

Содержание

От редактора	3
Предисловие	4
Благодарности	5
Введение. Микроструктуры, ультраструктуры, наноструктуры в биологии	6
Часть 1. Трансмиссионная электронная микроскопия	7
Электронный микроскоп	7
Формирование изображения	8
Разрешение	9
Как подготовить биологический объект для изучения с помощью трансмиссионного (просвечивающего) электронного микроскопа	10
Этап 1. Фиксация	11
Что важно понимать до начала фиксации?	11
Свойства фиксаторов	12
Формальдегид	13
Глюбаровый альдегид	13
Осмиевый фиксатор	14
Двойная фиксация	15
Осмотическое давление	17
Осмолярность раствора	17
Осмотическое давление	18
Значения осмолярности часто используемых растворов	19
Этап 2. Дегидратация	19
Как дегидратировать или обезводить объект?	19
Этап 3. Эпоксидные смолы	21
Для чего нужны эпоксидные смолы, и как с ними работать?	21

Чего следует опасаться, приступая к этапу пропитки? ...	22
Полимеризация	24
Как рассчитать нужный объем смолы?	25
Этап 4. Изготовление срезов	26
Тримминг, или «заточка пирамиды»	26
Простой и надёжный способ заточки пирамидки	29
Почему верхняя площадка должна быть в форме трапеции?	31
Полутонкие срезы	32
«Тонкие моменты» в изготовлении ультратонких срезов	35
Обратный захват среза	35
Чаддер, или полосатые срезы	36
Разноцветные срезы	36
Мятые срезы	36
Как снимать срезы с поверхности воды	36
Изготовление и свойства подложек	39
Как приготовить плёнку-подложку и приклеить её на бленду?	39
Следуйте простому правилу: «срезы к буквам»	41
Этап 5. Окраска ультратонких срезов или контрастирование мембран для изучения в потоке электронов	42
Правила работы и хранение контрастёров	42
Как контрастировать срезы?	43
Часть 2. Сканирующая электронная микроскопия, или как получить объёмное изображение биологического объекта и его поверхности	46
Сканирующий электронный микроскоп	46
Как подготовить биологический объект для изучения с помощью сканирующего электронного микроскопа	47
Этапы подготовки водного биологического объекта для изучения поверхностных ультраструктур	48

Особенности фиксации	48
Дегидратация	49
Высушивание биологических объектов методом критической точки	49
Критическая точка	50
Монтировка на столик-держатель	52
Придание электропроводности или напыление	52
Часть 3. Конфокальная лазерная микроскопия	56
Конфокальный сканирующий микроскоп	56
Флуоресценция как основа визуализации	58
Наиболее важные характеристики флуорофоров	60
Автофлуоресценция	61
Как подавить или избежать автофлуоресценции?	62
Часть 4. Как подготовить биологический объект для изучения под конфокальным лазерным микроскопом	63
Методы флуоресцентного окрашивания	63
Иммуно-флуоресцентный метод	63
Основные методы окраски антигенов	64
Как подготовить объект для иммуно-флуоресцентного окрашивания?	65
Общий протокол подготовки тотальных препаратов	65
Что важно понимать, следуя протоколу, или желая его изменить?	67
Инкубация в первичных антителах (АВ I)	68
Инкубация во вторичных антителах (АВII)	68
Флуоресцентные гистохимические красители	69
Часть 5. Ультроструктурная иммуноцитохимия, или Immuno-Gold-staining (ImGold)	70
Фиксаторы	70
Протокол фиксации в общем виде	71
Смолы для заключения объектов	71
Этапы пропитки и полимеризация	71

Особенности проведения иммуноцитохимических реакций на ультратонких срезах	72
“Silver enhancement”	73
Как правильно рассчитать разведение антител?	74
Часть 6. Рецептурный справочник	76
Приложение № 1. Буферные смеси	76
Приложение № 2. Фиксаторы	78
Приложение № 3. Эпоксидные смолы	81
Приложение № 4. Красители и контрастёры срезов	84
Приложение № 5. Протоколы подготовки объекта	88
Приложение № 6. Дополнительные рецепты	92
Особенности подготовки посуды для маточного раствора	92
Приготовление полимерных растворов для подложек	93
Физиологические растворы	93
Полезные сайты	98
Рекомендованная литература	99