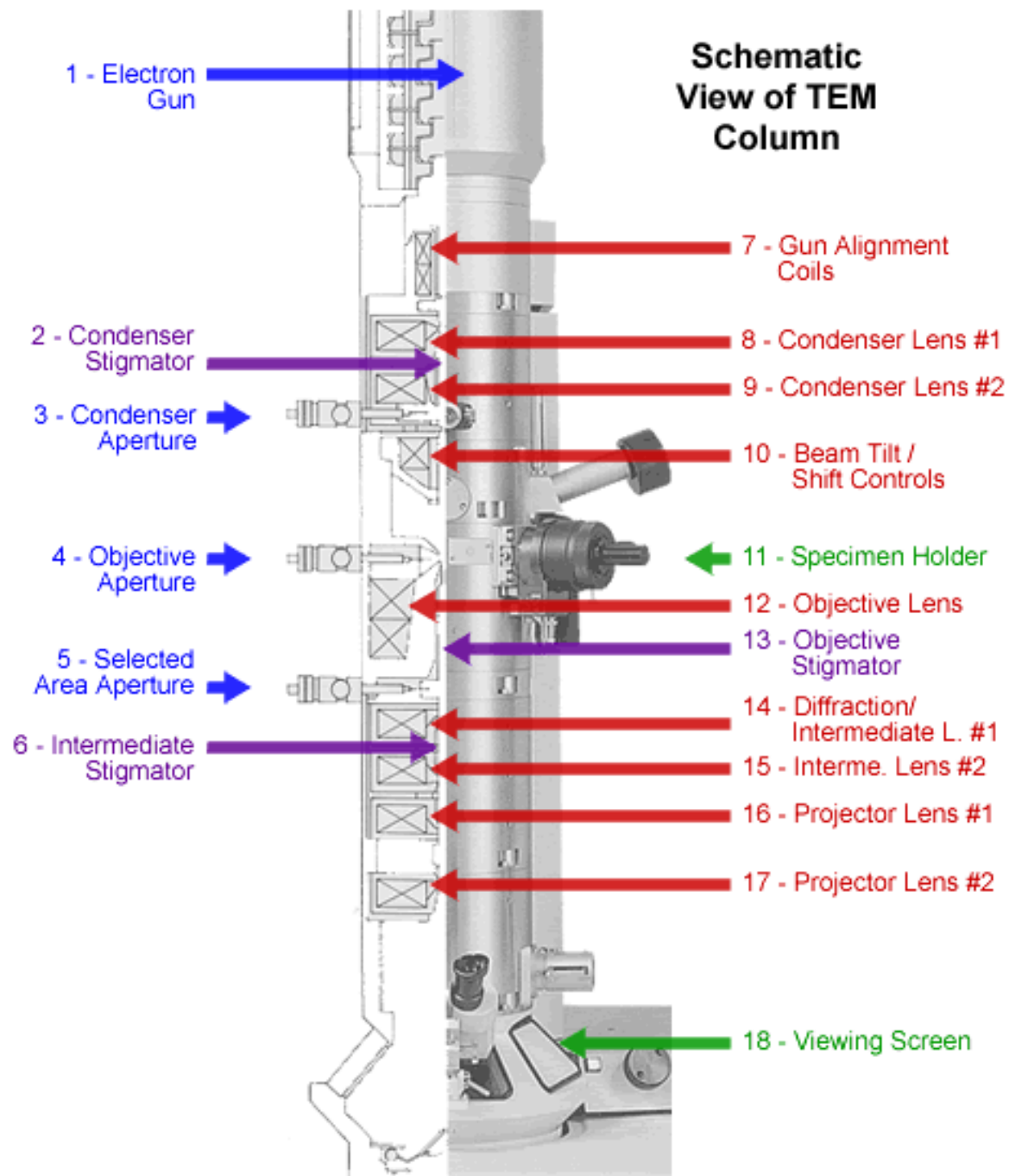


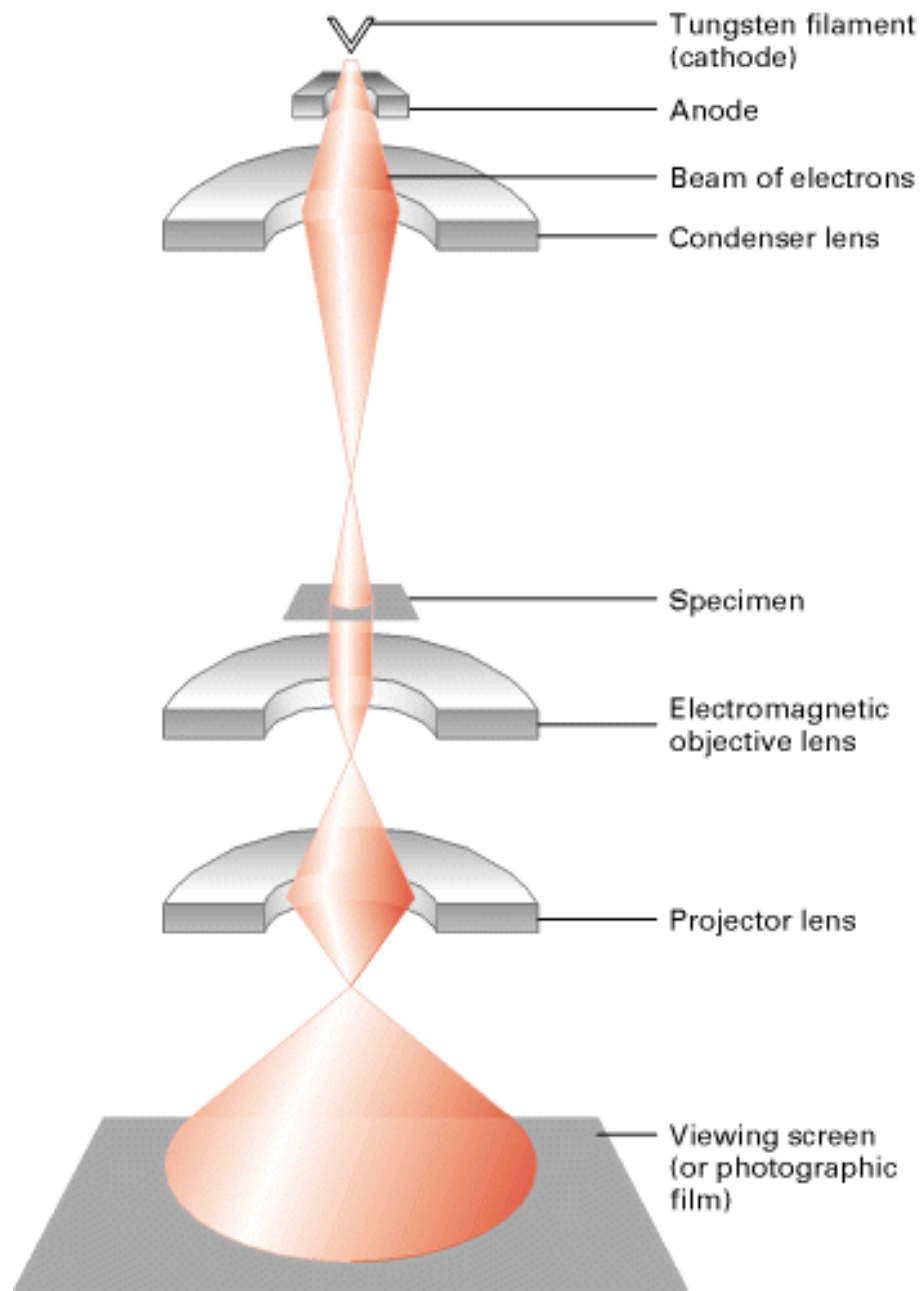
Transmission Electron Microscopy



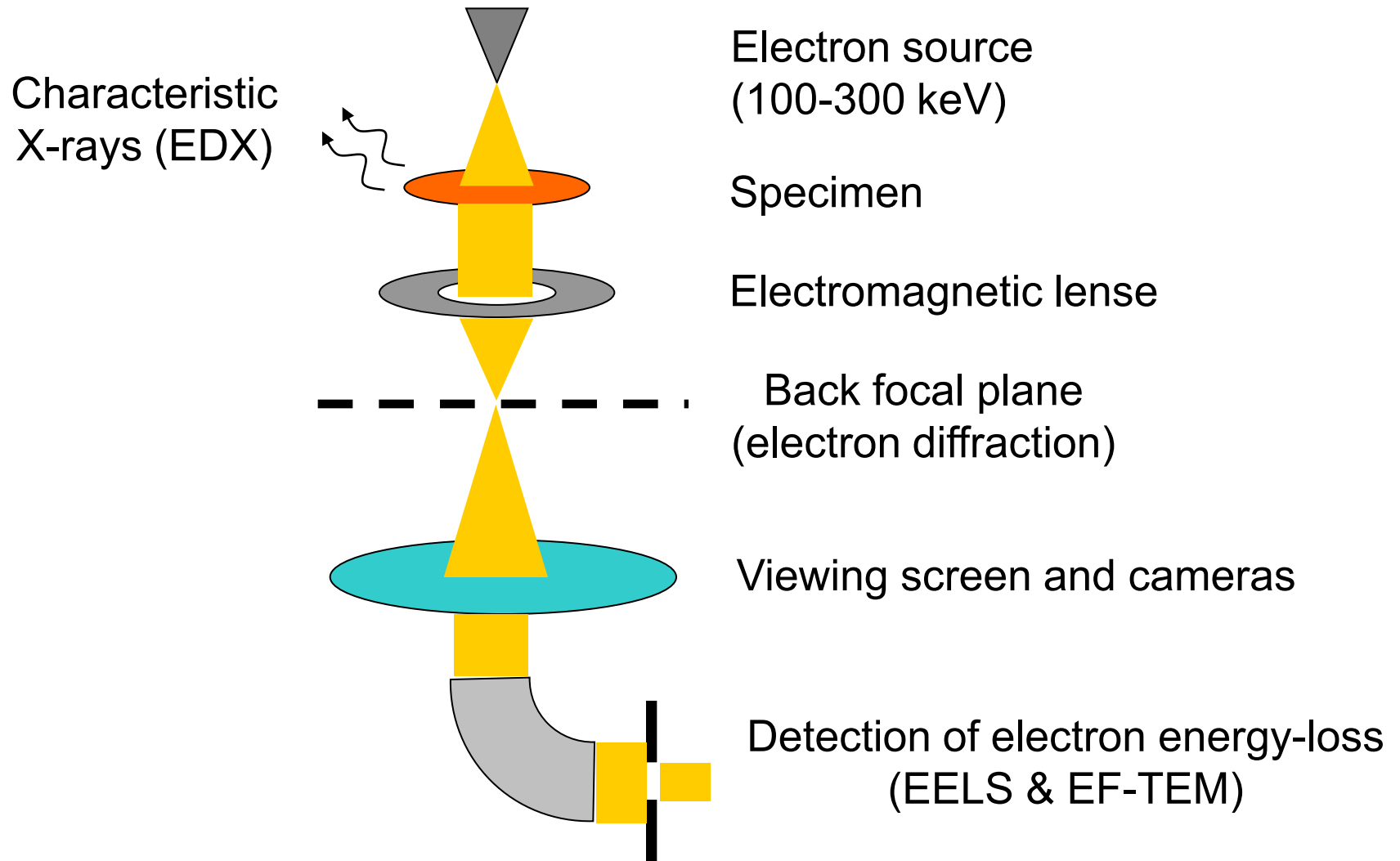
The Hitachi H-8100 TEM at the CNLME

Schematic View of TEM Column





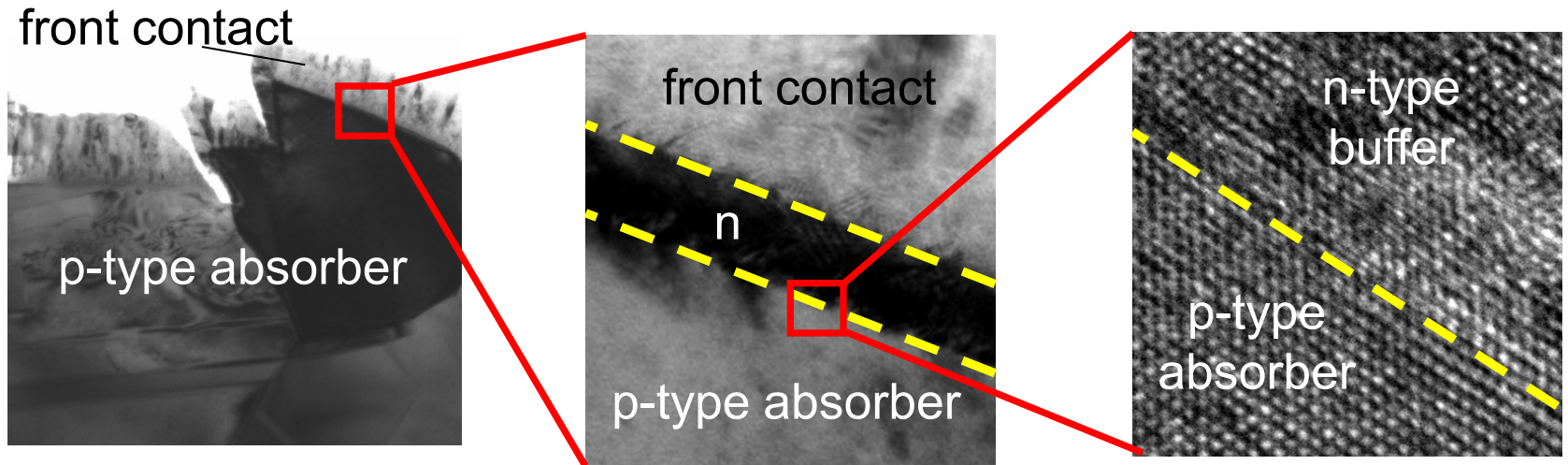
Setup di un microscopio TEM



Modi di utilizzo del TEM

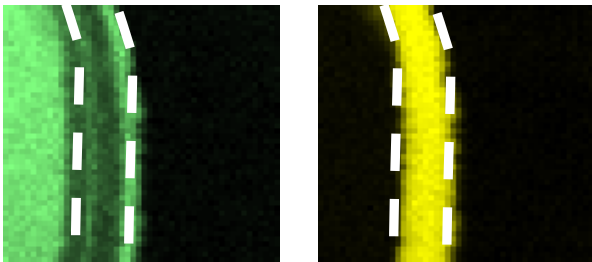
- **Imaging Mode: formazione dell'immagine**
- **Diffraction Mode: figura di diffrazione**
- **HRTEM : Alta risoluzione**
- **EDX: raggi X, composizione del materiale**

Che cosa si può rilevare con il TEM?

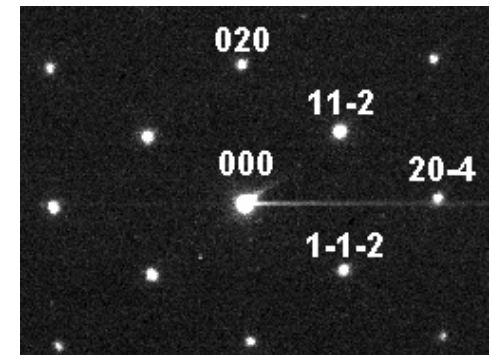


Interface formation: by bright-field, dark-field and high-resolution TEM

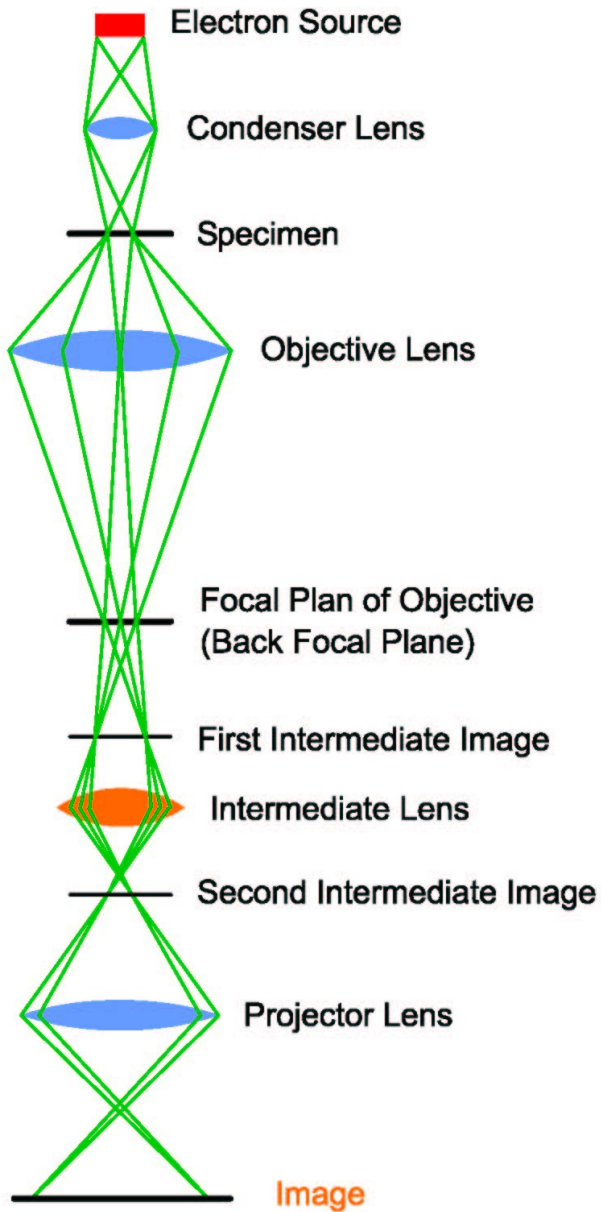
Diffusione: EDX o EFTEM



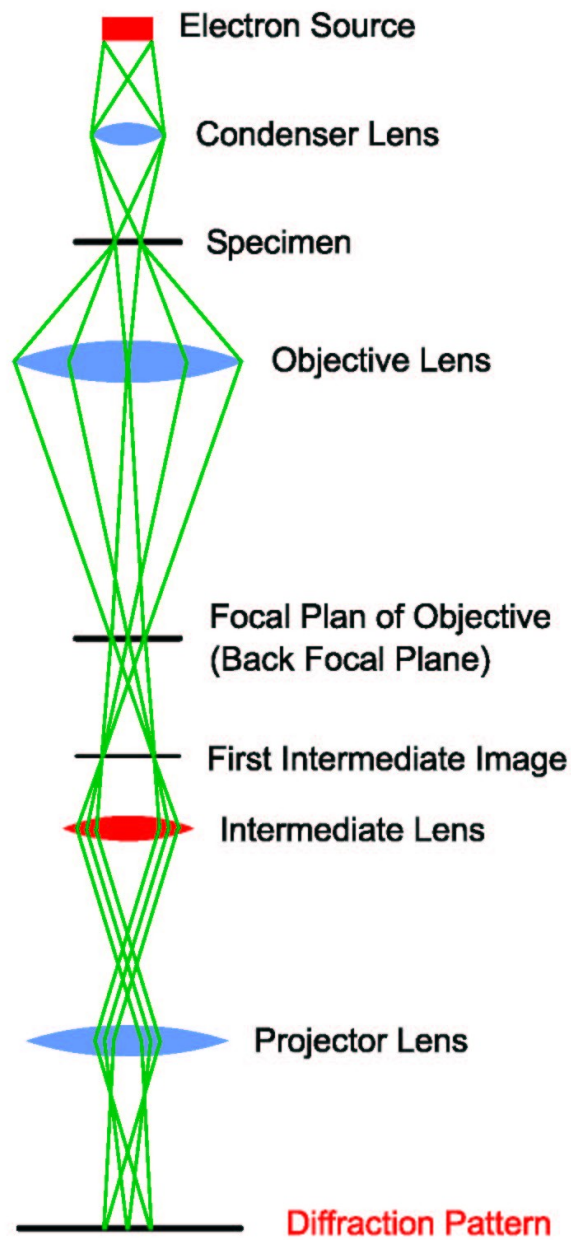
Orientazione
e struttura :
diffrazione
elettronica



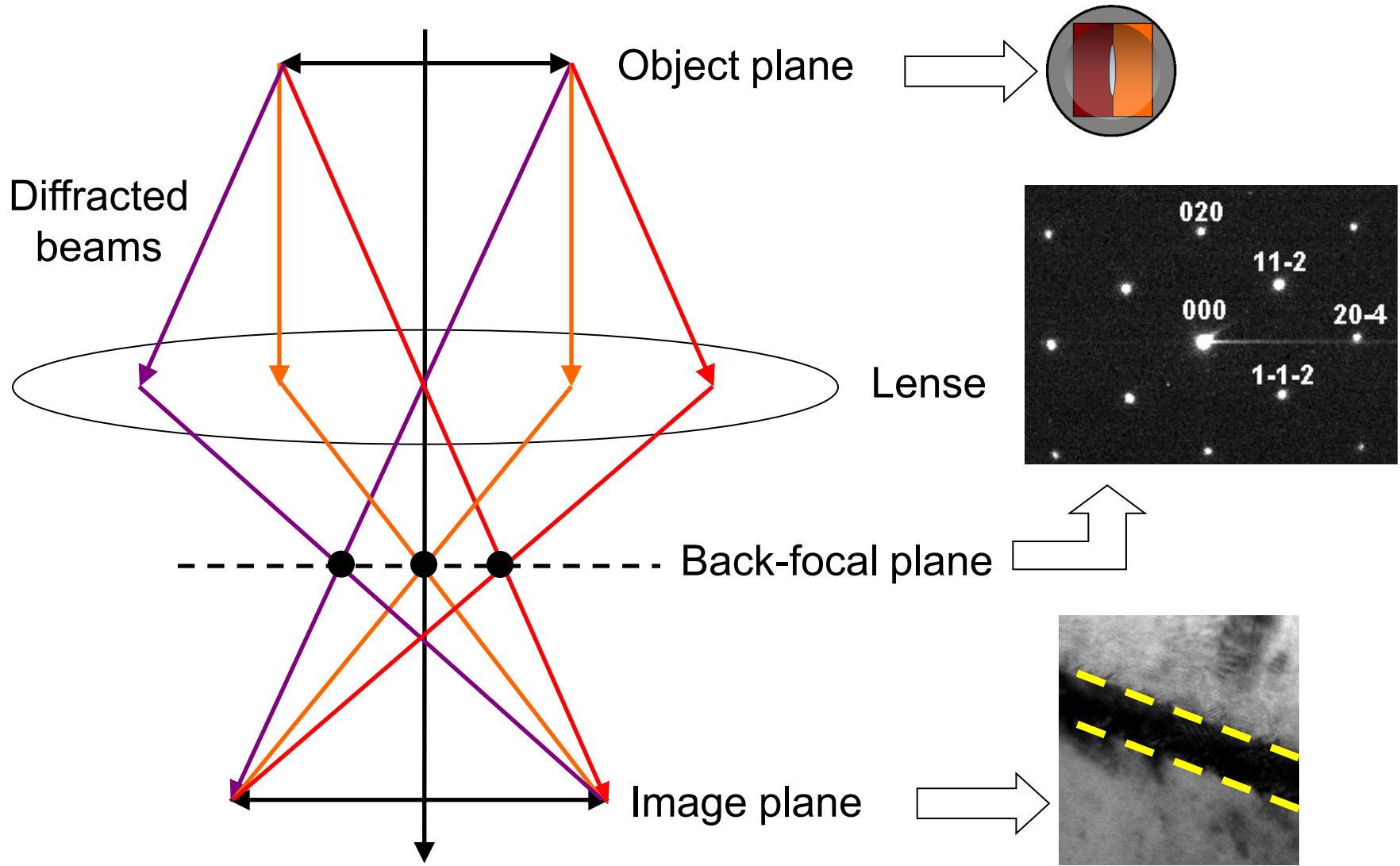
IMAGING MODE



DIFFRACTION MODE

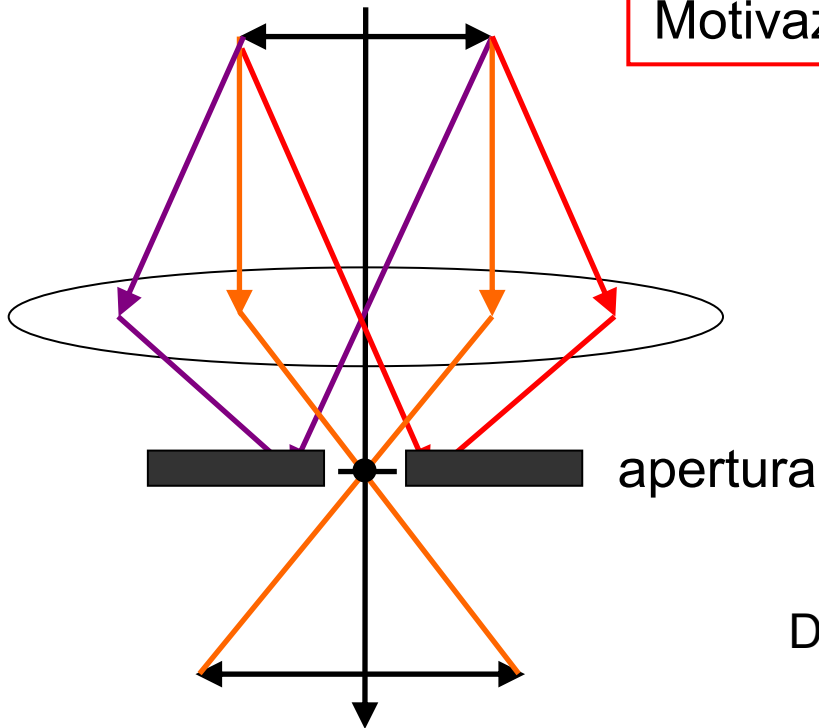


Imaging: Basics of optics

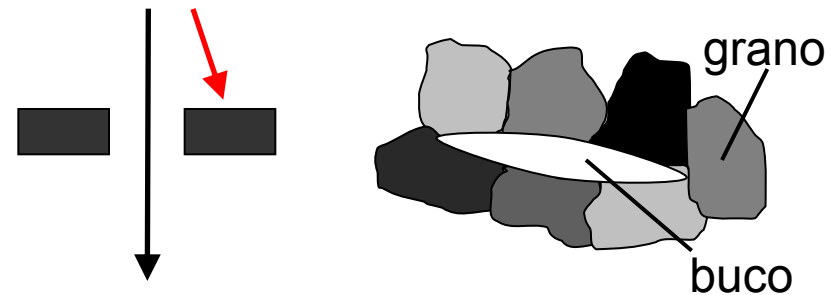


Imaging: bright-field and dark-field

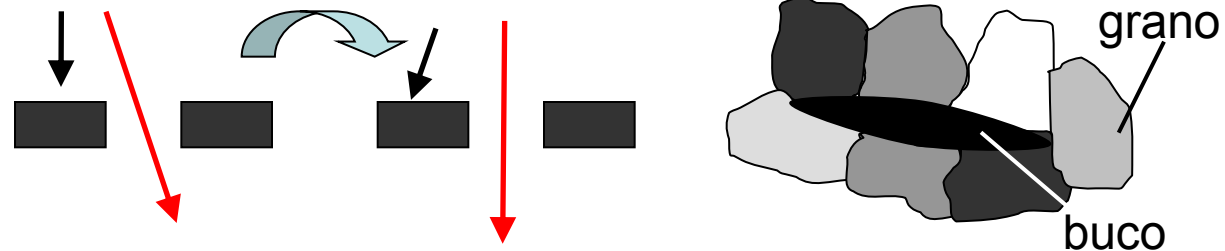
Motivazione: aumento del contrasto nell'immagine



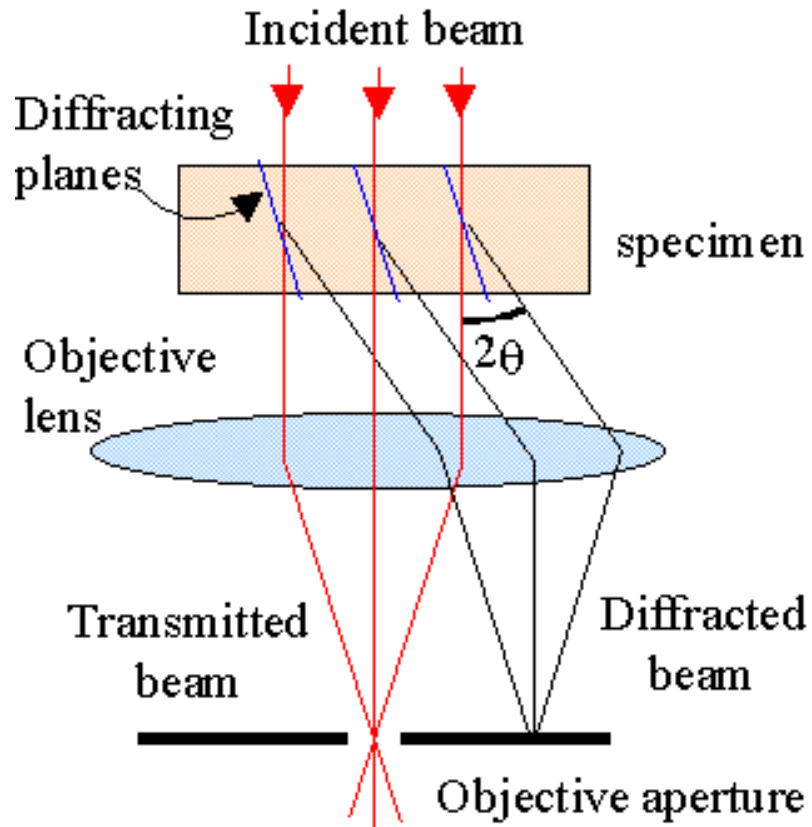
Bright-field: Apertura attorno al fascio diretto



Dark-field: Apertura attorno al fascio diffratto, ruotando il fascio attorno all'asse ottico

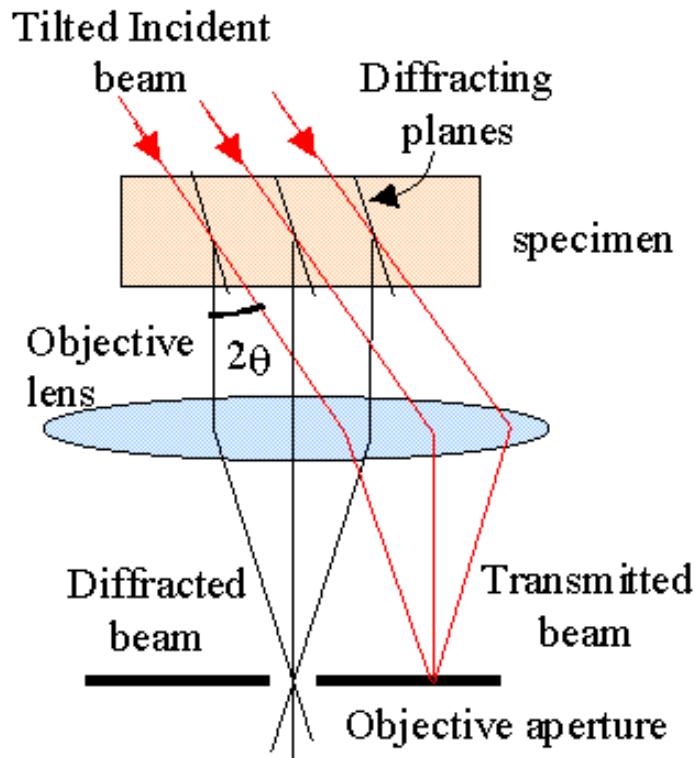


Imagine: modo „Bright field“

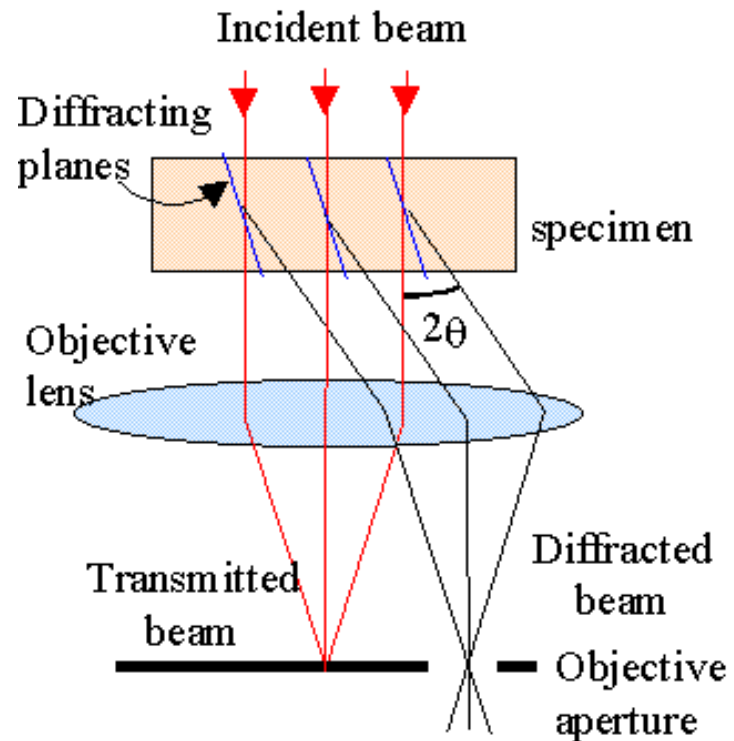


Bright Field Imaging

Imagine: modo „Dark field“



On-axis Dark Field



Off-axis Dark Field

Microscopio a trasmissione elettronica ad alta risoluzione

HRTEM :

High resolution Transmission Electron Microscopy

Per ottenere immagini del reticolo si deve scegliere un obiettivo grande che lascia passare molti fasci inclusi quelli diretti.

L'immagine è formata dall'interferenza dei raggi diffratti con i raggi diretti (contrasto di fase).

Se la risoluzione puntuale del microscopio è sufficientemente alta ed il campione è orientato lungo l'asse di zona, allora è possibile ottenere immagini ad alta risoluzione. In molti casi, la struttura atomica del campione può essere direttamente investigata con HRTEM.

Microscopio a trasmissione elettronica ad alta risoluzione

HRTEM :

High resolution Transmission Electron Microscopy

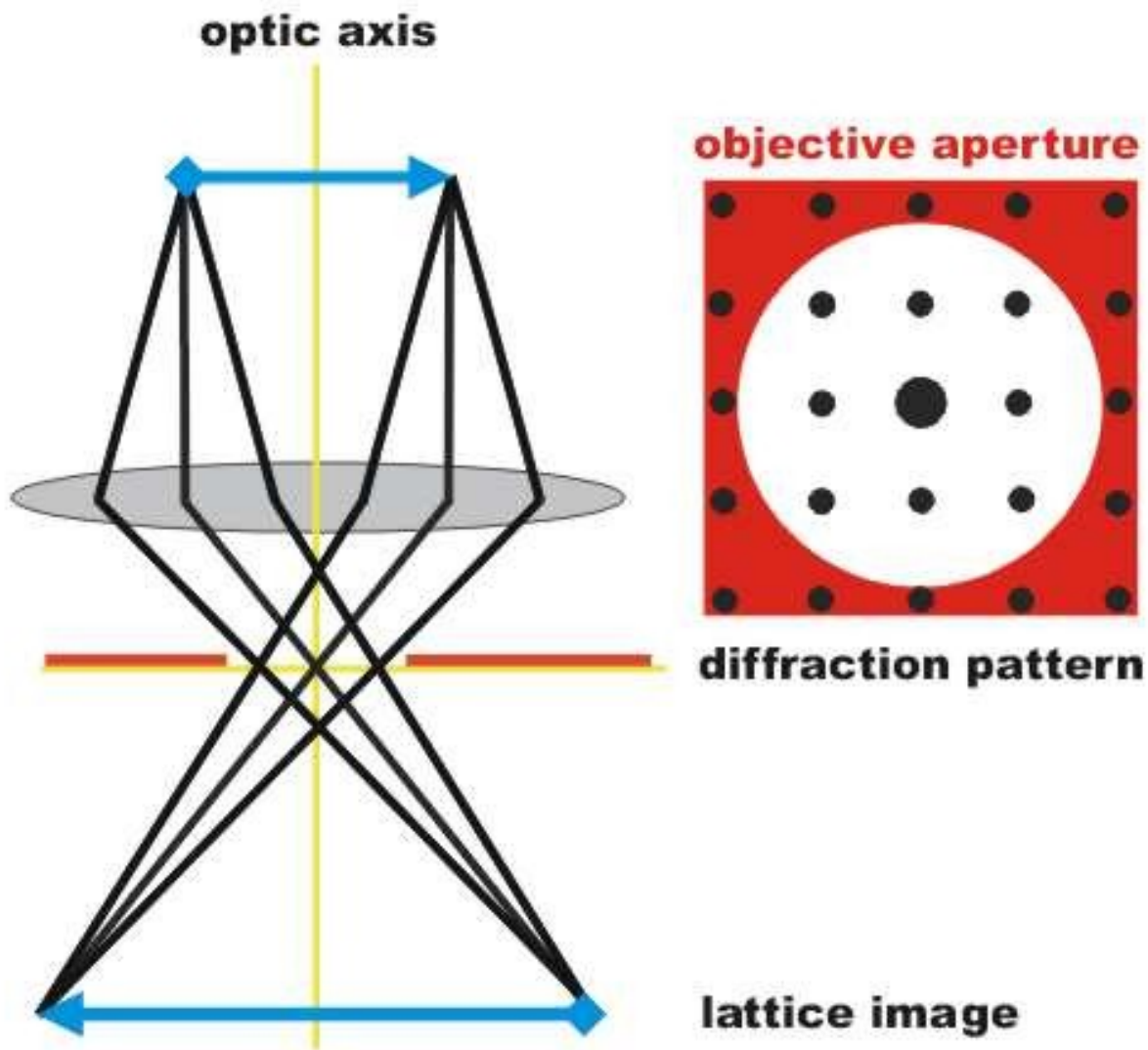
L'onda elettronica incidente parallela e la sua risultante modulazione della sua fase e ampiezza sono presenti nell'onda elettronica quando passano attraverso il campione.

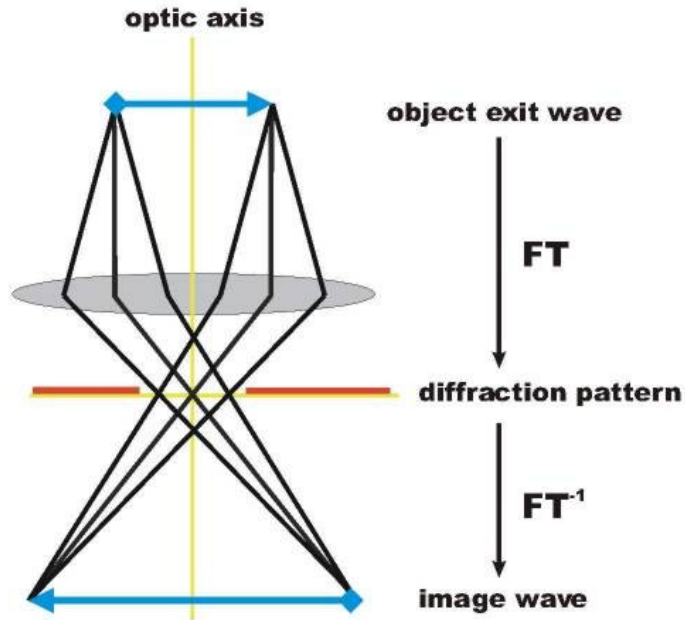
Quindi l'onda uscente contiene le informazioni sulla struttura degli oggetti.

Le lenti dell'obiettivo danno:

La **trasformata di Fourier** che crea la figura di diffrazione del campione sul piano focale.

La **trasformata di Fourier** inversa che fa dell'interferenza dei fasci diffratti un'immagine reale sul piano dell'immagine.





La trasformata di Fourier di una funzione $f(x)$ è definita come:

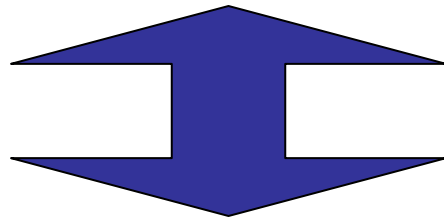
$$F\{f(x)\} = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) e^{-2i\pi qx} dx$$

L'elaborazione dell'immagine in uno spazio di Fourier è condotta nello stesso modo della formazione dell'immagine nel TEM:

1. La trasformata di Fourier di una immagine viene calcolata per esempio una immagine HRTEM. Strutture periodiche nell'immagine danno origine a punti chiari che compongono il pattern di diffrazione.
2. Si possono usare maschere che filtrino alcuni punti invece di altri (altre informazioni nello spazio reciproco) che poi vanno a contribuire all'immagine formata dalla trasformata di Fourier inversa .
3. Viene poi calcolata una immagine di Fourier inversa. .

$$f(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(k) e^{2\pi i k x} dk$$

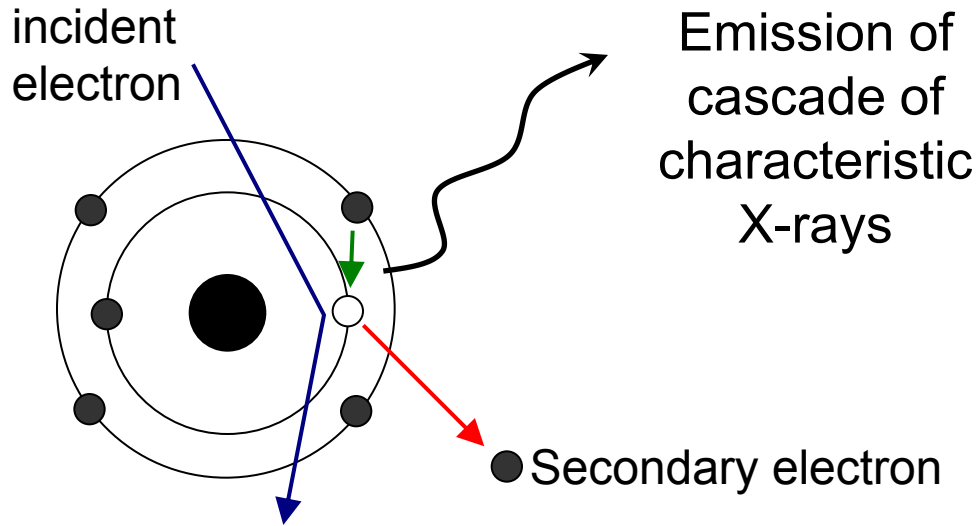
Trasformata di Fourier



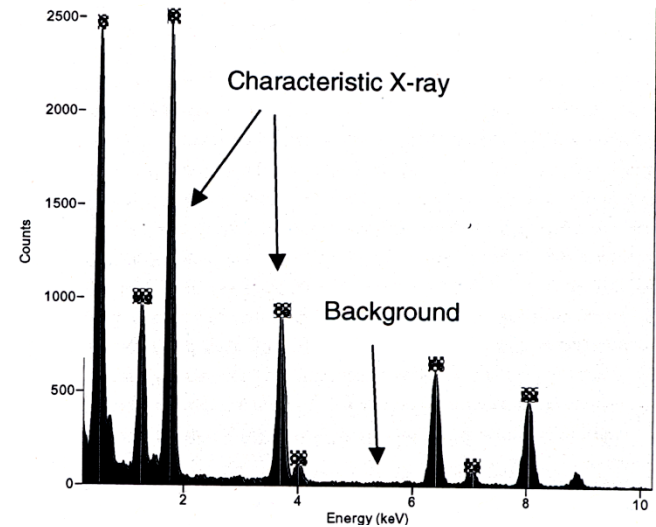
$$F(k) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) e^{-2\pi i k x} dx$$

Trasformata di Fourier inversa

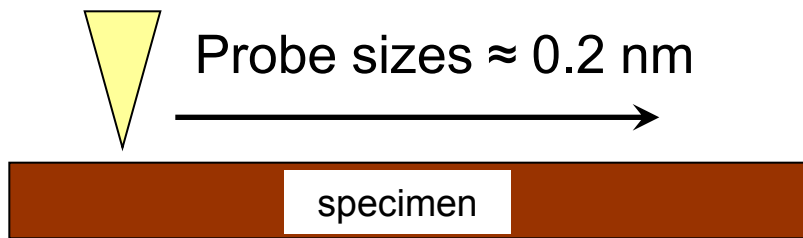
Spectrometry: EDX



Example spectrum:

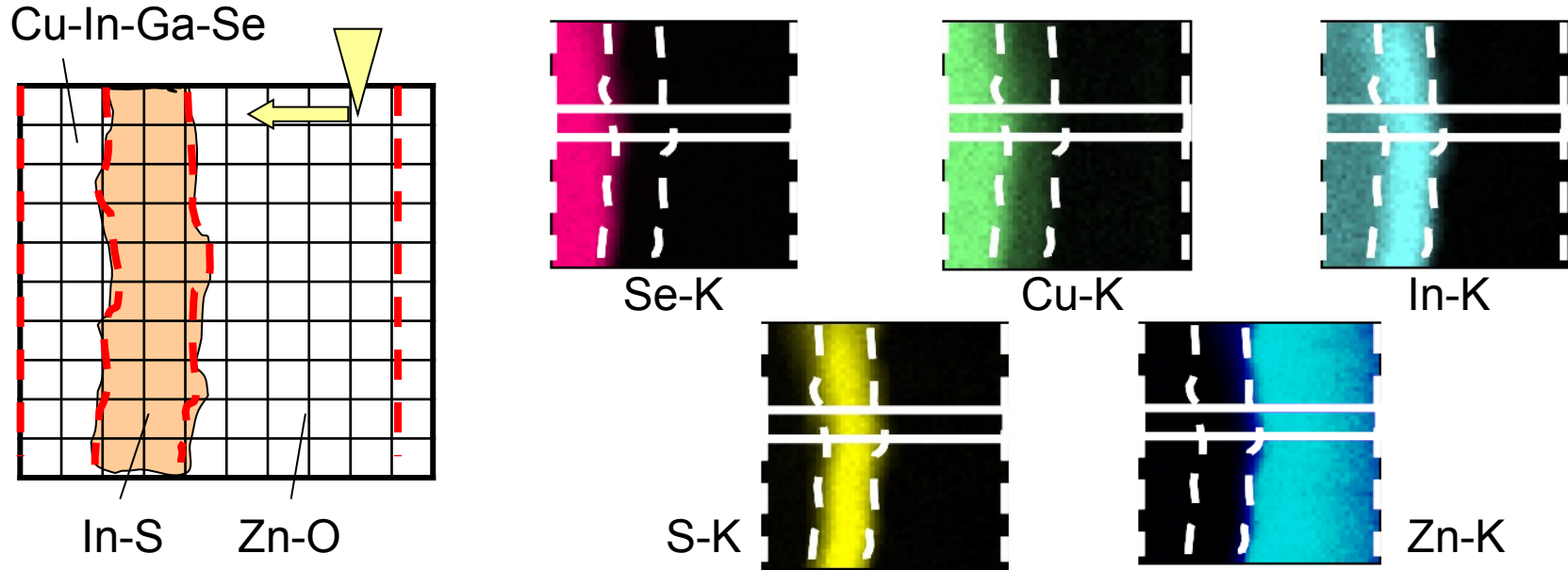


Scanning mode of the microscope (STEM):



Contamination layers on the specimen broaden the probe size slightly!

Spectrometry: Elemental mapping from EDX

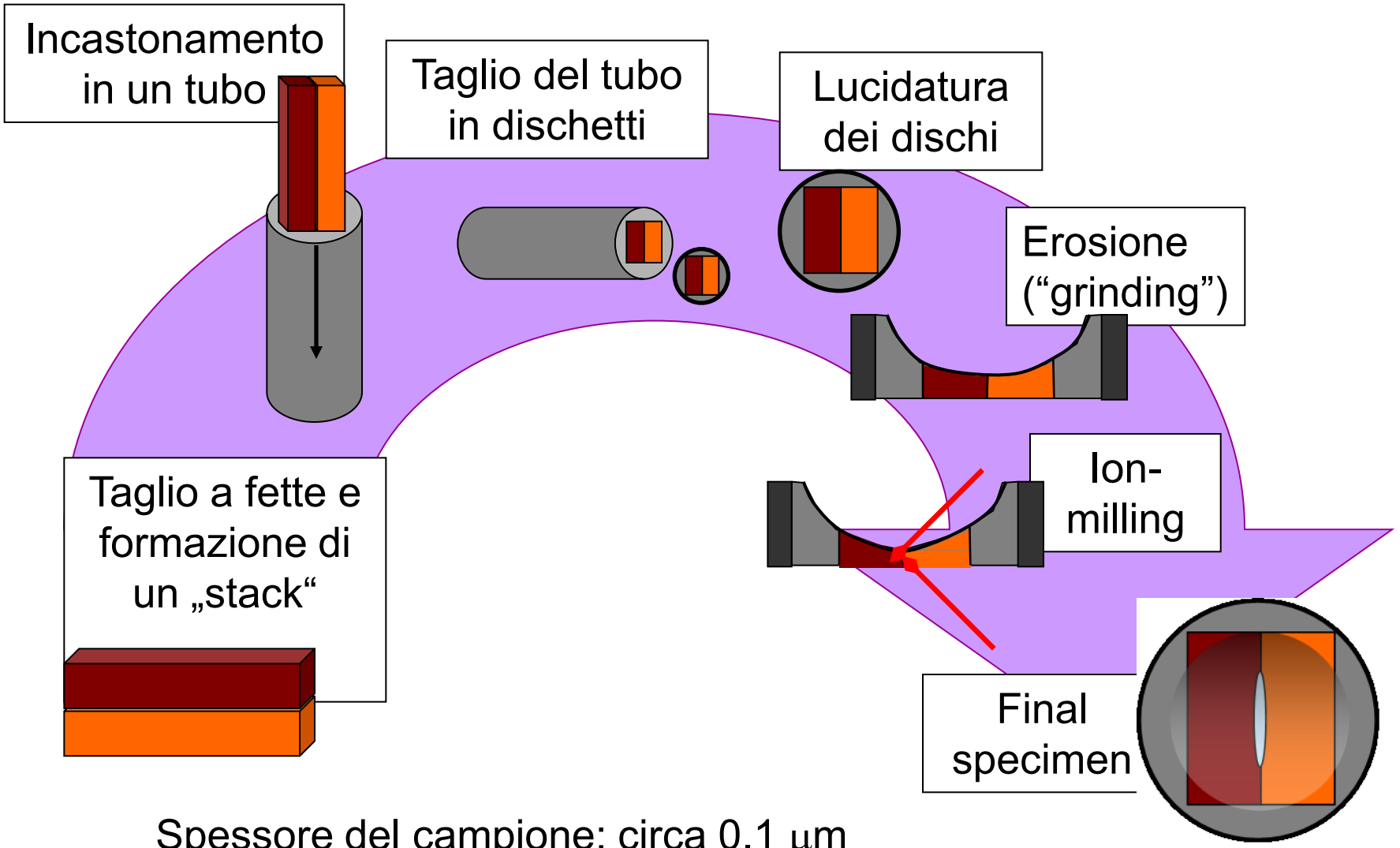


Principle of line scans & elemental mapping

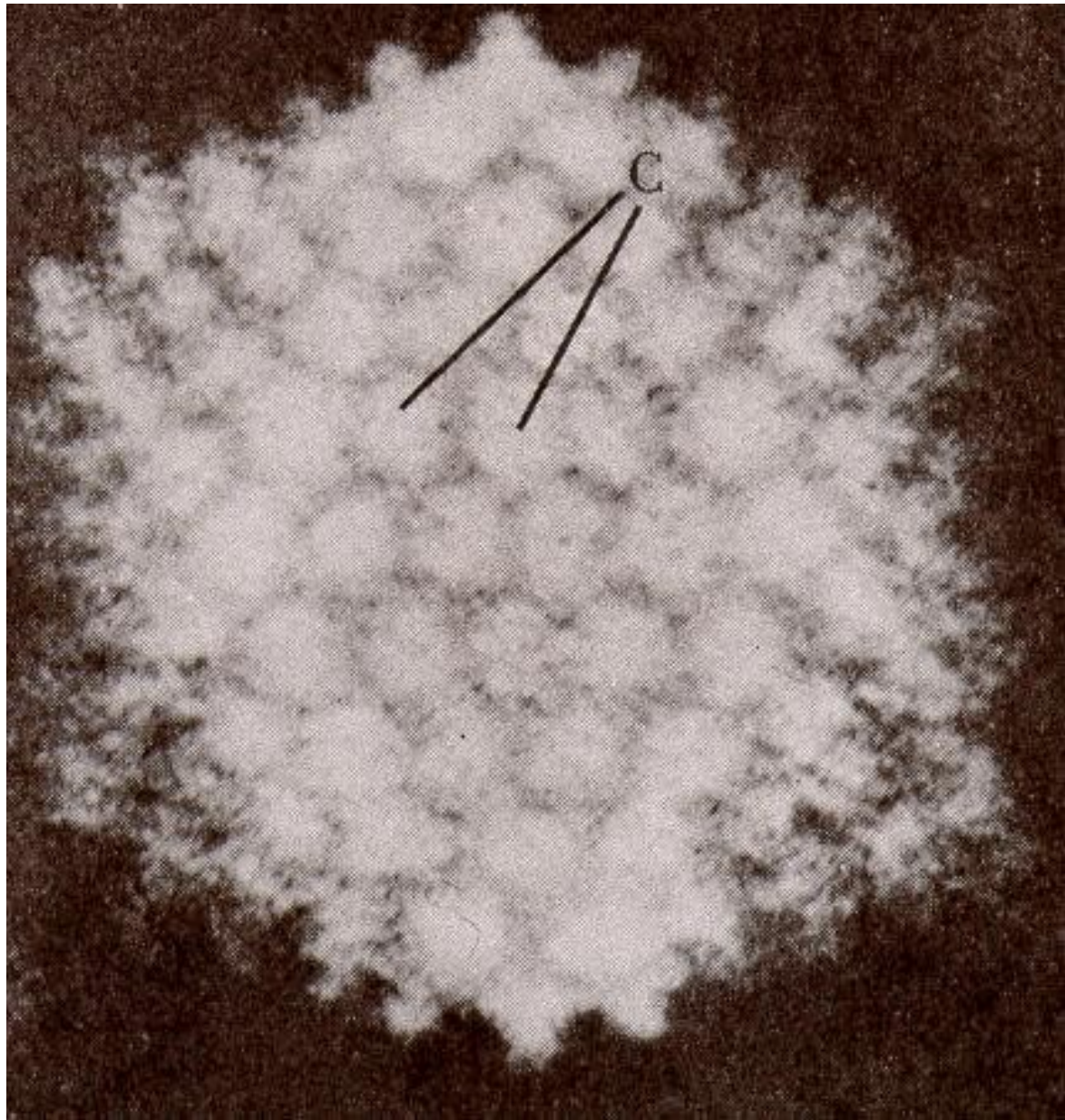
Better accuracy than line-scans: summing up several distribution profiles (frames)

⇒ *Qualitative* information of chemical features (e.g., interdiffusion)
Quantification is **very** difficult!

Preparazione del campione



Adenovirus
650,000 X



Problemi

TEM non utilizzato dai biologi prima del 1950

Considerazioni per il TEM-

- Alto vuoto

- Supporto per il campione

- Elevato calore dal fascio

- Campione capace di emettere il segnale

- Profondità della penetrazione degli elettroni

Considerazioni per il SEM-

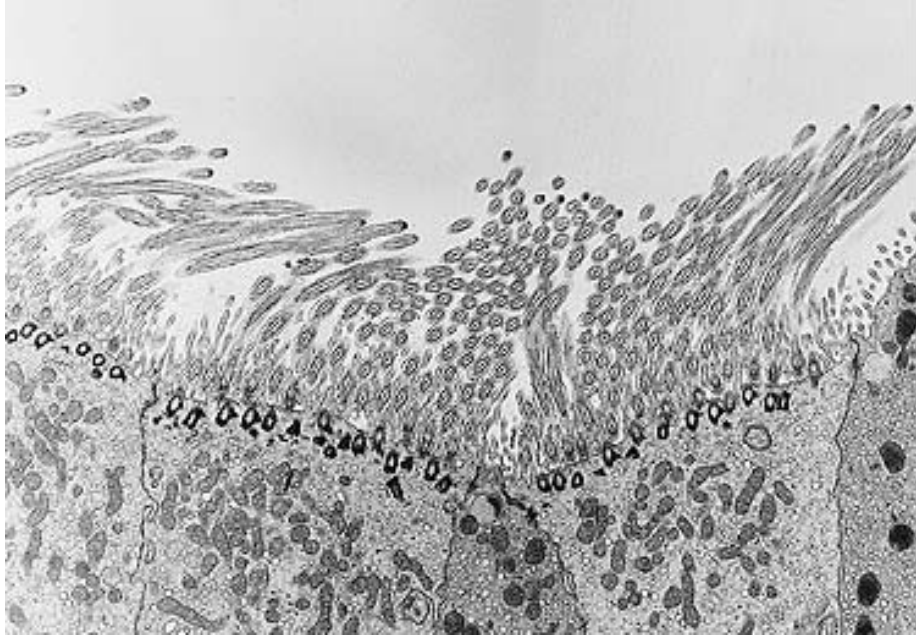
- Grandezza del campione

- Vuoto

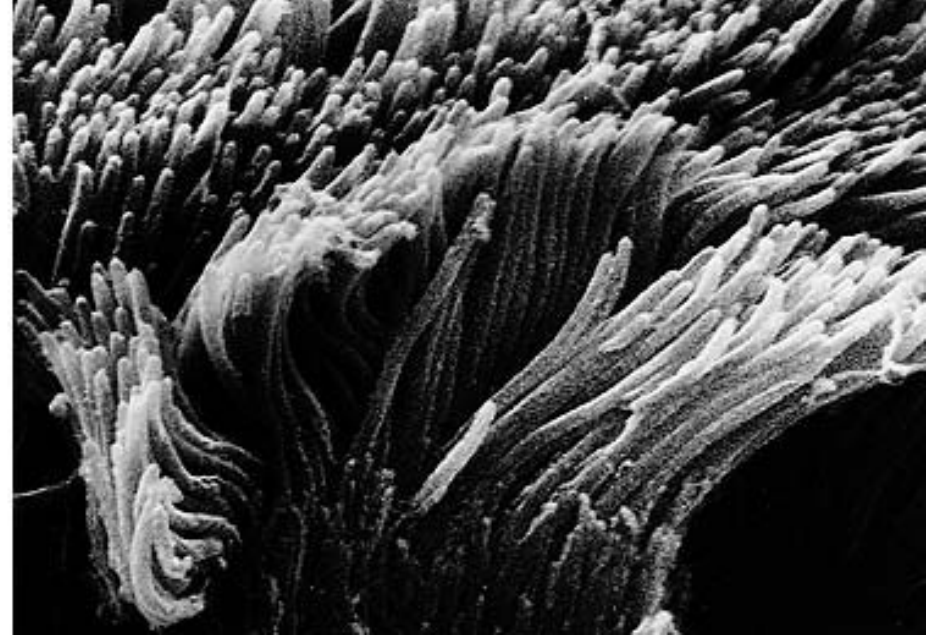
- Temperature elevate localizzate

- Conduttivo

Figure 6.4 Electron micrographs



•Transmission Electron Microscopy



Scanning Electron Microscopy

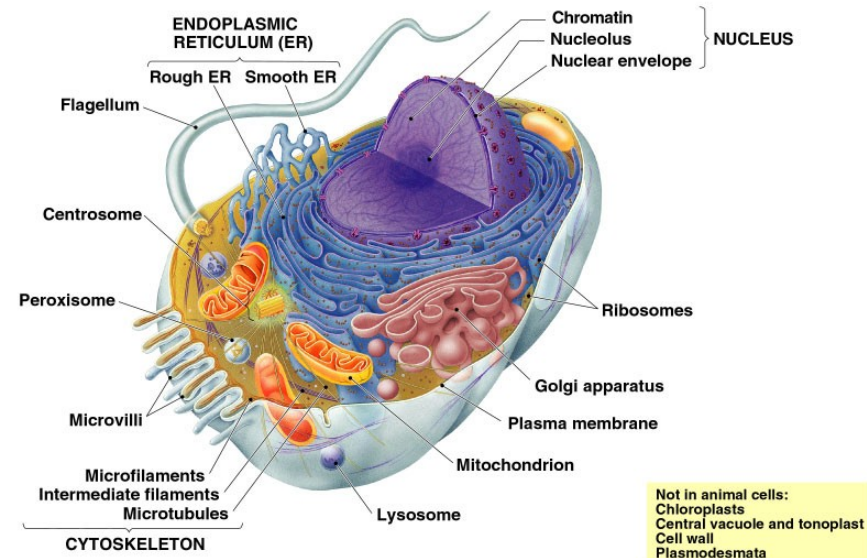
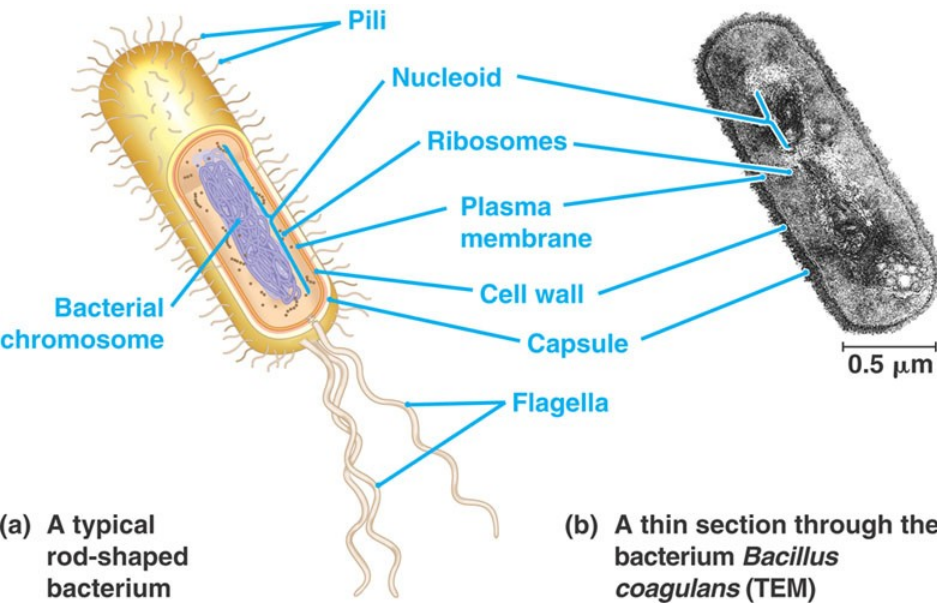
Prokaryotes vs. Eucaryotes

- Prokaryotes

- Bacteria and cyanobacteria
- 1-10 μm
- Few or no organelles
- Circular DNA
- No cytoskeleton or cytoplasmic streaming
- Chromosomes segregate by attachments to plasma membrane
- Mainly unicellular

- Eucaryotes

- Protists, fungi, plants and animals
- 5-100 μm
- Organelles
- Long linear DNA
- Cytoskeleton and cytoplasmic streaming
- Chromosomes segregate by cytoskeletal spindle apparatus
- Often multicellular



TEM of liver cell

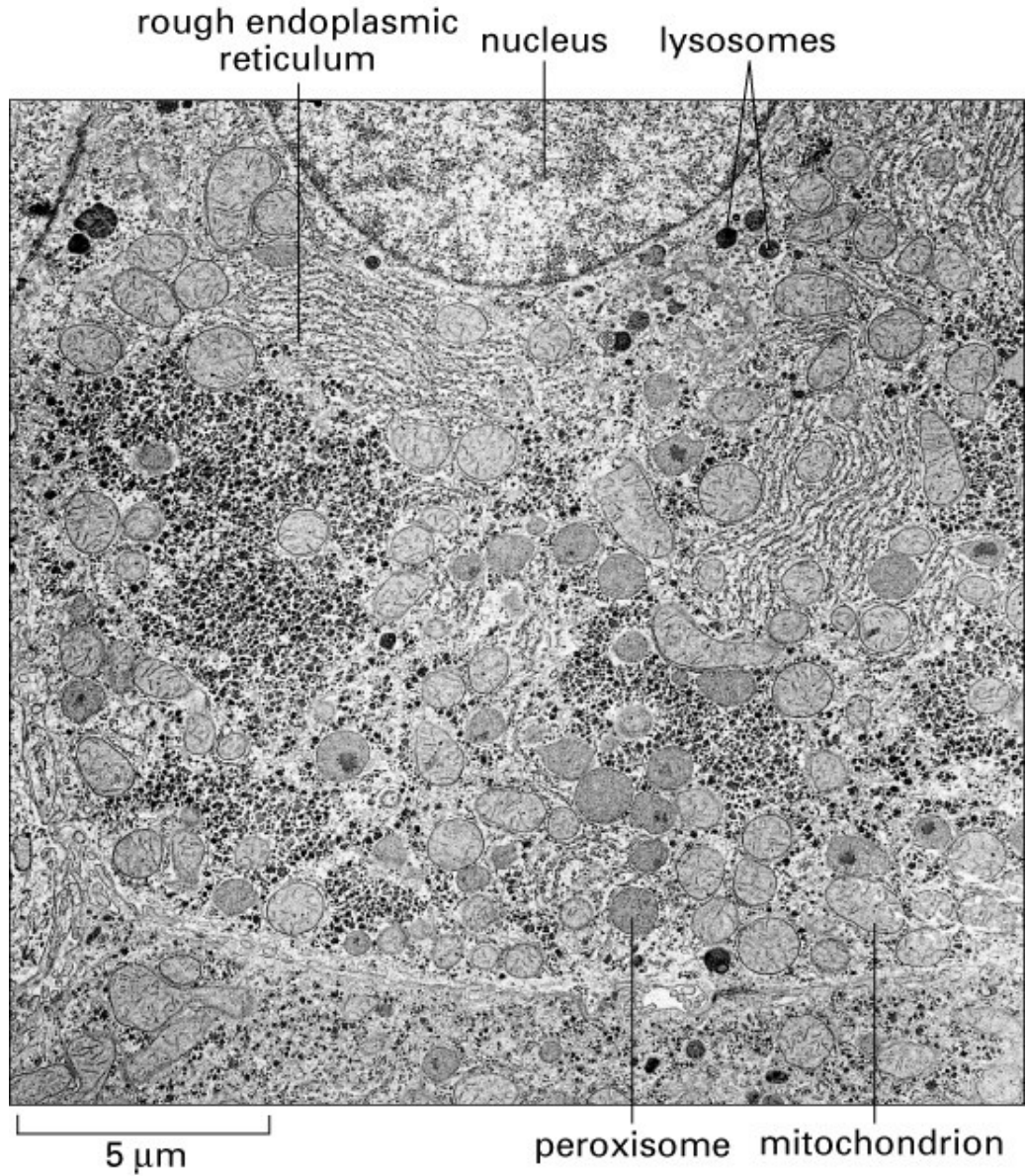


Figure 12-2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 6.8 The plasma membrane

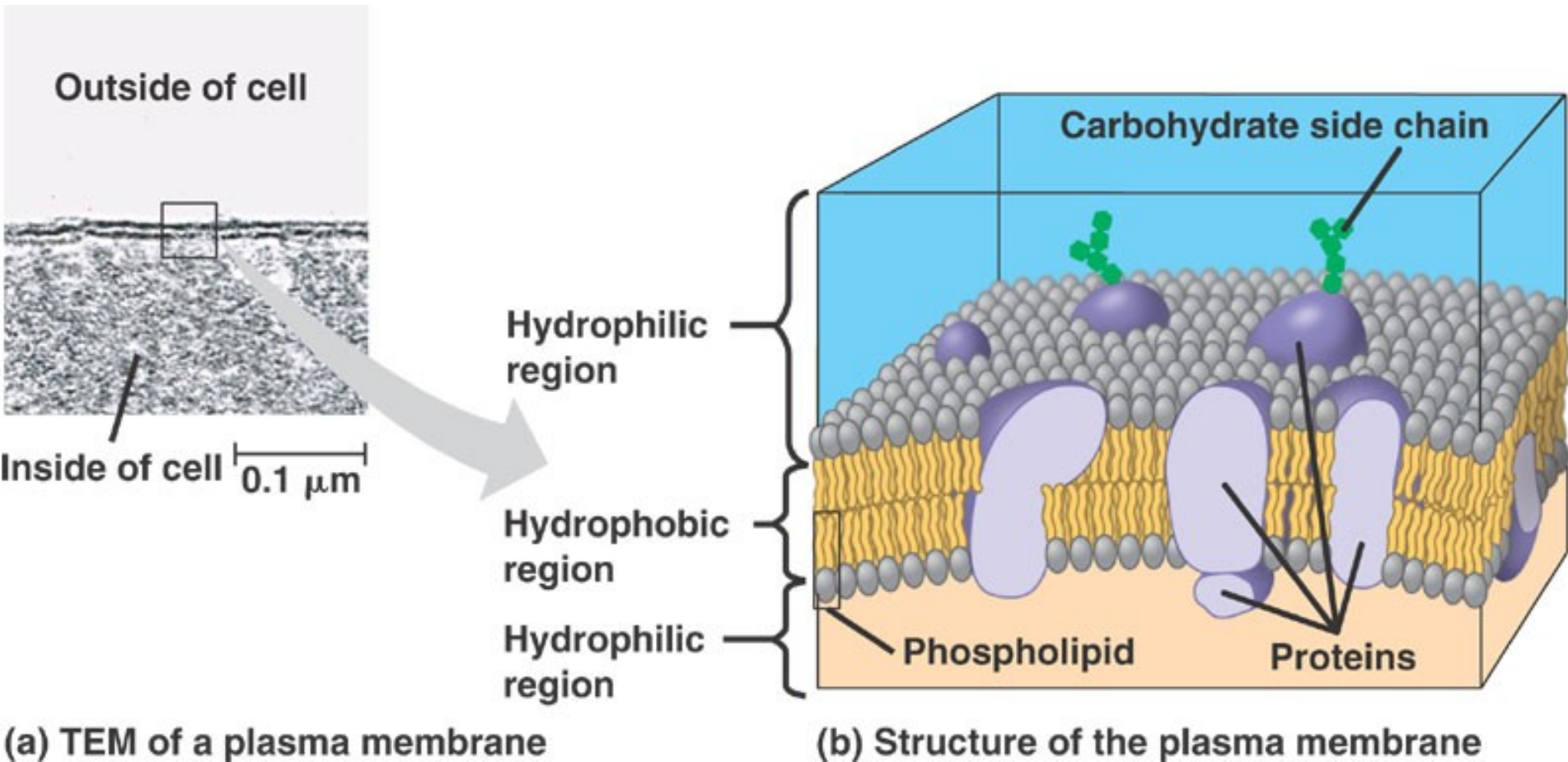


Figure 6.9 Overview of an animal cell

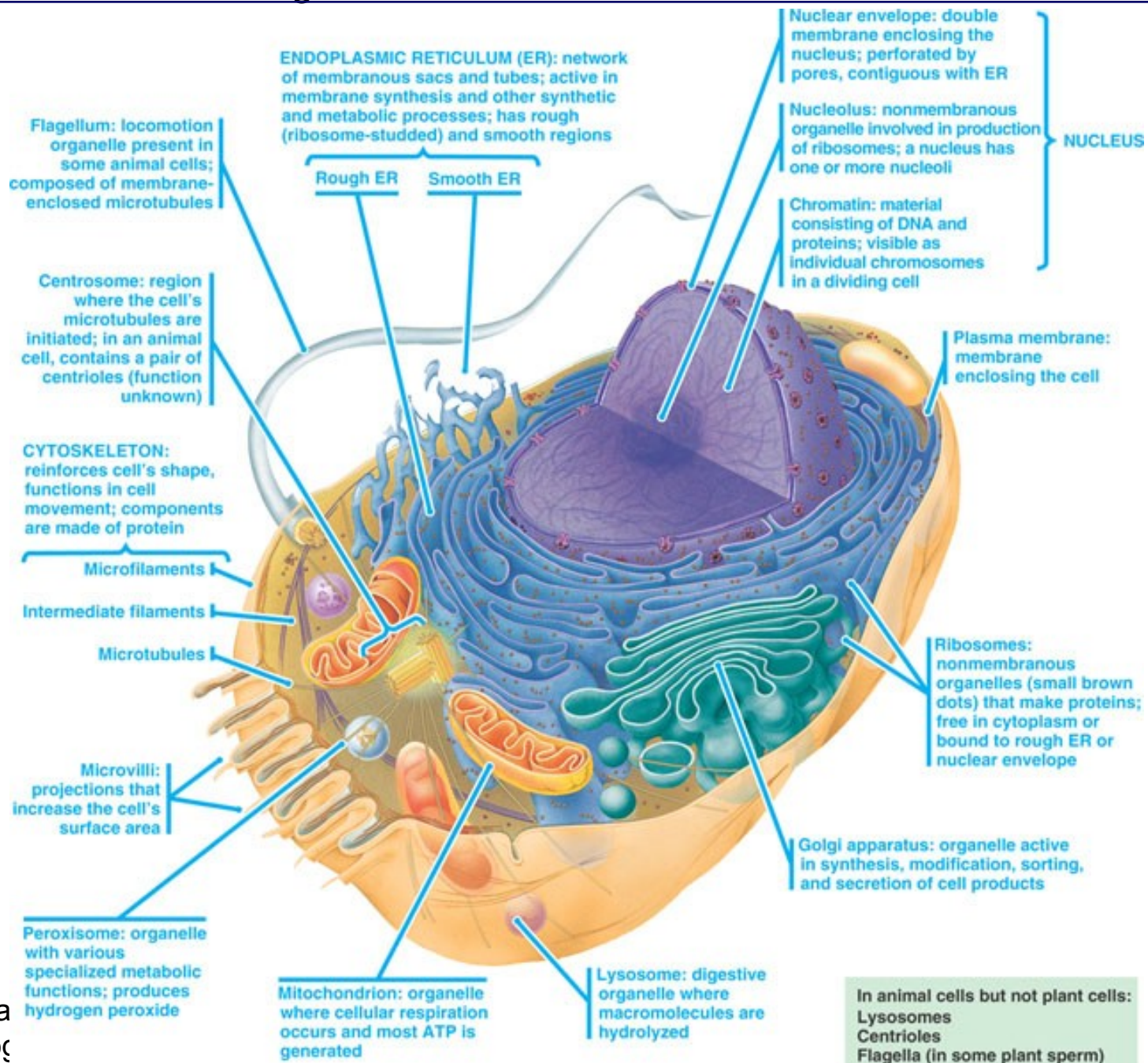
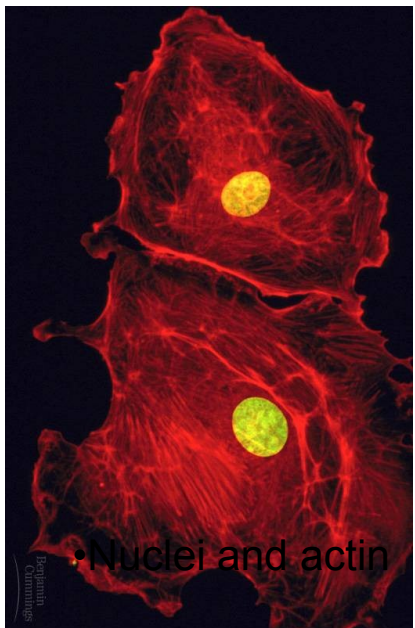
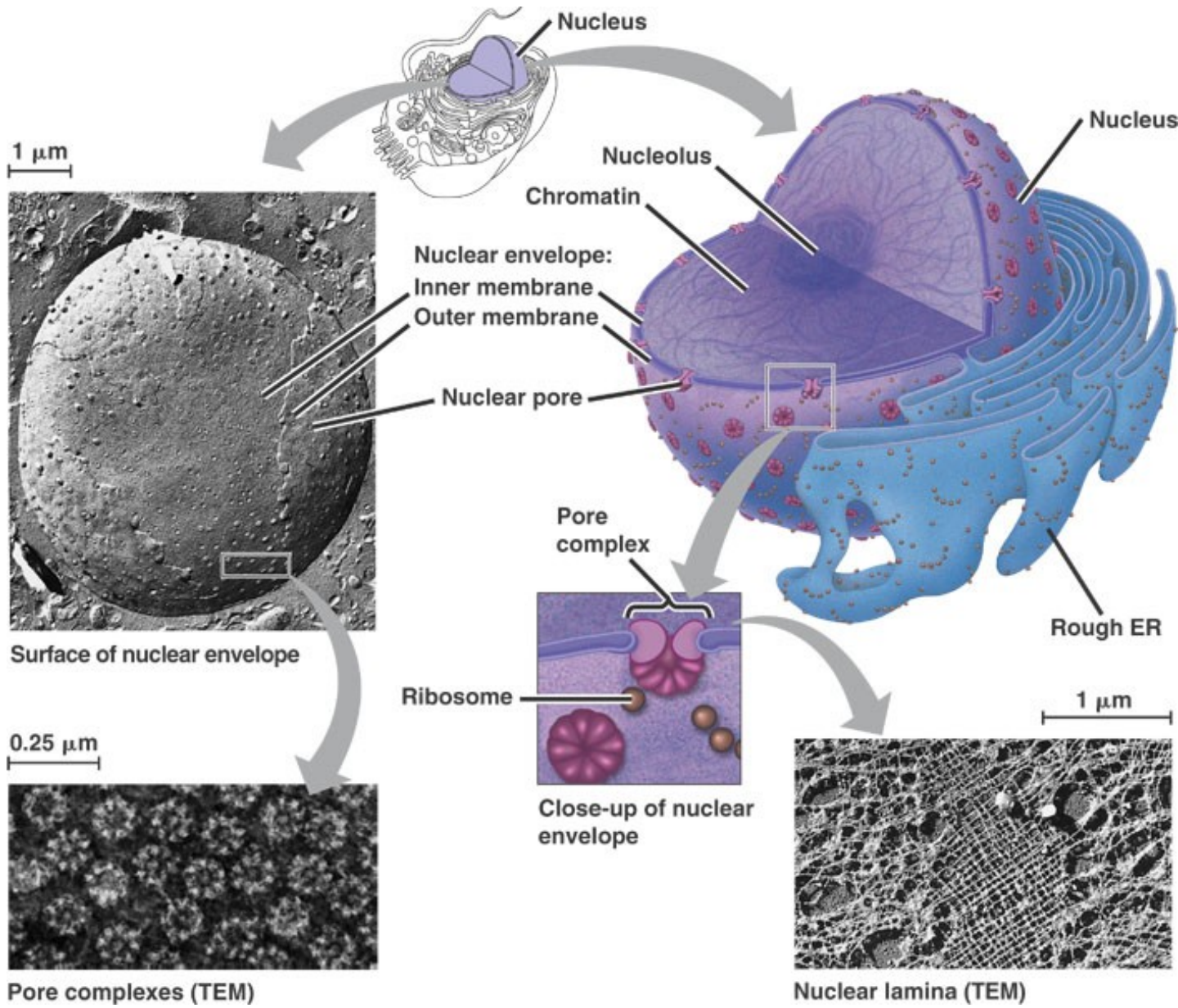
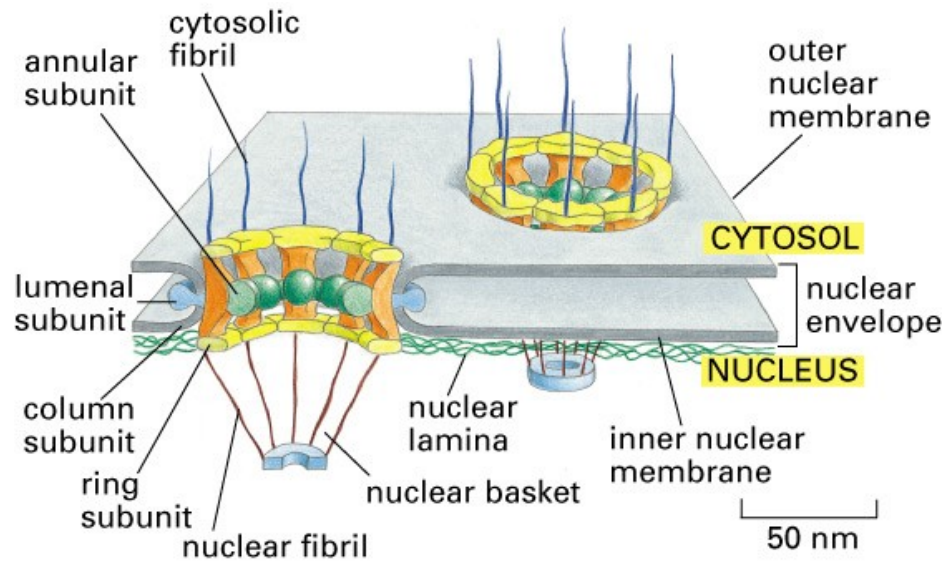


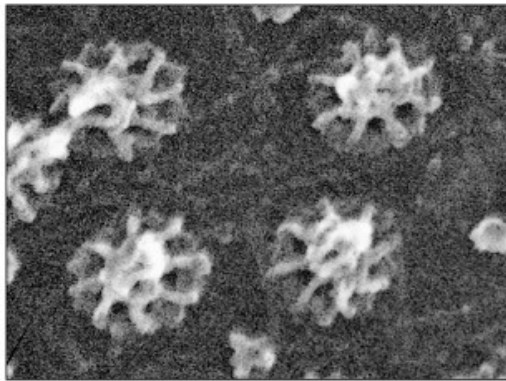
Figure 6.10 The nucleus and its envelope



Nuclei and actin

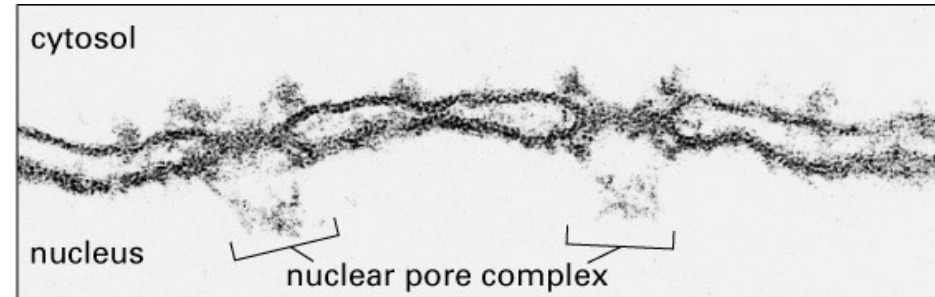


(A)



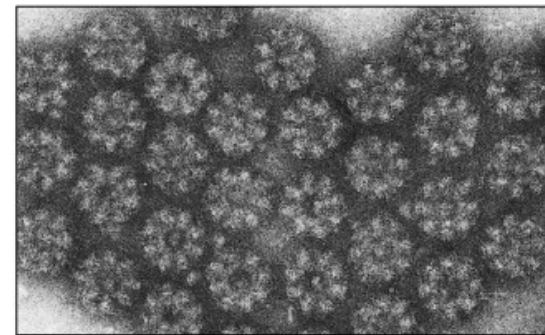
(B)

0.1 μm



(C)

0.1 μm



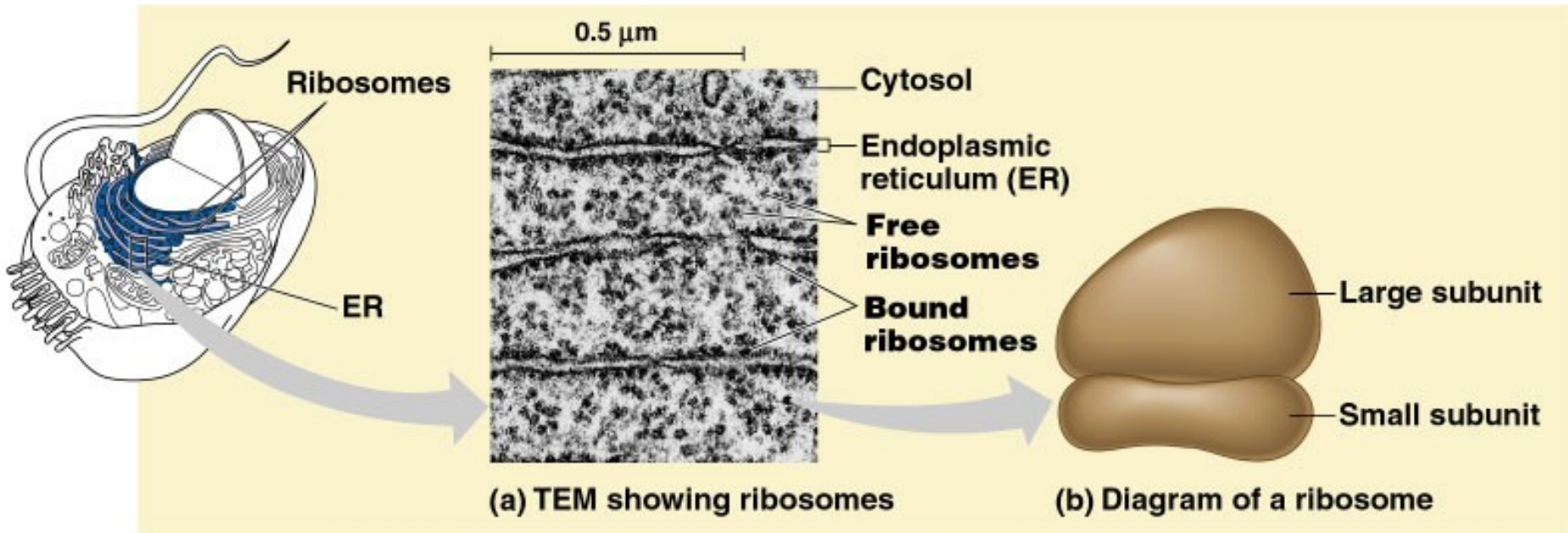
(D)

0.1 μm

Figure 12–10 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

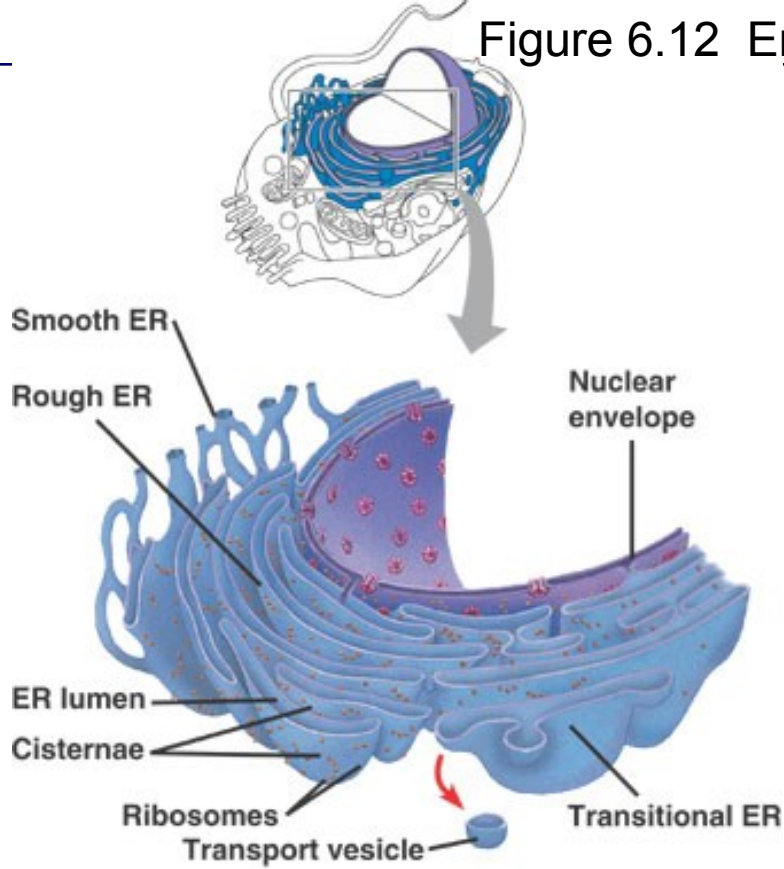
Figure 12–10 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 6.11 Ribosomes



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figure 6.12 Endoplasmic reticulum (ER)



- Rough and Smooth ER

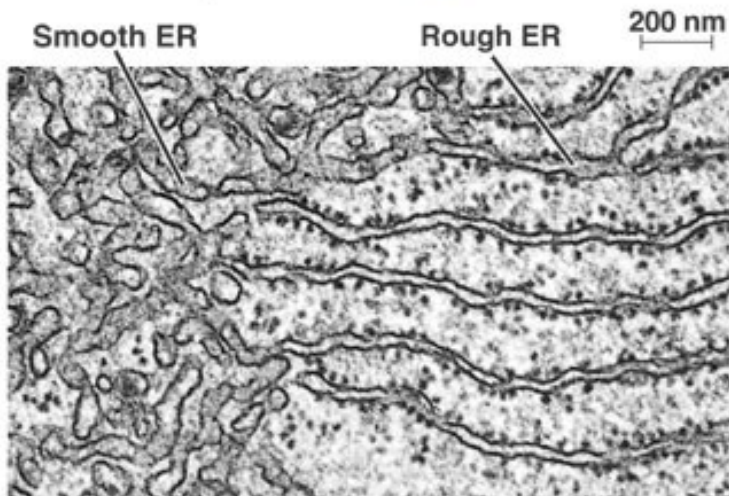
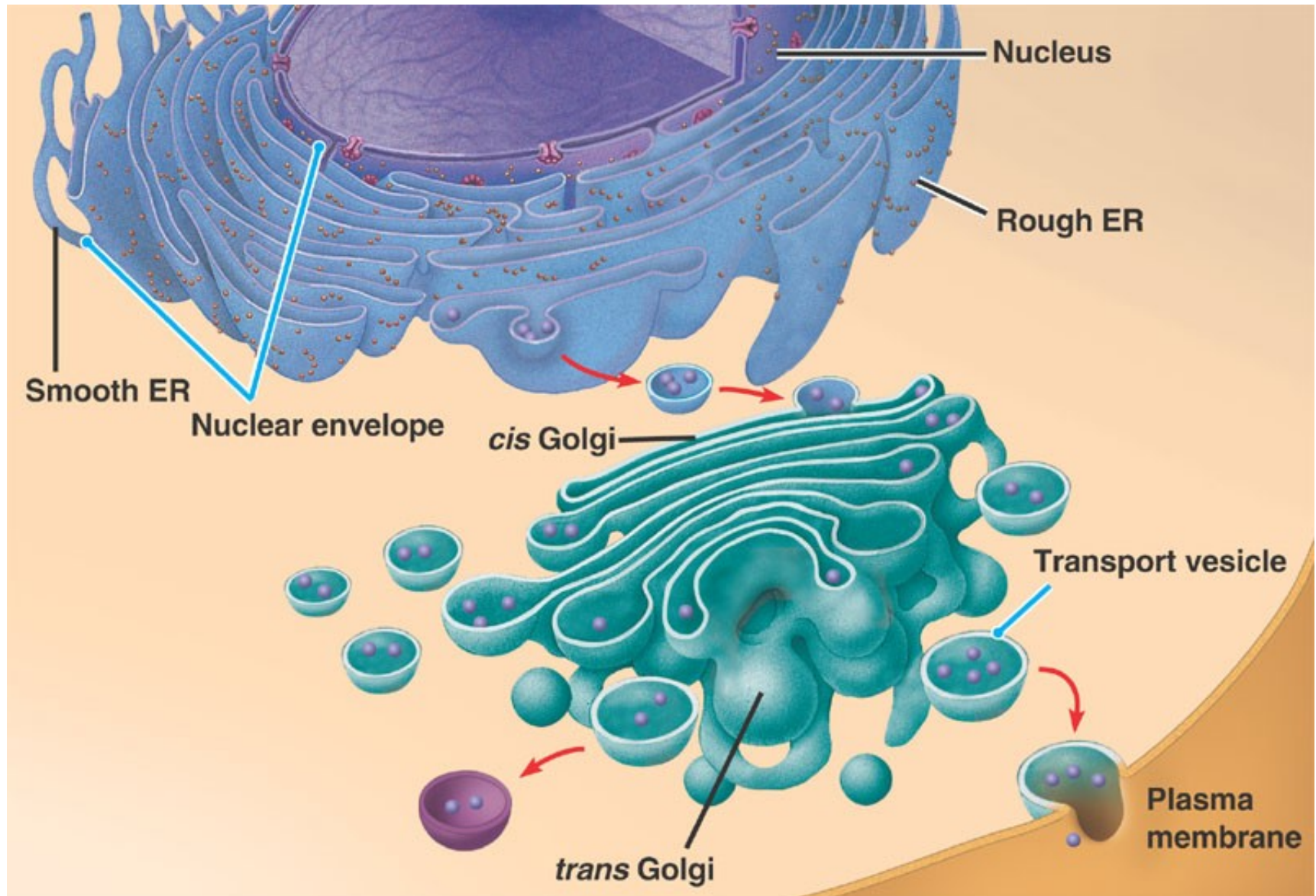


Figure 6.16 Review: relationships among organelles of the endomembrane system



SEM: Preparazione dei campioni

- Grandezza del campione: piccolo
- Lavaggio della superficie
- Fissaggio
- Deidratazione in etanolo
- Essiccazione da punto critico
- Montaggio
- Copertura per sputtering

Preparazione del Campione

Stabilizzazione - Fissaggio e deidratazione (SEM e TEM)
Incastonamento (embedding) in resina per il TEM

Preparazione della superficie - pulizia e/o utilizzo di una superficie nuova per SEM. Taglio del campione in sezioni ultra-sottili per il TEM

Montaggio - campione su una matrice (SEM) o su una griglia (TEM)

“Staining” con metalli pesanti per il contrasto di immagine (TEM e SEM)

Preparazione dei campioni per SEM

Per evitare l'eccessivo „caricamento“ elettrico dei campioni isolanti si può ricoprire il campione con materiali conduttori come oro, per esempio.

I campioni devono essere completamente privi di qualunque materiale che possa vaporizzare in vuoto come acqua, solventi ed altri materiali.

Lavaggio della superficie del campione

- Lavaggio leggero con buffer
- Lavaggio tramite solventi
- Lavaggio con soluzione di enzimi (glicosidasi per dissolvere le mucose)

Fissaggio

Un processo utilizzato per preservare (fissare) la struttura del materiale in uno stato che sia il più vicino allo stato in-vivo.

- Protocolli di fissamento simili tra SEM e TEM
- Molto variabile a seconda del tipo di campione
- I campioni biologici vengono spesso osmicati (trattati con tetrossido di osmio)
- Per alcuni campioni (piante) una soluzione di 70% etanolo è sufficiente

Fissaggio

- **Fissativi:**

1% glutaraldeide oppure 1% glutaraldeide + 1% formaldeide in un mezzo di buffering (per esempio acroleina per una veloce penetrazione di grandi campioni)

- **Tonicità:**

I veicoli di fissaggio devono essere isotonici con i fluidi dei tessuti per prevenire collassamenti delle superfici.

- **Temperatura:**

E' importante evitare cambi improvvisi di temperatura : le strutture sulle superfici possono essere distorte.

- **pH:**

Il pH deve essere molto simile a quello del tessuto dato che le proteine del tessuto, responsabili della forma della cella, possono cambiare forma con il cambiamento del pH.

Buffer

- Definizione: una soluzione contenente un acido debole e un sale
- Tiene il pH stabile durante il processo di fissaggio
- Fissaggio chimico e' un complesso set di reazioni ossidative e riduttive, quindi $[H^+]$ e' in costante cambiamento.
- Tutti i fissativi hanno un PH ottimale per il quale sono piu' efficienti.
- Ad un PH specifico, tutte le proteine hanno un punto isoelettrico (IEP) dove le cariche + e - si eguagliano. Il fissaggio è più efficiente al punto isoelettrico.

CONSIDERAZIONI NELLA SELEZIONE DEL BUFFER

pH – ogni buffer ha un punto (pKa) dove c'è un uguale concentrazione di acido e base. La capacità di buffering è più alta.

- Se pH cambia da entrambe le parti, la capacità di tenere il pH diminuisce.

Un buffer deve essere scelto a seconda del pH desiderato

- Compatibilità con i fissativi e con i titolatori (stains).

CONSIDERAZIONI NELLA SELEZIONE DEL BUFFER

- Resa a bassa concentrazione:
 - Se i buffer vengono diluiti perdono la loro capacità di controllo del pH.
 - Per esempio - i buffer a 0.1 M/l vengono usati per la maggior parte delle piante e tessuti animali, comunque alcuni invertebrati richiedono diluizioni di oltre un migliaio di volte per mantenere l'isotonicità.

Fissaggio

Chemical crosslinking - coagulanti/noncoagulanti

I fissativi crosslinking agiscono creando legami covalenti tra proteine e tessuti . Questo lega le proteine solubili al citoscheletro dando maggiore rigidità al tessuto.

- Coagulanti: agenti original killing (alcohols, Farmer's, FAA, Bouins)

Basso pH

Privi di buffer

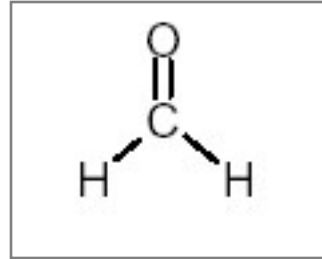
Coagulano componenti cellulari: come friggere un uovo

- Non Coagulanti: Formaldeide, Glutaraldeide, Tetrossido di Osmio

Aldeidi

Formaldeide

In forma di polvere di paraformaldeide in soluzione acquosa dal 37% al 16%

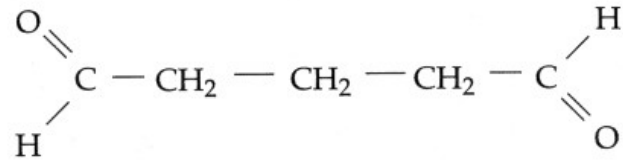


- Il basso peso molecolare lo rende molto penetrante. Viene quindi utilizzato nel fissaggio di materiali resistenti come semi, spore, materiale vegetale insieme ad una altra aldeide.
- La formaldeide per microscopio elettronico è normalmente preparata dal trattamento della *paraformaldeide*.
- Una volta preparata la soluzione ha una durata di qualche settimana.

Glutaraldeide (GTA)

Glutaraldehyde

The structure of glutaraldehyde (MW 100.12) is shown as follows:



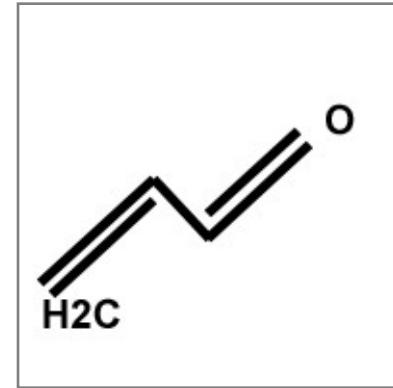
- E' il più diffuso fissativo sia nel microscopio a scansione sia nel microscopio a trasmissione.
E' quella con più alto grado di cross-linking di tutte le aldeidi.
Il fissaggio per GTA è irreversibile.
- Nel TEM, il GTA "bufferato" dà un' ottima conservazione strutturale di una vasta varietà di tessuti.

Glutaraldeide

- Non riesce a fermare l'estrazione di lipidi.
- Acidi nucleici vengono fissati con il fissaggio di proteine associate negli eucarioti. Il DNA batterico e virale non viene fissato.
- Carboidrati solubili non vengono fissati in genere.
- Il GTA reagente è in soluzione acquosa del 25 o 50% con un pH tra 3 e 6, e contengono impurità come etanolo, metanolo, acido glutarico e prodotti ossidanti.
È bene quindi purificare il GTA prima dell'uso.



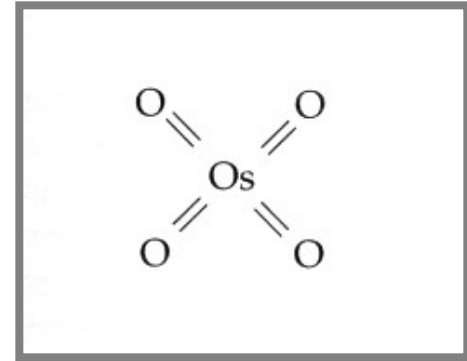
Acroleina



- Penetra velocemente nei tessuti.
- Altamente volatile e reattivo.
- Pericoloso e difficile da maneggiare.
- La volatilità lo rende un buon fissatore gassoso. Utile quando bisogna evitare liquidi come per certi tessuti mineralizzati.

Tetrossido di Osmio (OsO_4)

- Stabilizza e titola lipidi- acidi grassi insaturi.
- E' utilizzato sia nel SEM che nel TEM
- Fissativo non coagulante che non pero' non funziona con molte proteine
- Basso rate di penetrazione
- Viene utilizzato insieme ad altri fissativi
- Tossico, volatile e forte ossidante (e' indispensabile maneggiarlo con cura).
- I vapori fissano velocemente membrane mucose.
- Agisce reagendo con legami doppi e gruppi sulfidrici delle proteine causando cambiamenti strutturali delle proteine.

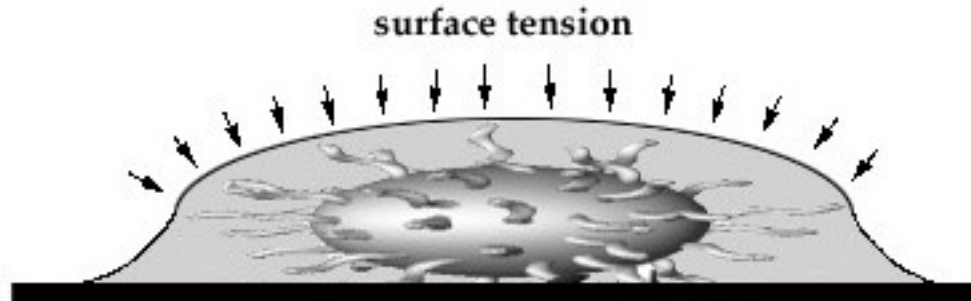
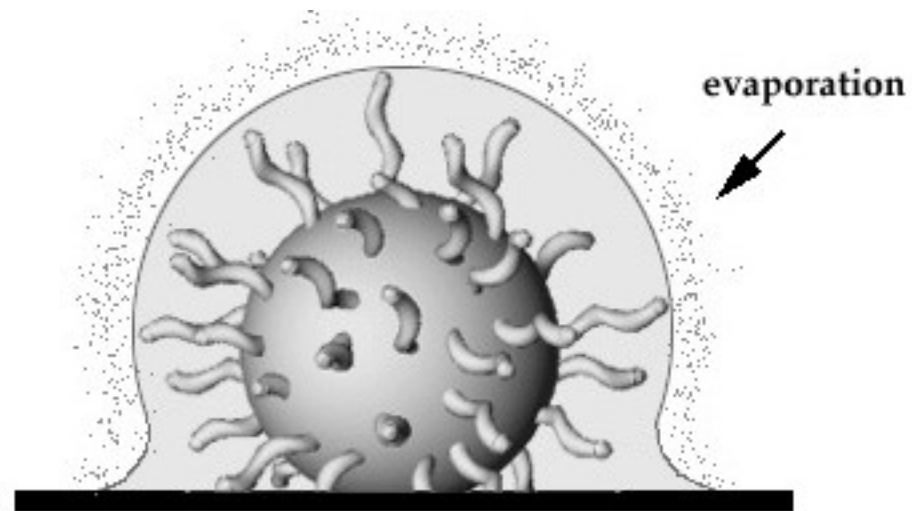


Tetrossido di Osmio (OsO_4)

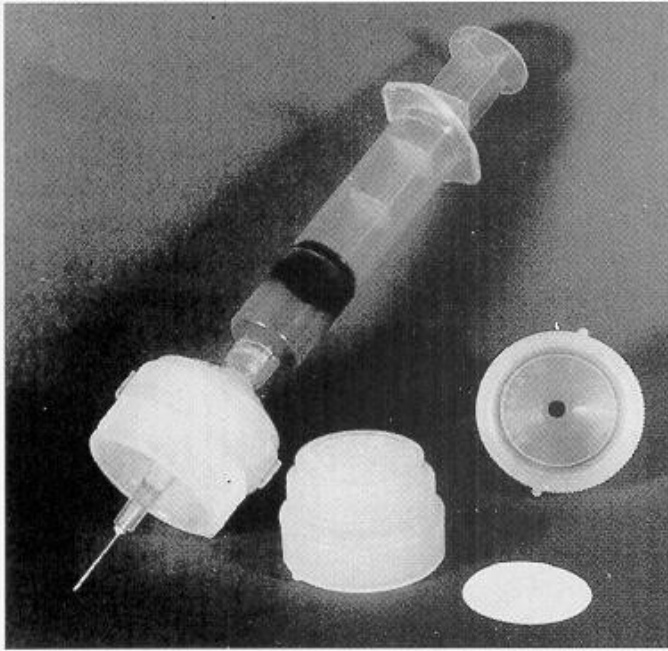
- Indurisce i tessuti, dando resistenza meccanica e quindi rendendoli più stabili agli step successivi.
- Da una piccola conducibilità, che può essere utile con una superficie estremamente dettagliata.

Deidratazione

- Etanolo: 30%, 50%, 70%, 95%, 100%
- Acetone
- Diossido di carbonio liquido (Punto critico)

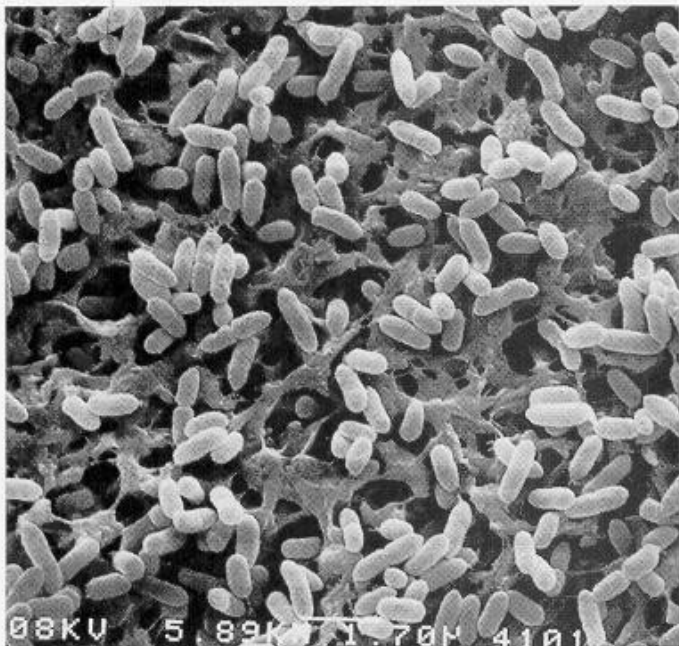


A



Infiltrazione di piccoli campioni

B



Essiccamento da punto critico (Critical point drying CPD)

- L'essiccamento ad aria può danneggiare i campioni a causa della tensione superficiale
- Lo strumento da CPD a gas e liquido sotto pressione (biossido di carbonio liquido)
- Il calore aumenta la pressione e diminuisce la densità del liquido mentre la densità del vapore aumenta
- Alla temperatura di punto critico e alla pressione della fase tra gas e liquido, il liquido è convertito in gas senza nessuna tensione superficiale.

Essiccamento da punto critico

L'essiccamento da punto critico è una tecnica di essiccamento usata per prevenire danni sui campioni biologici.

Durante il cambiamento di fase da liquido a gas, la tensione superficiale che si presenta nel passaggio da liquido a gas può causare danni.

La tensione superficiale è evitata essiccando il campione con una soluzione che è portata da un liquido subcritico a liquido ipercritico evitando un passaggio liquido-gas perché le densità del gas e del liquido sono equivalenti.

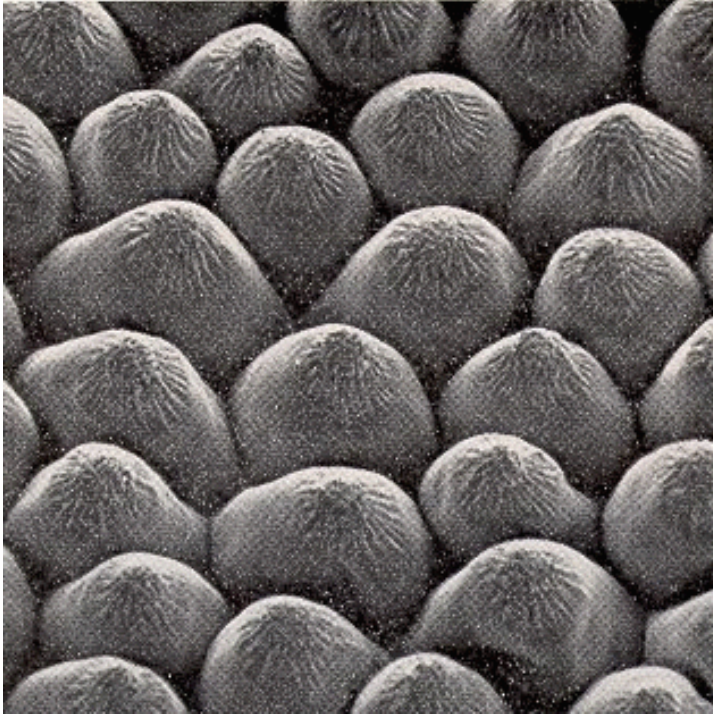
L'acqua non è usata perché il relativo punto critico è molto alto, per cui viene sostituita da alcool o da acetone.

Più di una sostituzione deve essere applicata perché la soluzione che sostituisce l'acqua deve essere miscibile con la soluzione ipercritica.

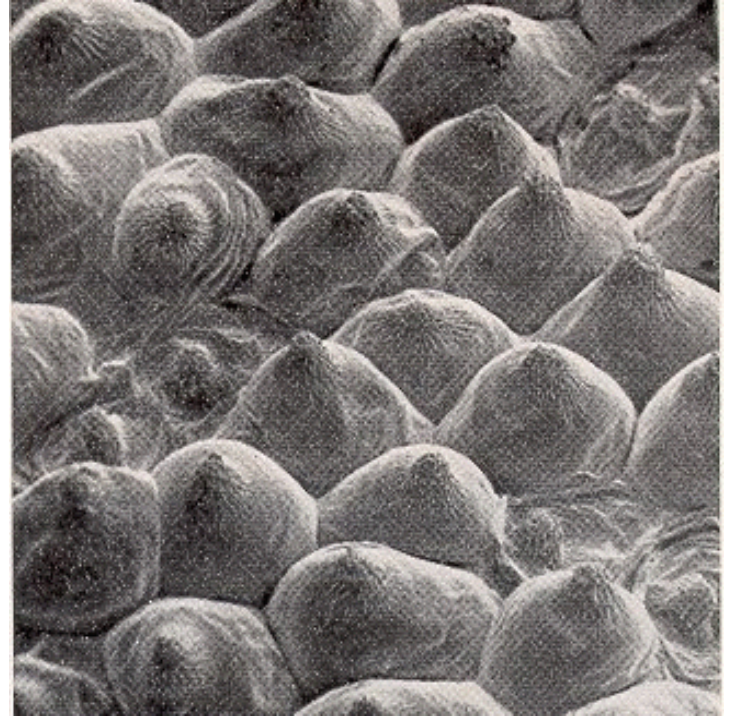
Dopo disidratazione, l'esemplare è disposto in una soluzione subcritica.

L'anidride carbonica è la sostanza il più frequentemente usata. La temperatura e la pressione sono aumentate fino a che la soluzione non sia ipercritica ed i cambiamenti del liquido a gas senza danneggiare il campione.

Perchè essiccamento da punto critico ?



- SEM image (850X) of rose petal surface, CPD



- SEM image (850X) of rose petal surface, fixed and air dried

Costanti da punto critico

Sostanza	Temp. °C	pressione
HYDROGEN	-234.5	20 bar
OXYGEN	-118	51 bar
NITROGEN	-146	33 bar
CARBON DIOXIDE	+31.1	74 bar
CARBON MONOXIDE	+141.1	36 bar
WATER	+374	221 bar

Campione H₂O → Acetone → 0%---100%** → CO₂ → C.P.D. (Campione a secco)

* 50/60/70/80/90 Tipicamente 10 min. ciascuno.

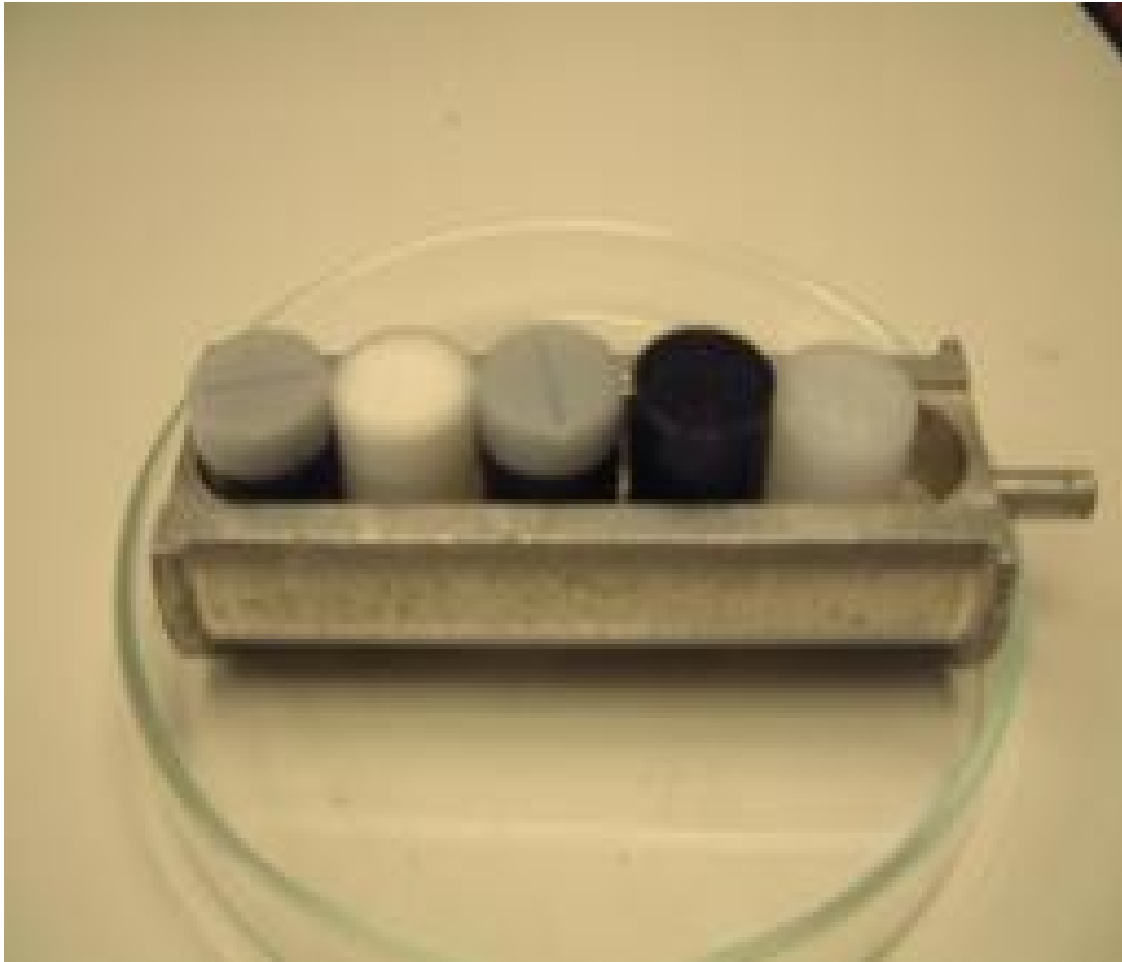
**3 volte.

Fluidi intermedi per il C.P.D.

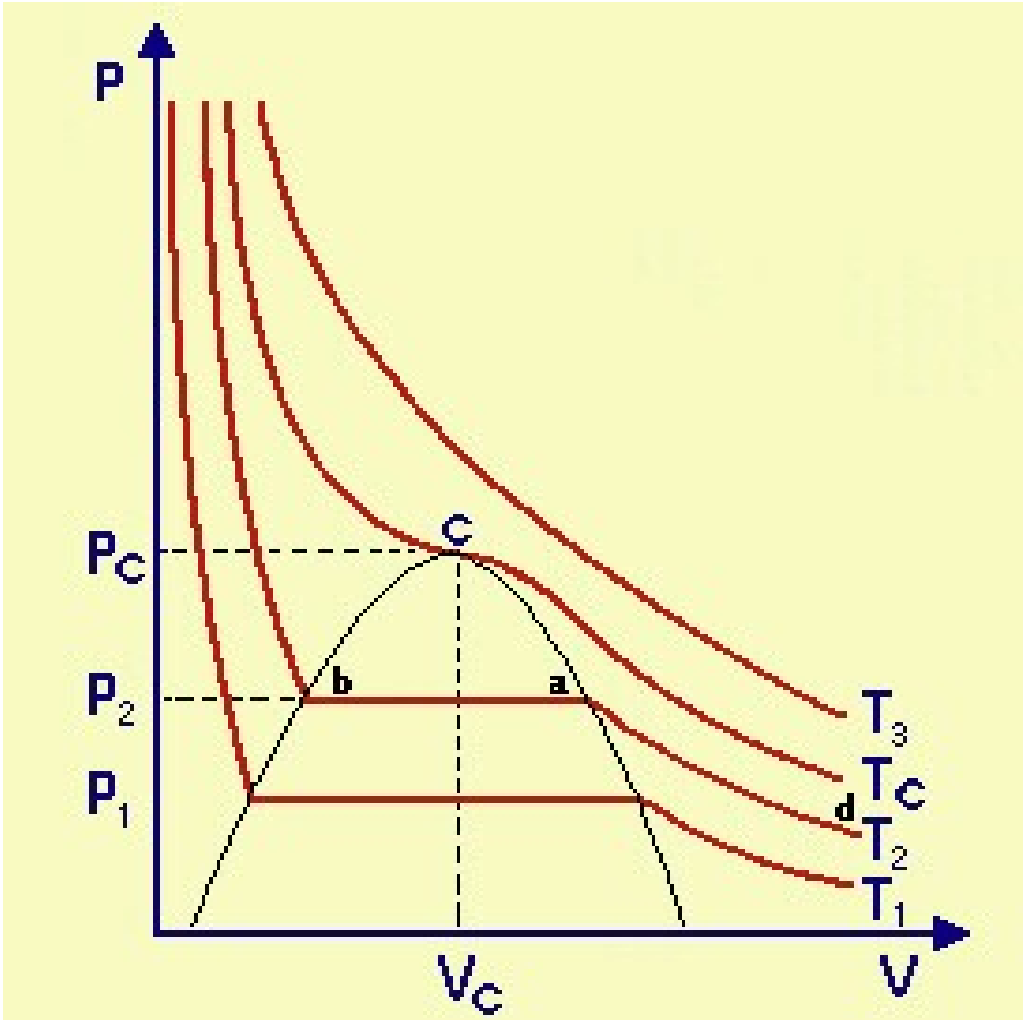
Sostanza	Tensione superficiale (DYNES/CM)
Etanolo	23
Acetone	24
Freon(113)	19

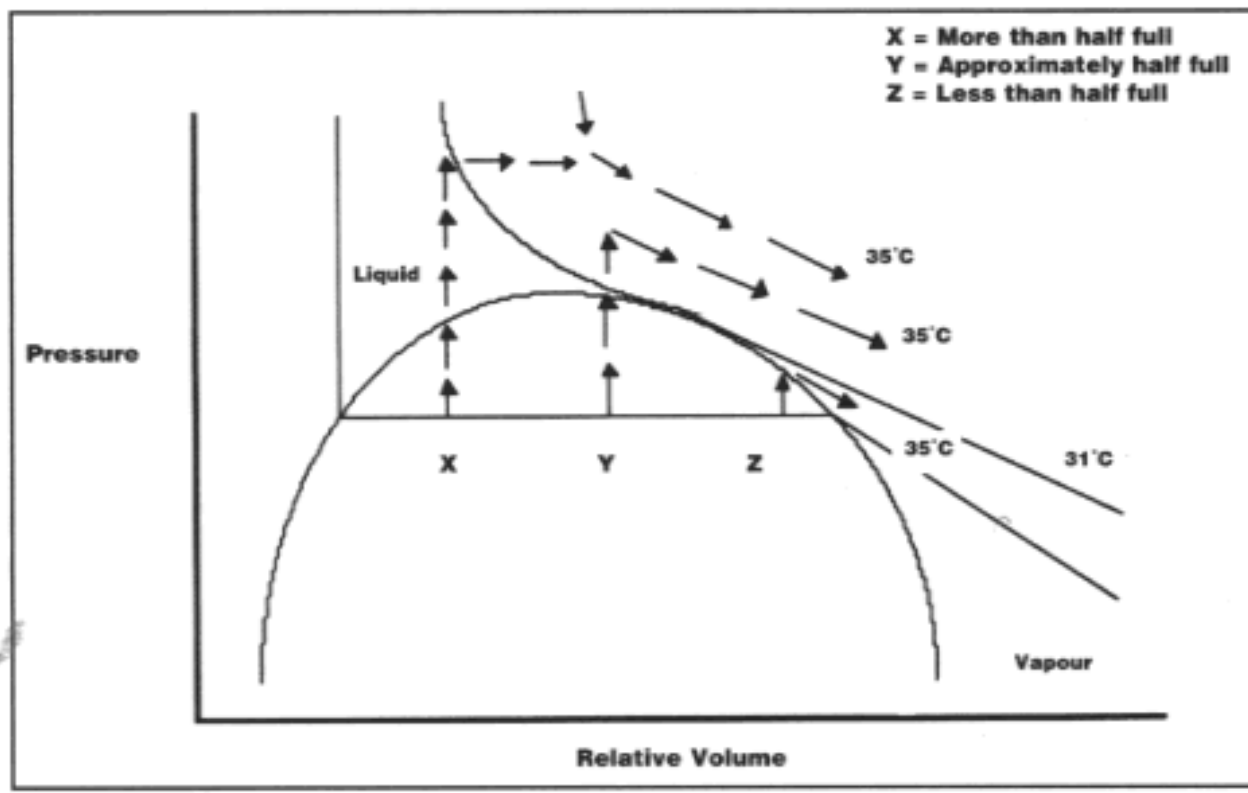


- I campioni vengono messi in recipienti porosi
- Questi recipienti vengono immersi in quantità sempre maggiori di etanolo 50-100% in modo da rimuovere l'acqua per gradi.

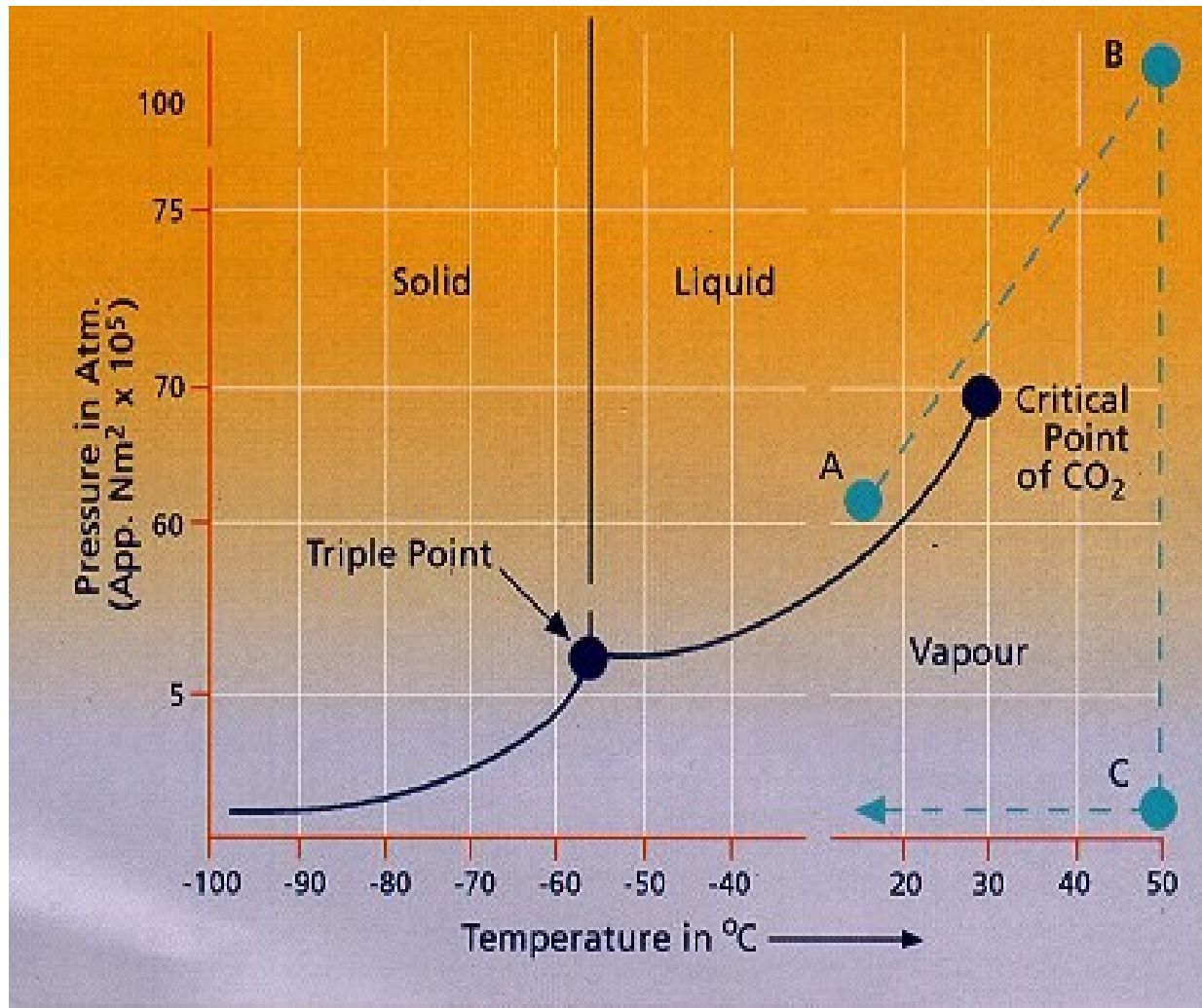


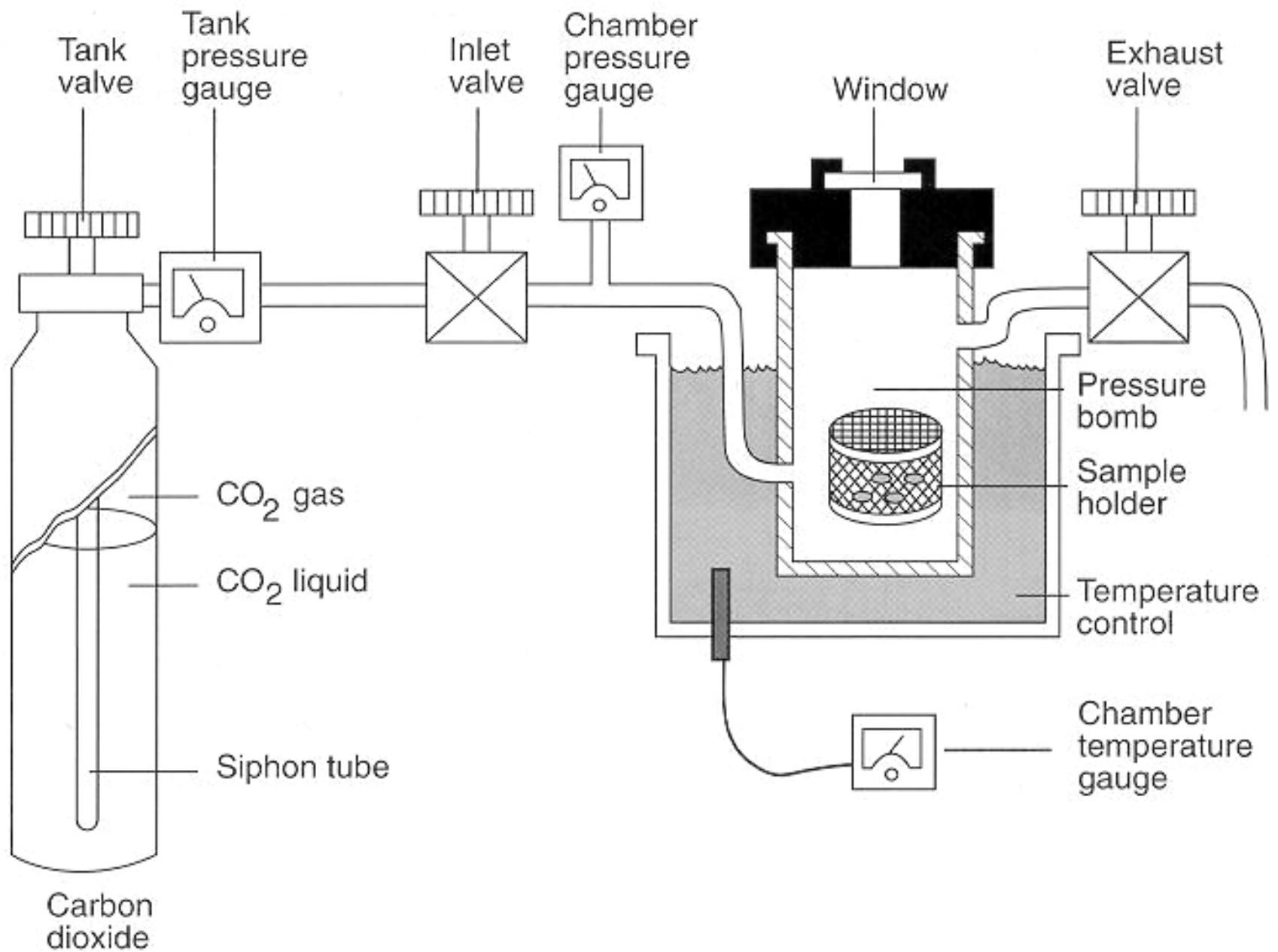
- I recipienti con I campioni deidratati sono poi messi in un crogiolo che è inserito in una camera in pressione

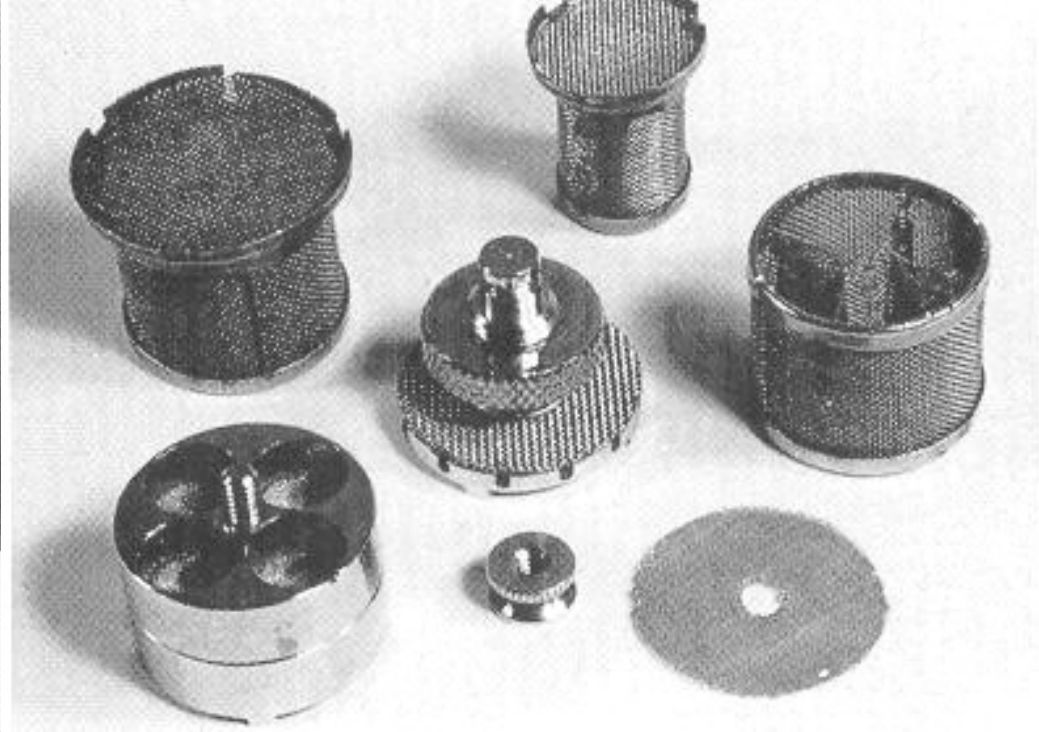
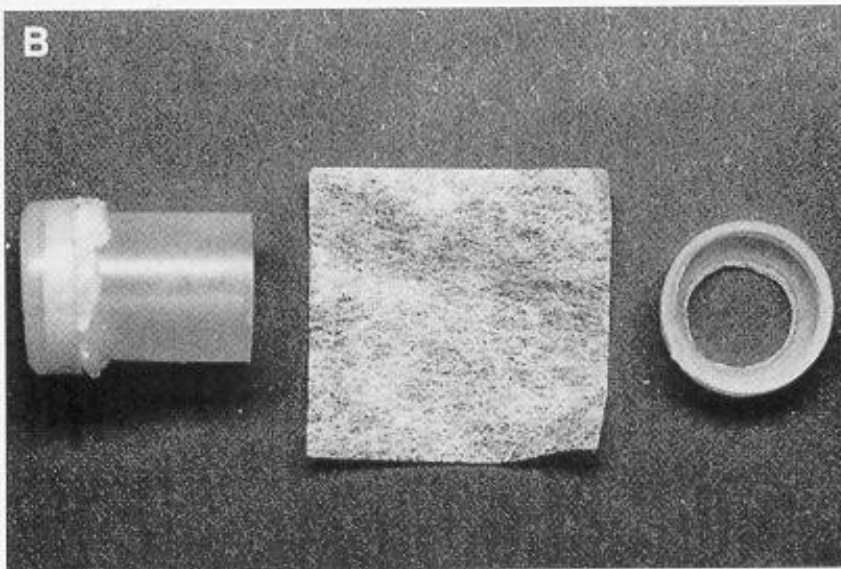
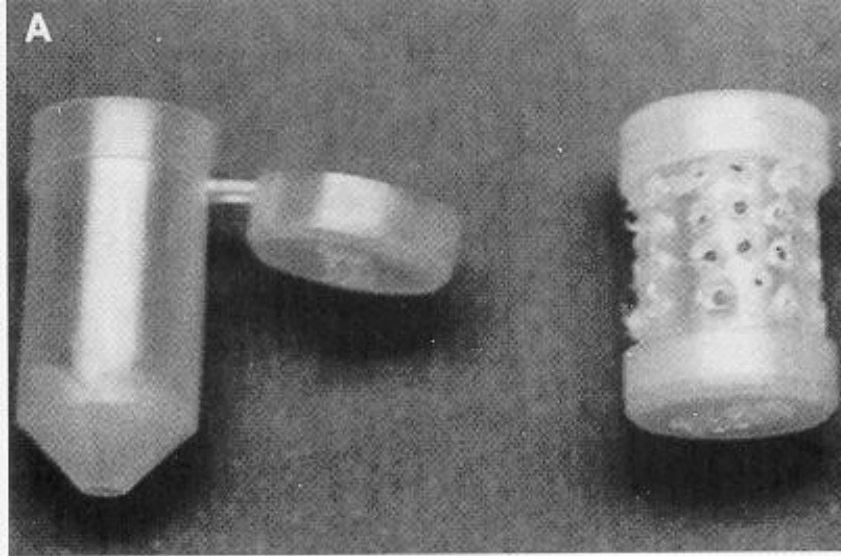




Fasi del CPD



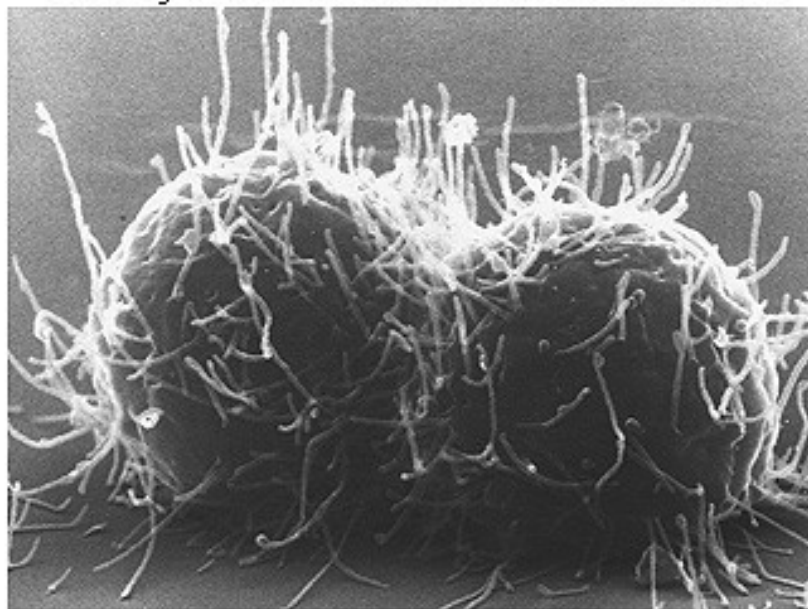




Portacampioni SEM per
essiccamento da punto
critico

Critical-Point Dried Cells and Tissues

Newly-Divided Cells in Tissue Culture

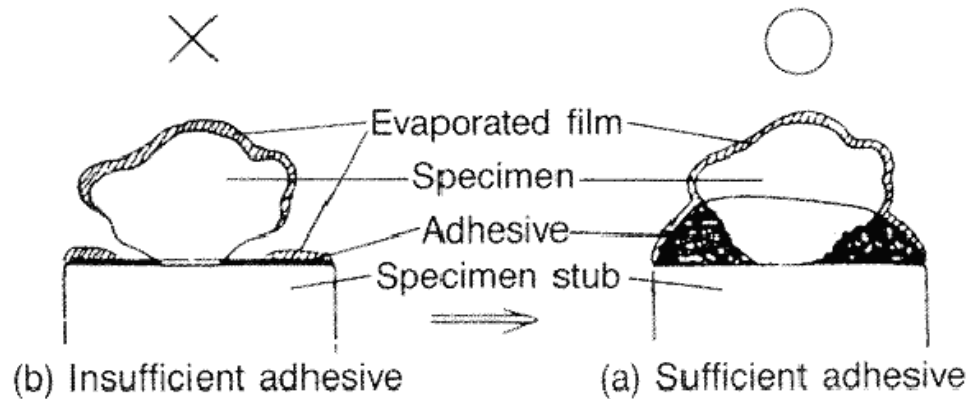


Oviduct Epithelium



Montaggio del campione

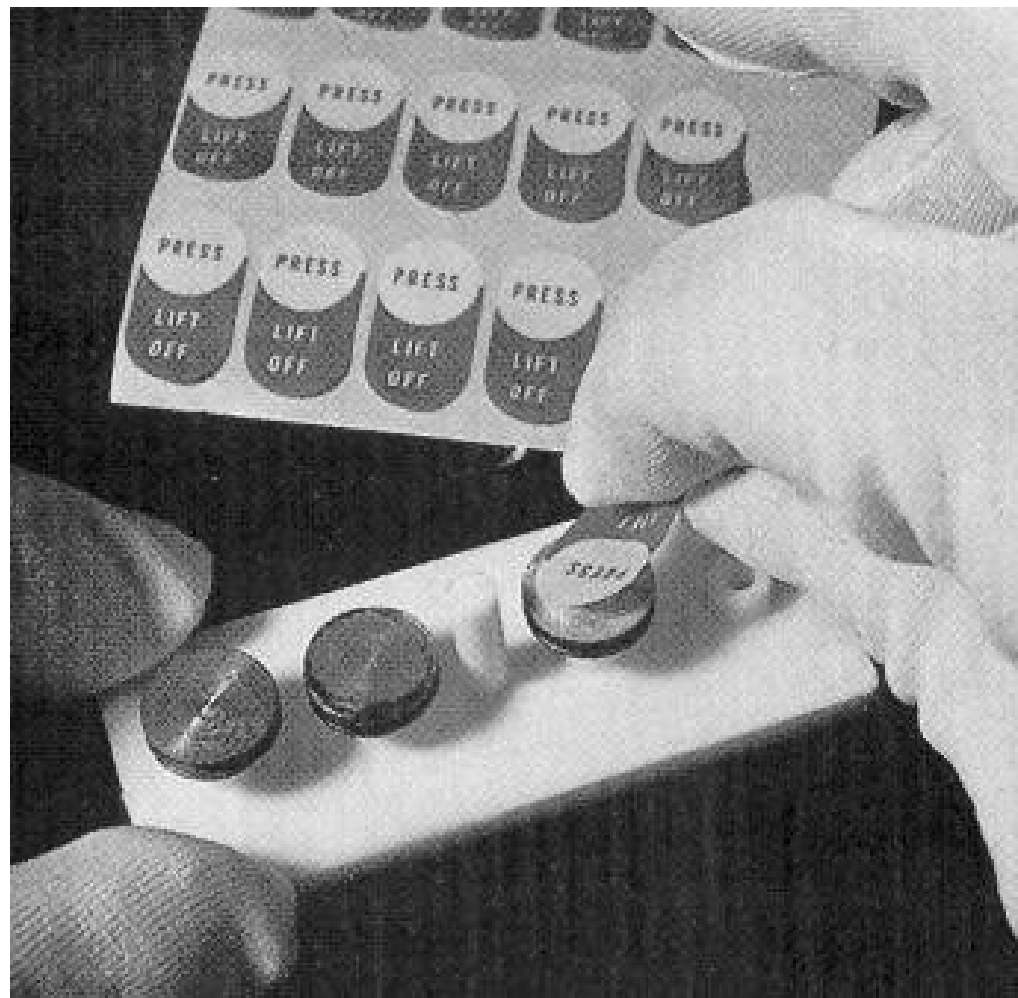
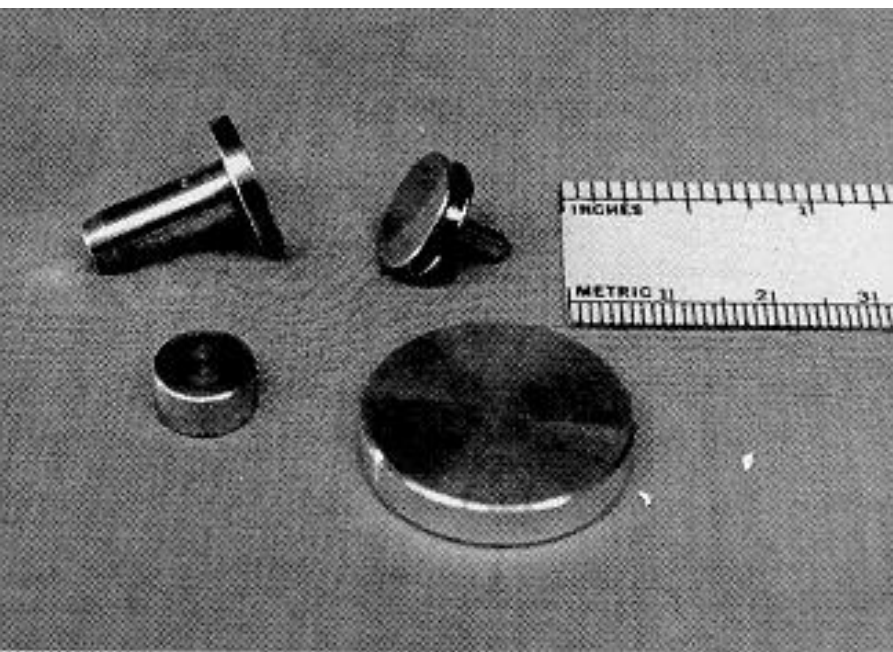
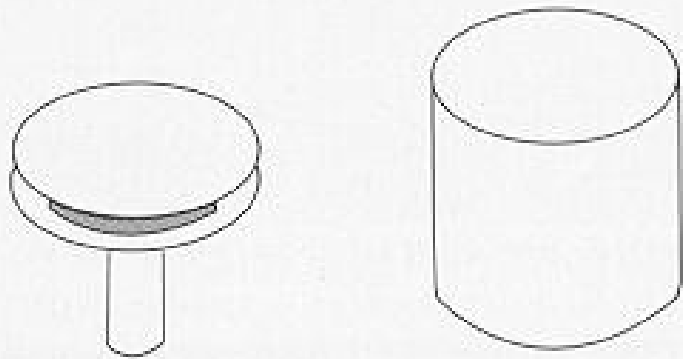
- Dischi di alluminio: 12 mm-25 mm
- Adesivo, vernice a base metallica o nastro bi-adesivo



Fixing of a bulk specimen

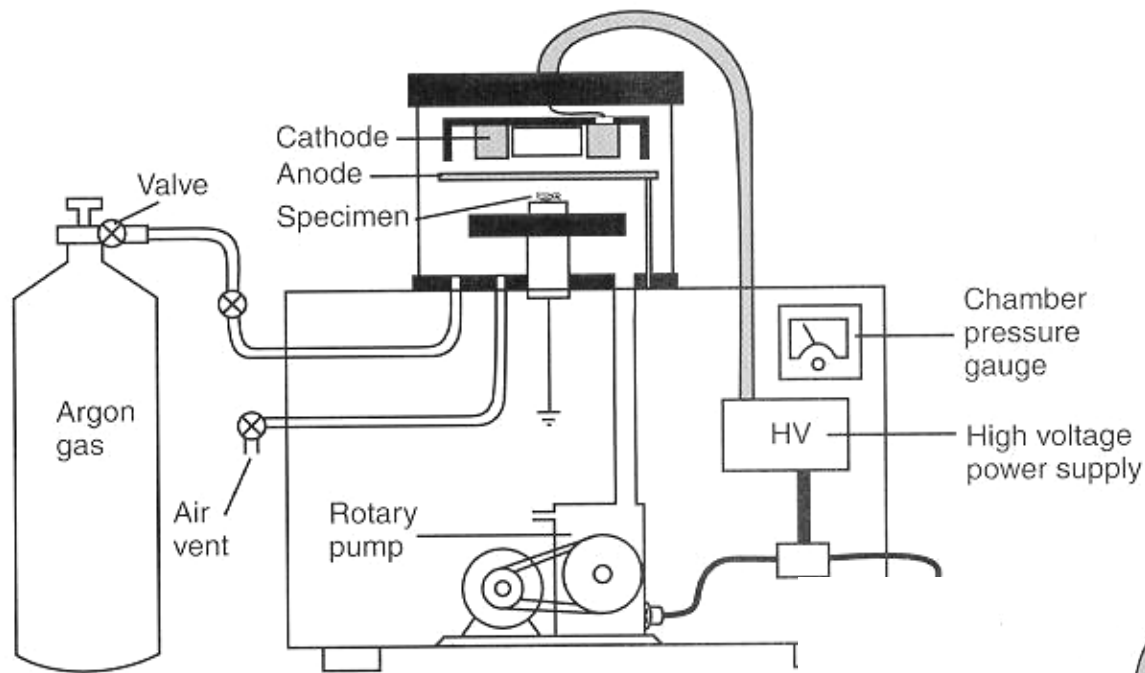


Fixing of fiber

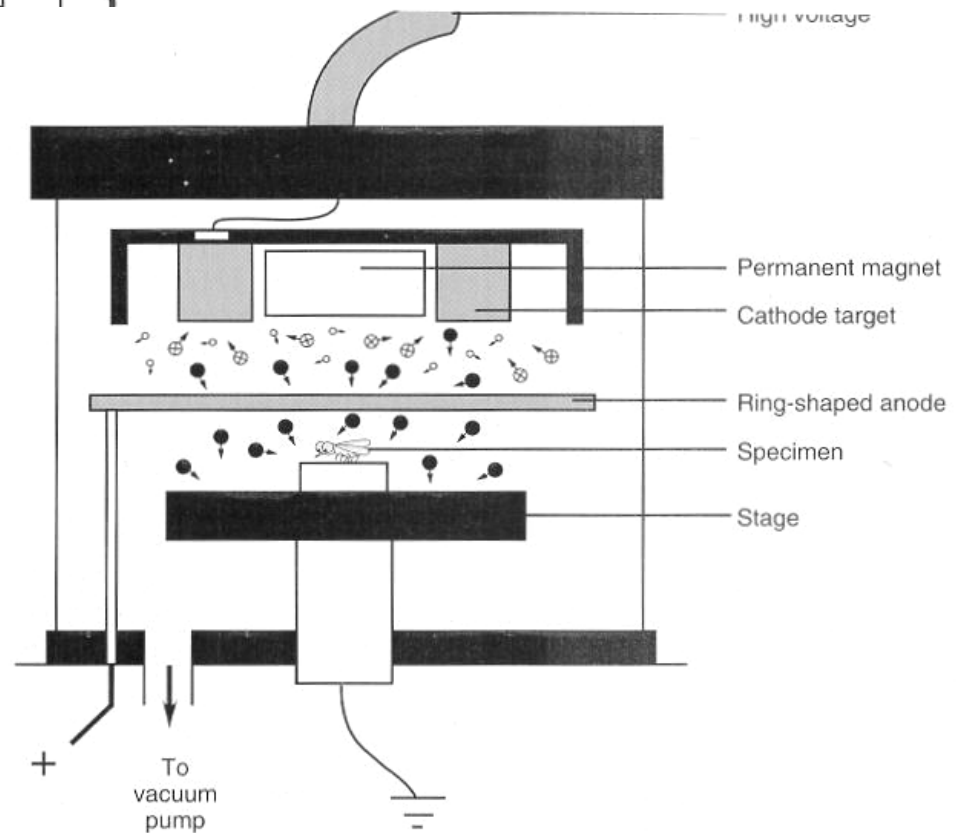


Sputter Coating

- La superficie del campione deve essere conduttrice
- Caricamento elettrico
- Si ricopre il campione con uno strato sottile di metallo (Au/Pd) che agisce come una sorgente di elettroni secondari
- Un copertura troppo spessa riduce i dettagli.



Sputtering



Schema generale per il tessuto delle piante

	Sostanza	Temperatura	Tempo	Ripetizioni
Fissamento primario	2.5% glutaraldeide in acqua distillata	ambiente oppure 0-4° C	2-4 ore oppure microonde	1
Lavaggio	Acqua distillata	ambiente oppure 0-4° C	30 minuti	3-5
Fissamento Secondario	1-4% tetrossido di osmio in acqua distillata	ambiente oppure 0-4° C	2-4 ore	1
Lavaggio	acqua distillata	ambiente oppure 0-4° C	30 minuti	3-5
Deidratazione	25% etanolo	ambiente oppure 0-4° C	20 minuti	1
	50% etanolo		20 minuti	1
	70-75% etanolo		20 minuti	1
	90-95% etanolo		20 minuti	1
	100% etanolo		30 minuti	2
Essiccamento da punto critico				
Montaggio sul portacampione con pasta d'argento o grafite				
Rivestimento con lega oro/palladio				
Porre il tutto in diessiccatori				

Microscopia a trasmissione elettronica: preparazione dei campioni

Generalmente per microscopia elettronica a trasmissione (TEM) I campioni devono essere sottili, asciutti (privi di acqua) e devono contenere molecole che possano diffrangere gli elettroni.

I campioni biologici, che sono grandi e consistono di grandi quantità d'acqua non diffrangono gli elettroni e sono quindi più difficili da osservare nel TEM.

Colorazione

- Il contrasto del campione è funzione delle proprietà di scattering elettronico degli atomi del campione stesso
- Le molecole organiche hanno un basso contrasto dovuto al fatto che gli atomi hanno un basso peso molecolare (C, H, O, N)
- Per aumentare il contrasto, atomi con peso atomico più alto devono attaccarsi agli atomi del campione
- Gli atomi più spesso utilizzati sono **uranio** e **piombo**

Montaggio e colorazione

Se i campioni sono sottili e piccoli possono essere montati direttamente su un film sottile di supporto e introdotti nel microscopio elettronico.

In questo caso il contrasto è dato dall'introduzione di atomi di metalli pesanti in uno dei seguenti modi:

Colorazione Positiva : Il campione viene colorato chimicamente con una soluzione di sali di metalli pesanti e appare scuro su sfondo chiaro.

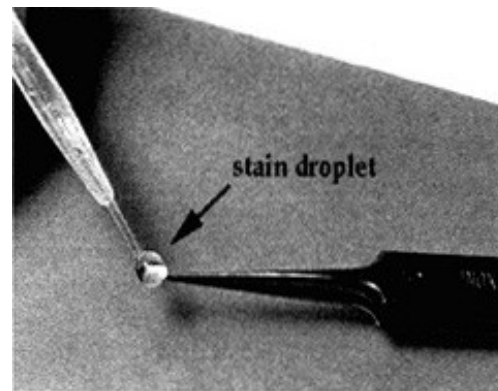
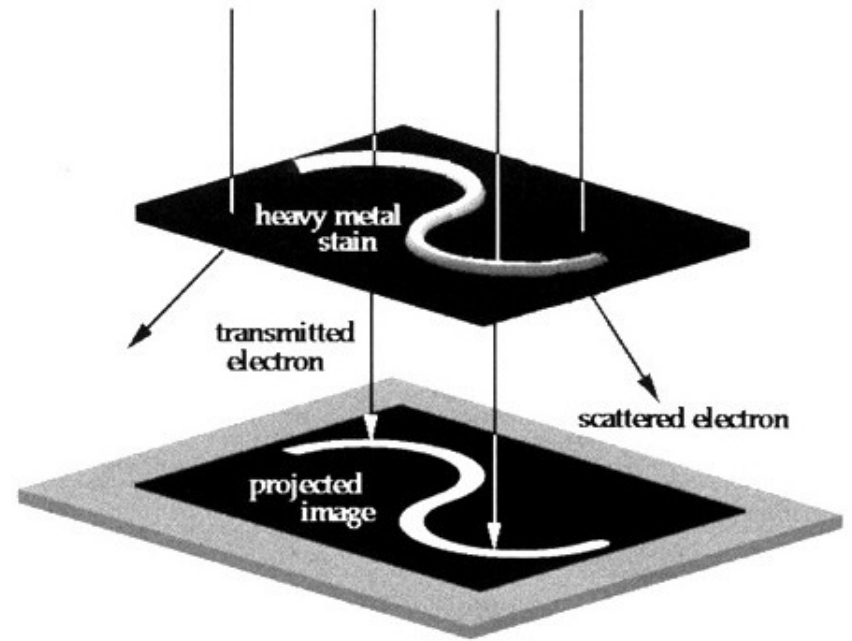
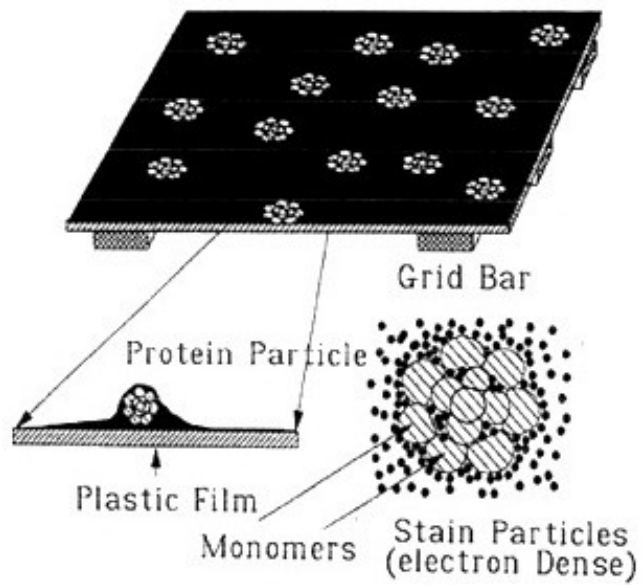
Colorazione negativa: Il campione rimane incolore ma è incastonato in un film del sale del metallo pesante opportunamente essiccato. Il campione appare chiaro su sfondo scuro

(particolarmente usato per lo studio di particelle di virus o per frazioni cellulari).

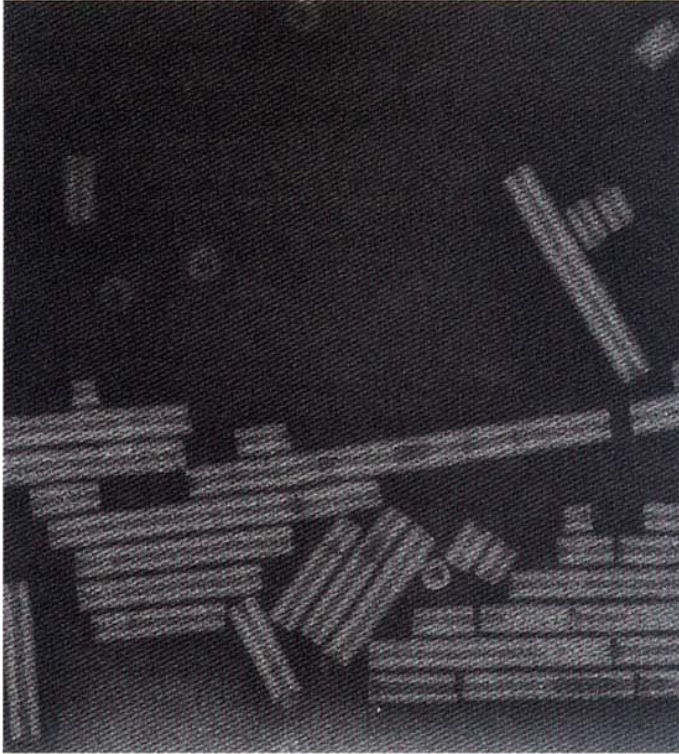
Shadowing: un sottile strato di atomi di metalli pesanti viene depositato sul campione per evaporazione (in vuoto).

L'oscuramento da una direzione dà una pseudo immagine virtuale.

Per visualizzare acidi nucleici e proteine invece il campione può essere uniformemente coperto dal metallo



Colorazione



(a)



(b)

Tobacco rattle virus (TRV) al TEM colorato negativamente (a) e per shadowing (b)

Soluzioni per titolazioni (stain)

Acetato di Uranile acquoso

Una soluzione da 1% a 3% di acetato di uranile dissolto in acqua può essere usato per colorare negativamente molti campioni. Il colorante ha un basso pH per cui la soluzione non è raccomandato per particelle che sono instabili in condizioni acide.

Acido fosfotungstico neutrale

Una soluzione da 1% a 3% di acido fosfotungstico è preparata in acqua ed il pH è regolato usando idrossido di sodio a 7. Questo è un colorante utile per molti campioni specialmente per virus che si dissociano a bassi pH. La colorazione produce meno contrasto che l'acetato di uranile.

Molibdato di Ammonio

Si prepara una soluzione all' 1% di molibdato di ammonio per colorare negativamente sottili sezioni congelate di cellule fissate.

Sezionamento

Il metodo più diffuso per esaminare materiali biologici è quello di incastonare il campione in materiale plastico e di tagliare sezioni ultrasottili che possano essere analizzate nel TEM.

- Il materiale è stabilizzato via **fissaggio chimico** (usando aldeidi come la formaldeide o gluteraldeide).
- Anche in questo caso il contrasto è dato da **soluzioni di metalli pesanti** (tetrossido di osmio e acetato uranile)
 - **Deidratato** in etanolo e acetone
 - **Incastonato** in resina epossica

Sezioni ultrasottili (60nm) vengono tagliati con punte di vetro o di diamante in acqua.

Il contrasto delle sezioni può essere ulteriormente aumentato con acetato uranile o citrato di piombo appena prima di montare il campione nel microscopio.

Crio-fissaggio

E' possibile cristallizzare il campione congelandolo in modo sufficientemente veloce da non permettere ai cristallini di ghiaccio di formarsi.

In questo modo il materiale può poi essere opportunamente tagliato (a bassa temperatura) e montato nel microscopio.

Il portacampione del microscopio elettronico dovrà avere un sistema per mantenere la bassa temperatura.

Crio-fissaggio

1. **Congelamento per immersione:** il campione viene immerso nel criostato
2. **Congelamento per urto:** il campione viene fatto impattare su un metallo lucidato raffreddato con azoto liquido o elio liquido.
3. **Congelamento per blocchi freddi:** due blocchi metallici freddi (opportunamente lucidati) attaccati ad una pinza stringono il campione congelandolo
4. **Congelamento per spray :** il campione viene finemente spruzzato nel materiale congelante (propano liquido)
5. **Jet freezing** – un getto di materiale congelante viene spruzzato sul campione
6. **Congelamento ad alta pressione** – congelare il campione ad alta pressione per eliminare l'acqua
7. **Congelamento per asportazione** – un ago freddo viene infilato nel campione congelandolo e sezionandolo allo stesso tempo.

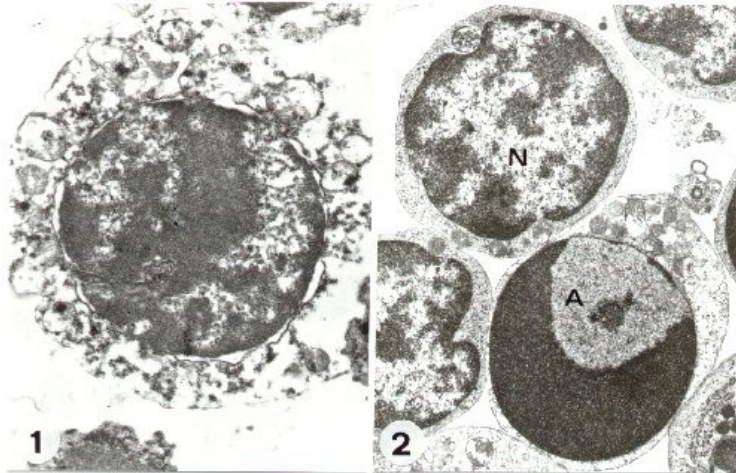
Crio-clivaggio (Freeze Fracture)

Si può fare una replica del campione.

Si deposita un strato sottile di metallo pesante come il platino sul campione per poi ricoprirlo con un sottile strato di carbonio. L'oggetto viene poi separato dalla sua replica (o staccandolo meccanicamente) o distruggendo il campione:

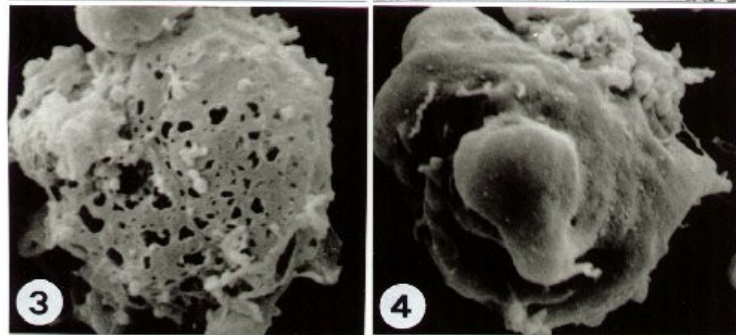
1. Il campione viene congelato
2. Il campione viene fratturato
3. Il campione così fratturato e lasciato in vuoto degassa vapore acqueo e si deidrata.
4. Una replica viene poi fatta dal campione deidratato e congelato.

Microscopia elettronica: necrosi ed apoptosi



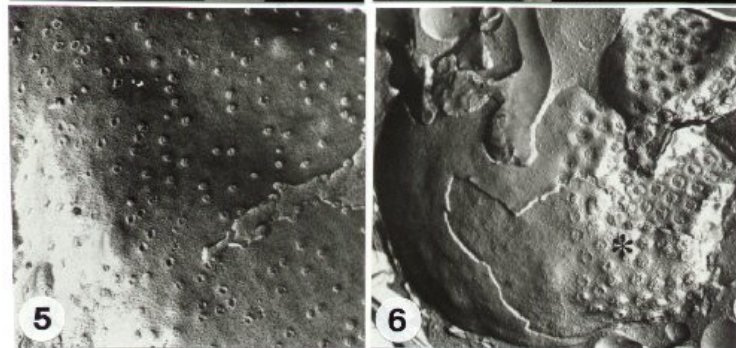
•**Fig. 1**
TEM di una cellula necrotica. (: x 10,000)

•**Fig. 2**
TEM di una cellula apoptotica(A) e normale (N). (x 8,000)



•**Fig.3**
SEM di una cellula necrotica. (superficie) (x 5,000)

•**Fig. 4**
SEM di una cellula apoptotica. (x 5,000)



•**Fig. 5**
FF (freeze fracture) di una cellula normale, parete del nucleo (: x 30,000) (replica in platino/carbonio)

•**Fig. 6**
FF di una cella apoptotica. (x 35,000)

Crio-sezionamento

Dopo fissaggio chimico il tessuto è immerso in una sostanza che protegge il campione come saccarosio.

Successivamente il campione viene congelato (cristallizzato) immergendolo in azoto liquido.

Questo crio-protettore evita che si formino dei cristalli di ghiaccio che possono danneggiare la struttura del campione stesso.

