

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ  
UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro  
imunoznačení ve skenovacím elektronovém mikroskopu  
s autoemisní tryskou

**Bc. Veronika Eiblová**  
**Vedoucí práce:** Ing. Jana Nebesářová, CSc.  
**Školitel – specialista:** RNDr. Marie Vancová, PhD.  
České Budějovice 2011

## **Zadání magisterské diplomové práce**

Eiblová V., 2011: Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunoznačení ve skenovacím mikroskopu s autoemisní tryskou. [The possibilities of using nanoparticles of various metals as the markers for immunocytochemical labelling in field emission scanning electron microscopy. Mgr. Thesis, in Czech] – 73 pages, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

Nowadays, electron microscopy is a widespread method used in many biological branches like medicine, physical science, mikrobiology or material technology.

Scanning electron microscope is a type of an electron microscope that shows the sample surface by scanning it with a high-energy beam of electrons in a raster scan pattern. The signal of electrons reveals information about the sample such as morphology, chemical composition and structure and materials.

Gold nanoparticles are widely used as a marker for immunolabeling in these days. The main point of this research was to find other nanoparticles, which can be used for multiple immunolabeling. The main task of this study is to conjugate these particles with antibodies, to use them for immunolocalisation on the convenient biological sample and to observe it in FESEM JEOL JSM-7401F.

Tato práce byla financována z projektu Nové nanočástice pro ultrastrukturální diagnostiku KAN200520704.

## Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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 dne .....

.....  
Veronika Eiblová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své upřímné poděkování všem, kteří mi pomohli s vypracováním této práce. Zejména své školitelce Ing. Janě Nebesářové, CSc. za cenné rady a trpělivost a RNDr. Marii Vancové, Ph.D. za odborné vedení práce. Také bych chtěla poděkovat Jiřímu Vaněčkovi za to, že mě naučil zacházet, obsluhovat, pracovat se skenovacím elektronovým mikroskopem, Petře Masařové za pomoc s laboratorními postupy, používanými při přípravě biologických preparátů a celému kolektivu laboratoře elektronové mikroskopie za ochotu a příjemnou atmosféru. V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině za podporu během celého studia.

# Obsah

<b>1.</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Elektronová mikroskopie .....	1
<b>2.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>3</b>
2.1.	Skenovací elektronový mikroskop FESEM JEOL JSM-7401F .....	3
2.2.	Co ovlivňuje tvorbu obrazu ve FESEM .....	12
2.3.	Imunolokalizace .....	13
2.4.	Příprava preparátů pro FESEM .....	18
2.5.	Vlastnosti nanočástic .....	20
2.6.	Konjugace .....	20
<b>3.</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>25</b>
4.1.	Přehled nanočástic .....	25
4.2.	Příprava vzorků nanočástic .....	25
4.3.	Výběr vhodných nanočástic .....	28
4.4.	Vliv pokovení na detekci nanočástic .....	30
4.5.	Pozorování ve FESEM .....	31
4.6.	Konjugace .....	32
4.7.	Měření proteinu .....	34
4.8.	Příprava vzorků pro imunoznačení .....	34
4.9.	Imunoznačení na ultratenkých řezech .....	37
4.10.	Dvojitě značení .....	38
4.11.	Prohlížení v TEM a FESEM .....	39
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
5.1.	Výběr vhodných nanočástic .....	41
5.2.	Vliv pokovení na detekci nanočástic .....	45
5.3.	Pozorování ve FESEM .....	45
5.4.	Konjugace .....	46
5.5.	Měření proteinu .....	46
5.6.	Imunoznačení na ultratenkých řezech .....	47
5.7.	Dvojitě imunoznačení .....	47
5.8.	Prohlížení v TEM a FESEM .....	48
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>68</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Elektronová mikroskopie

Po staletí byl optický mikroskop základním nástrojem v biologii. Elektronová mikroskopie však daleko přesáhla možnosti světelného mikroskopu díky velké rozlišovací schopnosti a možnosti velkého zvětšení. V dnešní době je to právě elektronová mikroskopie, která je používána při studiu biologických objektů. Je to metoda, která umožnila studium mikrostruktur, ale i nanostruktur zkoumaných biologických objektů.

Díky vysoké rozlišovací schopnosti těchto mikroskopů mohou být studovány jednotlivé části buňky, povrchové struktury i pochody, které v nich probíhají [32].

Elektronový mikroskop byl přelomový vynález 20. století. V roce 1935 Max Knoll navrhl skenovací elektronový mikroskop (dále jen SEM) [33]. O tři roky později Manfred von Ardenne poprvé sestavil skenovací transmisní elektronový mikroskop [69][50]. V roce 1942 rusko-americký vědec Vladimír Zworykin obohatil SEM o fotonásobič zesilující signál z detektoru sekundárních elektronů. Během vývoje se vědci snažili aplikovat i autoemisní trysku k dosažení vyššího kontrastu [71].

Od prvního vyobrazení povrchu získaného pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Knollem v roce 1935 skenovací elektronová mikroskopie významně pokročila. Od té doby použití tohoto mikroskopu dovolilo bližší poznání ultrastruktury povrchů různých biologických vzorků [33].

V elektronovém mikroskopu jsou světelné paprsky nahrazeny svazkem urychlených elektronů. Ty mají záporný náboj a je možné je urychlovat urychlovacím napětím. Elektrony mají také zanedbatelnou hmotnost v porovnání s protony a neutrony. Díky nízké hmotnosti elektrony nedevastují pozorovaný materiál [75].

Skleněné čočky, které upravují sbíhavost a rozbíhavost paprsků u světelného mikroskopu, byly nahrazeny čočkami elektromagnetickými.

Proud rychle letících elektronů je veden vnitřním prostorem mikroskopu, který je vyčerpán a dopadá na povrch preparátu [72].

SEM je přístroj určený k pozorování povrchů a morfologii pozorovaných objektů. Je také označován jako rastrovací či řádkovací elektronový mikroskop, protože při práci s ním primární svazek řádkuje určitou plochu na povrchu daného preparátu. Jeho popularita spočívá v možnosti získat obrázky povrchů širokého spektra biologických materiálů, jakými mohou být buňky, tkáňové povrchy, intracelulární povrchy, izolované orgány nebo molekulární struktury jako viry, proteiny, nukleoproteinové komplexy nebo nukleové kyseliny. Umožňuje pozorování a charakterizaci vzorků, jejichž velikost je omezena na jedné straně velikostí posunů preparátového stolku uvnitř vakuové komory, do níž se vzorek vkládá, na druhé straně přípravou vzorků určené k pozorování [46].

V dnešní době mají skenovací elektronové mikroskopy vybavené autoemisní tryskou tak velkou rozlišovací schopnost, že umožňují rozlišit i nanočástice zlata o velikosti nanometrů, které se používají při imunolokalizaci. Nejvíce je uplatňováno zlato, protože se v důsledku svého vysokého negativního náboje váže na většinu bílkovin a tvoří s nimi stabilní sol [19].

Cílem mé práce bylo najít další vhodné markery, které budou viditelné ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou. Takové markery navázat na protilátku a s ní provést imunolokalizaci na vhodném modelovém systému.

## 2. Teoretická část

### 2.1. *Skenovací elektronový mikroskop FESEM JEOL JSM-7401F*

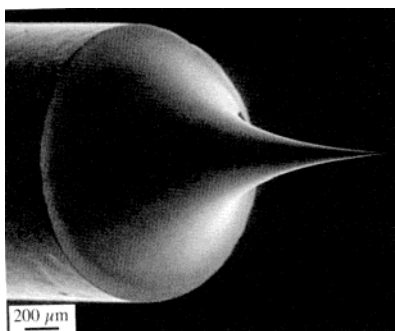
Mikroskop FESEM (field emission scanning electron microscope) JEOL JSM-7401F je vysoko-rozlišovací skenovací elektronový mikroskop. Jako zdroj elektronů používá autoemisní katodu (FE gun) [1].

Dále je mikroskop vybaven elektromagnetickými objektivovými čočkami, r – filtrem a speciálními pracovními módy pro detekci signálů na určité úrovni energie elektronů. Díky těmto technologiím se zlepšila rozlišovací schopnost mikroskopu při nízkém urychlovacím napětí. Mikroskop je dále vybaven Aurata – YAG detektorem, pro detekci zpětně odražených elektronů a kryokomorou CRYO ALTO 2500, zhotovenou firmou GATAN, která umožňuje pozorování zmrazených biologických preparátů [21].

#### 2.1.1. Zdroj elektronů

Ve skenovacím elektronovém mikroskopu FESEM JEOL JSM-7401F jako zdroj elektronů slouží autoemisní tryska (obr. 1). Je výkonnějším zdrojem elektronů s výrazně delší životností. Autoemisní tryska produkuje svazek primárních elektronů o průměru několika jednotek nanometrů. Elektrony jsou uvolňovány wolframovým vláknem, které má v autoemisní trysce hrot vyleptaný do atomární velikosti (60 – 200 nm). Proti hrotu katody je umístěna anoda s kladným napětím 5 kV. Kolem hrotu pak vznikne elektrické pole, díky kterému se začnou vytrhávat elektrony z wolframového vlákna. V okolí autoemisní trysky je prostor vyčerpán na hodnoty vakua okolo  $10^{-8}$  Pa [70].



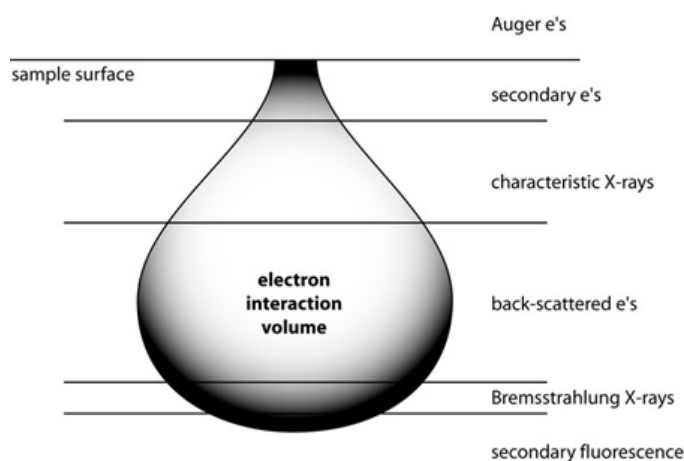


**Obrázek 1.** Autoemisní tryska [4]

### 2.1.2. Tvorba obrazu

Základním jevem při tvorbě obrazu je interakce mezi primárním svazkem elektronů a preparátem v prostoru vyčerpaném na hodnoty vakua.

Na obrázku 2. je znázorněn excitační objem. Je to oblast pod povrchem preparátu, kde jsou primární elektrony brzděny a vznikají jednotlivé signály. Změnou urychlovacího napětí se mění i tvar excitačního objemu. S klesajícím urychlovacím napětím se excitační objem stává mělkším, a tím se snižuje i rozlišovací schopnost mikroskopu. Na druhou stranu se tím snižuje riziko nabíjení vzorků [71].



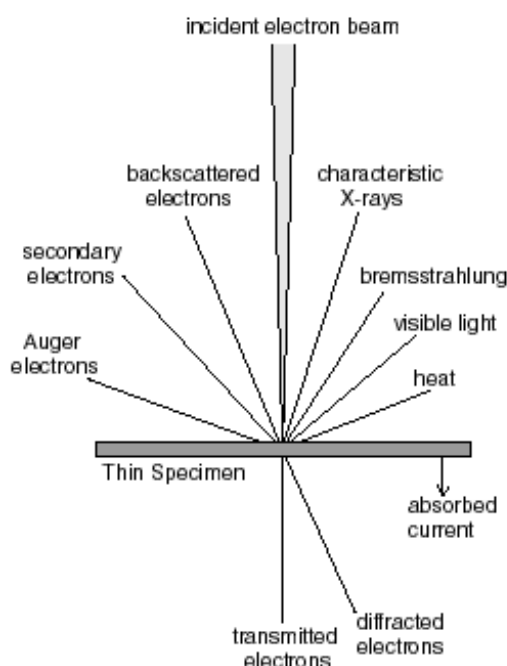
**Obrázek 2.** Excitační objem uvnitř vzorku [11]

Při interakci primárního svazku elektronů s povrchem preparátu může dojít ke dvěma jevům – elastickému a neelastickému rozptylu.

Elastický rozptyl je také označován jako pružný. Dochází k němu, když urychlený elektron prolétá elektronovým obalem atomu preparátu beze změny energie, ale se změnou směru trajektorie. Úhel vychýlení je tím větší, čím blíže míjí elektron jádro a čím větší je náboj jádra. Tento úhel může dosáhnout i  $180^\circ$  od původního směru dráhy a tento typ rozptylu je zdrojem zpětně odražených elektronů.

Neelastický (nepružný) rozptyl vzniká při srážce primárních elektronů s elektrony preparátu. Po této srážce primární elektrony přijdou o značnou část své energie, ale nedojde k odchýlení od původní dráhy [22]. Při této interakci může dojít k vyřazení elektronu z elektronového obalu. Pokud tyto elektrony vzniknou v blízkosti povrchu, z něj mohou vystoupit a jsou detekovány jako sekundární elektrony. Díky své nízké energii dokonale mapují povrch vzorku.

V SEM je výsledný obraz tvořen za pomoci sekundárních signálů – zpětně odražených elektronů (BSE, backscattered electrons) a sekundárních elektronů (SE, secondary electrons), to je považováno za metodu nepřímou. V komoře vzorku vznikají i další signály jako je rentgenové záření, kadtoluminiscence nebo Augerovy elektrony (obr. 3) [71].



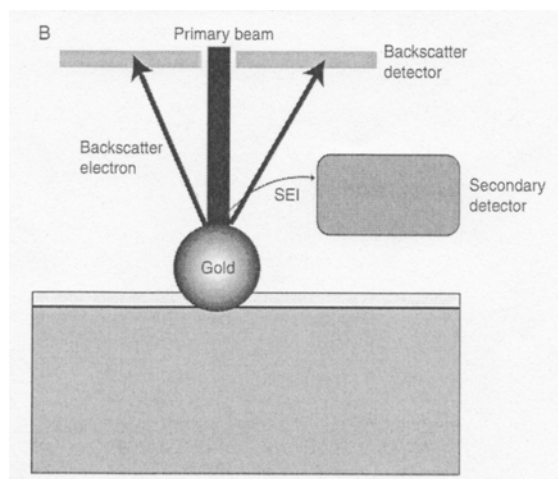
**Obrázek 3.** Interakce elektronů s preparátem tvořeným tenkou vrstvou [3]

Tvorba obrazu spočívá v detekci signálu, uvolněného po dopadu primárních elektronů z daného místa preparátu. Každý signál nese určitou informaci o preparátu. Sekundární nebo zpětně odražené elektrony dopadnou na detektor. Poté vznikne foton, který je zesílen ve fotonásobiči a zpátky převeden na signál elektrický. Signál je zpracováván v detekční soustavě. Po digitalizaci je veden do počítače. Výsledkem je obraz na monitoru počítače, přičemž platí, že čím světlejší místo na obrazu monitoru, tím silnější je signál detekovaný detekční soustavou.

Detekci sekundárních elektronů se získá topografický kontrast a detekci zpětně odražených elektronů materiálový kontrast. Výsledkem kombinace obou signálů je informace jak o topografii povrchu vzorku, tak o jeho materiálovém složení. Kvalitní zobrazení je však možné získat i za použití pouze jednoho signálu.

Sekundární elektrony se od zpětně odražených elektronů odlišují svojí nízkou energií (rychlostí). Vzhledem k jejich nízké rychlosti z vyvýšenin na povrchu vzorku se do detektoru dostane více sekundárních elektronů. To se projeví vyšší intenzitou signálu z detektoru a

v závěru světlým místem na obrazovce. U prohlubenin (mělkých míst) na povrchu vzorku je tomu naopak [70].



**Obrázek 4.** Biologické vzorky produkují méně zpětně odražených elektronů na rozdíl od denzního materiálu jako je částice zlata. Toho se využívá například při imunoznačení [46].

### 2.1.2.1. Detektor elektronů

První, kdo sestrojil detektor pro detekci elektronů, byl Thomas E. Everhart spolu s Richardem F. M. Thornleyem. Detektor Everhart – Thornleyho je v dnešní době široce používán pro detekci sekundárních ale i zpětně odražených elektronů [10]. Nevýhodou tohoto detektoru je skutečnost, že scintilátor, který přeměňuje elektrony na fotony pomocí katodoluminiscence, postupně ztrácí citlivost a musí být vyměněn [70].

Kromě Everhart – Thornleyho detektoru se pro detekci zpětně odražených elektronů využívá YAGova detektoru.

YAGový detektor je monokrystalický scintilační detektor aktivovaný cerem s citlivostí pro zpětně odražené elektrony [51][31]. YAG je zkratka pro yttrio-hlinitý granát ( $Y_3Al_5O_{12}$ ). Tento detektor je umístěný v zadní části FESEM a při použití je zasunut mezi vzorek a pólové nástavce elektromagnetické čočky objektivu [71].

YAG detektor upravený prof. Autratou je schopný detekovat signály zpětně odražených elektronů při nízkém urychlovacím napětí, aniž by se snížila kvalita rozlišení. Tento detektor patří v dnešní době k těm nejvíce používaným. Jeho výhodou je neomezená životnost [51].

### **2.1.3. Popis mikroskopu FESEM JEOL JSM-7401F**

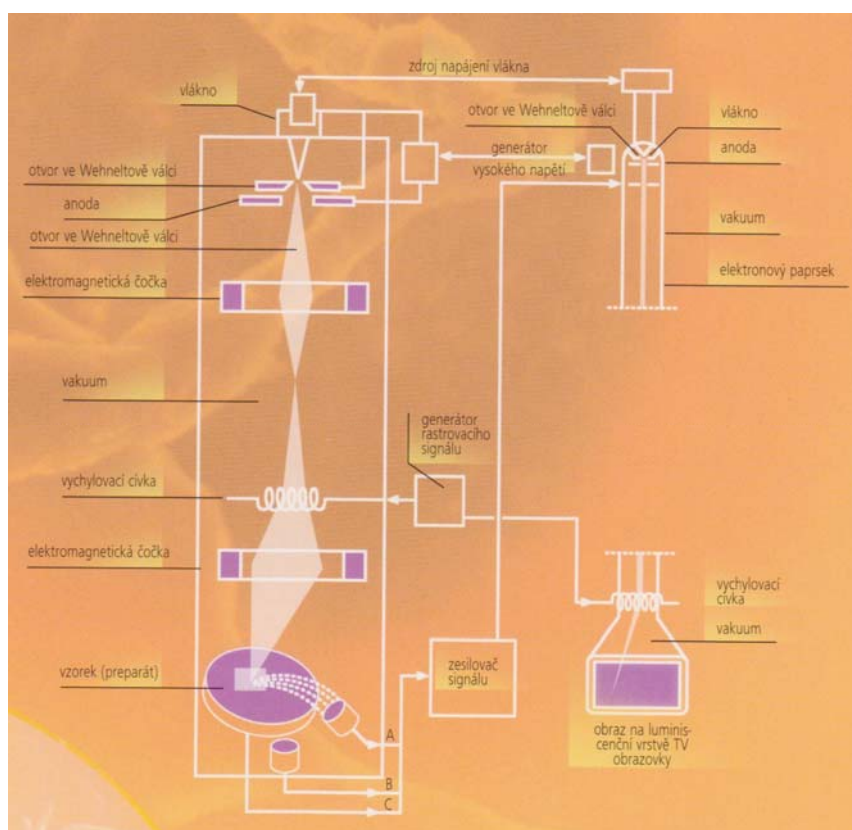
Na levé straně mikroskopu je umístěn tubus s elektronovou optikou, který je připevněn na horní části komory preparátu. Ve skříni pod nimi je vakuový systém. Napravo je obrazovka monitoru, klávesnice a myš pro ovládání mikroskopu a kamery. Všechny ostatní součásti jsou pod pracovní deskou.

Pod tubusem mikroskopu se nachází zdroj elektronů - autoemisní tryska. Pod ní jsou kondenzorové a objektivové čočky, které mají za úkol sfokusovat svazek elektronů. Svazek elektronů prochází vychylovacími cívkami, které způsobí, že po dopadu na povrchu preparátu svazek rastruje danou plochu. Preparát je umístěn na eucentrickém stolku v komoře preparátu.

Ten se nachází v dolní části mikroskopu v komoře preparátu. Na stolek se umísťují vzorky, upevněné ve speciálním držáku. Stolek je vyroben tak, že se s ním dá pohybovat, otáčet i naklánět, a to pomocí joysticku nebo myši počítače. V blízkosti vzorku jsou umístěny detektory signálů (sekundárních elektronů, odražených elektronů) [23].



**Obrázek 5.** Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7401F



**Obrázek 6.** Schéma skenovacího elektronového mikroskopu [23]

**Základní pojmy:**

<sup>1)</sup> **Rozlišovací schopnost** optické soustavy je nejmenší vzdálenost dvou bodů ležících vedle sebe, které je možné rozeznat daným zařízením jako oddělené [23]

<sup>2)</sup> **Zvětšení** je poměr velikost obrazu na monitoru k velikosti řádkování (snímané plochy preparátu). V SEM je zvětšení zcela určeno elektronickými obvody, které zajišťují řádkování (rastrování) elektronového povrchu po povrchu vzorku [23]

<sup>3)</sup> **Pracovní vzdálenost** je vzdálenost mezi vzorkem a elektromagnetickými čočkami [23]

**2.1.3.1. Čočky**

Nejjednodušší elektromagnetickou čočkou je solenoid. Jde o kruhovou cívku, která vytvořeným magnetickým polem působí na dráhu elektronů. Soustava čoček zajišťuje úzký průměr svazku primárních elektronů. Tubus FESEM je tvořen kondenzorovými čočkami, objektivovou čočkou, vychylovacími cívkami a cívkami stigmátorů, které slouží ke korekci astigmatismu [72].

**2.1.3.2. Vnitřní vakuovaný prostor**

Pomocí vakua se sníží pravděpodobnost interakcí elektronů se zbytkovými molekulami vzduchu, které by ovlivňovaly dráhu letících elektronů [75]. Obecně se dostatečně vysoké hodnoty vakua pro SEM získávají pomocí difúzní, nebo turbomolekulární pumpy. V obou případech se provádí předběžné odčerpání vzduchu rotační pumpou [23].

Ve FESEM JEOL JSM-7401F je vnitřní prostor mikroskopu vyčerpán na hodnoty vakua okolo  $10^{-5}$  Pa pomocí iontové pumpy. Největší hodnoty vakua ( $10^{-8}$  Pa) jsou v okolí autoemisní trysky. K odstranění zbytkových molekul vzduchu v tubusu a preparátové komoře slouží difúzní pumpa. Vakuový systém je plně automatizován a chráněn proti chybám obsluhy [21].

### **2.1.3.1. R – filtr**

Po dopadu svazku primárních elektronů se začnou z povrchu preparátu emitovat elektrony o různé energii. R – filtr je energetický filtr sloužící k tomu, aby na detektor sekundárních elektronů dopadaly jen elektrony o vybrané energii. Sekundární elektrony s nízkou energií jsou zachycené filtrem a ty s vyšší energií jsou detekovány [21].

### **2.1.3.2. Gentle Beam (GB) mód**

GB mód zpomaluje elektronový paprsek před vzorkem, snižuje jeho energii. Tím udržuje úzký elektronový svazek a minimalizuje se tak poškození vzorku, aby zajistil vysoké rozlišení.

Při nízkém urychlovacím napětí se průměr svazku zvětšuje a následně se zhoršuje rozlišovací schopnost. Tento mód poskytuje vysokou kvalitu zobrazení při nízkém urychlovacím napětí (100 V – 3 kV). Bez použití GB módu to bylo doposud možné jen při vysokém urychlovacím napětí.

### **2.1.4. Nízkovakuový a environmentální SEM**

Environmentální a nízkovakuový SEM je elektronový mikroskop, určený pro biologické aplikace, kdy je možné pozorovat biologické vzorky in vivo, tedy v původním stavu. Vakuový systém tohoto elektronového mikroskopu umožňuje ponechat v preparátové komoře dostatečný tlak, aby mohly být pozorovány zavodněné. Cenou za možnost prohlížet zavodněné preparáty je snížená rozlišovací schopnost [2].

### **2.1.5. Kryo-FESEM**

Dalším zařízením, umožňující pozorovat zmrazené biologické materiály, je mikroskop vybavený kryostolkem a kryokomorou pro úpravu zmrazených preparátů. Kryostolek je



umístěn spolu s antikontaminátorem přímo v preparátové komoře a umožňuje udržet biologické vzorky hluboce zmrazené i při vlastním prohlížení. V přídatné kryokomoře, která je připojena k mikroskopu, je možné lámat (freeze fracturing), leptat (freeze etching) a pokovovat (coating) [32].

Nejprve je vzorek upevněn do kryodržáku a fixován ponořením do tekutého dusíku. Poté je vzorek zaveden do kryokomory s vysokým vakuem, kde může být preparát upravován jednotlivými metodami (mrazovým lámáním, leptáním a pokovením), a nakonec je vzorek umístěn na kryostolek preparátové komory mikroskopu a pozorován v kryorežimu.

Mikroskopy vybavené kryokomorou jsou vhodné k pozorování tepelně náchylných materiálů jako je například led [6].

FESEM vybavený kryokomorou je mnohostranně využitelná technika, dovolující pozorovat 3D organizaci buněk a ultrastrukturu biologických preparátů [27].

V případě kombinace kryo-FESEM a správné metody přípravy vzorků mohou být pozorované biologické struktury podobné jejich nativnímu stavu [28].

## ***2.2. Co ovlivňuje tvorbu obrazu ve FESEM***

Nejdůležitějším parametrem, který má výrazný vliv na zobrazení, je správné seřízení mikroskopu. Často se vyskytuje osový astigmatismus, způsobený nesymetrií magnetického pole. Astigmatismus je způsoben nabíjením nečistot uvnitř mikroskopu (pólové nástavce čoček, clony). Nečistoty jsou vlivem magnetického pole nabíjeny, což vede k tomu, že letící elektrony procházejí elektromagnetickými čočkami v různých rovinách. Mají tedy jinou ohniskovou vzdálenost. Astigmatismus se koriguje pomocí magnetického pole stigmátoru. U FESEM se provádí i několikrát denně [21].

Mezi další parametry, ovlivňující obraz ve FESEM, je urychlovací napětí. To má vliv na průměr paprsku dopadajícího na preparát. Jeho rozsah je od 1 kV až do 50 kV. Při pozorování biologických preparátů se používá spíše nižšího urychlovacího napětí. Vyšší napětí poskytuje ostřejší obraz. Na druhé straně ale způsobuje rychlejší nabíjení preparátu, a tím snižuje rozlišitelnost povrchových struktur [1].

Dalším parametrem je nabíjení vzorku. Pokrytím povrchu preparátu kovem (zlatem, platinou) nebo uhlíkem se odvede negativní náboj, čímž se sníží možnost deformace vzorku a případná tvorba artefaktů. Vrstva by měla být tenká okolo 5 nm [71].

I složení vzorku má vliv na tvorbu obrazu. Pozorovaný vzorek, který je tvořen těžkými prvky (s vyšším středním atomovým číslem) produkuje více zpětně odražených elektronů. Ale i sekundárních elektronů než vzorek z lehkých prvků (s nižším středním atomovým číslem). Místa s těžšími prvky se ve výsledném obraze projeví jako světlá místa. Naopak lehčí prvky se budou jevit jako místa tmavá [35].

### **2.3. Imunolokalizace**

Imunolokalizace je také často nazývána jako imuno značení. Patří mezi imunocytochemické metody, které umožňují lokalizovat antigeny na elektron – mikroskopické úrovni za pomoci protilátek. Na protilátkách jsou navázány markery (nanočástice).

Imunocytochemické techniky jsou využívány k hledání buněčných a tkáňových antigenů, které se řadí do skupin od aminokyselin a proteinů až po infekční agens a specifické buněčné populace [57].

Poprvé v roce 1971 bylo pro imuno značení v transmisním elektronovém mikroskopu (dále jen TEM) použito koloidní zlato. Faulk a Taylor použili králičí imunoglobulin s navázanou zlatou nanočásticí k identifikaci a lokalizaci antigenů salmonely [36][44]. Následně byly zlaté částice použity v SEM Horisbergem [52].

V dnešní době jsou to především nanočástice zlata, které jsou široce používány jako markery v mikroskopii, k detekci řady buněčných i mimobuněčných komponent. Výhodou zlatých nanočástic je jejich kulovitý tvar, různá velikost částic, afinita k širokému okruhu ligandů, zachování bioaktivity makromolekul a schopnost produkovat SE a BSE signál. Elektron-denzní zlaté nanočástice snadno tvoří monodisperzní suspenze.

Koloidní partikule zlata se používají k imuno značení pro jejich jednoduchou detekci, snadnou přípravu koloidních roztoků o různých velikostech částic (1 – 150 nm), stabilitu a pro

jejich vazebnou rozmanitost. Na povrchu partikulí zlata je vrstva iontů, které obalí částici, a tím zajišťují stabilitu koloidu [25].

### 2.3.1. Antigeny

Antigeny jsou látky, které imunitní systém organismu rozpozná a určitým způsobem s nimi reaguje. Mohou to být buňky vlastního organismu (autoantigeny) nebo cizorodé látky (exoantigeny).

K tomu, aby imunitní systém mohl na antigeny reagovat, je potřeba, aby byly rozpoznány ve formě makromolekul. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny, polysacharidy, lipidy, lipoproteiny a také nukleové kyseliny.

Oblast molekuly antigenu, která je rozpoznávána receptory imunitního systému, se nazývá epitop. Komplexy antigenu s protilátkami a s komplementovými fragmenty se nazývají imunokomplexy [61].

### 2.3.2. Protilátky

Protilátka je sérový protein, který jako součást imunitního systému je schopný identifikovat a zneškodnit cizí částice, jako jsou bakterie nebo viry. Funkci protilátek v těle zastávají glykoproteiny, označované jako imunoglobuliny (proteiny s globulární terciální strukturou). Ty jsou v průběhu imunitní reakce syntetizovány a vylučovány plazmatickými buňkami, diferencovanými B-lymfocyty. Podle struktury imunoglobulinů se protilátky rozdělují do pěti tříd (izotypů) na IgG, IgA, IgM, IgD, a IgE.

IgG je nejčastěji se vyskytující imunoglobulin. Tvoří největší část protilátek. Prostupuje placentou, proto je důležitým faktorem specifické imunity novorozenců po porodu, než si vytvoří vlastní imunitní systém.

IgA se nachází v sekretech, ve slinách, na sliznici dýchacích cest, gastrointestinálního a urogenitálního (močopohlavního) traktu.

IgM je složitá molekula v krvi a tělních sekretech, zodpovědná za časnou protilátkovou odpověď na přítomnost bakterií v organismu.

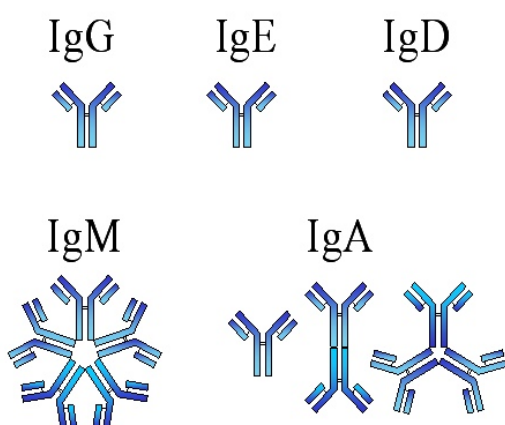
IgD je v séru zastoupen velmi málo. Spolu s IgM se vyskytuje jako receptor na membránách B-lymfocytů.

IgE se uplatňuje například při ochraně proti parazitům a při alergických reakcích, jako je astma a senná rýma [54].

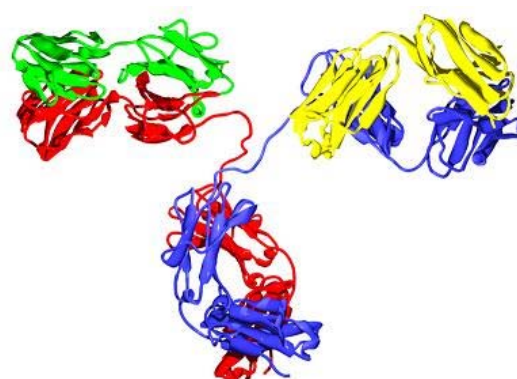
### 2.3.2.1. Struktura protilátek

Molekula imunoglobulinu je orientovaná do tvaru písmene Y. Skládá se ze dvou identických lehkých (L, light) řetězců a dvou těžkých (H, heavy) řetězců spojenými disulfidickými můstky (S–S).

Oblast těžkých řetězců imunoglobulinu tvoří krystalizující fragment, Fc fragment. Tyto fragmenty se váží na Fc receptory na leukocytech. Raménka imunoglobulinu jsou tvořena lehkým a těžkým řetězcem, který přechází z Fc fragmentu. Tato část imunoglobulinu se nazývají antigen vázající fragmenty, Fab fragment (antigen binding fragment). Přechod ramének v oblast s dvěma těžkými řetězci se nazývá závěs (hinge). Molekula je v tomto místě velmi pohyblivá. Raménka imunoglobulinu se mohou otevírat a zavírat podle velikosti navázaného antigenu [78].



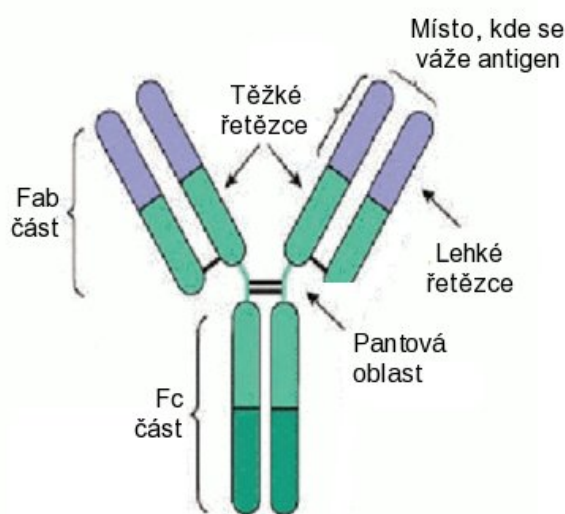
**Obrázek 7.** Struktura jednotlivých tříd imunoglobulinů [7]



**Obrázek 8.** Prostorové uspořádání (terciární struktura) imunoglobulinu [55]

L řetězce – vyznačeny žlutě a zeleně

H řetězce – vyznačeny modře a červeně



**Obrázek 9.** Popis imunoglobulinu [54]

### 2.3.2.2. Monoklonální a polyklonální protilátky

Monoklonální protilátky, jsou získány z klonální populace jedné plazmatické buňky. Protilátky pak mají jednu specifitu a jsou pouze jednoho izotypu. V organismu se vyskytuje jen nepatrné množství jednotlivých monoklonálních protilátek. In vitro se dají získat pomocí izolace klonů B-lymfocytů, které produkují protilátky žádané specifity, a jejich pěstováním v buněčné kultuře.

Polyklonální protilátky jsou produktem mnoha aktivovaných klonů B lymfocytů a proto jsou namířeny proti více epitopům určitého antigenu. Získávají se imunizací laboratorních zvířat antigenem. Při imunizaci organismu dochází ke stimulaci různých B lymfocytů a k jejich proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky. Je produkováno spektrum protilátek proti různým epitopům příslušné bílkoviny s různou schopností se na ni vázat. Po úspěšné imunizaci se zvířeti odebere sérum s protilátkami proti původnímu imunogenu. Specifita polyklonálních protilátek velice závisí na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi zvířete jsou z něj protilátky získávány [55].

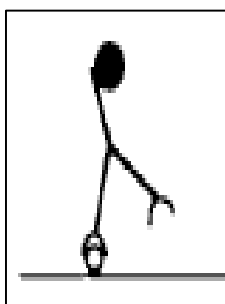
### 2.3.3. Princip imunolokalizace

Existují dvě možnosti, jak je možné provést imunoznačení. Prvním případem je metoda přímá, kdy jsou na povrchu vzorků antigeny, které se detekují. Preparát se inkubuje s primární protilátkou, která nese marker, například nanočástici zlata (obr. 9). Takto se lokalizuje antigen.

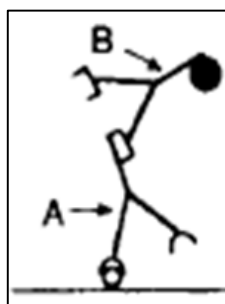
Druhou možností je použití nepřímého imunoznačení. Primární protilátka se naváže na antigen, na Fc konec primární protilátky se naváže sekundární protilátka, na které je navázaná nanočástice (obr. 10,11).

Postup imunoznačení je rozdělen do několika kroků. Prvním krokem je vyblokování nespecifických reakcí. Poté následuje navázání primární protilátky na epitopy ve vzorku. Nenavázané protilátky se musí vymýt ve vypíracím roztoku. V dalším kroku se na primární protilátku naváže sekundární protilátka nesoucí marker. Dále následuje opět promytí nenavázaných protilátek. Nakonec se preparát může zafixovat například 1% glutaraldehydem, po kterém však musí následovat promytí [46].

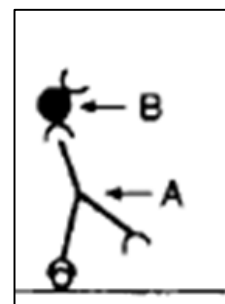
Specifičtější metodou imunoznačení je vícenásobné imunoznačení, kdy k navázání značené protilátky na antigen probíhá v několika krocích, za použití více markerů [76].



**Obrázek 10.** Příklad přímého značení [58]  
IgG s navázanou partikulí zlata



**Obrázek 11.** Příklad nepřímého značení [58]  
A – Protilátka  
B – IgG s navázanou partikulí zlata



**Obrázek 12.** Příklad nepřímého značení [58]  
A – Protilátka  
B – Protein A s navázanou partikulí zlata

### 2.3.4. Schopnost vybraných proteinů vázat se na příslušné proteiny (tab. 1)

Avidin je protein nacházející se ve vaječném bílku ptáků. Má antibakteriální vlastnosti a schopnost specificky a velmi silně se vázat na biotin (vitamin H).

Podobné vlastnosti jako avidin má streptavidin, protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*. Avidin a streptavidin získaly své jméno podle dychtivosti (avidity) s jakou se vážou k biotinu [57].

Protein A je protein izolovaný ze stěny bakterie *Staphylococcus aureus*. Rozpoznává Fc konce těžkých řetězců navázaných protilátek [50].

Tabulka 1. ukazuje vazebnou schopnost proteinů. V levém sloupci jsou primární protilátky, na které se váží sekundární protilátky (pravý sloupec).

Primární protilátka	Sekundární protilátka
Streptavidin	Avidin
Avidin	biotinovaná protilátka
Streptavidin	biotinovaná protilátka
Protein A	váže se na Fc konce navázaných protilátek

**Tabulka 1.** Přehledná tabulka vazebné schopnosti proteinů [57]

## 2.4. Příprava preparátů pro FESEM

Na vzorky určené k pozorování ve FESEM, jsou kladeny velké nároky. Preparát musí být zcela čistý, nesmí se nabíjet, musí odolávat primárním elektronům a měl by produkovat dostatečné signály, aby mohl být zobrazen jeho povrch.

Příprava preparátů podle H. Schattena [34]:

- 1) *Očištění* – povrch preparátu se nejdříve očistí, aby nezbavil nežádoucích nečistot. Větších nečistot je možné se zbavit pomocí jehly. Menší nečistoty se odstraní roztokem HCl nebo NaCl [34].
- 2) *Fixace* – preparát se musí stabilizovat pomocí fixace. To umožní, aby byl pozorovaný vzorek co nejlépe nativnímu stavu. K fixaci se nejvíce používají 1 – 4% roztoky aldehydů (glutaraldehyd, formaldehyd) nebo 1% oxid osmičelý [34].
- 3) *Odvodnění* – je dalším krokem přípravy preparátu. Biologické materiály obsahují přes 80% vody. Ve vakuu by se začala rychle vypařovat a tím by došlo k poškození preparátu. Odvodnění je krok, kdy se nahradí voda organickým rozpouštědlem (aceton, etanol, 2,2-dimetoxypropan) se vzrůstající koncentrací [30][34].
- 4) *Sušení* – vysoušením pomocí metody kritického bodu se vzorek zbaví dehydratačního činidla. Ve speciální aparatuře se dehydratační činidlo nahradí kapalinou (nejčastěji kapalný oxid uhličitý), ta se zahřeje na kritickou teplotu, při které mizí veškeré rozdíly mezi fázemi dané látky. V tomto bodě se kapalina převede do plynného skupenství. Vzorek tedy není poškozený povrchovým napětím kapaliny [28][34].
- 5) *Lepení na terčík* – nakonec se upravený vzorek přilepí na speciální kovový terčík koloidním stříbrem [34].

Po vysoušení se vzorek stává elektricky nevodivým. Při pozorování v mikroskopu dochází k nabíjení primárními elektrony. Aby se tomu zabránilo, pokryje se povrch preparátu tenkou vrstvou kovu nebo uhlíku. Vrstva kovu nebo uhlíku odvádí negativní náboj a teplo, snižuje poškození preparátu a zvyšuje produkci signálu. V případě kovu se nejčastěji používá zlato nebo platina [53].

Z fyzikálních postupů přípravy preparátů se nejčastěji používají mrazové metody jako je například kryofixace, mrazové lámání, mrazové sušení a mrazové leptání [70].



## 2.5. *Vlastnosti nanočástic*

Koloidní nanočástice jsou v dnešní době široce používané, například v biomedicině k diagnostice rakovinných onemocnění [43].

Základní vlastností nanočástic je jejich velikost. Kvůli velikosti v řádu nanometrů je není možné vidět ve světelném mikroskopu, ale pouze v mikroskopu elektronovém. Částice jsou navrženy tak, že odpovídají různým kritériím, souvisejícím s jejich použitím jako je jejich velikost, polarita, hydrofóbní či hydrofilní povrch [39].

Suspenze nanočástic jsou označovány jako koloidy (koloidní částice). To znamená, že jsou rozptýlené v jiné látce. Tato směs nanočástic se nazývá koloidní disperze (koloidní systém) [15].

Ke snížení vzniku irreverzibilních agregací při manipulaci s nanočásticemi, při jejich syntéze, během skladování a při jejich používání se využívá metody, při které jsou nabitě nanočástice obaleny ionty. Tím se jejich náboj vyruší, zůstávají v roztoku separované a nedochází k jejich agregacím [40].

## 2.6. *Konjugace*

Konjugace je proces, při kterém na sebe protein či protilátka naváže určitou nanočástici. Příprava stabilního komplexu nanočástice – protein je založena na dvou typech konjugace, elektrostatické a kovalentní.

Použití optimálního množství reaktantů, izoelektrický bod (pI) proteinu a pH a jsou parametry, které mají vliv na výsledek konjugace.

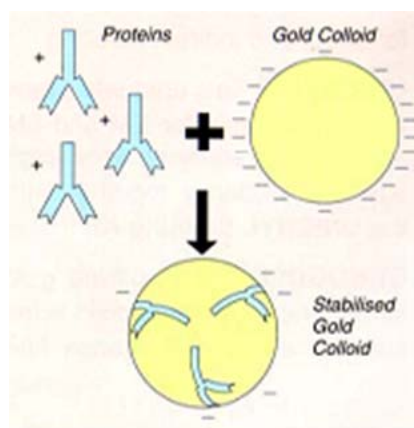
Při dosažení izoelektrického bodu dochází k navázání největšího množství proteinu. Izoelektrický bod je hodnota pH, kdy je volný náboj proteinu nulový. Kladný a záporný náboj je vyrovnán [48].

### 2.6.1. Konjugace elektrostatická

Konjugace elektrostatická je založena na náboji částice, proteinu či protilátky. Protein, který nese kladně nabitý náboj, vytvoří vazbu se záporně nabitou nanočásticí. Výsledkem je protein s navázanou příslušnou částicí, který je možné při imunoznačení použít jako primární nebo sekundární protilátku.

Přidáním proteinu k roztoku nanočástic vznikne spontánní adsorpce proteinu na povrch nanočástice díky elektrostatickým, hydrofobním a Van der Waalsovým interakcím. Vše musí být pečlivě promícháno. Ke stabilizaci proteinu s navázanou nanočásticí je možné použít polyetylenglykol (PEG) nebo imunochemické blokuující agens, jako je BSA nebo roztok ze sušeného mléka. Tyto blokuující agens zabraňují agregaci a tvorbě nespecifických vazeb během konjugace. Nedostatečně obalené částice se sráží přidáním roztoku NaCl. Přebytky proteinu mohou být odstraněny odsátím supernatantu po centrifugaci modifikovaného koloidu [19].

Povrch zlatých částic má hydrofobní a elektrostatické vlastnosti. Proto může dojít k adsorpci proteinů založené na elektrostatické interakci mezi negativně nabitým povrchem partikulí a pozitivně nabitou skupinou proteinů [56].



**Obrázek 13.** Schéma elektrostatické konjugace proteinu se zlatou nanočásticí [59]

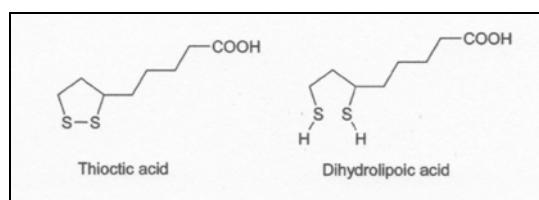
## 2.6.2. Konjugace kovalentní

Pokud elektrostatická konjugace nevyhovuje, je možné vázat proteiny kovalentní vazbou. Při této konjugaci se využívá kovalentní vazby mezi částicí a proteinem. Principem jsou reakce funkčních skupin ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ). Nanočástice je nutné některou z funkčních skupin vybavit.

K tomu se používají zesilující činidla (crosslinking agents), která zprostředkovávají navázání proteinu na nanočástici. Mezi taková činidla patří i EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid). Zajišťuje vazbu mezi látkami obsahující amino skupinu (například protein) a karboxylovou skupinou.

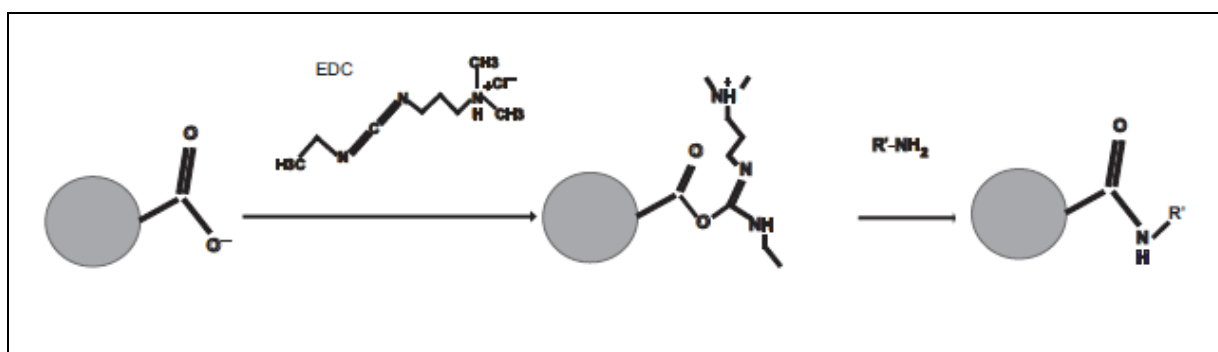
K této konjugaci se k navázání koloidních částic na protein používají látky, obsahující thiolové i karboxylové skupiny. Takové látky se svými thiolovými skupinami naváží na povrch nanočástice. Karboxylová skupina pomáhá stabilizovat elektrostatický náboj koloidních nanočástic. Molekula obsahující thiolovou skupinu může interagovat s nanočásticemi a vytvořit kovalentní vazbu [19].

Mezi takové látky patří dihydrolipoová kyselina. Je charakteristická jednou karboxylovou a dvěma thiolovými skupinami [42]. Je to průhledná, bezbarvá kapalina, která vzniká plnou redukcí kyseliny lipoové [41].



**Obrázek 14.** Vzorec lipoová a dihydrolipoové kyseliny [41]

Při použití DHLA se EDC jedním koncem naváže na karboxylovou skupinu DHLA a svým druhým koncem na amino skupinu molekuly proteinu [19].



**Obrázek 15.** Uspořádání amidové vazby mezi částicí s navázanou DHLA a proteinem obsahující amino skupinu za použití EDC [60]

### **3. Cíle práce**

- Provést literární rešerši k zadané problematice
- Zvládnout teoretické i experimentální základy práce se skenovacím elektronovým mikroskopem s autoemisní tryskou
- Vytipovat kovové nanočástice, které budou využitelné jako markery pro imunoznačení
- Navrhnout a vyzkoušet postup konjugace vhodných nanočástic s protilátkou
- Na vhodném modelovém systému provést s přípravnou značenou protilátkou imunolokalizaci

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Přehled nanočástic

V práci jsem testovala následující nanočástice, viz tabulka 2.

Nanočástice	Velikost (nm)	Označení	Výrobce	Stav
Au	6	Au <sub>06</sub>	Aurion	Roztok
Au	10	Au <sub>10</sub>	Aurion	Roztok
Au	15	Au <sub>15</sub>	Aurion	Roztok
Ag	5	Ag <sub>05</sub>	ÚMG AV ČR, Praha	Roztok
Ag	10	Ag <sub>10</sub>	ÚMG AV ČR, Praha	Roztok
Pd	5	Pd <sub>05</sub>	ÚMG AV ČR, Praha	Roztok
Pd	10	Pd <sub>10</sub>	ÚMG AV ČR, Praha	Roztok

**Tabulka 2.** Přehled použitých nanočástic

Nanočástice Au<sub>06</sub>, Au<sub>10</sub> a Au<sub>15</sub> byly dodané v PBS s 1% BSA a 15 mM NaN<sub>3</sub>. Tyto nanočástice jsou monodisperzní s koeficientem variace < 15%, ale ve většině případů < 10% [58].

Nanočástice Ag<sub>05</sub>, Ag<sub>10</sub>, Pd<sub>05</sub> a Pd<sub>10</sub> byly poskytnuty týmem vedeným RNDr. Miroslavem Šloufem, PhD. z Ústavu makromolekulární chemie, AV Praha, který je připravil podle daného protokolu [47].

### 4.2. Příprava vzorků nanočástic

Vzorky nanočástic byly připraveny nakápnutím příslušné suspenze na elektronmikroskopické síťky, což umožnilo vzorky kontrolovat v TEM.

#### 4.2.1. Příprava elektronmikroskopických sítěk

Materiál: elektronmikroskopické sítěky (TESLA), 50% kyselina octová, jarová voda

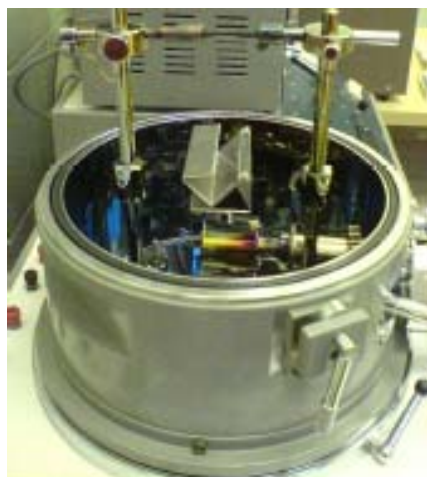
Elektronmikroskopické sítěky se musí před použitím umýt. Ke svým pokusům jsem používala měděné sítěky o průměru 3 mm s velikostí otvorů 400 MESH. Nejprve jsem sítěky ponechala 5 minut v roztoku 50% kyseliny octové. Poté jsem je umístila do jarové vody na dalších 5 minut, následně jsem je promyla 5 minut v destilované vodě a dalších 5 minut v acetonu. Nakonec jsem je usušila na filtračním papíru. Vyčištěné sítěky jsem uskladnila v Petriho miskách na čistém a suchém místě.

#### 4.2.2. Příprava podložní uhlíkové blány

Materiál: elektronmikroskopické sítěky (TESLA), uhlíkové elektrody (Karbotechnik)

Uhlíkové blány jsem připravila v napařovací aparatuře JEOL JEE 4C (obr. 16) pomocí metody nepřímého napařování [68]. Rozdílem mezi nepřímým a přímým napařováním je umístění odštipnuté slídy do zákrytu, aby nedocházelo k přímému napařování částic uhlíku. Blána připravená metodou nepřímého napaření je homogennější.

Na otáčecí stolek, doprostřed napařovací aparatury, jsem umístila pomůcku pro nepřímé napařování, vyrobenou Jiřím Vaněčkem z Laboratoře elektronové mikroskopie (LEM), České Budějovice. Do držáků elektrod v napařovací aparatuře jsem upevnila 2 uhlíkové elektrody o velikosti cca 5 až 10 cm. Uhlíkové elektrody jsem umístila naproti sobě, jedna měla zúžený konec, kterým se opírala o plochý konec druhé. K vytvarování zúženého konce jsem použila speciální ořezávátko (POLARON, Watford England) [20]. V místě dotyku došlo k průchodu elektrického proudu (30 A), zvýšil se odpor a elektrody se zahřály. Z daného místa se začaly vypařovat atomy uhlíku. Vše bylo provedeno po vyčerpání prostoru napařovací aparatury pomocí difúzní vývěvy na hodnoty vakua  $1,3 \times 10^{-4}$  až  $1,3 \times 10^{-5}$  Pa.



**Obrázek 16.** Umístění pomůcky pro nepřímé napařování doprostřed napařovací aparatury na otáčecí stolek

Následovalo splavení blan ve splavovací vaničce s výpustí (obr. 17), která byla také vyrobena technikem Jiřím Vaněčkem z LEM v ČB.

Vaničku jsem naplnila destilovanou vodou tak, aby hladina vody byla cca 1cm pod okraj. Pod vodní hladinu jsem na plíšek s otvory pomocí pinzety ponořila kousek filtračního papíru a na něj opatrně pinzetou pokládala čisté elektronmikroskopické sítky matnou stranou nahoru.

Slídu s uhlíkovou vrstvou jsem ponořila do destilované vrstvy pod úhlem  $45^\circ$ . Blána se oddělila od slídy a zůstala plavat na hladině. Pomocí špejle s řasou jsem blánu umístila nad filtrační papír se sítkami a pomalu jsem začala vypouštět vodu z vaničky do připravené kádinky. Po úplném vypuštění vody jsem filtrační papír se sítkami nechala uschnout a před použitím uchovávala v bezprašném suchém prostředí v Petriho miskách.





**Obrázek 17.** Splavovací vanička s výpustí

### **4.2.3. Postup přípravy vzorků nanočástic**

Materiál: Au<sub>10</sub> (Aurion), Ag<sub>05</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), Ag<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), Pd<sub>05</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), Pd<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), elektronmikroskopické síťky 400 MESH (Tesla)

Síťky s uhlíkovou podložní blanou jsem uchytila za okraj do křížových pinzet. Na síťky jsem nakápla 10  $\mu$ l roztoku nanočástic Au<sub>10</sub>, Ag<sub>10</sub>, Pd<sub>05</sub> a Pd<sub>10</sub>. Nechala jsem 15 minut zaschnout a zbytek roztoku jsem zespodu opatrně odsála filtračním papírem tak, abych neporušila vzorek.

Síťky jsem přilepila pomocí stříbra na terčik a pozorovala ve FESEM.

## **4.3. *Výběr vhodných nanočástic***

### **4.3.1. Statistické vyhodnocení**

Materiál: Au<sub>10</sub> (Aurion), Ag<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), Pd<sub>05</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), Pd<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), elektronmikroskopické síťky 400 MESH (Tesla)

Abych zjistila, jaké nanočástice jsou nejvhodnější pro pozorování ve FESEM, zjišťovala jsem jejich stabilitu pod elektronovým svazkem.

Nanočástice Pd<sub>05</sub>, Ag<sub>10</sub>, Au<sub>10</sub>, a Pd<sub>10</sub> nakápnuté na měděných sítkách s uhlíkovou blanou jsem vložila do FESEM při daném zvětšení, urychlovacím napětí, pracovní vzdálenosti a při použití daného pracovního módu viz tabulka 3.

Nanočástice	Zvětšení	Urychlovací napětí (kV)	Pracovní vzdálenost (mm)	Pracovní mód
Pd <sub>05</sub>	300 000	15	8,1	BSE
Ag <sub>10</sub>	200 000	15	8,1	BSE
Au <sub>10</sub>	120 000	10	8	BSE
Pd <sub>10</sub>	150 000	15	8,1	BSE

**Tabulka 3.** Nastavení FESEM při pozorování nanočástic

Ze snímků pořízených ve FESEM ve zpětně odražených elektronech snímaných digitálně s rozlišením o velikosti 1280×1024 jsem provedla statistické měření velikosti nanočástic, viz příloha 3. Měření jsem provedla v programu IMAGE J [12]. Pomocí kterého jsem prahovala, tedy stanovovala stupeň šedi, pod kterým byl objekt na snímku bílý, nad kterým byl černý. Výsledný obraz byl již jen v černé a bílé, a tím došlo k ohraničení plochy jednotlivých částic. Jejich průměr byl vypočten ze vztahu pro plochu kruhu, přičemž plocha nanočástice se rovnala ploše kruhu. Takto vypočtený průměr se označuje jako ekvivalentní [13]. Druhá metoda, stanovení tzv. Feretova průměru, je založena na změření nejdelší vzdálenosti mezi dvěma pixely na obvodu nanočástice [14].

Zjištěná data byla zpracována v programu Microsoft Office Excel 2007, pomocí kterého byly spočítány ekvivalentní a Feretovy průměry průměrů pro jednotlivé nanočástice a statistické odchylky průměrů nanočástic.

#### 4.4. *Vliv pokovení na detekci nanočástic*

Materiál: Au<sub>10</sub> (Aurion), elektronmikroskopické síťky 400 MESH (Tesla)

V rámci své práce jsem se věnovala vlivu pokovení vzorku na celkovém zobrazení ve FESEM.

Síťky s nanočásticemi Au<sub>10</sub> jsem připevnila na oboustranně lepicí pásku na podložní sklíčko. Takto připravené vzorky byly pokryty vrstvou uhlíku nebo platiny, jejíž tloušťka se lišila v závislosti na době napařování či napařování po různou dobu.

V napařovací aparatuře JEOL JEE 4C byl na vzorky přímo napařován uhlík po dobu 15 s, 34 s, 50 s při elektrickém proudu 30 A.

Do speciální aparatury Polaron Equipment LTD SEM Coating unit E5100 jsem umístila vzorky a pokrývala je vrstvou platiny po dobu 5 s, 10 s, 30 s, 60 s a 180 s. Aparatura byla nastavena na tyto parametry – elektrický proud 20 mA, napětí 2,5 kV při tlaku o velikosti menší než 0,1 torr.

Tento přístroj využívá vzniku usměrněného výboje v prostředí nízkotlaké argonové atmosféry účinkem elektrického napětí. Při výboji dochází k ionizaci plynu. Vzniklé ionty jsou přitahovány ke katodě, která je obkroužena prstencem z napařovaného kovu, tedy platiny. Urychlené ionty vyrážejí částice kovu, které se rozptylují srážkami s dalšími molekulami a ionty plynu, tím vznikne prostorový mrak částic napařovaného kovu, který padá na preparát a obalí jeho povrch tenkou vrstvou platiny [9].

Po napařování a napařování jsem síťky přilepila pomocí stříbra na terčik a pozorovala ve FESEM ve zpětně odražených a sekundárních elektronech, při urychlovacím napětí 10 kV, při zvětšení 120 000 a pracovní vzdálenosti 8,1 mm.



**Obrázek 18.** Napařovací aparatura  
JEOL JEE 4C



**Obrázek 19.** Iontová napařovací aparatura  
Polaron Equipment LTD SEM Coating unit  
E5100

## 4.5. Pozorování ve FESEM

### 4.5.1. Rozlišitelnost nanočástic různého složení a velikostí

Materiál: nanočástice Au<sub>06</sub> (Aurion), Au<sub>10</sub> (Aurion), Au<sub>15</sub> (Aurion), Pd<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), elektronmikroskopické síťky 400 MESH (Tesla)

Další otázka, která vyplynula při práci s FESEM, byla, zda jsme schopni v tomto mikroskopu rozlišit dvě různé částice. Částice jednoho kovu lišící se svou velikostí a částice různých kovů o stejné velikosti. K tomuto pokusu jsem použila vzorky nanočástic Au<sub>06</sub> s Au<sub>15</sub> a Au<sub>10</sub> s Pd<sub>10</sub>.

Na elektronmikroskopické síťky jsem nakápla nejprve 5  $\mu$ l roztok nanočástic Au<sub>15</sub> a poté 5  $\mu$ l Au<sub>06</sub>. Na další síťku jsem nakápla nejprve 5  $\mu$ l Au<sub>10</sub> a poté 5  $\mu$ l Pd<sub>10</sub>. Po 15 minutách jsem zbytek roztoku ze sítěk odsála filtračním papírem.

Síťky jsem přilepila pomocí stříbra na terčik a pozorovala nejprve v TEM při zvětšení 120 000 $\times$ . Následně ve FESEM ve zpětně odražených elektronech, při urychlovacím napětí 10 kV, při zvětšení 120 000 $\times$  a pracovní vzdálenosti 8 mm.

## 4.6. Konjugace

### 4.6.1. Konjugace elektrostatická

#### 4.6.1.1. Konjugace Pd nanočástic s IgG (kozí anti-myší)

Materiál: IgG kozí anti-myší o koncentraci 2,4 mg/ml (Jackson Immuno Research), nanočástice Pd<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), 25 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 50 mM HEPES (4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina), 6% PEG (polyethylenglykol)

K této konjugaci jsem použila nanočástice Pd<sub>10</sub> a protilátku IgG. Za použití 25 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jsem upravila pH nanočástic na 7,4. Ke 100 µl roztoku protilátek jsem přidala 66 µl 5 mM pufru NaHCO<sub>3</sub>. Poté jsem smíchala 25 µl roztoku protilátek IgG s 5 ml roztoku nanočástic Pd<sub>10</sub>. Vše bylo mícháno přes noc při pokojové teplotě. Následující den jsem roztok stabilizovala 0,04% PEG. Poté centrifugováno (Amicon Ultra 4) při 11 800 ot/min po dobu 30 minut. Supernatant jsem opatrně odsála a jemný pelet obsahující konjugáty jsem resuspendovala v 0,66 ml 50 mM pufru HEPES s 1 µl 6% PEGu. Výsledný roztok jsem pro lepší skladování zakonzervovala azidem sodným. Množství vzniklého konjugátu bylo ověřeno při imuno značení.

### 4.6.2. Konjugace kovalentní

#### 4.6.2.1. Konjugace nanočástic Pt a Pd se streptavidinem

Materiál: DHLA (laboratorně připravené a komerční – Fluka), nanočástice Pt<sub>12</sub>, Pd<sub>12</sub>, EDC, streptavidin (Sigma), 0,05 M tetraboritan sodný, 0,05 M kyselina boritá, PES (polyethersulfon) stříkačkový filtr 0,22 µm (Millipore), cut-off kolonky YM100 (Millipore)

Přidáním 0,05 M tetraboritanu sodného k 0,05 M kyseliny borité tak, aby pH výsledného roztoku bylo 7,4 jsem připravila borátový pufr. Použila jsem asi 70 µl

tetraboritanu sodného. Borátovým pufrům jsem 3x vypláchla ampuli s DHLA, promíchala a převedla do mikrozkuřavky (eppendorřky). Přidala jsem 300  $\mu\text{l}$  roztoku nanočářtic Pd<sub>12</sub> nebo Pt<sub>12</sub>. Směř jsem nechala míchat přibližně 1 hodinu na vortexu při pokojové teplotě a při teplotě 4° C. Rozděřila jsem roztok DHLA v borátovém pufru s přidávkem nanočářtic do 4 eppendorřek. Odvážřila jsem 2 mg streptavidinu a rozpustřila je ve 100  $\mu\text{l}$  borátového pufru. 25  $\mu\text{l}$  roztoku borátového pufru se streptavidinem jsem přidala do každé mikrozkuřavky s DHLA a čářticemi. Odhadem bylo v každé mikrozkuřavce přibližně 500  $\mu\text{g}$  streptavidinu. Vše bylo pečřlivě promícháno. Dále jsem připravřila roztok EDC. Odvážřila jsem 2 mg EDC a rozmíchala ve 200  $\mu\text{l}$  destilované vody. Ke každému vzorku jsem přidala 7  $\mu\text{l}$  EDC. Vše bylo mícháno 30 minut na vortexu při pokojové teplotě a při 4° C. Každý vzorek jsem přefřiltrovala přes PES filtr, abych odstranřila velké agregáty. Roztoky jsem převedla do čistě mikrozkuřavky a centrifugovala 15 minut, 17 500 ot/min při 4° C. Ke zkoncentrování konjugátu jsem postupně přidávala vzorky na cutt-off kolonky YM100 (cca 400  $\mu\text{l}$  při 12 000 ot/min a 4° C). Množství vzniklého konjugátu bylo ověřeno při imunoznačení.

#### **4.6.2.2. Konjugace Ag a Pd nanočářtic s proteinem A**

Materiál: DHLA (Fluka), nanočářtice Ag<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), Pd<sub>10</sub> (ÚMG AV ČR, Praha), EDC, streptavidin (Sigma), 0,05 M tetraboritan sodný, 0,05 M kyselina boritá

Podle stejného postupu, který je popsán v kapitole 4.5.2.1., jsem provedla kovalentní konjugaci proteinu A s nanočářticemi Ag<sub>10</sub> a Pd<sub>10</sub>. Místo streptavidinu bylo použřito stejného množství proteinu A. Množství vzniklého konjugátu bylo ověřeno při imunoznačení.

#### **4.6.3. Příprava DHLA**

Materiál: 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, lipoořvá kyselina, NaBH<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 36% HCl, toluen, síran hořečnatý, PES střřřkačkový filtr 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore)

Připravila jsem vodný roztok 0,25 M NaHCO<sub>3</sub>. Nejprve jsem odvážíla 6 g lipoové kyseliny do 117 ml roztoku NaHCO<sub>3</sub>. V lázni o teplotě okolo 0° C jsem pomalu po částech (10 – 20 mg) přidávala 1,2 g NaBH<sub>4</sub>. Vše jsem míchala 30 minut. Po přidání 100 ml toluenu vznikl dvoufázový roztok. Směs jsem okyselila na pH 1 přidáním H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 36% HCl. Vzniklá redukovaná forma lipoové kyseliny byla převedena plně do organické fáze, která se mléčně zakalila. K oddělení obou fází jsem použila dělicí nálevku. Odebrala jsem organickou fází obsahující požadovanou redukovanou formu lipoové kyseliny. Poté jsem přidala síran hořečnatý, který jsem použila jako sušící agens, díky němuž jsem roztok zbavila vody. Roztok jsem zfiltrovala přes PES filtr. Pomocí vakuové odparky jsem roztok zbavila toluenu.

#### **4.7. Měření proteinu**

Materiál: Quanti-IT™ Protein Assay Kit (INVITROGENA, Qubit™ fluorometer), IgG kozi anti-myší s Pd<sub>05</sub>, streptavidin s navázanými nanočásticemi Pt<sub>12</sub> a Pd<sub>12</sub>

Pomocí fluorometru jsem změřila množství proteinu po zkoncentrování. Tak byla měřena koncentrace zbytkového proteinu a toto číslo udávalo, jestli se změnila oproti vstupní koncentraci a jestli tedy došlo k snížení této koncentrace v důsledku konjugace [8].

Do tenkostěnných mikrozkušavek (eppendorfek) jsem odebrala 199 μl pufru a 1 μl fluorescenčního činidla. K tomu jsem přidala 2 μl roztoku jednotlivých proteinů s navázanými nanočásticemi. Vzorky jsem promíchala na vortexu a ponechala 15 minut ve tmě při pokojové teplotě. Poté jsem jednotlivé mikrozkušavky vložila do přístroje a změřila množství proteinu. Výsledek jsem zaznamenala do tabulky.

#### **4.8. Příprava vzorků pro imunoznačení**

Materiál: elektronmikroskopické síťky 400 MESH potažené formwarovou podložní blánou, HeLa buňky, BSA, slinné žlázy klíštěte *Ixodes ricinus*

Pro imunoznačení jsem použila ultratenké řezy, protože bylo nutné provést kontrolu v TEM JEOL JEM-1010. Použila jsem vzorky HeLa buněk, BSA a slinných žláz klíštěte *I. ricinus*. Řezy o tloušťce 70 nm mi byly poskytnuty laborantkou Petrou Masařovou z LEM ČB. Řezy byly nakrájeny diamantovým nožem na ultramikrotomu LEICA UCT a položeny na niklové síťky s formwarovou podložní blanou.

#### 4.8.1. HeLa buňky

Jsou buněčnou linií lidských epiteliálních buněk. Jedná se o nádorové buňky. Jejich název pochází ze jména pacientky **Henrietty Lacksové**, která trpěla rakovinou děložního hrdla. V roce 1951 byly poprvé izolovány právě z tkáně této pacientky. HeLa buňky se dnes kultivují v laboratořích takřka po celém světě a využívají se ve výzkumu v různých oborech jako je například imunologie nebo onkologie [5].

Vzorky HeLa buněk byly fixovány ve 2% paraformaldehydu s 0,1% glutaraldehydem. Materiál byl dehydrován roztoky etanolu, ve kterých se postupně zvyšovala jeho koncentrace, a zároveň se snižovala teplota (metoda PLT) [28]. Buňky byly zality do pryskyřice LR White při 4° C a polymerizovány 2 dny UV světlem při teplotě 4° C [73].

Vzorek HeLa buněk byl poskytnut prof. Pavlem Hozákem, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha. V LEM ČB se vzorky HeLa buněk používají jako standardy pro imunoznačení F-aktinu a  $\beta$ -tubulin.

#### 4.8.2. BSA

Materiál: BSA o koncentraci 4,7 mg/ml, želatina, 4% paraformaldehyd, 0,1% glutaraldehyd, 100% etanol, pryskyřice LR White (Polysciences)

Vzorek bovinního sérového albuminu o koncentraci 4,7 mg/ml byl připraven laborantkou Petrou Masařovou z LEM ČB rozpuštěním prášku BSA ve 20% želatině. Poté byl vzorek zafixován 4% paraformaldehydem s 0,1% glutaraldehydem ve fosfátovém pufru.

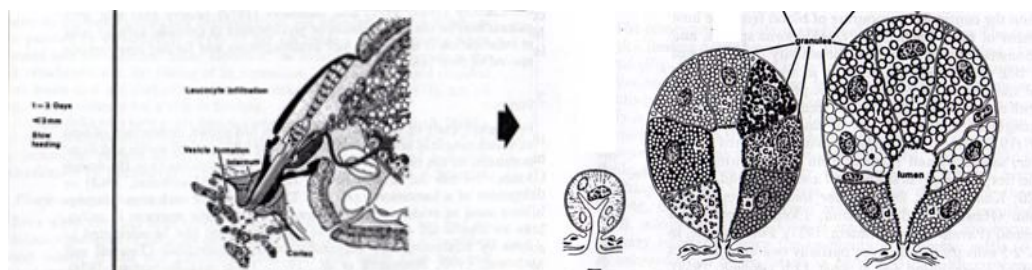


Vzorek byl odvodněn ve 100% etanolu a zalit do pryskyřice LR White. Polymerizován teplem při 56° C v termostatu.

#### 4.8.3. Slinné žlázy klíštěte *Ixodes ricinus*

Materiál: 4% formaldehyd, 0,5% glutaraldehyd, etanolová řada (30%, 50%, 70%, 100%), Lowicryl K4M (Polysciences)

Slinné žlázy z nasátých samic klíštěte *I. ricinus* (obr. 20) byly vypitvány RNDr. Marií Vancovou, Ph.D. Dále byly fixovány 1 hodinu 4% formaldehydem s 0,5% glutaraldehydem za teploty 4° C. Poté byly dehydratovány pomocí metody PLT (progressive lowering of temperature), která se používá pro imunoznačení, aby se zabránilo případným extrakcím, agregacím a změnám buněčných komponent. Materiál byl dehydrován roztoky etanolu se zvyšující se koncentrací za současného snižování teploty. Dehydratace začala 30% etanolem při 0° C, 50% a 70% při -20° C a nakonec 100% při -35° C. Vzorek byl zalit do pryskyřice Lowicryl K4M při -35° C. K polymeraci bylo použito UV světlo při teplotě -35° C po dobu 2 dnů [38].

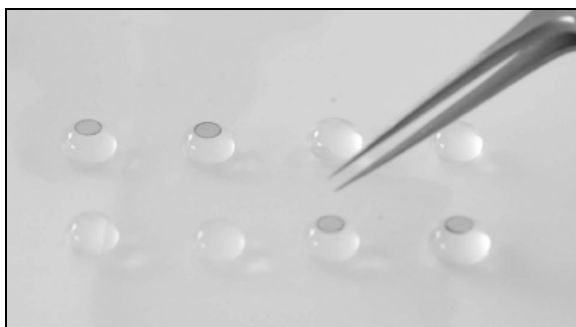


Obrázek 20. Slinné žlázy klíštěte *Ixodes ricinus* [49]

#### 4.9. Imunoznačení na ultratenkých řezech

Materiál: 3% BSA, 0,02 M glycin, 0,05% Tween 20 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát), TRIS (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), NaCl, elektronmiskroskopické sítěky 400 MESH

Provedla jsem nepřímé imunoznačení na ultratenkých řezech (HeLa buňky, slinné žlázy klíštěte *I. ricinus*, BSA). Praktické imunoznačení (obr. 21) spočívalo v přemísťování sítěk na kapky chemikálií v následujícím sledu:



**Obrázek 21.** Imunoznačení ultratenkých řezů

- 1) TBS (100 ml superdestilované vody, 753 mg TRIS, 876 mg NaCl)
- 2) Blok (3% BSA, 0,02 M glycin, 0,05% Tween 20 v 10 ml TBS) – 1 až 3 hodiny
- 3) Primární protilátka naředěná v TBS 1: 50 – 1 až 3 hodiny
- 4) Promytí v TBS/0,05% Tween 20 – 6x 2 minuty
- 5) Sekundární protilátka naředěná v TBS 1: 30 – 1 až 3 hodiny
- 6) Promytí v TBS/Tween 20 – 6x 2 minuty
- 7) Promytí v TBS – 3x 2 minuty
- 8) Promytí v H<sub>2</sub>O – 3x 2 minuty

#### 4.9.1. Primární a sekundární protilátky

Materiál:  $\beta$ -tubulin (Sigma), F-aktin (Sigma), biotinovaný konkavalin A (Vector), streptavidin, rabbit anti-BSA (Enzo)

U vzorku HeLa buněk jsem značila aktin a tubulin. Jako primární protilátku jsem použila  $\beta$ -tubulin, F-aktin a biotinovaný konkavalin A. Jako sekundární protilátka k  $\beta$ -tubulinu a F-aktinu sloužila protilátka IgG (kozí anti-myší) s elektrostaticky navázanou nanočásticí Pd<sub>05</sub>.

Vzorek BSA byl přímo značen primární protilátkou rabbit anti-BSA, na který se navázala sekundární protilátka protein A značená Ag<sub>10</sub> nebo Pd<sub>10</sub>.

U slinných žláz klíštěte *I. ricinus* jsem značila glykany pomocí biotinovaného konkavalinu A, na který se navázal streptavidin jako sekundární protilátka s navázanými nanočásticemi Pt<sub>12</sub> nebo Pd<sub>12</sub>.

#### 4.10. Dvojitě značení

Materiál: 3% BSA, 0,02 M glycin, 0,05% Tween 20, NaCl, TRIS, WGA biotin (Vector),  $\alpha$  biotin rabbit (Sigma), GNA dig (Roche),  $\alpha$  rabbit/gold (Aurion),  $\alpha$  dig sheep/gold (Aurion)

Provedla jsem dvojitě imunozačení na vzorcích slinných žláz klíštěte *I. ricinus* podle následujícího protokolu:

- 1) TBS (100 ml superdestilované vody, 753 mg TRIS, 876 mg NaCl)
- 2) Blok (3% BSA, 0,02 M glycin, 0,05% Tween 20 v TBS) – přes noc při 4° C
- 3) Protilátka WGA biotin naředěná v TBS 1: 50 – 2 hodiny
- 4) Promytí v TBS/0,05% Tween 20 – 6x 2 minuty
- 5)  $\alpha$  biotin rabbit + GNA dig v TBS v poměru 1: 50 – 2 hodiny
- 6) Promytí v TBS/0,05% Tween 20 – 6x 2 minuty
- 7)  $\alpha$  rabbit/gold (10nm) +  $\alpha$  dig sheep/gold (10 nm) v TBS v poměru 1: 30 – 2 hodiny
- 8) Promytí v TBS/Tween 20 – 6x 2 minuty

9) *Promytí v TBS* – 3x 2 minuty

10) *Promytí v H<sub>2</sub>O* – 3x 2 minuty

Pomocí WGA (**W**heat **G**erm **A**glutinin, patří do skupiny lektinů, lektin z obilných klíčků) jsem značila glukosamin a neuraminovou kyselinu [74], bylo značené ve třech krocích. Na WGA se navázalo biotinované WGA, na které se vázal  $\alpha$  biotin rabbit a následně se na něj navázal  $\alpha$  rabbit značený 10 nm zlatem.

Pomocí GNA (**G**alanthus **N**ovalis **A**gglutinin, také patří mezi lektiny) jsem značila manosu [16], bylo značené dvoukrokově. Na GNA se navázal GNA dig (digoxigenin), na který se navázal  $\alpha$  dig sheep (komerční) s navázaným zlatem o velikosti 10 nm.

#### **4.11. Prohlížení v TEM a FESEM**

Kvůli lepší orientaci jsem vzorky nejprve prohlížela v TEM JEOL JEM-1010 (obr. 22) a poté ve FESEM JEOL JSM-7401F (obr. 23).

V TEM jsem vzorky pozorovala při zvětšení 120 000, v případě dvojitého imunoznačení jsem pozorovala při zvětšení 50 000. Obraz byl zachycen CCD kamerou Sis MegaView III rozlišením 1392×1040 pixelů a snímacím softwarem AnalySIS 3.1 (Soft Imaging analysis, Jeol standard TEM). Snímky byly pořízeny v 16 bitovém formátu a pomocí programu AnalySIS převedeny do 12 bitového formátu. Mikroskop pracoval při urychlovacím napětí 80 kV.

Ve FESEM jsem vzorky pozorovala ve zpětně odražených a sekundárních elektronech při zvětšení 120 000 až 300 000, při pracovní vzdálenosti 8 až 8,1mm a při urychlovacím napětí 10 kV až 15 kV. Byl použit akviziční software Jeol PC-SEM 7401 EOS. Velikost rozlišení obrazu bylo 1280×1024 pixelů. Snímky byly pořízeny v 8 bitovém formátu.

K detekci zpětně odražených elektronů byl použit Autrata – YAG detektor.



**Obrázek 22.** Transmisní  
elektronový mikroskop JEOL JEM-1010



**Obrázek 23.** Skenovací  
elektronový mikroskop JEOL JSM-  
7401F

## 5. Výsledky

### 5.1. Výběr vhodných nanočástic

U nanočástic Ag bylo měření velmi nepřesné kvůli jejich nestabilitě pod elektronovým svazkem ve FESEM.

Nanočástice Pd byly pod elektronovým svazkem stabilní kromě nanočástic Pd<sub>05</sub> viz příloha 1. Jako nejvhodnější nanočástice jsou nanočástice Au.

Vhodnost či nevhodnost nanočástic pro pozorování ve FESEM ukazuje přehledná tabulka 4.

Nanočástice	Vlastnosti ve FESEM
Ag	Nestabilní
Pd	Stabilní
Pt	Nestabilní
Au	Stabilní

**Tabulka 4.** Přehled nanočástic a jejich vlastností ve FESEM

#### 5.1.1. Statistické vyhodnocení

Statického měření jsem provedla pro nanočástice Ag<sub>10</sub> (viz příloha 2), Au<sub>10</sub> (viz příloha 3.) a Pd<sub>10</sub> (viz příloha 4.). Nanočástice Ag<sub>05</sub> byly natolik nestabilní, že jsem nemohla pořídit zaostřený snímek a nemohla provést statistické měření.

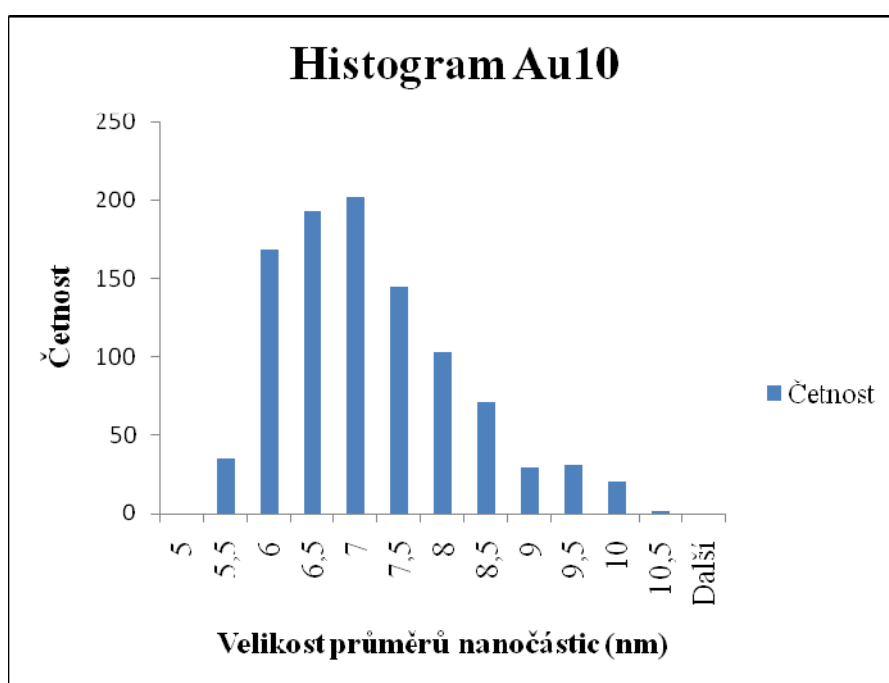
Feretův průměr byl u všech provedených měření vyšší, což je dáno vlivem skenování na tvar měřené částice.

Výsledné histogramy popisují závislost četnosti částic na velikosti průměrů nanočástic.

PRŮMĚR		FERET	
Průměr	6,9	Průměr	8,7
Počet	1000	Počet	1000
Minimum	5,1	Minimum	6,1
Maximum	10,1	Maximum	14,1
Směrodatná odchylka	1,0	Směrodatná odchylka	1,3

**Tabulka 5.** Hodnoty ekvivalentního průměru Au<sub>10</sub>

**Tabulka 6.** Hodnoty Feretova průměru Au<sub>10</sub>



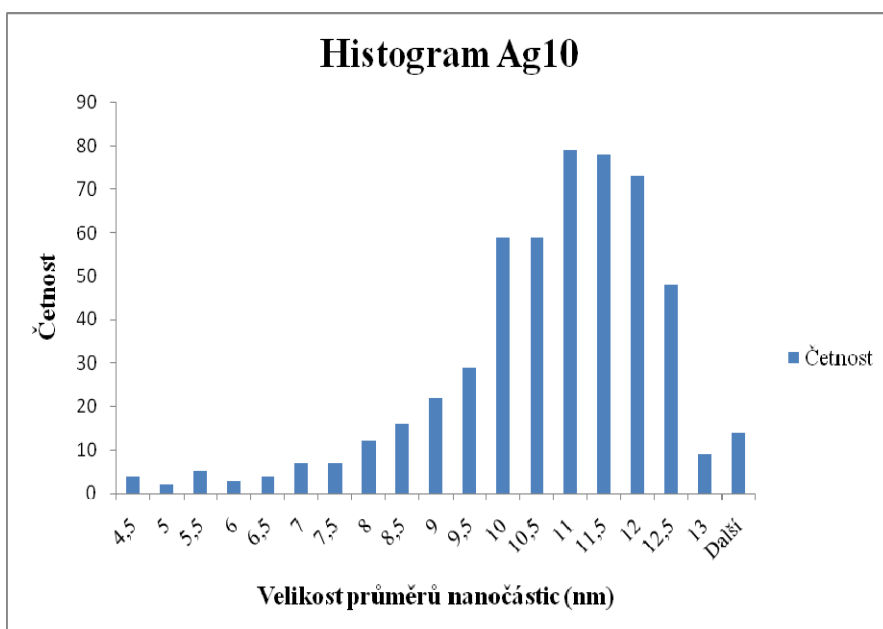
Velikost $\phi$ nanočástic (nm)	Četnost
5	0
5,5	35
6	168
6,5	193
7	202
7,5	145
8	103
8,5	71
9	30
9,5	31
10	20
10,5	2
Další	0

**Graf 1.** Histogram Au<sub>10</sub> - závislost velikosti průměru nanočástic na četnosti

PRŮMĚR		FERET	
Průměr	10,4	Průměr	12,0
Počet	530	Počet	530
Minimum	4,3	Minimum	5,1
Maximum	13,9	Maximum	17,4
Směrodatná odchylka	1,6	Směrodatná odchylka	1,9

**Tabulka 7.** Hodnoty ekvivalentního průměru Ag<sub>10</sub>

**Tabulka 8.** Hodnoty Feretova průměru Ag<sub>10</sub>



**Graf 2.** Histogram Ag<sub>10</sub> - závislost velikosti průměru nanočástic na četnosti

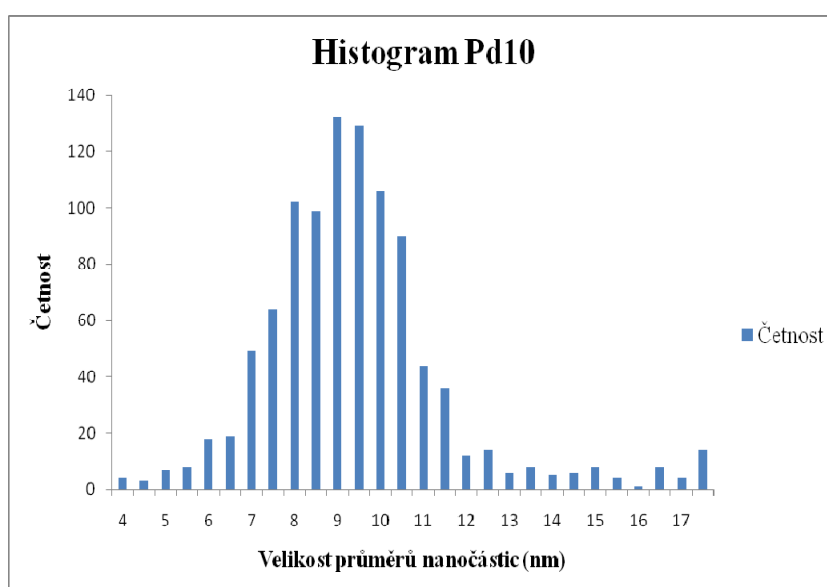
Velikost $\phi$ nanočástic (nm)	Četnost
4,5	4
5	2
5,5	5
6	3
6,5	4
7	7
7,5	7
8	12
8,5	16
9	22
9,5	29
10	59
10,5	59
11	79
11,5	78
12	73
12,5	48
13	9
Další	14



PRŮMĚR		FERET	
Průměr	9,2	Průměr	11,3
Počet	1000	Počet	1000
Minimum	3,7	Minimum	4,7
Maximum	19,0	Maximum	24,5
Směrodatná odchylka	2,2	Směrodatná odchylka	2,3

Tabulka 9. Hodnoty Feretova průměru

Tabulka 10. Hodnoty ekvivalentního

Pd<sub>10</sub>průměru Pd<sub>10</sub>Graf 3. Histogram Pd<sub>10</sub> - závislost velikosti průměru nanočástic na četnosti

Velikost $\phi$ nanočástic (nm)	Četnost	Velikost $\phi$ nanočástic (nm)	Četnost	Velikost $\phi$ nanočástic (nm)	Četnost
4	4	9	132	14	5
4,5	3	9,5	129	14,5	6
5	7	10	106	15	8
5,5	8	10,5	90	15,5	4
6	18	11	44	16	1
6,5	19	11,5	36	16,5	8
7	49	12	12	17	4
7,5	64	12,5	14	Další	14
8	102	13	6		
8,5	99	13,5	8		

## 5.2. *Vliv pokovení na detekci nanočástic*

Vzorky nanočástic Au<sub>10</sub> byly natolik stabilní, že je nebylo nutné pokovovat. V příloze 5. a 6. jsou pro srovnání obrázky nanočástic Au<sub>10</sub> v TEM a ve FESEM bez pokovení. U FESEM se pokovením odvádí náboj, čímž se snižuje možná deformace vzorku a případná tvorba artefaktů [71].

V případě platiny je nejvhodnější pokovovat v intervalu od 5 s do 30 s viz příloha 9., 10., 11., 12., 13. a 14. kdy při 30 s jsou částice skryté ve vrstvě platiny, ale jsou částečně viditelné. Při pokovování nad 30 s jsou částice překryté tlustou vrstvou platiny a nejsou viditelné, viz příloha 15., 16., 17., 18. V sekundárních elektronech nebylo možné částice pořádně zaostřit a výsledný obraz byl rozmazaný.

Při naprašování uhlíkem je ideální čas v intervalu od 15 s do 50 s viz příloha 19., 20., 21., 22., 23. a 24.

Při pozorování v sekundárních elektronech se ve všech případech zdají být částice větší než ve zpětně odražených.

## 5.3. *Pozorování ve FESEM*

### 5.3.1. *Rozlišitelnost nanočástic různého složení a velikostí*

Z hlediska vícenásobné imunolokalizace bylo potřeba zjistit, zda lze rozlišit nanočástice stejného kovu lišícího se velikostí nebo dvou různých kovů se stejnou velikostí.

Ze snímku z TEM (viz příloha 5.) a FESEM (viz příloha 6.) je vidět, že je možné rozlišit nanočástice stejného kovu, lišící se velikostí.

Při pozorování vzorku Au<sub>10</sub> a Pd<sub>10</sub> v TEM i FESEM bylo zjištěno, že není možné rozlišit nanočástice různých kovů o stejné velikosti viz příloha 7. a 8.

Předpokladem rozlišení nanočástic z jiných kovů pomocí BSE zobrazení bylo, že místa tvořená prvky s vyšším atomovým číslem se budou ve výsledném obraze jevit jako světlá a naopak tomu bude u prvků s nižším atomovým číslem. Těžší prvky s vyšším atomovým číslem budou ve FESEM produkovat více zpětně odražených elektronů na rozdíl

od prvků s nižším atomovým číslem. Tento předpoklad se nepodařilo prokázat, jak dokumentují snímky v příloze 7. a 8., kde jsou zachyceny nanočástice Au<sub>10</sub> a Pd<sub>10</sub> v TEM i FESEM.

## **5.4. Konjugace**

Úspěšnost konjugace jsem testovala pomocí imunoznačení. S nanočásticemi elektrostaticky navázanými na protein jsem provedla imunoznačení na vzorcích HeLa buněk. S proteiny s kovalentně navázanými nanočásticemi jsem provedla imunolokalizaci na vzorcích BSA a slinných žláz klíštěte *I. ricinus*.

### **5.4.1. Příprava DHLA**

Výsledný roztok DHLA měl být čirý. Roztok byl však žlutý. V průběhu mohlo dojít ke kontaminaci roztoku. Další pokusy proto byly prováděny s komerčně připravenou DHLA.

## **5.5. Měření proteinu**

Po zkoncentrování bylo změřeno množství konjugátu, viz tabulka 10. Výsledky jsou pouze orientační. Přístroj měří i volné proteiny, které mohly v roztoku zůstat i po přefiltrování a centrifugování.

Nanočástice	Protein	Druh konjugace	Teplota při konjugaci °C	Počáteční koncentrace µg/ml	Změřená koncentrace µg/ml
Pd <sub>05</sub>	IgG kozí anti-myší	elektrostatická	RT	2400	181
Pt <sub>12</sub>	Streptavidin	kovalentní	4	1250	856
Pt <sub>12</sub>	Streptavidin	kovalentní	RT	1250	942
Pd <sub>12</sub>	Streptavidin	kovalentní	4	1250	100
Pd <sub>12</sub>	Streptavidin	kovalentní	RT	1250	143

**Tabulka 10.** Výsledky měření proteinu

## 5.6. Imunozačnění na ultratenkých řezech

Ultratenké řezy s imunozačněním jsem nejprve prohlédla v TEM JEOL JEM-1010. Zjistila jsem, že navázaných částic je velmi málo. Z tohoto důvodu nebylo možné tyto preparáty prohlížet ve skenovacím elektronovém mikroskopu FESEM JEOL JSM-7401F.

## 5.7. Dvojitě imunozačnění

Bylo provedeno i dvojitě imunozačnění na vzorcích slinných žláz klíštěte *I. Ricinus*. Četnost navázaných nanočástic byla vyhovující pro pozorování ve FESEM. Největší četnost navázaných značených protilátek je na acinech typu III. V příloze 23. jsou výsledky dvojitěho značení při pozorování v TEM a v příloze 24. při pozorování ve FESEM ve zpětně odražených elektronech. Při zobrazení v sekundárních elektronech se částice nedaly zaostřit. Obraz byl rozmazaný.

## **5.8. Prohlížení v TEM a FESEM**

Připravené vzorky jsem pozorovala v TEM JEOL JEM-1010 a FESEM JEOL JSM-7401F. Pořízené snímky jsou přiložené v příloze, viz kapitola 8.

## 6. Diskuze

Dříve se ke studii buněčných ultrastruktur v rámci elektronové mikroskopie používal TEM, a pomocí SEM se zobrazovali pouze povrchy biologických materiálů. Zavedením nových technik jakými jsou autoemisní tryska, kryokomora, detektory, které zajišťují vysoké rozlišení mikroskopu, uvedly skenovací elektronovou mikroskopii téměř na úroveň rutinní biologické transmisní elektronové mikroskopie. Nevýhodou při pozorování preparátů v SEM je, že zobrazuje pouze povrch vzorků, nikoliv jejich vnitřní struktury jako TEM. Avšak v dnešní době jsme schopni řadou metod (především kryo) přípravy vzorků, které umožňují odhalení vnitřních částí biologického preparátu a následné pozorování v SEM.

V současné době pozorování v mikroskopu využívá různého imunoznačení některých buněčných komponent například k odhalování jejich funkce v buňce a ke stanovení její vitality. Imunocytochemické techniky také umožňují poznávání chemického složení jednotlivých buněčných komponent. Práce s elektronovými mikroskopy a imunolokalizace patří mezi jedny z nejrychleji se rozvíjející metod v oblasti biologického a medicínského studia.

Skenovací elektronový mikroskop FESEM poskytuje řadu možností k pozorování strukturního uspořádání biologických systémů, od samotných makromolekul až po organizaci tkání a celého organismu [30].

Hlavním úkolem mé práce bylo najít další možné markery z různých kovů, které by mohly být použity pro imunoznačení.

K vytipování nanočástic jsem použila nanočástice zlata, stříbra, palladia a platiny. Podle výsledků pozorování ve FESEM jsem došla k závěru, že po zlatu jsou nejvhodnější nanočástice palladia, které jsou při pozorování ve FESEM zachovávají stabilitu a jsou dobře rozpoznatelné. Dalším předpokladem k výběru nanočástic palladia byl ten, že se dají dobře konjugovat.

Provedla jsem statistické vyhodnocení těchto nanočástic v programu Image J. Změřila jsem dva druhy průměrů – ekvivalentní a Feretův průměr. Podle naměřených hodnot jsem zjistila, že ve všech případech byl Feretův průměr vyšší, což může být dáno vlivem skenování na tvar částice, ale i nepřesným prahováním označením částic v programu Image J.

Ekvivalentní průměr je brán za přesnější metodu [13]. V důsledku skenování se nanočástice jeví jako elipsy a Feretovův průměr je potom roven delší ose této elipsy.

Vícenásobným imunoznačením se v roce 2007 zabývala skupina vědců z Wisconsinské univerzity. Pro vícenásobné značení vybrali nanočástice zlata a palladia o velikosti 6 nm různého tvaru. Koloidní zlaté nanočástice byly elektrostaticky navázány na monoklonální protilátku myšního anti-myosinu. Koloidní nanočástice palladia byly elektrostaticky navázány na protilátky myšního anti-aktinu, pH bylo upraveno na 8,5 až 9. Vzorky byly centrifugovány na ultracentrifuze při 20 000 otáčkách po dobu 30 minut a resuspendovány v 0,05 M pufru HEPES o pH 7,4. K imunoznačení byla použita krysí kostní tkáň. Na kostní tkáň se jako primární protilátka použil anti-myosin s navázaným zlatem a myšící anti-aktin s navázanými nanočásticemi palladia. Vzorky byly nakrájené na ultratenké řezy o velikost 60 nm, položené na elektronmikroskopické síťky, pokryty vrstvou uhlíku a pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu Zeiss EFTEM (energy-filtering TEM) 912 při urychlovacím napětí 120 kV. Výsledkem vícenásobného značení jsou vícenásobná data získaná z jednoho vzorku. U vzorků krysí tkáně se zjistilo, že nanočástice zlata jsou navázána na myosinu a palladium na  $\alpha$ -aktinu [77].

Velikost částic pozorovaných ve FESEM je ovlivňována urychlovacím napětím mikroskopu. Čím větší je urychlovací napětí, tím větší je odchylka od skutečné velikosti nanočástice. Při vyšším urychlovacím napětí proniká primární svazek elektronů více do vzorku a vybudí tak vyšší intenzitu signálu. Tyto signály znehodnocují výsledný obraz a povrchové detaily, které se stávají špatně rozlišitelné. K dosažení lepšího obrazu povrchu vzorku by měly být vzorky pozorovány při nižším urychlovacím napětí [26].

V článku o vlivu urychlovacího napětí na velikosti částic bylo zjištěno, že při pozorování vzorku v sekundárních elektronech při 30 kV se částice jeví větší než při 5 kV. Při vyšším urychlovacím napětí svazek primárních elektronů proniká hlouběji do vzorku, tím dojde k produkci sekundárních elektronů označovaných jako SE2. Tyto elektrony vznikají v důsledku srážky se zpětně odraženými elektrony v tenké povrchové vrstvě. Následně dojde k degradaci povrchových detailů pozorovaného vzorku [26].

Moderní skenovací elektronové mikroskopy kombinované s adekvátní přípravou vzorků nyní poskytují rozlišení 2 – 5 nm. Citlivost YAG detektoru umožňuje detekci koloidních nanočástic v řádu jednotek nanometrů [35].

V rámci své práce jsem se věnovala schopnosti rozlišit ve FESEM dvě částice, což by mohlo mít přínos pro vícenásobné značení. Pro tento pokus jsem zvolila nanočástice zlata a palladia o velikosti 10 nm. Střední atomové číslo zlata je 79, zatímco palladia 46 [17]. Zlato by mělo produkovat více zpětně odražených elektronů než palladium. Zlato by se proto ve FESEM mělo jevit světlejší a palladium tmavší, přičemž velikost nanočástic by měla být stejná [35]. V mém případě při pozorování v mikroskopu FESEM JEOL JSM-7401F při pracovních podmínkách - urychlovací napětí 10 kV, zvětšení 120 000, pracovní vzdálenosti 8 mm, nebylo možné rozlišit nanočástice zlata a palladia částice. Nanočástice zlata a palladia vykazovaly v BSE zobrazení stejnou intenzitu, je nebylo možné rozlišit.

K rozlišení dvou částic stejného kovu jsem použila zlato o velikosti 6 a 15 nm. Na pořízených snímcích ze zpětně odražených elektronů je vidět, že nebyl problém tyto nanočástice ve FESEM, pracujícím při urychlovacím napětí 10 kV, při zvětšení 120 000, pracovní vzdálenosti 8 mm a za použití BSE signálu, rozlišit tyto částice.

Dále jsem se zabývala vlivem pokovení na detekci nanočástic ve FESEM. Pokrytím povrchu vzorku vrstvou kovu nebo uhlíku se snižuje jeho nabíjení a případné poškození [71]. Pro tento pokus jsem si zvolila zlaté nanočástice o velikosti 10 nm, které jsou při pozorování v elektronovém mikroskopu stabilní.

Platinou jsem pokovovala v časech 5 s, 10 s, 30 s, 60 s a 180 s. Nejvhodnější však byly časy v intervalu od 5 do 30 s. Při pokovení po dobu 30 s je pokovení hraniční, protože vrstva platiny už částečně překrývá částice zlata, přesto jsou ještě viditelné. Částice se v tomto případě jeví větší, mohlo jít o agregáty. Při pokovení povrchu vzorku po dobu více než 30 s byly částice skryté ve vrstvě platiny.

Uhlíkem jsem vzorky s nakápnutými zlatými částicemi naprašovala po dobu 15 s, 34 s a 50 s. Zjistila jsem, že i při naprašování po dobu 50 s jsou částice viditelné. Při naprašování uhlíkem je ideální čas v intervalu od 15 s do 50 s.

V obou případech se částice, pozorované v sekundárních elektronech, jeví větší než při zobrazení ve zpětně odražených elektronech. Při zobrazení v sekundárních elektronech byly detaily nanočástic skryté ve vrstvě platiny nebo uhlíku. Ztratily se detaily, které sekundární elektrony mohou zobrazit. Bylo možné zobrazit jen povrchovou vrstvu materiálu.

Nevodivé vzorky se pokrývají tenkou vrstvou kovu nebo uhlíku ke zvýšení vodivosti. Vrstva by měla být tenká, aby nezaničily struktury vzorku [29]. U zmrazených biologických



materiálů se vzorky nejprve pokryjí vrstvou kovu o tloušťce 1 až 3 nm, potom se pokryjí vrstvou uhlíku o tloušťce 5 až 10 nm. Celý tento proces vede ke stabilizaci vzorku, poté jsou vzorky prohlíženy v sekundárních nebo zpětně odražených elektronech. Pokud by se zmrazený vzorek pokryl pouze vrstvou platiny, při pozorování v elektronovém mikroskopu by vzorek roztál a vrstva platiny by se roztrhala. Vrstva uhlíku slouží jako podložní vrstva a tím se vzorek stává flexibilnější vůči ozáření [18].

Konjugace nanočástic není triviální záležitost. Je zde spousta aspektů, které ovlivňují průběh konjugace. Největším problémem při konjugaci je správné sladění pH roztoku protilátek s pH roztoku nanočástic. Když se pH přizpůsobí protilátkám, tak nanočástice ztrácí charakter koloidu. Konjugáty koloidního zlata se dnes široce používají pro imunolokalizaci v celé řadě odvětví, hlavně v biomedicině či biologickém výzkumu, protože zlaté nanočástice jsou při pozorování v elektronovém mikroskopu stabilní [35].

Provedla jsem konjugaci proteinů s nanočásticemi Ag, Pt a Pd. Při konjugaci jsem měla problémy detekovat množství konjugovaných proteinů. Měřením množství proteinu pomocí fluorometru u nanočástic platiny a palladia jsem získala pouze orientační celkovou koncentraci proteinů v roztoku, ze kterého byly odstraněny konjugáty. Nicméně je možné předpokládat, že u vzorků, které vykazují nejnižší zbytkovou koncentraci proteinů, proběhla konjugace úspěšně.

Pro vlastní potvrzení výsledků konjugace bylo třeba použít imunoznačení s preparáty HeLa buněk, BSA a slinných žláz klíštěte *I. ricinus*.

Nanočástice palladia byly na protein navázány pomocí elektrostatické vazby. V mém případě i po následně provedené imunolokalizaci nebylo množství navázaných částic dostatečné. Není jisté, zda nedošlo už v průběhu konjugace ke kontaminaci, což mohlo mít právě za následek nízký počet navázaných nanočástic. Tento vzorek nebylo možné prohlédnout ve FESEM kvůli nízkému počtu částic.

U kovalentní konjugace byl výsledek stejný jako u elektrostatické konjugace. Na vzorcích byl počet navázaných nanočástic příliš nízký. V tomto případě mohla být příčina v nadbytku DHLA při konjugaci, kdy mohlo dojít k rozštípání či zmišení částic.

Připravit konjugáty s navázanými nanočásticemi zlata, narozdíl od platiny, palladia nebo stříbra, je snadné, protože zlaté nanočástice jsou zachovávají stejnou velikost. To je důležité k vytvoření stabilního komplexu [24].

V případě imunoznačení na vzorcích HeLa buněk, BSA a slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* příliš nízká četnost navázaných nanočástic.

U vzorku vícenásobného imunoznačení slinných žláz klíštěte *I. ricinus* bylo navázaných částic dostatek pro pozorování ve FESEM. Zhotovila jsem snímek z TEM a z FESEM ve zpětně odražených elektronech pomocí YAG detektoru. Nebylo však možné pořídit snímky v módu sekundárních elektronů, protože se částice nedaly zaostřit, obraz byl rozmazaný. To mohlo být dáno špatným seřizením mikroskopu, popřípadě nabíjením vzorku.

Hiroko Agematsu, který vedl v roce 1997 studii k objasnění typu a původu kolagenových vláken uvnitř mléčného zubu, použil nepřímé imunoznačení s nanočásticemi zlata [45]

Orsinoho studie z roku 2007 ukázala morfologické uspořádání lidského dentinu a predentinu. Skenovací elektronový mikroskop ukázal organizaci kolagenových vláken v predentinu a přítomnost dentálních tubulů v dentinu. Přesná role dekorinu a biglykanu uvnitř prematrix a matrix v lidských zubech by však měla být blíže objasněna. K této studii byly také použity protilátky s navázanými zlatými nanočásticemi [37].

Práci s nanočásticemi bychom mohli přirovnat k běhu na dlouhou trať, neboť je to práce nelehká, která vyžaduje čas a trpělivost. Je to však cesta schůdná, na které je nutné dále pracovat.

## 7. Závěr

Ze všech pokusů bylo zjištěno, že pro imunoznačení ve FESEM jsou nejvhodnější nanočástice zlata a palladia.

Bylo zjištěno, že při pokování vzorků nanočástic Au<sub>10</sub> platinou je nejlepší pokovovat v intervalu od 5 s do 30 s a případě uhlíku je nejvhodnější v intervalu od 15 s do 50 s.

Ve FESEM bylo možné rozlišit nanočástice zlata o velikosti 6 nm a 15 nm. V mém případě však nebylo možné odlišit nanočástice palladia a zlata o velikosti 10 nm.

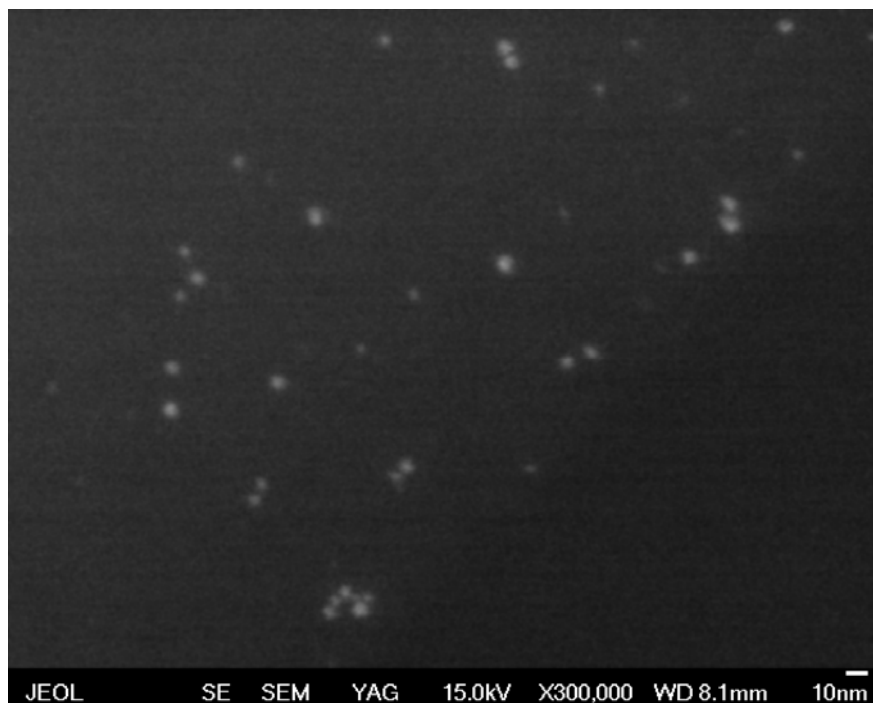
Byla provedena elektrostatická i kovalentní konjugace s různými nanočásticemi (Pd, Pt, Ag) o různých velikostech. Pomocí fluorometru byla změřena koncentrace zbytkového proteinu po zkoncentrování roztoku. Pro vlastní potvrzení výsledků byla provedena imunolokalizace na vzorcích HeLa buněk, BSA a slinných žláz klíštěte *I. ricinus*.

Pro imunoznačení byly použity koloidní nanočástice Pd (5 nm, 10 nm, 12 nm), Pt (12 nm) a Ag (10 nm).

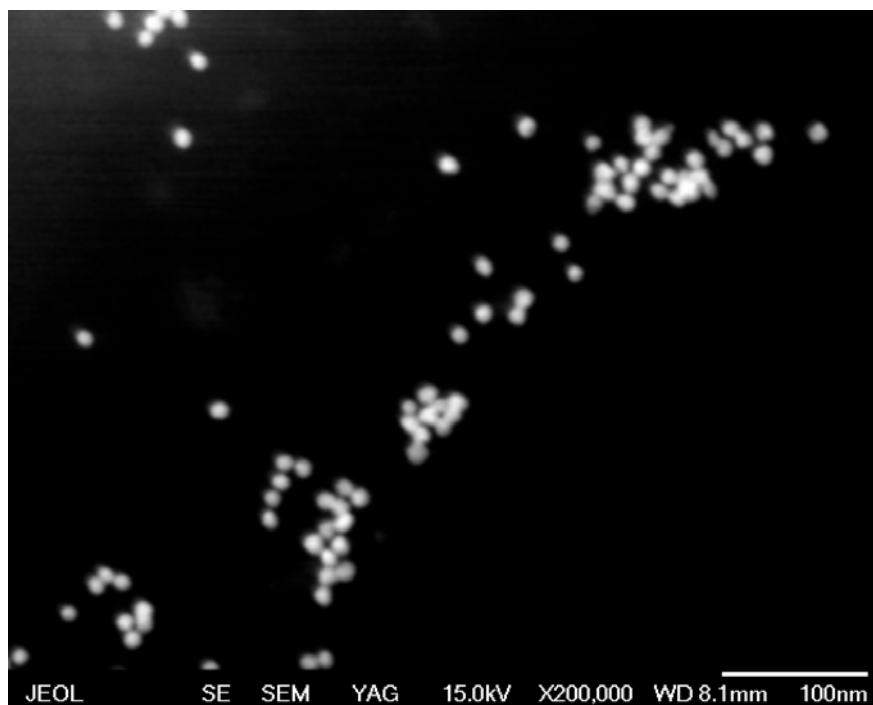
Vzorky byly prohlíženy nejprve v TEM JEOL JEM-101. V mém případě bylo při pozorování v mikroskopu zjištěno, že vzorky měly velmi malou četnost navázaných nanočástic a nebylo proto možné pozorovat ve FESEM JEOL JSM-7401F.

Bylo provedeno dvojité značení na vzorcích slinných žláz klíštěte *I. ricinus* s komerčními protilátkami. Četnost částic byla vyhovující.

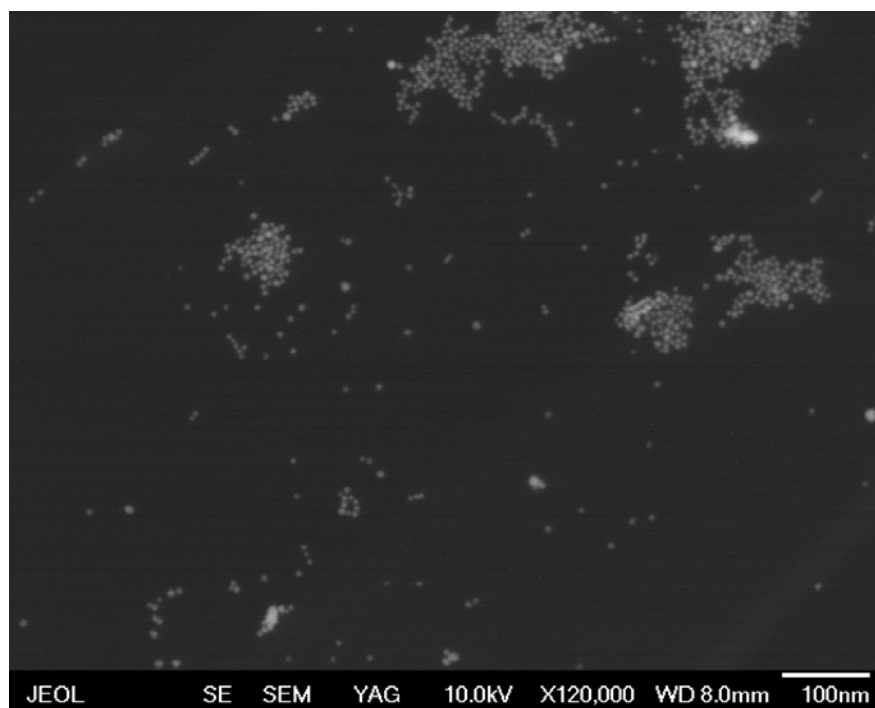
## 8. Přílohy



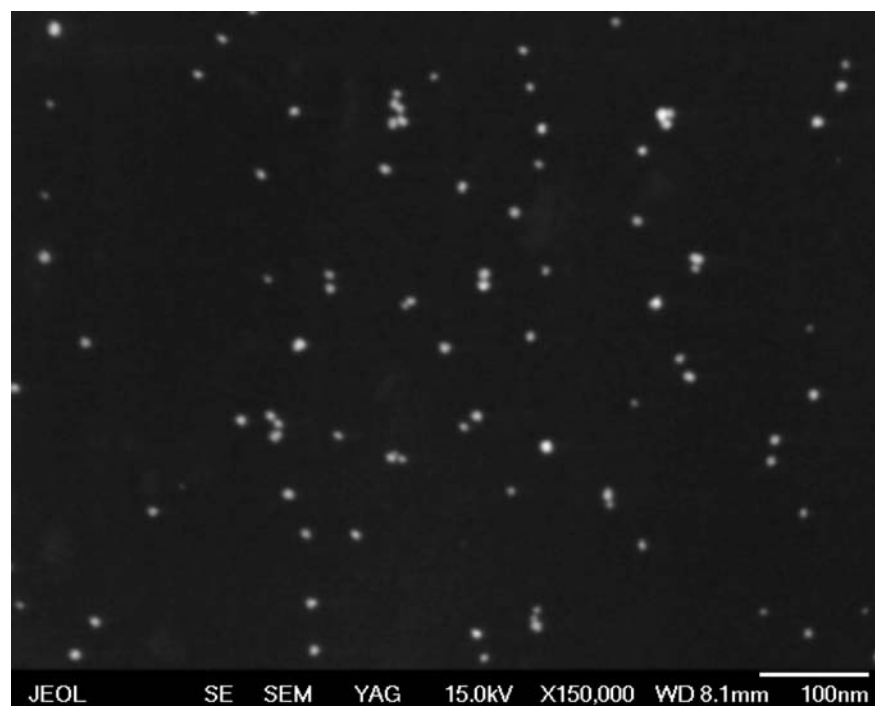
**Příloha 1.** FESEM Pd<sub>05</sub> ve zpětně odražených elektronech



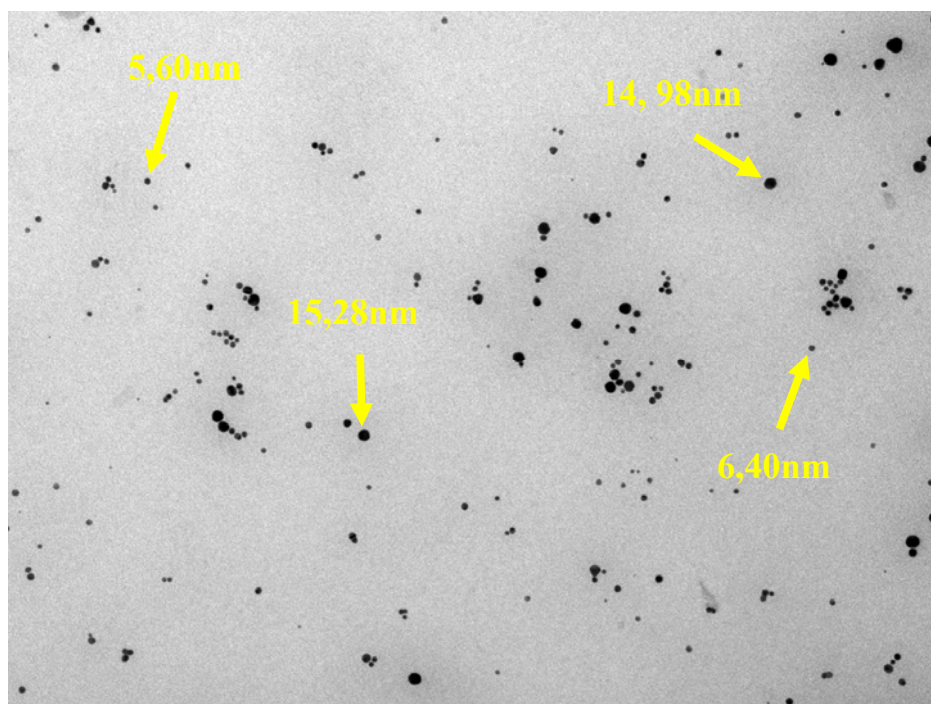
**Příloha 2.** FESEM Ag<sub>10</sub> ve zpětně odražených elektronech



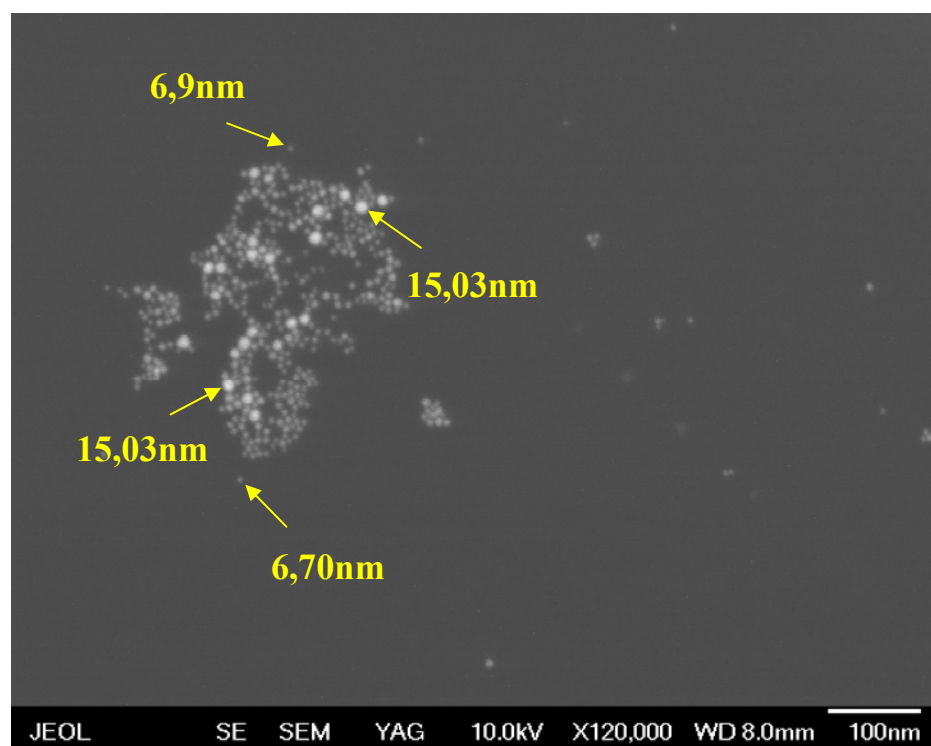
**Příloha 3.** FESEM Au<sub>10</sub> ve zpětně odražených elektronech



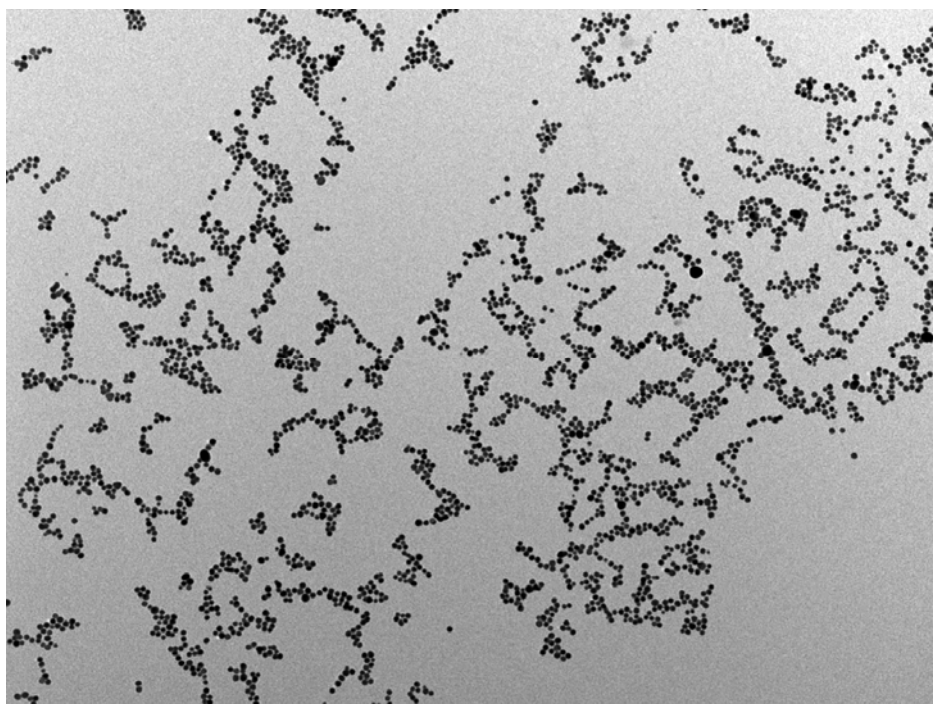
**Příloha 4.** FESEM Pd<sub>10</sub> ve zpětně odražených elektronech



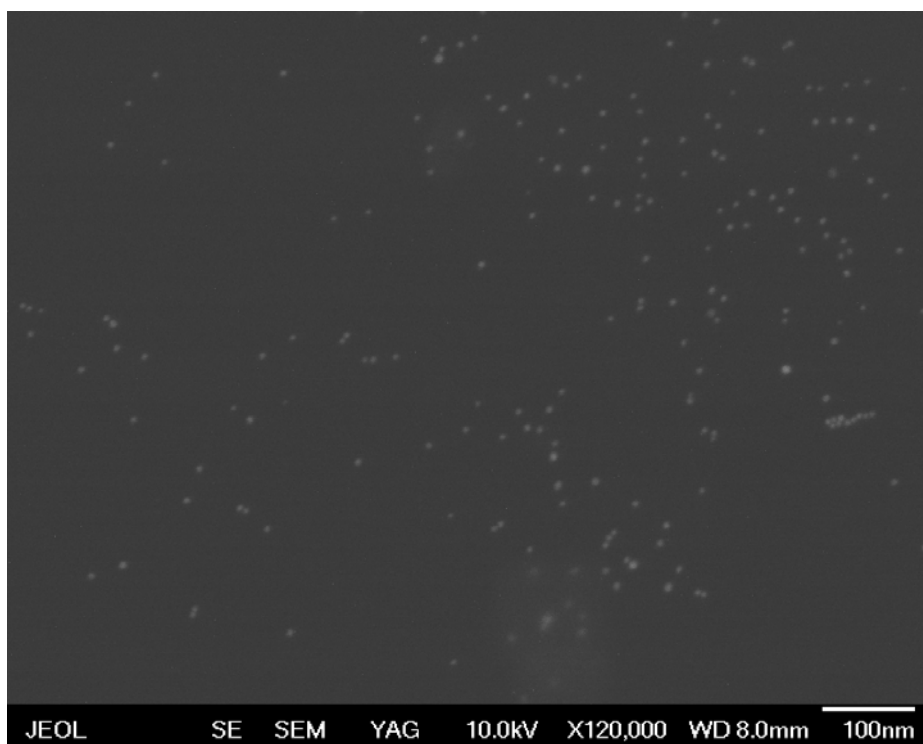
**Příloha 5.** TEM Au<sub>06</sub> + Au<sub>15</sub>



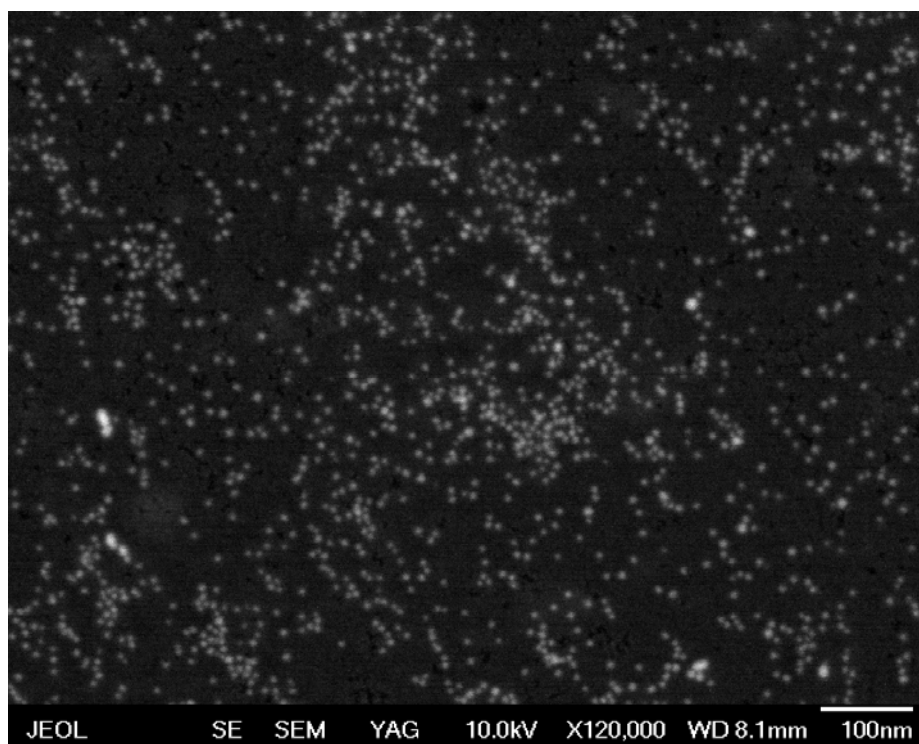
**Příloha 6.** FESEM Au<sub>06</sub> + Au<sub>15</sub> ve zpětně odražených elektronech



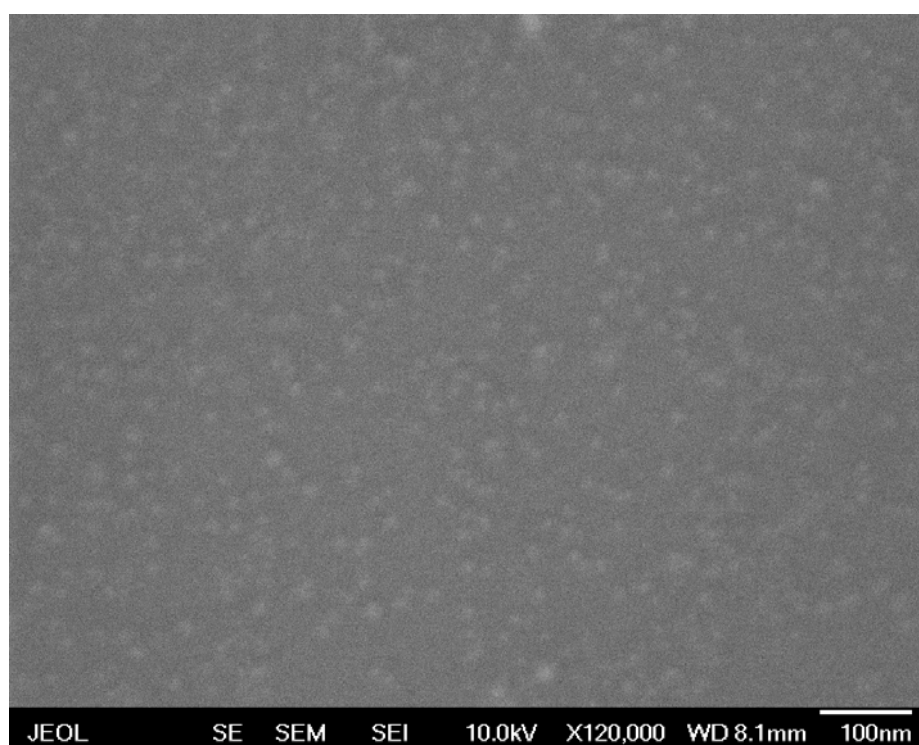
**Příloha 7.** TEM Au<sub>10</sub> + Pd<sub>10</sub>



**Příloha 8.** FESEM Au<sub>10</sub> + Pd<sub>10</sub> ve zpětně odražených elektronech

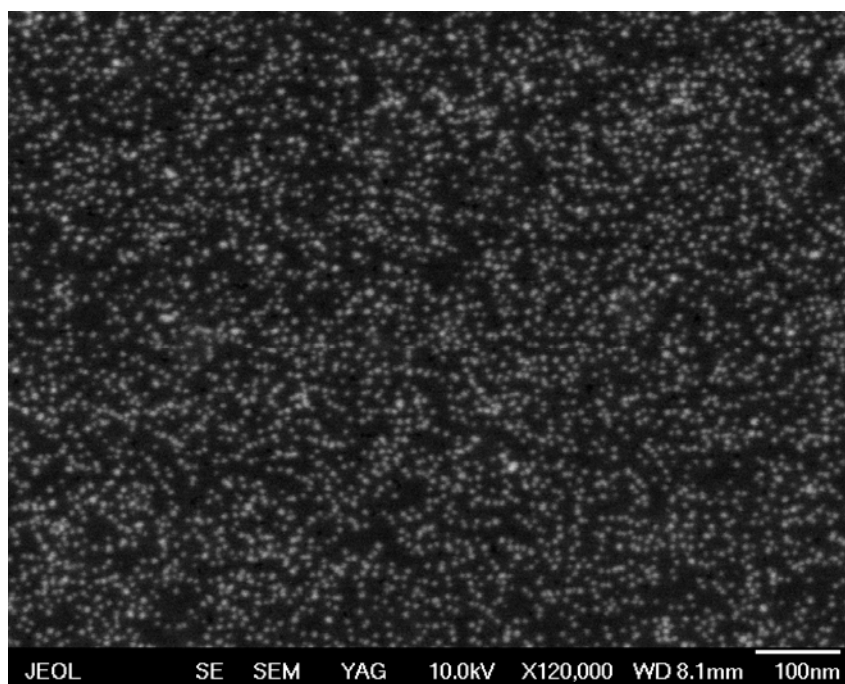


**Příloha 9.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 5 s ve zpětně odražených elektronech

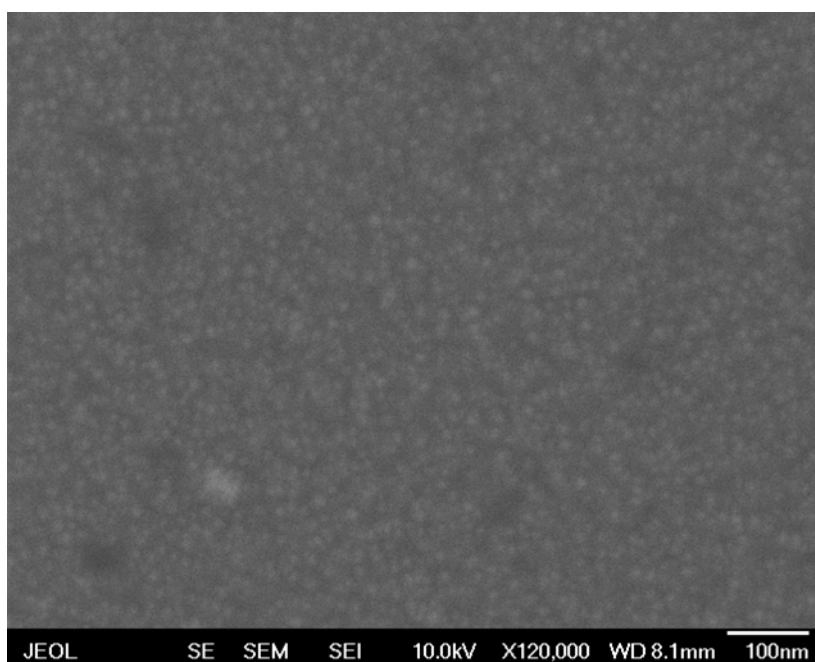


**Příloha 10.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 5 s v sekundárních elektronech

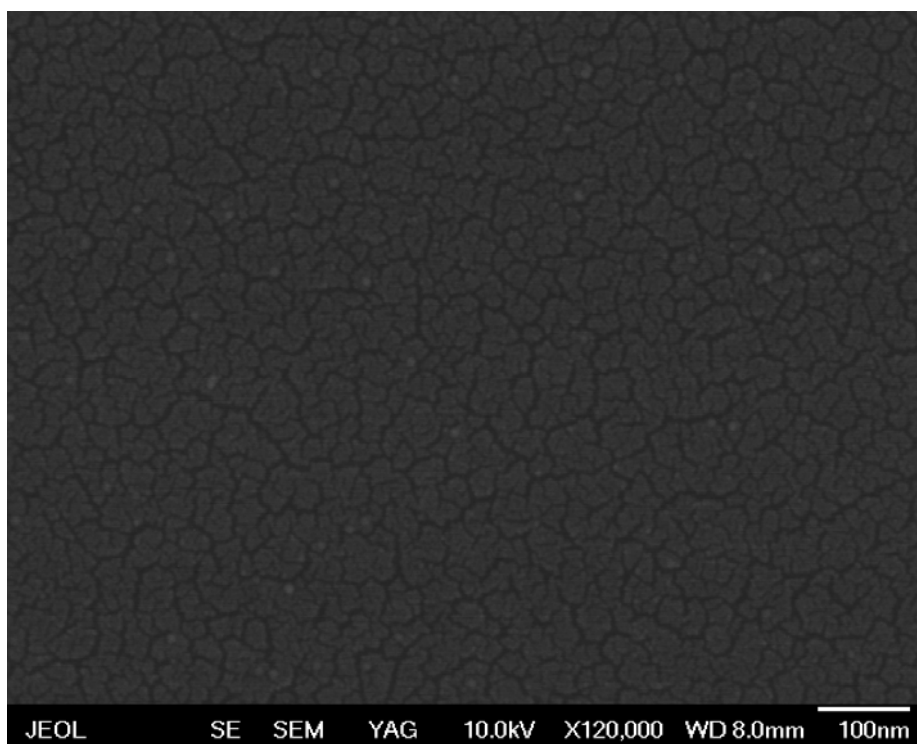




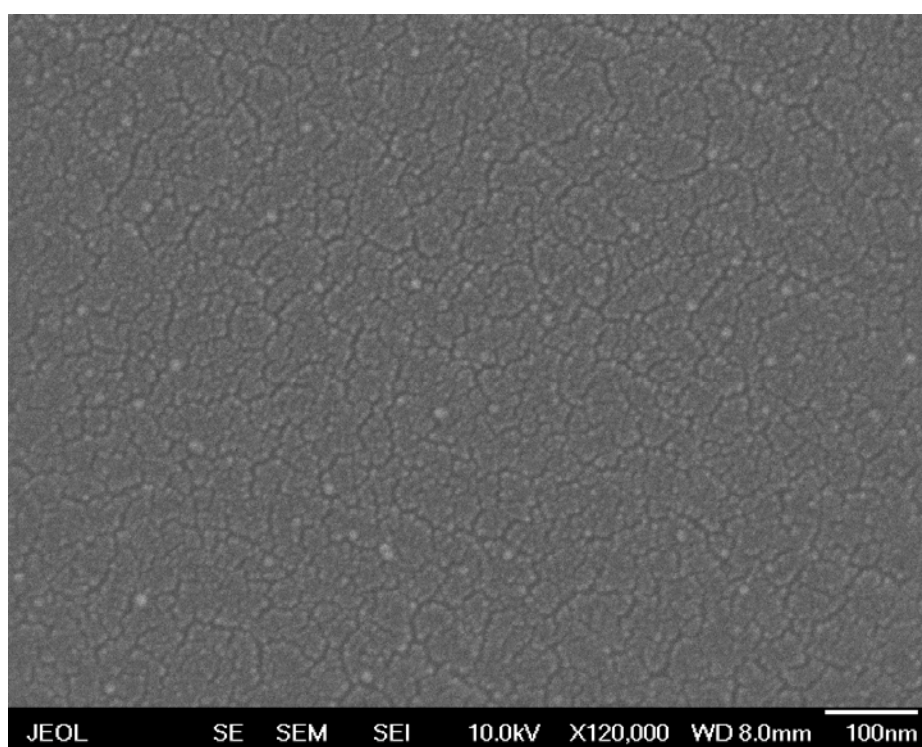
**Příloha 11.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 10 s ve zpětně odražených elektronech



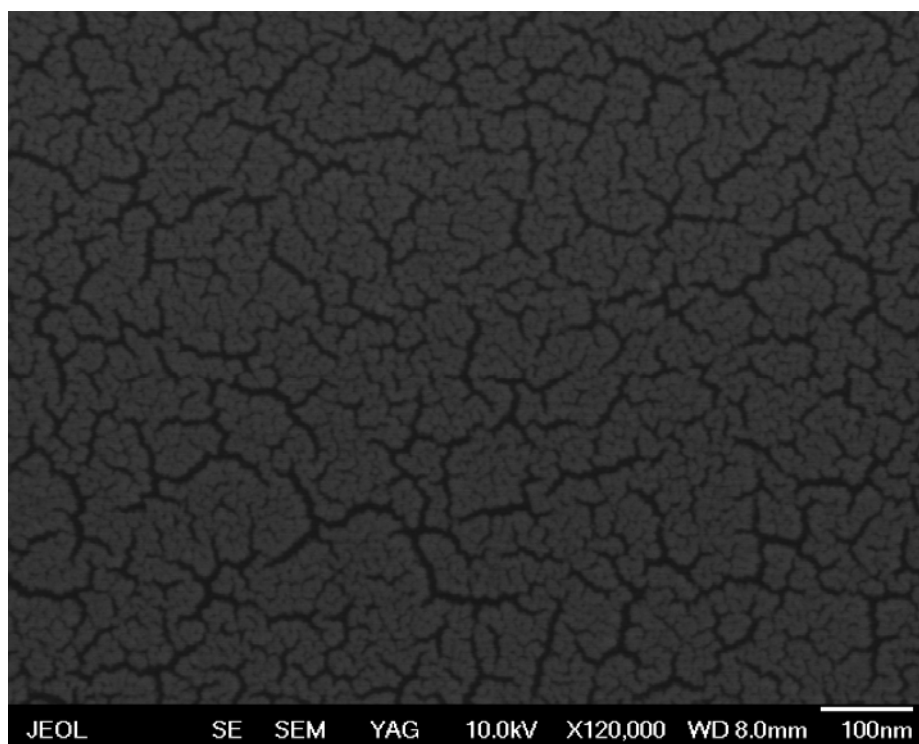
**Příloha 12.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 10 s v sekundárních elektronech



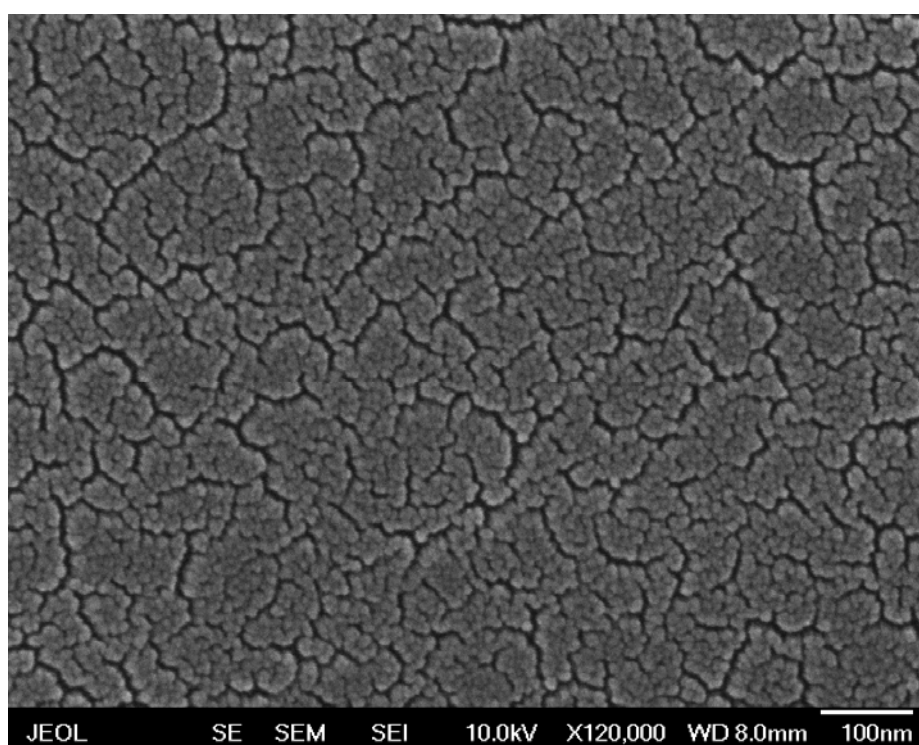
**Příloha 13.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 30 s ve zpětně odražených elektronech



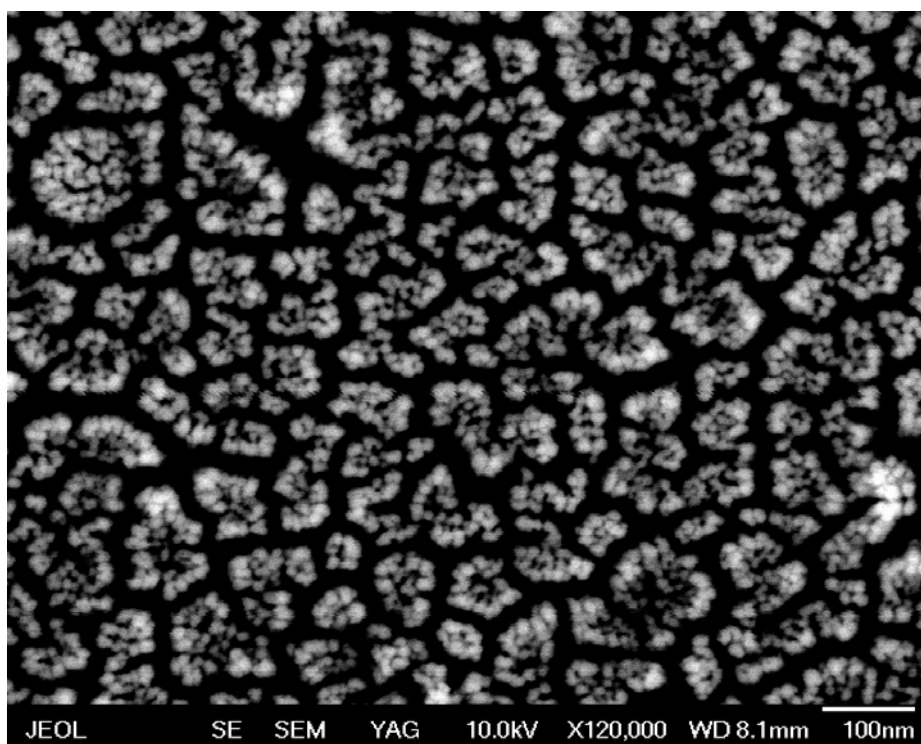
**Příloha 14.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 30 s v sekundárních elektronech



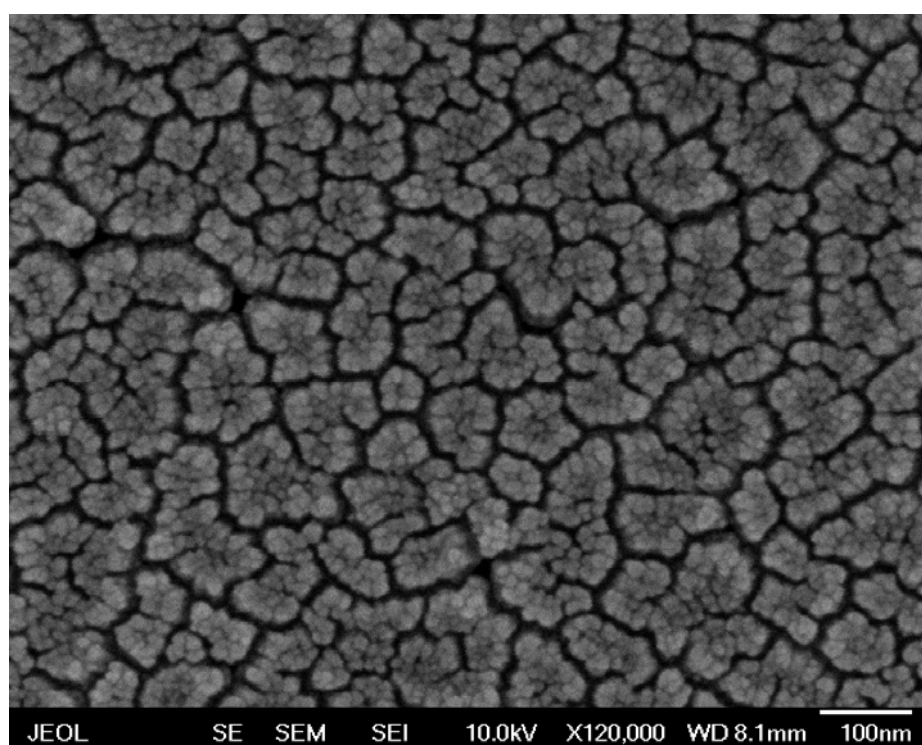
**Příloha 15.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 60 s ve zpětně odražených elektronech



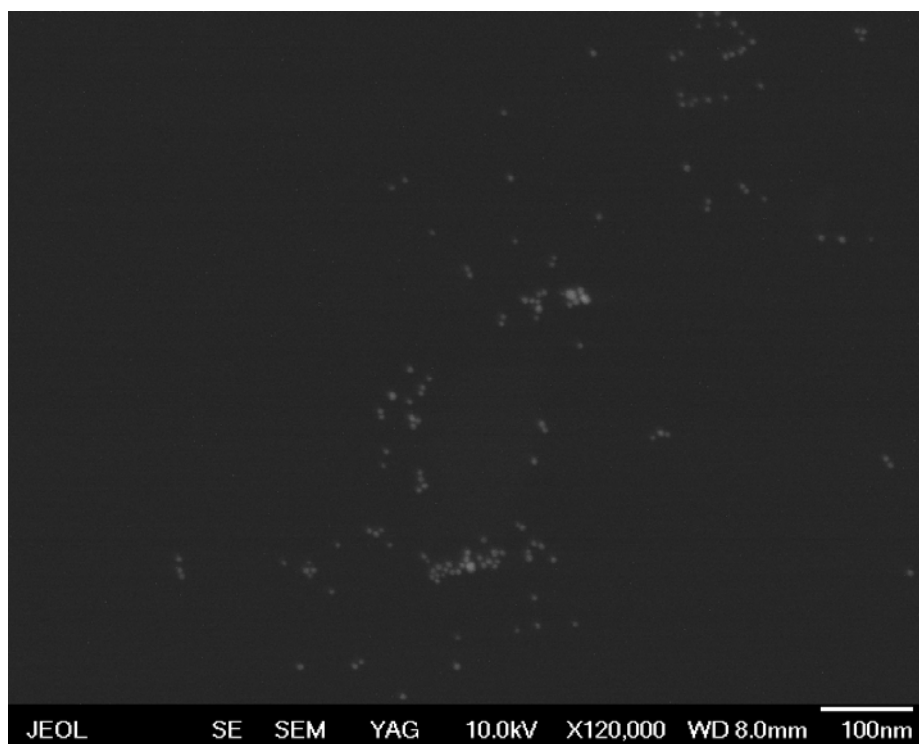
**Příloha 16.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 60 s v sekundárních elektronech



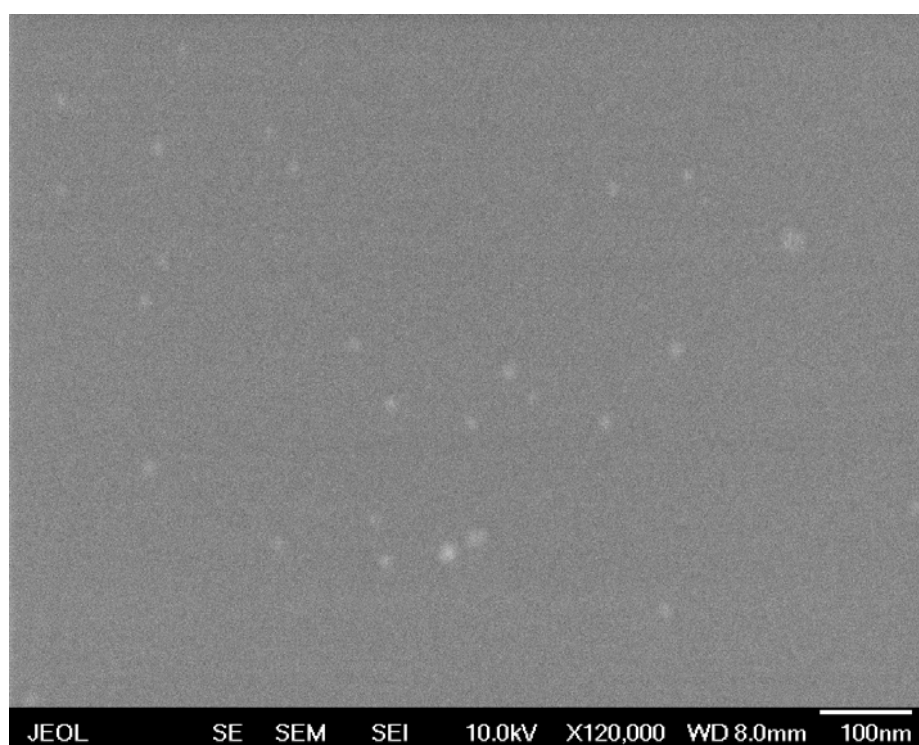
**Příloha 17.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 180 s ve zpětně odražených elektronech



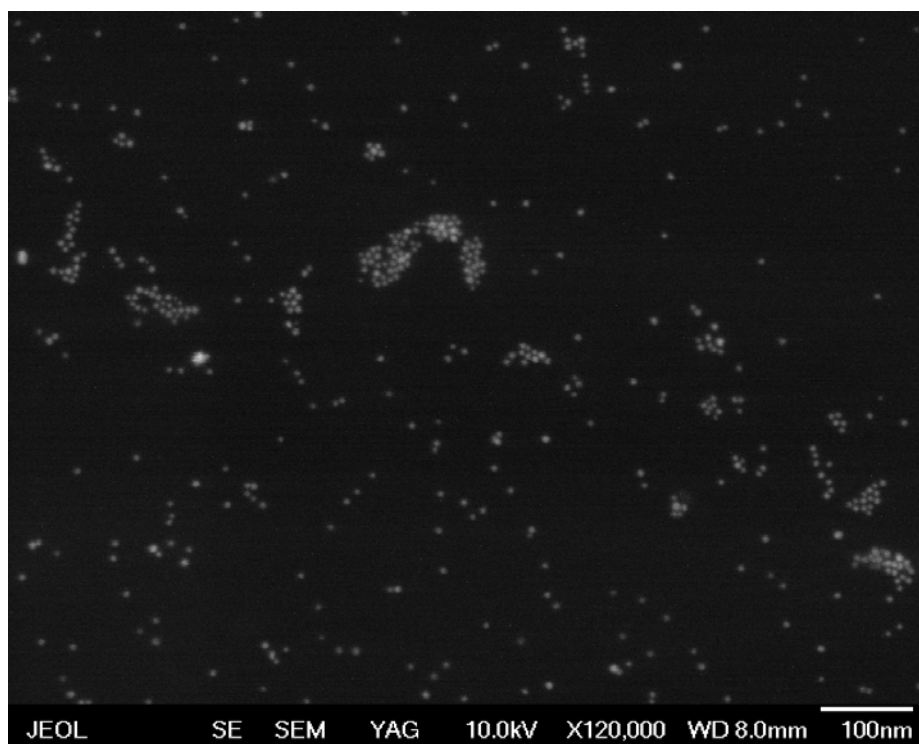
**Příloha 18.** FESEM Au<sub>10</sub> při pokovení platinou 180 s v sekundárních elektronech



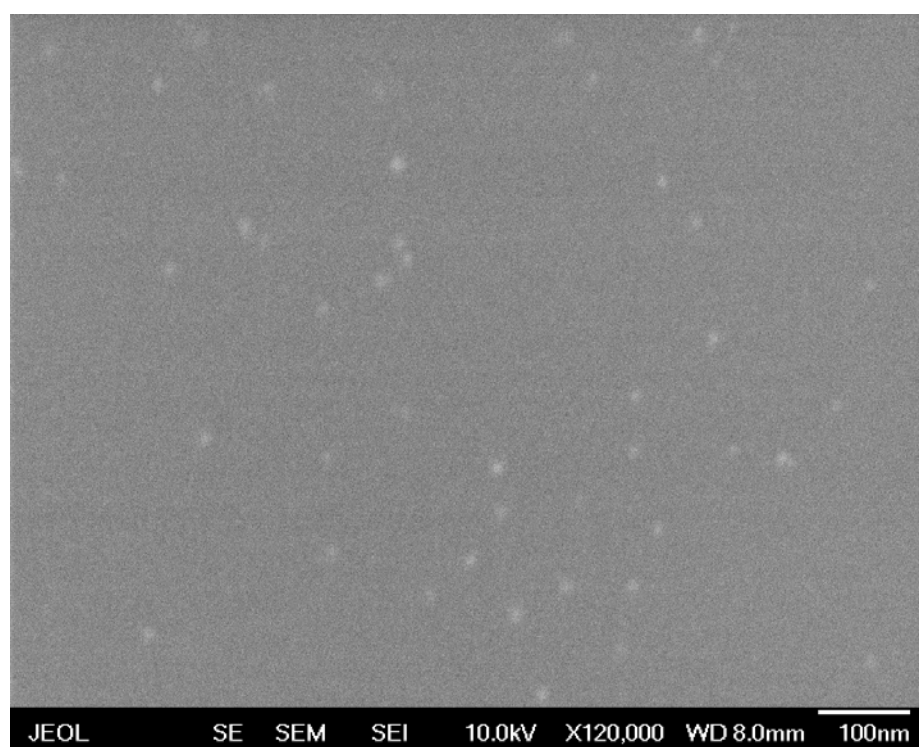
**Příloha 19.** FESEM Au<sub>10</sub> při naprášení uhlíkem 15 s ve zpětně odražených elektronech



**Příloha 20.** FESEM Au<sub>10</sub> při naprášení uhlíkem 15 s v sekundárních elektronech

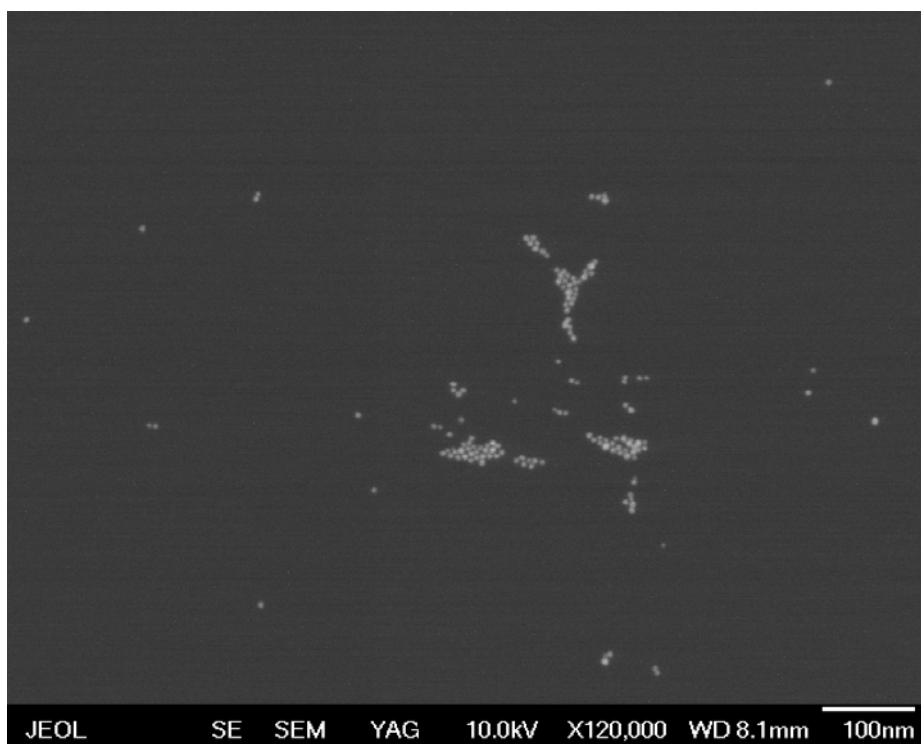


**Příloha 21.** FESEM Au<sub>10</sub> při naprášení uhlíkem 34 s ve zpětně odražených elektronech

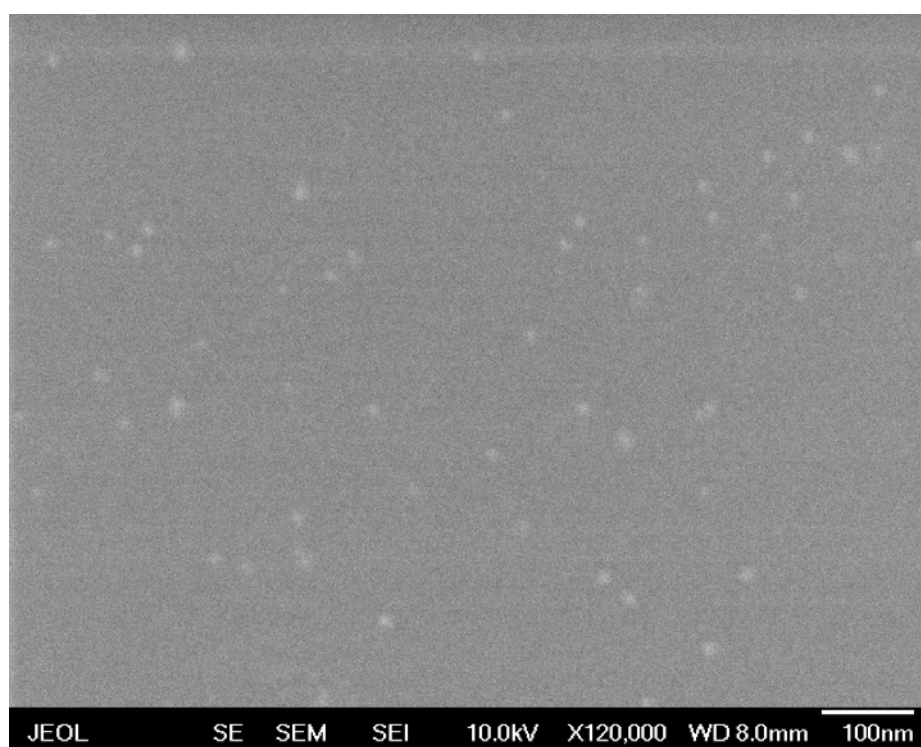


**Příloha 22.** FESEM Au<sub>10</sub> při naprášení uhlíkem 34 s v sekundárních elektronech

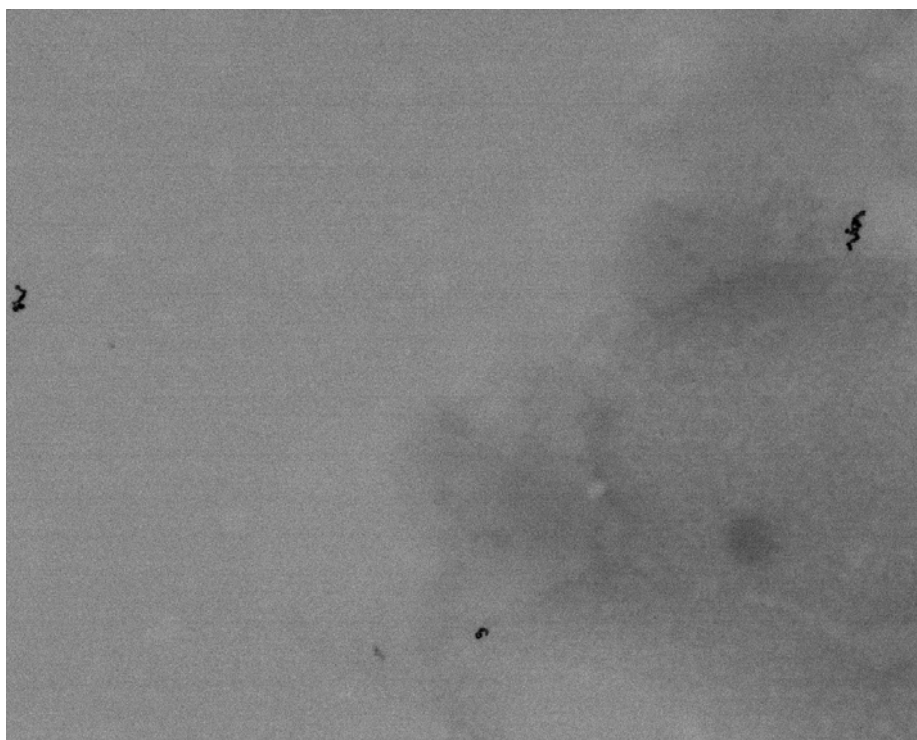




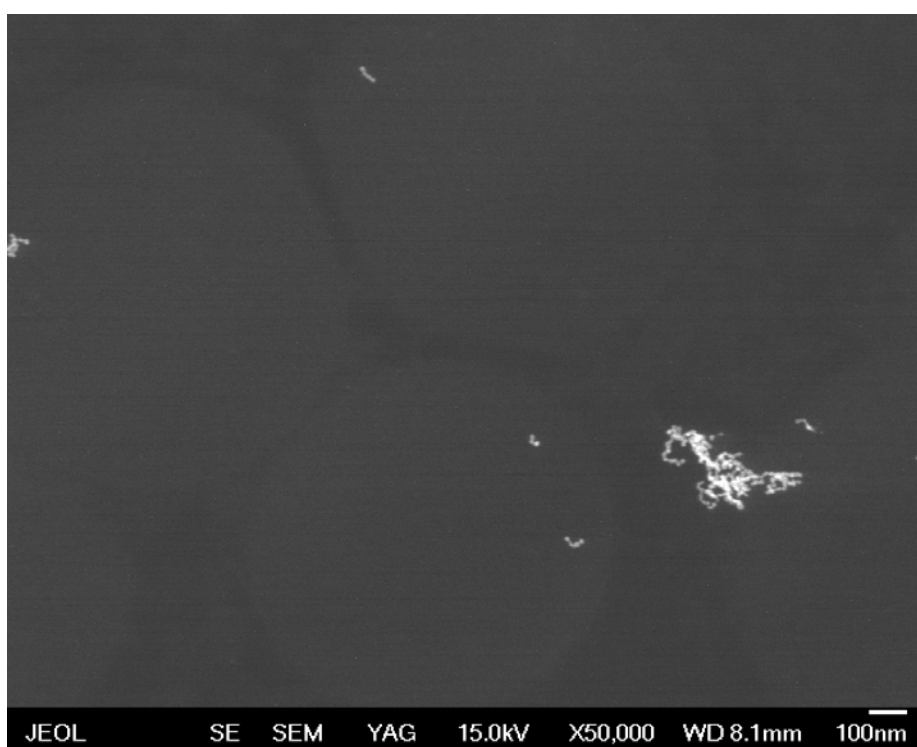
**Příloha 23.** FESEM Au<sub>10</sub> při naprášení uhlíkem 50 s ve zpětně odražených elektronech



**Příloha 24.** FESEM Au<sub>10</sub> při naprášení uhlíkem 50 s v sekundárních elektronech



**Příloha 25.** TEM dvojitě značení slinných žláz I. Ricinus



**Příloha 26.** FESEM dvojitě značení slinných žláz I. ricinus zpětně odražené elektrony



## 9. Seznam použité literatury

- [1] <http://www.photometrics.net/fesem.html>
- [2] <http://atmilab.upol.cz/vys/JineMet.html>
- [3] <http://www4.nau.edu/microanalysis/Microprobe/Interact-Effects.html>
- [4] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/3.1.html>
- [5] <http://helacells.com/>
- [6] [http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20EM%20VCT100/Brochures/EM\\_VC\\_T100\\_en\\_Brochure.pdf](http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20EM%20VCT100/Brochures/EM_VC_T100_en_Brochure.pdf)
- [7] <http://www.usnon.com/focus-on-omalizumab-xolair.htm>
- [8] <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp33211.pdf>
- [9] <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/tools/Bal-Tec%20SCD500%20Brochure.pdf>
- [10] [http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova\\_sem.pdf](http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_sem.pdf)
- [11] [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/electroninteractions.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/electroninteractions.html)
- [12] <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>
- [13] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kru%C5%BEnice>
- [14] <http://www.afssociety.org/FiltrationGlossary/Feret-Diameter.html>
- [15] [http://rum.bf.jcu.cz/public/fyzikala/Prezentace\\_prednasky/](http://rum.bf.jcu.cz/public/fyzikala/Prezentace_prednasky/)
- [16] [http://is.muni.cz/th/211777/prif\\_b/Lektiny.txt](http://is.muni.cz/th/211777/prif_b/Lektiny.txt)
- [17] <http://www.webelements.com/>
- [18] **Walther P., Wehrli E., Hermann R., Müller M.** Double layer rating for high resolution low temperature SEM. *J. Microsc.* 1995
- [19] **Hermanson G.** Bioconjugate techniques. *Academic Press, Inc., Second Edition.* 2008
- [20] Servisní manuál: JEOL JEE 4C, *Japan electron Optics Laboratory co., Ltd.* 1981
- [21] Servisní manuál: JSM-7401F Field Emission Scanning Electron Microscope. *JEOL Ltd., Tokyo 2005*
- [22] **Hulínský V., Jurek K.** Zkoumání látek elektronovým paprskem. *Praha.* 1982
- [23] Vše, co chcete vědět o elektronové mikroskopii... *FEI COMPANY.* 03/02

- [24] **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
- [25] **Walther P., Autrata R., Chen Y., Pawley J. B.** Backscattered Electron Imaging for High Resolution Surface Scanning Electron Microscopy with a New Type YAG–Detector. *Scanning Microscopy International*. 1991
- [26] **Yanez M. J., Barbosa S. E.** Changes in Particle Area Measurements Due to SEM Accelerating Voltage and Magnification. *Microscopy research and techniques*. 2003
- [27] **van Herp F., Coenen T., Geurts H. P. M., Janssen G. J. A., Martens G. J. M.** A fast method to study the secretory activity of neuroendocrine cells at the ultrastructural level. *Journal of Microscopy*. 2005
- [28] **Walther P.** High–resolution cryo–SEM allows direct identification of F–actin at the inner nuclear membrane of *Xenopus oocytes* by virtue of its structural features. *Journal of Microscopy*. 2008
- [29] **Walther P., Müller** Double Layer Coating for Field Emission Cryo Scanning Electron Microscopy – Present State and Applications. *Scanning*. 1997
- [30] **Kääb M. J., Richards R. G., Walthers P., Gwynn I., Nötzli H. P.** A comparison of four preparation methods for the morphological study of articular cartilage for scanning electron microscopy. *Scanning Microscopy International*. 1999
- [31] **Ushiki T., Hashizume H., Itoh S., Kuboki K., Saito S., Tanaka K.** Low–voltage backscattered electron imaging of non–coated biological samples in a low–vacuum environment using a variable–pressure scanning electron microscope with a YAG–detector. *Journal of Electron Microscopy*. 1998
- [32] **Hallegot P., Minondo M. A., Fiat F.** Cryo–techniques applies to stratum corneum with description of new sample holder cryo–scanning electron microscopy of freeze–fractured samples. *Journal of Microscopy*. 1999
- [33] **De Souza W., Campanati L., Attias M.** Strategies and results of field emission scanning electron microscopy FE–SEM– in the study of parasitic protozoa. *Micron*. 2008
- [34] **Schatten H.** Low voltage high–resolution SEM (LVHRSEM) for biological structural and molecular analysis. *Micron*. 2010

- [35] **Erlandsen S., Chen Y., Frethem C., Detrys J., Wells C.** High-resolution backscatter electron imaging of colloidal gold in LVSEM. *Journal of Microscopy*. 2003
- [36] **Faulk W., Taylor G.** An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1979
- [37] **Orsini G., Ruggeri A., Mazzoni A., Pap V., Mazzotti G., Di Lenarda R., Breschi L.** Immunohistochemical Identification of Decorin and Biglycan in Human Dentin: A Correlative Field Emission Scanning Electron Microscopy Study. *Calcif Tissue, Int*. 2007
- [38] **Vancová M., Zacharová K., Grubhoffer L., Nebesářová J.** Ultrastructure and lectin characterization of granular salivary cells from *Ixodes ricinus* females. *J. Parasitol*. 2006
- [39] **Elaissari A.** Colloidal Nanoparticles in Biotechnology. *John Wiley & Sons, Inc*. 2008
- [40] **Schmid G.** Nanoparticles. *WILEY-VCH*. 2004
- [41] **Garcia B., Salomé M., Lemelle L., Bridot J., Gillet P., Perriat P., Roux S., Tillement O.** Sulfur K-edge XANES study of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles: dihydrolipoic acid is bound by both sulfur ends. *Chem. Commun*. 2005
- [42] **Roux S., Garcia B., Bridot J., Salomé M., Marquette Ch., Lemelle L., Gillet O., Blum L., Perriat P., Tillement O.** Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol. *Langmuir*. 2005
- [43] **Salata O. V.** Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*. 2004
- [44] **Faulk W., Taylor G.** An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1971
- [45] **Ageamatsu H., Sawada T., Watanabe H., Yanagisawa T., Ide Y.** Immuno-Scanning Electron Microscope Characteriyation of Large Tubules in Human Dentin. *The Anatomical Record. Wiley-Liss, Inc*. 1997
- [46] **Golberg W. M.** Immunolabeling for Scanning Electron Microscopy (SEM) and Field Emission SEM. (Introduction to electron microscopy for biologists. Methods in Cell Biology). *Elsevier Inc*. 2008
- [47] **Hozák P., Šlouf M., Nebesářová J., Moša M., Krivjanská M.** Užité vzory. 2011

- [48] **Norde W.** Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Interface Sci.* 1986
- [49] **Binington K. C., Kemp D. H.** Role of Tick Salivary Glands in Feeding and Disease Transmission. *Advances in parasitology.* 1980
- [50] **Lesch H. P., Kaikkonen M. U., Pikkarainen J. T., Ylä-Herttuala S.** Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2010
- [51] **Nebesářová J., Vancová M., Huček S., Vaněček J.** Detection of gold nanoparticles by Aurata YAG detector in FE SEM working in cryo mode (EMC 14<sup>th</sup> European Microscopy Congress 1 – 5 September 2008), Aachen, Germany. *Springer.* 2008
- [52] **Horisberg M., Rosset J., Bauer H.** Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscope. *Experientia.* 1975
- [53] **Koehler J. K.** Advanced Techniques in Biological electron microscopy, *Springer.* 1973
- [54] **Ferenčík M., Rovenský J., Shoefeld Y., Mařha V.** Imunitní systém. *Grada Publishing.* 2005
- [55] **Kindt T. J., Goldsby R. A., Osborne B. A.** Kuby imunology. *Freeman.* 2007
- [56] **Hermann R., Schwarz H., Müller M.** High precision immunoscanning electron microscopy using Fab fragments coupled to ultra-small colloidal gold. *Journal of structural biology.* 1991
- [57] **Luongo de Matos L., Trufelli C. D., Luongo de Matos M. G., , Aparecida da Silva Pinhal M.** Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarkers Insights.* 2010
- [58] Data sheet AURION, AURION Conventional gold reagens, Immuno Gold Reagents & Accessories Custom Labelling ([http://www.aurion.nl/pdf/MSDSSOL\\_02.pdf](http://www.aurion.nl/pdf/MSDSSOL_02.pdf))
- [59] Prezentace Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.
- [60] **Vancová M., Nebesářová J., Šlouf M.** Application of new metal nanoparticles for multiple labelling in electron microscopy.
- [61] **Hořejší V., Bartůňková J.** Základy imunologie. *Praha Triton.* 1998
- [62] **Kikuchi H., Sawada T., Yanagisawa T.** Effects of a functional agar surface on in vitro dentinogenesis induced in proteolytically isolated, agar – coated dental papillae in rat mandibular incisors. *Archives of Oral Biology* 1996

- [63] **Sasano Y., Furusawa M., Ohtani H., Mizoguchi I., Takahashi I., Kagayama M.** Chondrocytes synthesize type I collagen and accumulate the protein in the matrix during development of rat tibial articular cartilage. *Anat. Embryol.* 1996
- [64] **Breschi L., Lopes M., Gobbi P., Mazzotti G., Perdigão J.** Dentin proteoglycans: an immunocytochemical FEISEM study. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2002
- [65] **Breschi L., Gobbi P., Lopes M., Prati C., Falconi M., Teti G., Mayyotti G.** Immunocytochemical analysis of dentin: a double labelling technique. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2003
- [66] **Erlandsen S. L., Macechko P. T., van Keulen H., Jarroll E. L.** Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 1996
- [67] **Nakamura C., Ueda-Nakamura T., De Souza W.** Visualization of the cystosome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. *FEMS Microbiology Letters.* 2005
- [68] **Robinson D. G., Ehlers U., Herken R.** Methods of Preparation for Electron Microscopy, *Springer-Verlag*, 1987
- [69] **McMullan D.** Scanning electron microscopy 1928 – 1965. *University of Cambridge.* 1993
- [70] **Schatten H., Pawley J.** Biological Low–Voltage Scanning Electron Microscopy. *Springer.* 2008
- [71] **Reimer L.** Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and microanalysis. *Springer, Second Edition.* 1998
- [72] **Wells O.** Scanning Electron Microscopy. *McGraw–Hill, Inc.* 1974
- [73] **V.V. Philimonenko<sup>1</sup>, J. Janáček, P. Hozák** LR White is preferable to Unicryl for immunogold detection of fixationsensitive nuclear antigens. *Eur. J. Histochem.* 2002
- [74] Data sheet DIG Glycan Differentiation Kit, ROCHE
- [75] **Hayat M. A.** Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. *Cambridge University Press, Fourth Edition.* 2000
- [76] **Griffiths G.** Fine structure Immunocytochemistry. Springer – Verlag. 1993

- [77] **Kandela I. K., Bleher R., Albrecht M. R.** Multiple correlative immunolabeling for light and electron microscopy using fluorophores and colloidal metal particles. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2007
- [78] **Coico R., Sunshine G.** Immunology: a short course. *Wiley-Blackwell, Sixth Edition*. 2009