

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Hedysarum grandiflorum Pall.
Копеечник крупноцветковый
Вельмовский П.В.



2022

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© В.Я. Катаев, 2022

УДК. 619: 616/618 + 619: 636.2

В.Я. Катаев

ОПТИМАЛЬНЫЙ МЕТОД ПРОБОПОДГОТОВКИ КЛЕТОК ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

Цель. Подобрать оптимальную методику подготовки бактериальных клеток для сканирующей электронной микроскопии на модели грамотрицательной бактерии *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S).

Материалы и методы. Клетки сальмонелл двукратно отмывали от питательной среды 0,1М фосфатно-солевым буфером (PBS), и проводили 4 варианта пробоподготовки для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Результаты. Были протестированы 4 метода пробоподготовки клеток модельного организма *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S), выявлена оптимальная концентрация фиксатора (1%) и начальная концентрация раствора этанола для обезвоживания образца (5%).

Заключение. Выявлено, что клетки сальмонелл требуют более тонкой пробоподготовки, по сравнению с грамположительными бактериями, такими как стафилококки или коринебактерии. Препараты из клеток сальмонелл требуют обязательного обезвоживания с плавным градиентом концентрации этанола, а также сушки в критической точке.

Ключевые слова: Сканирующая электронная микроскопия, морфология, сальмонеллы.

*V.Y. Kataev*¹

OPTIMUM METHOD FOR SAMPLE PREPARATION OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA CELLS FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

¹ Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS), Orenburg, Russia

Aim. To select the optimal method for preparing bacterial cells for scanning electron microscopy on a model of gram-negative bacterium *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S).

Materials and methods. Salmonella cells were washed twice from the nutrient medium with 0.1M phosphate-buffered saline (PBS), and 4 variants of sample preparation for scanning electron microscopy (SEM) were performed.

Results. Four methods of sample preparation of cells of the model organism *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S), the optimal fixative concentration (1%) and the initial concentration of ethanol solution for sample dehydration (5%) were found.

Conclusion. Salmonella cells have been found to require finer sample preparation than Gram-positive bacteria such as Staphylococcus or Corynebacterium. Preparations from Salmonella cells require mandatory dehydration with a smooth gradient of ethanol concentration, as well as drying at the critical point.

Key words: Scanning electron microscopy, morphology, salmonella.

Введение

В настоящее время сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) представляется чрезвычайно полезным инструментом для анализа морфологии биологических образцов. Разрешающая способность СЭМ зависит от длины волны электрона, которая намного короче длины волны видимого света, что обеспечивает гораздо более высокое разрешение (обычно около 10 нм), чем в традиционной световой микроскопии (около 200-250 нм) [1]. Новые поколения СЭМ высокого разрешения позволяют достичь разрешающей способности в 1 нм, однако качество результатов работы самого современного прибора может быть нивелировано плохой пробоподготовкой [2], поэтому выбор методики подготовки под конкретный тип образцов является первоочередной задачей исследователя. Неправильная подготовка образца может привести к усадке и деформации клеток, что может привести к неправильным, вводящим в заблуждение интерпретациям [3].

Целью данной работы явилась разработка оптимального протокола обработки образцов грамотрицательных бактерий для исследования методом СЭМ при анализе морфологии клеток.

Процесс подготовки биологических образцов для СЭМ состоит из нескольких этапов, основные из которых включают фиксацию, обезвоживание, сушку и напыление.

На первом этапе пробоподготовки биологические образцы обрабатывают сшивающими реагентами. Целью этого процесса является сохранение неизменной структуры биологического материала, что позволяет отображать естественное состояние объекта. Известно много фиксаторов [4], однако на практике чаще всего применяют глутаровый альдегид и тетраоксид осмия. Наиболее популярным фиксатором при работе с бактериями является глутаровый альдегид, эффективность которого связана с его многокомпонентностью [5]. Тетраоксид осмия является вторым наиболее часто используемым биологическим фиксатором, который сшивает липиды. Однако он проникает в клеточные структуры медленнее, чем глутаровый альдегид [5]. Кроме того, он проявляет канцерогенные свойства, а его пары токсичны для глаз, органов дыхания и пищеварения. Тетраоксид осмия также является сильным окислителем и может вызвать нежелательное повреждение или усадку компонентов мембраны в процессе фиксации [6].

Бактериальные и эукариотические клетки в значительной степени со-

стоят из воды, и перед помещением их в условия вакуума для напыления, воду необходимо удалить. Поэтому следующим важным этапом подготовки биологических образцов для СЭМ является обезвоживание, при котором вода, присутствующая в клетках, постепенно удаляется. Обезвоживание проводят путем погружения образцов на несколько минут в водные растворы этанола возрастающей концентрации до достижения концентрации этанола 100% [7].

Следующим этапом пробоподготовки является сушка в критической точке. Данный метод основан на том, что в критической точке жидкость превращается в газ, и это явление не сопровождается искажающими силами. Ранее использованный осушитель вытесняется жидкостью (двуокисью углерода или фреоном), доведенной до критической температуры при повышенных температуре и давлении. Как только достигается критическая точка, нагрев поддерживается при критической температуре, и пар медленно выпускается из камеры до тех пор, пока давление в камере не сравняется с атмосферным [6].

Будучи непроводящими материалами, обезвоженные биологические образцы обычно вызывают проблемы с зарядкой поверхности в СЭМ. Заряд, накопленный на образце, разрушает первичный электронный пучок, что приводит к искажению изображения и низкой контрастности. Поэтому необходимо покрывать образец тонким слоем проводящего материала, увеличивая таким образом его поверхностную проводимость [8]. Предпочтительными металлами для напыления являются золото, сплавы золота и палладия, платина, иридий и хром.

Материалы и методы

Культуру *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S) инкубировали в LB-бульоне (12 ч, 37 °C). Далее клетки собирали центрифугированием (5000 об/мин, 5 мин), и дважды отмывали от питательной среды 0,1 М PBS.

В нашем исследовании использовано 4 варианта пробоподготовки образцов для СЭМ:

Вариант 1

Клетки сальмонелл концентрировали центрифугированием, к осадку добавляли 2,5% глутаровый альдегид (Acros Organics, США) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Далее клетки наносили на стеклянный слайд, высушивали при комнатной температуре, промывали в дистиллиро-

ванной воде от глутарового альдегида, снова высушивали при комнатной температуре и производили напыление.

Вариант 2

На стеклянный слайд наносили 10 мкл 0,1% поли-L-лизина (Sigma Aldrich, США), высушивали в холодильнике при 4 °С. На слайд с поли-L-лизином наносили 5 мкл бактериальной суспензии ($\sim 10^6$ КОЕ/мл), и, не дожидаясь высыхания, капали 10 мкл 2,5% глутарового альдегида. Далее образец проводили через растворы этанола, начиная с 20%, до абсолютного этанола, с шагом в 10%. При этом в каждом растворе этанола образец инкубировали 5 минут, а в абсолютном этаноле – 10 минут. Далее производили сушку в критической точке и напыление образца.

Вариант 3

На слайд с поли-L-лизином наносили 5 мкл бактериальной суспензии ($\sim 10^6$ КОЕ/мл), и, не дожидаясь высыхания, капали 10 мкл 1% глутарового альдегида. Далее образец проводили через растворы этанола, начиная с 10%, до абсолютного этанола, с шагом в 10%. При этом в каждом растворе этанола образец инкубировали 5 минут, а в абсолютном этаноле – 10 минут. Далее производили сушку в критической точке и напыление образца.

Вариант 4

На слайд с поли-L-лизином наносили 5 мкл бактериальной суспензии ($\sim 10^6$ КОЕ/мл), и, не дожидаясь высыхания, капали 10 мкл 1% глутарового альдегида. Далее образец проводили через растворы этанола, начиная с 5%, до абсолютного этанола, с шагом в 5%. При этом в каждом растворе этанола образец инкубировали 5 минут, а в абсолютном этаноле – 10 минут. Далее производили сушку в критической точке и напыление образца.

Сушку в критической точке производили на приборе Quorum K850 Critical Point Dryer (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), в соответствии с рекомендациями производителя. Напыление производили золотом, на приборе Quorum Q150R S Plus (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), 1 мин. Сканирование производили на приборе TESCAN Mira 3 (Tescan, Чехия), при напряжении 5 или 10 kV.

Сушка в критической точке, напыление и сканирование были выполнены в Образовательном центре выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин» (Оренбург, Россия).

Результаты и обсуждение

Результаты апробации первого варианта пробоподготовки, который подразумевал фиксацию 2,5% глутаровым альдегидом, высушивание и напыление (без обезвоживания и сушки в критической точке) продемонстрировали, что клетки сальмонелл сильно деформируются, и не годятся для определения морфологических характеристик (рис. 1).

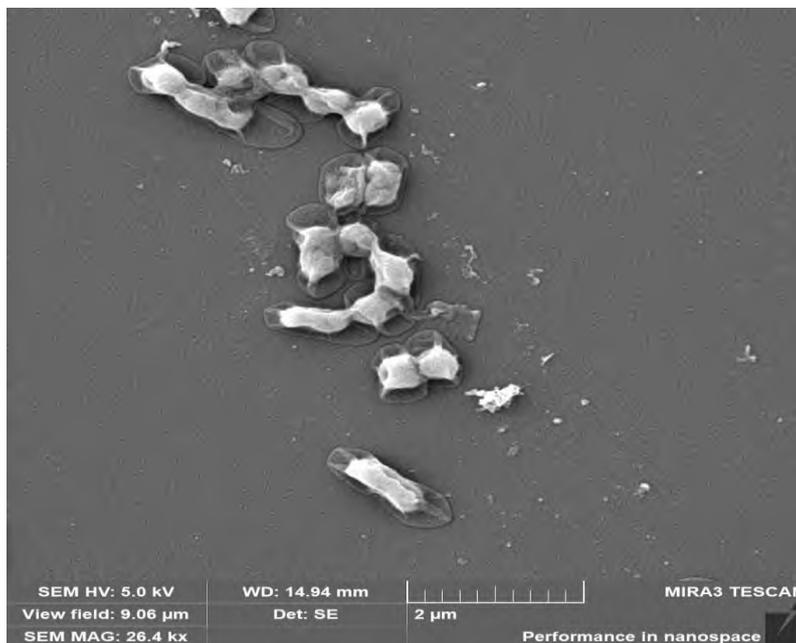


Рис. 1. Результаты сканирующей электронной микроскопии клеток *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S), подготовленных по Варианту 1 пробоподготовки.

При этом сходные методики активно используются для оценки морфологии грамположительных бактерий, таких как стафилококки или коринебактерии [8, 9]. Это связано с большей ригидностью клеточной стенки грамположительных бактерий, которые имеют толстый слой пептидогликана. Таким образом, данная методика пробоподготовки не подходит для грамотрицательных бактерий, обладающих барьерными структурами меньшей ригидности.

Кроме того, нами обнаружено, что часть клеток смывается со стеклянной пластины при отмывке глутарового альдегида. Поэтому, в дальнейшем мы использовали подложку, модифицированную поли-L-лизинном, который обеспечивает надежное прикрепление клеток.

Пробоподготовка по Варианту 2 показала лучшую сохранность клеток сальмонелл, однако препарат по-прежнему содержал большое количество деформированных, «сморщенных» клеток. При рассмотрении электронограммы данного препарата видно большое количество клеток с разной морфологией,

среди которых встречаются как аномально длинные и узкие, так и аномально широкие (рис. 2). Также отмечено, что клетки, подготовленные по данной методике, не полностью отмываются от глутарового альдегида, что выражается затемнением клеток, и меньшей контрастностью снимка.

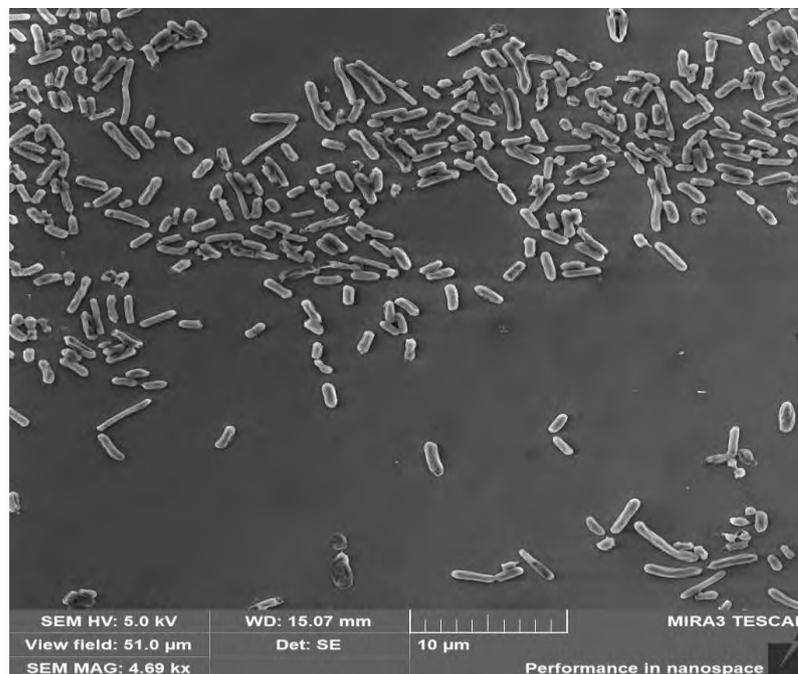


Рис. 2. Результаты сканирующей электронной микроскопии клеток *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S), подготовленных по Варианту 2 пробоподготовки.

В Варианте 3 протокола пробоподготовки, по сравнению со вторым вариантом, мы уменьшили концентрацию глутарового альдегида с 2,5% до 1%, а также снизили начальную концентрацию этанола до 10%, увеличив таким образом ряд разведений этанола и общее время обезвоживания образца. Уменьшение начальной концентрации этанола должно было сгладить переход между концентрациями, а также дополнительно улучшить отмывку от глутарового альдегида, за счет большего количества воды в начальных концентрациях спиртов.

Клетки сальмонелл, подвергнутые пробоподготовке по третьему варианту протокола, выглядят морфологически однородными по длине и ширине, не считая те клетки, которые только что поделились до начала фиксации (рис 3). Тем не менее, деформация поверхности клеток все еще визуальна. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для качественной фиксации сальмонелл не обязательно использовать высокие концентрации глутарового альдегида, оптимальной является концентрация 1%, хотя во многих подобных работах исследователи используют концентрации от 2,5 до 4%.

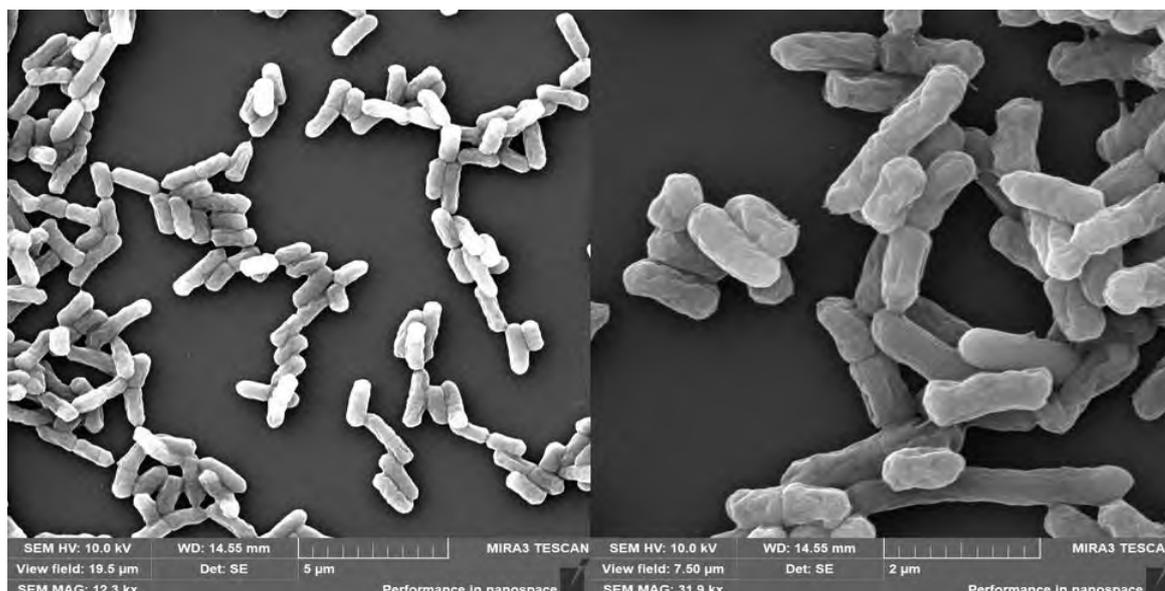


Рис. 3. Результаты сканирующей электронной микроскопии клеток *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S), подготовленных по Варианту 3 пробоподготовки.

В Варианте 4 протокола пробоподготовки, по сравнению с третьим вариантом, была снижена начальная концентрация этанола до 5%, что позволило добиться оптимального результата с точки зрения сохранности бактериальных клеток. Бактериальные клетки не имели значительных деформаций, и были морфологически однородны (рис. 4).

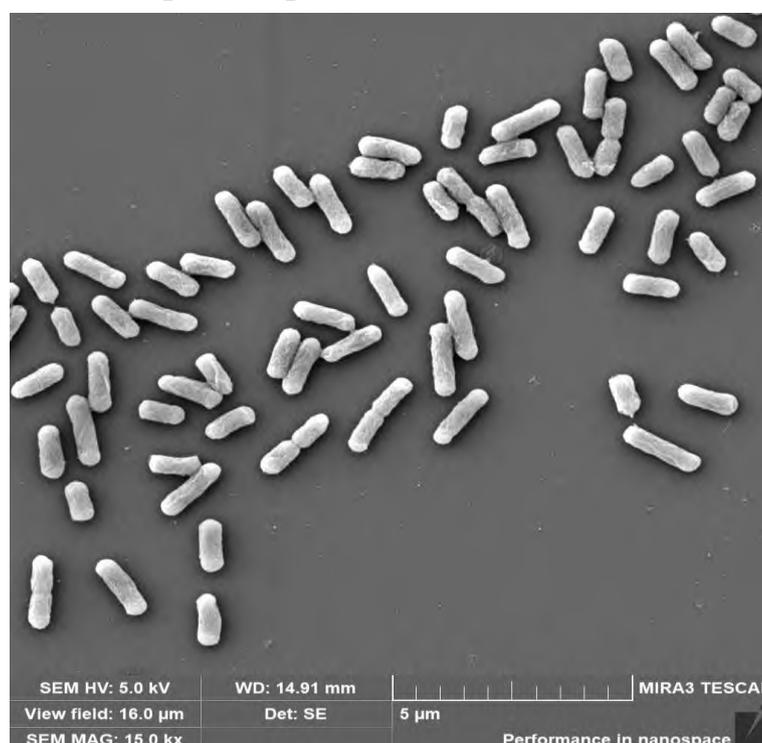


Рис. 4. Результаты сканирующей электронной микроскопии клеток *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028S), подготовленных по Варианту 4 пробоподготовки.

Заключение

Таким образом, нами был подобран оптимальный метод пробоподготовки клеток грамотрицательной бактерии *Salmonella enterica* для сканирующей электронной микроскопии.

Выявлено, что клетки сальмонелл требуют более тщательной пробоподготовки, по сравнению с грамположительными бактериями, такими как стафилококки или коринебактерии. Препараты из клеток сальмонелл требуют обязательного обезвоживания с более плавным снижением концентрации этанола в серии разведений, а также сушки в критической точке. Кроме того, установлено, что для качественной фиксации сальмонелл оптимальной является 1% концентрация глутарового альдегида.

Благодарности:

Автор выражает искреннюю благодарность М.Е. Игнатенко (ИКВС УрО РАН) за помощь с электронной микроскопией. Работа выполнена в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

Поступила 25.09.2023 г.

(Контактная информация: **Катаев Владимир Ярославович** – научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел.: 89328650692; E-mail: vladimir0334@yandex.ru)

ЛИТЕРАТУРА

1. Czerwińska-Główka D., Krukiewicz K. Guidelines for a Morphometric Analysis of Prokaryotic and Eukaryotic Cells by Scanning Electron Microscopy. *Cells*. 2021. 10(12): 3304. <https://doi.org/10.3390/cells10123304>
2. Schatten, H. Low voltage high-resolution SEM (LVHRSEM) for biological structural and molecular analysis. *Micron*. 2011. 42: 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.08.008>
3. Rahmah Aid S., Nur Anis Awadah Nik Zain N., Nadhirah Mohd Rashid N., Hara H., Shameli K., Koji I. A Study on Biological Sample Preparation for High Resolution Imaging of Scanning Electron Microscope. *J. Phys. Conf. Ser.* 2020, 1447, 012034. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1447/1/012034>
4. Singh H., Bishen K.A., Garg D., Sukhija H., Sharma D., Tomar U. Fixation and Fixatives: Roles and Functions – A Short Review. *Dent. J. Adv. Stud.* 2019. 7: 51-55. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693098>
5. Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., Waldron K.C. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 2004. 37: 790-802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>
6. Zhang Y., Huang T., Jorgens D.M., Nickerson A., Lin L.-J., Pelz J., Gray J.W., López C.S., Nan X. Quantitating morphological changes in biological samples during scanning electron microscopy sample preparation with correlative super-resolution microscopy. *PLoS ONE*. 2017. 12: e0176839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176839>
7. Fischer E.R., Hansen B.T., Nair V., Hoyt F.H., Dorward D.W. Scanning Electron Microscopy. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2012, 25, 2B.2.1–2B.2.47. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>
8. Otey C.A., Boukhelifa M., Maness P. B35 neuroblastoma cells: An easily transfected, cultured

- cell model of central nervous system neurons. *Methods Cell Biol.* 2003. 71: 287-304. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(03\)01013-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(03)01013-6)
9. Haddad G., Bellali S., Takakura T., Fontanini A., Ominami Y., Bou Khalil J., Raoult D. Scanning Electron Microscope: A New Potential Tool to Replace Gram Staining for Microbe Identification in Blood Cultures. *Microorganisms.* 2021; 9(6): 1170. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061170>
 10. Gladysheva I.V., Chertkov K.L., Cherkasov S.V. et al. Probiotic Potential, Safety Properties, and Antifungal Activities of *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 and *Corynebacterium amycolatum* ICIS 53 Strains. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09876-3>

Образец ссылки на статью:

Катаев В.Я. Оптимальный метод пробоподготовки клеток грамотрицательных бактерий для сканирующей электронной микроскопии. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2022. 3: 9 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2022-3/Articles/VYK-2022-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2022-13003