

**Odborná rešerše bakalářské práce**

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity  
v Českých Budějovicích  
2009**



**Možnosti využití metod imunolokalizace ve skenovacím  
elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou**

**Vypracovala: Markéta Svatáková**

**Vedoucí práce: Ing. Jana Nebesářová, CSc.**

## **Anotace**

V této práci porovnávám použití skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou a transmisního elektronového mikroskopu k imunolokalizaci antigenů biologických vzorků. Větší pozornost zde kladu na využití skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou, protože tento mikroskop v současnosti dosáhl technických parametrů nutných pro detekci značených protilátek a vzhledem k snazší přípravě preparátů přináší nové možnosti pro použití imunoznačení.

Cílem rešerše je nalézt v literatuře současné využití skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou pracujícího v kryorežimu pro imunolokalizaci a zaměřit se na technické podmínky a přípravu biologických preparátů pro tuto metodu.

## **Annotation**

In this bachelors thesis I compare and contrast the FESEM (field emission scanning electron microscopy) with the TEM (transmission electron microscopy) for the immuno localisation of antigens in biological specimens. More attention was paid to the use of the FESEM due to the recent technological improvements, allowing the detection of labelled antibodies in samples. Using the FESEM in this way would ease preparatory steps and bring forward new possibilities for immunolabelling in electron microscopy.

The aim of this research is to find, in the currently available literature, the use of FESEM under cryo conditions for immunolocalisation and to focus on the preparation of samples and physical conditions required to view them.

Svatáková M., 2009, Možnosti využití metod imunolokalizace ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou [The facilities of usage of immunolocalisation methods for field emission scanning electron microscopy. Bc. Thesis, in Czech] – p. 33, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji odbornou rešerši bakalářské práce jsem vypracovala samostatně s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své odborné rešerše bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích .....

Markéta Svatáková .....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Ing. Janě Nebesářové, CSc. za cenné rady a trpělivost a RNDr. Marii Vancové, Ph.D. za poskytnuté materiály imunologického podkladu. Dále bych chtěla poděkovat také Jiřímu Vaněčkovi za to, že mě naučil uživatelským potřebám skenovacího mikroskopu a celému kolektivu laboratoře elektronové mikroskopie za ochotu a příjemnou atmosféru.

# Obsah

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE.....</b>	<b>7</b>
<b>2. SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 FYZIKÁLNÍ ZÁKLADY .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Rozptyl elektronů.....	8
2.2.2 Sekundární a odražené elektrony .....	9
<b>2.2 POPIS PRÁCE A KONSTRUKCE SEM.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE S AUTOEMISNÍ TRYSKOU .....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Historie.....	12
2.3.2 Elektronové zdroje.....	12
2.2.3.1 Emise elektronů.....	13
2.2.3.2 Autoemisní elektronové trysky.....	13
2.3.3 FESEM JEOL 7401F.....	14
<b>2.4 ENVIRONMENTÁLNÍ A NÍZKOVAKUOVÝ SEM .....</b>	<b>17</b>
<b>3. PŘÍPRAVA VZORKŮ .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ PRO SEM .....</b>	<b>18</b>
<b>4. IMUNOZNAČENÍ.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 PŘEHLED IMUNOLOGICKÝCH POJMŮ .....</b>	<b>21</b>
4.1.1 Antigeny.....	21
4.1.2 Protilátky.....	21
4.1.2.1 Struktura imunoglobulinů.....	21
4.1.2.2 Polykonální a monoklonální protilátky .....	23
4.1.3 Povaha interakcí antigen – protilátka .....	23
<b>4.2 PRINCIP IMUNOLOKALIZACE .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3 MARKERY POUŽÍVANÉ K IMUNOLOKALIZACI V SEM .....</b>	<b>24</b>
<b>5. PARAMETRY OVLIVŇUJÍCÍ ZOBRAZENÍ.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 DETEKCE SE A BSE .....</b>	<b>25</b>
5.1.1 Detekce sekundárních elektronů.....	25
5.1.2 Detekce zpětně odražených elektronů.....	26
5.1.3 Urychlovací napětí .....	26
5.1.4 Pokovení.....	27
5.1.5 Pracovní vzdálenost (WD).....	29
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>30</b>
<b>7. POUŽITÉ ZDROJE .....</b>	<b>31</b>

# 1.Úvod

## 1.1 Elektronová mikroskopie

Při studiu struktury biologických materiálů se v současné době využívá elektronové mikroskopie, která výrazně přesahuje možnosti optické mikroskopie. Elektronový mikroskop je obdobou optického mikroskopu, kde jsou fotony nahrazeny elektrony a optické čočky elektromagnetickými čočkami. Využívá se toho, že vlnové délky urychlených elektronů jsou o mnoho řádů menší než fotonů viditelného světla. Proto má elektronový mikroskop mnohem větší rozlišovací schopnost a může tak dosáhnout mnohem většího zvětšení [1].

Mikrostruktura je studována ve vakuu pomocí elektronového svazku. Ten vzniká emisí elektronů z katody, které jsou dále urychlovány k anodě. Svazek je fokusován vhodně upraveným elektrickým, magnetickým nebo elektromagnetickým polem, aby bylo dosaženo požadovaného zvětšení. Elektronový svazek vytváří obraz interakcemi s pozorovaným preparátem. Podle fyzikální tvorby obrazu dělíme elektronovou mikroskopii na dva základní druhy, transmisní elektronovou mikroskopii a skenovací elektronovou mikroskopii.

U transmisní elektronové mikroskopie (TEM) elektrony pronikají pozorovaným preparátem. Interakcí se vzorkem vznikají elektrony odchylované od původního směru, jímž se pohyboval primární svazek. Většina odchýlených elektronů se pomocí clony zachytí a obraz je tvořen dopadem převážně neodchýlených elektronů na zobrazovací systém. Zobrazovacím systémem může být stínítko z luminiscenčního materiálu, na kterém se vytvoří kruhový obraz [2].

U skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) elektrony dopadají na pozorovaný preparát a interakcí s hmotou vyraží ze vzorku elektrony. Tyto elektrony jsou pomocí vhodného potenciálu přitahovány na detektory, které vytváří signál upravený pro zpracování v zobrazovacím systému. Zobrazovacím systémem může být obrazovka, na které se vytváří příslušný obraz vzniklý rastrováním elektronového paprsku po snímané ploše. Výsledným obrazem je snímek, který zachycuje povrchovou strukturu preparátu [2].

Podstatnou vlastností skenovací elektronové mikroskopie je zobrazování povrchových struktur, jejichž členitost se zachycuje s velkou hloubkou ostrosti [20]. Nové vylepšení konstrukce skenovacího mikroskopu a rozvoj metod třídících elektrony

před jejich detekcí [13] umožňuje použít tento mikroskop k lokalizaci jednotlivých komponent biologických materiálů pomocí imunocytochemických metod, což bylo dříve možné pouze v transmisním elektronovém mikroskopu.

## 2. Skenovací elektronová mikroskopie

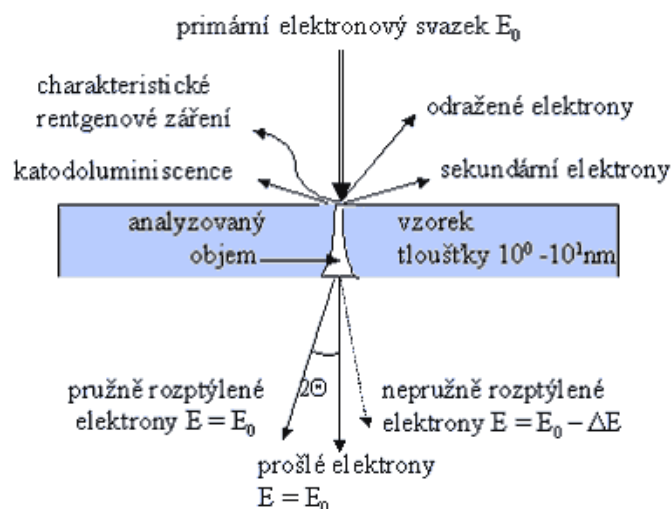
### 2.1 Fyzikální základy

#### 2.2.1 Rozptyl elektronů

Základním jevem při tvorbě obrazu v elektronovém mikroskopu je interakce mezi urychlenými elektrony ve vakuu a mezi preparátem [4]. Rychlé elektrony jsou po dopadu na hmotu rozptylovány a ztrácejí část své energie v poli jader a elektronových obalů atomů [19].

Při nárazu elektronu na atom mohou nastat dva případy: elektron se buď odrazí (odchýlí) do jiného směru bez ztráty své původní rychlosti (energie), nebo část energie předá atomu a dále se pohybuje se zmenšenou kinetickou energií. V prvním případě se jedná o pružný rozptyl, ve druhé situaci jde o rozptyl nepružný. [19] Výsledkem interakce je některý ze signálů naznačených na obr. 1, jež nesou zobrazovanou informaci o mikrostruktuře.

**Obrázek č. 1:** Interakce elektronů se vzorkem a její typické odezvy.  $E_0$  je energie primárních elektronů,  $\Delta E$  je charakteristická ztráta,  $\Theta$  je Braggův úhel [4].





V této práci budu více rozepisovat informace pouze o dvou signálech, které vzniknou po dopadu primárního elektronového paprsku na vzorek. Jedná se o odražené elektrony a sekundární elektrony.

### 2.2.2 Sekundární a odražené elektrony

Primární elektronový paprsek při kontaktu se vzorkem produkuje sekundární elektrony (SE) a zpětně odražené elektrony (BSE). Primární elektrony, které při průchodu hmotou ztratily značnou část své energie, se nakonec pohybují difúzním pohybem a označují se jako elektrony absorbované [22]. Absorbované elektrony tvoří 50 – 90% celkového proudu elektronů [23]. Nemohou již ionizovat hlubší vrstvy atomového obalu, ale mohou excitovat elektrony na vnějších orbitech. Uvolněné vnější elektrony mají energii nejvýše 50 eV a patří do kategorie tzv. pravých sekundárních elektronů. Tyto elektrony jsou emitovány z povrchové vrstvy o tloušťce asi jen 10nm. Horní hranice energetického spektra sekundárních elektronů je 50 eV. Jde tedy o elektrony s energií o něco vyšší, než je dostačující k jejich uvolnění z povrchu vzorku.

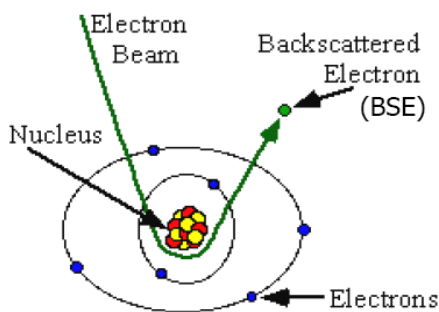
Některé primární elektrony po ztrátě části energie opouštějí vzorek jako odražené elektrony s nižší energií [22]. Odražené elektrony mají daný směr a energii poněkud menší než elektrony dopadající, ale řádově srovnatelnou. Zatímco sekundární elektrony mají energii podstatně nižší a mohou se dostat maximálně z hloubky několika nanometrů [23]. Získávání obrazu pomocí sekundárních elektronů, který by dokumentoval topografické změny na povrchu vzorku, je hlavním a nejčastějším posláním SEM. Ze signálů, jež se mohou ke stejnému účelu využít, je vůbec nejvýhodnější neboť poskytuje obraz nejpřehlednější i při nejlepší dosažitelné rozlišovací schopnosti. Emise sekundárních elektronů je tak citlivá na úhel, pod nímž na povrch dopadá primární svazek, že lze stanovit rozdíly v orientaci jednotlivých mikrooblastí kolem 2°. Čím je úhel dopadu primárního svazku menší, tím silnější je emise sekundárních elektronů [22].

Všechny emise nad 50 eV jsou považovány za zpětně odražené elektrony [22]. Snímání zpětně odražených elektronů je užitečné při odlišování materiálů, jelikož výtěžek zpětně odražených elektronů vzrůstá s atomovým číslem. Při tomto snímání lze s dobrým kontrastem odlišit prvky, jejichž rozdíl atomových čísel je roven alespoň 3.[23]. Obraz povrchových nerovností vytvořený pomocí odražených elektronů je velmi kontrastní a vlivem přímočarého pohybu elektronů prostý jakýchkoli detailů v oblasti

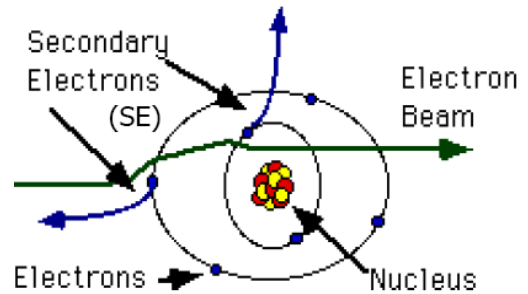
stínů [22]. Moderní přístroje umožňují definované mixování signálů jak sekundárních tak i odražených elektronů. Toto dovoluje využití pozitivních vlastností obou režimů a získání požadované obrazové informace [5].

Znázornění signálů:

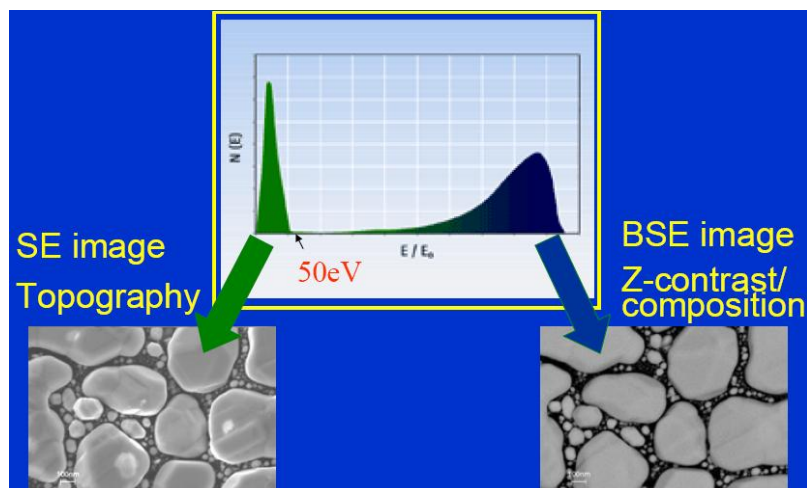
**Obrázek č. 2:** Zpětně odražené elektrony [5]



**Obrázek č. 3:** Sekundární elektrony [5]



**Obrázek č. 4:** Energetické rozložení (zastoupení) SE a BSE [5]



## 2.2 Popis práce a konstrukce SEM

Jak již bylo zmíněno, na preparát dopadají elektrony primárního svazku, které po interakci s preparátem vytvářejí jednotlivé signály (např. SE). Primární elektrony jsou emitovány ve vakuu ze zdroje, který je umístěn ve špičce tubusu a většinou ho tvoří přímo žhavené wolframové vlákno. Průměr zfokusovaného svazku primárních elektronů dopadajícího na povrch vzorku je přímo úměrný průměru katody a ovlivňuje rozlišovací schopnost mikroskopu, která se u přístrojů s wolframovou přímo žhavenou katodou pohybuje mezi 10ti až 15ti nm. Mikroskopy s autoemisní tryskou mají menší průměr hrotu katody a dosahují rozlišovací schopnosti<sup>1</sup> pod 5 nm [6].

Primární elektrony musí být urychleny potenciálem mezi katodou a anodou, která má ve svém středu kruhový otvor, kudy primární elektrony prolétají do soustavy elektromagnetických čoček<sup>2</sup>. Soustava čoček zajišťuje úzký průměr svazku primárních elektronů a obvykle je tvořena jednou nebo dvěma kondenzorovými čočkami a objektivovou čočkou. Důležitou součástí elektron - optického systému je stigmátor, pomocí kterého se koriguje astigmatismus<sup>3</sup> elektromagnetických čoček. Tato vada čoček má vliv na konečnou kvalitu obrazu a mění se hlavně po výměně preparátu. Kontrola vady pomocí stigmátorů je však vhodná i během pozorování vzorku.

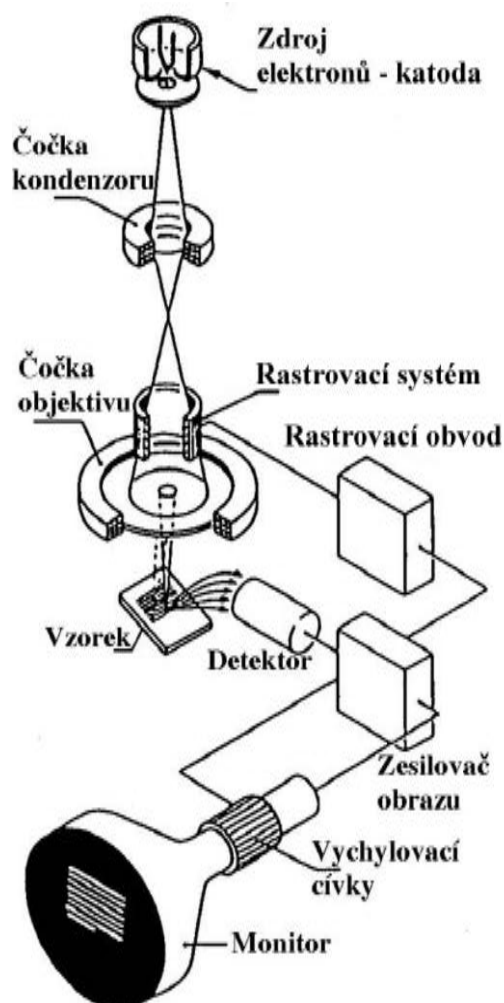
Před dopadem na preparát je paprsek primárních elektronů (zfokusovaný elektromagnetickými čočkami) rozpořehován vychylovacími cívkami a tím dochází postupnému skenování povrchu po jednotlivých řádkách. Rychlost přeběhu paprsku se může měnit, ale vhodná je 25 obrazů za sekundu [6].

Po interakci primárního svazku se vzorkem jsou vniklé signály detekované pomocí detektorů jednotlivých signálů, které jsou umístěné v blízkosti preparátu. Vzorky se nacházejí v komoře v dolní části tubusu, kde je v umístěn goniometrický stolek. Stolek umožňuje pohybovat s preparátem a většinou je ovládán pomocí joysticku nebo myši řídicího počítače [6].

<sup>1</sup>Rozlišovací schopností optické soustavy je nejmenší vzdálenost dvou bodů v obraze vhodného objektu, které se dají rozeznat jako oddělené. Podíl hodnoty rozlišovací schopnosti oka a rozlišovací schopnosti mikroskopu určuje hodnotu zvětšení [20].

<sup>2</sup>Elektromagnetické čočky: Nejjednodušší elektromagnetickou čočkou je solenoid - kruhová cívka, která vytvořeným magnetickým polem působí na dráhu elektronů procházejících pólovými nástavci. Dráha elektronů pak tvoří prostorovou spirálu ve směru magnetických čar [20].

<sup>3</sup>Astigmatismus: Optická vada, která je způsobená nečistotami usazenými na pólových nástavcích. Nečistoty tvoří elektrické náboje, které deformují nebo posouvají obraz [20].



**Obrázek č. 5:** Schéma skenovacího elektronového mikroskopu [21]

## **2.3 Skenovací elektronová mikroskopie s autoemisní tryskou**

### **2.3.1 Historie**

V roce 1935 navrhl Max Knoll skenovací elektronový mikroskop a o tři roky později sestavil Manfred Ardenne skenovací transmisní elektronový mikroskop [17][18]. Roku 1942 Vladimír Zworykin doplnil SEM o účinný detektor elektronů a pomalejší přeběh. Detektor se skládal z luminoforu a fotonásobiče, což umožnilo detekci sekundárních elektronů [17]. Přístroj dosáhl rozlišení 50 nm. Během vývoje se snažil Zworykin se spolupracovníky aplikovat i autoemisní trysku, aby zvýšil směrovou proudovou hustotu a dosáhl vyššího kontrastu snímaného obrazu.

Smith vypracoval principy dalšího elektronického zpracování signálu nelineárním zesílením, nahradil elektrostatické elektronové čočky elektromagnetickými a zavedl princip dvojitého vychylování. Everhart a Thornley podstatně zlepšili detektor sekundárních elektronů použitím světlovodu, takže se zvýšil poměr signálu k šumu. Další podstatná zlepšení přístroje provedli Broers zavedením nepřímo žhavené katody na bázi  $\text{LaB}_6$  a Crewe, který vypracoval stabilní autoemisní trysku [19].

V roce 1965 firma Cambridge Instrument Company v Anglii uvedla na trh Stereoscan 1 SEM, o šest měsíců později ho následoval s japonskou značkou JEOL mikroskop JSM-1 [17].

### **2.3.2 Elektronové zdroje**

Zdroj elektronů je základní součástí všech elektronově optických zařízení. Zformování elektronového svazku před dopadem na zkoumaný objekt je úkolem „osvětlovací soustavy“. Ta sestává z elektronové trysky a elektronově optické části zkomponované z různého počtu elektrostatických či elektromagnetických čoček. Elektronová tryska je tvořena vlastním emitérem elektronů, elektrostatickou extrakční a urychlovací soustavou formující současně první elektronově optickou čočku. Ta může být doplněna čočkou magnetickou [13].

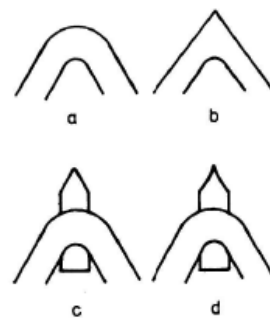
### 2.2.3.1 Emise elektronů

Emisi elektronů lze vyvolat mnoha způsoby (termoemise, fotoemise, emise polem, zářivé p-n přechody,..). Jako zdroj elektronů pro osvětlovací soustavy jsou však dosud využívány pouze některé.

Podle klasického dělení se jedná o katody termoemisní a autoemisní. Působení obou faktorů však nelze oddělit a ukazuje se, že mnohé výhody přinášení zdroje, u kterých je využíváno obou mechanismů emise zhruba ve stejné míře [13].

Dvě krajní meze jsou pak reprezentovány zdroji čistě termoemisními pracujícími s vysokými teplotami (až 3000 K) a s malými intenzitami elektrostatického pole u povrchu emitéru a zdroji čistě autoemisními, které pracují při pokojové teplotě a vysokých hodnotách pole na povrchu emitéru ( $10^{10}$  V. m<sup>-1</sup>). Vysokých hodnot intenzity elektrického pole je dosahováno úpravou emitéru do tvaru ostrého hrotu. Jednotlivé typy katod jsou znázorněny na obr. 6.

**Obrázek č. 6:** a) klasická termoemisní katoda tvořená ohnutým vláknem, b) zahrocená termoemisní katoda, c) termoautoemisní katoda tvořená emitérem s hrotem velkého poloměru (1 – 10 μm), d) autoemisní katoda tvořená emitérem o malém poloměru (0,05 – 1 μm).



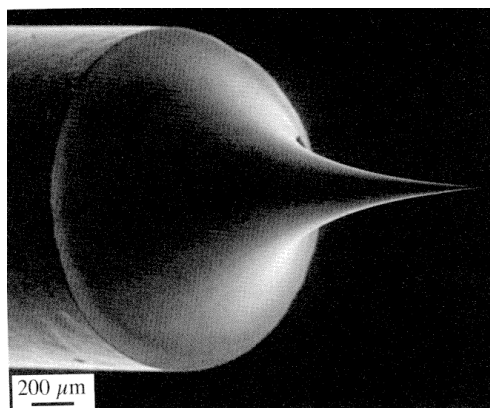
Materiál katod musí vyhovovat z mnoha hledisek. Měl by mít vysoký bod tání, nízkou výstupní práci, mechanickou pevnost, malou chemickou afinitu. Nejrozšířenějším materiálem katod zůstává stále wolfram splňující většinu požadavků s výjimkou výstupní práce elektronů ( $\varphi = 4,5$  eV). Z těchto důvodů je využíváno možnosti snížit výstupní práci wolframu jeho chemickou aktivací a vhodnou volbou krystalografické orientace. Materiálem, který není mechanicky vhodný k výrobě nosné části katody, ale ostatními vlastnostmi včetně výstupní práce ( $\varphi = 2,6$  eV) vyhovuje, je hexaborid lanthanu (LaB<sub>6</sub>) [13].

### 2.2.3.2 Autoemisní elektronové trysky

Tyto trysky s neomezenou životností představují zdroje elektronů o vysoké směrové proudové hustotě, neboť všechny elektrony opouštějí katodu téměř se stejnou rychlostí. Principem činnosti trysky je autoemise [19]. Elektrony emituje studené wolframové vlákno odleptané do hrotu s poloměrem 60 až 200 nm. Proti hrotu je

umístěna elektroda s kladným napětím 5 kV. Kolem hrotu potom vzniká elektrické pole s intenzitou  $10^8 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , které je schopno vytrhovat velké množství elektronů z povrchu wolframového hrotu. Nevýhodou autoemisní trysky je vysoká hodnota vakua ( $10^{-6}$  až  $10^{-8}$  Pa) [6].

**Obrázek č. 7:** Autoemisní tryska [17]



### 2.3.3 FESEM JEOL 7401F

JSM-7401F je vysoko-rozlišovací skenovací elektronový mikroskop. Používá autoemisní signál (FE gun) jako zdroj elektronů, elektromagnetické objektivové čočky s nízkou aberací, r – filtr a řadu speciálních pracovních módů, které ovlivňují detekci signálů na určité úrovni energie. Díky těmto novým technologiím se u skenovacího elektronového mikroskopu zlepšila rozlišovací schopnost při nízkém urychlovacím napětí: 1,5 nm při 1 kV.

Mikroskop je dále vybaven Aurata - YAG detektorem a kryokomorou CRYO ALTO 2500 od firmy GATAN, což rozšiřuje možnosti pozorování vzorků upravených různými metodami [15].

#### R – filtr

Po dopadu primárních elektronů na vzorek se z povrchu emitují elektrony o různé energii. V případě sekundárních elektronů dochází ke třem způsobům excitace. SE1 vznikají z primárních elektronů – nesou informaci z plochy vzorku odpovídající průměru stopy dopadajících primárních elektronů, SE2 vznikají v důsledku srážky s BSE v tenké povrchové vrstvě a SE3 vznikají dopadem BSE na stěnu komory vzorku [21]. R – filtr je energetický filtr, který zajišťuje, aby na detektor sekundárních

elektronů dopadaly elektrony o stejné energii [15]. SE o nízké energii jsou zachycené filtrem a SE s vyšší energií jsou detekovány.

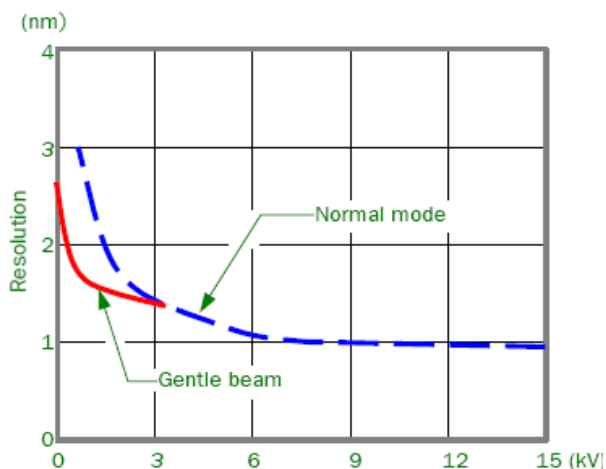
### GB mód

GB mód zpomaluje elektronový paprsek před vzorkem, snižuje jeho energii. Tím minimalizuje poškození vzorku a udržuje úzký elektronový svazek, aby zajistil vysoké rozlišení. Při nízkém urychlovacím napětí se totiž průměr svazku zvětšuje a následně se i zhoršuje rozlišovací schopnost. Tento mód poskytuje vysokou kvalitu zobrazení při nízkém urychlovacím napětí (100 V – 3 kV), což bylo bez použití GB módu doposud možné jen při vysokém urychlovacím napětí. Rozdílný vliv urychlovacích napětí na rozlišovací schopnost, průměr elektronového svazku, poškození a nabíjení vzorku bez použití GB módu a s použitím GB módu je porovnán v tabulce č. 1. Graf č. 1 znázorňuje závislost urychlovacího napětí na rozlišení v GB módu a bez něho [15].

**Tabulka č. 1:** Přehled vlivu urychlovacího napětí a použití GB módu na jednotlivé parametry

Urychlovací napětí	Rozlišení	Průměr el. svazku	Poškození vzorku	Nabíjení
Nízké	Nízké	Velký	Malé	Malé
Vysoké	Vysoké	Malý	Velké	Velké
Velmi nízké (GB mód)	Vysoká	Malý	Malé	Nízké

**Graf č. 1 :** Závislost urychlovacího napětí na rozlišení s použitím GB módu a bez něho



## Sb a Bs mód

Sb a Bs mód umožňuje kombinaci SE a BSE (v Sb módu se mísí BSE se SE a v Bs módu naopak). Touto kombinací je možné u Sb módu zajistit materiálový kontrast pomocí zpětně odražených elektronů a topografický kontrast sekundárními elektrony. V Bs módu se získává topografický i materiálový kontrast současně [15].

## YAG detektor

K detekci zpětně odražených elektronů se používá řada detektorů a liší se především svou citlivostí k BSE signálům o určitých energiích, konstrukcí a schopností tvořit topografický i materiálový kontrast, nebo účinností při časté změně vakuum – vzduch.

YAG je monokrystalický scintilační detektor s citlivostí pro BSE s energií od 1,5 keV, vyrobený z yttrium aluminium garnet. Jeho výhodou je neomezená životnost a tvorba materiálového a topografického kontrastu [24]. Tento detektor je vestavěný v zadní části SEM a před jeho použitím se zasouvá mezi vzorek a objektivovou čočku. Při krátké pracovní vzdálenosti ( $WD = 3\text{mm}$ ) se musí se stolkem manipulovat opatrně, aby nenarazil do YAG detektoru.

YAG detektor pozměněný panem Autratou je schopný detekovat signály při nízkém urychlovacím napětí, aniž by se snížila kvalita rozlišení.

## Kryo komora CRYO ALTO 2500 od firmy GATAN

Mikroskop vybavený touto kryo komorou umožňuje zobrazovat vnitřní struktury částečně nebo úplně zavodněných biologických materiálů.

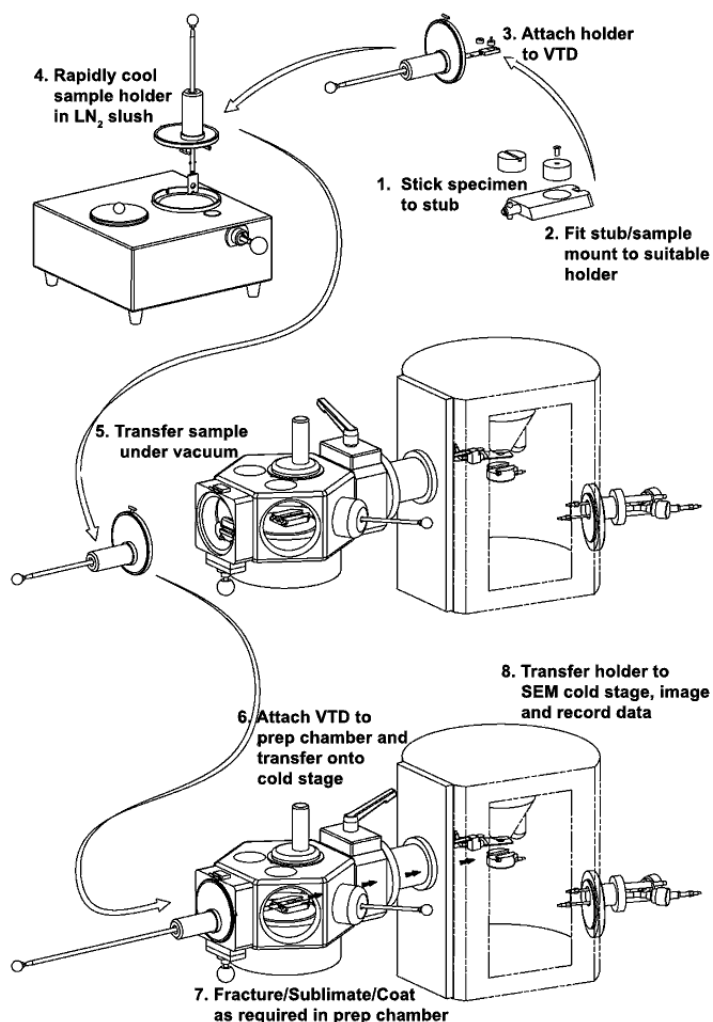
Komora obsahuje antikontaminátor, nástroje na freeze fracturing (mrazové lámání), freeze etching (mrazové leptání) a zařízení na pokovení vzorku [10].

Vzorky jsou upravené kryo fixací a pozorované ve vakuu při  $-140^{\circ}\text{C}$ . Nejdříve se preparát upevní do kryo držáku a ponoří do tekutého dusíku (kryo fixace). Potom se zavede do kryo předkomory a následně do kryo komory - v obou komorách je vysoké vakuum. V kryo předkomoře může být preparát upravován jednotlivými metodami (mrazovým lámáním, leptáním a pokovením). Nakonec se vzorek umístí na kryostolek do preparátové komory SEM, viz. obrázek 8 a pozoruje se v kryo režimu.[11]



Při práci s mikroskopem v kryo režimu je nutné se vyvarovat náklonu a rotaci preparátu, jelikož se vzorek nachází na speciálním chlazeném stolku a při náklonu by došlo k jeho poškození.

**Obrázek č. 8:** Popis postupu vložení vzorku do kryo – SEM [11]



## 2.4 Environmentální a nízkovakuový SEM

Dalšími způsoby, jak pozorovat zavodněné preparáty, je pomocí nízkovakuových a environmentálních skanovacích elektronových mikroskopů, ve kterých je v preparátové komoře tlak umožňující pozorovat vzorky s obsahem vody 70 až 90 %. Vnitřní prostor těchto mikroskopů je rozdělen do několika navzájem oddělených komor, které jsou čerpány na různé hodnoty tlaku a ten klesá směrem od elektronového děla ke komoře preparátů.

V nízkovakuových mikroskopech se potom ke tvorbě obrazu používají odražené elektrony, které mají dostatečnou energii a rychlost, aby v zaplněném prostředí preparátové komory dorazily k detektoru.

V environmentálním SEM se využívá k tvorbě obrazu sekundárních i odražených elektronů, které ionizují molekuly plynu v prostoru mezi vzorkem a detektorem a elektrony uvolněné při ionizaci přenáší signál dál do detektoru sekundárních elektronů. Cenou za možnost prohlížet zavodněné preparáty je snížená rozlišovací schopnost [6].

### **3. Příprava vzorků**

Přípravou vzorků pro SEM se snažíme o to, aby se co nejvíce zachovaly struktury materiálu. Většina preparačních technik, které mění živou tkáň na neživý preparát, zvyšuje možnost vzniku chyb jak ve strukturální, tak chemické stavbě biologických vzorků [19]. Mezi artefakty například patří změna objemu (smrštění) či tvaru, extrakce rozpustného materiálu nebo agregace materiálu. Tyto artefakty vznikají především při odvodňování vzorku [14].

Preparát tedy musí být stabilní ve vysokém vakuu a při ozáření elektronovým paprskem, čistý – bez cizorodých částic, dále by nemělo docházet k jeho nabíjení a u SEM by měl produkovat potřebné množství požadovaného signálu (např. sekundárních elektronů) [19], [14].

#### **3.1 Příprava preparátů pro SEM**

Nejdříve je nutné vzorky fixovat, aby preparáty zůstali co nejvíce podobné nativnímu stavu. To provedeme chemickými (ponořením do fixačního činidla – glutaraldehydu, formaldehydu nebo oxidu osmičelého) nebo fyzikálními (kryofixací) postupy.

Většina biologických materiálů obsahuje 80 – 90% vody, která se z nich postupně odvede pomocí organického rozpouštědla (etanol, aceton) [16]. Vzorky musejí být odvodněné, protože jsou v mikroskopu vystavené vysokému vakuu a voda by se z nich prudce uvolňovala, což by vzorek poškodilo.

Po úplném nahrazení vody je vzorek potřeba zbavit dehydratačního činidla a to metodou vysoušení pomocí kritického bodu (CPD - critical point drying). Takto

upravený biologický materiál se nalepí na terčík a následně se pokoví tenkou vrstvou kovu (zlatem, platinou, chrómem) nebo pouhlikuje [16].

### 2.1.1 Chemická příprava preparátů pro SEM

- a) Fixace: použití 1 – 4 % glutaraldehydu (GA), formaldehydu (FA), nebo 1% oxidu osmičelého; pufry – kakodylátový nebo fosfátový
- b) Dehydratace: etanol, aceton, nebo 2,2 – dimetoxypropan; vzorek se postupně promývá v určitém org. rozpouštědle se vzrůstající koncentrací (např. 30, 50, 70, 80, 90, 95 a 100%)
- c) Sušení: metoda kritického bodu - CPD (critical point drying): kapalina se zahřeje na kritickou teplotu, při které mizí veškeré rozdíly mezi fázemi dané látky – nejsou oddělené rozhraním apovrchové napětí klesá na nulu; v tomto bodě se převede kapalina na plyn; vzorek tedy není poškozený povrchovým napětím kapaliny; tato metoda se provádí ve speciální aparatuře [16]
- d) Lepení: vzorky se lepí na hliníkové terčíky uhlíkovou oboustranou páskou
- e) Pokovení: zvyšuje vodivost vzorku a provádí se: vakuovým napařováním, iontovým napařováním, nebo impregnací

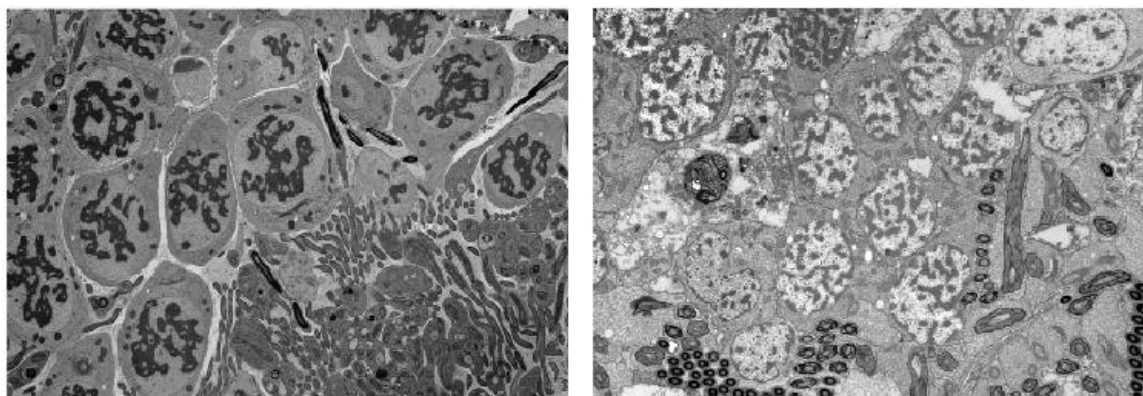
### 2.1.2 Kryo – metody

Prvním krokem je kryofixace. Musí být co nejrychlejší, aby při ní nevznikly krystalky ledu, které by poškodily preparát. Vzorek se může před zmrazením chemicky upravit přidáním kryoprotektantů nebo se zmrazí v nativním stavu tekutým dusíkem nebo pomocí high pressure freezing (HPF). Při fixaci tekutým dusíkem a HPF dochází k fixaci během milisekund, což je lepší než při chemické fixaci, která trvá sekundy až minuty (M. Müller 1990) [17].

Kryoprotektanty jsou látky, které snižují teplotu homogenní nukleace, zvyšují rekrytalizační teplotu a snižují množství volné vody v systému. Dělí se do dvou skupin na látky penetrující (pronikají do buněk a jejich kompartmentů – patří sem glycerol, dimethylsulfoxid a etylen glykol) nebo nepenetrující, které zůstávají vně buněk – polyvinylpyrolidon, sacharóza [6]. Kryoprotektanty prostupují vzorek a zabraňují tvorbě ledových krystalů do 5  $\mu\text{m}$ . K fixaci do větší hloubky se používá high – pressure freezing, tato nová metoda vzorek zmrazí do hloubky 200  $\mu\text{m}$  a šířky 2 mm [17].

HPF je metoda rychlého zmrazení, při které se vzorek vystaví tlaku 2100 barů – v tomto stavu se ve vodě netvoří krystaly ledu do teploty  $-90^{\circ}\text{C}$ . Při tlaku 2045 atm se sníží teplota tání z  $0^{\circ}\text{C}$  na  $-22^{\circ}\text{C}$  a krystaly se netvoří až do  $-100^{\circ}\text{C}$  [25].

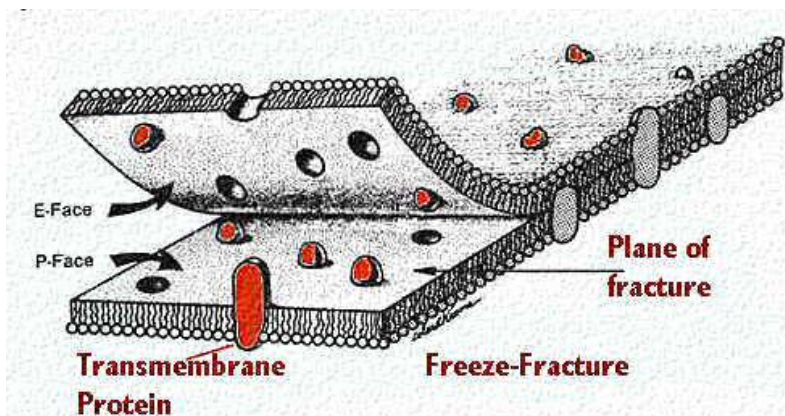
**Obrázek č. 9 :** Porovnání fixace high – pressure frzeezing (vlevo) s fixací pomocí glutaraldehydu (vpravo) [8]



Jelikož je v SEM možné pozorovat pouze povrch zmrzlého vzorku, musí se na zviditelnění vnitřních struktur použít kryo – lámání [17]. Lom se ve zmrazeném materiálu šíří cestou nejmenšího odporu, nejčastěji podél membrán. Samotné lámání je možné provést ve specializované aparatuře CRYO Alto 2500, kde se vzorek následně i pokoví. Jelikož je v kryo komoře vysoké vakuum, nedojde tam ke zničení odhalených povrchů např. Jejich orosením [6].

**Obrázek č. 10:** Mrazové lámání (freeze fracturing) [12]

Freeze etching (mrazové leptání) a freeze drying (mrazové sušení) jsou podobné metody, založené na vysublimování ledu z extracelulárních prostor, čímž se odkryjí buněčné struktury nebo makromolekuly [17].



Freeze etching je metoda prováděna za nízkého tlaku a vzorek se následně prohlíží se ve zmrazeném stavu. Freeze drying se používá u preparátů, které mají být pozorované

v mikroskopu bez kryodržáku. Vzorek je přemístěn do vakua a vysušen sublimací [6]. Následně může být vzorek post – fixován oxidem osmičelým [17].

## **4. Imunozaření**

Imunocytochemie je metoda, která umožňuje lokalizovat antigeny na elektron-mikroskopické úrovni pomocí protilátek, které nesou elektron-densní markery (nejčastěji partikule koloidního zlata).

### **4.1 Přehled imunologických pojmů**

#### **4.1.1 Antigeny**

Antigeny jsou látky, které imunitní systém rozpozná a reaguje na ně. Nejčastějšími antigeny jsou cizorodé látky z vnějšího prostředí (exoantigeny), většinou infekční mikroorganismy a jejich produkty. Antigeny, které pocházejí z organismu samotného (nejsou cizorodé), se nazývají autoantigeny.

K tomu, aby imunitní systém mohl na antigeny reagovat, je zpravidla potřeba, aby byly rozeznány ve formě makromolekul (rozpuštěných nebo přítomných na buněčném povrchu). Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní polysacharidy, ale také lipidy a lipoproteiny. Malá oblast molekuly antigenu, která je rozeznávána imunitními receptory, se nazývá epitop. Komplexy antigenu s protilátkami a s komplementovými fragmenty se nazývají imunokomplexy [26].

#### **4.1.2 Protilátky**

##### **4.1.2.1 Struktura imunoglobulinů**

Protilátky jsou proteiny ve tvaru písmene Y a nacházejí se v krvi nebo v jiných tělních tekutinách obratlovců – v imunitním systému slouží k rozpoznávání a neutralizaci cizích objektů, jako jsou bakterie a viry. Jsou produktem aktivované formy B lymfocytů – plazmocytů.

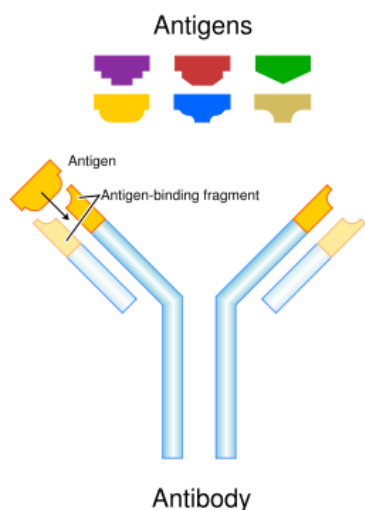
Skládají se ze dvou velkých a silných řetězců a ze dvou malých a lehkých řetězců (obr. 11). Dva těžké (H) řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidickými (cystinovými) můstky. Ke každému H-řetězci je cystinovým můstkem připojen jeden lehký (L) řetězec. Těžké řetězce se skládají ze čtyř (u některých tříd pěti) strukturálně

podobných domén. Každá doména je tvořena sekvencí 110 – 120 aminokyselin. Prostorová struktura těchto imunoglobulinových domén připomíná jakýsi soudek tvořený smyčkami polypeptidového řetězce a stabilizovaný cystinovým můstkem (obr. 12) [26].

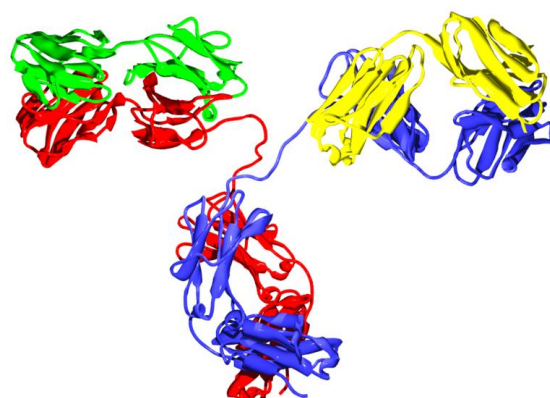
Jednotlivé domény jsou spojeny krátkými spojovacími úseky polypeptidového řetězce. Lehké řetězce se skládají ze dvou imunoglobulinových domén. Přibližná molekulová hmotnost L-řetězců je tedy 25 kDa, těžkých řetězců 50-75 kDa (podle konkrétní třídy řetězce). Domény na N-konci těžkého i lehkého řetězce jsou variabilní (označují se  $V_H$  a  $V_L$ ), tj. detaily jejich struktur se liší individuálně mezi molekulami produkovanými různými klony B lymfocytů. Ostatní domény jsou konstantní, tj. shodné u řetězců téhož typu. Konstantní domény lehkých řetězců se označují  $C_L$ , konstantní domény těžkých řetězců  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , popř.  $C_{H4}$ ; číslování jde od N – konce k C – konci. Indexy L a H jsou nahrazovány označením konkrétních typů řetězců –  $\kappa$  a  $\lambda$  u L-řetězců,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  a  $\epsilon$  u H-řetězců. Variabilní domény H – a L – řetězců vytvářejí společně vazebné místo pro antigen [26].

Oblast imunoglobulinu ze dvou těžkých řetězců, tvoří krystalizující fragment, tzv. Fc fragment. Tyto Fc fragmenty imunoglobulinů se váží na Fc receptory na leukocytech. Raménka jsou pak tvořena lehkým řetězcem a těžkým řetězcem, který přechází z krystalizujícího fragmentu. Tyto části imunoglobulinu se nazývají antigen vázající fragmenty (Fab - z angl. antigen binding fragment). Přejechod ramének v oblast s dvěma těžkými řetězci se nazývá zámek (hinge), v tomto místě je molekula velmi pohyblivá, raménka se mohou otevírat nebo zavírat podle velikosti antigenu, na který se váží, viz. obr. 13 [26].

**Obrázek č. 11:** Vazba protilátky na daný antigen [3]

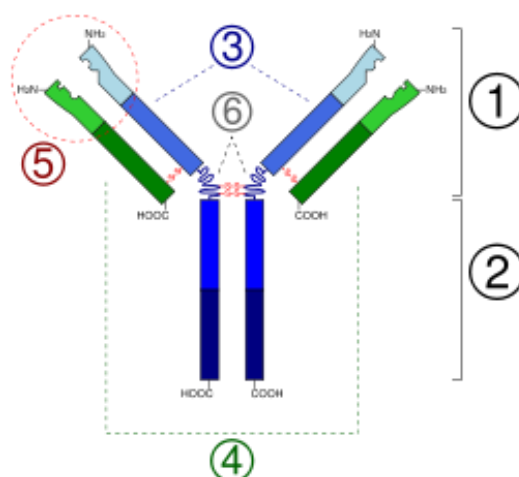


**Obrázek č. 12:** Prostorové uspořádání L – řetězce; červeně a modře jsou zbarvené těžké řetězce, zeleně a žlutě lehké řetězce protilátky



**Obrázek č. 13:** Popis imunoglobulinu [3]

1. Fab část
2. Fc část
3. těžký řetězec s jednou variabilní doménou ( $V_H$ ), na ní je napojena konstantní doména ( $C_{H1}$ ), pantová oblast a ještě dvě konstantní domény ( $C_{H2}$  a  $C_{H3}$ )
4. lehký řetězec s jednou variabilní doménou ( $V_L$ ) a s jednou konstantní doménou ( $C_L$ )
5. místo, kde se váže antigen
6. pantová oblast



#### 4.1.2.2 Polyklonální a monoklonální protilátky

V zásadě je nutné získat protilátku proti sledovanému antigenu. Protilátka se získá imunizací zvířete (např. králíka) antigenem [21]. Výsledkem záměrné imunizace experimentálního zvířete je pak polyklonální antisérum reagující s řadou epitopů na určitém antigenu.

Naproti tomu monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu plazmatických buněk, mají jednu specifitu a jsou jednoho izotypu. V organismu se vyskytují nepatrná množství jednotlivých monoklonálních protilátek [26].

In vitro lze homogenní monoklonální protilátky získat izolací klonů B lymfocytů, které produkují protilátky žádané specifity, a jejich pěstováním v buněčné kultuře. Problém je, že B lymfocyty mají krátkou dobu života, a proto se musí immortalizovat. Nejobvyklejším způsobem je fúze s vhodnou myelomovou buněčnou linií, která roste dobře a neomezeně ve tkáňové kultuře. Výsledkem fúze mezi specifickým B lymfocytem a myelomem je hybridom – hybridní buňka, která roste v kultuře a produkuje stejné protilátky jako původní B lymfocyt. [26].

#### 4.1.3 Povaha interakcí antigen – protilátka

Vazebná místa protilátek tvoří nekovalentní komplexy s molekulami antigenů. Uplatňují se v nich iontové, hydrofobní, van der Waalsovy síly a vodíkové můstky. Vazebné místo je vždy svým tvarem a rozložením nábojů v něm více či méně komplementární ke struktuře na povrchu antigenu (epitopu), se kterým vytváří komplex.

Jako všechny takové komplexy jsou i komplexy antigen-protilátka reverzibilní, tj. vyznačují neurčitou rychlostí reakcí vzniku a rozpadu. Poměr rychlostních konstant vzniku a rozpadu takového komplexu definuje rovnovážnou (asociační)  $K_{as}$ , která bývá pro typické komplexy antigen-protilátka v rozmezí  $10^6$ - $10^{12}$   $l \cdot mol^{-1}$  (převrácená hodnota  $K_{as}$  je disociační konstanta,  $K_{dis}$ ). Čím vyšší je  $K_{as}$ , tím vyšší je afinita protilátky k antigenu. Tyto fyzikálně chemické pojmy se týkají interakce jednoho vazebného místa s jednoduchým antigenem. Síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem vyjadřuje empirický pojem avidita reakce, která vzrůstá s afinitou jednoduché interakce jednoho vazebného místa a s počtem simultánně se uplatňujících vazebných míst [26].

## **4.2 Princip imunolokalizace**

Imunoznačení je možné provést metodou přímého nebo metodou nepřímého značení. Když se na preparát nanese primární protilátka, která se naváže na antigen, jedná se o metodu primárního značení. Primární protilátka může být konjugovaná se značícím markerem – např. se zlatem a imunolokalizovat tak daný antigen. Metoda nepřímého značení je specifitější a spočívá v tom, že se na primární protilátku naváže ještě protilátka sekundární nebo protein A či G [14]. Protein A se váže na Fc oblast protilátky, protein G na Fc i na Fab oblast, ale záleží na afinitě k dané protilátce [7]. Sekundární protilátky nebo zmíněné proteiny jsou ve skenovací elektronové mikroskopii naznačené většinou částicemi zlata. Někdy se používá jako marker ferritin - protein (10 nm), který obsahuje železo, častěji se s ním však imunoznačí ultratenké řezy pro transmisní elektronovou mikroskopii kvůli jeho přilnavosti a nízkému kontrastu [28]. Dalšími markery pro TEM je např. křenová peroxidáza [14], tu však není možné ve skenovací mikroskopii použít.

## **4.3 Markery používané k imunolokalizaci v SEM**

Jelikož při imunolokalizaci ve skenovací elektronové mikroskopii není možné rozpoznat tvar markerů, je pro vizualizaci protilátek lepší používat částice koloidního zlata, které je možné detekovat pomocí zpětně odražených elektronů. Partikule by měly být menších velikostí (do 20ti nm) pro jejich snadnější přístupnost k antigenům.



Použitím větších částic se snižuje schopnost protilátek značit antigeny, které jsou blízko sebe.

Je řada výhod partikulí koloidního zlata: elektro – densní povaha, různá velikost částic, afinita k širokému okruhu ligandů, zachování bioaktivity makromolekul a schopnost vytvářet SE a BSE signál [14]. Koloidní partikule zlata se používají k imunoznačení pro jejich jednoduchou detekci, snadnou přípravu koloidních roztoků o různých velikostech částic (1 – 150 nm), stabilitu a pro jejich vazebnou rozmanitost.

Na povrchu partikulí zlata je vrstva záporně nabitých iontů, které zajišťují stabilitu koloidu. Povrch zlatých částic má hydrofóbní a elektrostatické vlastnosti. Proto může být adsorpce proteinů určena elektrostatickou interakcí mezi negativně nabitým povrchem partikulí a pozitivně nabitou skupinou proteinu nebo hydrofóbní interakcí [29].

## **5. Parametry ovlivňující zobrazení**

### **5.1 Detekce SE a BSE**

Vizualizace partikulí závisí na volbě signálu, který budeme detekovat. Jak jsem již uváděla v kapitole Sekundární a odražené elektrony, detekcí SE se získá topografický kontrast a detekcí BSE materiálový kontrast – BSE se tedy tvoří ve větším množství v oblastech, kde se vyskytují těžší prvky. Světlé oblasti na obrazovce pak představují místa tvořená těžšími prvky a oblasti s lehkými prvky jsou místa tmavá [6], [17]. Kombinace obou signálů přináší informaci jak o topografii povrchu vzorku, tak o jeho materiálovém složení. Kvalitní zobrazení je však možné získat i za použití pouze jednoho signálu.

#### **5.1.1 Detekce sekundárních elektronů**

Sekundární elektrony se od zpětně odražených elektronů odlišují svojí nízkou energií a rychlostí. Aby byly schopné dostat se k detektoru sekundárních elektronů, je třeba je přitáhnout mřížkou s předpětím okolo 10 kV. Jas paprsku synchronně rastrujícího po obrazovce je přímo úměrný signálu z detektoru sekundárních elektronů. Vzhledem k nízké energii sekundárních elektronů se z vyvýšenin na povrchu preparátu dostane do detektoru více sekundárních elektronů a tím vznikne vyšší intenzita signálu z detektoru a tedy světlé místo na obrazovce, z prohlubenin je tomu naopak. Takto se

vytvoří topografický kontrast, který umožňuje zobrazit v mnohonásobném zvětšení povrch vzorku [6].

Partikule  $> 15$  nm mohou být snadno zobrazeny signálem sekundárních elektronů, ale k přesné lokalizaci menších částic zlata je nutné použít signál zpětně odražených elektronů [29].

### 5.1.2 Detekce zpětně odražených elektronů

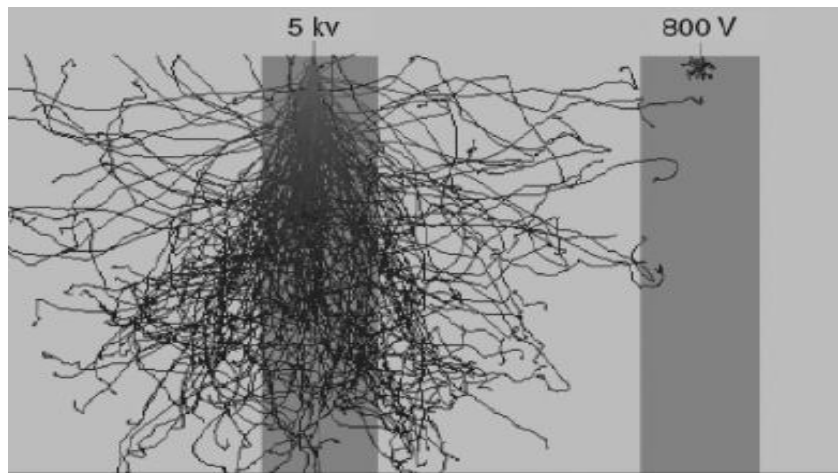
Zobrazení imunoznačených vzorků je možné především použitím YAG detektoru, který se vkládá do prostoru mezi vzorek a objektivovou čočkou. YAG detektor zpětně odražených elektronů upravený Autratou (1992) detekuje částice koloidního zlata při nízkém urychlovacím napětí, což minimalizuje poškození vzorku. Při napětí  $< 5$  kV detektor zobrazuje 5 – 10ti nm partikule, při detekci  $< 1$  nm částic je potřeba vyššího napětí 20 – 30 kV [30]. YAG detektor výborně zviditelňuje zlaté částice při urychlovacím napětí 1,8 kV až 5 kV, při nižším napětí než 1,8 kV neposkytuje dostatečný kontrast založený na rozdílných atomových číslech prvků [31].

### 5.1.3 Urychlovací napětí

Rozsah nastavení urychlovacího napětí je 1 kV až 50 kV. Při pozorování biologických materiálů se většinou používá urychlovací napětí do 10ti kV. Nižší urychlovací napětí zajišťuje při detekci SE lepší prokreslení povrchu [16]. Při vyšším urychlovacím napětí se zobrazí více detailů, ale vzorek je vystaven řadě artefaktů – nabíjení, hranový efekt<sup>4</sup>, radiační poškození, záleží však na vlastnostech preparátu. Při nedostatečném urychlovacím napětí – pod 1 kV nemají elektrony dostatečnou energii, aby vytvořily detekovatelný signál, což je znázorněné na obr. 14.

Urychlovací napětí ovlivňuje průměr stopy primárního elektronového paprsku dopadajícího na preparát. Většina moderních vysokorozlišovacích elektronových skenovacích mikroskopů má průměr elektronového svazku  $< 3$  nm při urychlovacím napětí nad 1,5 kV – s rostoucím napětím se průměr svazku zmenšuje a tím se zvyšuje rozlišení [17].

**Obrázek č. 14:** Vliv urychlovacího napětí na vzorek [9]

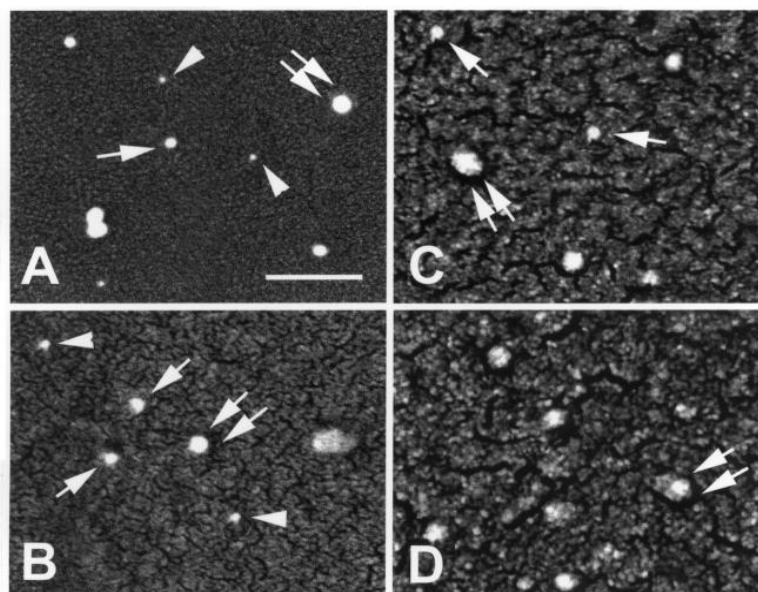


<sup>4</sup>Hranový efekt: Po dopadu primárního svazku na hranu se zvětšuje oblast, ze které se mohou uvolnit sekundární elektrony a v důsledku toho se zvyšuje signál z detektoru. Hrany se zobrazují jako přsvícené oblasti, ale neznamená to, že jsou vyvýšené [6].

#### 5.1.4 Pokovení

Pokovení minimalizuje nabíjení preparátu. Vrstva kovu odvádí negativní náboj, snižuje radiační poškození a zvyšuje produkci signálu. Nejčastěji se používá zlato, platina nebo slitina platiny a paládia. Výběr kovu se odvíjí od požadované granularity vrstvy kovu, obecně platí, že čím vyšší je bod tání napařovaného kovu, tím menší je granularita vrstvy. Optimální vrstva zlata je 5 – 7 nm, u pokovení paládiem 5 nm [6].

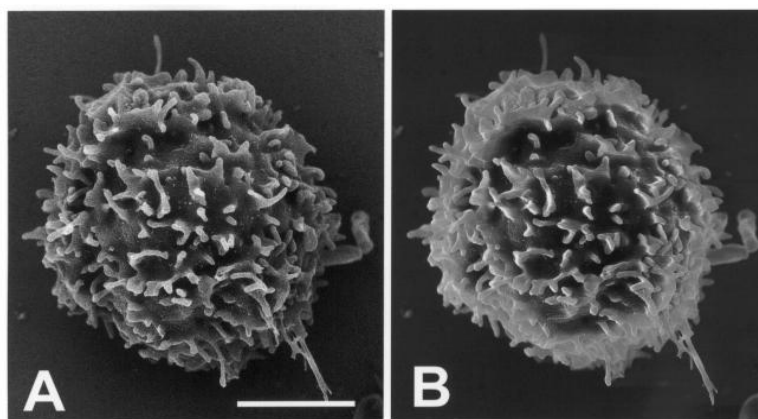
**Obrázek č. 15:** Vliv tloušťky pokovení (Pt) vzorku na imunogold značení; A) ~1 nm, B) ~2 nm, C) ~5 nm, D) ~10 nm; [30]



U imunoznačených vzorků se používá velmi slabá vrstva kovu (1 – 2 nm), nebo se povrch preparátu pokryje vrstvou uhlíku, což zamezí překrytí imunoznačení. Tenkou vrstvou pokovení jsou způsobené různé artefakty (vodivost se snižuje s tenkostí vrstvy pokovení) [32].

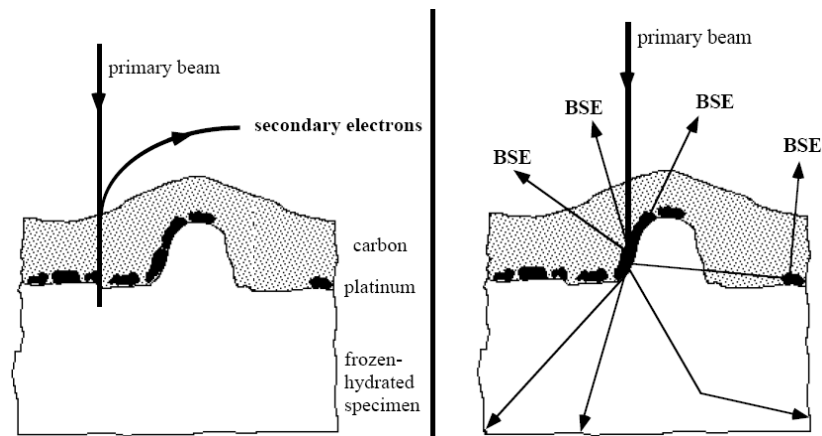
Když není pozorovaný preparát dostatečně vodivý, tak se primární svazek elektronů odkloní a zahltí detektor sekundárních elektronů. Vzorek se tedy nabíjí a důsledkem toho se na obrazu objevují bílé řádky až celková pulzace obrazu [30]. Zpětně odražené elektrony mají větší rozsah energie, ve které se detekují než sekundární elektrony a nabíjení vzorku způsobují minimálně, viz obr. 16 [27].

**Obrázek č. 16:** Lidské lymfocyty značené 12ti nm částicemi koloidního zlata, pokovené 1 – nm vrstvou platiny. Vlevo je zobrazení pomocí BSE, vpravo SE – vzorek se nabíjí [30].

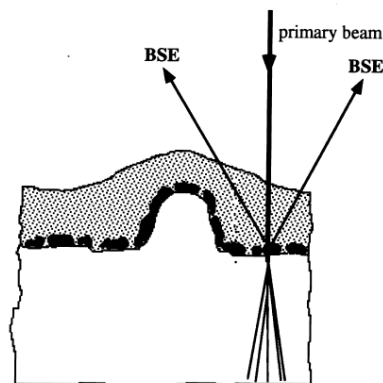


Zmražené vzorky jsou náchylnější na radiační poškození a nabíjení. Tento problém jde snížit použitím dvojího pokrytí vzorku 1 – 3 nm Pt se převrství 5ti – 10ti nm uhlíku. Signál SE se bude vytvářet ve vrstvě uhlíku a signál BSE ve vrstvě platiny, viz. obrázek 17. [32]. Na obrázku 17 vpravo se tvoří více BSE signálu, protože primární paprsek dopadal na preparát pod malým úhlem (vzorek byl nakloněný); kolmý dopad primárního svazku na vzorek a vytvoření menšího BSE signálu je znázorněn na obr. 18 [33]. Další postup, jak se sníží poškození vzorku radiací, aniž by zaniklo imunoznačení uvedl Walther roku 2008, kde byl preparát pokrytý 1,5 nm vrstvou wolframu [34].

**Obrázek č. 17:** Tvorba SE a BSE signálu na dvojité převrstveném vzorku [32]



**Obrázek č. 18:** Kolmý dopad primárního svazku na preparát [32]



### 5.1.5 Pracovní vzdálenost (WD)

Skenovací elektronové mikroskopy s autoemisní tryskou (FESEM) se dělí na tři typy, podle toho, do jaké oblasti se umístí vzorek. In – lens FESEM má vzorek umístěný mezi pólovými nástavci objektivové čočky, v below – the – lens FESEM je preparát pod pólovými nástavci a v semi – lens FESEM se také vzorek nachází pod pólovými nástavci, ale v kratší vzdálenosti než below – the – lens FESEM. In – lens FESEM umožňuje nejlepší rozlišení, ale je omezen náklony stolku a velikostí vzorku. Below – the – lens FESEM nedosáhne takového rozlišení, protože vzorek je příliš daleko od objektivové čočky, ale zajišťuje naklánění stolku podle potřeby. Semi – lens FESEM zajišťuje dostatečné rozlišení, protože se může vzorek přiblížit na krátkou pracovní vzdálenost k objektivové čočce, a také není omezen náklonem vzorku. Platí tedy, že čím kratší pracovní vzdálenost, tím vyšší rozlišení a menší hloubka ostrosti<sup>5</sup>. Malá hloubka ostrosti se doporučuje v případě málo členitých preparátů [6].

**Obrázek č. 19:** Umístění vzorku ve FESEM (in – lens je znázorněno vlevo, below – the – lens vpravo) [9]



<sup>5</sup>Hloubka ostrosti určuje rozdíl, o který se může změnit vzdálenost preparátu od zobrazovací čočky beze změny ostrosti [20].

## 6. Závěr

Dříve se ke studii buněčných ultrastruktur v rámci elektronové mikroskopie používal jen TEM a pomocí SEM se zobrazovali pouze povrchy biologických materiálů. Zavedením nových technik jakými jsou autoemisní tryska, kryo komora, detektory a módy pro udržení úzkého elektronového paprsku při nízkém urychlovacím napětí, které zajišťují vysoké rozlišení mikroskopu, uvedly skenovací elektronovou mikroskopii téměř na úroveň rutinní biologické transmisní elektronové mikroskopie.

Předností skenovacího mikroskopu je rychlejší a jednodušší příprava vzorků. Nevýhoda, která u SEM zůstává je, že zobrazuje pouze povrch vzorků, nikoliv jejich vnitřní struktury jako TEM. Řada metod (především kryo) přípravy vzorků už umožňuje odhalení vnitřních částí biologického preparátu a následné jeho pozorování v SEM.

Zde uvádím, dva důkazy, které potvrzují výborné výsledky skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou.

Kryo – FESEM je technika, která umožňuje 3D zobrazení buněčných ultrastruktur při velkém zvětšení. Vzorky připravené pro pozorování v kryo – stavu jsou upravené metodami (např. high – pressure freezing), které vzorek poškodí minimálně [35].

Müller a Hermann roku 1990 uvedli, že jedno – nanometrové zlaté partikule mohou lokalizovat povrch erytrocytů pomocí FESEM vybaveným vysoce citlivým anulárním YAG BSE detektorem [29].

## 7. Použité zdroje

- [1] [http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektronov%C3%BD\\_mikroskop](http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektronov%C3%BD_mikroskop)
- [2] <http://home.pf.jcu.cz/~bilyto00/bak/>
- [3] [http://en.wikipedia.org/wiki/Antibodies#Research\\_applications](http://en.wikipedia.org/wiki/Antibodies#Research_applications)
- [4] <http://www.fzu.cz/texty/brana/prozmikroskop/prozmikroskop.php>
- [5] <http://www.eng.tau.ac.il/~yossir/course/SEMlecture.pdf>
- [6] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.0.html>
- [7] <http://www.kpl.com/docs/techdocs/PURIFIGG.PDF>
- [8] [http://www.emlab.ubc.ca/imggallery/tem\\_hpf\\_glutL.jpg](http://www.emlab.ubc.ca/imggallery/tem_hpf_glutL.jpg)
- [9] <http://www.isibrno.cz/~bohunka/co08-11.pdf>
- [10] [http://www.gatan.com/sem/alto\\_2500\\_.php](http://www.gatan.com/sem/alto_2500_.php)
- [11] <http://www.gatan.com/knowhow14/cryo.htm>
- [12] <http://cellbio.utmb.edu/Cellbio/membran3.htm>
- [13] Eckertová L., Frank L., Metody analýzy povrchů, elektronová mikroskopie a difrakce, Academia Praha 1996
- [14] Harris J. R., Electron Microscopy in Biology (A practical Approach), Oxford University Press, New York 1991
- [15] Servisní manual: JSM-7401F Field Emission Scanning Electron Microscope. JEOL Ltd., Tokyo 2005
- [16] Koehler J. K., Advanced Techniques in Biological electron microscopy, Springer 1973
- [17] Schatten H., Pawley J. B., Biological Low – Voltage Scanning Electron Microscopy, Springer 2008
- [18] McMullan D., Scanning electron microscopy 1928 – 1965, University of Cambridge 1993
- [19] Hulínský V., Jurek K., Zkoumání látek elektronovým paprskem, Praha 1982
- [20] Kalina T., Pokorný V.: Základy elektronové mikroskopie pro biology, Univerzita Karlova, Praha 1981

- [21] Petr Wandrol, Ústav přístrojové techniky AV ČR: Rastrovací elektronový mikroskop v biologickém použití (prezentace); Podzimní škola základů elektronové mikroskopie, České Budějovice 2006
- [22] Jandoš F., Říman R., Gemperle A., Využití moderních laboratorních metod v metalografii, SNTL Praha, 1985. ([http://www.ateam.zcu.cz/Metal2006\\_Sosnova.pdf](http://www.ateam.zcu.cz/Metal2006_Sosnova.pdf))
- [23] ČERNOHORSKÝ T. , JANDERA P., Atomová spektroskopie. Univerzita Pardubice, Pardubice 1997. ([http://www.ateam.zcu.cz/Metal2006\\_Sosnova.pdf](http://www.ateam.zcu.cz/Metal2006_Sosnova.pdf))
- [24] Vilém Neděla, Ústav přístrojové techniky AV ČR: Detekce signálních elektronů v rastrovací elektronové mikroskopii a environmentální rastrovací elektronové mikroskopii (prezentace); Podzimní škola základů elektronové mikroskopie, Brno 2007
- [25] Hayat M. A., Principles and Techniques of Electron Microscopy Fourth Edition, Cambridge University Press 2000
- [26] Hořejší V., Bartůňková J., Základy imunologie, Praha Triton 1998
- [27] A Guide to Scanning Microscope Observation, příloha servisního manuálu mikroskopu JEOL
- [28] Stierhof Y., Schwarz H., 1989: Labeling properties of sucrose-infiltrated cryosections, Scanning Microscopy Supplement 3: 35 – 46
- [29] Hermann R., Schwarz H., Müller M, 1991: High precision immunoscanning electron microscopy using Fab fragments coupled to ultra-small colloidal gold, Journal of structural biology 107: 38 – 47
- [30] Erlandsen S., Macechko P. T., Frethem C., 1999: High resolution backscatter electron (BSE) imaging of immunogold with in – lens and below – the – lens field emission scanning electron microscopes, Scanning Microscopy, Vol. 13, No. 1: 43 – 54
- [31] Erlandsen S., Chen Y., Frethem C., Detry J., Wells C., 2003: High – resolution backscatter electron imaging of colloidal gold in LVSEM, Journal of Microscopy, Vol. 211: 212 – 218
- [32] Walther P., Müller M., 1997: Double layer coating for field emission cryo scanning electron microscopy – present state and applications, Scanning Vol. 19: 343 – 348
- [33] Walther P., Müller M., 1999: Biological ultrastructure as revealed by high resolution cryo – SEM of block faces after cryo – sectioning, Journal of Microscopy, Vol. 196: 279 – 287
- [34] Walther P., 2008: High – resolution cryo – SEM allows direct identification of F – actin at the inner nuclear membrane of *Xenopus* oocytes by virtue of its structural features, Journal of Microscopy, Vol. 232: 379 – 385



[35] Herp F., Coenen T, Geurts H. P. M., Janssen G. J. A., Martens G. J. M., 2005: A fast method to study the secretory activity of neuroendocrine cells at the ultrastructural level, *Journal of Microscopy*, Vol. 218: 79 – 83