

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192721** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.26

(51) Int. Cl. **H01J 37/20** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.02

(54) ВАКУУМНЫЙ АППАРАТ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ФИКСАЦИИ ОБЪЕКТОВ В ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

(96) **2021/031 (AZ) 2021.11.02**

(71) Заявитель:
**ГАСЫМОВ ЭЛЬДАР КОЧЕРИ ОГЛЫ;
АЛИЕВ РАШИД АЛИ ОГЛЫ (AZ)**

(72) Изобретатель:

**Гасымов Эльдар Кочери оглы,
Алиев Рашид Али оглы, Рзаев Фуад
Гусейнали оглы (AZ)**

(74) Представитель:

Гасымов Э.К. (AZ)

(57) Изобретение относится к устройствам, предназначенным для вакуумной подготовки биологических образцов для электронной микроскопии и может быть использовано в различных областях науки, в частности в гистологии. Вакуумный аппарат, используемый для фиксации объектов в электронной микроскопии, состоит из электрической части, включающей контроллер, который поддерживает установленную температуру с точностью до $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$, датчик NTC-10 kom, нагревателя на 500 W внутри ванны, сигнальной лампы, предохранителя на 5 A, включателя сетевого питания и механической части, состоящей из корпуса со следующими частями - водяная баня, верхняя панель, боковые плоскости, камера для образцов, верхняя крышка камеры, прокладка камеры, в вакуумную камеру размещают держатель с образцами, откачку воздуха проводят безмасляным диафрагменным насосом. Устройство имеет следующие технические характеристики: 1) напряжение питания - 220 V, 50 Hz; 2) потребляемая мощность - 600 W; 3) диапазон температурной регулировки 20-90°; 4) точность поддержания температуры $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$; 5) давление в камере - $1 \pm 0,1$ атм; 6) время установления стабильной температуры - 0,3 ч; 7) продолжительность процесса - 1 сутки; 8) вес без воды - 3 кг; 9) габариты - 330×200×170 мм.

A1

202192721

202192721

A1

ВАКУУМНЫЙ АППАРАТ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ФИКСАЦИИ ОБЪЕКТОВ В ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Изобретение относится к устройствам, предназначенным для вакуумной подготовки биологических образцов для электронной микроскопии и может быть использовано в различных областях науки, в частности, в гистологии.

Как известно, целью вакуумной инфильтрации образцов ткани является удаление воздуха из ткани при процессе фиксации материала, ускорение проникновения фиксаторов в ткань и инфильтрация фиксированного материала парафином в вакуумной среде.

В качестве прототипа данного изобретения авторы выбрали устройство для вакуумной обработки гистологического материала [1], главными элементами которого являются терморегулятор и манометр, позволяющие регулировать температуру инфильтрации тканевого материала и контролировать уровень разряжения воздуха в кювете. Несмотря на хорошую сохранность структуры клеток и тканей при микроскопической анализе препаратов, данное устройство имеет ряд недостатков:

1. Данное устройство предназначено для получения срезов с целью фиксации в парафине только при световой микроскопии. Известно, что толщина таких срезов должна быть не менее 5 мкм.

2. После фиксации образцов на данном устройстве не происходит полного обезвоживания материала, в связи с чем невозможно сделать ультратонкий срез на микротоме для проведения электронной микроскопии.

Задачей изобретения является создание устройства, которое бы устранило вышеперечисленные недостатки.

Задача решена тем, что в разработанном вакуумном устройстве нагреватель для равномерного распределения тепла, размещен под камерой на дне водяной бани.

Сущность изобретения состоит в следующем. Прибор состоит из электрической и механической части. Электрическая часть состоит из

контроллера (термостата Enda ET 2411), который поддерживает установленную температуру с точностью до $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ (Фиг. 1D). Температура в объекте измеряется с помощью датчика NTC-10 kom и подается на контроллер для дальнейшей обработки (Фиг. 1B и 3A). Внутри ванны размещен нагреватель на 500 W (Фиг. 4.10), который нагревает водяную баню до установленной температуры на контроллере (Фиг. 4.8). Сигнальная лампа L_1 служит для визуального контроля состояния прибора (Фиг. 1C). С целью безопасности установлен предохранитель F_1 на 5 А, предохраняющий устройство от коротких замыканий в приборе и нагревателе (Фиг. 4.11). K_1 – включатель сетевого питания (Фиг. 4.12).

Механическая часть прибора состоит из корпуса, изготовленного из следующих материалов:

- А) водяная баня – нержавеющая сталь (Фиг. 4.13);
- Б) верхняя панель – нержавеющая сталь (Фиг. 1);
- В) боковые плоскости из пластмассы (Фиг. 1);
- Г) камера для образцов – алюминий (Фиг. 2);
- Д) верхняя крышка камеры из пластмассы (Фиг. 3.2);
- Е) прокладка камеры из силикона (Фиг. 3.4).

В вакуумную камеру размещается держатель N с образцами в количестве 6 штук (Фиг. 2). Откачка воздуха происходит с помощью безмасленного диафрагменного насоса марки KNF 079112. Нагреватель, с целью равномерного распределения тепла, размещен под камерой на дне водяной бани. Контроллер и другие электрические элементы размещаются в пластмассовой коробке над водяной баней с целью исключения попадания воды на электрическую часть.

Технические характеристики:

1. Напряжение питания – 220 V , 50 Hz
2. Потребляемая мощность – 600 W
3. Диапазон температурной регулировки $20^{\circ} - 90^{\circ}$
4. Точность поддержания температуры $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$;
5. Давление в камере – 1 атм $\pm 0,1$ атм.;

6. Время установления стабильной температуры – 0,3 часа;
7. Продолжительность процесса – 1 сутка;
8. Вес без воды – 3 кг;
9. Габариты – $330 \times 200 \times 170$ мм.

Преимущества данного устройства:

1. После фиксации происходит полное обезвоживание образцов, что позволяет получать из них ультратонкие срезы (70-100 нм) на микротоме для проведения электронной микроскопии.

2. В образцах, прошедших фиксацию в вакуумном аппарате, сохраняется целостность окруженных мембраной структур клетки.

Принцип работы устройства отражен на нижеследующем примере.

Пример. Имеющиеся образцы растений фиксируют в растворе фосфатного буфера 0,1М (рН=7,4), 2,5% глутаральдегида, 2% параформальдегида, 4% суркозы, 0,1% пикриновой кислоты и 1% кофеина. Выдерживают как минимум 1 сутки в заявляемом вакуумном аппарате, используемом для фиксации объектов в электронной микроскопии. После извлечения из вакуумного аппарата каждый объект трижды промывают в 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4) по 15 минут (всего 45 минут). На основании методов, принятых для светового и электронного микроскопов [2, 3] на стадии пост фиксации кусочки, содержат в смешанном растворе 1% OsO_4 , 0,1М фосфатного буфера и 1,5% красной кровяной соли. На стадии пост фиксации каждый объект вновь трижды промывают в 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4) по 15 минут (всего 45 минут) и на третьем этапе кусочки подвергают процессу дегидратации. Для этого каждый образец три раза по 15 минут (всего 45 минут) проводят сначала через 50%-ный, а затем соответственно через 70%-ный и 96%-ный этиловый спирт. Далее кусочки каждый по три раза по 15 минут (всего 45 минут) промывают в растворе с равными частями чистого этилового спирта и ацетона. Впоследствии вновь кусочки каждый по три раза по 15 минут (всего 45 минут) фиксируют в чистом ацетоне. Следующий четвертый этап является этапом приготовления блоков. Для этого используют раствор

Аральдид-Эпон, состоящий из 5 компонентов (Эпон-812, DDSA, Аральдид М, Дибуталфталат и DMP-30). Их весовое соотношение меняется в зависимости от количества образцов (Например: для приготовления 10 мл раствора Аральдид-Эпон следует выбрать следующее соотношение состава: 2,5 мл – Эпон-812; 5,5 мл – DDSA; 1,5 мл – Аральдид М; 0,3 мл – Дибуталфталат; 7 капель – DMP-30). Этап приготовления блоков в свою очередь подразделяется на несколько частей. Каждый кусочек содержат:

- а) 1 час в растворе чистый ацетон 75%-ный + Аральдид-Эпон 25%-ный;
- б) 1 час в растворе чистый ацетон 50%-ный + Аральдид-Эпон 50%-ный;
- в) 1 час в растворе чистый ацетон 25%-ный + Аральдид-Эпон 75%-ный;
- г) 1 час в растворе чистого Аральдид-Эпона 100%-ного.

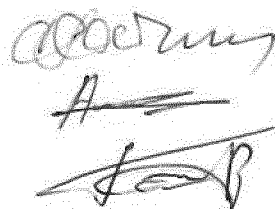
После завершения последнего этапа образцы выкладывают в специально подготовленные и пронумерованные формы и помещают в термостат. Кусочки выдерживают в термостате в течение 1 суток при температуре 37° С, суток 45° С и 1 суток 60 °С (3 сутки). Из полностью готовых блоков на ультрамикротоме Leica EM UC7 изготавливают полутонкие срезы (1 μ). Срезы окрашивают методом двухслойного окрашивания (раствор, а – 0,5% метиленовый синий + 0,5% азур II + 0,5% бура и раствор б – 5% этиловый спирт + 0,1% фуксин). Полутонкие срезы просматривают под световым микроскопом Zeiss и делаются фотографии нужных областей с помощью цифрового фотоаппарата Canon D650 (Япония). После этого, просматривая с помощью светового микроскопа, из необходимых частей выбранных областей полутонких срезов составляют пирамиды, изготавливают ультратонкие серебряные и золотые срезы толщиной 50-80 nm на указанном выше ультрамикротоме и собирают в grids (сетки).

Для того, чтобы просматривать на трансмиссионном электронном микроскопе срезы выдерживают в растворе 2%-ного уранил-ацетата в течение 15 минут и окрашивают приготовленным в 0,1 М растворе NaOH 0,6% чистом плюмбум-цитратом в течение 0,5-1 минуты. Ультратонкие срезы исследуют под напряжением 80-120 KV под трансмиссионным электронным микроскопом JEM-1400 (JOEL-Япония) и с помощью боковой камеры (Veleta) делаются

электронограммы. Морфометрический анализ описания выполняется при помощи компьютерной программы (The TEM imaging platform), созданной компанией «Olympus Soft Imaging Solutions GmbH» на электронограммах, сделанных в формате TIF.

На нижеследующей фигуре 5 представлены сравнительные фотографии со светового (А, В, D, E) и электронного (С, F, G, H) микроскопов различных частей растений, сделанные после фиксации без вакуума (левый столбик – А, В, С, G) и фиксации в вакуумном аппарате, изготовленном нами (правый столбик – D, E, F, H), при том, что не производилось никаких изменений в составе реактивов, использующихся в процессе фиксации. Значительная деформация клеточных и неклеточных элементов растений, прошедших фиксацию без вакуума, хорошо видна и на световом (А, В) и на электронном микроскопе (С, G). На ультраструктурном уровне наблюдается нарушение целостности мембраны, окружающей вакуоли (С), которые участвуют в формировании и создании объема растительных клеток, структурных элементов хлоропластов (G), связей между хлоропластами и других органелл, находящихся в цитоплазме (в частности, нарушение целостности крист митохондрий). В противоположность описанному, как световом (D, E), так и в ультраструктурном уровнях (F, H) в образцах, прошедших фиксацию в вакуумном аппарате, в окруженных мембраной структурах клетки, не наблюдается заметных изменений. Необходимо отметить, что структура хлоропластов, отличающихся наличием мембранной структуры и сложностью элементов матрикса выявляется только у растений, прошедших фиксацию с участием вакуумного аппарата (F, H).

Авторы:



Гасымов Э.К.

Алиев Р.А.

Рзаев Ф.Г.

Литература

1. Буданцев А.Ю. Устройство для вакуумной обработки гистологического материала // Цитология, 2015, т.57, №10, с. 742-745.
2. D'Amico F. A polychromatic staining method for epoxy embedded tissue: a new combination of methylene blue and basic fuchsin for light microscopy // Biotech Histochem., 2005; 80(5–6):207–10.
3. Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2007, 625 p.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ВЕЩЕСТВА И АППАРАТУРА

1. Фосфатный буфер 0,1М (рН=7,4);
2. 2,5% глютаральдегид;
3. 2% параформалальдегид;
4. 4% суркоза;
5. 0,1% пикриновая кислота;
6. 1% кофеин.
7. 1% OsO₄;
8. 1,5% красная кровяная соль;
9. 50%, 70%, 90%-ный этиловый спирт;
10. Ацетон;
11. Раствор Аральдид-Эпон;
12. Термостат;
13. Ультрамикротом Leica EM UC7;
14. 0,5% метиленовый синий;
15. 0,5% азур II;
16. 0,5% бур;
15. 0,1% фуксин;
16. Световой микроскоп Zeiss;
17. Цифровой фотоаппарат Canon D650 (Япония);
18. Раствор 2%-ного уранил-ацетата;
19. 0,1 М раствор NaOH 0,6%;
20. Чистый плюмбум-цитрат;
21. Трансмиссионный электронный микроскоп JEM-1400 (JOEL-Япония);
22. Боковая камера (Veleta).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вакуумный аппарат, используемый для фиксации объектов в электронной микроскопии, состоящий из электрической части, включающей контроллер, который поддерживает установленную температуру с точностью до $\pm 1,5^0$ C, датчик NTC-10 kom, нагревателя на 500 W внутри ванны, сигнальной лампы, предохранителя на 5 A, включателя сетевого питания и механической части, состоящей из корпуса со следующими частями – водяная баня, верхняя панель, боковые плоскости, камера для образцов, верхняя крышка камеры, прокладка камеры, в вакуумную камеру размещают держатель с образцами, откачку воздуха проводят безмасленным диафрагменным насосом, отличающийся следующими техническими характеристиками:

1. Напряжение питания – 220 V , 50 Hz;
2. Потребляемая мощность – 600 W;
3. Диапазон температурной регулировки $20^0 - 90^0$;
4. Точность поддержания температуры $\pm 1,5^0$ C;
5. Давление в камере – 1 атм $\pm 0,1$ атм.;
6. Время установления стабильной температуры – 0,3 часа;
7. Продолжительность процесса – 1 сутка;
8. Вес без воды – 3 кг;
9. Габариты – 330 × 200×170 мм.

Авторы:



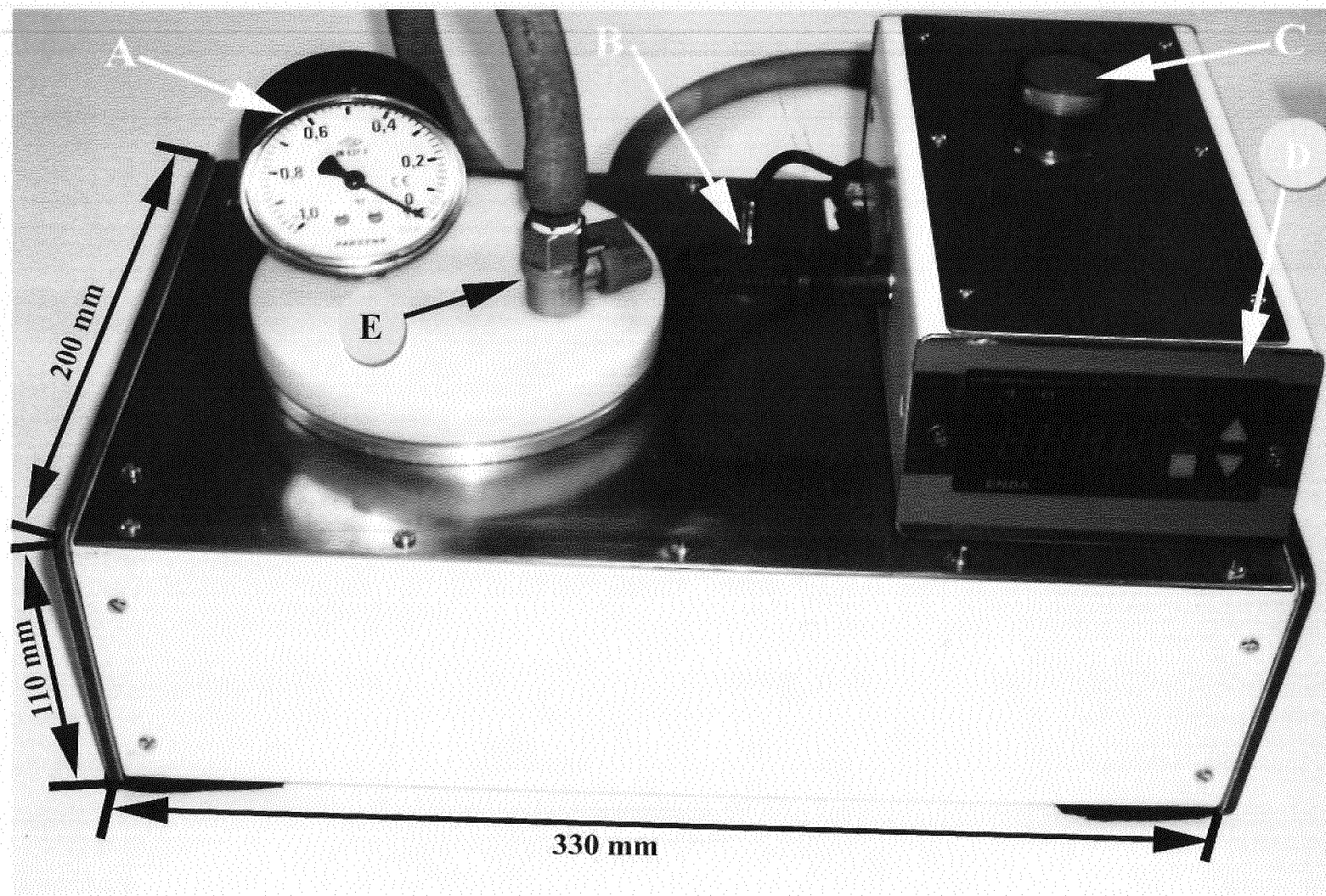
Гасымов Э.К.



Алиев Р.А.

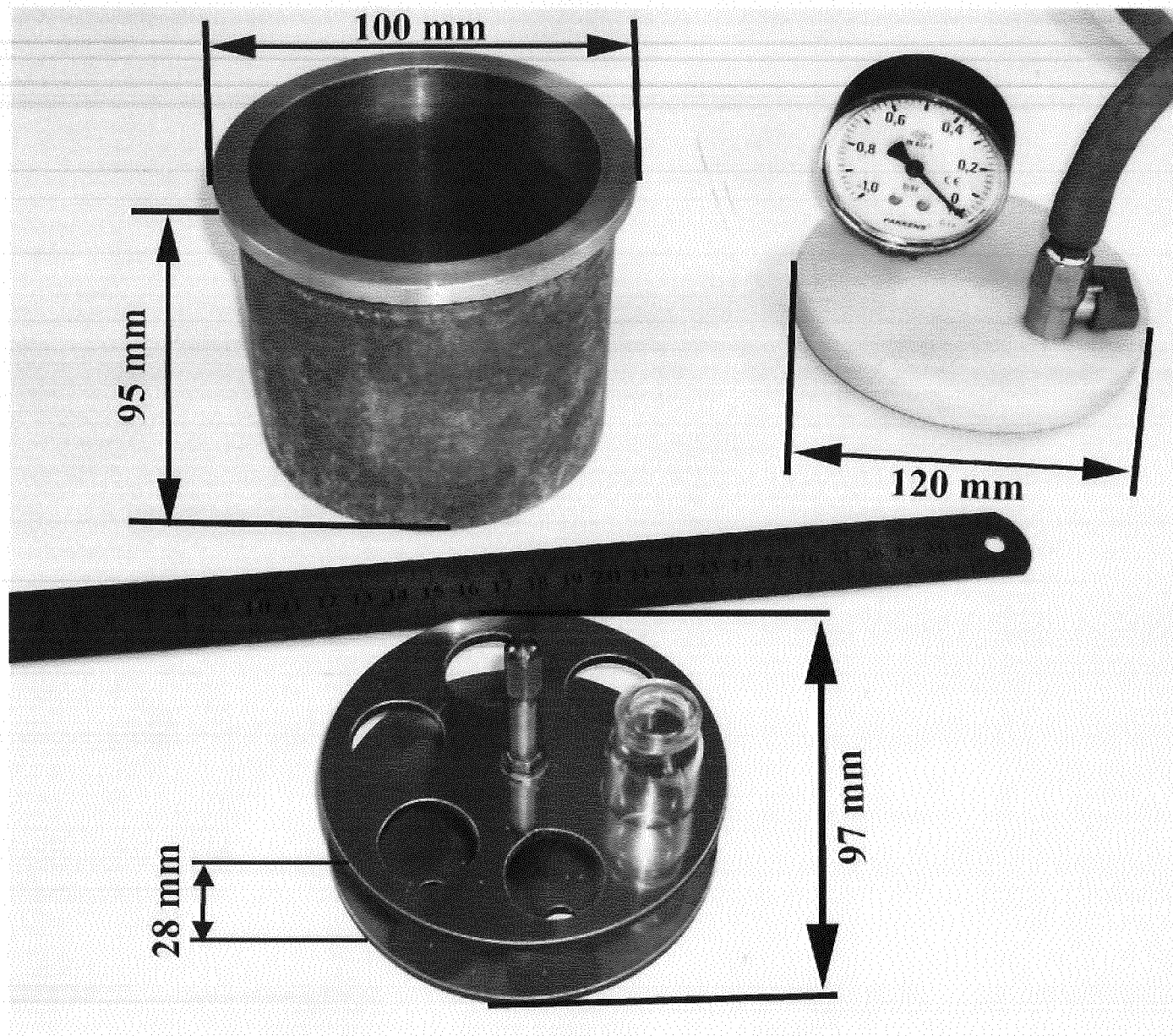


Рзаев Ф.Г.

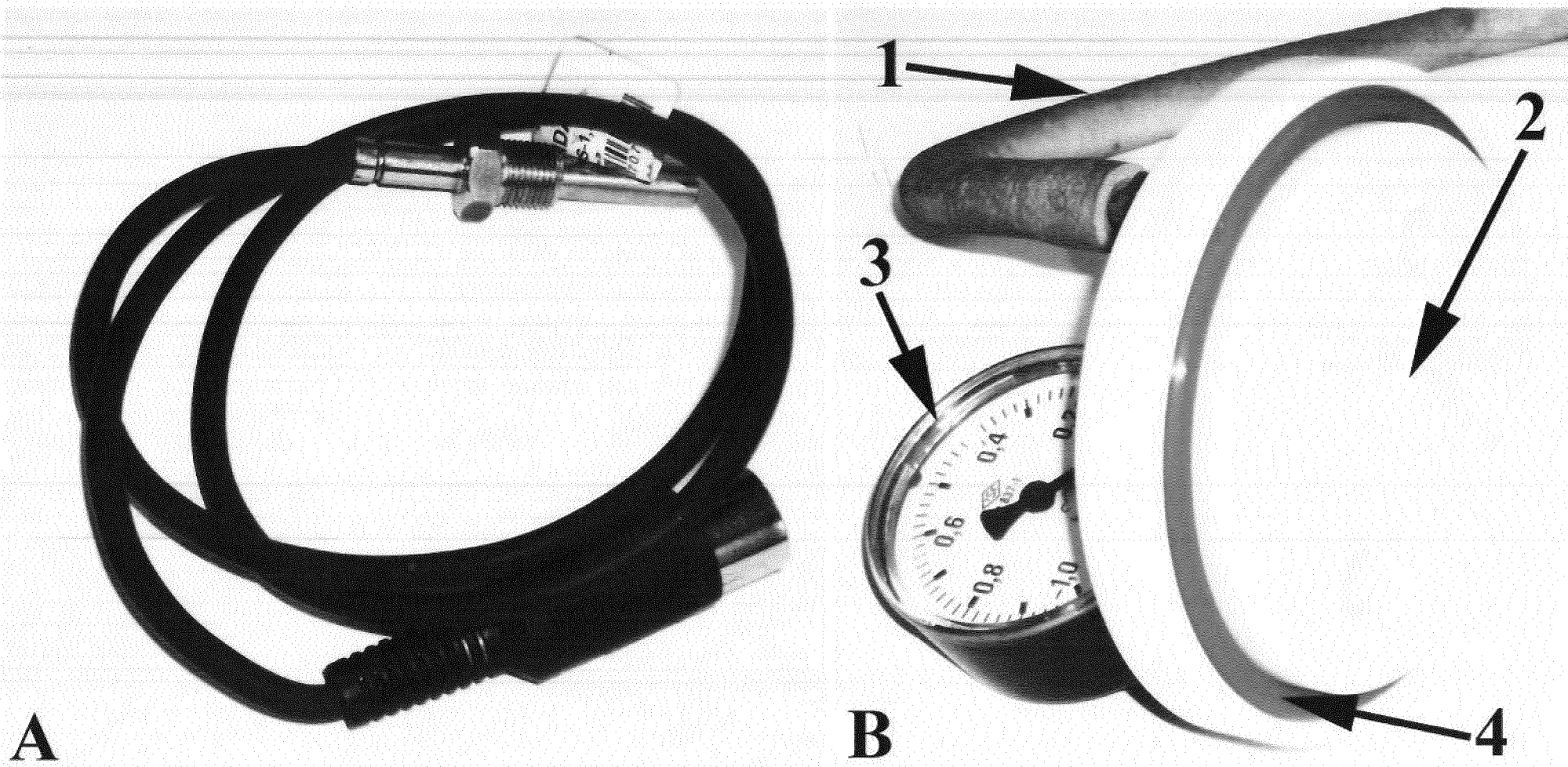


Фигура 1. Общий вид вакуумного аппарата.

A – Монометр, B – Термосенсор (NTC), C – Сигнальная лампа, D – Контроллер, E – Вакуумный кран



Фигура 2. Части вакуумного аппарата

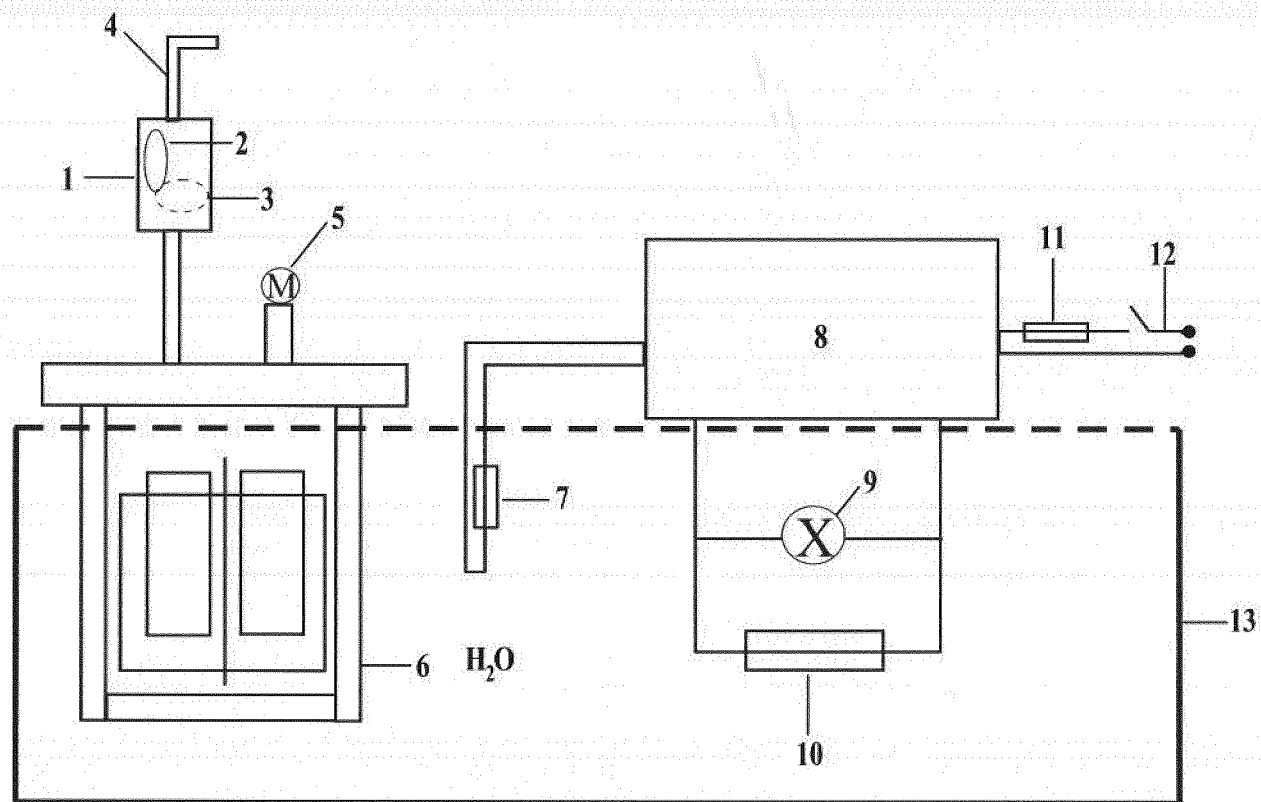


Фигура 3. Части вакуумного аппарата.

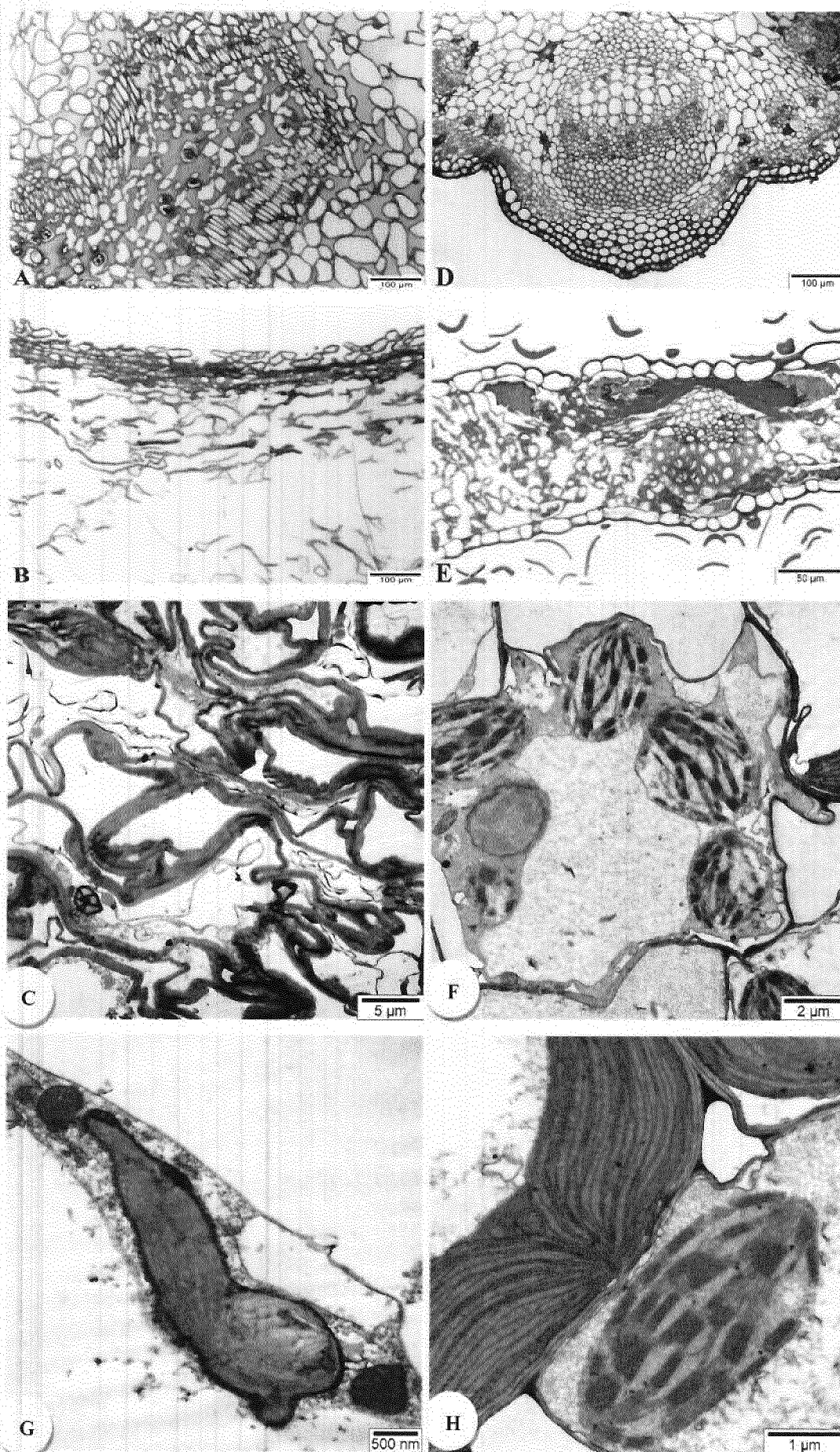
А – Температурный сенсор (NTC-10 kom), В – Верхняя крышка камеры,

1 – Шланг верхней крышки, 2 – Крышка камеры, 3 – Манометр, 4 – Прокладка из силикона

СХЕМА ПРИБОРА



Фигура 4. 1 – Вакуумный кран (Vk), 2 – ON, 3 – OFF, 4 – Шланг вакуумного насоса, 5 – Манометр, 6 – Камера, 7 – Температурный сенсор, 8 – Контроллер, 9 – Сигнальная лампа, 10 – Нагреватель, 11 – Предохранитель, 12 – Включатель сетевого питания, 13 – Нержавеющая ванна



Фигура 5. Фотографии светового (A, B, D, E) и электронного (C, F, G, H) микроскопов объектов, зафиксированных при помощи вакуумного аппарата, регулирующегося температурным режимом (правый столбец – D, E, F, H) и без него (левый столбец - A, B, C, G)

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202192721

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
H01J 37/20 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
H01J 37/20, C12M 3/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y, D	БУДАНЦЕВ А.Ю. Устройство для вакуумной обработки гистологического материала. ЦИТОЛОГИЯ, 2015, т.57, №10, с.742-744	1
Y	RU 2564250 C2 (КСОМА (ЮЭС)ЭЛ ЭЛСИ) 27.09.2015, с.15, стр.1	1
A	RU 2710049 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ЛАБОРАТОРИЯ ИМЕНИ ВЛАДИМИРА АНАТОЛЬЕВИЧА БУРЦЕВА") 24.12.2019	1
A	US 2009/0181448 A1 (YUBO FAN) 16.07.2009	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

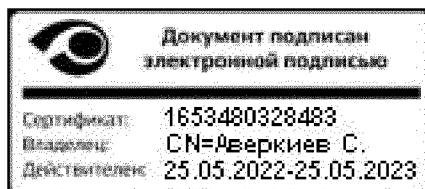
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 13 сентября 2022 (13.09.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев