

СПОСІБ ПІДГОТОВКИ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ ДЛЯ ШВИДКОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

Винахід відноситься до області медицини, зокрема до гістохімічної техніки, та призначений для підготовки біологічних об'єктів для електронної мікроскопії.

Відомий спосіб швидкої підготовки клітин для електронно-мікроскопічного дослідження /Я.Н.Филипенко. Быстрая подготовка клеток бронхиоальвеолярного лаважа для электронно-микроскопического исследования //Лабораторное дело.-1988,- 08.-с.40-42/. Суть методу полягав в тому, що після забору і центрифугування матеріалу, клітинний осад промивали какодилатним буфером, рН - 7,2-7,4, і фіксували на протязі 40-50 хвилин осмієвим фіксатором /2% OsO_4 - 5,0 мл; 0,2М какодилатного буферу - 4,5 мл; 0,2% NaClO_2 - 0,5 мл і 400,0 мг сахарози/. Після промивання в 50% спирті /2 рази по 5-10 хв./ матеріал зневоднювали в спиртах висхідної концентрації і окису пропілену по схемі: 70° спирт - 2 рази по 10 хв, 96° спирт - 2 рази по 10 хв, 100° спирт - 2 рази по 15 хв, суміш 100° спирту з окисом пропілену /1:1/ - 10 хв, окис пропілену 10 хв. Після цього частину осаду пастелівською піпеткою наносили на чисте покривне скло /2-3 краплі/ і підсушували при 37°C на протязі 15-20 хв. Матеріал напиляли золотом і проглодали в растровому електронному мікроскопі ЛБМ- 35G. Частину осаду що залишилась просякали в суміші смоли та окису пропілену /1:1/ і заключали в епон-аралдіт. Але даний спосіб швидкої підготовки клітки для електронно-мікроскопічного дослідження потребує певних навиків, наявності приладів /центрифуги, рН-метра, термостату та ін./, великої кількості різноманітних дорогих хімічних реактивів /осмію, золота, какодилатного буферу, розчину хлористого кальцію, сахарози, спиртів

різної концентрації, окису пропілену, епон-аралдиту та ін/ цього потребує багато часу /до 3-х діб/. Спосіб не забезпечує високої! якості електронно-мікроскопічного зображення і не дозволяє підвищити розрізняючу властивість об'єктів, що не дозволяє використовувати дану методику для швидкої підготовки тканин для електронно-мікроскопічного дослідження.

Завданням винаходу є скорочення часу підготовки тканин до електронно-мікроскопічного дослідження і спрощення методики підготовки біологічних об'єктів до дослідження.

Спосіб здійснюється слідуєчим чином: Фіксовану тканину органу занурюють в 2,5% глютар-альдегіду на 15 хв. Потім її одноразово відмивають в фізіологічному розчині 3-5 хвилин і для кінцевої фіксації переносять в 1,0% розчин осмієвої кислоти на 15-30 хвилин. Потім біологічну тканину занурюють в 70° ацетон /2 рази по 6 хв./, а потім в 100° ацетон /2 рази по 5 хв./, і далі в суміш /1:1/ ацетону і залівного середовища /2 рази по 5 хв./. Потім, як звичайно, заливка в капсули і полімеризація при температурі 95-120° на протязі 60 хвилин.

Приклад: Призначений для дослідження фрагмент тканини фіксували в 2,5% розчині глютарового альдегіду на фосфатному буфері при температурі 4°С 15 хв. Потім її одноразово відмивали фізіологічним розчином на протязі 3-5 хв. і для остаточної фіксації перенесли в 1% розчин осмієвої кислоти на 20 хв. Фіксовану тканину занурювали в 70° ацетон /2 рази по 6 хв./, потім в 100° ацетон /2 рази по 5 хв./ і далі в суміш /1:1/ ацетону і залівного середовища /епон/ на 10 хв. Після цього тканину перенесли в чисте залівне середовище /епон/ 2 рази по 5 хв. Потім проводилась звичайна заливка в капсули і полімеризація при температурі 95-120°С на протязі 60 хв. Всього витрачено біля 2-х годин.

Позитивним ефектом запропонованого способу є те, що значно

скорочується *час* підготовки об'єкту для дослідження /всього біля 1,5-2 години/, підвищується якість наступного електронно-мікроскопічного зображення, пов'язане з умовами полімеризації. Спосіб дозволяє прискорити електронно-мікроскопічне дослідження в екстрених випадках.

Спосіб рекомендований для практичного використання.
