електронномікроскопічні сіточки, знімають з першого контейнера і надівають її на другий контейнер для проведення другого етапу обробки, для чого другий контейнер заповнюють бідистильованою водою, якою промивають електронномікроскопічні сіточки, причому промивку їх здійснюють в другому контейнері двічі по 15 хвилин, потім кришку з тримачами, де знаходяться електронномікроскопічні сіточки, знімають з другого контейнера і надівають на третій контейнер для проведення третього етапу обробки, яку здійснюють з барвником, за який використовують розчин цитрату свинцю, при цьому обробку здійснюють протягом 30-60 хвилин, потім кришку з тримачами, де знаходяться електронномікроскопічні сіточки, знімають з третього контейнера і надівають на четвертий контейнер для проведення четвертого етапу обробки, яку здійснюють в четвертому контейнері з буферним розчином Соренсона протягом 10-15 хвилин, після чого електронномікроскопічні сіточки виймають із тримачів на кришці, висушування їх здійснюють на фільтрувальному папері, а видалення остаточної вологи з препаратів здійснюють шляхом їх обробки в термостаті при температурі 35-37 °С протягом 12-24 годин.

Корисна модель відноситься до галузі медицини та біології, зокрема нормальної анатомії, гістології, цитології, патологічної анатомії, вірусології та біології для покращення процесу контрастування ультратонких зрізів для трансмісійної електронної мікроскопії для вивчення ультраструктурної будови клітини при проведенні експериментальних та клінічних досліджень.

Відомий спосіб контрастування ультратонких зрізів, який проводиться за допомогою пластикового столику з отворами в які поміщають електронномікроскопічні сіточки та послідовно наносять на них краплі барвників. Після часу, необхідного для проходження барвника в зразок, його відсмоктують мікропіпеткою та промивають бідистильова-

ною водою чи буферним розчином Соренсона. При проведенні подвійного контрастування після промивки в отвори наноситься крапля іншого барвника та промивають водою після закінчення часу контрастування, [див. монографію Карупу В.Я. Електронная микроскопия. - К.: Вища школа, 1984. - С. 93 - 98.].

Вищезгаданий спосіб є найбільш близьким по технічній суті та результату, який може бути досягнуто, тому його обрано за прототип.

Але відомий спосіб характеризується неможливістю одночасного контрастування великого об'єму матеріалу, можливістю травмування об'єкта під час проведення маніпуляцій з мікропіпеткою, контактуванням поверхні сіточок з повітрям та ви-

(19) UA (11) 58290 (13) U

падіння солей барвників на поверхні об'єкта і необхідності використання захисних матеріалів для запобігання опроміненню розчинів сонячними променями.

В основу корисної моделі покладено завдання зменшити час контрастування великого за об'ємом матеріалу, зменшити контакт реактивів з повітрям та сонячним світлом, зменшити травмування поверхні ультратонких зрізів, зменшити кількість артефактів при перегляді контрастованих об'єктів на трансмісійному електронному мікроскопі.

Поставлене завдання вирішується тим, що процес контрастування ультратонких зрізів згідно корисної моделі відбувається в використанні чотирьох непрозорих контейнерів з інертного матеріалу об'ємом 17,5 см³ та щільно прилягаючої кришки з тримачами для сіточок. Сіточки для контрастування поміщають в пази тримачів кришки контейнерів. Після фіксації сіточок, кришку поміщають в контейнер з першим барвником, в якості якого виступає 2 % розчин уранілацетату, далі кришку з тримачами для електронномікроскопічних сіточок переміщують в другий контейнер де сіточки промивають в бідистильованій воді, потім кришку переносять в контейнер з другим барвником, яким є розчин цитрату свинцю та після цього кришку з тримачами для електронномікроскопічних сіточок переносять в третій контейнер де сіточки промивають розчином Соренсона. Після промивки сіточки підсушують на широкому фільтрувальному папері та переносяться в магазин для зберігання сіточок. Магазин зі знятою кришкою поміщають в термостат де відбуваються процеси видалення остаточної вологи з препаратів при температурі 35 – 37 °C протягом 12 - 24 годин.

Використання способу, що заявляється, з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє проводити контрастування великої кількості матеріалу одночасно. Використання непрозорого контейнеру та щільний контакт кришки з контейнером перешкоджає контакту матеріалу з повітрям та сонячними променями, що зменшує кількість артефактів при перегляді зразків в електронному мікроскопі. Фіксація сіточок на кришці контейнеру зменшує травматизацію зразків та підвищує їх якість. Таким чином, спосіб що заявляється, дозволяє вирішити поставлене завдання.

Графічна частина способу пояснює суть корисної моделі, де на фіг. показаний один з чотирьох контейнерів для контрастування ультратонких зрізів.

Комплект із чотирьох контейнерів включає: сам контейнер 1, в який вставляється кришка 2 з нижньої поверхні якої знаходяться щонайменше чотири тримачі 3, в яких знаходяться пази 4 для електронномікроскопічних сіточок.

Проведення контрастування за допомогою контейнера для контрастування ультратонких зрізів для трансмісійної електронної мікроскопії здійснюють таким чином.

Електронномікроскопічні сіточки зі зразками, наприклад кістки, обробляють в чотири етапи. Для обробки електронномікроскопічних сіточок зі зразками використовують чотири однакових контейнери 1, кожен об'ємом 17,5 мм³, кришку 2. У верхній

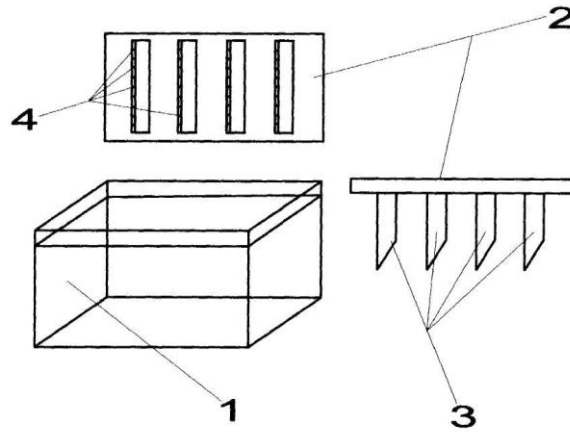
частині кришки 2 виконані щонайменше чотири вертикально розташованих тримачів 3 довжиною 1,5 мм з пазами глибиною 1,5 - 2,0 мм. Кришка 2 щільно прилягає до кожного із чотирьох контейнерів 1, що унеможлиблює контакт реагентів з атмосферним повітрям. Контейнери 1 виготовлені із інертного полімерного непрозорого матеріалу, а кришка 2 - із пінополістеролу. Верхню частину кришки 2 маркують літерами А, В, С, D відповідно до кількості тримачів та цифрами від 1 до відповідної кількості пазів. На першому етапі тримачі 3 із електронномікроскопічними сіточками зі зразками фіксують в пазах 4 кришки і занурюють в перший контейнер 1. В першому контейнері 1 електронномікроскопічні сіточки зі зразками обробляють протягом 30-60 хвилин 2 % розчином уранілацетату, об'єм розчину складає 17 мл. Потім кришку 2 із електронномікроскопічними сіточками зі зразками знімають із першого контейнеру 1 і надівають на другий, аналогічний першому контейнеру, контейнер. На другому етапі у другому контейнері 1, заповненому бідистильованою деіонізованою водою проводять промивку електронномікроскопічних сіточок зі зразками від залишків уранілацетату. Процес промивки проводять двічі по 15 хвилин, змінюючи воду у другому контейнері 1. Далі кришку 2 із електронномікроскопічними сіточками зі зразками знімають із другого контейнеру 1 і надівають та третій контейнер 1. На третьому етапі електронномікроскопічні сіточки зі зразками обробляють барвником - розчином цитрату свинцю. Обробку здійснюють протягом 30-60 хвилин. Потім кришку 2 із електронномікроскопічними сіточками знімають з третього контейнеру 1 і надівають на четвертий контейнер 1. На четвертому етапі електронномікроскопічні сіточки зі зразками промивають буферним розчином Соренсона. Промивка триває 10 хвилин після чого буферний розчин Соренсона зливають, а в четвертий контейнер 1 заливають бідистильовану деіонізовану воду, в якій електронномікроскопічні сіточки зі зразками знаходяться протягом 15 хвилин. Після промивки електронномікроскопічні сіточки зі зразками підсушують на широкому фільтрувальному папері протягом 20-30 хвилин, потім електронномікроскопічні сіточки зі зразками переносять в магазин для зберігання сіточок (на графічній частині не показаний). Магазин зі знятою кришкою 2 поміщають в термостат, де відбувається процес видалення вологи з препаратів при температурі 35-37 °C протягом 12-24 годин.

Запропонований спосіб є детальним та точним, дозволяє проводити контрастування великої кількості матеріалу одночасно. Використання непрозорого контейнеру та щільний контакт кришки з контейнером перешкоджає контакту матеріалу з повітрям та сонячними променями, що зменшує кількість артефактів при перегляді в електронному мікроскопі. Фіксація сіточок на кришці контейнеру зменшує травматизацію зразків та підвищує їх якість.

За допомогою запропонованого контейнеру для контрастування ультратонких зрізів для трансмісійної електронної мікроскопії на кафедрі анатомії людини проведене контрастування 186 сіточок

зі зразками кістки, легень, крові, регенерату. Це дозволило зменшити кількість артефактів при перегляді зразків на електронному мікроскопі та про-

водити одночасне контрастування більшої кількості зразків при вивченні ультраструктури досліджуваних об'єктів.



Фіг.