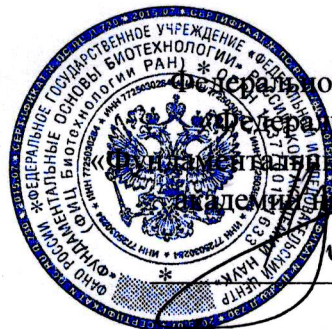


**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН)**

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор



Директор федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской
академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

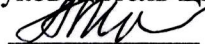
чл.-корр. РАН Попов

«12» сентября 2017

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ЭЛЕКТРОННО-
МИКРОСКОПИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ
КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ
в ЦКП «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных
физиологических групп биотехнологического назначения (UNIQEM)»
(ЦКП «Коллекция UNIQEM»)**

«Согласовано»

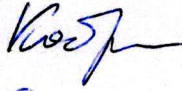

Руководитель ЦКП «Коллекция UNIQEM»

 д.б.н. А.Л. Мулюкин

«30» августа 2017

МОСКВА 2017

Разработано

ФИО, степень, должность	Подпись	Подразделение
Кострикина Н.А., с.н.с.		ЦКП «Коллекция UNIQEM»
Сорокин В.В., с.н.с.		

Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов клеток микроорганизмов осуществляют в соответствии со следующими процедурами

1. Подготовка образцов клеток микроорганизмов или иного биоматериала для получения ультратонких срезов:

- 1.1. Фиксация осажденных образцов в 2-4% глутаральдегиде в 0.05 – 0.1 М какодилатном буфере в течение 30 минут - нескольких часов.
- 1.2. Промывка осадка 0.05-0.1 М какодилатным буфером.
- 1.3. Фиксация промытого осадка 1 - 4% водным раствором тетраоксида осмия при 4 °С в течение нескольких часов - нескольких суток.
- 1.4. Центрифугирование осадка, заливка в 2% агар и нарезка на небольшие блоки (1-2 мм³).
- 1.5. Инкубация агаровых блоков в насыщенном растворе уранилацетатаⁱ в 30% этиловом спирте в течение не менее 2 часов.
- 1.6. Обезвоживание материала в серии спиртов возрастающей концентрации (от 30% до 96%), а затем - в нескольких сменах ацетона или окиси пропилена.
- 1.7. Пропитка обезвоженного материала в смесях эпоксидных смол, составленных по прописи фирмы-производителя ("Sigma" или "Fluka").
- 1.8. Заключение пропитанных смолой образцов в желатиновые или пластиковые капсулы со смесью смол и дальнейшая полимеризация в термостате при 37 °С (1 сут.) и затем при 60 °С (12 ч.).

2. Изготовление ультратонких срезов:

- 2.1. Заточка заполимеризованных капсул под лупой.
- 2.2. Резка заточенных капсул на ультрамикротоме LKB TYPE 8810A. Толщина срезов, пригодных для просмотра, должна составлять 400-500 ангстрем. Стеклопильные ножи, необходимые для получения срезов, получают на приборе LKB KNIFE MAKER 7800B. На ножи приклеивают воском ванночку для воды, на которую впоследствии спускают готовые срезы. Срезы с воды снимают на приготовленные медные сеточки (п. 3).

3. Приготовление сеточек для препаратов:

- 3.1. Нанесение формваровой или коллодиевой пленки на сеточки (диаметром 3 мм с перфорациями) и высушивание. Формвар растворяют в дихлорэтане, а коллодий - в амилацетате.

- 3.2. Напыление пленок на сеточках углем в вакуумной установке JEOL VACUUM EVAPORATOR JEE-4C для укрепления пленки.
 - 3.3. Деионизация напыленных сеточек на приборе JEOL FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100.
4. Окраска срезов:
- 4.1. Контрастирование срезов на сеточках водным раствором уранилацетата в течение 20 мин.
 - 4.2. Промывка сеточек в дистиллированной воде.
 - 4.3. Контрастирование срезов на сеточках в растворе азотнокислого свинца в течение 20 минут.
 - 4.4. Промывка в дистиллированной воде и высушивание.
5. Подготовка тотальных препаратов микроорганизмов для просмотра в просвечивающем электронном микроскопе. Осуществляют при необходимости, альтернативно или дополнительно к изучению ультратонких срезов.
- 5.1. Суспендирование биомассы в малом объеме водопроводной или дистиллированной воды.
 - 5.2. Контрастирование клеток микроорганизмов водным раствором фосфорновольфрамовой кислоты или водным раствором уранилацетата.
 - 5.3. Нанесение суспензии на приготовленные медные сеточки (п. 3) и высушивание.
 - 5.4. Просмотр в электронном микроскопе (в соответствии с п. 6).
6. Просмотр сеток со срезами в электронном микроскопе JEM-100CX или JEM-1400 при напряжении 80.000 В с увеличением от 5000 до 100000. Изображения снимают на высокочувствительной фотопленке фирмы AGFA формата 6 x 9, заправленные в кассеты для фотосъемки. Отснятые фотопленки проявляют в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя и высушивают. Изображения срезов, полученные на микроскопе JEM-1400, регистрируют также с помощью камеры MORADA G2 в цифровом формате.

¹ Здесь и далее концентрации уранилацетата, фосфорновольфрамовой кислоты, формвара и коллодия варьируют и подбираются в индивидуальном порядке.