

UŚL 222

Sposób przygotowania uwodnionej próbki materiału biologicznego do trójwymiarowych analiz mikroskopem świetlnym i elektronowym

Przedmiotem wynalazku jest sposób przygotowania uwodnionej próbki materiału biologicznego do trójwymiarowych analiz mikroskopem świetlnym i elektronowym, zwłaszcza próbek o delikatnej konstrukcji przestrzennej, utrzymywanej przez wewnętrzne siły hydrostatyczne.

Szybki rozwój technologiczny ostatnich lat pozwolił na stworzenie wielu technik obrazowania mikroskopowego, które umożliwiają badanie trójwymiarowej struktury materiału biologicznego na poziomie tkanek, komórek oraz organelli subkomórkowych.

Warunkiem koniecznym dla efektywnego zastosowania takich technik jest dobre zachowanie przestrzennej architektury obiektów biologicznych w procesie przygotowania preparatu. Należy zauważyć, że każda z obecnie stosowanych metod preparatyki wiąże się z ingerencją fizyczną i/lub

chemiczną w strukturę badanego materiału. Należy zatem tak dobrać metodę aby zminimalizować zmiany obserwowanej struktury przestrzennej. W przypadku silnie uwodnionych materiałów biologicznych takich jak biofilm bakteryjny, gdzie zawartość wody przekracza 90%, zakres oraz sposób w jaki preparatyka zmienia zawartość wody mają zasadnicze znaczenie. Struktura przestrzenna tego rodzaju materiałów jest bowiem utrzymywana dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym związanym z hydratacją.

Dotychczas do przygotowania preparatu do obserwacji mikroskopowej wymagane jest nierzadko usunięcie całości lub części wody z badanego materiału. Dotyczy to w szczególności konwencjonalnej mikroskopii elektronowej, gdzie obserwacja prowadzona jest w próżni rzędu 10^{-4} – 10^{-6} Torr. Dodatkowo w przypadku skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) niezbędne jest napylenie powierzchni materiału substancją o dużej przewodności elektronowej (zazwyczaj złotem), co wykonywane jest w próżni rzędu 10^{-3} Torr. Warstwa pokrywająca próbkę redukuje niekorzystny efekt związany ze oddziaływaniem wiązki elektronów w próżni mikroskopowej. W tych warunkach obserwacji konieczne jest zatem odpowiednie przygotowanie materiału biologicznego. Stosuje się tu suszenie preparatu w punkcie krytycznym CPD, gdzie ciecz przechodzi ze stanu płynnego w stan gazowy. Taka procedura, w przypadku bardzo delikatnych i silnie uwodnionych próbek biologicznych, utrzymywanych głównie przez wewnętrzne siły hydrostatyczne, powoduje ich obkurczenie, a co za tym idzie zmiany w przestrzennej konfiguracji przygotowywanego

materiału. Ponadto, jeżeli próbka zawiera dużo wody, to w próżni mikroskopowej siły napięcia powierzchniowego wzrastają w procesie parowania, sprzyjając wytworzeniu się kryształów lodu i powodując dodatkowe zmiany w strukturze przestrzennej komórek i tkanek. W celu zapobiegnięcia takim zmianom w strukturze przestrzennej stosuje się utrwalanie w glutaraldehydzie, którego karbonylowe grupy funkcyjne sieciują do struktur białek, polisacharydów i kwasów nukleinowych tworząc dodatkowy stelaż usztywniający badaną strukturę. Należy jednak zauważyć, że taka procedura pozwala jedynie ograniczyć pewne zmiany strukturalne, lecz ich nie eliminuje. Ponadto, w przypadku materiału biologicznego, który nie posiada sztywnych elementów, na przykład ścian komórkowych, obserwowano obkurczenie pod wpływem samego utrwalania w glutaraldehydzie.

Powyższe niedogodności badań w SEM silnie uwodnionych obiektów częściowo rozwiązuje środowiskowa skaningowa mikroskopia elektronowa (ESEM), w której warunki obserwacji są zbliżone do stanu naturalnego i umożliwia prowadzenie obserwacji pod ciśnieniem gazu nawet do 20 Torr, bez efektu wysuszenia i konieczności napyłania warstwą przewodzącą. Wadą tej techniki jest jednak wysoki koszt aparatury i w konsekwencji mała jej dostępność oraz ograniczenia związane z uzyskiwanymi powiększeniami oraz rozdzielczością.

Obserwacja przestrzennej struktury materiału biologicznego w warunkach fizjologicznego uwodnienia i temperatury jest możliwa przy wykorzystaniu fluorescencyjnej mikroskopii świetlnej, na przykład

konfokalnej lub wielofotonowej. Należy jednak podkreślić, że niewiele substancji biologicznych wykazuje naturalną, silną fluorescencję w świetle widzialnym. Wynika z tego konieczność wprowadzenia do materiału biologicznego znaczników fluorescencyjnych, co wiąże się z reguły z utrwaleniem materiału przy użyciu wodnych roztworów formaldehydu i/lub glutaraldehydu albo substancji bezwodnych, na przykład alkohol etylowy. Taka procedura wiąże się jednak często ze zmianą zawartości wody w materiale. Dodatkowo, niektóre specjalistyczne techniki znakowania, na przykład fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) wymagają środowiska o małej zawartości wody, na przykład 70% formamidu. Fluorescencyjne znakowanie materiału biologicznego wiąże się z możliwymi zmianami struktury przestrzennej, szczególnie w przypadku silnego uwodnienia. Mikroskopia świetlna podlega więc w przypadku badań struktury przestrzennej podobnym ograniczeniom jak mikroskopia elektronowa.

Zadaniem niniejszego wynalazku jest modyfikacja metody preparatyki subtelnych struktur materii o wysokim uwodnieniu, dzięki którym ogranicza się zmiany w trójwymiarowej architekturze materiału biologicznego.

Sposób stanowiący przedmiot niniejszego wynalazku zadania te rozwiązuje. Istota sposobu według wynalazku polega na tym, że pobraną próbkę w pierwszej fazie poddaje się szybkiemu zamrożeniu w temperaturze od -20°C do -200°C , korzystnie -196°C poprzez zanurzenie w ciekłym azocie, a w drugiej fazie prowadzi się liofilizację w temperaturze od -20°C

do -70°C , korzystnie -50°C i ciśnienia od 0,01hPa do 0,0001hPa, korzystnie 0,001 hPa aż do całkowitego wysuszenia próbki. Następnie wysuszoną próbkę do badań we florescencyjnym mikroskopie świetlnym poddaje się procedurze znakowania bezpośredniego lub fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Alternatywnie wysuszoną próbkę do badań w mikroskopie elektronowym skaningowym pokrywa się cienką warstwą metalu szlachetnego, korzystnie złotem w komorze napyłarki próżniowej.

Podczas prowadzonych badań nad uzyskaniem najlepszej jakości próbek materiału biologicznego, niespodziewanie okazało się, że wykonanie odpowiednich próbek, gwarantujących zachowanie nienaruszonej struktury przestrzennej i ich właściwości można uzyskać przez poddanie pobranego materiału biologicznego obróbce, sposobem według niniejszego wynalazku.

Przykład 1. Dla badań w technice mikroskopii fluorescencyjnej, dla zachowania struktury trójwymiarowej pobrana próbka zamraża się w ciekłym azocie do temperatury -196°C , a następnie umieszcza się zamrożoną próbkę w komorze liofilizatora. Liofilizację prowadzi się w temperaturze -50°C i ciśnieniu 0,001 hPa i liofilizuje się aż do całkowitego wysuszenia materiału przez około 15 godzin. Następnie wysuszoną próbkę poddaje się procedurze fluorescencyjnego znakowania bezpośredniego lub FISH, jednak po każdym z etapów procedury mokry materiał poddaje się liofilizacji. Po zakończeniu procedur znakowania uzyskany preparat przesącza się olejkim immersyjnym i obserwuje się w mikroskopie fluorescencyjnym.

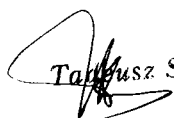
Przykład 2. Próbkę materiału biologicznego przeznaczoną do badań w mikroskopie elektronowym skaningowym zamraża się w ciekłym azocie do

temperatury -196°C , a następnie umieszcza się zamrożoną próbę w komorze liofilizatora. Liofilizację prowadzi się w standardowych warunkach liofilizacji w temperaturze -50°C i ciśnieniu $0,001\text{hPa}$ i liofilizuje się aż do całkowitego wysuszenia materiału przez około 15 godzin. Po wysuszeniu próbę wyjmuje się ostrożnie z liofilizatora i umieszcza w komorze napyłarki. Po napyleniu tak przygotowany materiał można obserwować z użyciem mikroskopu skaningowego.

Zastosowanie sposobu będącego przedmiotem niniejszego wynalazku, ma następujące zalety: szybkie i skuteczne odwodnienie preparatu, zminimalizowanie uszkodzeń trójwymiarowej architektury badanego materiału, brak ingerencji chemicznej w strukturę materiału, możliwość poddania preparatu dalszym etapom preparatyki wymagającym odwodnionego materiału na przykład napyłaniu, hybrydyzacji.


Dodatkową cechą i zaletą wynalazku jest możliwość wielokrotnej obserwacji tak przygotowanych preparatów, wykorzystanie standardowych mikroskopów umożliwiających obserwacje struktury 3D (SEM oraz mikroskopia konfokalna/wielofotonowa), ominięcie konieczności stosowania drogich urządzeń np. ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy), uniknięcia problemów związanych z prężnością pary wodnej w komorze mikroskopu oraz uzyskuje się możliwość obserwacji w SEM zarówno w wysokiej jak i niskiej próżni.

RZECZNIK PATENTOWY


Tadeusz Szczepanik

Uniwersytet Śląski

w Katowicach T O R


prof. zw. dr hab. Wiesław Banys