

Preparación de muestras biológicas

Tejidos Blandos

Obtención de la muestra

Porción de aproximadamente 0,3-0,6 mm³ para preparar el mismo día

Procesamiento de la muestra

Fijación

Se lava la muestra 3 veces por 5 min con PBS a 0,1M con pH de 7,4

Fijarla con glutaraldehído al 2,5 o 3% o en paraformaldehído al 2,5% en PBS a 0,1M por 4h.

Se enjuaga la muestra con PBS a 0,1M tres veces por 10 min.

Se realiza una postfixación con tetróxido de osmio al 1% en PBS a 0,1M; dura entre 1 y 2h, nuevamente se lava con PBS a 0,1M

Inclusión

Deshidratación con acetona en dos ocasiones durante 10 min y alcoholes (Etanol al 30, 50, 80, 90 y 96%) cada uno por 10 min y por último enjuagar 3 veces con etanol al 100% por 10 min

Se forman las pirámides

Se preincluye por 16h, quedando sumergidas (muestras) para después incluirlas a temperatura de 60°C por 24h.

Se lava con óxido de propileno 3 veces por 10 min

Montaje

Para el uso de electrones, se emplea rejillas de oro o cobre

Las rejillas se revisten con una fina película de carbono o plástica delgada de Formvar que servirá de sostén.

Rejilla sostiene la película y la película a la muestra.

Se coloca la muestra en la película y la rejilla se manipula con delicadeza.

Corte

Se debe realizar en ultramicrotomo por medio de cuchillas de diamante o de vidrio

Primero se hace un corte semifino con un grosor de 100-150nm de la pirámide

Se sumerge de toluidina

Realizar los cortes ultrafinos de 50-100 nm

Se observan en el microscopio fotónico para determinar el sitio de estudio

Tinción y Coloración

Obtención de la muestra

Al inicio no hay una medida exacta, pero al final si es MET la muestra debe ser de 50-100nm y si es HEB de 0,5 cm³

La muestra debe estar hidratada y limpia de blndos y se lava 3 veces para eliminar

La muestra si requiera ha de ser procesada

Con la muestra limpia, se procede a preparar un cajón de acetato para formar la columna de 10x10x20mm y vaciar el acrílico autopolimerizable

El bloque de acrílico se coloca en la recortadora

La profundidad de los cortes es 2,0 mm

La muestra debe estar paralela al disco diamante, se asegura y se hace avanzar según la velocidad del giro (1000 rpm)

Pulido de la muestra

Se realiza el desgaste de la muestra hasta obtener un grosor de 100-120nm

Se monta el esp en un portamuestras Se fija con resina plástica, se debe de forma homog coloca la muestr

Desgaste de la muestra

La muestra se coloca por medio de resina en un portamuestras de acero inoxidable del sistema digital, se coloca la muestra en el equipo y el disco de acero inox. sobre la muestra

La muestra lisa y brillante terminado e una vez recal terna y se con la col

Se coloca una solución de P. diamante con grano de 5 micras de grueso

Calibra Se inicia en la s

Calibrar → Estructura o tejido que tinte

Tejidos Duros

Obtención de la muestra

Procesamiento de la muestra

Montaje de la muestra

Procesamiento de muestras para MEB

Para el paso de electrones, se emplea rejillas de oro o cobre

Las rejillas se revisten con una fina película de carbono o plástica delgada de Formvar que servirá de sostén.

Rejilla sostiene la película y la película a la muestra.

Se coloca la muestra en la película y la rejilla se manipula con delicadeza.

Al inicio no hay una medida exacta, pero al final si es MET la muestra debe ser de 50-100nm y si es MEB de 0,5 cm³

La muestra debe encontrarse hidratada y limpia de tejidos blandos y se lava con detergente para eliminar la sangre

La muestra se rehidrata hasta ser procesada

Se desmonta el portamuestras del sistema dimplex y se monta en una rejilla de cobre con perforación central por medio de resina epoxica catalizable.

Se limpia la muestra y se pinta su periferia con Pintura de Plata Para MET

La pintura se vierte a la muestra en un conductor eléctrico

El montaje, limpiado y pintado se realiza bajo observación de un estereoscopio

Corte

Con la muestra limpia, se procede a preparar un cajón de acetato para formar la columna de 10x10x20mm y vaciar el acrílico autopolimizable

El bloque de acrílico se coloca en la recortadora.

Se utiliza una recortadora con disco de diamante sin dientes

La profundidad de los cortes es 2,0 mm

La muestra debe estar paralela al disco diamante, se asegura y se hace avanzar según la velocidad del giro (1000 rpm)

El bloque se posiciona en el sitio de estudio y se fija en el portamuestras de la recortadora.

Pulido de la muestra

Se realiza el desgaste de la muestra hasta obtener un grosor de 100-120µm

Se monta el espécimen en un portamuestras y se fija con resina termoplástica, se debe extender de forma homogénea, se coloca la muestra y enfriar.

El portamuestras se coloca en la pulidora orbital y se pule a través de un sistema de lijas de diferentes grados de grosor.

Desgaste de la muestra

La muestra se coloca por medio de resina en un portamuestras de acero inoxidable del sistema digital, se coloca la muestra en el equipo y el disco de acero inox. sobre la muestra

La muestra debe quedar lisa y brillante con un "terminado en espejo", una vez realizado se retira y se hace lo mismo con la cara contraria.

Se pasa un paño húmedo para eliminar asperezas y rayaduras de la superficie

Se coloca una solución de P. diamante con grano de 6mm de grosor dispersa en Dialub.

Calibrado el equipo se inicia el desgaste en la parte central, debe ser controlado por MF, Debe quedar con un grosor de 18±2mm en el centro.

La muestra se pule con disco de Fieltra y se le coloca suspensión de pulido a base de sílice coloidal Buehler.

Erosión iónica de la muestra

Se realiza en un equipo de ion mill (molino de iones). Se monta el portamuestras en el equipo usando guantes de plástico

Se cierra el equipo para obtener vacío de 10⁻⁴ torr, se posiciona dentro de la cámara y se activa la rotación

Recubrimiento de conducción

Realizada la perforación y revisión con el ME, se cubre la muestra con una fina película de carbono

Se realiza para MET y MEB un sombreado de la muestra

con material conductor de calor como oro, platino; se usa más el carbón

Se crea un vacío de 50 militorr y se hace pasar una corriente eléctrica por el filamento para desprender el carbón y este se deposita sobre la muestra

Se coloca la muestra en la base de la evaporadora de carbón, aplicable filamentos con carbón

Montaje

ión
ración

→ Estructura o tejido que tiene

410000	Giacott		
gris oscuro	Rosa gris	Delgado en agua	verde

Se prepara a preparar un
según lo indicado para
tomar la columna de
10x10x20mm y vaciar
el conlito autopolimerizable

El bloque de
cristal se
coloca en la
recortadora

Se utiliza una
recortadora con
disco de diamante
sin dientes

Pulido de la muestra

La profundidad
de los cortes
es 210mm

La muestra debe estar
paralela al disco diamante,
se asegura y se hace
avanzar según la velocidad
del giro (1000 rpm)

El bloque se posiciona
en el sitio de estudio
portamuestras de la
recortadora.

Desgaste de la muestra

Se realiza el desgaste
de la muestra hasta
obtener un grosor de
100-120µm

La muestra se coloca por
medio de resina en un
portamuestras de acero
inoxidable del sistema
hidráulico, se coloca la muestra
en el equipo y el disco
de acero inox. sobre la muestra

Se monta el espécimen
en un portamuestras y
se fija con resina term-
plástica, se debe extender
de forma homogénea, se
coloca la muestra y enfriar.

La muestra debe quedar
lisa y brillante con un
referencial en espejo,
una vez realizada se
retira y se hace lo mismo
con la cara contraria.

El portamuestras se
coloca en la pulidora
orbital y se pulen
ataques de un sistema
de lijas de diferentes
grados de grosor.

Se pasa un paño húmedo
para eliminar asperezas
y rugosidades de la superficie

Se coloca una solución
de P. diamante con grana
de 6mm de grosor
dispuesta en Dialab

Se inicia el desgaste
en la parte central, debe
ser controlado por MF,
Debe quedar con un grosor
de 18±2mm en el centro.

La muestra se pulie con
disco de feltro y se le
coloca suspensión de
pulido a base de
sílice coloidal Guebler.

Erosión iónica de la muestra

Se realiza en un
equipo de 100 mill.
Se monta el portamuestras
en el equipo usando
guantes de plástico

Se cierra el equipo
para obtener vacío
de 10⁻⁴ torr, se
posiciona dentro de
la cámara y se acti-
va la rotación

Realizado la perforación
y revisión con el MF,
se cubre la muestra
con una fina película
de carbono

Recubrimiento de conducción

Se realiza para MET
y MEB un sombreado
de la muestra

con material conductor
de color como oro,
más el carbono

Se crea un vacío de
50 militorr y se hace
pasar una corriente
eléctrica por el filamento para despegar
el carbono y este se
deposite sobre la muestra

Se coloca la muestra en
la base de la columna
de carbono, el
filamento filamentos
con carbono

El carbono que cubre a la muestra
permite el peso de electrones
en la observación por MET

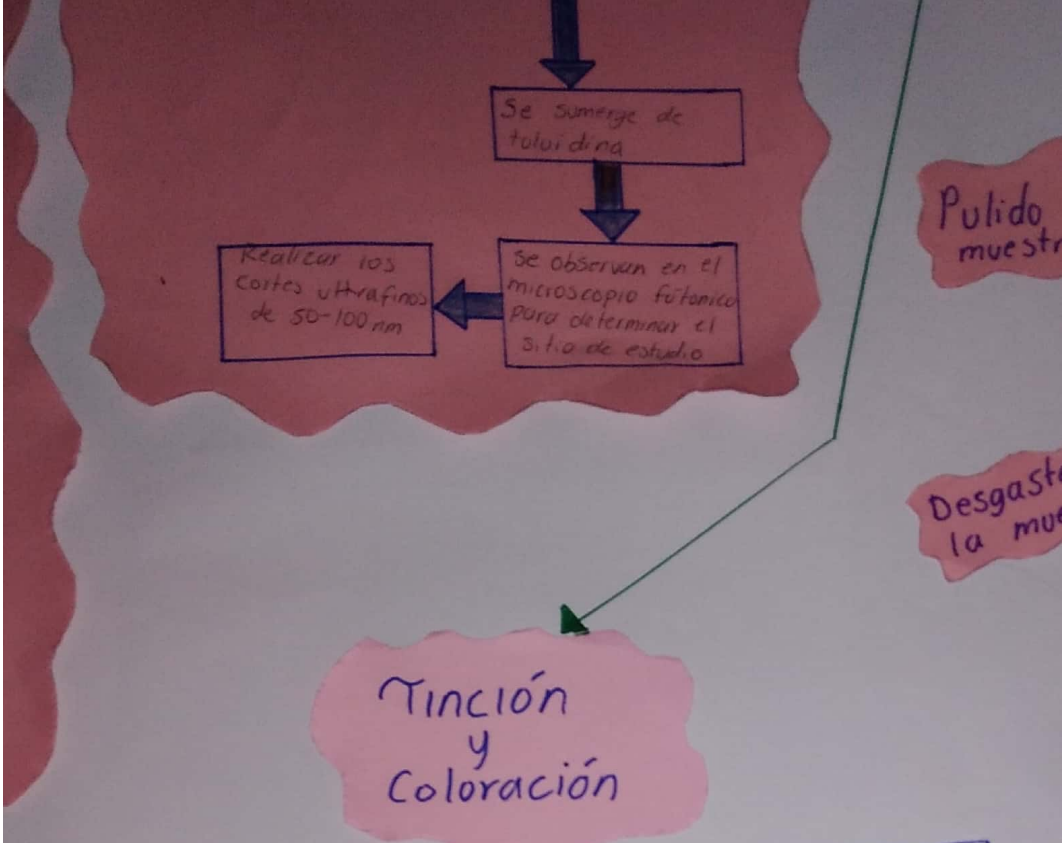
La muestra debe tener un
espesor de 10µm, se forman
bloques respetando el lugar
que se quiere observar y
una vez cortado, se seca.

Se desmineraliza
con ácido fosfórico al 20%
por 1min, se lava con agua
corriente por 70 min, se
seca y se observa al MF

La muestra se limpia de
impurezas por medio de
ultrasonido y agua
hacia por espuma de
lana


Se fija la muestra con
plata para
ME, se somete la
muestra con el sputter
y la muestra está lista
para observar.


Se deja evaporar la
acetona y se monta en
un cilindro de cobre.



Tinción/Técnica	Color	Estructura o tejido que tiñe
Ácido periódico de Schiff (PAS) Rojo ●	Azul ●	Grocott Gris oscuro → Mucina Rosa gris → Hifas y micelios Delatado en negro → Hongos Verde → Fondo
↓ Hidratos de carbono macromoléculas ricas en hongos y membrana basal	↓ Núcleo	Hematoxilina azul o morado → Núcleos
Azul Alcian	Azul oscuro → Mucosustancias ácidas sulfatadas Rosa a Rojo → Núcleo Rosa pálido → Citoplasma	Mucicarmin Rosa oscuro → Mucina Negro → Núcleo Amarillo → Fondo
Azul de Anilina azul ● → Colágeno	Azul de Metileno Azul ● → Fibras nerviosas	Rojo Congo Rosa → Rojo → Amiloide Azul ● → Núcleo
Azul de Toluidina Azul ● → Cartilago y células cebadas	Bielschowsky Negro ● → Neurofibrillas, núcleo Amarillo o Café → Fondo, citoplasma	Tioflavina verde-amarillo → sustancia amiloide
Eosina Rosa ● → citoplasma	Fontana Masson Negro ● → Melanina Negro ● → Granulos argentafines Rosa → Rojo → Núcleo y citoplasma	Triómic de Masson Rojo ● → Músculo, citoplasma, queratina Azul verde ● → Colágeno Negro ● → Núcleos
Van Gieson Rojo ● → Colágeno Amarillo ● → Músculo, queratina Negro ● → Núcleos	Von Kossa Negro ● (depositos) → Huesos y sales minerales de calcio Rosa a Rojo ● → Núcleo y citoplasma	

Simbología

 Orden del proceso.

 } conectores

Alumna:

Llenifer Yaquelín

García Díaz

"1-C"