

## Produits

- Acétate d'uranyle : solution 2 ou 5% / H<sub>2</sub>O
- Hydroxyde de sodium en pastilles
- Nitrate de plomb : Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- tri-sodium citrate : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.
- H<sub>2</sub>O distillée filtrée sur millipore

## Petit matériel

- Pince à bouts fins pour tenir les grilles
- Chronomètre
- Pissette ou seringue remplie d'H<sub>2</sub>O distillée filtrée sur millipore
- Boîtes de Pétri dont le fond est couvert d'un morceau de parafilm
- Boîte de séchage des grilles entre les 2 colorations
- Papier filtre Schleicher & Schuell n° 576

## Préparation des colorants

### 1. Citrate de plomb selon Reynolds (1963)

Reference : Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212.

- Utiliser de l'eau distillée filtrée sur millipore fraîchement bouillie pendant 20 minutes et ensuite refroidie.
- Déposer dans le fond d'un bécher de 50 ml 1,33 g de nitrate de plomb, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, et 1,76 g de tri-sodium citrate, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>. Ajouter 30 ml environ d'eau distillée filtrée bouillie et refroidie. Placer sur agitateur magnétique (agitation douce) pendant 30 min en couvrant le bécher.
- Ajouter 8 ml de NaOH 1 N et replacer le bécher sur agitateur magnétique pour homogénéiser la solution : la solution devient limpide
- Transférer la solution de colorant dans un jaugé de 50 ml et ajuster le volume à 50 ml avec de l'eau distillée filtrée sur millipore et fraîchement bouillie.
- Remettre sur agitateur ou mélanger par inversion.
- La solution finale (pH 12) est stable relativement longtemps à 4°C si elle est conservée dans un flacon bien fermé à l'abri de l'air et de la lumière.

### 2. Acétate d'uranyle

- Préparer une solution à 2% ou 5% dans de l'eau distillée filtrée sur millipore
- Mettre sur agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète de la poudre
- Stocker 24 h au frigo à l'abri de la lumière à T° du labo dans une bouteille bien fermée
- Garder ensuite la solution à 4°C, toujours à l'abri de la lumière.

### Procédure de coloration

- Centrifuger une aliquote de chacun des 2 colorants (prévoir environ 30-50 µl/grille), dans des tubes Eppendorf, 10 min à vitesse maximum d'une centrifugeuse de table.
- Disposer un morceau de parafilm sur le fond d'une boîte de Pétri en notant sur celui-ci le numéro des grilles à colorer (n° dans Grid Box).
- Déposer des gouttes d'acétate d'uranyle (~30 µl) sur le morceau de parafilm (une goutte/grille).
- A l'aide d'une pince à bouts fins déposer la grille à colorer sur la goutte de colorant, les coupes en contact avec celui-ci. Le temps de coloration varie selon le matériel.  
Si on colore plusieurs grilles, prévoir un décalage d'une minute entre chaque grille pour le rinçage à l'H<sub>2</sub>O distillée filtrée sur millipore.
- Rincer chaque grille avec 5 ml d'H<sub>2</sub>O distillée filtrée sur millipore pendant environ 20 secondes en tenant la grille avec une pince et en faisant couler l'eau sur la grille le long des bras de la pince, à la pissette ou à la seringue munie d'un filtre millipore.
- Sécher la grille en appliquant une de ses bords verticalement sur un papier filtre. Enlever l'excès d'eau entre les bras de la pince avec du papier filtre et déposer la grille, coupes vers le haut, soit sur du papier filtre Schleicher & Schuell n° 576, soit sur un support en silicone.
- Laisser sécher les grilles à l'abri des poussières pendant 5 minutes.
- Disposer des gouttes de citrate de plomb sur du parafilm dans une boîte de Pétri dans laquelle on a déposé au préalable des pastilles de NaOH pour capter le CO<sub>2</sub> et éviter ainsi la formation de dépôts de carbonate de plomb. Le temps de coloration varie de nouveau selon le matériel. Refermer la boîte de Pétri pendant la coloration.
- Rincer les grilles à l'H<sub>2</sub>O distillée filtrée et les récupérer comme décrit plus haut, puis les remettre dans leur boîte de stockage (Grid Box)

### Exemples de temps de coloration

Coupes	Acétate d'uranyle 2%	Plomb
Racines de <i>Zea mays</i>	25 min	15-20 min
<i>Chlamydomonas</i>	20 min	6 min