

Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích

Rešerše bakalářské práce



**Možnosti vícenásobného imunoznačení biologických preparátů ve  
skanovacím elektronovém mikroskopu**

Vypracovala: Denisa Martykánová

Vedoucí práce: Ing. Jana Nebesářová, Csc.

## **Anotace**

V této práci hodnotím Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM), jako vhodný nástroj pro imunolokalizaci buněčných komponent pomocí specifické vazby antigen - protilátka značená koloidním zlatem.

Cílem bylo nalézt v literatuře způsoby přípravy preparátů pro imunoznačení, vlastnosti jednotlivých markerů a možnosti jejich využití pro vícenásobné imunoznačení biologických preparátů.

## **Annotation**

In this thesis I evaluate the Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) as a suitable instrument for immunolocalization of cell components by specific binding of the antigen - antibody labelled with colloidal gold.

The aim of this thesis is to find in the literature the techniques of the specimen's preparation for immunolabelling, properties of the markers and the possibilities of their use for multiple immunolabeling of biological samples.

Martykánová D., 2011, Možnosti vícenásobného imunoznačení biologických preparátů ve skanovacím elektronovém mikroskopu [The possibilities of multiple immunolabelling of biological samples in a scanning electron microscope], Bc. Thesis, in Czech – p. 30, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 2011

.....

Denisa Martykánová

## **Poděkování**

Touto cestou chci poděkovat Ing. Janě Nebesářové, Csc. za konzultace a vedení při zpracování této bakalářské práce. Také děkuji za půjčení odborné literatury.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
1.1	Elektronový mikroskop.....	1
2	HISTORIE .....	2
3	FESEM.....	3
3.1	Popis přístroje .....	4
3.1.1	Osvětlovací soustava.....	5
3.1.1.1	Elektronová tryska .....	5
3.1.1.2	Elektromagnetické čočky.....	8
3.1.1.2.1	Vady elektromagnetických čoček.....	8
3.1.2	Zobrazovací soustava.....	9
3.1.2.1	Objektivová čočka .....	10
3.1.2.2	Komora preparátu .....	10
3.1.2.3	Detektory signálů.....	10
3.1.2.3.1	Detekce sekundárních elektronů.....	10
3.1.2.3.2	Detekce zpětně odražených elektronů .....	11
3.1.3	Vakuový systém.....	11
3.2	Rozptyl elektronů.....	11
3.2.1	Pružný rozptyl.....	12
3.2.2	Nepružný rozptyl .....	12
3.3	Příprava vzorků.....	13
3.3.1	Příprava preparátů chemickou cestou .....	14
3.3.1.1	Očištění preparátu .....	14
3.3.1.2	Fixace.....	14
3.3.1.3	Dehydratace .....	15
3.3.1.4	Sušení.....	15
3.3.1.5	Lepení .....	16
3.3.1.6	Pokovení .....	16
3.3.2	Příprava preparátů fyzikální cestou .....	17
3.3.2.1	Kryofixace (mrazová fixace) .....	18
3.3.2.2	Mrazové metody .....	19
4	IMUNOZNAČENÍ .....	21
4.1	Markery.....	23
4.1.1	Enzymové markery .....	23
4.1.2	Koloidní zlato .....	24
4.1.3	Quantum dots.....	24
4.1.4	Jiné markery.....	25
4.2	Příprava preparátů pro imunoznačení .....	25
5	ZÁVĚR .....	27
6	POUŽITÁ LITERATURA .....	28

# 1 ÚVOD

## 1.1 Elektronový mikroskop

Elektronový mikroskop je obdobou mikroskopu světelného, ale fotony v něm jsou nahrazeny elektrony <sup>[1]</sup>. Umožňuje nám studovat jak povrch preparátu, tak jeho mikrostrukturu <sup>[2]</sup>. Elektronové mikroskopy dosahují vyšší rozlišovací schopnosti (až 0,1 nm) a většího zvětšení, než mikroskopy světelné (10 - 1 500 000 x) <sup>[51]</sup>.

Podle tvorby obrazu dělíme elektronové mikroskopy na transmisní a skanovací <sup>[2]</sup>.

### Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Transmisní elektronový mikroskop je přístroj, který umožňuje pozorování mikrostruktury preparátů do tloušťky 100 nm <sup>[3]</sup>. Při průchodu elektronů preparátem, interagují elektrony s atomy vzorku. Obraz je tvořen dopadem neodchýlených elektronů na pozorovací stínítko <sup>[2][4]</sup>.

Transmisní elektronový mikroskop dosahuje zvětšení 50 - 1 500 000 x a rozlišení 0,1 nm.

### Skanovací elektronový mikroskop (SEM)

Skanovací (také rastrovací, řádkovací) elektronový mikroskop je přístroj určený k pozorování povrchů vzorků, kdy se primární svazek elektronů pohybuje pomocí vychylovacích cívek po povrchu preparátu a skanuje ho. Pro vychylování paprsku ve dvou kolmých směrech jsou použity dvě dvojice cívek. Vychylovací cívkou jsou uloženy v otvoru objektivové čočky <sup>[52]</sup>.

Výsledný obraz v SEM je tvořen pomocí zpětně odražených (BSE), nebo sekundárních (SE) elektronů, proto je zobrazení v SEM považováno za nepřímou metodu <sup>[5]</sup>.

Skanovací elektronový mikroskop dosahuje zvětšení 10 - 1 000 000 x a rozlišení 0,5 nm.

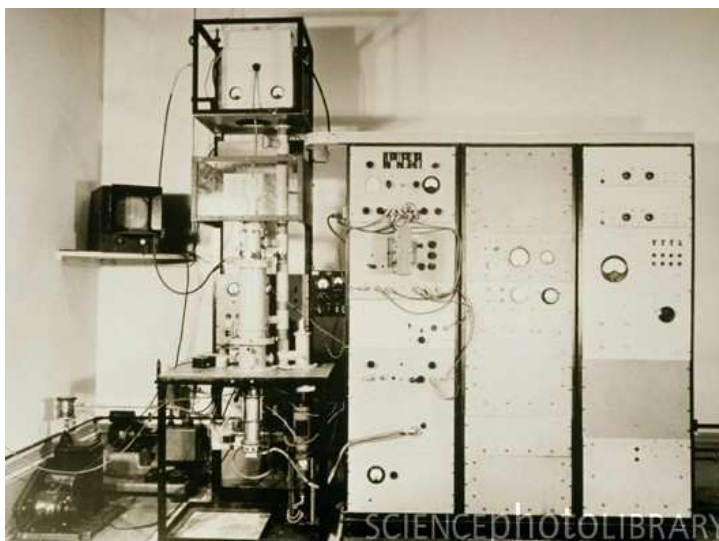
## 2 HISTORIE

Roku 1931 sestavil Max Knoll a Ernst Ruska první prototyp elektronového mikroskopu (obr. 1) <sup>[2][6]</sup>. V roce 1939 zahájila firma Siemens a Halske úspěšnou komerční výrobu transmisních elektronových mikroskopů <sup>[7]</sup>.

Základy skanovacího elektronového mikroskopu byly stanoveny ve 30. a 40. letech 20. století M. Knollem <sup>[53]</sup>.

Roku 1938 vynalezl německý fyzik Manfred von Ardenne rastrovací princip. Ten byl poprvé využit pro transmisní elektronovou mikroskopii. A téhož roku sestrojil první skanovací transmisní elektronový mikroskop <sup>[8]</sup>.

Roku 1942 použil rastrovací princip k detekci sekundárních elektronů pomocí fotonásobiče Vladimír Kosma Zworykin, který později sestrojil první skanovací elektronový mikroskop s rozlišením 50 nm <sup>[2][8][52]</sup>. Po druhé světové válce pracoval v Anglii na vývoji SEM vědec Charlese William Oatley a Dennis McMullan. Výsledkem jejich práce byl elektronový mikroskop dosahující rozlišení asi 50 nm. Ve fotografiích z tohoto SEM bylo možné najít trojrozměrný aspekt, který je typický pro dnešní SEM <sup>[8][52]</sup>. První skanovací mikroskopy byly vyráběny v Anglii a v Japonsku <sup>[53]</sup>.



Obr. 1 – První skanovací elektronový mikroskop <sup>[9]</sup>



### 3 FESEM

Field emission scanning electron microscope (FESEM) je vysoko rozlišovací skanovací elektronový mikroskop (obr. 2), který používá autoemisní katodu jako zdroj elektronů<sup>[10]</sup>.

Rozlišení FESEM závisí na typu přístroje, pohybuje se kolem ~1 nm při 15 kV a ~2,2 nm při 1 kV. Urychlovací napětí se pohybuje v rozmezí 0,1 – 30 kV a dosahuje zvětšení 25 – 1 000 000 x<sup>[11]</sup>.

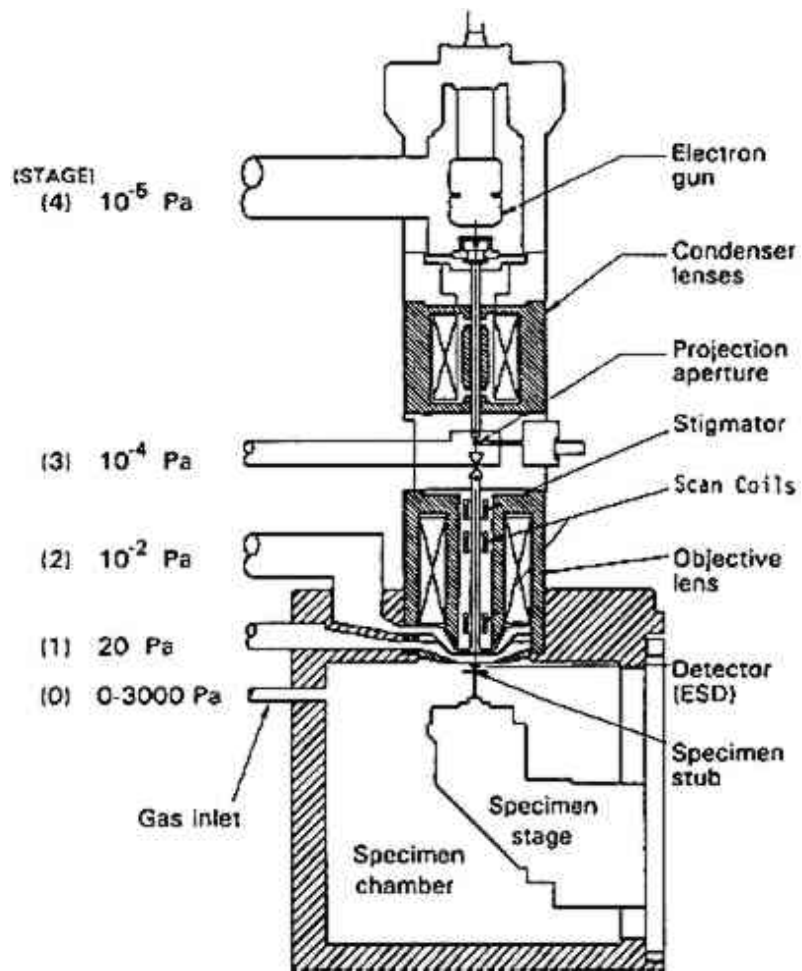
Skannovací elektronový mikroskop JEOL 7401F v laboratoři elektronové mikroskopie je dále vybaven YAG (Yttrium aluminium garnet) detektorem (Aurata Brno) a kryokomorou cryo alto 2500 (Gatan).



Obr. 2 – JEOL 7401F

### 3.1 Popis přístroje

Na obrázku (obr. 3) je znázorněno schéma skanovacího elektronového mikroskopu.



Obr. 3 – FESEM<sup>[12]</sup>

### 3.1.1 Osvětlovací soustava

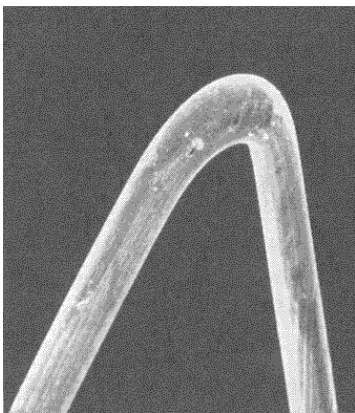
Osvětlovací soustavu tvoří elektronová tryska a elektromagnetické čočky.

#### 3.1.1.1 Elektronová tryska

Elektronové mikroskopy jsou vybaveny různými typy elektronových trysek, ale ve FESEM se využívá jen autoemisní tryska.

#### Wolframová katoda

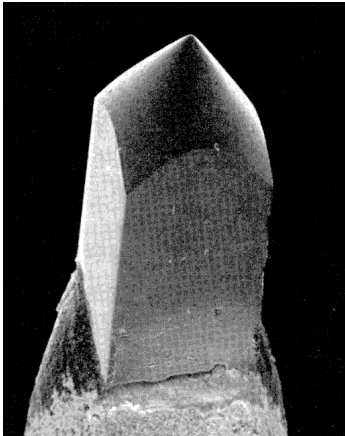
Katodu tvoří přímo žhavené wolframové vlákno o průměru asi 100  $\mu\text{m}$ , ohnuté do tvaru písmene V (obr. 4). K termoemisi elektronů dochází při průchodu elektrického proudu vláknem. Wolframové vlákno nevyžaduje vysokou hodnotu vakua, pro provoz stačí hodnota  $10^{-2}$  Pa. Mezi nevýhody patří nízká životnost. Proto se katoda žhaví jen do určité teploty, přezhahováním se opotřebovává a snižuje se tak její životnost <sup>[13][52]</sup>.



Obr. 4 – Wolframová katoda <sup>[13]</sup>

#### LaB<sub>6</sub>

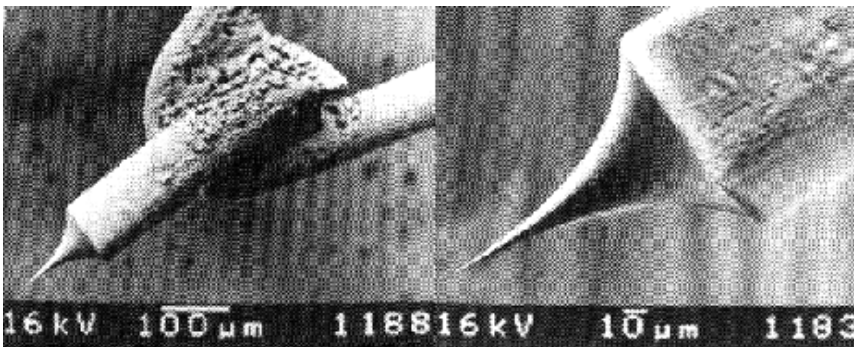
Hexaboridlanthan (obr. 5) je nepřímo žhavená katoda wolframovou spirálou. Má vyšší emisi elektronů při nižší teplotě než wolframové vlákno, ale v oblasti trysky je nutno dosáhnout lepšího vakua. Jeden konec tyčinky je vybroušen do hrotu o průměru asi 10  $\mu\text{m}$ , druhý je namočen do chladicího média (olej) <sup>[52]</sup>.



Obr. 5 – Katoda z LaB<sub>6</sub> <sup>[13]</sup>

### Schottkyho katoda

Schottkyho emisní katody (obr. 6) jsou typu ZrO/W (100) s poloměrem hrotu 0,1 – 1 μm. Katoda je obklopena supresorovou elektrodou s negativním předpětím. Při napětí 4 – 8 kV jsou elektrony vytrhovány z povrchu hrotu <sup>[54]</sup>.



Obr. 6 – Schottkyho katoda <sup>[50]</sup>

### Autoemisní tryska

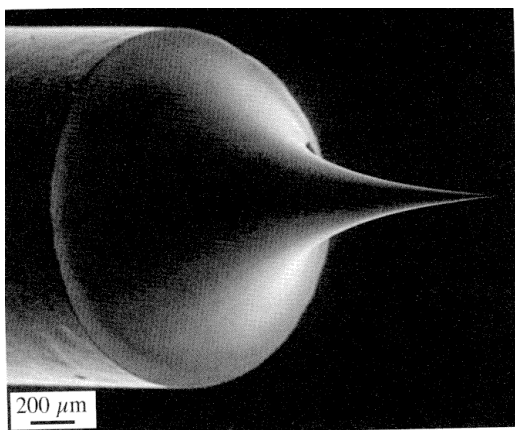
Elektrony emituje studené wolframové vlákno vyleptané do hrotu, jehož průměr je 0,1 μm (obr. 7). Naproti vláknu je umístěna elektroda s kladným předpětím. Kolem hrotu tak vzniká elektrické pole, které vytrhává elektrony z povrchu hrotu <sup>[13]</sup>.

Elektrony emitované katodou jsou poté postupně odsávány do kruhového otvoru anody, která jim dává zrychlení na průlet tubusem mikroskopu.

Elektrony jsou urychlovány urychlovacím napětím 0,1 – 30 kV <sup>[13]</sup>. Jejich vysoké energie ale vedou k poškození vzorku, u nízkých energií je problém s fokusací čoček. Řešením je Gentle Beam mode používaný firmou JEOL, kdy je primární svazek elektronů před dopadem na preparát zbrzděn.

Metoda Gentle Beam vytváří vysoké rozlišení při nízkém urychlovacím napětí (0,1 kV), umožňuje pozorování povrchových struktur a snižuje nabíjení nevodivých preparátů <sup>[10]</sup>.

Předností autoemisní trysky je její dlouhá životnost a rozlišovací schopnost pod 5 nm, nevýhodou je vysoká hodnota vakua, kterou potřebuje pro provoz ( $10^{-8}$  Pa).



Obr. 7 – Autoemisní tryska <sup>[13]</sup>

V tabulce (tab. I) jsou porovnány jednotlivé zdroje elektronů.

Tab. I – Parametry elektronových trysek

Zdroj elektronů	Průměr hrotu	Provozní teplota	Životnost	Požadované vakuum
Wolframová katoda	100 $\mu\text{m}$	2 700 K	40 – 80 hodin	$10^{-2}$ Pa
LaB <sub>6</sub> katoda	10 $\mu\text{m}$	1 900 K	200 hodin	$10^{-4}$ Pa
Schottkyho katoda	0,1 - 1 $\mu\text{m}$	1 800 K	>2 000 hodin	$10^{-6}$ Pa
Autoemisní tryska	0,1 $\mu\text{m}$	300 K	>2 000 hodin	$10^{-8}$ Pa

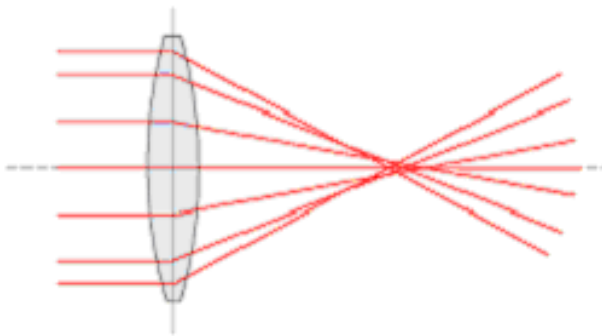
### 3.1.1.2 Elektromagnetické čočky

Elektromagnetické čočky ve skanovacím elektronovém mikroskopu zaostřují a zmenšují průměr primárního svazku elektronů a přenášejí elektronový paprsek z křižště na preparát. Tubus obsahuje jednu až dvě kondenzorové čočky a stigmátor<sup>[52]</sup>.

#### 3.1.1.2.1 Vady elektromagnetických čoček

##### Sférická vada

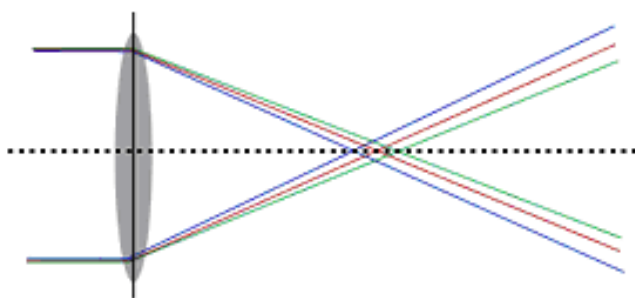
Sférická vada (obr. 8) je neschopnost čočky zaostřit všechny paprsky do jednoho bodu. Zvětšení v krajích obrazu je jiné než ve středu. Vada se odstraňuje pomocí clony, to je ale spojeno se ztrátou světelné energie<sup>[14][52]</sup>.



Obr. 8 – Sférická vada<sup>[28]</sup>

##### Chromatická vada

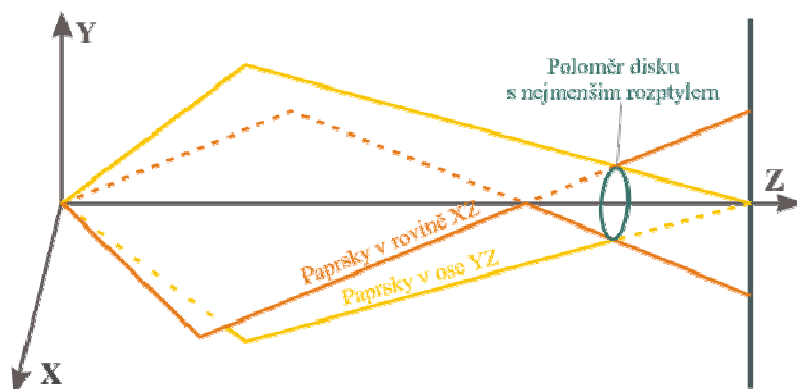
Chromatická vada (obr. 9) vzniká v důsledku rozdílných energií elektronů a kolísáním urychlovacího napětí. Pomalejší elektrony jsou vychylovány jinak, než elektrony s vyšší rychlostí. Vadu je možné omezit zlepšením koherentnosti elektronového svazku, ale nelze ji odstranit<sup>[14][52]</sup>.



Obr. 9 – Chromatická vada <sup>[29]</sup>

### Osový astigmatismus

Příčinou astigmatismu (obr. 10) je nesymetrické magnetické pole elektromagnetických čoček, ale i nečistoty na vnitřních plochách mikroskopu, u kterých může docházet k nabíjení. Astigmatismus se koriguje pomocí stigmátoru. Ten bývá uložen uvnitř druhého kondenzoru <sup>[14][52]</sup>.



Obr. 10 – Osový astigmatismus <sup>[30]</sup>

### 3.1.2 Zobrazovací soustava

Zobrazovací soustava je tvořena objektivovou čočkou, komorou preparátu a detektory signálů.

### 3.1.2.1 Objektivá čočka

Objektiv je poslední čočkou v soustavě čoček s největší výkonností a nejkratší ohniskovou délkou. Objektivovou čočkou prochází primární svazek elektronů, který je zaostřován na povrch preparátu.

### 3.1.2.2 Komora preparátu

Komora obvykle obsahuje eucentrický stolek pro držák vzorku. Držák slouží k upevnění vzorku a k manipulaci s ním. Stolek je ovládán mikrometrickými šrouby buď ručně, nebo pomocí motorků. Dále obsahuje antikontaminační zařízení, které zabraňuje kontaminaci vakua při ozáření preparátu. V komoře se také nachází osvětlení komory a detektory signálů. Komora má vlastní čerpání difúzní vývěvou. Vzorky se vkládají do komory přes předkomůrku, která se pak předčerpá. V případě, že mikroskop předkomůrku nemá, je vybaven dostatečně výkonnými vývěvami, které zavzdušněnou komoru rychle vyčerpají <sup>[52]</sup>.

### 3.1.2.3 Detektory signálů

#### 3.1.2.3.1 Detekce sekundárních elektronů

Detektor k detekci sekundárních elektronů vyvinul V. K. Zworykin, J. Hillier a R. L. Snyder. Později byl zdokonalen T. E. Everhartem a R. F. M. Thornleyem, proto se mu také říká Everhart-Thornleyův detektor <sup>[52]</sup>.

Detektor se skládá ze scintilátoru, umístěného uvnitř Faradayovy klece, která je uvnitř komory preparátů. Sekundární elektrony mají nízkou energii, proto se na scintilátor přitahují pomocí přepětí +10 kV. Díky kladnému napětí mohou být elektrony zachyceny ve velkém prostorovém úhlu. Elektrony pak vybudí fotony, které jsou vyvedeny do fotonásobiče a jsou převedeny na elektrický impuls. Z vyvýšených oblastí preparátu se k detektoru dostane víc elektronů, proto se na obrazovce jeví jako světlé místo <sup>[52]</sup>.



### 3.1.2.3.2 Detekce zpětně odražených elektronů

Stejně jako u sekundárních elektronů i zpětně odražené elektrony lze detekovat Everhart-Thornleyovým detektorem. Detektor je umístěn na okraji pólových nástavců.

Dalším detektorem, který se využívá k detekci zpětně odražených elektronů v mikroskopu JEOL 7401F je YAG detektor. Autratův YAG detektor patří mezi detektory s nejvyšším rozlišením, umožňující pozorování markerů koloidního zlata. Detektorem mohou být detekovány zlaté částice o velikosti 10 nm, a to i ve FESEM, který pracuje v kryo módu<sup>[55]</sup>. Při urychlovacím napětí do 5 kV je možné pozorovat nanočástice o velikosti 5 – 10 nm. Pro detekci částic menších jak 1 nm je potřeba vyššího urychlovacího napětí (~25 kV)<sup>[56]</sup>.

### 3.1.3 Vakuový systém

Vnitřní prostor mikroskopu musí být evakuován, proto je mikroskop vybaven vývěvami. Při vyšším tlaku by docházelo ke srážkám elektronů s molekulami vzduchu a tak ke změně jejich směru. Dále ke zavzdušnění katody a k její korozi a k rychlé kontaminaci vnitřního prostoru mikroskopu.

Rotační vývěva přečerpává vnitřní prostor mikroskopu a komoru při výměně preparátů. Snižuje tlak na hodnotu  $10^{-1}$  Pa. Poté začíná pracovat difúzní vývěva, která snižuje tlak na hodnotu  $10^{-3}$  Pa. Tato hodnota vakua nestačí v oblasti elektronové trysky. Zde je zapotřebí iontové vývěvy, která tlak ještě sníží<sup>[52]</sup>. Ještě vyššího vakua dosahuje turbomolekulární vývěva, ta je schopna snížit tlak až na  $10^{-11}$  Pa<sup>[15]</sup>.

## 3.2 Rozptyl elektronů

Obraz vzniká interakcí elektronů s preparátem. Při interakci se může elektron odchýlit do jiného směru bez ztráty energie, nebo projde preparátem bez změny směru se ztrátou energie. Podle toho se jedná buď o pružný, nebo nepružný rozptyl<sup>[52]</sup>.

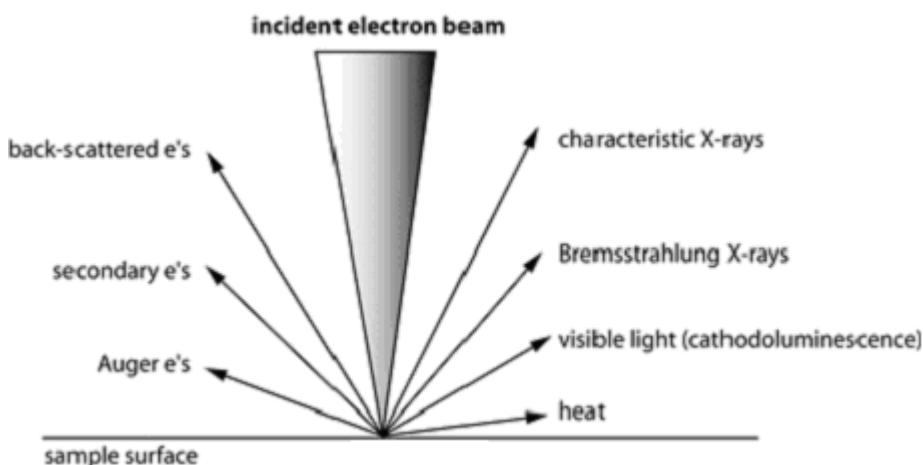
### 3.2.1 Pružný rozptyl

Při průletu elektronu preparátem jsou elektrony vychýleny pod určitým úhlem. Když prolétá elektron blízko jádra, může být i zpětně odražen. Energie zpětně odražených elektronů je zhruba stejná jako energie primárního svazku elektronů. Zpětně odražené elektrony jsou citlivé na atomové číslo, dávají nám představu o povrchové morfologii a o prvkovém složení <sup>[16][52]</sup>.

### 3.2.2 Nepružný rozptyl

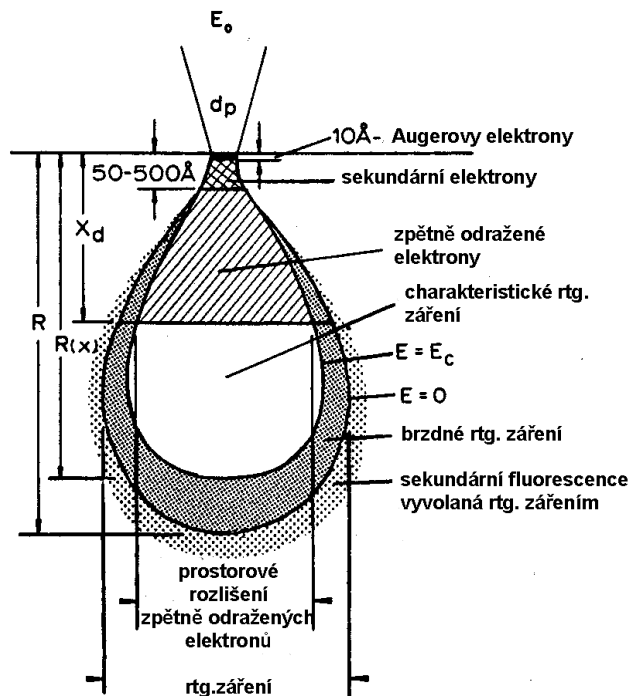
Při nepružném rozptylu dojde ke srážce primárních elektronů s elektrony na orbitách preparátu. Primární elektrony předají energii elektronům na orbitách, ale nedochází ke změně jejich směru. Jako produkt nepružných srážek vznikají sekundární elektrony, které nám po detekci dávají představu o morfologii povrchu preparátu. Elektrony jsou uvolňovány ze slupek a jejich místo je nahrazeno elektronem z vyšší valenční slupky. Rozdíl v energiích je vyzářen ve formě rentgenového záření a katodoluminiscence. Pomocí nich lze zjistit prvkové složení preparátu <sup>[16][52]</sup>.

Na obrázku (obr. 11) jsou znázorněny jednotlivé signály, které vznikají při průchodu primárního svazku elektronů preparátem.



Obr. 11 – Interakce elektronů s povrchem vzorku <sup>[17]</sup>

Oblast pod povrchem preparátu, ve které se tvoří jednotlivé signály se nazývá excitační objem (obr. 12).



Obr. 12 – Excitační objem <sup>[18]</sup>

### 3.3 Příprava vzorků

Vzorky nelze pozorovat bez jakékoli úpravy, musí splňovat určitá kritéria. Biologický materiál nesmí obsahovat vodu, musí být očištěný, stabilní ve vakuu, při ozáření primárním svazkem elektronů a musí produkovat dostatečné množství sekundárních a odražených elektronů. Všechny vzorky musí mít také vhodnou velikost, aby se vešly do komory preparátů <sup>[19][52]</sup>.

### 3.3.1 Příprava preparátů chemickou cestou

#### 3.3.1.1 Očištění preparátu

Ve většině případů nejsou povrchy získaných vzorků čisté, obvykle se na nich objevují nějaké kontaminace. Kontaminace lze odstranit pomocí pinzety, roztoku s chloridem sodným, ofukováním tlakovým vzduchem, nebo centrifugací<sup>[21]</sup>.

#### 3.3.1.2 Fixace

Po očištění následuje fixace. Cílem fixace je zachovat preparát co nejvíce podobný nativnímu stavu a zabránit degradačním procesům. Používají se jak chemické, tak fyzikální metody. Fixaci můžeme urychlit mikrovlnným ozářením.

Chemická fixační činidla se dělí do dvou skupin:

- Koagulanty (neaditivní) – denaturují proteiny, způsobují jejich srážení (např. metanol, etanol, kyselina chlorovodíková)<sup>[27]</sup>.
- Nekoagulanty (aditivní) – dochází k přeměně cytoplazmy v gel. Tato fixace lépe zachovává buněčnou ultrastrukturu (např. glutaraldehyd, formaldehyd, oxid osmičelý, manganistan draselný)<sup>[27]</sup>.

Aldehydy:

Glutaraldehyd je bezbarvá kapalina štiplavého zápachu. Při fixaci reaguje hlavně s peptidy a bílkovinami. Nereaguje s lipidy, některými polysacharidy a proteoglykany. Glutaraldehyd má výrazně nižší penetrační rychlost než formaldehyd. Rychlost pronikání glutaraldehydu do tkáně je ~ 0,2 - 0,34 mm/hod<sup>[20][21]</sup>.

Formaldehyd je za pokojové teploty plyn se štiplavým zápachem. Komerčně se prodává jako vodný roztok s koncentrací 40%. Má vysokou penetrační rychlost, a to díky své malé molekule. Často se používá kombinace glutaraldehydu s formaldehydem. Glutaraldehyd zaručuje kvalitní a formaldehyd rychlou fixaci<sup>[21][22]</sup>.

Oxidační činidla:

Oxid osmičelý se za pokojové teploty vyskytuje ve formě krystalků nažloutlé barvy, je velmi těkavý a velmi reaktivní. Jeho páry mají dráždivý a leptavý účinek. K manipulaci s oxidem osmičelým musíme používat dobře větranou digestoř. Má silné oxidační účinky. Při reakci s organickými sloučeninami vzniká tzv. osmiová čern. Vzhledem k vysoké reaktivitě a těkavosti se roztoky skladují ve skleněných ampulích <sup>[23]</sup>.

Způsob fixace

Imerzní fixace spočívající v ponoření získaného materiálu do fixačního roztoku. Perfúzní způsob fixace je možné použít při experimentu na pokusném zvířeti, kterému se v celkové anestézii vstříkuje fixační roztok přímo do krevního řečiště <sup>[24]</sup>.

### **3.3.1.3 Dehydratace**

Jde o nahrazení vody organickým rozpouštědlem. Vzorky dehydratujeme, aby nedocházelo k bouřlivému uvolňování vody ze vzorků ve vakuu. Nejčastěji se používá etanol nebo aceton. Při odvodnění prochází vzorek řadou roztoků se zvyšující se koncentrací rozpouštědla, až dojde k úplnému nahrazení vody. Doba odvodnění je přímo úměrná velikosti preparátu. Dehydrataci můžeme urychlit mikrovlnným ozářením <sup>[21]</sup>.

### **3.3.1.4 Sušení**

Po dehydrataci následuje sušení. Preparát je možné vysušit na vzduchu, ale dochází ke vzniku artefaktů. Řešením tohoto problému je metoda kritického bodu, která slouží k odstranění dehydratačního činidla. Při této metodě je vzorek vložen do speciální uzavřené preparátové komory aparatury pro sušení metodou kritického bodu. Poté je zaplaven kapalným oxidem uhličitým při teplotě kolem 10°C, kterým se nahradí dehydratační činidlo. Preparátová komora se začne zahřívat, kapalným oxidem uhličitým

přechází do plynné formy na stěnách komory, takže v ní roste tlak i teplota až dosáhne kritických hodnot (teplota 36 – 40°C, tlak 73 atm). V tomto bodě zmizí rozdíl mezi plynnou a kapalnou fází oxidu uhličitého a povrchové napětí je rovno nule. Právě teď se převede kapalina na plyn, který se poté vypustí z komory <sup>[21]</sup>.

### **3.3.1.5 Lepení**

Vysušený preparát se nalepuje na hliníkové kruhové podložky a poté se pokovuje. Velké předměty se na terč lepí pomocí koloidního stříbra, malé předměty přilepíme oboustrannou lepicí uhlíkovou páskou <sup>[21]</sup>.

### **3.3.1.6 Pokovení**

Vzorky musí být vodivé, ale uzemněné, aby se zabránilo hromadění elektrostatického náboje primárních elektronů pod povrchem preparátu během jeho prohlížení v SEM. Nevodivé vzorky mají tendenci se nabíjet, když jsou skanovány paprskem elektronů. To vede k řadě artefaktů. Proto bývají vzorky pokryty vrstvičkou vodivého materiálu o tloušťce 10 - 20 nm. V současnosti se používá zlato, slitina platina s paladinem, platina <sup>[31]</sup>.

Pokovení můžeme provést několika způsoby.

- Vakuové napařování

Kov se v napařovací aparatuře zahřeje na teplotu, při které se z jeho povrchu začnou odpařovat jednotlivé molekuly. Ty se od zdroje šíří a po dopadu na chladnější předmět kondenzují. Touto metodou ale vznikají na preparátu stíny <sup>[31]</sup>.

- Iontové napařování

Účinkem elektrického napětí vznikne usměrněný výboj. Při výboji dojde k ionizaci plynu. Vzniklé ionty jsou přitahovány ke katodě, která je obklopena napařovaným kovem. Urychlené ionty vyrážejí částice kovu, které se rozptylují

srážkami s dalšími molekulami a ionty plynu, vznikne mrak, který obalí povrch preparátu tenkou vrstvou kovu <sup>[31]</sup>.

- Impregnace

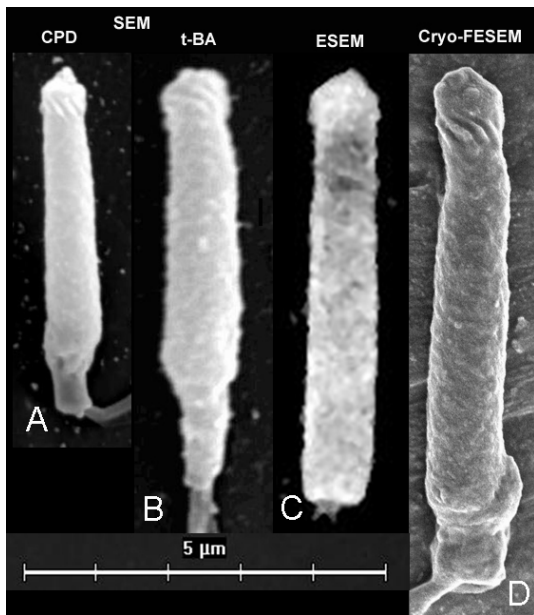
Vytvoření nánosů kovu na povrchu preparátu chemickou cestou. Založena na reakci osmía s kyselinou tanovou <sup>[31]</sup>.

V případě imunolokalizace pokovujeme jen když je to nezbytné. Vrstva kovu musí být co nejtenčí, aby nezakryla markery.

### **3.3.2 Příprava preparátů fyzikální cestou**

Velkou výhodou fyzikální fixace je rychlost přípravy a zachování povrchové struktury. Nedochází především ke změnám tvaru v důsledku odstranění vody z preparátu, protože v něm zůstává ve formě ledu (obr. 13). Z hlediska imunoznačení je pozitivní skutečnost, že nedochází k denaturaci proteinů, agregaci, ztrátě aktivity enzymů ani osmotickým změnám <sup>[25]</sup>.

Pro ověření do jaké míry ovlivňuje způsob přípravy preparátu jeho velikost byl ve studii M. Pšeničky, Ph.D. (obr. 13) použit skanovací elektronový mikroskop JEOL 6300, environmentální skanovací elektronový mikroskop Quanta 200 FEG a skanovací elektronový mikroskop s vysokým rozlišením JEOL 7401F s kryo nástavcem <sup>[62]</sup>.



Obr. 13 – Spermie jesetera <sup>[62]</sup>

### 3.3.2.1 Kryofixace (mrazová fixace)

Cílem kryofixace je ochladit preparát pod rekrystalizační teplotu bez tvorby krystalů a dosáhnout tak vitrifikovaného stavu vzorku. Aby se minimalizovaly škody během mrazení, musí být rychlost kryofixace co nejvyšší ( $\sim 10\,000^\circ\text{C/s}$ ) <sup>[25][26]</sup>.

Buňky se asi z 80% skládají z vody. Voda mrzne procesem homogenní nebo heterogenní nukleace. U homogenní nukleace začnou při 235 K vznikat krystaly ledu, které fungují jako krystalizační zárodky. S krystalizací ledu je spojeno uvolňování tepla, které ohřívá celý systém a udržuje ho v oblasti růstu krystalů. U heterogenní nukleace působí v roli krystalizačních zárodků nerozpustné částice <sup>[25][26]</sup>.

K zamrznutí buňky dojde při 233 K. Při této teplotě dochází k tvorbě krystalů ledu a růst pokračuje až do dosažení rekrystalizační teploty, ta má hodnotu 188 K. Teplotní interval, při kterém dochází k tvorbě krystalů lze zkrátit ošetřením vzorku kryoprotektantem. Kryoprotektant je látka, která snižuje teplotu heterogenní nukleace a zvyšuje rekrystalizační teplotu <sup>[25][26]</sup>.



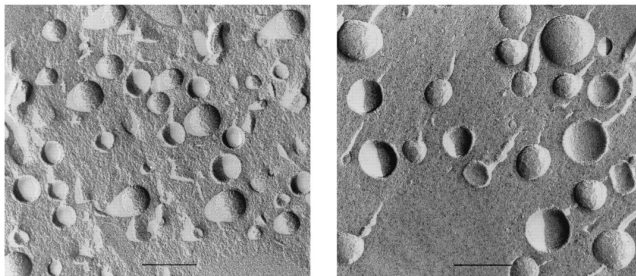
Kryoprotektanty dělíme na dvě skupiny – penetrující a nepenetrující. Penetrující pronikají do buňky a jejích organel (např. glycerol). Nepenetrující zůstávají vně buňky (např. sacharóza, polyvinylpyrrolidon, dextran) [25].

Jako chladicí médium se používá propan, etan, nebo kapalný dusík. Propan a etan jsou ale vysoce explozivní. U kapalného dusíku je nevýhoda v tom, že má blízko bod tání a varu. Proto musí být vzorky při použití kapalného dusíku ošetřeny kryoprotektantem [25][26].

Mezi metody kryofixace patří imerzní kryofixace, kdy je malý kousek tkáně ponořen do kapalného chladicího média. Další metodou je high pressure freezing, neboli mražení za vysokého tlaku. Vzorek je za tlaku ~2 000 barů zmražen za několik milisekund. K mrazení je možné použít i kapalný dusík.

### 3.3.2.2 Mrazové metody

Mrazové lámání (freeze fracturing) odhaluje povrchy organel. Lom se šíří cestou nejmenšího odporu, nejčastěji podél membrán (obr. 14).



Obr. 14 – Mrazové lámání [32]

Mrazové leptání (freeze etching) je částečná sublimace ledu po odkrojení zmrazeného preparátu za sníženého tlaku (obr. 15).



Obr. 15 – Mrazové leptání <sup>[33]</sup>

Mrazové sušení (freeze drying) se používá v případě, kdy nemá mikroskop kryodržák. Zmrazený preparát se umístí do vakua a nechá se z něj vysublímovat led <sup>[34]</sup>.

Tyto mrazové metody se provádí v kryokomoře (obr. 16), která je připevněna k mikroskopu. Komora obsahuje nástroje pro mrazové lámání, sublimaci a zařízení na pokovení vzorku <sup>[35]</sup>.



Obr. 16 – Kryokomora cryo alto 2500 (Gatan) <sup>[35]</sup>

## 4 IMUNOZNAČENÍ

Imunocytochemie je technika, kterou můžeme identifikovat antigen v tkáni <sup>[36]</sup>. Umožňuje sledovat umístění proteinu v rámci buňky i v rámci tkáně či celého organismu <sup>[37]</sup>.

### Antigen

Antigen je jakákoli látka, která způsobí vyvolání imunitní reakce. Nejčastěji jde o proteiny, polysacharidy nebo nukleové kyseliny. Konkrétní místo antigenu, na které se váží protilátky se nazývá epitop.

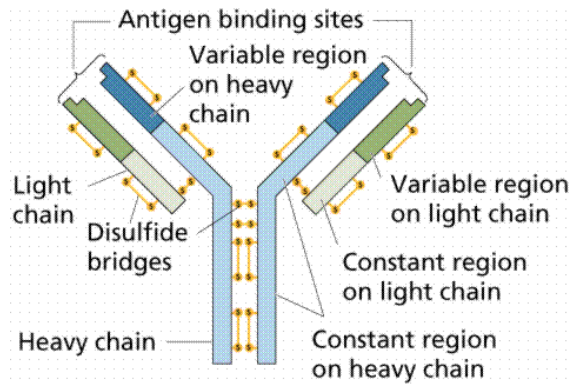
Autoantigeny jsou antigeny, které pochází z vlastního organismu a proti kterým se tvoří specifické protilátky.

### Protilátka

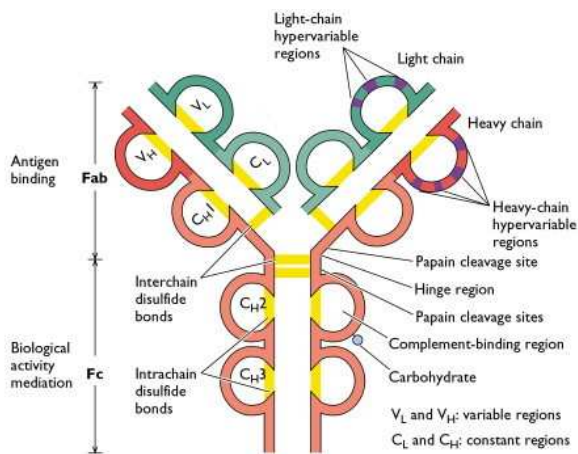
Protilátka (obr. 17) je protein produkovaný imunitním systémem jako ochrana proti infekci <sup>[38]</sup>. Sérové protilátky neboli imunoglobuliny se skládají ze dvou těžkých peptidických řetězců o hmotnosti 50 kDa a dvou lehkých řetězců o hmotnosti 25 kDa. Oba řetězce obsahují jak konstantní, tak variabilní oblasti. Řetězce jsou uspořádány do tvaru písmene Y a jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky <sup>[39]</sup>. Těžké řetězce obsahují jednu variabilní doménu a tři až čtyři konstantní domény (obr. 18). Každá doména se skládá asi ze 110 aminokyselin.

Fab oblast (fragment antigen-binding) je oblast, která se váže na antigen (obr. 19). Tvoří tzv. paratop = místo pro navázání antigenu. Oblasti jsou tvořeny jednou konstantní a jednou variabilní doménou jak z lehkého, tak z těžkého řetězce <sup>[40]</sup>.

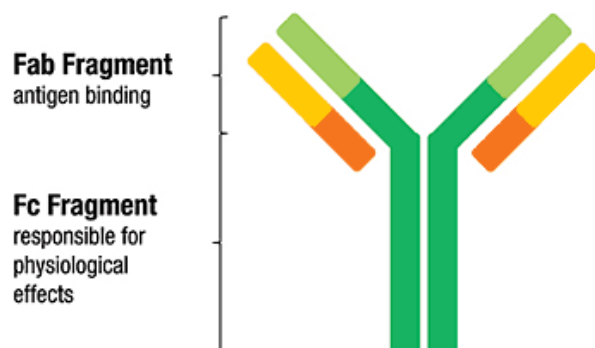
Fc fragment (fragment crystallizable) je oblast tvořena konstantními oblastmi těžkých řetězců, která reaguje s receptory na povrchu buněk (obr. 19) <sup>[41]</sup>.



Obr. 17 – Protilátka [42]



Obr. 18 – Doménová struktura [43]



Obr. 19 – Fab a Fc fragment [44]

Rozeznáváme přímé a nepřímé imunoznačení. Při přímém imunoznačení je protilátka antigenu označena markerem a přímo reaguje s antigenem. Přímé imunoznačení využívá pouze jednu protilátku, je rychlé a snadné, ale má nižší citlivost. Je nutné, aby se daný protein vyskytoval ve vzorku v dostatečném množství. Nepřímé imunoznačení je dvoustupňová metoda. Primární protilátka, která se váže na antigen je neoznačená. Označená je sekundární protilátka, která má afinitu k primární protilátce. Sekundární protilátka pak reaguje s primární protilátkou, proteinem A nebo G. Protein A se váže na Fc konec primární protilátky <sup>[37][45][57]</sup>.

Sekundární protilátka je většinou polyklonální a až několik molekul protilátky se může navázat na primární protilátku. Tak dojde k zesílení signálu, protože jedna molekula antigenu je označena několika molekulami markeru <sup>[46]</sup>.

## **4.1 Markery**

V počátcích elektronové mikroskopie byly pro imunocytochemické značení používané markery obsahující kov, např. ferritin, nebo křenová peroxidáza (HRP). Ferritinové markery byly používány hlavně pro značení povrchů buněk. HRP markery zase snadno pronikaly do buněk. Později byly zavedeny i další markery a technika se rozvinula <sup>[58]</sup>.

### **4.1.1 Enzymové markery**

Enzymové markery byly objeveny v roce 1966 Nakanem a Piercem <sup>[59]</sup>.

Mezi nejpoužívanější enzymové markery patří peroxidáza křenu selského (horseradish peroxidase HRP) a alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase ALP). Mezi další patří glukosooxidáza a B-D-galaktosidáza.

Enzymové markery se používají pro transmisní elektronovou mikroskopii.

#### 4.1.2 Koloidní zlato

Částice koloidního zlata byly poprvé zavedeny Faulkem a Taylorem v roce 1971<sup>[59][60]</sup>. Poprvé byly použity jako markery pro transmisní elektronovou mikroskopii a následně také pro skanovací elektronovou mikroskopii<sup>[61]</sup>. Roku 1974 zavedl Romano zlatem značené sekundární protilátky<sup>[59]</sup>.

Elektrodenzní zlaté částice jsou v elektronovém mikroskopu dobře viditelné. Nejsou vázány na imunoglobuliny stejně jako v případě enzymových nebo fluorescentních markerů, ale jsou spojeny nekovalentními vazbami<sup>[61][63]</sup>.

Postupem času byly velké koloidní částice zlata nahrazeny menšími o velikosti 4 – 20 nm. K dispozici jsou různé velké koloidy (Slot a Geuze 1985), které umožňují vícenásobné značení.

Jejich příprava je jednoduchá a levná. Jsou vyráběny chemickou redukcí z vodného roztoku kyseliny chlorozlatité<sup>[60]</sup>.

Pro vícenásobné imunoznačení se používá koloidní zlato v různých velikostech. Částičky se musí lišit velikostí ~ 10 nm, aby se zabránilo nejasnostem při prohlížení. K dispozici máme jen dvě různé velikosti částic, proto lze imunoznačit jen dva proteiny. Další možností jak vícenásobně značit je použití markerů odlišných tvarů (např. čtverec, pyramida,..)<sup>[64]</sup>.

Koloidní částice nemusí být vždy zlaté, je možné je vytvořit i z dalších prvků – z platiny, stříbra, paladia, ruthenia, rhodia a železa. U těchto kovů, kromě zlata a paladia, může být problém s konjugací molekul. Tomu se dá zabránit tím, že se vytvoří částice s jádrem požadovaného kovu a obalí se tenkou vrstvou zlata<sup>[64]</sup>.

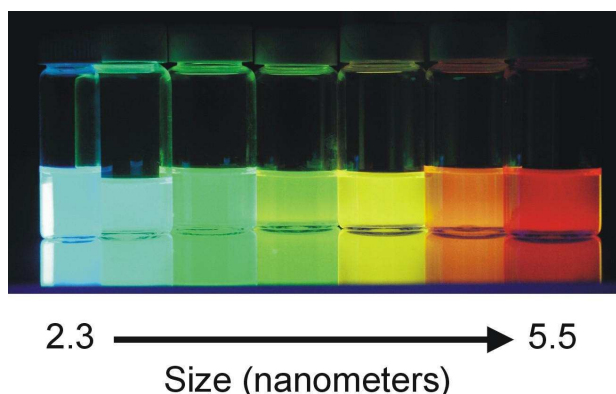
#### 4.1.3 Quantum dots

Quantum dots byly objeveny na začátku 80. let 20. století Alexeiem Ekimovem a Louisem E. Brussem. Termín quantum dot vytvořil Mark Reed<sup>[47]</sup>.

Quantum dots jsou asi 3 – 10 nm velké a jsou vyrobené z polovodičového materiálu. Jsou z křemíku, nebo selenidu kadmnatého, který je obklopen sulfidem zinečnatým.

Quantum dots emitují světlo od infračerveného po ultrafialové (obr. 20). Barva světla závisí na velikosti částic. Větší emitují červené světlo, menší modré<sup>[48][64]</sup>.

Mají uplatnění ve výpočetní technice, biologii, lékařství a fotovoltaických zařízeních.



Obr. 20 – Quantum dots<sup>[49]</sup>

#### 4.1.4 Jiné markery

Radioizotopy se využívají pro vícenásobné imunoznačení. Izotop se připojuje na antigen, který pak reaguje s protilátkami. Specifické protilátky jsou tak označeny antigenem, ale stále mají jedno vazebné místo volné pro navázání další molekuly antigenu<sup>[63]</sup>.

## 4.2 Příprava preparátů pro imunoznačení

Příprava preparátů pro imunoznačení není úplně totožná s obvyklou přípravou preparátů. Je zde několik odlišností.

V první fázi přípravy se preparát nemusí fixovat, nebo se fixuje 4% paraformaldehydem.

V případě, že se vzorek v první fázi přípravy nefixuje, nespecifická vazebná místa jsou zablokována a poté je vzorek pokryt roztokem s nekonjugovanými primárními protilátkami ve fosfátovém pufru. Následuje promytí vzorku puftrem a poté se vzorek na 60 minut pokryje roztokem se zlatými částicemi a zafixuje se 2,5% glutaraldehydem. Za účelem zvýšení citlivosti detekce, nebo-li zesílení signálu zpětně odražených elektronů se mohou markery postříbřit. Poté následuje promývání fosfátovým, nebo kakodylanovým puftrem a postfixace  $\text{OsO}_4$ . Nakonec se preparát dehydratuje, suší a když je to nezbytné pokovuje se tenkou vrstvou kovu.

Pokud se vzorek v první fázi přípravy fixuje paraformaldehydem, nechá se následně inkubovat s želatinou ve fosfátovém pufru po dobu 10 minut. Poté následuje blokování nespecifických vazebných míst a pokrytí roztokem s nekonjugovanými primárními protilátkami ve fosfátovém pufru. Další část přípravy je identická s předchozím postupem <sup>[65]</sup>.



## 5 ZÁVĚR

Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) je mikroskop s vysokým rozlišením, který pracuje jak v režimu sekundárních elektronů, tak v režimu zpětně odražených elektronů. Pro detekci zpětně odražených elektronů je používán YAG detektor, který je schopen detekovat markery o velikosti 1 nm. Díky této schopnosti je FESEM vhodným přístrojem pro detekci imunoznačených protilátek těmito markery.

Existují různé typy markerů, např. quantum dots, radioizotopy, enzymy, ale pro FESEM je nejvhodnějším markerem koloidní zlato. Elektrodenzní zlaté částice jsou v elektronovém mikroskopu dobře viditelné.

V současné době je vícenásobné imunoznačení omezeno dostupnou velikostí používaného koloidního zlata. Další možností, jak vícenásobné značení rozšířit, je použití markerů odlišných tvarů (např. čtverec, pyramida), nebo využití koloidních částic vyrobených z různých kovů (platina, stříbro, paladium, ruthenium, rhodium a železo).

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] [http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektronov%C3%BD\\_mikroskop](http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektronov%C3%BD_mikroskop)
- [2] [http://home.pf.jcu.cz/~bilyto00/bak/1\\_1.htm](http://home.pf.jcu.cz/~bilyto00/bak/1_1.htm)
- [3] [http://cs.wikipedia.org/wiki/Transmisn%C3%AD\\_elektronov%C3%BDmikroskop](http://cs.wikipedia.org/wiki/Transmisn%C3%AD_elektronov%C3%BDmikroskop)
- [4] [http://en.wikipedia.org/wiki/Transmission\\_electron\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscope)
- [5] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.0.html>
- [6] [http://en.wikipedia.org/wiki/Electron\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Electron_microscope)
- [7] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/1.0.html>
- [8] <http://www2.eng.cam.ac.uk/~bcb/history.htm>
- [9] [http://www.sciencephoto.com/images/download\\_lo\\_res.html?id=725120013](http://www.sciencephoto.com/images/download_lo_res.html?id=725120013)
- [10] <http://www.speciation.net/Database/Instruments/JEOL/JSM7401F-;i24>
- [11] <https://fas.dsi.a-star.edu.sg/equipments/feSEM.aspx>
- [12] [http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic33-02-008\\_3.html](http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic33-02-008_3.html)
- [13] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/3.1.html>
- [14] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/2.3.html>
- [15] <http://kfe.fjfi.cvut.cz/~horny/turbo.pdf>
- [16] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/3.4.html>
- [17] [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/electroninteractions.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/electroninteractions.html)
- [18] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.2.html>
- [19] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/8.0.html>
- [20] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glutaraldehyd>
- [21] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/8.1.html>
- [22] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Formaldehyd>
- [23] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/4.2.html>
- [24] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/4.3.html>
- [25] [http://cs.wikipedia.org/wiki/Mrazov%C3%A1\\_fixace](http://cs.wikipedia.org/wiki/Mrazov%C3%A1_fixace)
- [26] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/5.1.html>
- [27] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/4.1.html>
- [28] <http://www.umich.edu/~lowbrows/guide/opticaljargon.html>

- [29] <http://mohamednabeel.blogspot.com/2010/06/testing-chromatic-aberration-in-sigma.html>
- [30] [http://home.pf.jcu.cz/~bilyto00/bak/3\\_2.htm](http://home.pf.jcu.cz/~bilyto00/bak/3_2.htm)
- [31] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/8.3.html>
- [32] <http://www.pnas.org/content/95/3/1032/F4.expansion.html>
- [33] <http://www.abdn.ac.uk/emunit/emunit/temcells/pages/freeze%20etch%20yeast.htm>
- [34] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/8.2.html>
- [35] <http://www.gatan.com/products/semproducts/products/alto2500.php>
- [36] <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunocytochemistry>
- [37] [http://is.muni.cz/th/178854/prif\\_b/Metody\\_analyzy\\_genove\\_exprese\\_u\\_Arabidopsithaliana.txt](http://is.muni.cz/th/178854/prif_b/Metody_analyzy_genove_exprese_u_Arabidopsithaliana.txt)
- [38] <http://biochemistryquestions.wordpress.com/2009/05/>
- [39] <http://sehgut.co.uk/codex/notes/?biochem30a>
- [40] [http://en.wikipedia.org/wiki/Fragment\\_antigen-binding](http://en.wikipedia.org/wiki/Fragment_antigen-binding)
- [41] [http://en.wikipedia.org/wiki/Fc\\_region](http://en.wikipedia.org/wiki/Fc_region)
- [42] <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/lifescience/generalbiology/physiology/LymphaticSystem/Antibodymediated/Antibodymediated.htm>
- [43] <http://www.virology.ws/wp-content/uploads/2009/07/antibody-150x150.jpg>
- [44] <http://www.familion.com/rituximab/>
- [45] <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunohistochemistry>
- [46] <http://Ige.lf1.cuni.cz/heslo/prikklady/files/methods%20of%20cell%20biology-complet%20with%20figures2%20cz.htm>
- [47] [http://en.wikipedia.org/wiki/Quantum\\_dot](http://en.wikipedia.org/wiki/Quantum_dot)
- [48] <https://www.llnl.gov/str/Lee.html>
- [49] <http://www.elec-intro.com/quantum-dots>
- [50] [http://home.pf.jcu.cz/~bilyto00/bak/3\\_3.htm](http://home.pf.jcu.cz/~bilyto00/bak/3_3.htm)
- [51] *Encyklopedie Diderot*. Praha : Diderot, 1999
- [52] HULÍNSKÝ, V.; JUREK, K. *Zkoumání látek elektronovým paprskem*. Praha : SNTL, 1982. 404 s.
- [53] WELLS, O.C.; JOY, D.C. The early history and future of the SEM. *Surface and interface analysis*. 2006, 38, s. 1738–1742.
- [54] REIMER, L. *Scanning Electron Microscopy : Physics of Image Formation and Microanalysis*. 2. vydání, Springer-Verlag Berlin, 1998.

- [55] NEBESÁŘOVÁ, J., et al. Detection of gold nanoparticles by AuTrata YAG detector in FE SEM working in cryo mode, submitted.
- [56] ERLANDSEN, S.L.; MACECHKO, P.T.; FRETHERM, C. High resolution backscatter electron (BSE) imaging of immunogold with in-lens and below-the-lens field emission scanning electron microscopes. *Scanning Microscopy*. 1999, 13, s. 43-54.
- [57] HERMANN, R.; WALTHER, P.; MÜLLER, M. Immunogold labeling in scanning electron microscopy. *Histochem Cell Biol*. 1996, 106, s. 31-39.
- [58] BASCHONG, W.; STIERHOF, Y.D. Preparation, Use, and Enlargement of Ultrasmall Gold Particles in Immunoelectron Microscopy. *Microscopy Research and Technique* . 1998, 42, s. 66-79.
- [59] ROBINSON, J.M., et al. Ultrasmall Immunogold Particles: Important Probes for Immunocytochemistry. *Microscopy Research and Technique* . 1998, 42, s. 13-23.
- [60] HUGHES, D. Preparation of Colloidal Gold Probes. *Methods in Molecular Biology*. 2005, 295, s. 155-157.
- [61] LEA, P.; GROSS, D.K. Effective Diameters of Protein A-Gold and Goat Anti-rabbit-Gold Conjugates Visualized by Field Emission Scanning Electron Microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1992, 40, 6, s. 751-758.
- [62] PŠENIČKA, M., et al. Size determination of *Acipenser ruthenus* spermatozoa in different types of electron microscopy. *Micron*. 2010, 41, 5, s. 455-460.
- [63] POLAK, J.M.; VAN NOORDEN, S. *Introduction to Immunocytochemistry*. 2. vydání, BIOS Scientific Publishers, 1997.
- [64] SCHATTEN, H.; PAWLEY, J. B. *Biological Low – Voltage Scanning Electron Microscopy*, Springer, 2008.
- [65] ROBARDS, A.W.; WILSON, A.J. *Procedures in Electron Microscopy*. Wiley, 1993.