

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 546

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 1/28 (2006.01)

B65D 85/42 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40099**
(22) Přihlášeno: **25.07.2022**
(47) Zapsáno: **14.11.2022**

- (73) Majitel:
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České
Budějovice, České Budějovice 2, CZ
- (72) Původce:
Ing. Jana Nebesářová, CSc., Hosín, CZ
Petra Masařová, České Budějovice, České
Budějovice 2, CZ
RNDr. Marie Vancová, Ph.D., Pištín, CZ
Mgr. Martina Tesařová, České Budějovice, České
Budějovice 2, CZ
- (74) Zástupce:
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Okružní
2824, 370 01 České Budějovice, České Budějovice
3

- (54) Název užitného vzoru:
**Souprava chemických činidel pro přípravu
biologických vzorků pro elektronovou
mikroskopii**

CZ 36546 U1

Souprava chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii

5 Oblast techniky

Technické řešení se týká oblasti zpracovávání biologických vzorků před jejich vyhodnocením pomocí elektronových mikroskopů, konkrétně soupravy chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii, jako je skenovací elektronová mikroskopie s fokusovaným svazkem iontů neboli FIB SEM, sériově bloková skenovací elektronová mikroskopie neboli SBF SEM nebo micro-array tomografie neboli MAT.

15 Dosavadní stav techniky

Řada metod biologické elektronové mikroskopie vyžaduje, aby odvodněný biologický materiál tvořící vzorek byl nakrájen buď do tenkých vrstev neboli ultratenkých řezů s tloušťkou do 100 nm pro transmisní elektronovou mikroskopii neboli TEM a skenovací transmisní elektronovou mikroskopii neboli STEM nebo aby byl postupně odkrajován/odprašován ve řezech/vrstvách s tloušťkou od 5 nm pro metody 3D skenovací elektronové mikroskopie neboli 3D SEM. Aby bylo možné řezů/vrstev těchto tlouštěk dosáhnout, musí být biologický vzorek složitě zpracováván a nakonec zpevněn zalitím do vhodné pryskyřice. Celý postup začíná nejčastěji chemickou fixací, následuje kontrastování pomocí sloučenin těžkých kovů, dehydratace, prosycení vzorku vhodnou pryskyřicí a končí polymerizací. V současné době existuje velké množství různých postupů, které vykazují tyto společné prvky:

Chemická fixace poskytuje stabilizaci odebraného vzorku a zamezení jeho degradace. Chemická fixace je založena na postupné reakci glutaraldehydu/formaldehydu a oxidu osmičelého s buněčnými komponentami. K odvodnění se používají nejčastěji organická rozpouštědla jako etanol či aceton. Těmi se postupně nahradí volná voda v biologickém preparátu. Dalším krokem je infiltrace preparátu vhodnou, nejčastěji epoxidovou pryskyřicí, rozpuštěnou v dehydratačním činidle. Po prosycení čistou pryskyřicí je vzorek umístěn do vhodné zalévací formy a polymerizován za zvýšené teploty.

Pro nové pokročilé metody biologické elektronové mikroskopie, k nimž patří i metody umožňující 3D rekonstrukci analyzovaného vzorku, se často používá k tvorbě obrazu signálu zpětně odražených elektronů neboli BSE zobrazení. Kontrast v tomto zobrazovacím módu závisí na přítomnosti atomů těžkých kovů, které je nutné do biologického materiálu přidat během procesu přípravy vzorků. Obecně jsou biologické vzorky tvořeny lehkými prvky, které nedostatečně rozptylují primární elektrony a následkem toho výsledný obraz vykazuje nízký kontrast. Za první kontrastující činidlo je považován oxid osmičelý, který se používá během fixace a který reaguje převážně s lipidy v buněčné ultrastruktuře. Pro metody využívající BSE zobrazení neposkytuje rutinní jednostupňové kontrastování oxidem osmičelým dostatečný kontrast. Proto se využívá opakovaných inkubací vzorku v roztoku oxidu osmičelého v kombinaci se sloučeninami zvyšujícími jeho depozit v buněčné ultrastruktuře. Takovými sloučeninami je například thiokarbohydrazid. Tyto postupy jsou označovány jako tzv. „OTO postupy“ (Seligman A. M. et al., A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide (TCH), J. Cell Biol, 1966, p. 424–432). Další sloučeninou je kyselina tannová, využívána k tzv. „OTAO postupu“ (Katsumoto T. et al., The effect of tannic acid on the preservation of tissue culture cells for scanning electron microscopy, J. El. Micro., 1981, p. 177–182). Navíc se během odvodnění vzorky kontrastují dalšími roztoky obsahujícími těžké kovy jako jsou uran nebo olovo, zejména pomocí Waltonova roztoku nebo roztoku octanu uranylu. Celkově zpracování vzorku při pokojové teplotě působením různých chemikálií, včetně zalití do vhodné pryskyřice a polymerizace trvá cca 5 pracovních dní. V další fázi přípravy je třeba zalitý vzorek opracovat do požadovaného tvaru.

Například pro sériovou blokovou skenovací elektronovou mikroskopii neboli SBF SEM se vzorek trimuje do podoby krychle o straně 400x400 µm, která se přilepí vhodným lepidlem k držáku preparátů. Celý povrch vzorku se pokryje dobře vodivou vrstvou kovu, aby se minimalizovalo možné nabíjení, které se u této metody často vyskytuje.

5

Nevýhodou těchto řešení je, že pro zpracování biologických vzorků pro výše zmíněné elektronové mikroskopie je třeba v laboratoři připravit řadu roztoků s definovaným složením, osmolaritou a pH. Navíc některé patří mezi speciální chemikálie, které mají často omezenou trvanlivost nebo jsou velmi jedovaté, jako např. oxid osmičelý nebo octan uranylu, což je problematické z hlediska manipulace a bezpečné likvidace nespotřebovaných nebo použitých roztoků.

10

Úkolem technického řešení je připravit soupravu chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii, která by umožňovala snadnou, rychlou a bezpečnou přípravu biologických vzorků při pokojové teplotě, a dále by vzorky připravené pomocí této soupravy chemických činidel splňovali výše zmíněné požadavky na vlastnosti biologických vzorků pro jejich pozorování technikami 3D skenovací elektronové mikroskopie neboli SEM a transmisní elektronové mikroskopie neboli TEM.

15

20 Podstata technického řešení

Vytčený úkol je vyřešen pomocí soupravy chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii, která zahrnuje alespoň po jednom z následujících činidel: fixační činidlo, promývací činidlo, dehydratační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium. Podstata technického řešení spočívá v tom, že alespoň fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium jsou v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití. Každé z činidel je v soupravě v uzavřeném balení v množství od 0,1 do 100 ml. Taková souprava chemických činidel pro přípravu biologických vzorků umožňuje snadnou, rychlou a bezpečnou přípravu biologických vzorků při pokojové teplotě, přičemž vzorky takto připravené splňují požadavky na vlastnosti biologických vzorků pro jejich pozorování technikami 3D skenovací elektronové mikroskopie neboli SEM a transmisní elektronové mikroskopie neboli TEM.

25

30

Fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium mohou být v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití, přičemž každé z činidel je v uzavřeném balení v množství od 0,1 do 0,5 ml. Takový objem je vhodný pro přípravu jednotlivých vzorků bez potřeby skladování přebytečných chemikálií.

35

Fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium mohou být v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití, přičemž každé z činidel je v uzavřeném balení v množství od 0,5 do 1,0 ml. Takový objem je vhodný pro přípravu dvou až pěti vzorků najednou a to bez potřeby dalšího skladování nepoužitých, přebytečných chemikálií. Další možností je použití takového objemu v případě, že je potřeba připravit dva až pět vzorků v průběhu několika týdnů v rámci trvanlivosti jednotlivých chemikálií.

40

45

Fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium mohou být v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití, přičemž každé z činidel je v uzavřeném balení v množství od 0,1 do 5,0 ml. Takový objem je vhodný pro přípravu maximálně 10 vzorků najednou a to bez potřeby dalšího skladování nepoužitých, přebytečných chemikálií. Další možností je použití takového objemu v případě, že je potřeba připravit 10 vzorků v průběhu několika týdnů v rámci trvanlivosti jednotlivých chemikálií.

50

Fixační činidlo může být vybráno ze skupiny: glutaraldehyd, formaldehyd, oxid osmičelý a/nebo jejich kombinace. Vybrané činidla jsou běžně používaná k fixaci biologických vzorků a s ohledem na jednotlivé popsání metody elektronové mikroskopie.

55

Inkubační činidlo může být vybráno ze skupiny: kyselina tannová, síran sodný, thiokarbohydrazid, pyrogallol, ferokyanid draselný, ferokyanid sodný a/nebo jejich kombinace. Tyto inkubační činidla jsou vybrány s ohledem na zvyšující efekt osmifikace vzorku díky jejich použití.

5

Kontrastující činidlo může být vybráno ze skupiny: citrát olovnatý, dusičnan olovnatý neboli Waltonův roztok, hexakynoželeznan sodný, hexakynoželeznan draselný, octany lanthanoidů, octan hafnia, kyselina fosfowolframová a/nebo jejich kombinace. Octany lanthanoidů mohou být vybrány ze skupiny: octan samaria, octan gadolinia, octan ytterbia, octan lutecia, octan neodymu a/nebo jejich kombinace. Kontrastující činidla jsou vybrána dle nejvyšších kontrastujících vlastností známých chemikálií a s ohledem na vybrané metody elektronové mikroskopie.

10

Zalévacím médiem může být epoxidová pryskyřice a/nebo metakrylátová pryskyřice. Tyto zalévací média jsou vybrána s ohledem na jejich dobré vlastnosti a manipulovatelnost za různých laboratorních podmínek. Pufrovacím činidlem používaným i k promývání může být roztok kakodylátu sodného.

15

Souprava dále může zahrnovat přídatnou látku promývacího nebo fixačního činidla vybranou ze skupiny: chlorid vápenatý, hydroxid sodný/draselný, glukóza, sacharóza a/nebo jejich kombinace. Tyto látky slouží k úpravě vlastností použitých roztoků, jako je například pH roztoku použitím hydroxidu sodného a/nebo hydroxidu draselného či jeho osmolarita použitím glukózy a/nebo sacharózy. Chlorid vápenatý dále zabraňuje poškození ultrastruktury mitochondrií.

20

Dehydratačním činidlem může být ethanol a/nebo aceton. Takové dehydratační činidla jsou lehce skladovatelné za obvyklých podmínek a v malých množstvích mají malou toxicitu pro člověka, který s nimi manipuluje.

25

Uzavřené balení může být tvořeno plastovou mikrozkumavkou nebo skleněnou špičkou. Mikrozkumavka je s výhodou opatřena kapátkem. Takové uzavřené balení poskytuje jednoduchou manipulaci při přípravě biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii i za běžných podmínek a laboratoře s omezeným vybavením.

30

Všechna chemická činidla v uzavřených baleních mohou být uspořádána ve společném přepravním obalu, kterým je s výhodou papírová nebo plastová krabice. Taková přepravná krabice zabezpečuje, že jsou všechny části soupravy bezpečně přepraveny k uživateli a že obsahuje všechny potřebné komponenty pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii.

35

Výhody soupravy chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii podle tohoto technického řešení spočívá v tom, že umožňuje snadnou, rychlou a bezpečnou přípravu biologických vzorků při pokojové teplotě. Dávky jednotlivých roztoků se pohybují v množství od 0,1 do 0,5 ml na přípravu jednoho vzorku o velikosti 1 až 2 mm³. Další výhodou soupravy chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii je, že jednotlivá chemická činidla jsou umístěna v plastových mikrozkumavkách s kapátkem, přičemž po jejich otevření se obsah lehce vymáčkne do reakční kapsle. Výjimkou je roztok oxidu osmičelého, jehož dávka je zatavena ve skleněné špičce. Po jejím odlomení je možné roztok nalít do reakční kapsle. Je tak vyloučen kontakt roztoku a par oxidu osmičelého s kůží a povrchem očí uživatele. Další výhodou soupravy chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii je nahrazení kontrastování vzorku roztokem octanu uranuly roztokem octanu neodymu.

45

50

Příklady uskutečnění technického řešení

V příkladech 1 až 4 je popsáno složení soupravy pro přípravu preparátů pro různé metody elektronové mikroskopie, které využívají zalití biologického materiálu do epoxidové pryskyřice.

55

V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění byl biologický materiál neboli vzorek zalitý do metakrylátové pryskyřice. Příklady uvádějí stručný popis protokolu, který byl použit v daném případě, složení soupravy a podrobný návod, odpovídající použitému protokolu. Mezi vybrané metody, kdy je možné soupravu pro přípravu biologického materiálu použít, patří 3D analýza ve vysokorozlišovacím skenovacím elektronovém mikroskopu neboli HRSEM pomocí odprašování tenkých vrstev fokusovaným svazkem iontů v komoře mikroskopu neboli FIB HRSEM. Dalším příkladem je použití přímého odkrajování ultratenkých řezů v preparátové komoře mikroskopu, přičemž tato metoda je známá jako sériově bloková skenovací elektronová mikroskopie neboli SBF SEM. Další aplikační možnosti je protokol pro 3D analýzu pomocí HRSEM za použití microarray tomografie neboli MAT SEM. Poslední protokol je určen pro přípravu vzorku pro ultrastrukturální studie pomocí transmisní elektronové mikroskopie neboli TEM nebo skenovací transmisní elektronové mikroskopie STEM.

Důležitou součástí soupravy podle tohoto technického řešení je podrobný návod s přesnými pokyny, jak při přípravě vzorku postupovat. Složení sady může být modifikováno podle protokolu, který je vybrán pro přípravu daného preparátu. Souprava je připravena v různých variantách optimalizovaných pro jednotlivé aplikace.

Pro účely popisu příkladů uvedených v tomto technickém řešení je použita zkratka RT pro pokojovou teplotu, která je zpravidla určena v rozmezí od 20 do 22 °C. Dále pro účely popisu tohoto technického řešení je používán pojem dd voda, který popisuje redestilovanou vodu.

Příklad 1: Složení soupravy pro přípravu preparátu pro metodu FIB SEM podle protokolu OTOTO

V tomto případě byla souprava založena na modifikovaném Deerinckově protokolu, uvedeno v tabulce 1, zahrnujícím vícenásobnou inkubaci vzorku v oxidu osmičelém a thiokarbohydrazidu. Oproti původnímu protokolu byla fixace oxidem osmičelým a hexakvanoželeznanem draselným ve třetím kroku rozdělena do dvou po sobě následujících kroků, což zvýšilo hloubku penetrace osmičelých iontů do fixovaného materiálu. Radioaktivní octan uranilu byl nahrazen v tomto protokolu octanem neodymitým. Waltonův roztok byl vodný roztok obsahující dusičnan olovnatý, který fungoval taktéž jako kontrastující činidlo a přispíval ke zvýšení výsledného obrazového kontrastu vzorku v BSE zobrazení. Jako zalévací médium byla použita epoxidová pryskyřice, která vykazovala po vytvrnutí teplem dostatečnou tvrdost, aby mohla být odkrajována nebo odprašována v tenkých vrstvách v komoře HRSEM. Takto připravený protokol je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Protokol OTOTO

Krok	Úkon	Čas	Teplota
1	fixace 2% glutaraldehydu 0,1 M pufrém kakodylátu sodného	1-12 h	4 °C
2	promytí promývacím roztokem (4% glukóza v 0,1 M pufru kakodylátu sodného)	3x5 min	RT
3	inkubace 2% oxidem osmičelým ve vodě	30 min	RT
4	inkubace 1,5% ferokyanidem draselným ve vodě	30 min	RT
5	promytí dd voda	3x5 min	RT
6	inkubace 1% thiokarbohydrazidu ve vodě	20 min	RT
7	promytí dd voda	3x5 min	RT
8	inkubace 1% oxidem osmičelým ve vodě	30 min	RT
9	promytí dd voda	3x5 min	RT

40

10	inkubace 1% thiokarbohydrazidem ve vodě	20 min	RT
11	promytí dd voda	3x5 min	RT
12	inkubace 1% oxidem osmičelým ve vodě	30 min	RT
13	promytí dd voda	4x10 min	RT
14	inkubace 0,5% octanem neodýmítmým v dd vodě	přes noc	4
15	promytí dd voda	3x5 min	RT
16	inkubace s Waltonovým roztokem	2 hod	50
17	promytí dd voda	3x5 min	RT
18	dehydratace acetonovou řadou 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%	15 min	RT
19	infiltrace epoxidovou pryskyřicí s acetonem v poměru 1:2	60 min	RT
20	infiltrace epoxidovou pryskyřicí s acetonem v poměru 1:1	60 min	RT
21	infiltrace epoxidovou pryskyřicí s acetonem v poměru 2:1	60 min	RT
22	Čistá epoxidová pryskyřice	přes noc	
23	výměna za novou čistou epoxidovou pryskyřicí – do formiček/kapslí		
24	vytvrzení – polymerizace	48 hod	60

Složení soupravy:

- 5 Souprava pro přípravu jednoho preparátu byla složena ze souboru dávek chemických činidel ve vhodné koncentraci připravených k okamžitému použití pro fixaci, dehydrataci, infiltraci a zalití daného biologického vzorku, dále z návodu a příslušenství.

Dávky chemických roztoků a jejich označení:

- 10
- F1** fixace 2% glutaraldehyd v 0,1 M pufru kakodylátu sodného (1 dávka o objemu 1 ml),
- F2** 2% oxid osmičelý v redestilované vodě (3 dávky s 0,2 ml roztoku),
- 15 **F3** 1,5% feroxyanid draselný v redestilované vodě (1 dávka o objemu 1 ml),
- P1** 4% glukóza v 0,1 M pufru kakodylátu sodného (objem 3 ml),
- I1** 1% thiokarbohydrazid v redestilované vodě (objem 1 ml),
- 20 **K1** 0,5% octan neodýmítmým v redestilované vodě (objem 1 ml),
- K2** Waltonův roztok (objem 1 ml),
- 25 **D** 100% aceton (objem 10 ml),
- W** redestilovaná voda (objem 20 ml),
- R** zalévací médium bez katalyzátoru polymerizace,
- 30 **RK** katalyzátor polymerizace.

Nádoby na odpadní tekutiny:

- O1** odpad na redestilovanou vodu a vodné roztoky,
 5 **O2** odpad na organické rozpouštědla a zalévací médium.

Podrobný návod přípravy vzorku pomocí této soupravy podle protokolu OTOTO:

Krok 1: Fixace

10

Vzorek vložte do reakční kapsle označené **F1**, kde je fixační činidlo. Vzorek zde ponechejte minimálně 4 hodiny před dalším zpracováním při RT nebo 12 hodin pokud jej umístíte do lednice. Po uplynutí této doby byl použitý fixační činidlo odsajte a to pomocí plastové pipetky s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

15

Krok 2: Promytí

Vzorek postupně třikrát promyjte roztokem ze zkumavky s označením **P1**. Při každém promytí roztok o objemu cca 0,5 ml nakapejte pomocí kapátka, které nasadíte přímo na zkumavku po odstranění plastového uzávěru zkumavky **P1**. Promývací roztok nechte působit cca 5 min, potom jej z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

20

Krok 3: Post-fixace

25 Odломte špičku skleněné ampule s označením **F2** a roztok nakapejte ke vzorku. Reakční kapsli okamžitě uzavřete a nechte roztok působit 30 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok plastovou jednorázovou pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

30

Krok 4: Post-fixace

Do reakční nádoby ke vzorku přidejte roztok ze zkumavky označené **F3** a nechte jej působit opět 30 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok pipetou **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

35

Krok 5: Promytí

Vzorek postupně třikrát promyjte redestilovanou vodou z lahvičky s označením **W**. Použijte pro to plastovou mikropipetku s označením **W**. Nechte působit cca 5 min, potom promývací roztok z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

40

Krok 6: Inkubace

45 Ke vzorku přidejte polovina objemu inkubačního roztoku ze zkumavky **I1** na 20 minut při pokojové teplotě, a potom roztok odsajte pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**.

Krok 7: Promytí

50 Vzorek promyjte 3x redestilovanou vodou v objemu 0,5 ml, kterou přenesete pomocí plastové pipety s označením **W** z lahvičky s označením **W**. Promývací roztok nechte působit po dobu 5 minut a přebytek roztoku odsajte pipetou **O1** a přeneste do odpadní nádoby **O1**.

Krok 8: Post-fixace

5 Odlomte špičku druhé skleněné ampule s označením **F2** a roztok nakapejte ke vzorku. Reakční kapsli okamžitě uzavřete a nechte roztok působit 30 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok plastovou jednorázovou pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 9: Promytí

10 Opakujte krok 7.

Krok 10: Inkubace

15 Opakujte krok 6 s druhou polovinou roztoku **I1**.

Krok 11: Promytí

Opakujte krok 7.

20 Krok 12: Post-fixace

Opakujte krok 8 s třetí ampulí s označením **F2**.

Krok 13: Promytí

25

Opakujte krok 7.

Krok 14: Kontrastování 1

30 Ke vzorku přidejte dávku roztoku ze zkumavky s označením **K1** a nechte jej působit 12 hodin při teplotě lednice (4 °C). Potom přebytek roztoku odsajte pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**.

Krok 15: Promytí

35 Opakujte krok 7.

Krok 16: Kontrastování 2

40 Ke vzorku přidejte dávku roztoku ze zkumavky s označením **K2**. Reakční kapsli uzavřete a vložte do vodní lázně, tedy jiné větší nádoby s teplou vodou (cca 50 °C). Po 2 hodinách reakční kapsli z lázně vyjměte. Otevřete ji, odsajte přebytek roztoku pomocí pipety **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 17: Promytí

45

Opakujte krok 7. Po posledním promytí odsajte z reakční kapsle pouze polovinu promývacího roztoku.

Krok 18: Dehydratace

50

55 Ke zbývajícimu roztoku v reakční kapsli přidejte 0,2 ml 100% acetonu (**D**) ze zásobní lahvičky pomocí mikropipetky a lehce s reakční kapslí zatřepejte. Po 15 minutách odsajte polovinu roztoku z reakční kapsle pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**. Přidejte dalších 0,2 ml 100% acetonu (**D**). Vždy po 15 min tento postup dvakrát zopakujte. Potom odsajte veškerý dehydratační roztok pipetou **O2** do odpadní nádoby **O2** a ke vzorku přidejte mikropipetou 0,5 ml 100% acetonu

z nádoby **D**. Výměnu roztoků provádějte rychle tak, aby nedošlo k vyschnutí vzorku v reakční nádobce. Po 5 minutách čistý aceton v reakční nádobce vyměňte za čerstvý bezvodý aceton. Tento postup ještě jednou zopakujte, a použité roztoky slévejte do odpadní nádoby **O2**. Při poslední výměně opět odsajte pouze polovinu dehydratačního činidla.

5

Krok 19: Infiltrace

K roztoku v reakční kapsli přidejte první dávku epoxidové pryskyřice v objemu cca 0,2 ml ze zkumavky s označením **R** pomocí mikropipetky, lehce protřepete a nechte roztok na vzorek působit 1 hod při RT. Následně odsajte polovinu roztoku pipetou s označením **O2** do odpadní nádoby **O2**. Ke vzorku přidejte další dávku epoxidové pryskyřice ve stejném objemu a roztok opatrně promíchejte a opět ponechte působit 1 hod. Tento postup opakujte ještě jednou.

10

Krok 19: Zalévání

15

V poslední dávce čisté epoxidové pryskyřice o objemu 0,5 ml ponechte vzorek 24 hod v lednici při teplotě 4 °C. Potom pomocí párátko vzorek přeneste do zalévací formy vyplněné zčásti čistou epoxidovou pryskyřicí ze zkumavky **R**, do které byl předtím přidán obsah kapsle s označením **RK** a promíchán párátkem. Do zalévací formy pak přidejte ke vzorku štítek s označením a doplňte epoxidovou pryskyřicí tak, aby dutiny ploché formy nebo obsah kapsle byly plné.

20

Krok 20: Polymerizace

Vzorky zalité v epoxidové pryskyřici spolu s nádobkou **O2** umístěte do termostatu nastaveném na teplotu 60 °C a nechte je zde po dobu 48 hod.

25

Příslušenství soupravy:

Reakční nádobka, ve které probíhá reakce mezi zpracovávaným vzorkem a chemickými činidly, obsahuje fixační činidlo pro první krok zpracování vzorku a má označení **F1**. Dále souprava obsahuje plastové mikropipety, injekční stříkačky a jehly v potřebném množství a s příslušným označením k transportu chemických činidel do a z reakční nádoby, zalévací formičky nebo kapsle. Souprava dále obsahuje drobné nástroje k úpravě velikosti vzorku, krájecí podložku, štítky pro označení zalitého preparátu a ochranné pomůcky, např. respirátor, rukavice. Jednotlivá chemická činidla jsou v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozukumavkou, a dále oxid osmičelý je uložený v uzavřeném balení tvořeném skleněnou špičkou. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění jsou jednotlivá chemická činidla v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozukumavkou opatřenou kapátkem, přičemž oxid osmičelý je uložený v uzavřeném balení tvořeném skleněnou špičkou. Celá souprava chemických činidel je uspořádána ve společném přepravném obalu tvořeném plastovou krabicí. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění je společným přepravným obalem papírová krabice.

30

35

40

Příklad 2: Složení soupravy pro přípravu preparátu pro metodu SBF SEM podle protokolu TAO

45

Složení soupravy vycházelo z protokolu používajícího kyselinu tannovou jako inkubačního činidla, která zlepšila výslednou distribuci atomů těžkých kovů ve vzorku. Tento protokol se osvědčil pro přípravu větších preparátů s velikostí přesahující 0,5 mm. Využito bylo také rozdělení postfixace oxidem osmičelým a feroxyanidem sodným do dvou po sobě jdoucích kroků. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění byl použit feroxyanid draselný. Acetát uranylu byl nahrazen v prvním kontrastovacím kroku octanem neodymitým. V druhém kroku byl použit Waltonův roztok. Epoxidová pryskyřice typu Epon nebo Hard Plus byla použita jako zalévací médium. Takto připravený protokol je uveden v tabulce 2

50

Tabulka 2: Protokol TAO

Krok	Úkon	Čas	Teplota
1	fixace vzorku roztokem 2,5% glutaraldehydu v 0,15 M kakodylátu sodném (pH = 7,4)	4–12 hod	4 °C
2	promytí a úprava vzorku - 0,15 M kakodylátem sodným s 0,002 M chloridem vápenatým	3x5 min	RT
3	postfixace 2% oxid osmičelý v dd voda	1,5 hod	RT
4	postfixace 2,5% ferokyanidu sodného/draselného v dd voda	1,5 hod	RT
5	promytí dd voda	2x15 min	RT
6	inkubace 1% kyselinou tannovou v dd vodě	30 min	RT
7	promytí 1% vodný roztok síranu sodného	5 min	RT
8	inkubace 0,5% octanem neodymitým v dd vodě	12 hod	4 °C
9	promytí dd voda	2x15 min	RT
10	kontrastování Waltonovým roztokem	2 hod	50 °C
11	promytí dd voda	2x15 min	RT
12	dehydratace acetonovou řadou 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%	15 min	RT
13	infiltrace směsí epoxidové pryskyřice aceton 1:2	60 min	RT
14	infiltrace směsí epoxidové pryskyřice aceton 1:1	60 min	RT
15	infiltrace směsí epoxidové pryskyřice aceton 2:1	60 min	RT
16	čistá epoxidová pryskyřice	přes noc	
17	výměna za novou čistou epoxidovou pryskyřici – do formiček/kapslí		
18	vytvrzení – polymerizace	48 hod	60 °C

5 Složení soupravy:

Souprava pro přípravu jednoho preparátu nebo více preparátů byla složena ze souboru příslušných dávek chemických činidel ve vhodné koncentraci připravených k okamžitému použití pro fixaci, dehydrataci, infiltraci a zalití daného biologického vzorku, dále z návodu a příslušenství.

10

Dávky chemických roztoků a jejich označení:

- F1** fixace 2% glutaraldehyd v 0,15 M pufru kakodylátu sodného (1 dávka o obj. 1 ml),
- F2** 2% oxid osmičelý v redestilované vodě (1 dávka o objemu 0,2 ml roztoku),
- F3** 2,5% ferokyanid draselný ve vodě (1 dávka o objemu 1 ml),
- P1** 0,15 M pufru kakodylátu sodného s přídatkem chloridu vápenatého o koncentraci 0,002 M (objem 3 ml),
- I1** 1% kyselina tanová (LMW Galloylglucose) v redestilované vodě (objem 1 ml),
- I2** 1% vodný roztok síranu sodného
- K1** 0,5% octan neodymitý v redestilované vodě (objem 1 ml),
- K2** Waltonův roztok (objem 1 ml),
- D** 100% aceton (objem 10 ml),

30

W redestilovaná voda (objem 10 ml),

R zalévací médium bez katalyzátoru polymerizace,

5 **RK** katalyzátor polymerizace.

Nádobky na odpadní tekutiny:

10 **O1** odpad na redestilovanou vodu a vodné roztoky,

O2 odpad na organické rozpouštědla a zalévací médium.

Podrobný návod přípravy vzorku pomocí této soupravy podle protokolu TAO

15 Krok 1: Fixace

Vzorek vložte do reakční zkumavky označené **F1**, kde je fixační činidlo. Vzorek zde ponechejte minimálně 4 hodiny před dalším zpracováním při RT nebo 12 hodin pokud jej umístíte do lednice. Po uplynutí této doby fixační činidlo odsajte a to pomocí plastové pipetky s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 2: Promytí

25 Vzorek postupně třikrát promyjte roztokem ze zkumavky s označením **P1**. Při každém promytí roztok o objemu cca 0,5 ml nakapejte pomocí kapátka, které nasadíte přímo na zkumavku **P1** po odstranění plastového uzávěru. Promývací roztok nechte působit cca 5 min, potom jej z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 3: Post-fixace

30 Odlomte špičku skleněné ampule s označením **F2** a roztok nakapejte ke vzorku. Reakční kapsli okamžitě uzavřete a nechte roztok působit 90 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok plastovou jednorázovou pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 4: Post-fixace

40 Do reakční nádoby ke vzorku přidejte roztok ze zkumavky označené **F3** a nechte jej působit opět 90 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok pipetou **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 5: Promytí

45 Vzorek postupně dvakrát promyjte redestilovanou vodou z lahvičky s označením **W**. Použijte pro to plastovou mikropipetku s označením **W**. Nechte působit cca 15 min, potom promývací roztok z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 6: Inkubace

50 Do reakční zkumavky nakapejte dávku roztoku ze zkumavky **I1** a nechte působit 30 minut při pokojové teplotě. Potom roztok odsajte pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**.

Krok 7: Promytí

Ke vzorku přidejte roztok z mikrozkušavky s označením **I2**. Po 5 minutách působení roztok odeberte pipetou **O1** a přeneste do odpadní nádoby **O1**.

5

Krok 8: Kontrastování 1

Ke vzorku přidejte dávku roztoku ze zkumavky s označením **K1** a nechejte jej působit 12 hodin při teplotě lednice (4 °C). Potom přebytek roztoku odsajte pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**.

10

Krok 9: Promytí

Opakujte krok 5.

15 Krok 10: Kontrastování 2

Ke vzorku přidejte dávku roztoku ze zkumavky s označením **K2**. Reakční kapsli uzavřete a vložte do vodní lázně, tedy jiné větší nádoby s teplou vodou (cca 50 °C). Po 2 hodinách reakční kapsli z lázně vyjměte. Otevřete ji, odsajte přebytek roztoku pomocí pipety **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

20

Krok 11: Promytí

Opakujte krok 5. Po druhém promytí odsajte z reakční kapsle pouze polovinu promývacího roztoku.

25

Krok 12: Dehydratace

Ke zbývajícimu roztoku v reakční kapsli přidejte 0,2 ml 100% acetonu (**D**) ze zásobní lahvičky pomocí mikropipetky a lehce s reakční kapslí zatřepejte. Po 15 minutách odsajte polovinu roztoku z reakční kapsle pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**. Přidejte dalších 0,2 ml 100% acetonu (**D**). Vždy po 15 min tento postup dvakrát zopakujte. Potom odsajte veškerý dehydratační roztok pipetou **O2** do odpadní nádoby **O2** a ke vzorku přidejte mikropipetou 0,5 ml 100% acetonu z nádoby **D**. Výměnu roztoků provádějte rychle tak, aby nedošlo k vyschnutí vzorku v reakční nádobce. Po 5 minutách čistý aceton v reakční nádobce vyměňte za čerstvý bezvodý aceton. Tento postup ještě jednou zopakujte, a použité roztoky slévejte do odpadní nádoby **O2**. Při poslední výměně opět odsajte pouze polovinu dehydratačního činidla.

30

35

Krok 13: Infiltrace

K roztoku v reakční kapsli přidejte první dávku epoxidové pryskyřice v objemu cca 0,2 ml ze zkumavky s označením **R** pomocí mikropipetky, lehce protřepte a nechte roztok na vzorek působit 1 hod při RT. Následně odsajte polovinu roztoku pipetou s označením **O2** do odpadní nádoby **O2**. Ke vzorku přidejte další dávku epoxidové pryskyřice ve stejném objemu a roztok opatrně promíchejte a opět ponechte působit 1 hod. Tento postup opakujte ještě jednou.

40

45

Krok 14: Zalévání

V poslední dávce čisté epoxidové pryskyřice o objemu 0,5 ml ponechte vzorek 24 hod v lednici při teplotě 4 °C. Potom pomocí párátko vzorek přeneste do zalévací formy vyplněné zčásti čistou epoxidovou pryskyřicí ze zkumavky **R**, do které byl předtím přidán obsah kapsle s označením **RK** a promíchán párátkem. Do zalévací formy pak přidejte ke vzorku štítek s označením a doplňte epoxidovou pryskyřicí tak, aby dutiny ploché formy nebo obsah kapsle byly plné.

50

Krok 15: Polymerizace

Vzorky zalité v epoxidové pryskyřici spolu s nádobkou **O2** umístěte do termostatu nastaveném na teplotu 60 °C a nechte je zde po dobu 48 hod.

5

Příslušenství soupravy

Reakční nádoba, ve které probíhá reakce mezi zpracovávaným vzorkem a chemickými činidly, obsahuje fixační činidlo pro první krok zpracování vzorku a má označení **F1**. Dále souprava obsahuje plastové mikropipety, injekční stříkačky a jehly v potřebném množství a s příslušným označením k transportu chemických činidel do a z reakční nádoby, zalévací formičky nebo držák pro daný typ SEM v případě použití metody zalití s minimálním množstvím epoxidové pryskyřice. Souprava dále obsahuje drobné nástroje k úpravě velikosti vzorku, krájecí podložku, štítky pro označení zalitého preparátu a ochranné pomůcky, např. respirátor, rukavice. Jednotlivá chemická činidla jsou v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozkuřavkou, a dále oxid osmičelý je uložen v uzavřeném balení tvořeném skleněnou špičkou. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění jsou jednotlivá chemická činidla v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozkuřavkou opatřenou kapátkem, přičemž oxid osmičelý je uložen v uzavřeném balení tvořeném skleněnou špičkou. Celá souprava chemických činidel je uspořádána ve společném přepravném obalu tvořeném plastovou krabicí. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění je společným přepravným obalem papírová krabice.

10

15

20

Příklad 3: Složení soupravy pro přípravu preparátu pro metodu MAT neboli microarray tomografie podle protokolu HUA

25

Tento protokol byl modifikovanou verzí protokolu, který byl poprvé publikován skupinou Hua et al. Byl založen stejně jako v případě OTOTO protokolu na vícenásobné inkubaci vzorku v roztoku oxidu osmičelého a thiokarbohydrazidu. Postfixace oxidem osmičelým a feroxyanidem draselným byla rozdělena do dvou kroků, aby se zvýšila hloubka penetrace osmičelých iontů do fixovaného materiálu. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění byl použit feroxyanid sodný. Fixační činidla obsahující aldehydy byly pufrovány a následný promývací roztok obsahoval přídavek chloridu vápenatého k ochraně mitochondrií při fixaci oxidem osmičelým. Acetát uranylu byl nahrazen v prvním kontrastovacím kroku octanem neodymitým, v druhém kroku byl použit Waltonův roztok. Epoxidová pryskyřice typu Epon nebo Hard Plus byla použita jako zalévací médium. Takto připravený protokol je uveden v tabulce 3.

30

35

Tabulka 3: Protokol HUA.

Krok	Úkon	Čas	Teplota
1	fixace vzorku roztokem 2,5% glutaraldehydu v 0,15 M kakodylátu sodném (pH = 7,4)	12 hod	4 °C
2	promytí a úprava vzorku - 0,15 M kakodylátu sodným s 0,002 M chloridem vápenatým	3x5 min	RT
3	postfixace 2% oxid osmičelý v dd voda	1,5 hod	RT
4	postfixace 2,5% feroxyanidu sodného/draselného v dd voda	1,5 hod	RT
5	promytí dd voda	2x15 min	RT
6	inkubace 1% thiokarbohydrazinem	45 min	40

40

7	promytí dd voda	2x15 min	RT
8	postfixace 2% oxid osmičelý v dd voda	1,5 hod	RT
9	promytí dd voda	2x15 min	RT
10	kontrastování 1% octanem neodymitým v dd vodě	12 hod 2 hod	4 °C/ 50 °C
11	promytí dd voda	2x15 min	RT
12	kontrastování Waltonovým roztokem	2 hod	50
13	promytí dd voda	2x15 min	RT
14	dehydratace acetonovou řadou 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%	15 min	RT
15	infiltrace směsí epoxidová pryskyřice aceton 1:2	60 min	RT
16	infiltrace směsí epoxidová pryskyřice aceton 1:1	60 min	RT
17	infiltrace směsí epoxidová pryskyřice aceton 2:1	60 min	RT
18	čistá epoxidová pryskyřice	přes noc	
19	výměna za novou čistou epoxidovou pryskyřici – do formiček/kapslí		
20	vytvření – polymerizace	48 hod	60 °C

Složení soupravy:

- 5 Souprava pro přípravu jednoho preparátu se skládá ze souboru chemických činidel ve vhodné koncentraci a dávce připravených k okamžitému použití pro fixaci, dehydrataci, infiltraci a zalití daného biologického vzorku, dále z návodu a příslušenství.

Dávky chemických roztoků a jejich označení:

- 10
- F1** fixace 2% glutaraldehyd v 0,15 M pufru kakodylátu sodného (1 dávka o obj. 1 ml),
- F2** 2% oxid osmičelý v redestilované vodě (2 dávky, každá o objemu 0,2 ml roztoku),
- 15 **F3** 2,5% feroxyanid draselný ve vodě (1 dávka o objemu 0,5 ml),
- P1** 0,15 M pufru kakodylátu sodného s přídatkem chloridu vápenatého v koncentraci 0,002 M (objem 3 ml),
- 20 **I1** 1% thiokarbohydrazid v redestilované vodě (objem 1 ml),
- K1** 0,5% octan neodymitý v redestilované vodě (objem 0,5 ml),
- K2** Walton roztok (objem 1 ml),
- 25 **D** 100% aceton (objem 10 ml),
- W** redestilovaná voda (objem 20 ml),
- 30 **R** zalévací médium bez katalyzátoru polymerizace,
- RK** katalyzátor polymerizace.

Nádobky na odpadní tekutiny:

- O1** odpad na redestilovanou vodu a vodné roztoky,
 5 **O2** odpad na organické rozpouštědla a zalévací médium.

Podrobný návod přípravy vzorku při použití této soupravy:

Krok 1: Fixace

10

Vzorek vložte do reakční zkumavky označené **F1**, kde je fixační činidlo. Vzorek zde ponechejte minimálně 4 hodiny před dalším zpracováním při RT nebo 12 hodin pokud jej umístíte do lednice. Po uplynutí této doby fixační činidlo odsajte a to pomocí plastové pipetky s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

15

Krok 2: Promytí

Vzorek postupně třikrát promyjte roztokem ze zkumavky s označením **P1**. Při každém promytí roztok o objemu cca 0,5 ml nakapejte pomocí kapátka, které nasadíte přímo na zkumavku **P1** po odstranění plastového uzávěru. Promývací roztok nechte působit cca 5 min, potom jej z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

20

Krok 3: Post-fixace

25 Odломte špičku skleněné ampule s označením **F2** a roztok nakapejte ke vzorku. Reakční kapsli okamžitě uzavřete a nechte roztok působit 90 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok plastovou jednorázovou pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

30

Krok 4: Post-fixace

Do reakční nádoby ke vzorku přidejte roztok ze zkumavky označené **F3** a nechte jej působit opět 90 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok pipetou **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

35

Krok 5: Promytí

Vzorek postupně dvakrát promyjte redestilovanou vodou z lahvičky s označením **W**. Použijte pro to plastovou mikropipetku s označením **W**. Nechte působit cca 15 min, potom promývací roztok z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

40

Krok 6: Inkubace

45 Do reakční zkumavky nakapejte dávku roztoku ze zkumavky **I1**. Reakční zkumavku uzavřete a vložte na 45 minut do vodní lázně – větší nádoby s teplou vodou (cca 40 °C). Potom reakční nádobu otevřete a roztok odsajte pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**.

Krok 7: Promytí

50 Opakujte krok 5.

Krok 8: Post-fixace:

55 Odломte špičku druhé skleněné ampule s označením **F2** a roztok nakapejte ke vzorku. Reakční kapsli okamžitě uzavřete a nechte roztok působit 90 minut při RT. Po uplynutí této doby odsajte

přebytečný roztok plastovou jednorázovou pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 7: Promytí

5

Opakujte krok 5.

Krok 8: Kontrastování 1

10 Ke vzorku přidejte dávku roztoku ze zkumavky s označením **K1** a nechejte jej působit 12 hodin při teplotě lednice (4 °C). Potom přebytek roztoku odsajte pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**.

Krok 9: Promytí

15 Opakujte krok 5.

Krok 10: Kontrastování 2

20 Ke vzorku přidejte dávku roztoku ze zkumavky s označením **K2**. Reakční kapsli uzavřete a vložte do vodní lázně, tedy jiné větší nádoby s teplou vodou (cca 50 °C). Po 2 hodinách reakční kapsli z lázně vyjměte. Otevřete ji, odsajte přebytek roztoku pomocí pipety **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 11: Promytí

25

Opakujte krok 5. Po druhém promytí odsajte z reakční kapsle pouze polovinu promývacího roztoku.

Krok 12: Dehydratace

30

Ke zbývajícimu roztoku v reakční kapsli přidejte 0,2 ml 100% acetonu (**D**) ze zásobní lahvičky pomocí mikropipetky a lehce s reakční kapslí zatřepejte. Po 15 minutách odsajte polovinu roztoku z reakční kapsle pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**. Přidejte dalších 0,2 ml 100% acetonu (**D**). Vždy po 15 min tento postup dvakrát zopakujte. Potom odsajte veškerý dehydratační roztok pipetou **O2** do odpadní nádoby **O2** a ke vzorku přidejte mikropipetou 0,5 ml 100% acetonu z nádoby **D**. Výměnu roztoků provádějte rychle tak, aby nedošlo k vyschnutí vzorku v reakční nádobce. Po 5 minutách čistý aceton v reakční nádobce vyměňte za čerstvý bezvodý aceton. Tento postup ještě jednou zopakujte, a použité roztoky slévejte do odpadní nádoby **O2**. Při poslední výměně opět odsajte pouze polovinu dehydratačního činidla.

40

Krok 13: Infiltrace

45 K roztoku v reakční kapsli přidejte první dávku epoxidové pryskyřice v objemu cca 0,2 ml ze zkumavky s označením **R** pomocí mikropipetky, lehce protřepte a nechte roztok na vzorek působit 1 hod při RT. Následně odsajte polovinu roztoku pipetou s označením **O2** do odpadní nádoby **O2**. Ke vzorku přidejte další dávku epoxidové pryskyřice ve stejném objemu a roztok opatrně promíchejte a opět ponechte působit 1 hod. Tento postup opakujte ještě jednou.

Krok 14: Zalévání

50

V poslední dávce čisté epoxidové pryskyřice o objemu 0,5 ml ponechte vzorek 24 hod v lednici při teplotě 4 °C. Potom pomocí párátko vzorek přeneste do zalévací formy vyplněné zčásti čistou epoxidovou pryskyřicí ze zkumavky **R**, do které byl předtím přidán obsah kapsle s označením **RK** a promíchán párátkem. Do zalévací formy pak přidejte ke vzorku štítek s označením a doplňte epoxidovou pryskyřicí tak, aby dutiny ploché formy nebo obsah kapsle byly plné.

55

Krok 15: Polymerizace

5 Vzorky zalité v epoxidové pryskyřici spolu s nádobkou **O2** umístěte do termostatu nastaveném na teplotu 60 °C a nechte je zde po dobu 48 hod.

Příslušenství soupravy

10 Reakční nádoba, ve které probíhá reakce mezi zpracovávaným vzorkem a chemickými činidly, obsahuje fixační činidlo pro první krok zpracování vzorku a má označení **F1**. Dále souprava obsahuje plastové mikropipety, injekční stříkačky a jehly v potřebném množství a s příslušným označením k transportu chemických činidel do a z reakční nádoby, zalévací formičky nebo kapsle. Souprava dále obsahuje drobné nástroje k úpravě velikosti vzorku, krájecí podložku, štítky pro
15 označení zalitého preparátu a ochranné pomůcky, např. respirátor, rukavice. Jednotlivá chemická činidla jsou v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozkrumavkou, a dále oxid osmičelý je uložený v uzavřeném balení tvořeném skleněnou špičkou. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění jsou jednotlivá chemická činidla v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozkrumavkou opatřenou kapátkem, přičemž oxid osmičelý je uložený
20 v uzavřeném balení tvořeném skleněnou špičkou. Celá souprava chemických činidel je uspořádána ve společném přepravném obalu tvořeném plastovou krabicí. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění je společným přepravným obalem papírová krabice.

25 **Příklad 4: Protokol vhodný pro přípravu vzorků pro transmisní elektronový mikroskop neboli TEM nebo skenovací elektronový mikroskop pracující v transmisním modu neboli STEM**

30 Složení soupravy vychází z rutinního protokolu používaného pro zalévání živočišných nebo rostlinných tkání, buněčných suspenzí malých organismů apod, a pro ultrastrukturální studie. Kontrastování bylo prováděno na ultratenkých řezech. V jiných nezobrazených příkladech uskutečnění byl do protokolu zařazen kontrastovací krok pomocí vodných roztoků solí olova či lanthanoidů. Základní protokol je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: Protokol TEM.

Krok	Úkon	Čas	Teplota
1	fixace vzorku roztokem 2,5% glutaraldehydu v 0,15 M pufru kakodylátu sodného	4–12 hod	RT
2	promytí promývacím roztokem (4% glukóza v 0,1 M pufru kakodylátu sodného)	3x15 min	RT
3	Inkubace 1:1 pufr kakodylátu sodného + oxid osmičelý	3-4 hod (rostlinný vz.) 2 hod (živočišný vz.)	RT
4	promytí promývacím roztokem (4% glukóza v 0,1 M pufru kakodylátu sodného)	3x15 min	RT
5	dehydratace acetonovou řadou 30 % aceton	15 min	RT
6	dehydratace acetonovou řadou 50 % aceton	15 min	RT
7	dehydratace acetonovou řadou 70 % aceton	15 min	RT
8	dehydratace acetonovou řadou 80 % aceton	15 min	RT
9	dehydratace acetonovou řadou 90 % aceton	15 min	RT
10	dehydratace acetonovou řadou 95 % aceton	15 min	RT
11	dehydratace acetonovou řadou 100 % aceton	15 min	RT
12	převedení do epoxidové pryskyřice, 1:2 epoxidová pryskyřice: aceton	60 min	RT
13	převedení do epoxidové pryskyřice, 1:1 epoxidová pryskyřice: aceton	60 min	RT

35

14	převedení do epoxidové pryskyřice, 2:1 epoxidová pryskyřice: aceton	60 min	RT
15	čistá epoxidová pryskyřice	24 hod	RT
16	zalití do formiček/kapslí – vytvrzení	48 hod	60

Složení soupravy:

- 5 Souprava pro přípravu jednoho preparátu se skládala ze souboru chemických činidel v dávkách pro zpracování jednoho či více vzorků s vhodnou koncentrací připravených k okamžitému použití pro fixaci, dehydrataci, infiltraci a zalití daného biologického vzorku, dále z návodu a příslušenství.

Dávky chemických roztoků a jejich označení:

- 10 **F1** fixace 2% glutaraldehyd v 0,15 M pufru kakodylátu sodného (1 dávka o obj. 1 ml),
- F2** 4% oxid osmičelý v redestilované vodě (0,2 ml roztoku),
- 15 **P1** 4% glukóza v 0,1 M pufru kakodylátu sodného (objem 6 ml),
- D** 100% aceton (objem 10 ml),
- W** redestilovaná voda (objem 20 ml),
- 20 **R** zalévací médium bez katalyzátoru polymerizace,
- RK** katalyzátor polymerizace.

25 Nádobky na odpadní tekutiny:

- O1** odpad na redestilovanou vodu a vodné roztoky,
- O2** odpad na organické rozpouštědla a zalévací médium.

30

Podrobný návod přípravy vzorku pomocí této soupravy podle protokolu TEM:

Krok 1: Fixace

- 35 Vzorek vložte do reakční kapsle označené **F1**, kde je fixační činidlo. Vzorek zde ponechejte minimálně 4 hodiny před dalším zpracováním při RT nebo 12 hodin pokud jej umístíte do lednice. Po uplynutí této doby byl použitý fixační činidlo odsajte a to pomocí plastové pipetky s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

40 Krok 2: Promytí

- Vzorek postupně třikrát promyjte roztokem ze zkumavky s označením **P1**. Při každém promytí roztok o objemu cca 0,5 ml nakapejte pomocí kapátka, které nasadíte přímo na zkumavku po odstranění plastového uzávěru zkumavky **P1**. Promývací roztok nechte působit cca 15 min, potom jej z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**. V posledním kroku promývání odsajte pouze polovinu roztoku z reakční kapsle.

Krok 3: Post-fixace

- 50 Odlomte špičku skleněné ampule s označením **F2** a roztok přidejte do zbytku promývacího roztoku v reakční zkumavce. Reakční kapsli okamžitě uzavřete a nechte roztok působit 3 až 4 hodiny

v případě zpracování rostlinného materiálu při RT nebo 2 hodiny při zpracování živočišného materiálu při RT. Po uplynutí této doby odsajte přebytečný roztok plastovou jednorázovou pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

5 Krok 4: Promytí

Vzorek postupně třikrát promyjte roztokem ze zkumavky s označením **P1**. Při každém promytí roztok o objemu cca 0,5 ml nakapejte pomocí kapátka, které nasadíte přímo na zkumavku po odstranění plastového uzávěru zkumavky **P1**. Promývací roztok nechte působit cca 15 min, potom jej z reakční nádoby odsajte pipetou s označením **O1** a přeneste jej do odpadní nádoby **O1**.

Krok 5: Dehydratace

Ke zbývajícimu roztoku v reakční kapsli přidejte 0,2 ml 100% acetonu (**D**) ze zásobní lahvičky pomocí mikropipetky a lehce s reakční kapslí zatřepejte. Po 15 minutách odsajte polovinu roztoku z reakční kapsle pipetou **O1** do odpadní nádoby **O1**. Přidejte dalších 0,2 ml 100% acetonu (**D**). Vždy po 15 min tento postup dvakrát zopakujte. Potom odsajte veškerý dehydratační roztok pipetou **O2** do odpadní nádoby **O2** a ke vzorku přidejte mikropipetou 0,5 ml 100% acetonu z nádoby **D**. Výměnu roztoků provádějte rychle tak, aby nedošlo k vyschnutí vzorku v reakční nádobce. Po 5 minutách čistý aceton v reakční nádobce vyměňte za čerstvý bezvodý aceton. Tento postup ještě jednou zopakujte, a použité roztoky slévejte do odpadní nádoby **O2**. Při poslední výměně opět odsajte pouze polovinu dehydratačního činidla.

Krok 6: Infiltrace

K roztoku v reakční kapsli přidejte první dávku epoxidové pryskyřice v objemu cca 0,2 ml ze zkumavky s označením **R** pomocí mikropipetky, lehce protřepte a nechte roztok na vzorek působit 1 hod při RT. Následně odsajte polovinu roztoku pipetou s označením **O2** do odpadní nádoby **O2**. Ke vzorku přidejte další dávku epoxidové pryskyřice ve stejném objemu a roztok opatrně promíchejte a opět ponechte působit 1 hod. Tento postup opakujte ještě jednou.

Krok 7: Zalévání

V poslední dávce čisté epoxidové pryskyřice o objemu 0,5 ml ponechte vzorek 24 hod v lednici při teplotě 4 °C. Potom pomocí párátka vzorek přeneste do zalévací formy vyplněné zčásti čistou epoxidovou pryskyřicí ze zkumavky **R**, do které byl předtím přidán obsah kapsle s označením **RK** a promíchán párátkem. Do zalévací formy pak přidejte ke vzorku štítek s označením a doplňte epoxidovou pryskyřicí tak, aby dutiny ploché formy nebo obsah kapsle byly plné.

40 Krok 8: Polymerizace

Vzorky zalité v epoxidové pryskyřici spolu s nádobkou **O2** umístěte do termostatu nastaveném na teplotu 60 °C a nechte je zde po dobu 48 hod.

45 **Příslušenství soupravy:**

Reakční nádobka, ve které probíhá reakce mezi zpracovávaným vzorkem a chemickými činidly, obsahuje fixační činidlo pro první krok zpracování vzorku a má označení **F1**. Dále souprava obsahuje plastové mikropipety, injekční stříkačky a jehly v potřebném množství a s příslušným označením k transportu chemických činidel do a z reakční nádoby, zalévací formičky nebo kapsle. Souprava dále obsahuje drobné nástroje k úpravě velikosti vzorku, krájecí podložku, štítky pro označení zalitého preparátu a ochranné pomůcky, např. respirátor, rukavice. Jednotlivá chemická činidla jsou v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozukmavkou. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění jsou jednotlivá chemická činidla v soupravě uložena v uzavřeném balení tvořeném plastovou mikrozukmavkou opatřenou kapátkem. Celá souprava

chemických činidel je uspořádaná ve společném přepravném obalu tvořeném plastovou krabicí. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění je společným přepravným obalem papírová krabice.

5 **Příklad 5: Další modifikace popsaných složení soupravy chemických činidel dle protokolů OTOTO, TAO, HUA, TEM**

10 Vybrané protokoly byly dále použity v jiných nezobrazených příkladech uskutečnění, kde bylo vybráno jiné fixační činidlo a to formaldehyd, nebo kombinace formaldehydu, oxidu osmičelého a/nebo glutaraldehydu. Dále bylo v jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění použito inkubační činidlo pyrogallol, kyselina tannová, síran sodný, thiokarbohydrazid a/nebo jejich kombinace. Jako kontrastující činidlo bylo použito v jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění citrát olovnatý, hexakvanoželeznatan sodný, octan samaria, octan gadolinia, octan ytterbia, octan lutecia, octan neodymu a/nebo octan hafnia, kyselina fosfowolframová a/nebo jejich kombinace.

15 V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění bylo promývací nebo fixační činidlo dále opatřeno přídatní látkou vybranou ze skupiny: sacharóza a/nebo její kombinace s chloridem vápenatým a/nebo glukózou. V jiném nezobrazeném příkladu uskutečnění bylo dále jako dehydratační činidlo použitý ethanol. V těchto nezobrazených příkladech uskutečnění bylo použito každé z činidel v uzavřeném balení v množství od 0,1 do 100 ml.

20

Průmyslová využitelnost

25 Soupravu chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii, které je nutné zalévat do epoxidové pryskyřice nebo metakrylátové pryskyřice před jejich vizualizací pomocí elektronové mikroskopie lze podle tohoto technického řešení využít k přípravě biologických vzorků ve výzkumných laboratořích a výzkumných institucích v oblasti biologie a biomedicíny.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Souprava chemických činidel pro přípravu biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii, zahrnující alespoň po jednom z následujících činidel: fixační činidlo, promývací činidlo, dehydratační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo, a zalévací médium, **vyznačující se tím**, že alespoň fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium jsou v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití, přičemž každé z činidel je v uzavřeném balení v množství od 0,1 do 100 ml.
- 10 2. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že alespoň fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium jsou v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití, přičemž každé z činidel je v uzavřeném balení v množství od 0,1 do 0,5 ml.
- 15 3. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že alespoň fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium jsou v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití, přičemž každé z činidel je v uzavřeném balení v množství od 0,5 do 1,0 ml.
- 20 4. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že alespoň fixační činidlo, inkubační činidlo, kontrastující činidlo a zalévací médium jsou v soupravě uspořádané v oddělených a uzavřených baleních pro jednorázové nebo opakované použití, přičemž každé z činidel je v uzavřeném balení v množství od 0,1 do 5,0 ml.
5. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že fixační činidlo je vybráno ze skupiny: glutaraldehyd, formaldehyd, oxid osmičelý a/nebo jejich kombinace.
- 25 6. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že inkubační činidlo je vybráno ze skupiny: kyselina tannová, síran sodný, thiokarbohydrazid, pyrogallol, feroxyanid draselný, feroxyanid sodný a/nebo jejich kombinace.
7. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kontrastující činidlo je vybráno ze skupiny: citrát olovnatý, dusičnan olovnatý, hexakynoželeznatán sodný, hexakynoželeznatán draselný, octan samaria, octan gadolinia, octan ytterbia, octan lutecia, octan neodymu a octan hafnia, kyselina fosfowolframová a/nebo jejich kombinace.
- 30 8. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zalévacím médiem je epoxidová pryskyřice a/nebo metakrylátová pryskyřice.
9. Souprava podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že fixační činidlo a/nebo promývací činidlo a/nebo inkubační činidlo obsahuje kakodylát sodný.
- 35 10. Souprava podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje přídatnou látku promývacího nebo fixačního činidla vybranou ze skupiny: chlorid vápenatý, glukóza, sacharóza a/nebo jejich kombinace.
11. Souprava podle některého z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že dehydratačním činidlem je ethanol a/nebo aceton.
- 40 12. Souprava podle některého z nároků 1 až 11, **vyznačující se tím**, že uzavřené balení je tvořeno plastovou mikrozkuřavkou nebo skleněnou špičkou.
13. Souprava podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že mikrozkuřavka je opatřena kapátkem.

14. Souprava podle některého z nároků 1 až 13, **vyznačující se tím**, že všechna chemická činidla v uzavřených baleních jsou uspořádána ve společném přepravním obalu.

15. Souprava podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že přepravním obalem je papírová nebo plastová krabice.