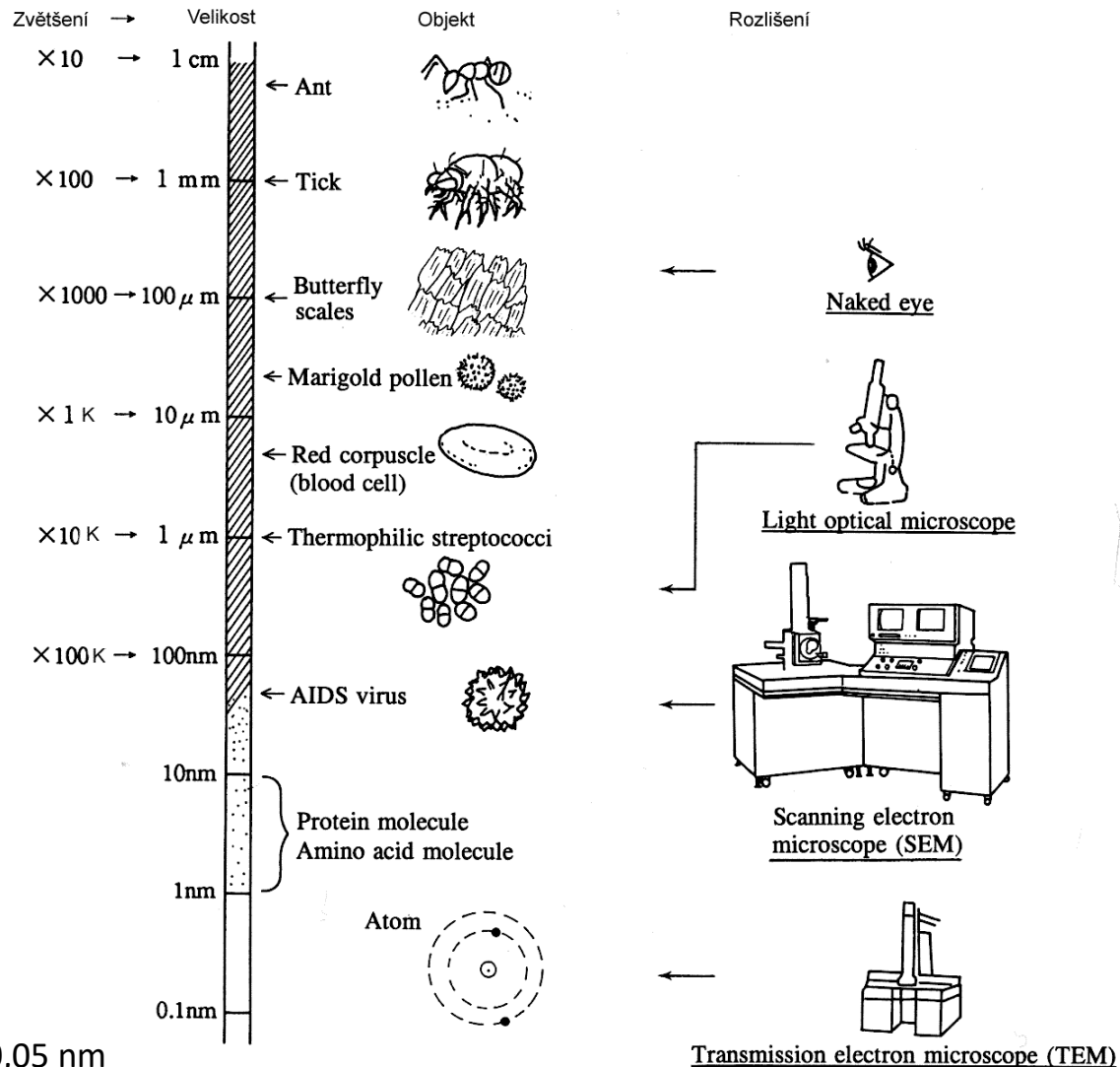


Úvod do elektronové mikroskopie

Srovnání rozměrů a rozlišení



Atom vodíku = $0,529 \cdot 10^{-10} \text{ m} = 0,05 \text{ nm}$

Jádro atomu = $10^{-15} \text{ m} = 1 \text{ fm}$

Co je elektronová mikroskopie

- EM je diagnostický nástroj , který umožňuje unikátní vhled do
 - morfologie vzorku
 - tvar a velikost částic (TEM)
 - topologie
 - povrchové vlastnosti (SEM)
 - struktury, uspořádání
 - krystalografické vlastnosti (Elektronová difrakce)
 - složení materiálů
 - prvkové složení (Analytická EM)

Elektronová mikroskopie, spolu s využitím rentgenového záření a dalších technik, významně podpořila vznik oboru **molekulární biologie**.

Proč elektrony?

- Elektron má náboj – negativní
- Elektron je velmi lehký - 1800x lehčí než jaderné částice
- Je výrazně jednodušší elektrony uvolnit z orbitalů

=> je možné elektrony urychlit v elektrickém poli

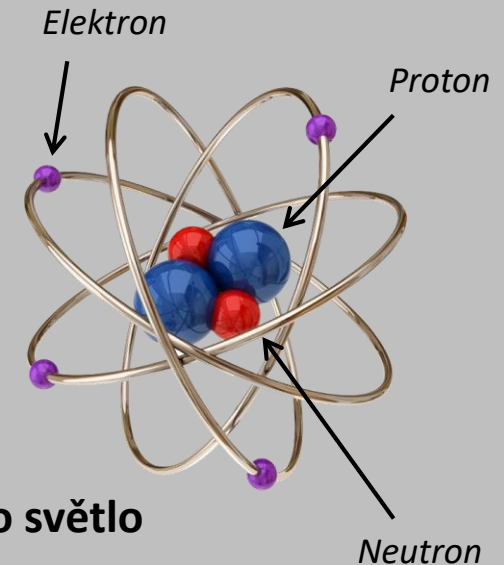
- **Když se uvolní elektrony z atomů ve vakuu, chovají se jako světlo**
- **Napětím lze regulovat délku vlny elektronu**

- Při 100 kV je vln délka 0,0038 nm.

$$\lambda = 1,226 / U^{1/2}$$

λ - vlnová délka
U – el. napětí

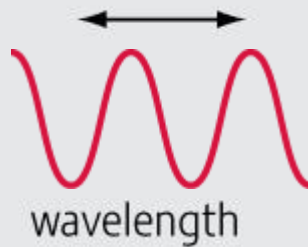
- Ačkoliv v současnosti jsou TEMy využívány s rozlišením 0,1 nm. Vyšší rozlišení znamená technické obtíže – vibrace atomů v pevných látkách rozmazávají obraz s limitem okolo 0,03-0,07 nm.



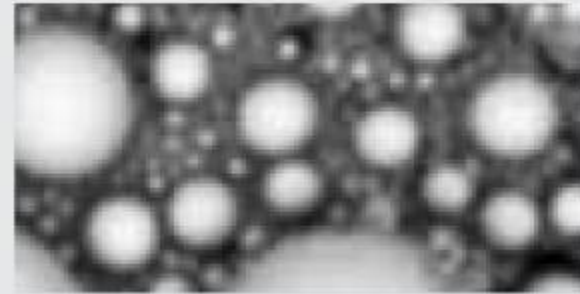
Atom vodíku = $0,529 \cdot 10^{-10}$ m = 0,05 nm
Jádro atomu = 10^{-15} m = 1 fm

Jak je rozlišovací schopnost ovlivněna vlnovou délkou

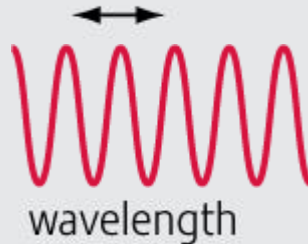
dlouhá vlna



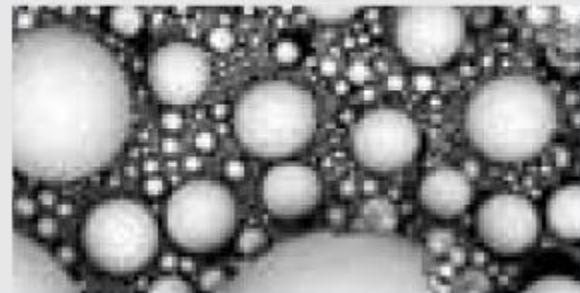
poor resolution



krátká vlna

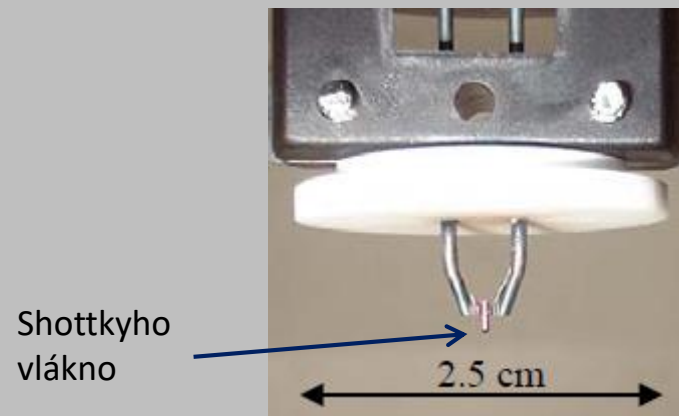
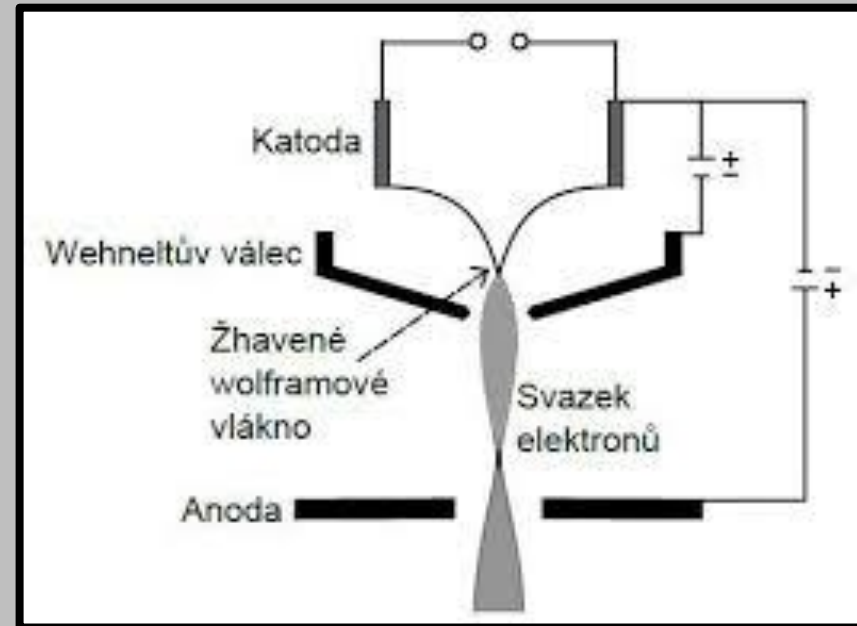


good resolution



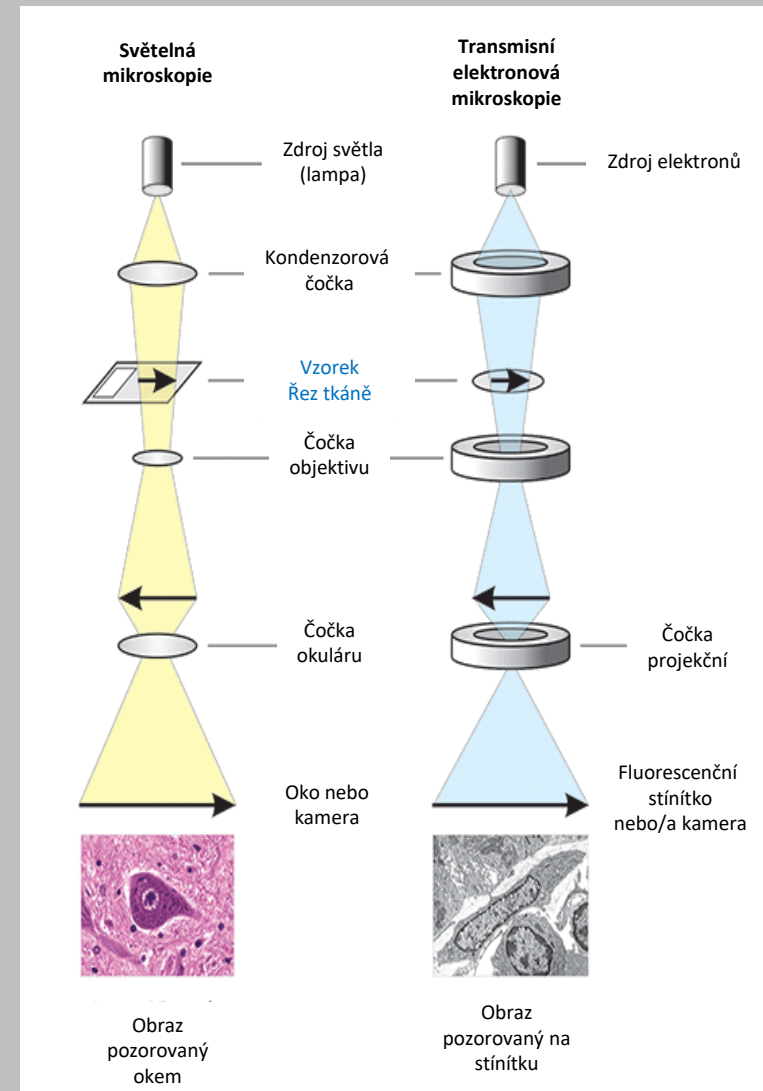
Zdroj elektronů (elektronové dělo)

- Zdrojem elektronů je ohnutý vodičvlákno, kterým protéká proud – to je katoda
 - Nejčastější materiály vlákna
 - Wolfram (W)
 - Thermionin (LaB_6)
 - Schottky (ZrO/W)
 - Rozdíly jsou v ceně a vlastnostech – zejména jas
- Elektrony v ohybu vypadávají, proletují štěrbinou wehneltova válce a následně skrze jsou urychleny k anodě a skrze štěrbinu opouští zdroj do vakuovaného tubusu.



Směřování elektronového paprsku

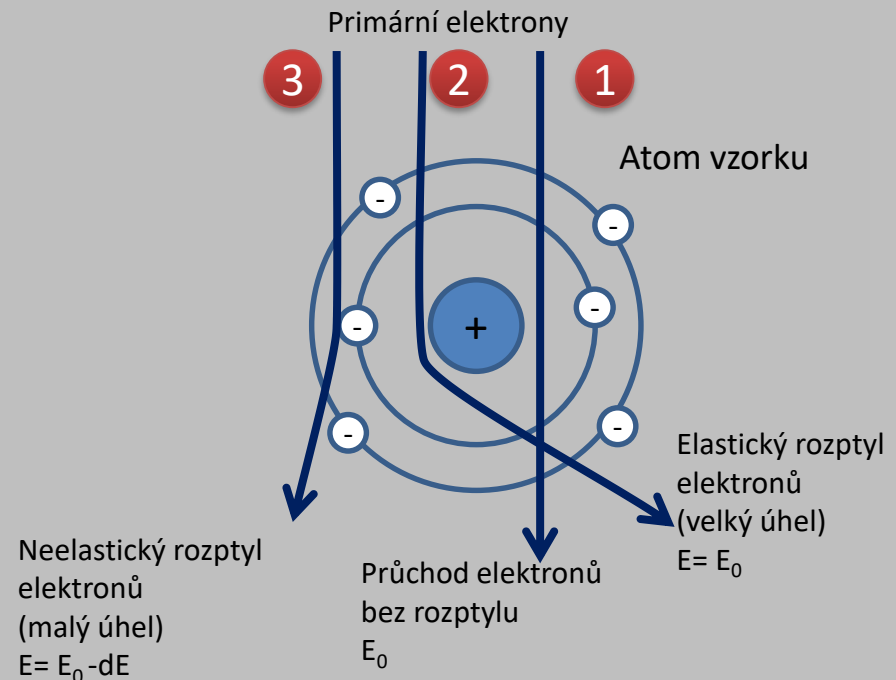
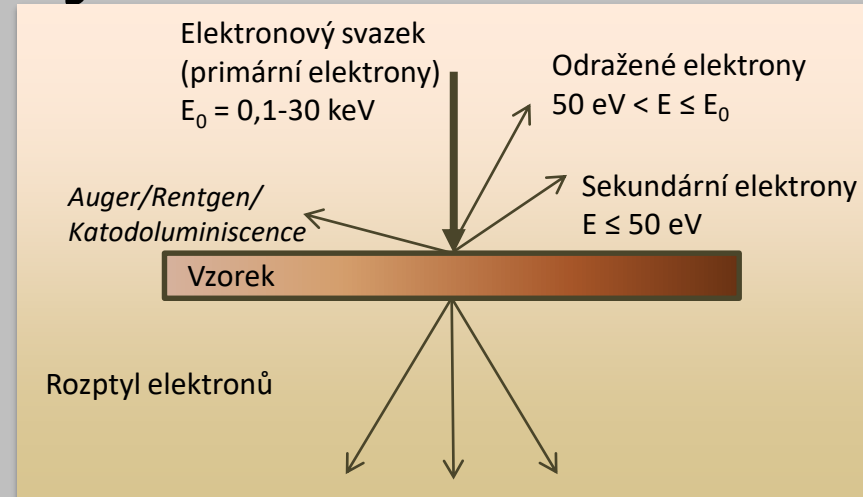
- Svazek elektronů soustředí **kondenzorová „čočka“** (elektromagnetická cívka) na preparát
- „čočky“ = elektromagnetické cívky **objektivu** směřují elektrony, které prošly preparátem, na fluorescenční stínítko nebo speciální kameru, kde se vytváří obraz.
- Stínítko umožňuje převedení elektromagnetického vlnění na světlo.



Elektrony dopadají na vzorek

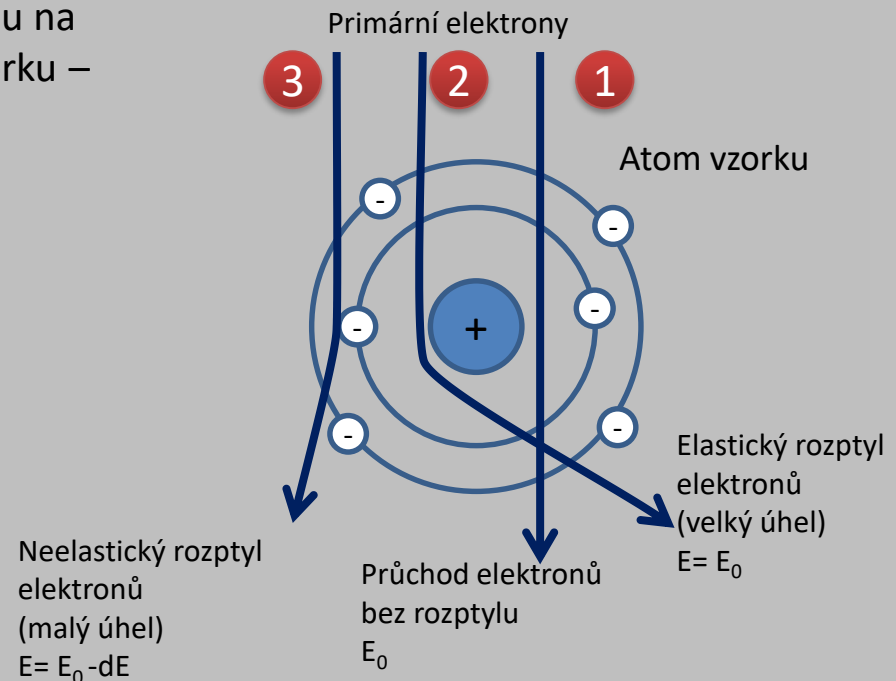
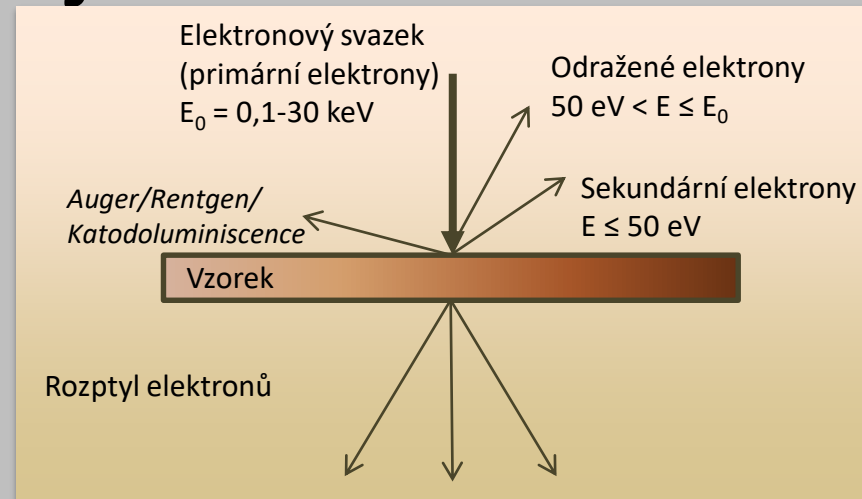
- Schémata interakce elektronů s hmotou po jejich dopadu
- Pro TEM musí být preparát dostatečně tenký, aby elektrony prošly

1 Elektrony, která vzorkem projdou – ale nereagují s ním, vytváří na fluorescenčním stínítku / kameře světlé body



Elektrony dopadají na vzorek

- Schémata interakce elektronů s hmotou po jejich dopadu
- Pro TEM musí být preparát dostatečně tenký, aby elektrony prošly
- 2 Elastický rozptyl ohybem dráhy v blízkosti jádra způsobí odklonění elektronů – žádná energie není z elektronu přenesena do vzorku – el. nedopadnou na stínítko a jsou registrovány jako tmavá místa vzorku – tento rozptyl je pro TEM zásadní

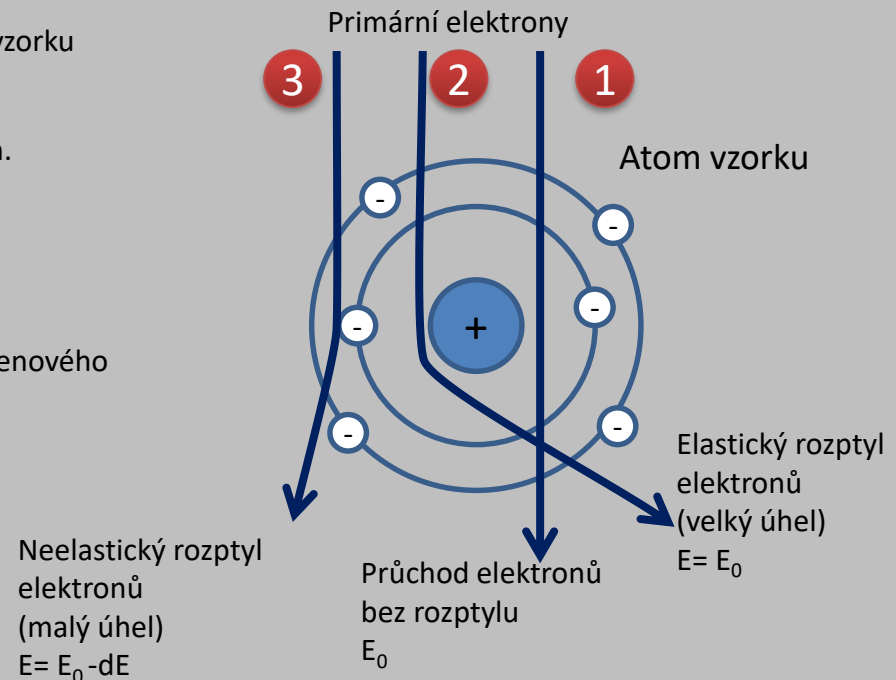
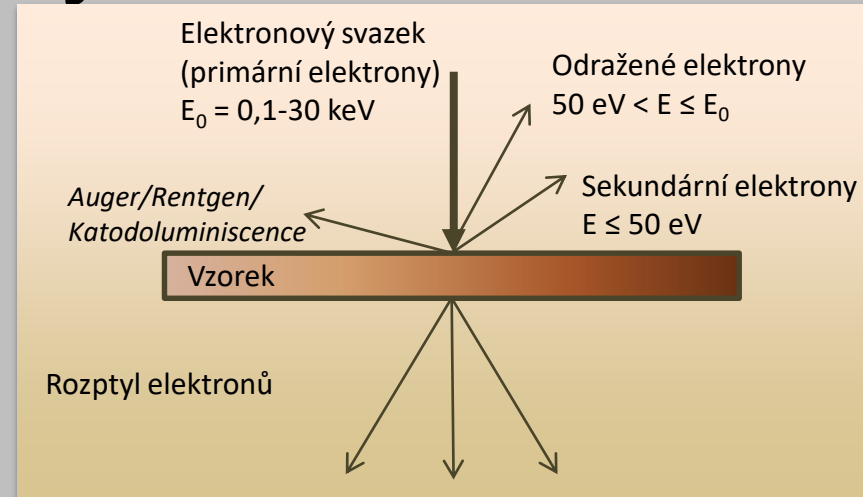


Elektrony dopadají na vzorek

- Schémata interakce elektronů s hmotou po jejich dopadu
- Pro TEM musí být preparát dostatečně tenký, aby elektrony prošly
- 3 Neelastický rozptyl elektronů – reakce s elektrony vzorku

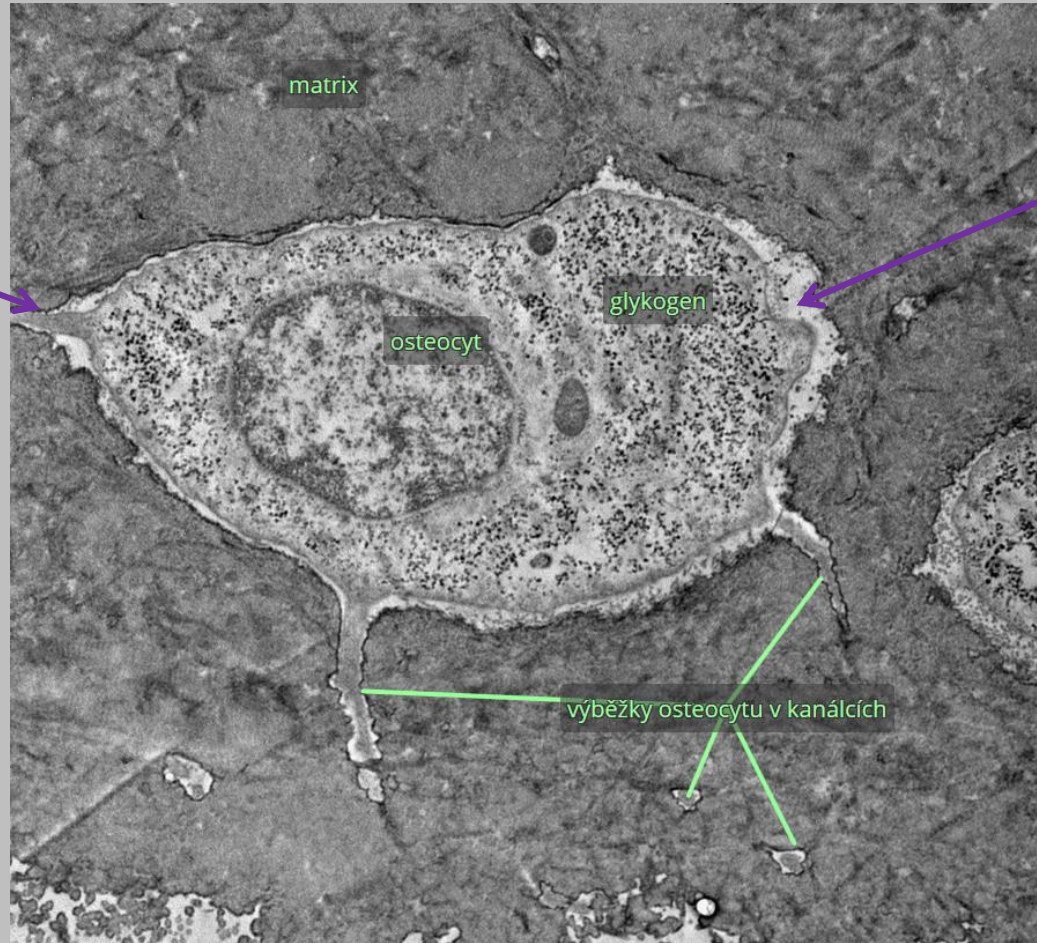
- způsobuje malý odklon elektronu a tyto vytváří v obraze vzorku nespecifické rozmazání – pro TEM je nežádoucí
- navíc část energie z elektronu je přenesena do vzorku, tzn.
- změní se vlnová délka elektronu

Pozn. Při srážce elektronu s jádrem dochází k produkci rentgenového záření



TEM vzorku kosti

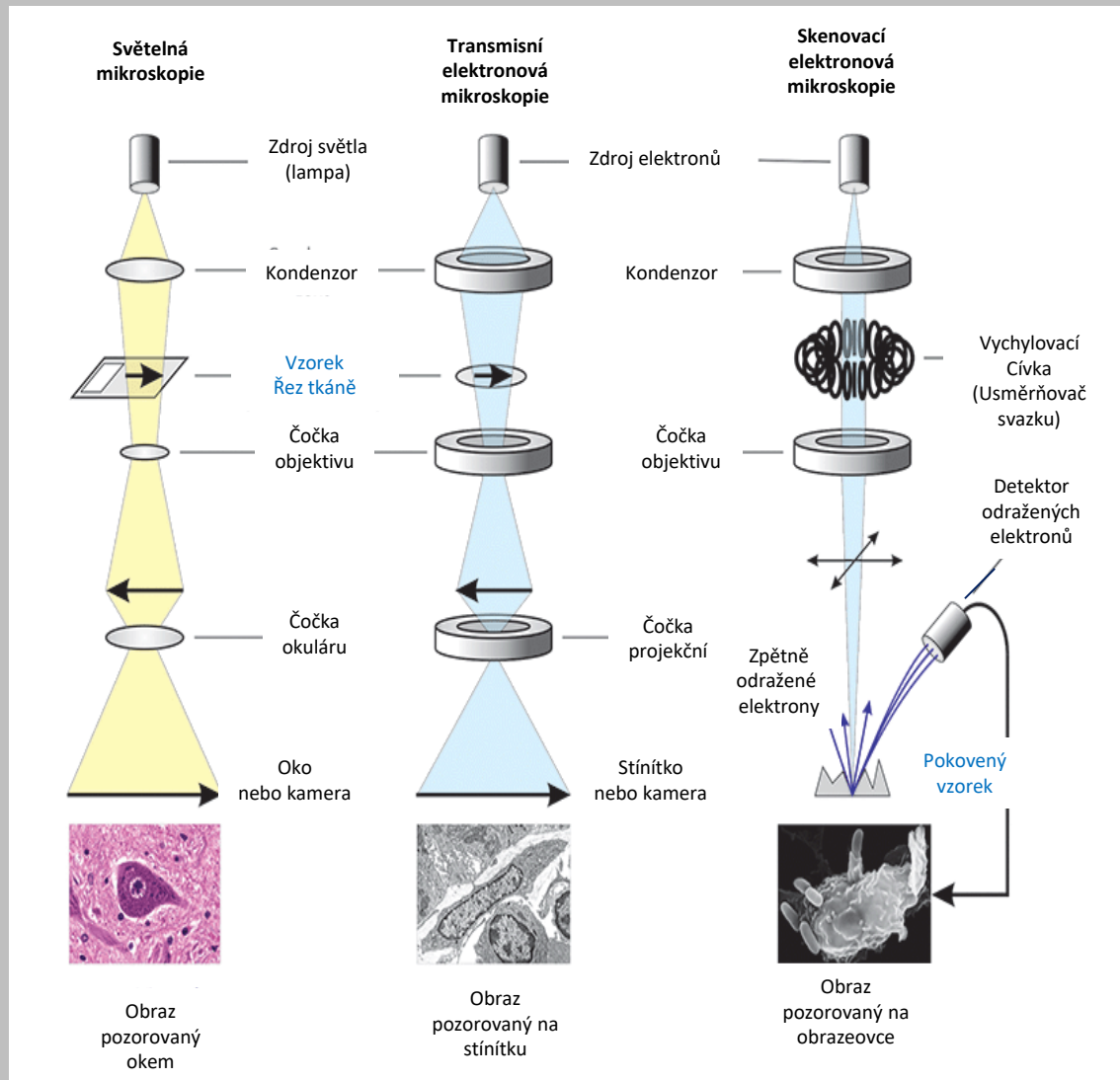
(tkáň byla kontrastována těžkými kovy)



V místě membrány buňky je vyvážen těžký kov, který způsobil odklon většiny elektronů, nebo jeho pohlcení

Většina elektronů prošla tímto místem až na stínítko

Skenovací elektronový mikroskop (SEM)



Směřování paprsku u SEM

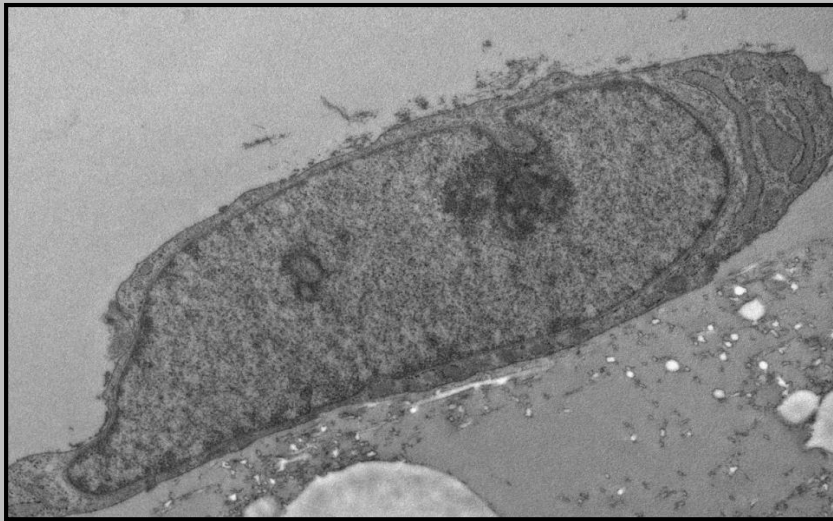
- **kondenzorová** „čočka“ (elektromagnetická cívka) soustředí svazek elektronů do malého místa-“bodu“ (méně než 4 nm v průměru) na preparátu
- směrování svazku elektronů je regulováno **usměrňovačem svazku**, což umožňuje skenování preparátu **řádek po řádku**
- z povrchu pozorovaného objektu jsou vyráženy sekundární elektrony, které jsou zaznamenávány detektorem elektronů
- obraz povrchu pozorovaného objektu vzniká podobně jako u skeneru – rastrováním povrchu elektronovým svazkem

Srovnání TEM a SEM

	TEM	SEM
<i>Elektronový svazek</i>	široký, statický	fokuseovaný do bodu, vychylovaný řádek po řádku
<i>Urychlovací el. napětí</i>	v rozsahu 60-300.000 voltů	Urychlovací napětí mnohem nižší, netřeba penetrovat vzorek (100 V)
<i>Interakce elektronů</i>	Vzorek musí být velmi tenký (50 nm)	Možné skenovat široké spektrum vzorků - jednoduchá příprava
<i>Snímání</i>	Elektrony musí projít skrze vzorek	Potřebná informace je získána v blízkosti povrchu vzorku
<i>Vyobrazení</i>	Svazek elektronů je zaostřený na stínítko čočkou objektivu a zvětšeny k vytvoření obrazu	Obraz je vytvářen v průběhu rastrování (řádkování) povrchu vzorku

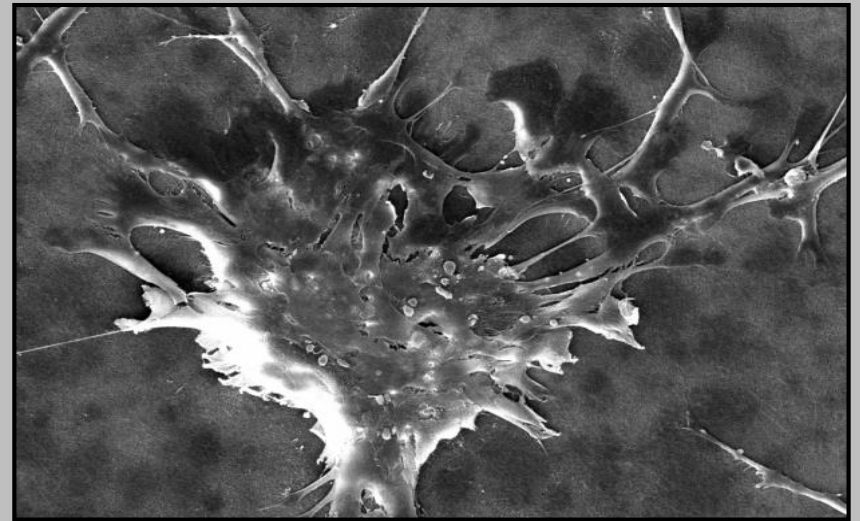
Elektronová mikroskopie buňky

Transmisní



↔
2 μm

Skenovací



↔
50 μm

1934 - první TEM

- 1934 první TEM
- **Ernst Raska** - University of Berlin
- 1938 – první obrázek viru
- 1986 – Nobelova cena



- Rozlišení 100 nm
- Zvětšení 400x
- V Československé republice
- 1949 – první český EM v Tesle Brno prof. Armin Delong

SONDERDRUCK AUS
**KLINISCHE
WOCHENSCHRIFT**

ORGAN DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE
VERLAG VON JULIUS SPRINGER, BERLIN, UND J. F. BERGMANN, MÜNCHEN

JAHRG. 17

2. JULI 1938

Nr. 27, S. 921/925

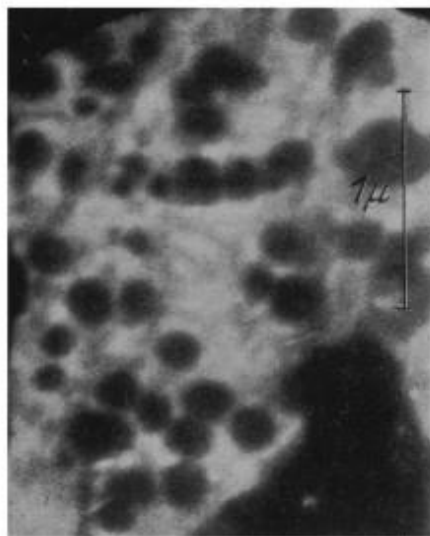
**BAKTERIEN UND VIRUS IN ÜBERMIKRO-
SKOPISCHER AUFNAHME**
(mit einer Einführung in die Technik des Übermikroskops).

Von

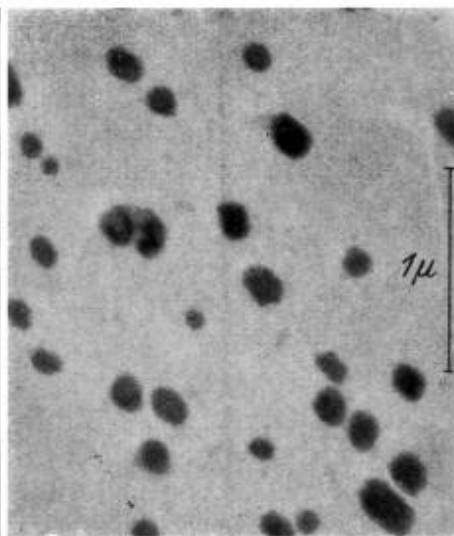
B. VON BORRIES, E. RUSKA und H. RUSKA.*

Aus dem Laboratorium für Elektronenoptik des Wernerwerks F der Siemens & Halske.
Aktiengesellschaft und der I. Medizinischen Universitätsklinik der Charité.

(a)



(b)

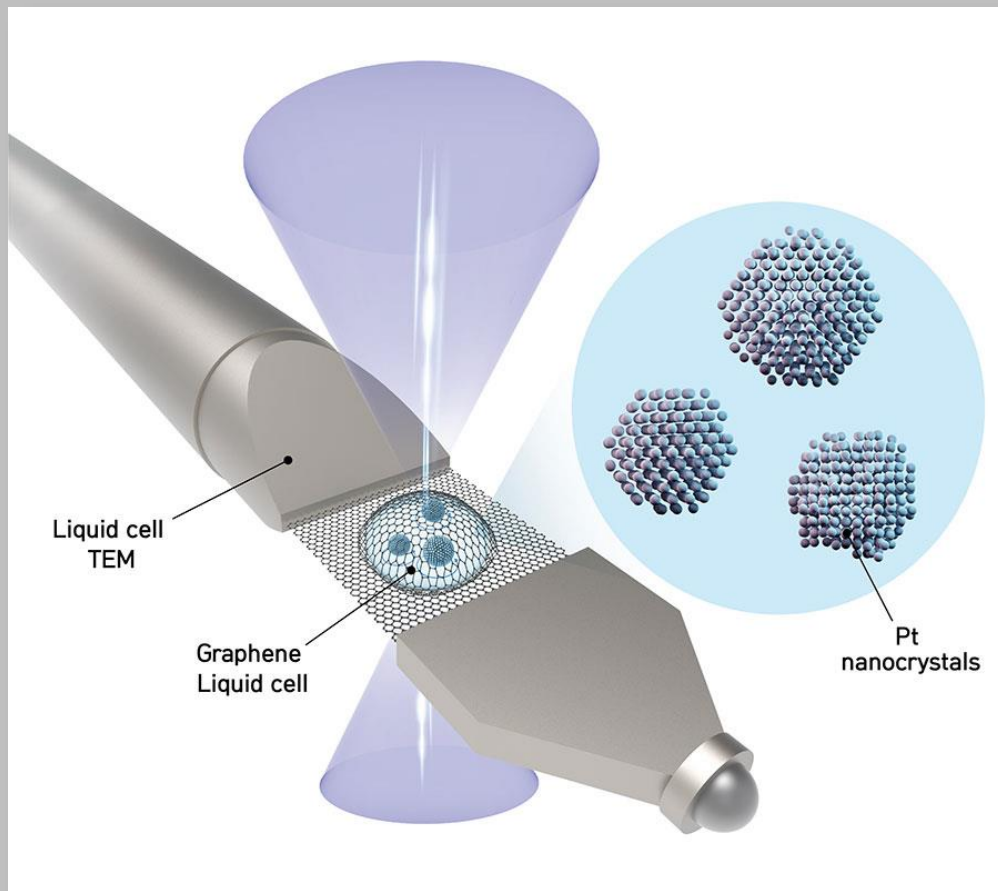


2020 – TEM – Titan FEI

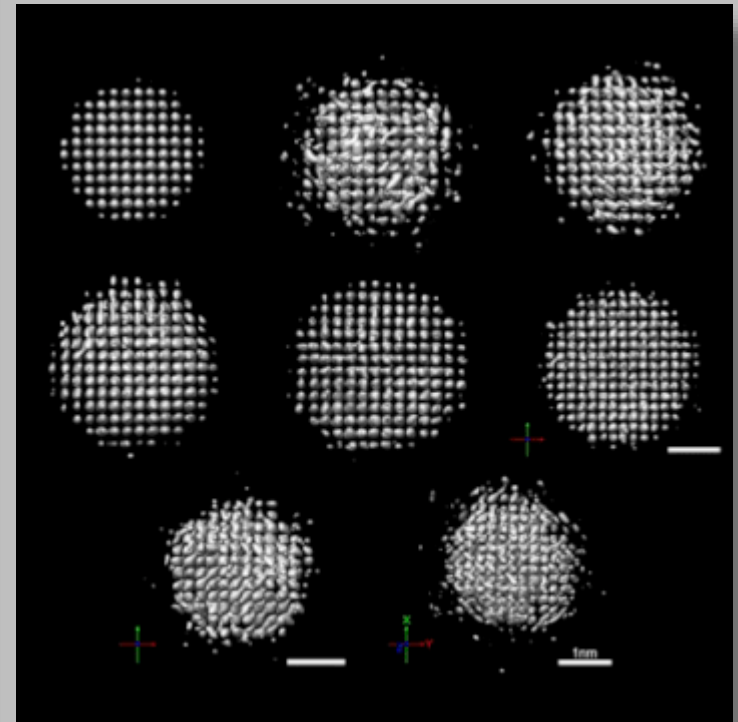
- Dosažen teoretický limit prostorového rozlišení 0,05 nm
- Precizně nastavitelné parametry pro specifická vlákna, řízení vakua, napětí
- Zpřesnění manipulace se svazkem elektronů – kolimátory, redukce sférické a chromatické aberace
- Digitální kamery, fotonásobiče



2020 - Ukázka lokalizace atomů v nanočásticích



Získávání 3D struktur v kapalině s atomárním rozlišením. Schéma znázorňuje kapalný vzorek umístěný mezi dvěma listy grafenu. Nanočástice v kapalině volně rotují, zatímco TEM pořizuje tisíce snímků nanočástic. Snímky se pak analyzují a určují polohu každého atomu v každé nanočástici.



3D snímky částic platiny o průměru 2-3 nm rotujících v kapalině pod elektronovým mikroskopem. Každá nanočástice má přibližně 600 atomů. Bílé kuličky označují polohu každého atomu v nanočástici. Měřítko 1 nm.

Metody přípravy biologického materiálu pro TEM

Standardní metody:

- **ultratenké řezy**
- **metoda negativního kontrastování**
- **imunoznačení**

- **freeze fracture and etching** (mrazové lámání a leptání)
- **stínění kovem**

Specializované metody:

- **kryo- transmisní elektronová mikroskopie**

Příprava vzorků pro TEM

- ultratenké řezy

- Vzorek musí být velmi tenký (50 nm) a pro elektrony prostupný
- Nejčastěji se připravuje zaléváním do pryskyřice a poté se upravuje krájením řezů o požadované tloušťce, které se „dobarvují“ těžkými kovy, či protilátkami s navázanými nanočásticemi kovu (Au, Ag)



Příprava vzorků pro TEM

- ultratenké řezy

Fixace - aldehydy (zejména glutaraldehyd) - cílem je stabilizovat preparát (1 mm³) co nejlépe nativnímu stavu

Postfixace - OsO₄ – šetrně a jemně gelifikuje intracytoplazmatické proteiny, dobře zachovává strukturu biologických membrán a nadto stabilizuje a kontrastuje lipidy - vysoce toxická látka

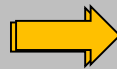
Odvodnění - vzestupná řada alkoholu, aceton

Prosycení a zalévání - vzorek je prosycen rostoucí koncentrací pryskyřice – dle typu tkáně a použité techniky snímání.

- na epoxidové bázi – e.g. Durcupan
- na akrylátové bázi – e.g. LR White
- na polyesterové bázi - Vestopal W

Nejčastěji LR White.

Polymerace – Vzorek přenesen do formy a přelitý vytvrzen teplem nebo ozářením UV světlem



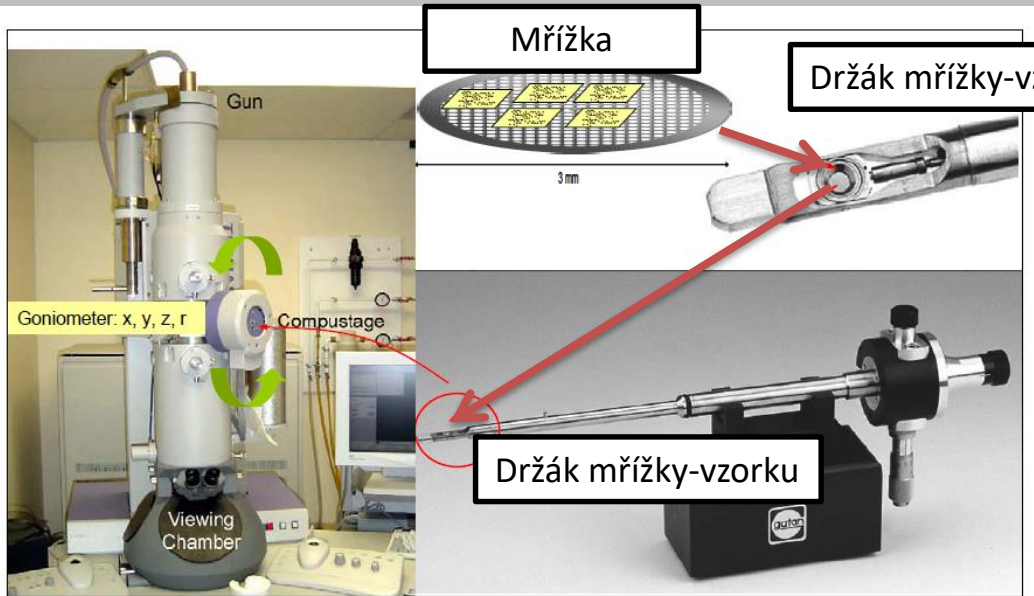
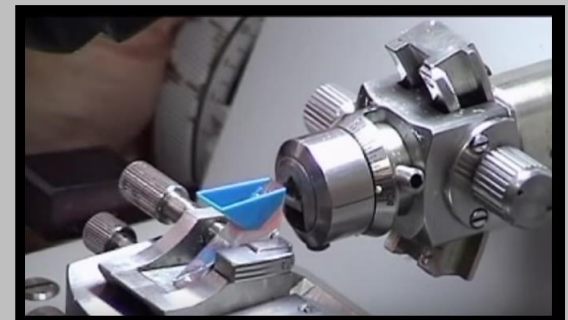
vzorek zalitý v pryskyřici
Černý díky postfixaci v OsO₄

Příprava vzorků pro TEM

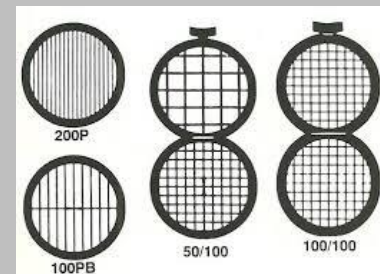
- ultratenké řezy

Krájení – vzorku v pryskyřici ultramikrotomem na hladinu dH₂O.

Přenesení vzorku – Na mřížky (sítky) potažené **formvarovou blánou** se naberou z hladiny ultratenké řezy a následuje mikroskopie



Nosné mřížky (sítky)



(Pozitivní) Kontrastování ultratenkých řezů

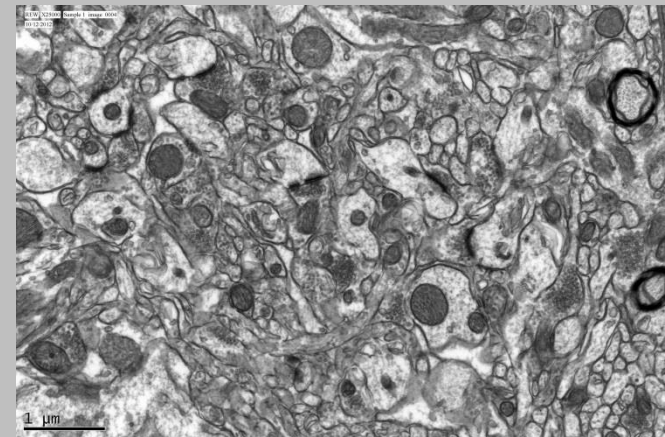
Ultratenké řezy mají minimální kontrast. Ten zvýšíme adsorpcí těžkých kovů na buněčné struktury. Používají se převážně kovy, které dovedou zvýšit rozptyl primárních elektronů: U, W, Pt, Pb a Mn, nazývané též elektronová barviva.

Oxid osmičelý – lipidy (membrány)

Octan uranylu - nukleové kyseliny a proteiny

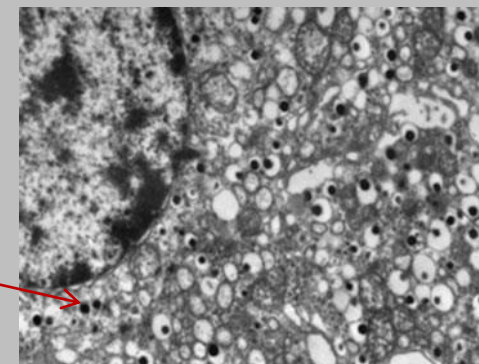
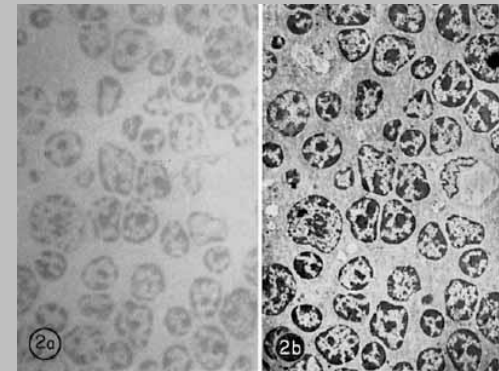
Citrát olova – (precipitát, zrna) – membrány, nukleové kyseliny, glykogen

OsO4



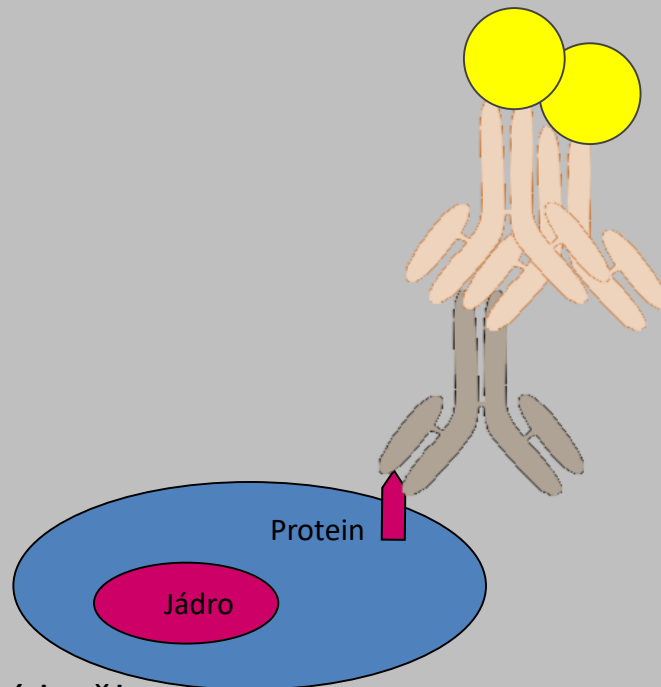
Bez

s kontrastováním



Imunoznačení pro TEM

- lokalizace antigenu na vzorku probíhá navázáním specifické primární protilátky a následně označený pomocí sekundární **protilátky značené těžkým kovem** (ferritin, částice koloidního zlata, stříbra. aj.)
- Značeny jsou ultratenké řezy – vzorky fixovány, odvodněny a zality do hydrofilních pryskyřic
- velikost nanočástic 3-40 nm



Nanočástice

Anti-myší sekundární protilátka
značená částicemi koloidního zlata

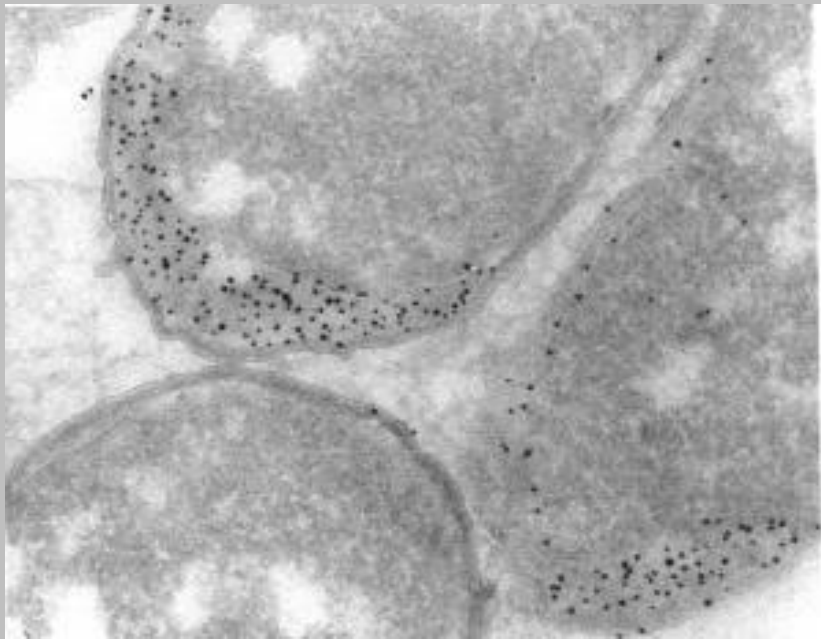
Primární protilátka anti-aktin
produkovaná v myši

Vzorek tkáně - Lidská buňka

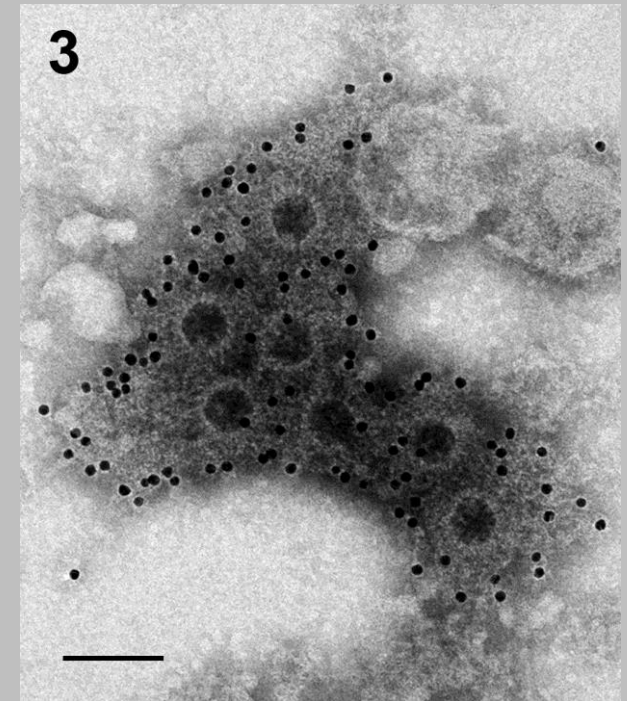
Imunoznačení v EM

Imunocytochemie

Imunoznačení zlatem - lokalizace specifického antigenu pomocí částic koloidního zlata (3-40 nm) navázaných na sekundární protilátku



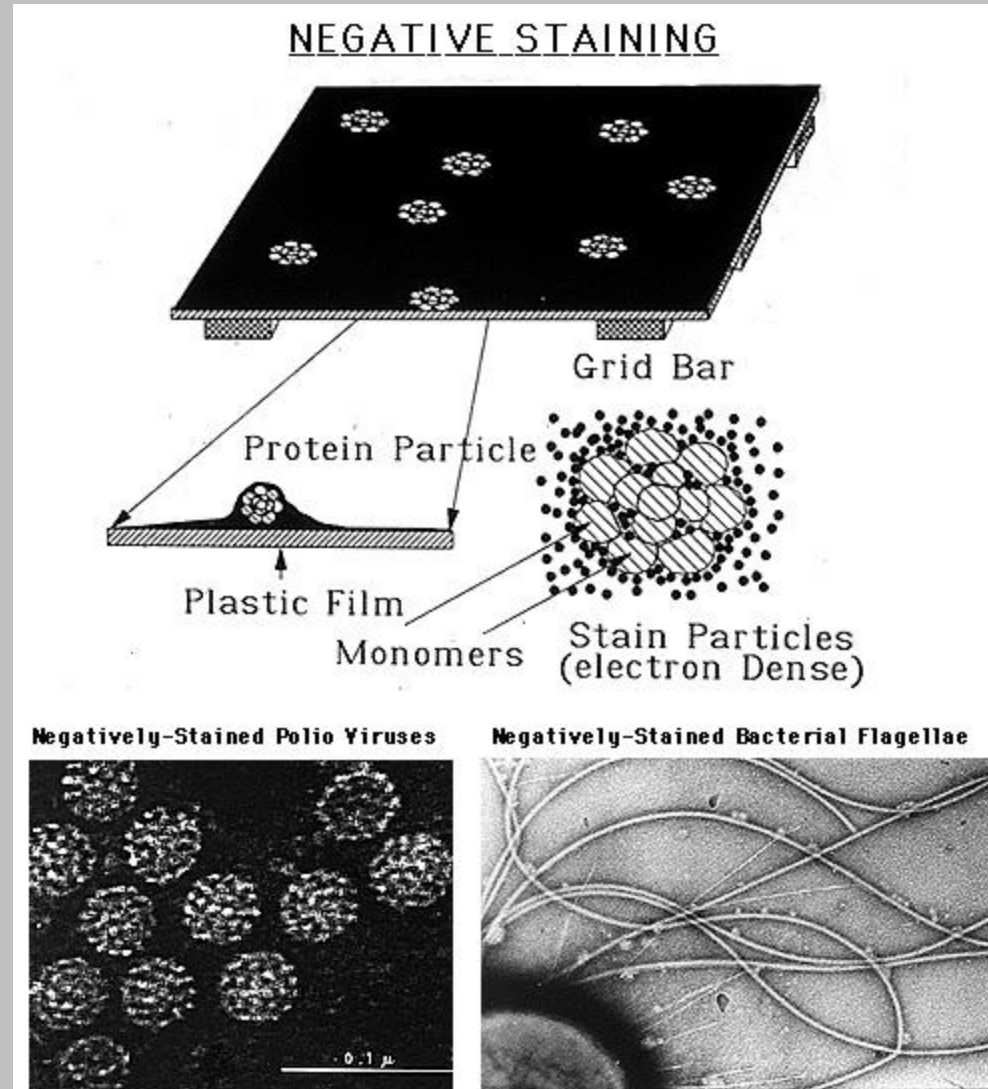
Imunoznačení periplazmatického prostoru ultratenkých kryořezů *Escherichia coli* konjugátem zlata s proteinem A.
<https://www.emsdiasum.com/microscopy/products/immunogold/immunogold.aspx>



Imunogold barvení vzorku rotavirům podobných částic v transdukovaných buňkách rVLPs pomocí polyklonální protilátky a sekundární protilátky spojené s 12 nm koloidním zlatem. Měřítka = 100 nm.
<http://www.microscopy.cz/html/2141.html>

Negativní kontrastování

- Je určena pro pozorování vzorků jejichž velikost je hluboko pod tloušťkou ultratenkých řezů, např. různých biologických makromolekul (proteinů, lipoproteinů, polysacharidů, nukleoproteinových komplexů), izolovaných buněčných organel (mitochondrie, membránové systémy) a celých buněk (bakterie, viry).
- Smíchání vzorku v roztoku s fixačním roztokem
 - kyselina wolframová
 - uranyl acetát, etc.
- Nanesení na mřížku, zaschnutí, pozorování
- Rychlá metoda
- Kontrastovací látka obalí a zčásti penetruje vzorek. Díky rozdílu hustoty ve vrstvě kontrastovací látky na vzorku a v okolí se pak částice jeví v některých oblastech transparentní. Okolo částic je charakteristické tmavé ohraničení způsobené vzlínáním kontrastovací látky

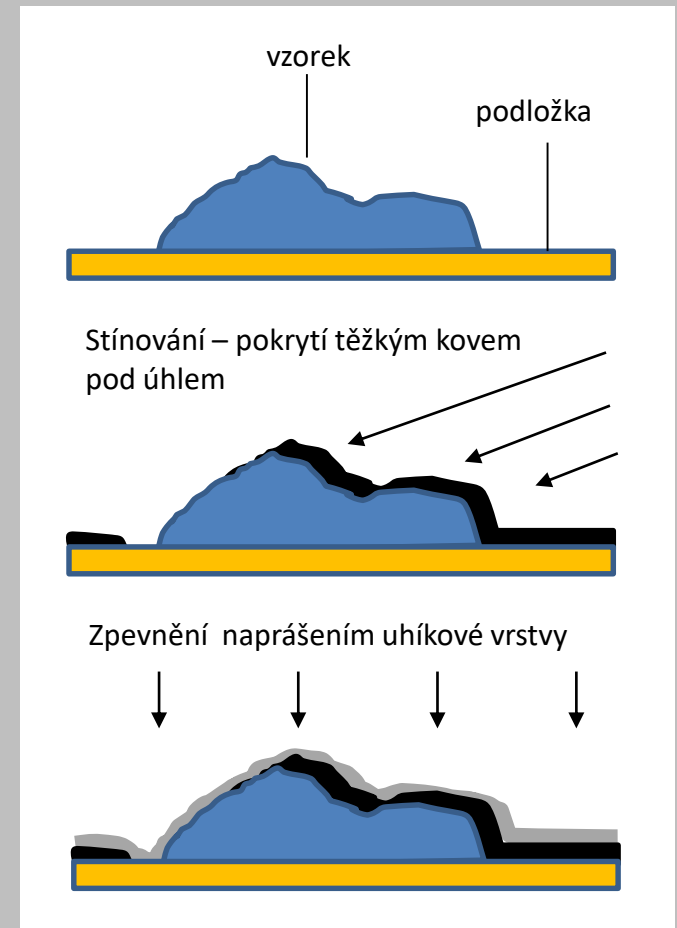


Stínění kovem

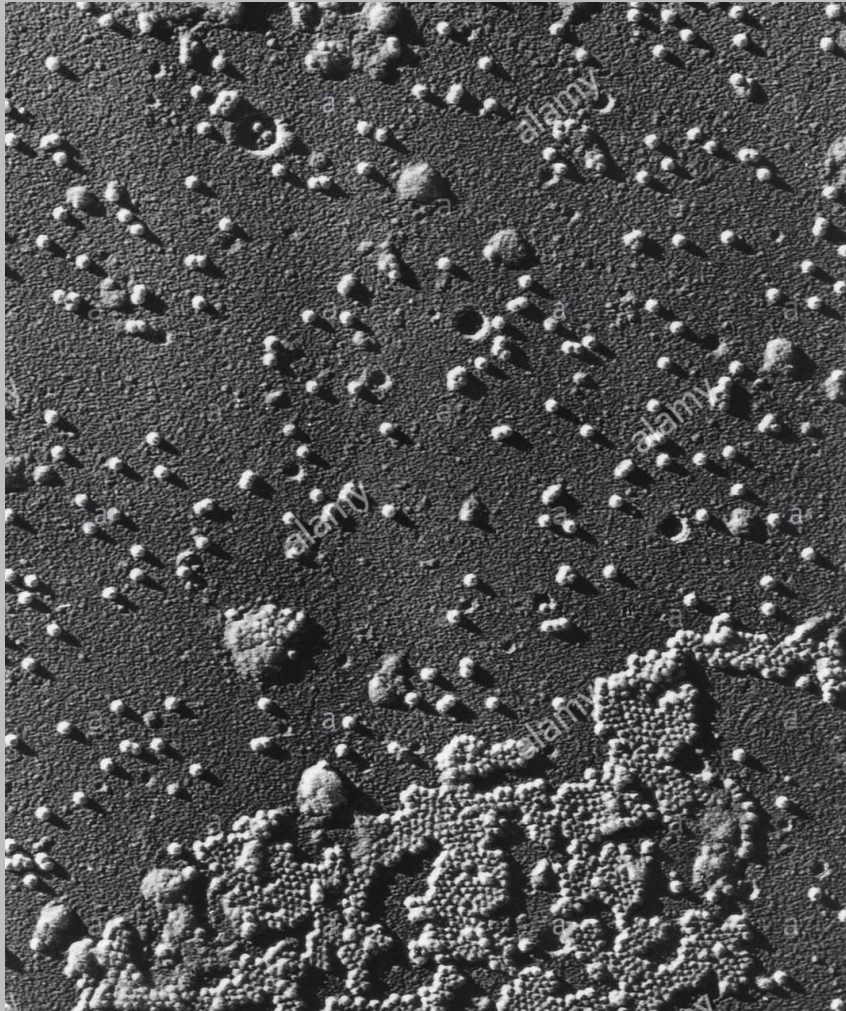
- Stínování spočívá v pokrývání preparátu tenkou vrstvou kovu. Při pokovování je preparát nakloněný, což zajistí zvýraznění jemných fibrilárních struktur a detailů malých makromolekul, např. kolagenu, DNA, RNA, ribozomů nebo buněčné stěny.
- pokovování se provádí ve vakuu (10^{-4} Pa)



pokovovačka s komorou pro vytvoření podtlaku



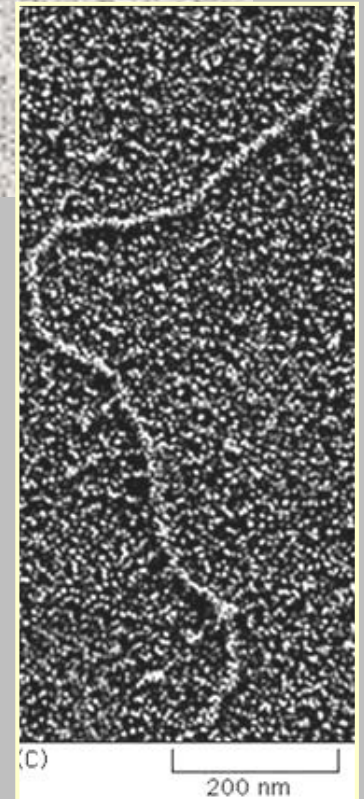
Stínění kovem - výsledný obraz



Polio virus



DNA



200 nm

Mrazové lámání a leptání

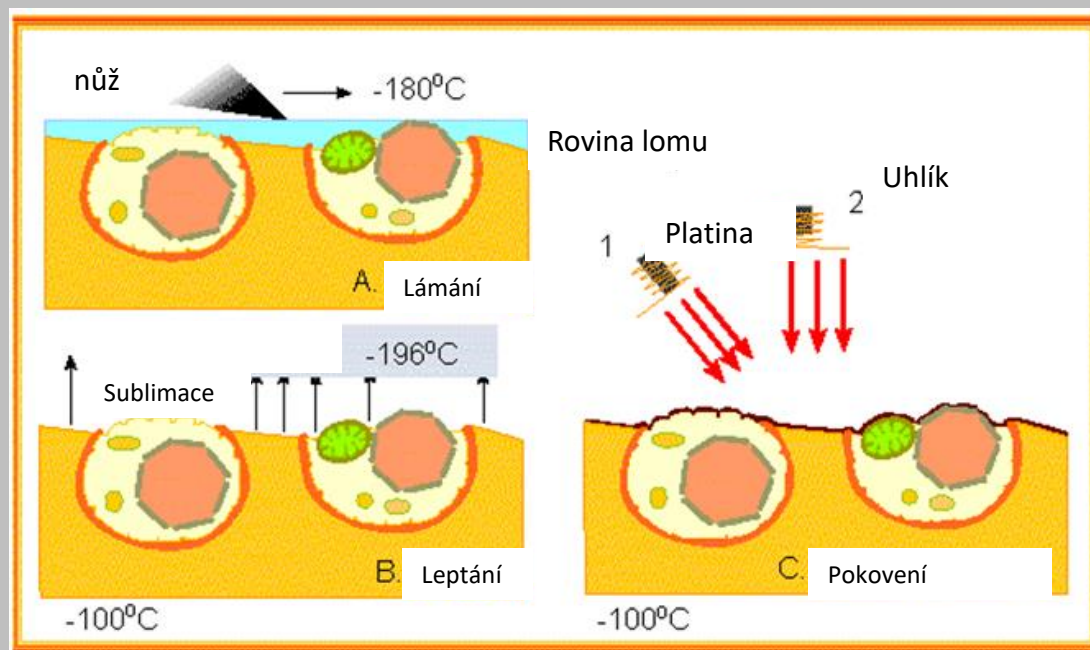
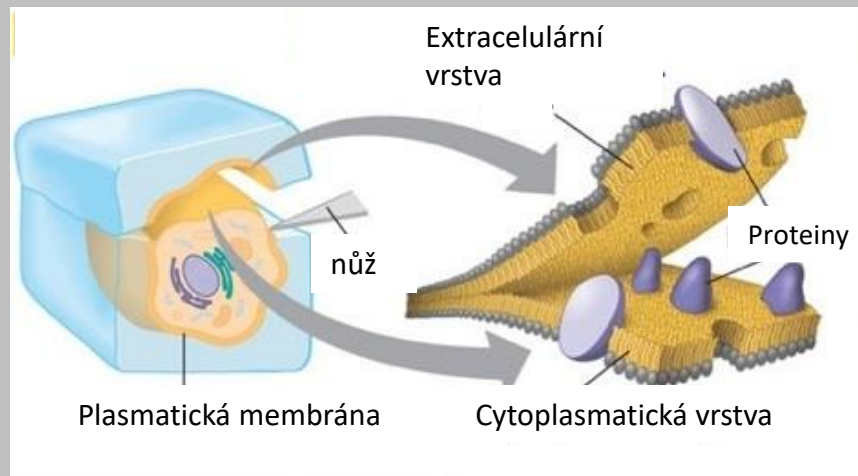
Freeze fracturing and etching

- Fixace, nahrazení části vody v preparátu kryoprotektivem (PEG)
- **Zmrazení** v tekutém freonu (-160°C), přenesení do tekutého dusíku (-196°C)
- **Lom vzorku** (aparatura pro mrazové lámání, vakuum, -190°C)
- Odsublímování části vody z lomné plochy při (etching, -100°C)
- **Pokovení lomné plochy:** Pt (pod úhlem 45°) a C (pod úhlem 90°)
 - vytvoření tzv. uhlíkové **repliky** (20 nm)
- Čištění replik - odstranění veškerého biologického materiálu kyselinami
- Přenos řezů na nosné sítěky s formvarovou blánou, pozorování

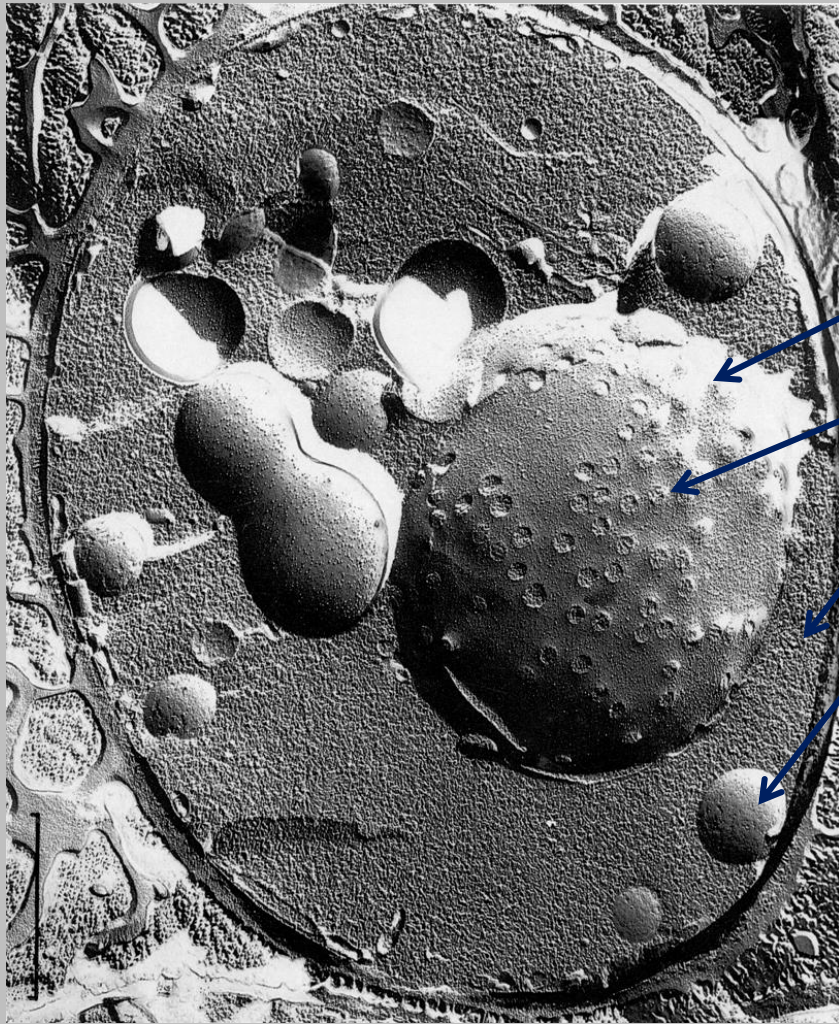


<http://www.tobiasrose.co.uk/mrbevis/ebpf.html>

Metoda pro zobrazování povrchu lomných ploch membránových struktur



Mrazové lámání a leptání - výsledný obraz



jádro

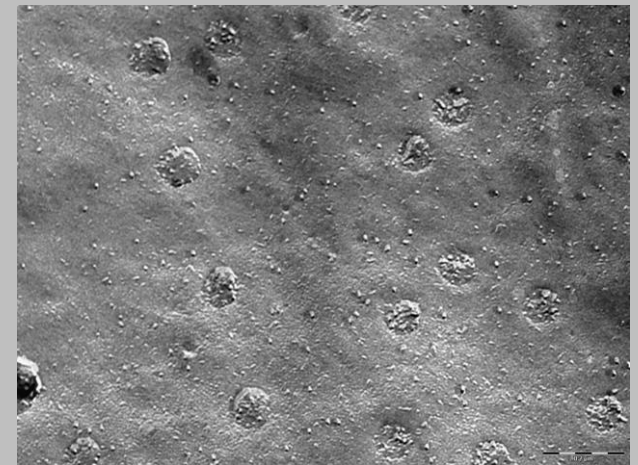
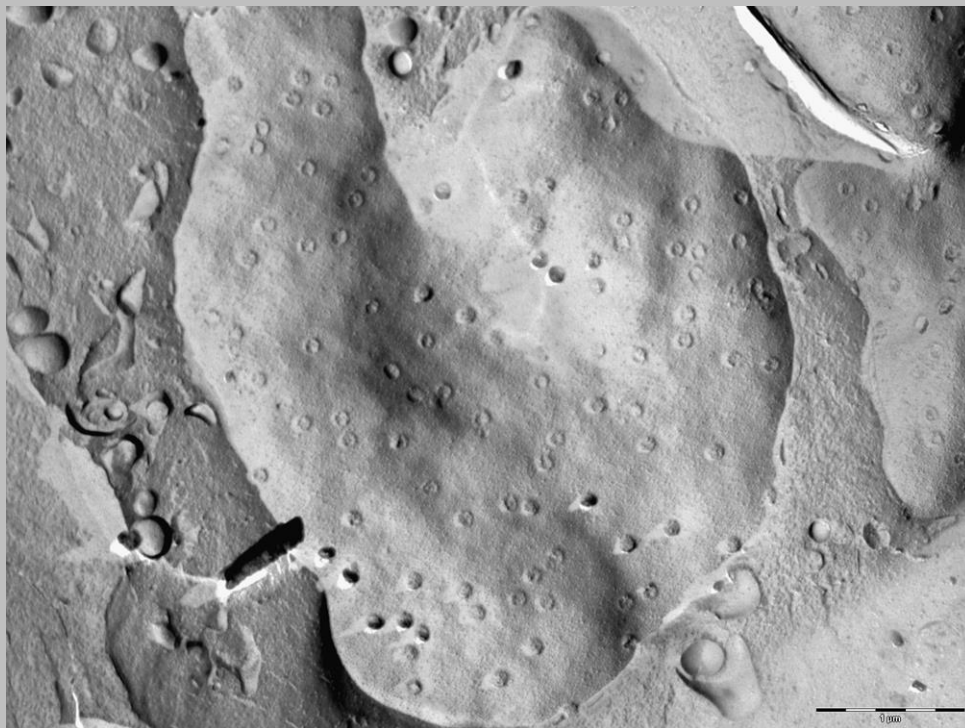
póry v jaderné membráně

cytoplasma

mitochondrie

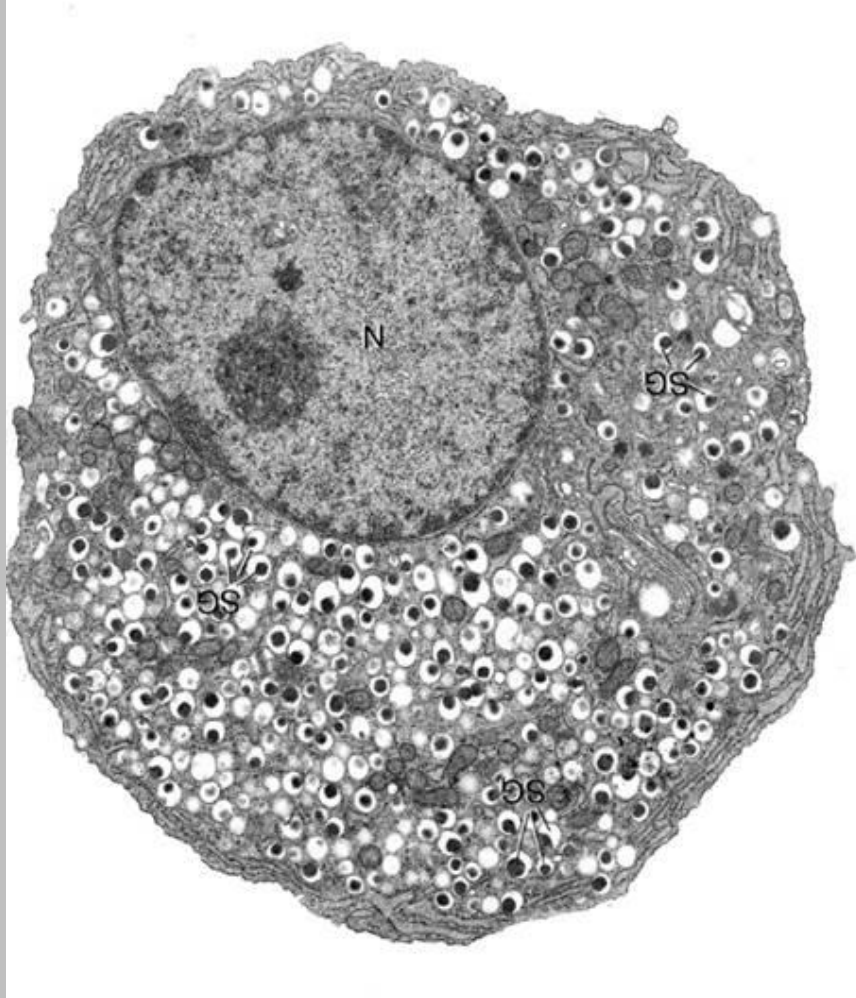
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

Mrazové lámání a leptání - výsledný obraz detailního pozorování povrchu jaderné membrány

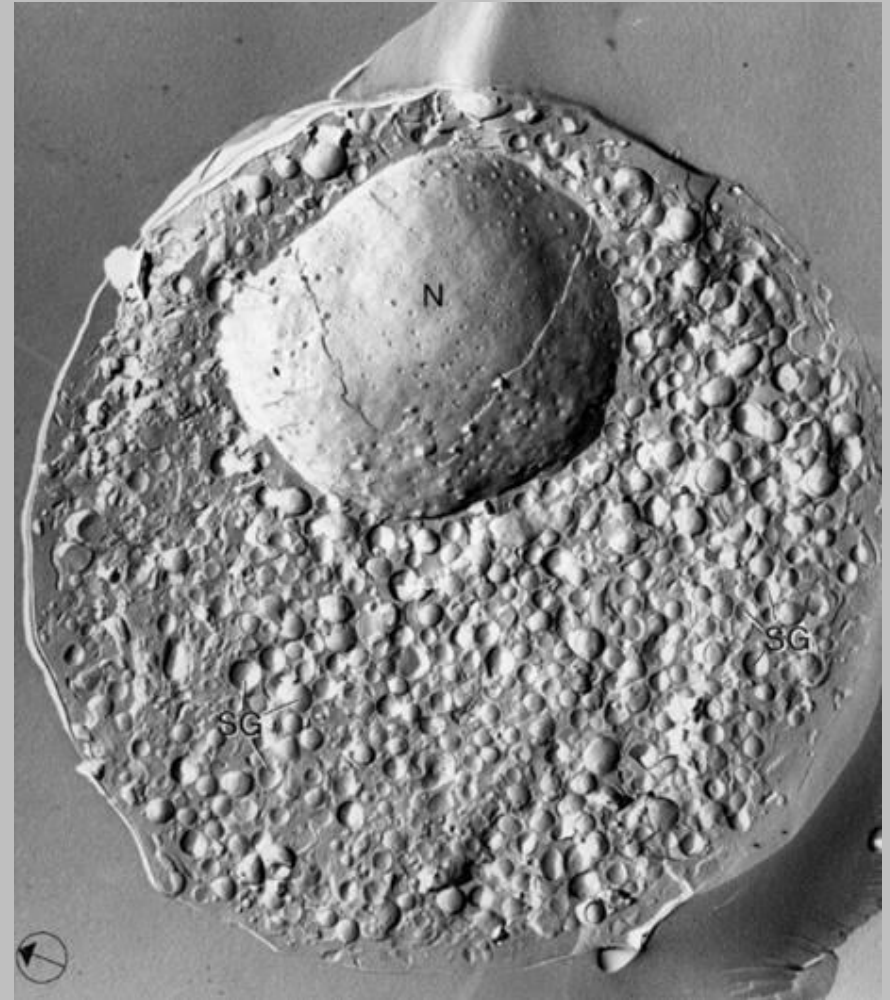


Leukemická buněčná linie HL-60

Srovnání ultratenkého řezu a repliky z freeze-etching



živočišná buňka - ultratenký řez TEM



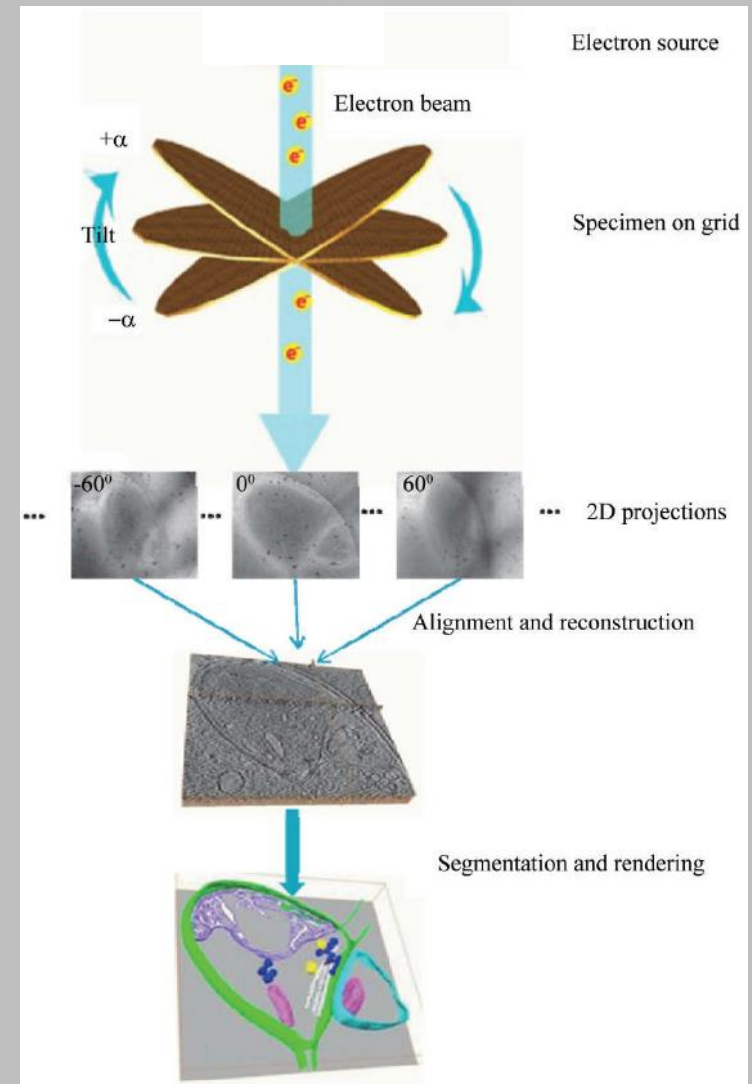
živočišná buňka - freeze-etching

3D elektronová mikroskopie

TEM tomografie

Nakláněním (otáčením) vzorku v mikroskopu a následným prosvěcováním elektronovým svazkem, je získána série obrazů, ze kterých je zpětnou projekcí vytvořena 3D morfologie objektu. Technika poskytuje vysoké rozlišení, ale je limitována velikostí analyzovaných objektů. Řádově desítky nm. Proto se využívá pro analýzy struktury molekul, proteinů, krystalů. Zejména pro krystalografii má své výhody vzhledem k tomu, že lze vynechat nezbytný krok krystalizace vzorku.

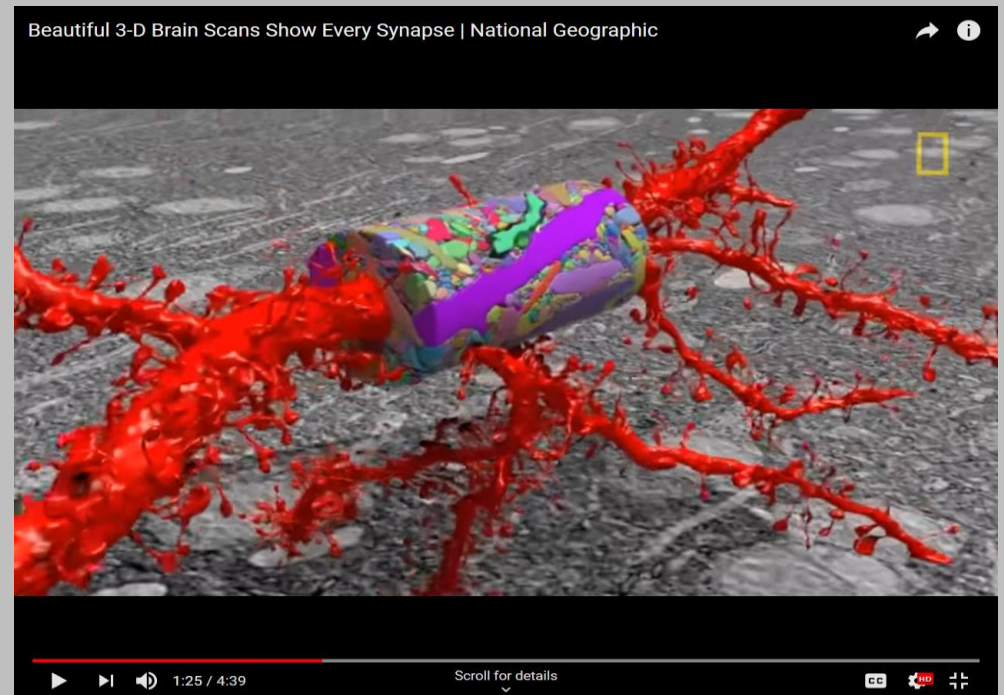
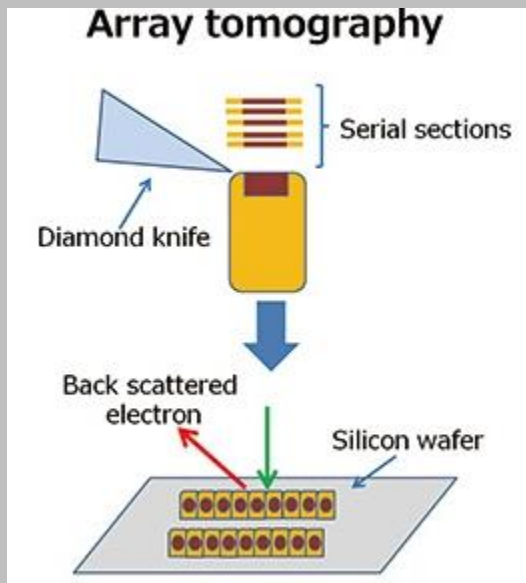
Při využití technik kontrastování biologických vzorků dochází ke vzniku množství artefaktů. Proto se v současnosti technika tomografie využívá nejvíce v souvislosti s Cryo-elektronovou mikroskopií, při které je vzorek pozorován za nízkých teplot (-180oC) bez nutnosti kontrastování. Viz následující přenášky.



3D elektronová mikroskopie

Síťová tomografie (Array tomography)

Příprava vzorku je obdobná jako pro transmisní EM, avšak řezy jsou kladeny na fólii jeden za druhým. Z milimetru tkáně je získáno více než 10 tisíc vzorků. Tyto jsou následně skenovány pomocí SEMu a z obrazů je vytvořena 3D rekonstrukce.

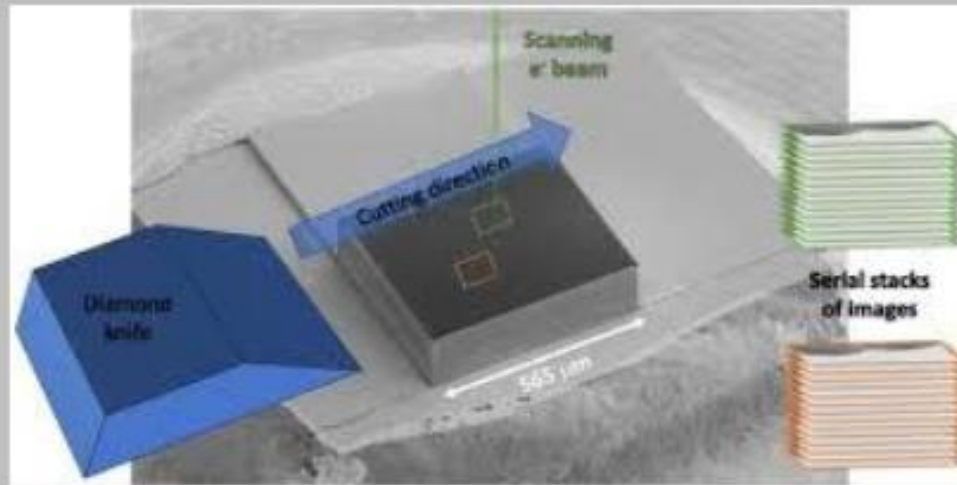


<https://www.youtube.com/watch?v=nvXuq9jRWKE&feature=youtu.be&t=40>

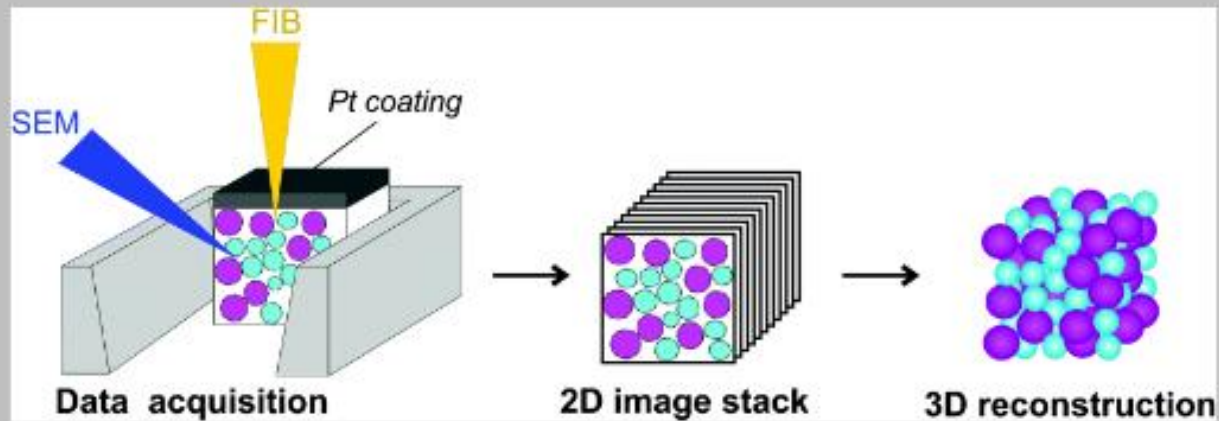
SBF-SEM a FIB-SEM

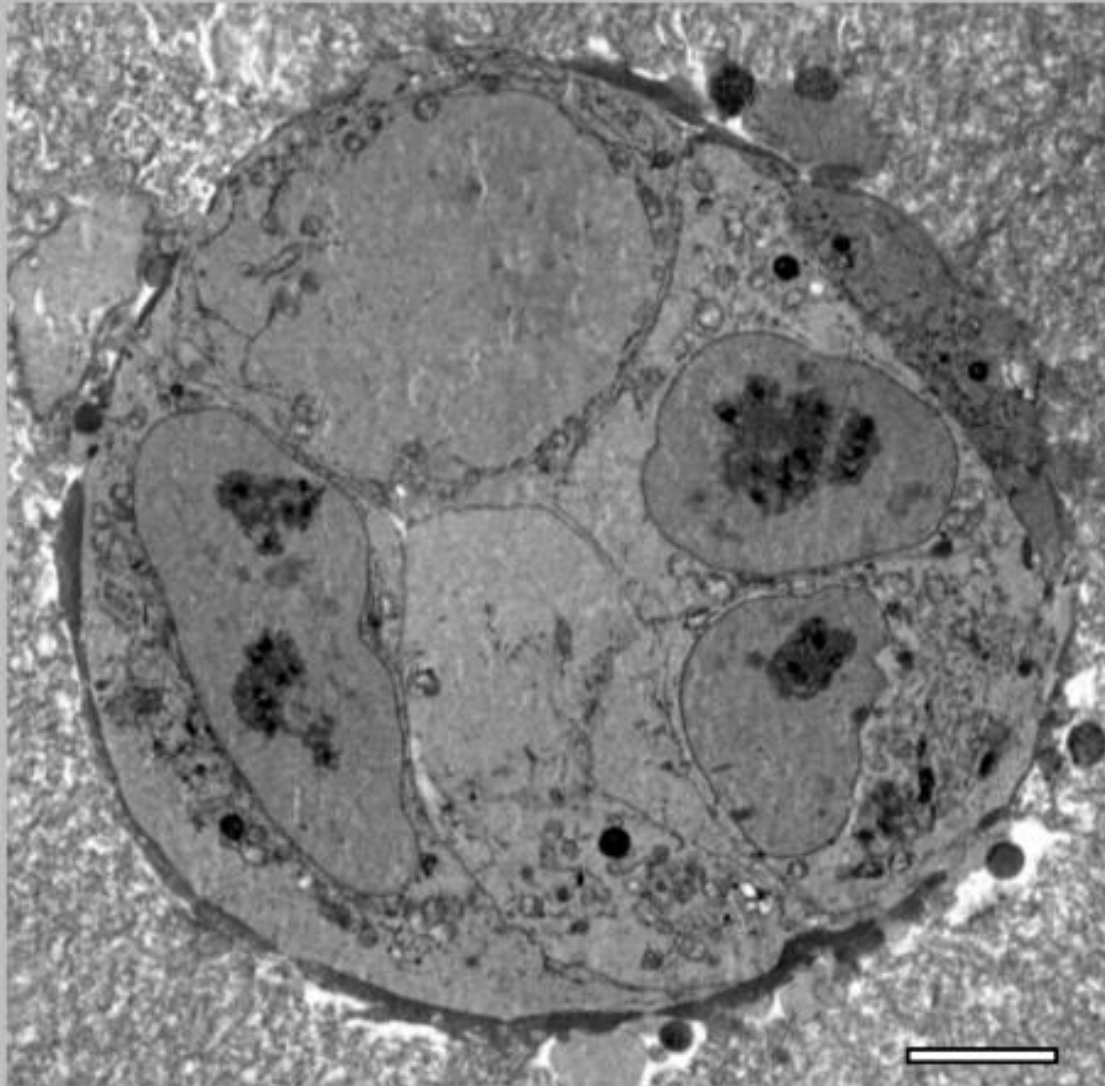
Serial block-face SEM
Focused ion beam SEM

SBF-SEM

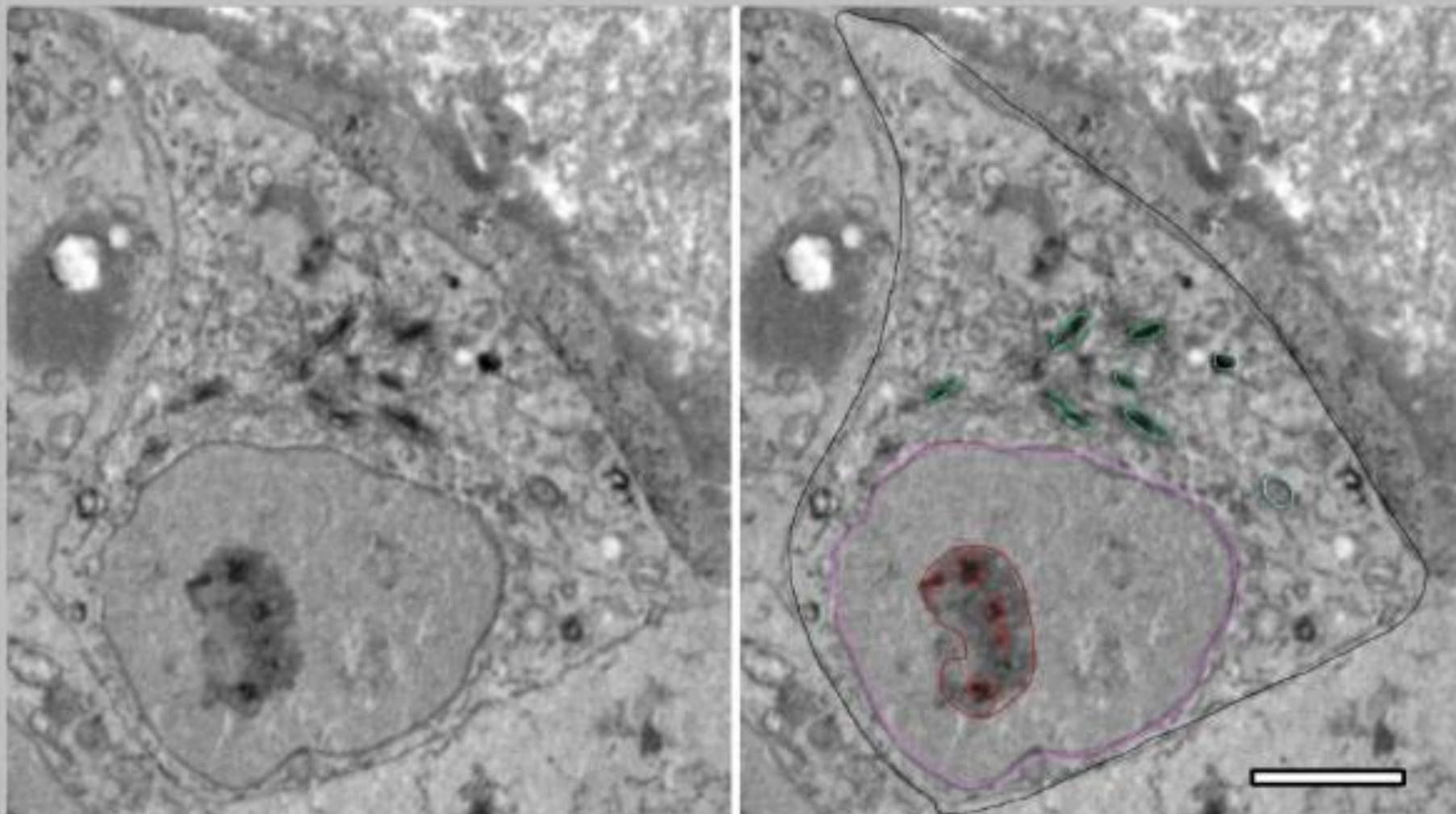


FIB-SEM

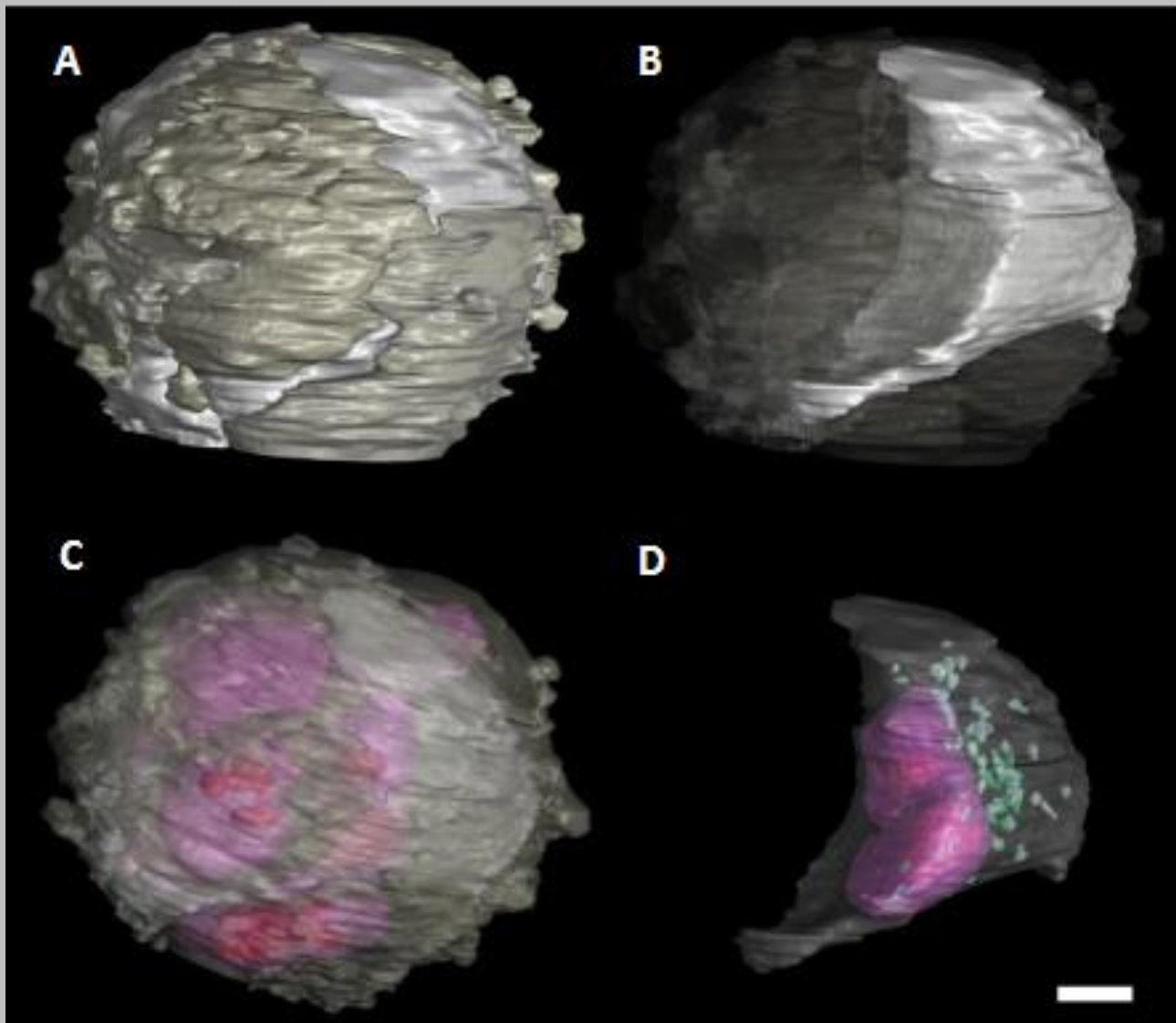




Obraz seříznutého bloku sféroidu s buňkami v SEMu



Ohraničením objektů zájmu v každém obraze – segmentace lze následně vytvořit 3D obraz



SBF-SEM – 3D rekonstrukce obrazu buněk a organel sféroidu

*Jaros, Petrov, Tesarova – colaboration with Tescan, VUT
3D Cell Culture, 2017, Volume 1612*

Využití EM

- Věda (biologie, chemie – např. ke kvantitativní
- prvkové analýze, geologie ...)
- Lékařství (studium bakterií a virů ...)
- Soudní lékařství (forensní EM)
- Metalurgie (studium vlastností materiálů)
- V mikroelektronice (studium čipů, mikroprocesory)

Nevýhody EM

- Drahý a prostorově náročný přístroj
- Pozorování jen ultratenkých řezů (náročné na přípravu preparátů)
- Umístění preparátu ve vakuu znemožňující pozorování živých organismů