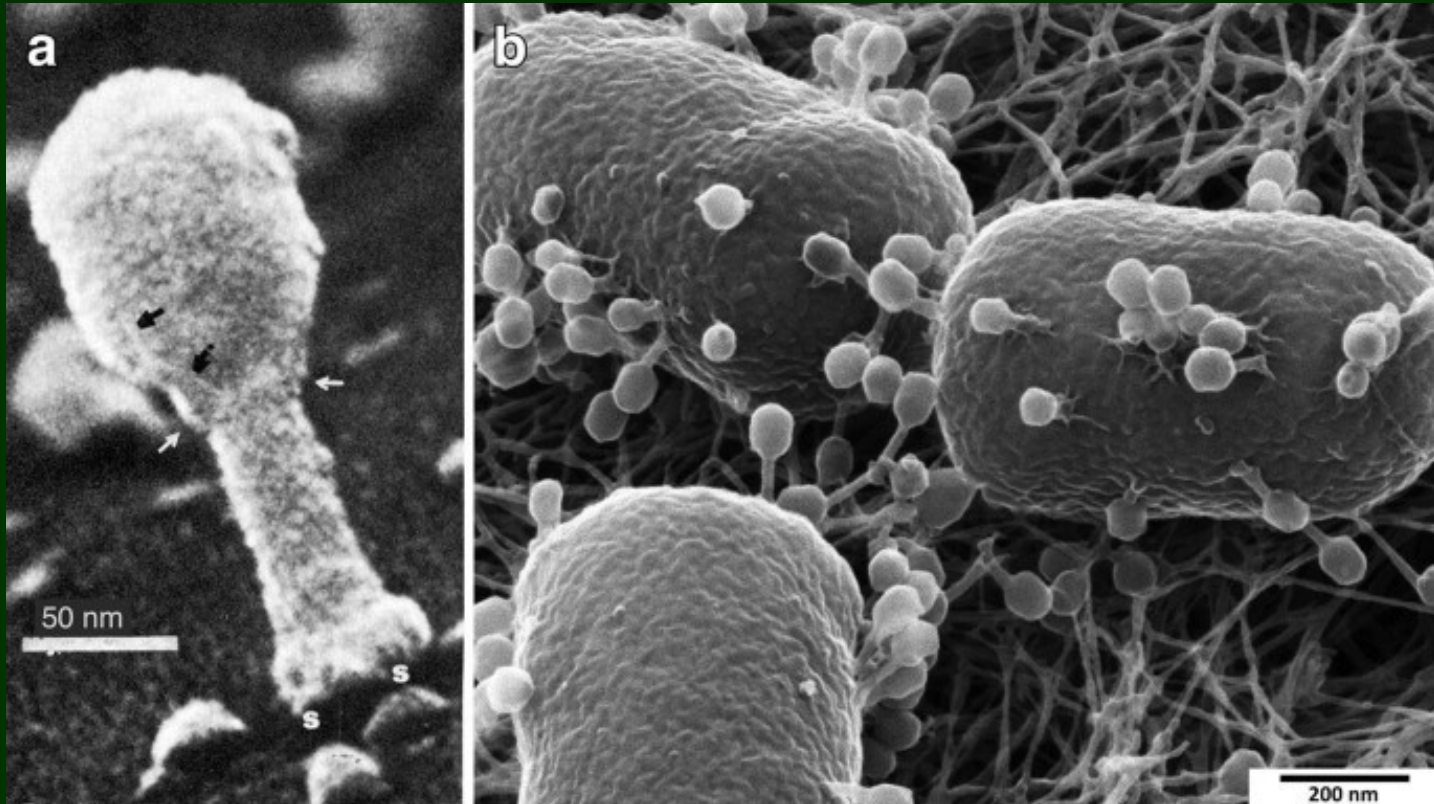


Téma 10_Základy elektronové mikroskopie



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

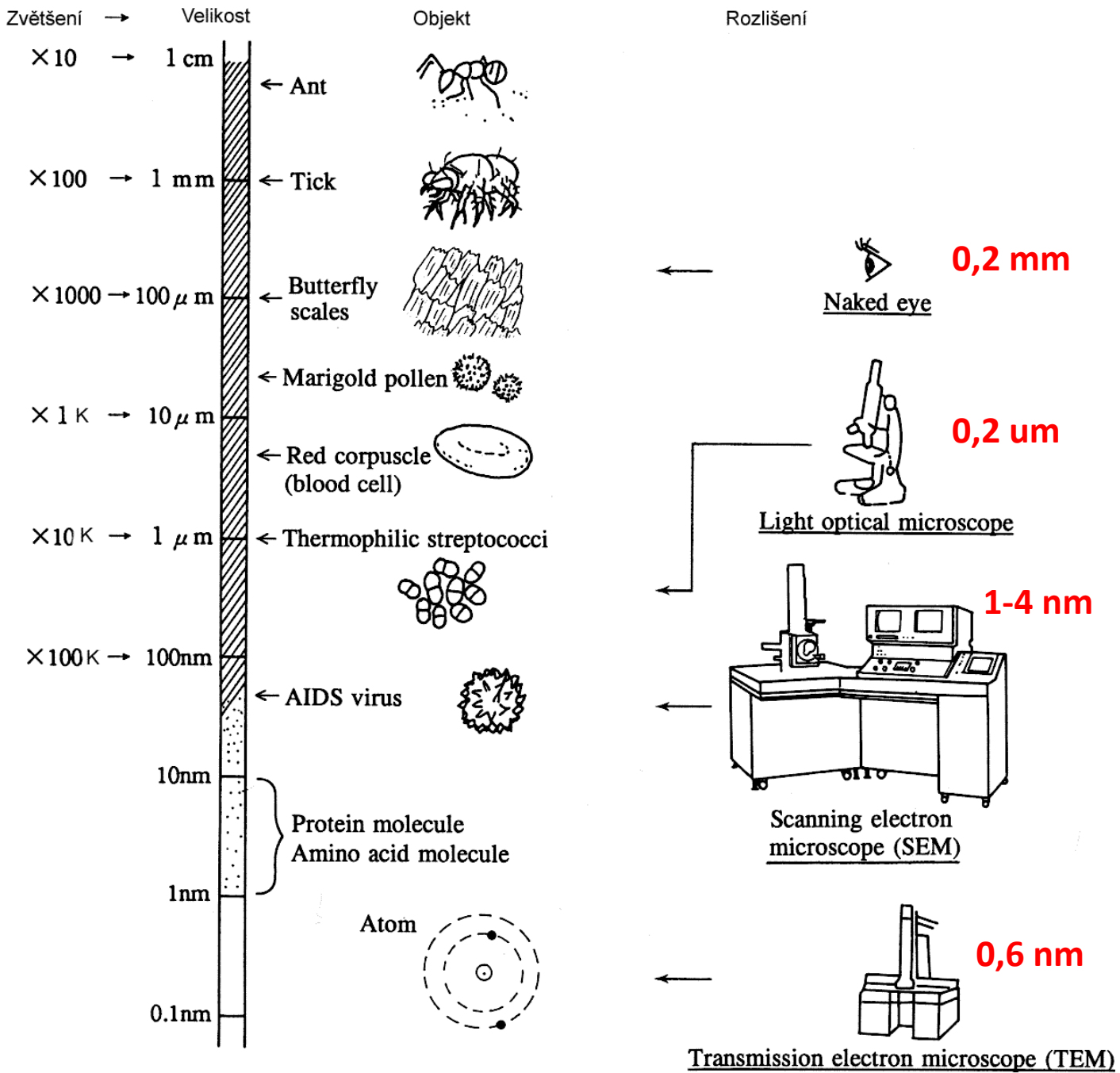
Mikroskopické (pozorovací) techniky

Světelná mikroskopie

- diagnostika bakterií
- virologické studie – detekce CPE, imunofluorescence
- tkáňové preparáty, cytochemie, histochemie

Elektronová mikroskopie

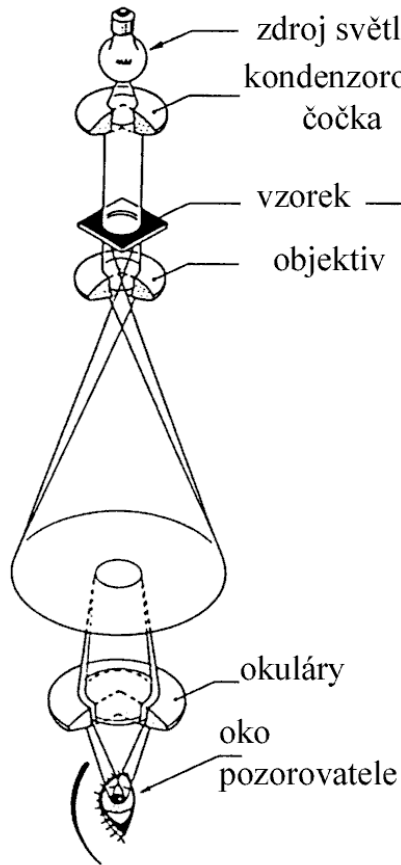
- hlavně pro diagnostiku virů
- pokročilé morfologické studie bakterií



- 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

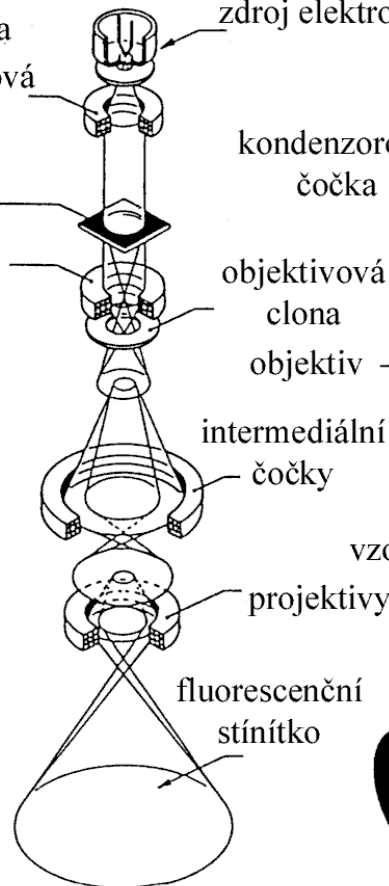
Světelný mikroskop



Rozlišení 200 nm

Zvětšení ~×2000

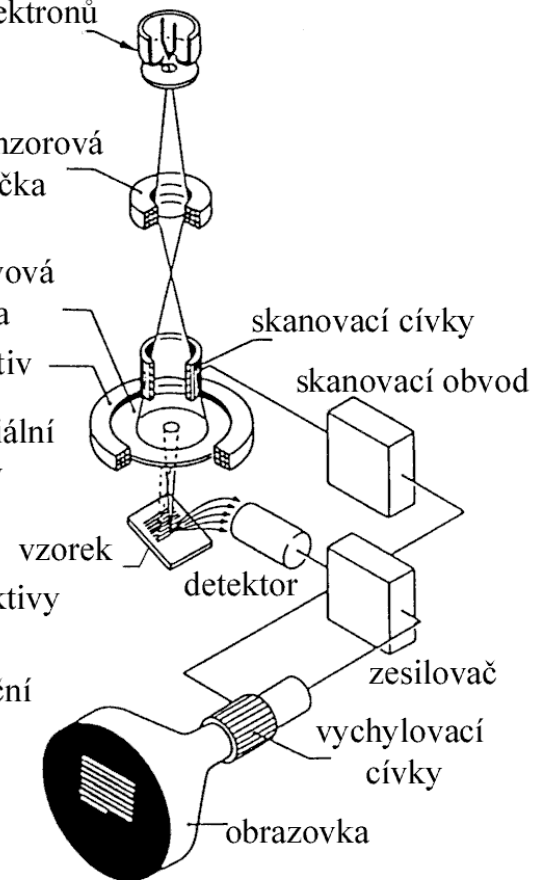
TEM



0.1 nm

×50~×1,500,000

SEM



0.5 nm

×10~×1,000,000

Elektronová mikroskopie

Pro úspěšnou vizualizaci musí být ve vzorku alespoň 10^6 virových partikulí v 1 ml. Použité zvětšení bývá 50,000 - 60,000x. Viry lze prokázat v těchto typech vzorků:

Stolice	rotaviry, adenoviry viry skupiny Norwalk astroviry, kaliciviry
Tekutina z puchýřů	HSV VZV
Kožní seškrab	papillomaviry, orf virus, virus molluscum contagiosum

Elektronová mikroskopie

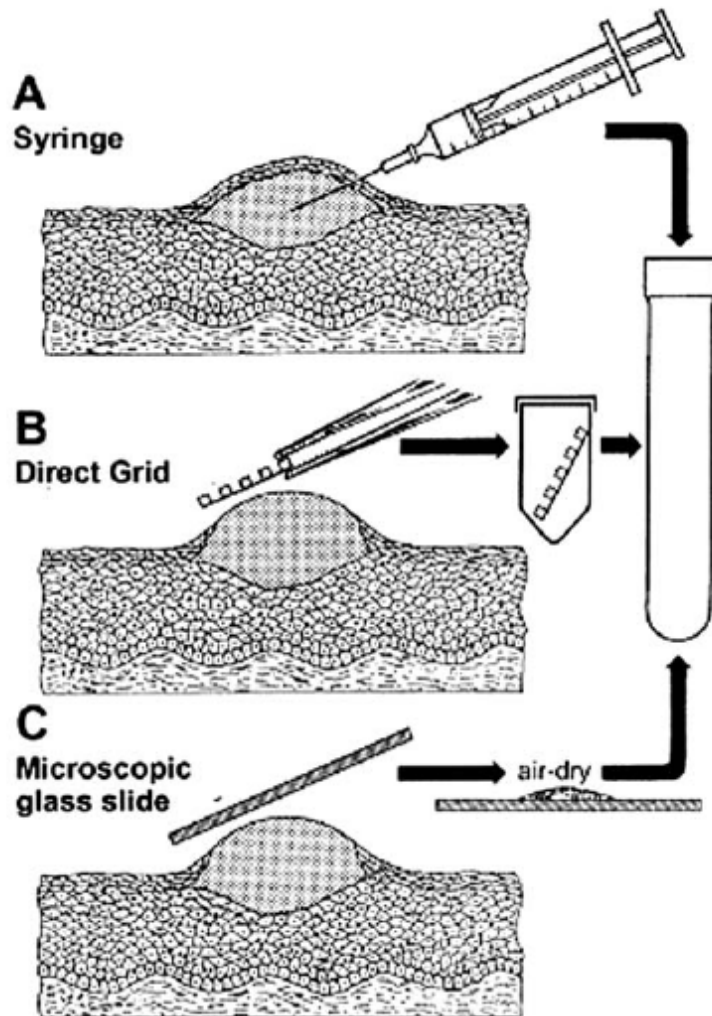


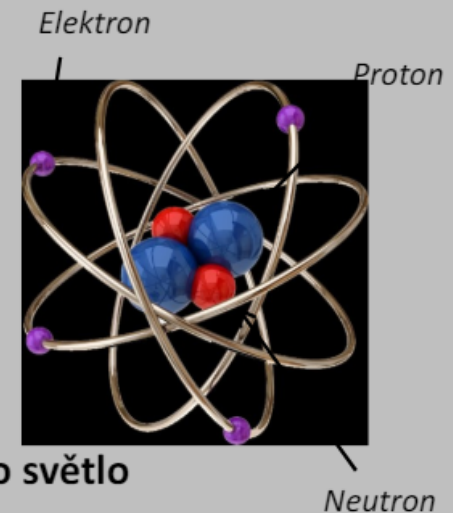
Figure 3. Three methods for efficient collection of vesicular and blister fluids for diagnostic electron microscopy. A. The contents of a vesicle are collected into the barrel of a needle. B. After the blister is opened, a coated electron microscope grid is touched to the fluid and air-dried (direct electron microscopy). C. A glass microscope slide is touched directly to an unroofed lesion and a smear prepared. Samples are then placed in rigid containers for transport to the electron microscopy laboratory.



Hlavní nevýhoda spočívá v nízké citlivosti detekce, nákladnosti. Nutná značná zkušenost s rozlišením virových částic od jiných částí buněk či artefaktů.

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.
- Ačkoliv v současnosti jsou TEMy využívány s rozlišením 0,1 nm. Vyšší rozlišení znamená technické obtíže.



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

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

Vlnové vlastnosti

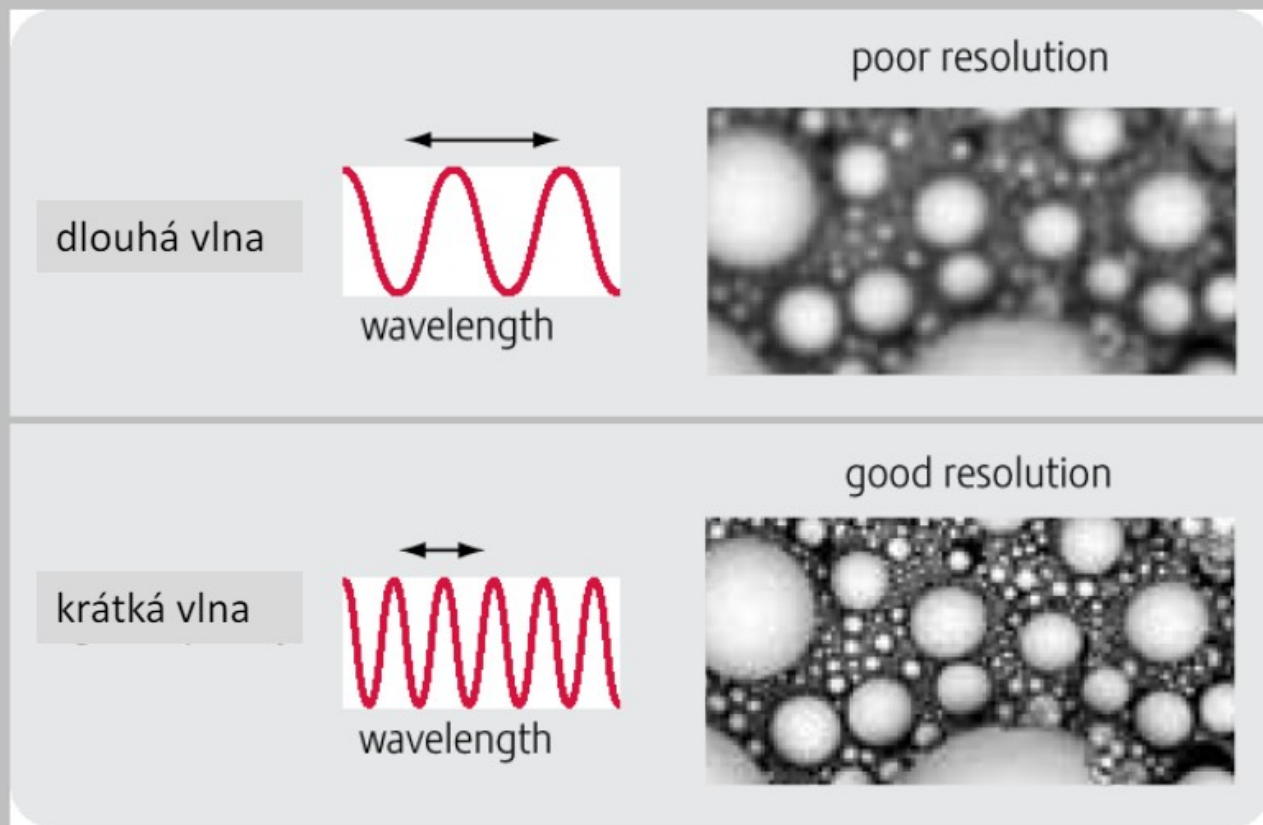
- V roce 1924 de Broglie postuloval dualitu částice a vlnění, tzn. každá částice se může projevovat jako vlnění a naopak.
- Veškerá pohybující se částice má vlastnosti vlny s vln. délkou λ , která je nepřímo úměrná momentu hybnosti částice p .

$$\lambda = h / p = h / mv$$

(h - Planckova konstanta; m - hmotnost; v - rychlost)

- *Myšlenku duality částic a vlnění zavedl v roce 1905 Albert Einstein pro objasnění fotoelektrického jevu. Později byla experimentálně potvrzena i v souvislosti s jinými jevy.*

Jak je rozlišovací schopnost ovlivněna vlnovou délkou



Transmisní elektronový mikroskop

Nepohyblivý svazek elektronů, detekují se elektrony prošlé vzorkem, vhodné pro velmi malé objekty (viry, bakterie) případně se mikroskopují řezy (např. z buněk), velkými objekty elektrony neprojdou.

-větší vzorky (buňky) se před prohlížením musí fixovat, odvodnit, zalít do pryskyřice a nařezat na ultramikrotonu

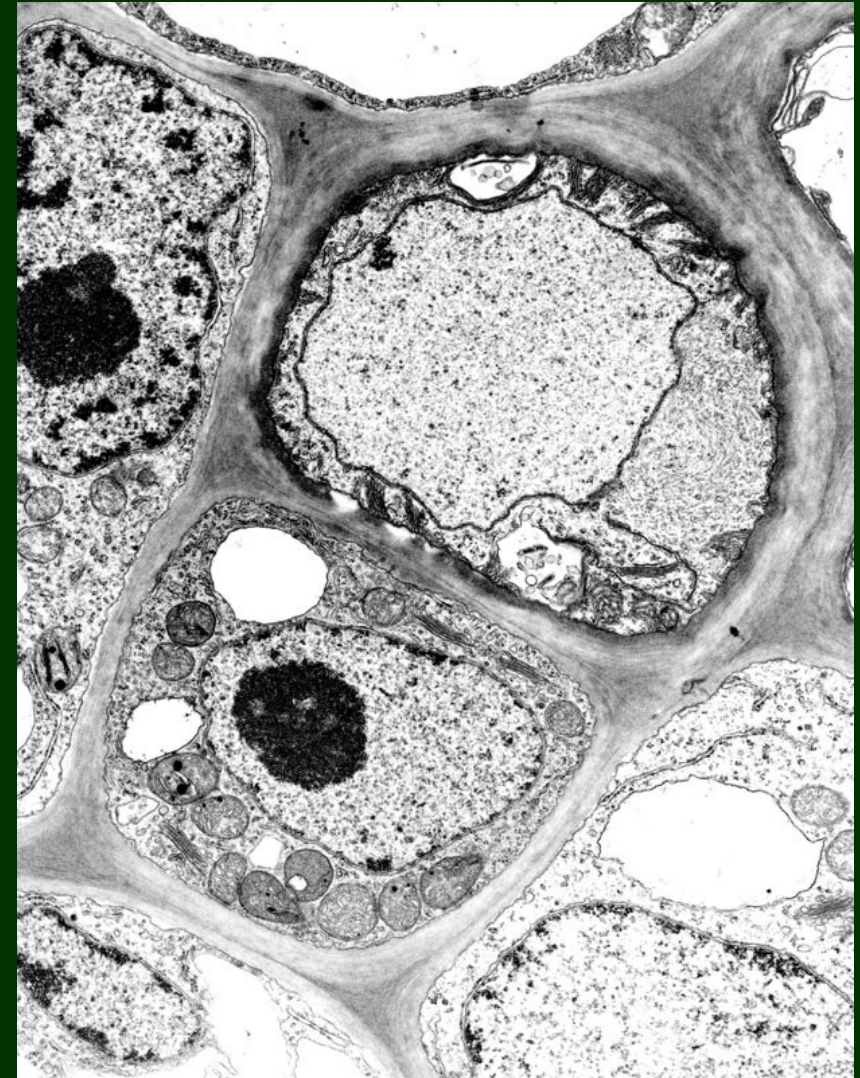
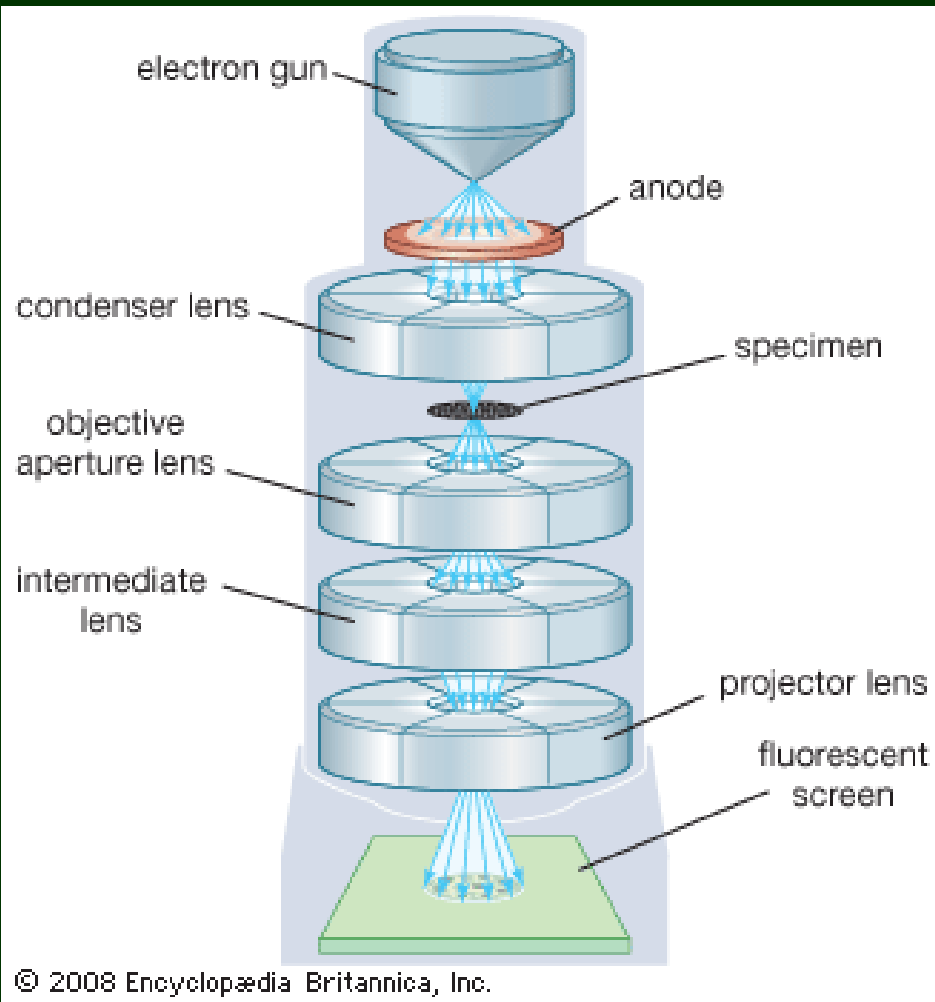
-malé vzorky (hlavně viry) se přichytí na sítku a negativně barví (viz. protokol a ukázkové fotografie virů)

Rastrovací elektronový mikroskop

Pohyblivý svazek elektronů, detekují se odražené sekundární elektrony (tedy používá se pro zobrazení povrchu vzorku)

-vzorky se musí před mikroskopováním fixovat, odvodnit a vysušit

TEM

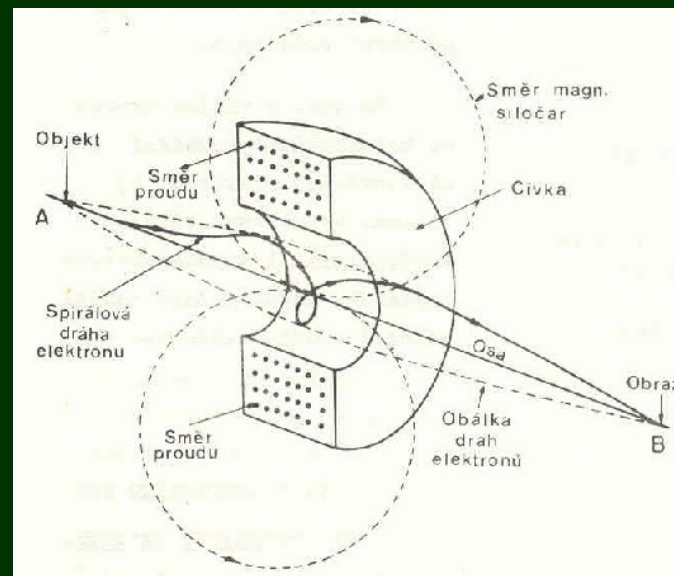


Bavlňný floém, 8 000x zvětšený

Transmisní elektronový mikroskop

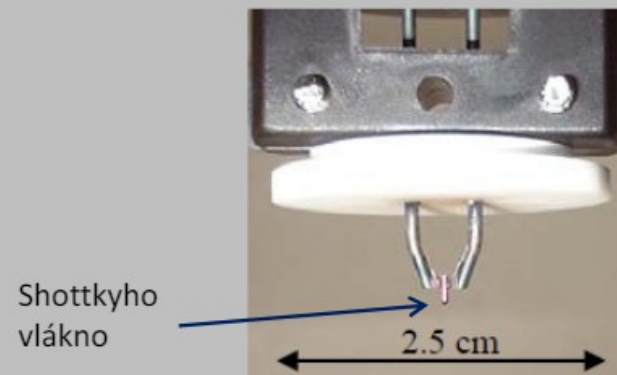
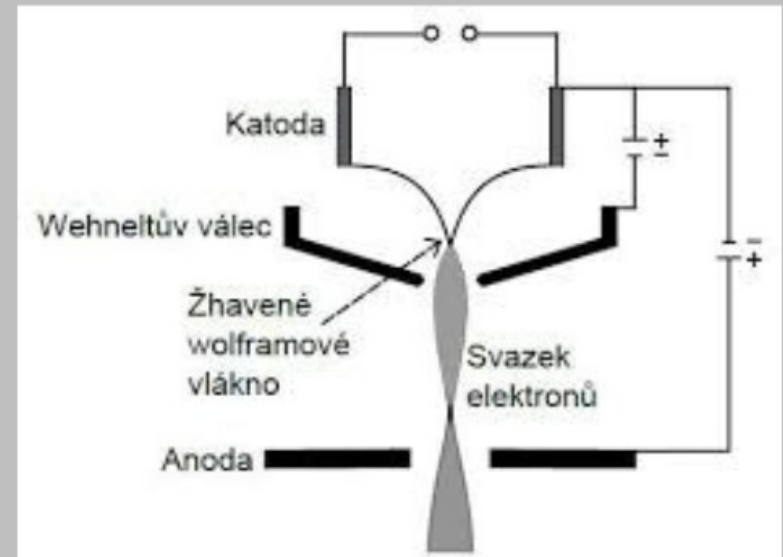
Zdrojem zobrazujícího vlnění je tzv. elektronová tryska. Zobrazovacím prostředím je vakuum, protože ve vzduchu by docházelo k pohlcování elektronů. K úpravě chodu elektronového svazku se používají tzv. elektromagnetické čočky, což jsou prakticky různé typy cívek. Výsledný obraz nelze pozorovat přímo okem, ale např. prostřednictvím fluorescenčního stínítka či obrazovky, díky nimž lze proud dopadajících elektronů zviditelnit.

Působení magnetického pole na tvar trajektorie letícího elektronu lze využít k sestavení tzv. elektromagnetické čočky, která by fungovala přibližně stejně jako skleněná čočka v případě světla. Nejjednodušší elektromagnetickou čočkou je solenoid. Solenoid je cívka s velkým počtem závitů, jejichž průměr je mnohem menší než délka cívky. Uvnitř solenoidu vzniká homogenní magnetické pole a v okolí solenoidu nehomogenní magnetické pole.



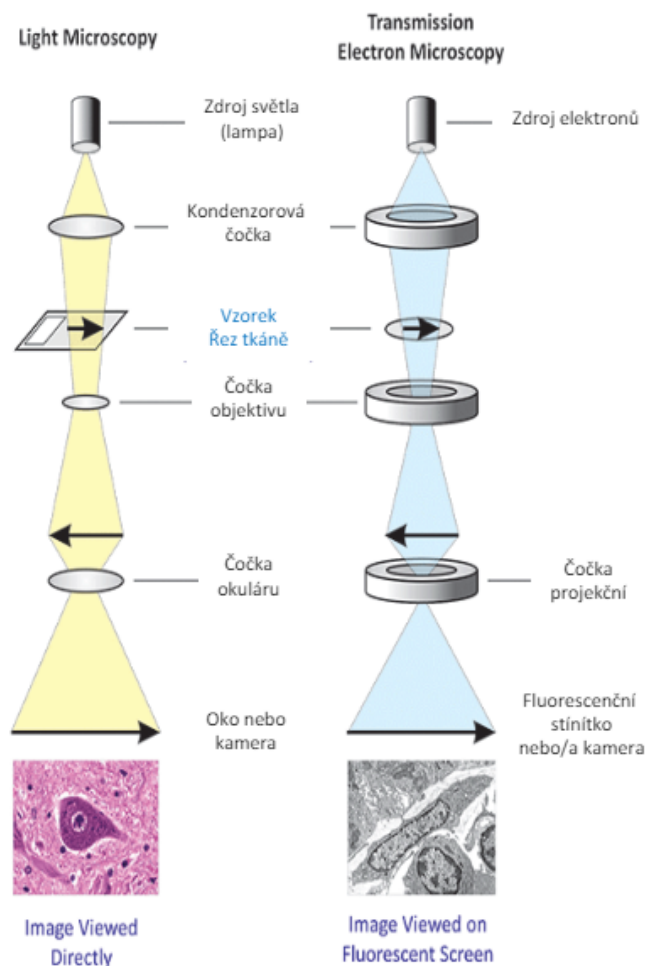
Zdroj elektronů: elektronová tryska

- Zdrojem elektronů je ohnutý vodič-vlákno, kterým protéká proud – to je katoda
 - Nejčastější materiály vlákna
 - Wolfram (W)
 - Thermionin (LaB_6)
 - Schottky (ZrO/W)
 - Rozdíly jsou v ceně a vlastnostech – zejména jasu
- Elektrony v ohybu vypadávají, proletují štěrbinou a následně jsou urychleny směrem k anodě

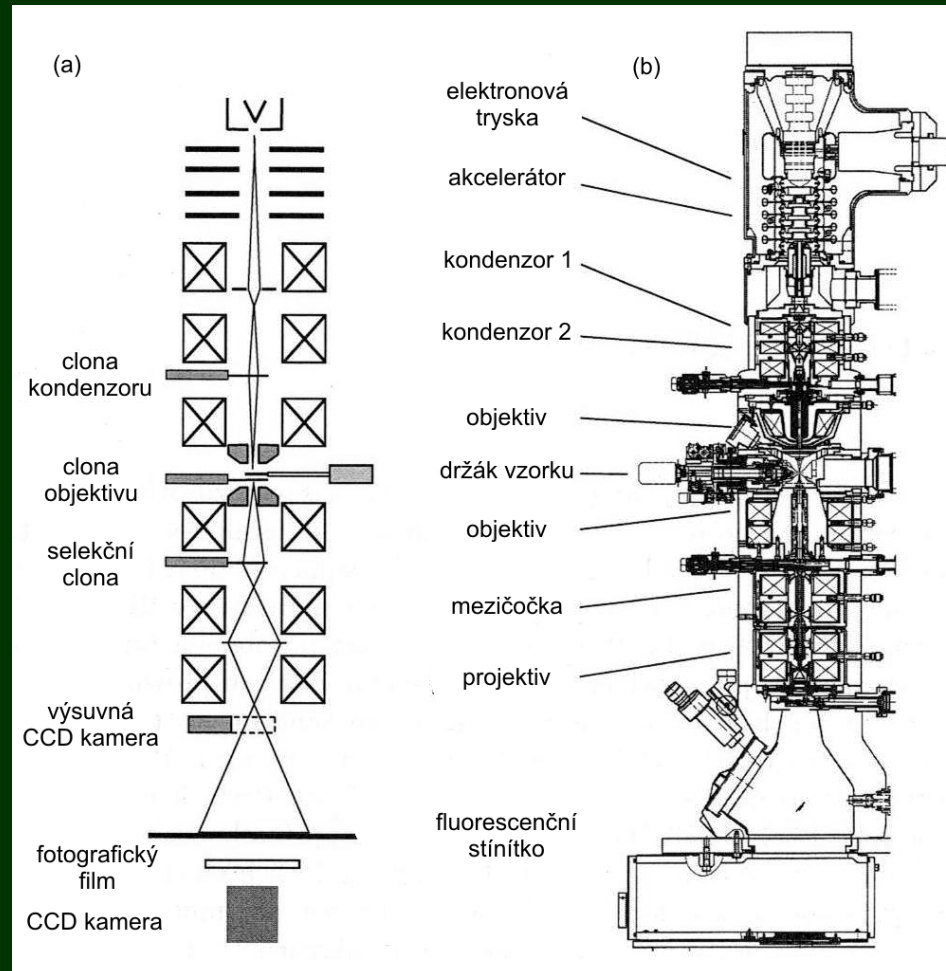


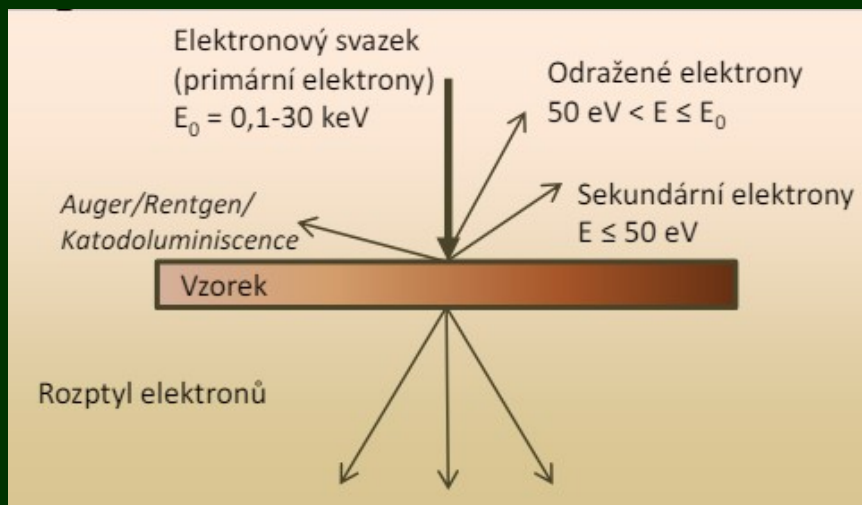
Fokusace elektronového paprsku

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



TEM detekuje elektrony, které procházejí hmotou preparátu. Jedná se o elektrony, které projdou elektronovým obalem atomů preparátu (vychýlení z původní dráhy, ale neztratí energii. Odražené TEM nedetekuje), nebo elektrony, které se srazí s elektrony v el. obalu atomů preparátu (úbytek energie, změna vlnové délky).



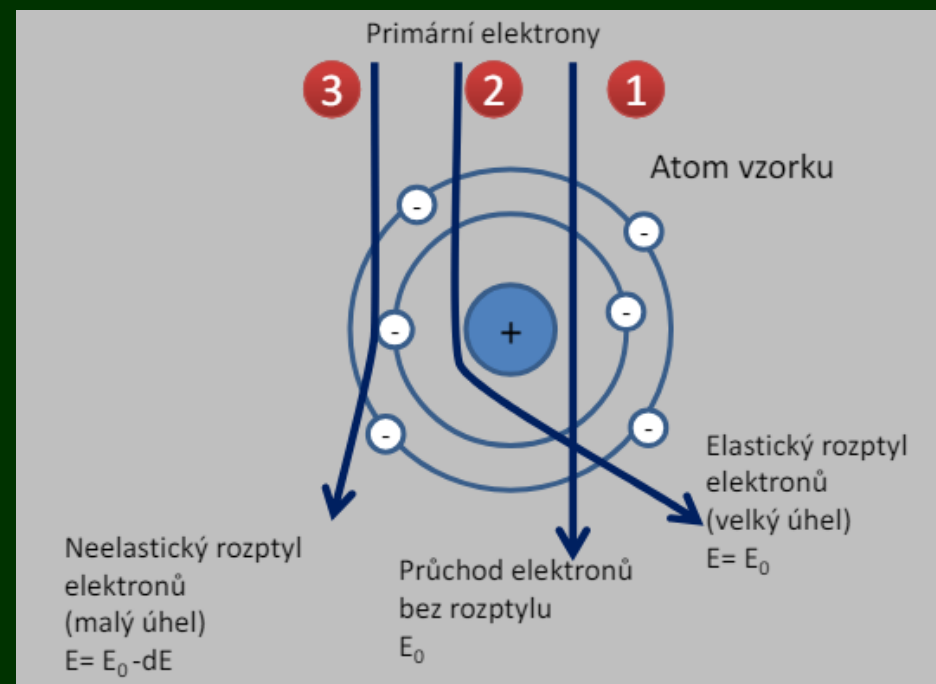


1 Elektrony, která vzorkem projdou – ale nereagují s ním, vytváří na fluorescenčním stínítku / kameře světlé body

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

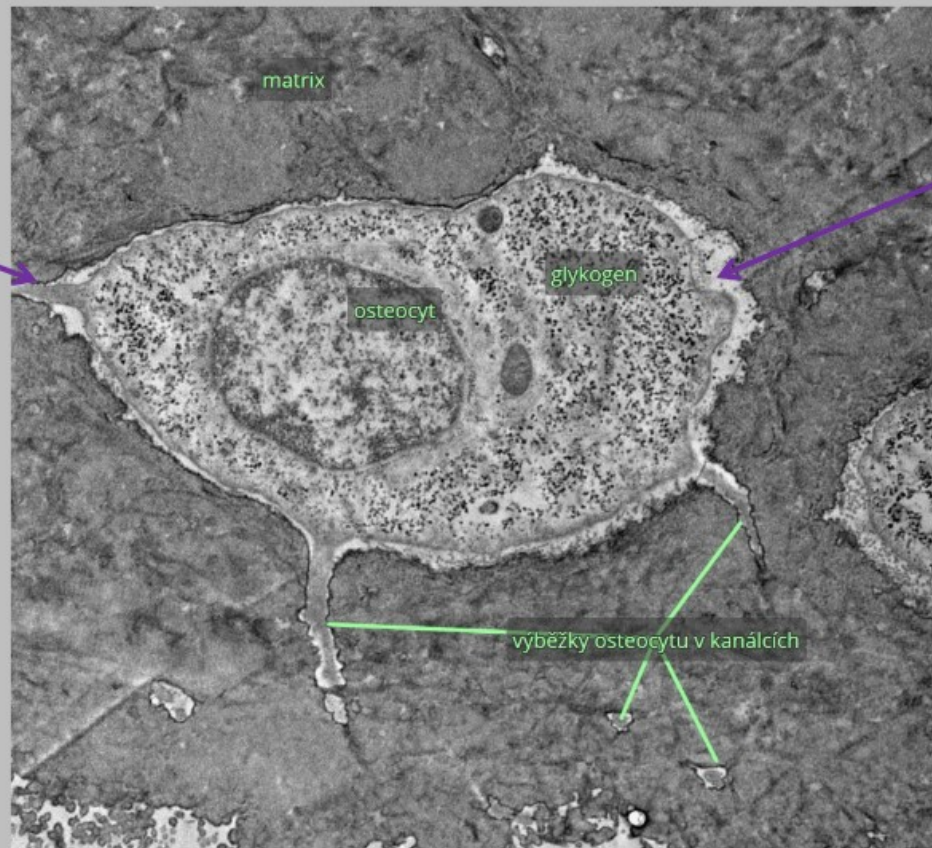
3 Neelastický rozptyl elektronů – reakce s elektrony vzorku

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



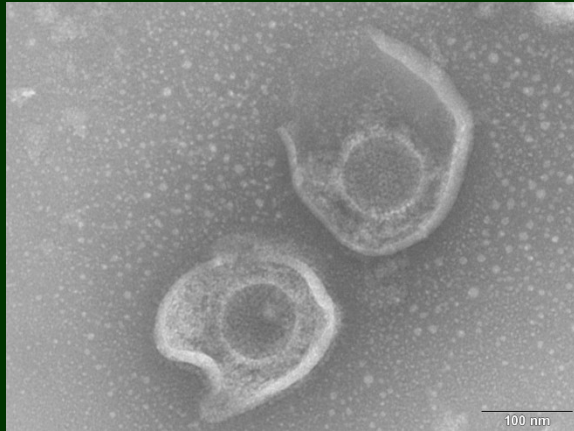
TEM vzorku kosti (kontrastováno těžkým kovem)

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

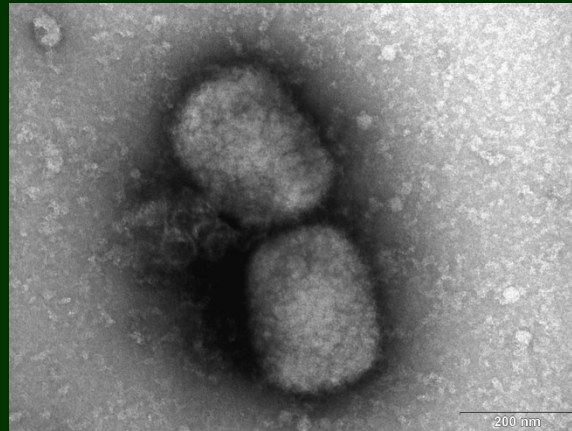


Většina elektronů prošla tímto místem až na stínítko

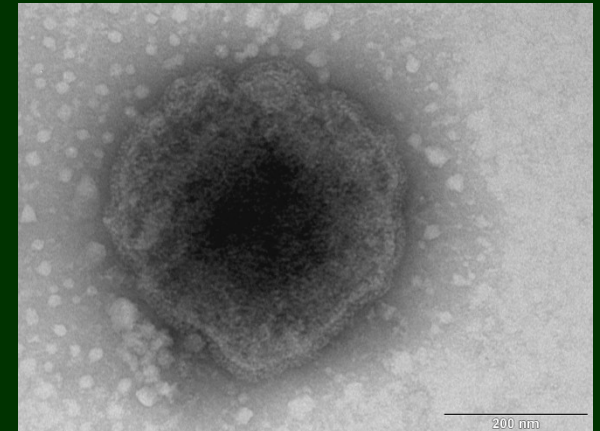
Fotografie virových částic (transmisní EM, negativní barvení)



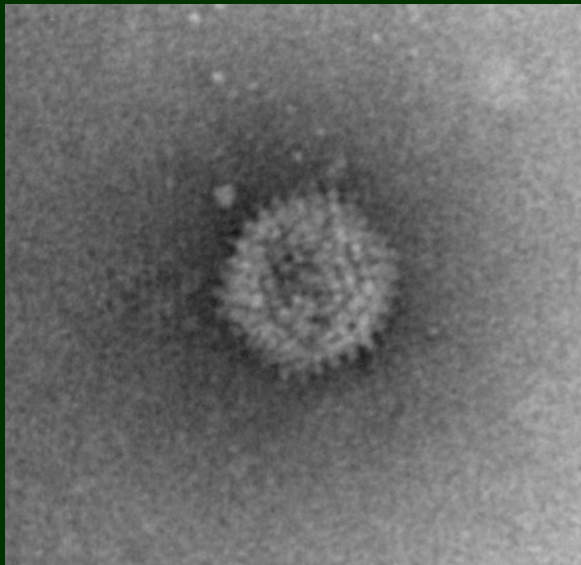
herpes simplex



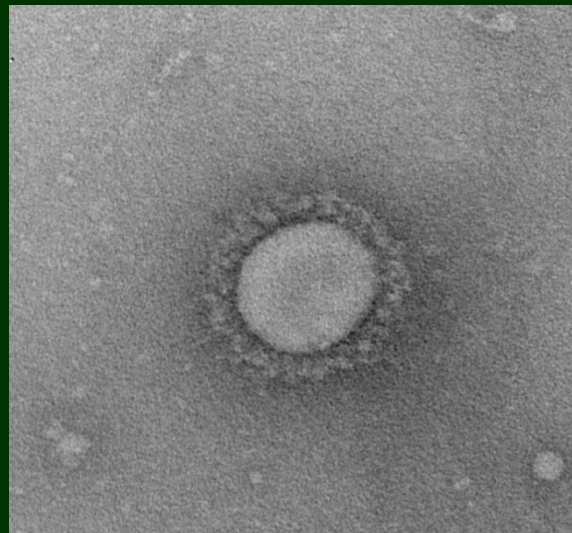
poxvirus



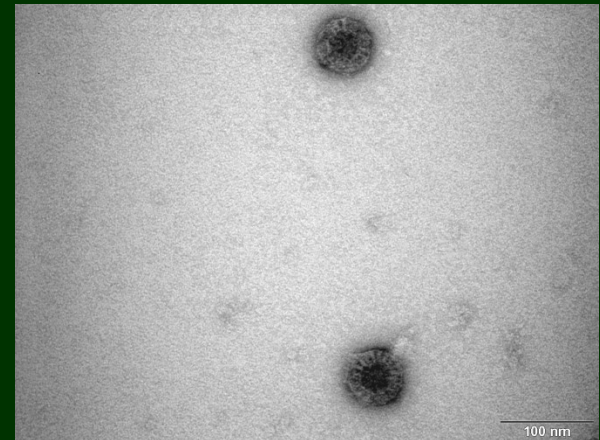
paramyxovirus



adenovirus

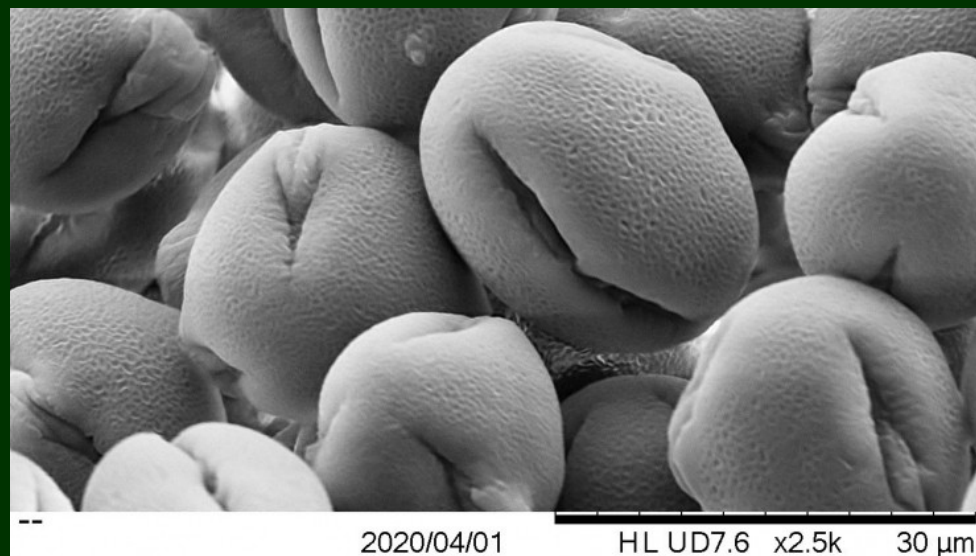
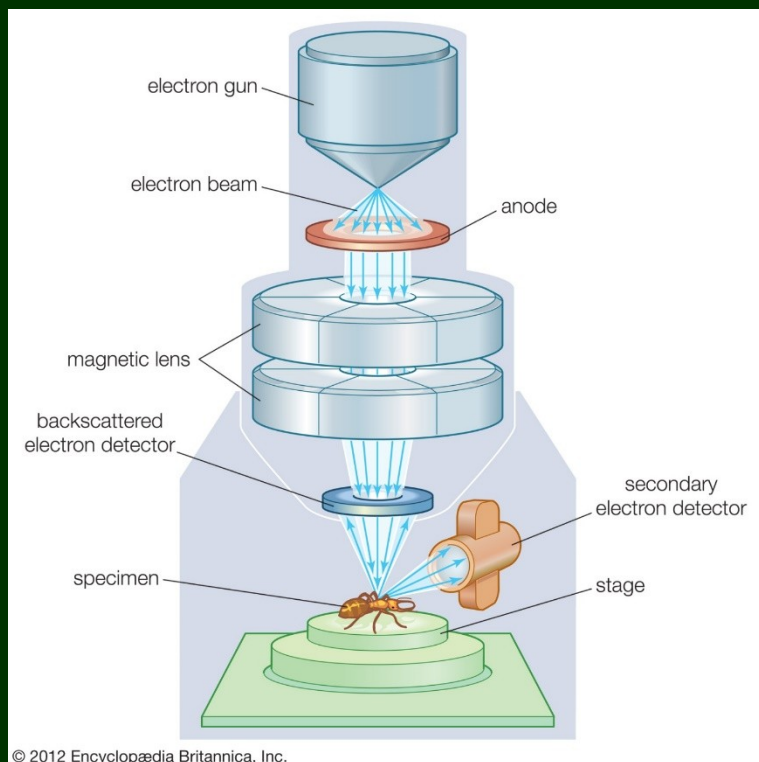


coronavirus



rotavirus

SEM

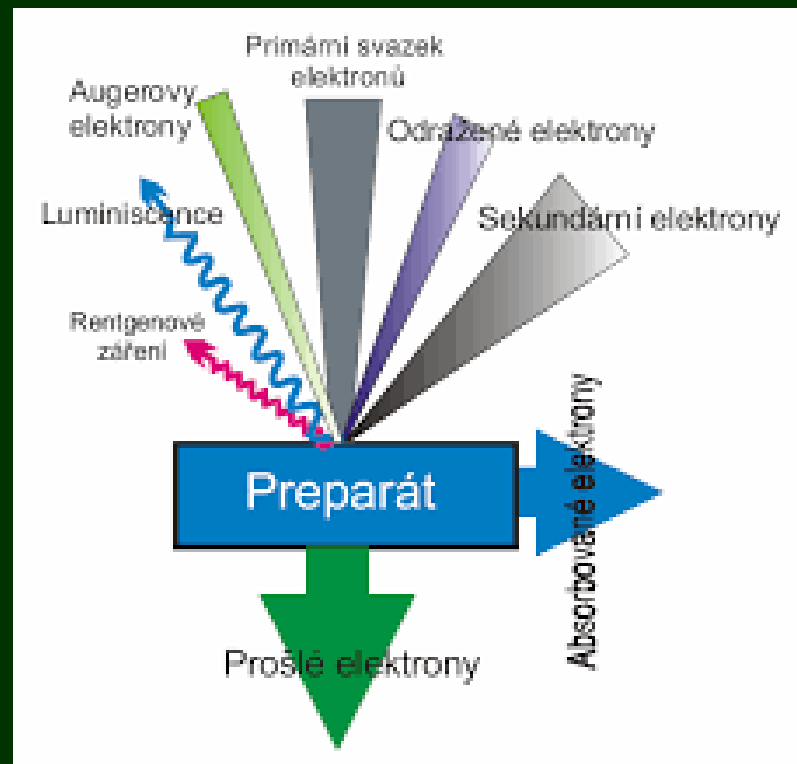


Pylové zrno, 2500x zvětšení

Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop

Rastrovací elektronový mikroskop pracuje tak, že na vzorek dopadá tenký svazek elektronů, který dopadá postupně na všechna místa vzorku. Odražený (emitovaný) paprsek se převádí na viditelný obraz.

Detekují se odražené elektrony (studium povrchu, reliéfu), primární elektrony (prošlé vzorkem), sekundární elektrony (vyražené ze vzorku, používají se k analýze prvkového složení), někdy RTG fotony



Srovnání TEM a SEM

	TEM	SEM
<i>Elektronový svazek</i>	široký, statický	fokusovaný 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

Příprava preparátu pro TEM

Standardní metody:

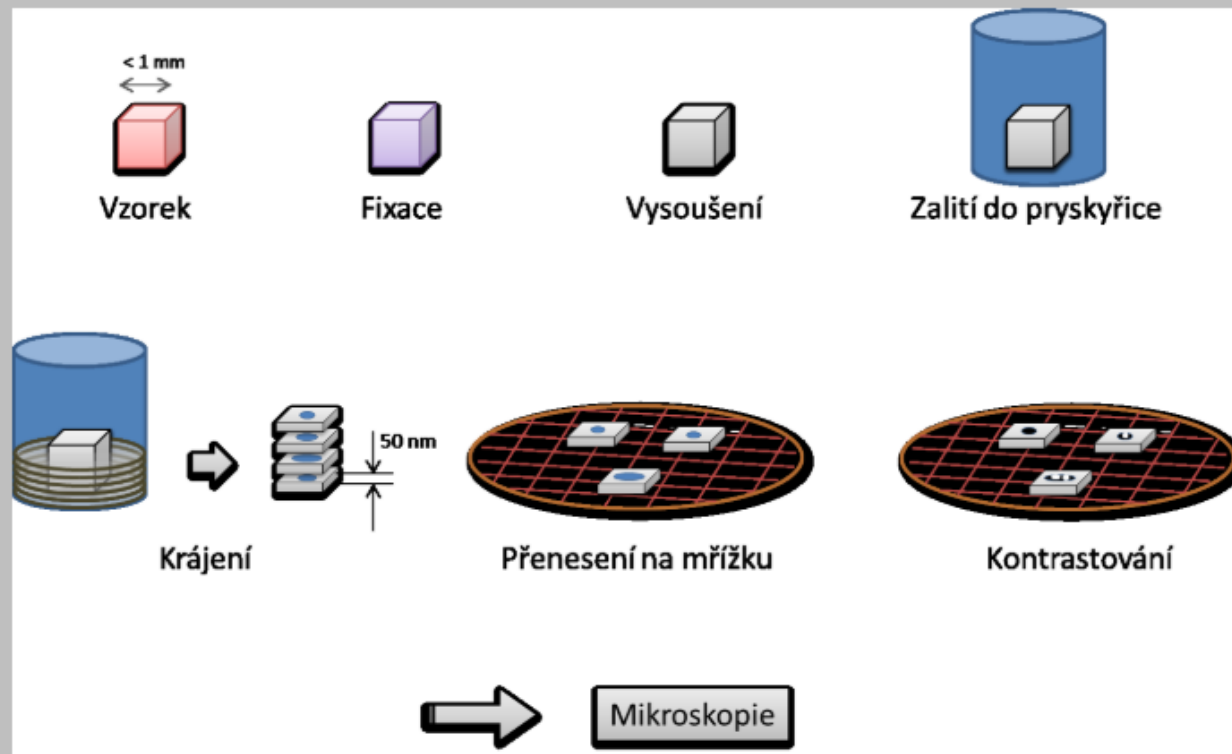
- ultratenké řezy
- metoda negativního kontrastování
- imunoznačení

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

Specializované metody:

- kryo- transmisní elektronová mikroskopie

- Vzorek musí být velmi tenký 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)



Fixace - aldehydy (glutaraldehyd, formaldehyd) - cílem je stabilizovat preparát co nejblíže 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 - 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 LRW.

vzorek zalitý v pryskyřici

Polymerace – teplem nebo ozářením UV světlem

Krájení – vzorku v pryskyřici ultramikrotomem na hladinu dH₂O.

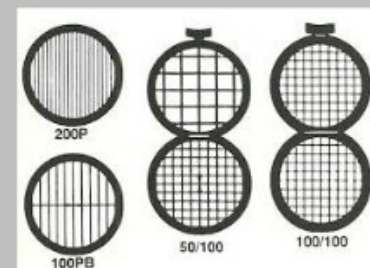
Přenesení – Na sítinky potažené **formvarovou blánou** se naberou z hladiny ultratenké řezy.

(Pozitivní) Kontrastování ultratenkých řezů

Ultratenké řezy mají minimální kontrast. Ten zvýšíme navázáním těžkých kovů na buněčné struktury.

Provádí se nakápnutím roztoku na mřížku se vzorkem.

Protože těžké kovy blokují a rozptylují tok primárních elektronů, místa, kde se navázaly jsou tmavá.

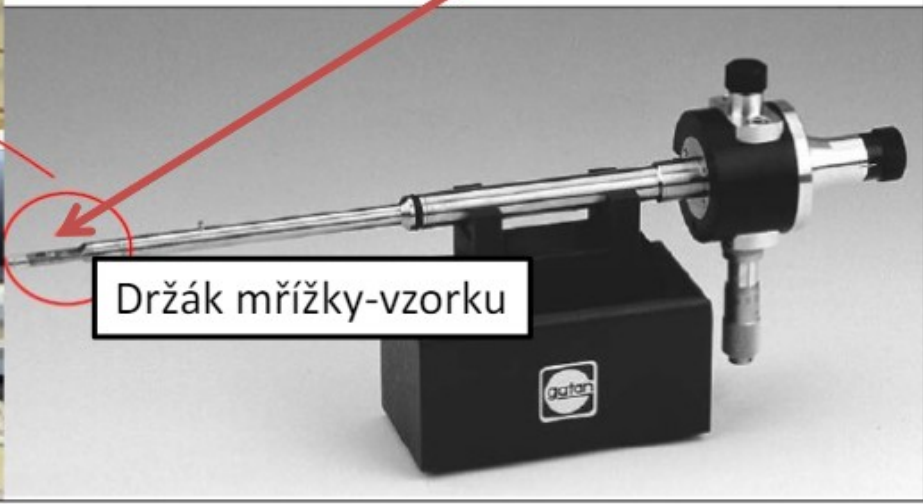
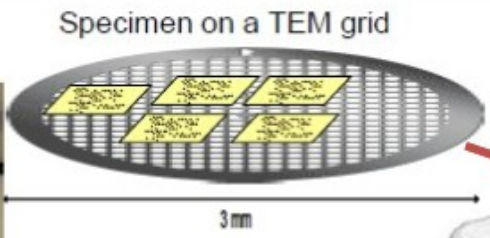


Nosné mřížky (sítinky)



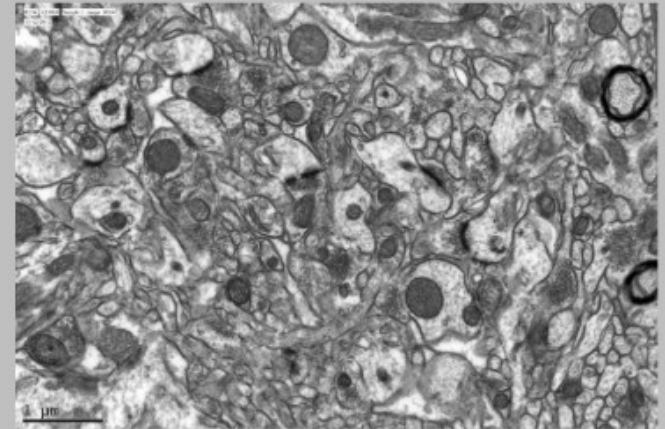
Mřížka

Držák mřížky-vzorku



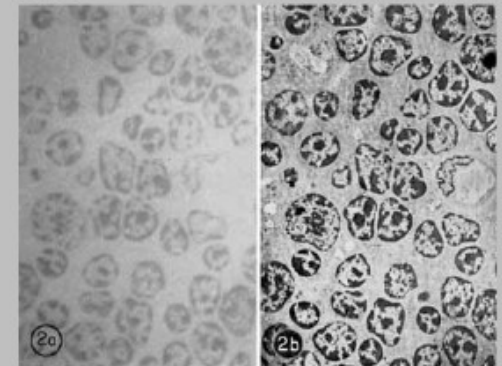
Kontrastovací látky

Oxid osmičelý – lipidy (membrány)
Ferokyanid

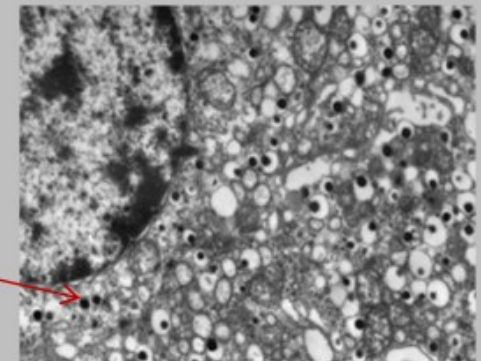


Octan uranylu - nukleové kyseliny a proteiny

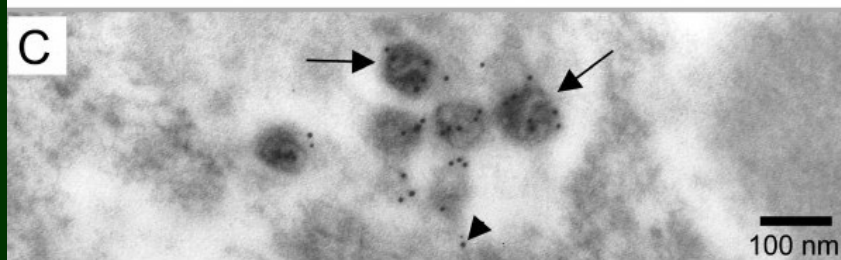
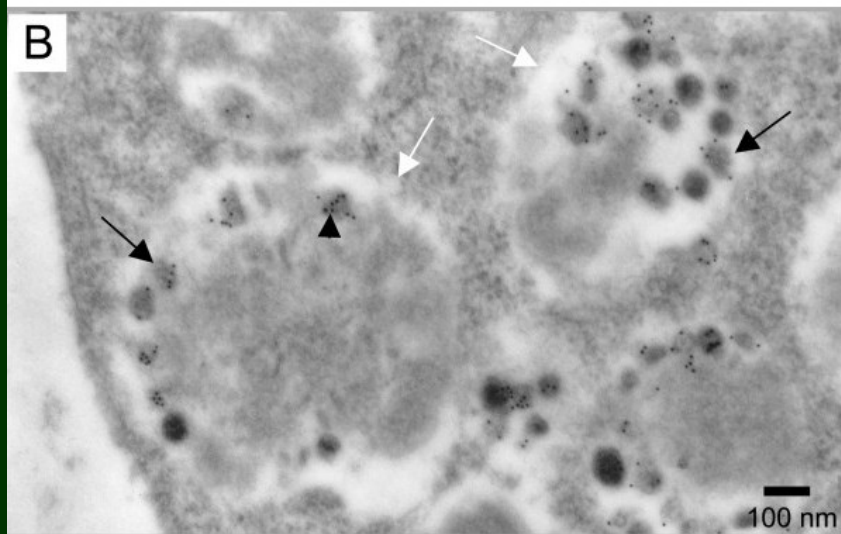
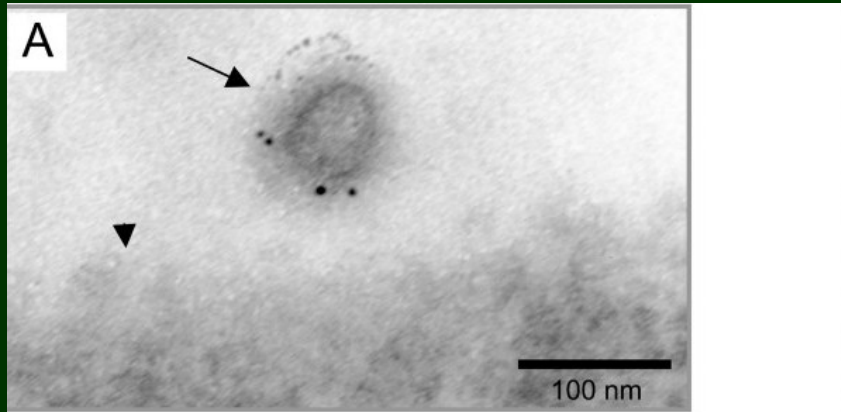
Bez s kontrastováním



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



Imunoelektronová mikroskopie

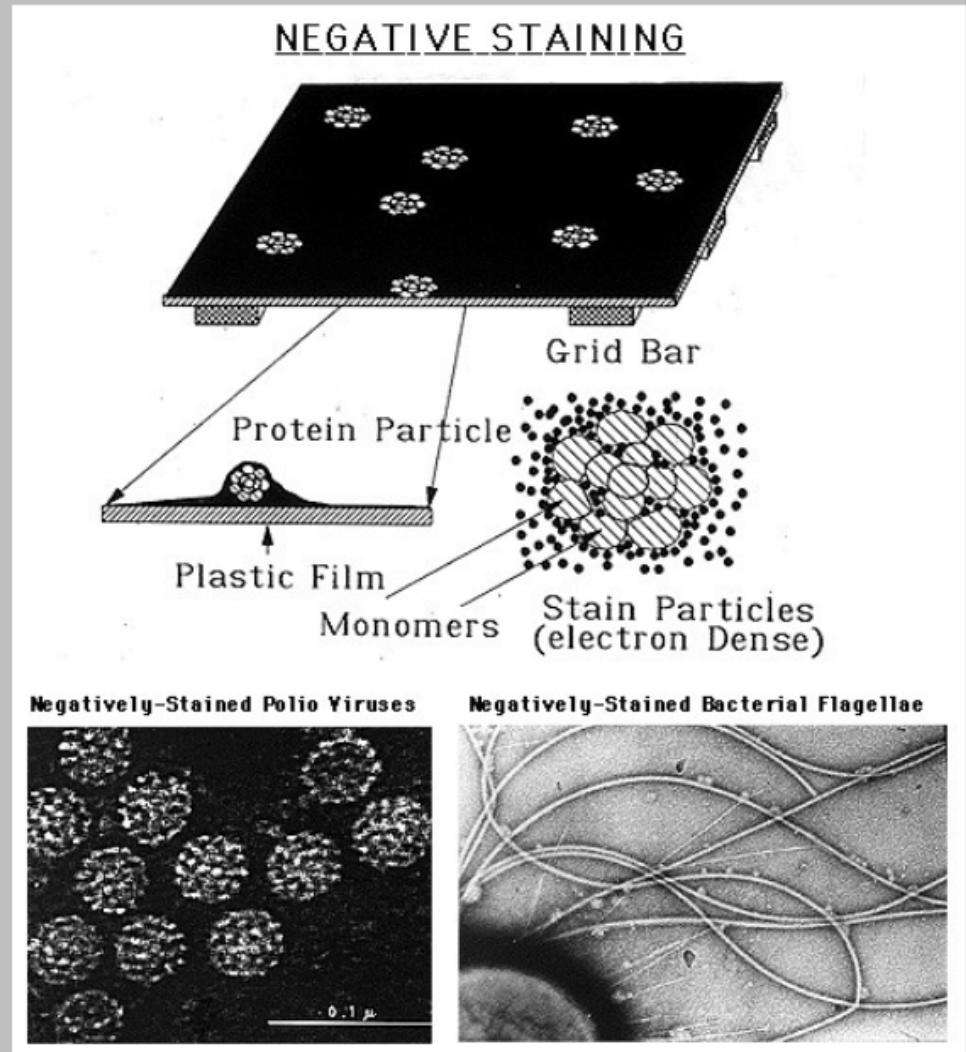


Na protilátky navázány částičky koloidního zlata; možno současná detekce více patogenů – použijí se kuličky různé velikosti.

Imunoelektronová mikroskopie vykazuje mnohem vyšší citlivost v porovnání s klasickou elektronovou mikroskopií; v diagnostice se však obvykle nepoužívá.

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



Mrazové leptání a lámání

- 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 sítky s formvarovou blánou, pozorování

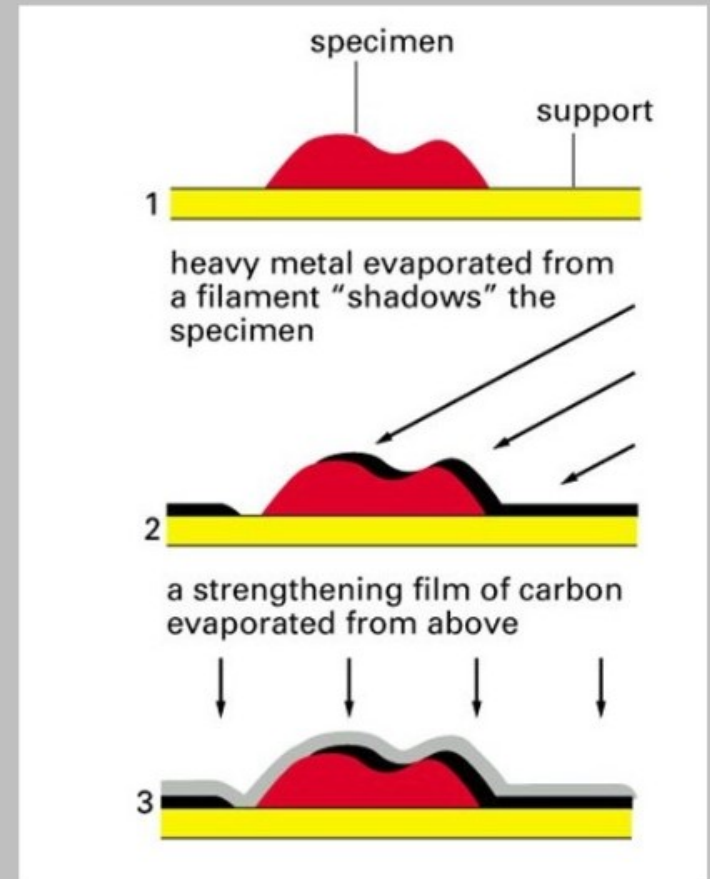


<http://www.tobiasrose.co.uk/mrbevis/ebpf.html>

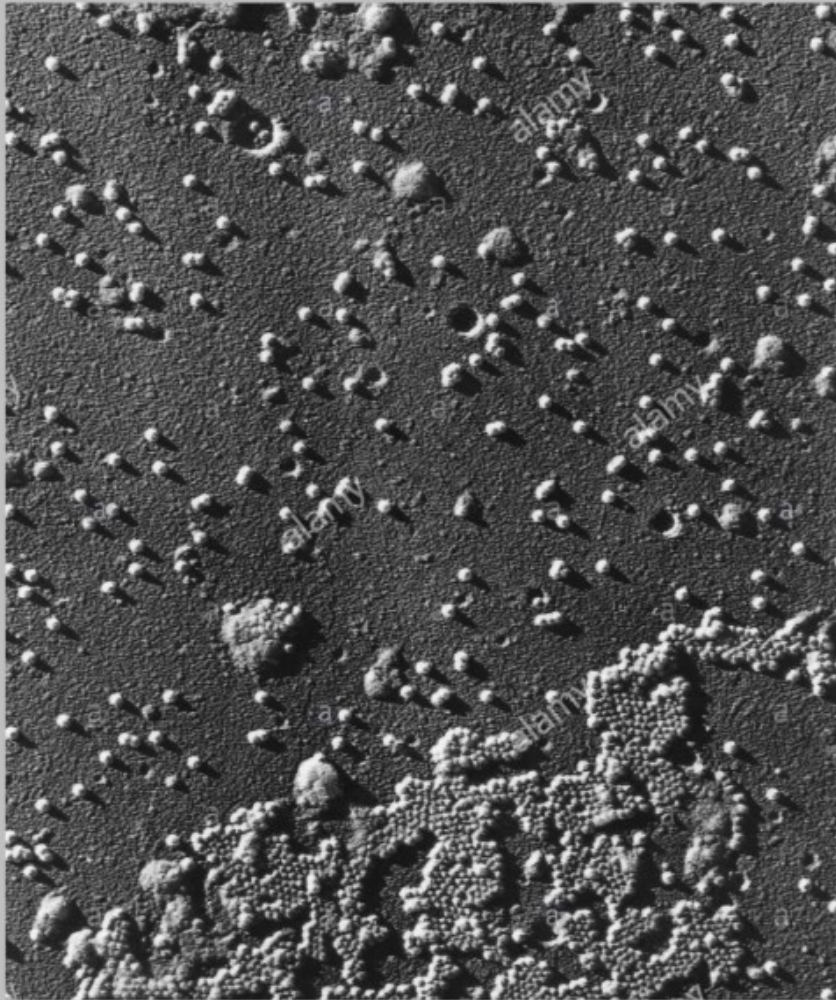
Metoda pro zobrazování povrchu lomných ploch membránových struktur

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)



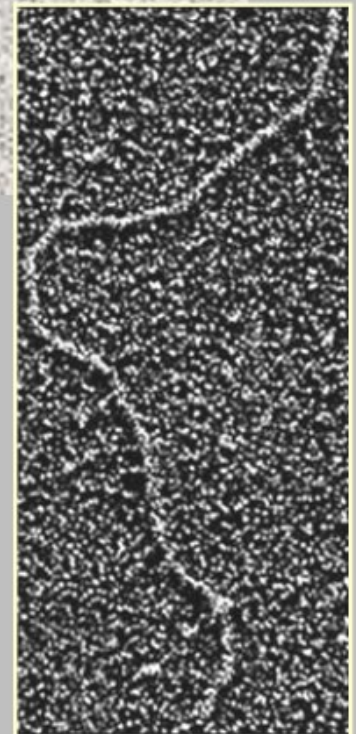
pokovovačka s komorou pro vytvoření podtlaku



Polio virus



DNA

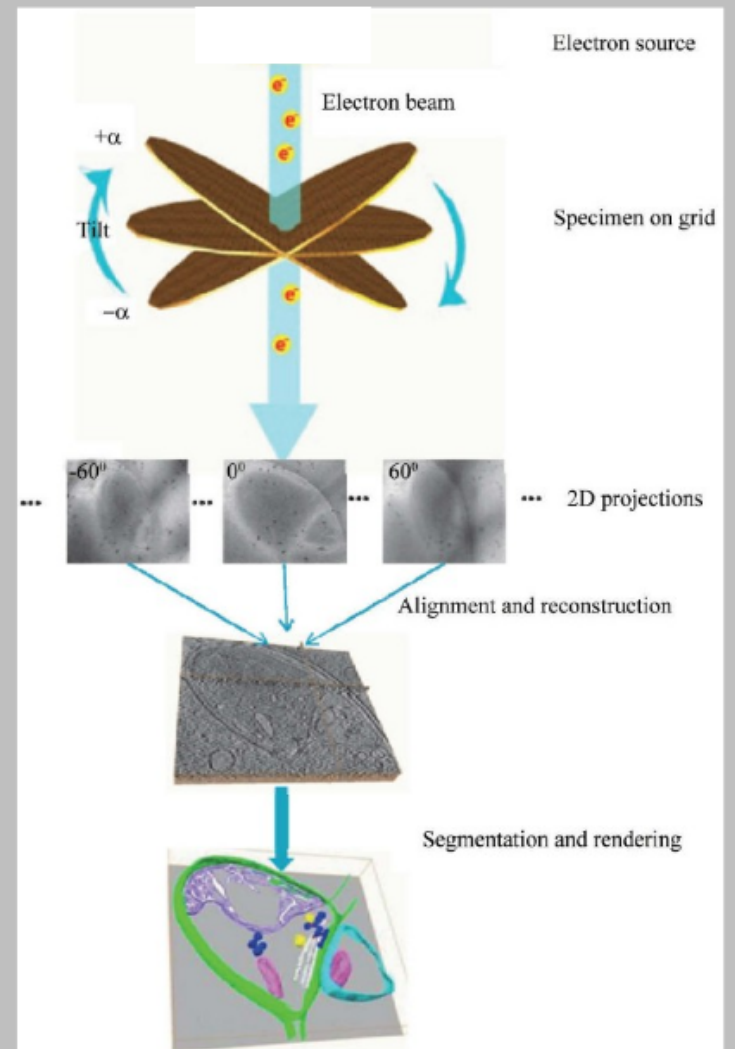


(C) 200 nm

3-D 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 (-180°C) bez nutnosti kontrastování. Viz následující přenášky.

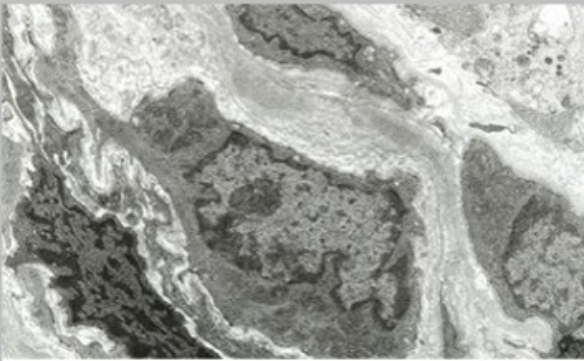


Nevýhody EM

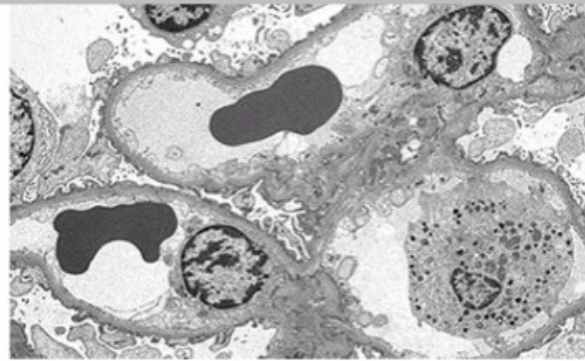
- Drahý a prostorově náročný přístroj
- Pozorování jen ultratenkých řezů (náročné na přípravu preparátů)
- Umístění preparátu ve vakuu znemožňující pozorování živých organismů

Příklady využití elektronové mikroskopie v medicíně (užíváno jako doplňková metoda upřesnění diagnózy)

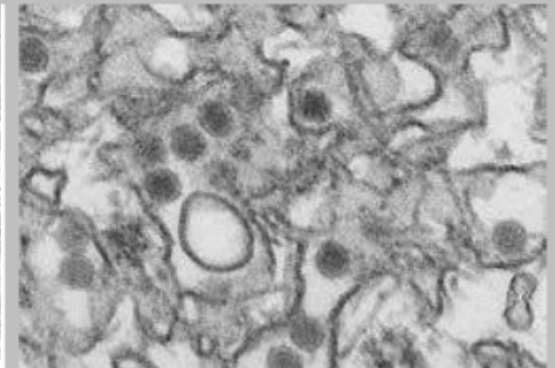
- Diagnostika nemocí ledvin – detekce strukturních změn glomerulu, detekce depozit imunokomplexů
- Diagnostika svalových onemocnění
- Diagnostika poruch metabolismu
- Detekce virů



Lupu nephritis of kidney imaged with TEM



Renal biopsy of diseased kidney tissue



TEM of Zika Virus. Virus particles are 40 nm in diameter, with an outer envelope and an inner dense core.

Courtesy of Cynthia Goldsmith, CDC.

Využití elektronové mikroskopie pro diagnostiku

- rychlá metoda, výsledek do několika hodin
- Určení virů pomocí morfologické struktury, spolu s informacemi o klinickém průběhu onemocnění, často stačí ke stanovení prozatímní diagnózy nebo vyloučení mnohem závažnějšího infekčního onemocnění.
- virus musí být v klinickém materiálu v dostatečné koncentraci- (10^9 - 10^{12} v 1ml)
- zkoncentrování virů centrifugací
- možnost průkazu inaktivovaných virů
- průkaz všech virů v daném materiálu- neselektivní metoda
- klinický materiál: vezikulární tekutina, kožní léze, nosohltanový sekret, sliny, slzy, tekutina z bioptického materiálu nebo tkáňových kultur, moč, krevní sérum, mozkomíšní mok, stolice, bradavice, bioptický a autoptický materiál, tkáňové kultury a chorioalantois

- diagnostika pravých neštovic- přímá diagnostika tekutiny nebo oškrabků z lézí, které obsahují velké množství virových partikulí, umožňuje rychlou identifikaci viru
- diferenciální diagnostika poxvirů a parapoxvirů oproti herpetickým virům
- V nosohltanových sekretech prokazujeme paramyxoviry, respirační synciciální virus (RSV) a řadu dalších virů vyvolávajících respirační onemocnění.
- V mozkomíšním moku a v homogenátech mozkové tkáně bývají viry přítomny ve velmi malých koncentracích, nedostatečných pro přímou elektronovou mikroskopii. Přesto však lze některé viry v tomto klinickém materiálu prokázat. Je jím například virus příušnic nebo viry herpetických encefalitid.
- „Neselektivnost“ elektronové mikroskopie má velký význam v diagnostice virů trávicího ústrojí. Ve filtrátech nebo extraktech stolice lze tak prokázat řadu virů, jako jsou astroviry, adenoviry, koronaviry a kaliciviry.