

Sesión 5:

Manipulación de muestras para su estudio
al Microscopio Electrónico

Nicolás Ubero Pascal



Nota informativa del autor de la presentación

Las imágenes, ilustraciones y/o esquemas que aparecen en esta presentación pueden no ser completamente de la propiedad del autor, por tanto la autoría de éstas, así como su procedencia, se pueden consultar al final de la presentación bajo el título:

Créditos de las Ilustraciones

Copyright informative note of presentation

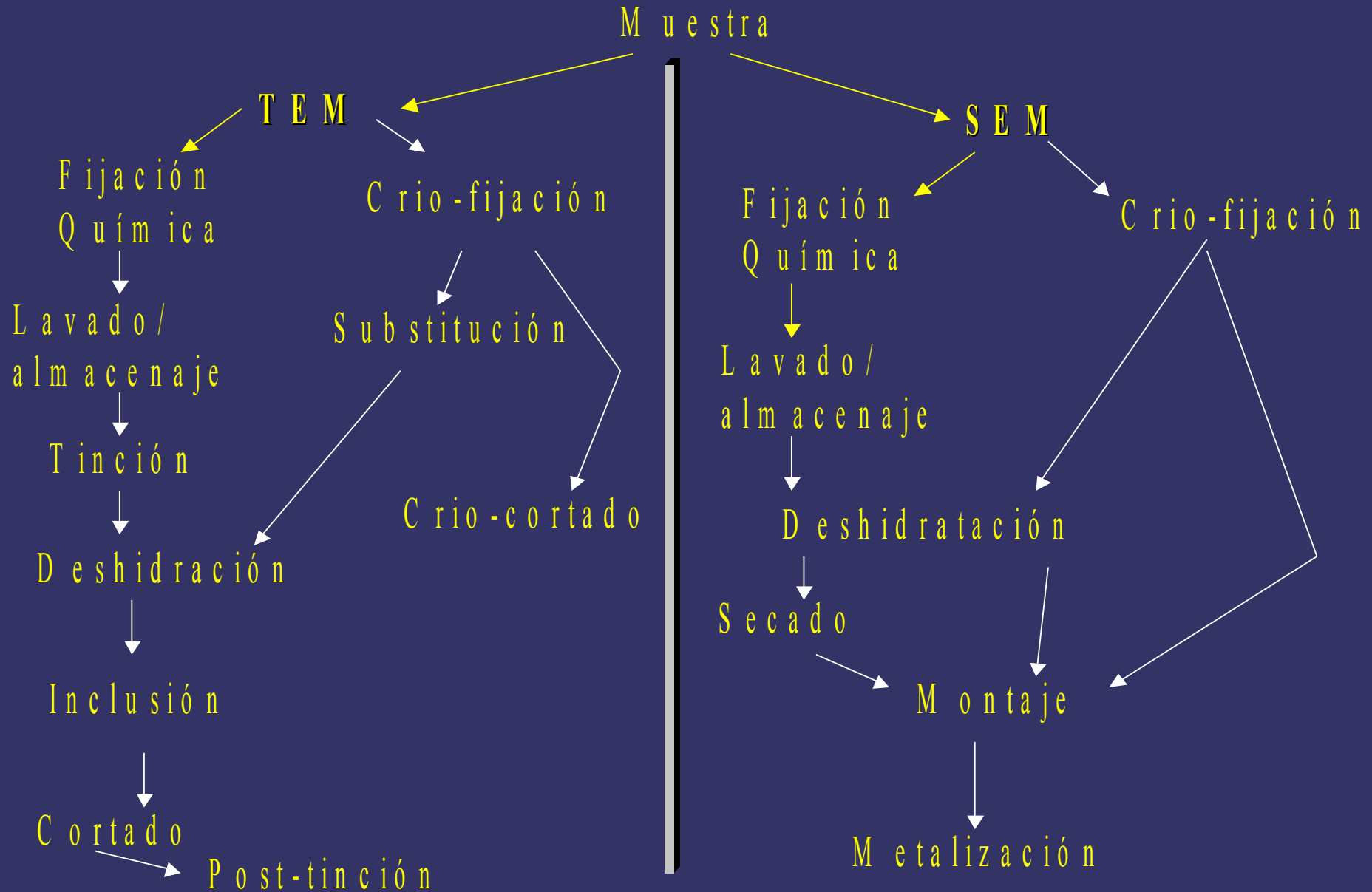
Pictures (photography, illustrations and/or graphics) appearing in this presentation could not be at all copyrighted by the author, therefore at the end of the presentation all the pictures will be related to their authorship and the pathway of the web site where they have been taken.

The title of that slide is:

Pictures Copyright



Preparación Estándar de Muestras para Microscopía Electrónica





Preparación muestras al SEM

Fijación

Deshidratación (gradiente etanol y acetona)

Desección

- Punto crítico
- Compuestos orgánicos volátiles

Montaje

Metalización

Fijación de la muestra



© N. Ubero-Pascal

Series de concentraciones creciente de etanol y acetona

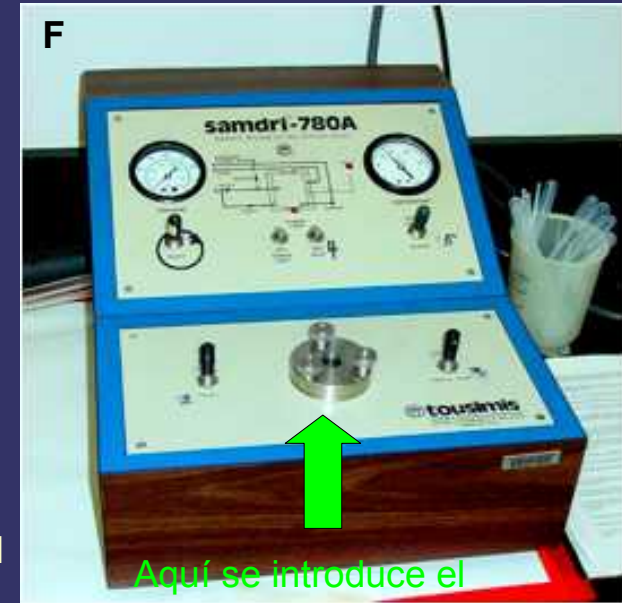


Preparación muestras al SEM

Dsecación - Punto crítico



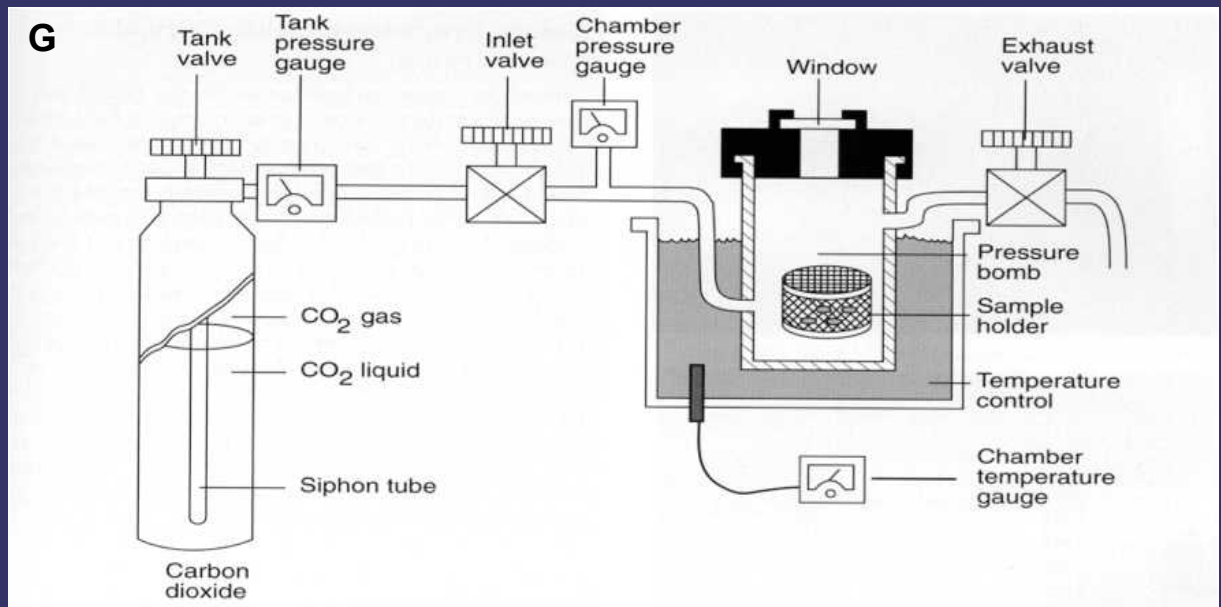
Aspecto general de la instalación del desecador y detalle del aparato desecador



Aquí se introduce el contenedor con la muestra



Contenedores de la muestra para el punto crítico



Esquema del funcionamiento del desecador por punto crítico



Desecación

- Compuestos orgánicos volátiles



La desecación mediante compuestos orgánicos volátiles, como el HMDS, no requiere de aparataje complejo, ya que tras el tratamiento de la muestra con el agente desecador, -esta se deja secar al aire, bien en una campana flujo continuo (H), un desecador de silicagel (I) o un desecador eléctrico (J)





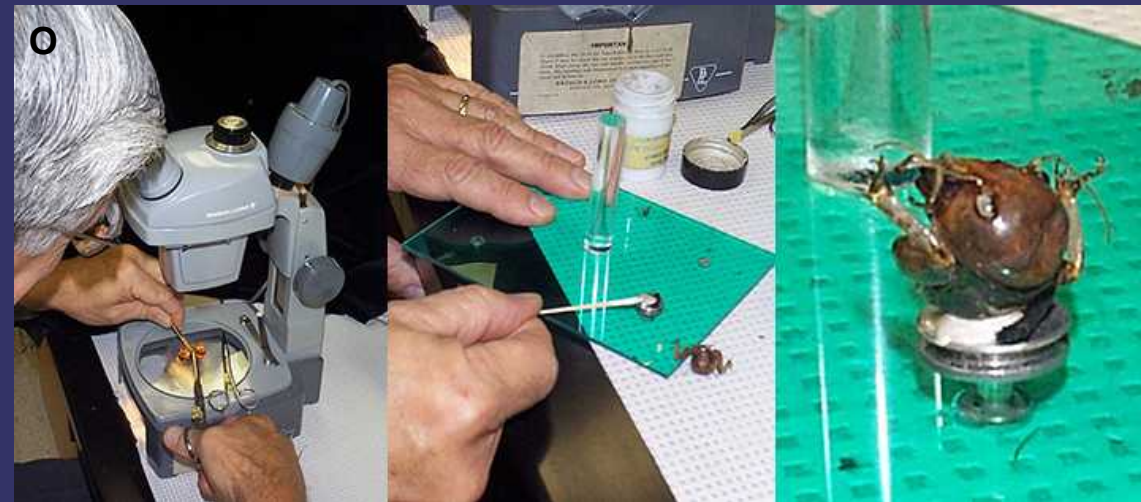
Montaje



Diferentes tipos de pedestales y útiles para fijar la muestra (cinta de doble capa y pegamento de Ag)



Ñ



O

Procedimiento para montar la muestra en el pedestal, en este caso utilizando pegamento conductor de plata, y aspecto de la muestra desecada sobre pedestales dispuesta para metalizar

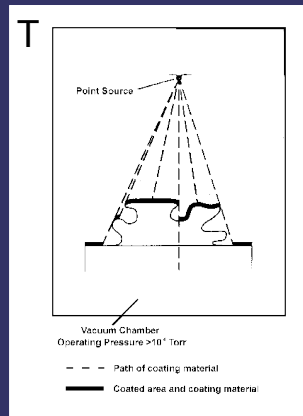
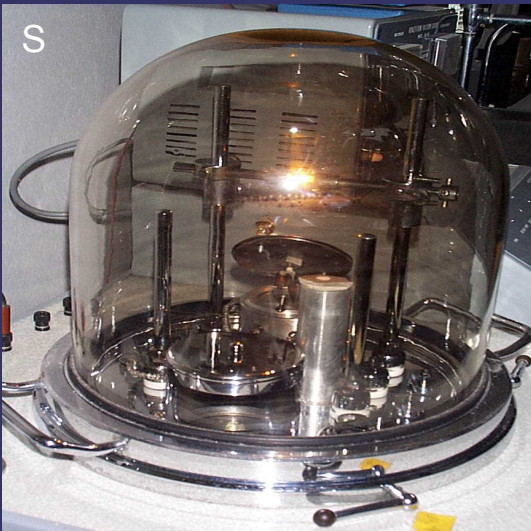
Aspecto de una muestra tras su desecación



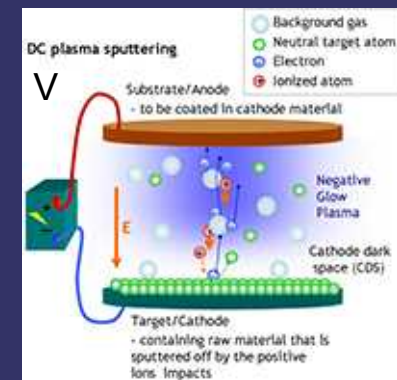
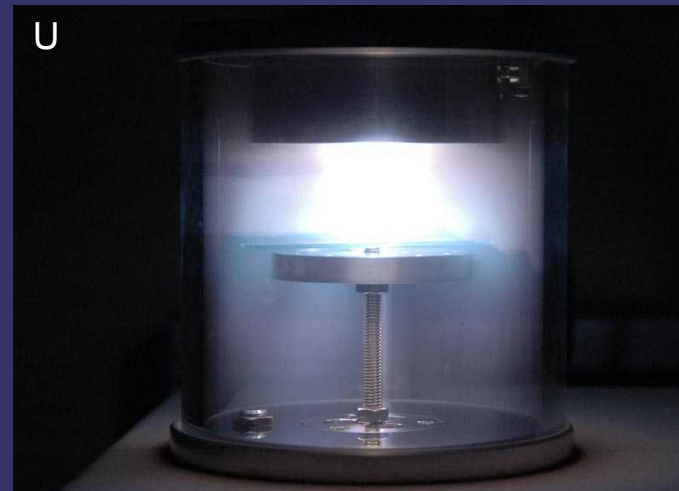
Metalización



Diferentes dispositivos para la prepara la muestra para su visualización al SEM. (A) metalizador de carbón, (B) metalizador de metales pesados, (C) Crio-metalizador



Campana de vacío del metalizador de carbón funcionando y esquema del metalizado



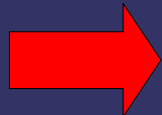
Campana de vacío del metalizador de metales pesados y esquema de funcionamiento



Metalización



Comparación del aspecto de un insecto desecado antes y después de ser metalizado con Au-Pd

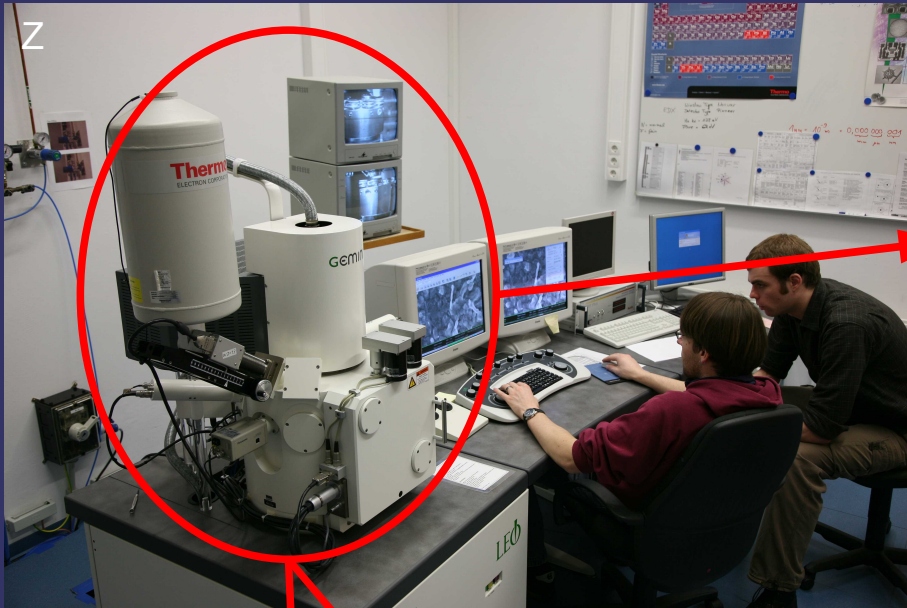


Aspecto de otras muestras metalizada

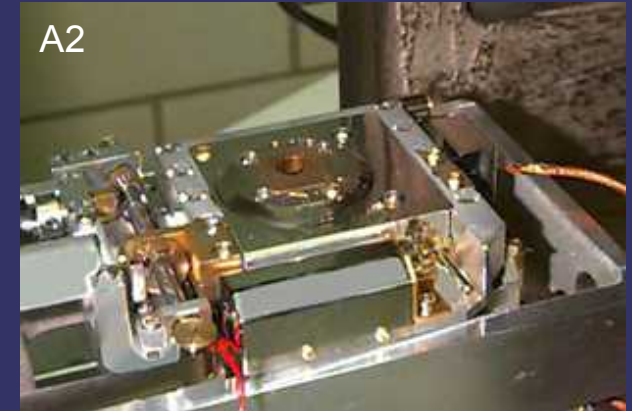




Introducción de la muestra metalizada en el SEM



Soporte para la muestra



Diferentes aspectos de cámaras de vacío del SEM donde se introduce la muestra metalizada

Cámara criogénica para la visualización de muestras congeladas, que pueden tener acoplada algunos SEM





Preparación muestras al TEM

Fijación

Fijación de la muestra

Postfijación y Tinción (Tetróxido de osmio)

Deshidratación

Inclusión

Cortes ($<0,5\mu\text{m}$)

Montaje (rejilla y Formvar)

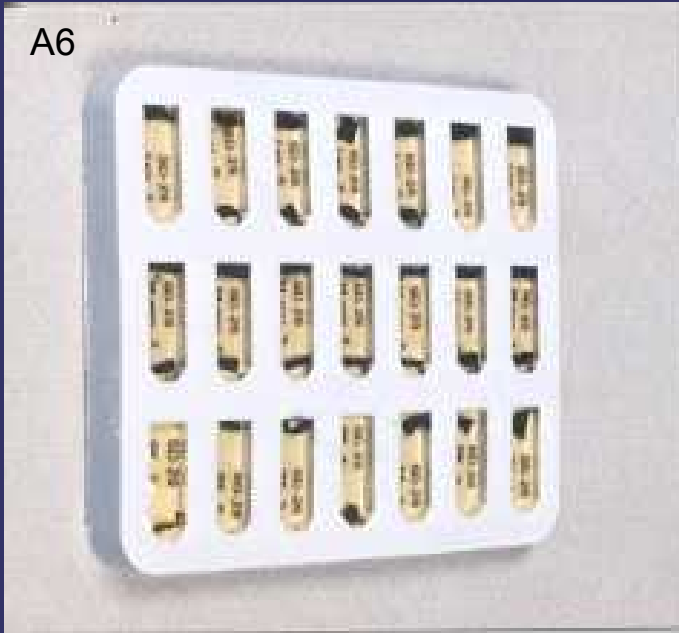
Posttinción (Acetato de uranilo)

Series de concentraciones creciente de etanol y acetona





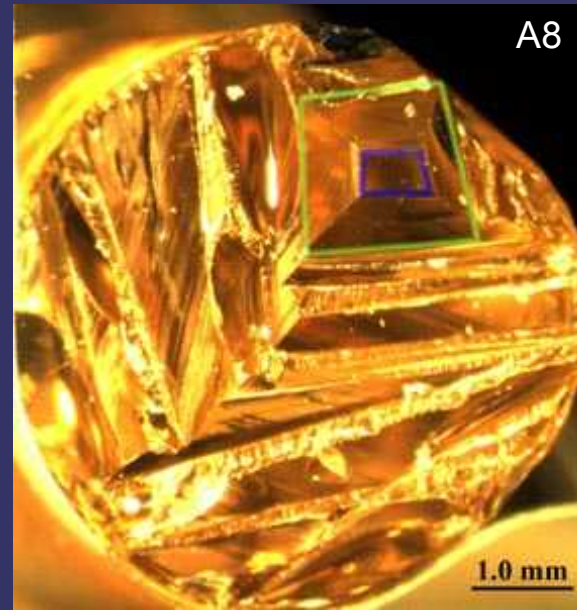
Inclusión



Moldes para hacer los bloques



Ejemplo de bloques



Tallado del bloque



ultramicrotomo

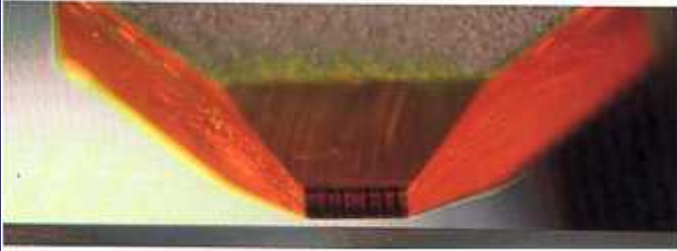


Cortes (<math><0,5\mu\text{m}</math>)

B1

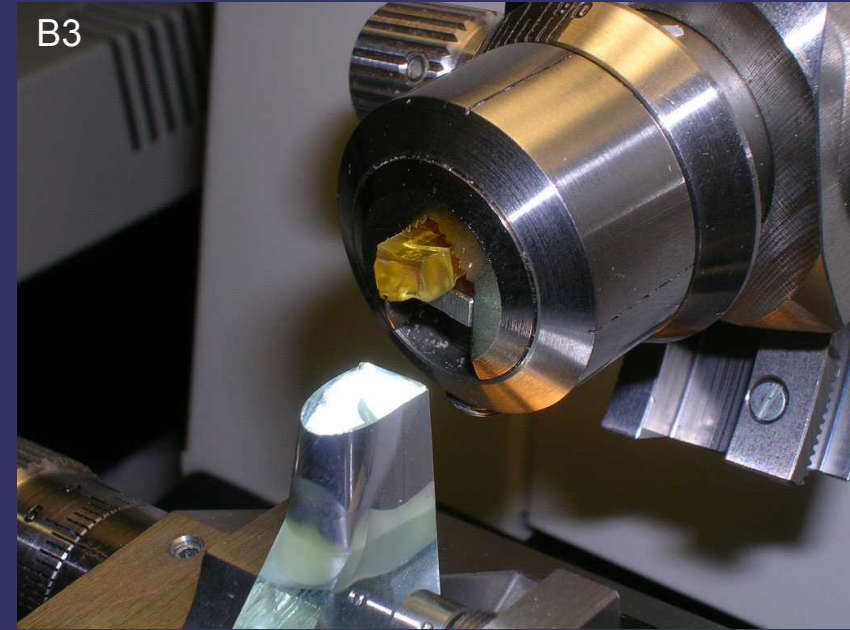


Dispositivo del microtomo para sujetar el bloque con la muestra y detalle del extremo tallado de un bloque



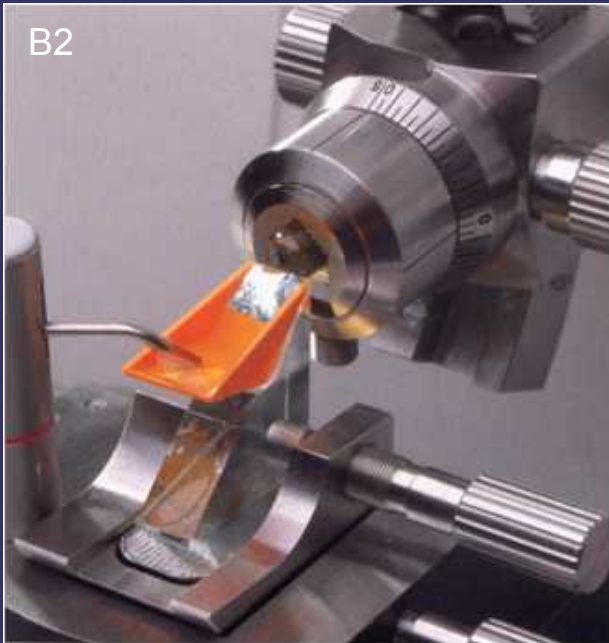
Posición del dispositivo de sujeción del bloque con la muestra y la cuchilla en el microtomo

B3



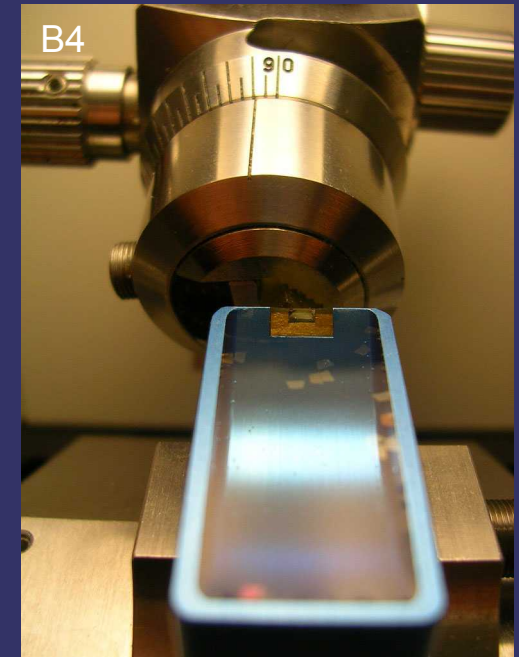
Corte de la muestra y secciones flotando en el agua del dispositivo de recogida de muestras

B2



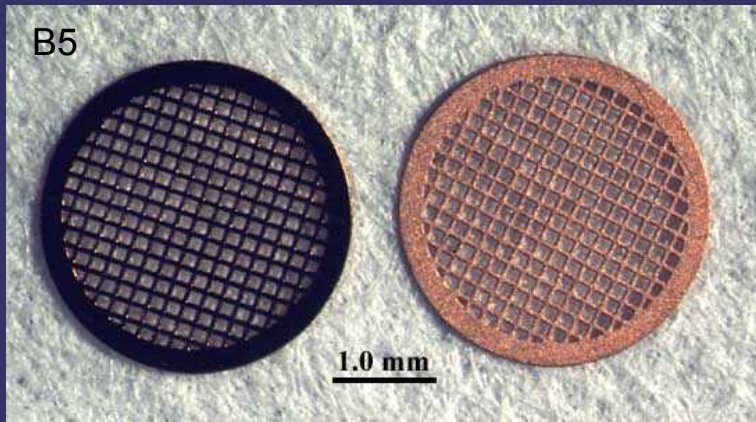
Llenado con agua del dispositivo de recogida de muestras de la cuchilla antes de comenzar a cortar el bloque

B4

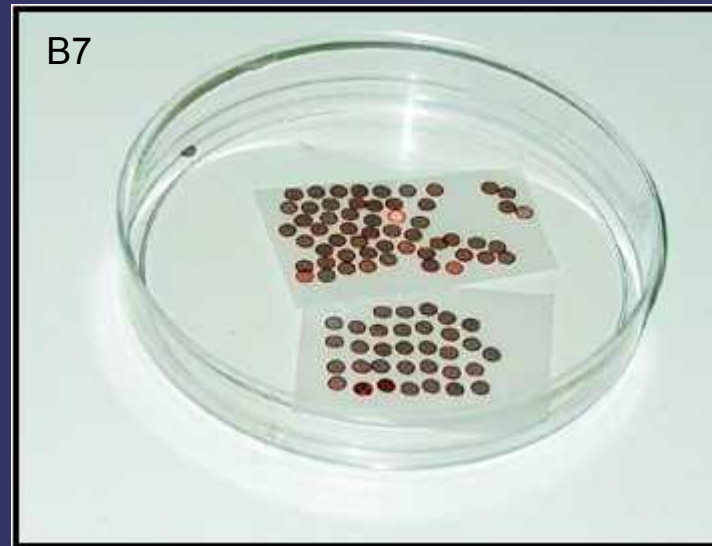




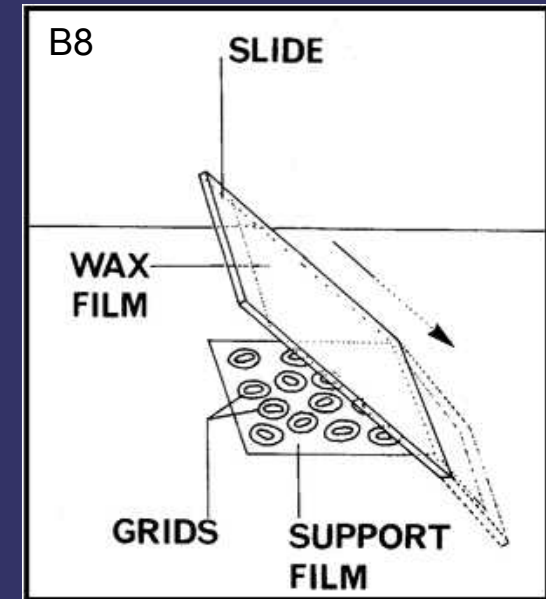
Montaje



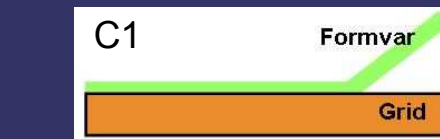
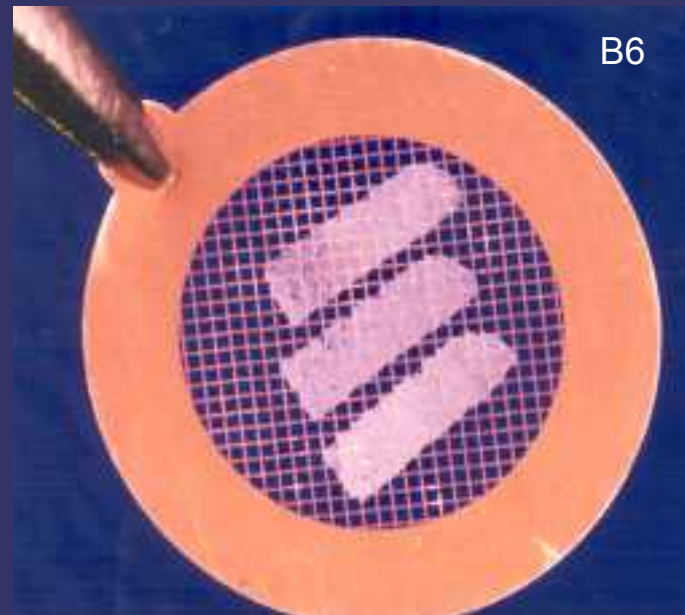
Rejillas para la disposición de los cortes ultrafinos



Forma de disponer la lámina de formvar

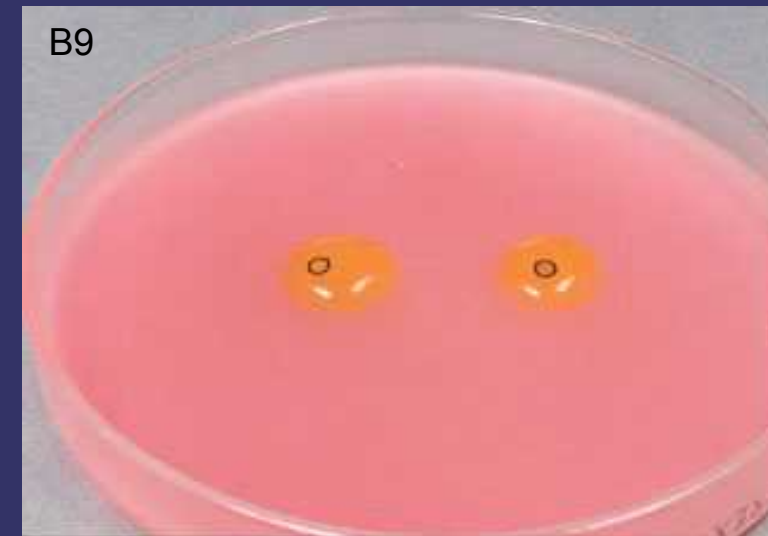


Captura de rejillas con lámina de formvar



Rejillas con Formvar

Aspecto de las muestras sobre la rejilla

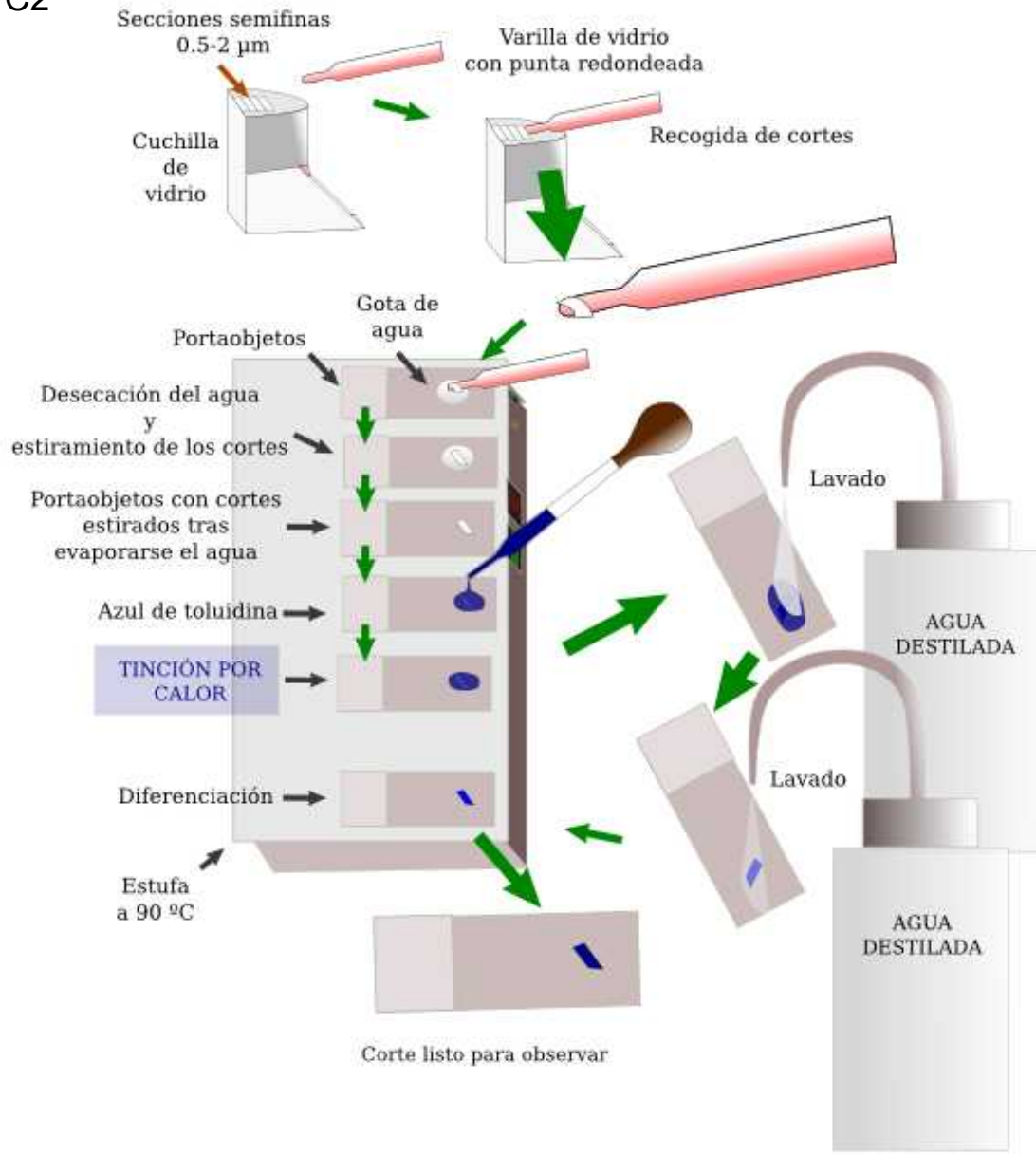


Aspecto de como se lleva a cabo la postinción en acetato de uranilo



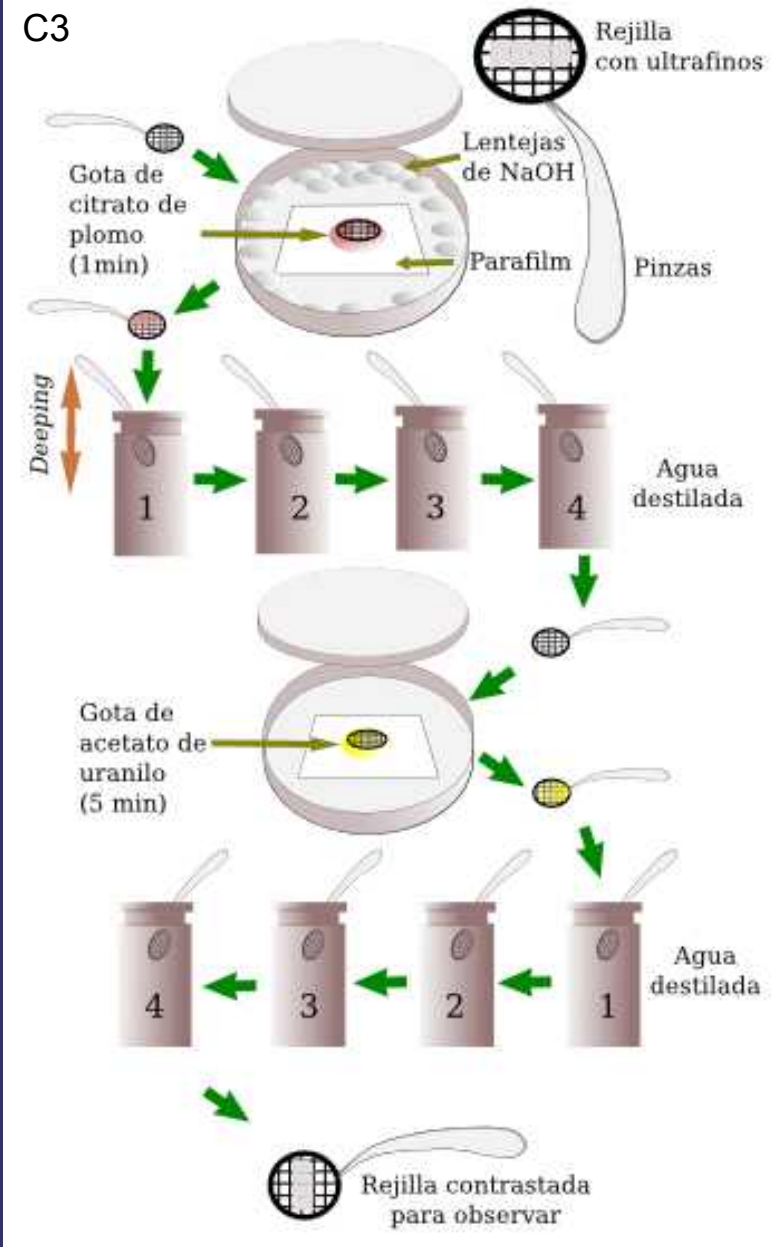
Montaje de semifinos

C2



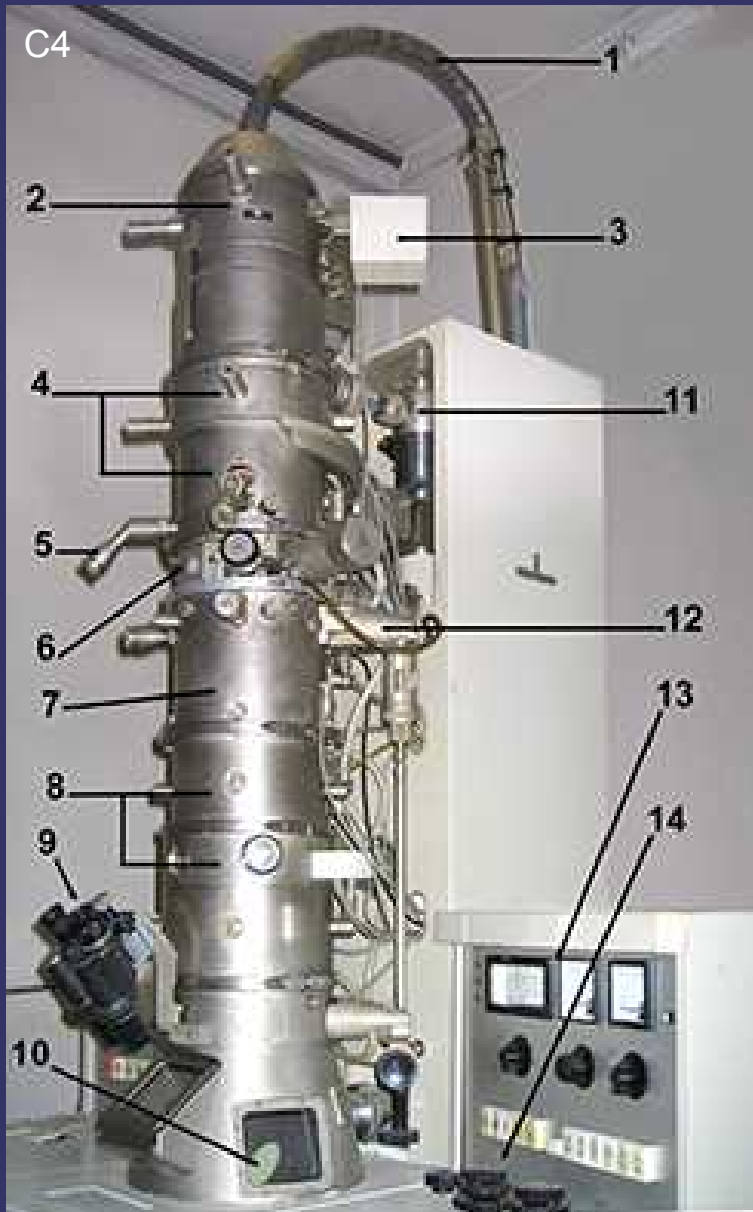
Montaje de ultrafinos

C3





Introducción de la muestra metalizada en el TEM



columna de vacío de un TEM donde se dispone la rejilla con la muestra, concretamente en la posición nº 6

Dispositivo para introducir la rejilla en el microscopio



Visor donde se proyecta la muestra en el TEM



Créditos de las Ilustraciones / Pictures copyright

- Logo Portada OCW-UM. Autor: Universidad de Murcia: Dirección web: <http://ocw.um.es/>
- Logo encabezamiento. Autor: Musarumana: Dirección web: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscopio_gif.jpg
- La figura A de la diapositiva 4 y 11 procede de la página web de la Division of Human Pathology de la Michigan State University. Está disponible en: <http://www.humanpathology.msu.edu/electronmicro/gallery/fig2.jpg>
- La figura B de la diapositiva 4 y 11 es de Nicolás Ubero Pascal
- Las figuras C y D de la diapositiva 5 han sido obtenidas de la página de Tedpella. Están disponibles en http://www.tedpella.com/2400_html/2400accs.htm.
- Las figuras E, F y G de la diapositiva 5 se han obtenido de la presentación de J.P. Shield "SEM sample preparation" de la página Modern Microscopy Technique Resource del Center for Advanced Ultrastructural Research of the University of Georgia. Están disponibles en: <http://www.uga.edu/caur/ppt/semrep.ppt>
- La figura H de la diapositiva 6 han sido obtenidas de la página web Virtual Classroom Biology: imaging techniques de la Faculty of Science, Mathematics and Computing Science de la Radboud University of Nijmegen. Está disponible en: http://www.vcbio.science.ru.nl/images/02-tem-fumehood_zoom.jpg
- La figura I de la diapositiva 6 es de Nicolás Ubero Pascal
- La figura J de la diapositiva 6 procede de la página web de Trallero y Schlee. Esta disponible en: <http://www.tralleroschlee.com/productos-especiales>
- Las figuras K, L y M de la diapositiva 7 proceden de la página web de ANAME. Están disponibles en <http://www.aname.es>
- La figuras N de la diapositiva 7 se ha obtenido de la presentación de J.P. Shield "SEM sample preparation" de la página Modern Microscopy Technique Resource del Center for Advanced Ultrastructural Research of the University of Georgia. Están disponibles en: <http://www.uga.edu/caur/ppt/semrep.ppt>
- La figura Ñ de la diapositiva 7 es de Nicolás Ubero-Pascal
- La figura O de la diapositiva 7 es un montaje de varias fotografías procedentes de la página web Ugly Bug. Están disponibles en: <http://www.uglybug.org/bugprep.shtml>
- La figura P de la diapositiva 8 procede de la página web Electroon Microscopy Sciences. Está disponible en: http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/equipment/turbo_evaporator.aspx
- Las figuras Q, R y T de la diapositiva 8 procede de la página web Quorum Technologies. Esta disponible en: <http://www.sputtercoating.com/Products/K550X-sputter-coater.htm> y <http://www.sputtercoating.com/Products/K775X.htm> y <http://www.sputtercoating.com/Products/e6300ande6700-bench-top-evaporators.htm>
- La Figura S de la diapositiva 8 procede de la página web Ugly Bug. Están disponibles en: <http://www.uglybug.org/bugprep.shtml>
- Las figuras U y V de la diapositiva 8 son de "GcG(jawp)" y K. Molhave respectivamente y procede de la página Wikimedia Commons. Están disponibles en: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Au_sputtering_light.JPG y <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DCplasmaSputtering.jpg>
- La figura W de la página 9 procede de la página web Ugly Bug. Está disponible en: <http://www.uglybug.org/bugprep.shtml>
- La figura X de la páginas 9 es de Nicolás Ubero Pascal
- La figura Y de la página 9 es de P. Halaxz y procede de la página Wikimedia Commons. Está disponible en: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Golden_insect_01_Pengo.jpg
- Las figuras Z, A1, A2 y A4 de la diapositiva 10 son de D. Schwen y se han obtenido de la página Wikimedia Commons. Están disponibles en: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Goe_SEM_students_working1.jpg, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Goe_SEM_sample_loading.jpg y http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SEM_chamber1.JPG
- Las figuras A3 y A4 de la diapositiva 10 proceden de la página web World of the Scanning Electron Microscopy, Iowa State University. Están disponibles en: <http://mse.iastate.edu/microscopy/chamber.html>
- La figura A5 de la diapositiva 10 se ha obtenido de Quorum Technologies Esta disponible en http://www.sputtercoating.com/Applications/Case_studies/Universidad-Politecnica-de-Cartagena.htm
- La figura A6 de la diapositiva 12 procede de la página web de la Division of Human Pathology de la Michigan State University. Está disponible en: <http://www.humanpathology.msu.edu/electronmicro/gallery/slides/fig3.html>
- La figura A7 de la diapositiva 12 se han obtenido de la presentación de J.P. Shield "Biological sample preparation" de la página Modern Microscopy Technique Resource del Center for Advanced Ultrastructural Research of the University of Georgia. Están disponibles en: <http://www.uga.edu/caur/ppt/EMprep.ppt>
- Las figuras A8 y A9 de la diapositiva 12 se han obtenido de página web Virtual Classroom Biology de la Faculty of Science, Mathematics and Computing Sciences de la Radboud University Nijmegen. Está disponible en: http://www.vcbio.science.ru.nl/images/tem_spurrblock_lowmag.jpg y http://www.vcbio.science.ru.nl/images/05-tem-ultramicrotome_zoom.jpg
- Las figuras B1 y B2 de la diapositiva 13 se han obtenido de la presentación de J.P. Shield "Biological sample preparation" de la página Modern Microscopy Technique Resource del Center for Advanced Ultrastructural Research of the University of Georgia. Están disponibles en: <http://www.uga.edu/caur/ppt/EMprep.ppt>
- Las diapositivas B3 y B4 de la diapositiva 13 se han obtenido de página web Virtual Classroom Biology de la Faculty of Science, Mathematics and Computing Sciences de la Radboud University Nijmegen. Está disponible en: http://www.vcbio.science.ru.nl/images/06-tem-ultramicrotome-detail_zoom.jpg y http://www.vcbio.science.ru.nl/images/08-diamond-knife-sectioning_zoom.jpg
- La diapositiva B5 de la diapositiva 14 se han obtenido de página web Virtual Classroom Biology de la Faculty of Science, Mathematics and Computing Sciences de la Radboud University Nijmegen. Está disponible en: http://www.vcbio.science.ru.nl/images/10-tem_grid_zoom.jpg
- La figura B6 y B9 de la diapositiva 14 proceden de la página web de la Division of Human Pathology de la Michigan State University. Está disponible en: <http://www.humanpathology.msu.edu/electronmicro/gallery/slides/fig7.html> y <http://www.humanpathology.msu.edu/electronmicro/gallery/slides/fig9.html>
- Las figuras B7 y B8 de la diapositiva 14 se han obtenido de la presentación de J.P. Shield "Biological sample preparation" de la página Modern Microscopy Technique Resource del Center for Advanced Ultrastructural Research of the University of Georgia. Están disponibles en: <http://www.uga.edu/caur/ppt/EMprep.ppt>
- La figura C1 de la diapositiva 14 se ha obtenido del catálogo de la empresa Grid Tech. Esta disponible en: <http://www.grid-tech.com/catalog.htm>
- Las figuras C2 y C3 de la diapositiva 15 proceden de han obtenido de Molist, P., Pombal, MA, y Megías, M. 2009. Atlas de Histología Vegetal y Animal (On line). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Vigo. Los esquemas se encuentran en las direcciones: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-resina.php> y <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/5-general.php>
- La figura C4 de la diapositiva 16 es de Ricce y ha sido obtenida en Wikimedia Commons. Está disponible en: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simens_numeri.jpg
- La figura C5 de la diapositiva 16 ha sido obtenida de la página web Transmission Electron Microscopy de la University of Cambridge. Está disponible en: <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/tem/printall.php>
- La figura C6 de la diapositiva 16 ha sido obtenida de la página web Daylife. Está disponible en: <http://www.daylife.com/photo/06Pw6ODaZz40a>