

Preparación de Muestras Biológicas del Tejido Blando

Para obtener la muestra se debe tener una porción del tejido blando aprox $0.3, 0.6 \text{ mm}^3$ para hacerla el mismo día.

2do paso se enjuaga la muestra con PBS a 0.1 M 3 veces por 10 min. La postfixación tarda entre 1 o 2 h y se realiza con tetraóxido de osmio al 1% en PBS a 0.1 M . Nuevamente se lava con PBS a 0.1 M .

Cuando las muestras estén lavadas se fijan con paraformaldehído al 2.5-3% y con glutaraldehído al 2.5-3%. El paraformaldehído está formado por una mezcla de polioximetilenglicales y contiene 87-98% de formaldehído.

6to paso posteriormente se debe cortar con microtoma en caso de no tener hacerlo con cuchillas de vidrio, proceder a dotar cortes finos de 50-100 nm

1er paso con la muestra obtenida del tejido se debe lavar 3 veces por 5 min con solución amortiguadora de fosfato a 0.1 M con pH de 7.4 para posteriormente fijarla con glutaraldehído al 2.5 o 3%.

3er paso el tejido se deshidrata con acetona en 2 ocasiones durante 10 min y alcoholes específicamente etanol al 30, 50, 80, 90 y 96% cada uno por 10 min, por último se realizan 3 enjuagues por 10 min en etanol.

5to paso ya que la muestra haya pasado por la preparación procede a incluirse, la preincubación se realiza con óxido de propileno en una relación 1:1. Las muestras se dejan embebido por 16 h. Al terminar este lapso se incluyen las muestras y se dejan conservar a una temperatura de 60°C por 24 h se obtiene el bloque y se forma la pirámide.

Para el montaje es necesario emplear rejillas de oro o cobalto, estas rejillas se revisten con una fina película de carbón o plástico delgado de forma que sirva de sosten de tal manera que la rejilla sostenga a la película y la película sostenga a la muestra.

Preparación de Muestras Biológicas del Tejido Duro

No se tiene una dimensión específica al inicio del proceso pero si se emplea la MET final debe ser de 50-100 nm y para MEB el tamaño debe ser 0,5 cm² la muestra debe ser hidratada para cortar frías, al inicio del proceso la muestra se rehidrata.

2do paso: la muestra es recortada con una cortadora con disco de diamante, la profundidad de los cortes es cercana a los 2,0 mm.

4to paso debe realizar un desgaste de la muestra para lograrla se deberá colocar la muestra en el porta-muestras para colocar resina, una vez posicionada la muestra se coloca una solución pasta diamante con granos de 6 mm de grosor. Todo este proceso debe ser controlado con el microscopio fotónico.

La erosión iónica de la muestra es de que importancia y cuidado, debido a que la muestra debe ser erosionada en la parte central para adelgazarla, se realiza con equipo.

7mo paso: El recubrimiento de conducción es utilizado para MET como para MEB donde se realiza un sombreado de la muestra con material conductor y puede ser de oro, plata no, pero se usa más el carbón. Se crea un vacío de 50 mili y se hace pasar una corriente eléctrica por el filamento, provocando que se desprendan el carbón por sublimación depositándose sobre la muestra.

1er paso para iniciar con el proceso, se prepara un cajón de acetato para formar una columna de 10 x 10 x 20 mm, para vaciar el poliacrilato de metilo, una vez realizado el bloque de acrílico es llevado a la cortadora.

3er paso: Se realiza un despegado en la muestra obtenida hasta obtener un grosor de 100-120 nm. Para lograrlo se monta en un porta muestras donde se fija con resina fenoplastica (300c) se coloca la muestra y se deja enfriar. Después se coloca en una pulidora orbital. La muestra debe quedar lisa y brillante con un "terminado en espejo" se retira del porta muestras y se sigue con el mismo procedimiento.

5to paso: Para el montaje de la muestra, se monta en una rejilla de cobre con perforación central mediante resina epoxi catalizable, la muestra se limpia y se pinta su periferia con pintura de plata para ME, la pintura se vierte a la muestra en un conducto eléctrico, se realiza bajo observación del estereoscopio o microscopio invertido.

6to paso: Se monta de nuevo en el porta muestras de este equipo utilizando granos de plástico, una vez cobrada se crea el vacío para obtener el vacío de 10⁻³, se posiciona la muestra dentro de la cámara y se activa la rotación del espécimen cuando este proceso termine será revisada por el microscopio fotónico y se cubra con una fina película de carbón.

8to paso: Para procesar la muestra para MEB la muestra debe tener un grosor de 1 cm², una vez cortada se seca, se desmineraliza con ácido fosfórico al 20% por 60 s, se lava con agua por 10 min, se seca y se observa al microscopio fotónico, después la muestra se limpia por vibración ultrasónica y alcohol se deja evaporar la acetona y se monta en un cilindro de cobre.