

*Антс-Пеэп СИЛЬВЕРЕ, Юлле КААРЕП, Тоомас ТИЙВЕЛЬ*

## О МЕТОДИКЕ ОКРАСКИ СРЕЗОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ, ЗАЛИТЫХ В ЭПОКСИДНЫЕ СМОЛЫ, ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

*Ants-Peep SILVERE, Ulle KAAREP, Toomas TIIVEL. EPOKSÜVAIKUDESSE SISESTATUD  
BIOLOGILISTE OBJEKTIDE LÕIKUDE VÄRVIMISEST VALGUSMIKROSKOOPA  
TARVIS*

*Ants-Peep SILVERE, Ulle KAAREP, Toomas TIIVEL. METHODS OF STAINING SECTIONS OF  
EPOXY-EMBEDDED BIOLOGICAL SPECIMENS FOR OPTICAL MICROSCOPY*

В электронно-микроскопической цитологии при исследовании ультраструктурной организации биологических объектов для ориентирования в материале часто необходимо изучить под световым микроскопом относительно крупные по площади (по сравнению с ультратонкими срезами) т. н. толстые срезы. Цель подобного исследования, как правило, ограничивается выбором участка для ультратонкой резки и обработка толстых срезов обычно минимальна — широко применяются окрашивание толуидиновым голубым и приготовление из срезов временных препаратов практически одноразового использования. При этом высокое качество фиксации и иной обработки материала для электронной микроскопии, прочность залитых в эпоксидные смолы объектов и возможность получения на современных ультрамикротоме срезов практически любой толщины делают весьма заманчивой перспективу использования обработанного материала при изучении более общих гистологических деталей объектов. Применение таких препаратов расширяет возможности светомикроскопической гистологии и повышает четкость получаемых результатов (за счет минимальной толщины изучаемых срезов), позволяет лучше и точнее связывать эти данные с результатами электронно-микроскопического исследования. Кроме того, это необходимо при электронно-микроскопическом изучении мелких, гетерогенных по клеточному составу объектов, таких как органы членистоногих и растений, популяции микроорганизмов в колониях и т. п.

В лаборатории электронной микроскопии института были опробованы различные методы окраски толстых срезов (толщиной 0,5—1 мкм) с залитого в «Эпон 812» и «Аральдит М» биологического материала и разработана методика — модификация описанных в литературе методов (Jupirig и др., 1970; Уикли, 1975), обеспечивающая достаточно воспроизводимые результаты и получение стабильных постоянных препаратов, обратимо обесцвечивающихся лишь сильным ультрафиолетовым освещением лампами типа ДРШ-250 и т. п.

При приготовлении постоянных препаратов по рассматриваемой методике толстые срезы снимают с поверхности воды в ванночке на ноже ультрамикротоме полосками покровного стекла шириной 3—4 мм.

Для удобства манипулирования желательно, чтобы поверхность воды в ванночке равнялась  $5 \times 10$ —15 мм, ибо во избежание попадания пузырьков воздуха между срезом и стеклом и для сохранения порядка срезов (особенно при серийных срезах) полоску стекла, зажатую тонким пинцетом, в погруженном состоянии подводят под снимаемые с воды срезы и, придерживая последние тонкой иглой-волоском, поднимают погруженный конец стекла, сохраняя ориентировку и последовательность срезов. Не выпуская стекла из пинцета, удаляют лишнюю воду с тыльной его стороны фильтровальной бумагой, а мокрый препарат помещают на нагревательную пластинку (желательно с зеркально-гладкой поверхностью) и сушат при температуре 50—60 °С в течение 10—15 мин. При этом срезы достаточно прочно приклеиваются к стеклу, что важно для дальнейшей обработки препарата красителями.

Окраска срезов производится в два этапа. Сначала используется двойной краситель — смесь 1%-ного водного раствора метиленового синего в 1%-ном растворе буры (бура растворяется в небольшом количестве воды, добавляется нужное количество метиленового синего и после растворения доводится до объема, рассчитанного на 1%-ный раствор) и 1%-ный водный раствор азура II, смешанные в равных частях. Рабочий раствор красителя сохраняется, вопреки данным литературы, в темной посуде очень стабильно в течение нескольких месяцев. На втором этапе растительные ткани и микроорганизмы докрашивают насыщенным водным раствором кристаллического фиолетового, а животные ткани (в практике нашей лаборатории органы насекомых) — 1%-ным раствором основного фуксина в 70%-ном этиловом спирте.

Для окрашивания препарата каплю первого красителя тонкой пипеткой наносят на срезы на полоске покровного стекла и красят, подогревая препарат на нагревательной пластинке, в течение 3—5 мин; для предотвращения высыхания краски на препарате при необходимости добавляется капля воды. Краситель смывают, погружая препарат в воду, а затем промывают его тонкой струйкой или каплями воды из капельницы до прекращения выхода краски из срезов. После первой окраски препарат сушат на нагревательной пластинке 5 мин, затем красят без подогрева каплей второго красителя в течение 10—15 мин. Промывают его как и после первой окраски; затем удаляют лишнюю воду с тыльной стороны полоски стекла и во влажном состоянии заключают срезы в гумми-сироп по Апати: полоска стекла срезами вниз накладывается на каплю гумми-сиропа на предметном стекле, прижимается слегка, чтобы сироп растекался по всей площади препарата — постоянный препарат готов к просмотру.

Таких полосок покровного стекла можно смонтировать до десятка на одно предметное стекло, что позволяет очень рационально располагать исследуемый материал по мере его накопления и заметно укорачивает время на его просмотр и сравнительное изучение. Вся процедура обработки препарата на полоске покровного стекла занимает не более 40—50 мин. Такая методика обработки толстых срезов для световой микроскопии лучшие результаты дает на эпоновых срезах; аральдитовая заливка материала не препятствует применению этой окраски, но сам аральдит окрашивается в голубой цвет.

Качество окраски срезов — интенсивность, равновесие между различными тонами (в основном различные оттенки сине-зеленого и красно-фиолетового) — зависит как от толщины срезов, так и от режима обработки препаратов. Поэтому наиболее рационален подбор конкретного режима окраски для каждого типа изучаемых объектов, в оптимальном случае — для каждой партии материала, обработанной

новыми порциями реактивов — как фиксаторов, так и заливочных смесей. В таком случае в пределах одной партии можно рассчитывать на вполне удовлетворительную воспроизводимость окраски срезов.

Хотя специальных исследований по выявлению дифференцирующей способности вышеописанной методики окраски препаратов нами не проводилось, продолжительное использование ее на различных объектах позволяет сделать некоторые выводы о дифференцировке различных структур и веществ исследованных биологических объектов.

В молодой, растущей растительной ткани преобладают сине-зеленые тона, которые хорошо выявляют цитоплазму, ядро и ядрышко наиболее интенсивных синих тонов, бледно-зеленоватые капли липидов, розоватые вакуоли и окрашивающиеся от красного до интенсивно фиолетового включения в них, а также клеточные стенки. Очень четкая дифференциация получена на проростковых корешках крестоцветных: находящиеся ниже инициальных клеток и меристемы ткани (чехлик и первичный эпидермис) окрашиваются в фиолетово-розовые тона, все клетки расположенных выше тканей корня — сине-зеленые с розовыми вакуолями. При этом четко окрашиваются в фиолетово-розовые тона даже отдельные клетки и их участки, затронутые дегенерацией в районе спонтанного разрыва корневой ткани (Сильвер, Шнайдер, 1973). В то же время искусственное повреждение здоровой ткани при последующей немедленной фиксации и окраске клеток, находящихся выше меристемы, изменения не вызывает. Можно предполагать, что фиолетово-розовая окраска связана с особенностями состава или метаболизма соответствующих клеток, потерявших в чехлике и первичном эпидермисе способность к делению и существующих как «переживающие» клетки. В этом отношении они сходны с дегенерирующими в противоположность меристематическим и другим интенсивно метаболизирующим клеткам, которые окрашиваются в сине-зеленые тона. Данный вывод подтверждается и тем, что стареющие растительные ткани окрашиваются, как правило, в фиолетовые тона.

Изученные препараты насекомых окрашивались в основном в красно-фиолетовые тона, достаточно точно и четко дифференцирующие как отдельные органы и ткани, так и компоненты клеток: ядра — интенсивно фиолетовые, железистые клетки и поперечнополосатые мышцы — фиолетовые, соединительная ткань — красно-розовая, капли липидов в жировой ткани — бледно-зеленоватые, базальная мембрана органов — бледно-розовая. В покровах насекомых очень четко выявляется принимающее интенсивный зеленый цвет вещество — по-видимому, хитин, которое содержится исключительно в наиболее толстых участках тергитов и стернитов.

Таким образом, вышеописанная методика позволяет на материале, залитом в эпоксидные смолы, проводить обще-гистологические исследования и в сочетании с другими гисто-цитологическими методами может повысить информативность результатов электронно-микроскопических исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Сильвер А.-П., Шнайдер Т., 1973. Изучение спонтанных разрывов корневой ткани проростков крестоцветных. II. Цитологические-ультраструктурные изменения в корневой ткани. Изв. АН ЭССР. Биол. 22 (3) : 146—154.  
Уикли Б., 1975. Электронная микроскопия для начинающих. М.  
Juniper, V. E., Cox, G. C., Gilhurst, A. I., Williams, P. R., 1970. Technics for plant electron microscopy. Oxford—Edinburgh.