

4
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

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

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Paeonia hybrida Pall.
Пион гибридный (степной)
Вельмовский П.В.



2022

УЧРЕДИТЕЛЬ

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

© Коллектив авторов, 2022

УДК 620.187; 579(076)

Е.А. Щуплова, И.В. Гладышева

ПРИМЕНЕНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Цель. Адаптировать методику пробоподготовки эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов для их визуализации при использовании сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили эритроциты здорового донора, а также условно-патогенные микроорганизмы различных видов. Применяли различные методы подготовки образцов для сканирующей электронной микроскопии с целью получения качественных изображений.

Результаты. В результате данного исследования был адаптирован протокол, для работы со сканирующим электронным микроскопом, обеспечивающий наиболее эффективные этапы подготовки эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов, исключаящий их лизис и деформацию мембраны.

Заключение. Качество получаемых СЭМ-изображений напрямую зависит от того насколько качественно была выполнена пробоподготовка исследуемого материала.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, эритроциты, микроорганизмы.

E.A. Shchuplova, I.V. Gladysheva

APPLICATION OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY TO STUDY THE MORPHOLOGY OF ERYTHROCYTES AND OPPORTUNITICAL MICROORGANISMS

Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences), Orenburg, Russia

Aim. To adapt the method of sample preparation of erythrocytes and opportunistic microorganisms for their visualization using scanning electron microscopy.

Materials and methods. The material for the study was the erythrocytes of a healthy donor, as well as opportunistic pathogens of various types. Various methods were used to prepare samples for scanning electron microscopy in order to obtain high-quality images.

Results. As a result of this study, a protocol was adapted to work with a scanning electron microscope, which provides the most effective stages in the preparation of erythrocytes and opportunistic microorganisms, excluding their lysis and membrane deformation.

Conclusion. The quality of the obtained SEM images directly depends on how well the sample preparation of the material under study was performed.

Key words: scanning electron microscopy, erythrocytes, microorganisms.

Введение

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) широко применяется для исследования поверхности и характеристики как природных, так и искусственных объектов [1]. По сравнению с атомно-силовой микроскопией и электронной микроскопией СЭМ по-прежнему отличается своей способностью получать трехмерную топографическую визуализацию структур с хорошим разрешением [2].

СЭМ помогает в морфологической характеристике микроорганизмов – различных бактерий, грибов, водорослей и протистов, где наблюдение за особенностями микроморфологии и выявление признаков тонкого строения имеют важное значение в их классификации и таксономии [3, 4].

Однако приготовление препаратов для СЭМ включает такие этапы, как высушивание и напыление металлами, что неизбежно сопровождается появлением артефактов [5]. Значительные изменения происходят в чувствительных к обезвоживанию мембранах клеток как прокариот, так и эукариот.

Сохранение биологических структур таким образом, чтобы предотвратить распад в условиях высокого вакуума, необходимого для средней длины свободного пробега электронного луча, является первостепенной задачей.

Цель данного исследования – адаптировать методику пробоподготовки эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов для их визуализации при использовании сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы

Для изучения морфологии эритроцитов с помощью СЭМ получали эритроциты из крови здорового донора. Для этого производили забор крови из локтевой вены в стерильную пробирку, содержащую антикоагулянт (цитрат натрия). Затем в пробирку, содержащую 2 мл крови добавляли 8 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН=7,4) и трехкратно отмывали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин, затем эритроциты доводили до концентрации 10^6 кл/мл.

Для изучения морфологии клеток условно-патогенных микроорганизмов использовали штаммы *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* из Сетевой коллекции симбиотических микроорганизмов и их консорциумов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург, Россия). Все штаммы микроорганизмов хранили в триптонно-соевом бульоне (ТСБ) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Мумбаи,

Индия, штат Мэриленд, США), содержащем 20% (об./об.) глицерина, при отрицательной температуре (-80°C). Для эксперимента штаммы выращивали в ТСБ при 37°C в течение 24 ч. Для проведения СЭМ, использовали взвесь тест-штаммов в физиологическом растворе в концентрации 10⁹ КОЕ/мл.

Для фиксации эритроцитов использовали 2,5% раствор глутарового альдегида (Sigma). Фиксирующий раствор объемом 400 мкл добавляли к осадку, содержащему эритроциты, и выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого фиксированные эритроциты промывали и ресуспендировали в ФСБ (рН=7,4). На следующих этапах фиксации добавляли раствор этанола с возрастающей концентрацией – 30, 50, 80 и 100%, внося в исследуемые образцы по 400 мкл каждого раствора этанола с последующей инкубацией при 4°C в течение 10 мин.

Фиксацию исследуемых микроорганизмов проводили следующим способом: взвесь тест-штаммов бактерий в физиологическом растворе в концентрации 10⁹ КОЕ/мл трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН=7,4) и добавляли 400 мкл 2,5% глутарового альдегида к последнему осадку. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Далее образцы отмывали фосфатно-солевым буфером (рН=7,4), обезвоживали серией водно-этанольных растворов (10, 30, 50, 70, 90, 100%) и наносили на покровные стекла. Покровные стекла с высушенными образцами прикрепляли двухсторонним скотчем к столику СЭМ и напыляли золотом с помощью установки ионно-плазменного напыления Quorum Q150R plus.

Изучение морфологии клеток эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов проводили с использованием оборудования: микроскоп Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Germany), сканирующий электронный микроскоп Tescan Mira 3 (Tescan Brno, Czech Republic), ионноплазменная напылительная установка Quorum Q150R S plus (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), установка сушки в критической точке Quorum K850 Critical Point Dryer (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), центрифуга Microspin 12 (Biosan, Латвия) ЦКП образовательного Центра выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин» (Оренбург).

Результаты и обсуждение

Для проведения анализа морфологии эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов с помощью СЭМ необходимо было адаптировать методику пробоподготовки.

На первом этапе, необходимо было разработать и адаптировать режим фиксации эритроцитов и клеток условно-патогенных микроорганизмов, для того чтобы их мембраны не деформировались, не лизировались, а сами эритроциты и бактериальные клетки не «лопались». Для этого использовали 2,5% глутаровый альдегид, время инкубации составило 30 мин при комнатной температуре. В результате исследований было установлено, что при фиксации 2,5% глутаровым альдегидом эритроциты сохраняли четко выраженные контуры и характерное двояковогнутое углубление в середине клетки (рис. 1).

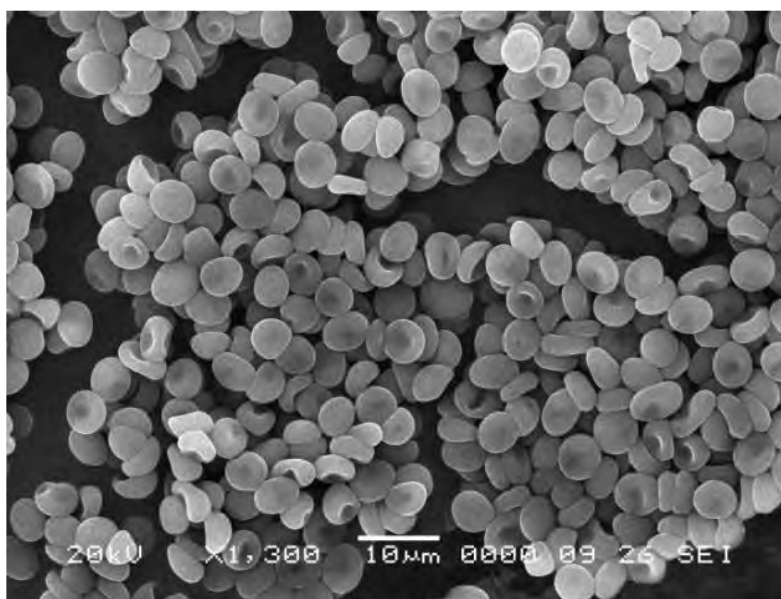


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия эритроцитов здорового донора.

Полученные результаты согласуются с данными И.А. Лобова и соавт. [6], показавшими отсутствие деформаций эритроцитов при воздействии 2,5% глутарового альдегида.

На следующем этапе исследований при работе со сканирующим электронным микроскопом было обнаружено, что при подготовке эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов нужно выполнять еще один этап фиксации. После обработки 2,5% раствором глутарового альдегида в исследуемые образцы необходимо было добавлять раствор этанола с последовательно увеличивающимися концентрациями: 30, 50, 80 и 100%. Время инкубации в каждом растворе составляло 10 мин при 4°C.

Результаты исследования показали, что комбинация, состоящая из 2,5% раствора глутарового альдегида с последующим добавлением раствора эта-

нола в градиенте концентраций – 30, 50, 80 и 100%, способствовала укреплению мембран эритроцитов и не приводила к образованию астроцитоза, микро- и макроцитоза, а также пойкилоцитозу. Контуры клеток условно-патогенных микроорганизмов также выглядели четко, не размыто (рис. 2).

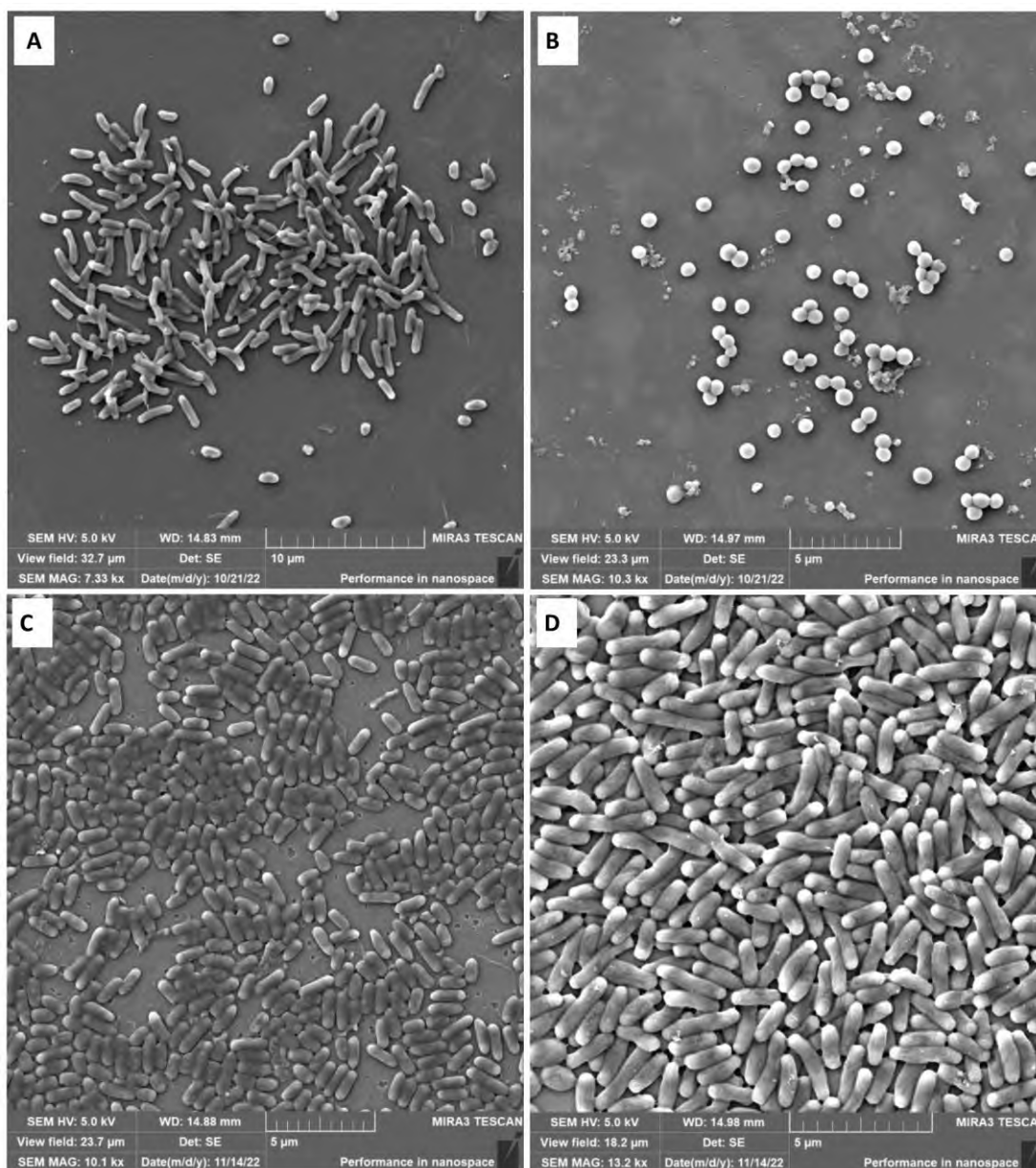


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия *Pseudomonas aeruginosa* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Klebsiella pneumoniae* (C, D).

Таким образом, при изучении морфологии эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов рекомендуется использовать 2,5% раствор глутарового альдегида в качестве основного фиксатора клеток с последующим добавлением раствора этанола с возрастающими концентрациями 30, 50, 80 и 100%.

Заклучение

В результате данного исследования был адаптирован протокол для работы со сканирующим электронным микроскопом, обеспечивающий наиболее эффективные этапы подготовки эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов, исключаяющий их лизис и деформацию мембраны. Качество получаемых СЭМ-изображений напрямую зависит от того, насколько качественно была выполнена пробоподготовка исследуемого материала. В дальнейшем этот протокол пробоподготовки может быть использован при изучении взаимодействия бактерий с эритроцитами человека.

(Автор выражает искреннюю признательность за техническую помощь в проведении исследований к.б.н. Игнатенко М.Е. Работа по получению СЭМ-изображений проведена на базе ЦКП образовательного Центра выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин», Оренбург).

ЛИТЕРАТУРА

1. Fischer E.R., Hansen B.T., Nair V., Hoyt F.H., Dorward D.W. Scanning electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol.* 2012. Chapter 2: Unit 2B.2. doi: 10.1002/9780471729259.mc02b02s25.
2. Laws R., Steel D.H., Rajan N. Research Techniques Made Simple: Volume Scanning Electron Microscopy. *J Invest Dermatol.* 2022. 142(2): 265-271.e1. doi: 10.1016/j.jid.2021.10.020
3. Kumar V., Bharti A., Gusain O., Bisht G.S. Scanning electron microscopy of *Streptomyces* without use of any chemical fixatives. *Scanning.* 2011. 33: 446-449.
4. Степанова А.А., Чилина Г.А., Баракаева Ф.Р. Сканирующая электронная микроскопия *Aspergillus Fumigatus Fres.* Проблемы медицинской микологии. 2018. Т.20. №4: 39-42.
5. Игнатенко М.Е. Методы подготовки водорослей к исследованию с использованием сканирующей электронной микроскопии. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2022. 2. 8с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2022-2/Articles/IME-2022-2.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2022-12003
6. Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А. Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии. Вестник Омского университета. 2013. №2: 129-132.

Поступила 23.12.2022 г.

(Контактная информация: Щуплова Елена Алексеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел.: 89328414616; E-mail: Khanina83@yandex.ru;

Гладышева Ирина Вячеславовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел.: 89619246693; E-mail: gladishewaiv@yandex.ru)

REFERENCES

1. Fischer E.R., Hansen B.T., Nair V., Hoyt F.H., Dorward D.W. Scanning electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol.* 2012. Chapter 2: Unit 2B.2. doi: 10.1002/9780471729259.mc02b02s25.
2. Laws R., Steel D.H., Rajan N. Research Techniques Made Simple: Volume Scanning Electron Microscopy. *J Invest Dermatol.* 2022. 142 (2): 265-271.e1. doi:

10.1016/j.jid.2021.10.020

3. Kumar V., Bharti A., Gusain O., Bisht G.S. Scanning electron microscopy of *Streptomyces* without use of any chemical fixatives. *Scanning*. 2011. 33: 446-449.
4. Stepanova A.A., Chilina G.A., Barakaeva F.R. Scanning electron microscopy of *Aspergillus Fumigatus* Fres. *Problems of medical mycology*. 2018. 20 (4): 39-42.
5. Ignatenko M.E. Methods of processing samples of algae for study by scanning electron *Bulletin of the Orenburg Scientific Center, UB RAS*. 2022. 4. 8s. [Electr. resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2022-2/Articles/IME-2022-2.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2022-12003
6. Lobov I.A., Davletkildeev N.A. Influence of the method of sample preparation on the morphofunctional characteristics of erythrocytes in the study by atomic force microscopy. *Bulletin of Omsk University*. 2013. 2: 129-132.

Образец ссылки на статью:

Щуплова Е.А., Гладышева И.В. Применение сканирующей электронной микроскопии для изучения морфологии эритроцитов и условно-патогенных микроорганизмов. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2022. 4: 7 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2022-4/Articles/EAS-2022-4.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2022-14005