

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Možnosti využití nízkonapěťového transmisního elektronového
mikroskopu LVEM 5 k identifikaci virů

Magisterská práce

Vypracovala: Bc. Hana Bielníková

Vedoucí práce: Ing. Jana Nebesářová, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Marie Vancová, PhD.

České Budějovice, prosinec 2008

Bielniková H., 2008: Možnosti využití nízkonapěťového transmisního elektronového mikroskopu LVEM 5 k identifikaci virů

[Potential uses of the low voltage transmission electron microscope LVEM 5 for the identification of viruses. Mgr. Thesis, in Czech]- 80p., Faculty of Biological Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this study was to define and examine the capabilities of LVEM 5 in the detection and identification of viruses, taking into consideration various contrasting agents, and a comparison to data from HV TEM.

Tato práce byla financována grantem ing. Jany Nebesářové, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/ 1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské 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 1.11. 2008

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí této práce Ing. Jana Nebesářové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost, kterou mi po celou dobu vypracování této práce věnovala. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře elektronové mikroskopie za trpělivost, pomoc a rady, zvláště pak technikům Jiřímu Vaněčkovi a Bc. Tomáši Bílému, za pomoc při řešení technických a softwerových otázek. Dále bych chtěla poděkovat Dr. Janě Fránové a Dr. Danielu Růžkovi za poskytnutí virových suspenzí pro mou práci. Také bych chtěla poděkovat Ing. Zdenko Gardiánovi, za odborné rady a technickou pomoc. V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině za psychickou a finanční podporu .

I. ÚVOD	7
1. Elektronová mikroskopie ve virologii.....	7
1.1. Elektronová mikroskopie v historii	7
1.2. Elektronová mikroskopie v lékařské diagnostice	8
2. ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE A DIAGNOSTIKA VIRŮ.....	9
2.1. Struktura virových částic	9
2.2 Elektronmikroskopická diagnostika virů v klinickém materiálu	11
2.3 Vyšetření klinických materiálů elektronovou mikroskopií	11
3. TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	13
3.1. Zobrazení virů v transmisní elektronové mikroskopii.....	14
3.2. Nízkonapěťový elektronový mikroskop	15
3.2.1. Zdroj nízkonapěťového elektronového mikroskopu.....	17
3.2.2. Elektron-optická soustava	17
3.2.3. Vady elektronových čoček	19
3.2.4. Projekční soustava	19
3.2.5. Vakuový systém	20
3.3. Záznam obrazu.....	20
3.4. Interakce elektronového svazku s preparátem a tvorba obrazu.....	20
4. METODY ZPRACOVÁNÍ VIRŮ PRO ZOBRAZENÍ V TRANSMISNÍM ELEKTRONOVÉM MIKROSKOPU.....	21
4.1. Metoda negativního barvení.....	22
4.2. Virová suspenze.....	23
4.3. Negativní barviva	24
4.4. Techniky negativního barvení.....	26
4.4.1. Kapací techniky	26
4.4.2. Sprejovací technika	27

4.4.3. Plovací techniky	27
4.5. Příklady specializovaných technik negativního barvení virů	28
4.5.1. Metody jednostranného obarvení	28
4.5.2 Mikrodialyzační metoda	28
4.5.3. Negativní barvení v kombinaci s mrazovým vysušením virové suspenze.....	29
4.5.4. Metoda negativního barvení virové suspenze potažené uhlíkem	29
4.6. Podložní blány používané v elektronové mikroskopii.....	30
4.7. Typy blan	31
4.8. Metody přípravy podložních blan	32
4.9. Doutnavý výboj	36
II. CÍLE PRÁCE	39
III. MATERIÁL A METODY	40
1. Virové suspenze	40
1.1. Virus klíšťové encefalitidy (Čeď: Flaviviridae, Rod: Flavivirus)	40
1.2. Virus tabákové mozaiky (Čeď: Tombusviridae, Rod: Tobamovirus)	40
1.3. Virus tabákové nekrosy (Čeď: Tombusviridae, Rod: Necrovirus).....	40
1.4. Vlákňitý bílý mozaikový virus jetele (Čeď: Flexiviridae, Rod: Potexvirus)	41
2. Negativní barviva	41
3. Izolace virů z rostlinného materiálu	42
3.1. Koncentrování virů centrifugací.....	42
4. Čištění elektronmikroskopických sítěk	42
5. Příprava uhlíkových podložních blan	42
5.1. Metoda přímého napařování.....	43
5.2. Metoda nepřímého napařování.....	46
6. Příprava vzorků	48

6.1. Příprava vzorků bez použití negativního barvení	48
6.2. Příprava vzorků metodou negativního barvení.....	49
6.2.1. Dvoustupňová sukcesivní kapací technika	49
6.2.2. Plovací technika	49
7. Aktivace povrchu uhlíkových blan metodou doutnavého výboje	49
8. Mikroskopy.....	50
IV. VÝSLEDKY	51
V. DISKUZE	55
VI. ZÁVĚRY.....	63
VII. PŘEHLED LITERATURY	64
VIII. PŘÍLOHA	70

I. Úvod

1. Elektronová mikroskopie ve virologii

Viry a bakterie jsou patogenními činiteli mnoha závažných onemocnění, které již v minulých stoletích se vědci snažili pozorovat a následně popsat. Před zkonstruováním prvního transmisního elektronového mikroskopu bylo možno pozorovat nepatrné objekty pouze světelným mikroskopem. Těmito objekty byly například buňky a bakterie. S pomocí světelného mikroskopu dosáhl velkého úspěchu v oboru bakteriologie v druhé polovině 19. století Robert Koch, který systematicky aplikoval mikroskopické techniky k hledání a identifikaci patogenů. Díky tomu úspěšně popsal řadu medicínsky důležitých činitelů, například *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Vibrio cholerae* (11,17,35,52). Světelný mikroskop byl však pro zobrazení virových částic limitován svou rozlišovací schopností, která se pohybuje okolo 0.2 μm . Brzy vznikla potřeba zkonstruovat nový typ mikroskopu, který by umožňoval sledovat objekty mnohem menší než jsou bakterie a buňky (11,17,27,52). Teprve rozvoj vědy a techniky v 1. polovině 20. století po dlouhých letech bádání a zkoušení přinesl kýžený nástroj pozorování v podobě prvního elektronového mikroskopu, který využíval k zobrazení objektů svazek elektronů. Tímto okamžikem mohl výzkum v oblasti virologie úspěšně odstartovat.

1.1. Elektronová mikroskopie v historii

První transmisní elektronový mikroskop byl zkonstruován na Vysoké škole technické v Berlíně kolektivem vedeným Knollem a Ruskou. Podstatnou výhodou elektronového mikroskopu byla jeho rozlišovací schopnost, která se pohybuje okolo 0.2 nm, u současných špičkových přístrojů kolem 0.12 až 0.17 nm. Díky této vlastnosti se elektronový mikroskop stal nenahraditelným při pozorování a popisu submikroskopických struktur (52).

První fotografie viru, kterou elektronový mikroskop vynesl na světlo světa, byla publikována v roce 1938 a byl na ní zobrazen poxvirus. O pár let později, při studiu viru tabákové mozaiky v roce 1941, byl objeven tzv. princip imunoelektronové mikroskopie (13,34,39,53). Počátek šedesátých let, se zavedením metody negativního kontrastu, umožnil využít elektronovou mikroskopii ke studiu struktury virů a následně i v diagnostice virových infekcí. Tato metoda poskytla virologům přesnější informace o velikosti a morfologii virových partikulí. Tyto poznatky byly později využity jako jedno

z kritérií pro klasifikaci virů (13,15,34,36,39,84). Svého vrcholu elektronová mikroskopie dosáhla mezi sedmdesátými a osmdesátými lety. S pozdějším nástupem nových a modernějších diagnostických metod využití elektronové mikroskopie v lékařské diagnostice začalo značně ustupovat do pozadí (11,17,39).

1.2. Elektronová mikroskopie v lékařské diagnostice

Elektronovou mikroskopii řadíme v lékařské diagnostice mezi rychlé metody, schopné poskytnout výsledek během několika hodin od získání klinického materiálu. Určení virů pomocí morfologické struktury, spolu s informacemi o klinickém průběhu onemocnění, často stačí ke stanovení prozatímní diagnózy nebo vyloučení mnohem závažnějšího infekčního onemocnění. Detekce se provádí buď přímo (přímá elektronová mikroskopie) nebo po inkubaci s antisérou (imunoelektronová mikroskopie).

Pro přímou diagnostiku je potřeba, aby byl virus v klinickém materiálu přítomen v dostatečně vysoké koncentraci (10^9 - 10^{12} v 1ml) a vykazoval zřetelnou morfologickou charakteristiku. V nižších koncentracích mohou být prokázány jen velké viry, naproti tomu u malých virů je nezbytná vyšší koncentrace, obzvláště v klinických nepurifikovaných materiálech. Při preparaci si můžeme pomoci zkoncentrováním virů, například gradientovou centrifugací nebo metodou ultracentrifugace. Jinou možností je kultivace virů ve vhodném buněčném systému. Průkaz virů pak můžeme provést v tekutině nad buněčnou kulturou nebo přímo v buňkách. Tento postupu lze využít v diferenciální diagnostice virů s podobným cytopatickým efektem a odlišnou morfologií. Výhodou přímé elektronmikroskopické diagnostiky je v neposlední řadě i možnost průkazu inaktivovaných virů. Tato metoda je navíc „neselektivní“ metodou, prokazující všechny viry v daném materiálu (2,10,60,79,80,84).

Metody imunoelektronové mikroskopie umožňují vizualizaci interakce antigenu s protilátkou na submikroskopické úrovni. Jde o dva typy metod s odlišným principem. První využívá určení přítomnosti a přesné lokalizace určitého antigenu pomocí protilátek označených elektrondenzním znakem. Tyto metody označujeme jako metody imunocytochemické. Jejich využití umožňuje zjistit lokalizaci virů v buňkách a tkáních. Oproti tomu druhá skupina metod je založena na principu tvorby agregátů virových partikulí v přítomnosti specifické protilátky. Zkombinování imunoelektronových metod s metodou negativního kontrastu dovoluje vyšetřovat povrchové struktury virových částic s vysokým rozlišením včetně vizualizace protilátek vázaných na tyto povrchy. Největší výhodou imunoelektronových metod je možnost diferenciací morfologicky identických nebo

podobných, antigeně však odlišných, virů. Navíc lze těmito metodami zachytit viry v koncentracích, které nestačí pro přímou elektronovou mikroskopii. Nespornou výhodou imunometod je mnohem vyšší specifita i citlivost elektronmikroskopických postupů ve virologii. Kontrastování spolu s metodami imunoelektronové mikroskopie pomohlo objevit nové, dosud neznámé, druhy virů (1,10,79,80,84).

2. Elektronová mikroskopie a diagnostika virů

2.1. Struktura virových částic

Virová částice je označována jako **virion**. Podstatnou složkou virionu je nukleová kyselina nesoucí genetickou informaci nezbytnou pro realizaci reprodukce viru. Nukleová kyselina se v přírodě vyskytuje ve dvou typech. Jedním je ribonukleová kyselina (RNA) a druhým deoxyribonukleová kyselina (DNA). Její struktura může být lineární nebo cirkulární. Genom je chráněn před okolním prostředím jedním nebo několika obaly a je vždy zastoupen jen jedním typem kyseliny. Virový genom na sebe váže různé proteiny, především proteiny kódované virovými geny. Často se jedná o několik druhů polypeptidů, které se k sobě vzájemně řadí podle fyzikálních a chemických afinit a autoagregací vytvářejí kolem genomu proteinový plášť- **kapsidu**. Virové kapsidy se často vyznačují symetrickým uspořádáním. Na základě těchto symetrií zařazujeme viry do tří morfologických skupin. U živočišných virů se většinou jedná o symetrii **helikoidální** nebo **kubickou (ikosaedrální)**. Některé viry se vyznačují i **komplexní**, atypickou strukturou (8,11,17,40,43,59,72,73,79).

Kapsidy s helikoidální symetrií tvoří jednotlivé polypeptidy (**protoméry**), které se řadí za sebou a sledují longitudinálně vlákno genomu. Tento typ kapsidy se vyskytuje u řady RNA virů (např. čeledi *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* a dalších).

U většiny DNA virů a některých RNA virů má kapsida symetrii kubickou. Je tvořena pravidelným dvacetistěnem se třemi osami symetrie, který vzniká autoagregací subjednotek, **kapsomér** dvojího druhu. Jedním druhem jsou **pentony**, které tvoří 12 vrcholů dvacetistěnu. Druhým druhem jsou **hexony**, které tvoří stěny dvacetistěnu. Pentony jsou tvořeny pěti, hexony šesti, do kruhu spojenými totožnými molekulami polypeptidů. Počet kapsomér, které utvářejí kapsidu, je pro viry každé čeledi stálý a charakteristický. Viry s kubickou symetrií často vytvářejí tzv. pseudokrystaly, vznikající pravidelným řazením k sobě v místě svého vzniku (8).

Virové proteiny bývají tvořeny v nadbytku, a proto často v průběhu replikace vznikají prázdné kapsidy (8,17). Kapsida obsahující genom viru je označována jako **nukleokapsida**. U řady virů představuje nukleokapsida kompletní virion. Takový virus označujeme jako neobalený (nahý). Neobalené viry jsou většinou rezistentní k éteru a tukovým rozpouštědlům a jsou relativně odolné k vlivům zevního prostředí. Obalené viry mají ještě kromě kapsidy další lipoproteinový obal. Ten je tvořený lipidovou dvojvrstvou hostitelského původu, kterou se kapsida obalí při prostupu skrze membrány hostitelské buňky. Na vnitřní straně lipidové dvojvrstvy některých obalených virů je protein který váže obal k nukleokapsidě. Označuje se jako membránový protein a je pro každý druh viru specifický. Na povrchu lipoproteinového obalu jsou výběžky, **peploméry**. Ty jsou tvořeny biologicky aktivními glykoproteiny, jenž se uplatňují především při adsorpci virionů na povrch hostitelských buněk. Mohou však plnit i zcela jiné funkce. Místo, kde vznikají novotvořené nukleokapsidy, je pro příslušníky každé čeledi virů charakteristické. Podle toho viry získávají obal buď pučením skrze jadernou membránu (čeleď *Herpesviridae*), pučením z cisteren endoplazmatického retikula (čeledi *Arenaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* a *Coronaviridae*), popřípadě pučením na cytoplazmatické membráně (čeledi *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* aj.). Obalené viry jsou snadno desintegrovány éterem a jinými tukovými rozpouštědly a jsou citlivější vůči fyzikálním a chemickým vlivům.

Některé viry mají atypickou strukturu virionu, která se vymyká uvedeným schématům. Příslušníci čeledi *Reoviridae* mají dvojitou kapsidu. *Arenaviry* mají nukleovou kyselinu uloženou v amorfnní proteinové matrix a dřeň virionů obsahuje různý počet granul (hostitelských ribozomů). Virus *hepatitidy B* má kapsidu kubické symetrie krytou lipoglykoproteinovou vrstvou, kterou tvoří rezistentní subjednotky HBs antigenu. Také viry čeledi *Poxviridae* a *Retroviridae* mají komplexní, atypické uspořádání částic (8).

Příslušníci určité čeledi nebo rodu mají obdobný morfologický vzhled, na jehož základě je můžeme identifikovat. Zařazení do specifického druhu však bývá obtížnější. Například virus planých neštovic, *Herpes varicella*, je identický s herpes virem, *Herpes simplex*, způsobujícím opary. Tato podobnost znesnadňuje jejich identifikaci. I přesto, že jsou viry podle morfologie kapsid děleny do tří symetrických skupin, vyznačují se širokým rozmezím velikostí a tvarů. Odlišné tvary a velikosti virů se vyskytují v každé symetrické skupině (11,17).

Nejmenším lidským virem je *parvovirus* s 18-26 nm v průměru. Oproti němu je *poxvirus* se svou velikostí 250 nm největším lidským virem. Jsou známy také vláknité viry, jako je *Marburg* nebo *Ebola*, které způsobují hemoragické horečky s vysokým procentem úmrtnosti.

Tyto viry mají průměr kolem 80 nm, ale v délce částic jsou značně variabilní, s přesahem až 20 μ m. *Paramyxoviry*, viry vyvolávající spalničky, příušnice a jiná respirační onemocnění, jsou svým tvarem pleomorfní. Jsou však charakteristické svou nukleokapsidou helikální symetrie se specifickým průměrem a strukturou. Nukleokapsida je dlouhá, tenká, s průměrem 18-22 nm a je jejich důležitým diagnostickým znakem. V elektronovém mikroskopu se jeví jako „klasnatý steh“ nebo „smrková větvíčka“ (v angličtině popisováno výrazem- **herringbone**). V určitých případech jsou viry v rámci jedné skupiny morfologicky shodné, například u *adenovirů*, které se vyznačují kubickou symetrií, stejným tvarem a velikostí (17).

2.2 Elektronmikroskopická diagnostika virů v klinickém materiálu

V diagnostice virů může být použit klinický materiál nejrůznějšího původu. Některý můžeme použít pro elektronovou mikroskopii přímo, bez další preparace. Tímto materiálem může být například vezikulární tekutina, kožní léze, nosohltanový sekret, sliny, slzy, tekutina z bioptického materiálu nebo tkáňových kultur. Tělesné tekutiny však obvykle obsahují množství solí, tudíž je vhodné při zpracování těchto materiálů použít metodu agarové difúzní filtrační techniky.

Dalším klinickým materiálem využívaným v elektronové mikroskopii bývá moč, krevní sérum, mozkomíšní mok, stolice, bradavice, bioptický a autoptický materiál, tkáňové kultury a chorioalantois. Pro úspěšné vyšetření těchto materiálů je důležitý jejich správný odběr a zpracování. Neadekvátní zacházení a zpracování těchto vzorků může značně zdržet či zamezit identifikaci kauzálního činitele (11,17,29,39,79).

2.3 Vyšetření klinických materiálů elektronovou mikroskopií

Elektronová mikroskopie má nemalé zásluhy v rychlé diagnostice pravých neštovic (virus *varioly*). Pravé neštovice jsou vážným infekčním onemocněním s vysokým procentem morbidity a mortality. V osmdesátých letech minulého století se díky intenzivnímu celosvětovému vakcinačnímu programu podařilo virus varioly eradikovat. I přes tento úspěch by se však nemělo zapomínat na možné znovuobjevení viru. Úspěšná byla také diferenciální diagnostika varioly proti viru *varicella-zoster* (VZV), který je infekčním činitelem planých neštovic. Tato dvě onemocnění si jsou svými klinickými příznaky velmi podobná, zvláště tvorbou kožních lézí. Plané neštovice však nemají tak fatální následky jako

variola. Přímá diagnostika tekutiny nebo oškrabků z lézí, které obsahují velké množství virových partikulí, umožňuje rychlou identifikaci viru (11,17, 66,75,79,86).

Vyšetření kožních lézí elektronovou mikroskopií se dále využívá v diferenciální diagnostice *poxvirů* a *parapoxvirů* oproti *herpetickým* virům, kdy je lze v negativně barvených preparátech od sebe odlišit.

Dalšími viry, které lze z kožních lézí či jejich tekutiny diagnostikovat, je lidský *papillomavirus* způsobující kožní bradavice, *Orf* virus vyvolávající neštovičné léze u koz a ovcí, přenosných i na člověka, a virus *molluscum contagiosum*, který dává vznik benigním tumorkům na kůži a sliznicích člověka (8,11,17,79).

V nosohltanových sekretech prokazujeme *paramyxoviry*, *respirační synciciální virus* (RSV) a řadu dalších virů vyvolávajících respirační onemocnění. Pro zajímavost, v roce 1995 byl pomocí elektronové mikroskopie v Austrálii objeven nový *morbillivirus*, nazvaný *Handra* virus. Virus, způsobující těžké respirační onemocnění u koní i u lidí. O čtyři roky později byl v Malajsií objeven příbuzný *Nipah* virus. V roce 2003 byl při vyšetřování klinických vzorků pacientů s těžkým akutním respiračním syndromem (SARS) identifikován činitel vyvolávající tento syndrom - nově objevený *SARS coronavirus* (8,11,17,24,32,47,54,64,85).

Na tkáňových kulturách lze provádět diferenciální diagnostiku *myxovirů*, *paramyxovirů* a jiných pro kultivaci vhodných virů (11,17,60,77).

V moči můžeme prokázat *cytomegalovirus* a *BK* virus, který se nachází hlavně u pacientů po transplantacích. *BK* virus patří spolu s *JC* virem do rodu lidských *polyomavirů* (8,11,12,17,28,77). *JC* virus byl prvně objeven na ultratenkých řezech mozku pacienta s progresivní multifokální leukoencefalopatií.

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 průšnic nebo viry herpetických encefalitid (5,7,12,25,52).

V krevní séru se viry detekují málokdy, výjimkou je jen virus *hepatitidy B* a *parvovirus B19*. Malý, krví přenosný virus *hepatitidy B* (HBV) je vyvolavatelem sérové hepatitidy. Hepatitida má výrazný tropismus k jaterním buňkám. Její tendence perzistovat v organismu navozuje vznik chronické hepatitidy, nemocí z imunokomplexů nebo cirhozy jater, která později může progradovat v hepatocelulární karcinom. Kompletní virion tvoří tzv. Daneova částice o průměru 42nm. Proteinovou kapsidu kubické symetrie obklopuje obal o průměru 22nm tvořený glykoproteiny, proteiny a lipidy. Virus se může v séru objevovat ve třech morfologických formách. První z nich je již zmiňovaná Daneova částice, která je také

jedinou infekční formou viru. Druhou formou jsou sférické partikule o přibližné velikosti 20 nm. Třetí formou jsou tubulární částice o průměru 20nm, dosahující délky až 100nm. Tyto dvě formy jsou tvořeny nadbytečnými virovými proteiny. Pro imunoelektronovu diagnostiku jsou důležité také tři virové antigeny. Prvním je HBs antigen vnějšího obalu částice, druhým je HBc antigen, který je kapsidovým proteinem. Třetí je HBe antigen, solubilní glykoprotein, který je produkován při množení viru (6,8,11,16,17,18,25,39,76,79,).

„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*. Přímá elektronová mikroskopie extraktu stolice umožňuje zviditelnění všech morfologických variant *rotavirů*. Použitím imunoelektronové mikroskopie lze takto diagnostikovat viry skupiny *Norwalk*, původce virových gastroenteritid, *noroviry* a viry *hepatitidy A* a *E* (5,8,11,17,26,38,49,50,55,57,58,61,74,79,85).

Na tkáňových řezech můžeme vyšetřovat *retroviry*, které jsou jinak v negativním barvivu špatně viditelné (17).

Elektronová mikroskopie se také využívá při vyšetřování exotických virových infekcí. Prokazovat můžeme například *Lassa virus* z rodu *arenavirus*, *filoviry Marburg* a *Ebola*, *Hantavirus* z rodu *bunyavirus*, *flavivirus Dengue* a mnoha dalších (8,17,39).

3. Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronový mikroskop slouží k pozorování a zvětšování velmi malých předmětů, které již nejsou zobrazitelné optickým mikroskopem. Mikroskop může maximálně rozlišit 2 body ležící od sebe ve vzdálenosti poloviny vlnové délky zdroje osvětlení. Abychom dosáhli požadovaného rozlišení v mikrosvětě, na který už světelný mikroskop nestačí, musíme použít záření s mnohem kratší vlnovou délkou než má viditelné světlo. Proto se použití lineárního svazku elektronů urychlených vysokým napětím jeví jako nejlepší řešení (48, 87).

Konstrukce elektronového mikroskopu je v principu stejná jako stavba mikroskopu světelného. Základním rozdílem však je, že k zobrazení preparátu používáme proud urychlených elektronů a k úpravě chodu elektronového svazku se používají elektromagnetické čočky, které jsou vlastně vhodně tvarovaným magnetickým polem. Kromě tubusu s elektronovou optikou je další nezbytnou součástí mikroskopu vakuový systém, přídatná elektronika (pro napájení čoček, zdroj vysokého napětí) a software.

3.1. Zobrazení virů v transmisií elektronové mikroskopii

Jedním z problémů elektronové mikroskopie v biologii je velmi nízký kontrast vzorků. Kontrast obrazu je dán rozptylem primárních elektronů na atomech preparátu a klesá se zvyšujícím se urychlovacím napětím. Biologické vzorky tvořené prvky s nízkým atomovým číslem jako je C, O, N, H, P, nedostatečně rozptylují elektrony na atomech vzorku a proto jsou málo kontrastní. Z tohoto důvodu se u těchto objektů přistupuje ke kontrastování, kdy preparát zalijeme roztokem elektrondenzního barviva. Toto barvivo obsahuje atomy těžkých kovů jako je U, Os, W, Pb, Mo, na kterých dochází k lepšímu rozptylu primárních elektronů. Metoda kontrastování má však nevýhodu v tom, že pozorovaný objekt se vzdaluje své původní struktuře a je také velkým zdrojem artefaktů. Vlivem používaných negativních barviv může také docházet k poškození sledovaných objektů (68,79,83).

Řešením, jak kontrast zvýšit bez přidání kontrastujících barviv, je snížení energie elektronů, čímž se nám zvýší počet interakcí mezi elektrony a zkoumaným vzorkem. Po dlouhá léta se uskutečňovaly pokusy, kdy se pozorovaly biologické řezy při urychlovacích napětích od 5 do 15 kV. Tyto pokusy však skončily neúspěchem v důsledku řady technických problémů. Jedním z těchto problémů, který znehodnocoval kvalitu optiky, bylo nabíjení různých částí mikroskopu v důsledku nedostatečného vakua. Nízký jas elektronového zdroje byl příčinou nedostatečné intenzity obrazu. Běžně používaná detekční zařízení byla neúčinná a problémem také byla vysoká citlivost mikroskopu k vnějšímu magnetickému a elektrickému poli. Až v devadesátých letech minulého století se povedlo panu profesoru DeLongovi, po překonání těchto technických problémů, zkonstruovat nízkonapěťový elektronový mikroskop pracující při urychlovacím napětí 5kV. Kromě snahy snížit energii urychlených elektronů byla také požadována miniaturizace mikroskopu, cenová a uživatelská dostupnost a možnost instalovat přístroj do jakékoli místnosti (68,83).

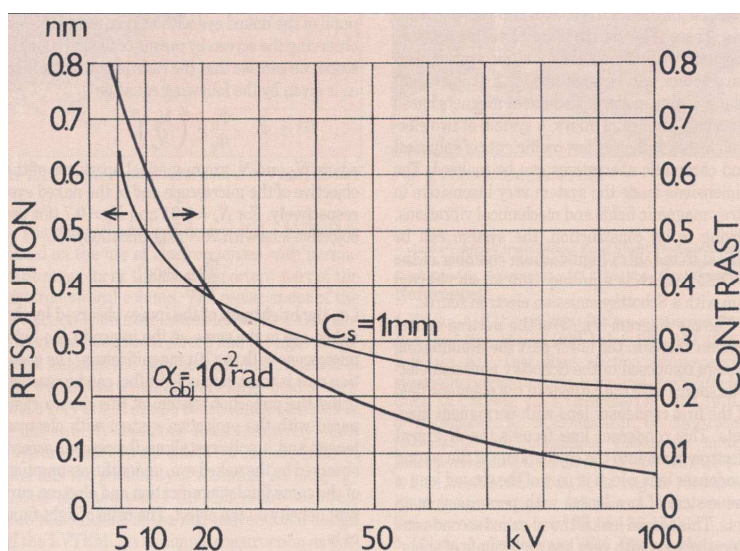
3.2. Nízkonapěťový elektronový mikroskop

Nízkonapěťový elektronový mikroskop je nový typ elektronového mikroskopu vhodný pro studium biologických objektů a polymerních materiálů (Obr.1.). Při použití nízkého urychlovacího napětí o hodnotě 5kV postačí k rozptylu primárních elektronů i atomy lehkých prvků (Obr.2.). Zvýšení kontrastu obrazu přirozenou cestou, bez přídavku kontrastujících činidel, nám umožní přiblížit se skutečnému vzhledu pozorovaných objektů a zároveň dochází k omezení výskytu artefaktů.

Zkrácením střední volné dráhy urychlených primárních elektronů byla umožněna miniaturizace tubusu elektronového mikroskopu tak, že bylo možné umístit jej pod optický mikroskop. Zmenšením všech součástí mikroskopu se dosáhlo toho, že vzhledově se celý elektronový mikroskop podobá spíše mikroskopu světelnému (20,68,83).



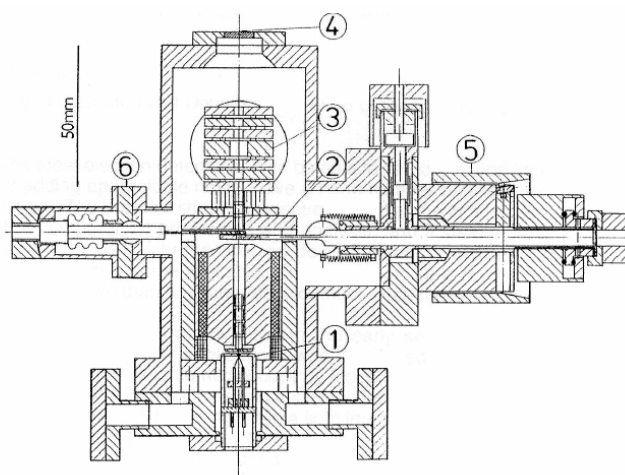
Obr.1. Nový a starší prototyp nízkonapěťového elektronového mikroskopu LVTEM5.



Obr.2. Graf závislosti rozlišení a kontrastu na urychlovacím napětí u 20 nm uhlíkových blan (Delong A., Hladil K., Kolařík V., Eur. Micr. And Anal. 1994).

Mikroskop se skládá ze dvou základních částí. První částí je miniaturizovaný elektronový mikroskop obsahující elektron-optickou soustavu, zakončený luminiscenčním stínítkem. Druhou částí je klasický světelný mikroskop sloužící ke zvětšení a pozorování obrazu na luminiscenčním stínítku. Rozlišovací schopnost mikroskopu se pohybuje v rozmezí od 2 do 2,5 nm, což je pro studium biologických vzorků dostačující. Maximální zvětšení, kterého tento mikroskop může dosáhnout je přibližně 200 000x. Výsledné zvětšení je fakticky součinem zvětšení obou mikroskopů, kdy miniaturizovaný elektronový mikroskop dosahuje maximálního zvětšení 500x a světelný mikroskop 400x (19,20,68,83).

Nově vyvinuté elektronové čočky tvořené permanentními magnety umožňují přibližně desetinásobné zmenšení optiky, díky čemuž byla uskutečnitelná miniaturizace elektronového tubusu (Obr.3.). Ve velmi malých rozměrech se dají konstruovat také elektrostatické čočky, které spolehlivě fungují při nízkých energiích v kvalitním vakuu.



Obr.3. Schématický náčrt elektron-optické části LVTEM : 1- elektronové dělo, 2- objektivové čočky, 3- projekční elektrostatické čočky, 4- luminiscenční stínítko, 5- umístění vzorku, 6- zařízení objektivové apertury (DeLong A., Hladil K., Kolařík V., Eur. Micr. And Anal. 1994).

Další unikátností tohoto mikroskopu je, že může pracovat v rastrovacím režimu STEM pro objekty pro elektrony prostupné a v režimu SEM pro objekty pro elektrony nepropustné. Jednou z limitujících skutečností je, že snížením energie urychlených elektronů dochází ke zmenšení hloubky prostupnosti elektronů materiálem, a proto je nutné používat preparáty tloušťky 20 až 30 nm. Porovnáme-li LVTEM se standardními přístroji, kde se používají

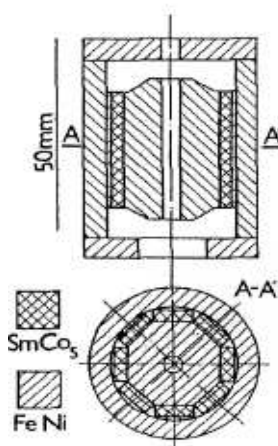
elektrony s energií 100 kV a preparáty s tloušťkou okolo 80 nm, dosahujeme asi dvacetinásobného kontrastu (83).

3.2.1. Zdroj nízkonapětového elektronového mikroskopu

Zdrojem elektronů je autoemisní Schottkyho katoda, umístěná ve spodní části tubusu miniaturizovaného elektronového mikroskopu. Katoda slouží k emisi elektronů a v prostoru nazývaném křížiště vytváří technický zdroj elektronů. Polohu křížiště lze měnit centrováním katody. Schottkyho katoda je výkonnou katodou s vysokým jasem, poskytující vysoce koherentní zdroj elektronů. Další nespornou výhodou této katody je její neomezená životnost. Za katodou je dále řazena extrakční elektroda se stabilizovaným napětím a uzemněná anoda. Obě zajišťují nezávislost proudu elektronů na urychlovacím napětí tím, že urychlují elektrony v prostoru mezi sebou (19,20,83).

3.2.2. Elektron-optická soustava

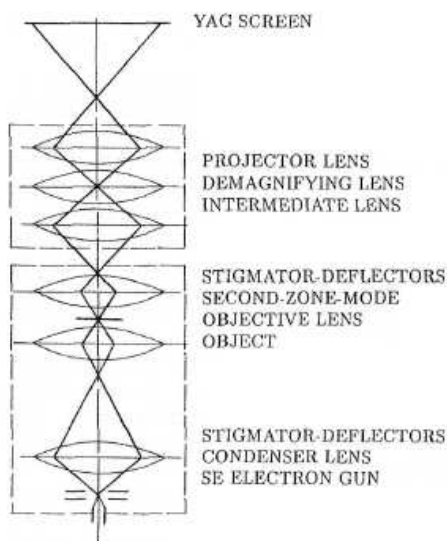
Kromě zdroje elektronů zde patří kondenzorové a objektivové elektronové čočky buzené polem permanentních magnetů. Tyto čočky nevyžadují chlazení vodou ani proudové zdroje oproti klasickému vysokonapětovému elektronovému mikroskopu. Nevýhodou je, že magnetická pole čoček jsou konstantní a pro zaostření obrazu se musí měnit výška vzorku v objektivu. Konstrukce elektronové čočky tvořené permanentními magnety je odlišná oproti konstrukci elektronové čočky s budící cívkou. Elektronová čočka tvořená permanentními magnety nemůže být realizována jako jednotlivá čočka bez nežádoucího rozptylu magnetického pole. Řešením je vytvoření magnetického obvodu se dvěma mezerami, tj. dvěma čočkami (Obr.4).



Obr.4. Schématický náčrt objektivové a kondenzorové čočky sekundární zóny tvořené permanentními magnety (Delong A., Hladil K., Kolařík V., Eur. Micr. And Anal. 1994).

Kondenzorové a objektivové čočky spolu se soustavou běžných permanentních magnetů jsou složeny z osmi malých SmCo_5 magnetů o rozměrech 30 x 9 x 3 mm, tato sestava tvoří integrální část mikroskopu. Použitím permanentních magnetů ze slitiny kobaltu a samaria vznikla soustava elektronových čoček s velmi nízkým koeficientem sférické a chromatické vady. Díky miniaturizovaným rozměrům (délka 150 mm), je elektron-optický systém odolný k rozptýlenému magnetickému poli a mechanickým vibracím (19,20,68,83).

Paprskový diagram (Obr.5.) elektron-optického sloupce znázorňuje uspořádání světelné soustavy mikroskopu. Schottkyho katoda zasahuje do magnetického pole první kondenzorové čočky. Tato kondenzorová čočka zaostřuje rozběhavý elektronový paprsek do roviny preparátu druhé kondenzorové čočky. Druhá kondenzorová čočka je součástí takzvané objektivové čočky sekundární zóny (the second-zone objective lens). Tato objektivová čočka je důležitá při zobrazování v SEM módu, kdy sekundární elektrony jsou odsávány magnetickým polem ze sekundární zóny objektivové čočky a transmittované elektrony dopadají na stínítko, na kterém se vytvoří viditelný obraz a dále je zvětšen optickým mikroskopem. Obě elektronové čočky jsou vybaveny dvěma elektrostatickými oktupóly, které jsou užívány jako stigmátory a deflektory.



Obr.5. Paprskový diagram elektron-optické části nízkonapětového elektronového mikroskopu LVTEM5 (DeLong A., Hladil K., Kolařík V., Eur. Micr. And Anal. 1994).

3.2.3. Vady elektronových čoček

Elektronové čočky tvořené permanentními magnety mají obdobné vady jako elektromagnetické čočky vysokonapěťového elektronového mikroskopu. Důvodem je, že uvnitř reálné čočky není magnetické pole zcela homogenní. Tyto vady negativně ovlivňují obraz vytvořený čočkou, hlavně jeho kontrast, rozlišovací schopnost a hloubku ostrosti (48,87).

Sférická vada- čočka není schopna zaostřovat všechny paprsky vycházející z bodového zdroje opět do jednoho bodu. Elektrony procházející vnější částí čočky jsou zaostřeny do bodu, který je blíže k čočce, než elektrony procházející čočkou v těsné blízkosti optické osy. Důsledkem je, že zvětšení ve středu čočky je jiné než na okrajích. Rozsah sférické vady je závislý na ohniskové vzdálenosti čočky, a je tím větší, čím větší ohnisková vzdálenost je. Tato vada se omezuje zařazením clony, která odstraňuje okrajové paprsky.

Chromatická vada- je způsobená rozdílnými vlnovými délkami elektronů v paprsku. Pomalejší elektrony s větší vlnovou délkou jsou v magnetickém poli cívky vychylovány jinak a protínají osu cívky v jiném bodě, než elektrony s vyšší rychlostí. Vliv chromatické vady lze snížit stabilizací urychlovacího napětí, které nám poskytne koherentnější elektronový svazek a použitím tenkých preparátů.

Osový astigmatismus- vzniká v důsledku nesymetrie magnetického pole. Elektrony, které procházejí čočkou v různých rovinách pak mají různé ohnisko. Častým zdrojem astigmatismu jsou různé nečistoty na vnitřních plochách mikroskopu. Tato vada se koriguje magnetickým polem stigmátoru.

3.2.4. Projekční soustava

Elektronový obraz vytvořený soustavou objektivových čoček je dále zvětšen projekční soustavou, kterou tvoří tři elektrostatické čočky (projektorové čočky a mezičočky).

Tento obraz je posléze převeden na světelný obraz pomocí luminiscenčního stínítka, které má 4 až 10 mm v průměru. Toto stínítka je vyrobeno z vysoce účinného materiálu tvořeného monokrystalem YAG (yttrium-hlinitý granát) a v porovnání s práškovými luminofory prakticky nemá žádnou mikrostrukturu. Také se vyznačuje vysokou odolností k radiačnímu poškození. Ke konečnému zvětšení obrazu slouží optický mikroskop, který je spojen se výkonnou CCD kamerou. Dalšími prvky soustavy jsou držák preparátu a mezičočky (19,20,68,83).

3.2.5. Vakuový systém

Miniaturizovaný tubus elektronového mikroskopu a malé rozměry preparátové komory umožňují vyčerpát mikroskop k velmi vysokým hodnotám vakua. Hodnota pracovního vakua mikroskopu se pohybuje kolem 10^{-7} Pa. Díky tomu byly odstraněny problémy spojené s kontaminací a elektrickým nabíjením vnitřní části mikroskopu. Usnadněné a rychlé je také vyčerpání preparátové komory při výměně preparátů. Vysoká hodnota vakua je také nutná pro správnou funkci Schottkyho emisního elektronového zdroje. Vakuový systém zahrnují dvě malé iontové pumpy a turbomolekulární vývěva (19,20).

3.3. Záznam obrazu

Konečným výstupem z transmisního elektronového mikroskopu je záznam obrazu pozorovaného předmětu. Snímek můžeme zaznamenat digitálně pomocí slow-scan CCD kamer.

Digitální záznam nám umožňuje sledovat získaný obraz v digitální podobě přímo na obrazovce monitoru počítače a také si jej uložit do paměti. Detektor kamery, který se vkládá do dráhy elektronového svazku, zaznamenává množství primárních elektronů a jejich energii v závislosti na místě dopadu. Obraz by měl být detektorem zaznamenán během několika vteřin a měl by být ihned k dispozici v počítači k dalšímu zpracování a analýze. Dalšími požadavky na detektor je, aby při detekci elektronového obrazu nedocházelo k degradaci jeho rozlišení a přidání šumu, měl by mít velký počet pixelů, široký dynamický rozsah a výbornou linearitu.

3.4. Interakce elektronového svazku s preparátem a tvorba obrazu

Interakce mezi elektrony ze zdroje a hmotou zobrazovaného předmětu jsou vlastním zdrojem obrazu v elektronovém mikroskopu. Při dopadu urychlených elektronů na preparát nám vznikají dva druhy interakcí:

Pružný(elastický) rozptyl - urychlený elektron je při průletu elektronovým obalem atomu preparátu vychýlen pod úhlem, který je tím větší, čím blíže tento elektron mívá jádro a čím větší je náboj jádra. Tento úhel může přesáhnout i 90° a elektron je pak zpětně odražen. Při tomto ději se energie primárních elektronů nemění. Část elektronů vychýlených preparátem o

příliš velký úhel je zachycena objektivovou clonou a tím vyřazena z tvorby obrazu preparátu na stínítku. Vyřazení části elektronů způsobí, že se mění intenzita elektronového svazku a vzniká kontrast obrazu a označuje se jako amplitudový kontrast. V důsledku rozdílu drah elektronů odchýlených pod různým úhlem nám vzniká také fázový kontrast, který se rovněž podílí na tvorbě obrazu a různých stupňů šedi. V případě nízkonapětového elektronového mikroskopu převládá při interakci urychlených elektronů s povrchem preparátu, elastický rozptyl (48,82,87).

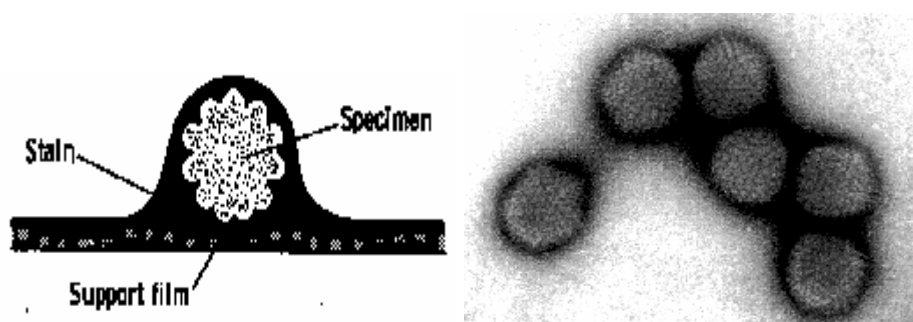
Nepružný rozptyl - dochází k němu při srážkách primárních elektronů s elektrony atomů preparátu. Při této interakci dochází ke srážce dvou částic stejné hmotnosti a primární elektrony při ní ztrácejí část své energie. K odchýlení elektronů od původního směru nedochází a tudíž se všechny elektrony podílejí na tvorbě obrazu na stínítku. Protože dochází ke změně energie a rychlosti těchto elektronů mění se i jejich vlnové délky. V důsledku toho jsou tyto elektrony jedním ze zdrojů vad zobrazení. S tloušťkou preparátu a s klesajícím urchlovacím napětím jejich nepříznivý vliv roste.

4. Metody zpracování virů pro zobrazení v transmisním elektronovém mikroskopu

Dvě stěžejní techniky přípravy preparátů, nezbytné pro virologii, jsou negativní barvení a příprava ultratenkých řezů. Metoda přípravy ultratenkých řezů umožňuje studium interakce virů s buňkami či sledování replikace virů ve tkáni na ultrastrukturální úrovni. Izolované virové částice patří v elektronové mikroskopii mezi takzvané totální preparáty. Jsou to vzorky, jejichž velikost je hluboko pod tloušťkou ultratenkých řezů. Dále sem patří bakterie, izolované buněčné orgány (mitochondrie, chloroplasty) a různé biologické makromolekuly (proteiny, lipoproteiny, polysacharidy, nukleoproteinové komplexy). Pro transmisní elektronovou mikroskopii se tyto vzorky zpracovávají metodou negativního barvení (79).

4.1. Metoda negativního barvení

Principem metody je, že se studovaný virus „zalije“ do amorfního elektrondenzního barviva, kterým jsou většinou roztoky solí těžkých kovů. Negativní barvivo virus obklopí a vytvoří tmavé pozadí, v němž se jednotlivé virové částice, v důsledku nižší schopnosti rozptylovat elektrony, jeví jako světlé. Barvivo zároveň pronikne do povrchových nerovností virové částice a umožní tak vizualizaci substrukturálních detailů až do velikosti 2 nm (Obr.6.).



Obr.6. Schématické zobrazení virové částice kompletně obklopené negativním barvivem (Hayat and Miller, 1990, str.2). Na vedlejší fotce jsou zobrazeny virové částice adenoviru kontrastované 1% kyselinou fosfowolframovou (převzato z www.hei.org).

Metoda negativního barvení tak řeší problém nízkého kontrastu virů při jejich elektronmikroskopickém pozorování. Její velkou předností je rychlost a relativní jednoduchost. Negativní barvení, však zcela nenáročnou a interpretačně bezproblémovou metodou není. Barvení neobalených virů, u nichž barvivo poměrně málo reaguje s povrchovými strukturami, skýtá méně technických problémů než u virů obalených. Lipoproteinové membrány obalených virů často interagují s barvivem, což je zdrojem artefaktů a interpretačních obtíží (79). Dalším nepříznivým účinkem negativních barviv na obalené viry je, že jsou často poškozovány, stejně tak jako mohou být tyto viry poškozeny při vysoušení, k němuž v průběhu negativního barvení dochází.

Pro optimální zobrazení virových částic je žádoucí správná proporce koncentrací viru a negativního barviva, minimální interakce mezi barvivem a virovou částicí a dokonalá disperze viru i barviva na elektronmikroskopické síťce (79). Stále však neexistují spolehlivé metody, které by zaručovaly splnění všech uvedených podmínek, proto je výsledek negativního barvení preparátu vždy závislý na zkušenostech experimentátora a jisté míře náhody.

4.2. Virová suspenze

Důležitým předpokladem kvalitního výsledku negativního barvení je koncentrace virů v suspenzi. Pro práci je nejvýhodnější použít vysoce purifikovanou a koncentrovanou suspenzi. Máme-li suspenzi s koncentrací virů nižší než 10^6 částic v 1 ml, zobrazení virů je potom obtížné. Optimální koncentrace virových částic v 1 ml suspenze je 10^9 až 10^{12} (79). Podle některých autorů je pro diagnostiku virů přímou elektronovou mikroskopií dostačující již koncentrace virů 10^7 až 10^9 v 1 ml. Důležité také je, aby virus vykazoval zřetelnou morfologickou charakteristiku (17,21,46,79). Důležitou prerekvizitou kvalitního negativního barvení je dosažení optimálního poměru mezi koncentrací viru a koncentrací negativního barviva. Přebytek barviva dává vznik velkým elektrondenzním oblastem, v nichž se jednotlivé viriony ztrácejí. Naopak nadbytek virových částic vede k nerovnoměrnému obarvení, kdy dochází k vytvoření rozsáhlých nezbarvených oblastí s kolapsem a částečnou destrukcí virových částic. Vhodnou koncentraci virů je nejvhodnější zjistit empiricky. Existují dva způsoby jak toto zjištění provést. V prvním případě smícháme malé množství virové suspenze se stejným množstvím negativního barviva a současně připravíme několik dalších vzorků, v nichž je barviva více nebo méně. Podle výsledku negativního barvení následně zvolíme pro daný materiál optimální koncentraci. Při druhém způsobu nakapeme na elektronmikroskopickou síťku, co nejkonzentrovanejší virovou suspenzi. Necháme ji zcela zaschnout a potom ji negativně obarvíme. Po prohlédnutí vzorku zjistíme, zda použitá koncentrace je vhodná, nebo je třeba ji změnit. Tímto způsobem současně ověříme i stupeň purifikace vzorku. Zjistíme-li, že preparát není dostatečně purifikovaný, můžeme ho nečistot zbavit přímo na síťkách a to opakovaným promýváním destilovanou vodou nebo pufry (např. 0,1 mol/l octan nebo uhličitan amonný)(79). Promytí virové suspenze, před aplikací na síťky nebo po adsorpci virů, je jedním z kroků preparačních postupů. Musíme však počítat s tím, že každým promytím se snižuje koncentrace virové suspenze na síťce. Ve starších publikacích je doporučováno u mimořádně znečištěných suspenzí jejich promytí v 0,1 mol/l HCl nebo 0,1 mol/l NaOH, případně proteolytickými enzymy (63, 79). Přistoupíme-li k některému z těchto postupů dosáhneme odstranění nečistot ze suspenzí, ale zároveň může dojít k poškození zkoumané virové částice.

Pracujeme-li se zvláště infekčními viry je někdy nutné přistoupit k fixaci těchto virových suspenzí. Důvodem je, že většina virů zůstává i po negativním barvení

a zaschnutí suspenze plně infekční. Fixačním činidlem, které lze použít, může být 1-5% glutaraldehyd ve fosforečném pufru pH 7,2 nebo 0,1-1% oxid osmičelý v destilované vodě(39,79). Doba fixace se pohybuje v rozmezí od 5 do 10 minut. Fixativum můžeme přidat k suspenzi viru adsorbované na síťce, po fixaci je nutné opláchnout preparát destilovanou vodou a poté jej můžeme negativně obarvit. Chceme-li před kapáním provést ultracentrifugaci suspenze, není vhodné k ní přidávat fixativum, protože by to vedlo k agregaci virů. Agregované viry nejsou vhodné pro negativní barvení, protože jsou velmi denzní a navíc může, při barvení, docházet k jejich odstranění ze sítěk. Pokud se přeci jen v suspenzi agregáty virů vyskytují, lze je resuspendovat sonifikací nebo přidáním solí. Bylo prokázáno, že ultrastruktura některých virů po fixaci je odlišná ve srovnání se strukturou nefixovaných virů a to i při použití různých fixačních postupů (např. glutaraldehyd ve srovnání s oxidem osmičelým). Je tedy u fixovaných materiálů třeba počítat s možností vzniku artefaktů. Pokud se chceme vyhnout vzniku morfologického poškození negativně barvených virů, v důsledku použití fixačního činidla, je vhodné k inaktivaci zvolit oboustranné ozáření sítěk s obarvenými viry UV lampou (15minut, vzdálenost 10-15cm) (37,39,79). Možná je i fixace virů 0,1% azidem sodným, jež navíc napomáhá stabilizaci viru (69, 79). Pokud je nutné zkoncentrovat virové částice z klinického materiálu jako jsou infikované buněčné kultury, tkáň nebo tělesné tekutiny, můžeme použít metodu ultracentrifugace nebo gradientovou metodu. Pro úspěšnost metody je potřeba, aby počet virových částic v materiálu byl dosti vysoký a laboratoř měla potřebné vybavení.

4.3. Negativní barviva

Negativní barvivo by mělo splňovat několik požadavků; mělo by být snadno rozpustné, mělo by mít vysokou elektronovou denzitu, má být stále v proudu elektronů a nemělo by reagovat se studovaným virem. Žádoucí také je, aby barvivo mělo dostatečně malou molekulu pro snadnou penetraci do povrchových nerovností virové částice (79).

Z poměrně širokého spektra negativních barviv jsou běžně používány jen některé látky. Nejčastěji používaným negativním barvivem je kyselina fosfowolframová. Její vodný roztok je možno připravit v koncentracích od 1 do 3%. Rozsah používaného pH se pohybuje v hodnotách od 5 do 8 a upravuje se pomocí 0,1 mol/l NaOH nebo KOH. Pro většinu virologických preparátů postačíme s 2% roztokem o pH 6 až 7. Roztok kyseliny fosfowolframové je stabilní poměrně dlouhou dobu, je však třeba občas kontrolovat jeho pH,

kteřé se mění. I v průběhu zasychání kyseliny při barvení dochází k mírnému vzestupu pH (14,79). Změnit koncentraci kyseliny je potřeba jen v případě, vyžaduje-li to koncentrace materiálu. Ke změně pH přistupujeme tehdy, je-li virus daným pH poškozován. Hodnotu pH lze upravit pomocí 1 mol/l NaOH nebo KOH. Nepříznivou vlastností kyseliny fosfowolframové je, že často poškozuje obalené viry, a proto je vhodná zejména pro barvení stabilnějších virů.

Druhým hojně používaným barvivem je octan uranylu, který lze připravit ve formě vodného i alkoholového roztoku. Ve virologii je barvivem se širokými aplikačními možnostmi. Připravují se roztoky o koncentracích od 0,5 do 2 % a pH 4 až 5. Hodnotu pH barviva nelze zvýšit nad 5, protože při vyšším pH se začnou vytvářet sraženiny hydroxidu uranylu. Tvorbě sraženin můžeme zabránit přidáním roztoku ethylendiaminoctové kyseliny (EDTA) v molekulárním poměru octan uranylu : EDTA = 2:1, barvivo má však poměrně velikou zrnitost, což není žádoucí vlastností(79). Octan uranylu je méně stabilním barvivem, které je nejlépe před použitím připravovat čerstvé.

Dalším používaným barvivem je molybdenan amonný jehož výhodou je malá zrnitost. Pro negativní barvení se používají vodné roztoky v koncentracích 0,5 až 5% a rozmezím pH od 5 do 8. Hodnotu pH můžeme upravit pomocí roztoků 1 mol/l KOH nebo 1,5 mol/l NH₄OH. V praxi se nejčastěji používá 2% roztok molybdenanu, který je izoosmotický k 0,25 mol/l sacharóze. Výhodné je použít molybdenan amonný jako barvivo při jednostranném obarvení částic(22,77,78,79).

Oxid osmičelý je v elektronové mikroskopii používán primárně jako fixační činidlo. Jeho nespornou výhodou je, že kromě fixace některé struktury současně kontrastuje. Nejčastěji se používá v 1% koncentraci. Oxid osmičelý fixuje dobře zejména fosfolipidy, s polysacharidy takřka nereaguje a v případě proteinů reaguje nejvýrazněji s molekulami aminokyselin obsahujícími síru. Nevýhodou použití je, že může způsobit strukturální změny objektů a porušuje osmotické vlastnosti membrán.

Jaké barvivo zvolit závisí na tom, co potřebujeme zdůraznit. Barvivo s větší molekulou poměrně málo proniká do hlubších částí a proto je vhodné pro pozorování základní morfologie virové částice (např. kyselina fosfowolframová). Chceme-li pozorovat detailnější substruktury částice je vhodné vybrat barvivo s molekulou menší (např. šťavelan uranylu). Je zřejmé, že s různými barvivy můžeme dosáhnout různých výsledků.

4.4. Techniky negativního barvení

4.4.1. Kapací techniky

Kapací techniky jsou nejjednodušší a nejčastěji používané techniky v přípravě virů. Prvním způsobem provedení je jednostupňová simultánní technika. Principem je, že se suspenze viru optimální koncentrace smíchá se stejným objemem negativního barviva a nanese se na elektronmikroskopickou síťku. Síťku lze uchytit křížovou pinzetou nebo může být za okraj uchycena v plastelíně (63, 79). Suspenze se na síťce ponechá přibližně 30 sekund, a následně se přebytek tekutiny odsaje filtračním papírem. Preparát je vhodné co nejdříve po obarvení prohlížet v elektronovém mikroskopu, protože u některých virů může docházet k postupné pomalé penetraci barviva do partikulí. Problémem simultánní techniky je nestandardnost, která vzniká ztrátami materiálu při odsávání a nekontrolovatelností mikropodmínek při přichycení virů zalitých do negativního barviva. Techniku je vhodné použít pouze v případě, máme-li k dispozici dostatečně koncentrovanou virovou suspenzi.

Druhým postupem je dvoustupňová-sukcesivní kapací technika, kdy virovou suspenzi nakapeme na síťku a po určité době potřebné k přichycení virů k síťce se přebytek tekutiny odsaje kouskem filtračního papíru. Doba, po kterou se suspenze na kapce ponechá, se pohybuje v rozmezí dvou minut až půl hodiny v závislosti na koncentraci suspenze. Následně se na síťku nakape negativní barvivo. Doba barvení je několik sekund až jedna minuta, obecně používaným standardem je 30 sekund. Aby se zamezilo poškození virových částic musí být barvivo přidáno dříve, než virová suspenze na síťce zaschne. Při sukcesivní technice lze po adsorpci virů provést promytí kapkou destilované vody nebo pufru. Musíme však počítat s tím, že může docházet k určitým ztrátám virové suspenze. Výhodou sukcesivní techniky je i to, že její výsledek není tak závislý na koncentraci viru jako u metody simultánní. Zvolíme-li delší dobu adsorpce, na síťku se přichytí výrazně větší množství virových částic. Pokud máme virovou suspenzi o velmi nízké koncentraci řešením může být, když necháme suspenzi na síťce téměř zcela zaschnout a poté k barvení použijeme negativní barvivo nižší koncentrace.

V minulosti byla popsána modifikace kapací techniky, kdy se virová suspenze nanese na síťky umístěné v agaru (4). Principem metody je, že se jamky mikrotitrační destičky naplní do 3/4 1% agarem a na ten se položí síťky s pouhlikovanou formvarovou blánou směrem nahoru. Takto připravené destičky se síťkami lze uchovávat v lednici 2 až 3 týdny, jsou-li přelepeny

izolepou. Na síťku se nakape jedna až dvě kapky virové suspenze a ponechá se adsorbovat 15 až 30 minut. Během této doby difunduje médium s rozpustnými látkami do agaru při současné částečné purifikaci materiálu. Následně se na síťky nakape barvivo a po několika sekundách se přebytek tekutiny odsaje filtračním papírem. Pomocí této metody lze dosáhnout zvýšení koncentrace adsorbovaných virových částic, protože síly difúze napomáhají jejich adsorpci na podložní blánu (7,77,78,79).

4.4.2. Sprejovací technika

Sprejovací technika zaručí poměrně rovnoměrnou distribuci virových částic na síťce, její provedení je však poněkud složitější. Existují rozličné druhy rozprašovačů, které zajistí rovnoměrné rozprášení virové suspenze a její nanesení na síťky v malých kapkách (42).

4.4.3. Plovací techniky

Plovací techniky jsou jednoduché a poskytují velmi dobré výsledky. Na vhodnou podložku (např. parafilm) se umístí kapka virové suspenze a na ni se položí elektronmikroskopická síťka podložní blánou dolů, to znamená směrem k suspenzi. Viry se ponechají adsorbovat několik minut, v závislosti na koncentraci viru v suspenzi. Následně se síťka přenese na kapku negativního barviva. Mezi kapkou suspenze a negativního barviva je možné zařadit také promývací krok na kapce promývací tekutiny (destilovaná voda, pufr). Při přenášení síťky z jedné kapky na druhou osušíme preparát kouskem filtračního papíru. Doba negativního barvení je stejná jako u kapacích technik.

Při přenášení vzorku z jedné kapky na druhou dochází ke změnám povrchového napětí. Některé viry jsou k těmto změnám citlivější a v tom případě je lepší přistoupit k jednodokapkové metodě. Tato technika spočívá v tom, že tekutinu je možné vyměňovat přímo pod síťkou, kdy z jedné strany pipetou odsáváme suspenzi a současně z druhé strany přidáváme promývací roztok nebo barvivo. Tím, že je materiál neustále v kontaktu s tekutou fází, zamezíme jeho vysušení před konečným zaschnutím po obarvení.

Jako modifikaci plovací techniky lze provést agarovou difúzní filtrační techniku. Poprvé byla popsána pro elektronmikroskopický průkaz viru hepatitidy B (51). Při této technice se kapka suspenze nanese na povrch podložního mikroskopického sklíčka pokrytého 0,8% agarem. Na kapku virové suspenze se pak položí síťka a postupuje se obdobně jako u ostatních plovacích technik. Tekutá fáze difunduje během několika minut do agaru za současné částečné purifikace materiálu, protože do agaru difundují rozpustné látky média. Touto metodou si také

pomůžeme ke zvýšení koncentrace virů. Síťku z agaru musíme odstranit dříve, než difunduje všechna tekutina, aby nedošlo k úplnému zaschnutí suspenze na síťce a případnému přenesení kousků agaru na síťku (79). Negativní barvení je pak obdobné jako u předešlých postupů.

4.5. Příklady specializovaných technik negativního barvení virů

4.5.1. Metody jednostranného obarvení

Při použití standardních technik negativního barvení jsou virové částice většinou obarveny ze všech stran. V důsledku toho se v elektronovém mikroskopu promítají přes sebe vrchní i spodní struktury objektu. Technikou jednostranného obarvení je možno do jisté míry zajistit, že většina obarvených částic přijde do kontaktu s negativním barvivem jen svou jednou stranou. Při technice jednostranného obarvení shora necháme částice nanesené na síťce rychle zaschnout, potom se přidá negativní barvivo, které se po několika sekundách odsaje filtračním papírem a síťka se nechá opět rychle zaschnout (62). Nejvhodnější negativní barvivo použitelné pro tuto techniku je molybdenát amonný (65). Nevýhodou této techniky je, že může dojít k poškození citlivějších virů a vzniku artefaktů během vysychání.

Třetí možným způsobem jednostranného obarvení je negativní obarvení částic zdola (3). Při této technice se na síťku nakape negativní barvivo (např. 2% kyselina fosfowolframová), které se nechá důkladně zaschnout pod infračervenou lampou. Pak se na zaschlou vrstvu barviva kápne koncentrovaná virová suspenze. Po okamžitém odsátí suspenze se část virových partikulí zachytí na povrchu negativního barviva a obarví se zdola.

4.5.2 Mikrodialyzační metoda

Tuto metodu je vhodné použít k purifikaci virových suspenzí, které byly upravovány gradientovou centrifugací. Suspenze po centrifugaci obsahují vysoké koncentrace látek tvořících gradient (sacharóza, CsCl, aj.) (79). Metoda se provádí na Webbově zařízení, které sestává z kádinky s kapalinami, obrácené kádinky, filtračního papíru a misky. Principem metody je, že se síťky s naneseným vzorkem položí na kvalitní filtrační papír suspenzí nahoru. Filtrační papír je jedním koncem namočen v kádince obsahující destilovanou vodu nebo pufr. Rychlost průtoku kapaliny se upravuje výškou hladiny v kádince, optimum je jedna kapka za dvě sekundy. Síťky se kladou na vlhký filtrační papír v době, kdy virová suspenze nanesená na síťce ještě nezaschla. Touto technikou je rovněž možné provést negativní barvení,

kdy stejným způsobem necháme filtračním papírem protékat vhodné negativní barvivo. Barvivo dialyzuje přes podložní blánu rozpustné látky z preparátu a současně barví adsorbované částice. Metoda však není vhodná pro některé obalené viry, jenž jsou citlivé na změny puřrovacích podmínek.

4.5.3. Negativní barvení v kombinaci s mrazovým vysušením virové suspenze

Při běžných postupech negativního barvení je častým problémem fáze konečného vyschnutí virové suspenze, kdy dochází k poškození virových partikulí. Použitím techniky negativního barvení s mrazovým vysušením je možné riziko poškození virů minimalizovat (67,70). V prvních krocích je tato metoda shodná s plovací technikou negativního barvení. Síťka se položí na kapku virové suspenze, po adsorpci viru se přenese na promývací roztok a nakonec na kapku negativního barviva. Po obarvení a odsátí přebytečné tekutiny filtračním papírem se okamžitě síťka se vzorkem ponoří na dobu deseti sekund do tekutého dusíku. Závěrečné vysušení se provede ve vhodném přístroji s vysokým vakuem a kvalitním chladícím zařízením umožňujícím ochlazení držáku preparátu na -150°C . Síťka se rychle přenese do vychlazeného držáku a přístroj se evakuuje. V průběhu mrazového vysoušení se teplota preparátu postupně zvyšuje na -80°C . Nevýhodou metody jsou vysoké pořizovací náklady na zařízení a také její pracnost. Jejím přispěním však byly získány vynikající výsledky především u obalených virů. V případě stabilnějších virů nebyly zjištěny podstatné rozdíly mezi výsledky získanými touto metodou a metodami klasickými.

4.5.4. Metoda negativního barvení virové suspenze potažené uhlíkem

Tato metoda je vhodná pro přípravu vysoce koncentrované virové suspenze, ve které jsou viry uspořádané v plošné krystalické mřížce nebo ve větších plošných shlucích (44). Na plochu čerstvě uštipnuté slídy se nanese směs vysoce koncentrovaného viru a negativního barviva. Nejčastěji používaným barvivem je roztok 1,5 až 3 % molybdenanu amonného s hodnotami pH v rozmezí od 5,2 do 7,5. Přebytečná tekutina se odsaje filtračním papírem a slída s negativně obarvenou vrstvou virů se přenese do pokovovacího zařízení. V zařízení se na virovou suspenzi nanese velmi tenká vrstva uhlíku a potom se tato vrstva s adsorbovanými virovými částicemi splaví ze slídy opatrným a pomalým ponořením do druhého roztoku negativního barviva (např. 1% octan uranylu). Následně se vzorek nabere zespu na elektronmikroskopickou síťku a nechá se zaschnout. Tento postup umožnil u řady virů získat

hustou suspenzi, která tvoří pravidelnou krystalickou mřížku, kterou lze dobře studovat pomocí optické difrakce. Tuto techniku není příliš vhodné použít pro obalené viry (71).

Jedním z hlavních problémů metody negativního barvení jsou artefakty vznikající v důsledku interakce negativního barviva s virovou částicí. Nejčastějším zdrojem artefaktů jsou obalené viry, neboť barvivo reaguje s jejich povrchovou membránou. Jednotlivá barviva se také značně liší hloubkou průniku do povrchových struktur virové částice. Některá barviva pomohou zvýraznit jen povrchovou morfologii částice, jiná zdůrazní i substrukturální detaily. Při prohlížení preparátu virové suspenze můžeme často vidět kromě plných virionů též tzv. „prázdné“ viriony. Jedná se o viry u nichž se z různých důvodů nezabudovala nebo uvolnila nukleová kyselina. Bylo však prokázáno, že k uvolnění nukleové kyseliny může docházet i arteficiálně nevhodným pH při negativním barvení (62). Na vznik artefaktů může mít také vliv ozáření negativně barvených virů elektrony (45). Bombardování preparátů elektrony v nižších dávkách může způsobit tvorbu mikrokrystalů z negativního barviva. Vyšší dávky mohou vést k migraci barviva do hlubších částí povrchu virů, a to do jisté míry může být výhodné pro strukturální analýzy (79).

Metoda negativního barvení může pozměnit strukturu povrchu virů, a proto pro posouzení strukturální konstantnosti je nejvhodnější provést tuto metodu při různých barvivech, různých hodnotách pH a dalších fyzikálních a chemických podmínkách. Tímto si můžeme ověřit, že daná struktura je přítomna při rozdílných způsobech negativního barvení.

4.6. Podložní blány používané v elektronové mikroskopii

Výběr vhodných sítěk a podložních blan je důležitou podmínkou pro výsledek negativního barvení. Pro běžnou práci používáme ve virologii síťky s velikostí otvorů 300 - 400 MESH. Chceme-li však zamezit rozpadu blan, ke kterým při manipulaci může docházet, je vhodnější použít síťky s velikostí otvorů 600-1000 MESH. Blány, kterými se elektronmikroskopické síťky pokrývají slouží jako elektrontransparentní podklad pod vzorky (7,22,77,78).

Je žádoucí, aby podložní blány byly co nejtenčí, byly dobře smáčitelné, pevné při manipulaci a stabilní v proudu elektronů. Také by neměly mít vlastní strukturu. Pro dobrou smáčitelnost je důležité, aby byl povrch blan hydrofilní. Nejvyšší hydrofilitu má povrch blan krátce po jejich zhotovení. V průběhu času však dochází k vytrácení povrchového náboje, blány se tak stávají hydrofobními a jsou tedy špatně smáčitelné. Hydrofilitu uhlíkových blan lze obnovit

jejich vystavením doutnavému výboji, druhou alternativou je chemická aktivace. K obnovení hydrofilního povrchu chemickou aktivací můžeme použít vodný roztok ethidium bromidu (5mg/ml), kdy kapku tohoto roztoku nakapeme na kousek parafilmu a na ni položíme elektronmikroskopickou síťku podložní blánou dolů. Síťku na kapce ponecháme 10 minut ve tmě, při pokojové teplotě. Následně síťku promyjeme třikrát po 5 sekundách v destilované vodě a přebytek tekutiny odsajeme filtračním papírem. Takto aktivovaný povrch sítěk vydrží být hydrofilní po dobu několika hodin (78). Dobrá smáčitelnost povrchu znamená lepší adhezi virových částic. Existují postupy, kdy pro zlepšení smáčitelnosti jsou k virové suspenzi či barvicím roztokům přidávány povrchově aktivní látky. Běžně se používá 0,01 až 0,1% bovinní sérový albumin. Nevýhodou jeho použití však je, že může zvýšit granularitu pozadí a také může docházet k interakci virových proteinů s albuminem. Někteří autoři doporučují použití 0,1 % roztok propylenglykolu nebo glycerolu (40). Jiné práce popisují použití roztoku oktadekanolu v hexanu, bacitracinu v koncentraci 20 μ g/ml nebo 0,1% polylyzinu (7,30,31). Částečného zvýšení smáčitelnosti sítěk lze dosáhnout jejich ozářením UV světlem po dobu 10 až 30 minut (36,37). Použitím podložní blány (hlavně v případě formarové) dochází ke snížení rozlišovací schopnosti i kontrastu (7,48). Mezi nejčastěji užívané podložní blány patří formvarová, butvarová, nitrocelulózová a uhlíková blána.

4.7. Typy blan

Nitrocelulózová blána (collodion film)- připravuje se z 1 až 2% roztoku nitrocelulózy rozpuštěné v octanu amylnatém a má obdobné vlastnosti, jako blána formvarová. Blánu je vhodné použít jako „podpěru“ jemných částic nebo k pokrytí sítěk s velkými otvory. Je relativně stabilní v elektronovém paprsku a vysoce propustná pro elektrony. Síťky pokryté nitrocelulózovou blánou lze skladovat několik měsíců na suchém a bezprašném místě (Petriho miska), (7, 77,78).

Formvarová blána - Formvar (polyvinyl formaldehyd) může být kouspen ve formě prášku nebo již rozpuštěný v chloroformu nebo ethylen dichloridu jako 0,25 až 0,5 % roztok. Polyvinyl formaldehyd má schopnost vytvářet po zaschnutí na hladkých površích, např. skla, tenké filmy. Formvarové blány jsou více stabilní v elektronovém paprsku než blány nitrocelulózové a také vynikají velmi dobrou soudržností. Jejich tloušťka se pohybuje v rozmezí 20 až 40 nanometrů. Tloušťka blány závisí přímo úměrně na koncentraci formvaru v roztoku (čím je roztok koncentrovanější, tím bude blána silnější), také ji ovlivňuje rychlost vytažení sklíčka z roztoku (čím rychleji, tím tenčí blána) a v neposlední řadě tloušťku

ovlivňuje délka doby, po kterou je sklíčko v roztoku ponecháno (čím je kratší, tím je blána silnější). V elektronové mikroskopii jsou jedny z nejvíce používaných blan (7,77,78).

Butvarová blána - Butvar (polyvinylbutyral) je používán obdobně jako formvarová blána. Butvarové blány se vyznačují větší mechanickou stabilitou v elektronovém paprsku a jsou více propustné pro elektrony, než blány formvarové. Předností butvaru je také to, že se při pozorování preparátů v mikroskopu velmi málo projevuje jeho vlastní struktura. Povrch butvarových blan je více hydrofilní, tudíž lépe smáčitelný, oproti ostatním blánám. Tyto blány je vhodné používat při negativním barvení nebo k překrytí sítěk s velkými otvory. Použitelné sítě s butvarovou blánou můžeme skladovat po dobu devíti měsíců (7,77,78,79).

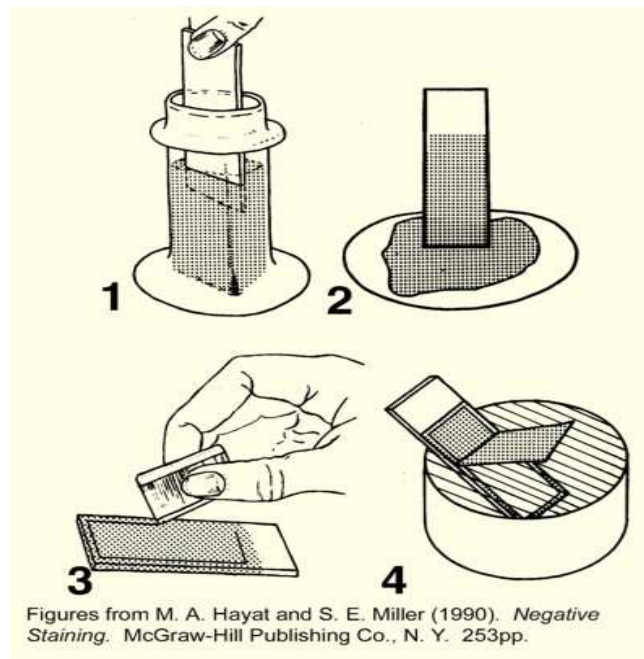
Uhlíková blána – Tenká vrstva uhlíku se nanáší na předešle zmíněné podložní blány z důvodu jejich stabilizace a zvýšení smáčitelnosti. Kromě toho však lze povrch sítěk překrýt samotnou uhlíkovou blánou. Vlastní uhlíkové blány vynikají svou kvalitou a je možné je připravit v tloušťkách 2 až 10 nm. Vyznačují se dobrou tepelnou stabilitou, vysokou vodivostí, homogenitou povrchu, jsou elektron-transparentní a lze je použít jako podložní blánu pod různé izolované částice stejně jako pod řezy. Nemají téměř žádnou strukturu ani při největších zvětšeních, proto se používají hlavně při práci, vyžadující nejvyšší rozlišení(48). Nevýhodou uhlíkových blan je, že jsou oproti plastickým blánám více fragilní (7,78).

4.8. Metody přípravy podložních blan

Kapková metoda – Tato metoda je obecně používána pro přípravu nitrocelulóзовých blan, protože nitrocelulóza rozpuštěná v octanu amylnatém se po kápnutí na vodní hladinu velmi rychle rozprostře a zůstává na hladině. Jiné typy blan mají tendenci po nakapání na vodní hladinu klesat ke dnu a také se zcela po hladině nerozprostřou. Princip metody spočívá v tom, že se do připravené skleněné nádoby s destilovanou vodou, pipetou, nakapou 1 až 3 kapky 2% roztoku nitrocelulózy rozpuštěné v octanu amylnatém. Potom, co se rozpouštědlo odpaří, zůstane na vodní hladině nitrocelulózová blána. Vzniklá blána má zvrásněný povrch a oblasti s různou tloušťkou, které lze posuzovat podle interference barev. Když je rozpouštědlo kompletně odpařeno, přibližně za 1-2 minuty, povrch blány přestává měnit barvy a blána může být po nanesení sítěk, na vhodné místo, z vodní hladiny odejmuta. K vytažení blány se sítěkami můžeme použít mikroskopické sklíčko, kdy jej opatrně ponoříme pod vodní hladinu a blánu se sítěkami jím podebereme a vytáhneme. Takto zhotovené blány uložíme do Petriho

misky a necháme vysušit. Po vysušení můžeme blány nechat pokryt vrstvou uhlíku v napařovací aparatuře (7,77,78,79).

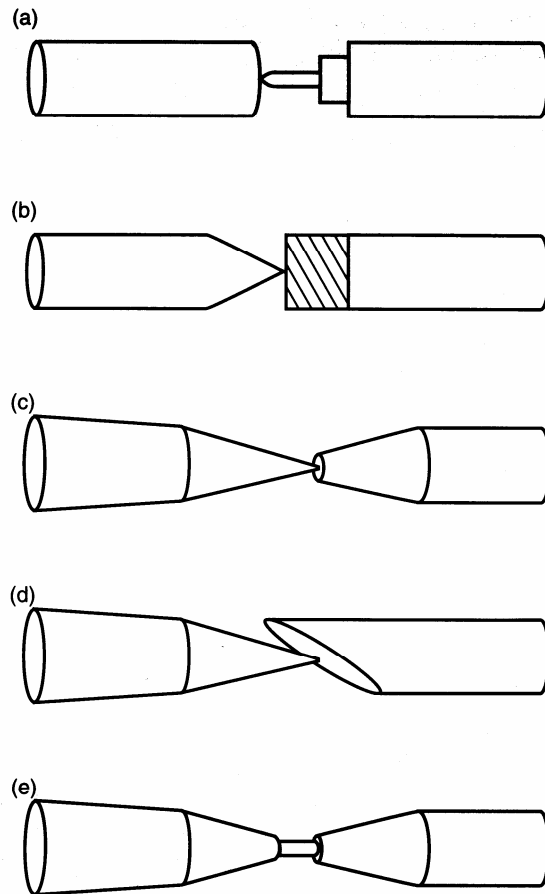
Skličková sloupávací metoda (slide stripping) – Sloupávací metodou se obvykle připravují blány formvarové nebo butvarové. Náročným krokem metody, je příprava mikroskopického sklíčka, na které je blána nanášena. Máme-li příliš čisté sklíčko, blána se při splavování od povrchu sklíčka obtížně odděluje. Na druhé straně, pokud je sklíčko příliš znečištěné, blána může mít mnoho nedokonalostí (pruhy, díry), které budou při prohlížení v mikroskopu viditelné. Postup přípravy formvarových blan může mít každá elektronmikroskopická laboratoř modifikován podle svých potřeb. Základní princip přípravy však zůstává stejný. Roztok formvaru (používané koncentrace 0,25 - 0,5%) se nalije do odměrného válce a překlopí se alobalem nebo nějakým víčkem, aby nedošlo k vypaření chloroformu. Očištěné sklíčko se uchytí pinzetou a částečně se ponoří, na dobu 1 minuty, do formvaru. Po uplynutí jedné minuty se sklíčko rychle z roztoku formvaru vytáhne a nechá se oschnout. Někteří autoři ve svých pracovních protokolech uvádějí, že je možné sklíčko před ponořením do formvaru, mírně nahřát na elektrické ploténce (78). Poté, co sklíčko oschne, ořízneme blánu pomocí čisté žiletky, skalpelu nebo diamantové tužky, aby se při splavení na hladině vody blána od sklíčka snadněji oddělila. Sklíčko, s oříznutým povrchem nahoře, se následně pomalu noří, pod mírným úhlem (cca 45°), do kádinky s destilovanou vodou. Stoupající vodní meniskus odděluje formvarovou blánu od sklíčka až se nakonec blána splaví na hladinu destilované vody (Obr.7.). Použitelná je blána, která má šedé zbarvení a je homogenní. Nakonec se na blánu položí síťky a na to kousek parafilmu, kterým se blána sejme z vodní hladiny. Parafilm s formvarovou blánou a síťkami uložíme na suché a bezprašné místo, nejlépe do Petriho misky, a necháme oschnout do druhého dne. Povrch formvarových blan se často pokrývá tenkou vrstvou uhlíku, tím dosáhneme lepší soudržnosti a smáčitelnosti blan (7,77,79).



Obr.7. Schéma postupu při sloupávací sklíčkové metodě.

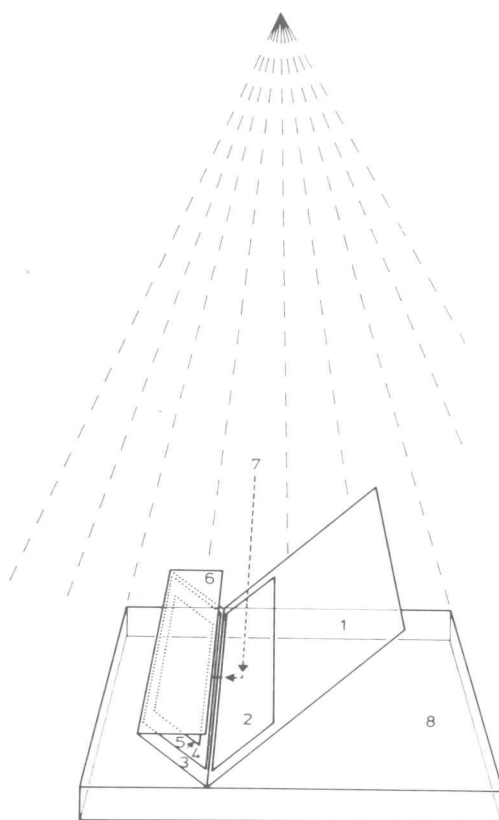
Dírkované podložní blány (holey films) – Pro zobrazení v elektronovém mikroskopu je nejlepší, když je podložní blána tenká. Nevýhodou tenkých blan však je, že nejsou dostatečně stabilní na velkých čtvercových otvorech elektronmikroskopických sítěk. Jednou z možností je připravit si podložní blány z formvaru nebo nitrocelulózy s množstvím malých otvorů, které jsou poté překryty tenkou vrstvou uhlíku. Vzniklá formvarová blána slouží jako síťka s „minimech“ otvory a vlastní podložní blánou je tenká vrstva uhlíku (7,77,78,79). Blány připravíme tak, že do 0,5 až 1% roztoku formvaru přidáme vodu a tento roztok pořádně protřepeme. Následně do roztoku ponoříme očištěné mikroskopické sklíčko a v dalších krocích je příprava stejná jako u přípravy normálních formvarových blan. Jinou metodou je, že po ponoření sklíčka do formvaru na roztok silně dýcháme, abychom mu dodaly vlhkost. Voda vytvoří v bláně početné množství otvorů o různých velikostech, a po oschnutí se blána v napařovací aparatuře pouhlikuje (7).

Příprava uhlíkových blan – Připravují se napařením uhlíku na slídu ve vakuové napařovací aparatuře. Do aparatury umístíme uhlíkové nebo grafitové tyče, kdy jedna má zúžený konec do hrotu a druhá má konec plochý. K vytvarování uhlíkové elektrody se používají speciální ořezávká. Upravené konce elektrod se o sebe opřou (Obr.8.). Při průchodu elektrického proudu dochází v místě zúžení ke zvýšení odporu a v důsledku toho se zvýší teplota na hodnotu, při které se z daného místa začne vypařovat uhlík.



Obr.8. Různé způsoby ořezání a uspořádání uhlíkových elektrod (převzato z Procedures in Elektron Microscopy, A.W. Robards, A.J. Wilson, 1993).

Proces napařování se provádí po vyčerpání prostoru napařovací aparatury difúzní vývěvou na hodnotu $1,3 \times 10^{-2}$ až $1,3 \times 10^{-3}$ Pa. Vrstvička uhlíku nanosená na slídě se splaví podobně jako u formvarových blan na vodní hladinu. Uhlíkové blány můžeme připravovat dvěma způsoby napařování. Prvním z nich je přímé napařování, kdy je uhlík napařován přímo na slídu. Chceme-li však připravit uhlíkové blány s homogenním povrchem, použijeme metodu tzv. nepřímého napařování (Obr.9.). Vypařené částice uhlíku jsou odráženy z povrchu mikroskopického podložního skla nastaveného v určitém úhlu k elektrodám a dopadají na čerstvě odštípnutý kousek slídy, zastíněný před přímým dopadem (78).



Obr.9. Pomůcka pro nepřímé napařování uhlíkových blan (D.G.Robinson, 1987).

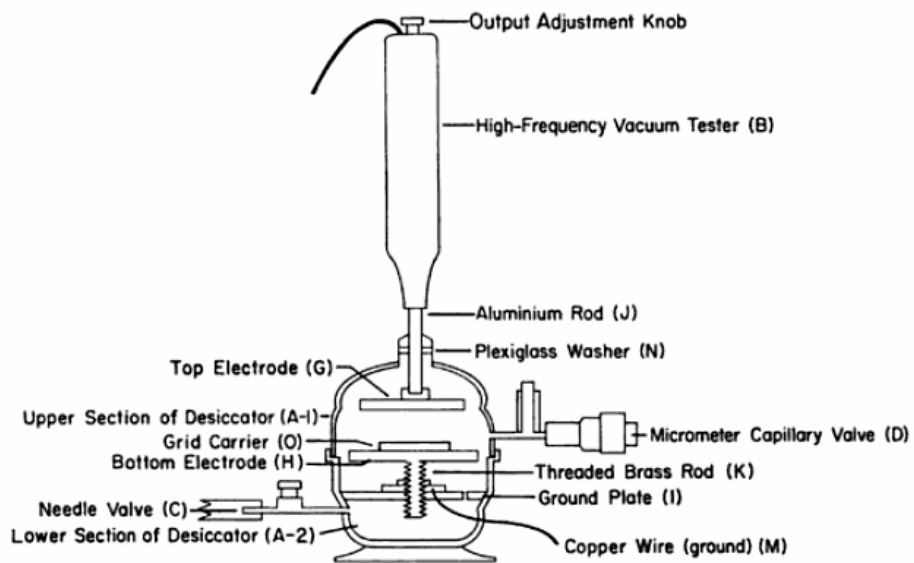
4.9. Doutnavý výboj

Častým problémem negativního barvení je nerovnoměrné rozprostření vzorků a barviv na podložní bláně. Příčinou je špatná smáčitelnost povrchu blány. K zhoršení smáčitelnosti uhlíkových podložních blan přispívá jejich stárnutí a kontaminace. Jednou z možností aktivace blan je vystavení jejich povrchu doutnavému výboji. Principem doutnavého výboje je ionizace atomů a molekul, ke které dochází mezi dvěma kovovými elektrodami,

v atmosféře vakua. Výsledkem je, že ionty indukují náboj na povrchu blan a dělají ho tak hydrofilním nebo hydrofobním.

Ošetření podložních blan touto metodou učiní jejich povrch lépe smáčitelným. Vlastnosti uhlíkové blány mohou být ovlivněny pracovními podmínkami během přípravy (např. poloha a vzdálenost umístění sítěk vůči elektrodám) a také čistotou napařovací aparatury při napařování (9,37). Atmosféra vysokého vakua a čistá vakuová jednotka vedou k produkci hladkých, nekontaminovaných, tenkých a hydrofilních uhlíkových blan. Provádíme-li doutnavý výboj v redukované atmosféře vzduchu dosáhneme toho, že hydrofilního, negativně nabitého a stejnoměrně tenkého povrchu blány. Hydrofilita takovýchto filmů vydrží několik minut až hodin. V jiném případě můžeme doutnavý výboj provést v prostředí organických par (např. pentylaminu), kdy nám vznikne hydrofóbní, pozitivně nabitý a stejnoměrně tlustý povrch. Vzniklý náboj na bláně lze také odhadnout podle barevných přechodů, ke kterým mezi elektrodami, při doutnavém výboji dochází. Doutnavý výboj s přechodem barev z intenzivní purpurové do fialové nám poskytne negativně nabitě blány. Naopak doutnavý výboj s přechodem od intenzivní fialové do modré dává blány s pozitivním nábojem (37).

Při vlastním provedení doutnavého výboje jsou sítinky s podložní blánou umístěny do aparatury (Obr.10.) a přikryty krycím zvonem. Dále jsou součástí aparatury, horní a spodní, aluminiové elektrody, o průměru 80 mm, mezi kterými k doutnavému výboji dochází. Povrch elektrod musí být dokonale vyleštěn a vyčištěn. Jakákoliv nerovnost či nečistota na jejich povrchu, by se projevila zhoršenou kvalitou blan. Prostor zvonu se čerpá na hodnotu vakua 13 Pa, pomocí rotační pumpy. Pro vyšší smáčitelnost je vhodné provést výboj při nižších hodnotách tlaku. Doutnavý výboj vzniká poté, co se na aluminiové elektrody, po dobu 5 až 15 sekund, aplikuje napětí okolo 500 V. Během výboje stoupá tlak (obvykle na 20 Pa) a proud (na 18 mA). Nadměrný výboj může podložní blány spálit nebo je učinit fragilnějšími. Po provedení doutnavého výboje by se měli sítinky použít co nejdříve, aby se zabránilo atmosférickým kontaminacím (9,37).



Obr.10. Aparatura pro provedení doutnavého výboje (Hayat M. A., 2000).

II. Cíle práce

1. Na základě literární rešerše vybrat vhodné typy virů k jejich použití jako modelu k vypracování metodického postupu
2. Modifikovat metodu negativního kontrastu pro potřeby nízkonapětového elektronového mikroskopu
3. Odkoušet postup přípravy podložní uhlíkové blány metodou přímého a nepřímého napařování a ověřit její povrchové vlastnosti
4. Porovnat výsledky identifikace použitého modelového viru na nízkonapětovém mikroskopu s výsledky získanými pomocí vysokonapětového transmisního elektronového mikroskopu

III. Materiál a metody

1. Virové suspenze

V práci byly použity čtyři druhy virových suspenzí. Tři druhy virů rostlinného původu byly poskytnuty Dr. Janou Fránovou z Ústavu molekulární biologie rostlin, Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích. Jednalo se o virus tabákové mozaiky, virus tabákové nekrosy a o vláknitý bílý mozaikový virus jetele. Čtvrtý virus, virus myší klíšťové encefalidity, byl poskytnut Dr. Danielem Růžkem z Parazitologického ústavu, Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích.

Virus klíšťové encefalidity byl získán jako částečný purifikát mozkové tkáně o neznámé koncentraci virových partikulí, v 2 mililitrové plastové zkumavce firmy Eppendorf. Virus byl fixován roztokem 2,5% glutaraldehydu.

Rostlinné viry byly izolovány z dodaného rostlinného materiálu podle návodu Dr. Fránové.

1.1. Virus klíšťové encefalidity (Čeleď: Flaviviridae, Rod: Flavivirus)

Virus je tvořen sférickou částicí o průměru 40-50 nm. Jedná se o obalený RNA virus, kdy povrch je tvořen lipidovou membránou s krátkými glykoproteinovými výběžky a vnitřní kapsida je kubické symetrie. Vektorem viru jsou klíšťata různých druhů a rezervoárem jsou drobní i větší divoce žijící savci.

1.2. Virus tabákové mozaiky (Čeleď: Tombusviridae, Rod: Tobamovirus)

Jedná se o neobalený RNA virus infikující rostliny, hlavně rostliny tabáku a další členy čeledi Solanaceae. Kapsida je helikální, 300 nm dlouhá a 18 nm široká. Virus vstupuje do rostliny v místech mechanického poškození povrchu rostliny.

1.3. Virus tabákové nekrosy (Čeleď: Tombusviridae, Rod: Necrovirus)

Tabáková nekrosa je neobalený RNA virus s kapsidou kubické symetrie o velikosti 20 - 30 nm. Stejně jako tabáková mozaika, infikuje tabáková nekrosa rostliny tabáku a do rostliny vstupuje v místech poškození.

1.4. Vlákknitý bílý mozaikový virus jetele (Čeled':Flexiviridae, Rod: Potexvirus)

Tento vláknitý virus patří k rostlinným RNA virům. Virová částice je neobalená, složená pouze z vláknité kapsidy dlouhé 480 nm a široké okolo 13 nm. Tento virus způsobuje onemocnění jetele a nejčastěji se do rostliny dostává cestou mechanického poškození.

2. Negativní barviva

V metodě negativního kontrastování byly použity čtyři druhy negativních barviv. Prvním barvivem byl vodný roztok běžně používaného octanu uranylu, připravený v koncentracích 2%, 1% a 0,5%. Vodný roztok 2% octanu uranylu (Spi Supplies,USA) se připravil rozpuštěním 0,2 g v 8 ml destilované vody. Roztok byl míchán 15-20 minut, po rozmíchání se ponechal 30 minut odstát a poté se roztok 3x přefiltroval přes stejný filtrační papír. Nakonec se upravilo pH hydroxidem sodným na hodnotu 5 a objem se doplnil na konečných 10 ml destilovanou vodou. Roztok byl uchován v tmavé skleněné lahvičce v lednici pro použití druhý den po přípravě. Roztoky o dalších koncentracích byly připraveny stejným postupem.

Druhým použitým barvivem byl vodný roztok molybdenanu amonného, připravený v koncentracích 2%, 1% a 0,5%. V 8 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,2 g molybdenanu amonného (čistý tetrahydrát,Lachema, Brno). Hydroxidem draselným se upravilo pH roztoku na hodnotu 7 a objem byl doplněn destilovanou vodou na 10 ml. Roztoky o dalších koncentracích byly opět připraveny stejným postupem.

Dalším negativním barvivem byl vodný roztok kyseliny fosfowolframové (Lachema, Brno) o koncentracích 2%, 1% a 0,5%. Navážené 0,2 g kyseliny fosfowolframové se opět rozpustily v 8 ml destilované vody, pH se upravilo přidáním hydroxidu sodného na hodnotu 7 a roztok se doplnil na objem 10 ml destilovanou vodou. Roztoky o dalších koncentracích byly opět připraveny stejným postupem.

Posledním použitým barvivem byl roztok fixačního/kontrastujícího oxidu osmičelého (SPI-CHEM, USA), který byl připraven naředěním koupenného 4% roztoku na dané koncentrace.

3. Izolace virů z rostlinného materiálu

Listy tabáku byly rozmělněny ve třecí misce v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,7. Vzniklá suspenze byla odsáta mikropipetou do 2 mililitrové plastové zkumavky Eppendorf. Třecí miska byla ještě jednou pufrům promyta a tato suspenze se doplnila do plastové zkumavky. Následně byla zkumavka centrifugována po dobu 15 minut v centrifuze Minispin (Eppendorf) při otáčkách 13 400 RPM, což odpovídá hodnotě RCF 12 100g. Stejným způsobem se postupovalo při izolaci vláknitého viru z listů jetele.

Ze suspenzí připravených přímo z rostlinného materiálu nelze určit koncentraci virových částic, pouze u purifikovaných preparátů lze změřit absorbanci nukleové kyseliny (při 260 nm) a podle toho vypočítat koncentraci. Je to však číslo jen orientační.

3.1. Koncentrování virů centrifugací

Všechny získané suspenze virů, včetně viru klíšťové encefalitidy, byly centrifugovány 30 minut při 18 000 RPM (RCF 23 910g) v centrifuze Universal 32, firmy Hettich. Následně byl od každé suspenze přenesen supernatant do nové plastové zkumavky a posléze ještě byly centrifugovány 20 minut v centrifuze Minispin (Eppendorf) při otáčkách 13 400 RPM, (RCF 12 100g).

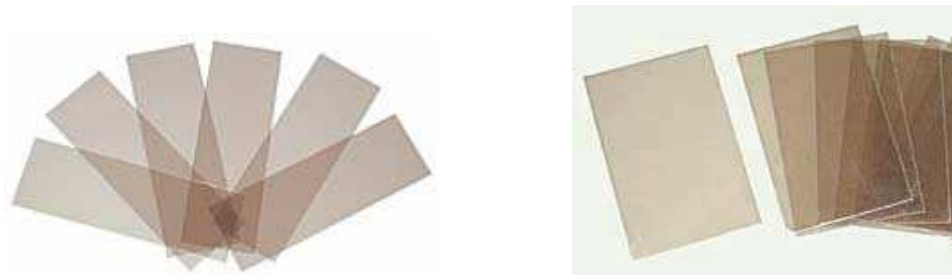
4. Čištění elektronmikroskopických sítěk

Vzorky byly nanášeny na měděné elektronmikroskopické síťky firmy Tesla o průměru 3mm s velikostí otvorů 1000 MESH. Nové síťky se před použitím musí dokonale umýt. Nejprve se ponechají 5 minut v roztoku 50 % kyseliny octové, poté se umístí na 5 minut do jarové vody, následně se promyjí 5 minut v destilované vodě a dalších 5 minut v acetonu. Nakonec se 5 minut vystaví účinku ultrazvuku a nechají se usušit na filtračním papíru. Takto vyčištěné síťky se uskladní na suchém, čistém a tmavém místě. Po delší době uskladnění se doporučuje síťky před použitím znovu promýt 5 minut v acetonu a nechat oschnout.

5. Příprava uhlíkových podložních blan

Uhlíkové blány byly připravovány v napařovací aparatuře JEOL JEE 4C. Uhlík byl napařován na čerstvě odštipnutý povrch slídy (Science Services, Obr.1.).

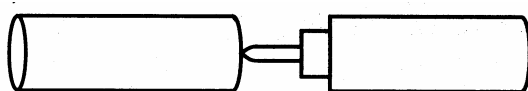
K napařování se používaly uhlíkové elektrody z čistého uhlíku o průměru 5 mm a délce 10 cm od firmy Karbotechnik.



Obr.1. Plátky slídy používané pro přípravu uhlíkových blan.

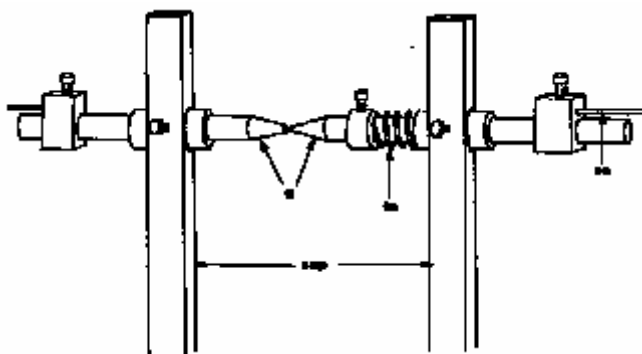
5.1. Metoda přímého napařování

V prvním kroku se připravila, podle doporučeného návodu, napařovací aparatura. Po předčerpání aparatury se po otevření zvonu recipientu upravily uhlíkové elektrody ořezáním ve speciálním ořezávátku (POLARON, Watford England). Konec jedné elektrody byl ořezán na hrot o průměru přibližně 1 mm, plocha konce druhé elektrody byla zarovnána obroušením na smirkovém papíře (Obr.2.).



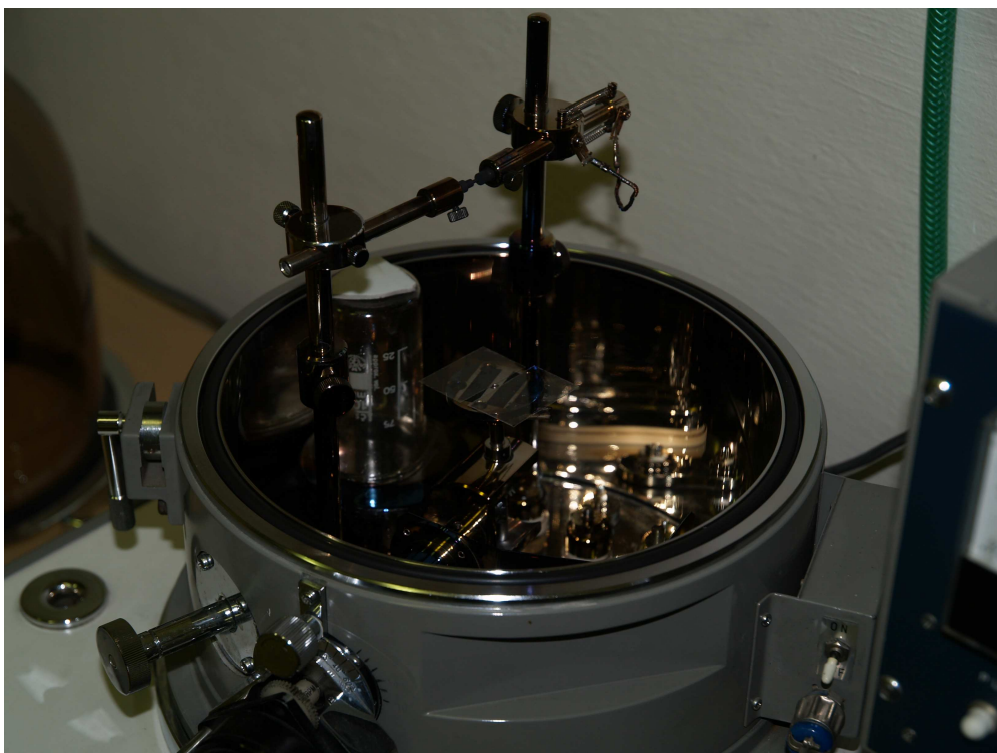
Obr.2. Úprava konců uhlíkových elektrod.

Konce upravených elektrod se o sebe opatrně opřely, aby nedošlo ke zlomení ořezaného hrotu (Obr.3.). Dále se do zvonu umístil keramický střep s kapkou oleje pro orientační kontrolu množství napařeného uhlíku.



Obr.3. Umístění konců uhlíkových elektrod (Willison and Rowe, p.34).

Z plátku slídy o rozměrech 2,5 x 7,5 cm a tloušťce 0,26 až 0,31 mm, se pomocí žiletky odštípnul tenčí plátek, který byl rozstřížen na dva menší obdélníkové kousky (cca 2,5 x 3cm). Tyto poloviny byly umístěny na otáčecí stolek napařovací aparatury a vystaveny čerstvě odštípnutou stranou k uhlíkovým elektrodám. Povrch slídy byl od elektrod vzdálený 10 cm (Obr.4.).

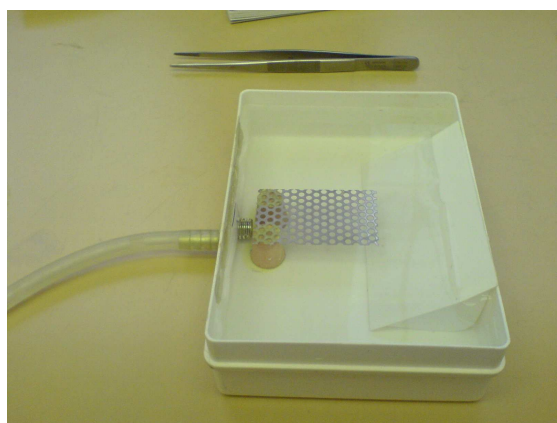


Obr.4. Umístění slídy do zvonu recipientu napařovací aparatury.

Pro zamezení kontaminací blan, by měla být slída odštipnuta bezprostředně před uhlíkováním a použitá žiletka by měla být očištěna acetonem. Čerstvě odštipnutý kousek zaručuje, že povrch slídy je čistý a hydrofilní. Aby nedošlo k uvolnění kousků slídy ze stolku, upevnily se pomocí oboustranné uhlíkové lepící pásky. Předností uhlíkové lepící pásky je, že je elektricky vodivá (odvádí statickou elektřinu), je stabilní ve vakuu a nemění v něm své vlastnosti. Když bylo vše připraveno zvon recipientu se přiklopil zpátky a podle návodu se pokračovalo v čerpání aparatury. Po vyčerpání prostoru zvonu na hodnotu $1,3 \times 10^{-2}$ až $1,3 \times 10^{-3}$ Pa, bylo možno začít uhlíkovat. Uhlíkové elektrody se začaly pomalu žhavit pozvolným přidáváním žhavicího proudu, který byl později ustaven na hodnotách mezi 30 - 40 A. Doba uhlíkování, podle empirického odhadu, byla 1 až 4 minuty v závislosti na velikosti žhavicího proudu. Čím větší proud, tím kratší doba.

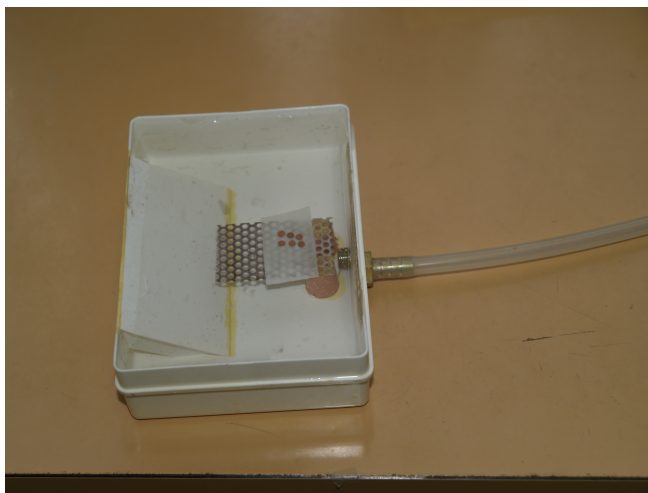
Po pouhlíkování se kousky slídy z aparatury vyjmuly a splavily na hladině destilované vody.

Splavení se provedlo ve splavovací vaničce s výpustí (Obr.5., vyrobeno technikem LEM, Jiřím Vaněčkem).



Obr.5. Splavovací vanička s výpustí.

Uprostřed vaničky je umístěn plíšek s otvory, na který se pokládá filtrační papír s elektronmikroskopickými sítkami. Vanička se naplnila destilovanou vodou cca. 1 cm pod okraj. Pod vodní hladinu se pomocí pinzety ponořil kousek filtračního papíru, který se položil na plíšek s otvory. Na ponořený filtrační papír se začaly pinzetou pokládat čisté elektronmikroskopické sítky, kdy jsem síťku pinzetou uchytla za okraj a opatrně ji ponořila pod vodní hladinu. Když se kolem sítky vytvořil hydrofilní vodní obal, pomalu jsem ji umístila na filtrační papír matnou stranou nahoru.. Takto položené sítky se na filtračním papíru udržely, aniž by vyplavaly zpět na vodní hladinu (Obr.6.).



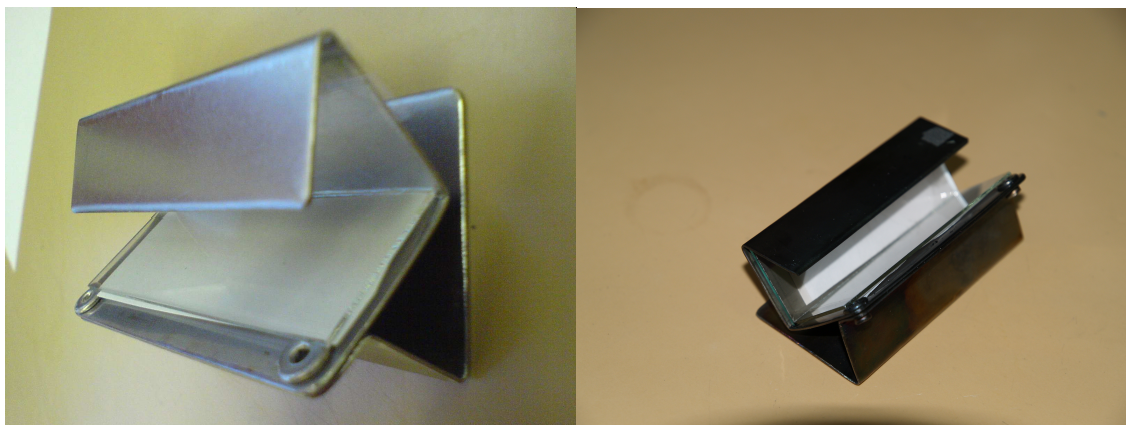
Obr.6. Filtrační papír s elektronmikroskopickými sít'kami umístěný pod vodní hladinou.

Následně se provedlo splavení blány. Slída s napařeným uhlíkem se pozvolna nořila do destilované vody pod úhlem 45° . Blána se pomalu oddělila od povrchu slídy a zůstala plavat na vodní hladině. Po splavení se blána pomocí špejle s řasou navedla nad filtrační papír se sít'kami a poté se otevřela výpust vody. Během vypouštění se řasou udržovala a kontrolovala poloha blány, aby nedošlo k jejímu přilepení k okrajům vaničky. Po vypouštění vody byl filtrační papír, se sít'kami s nanesenou uhlíkovou blánou umístěn do Petriho misky a ponechán vyschnout do druhého dne.

5.2. Metoda nepřímého napařování

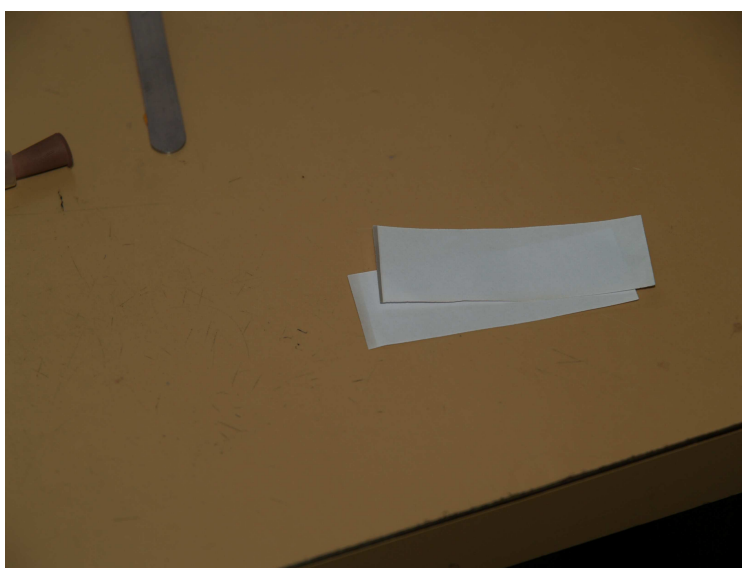
Postup přípravy uhlíkových blan metodou nepřímého napařování byl převzat z knihy *Methods of Preparation for Elektron Microscopy*, D.G. Robinson, 1987. Tato metoda je podobná s předchozí metodou. Rozdílem je, že se odštípnutá slída umísťuje do zákrytu, aby nedocházelo k přímému napaření atomů uhlíku. Tím zajistíme větší homogenitu povrchu uhlíkové blány.

Do pomůcky pro nepřímé napařování (Obr.7., vyrobeno technikem LEM, Jiřím Vaněčkem) se vložily dvě čisté mikroskopické sklíčka. Obě strany, na které se sklíčka pokládají, jsou nakloněny pod úhlem 45° vůči elektrodám.



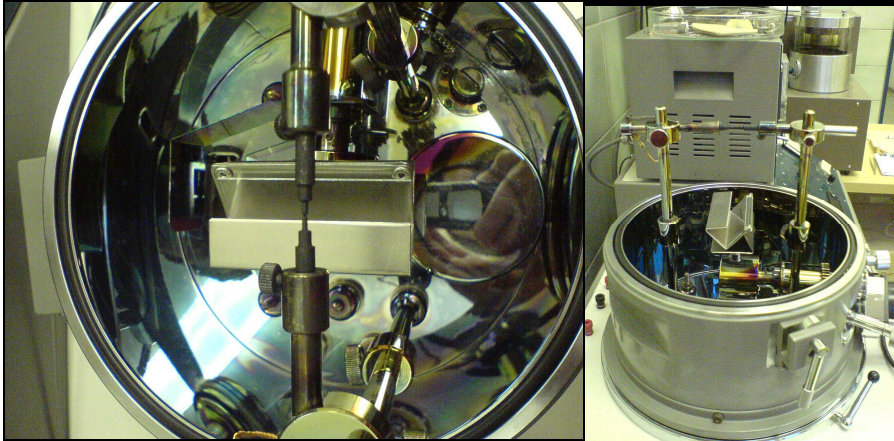
Obr.7. Pomůcka pro nepřímé napařování.

Pro orientační kontrolu množství napařeného uhlíku se umístily pod sklíčka proužky částečně přesahujícího, čistého, bílého papíru. Intenzita černého zbarvení papíru nám indikuje přibližnou tloušťku blány (Obr.8.).



Obr.8. Indikace tloušťky blány pomocí papíru.

Odštípnutá slída se položila na mikroskopické sklíčko, ležící na straně, která je zastíněná před přímým dopadem uhlíku. Druhé mikroskopické sklíčko umístěné naproti slídy, na nezakryté straně, bylo očištěno jarovou vodou a ethanolem a buničinou utřeno do sucha. Takto připravená pomůcka se položila na otočný stolek napařovací aparatury (Obr.9.).



Obr.9. Umístění pomůcky pro nepřímé napařování do napařovací aparatury.

Při vlastním uhlíkování jsou vypařené částice uhlíku odráženy z povrchu čistého sklíčka a nezakryté straně, nastaveného v 45° úhlu k elektrodám, a dopadají na čerstvě odštípnutý kousek slídy. Po pouhlíkování se blány ze slídy opět splavily ve splavovací vaničce, stejně jako v předchozím postupu, a filtrační papír se sítkami s nanesenou uhlíkovou blánou se nechal oschnout do druhého dne v Petriho misce.

6. Příprava vzorků

Virové suspenze byly připravovány bez přidání negativních barviv i metodou negativního barvení. Použily se sítky s uhlíkovou podložní blánou připravenou metodou nepřímého napařování. Při metodě negativního barvení byly použity, dvoustupňová sukcesivní kapací technika a technika plovací.

6.1. Příprava vzorků bez použití negativního barvení

Na kousek parafilmu byly nakapány, po 20 μ l, 4 kapky z každé virové suspenze. Na tyto kapky se pinzetou položily sítky pokryté uhlíkovou blánou. Virové suspenze se nechaly adherovat v časových intervalech 5, 15, 30 a 60 minut. Poté se sítky z kapek pomocí pinzety sejmuly a přebytečná tekutina byla odsátá filtračním papírem. Tyto sítky se uložily na čistý a suchý filtrační papír do Petriho misky.

Při druhém způsobu kapání byla síťka uchycena do pinzety a virová suspenze byla na ni nakapána. Z každé virové suspenze byly nakapány 4 kapky, po 20 μ l a viry se ponechaly adherovat v časových intervalech 5, 15, 30 a 60 minut. Po uplynutí požadované doby byl přebytek kapaliny ze sítěky odsát filtračním papírem a sítky byly uloženy na suché, čisté a bezprašné místo.

6.2. Příprava vzorků metodou negativního barvení

6.2.1. Dvoustupňová sukcesivní kapací technika

Suspenze virů byly nakapány, každá po jedné kapce, o 20 μ l, na síťky. Síťky byly za okraj uchyceny křížovou pinzetou. Tabáková mozaika se ponechala adherovat 5 minut, vláknitý bílý mozaikový virus jetele byl nechán na síťce 30 minut, virus klíšťové encefalitidy a virus tabákové nekrosy adheroval na síťce 30 a 60 minut. Po uplynutí požadované doby byl přebytek kapaliny ze síťky odsát filtračním papírem a na síťku bylo nakapáno negativní barvivo. Doba barvení byla 30 sekund, potom se přebytek tekutiny opět odsál filtračním papírem a síťky byly uloženy na filtrační papír do Petriho misky.

6.2.2. Plovací technika

Na kousek parafilmu byly nakapány suspenze virů, každá po jedné kapce o 20 μ l. Následně se na jiný, čistý kousek parafilmu nakapaly 20 μ l kapky negativních barviv (z každého typu barviva a z každé koncentrace, po jedné kapce). Na kapky virových suspenzí se pinzetou položily síťky pokryté uhlíkovou blánou. Síťky se na suspenzích ponechaly ve stejných časových intervalech, jako u předešlého postupu. Když uplynula požadovaná doba byl přebytek kapaliny ze síťky odsát filtračním papírem a síťka byla přenesena na kapku barviva, kde se nechala 30 sekund. Přebytek kapaliny byl opět odsát filtračním papírem a síťky byly umístěny do Petriho misky.

7. Aktivace povrchu uhlíkových blan metodou doutnavého výboje

Aktivace byla provedena v Laboratoři rostlinné fotosyntézy, na Ústavu molekulární biologie rostlin, Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích, za pomoci Ing. Zdenko Gardina. V této laboratoři byl pro provedení doutnavého výboje k dispozici nekomerční přístroj, zhotovený zaměstnanci laboratoře. Součástí přístroje jsou dvě aluminiové elektrody (o průměru 80 mm a tloušťce 120 mm), které jsou od sebe vzdálené 5 cm. K vyčerpání vnitřního prostoru slouží rotační pumpa. Před uskutečněním doutnavého výboje, jsem si zhotovila 15 elektronmikroskopických síťek, s podložní uhlíkovou blánou, připravenou metodou nepřímého napařování. Síťky jsem následně uschovala v Petriho misce, po dobu 40 dní, na suché, bezprašné a tmavé místo. Po uplynutí této doby jsem síťky vystavila doutnavému výboji.

Sít'ky byly položeny na filtrační papír, který se položil na speciálně zhotovený plastový držák, a s ním byly umístěny mezi elektrody. Sít'ky na držáku ležely v rovině a byly od elektrod vzdáleny 2,5 cm. Po vyčerpání prostoru, na tlak 10 Pa, bylo na elektrody aplikováno napětí 470 V. Časový interval působení doutnavého výboje na blány, byl 1 minuta. Během doutnavého výboje došlo ke zvýšení proudu na 15 mA a k barevnému přechodu z intenzivní purpurové na fialovou (negativně nabitě blány). Po nabití povrchu blan byly sít'ky z aparatury vyjmuty a ihned uloženy do Petriho misky.

8. Mikroskopy

K prohlížení preparátu byl použit vysokonapěťový elektronový mikroskop TEM JEOL 1010 od firmy JEOL a nízkonapěťový elektronový mikroskop LVTEM 5 od firmy Delong Instruments.

IV. Výsledky

Na základě vypracované literární rešerše byly prozkoumány a uváženy možnosti výběru vhodných typů virů. Muselo se přihlídnout k možnostem získání a dostupnosti virových suspenzí i k pracovním podmínkám, hlavně výbavě a možnostem laboratoře. Pro práci se mi podařilo získat od Dr. Daniela Růžka suspenzi viru myší klíšťové encefalitidy, která byla fixována v 2,5% glutaraldehydu. Další viry, poskytnuté Dr. Fránovou, byly - rostlinný virus tabákové mozaiky, tabákové nekrosy a bílý vláknitý mozaikový virus jetele. Tyto viry bylo nutné izolovat z dodaného rostlinného materiálu - podle návodu Dr. Fránové. Získané viry byly po tvarové i velikostní stránce rozmanité.

K prohlížení v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu se nejprve připravily nekонтastované preparáty. Viry tabákové nekrosy a klíšťové encefalitidy při pozorování zhotovených vzorků nebyly v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu patrné. Ani po té, co byly preparáty kontrastovány negativními barvivy, nešly tyto dva viry v LVEM 5 rozpoznat. Stejně vzorky byly následně prohlíženy ve vysokonapětovém elektronovém mikroskopu, kde se přítomnost viru tabákové nekrosy a klíšťové encefalitidy povedlo prokázat (Obrázek 1,2). Z prohlížených vzorků však bylo zřejmé, že koncentrace těchto virů v suspenzi je hluboko pod hodnotou 10^6 virových částic v 1 ml suspenze. V případě vláknitého viru jetele a tabákové mozaiky se podařilo viry zobrazit v obou mikroskopech, a to na nekонтastovaných i kontrastovaných preparátech.

Kvůli snaze zkoncentrovat virové suspenze byla provedena centrifugace. S ohledem na vybavení naší laboratoře byly suspenze nejprve centrifugovány v centrifuze Universal 32 (Hettich) - 30 minut při 18 000 RPM (RCF 23 910g). Poté byl supernatant každého viru přenesen do nové plastové zkumavky (Eppendorf) a ještě jednou se provedla centrifugace v centrifuze Minispin (Eppendorf) při otáčkách 13 400 RPM (RCF 12 100g) po dobu 20 minut. Po centrifugaci byly připraveny nové vzorky k prohlížení. U suspenzí virů tabákové mozaiky a bílého vláknitého mozaikového viru jetele byl pozorován zvýšený počet částic ve vzorku. V případě virových suspenzí klíšťové encefalitidy a tabákové nekrosy ke zvýšení počtu částic po centrifugaci nedošlo.

Druhým úkolem bylo modifikovat metodu negativního kontrastu pro potřeby nízkonapětového elektronového mikroskopu. Při této úloze byly použity čtyři druhy negativních barviv o třech vybraných koncentracích. Prvním barvivem byl vodný roztok octanu uranylu, dále to byl vodný roztok molybdenanu amonného, kyselina fosfowolframová

a vodný roztok oxidu osmičelého. Všechna barviva byla připravena v koncentracích 0,5%, 1% a 2% v zásobním množství 10 ml. K provedení metody negativního barvení byly vybrány dva postupy - plovací technika a dvoustupňová sukcesivní technika. Jako vhodnější metoda k přípravě vzorků se jevila plovací technika, protože při ní nedocházelo k tak výraznému zachycení nečistot na mikroskopickou síťku jako u sukcesivní techniky (Obrázek 3,4). Plovací technikou se také dosáhlo lepší distribuce, virových částic tabákové mozaiky a bílého vláknitého mozaikového viru na síťce.

Pro sestavení vhodného postupu k přípravě vzorků byla zkoušena doba nezbytná k přichycení virů na síťku. Byly použity čtyři časové intervaly - 5 minut, 15 minut, 30 minut a 60 minut. Během přípravy preparátů plovací technikou stačil časový úsek 5 minut k přichycení dostatečného počtu virových částic tabákové mozaiky a 30 minut stačilo k přichycení vláknitého viru. Při provedení dvoustupňové sukcesivní techniky k adsorpci virů na síťku postačily poloviční časové intervaly. Na zvýšení adsorpce virových částic tabákové nekrosy a klíšťové encefalitidy na síťku neměla vliv ani jedna z použitých technik, ani to, že se při adsorpci aplikovaly delší časy (30, 60 minut).

Po adsorpci virů na síťku se provedlo barvení. Negativní barvivo bylo ponecháno na síťce po dobu 30 sekund. Tato standardní doba k obarvení preparátů stačila.

Dalším úkolem bylo odzkoušet postup přípravy podložní uhlíkové blány metodou přímého a nepřímého napařování a ověřit její povrchové vlastnosti. Nejprve byla odzkoušena příprava uhlíkových blan metodou přímého napařování podle návodu Ing. Gardiana (Ústav molekulární biologie rostlin, Biologické centrum Akademie věd ČR v Českých Budějovicích), a poté byla odzkoušena příprava blan metodou nepřímého napařování podle návodu D.G. Robinsona. Blány byly připravovány v napařovací aparatuře JEOL JEE 4C napařením na kousek čerstvě odštipnuté slídy, a potom splaveny ve splavovací vaničce. V případě blan připravených metodou přímého napařování byl jejich povrch méně homogenní než u blan připravených metodou nepřímého napařování (Obrázek 5,6). Nevýhodou blan připravených oběmi metodami byla jejich fragilita při manipulaci. Pro omezení rozpadu blan při práci se osvědčilo použití elektronmikroskopických sítěk s velikostí otvorů 1000 MESH. Dalšího zlepšení pevnosti a homogenity blan bylo docíleno pozvolným přidáváním žhavícího proudu během vlastního uhlíkování. Hodnota žhavícího proudu, vhodná pro uhlíkování, se pohybuje mezi 30 až 40 A.

Pro zkoušení povrchových vlastností uhlíkových blan byly vybrány blány připravené metodou nepřímého napařování a jako modelový vir byla použita tabáková mozaika. Následujícími povrchovými vlastnostmi, které byly sledovány, byla hydrofilita povrchu blan

po uplynutí určitého časového období. Druhou vlastností byla délka hydrofility povrchu starých uhlíkových blan po jejich vystavení doutnavému výboji.

V případě prvního pokusu bylo připraveno 15 sítěk metodou nepřímého napaření, a poté byla sledována délka hydrofility povrchu blány v časových intervalech 1.den, 7. den, 14. den, 21. den a 40. den. První tři sítěky byly nakapány ihned po jejich zhotovení (1.den). Virová suspenze tabákové mozaiky byla na síťce ponechána po dobu 5 minut. Sítěky byly poté prohlíženy v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu. Na každé síťce bylo prohlédnuto 5 otvorů, na kterých byl spočítán počet virových částic, a tento počet byl zaznamenán. Takto bylo postupováno i u dalších sítěk v dalších časových intervalech. Po naměření byla data zpracována a následně vynesena do grafu v programu Microsoft Excel. Jak je viditelné na grafu hydrofility blan měřené v čase (Graf č.1), hydrofilita povrchu uhlíkových blan v čase lineárně klesá.

V případě doutnavého výboje bylo zhotoveno 15 sítěk metodou nepřímého napaření a tyto sítěky byly ponechány v uzavřené Petriho misce na suchém, čistém a tmavém místě po dobu 40 dní. Po uplynutí této doby byly sítěky vystaveny při napětí 470 V, jednu minutu, doutnavému výboji. První tři sítěky byly vystaveny doutnavému výboji 24 hodin před kapáním suspenze, další byly vystaveny doutnavému výboji 4 hodiny, 2 hodiny a 1 hodinu před kapáním. Poté byla na sítěky, které byly vystaveny doutnavému výboji, nakapána suspenze viru tabákové mozaiky. Nakapání suspenze na všechny sítěky proběhlo najednou. Suspenze byla na síťkách ponechána 15 minut. Sítěky byly prohlíženy v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu. Z každého časového intervalu byly prohlédnuty tři sítěky a na nich 4 otvory, kde byl spočítán počet virových částic. V původní plánu mělo být prohlédnuto pět otvorů na každé síťce. Z důvodu značného poškození uhlíkových blan se však tento záměr nepovedlo uskutečnit. Tento pokus byl ještě jednou opakován, kdy byly znovu připraveny sítěky metodou nepřímého napaření a ponechány odstát po dobu 40 dní. Měření mělo být provedeno ve více časových intervalech a to 96 hodin před kapáním, 48 hodin před kapáním, 24 hodin před kapáním, 16 hodin před kapáním, 4 hodiny před kapáním, 2 a 0 hodin před kapáním. Žel, z důvodu neobjasněné kontaminace sítěk se tento pokus nezdařil. Pro vytvoření grafu byly použity naměřené hodnoty z předešlého pokusu. Data byla zpracována a následně vynesena v programu Microsoft Excel. Jak je vidět na grafu hydrofility uhlíkové blány po vystavení doutnavému výboji (Graf č. 2.), počet virových částic adsorbovaných na povrch blány v čase exponenciálně klesá.

Posledním úkolem bylo porovnání výsledků identifikace použitého modelového viru na nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu s výsledky získanými pomocí vysokonapěťového

transmisního elektronového mikroskopu. Pro tento pokus byl jako modelový virus použit virus tabákové mozaiky. Suspenze byla před použitím zcentrifugována 2 minuty při 13 400 RPM (RCF 12 100g). Nejprve byly připraveny nekонтastované preparáty. Vzorky byly prohlíženy ve vysokonapěťovém elektronovém mikroskopu a následně v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu.

Při pozorování nekонтastovaných vzorků ve vysokonapěťovém elektronovém mikroskopu bylo možné vidět virové částice jen díky citlivosti CCD kamery (Obrázek č. 7,8)

Vzorky prohlížené v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu vykazovaly vysoký kontrast obrazu i bez použití negativního barviva (Obrázek 9,10). Ze stejné virové suspenze se připravily vzorky, které byly kontrastovány uvedenými roztoky negativních barviv. U preparátů prohlížených vysokonapěťovým elektronovým mikroskopem došlo k výraznému zvýšení kontrastu obrazu (Obrázek č. 11,12,13,14).

Kontrast obrazu v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu u negativně barvených preparátů nebyl nijak výrazně zvýšen a byl srovnatelný s kontrastem u nebarvených vzorků. Ani koncentrace roztoků negativních barviv, v rozmezí 0,5 až 2%, neměly žádný výrazný vliv na kontrast obrazu. Obarvením preparátů roztoky octanu uranylu a molybdenanu amonného byly zvýrazněny vnitřní struktury virových částic tabákové mozaiky (Obrázek č. 15,16). Roztoky oxidu osmičelého a kyseliny fosfowolframové ke zvýraznění vnitřní struktury virových částic nepřispěly (Obrázek č. 17, 18).

Preparáty barvené roztoky oxidu osmičelého, molybdenanu amonného a octanu uranylu jevíly pozitivní kontrast při prohlížení v LVEM 5. V případě preparátů barvených kyselinou fosfowolframovou byl pozorován kontrast negativní.

Při prohlížení vzorků v obou mikroskopech nebyly pozorovány žádné výrazné změny ve struktuře virových částic.

V. Diskuze

V dnešní moderní době, kdy člověk udělal mnoho významných pokroků ve většině oblastí biologie, medicíny a diagnostické techniky, se naskytá otázka, zda-li se v některých odvětvích dá dostat ještě někam dál. Před lety tato otázka vyvstala právě pro elektronovou mikroskopii, která se zdála být zmírajícím oborem, který už všechny své potenciály a možnosti vyčerpal. Časem se však ukázalo, že zatracovat elektronovou mikroskopii kvůli její přestárlosti je předčasné. Technický a materiální pokrok umožnil dále zdokonalovat elektronové mikroskopy po konstrukční a funkční stránce. Také nové metodiky přípravy vzorků dovolily elektronové mikroskopii posunout se „o krok dál“.

Elektronová mikroskopie měla dlouhá léta hlavní význam v diagnostice virových infekcí. Umožňovala po obarvení vzorků negativními barvivy rychlou morfologickou identifikaci, stejně tak i diferenciální diagnostiku různých infekčních agens přítomných ve vzorku. Dalšími nespornými výhodami byla její neselektivnost, schopnost morfologicky identifikovat všechny infekční agens v daném materiálu, včetně inaktivovaných virů a prázdných virionů, tzv. "open view and catch all" metoda (79,81). Viry mohou být detekovány v klinickém materiálu nejrůznějšího původu, jako je mozkomíšní mok, nosohltanové sekrety, extrakty stolice, moč a další. Elektronová mikroskopie však není vhodná pro screening většího množství vzorků(39,79,81).

Poté, co na diagnostickou scénu nastoupily mnohem sofistikovanější metody v podobě polymerázové řetězové reakce, imunofluorescenčních a sérologických metod, začala elektronová mikroskopie v diagnostice přicházet o své místo. Nové diagnostické metody jsou citlivější, ale nemívají stoprocentní úspěšnost v odhalení virů, bakterií nebo jiných infekčních činitelů. Alternativní imunologické a molekulární metody prokazují v materiálu antigeny, protilátky nebo nukleové kyseliny, což znamená, že jsou schopné identifikovat přítomnost genomového materiálu po předešlé úvaze (81). Navíc bývají tak specificky zaměřené, že se v některých případech diagnostiky musí těchto metod použít více, což vyžaduje více času i více peněz. Také výskyt zkřížených antigenních reakcí při sérologických metodách znesnadňuje diagnostiku virů. Většina diagnostických laboratoří používá alternativní metody, s výjimkou průkazu virů při akutních gastroenteritidách. Pro svou rychlou přípravu vzorků a jejich rychlé vyhodnocení má elektronová mikroskopie nezastupitelnou roli v případě bioterorismu. V současné době je v otázkách týkajících se elektronové mikroskopie uvažováno o jejím

využití při diagnostice nebezpečných infekčních onemocnění (Ebola, virus Marburg) nebo u komplikovaných a obtížných případů (lidé po transplantacích, imunodeficientní jedinci)(81).

V devadesátých letech minulého století přišla s další inovací v oblasti elektronové mikroskopie brněnská společnost Delong Instruments. Jak je všeobecně známo, biologické vzorky při pozorování v elektronovém mikroskopu vykazují velmi nízký kontrast. Z tohoto důvodu se při jejich zpracování musí zvýšit kontrast metodou negativního barvení (68,83). Nevýhodou použití kontrastování však je, že se vzdálíme skutečnému vzhledu pozorovaných objektů a negativní barviva jsou častým zdrojem artefaktů. Letitou snahou zakladatele společnosti, pana profesora Delona, bylo zkonstruovat nízkonapětový elektronový mikroskop, který by zvýšil kontrast zobrazovaných biologických vzorků bez přidání kontrastujících činidel. Po překonání řady technických komplikací se tento plán povedlo uskutečnit, a tak byl v Brně zkonstruován unikátní nízkonapětový elektronový mikroskop, pracující při urychlovacím napětí 5 kV(19,20,68,83).

Hlavním úkolem této magisterské práce bylo prozkoumat možnosti využití nízkonapětového elektronového mikroskopu LVEM 5 k identifikaci virů. Prvním důležitým krokem byl výběr vhodných virů. V druhé řadě také záleželo na možnostech získání virů a také na vybavení laboratoře, kde budou viry zpracovány. Pro práci se mi povedlo zajistit čtyři druhy virů - jeden živočišný a tři rostlinné. Vybrané viry byly po velikostní i tvarové stránce rozmanité. Nevýhodou však bylo, že virové suspenze nebyly dostatečně purifikované a koncentrace virových částic nebyla známa. Zvláště efektivita identifikace, pomocí elektronové mikroskopie, závisí na koncentraci a čistotě virových suspenzí (11). Máme-li suspenzi s koncentrací virů nižší než 10^6 částic v 1 ml, zobrazení virů je potom obtížné. Optimální koncentrace virových částic v 1 ml suspenze je 10^9 až 10^{12} (79). Podle některých autorů je pro diagnostiku virů přímou elektronovou mikroskopií dostačující již koncentrace virů 10^7 až 10^9 v 1 ml. Důležité také je, aby virus vykazoval zřetelnou morfologickou charakteristiku (21,46,79). Jiným aspektem, který může pomoci při zobrazování virů, je také velikost virových částic. Nejsnáze zobrazitelné jsou virové částice o velkých velikostech (70 – 400 nm), kdy často postačí i jejich menší koncentrace v suspenzi. V případě virových částic s menší velikostí (20-50 nm) je pro kvalitní zobrazení důležité mít již odpovídající koncentraci virů v suspenzi.

Zjistit koncentraci virů v suspenzi lze spektrofotometrickým měřením absorbance nukleové kyseliny při 260 nm. Podle toho vypočteme koncentraci, avšak její hodnota je orientační. Spektrofotometrické měření lze provést jen u dostatečně purifikovaných vzorků. Protože mé suspenze nebyly dostatečně purifikované, nebylo možno ke

spektrofotometrickému měření přistoupit, neboť nečistoty přítomné v suspenzi by značně zkreslovaly naměřené hodnoty.

Jednou z možností přečištění virové suspenze je použití metody centrifugace v sacharózovém gradientu. Žel, provedení této metody v mé práci chybí, protože v době, kdy jsem o její realizaci začala uvažovat, nebylo k dispozici funkční zařízení.

Při pozorování virových suspenzí tabákové nekrosy (28-32nm) a myší klíšťové encefalitidy (40-60nm) v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu nebyly virové částice rozpoznatelné. Následným kontrastováním zhotovených preparátů byla přítomnost těchto dvou virů v suspenzi prokázána ve vysokonapětovém elektronovém mikroskopu, kdy podle počtu nalezených virových částic bylo zřejmé, že koncentrace virů v suspenzi nebyla dostatečná. Toto zjištění potvrdilo, že optimální koncentrace virových částic v suspenzi, jak uvádí některé publikace, je jedním z důležitých předpokladů při identifikaci virů. Další dva získané viry, tabáková mozaika (300 x 18nm) a vláknitý bílý mozaikový virus jetele (480 x 13nm), byly v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu, díky své velikosti, dobře viditelné i v případě nektrastovaných vzorků. Virové částice tabákové mozaiky byly v suspenzi ve velkém počtu, oproti množství částic vláknitého bílého mozaikového viru, který tak vysoký nebyl.

Máme-li v suspenzi nízkou koncentraci virů, můžeme si částice zkoncentrovat centrifugací (7,77,79). Poté, co jsem provedla zkoncentrování virů centrifugací, došlo ke zvýšení počtu částic u preparátů tabákové mozaiky a bílého vláknitého mozaikového viru. Počet částic virů klíšťové encefalitidy a tabákové nekrosy se po centrifugaci nezvýšil. Je otázkou, proč u těchto dvou virů byla tak výrazně nízká koncentrace částic. Pravdou však je, že nedostatek virů mohl být zapříčiněn již jeho malým obsahem ve zpracovaném materiálu. Tabáková nekrosa byla izolována z listů tabáku, které byly z rostliny sesbírány náhodným výběrem. Je možné, že zamoření listů virem u této rostliny nebylo vysoké, tudíž ani při izolaci se nepodařilo získat více částic. Stejný případ mohl nastat u viru klíšťové encefalitidy, který byl izolován z myší mozkové tkáně. Na snížení počtu částic mohla mít vliv i samotná izolace, jelikož už během izolačních kroků dochází ke ztrátám izolovaných virů..

Vzhledem k tomu, že průměr tabákové mozaiky se pohybuje okolo 18 nm a průměr vláknitého viru je kolem 13 nm, je pravděpodobné, že pokud by byly viry tabákové nekrosy a klíšťové encefalitidy v suspenzi v dostatečném počtu, tak by jejich zobrazení pomocí nízkonapětového mikroskopu bylo možné.

Zavedením techniky negativního barvení bylo možné využít elektronovou mikroskopii ke studiu struktury virů, ale také aplikovat ji v diagnostice virových infekcí (2,21,79).

Barvením vzorků roztoky negativních barviv dosáhneme zesílení kontrastu málo kontrastních biologických vzorků, a také zvýrazníme různé povrchové substrukturální detaily pozorovaných virových částic. Na druhé straně se však vzdalujeme od skutečného vzhledu těchto částic a dalším důsledkem použití negativních barviv je vznik artefaktů.

Jedním z mých úkolů bylo vyzkoušet a porovnat zobrazení vzorků v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu s použitím kontrastujících činidel.

Prvním podstatným krokem před provedením metody negativního barvení byla volba vhodné techniky. V literatuře můžeme najít množství pracovních postupů - výběr záleží na tom, co od dané techniky požadujeme. Volbu metody může také ovlivnit typ klinického materiálu, ze kterého se budou vzorky připravovat, nebo druh viru přítomný v materiálu, protože při zpracování vzorků dochází u řady obalených virů k poškození struktury virových částic (77,78,79).

K provedení metody negativního barvení jsem si vybrala dvoustupňovou sukcesivní kapací techniku a techniku plovací. Zvolené techniky jsou nenáročné provedením i časově. Obě techniky jsou si postupem značně podobné, hlavní rozdíl je však v umístění elektronmikroskopické síťky. U sukcesivní techniky se síťka pokládá pod kapku suspenze i barviva, kdežto u techniky plovací se síťka naopak pokládá na kapku. Velmi dobrých výsledků jsem dosáhla zpracováním vzorků tabákové mozaiky a bílého vláknitého mozaikového viru plovací technikou. Použitím této techniky nedocházelo k zachycení tak velkého množství nečistot, jako u dvoustupňové sukcesivní techniky. Také distribuce virových částic na síťce byla v případě tabákové mozaiky, která byla dostatečně koncentrovaná, lepší. Podle mého mínění je vhodné použít plovací techniku u vysoce koncentrovaných suspenzí, kdy si můžeme zajistit rovnoměrné rozprostření virových částic na síťce. Důležitý je také časový interval, během kterého síťku necháme na kapce adherovat. Plovací technikou lze rovněž zpracovat virové suspenze, které nejsou dostatečně purifikované, protože nedochází k nachytání nečistot na síťku v tak velké míře jako u sukcesivní techniky. Použitím plovací techniky můžeme dosáhnout jakéhosi pomyslného naředění koncentrované suspenze, i když na to, kolik částic se na síťku nachytá, mají rovněž vliv povrchové vlastnosti použité podložní blány. V případě dvoustupňové sukcesivní techniky závisí adsorpce virů na síťku také na působení gravitační síly. Umístíme-li síťku pod kapku virové suspenze, částice vlivem své váhy naadsorbují na síťku ve větším počtu. Dvoustupňovou sukcesivní techniku je vhodné použít pro zpracování vysoce purifikovaných virových suspenzí s přiměřenou koncentrací virových částic. Čistota suspenzí je u této

techniky nutností, jelikož v případě znečištění se na sítku, vlivem gravitace, nachytá také větší množství nečistot.

Jak již bylo zmíněno výše, na výsledek adsorpce virů na sítku má také vliv doba, po kterou necháme suspenzi na síťce. V mých pokusech jsem vyzkoušela čtyři časové intervaly pro každou z technik. U dvoustupňové sukcesivní techniky stačily poloviční doby oproti technice plovací, což může mít souvislost s tím, že míra adsorbce je u této techniky značně ovlivněna i fyzikálními silami.

Pro svou práci jsem si zvolila tři druhy, v literatuře nejčastěji zmiňovaných, barviv (octan uranylu, kyselinu fosfowolframovou, molybdenan amonný) a jedno činidlo, které se primárně v elektronové mikroskopii používá jako fixační, ale jednou z jeho dalších vlastností je, že preparáty také kontrastuje (oxid osmičelý). Všechna negativní barviva jsem připravila ve formě vodných roztoků o třech koncentracích; 0,5%, 1% a 2%.

Doba barvení byla standardní, a to 30 sekund. Použití všech barvicích činidel v uvedených koncentracích nemělo žádný vliv na zvýšení kontrastu obrazu v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu. Ten byl srovnatelný s kontrastem u nebarvených preparátů. V případě uranyl acetátu a molybdenátu amonného došlo ke zvýraznění vnitřní struktury virových částic tabákové mozaiky.

V dalším z mých úkolů jsem měla odzkoušet postup přípravy uhlíkových blan metodou přímého a nepřímého napařování a ověřit jejich povrchové vlastnosti.

Snížíme-li energii urychlovacího napětí, dojde ke zmenšení hloubky průniku elektronů materiálem, a proto je pro nízkonapětový elektronový mikroskop nutné připravit preparáty tloušťky 20 až 30nm (19,20,68,83). Pokud je vrstva suspenze nanosená na sítku příliš silná, nemusí dojít k průniku elektronů vzorkem. Protože se k tloušťce preparátu přičítá i tloušťka blány, je důležité vybrat pro nízkonapětový mikroskop vhodný typ podložní blány. V přípravě vzorků pro vysokonapětovou elektronovou mikroskopii se nejčastěji používají formvarové blány s vrstvou napařeného uhlíku. Pro prohlížení v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu je už samotná tato podložní blána dost silná. Z tohoto důvodu je vhodné sítky pro nízkonapětový elektronový mikroskop pokrývat uhlíkovou blánou, jejíž tloušťka se pohybuje v rozmezí od 2 do 10nm. Nevýhodou však je, že čím je blána tenčí, tím je křehčí, a při manipulaci má tendenci se bortit. Tento nepříznivý vliv se mi povedlo zmírnit použitím sítěk s co nejmenší velikostí otvorů, 600-1000 MESH.

Vedle tloušťky je u uhlíkových blan žádoucí, aby jejich povrch byl homogenní. Uhlíkové blány lze připravit v napařovací aparatuře metodou přímého a nepřímého napařování. Rozdíl mezi těmito dvěma postupů je způsob napaření uhlíku na povrch slídy.

Kvalitnějšího homogenního povrchu blány jsem dosáhla metodou nepřímého napařování, kdy povrch slídy byl zastíněn před přímým dopadem atomů uhlíku. Během napařovacího procesu dochází k odpařování atomů a molekul uhlíku z elektrod, avšak kromě toho může docházet k uvolňování větších částic uhlíku, které na povrchu blan vytváří nehomogenní oblasti. Zastíněním slídy zabráníme přímému napaření těchto nestejně velkých částic na blánu, protože vlivem své váhy se neodrazí od mikroskopického sklíčka tak snadno, jako mnohem lehčí atomy.

Dalšího zlepšení pevnosti a homogenity blan se mi povedlo docílit při vlastním uhlíkování, kdy jsem elektrody začala pomalu žhavit pozvolným přidáváním žhavícího proudu, a později ho ustavila na hodnotách mezi 30 – 40 A. Příliš rychlým žhavením elektrod dochází ke "skokovému" zvýšení teploty v místě jejich spojení a kromě atomů uhlíku se uvolňují i větší partikule uhlíku. Postupným žhavením elektrod tomu můžeme zabránit.

Povrch uhlíkových blan je čerstvě po napaření dobře smáčitelný, tudíž objekty na blánu lépe adherují. S časem však povrch blan stárne, hydrofilita se pomalu vytrácí a povrch blan začíná být hydrofóbní. Příčinou jsou kromě stárnutí také kontaminace blan, které smáčitelnost rovněž snižují (9,37,78). Dokud je nově zhotovená blána umístěna ve vakuovém prostoru napařovací aparatury, kontaminace povrchu nehrozí. Avšak již prvním vyjmutím blan z aparatury dojde k znečištění jejich povrchu okolním prachem, který se nachází ve vzduchu. Zamezit nachytání nečistot na povrch blány zcela nejde. Můžeme to však omezit tím, že budeme pracovat v čistém, bezprašném prostředí a k přípravě použijeme čisté pomůcky.

Podle sledování, která jsem prováděla, dostatečně hydrofilní povrch blan vydrží 14 dní . Po uplynutí této doby, kolem dvacátého dne od napaření, pozorované objekty na blánu také ještě adherují, i když již ve výrazně menším množství. Smáčitelnost blan starých více než 30 dní je již viditelně omezena a k adsorpci částic již skoro nedochází. Vliv na pomalé vytrácení povrchového náboje mělo, kromě kontaminací, právě postupné stárnutí podložních blan. Hydrofilitu povrchu u starých uhlíkových blan lze obnovit chemickou cestou nebo doutnavým výbojem. Je-li doutnavý výboj proveden v atmosféře vzduchu, bude povrch blány opět hydrofilní a negativně nabitý. Náboj na povrchu vydrží řádově v minutách až hodinách. Jedním z důvodem rychlého vymizení náboje byly opět kontaminace povrchů. Kvalita blan, po doutnavém výboji, značně závisí na pracovních podmínkách a čistotě aparatury. Také pozice a vzdálenost sítěk vůči elektrodám nám ovlivňuje vlastnosti blan. Doutnavý výboj lze opakovat po pěti až osmi dnech, rizikem však je, že časté vystavování uhlíkových blan výboji způsobí jejich rozpad pod elektronovým svazkem.

Ačkoliv je známo, že vakuové podmínky během napařování ovlivňují míru hydrofobicity blan, stále není známo, co přesně se během napařování odehrává. Je také zřejmé, že na smáčitelnost blan po napařování i po doutnavém výboji nemá vliv pouze povrchový náboj. Kdyby vše záleželo na povrchovém náboji, ke ztrátě hydrofilicity by došlo mnohem rychleji, protože náboj je z povrchu odnímán při kontaktu s molekulami vzduchu, nečistotami, pinzetou aj. Jaké změny se na povrchu uhlíkové blány odehrávají, není zřejmé. Může to být způsobeno změnami sil na povrchu látky nebo změnami dipólových momentů atomů a molekul. Naskytá se otázka, co by se dělo s povrchem blan, kdyby byly po napaření nebo doutnavém výboji uschovány v atmosféře vakua.

Posledním úkolem této práce bylo porovnat výsledky identifikace zvoleného modelového viru mezi nízkonapětovým a vysokonapětovým elektronovým mikroskopem. Jako modelový virus jsem si vybrala tabákovou mozaiku, jelikož tento virus byl v suspenzi přítomen v dostatečné koncentraci a byl dobře identifikovatelný v obou typech mikroskopu. Vysokonapětový elektronový mikroskop potvrdil, že je stále přístrojem, který má v identifikaci virů svou úlohu. Dokonce i bez přidání kontrastujících činidel bylo možné, díky citlivosti CCD kamery, pozorovat virové částice, i když s velmi nízkým kontrastem. Příčinou pravděpodobně byly nečistoty v suspenzi, které obklopily naadherované virové částice, a tím je trochu zvýraznily.

Velkým překvapením byl nízkonapětový elektronový mikroskop, který jevil velmi vysoký kontrast i bez přidání negativního barviva. LVEM 5, oproti jiným standardním přístrojům pracujícím s energií 100 kV, dosahuje asi dvacetinásobného kontrastu. Takto vysoký kontrast vzniká zásluhou zvýšené rozptylové schopnosti atomů, při nízké energii elektronů a převahou elastického rozptylu při interakci urychlených elektronů s preparátem (82). Použití nízkonapětového elektronového mikroskopu nám umožnilo přiblížit se nativnímu stavu pozorovaného objektu, a také eliminovat výskyt možných artefaktů, které při barvení preparátů vznikají. Protože vzorky pro nízkonapětový elektronový mikroskop nemusíme kontrastovat, odpadá tím jeden z kroků jejich přípravy. Díky tomu je identifikace virů pomocí nízkonapětového elektronového mikroskopu zase „o krok“ rychlejší.

Při prohlížení kontrastovaných vzorků v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu byl v případě tří použitých negativních barviv pozorován pozitivní kontrast. Pozitivní kontrast vykazovaly preparáty barvené octanem uranylu, molybdenanem amonným a oxidem osmičelým. Jediná kyselina fosfowolframová obarvila vzorky negativně. Tyto stejné vzorky byly prohlíženy i ve vysokonapětovém elektronovém mikroskopu, kde byl u všech preparátů pozorován kontrast negativní. Tento jev zatím nebyl nikde popsán, pravděpodobnou příčinou

však mohou být interakce primárních elektronů o nízké energii s povrchem kontrastovaných virových částic. Použití kontrastujících činidel v případě nízkonapětového elektronového mikroskopu není nezbytné. V případě, že by bylo požadováno zvýraznění vnitřních struktur virové částice, je možné použít uranyl acetát nebo molybdenan amonný v rozmezí koncentrací 0,5 až 2%. Během prohlížení připravených preparátů v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu nebyly objeveny žádné výrazné strukturální změny virových částic, v porovnání s vysokonapětovým elektronovým mikroskopem.

Současný nízkonapětový elektronový mikroskop je široce aplikovatelný v biologickém výzkumu stejně, jako v lékařské diagnostice. V zahraničí se úspěšně osvědčil při studiu polymerů, virů a jiných biologických vzorků. Nově vyvinutý nízkonapětový elektronový mikroskop se do budoucna jeví jako velice přínosný pomocník v diagnostických metodách.

VI. Závěry

- Pro práci se povedlo získat čtyři, tvarově i velikostně, rozdílné typy virů, k vypracování metodického postupu.
- Při zpracování vzorků, byly vyzkoušeny a metodicky přizpůsobeny dvě techniky negativního barvení. Tyto techniky se pozitivně osvědčily, při přípravě vzorků pro nízkonapěťový i vysokonapěťový transmisní elektronový mikroskop.
- Během práce byly odzkoušeny postupy přípravy uhlíkových blan metodou přímého a nepřímého napařování. Blány připravené metodou nepřímého napařování se vyznačovaly lepší homogenitou povrchu, než blány připravené metodou přímého napařování. Bylo ověřeno, že hydrofilita povrchu blan se časem vytrácí. Vystavíme-li staré a hůře smáčitelné blány působení doutnavého výboje, hydrofilní povrch blan vydrží řádově několik hodin.
- Porovnáním výsledků identifikace zvoleného modelového viru mezi HV TEM a LVEM 5, nebyly objeveny žádné výrazné strukturální změny. V případě LVEM 5 se osvědčilo kontrastování preparátů některými použitými barvivy, pro zvýraznění vnitřní struktury virové částice. Jinak však použití kontrastujících činidel, v případě LVEM 5, není nezbytné. Naopak pro kvalitní identifikaci vzorků v HV TEM, je použití negativních barviv nutné.

VII. Přehled literatury

1. **Almeida J. D.** Practical aspects of diagnostic electron microscopy. *Yale J. Biol. Med.* 1979; 53: 5-18.
2. **Almeida J. D.** Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. *Curr. Top Microbiol. Immun.* 1983; 104:147-57.
3. **Anderer F.A., Schlumberger H.D., Koch M.A., Frank H., Eggers H.J.** Structure of simian virus 40. II. Symmetry and components of the virus particle. *J. Virology.* 1967; 32(3): 511-23.
4. **Anderson N., Doane F.W.** Argar diffusion method for negative staining of microbial suspensions in salt solution. *Appl. Microbiol.* 1972; 24: 495-499.
5. **Appleton H., Higgins P. G.** Viruses and gastroenteritis in infants., *Lancet.* 1975; 1: 1297.
6. **Balayan M. S., Andjaparidze A. G., Saninskaya S. S., Ketiladze E. S., Savinov A. P., Braginsky D. M., Poleschuk V. F.** Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted by the feacal oral route. *Intervirology.* 1983; 20: 23-31.
7. **Barth O. M.** The use of polylysine during negative staining of viral suspensions. *J Virol Methods.* 1985; 11(1): 23-7.
8. **Bednář M. a kolektiv.** Lékařská mikrobiologie. *Marvil* 1996; 1: 367- 478.
9. **Benada O., Pokorný V.** Modification of the polaron sputter-coater unit for glow-discharge activation of carbon support films. *J. of El.Micro. Tech.* 1990;16: 235-239.
10. **Biel S. S., Gelderblom H. R.** External quality assessment scheme in electron microscopic virus diagnostics. *Progress in Clinical Virology IV*, Hamburg 1998, Abstract 277, 49.
11. **Biel S. S., Gelderblom H. R.** Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method., *J. Clin. Virol.* 1999; 13: 105-19.
12. **Biel S. S., Nitsche A., Kurth A., Siegert W., Özel M., Gelderblom H. R.** Detection of polyomaviruses in urine from bone marrow transplant patients: comparison of electron microscopy with PCR., *Clin. Chem.* 2004; 50: 306-312.
13. **Bozzola J. J., Russell L. D.** Electron microscopy – Principles and techniques for biologists. *Jones and Bartlett Publ.* Boston 1992.
14. **Bradley D.E.** A study of the negative staining process. *J. gen. Microbiol.* 1962; 29: 503-516.
15. **Brenner S., Horne R. W.** Negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta* 1959; 34: 103-10.

16. **Cossart Y. E., Field A. M., Cant B., Widdows D.** Parvovirus-like particles in human sera., *Lancet* 1975; 1: 72-73.
17. **Curry A., Appleton H., Dowsett B.** Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: *Present and future. Mic.* 2006; 37: 91-106.
18. **Dane D. S., Cameron C. H., Briggs M.** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-698.
19. **DeLong A.** Low voltage TEM. *El. Micro.* 1992; 1: 79-81.
20. **DeLong A., Hladil K., Kolařík V.** A low voltage transmission elektron microscope. *Eur. Micr. And Anal.* 1994; 27: 13-15.
21. **Doane F. W.** Virus morphology as an aid for rapid diagnosis. *J Biol Med.* 1980; 53(1): 19-25.
22. **Dykstra J. M., Reuss L. E.** Biological electronmicroscopy (Theory, Techniques, and Troubleshooting). *Kluwer Academic/Plenum Publisher, Second edition.* 2003: 241-284.
23. **Fabergé A. C., Oliver R.M.** Methylamine tungstate, a new negative stain. *J. Microscopic.* 1974; 20: 241–246.
24. **Falsey A. R., Walsh E. E.** Novel coronavirus and severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003; 361: 1312-1313.
25. **Feinstone S. M., Kapikian A. Z., Purcell R. H.** Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science.* 1973; 182: 1026-1028.
26. **Flewett T. H., Bryden A. S., Davies H. A., Morris C. A.** Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet.* 1975; 1: 4-5.
27. **Gabor D.** The electron microscope , *Electronic Engineering Technical Monographs. Hulton Press.* 1945.
28. **Gardner S. D., Field A. M., Coleman D. V., Hulme B.** New human papovavirus (BK) isolated from urine after transplantation. *Lancet.* 1971; 1: 1253-1257.
29. **Gelderblom H. R., Hazelton P. R.,** Specimen collection for electron microscopy. *Emerg. Infect. Dis.* 2000; 6: 433-4.
30. **Gordon C. N.** The use of octadecanol monolayers as wetting agents in the negative staining technique. *J. Ultrastruct. Res.* 1972; 39(1): 173-85.
31. **Gregory D. W., Pirie B. J.** Wetting agents for biological electronmicroscopy. II. Shadowing. *J. Microsc.* 1973; 99(3): 267-78
32. **Halpin K., Young P. L., Field H. E., Mackenzie J. S.** Isolation of Hendra virus from

pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gener. Virol.* 2000; 81: 1927-1932.

33. **Harris J. R., Horne R. W.**, Negative staining: A brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities. *Micron.* 1994; 25: 5-13.
34. **Harris J. R.** Negative staining and cryoelectron microscopy. *Royal Microscopic Society Microscopy Handbooks 35.* Oxford: Bios Scientific Publishers, 1997.
35. **Hawkes P. W.** The beginnings of electron microscopy. *Adv. Electron Phys., Suppl.* Orlando: Academic Press. 1995; 16.
36. **Hayat M. A., Miller S. E.** Negative staining. NY : McGraw-Hill. 1990.
37. **Hayat M. A.** Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. Cambridge: Cambridge University Press., Fourth edition. 2000: 237-240.
38. **Hazelton P. R., Aoki F. Y., Hammond G. W., Coombs K.M., Dawood M.** Identification of a proposed novel agent of viral gastroenteritis. 18th Annual Meeting of the American Society for Virology; 1999; 10-14; Amherst, MA. Washington: American Society for Microbiology. Abstract W8-8, p.73.
39. **Hazelton P. R., Gelderblom H. R.** Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 294-303.
40. **Horne R. W., Wildy P.** Symmetry in virus architecture. *Virology.* 1961; 15: 348-373.
41. **Horne R. W.** Techniques for electron microscopy (ed. D.K. Kay) 2 vydání, Blackwell Scientific Publications Oxford, str.328,1965..
42. **Horne R. W.** Methods in virology (ed. K. Maramorosch& H. Koprowski) Vol 3. Accademic Press New York- London. 1967; str. 521.
43. **Horne R. W.** Virus structure. Academic Press, New York. 1974; 1-52.
44. **Horne R. W., Ronchetti I. P.** Preparative procedures for examining icosahedral and filamentous viruses. *J. Ultrastruct. Res.* 1974; 47(3): 361-83.
45. **Hosoi J., Matsuo T.** Radiation-induced changes in the images of a negatively stained specimen. *Ultramicroscopy.* 1982; 7: 233-240.
46. **Hsiung G. D., Fong C. K. Y., August M. J.** The use of electron microscopy for diagnosis of virus infections: an overview. *Prog. Med. Virol.* 1979; 25: 133-159.
47. **Chua K. B., Goh K. J., Wong K. T., Kamarulzama A., Tan P. S., Ksiazek T. G., Zaki S. R., et al.** Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet.* 1999; 354: 1257-1259.
48. **Kalina T.** Základy elektronové mikroskopie. Univerzita Karlova. 1981.
49. **Kapikian A. Z., Wyatt R. G., Dolin R., Thornhill T. S., Kalica A. R., Chanock R. M.**

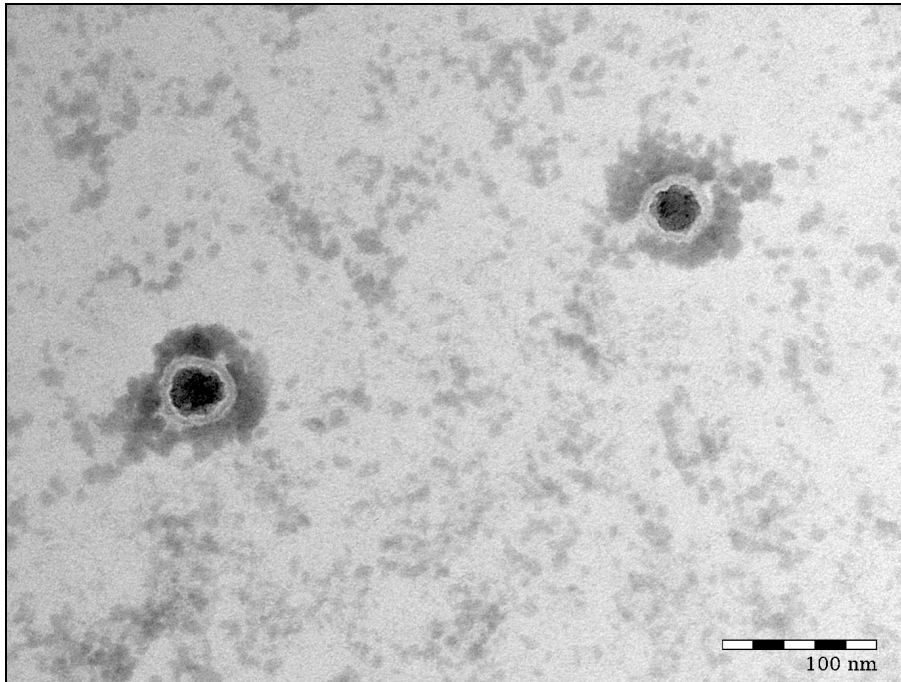
Visualization by immune electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 1972; 10: 1075-81.

50. **Kapikian A. Z.** The discovery of the 27 nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Inf. Dis.* 2000; 181(Suppl.2): S295-S302.
51. **Kelen A.E., Hathaway A. E., McLeod D. A.** Rapid detection of Australia-SH antigen and antibody by a simple and sensitive technique of immunoelectronmicroscopy. *Ca. J. Microbiol.* 1971; 17(7): 993-1000.
52. **Knoll M., Ruska E.** Das elektronenmikroskop. *Zeit. Phys.* 1932; 78: 318-329.
53. **Krüger D. H., Schneck P., Gelderblom H. R.** Sixty years ago: Helmut Ruska and the visualization of viruses. *Lancet.* 2000; 355: 1713-7.
54. **Ksiazek T. G., Erdman D., Goldsmith C. S., et al.** A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England J. Med.* 2003; 348. 1953-1966.
55. **Kurtz J. B., Lee T. W.** Astroviruses. human and animal., *In: Novel Diarrhoea Viruses. CIBA Foundation Symposium 128. Wiley, New York* 1987. pp. 92-107.
56. **Lawrence F. D., et al.** Low-voltage elektron microscopy of polymer and organic molecular thin films. *Ultramicro.* 2004; 99: 247-256.
57. **Madeley C. R., Cosgrove B. P.** 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet.* 1975; 2: 451-2.
58. **Madeley C. R., Cosgrove B. P.** Caliciviruses in man. *Lancet.* 1976; 1: 199-200.
59. **Madeley C. R., Field A. M.** Virus morphology, second ed. Churchill Livingstone. 1988.
60. **Madeley C. R.** Origins of electron microscopy and viral diagnosis. *J. Clin. Path.* 1997; 50: 454-456.
61. **Mayo M. A.** A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 2002; 147: 1655-1656.
62. **Müller G., Peters D.** Substructures of vaccinia virus,demonstrated by negative kontrast. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1963. 26;13:435-51.
63. **Müller G.** Methodenensammlung der elektronenmikroskopie (ed. G. Schimmel &M. Vogel). *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH Stuttgart*, kap.3.1.2.3,1971.
64. **Murray K., Selleck P., Hooper P., et al.** A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science.* 1995; 268: 94-97.
65. **Nagington, J.** Elektron microscopy in differential diagnosis of poxvirus infections.*Brit. Med. J.* 1964; 2: 1499.
66. **Nagler F. P. O., Rake G.** The use of elctron microscopy in diagnosis of variola, vaccinia and varicella. *J. Bacteriol.* 1948; 55: 45-51.

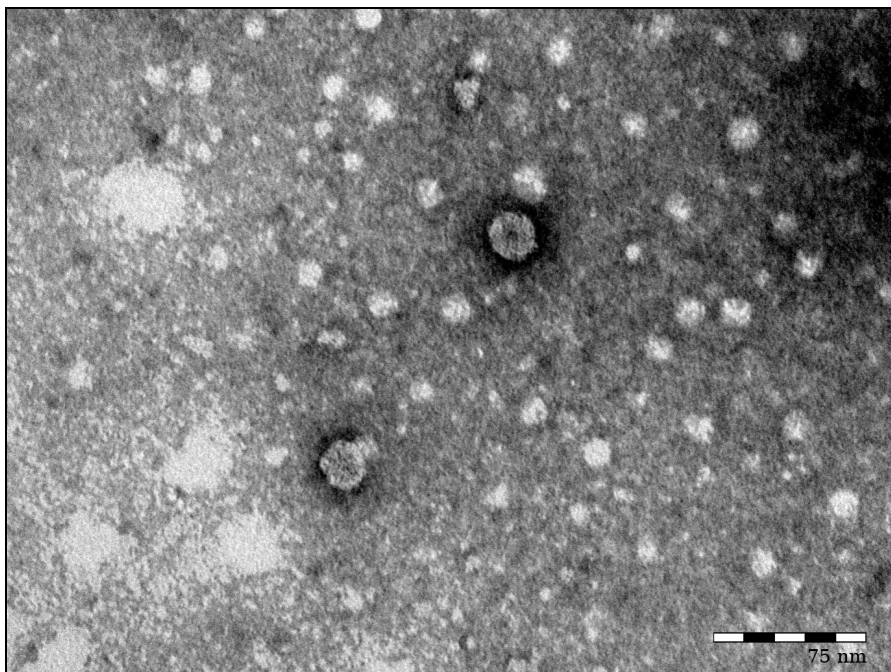
- 67. Nanninga. N.** The conformation of the 50S ribosomal subunit of *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1968; 61: **614**.
- 68. Nebesářová J., Vancová M.** Preparation of different biological objects for low voltage electron microscope. *IMC16, Sapporo*, 2006; 500.
- 69. Nermut M. V., Frank H.** Fine Structure of Influenza A2 (SINGAPORE) as revealed by negative staining, freeze-drying and freeze-etching. *J. Gen. Virol.* 1971; 10: 37-51.
- 70. Nermut M. V.** Negative staining of viruses. *J. Microsc.* 1972; 96(3): 351-62.
- 71. Nermut M. V.** New developments in practical virology (ed. C.R. Howard). Alan R. Liss New York, 1982.
- 72. Nermut M. V.** General principles of virus architecture. In: Nermut M. V., Steven A. C. (Eds.), *Animal Virus structure Perspectives in Medical Virology*, vol. 3. *Elsevier, Amsterdam*. 1987; 3-18.
- 73. Nermut M. V., Hockley D. J., Gelderblom H.** Electron microscopy: methods for studies of virus particles and virus infected cells. In: Nermut, M. V., Steven A. C. (Eds.), *Animal Virus structure Perspectives in Medical Virology*, vol. 3. *Elsevier, Amsterdam*. 1987; 21-33.
- 74. Parashar U. D., Hummelman E. G., Bresee J. S., Miller M. A., Glass R. I.** Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emer. Inf. Dis.* 2003; 9: 565-572.
- 75. Peters D., Nielsen G., Beyer M. E.** Variola: die Zuverlässigkeit der elektronenmikroskopischen Schnell Diagnostik., *Dtsch. Med. Wschr.* 1962; 87:2240-6.
- 76. Plummer F. A., Hammond G. W., Forward K., Sekla L., Thompson L. M., Jones S. E., et al.** An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313: 74-9.
- 77. Robards A. W., Wilson A. J.** Procedures in electron Microscopy. *John Wiley & Sons*. 1993. 4:6.7-4:6.32.
- 78. Robinson D. G., Ehlers U., Herken R., et al.** Methods of Preparation for Electron Microscopy. *Springer-Verlag*. 1987; 16-19,76-80.
- 79. Rýc M., Čiampor F., Wagner M.** Elektronová a imunoelektronová mikroskopie ve virologii. *Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, Praha*. 1989.
- 80. Sabatini D. D., Bensch K., Barnett R. J.** Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 1963; 17: 19-58.

- 81. Schramlová J.** Výhody a nevýhody diagnostiky metodou elektronové mikroskopie. *Zprávy CEM*. 2004;13(8):1-4.
- 82. Starý V., Nebesářová J.** Contrast of karbon in low-voltage elektron microscopy-Monte-Carlo simulation. *El. Micro.and Anal.* 2007: 1-4.
- 83. Štěpán P.** Nízkovoltový prozařovací elektronový mikroskop. *Vědecko-technický časopis*. 2005; 2: 52.
- 84. Tyrrell D. A. J., Almeida J.** Direct electron-microscopy of organ cultures for the detection and characterization of viruses. *Arch Virusforsch* 1967; 22: 417-25.
- 85. van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Carstens E. B., Estes M. K., Lemon S. M., et al.** Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses, 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: *Academic Press*; 2000.
- 86. van Rooyen C. E., Scott M. A.** Smallpox diagnosis with special reference to electron microscopy. *Can. J. Pub. Health*. 1948; 39: 467-77.
- 87. Williams D. B., Carter C. B.** Transmission elektron microscopy, a text book for material science. Plenum press. New York-London. 1996.
- 89. Zu Rhein G. M., Chou S.-M.** Particles resembling papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science*. 1965; 148: 1477-1479.

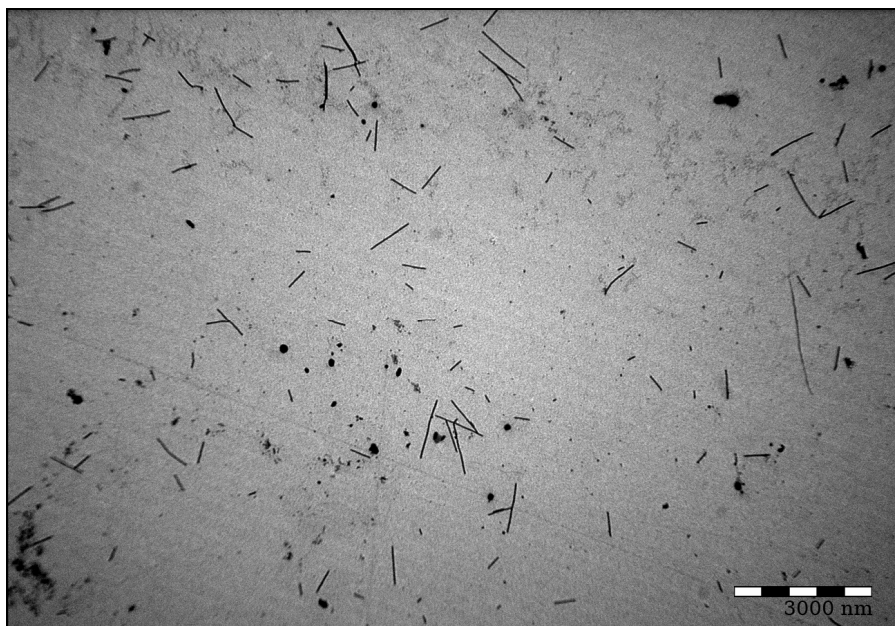
VIII. Příloha



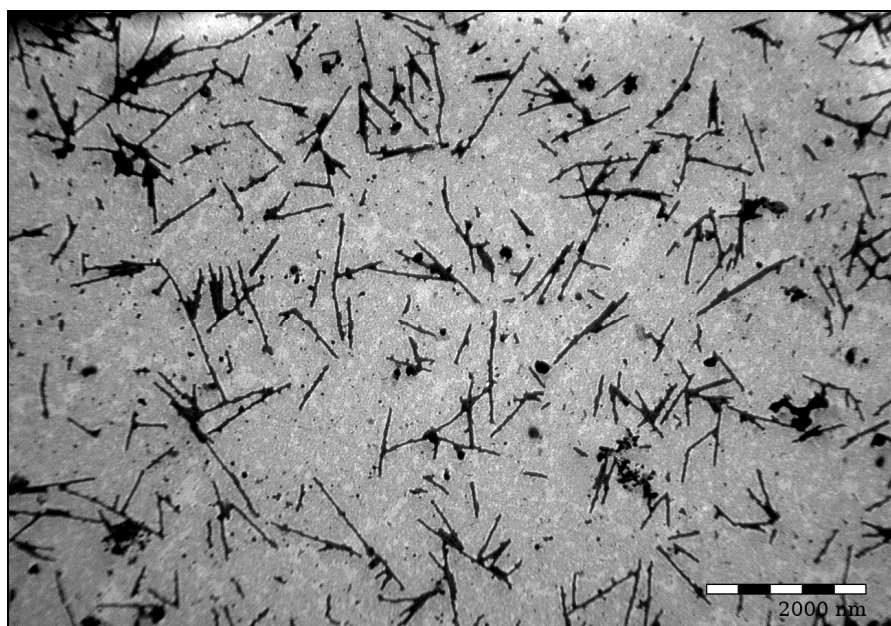
Obrázek č. 1. Virus myší klíšťové encefalidity, negativně barvený 2% kyselinou fosfowolframovou, (zvětšeno 150 000x, **HV TEM JEOL 1010**).



Obrázek č. 2. Virus tabákové nekrosy, negativně barvený 2 % octanem uranylu, (zvětšeno 150 000 x, **HV TEM JEOL 1010**).



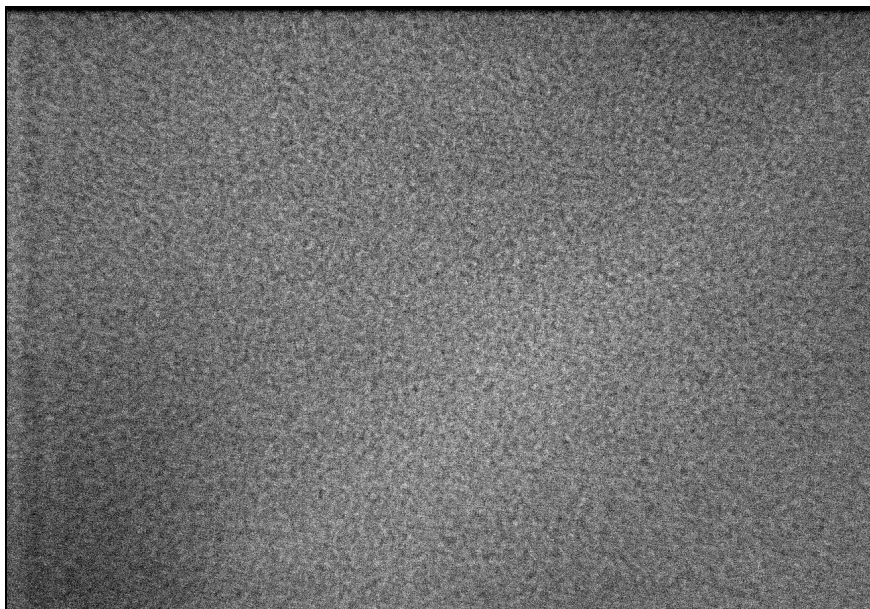
Obrázek č. 3. Preparát tabákové mozaiky zhotovený plovací technikou, nekontrastováno, (zvětšeno 20 000x, **LVEM 5**)



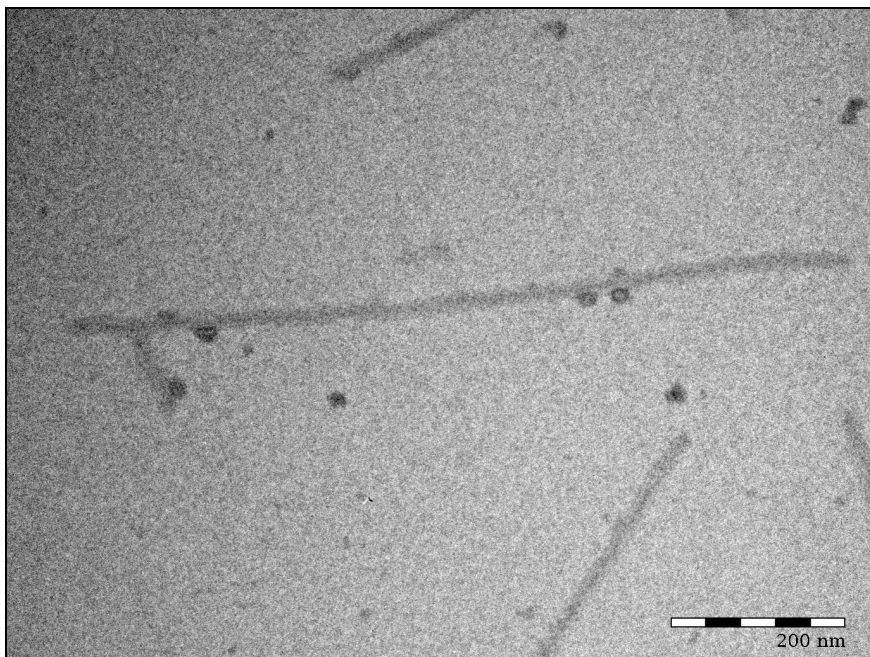
Obrázek č. 4. Preparát tabákové mozaiky zhotovený dvoustupňovou sukcesivní technikou, nekontrastováno, (zvětšeno 35 000x, **LVEM 5**)



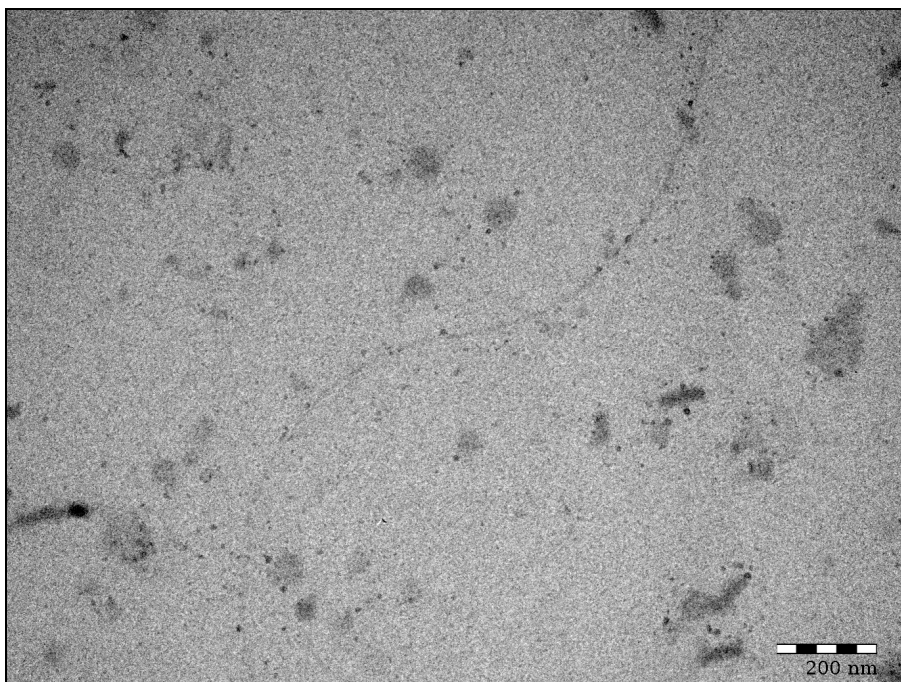
Obrázek č. 5. Uhlíková blána zhotovená metodou přímého napaření, nekcontrastováno, (zvětšeno 145 000x, **LVEM 5**).



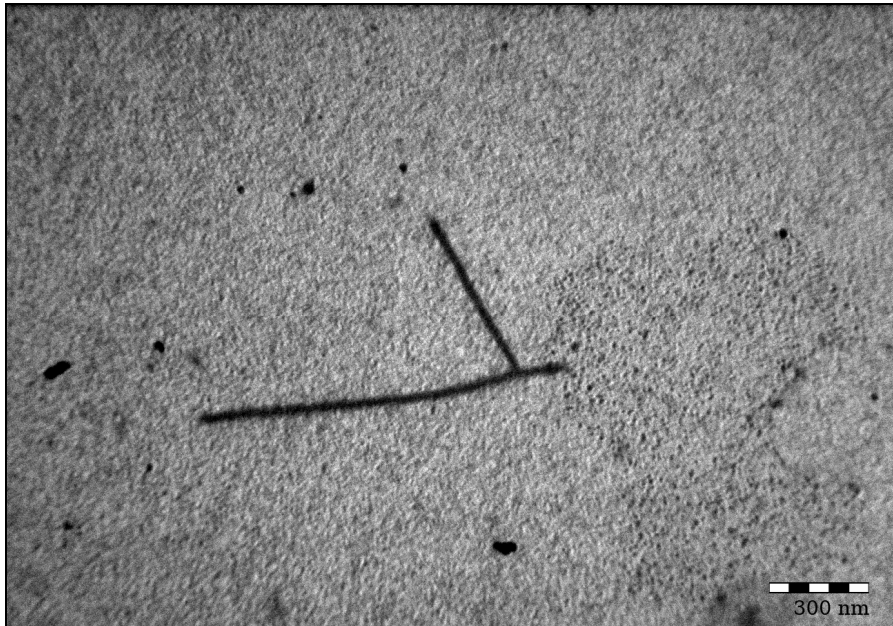
Obrázek č. 6. Uhlíková blána zhotovená metodou nepřímého napaření, nekcontrastováno, (zvětšeno 145 000x, **LVEM 5**).



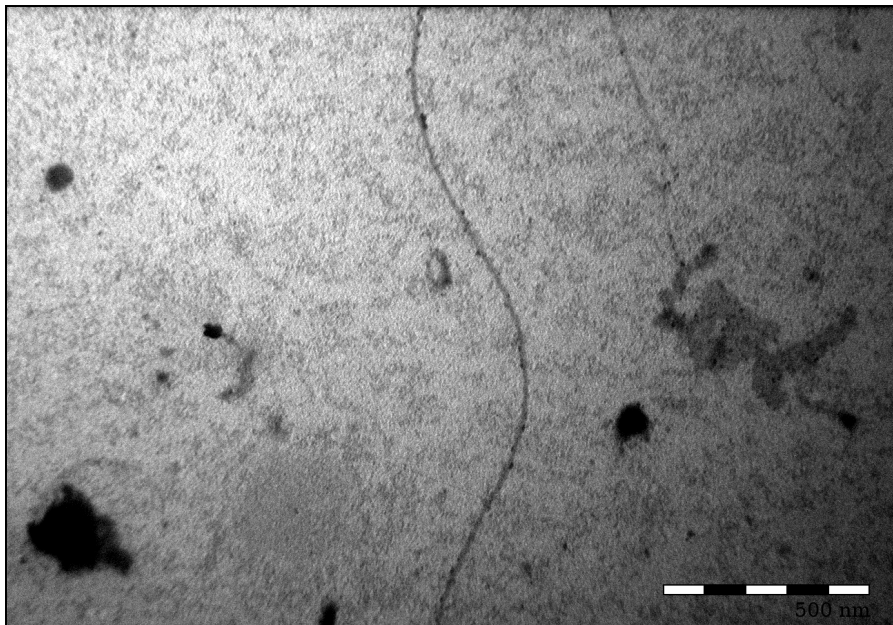
Obrázek č. 7. Virus tabákové mozaiky, nektrastováno, (zvětšeno 150 000x, **HV TEM JEOL 1010**).



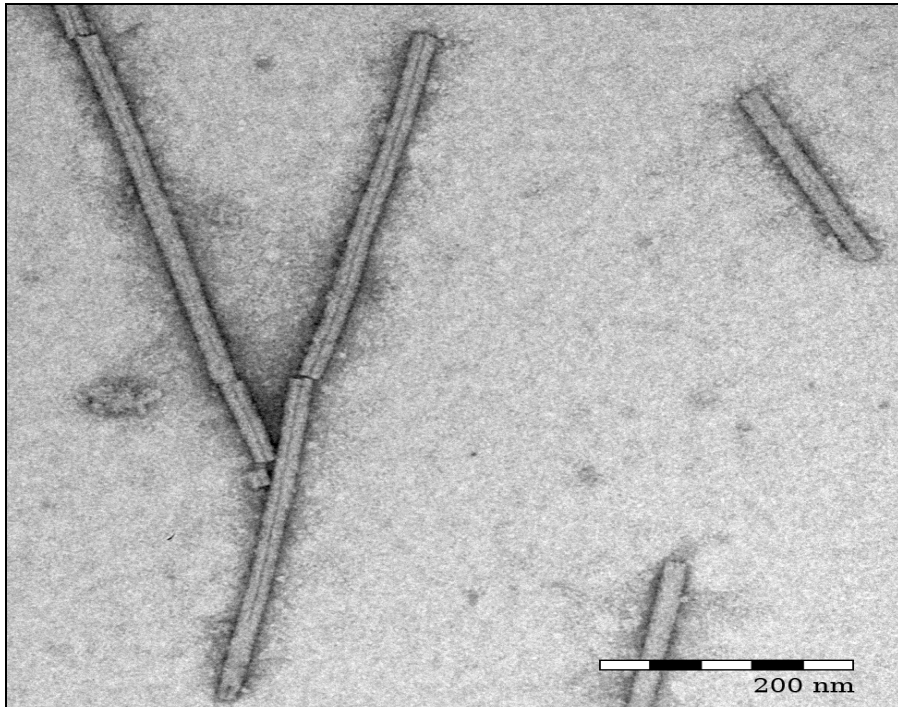
Obrázek č. 8. Vlákknitý bílý mozaikový virus jetele, nektrastováno, (zvětšeno 50 000x, **HV TEM JEOL 1010**).



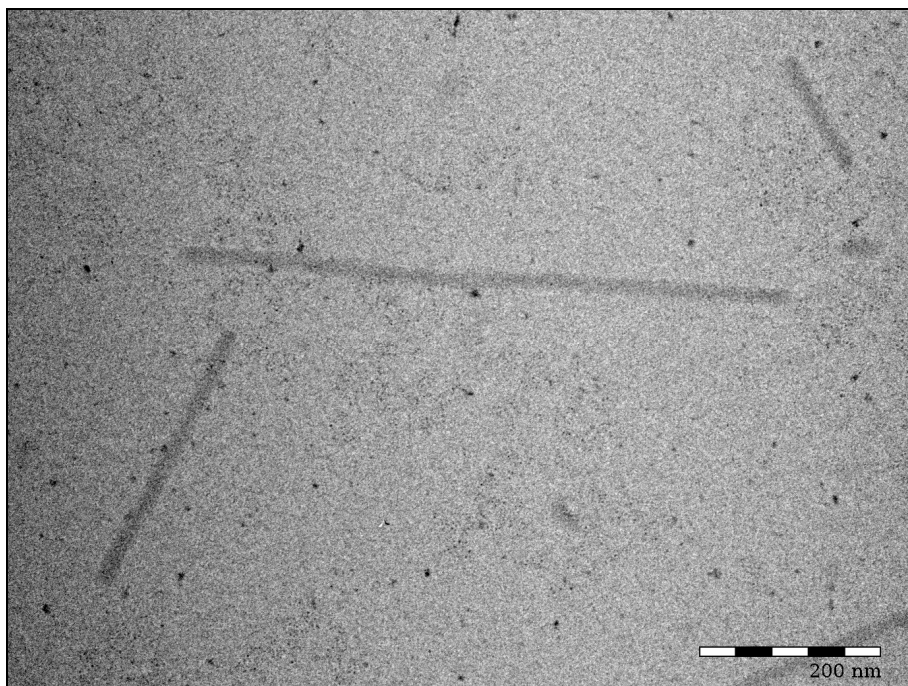
Obrázek č. 9. Virus tabákové mozaiky, nektrastováno, (zvětšeno 145 000x, **LVEM 5**).



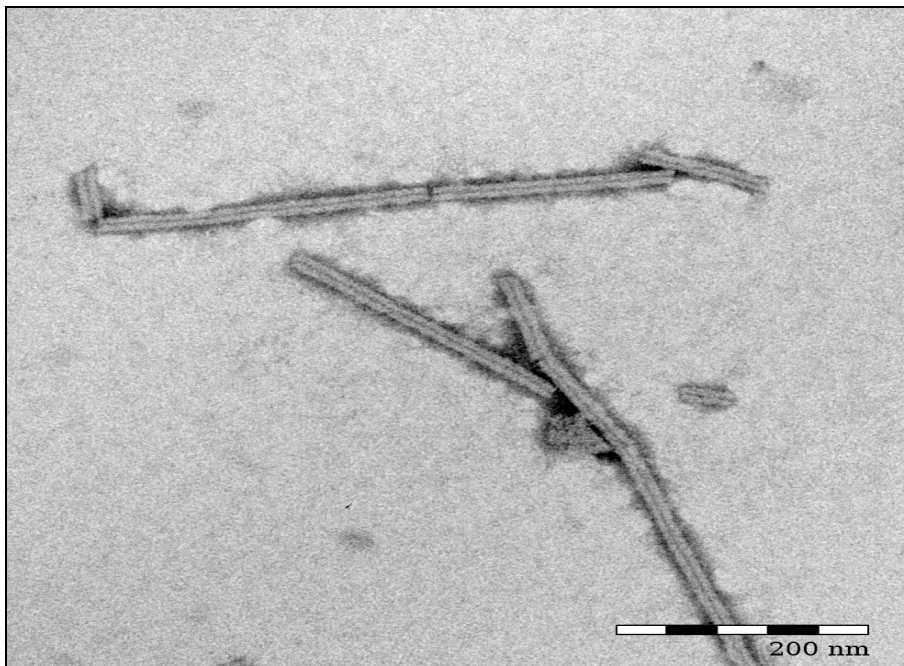
Obrázek č. 10. Vlákňitý bílý mozaikový virus jetele, nektrastováno, (zvětšeno 80 000x, **LVEM 5**).



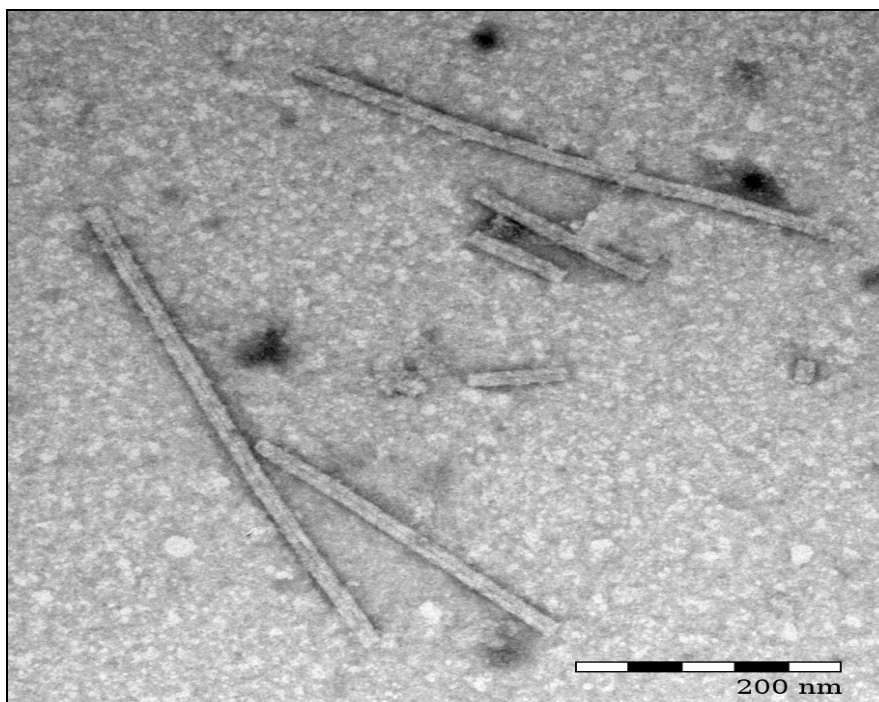
Obrázek č. 11. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% molybdenátem amonným, (zvětšeno 150 000x, **HV TEM JEOL 1010**).



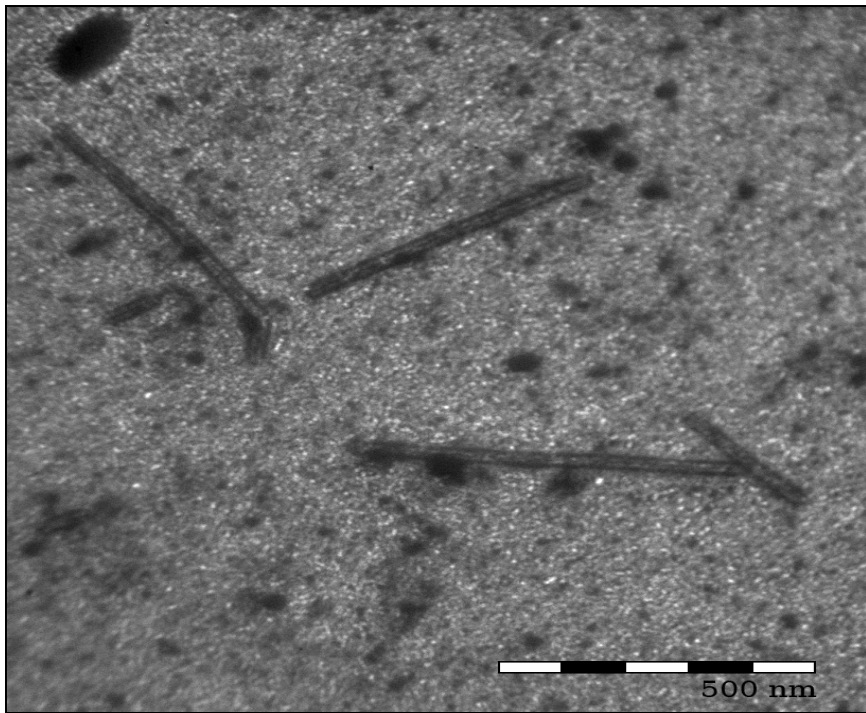
Obrázek č. 12. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% oxidem osmičelým, (zvětšeno 150 000x, **HV TEM JEOL 1010**).



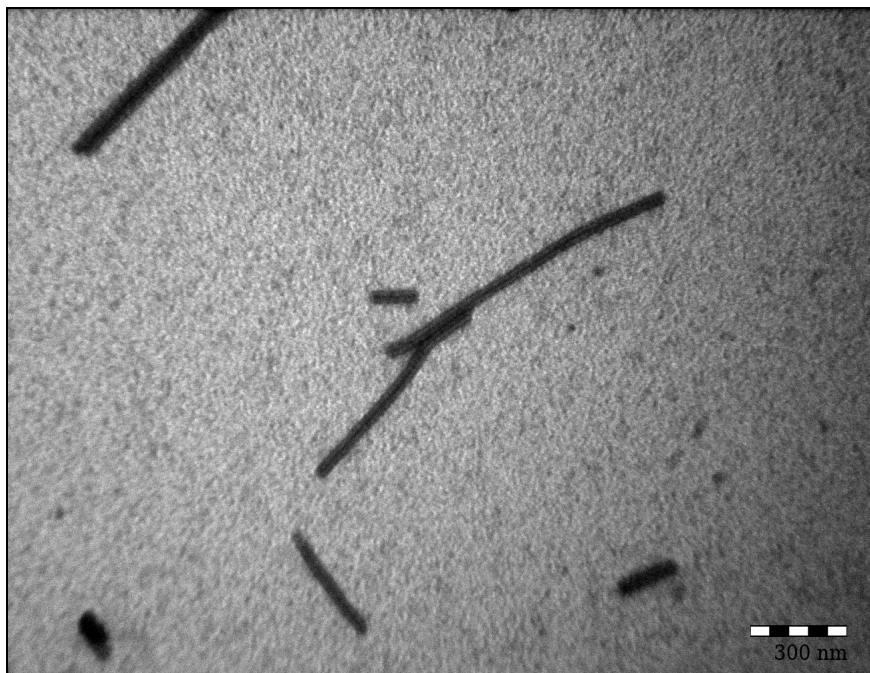
Obrázek č. 13. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% kyselinou fosfowolframovou, (zvětšeno 150 000x, **HV TEM JEOL 1010**).



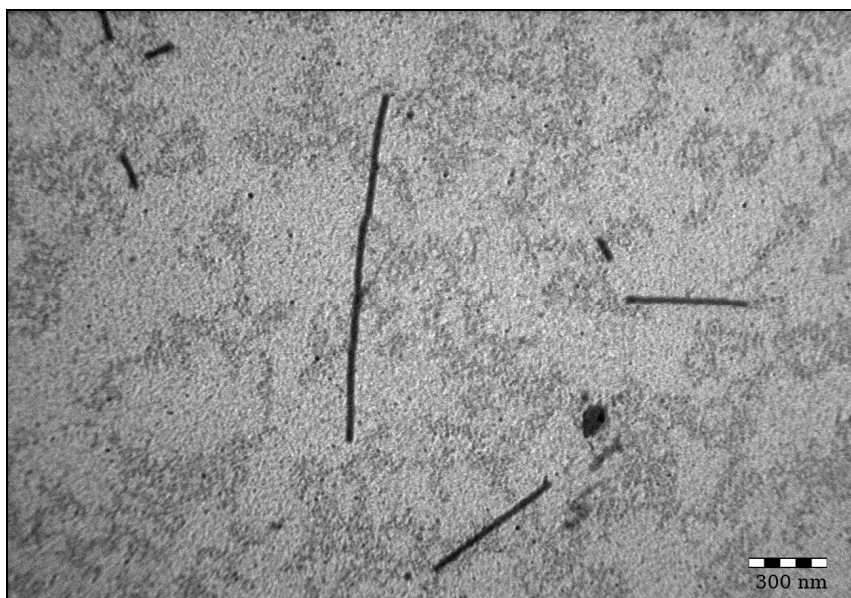
Obrázek č. 14. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% octanem uranylu, (zvětšeno 150 000x, **HV TEM JEOL 1010**).



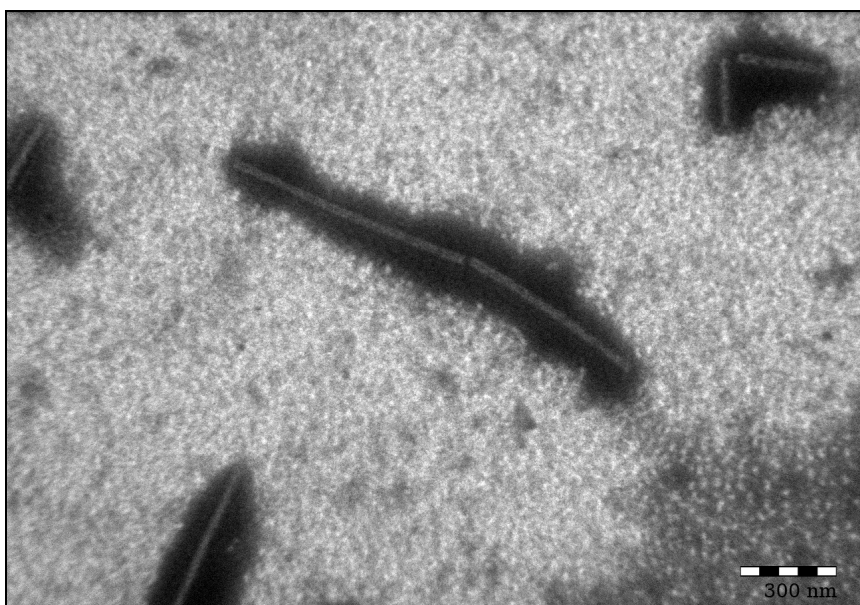
Obrázek č. 15. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% octanem uranylu, (zvětšeno 80 000x, **LVEM 5**).



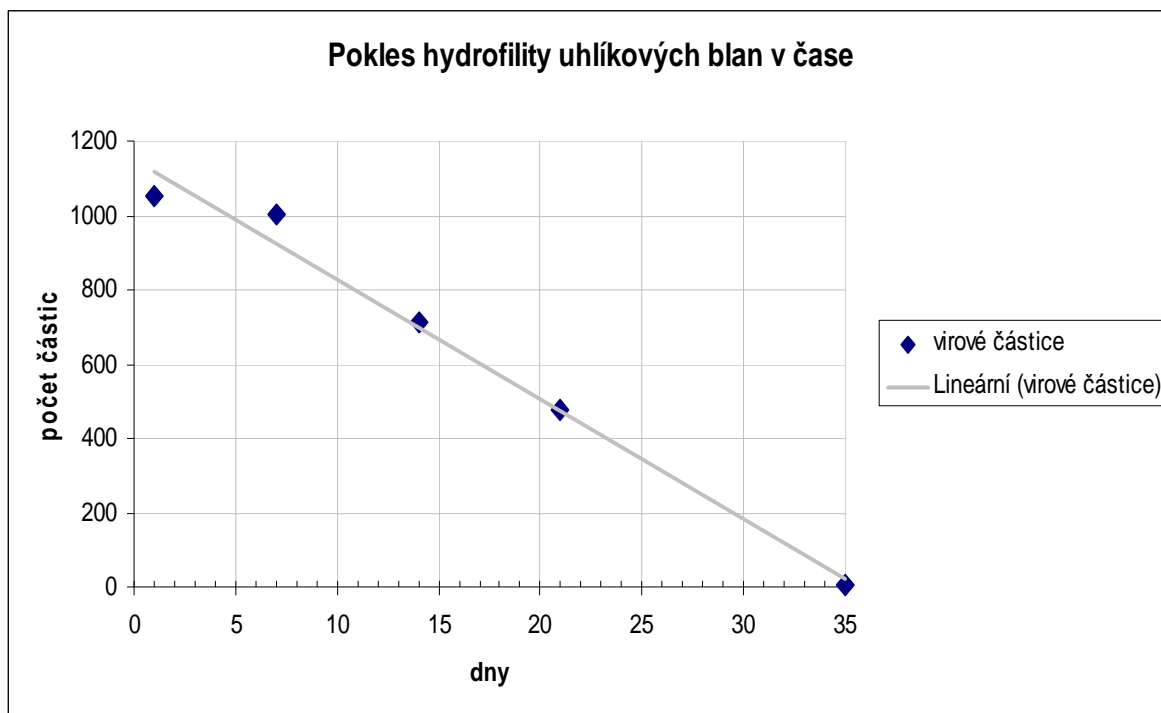
Obrázek č. 15. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% molybdenátem amonným, (zvětšeno 145 000x, **LVEM 5**).



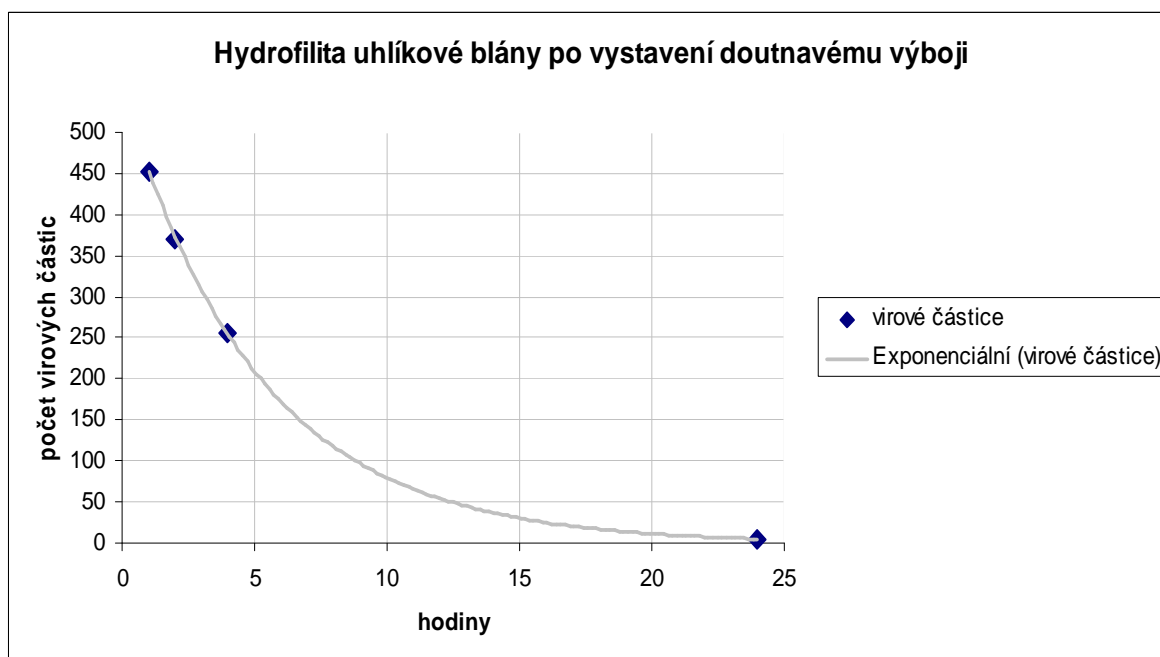
Obrázek č. 16. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% oxidem osmičelým, (zvětšeno 120 000x, **LVEM 5**).



Obrázek č. 17. Virus tabákové mozaiky, barveno 1% kyselinou fosfowolframovou, (zvětšeno 145 000x, **LVEM 5**).



Graf č. 1. Graf závislost hydrofility blan na čase.



Graf č. 2. Graf závislosti trvání hydrofility blan po jejich vystavení doutnavém výboji na čase.