

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Pedagogická fakulta – Katedra fyziky

**Mrazová sublimace v kryonástavci Gatan Alto 2500
skenovacího elektronového mikroskopu JSM-7401F**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Stanislav HUČEK, Ph.D.

Autor: Bc. Roman MAROUŠEK

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá mrazovou sublimací v kryozařízení Gatan Alto 2500 ve spojení se skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) JEOL JSM-7401F. Práce se dělí na teoretickou a praktickou část.

V teoretické části se zabývám především fyzikálními vlastnostmi vody a problematikou mrazového sušení. Popisuji také vlastnosti pomocných látek, které se využívají při práci s kryotechnologiemi. Stručně popisuji použitou techniku: kryozařízení Alto 2500 a SEM JSM-7401F.

V praktické části se věnuji popisu metody, kterou jsem vypracoval za účelem změření úbytku hmotnosti zmrazené látky vlivem její sublimace ve vakuu. Uvádím výsledky měření sublimace pro látky: destilovaná voda, Dextran, glycerol a fosfátový pufr (PBS).

Abstract

This thesis deals with freezy sublimation in cryoattachement Gatan Alto 2500 connected to scanning electron microscope (SEM) JEOL JSM-7401F. The thesis is devided into the theoretical and practical parts.

In the theoretical part I focus mainly on physical qualities of water and on problematics of freezy-drying. I also describe qualities of subsidiary substances which are being used when working with cryotechnology. I briefly describe technology used: cryoattachement Alto 2500 and SEM JSM-7401F.

In the practical part I deal with the description of the method that I have developed in order to measure weight decrease of frozen specimen owing to its sublimation in vacuum. I provide measurement results of the sublimation of these substances: demineralized water, Dextran, glycerol and phosphate buffer saline.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum

Podpis studenta

Chtěl bych poděkovat své konzultantce Ing. Janě Nebesářové, CSc, za její cenné rady, nápady a připomínky během zpracování mé diplomové práce, celému kolektivu Laboratoře elektronové mikroskopie (Biologické centrum AVČR) za trpělivost a pomoc při technické realizaci praktické části práce a také mému vedoucímu práce RNDr. Stanislavu Huckovi, PhD.

Obsah

Úvod	8
I. TEORETICKÁ ČÁST	10
2. Fyzikální vlastnosti vody	10
2.1 Fázový diagram vody	10
2.2 Amorfni led	16
2.2.1 Vznik amorfniho ledu	17
2.2.2 Amorfni led s nízkou hustotou (LDA)	17
2.2.3 Hyperchlazená sklovitá voda (HGW)	17
2.2.4 Amorfni led s vysokou hustotou (HDA)	17
2.3 Proces krystalizace	18
3. Rychlost mrazového sušení biologických vzorků	19
3.1 Transport hmoty a tepla	19
3.2 Mrazová sublimace	20
3.2.1 Průběh sublimace	20
3.2.2 Teoretická rychlost sublimace	21
4. Pomocné látky využívané při mrazovém sublimaci	22
4.1 Kryogeny	22
4.1.1 Uchování kryogenů	23
4.2 Kryoprotektanty	23
4.2.1 Penetrující kryoprotektant – Glycerol	24
4.2.2 Nepenetrující kryoprotektant – Dextran	24
4.3 Pufry	25
4.3.1 Fosfátový pufr	25
5. Popis kryozariadení Alto 2500	27
5.1 Komponenty Alto 2500	27
5.1.1 Preparátová komora	27
5.1.2 Klávesnice	28
5.1.3 Komponenty pro komoru SEM	28
5.1.4 Slushing station	29
5.1.5 Vakuové transportní zařízení	30
5.1.6 Vakuový systém	31
5.2 Sublimace vody v kryokomoře	31

6. Popis mikroskopu JSM-7401F	32
6.1 Funkční charakteristika	32
6.1.1 <i>Gentle beam</i>	32
6.1.2 <i>R-filter</i>	33
6.2 Komponenty mikroskopu	33
6.3 Vakuový systém	35
II. PRAKTICKÁ ČÁST	38
7. Měření sublimace	38
7.1 Testovací pomůcka	38
7.2 Pomůcky nutné k pokusu	39
7.3 Postup měření	41
7.3.1 <i>Zprovoznění kryozariadení</i>	41
7.3.2 <i>Měření sublimací</i>	42
7.3.3 <i>Ukončení práce s kryoattechementem</i>	47
8. Výsledky měření	48
8.1 Úvod do měření	48
8.1.1 <i>Chyba metody – vliv orosení</i>	48
8.1.2 <i>Použité hodnoty a způsob jejich výpočtu</i>	49
8.2 Měření sublimace vody	49
8.3 Měření sublimace kryoprotektantů	53
8.3.1 <i>Sublimace Dextranu</i>	53
8.3.2 <i>Sublimace glycerolu</i>	54
8.4 Měření sublimace pufru	55
8.4 Kontrolní test prázdného terčíku	56
Závěr	58
Použitá literatura	60

Úvod

Diplomová práce se zabývá možnostmi pozorování vodnatých biologických vzorků pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Vzhledem k tomu, že biologické vzorky (kousky tkáně, buňky ...) obsahují velké množství vody, je téměř nemožné je pozorovat neupravené pomocí běžného SEM. A to z důvodu degradace vzorku při umístění do vakua a také vlivem ozařování elektronovým paprskem o intenzitě jednotek až desítek kV. Z těchto důvodů je nezbytně nutné preparát před vložením do preparátorové komory mikroskopu upravit.

Jako vhodná a šetrná úprava vzorku se ukazuje metoda, při níž je preparát velmi rychle zamrazen na velmi nízkou teplotu, následně proběhne sublimace povrchu (a případné jemné pokovení povrchu), pak již následuje pozorování nepoškozeného vzorku. Tuto metodu nám umožňuje provést elektronový skenovací mikroskop JSM-7401F vyrobený firmou JEOL ve spojení s kryozářzením Alto 2500 od firmy Gatan. Vzorek se nechá prudce zmrznout v kapaném dusíku v tzv. slushing station, poté je přenesen ve vakuu do kryokomory, kde se provede sublimace (a případné pokovení) a vzorek je následně transportován do rovněž chlazené preparátorové komory mikroskopu. Sublimace povrchu je důležitá, protože jinak dojde k degradaci povrchu vlivem zahřívání vody (ledu) obsažené ve vzorku elektronovým paprskem. Jelikož urychlovací napětí můžeme v mikroskopu JSM-7401F snížit na řádově až stovky voltů, stačí vysublimovat pouze tenkou vrstvičku vody na povrchu.

Mým hlavním úkolem proto bylo zjistit, jak probíhá sublimace v kryokomoře Gatan Alto 2500, stanovit vhodnou teplotu sublimace (vzorek se nesmí poškodit) a změřit časovou závislost sublimace ledu ze vzorku. Vzhledem k tomu, že na tomto (nebo i podobném) zařízení jde o věc dosud v literatuře nepopsanou, bylo třeba vyvinout metodu, jak množství vysublimované vody vůbec změřit.

Pro měření sublimace byly použity originální duralové terčíky určené na upevnění (přilepením) pozorovaného vzorku. Ty jsem ale upravil vyvrtáním otvoru s určitou (co největší) plochou. Zde byla nakápnuta kapka vody či jiné látky, tento preparát byl poté zamrazen, přenesen do kryokomory a sublimován při různých časech a teplotách. Množství látky (např. vody) před a po sublimaci bylo měřeno pomocí laboratorních vah o přesnosti setiny miligramu. Právě dodržet přesnost vážení bylo velmi náročné – vzorek bylo nutné přenášet z vah do dusíku, z dusíku do kryokomory a z komory zpět na váhy. Nakonec se povedlo celý tento náročný proces zoptimalizovat.

Terčík byl přišroubován ve speciálním držáku a ten byl celý umístěn (pochopitelně pouze při transportu mimo komoru) v uzavřené skleněné vážence. Vše samozřejmě muselo být udržováno z důvodu možné kontaminace a následné změny váhy v naprosté čistotě. Celý původní postup je součástí praktické části práce.

Podářilo se mi změřit křivku sublimace vody při teplotě -80°C v časovém intervalu 0 – 120 minut. Teplotu -80°C jsem zvolil jako poslední bezpečnou – nedochází ještě k degradaci vzorku a zároveň ještě probíhá sublimace ledu v přijatelném časovém horizontu, tj. naměřené množství vysublimované vody lze kvantifikovat.

Rovněž jsem otestoval dva zástupce látek, zvané kryoprotektanty: testoval jsem 20% roztok Dextranu a rovněž 20% roztok glycerolu. Testoval jsem také roztok fosfátového pufru (PCB), ve kterém se biologické vzorky uchovávají.

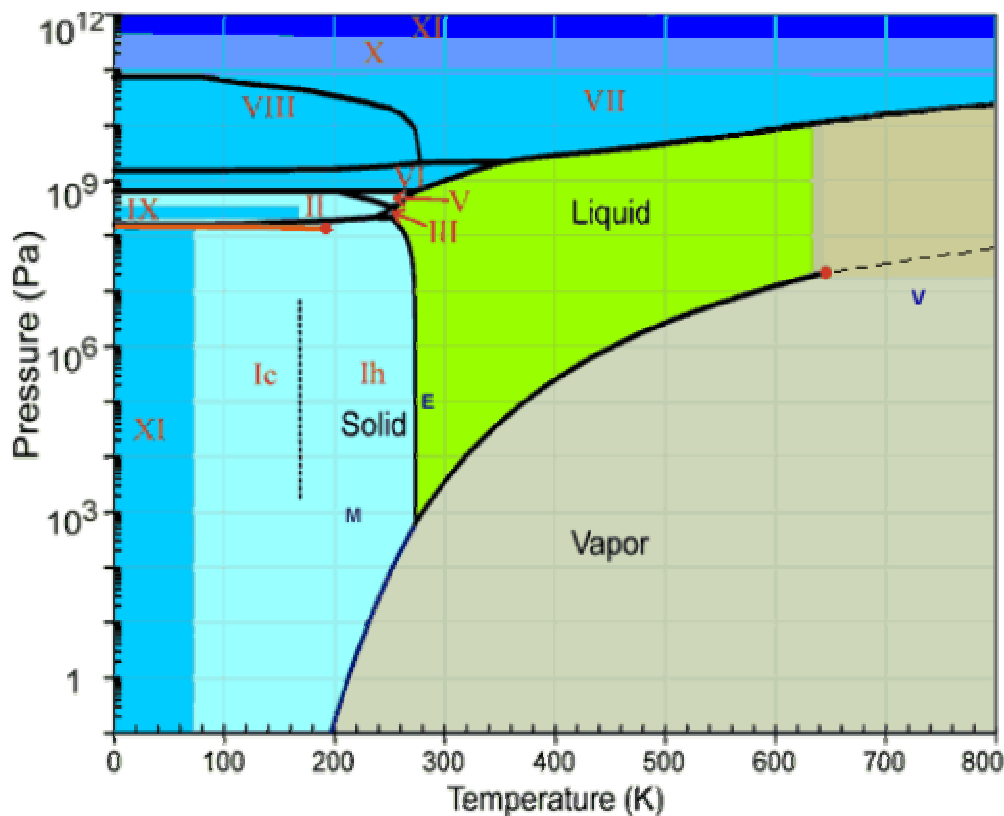
Diplomovou práci jsem rozdělil na dvě logické části: teoretickou a praktickou. V teoretické části se věnuji teoretickému zdůvodněním mrazové sublimace a možným vlivům a okolnostem. Podrobně je rozepsán fázový diagram vody; zvláště ty části, které souvisí s problémem mrazové sublimace. Popsány jsou také hojně využívané pomocné látky, jako kryoprotektanty a pufrы. Součástí jsou ještě kapitoly s popisem využívaných zařízení: kryozariadení Alto 2500 a skenovacího elektronového mikroskopu JSM-7401F. V praktické části se věnuji použité metodě měření, samotnému měření sublimací a vyhodnocování naměřených výsledků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

2. Fyzikální vlastnosti vody

2.1 Fázový diagram vody

Obrázek 2.1: fázový diagram H_2O zahrnující všechny fáze [3]:

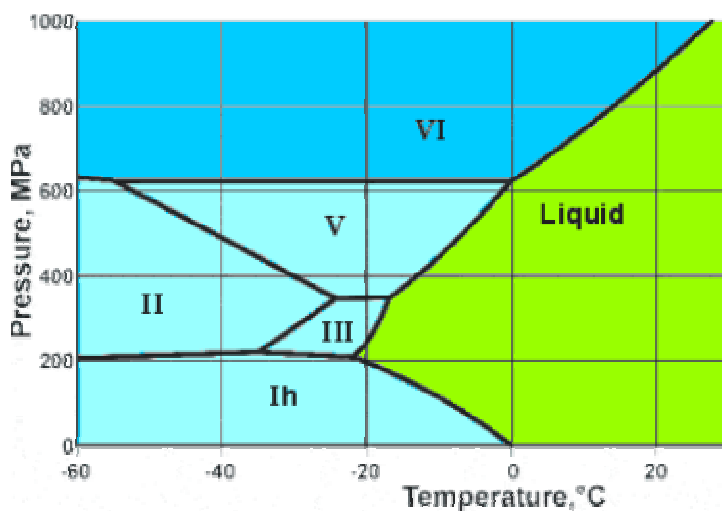


Fázový diagram na Obrázku 2.1 (spolu s detailem na Obrázku 2.2) znázorňuje jednotlivá skupenství vody za různých teplot a tlaků. Při změnách skupenství se nemění chemické složení vody, ale dochází ke změně fyzikálního stavu. Za laboratorní teploty a atmosférického tlaku (označeno E) je voda kapalná, ale stává se pevnou – ledem, když se sníží teplota pod 273K a stává se plynou – párou, když se teplota zvedne nad 373K za stejného tlaku. Jak také vidíme na obrázku, voda má sice tři základní skupenství, ale jednotlivých fází vody (hlavně ledu) zde nalezneme podstatně více.

Každá křivka na Obrázku 2.1 či 2.2 ukazuje hranici mezi jednotlivými fázemi vody a udává podmínky, za kterých spolu mohou dvě fáze koexistovat. Na této hranici způsobí malá změna teploty nebo tlaku rychlou změnu fáze z jedné na druhou. Spojíme-

li tři křivky, nalezneme tzv. trojný bod, kde mohou koexistovat všechny tři fáze. Na grafu (Obrázek 2.1) dále nalezneme tzv. kritický bod (označen znakem ●), kdy jsou od sebe dvě fáze nerozlišitelné. Fázový diagram vody je komplexní, má několik trojných bodů (termodynamická dat různých trojných bodů jsou uvedena v Tabulce 2.1) a jeden nebo dva kritické body. Mnoho krystalických forem může být metastabilních a to hlavně za nízkých teplot a tlaků.

Obrázek 2.2: fázový diagram H_2O – detailní přechod mezi kapalným a pevným skupenstvím [3]:



Všechny krystalické fáze ledu obsahují molekuly vody spojené vodíkovou vazbou se čtyřmi sousedními molekulami. Ve všech případech jsou oba vodíkové atomy v molekule H_2O ekvivalentní, udržují v molekule symetrii a dodržují tzv. ledové pravidlo: dva vodíky na každém kyslíku, jeden vodík na každé $O...O$ vazbě. $H-O-H$ úhel v ledových fázích je o trochu menší než úhel v tetraedru ($109,47^\circ$) a to cca 107° .

Tabulka 2.1: termodynamická data trojných bodů vody [3]:

Trojný bod			MPa	$^\circ C$	$\Delta S, J mol^{-1} K^{-1}$	$\Delta V cm^3 mol^{-1}$
plyn	kapalina	Ih	0.000611657	0.010		
			plyn \rightarrow kapalina		-132.5	-22050
			plyn \rightarrow Ih		-154.5	-22048
			kapalina \rightarrow Ih		-22.0	1.634
plyn	Ih	XI	0	-201.0		
kapalina	Ih	III	207.5	-22.0		
			kapalina \rightarrow Ih		-14.9	2.434
			kapalina \rightarrow III		-13.9	-0.839
			Ih \rightarrow III		1.0	-3.273
Ih	II	III	212.9	-34.7		

			Ih→II	-2.1	-3.919
			Ih→III	1.0	-3.532
			II→III	3.2	0.387
II	III	V	344.3	-24.3	
			II→III	3.1	0.261
			II→V	3.3	-0.721
			III→V	0.1	-0.982
kapalina	III	V	346.3	-17.0	
			kapalina →III	-13.2	-0.434
			kapalina →V	-13.1	-1.419
			III→V	0.1	-0.985
II	V	VI	~620	~-55	
kapalina	V	VI	625.9	0.16	
			kapalina →V	-15.7	-0.949
			kapalina →VI	-16.2	-1.649
			V→VI	-0.5	-0.700
VI	VII	VIII	2,100	~5	
kapalina	VI	VII	2,200	81.6	
VII	VIII	X	62,000	-173	
kapalina	VII	X	43,000	>700	

Oba kritické body jsou ve fázovém diagramu vody (Obrázek 2.1) znázorněny znakem ●. Za kritickým bodem v prostoru kapalina-pára (směrem nahoru vpravo) voda existuje v tzv. superkritickém stavu, kde se fyzikální vlastnosti (kapalina/plyn) mění v závislosti na hustotě. Vlastnosti superkritické vody jsou velmi odlišné od nesuperkritické vody. Například superkritická voda je slabé rozpouštědlo pro elektrolyty, které mají tendenci tvořit iontové páry. Nicméně je výborným rozpouštědlem pro nepolární molekuly, kvůli své malé dielektrické konstantě a slabým vodíkovým vazbám (můstkům) je totiž velmi dobře mísitelná. Superkritická voda je také výrazně viskóznější než nesuperkritická voda.

Mnoho vlastností studené kapalné vody (viskozita, samodifuze, stlačitelnost, Ramanovské spektrum a molekulární separace) se změní při tlaku okolo 200MPa. To může být vysvětleno vysokou hustotou kapalné fáze obsahující penetrující vodíkové vazby (Obrázek 2.3). Chemické vlastnosti vody jsou nestálé za vysokých teplot a tlaků, díky změnám v: ionizaci, rozpustnosti, difuzivitě a reaktivitě díky snižování počtu vodíkových vazeb. [3]

Kritický bod a horizontální křivka ve fázi hexagonálního ledu (Ih) oddělují amorfní led s nízkou hustotou (LDA) a amorfní led s vysokou hustotou (HDA). Přestože je všeobecně akceptována a podpořena množstvím experimentálních dat

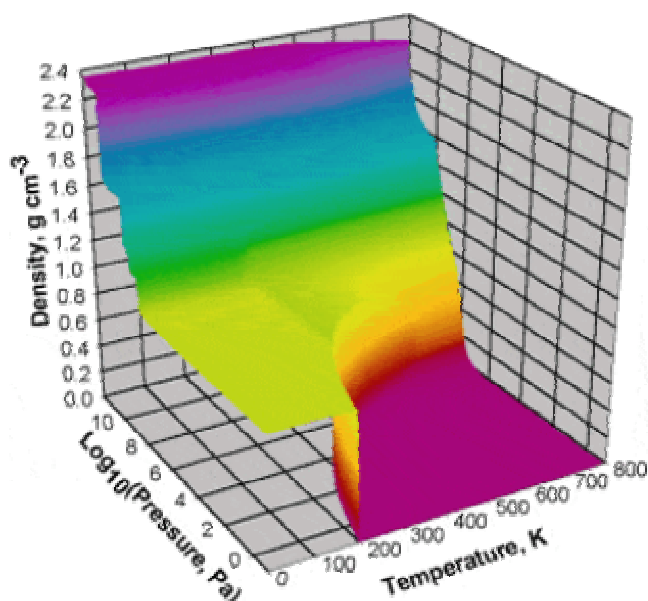
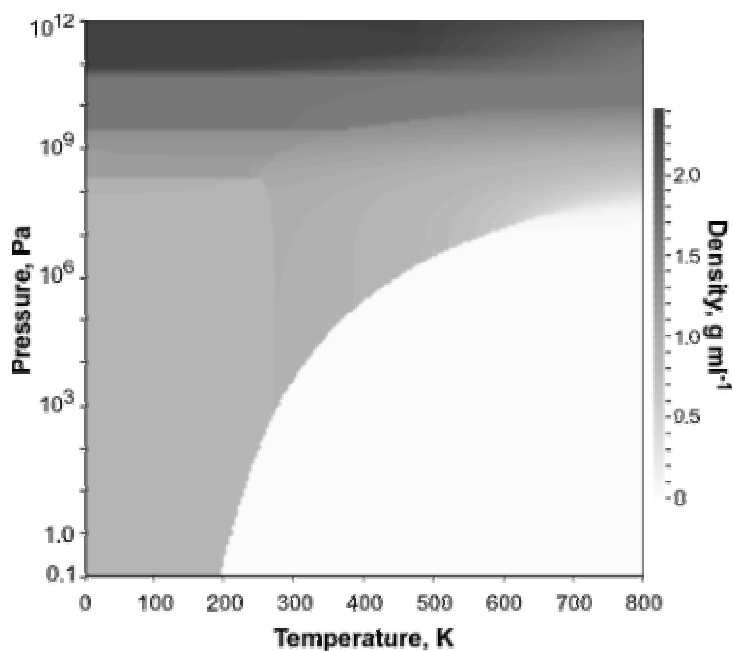
existence druhého (pravděpodobně metastabilního) kritického bodu, není potvrzena teoretickou hypotézou. Přechod mezi LDA a HDA je doprovázen v HDA zvyšováním entropie a vlivu van der Waalsových sil. Křivky vysokotlaké fáze mezi ice-ten (X) a ice-eleven (XI) jsou stále ještě předmětem experimentů.

Jenom Ih, III, V, VI, VII mohou být v rovnováze s kapalnou vodou, kdežto ostatní fáze ledu, včetně ice-two, nejsou stabilní s kapalnou vodou za žádného tlaku ani teploty. Nízkoteplotní ledy ice-two, ice-eight (VIII), ice-nine (IX), ice-eleven (nízkotlaká forma), ice-thirteen (XIII) a ice-fourteen (XIV) mají (IX a XIV pouze částečně) nízkou entropii uspořádaných vodíkových vazeb, kdežto u ostatních ledů (kromě ice-ten a ice-eleven, kde jsou vodíkové atomy symetricky rozmístěné) jsou vodíkové vazby rozrušovány směrem k 0K. Ice-four (IV) a ice-twelve (XII) jsou metastabilní v prostoru fáze ice-five. Kubický led (Ic) je metastabilní vzhledem k hexagonálnímu ledu. Je důležité zdůraznit, že kapalná voda je stabilní v celém svém fázovém prostoru. Ice-nine, protonovaná forma ice-three, existuje pouze při nízkých teplotách a vysokém tlaku a nemůže koexistovat s kapalnou vodou za žádných podmínek. Hexagonální led (Ih) může být metastabilní pod negativním tlakem (roztahování) za velmi nízkých teplot díky „prázdným“ strukturám o nízké hustotě (tzv. klatrát). Zcela vyčerpávající údaje o výše jmenovaných formách ledu nalezneme v Tabulce 2.2.

Na Obrázku 2.3 vidíme, jak se za zvyšujícího tlaku zvyšuje hustota jednotlivých ledových fází. Zvětšení hustoty se dosahuje ohýbáním vazeb a utvářením pevnějších kruhových nebo helikálních sítí, ve kterých se vytváří větší množství penetrujících vodíkových vazeb.

Ještě podrobnější a komplexnější popis fázového diagramu vody nalezneme v odkazu [3], ze kterého jsem volně citoval v této kapitole.

Obrázek 2.3: za zvyšujícího tlaku se zvyšuje hustota ledových fází. Oba obrázky jsou totožné, pouze první je klasický 2D graf, druhý je nakreslen prostorově (3D) [3]:



Tabulka 2.2: strukturální údaje různých typů ledu [3]:

Ice polymorph	Density, g cm^{-3}	Protons	Crystal	Symmetry	Dielectric constant, ϵ_s	Notes
Hexagonal ice, Ih	0.92	disordered	Hexagonal	one C_6	97.5	
Cubic ice, Ic	0.92	disordered	Cubic	four C_3		
LDA	0.94	disordered	Non-crystalline			As prepared, may be mixtures of

						several types
HDA	1.17	disordered	Non-crystalline			As prepared, may be mixtures of several types
VHDA	1.25	disordered	Non-crystalline			
II, Ice-two	1.17	ordered	Rhombohedral	one C ₃	3.66	
III, Ice-three	1.14	disordered	Tetragonal	one C ₄	117	protons may be partially ordered
IV, Ice-four	1.27	disordered	Rhombohedral	one C ₃		metastable in ice V phase space
V, Ice-five	1.23	disordered	Monoclinic	one C ₂	144	protons may be partially ordered
VI, Ice-six	1.31	disordered	Tetragonal	one C ₄	193	protons can be partly ordered
VII, Ice-seven	1.50	disordered	Cubic	four C ₃	150	two interpenetrating ice Ic frameworks
VIII, Ice-eight	1.46	ordered	Tetragonal	one C ₄	4	low temperature form of ice VII
IX, Ice-nine	1.16	ordered	Tetragonal	one C ₄	3.74	low temperature form of ice III, metastable in ice II space
X, Ice-ten	2.51	symmetric	Cubic	four C ₃		symmetric proton form of ice VII
XI, Ice-eleven	0.92	ordered	Orthorhombic	three C ₂		low temperature form of ice Ih
XI, Ice-eleven	>2.51	symmetric	Hexagonal	distorted		Found in simulations only
XII, Ice-twelve	1.29	disordered	Tetragonal	one C ₄		metastable in ice V phase space
XIII, Ice-thirteen	1.23	ordered	Monoclinic	one C ₂		ordered form of ice V phase
XIV, Ice-fourteen	1.29	mostly ordered	Orthorhombic	one C ₄		ordered form of ice XII phase

další údaje o struktuře:

Ice polymorph	Molecular environments	Small ring size(s)	Helix	Approximate O-O-O angles, °
Ice polymorph	1	6	None	All 109.47±0.16
Hexagonal ice, Ih	1	6	None	109.47
Cubic ice, Ic	3+	5, 6	None	mainly 108, 109 and 111
LDA	6+	5, 6	None	broad range
HDA	6+	5, 6	None	broad range
VHDA	2 (1:1)	6	None	80,100,107,118,124,128; 86,87,114,116,128,130
II, Ice-two	2 (1:2)	5, 7	4—fold	(1) 91,95,112,112,125,125 (2) 98,98,102,106,114,135
III, Ice-three	2 (1:3)	6	None	(1) 92,92,92,124,124,124 (3) 88,90,113,119,123,128
IV, Ice-four	4 (1:2:2:2)	4, 5, 6, 8	None	(1) 82,82,102,131,131,131 (2) 88,91,109,114,118,128 (3) 85,91,101,103,130,135 (4) 84,93,95,123,125,126
V, Ice-five	2 (1:4)	4, 8	None	(1) 77,77,128,128,128,128 (2) 78,89,89,128,128,128
VI, Ice-six	1	6	None	109.47
VII, Ice-seven	1	6	None	109.47
VIII, Ice-eight	2 (1:2)	5, 7	4—fold	(1) 91,95,112,112,125,125 (2) 98,98,102,106,114,135
IX, Ice-nine	1	6	None	109.47
X, Ice-ten	1	6	None	109.47
XI, Ice-eleven	undetermined	6	None	undetermined
XI, Ice-eleven	2 (1:2)	7, 8	5—fold	(1) 107,107,107,107,115,115 (2) 67,83,93,106,117,132
XII, Ice-twelve	7 (all equal)	4, 5, 6, 8	None	(1) 82,82,102,131,131,131 (2) 88,91,109,114,118,128 (3) 85,91,101,103,130,135 (4) 84,93,95,123,125,126
XIII, Ice-thirteen	2 (1:2)	7, 8	5—fold	(1) 107,107,107,107,115,115 (2) 67,83,93,106,117,132

2.2 Amorfní led

Běžný led, se kterým se setkáváme, je krystalický, to znamená, že jeho struktura je tvořena opakující se maticí molekul. Amorfní led je amorfní pevná forma vody, skládající se z molekul H₂O náhodně rozložených podobně jako u běžného skla. Tato forma ledu vzniká velmi rychlým zmrazením kapalné vody (okolo 100000 K/s), kdy molekuly nestačí vytvořit krystalovou mřížku. [9]

Stejně, jako existuje mnoho forem krystalického ledu (obvykle se uvádí čtrnáct), existuje i amorfní led v několika formách, které od sebe rozeznáváme na základě jejich hustoty.

2.2.1 Vznik amorfního ledu

Klíčovou vlastností pro vznik amorfního ledu je rychlost chlazení. Kapalná voda musí být zchlazena na tzv. glass transition temperature (okolo 136K) v několika milisekundách, abychom předešli samovolnému vzniku krystalů.

Tlak je dalším důležitým faktorem pro vznik amorfního ledu a jeho změny způsobují, že se jedna forma ledu může změnit na jinou.

Další důležitou věcí, která se podílí na pohodlnější produkci amorfního ledu, jsou chemické látky nazývané kryoprotektanty. Přidáním kryoprotektantu do vody snižujeme její bod tuhnutí a zvyšujeme viskozitu, což brání vzniku krystalů. Vitřifikace bez přidání kryoprotektantu vyžaduje velmi rychlé mrazení. [9]

2.2.2 Amorfní led s nízkou hustotou (LDA)

Amorfní led s nízkou hustotou (Low-density amorphous ice) obvykle vzniká v laboratoři pomalou akumulací vodních par na velmi rovný kovový povrch podchlazený na 120K. LDA má hustotu 0,94 g/cm³. [9]

2.2.3 Hyperchlazená sklovitá voda (HGW)

Hyperchlazená sklovitá voda (Hyperquenched glassy water) vzniká naprašováním kapiček vodní mlhy do kryogenu (propanolu) o teplotě okolo 80K nebo hyperchlazením mikrometrových kapiček vody na držáku vzorku vloženém ve vakuu do kapalného dusíku (77K). Rychlost chlazení ale musí být nad 10000 K/sec, abychom se vyhnuli krystalizaci kapek. Při teplotě kapalného dusíku (77K) je HGW kineticky stabilní a může být uchována po mnoho let. [9]

2.2.4 Amorfní led s vysokou hustotou (HDA)

Amorfní led s vysokou hustotou (High-density amorphous ice) vzniká stlačením hexagonálního ledu (I_h) při teplotě pod 140K. Při 77K vzniká HDA z I_h ledu tlakem okolo 1,6 GPa a z LDA tlakem okolo 0,5GPa. Hustota tohoto ledu je 1,17 g/cm³. [9]

2.3 Proces krystalizace

Proces krystalizace ve vodných roztocích v buňkách přináší fázovou separaci, kdy rostoucí krystaly ledu stahují vodu z nezamrzlých oblastí, čímž se zvyšuje koncentrace zbylých roztoků. Tento proces pokračuje do chvíle, kdy celý systém dosáhne eutektické teploty a ztuhne. [str. 5-11; 1]

Čistá voda nemusí zmrznout při 273K (0°C), ale je ji možno podchladiť bez tvorby ledu až na teplotu 235K (-38°C) při normálním atmosférickém tlaku. Při této teplotě začnou náhodně vznikat jednotlivá krystalizační jádra, která pak fungují jako zárodky postupné krystalizace. Při krystalizaci ledu se uvolňuje teplo, které ohřívá celý systém a udržuje jej v oblasti růstu krystalů. Tento děj se nazývá homogenní nukleace. Růst krystalů pokračuje až do dosažení rekrystalizační teploty (cca 138K), a pokud latentní teplo uvolňované krystalizací dostatečně rychle neodvádíme, jsou vytvořené krystaly relativně velké. U vody obsahující nečistoty (např. voda v buňkách a tkáních) působí v roli krystalizačních jader (zárodků krystalů) nerozpustné částice; v tomto případě se jedná o heterogenní nukleaci. [str. 5-11; 1]

Základním podmínkou pro minimalizaci škod při mrazení vzorku je dostatečně vysoká rychlost odvodu tepla ze vzorku, tedy dosažení vysoké chladicí rychlosti. V literatuře [1] se obvykle uvádí, že pro kvalitní kryofixaci je nutná chladicí rychlost minimálně 10⁴K/s. Pokud není této rychlosti dosaženo, je vzorek vystaven nebezpečí poškození vlivem růstu krystalů (viz výše). Cílem kryofixace je dosáhnout u vzorku tzv. vitrifikovaného stavu, kdy je vzorek zchlazen pod rekrystalizační teplotu bez vzniku krystalů.

3. Rychlost mrazového sušení biologických vzorků

Čas sušení poblíž hodnoty vypočtené pro maximální sublimační rychlosti čisté vody můžeme očekávat pouze pro některé druhy biologických vzorků jako zředěné suspenze makromolekul. Pro většinu biologických vzorků, jako samostatné buňky nebo i celé tkáně, se skutečná rychlost sušení dramaticky odchyluje od teoretických výpočtů sublimace čistého ledu. Ve zmrazených biologických preparátech totiž proces sublimace vede k narůstání povrchové suché vrstvy látky, které následně brání další volné sublimaci. [str.243–246; 1]

3.1 Transport hmoty a tepla

Musíme mít na paměti, že pro vodu, která je sublimována z povrchu ledu (a přepravována přes povrch vzorku) je požadované množství energie kvantitativně ekvivalentní latentnímu teplu. Tedy mrazové sušení je operace zahrnující jak transport hmoty (molekul H_2O), tak i transport tepla. Rychlost sušení pak závisí na velikosti rezistence těchto transportů.

Existují dvě hlavní kombinace transferů tepla a hmoty během mrazového sušení [str.252; 1]:

- transport tepla a transport hmoty prochází stejnou cestou (suchá vrstva), ale opačným směrem
- tepelný transport probíhá přes zmrazenou vrstvu a transport hmoty skrz suchou vrstvu

V reálných podmínkách se můžou vyskytnou všechny možné kombinace transportu hmoty a tepla a aktuální přenosy záleží na:

- velikosti vzorku, jeho tvaru a struktuře
- povaze kontaktu vzorku se stolkem (držákem, ...)
- velikosti vakua
- přítomnosti kondezátoru (chladiče) a jeho tvaru a orientaci

Pro vzorky užívané pro elektronovou mikroskopii vyžaduje množství transportovaného tepla přes mrazenou vrstvu, aby byl vzorek chlazen během sušení, abychom se vyhnuli teplotnímu růstu plynoucímu z tepla jdoucího přes suchou vrstvu preparátu.

3.2 Mrazová sublimace

Velké rozdíly ve velikosti, tvaru a struktuře biologických vzorků nám nedovolují stanovit obecná pravidla pro mrazovou sublimaci. Můžeme ale dokázat, že čas mrazové sublimace pro daný vzorek v optimálních vakuových podmínkách je závislý na teplotě preparátu, takže nejkratší čas je dosahován, jestliže je vzorek držen právě pod teplotou možné rekrystalizace ledu.

Pro biologické vzorky s vysokým obsahem vody nastává jev rekrystalizace při teplotě okolo -80°C (193K) a zamrznutí okolo 233K (rekrystalizace je také časově závislý jev). To proto, že buňky se skládají z řady navzájem propojených či naopak oddělených kompartment, které obsahují směsi různých organických i anorganických roztoků.

Je také důležité vědět, že zbylá vázaná voda v tkáních má stabilizační efekt v proteinových strukturách. Také plyny, které jsou rozpuštěny v buněčné vodě, mohou být příčinou vzniku artefaktů. A to kvůli značné roztažnosti plynů, která je závislá na teplotě a tlaku. [str.256–261; 1]

3.2.1 Průběh sublimace

Podíl mezi časem nutným k mrazové sublimaci definované vrstvy použitého preparátu a časem sublimace identické vrstvy ledu se nazývá prolongační faktor f [str.254; 1]:

$$f = \text{sušící čas pro } x \text{ } \mu\text{m vrstvu vzorku} / \text{sublimační čas pro } x \text{ } \mu\text{m vrstvu ledu} ; F \geq 1$$

Rychlost sublimace se během mrazového sušení biologických vzorků samozřejmě mění a můžeme si ji rozdělit do tří skupin:

- A. během první části, kdy je zmrazený preparát (který byl uložen při nízké teplotě, např. v tekutém dusíku) rozehríván na teplotu mrazového sušení, dosahuje sublimační rychlost nejvyšších hodnot. Za okolnosti, že je preparát obklopen vrstvičkou ledu, rychlost sušení odpovídá teoretickým předpokladům pro sublimaci ledu.
- B. ve druhé části křivky, kdy sušení přechází z povrchu do vnitřku preparátu, dochází k podstatnému zpomalení vysoušení. To je způsobeno jak rezistencí vodních par, tak i tokem tepla mezi zvětšujícím se prostorem mezi místem (dějištěm) sublimace a volným povrchem vzorku.

- C. během třetí fáze se množství vypařování stále snižuje a blíží se k nule. V tomto bodě musíme rozlišovat mezi tzv. zmrazitelnou vodou a přechlazenou vodou, také nazývanou vazebná voda. V průměrné biologické tkáni tvoří vazebná voda 5-10% z celkového množství vody. [str.255; 1]

3.2.2 Teoretická rychlost sublimace

Jevům sublimace a kondenzace kapaliny můžeme porozumět na základě kinetické teorie plynů. Absolutní rychlost sublimace ledu si můžeme vypočítat pomocí následující rovnice (tzv. Knudsenova rovnice) [str.250; 1]:

$$J_s = \eta P_s \left(\frac{M}{2\pi\phi T} \right)^{0,5}, \quad 0 < \eta < 1,$$

kde:

η ... koeficient vypařování

P_s ... nasycení (saturace) vodních par v ledu

M ... molekulární váha vodních par (18,016)

ϕ ... plynová konstanta

T ... absolutní teplota

J_s ... absolutní rychlost sublimace ledu [$g.cm^{-2}.s^{-1}$]

4. Pomocné látky využívané při mrazovém sublimaci

4.1 Kryogeny

Kryogen je látka, nejčastěji kapalina, která nám umožňuje prudce zmrazit vzorek, aniž by docházelo ke vzniku velkých krystalů. Vznik velkých krystalů je pro biologické vzorky často fatální, protože nám krystaly potrhají buněčné stěny, o vnitrobuněčných kompartmentech nemluvě.

Nejznámější kryogeny a jejich základní charakteristiku (bod tání a bod varu) vidíme v Tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: základní vlastnosti kryogenů [str. 49; 1]:

Kapalina	Vzorec	Bod tání [°C]	Bod varu [°C]
Ethanol	C_2H_5OH	-117,3	78,5
Isobutan	$CH_3CH(CH_3)_2$	-159,2	-11,7
Isopentan	$(CH_3)_2C_3H_6$	-159,9	27,8
Propan	C_3H_8	-189,6	-42,1
Ethan	C_2H_6	-183,5	-88,8
Tekutý dusík	N_2	-210	-195,8

Asi nejznámějším a také nejpoužívanějším kryogenem je kapalný dusík, označovaný jako LN_2 . Dusík je za běžné laboratorní teploty plyn bez barvy, chuti a zápachu. Není toxický, nepodporuje hoření a není ani jinak nebezpečný. Prvek dusík patří v periodické tabulce prvků mezi inertní plyny, to znamená, že reaguje s jinými chemickými sloučeninami pouze za vysokých teplot a tlaků. V atmosféře je dusík tvořen dvouatomovými molekulami, které jsou spojeny velmi pevnou trojnou vazbou. Tato trojná vazba má za následek jeho nízkou reaktivitu. Tyto vlastnosti, spolu s velmi nízkým bodem tání a varu (viz Tabulka 4.1) ho činí dobře a snadno použitelným v laboratoři. V neposlední řadě je velmi dobře dostupný, kvůli snadné výrobě pomocí frakční destilace je totiž poměrně levný (ve srovnání s ostatními kryogeny).

4.1.1 Uchování kryogenů

Kryogeny uchováváme v tzv. Dewarově nádobě. Dewarova nádoba (viz Obrázek 4.1) funguje stejně jako běžná termoska, tj. tepelně izoluje vnitřní obsah od venkovního prostředí. Pouze s rozdílem, že vnitřní a vnější nádoba (které jsou obě vyrobeny z kovu) jsou odděleny vakuem, které tvoří izolační vrstvu mezi vnitřním obsahem a venkovním prostředím.

Obrázek 4.1: Dewarova nádoba, ve které jsem měl uchovaný kapalný dusík a polystyrénová nálevka, pomocí které jsem naléval LN₂ do potřebných zařízení:



4.2 Kryoprotektanty

Kryoprotektanty se používají s cílem nahradit vodu ve tkáních či buňkách. Tím se minimalizuje poškození způsobené vznikem velkých krystalů a podporuje se vznik amorfního ledu v buňkách. Kryoprotektanty můžeme rozdělit na základě jejich funkce na dvě skupiny, které dále ještě dělíme podle molekulární váhy (molecular weight – MW): [2]

1. Penetrující kryoprotektanty (Penetrating cryoprotectants – PCs)

1.1. MW < 100Da - látky s nízkou molekulární vahou:

Polyalkoholy (PVAs): ethylen glykol (EG), dimethyl sulfoxid (DMSO), propylen glykol, glycerol. Butandioly: 1,2-/2,3-butandiol, formamid, acetamid.

2. Nepenetrující kryoprotektanty (Non-penetrating cryoprotectants – NPCs)

2.1. $180 < MW < 594\text{Da}$ - cukry:

Monosacharidy: fruktosa, glukosa, laktosa, maltosa. Disacharidy: sukrosa, trehalosa. Polysacharid: rafinosa.

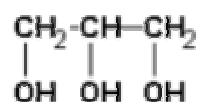
2.2. $MW < 1000\text{Da}$ – látky s vysokou molekulární vahou: Ficoll, Dextran, polyvinylpyrolidon (PVP), polyethylen glykol (PEG), polyvinyl alkohol (PVA).

Penetrující či nepenetrující kryoprotektant je určen tím, zda látka proniká či neproniká dovnitř buněk či vnitrobuněčných kompartmentů.

4.2.1 Penetrující kryoprotektant – Glycerol

Glycerol, neboli glycerín, má systematický název 1,2,3-propantriol, propan-1,2,3-triol nebo 1,2,3-trihydroxypropan. Jeho sumární vzorec je $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ a strukturní vzorec vidíme na Obrázku 4.2. Molární hmotnost glycerolu je $92,0932\text{g/mol}$ a hustota $1,26\text{g/cm}^3$. Teplota tání je $17,8^\circ\text{C}$ a teplota varu 290°C . [4]

Obrázek 4.2: strukturní vzorec glycerolu [4]:



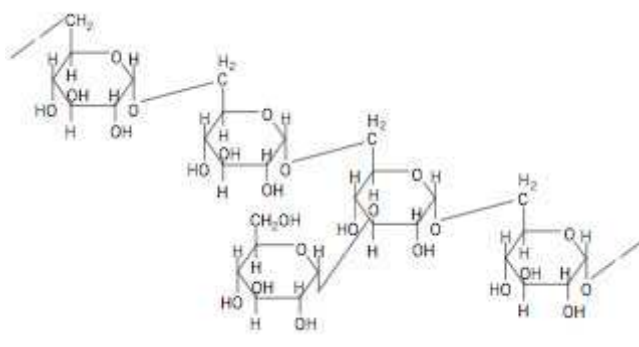
Glycerol je hygroskopická bezbarvá viskózní kapalina bez zápachu, sladké chuti. Je důležitou biogenní organickou sloučeninou, neboť je ve formě svých esterů součástí tuků.

4.2.2 Nepenetrující kryoprotektant – Dextran

Dextran je komplexní, rozvětvený polysacharid složený z mnoha glukosových ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) molekul spojených v řetězce o různých délkách. Ukázku struktury Dextranu si můžeme prohlédnout na obrázku 4.3. Příímý řetězec se skládá $\alpha 1 \rightarrow 6$ glykosidické vazby mezi glukosovými molekulami, jestliže větve začínají od $\alpha 1 \rightarrow 3$ vazby. Stupeň větvení je přibližně 5%. Větve jsou nejčastěji 1 až 2 glukosové jednotky dlouhé.

Je neutrální a rozpustný ve vodě, biodegradovatelný a v neposlední řadě stabilní více než 5 let. [5]

Obrázek 4.3: fragment struktury dextranu [5]:



4.3 Pufry

Pufř (z německého Puffer, „náravník“; též tlumivý roztok, v angličtině buffer) je konjugovaný pár kyseliny anebo zásady (báze), který je schopný udržovat v jistém rozmezí stabilní pH po přidání silné kyseliny či báze do systému. Pufřy jsou obvykle směsi slabých kyselin a jejich solí, nebo směsi slabých bází a jejich solí. Pufřační kapacita je maximální, pokud je koncentrace obou konjugovaných složek pufřu stejná, tj. při pH rovném pK^A pufřu. Pufř je například i krev, která uchovává pH na cca 7,4.

pH pufřu lze spočítat dle tzv. Henderson-Hasselbachovy rovnice: [6]

$$pH = pK^A + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right), \text{ neboli}$$

$$pH = pK^A + \log \left(\frac{[\text{báze}]}{[\text{kyseliny}]} \right),$$

kde A^- je báze a HA kyselina, pK^A je pH, při kterém je kyselina z poloviny disociována, prakticky se zjistí titrací kyseliny hydroxidem.

4.3.1 Fosfátový pufř

Fosfátový pufř (Phosphate buffer saline – PBS) je pufřující roztok běžně užívaný v biochemii. Je to solný roztok obsahující chlorid sodný (NaCl), hydrogenfosforečnan vápenatý (Na_2HPO_4) a fosforečnan dihydrogendraselný (KH_2PO_4).

PBS má velké využití, protože je isotonický a netoxický pro buňky. Může být užit pro ředění látek, užívá se také jako vypírací roztok. K zajištění prodloužení suchého uchování imobilizovaných biomolekul (například proteinů, enzymatických proteinů atd.) se PBS užívá jako biomolekulární rozpouštědlo, protože může uspořádat vodu

kolem biomolekul na pevný povrch. Tento tenký film vody zabraňuje deformaci biomolekul nebo změně jejich konformace. [6]

Výroba 0,2M PBS:

- 14,32 Na₂HPO₄ rozpustit ve 200ml H₂O
- 1,36g KH₂PO₄ rozpustit ve 50ml H₂O
- oba roztoky smíchat dohromady
- přidat 0,1g NaCl
- přefiltrovat

5. Popis kryozariadení Alto 2500

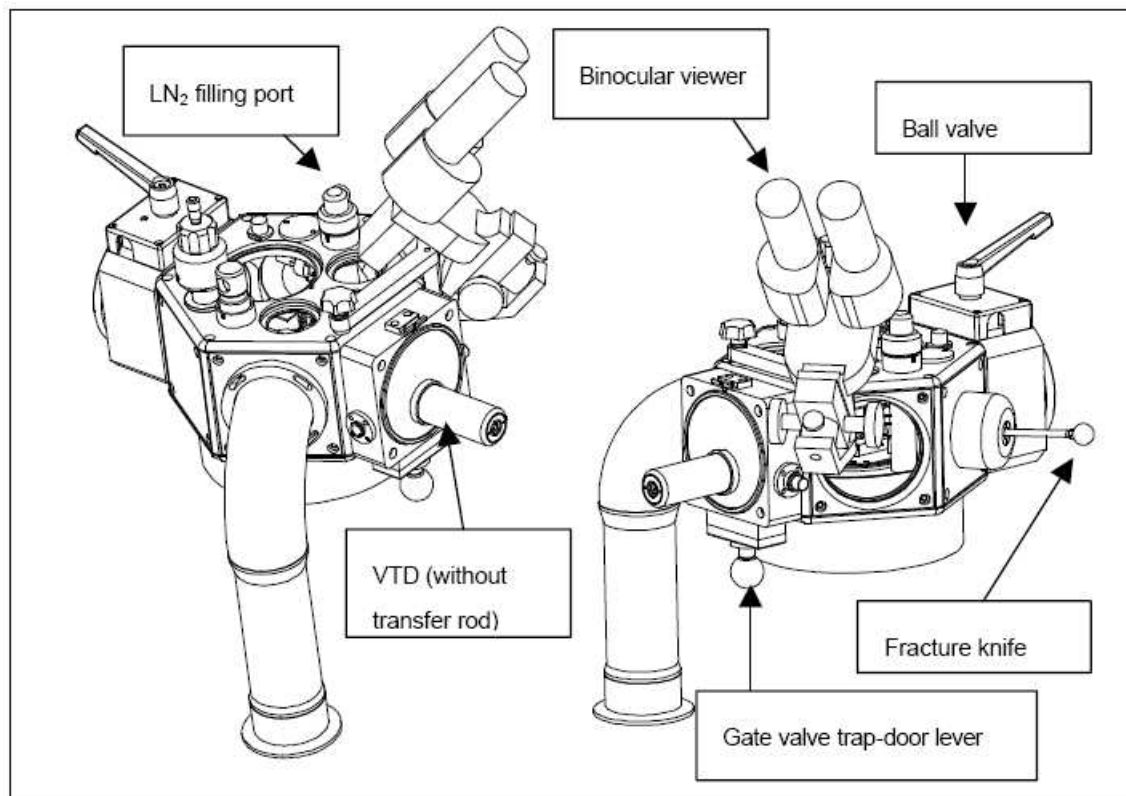
Alto 2500 od firmy Gatan je pokročilé kryozariadení neboli kryoattechement speciálne konštruované pre spojenie se skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM).

Alto je integračný systém a skladá se z preparátovú komoru, komponent pro komoru SEM, slushing station, vakuového transportního zařízení, vakuového systému, speciální klávesnice a samozřejmě boxu s elektronikou.

5.1 Komponenty Alto 2500

5.1.1 Preparátová komora

Obrázek 5.1: celkový pohled na preparátorovou komoru [str. 6; 7]:



Preparátovou komoru neboli kryokomoru si můžeme prohlédnou na Obrázku 5.1. Kryokomora je vybavena kromě jiných zařízení magnetronovou pokovovací hlavou, kterou můžeme využít pro pokovení vzorku a následného zvětšení požadovaného rozlišení. Tuto pokovovací hlavu na obrázku nenajdeme, je sundána kvůli lepšímu pohledu na celé zřízení.

V komoře můžeme provést tzv. mrazový lom, který nám odhalí vnitřní strukturu preparátu. K tomu slouží speciální vyměnitelný nůž – skalpel, který můžeme ovládat pomocí táhla, které je vyvedené ven z boku komory (viz Obrázek 5.1).

Do komory je vidět bočním a horním okénkem z čirého skla. Na pohled dovnitř můžeme použít také binokl, který využijeme zvláště při kontrole lomů a pokovení preparátu. Pohled na preparát nám zlepšuje osvětlení vnitřku komory halogenovou žárovkou.

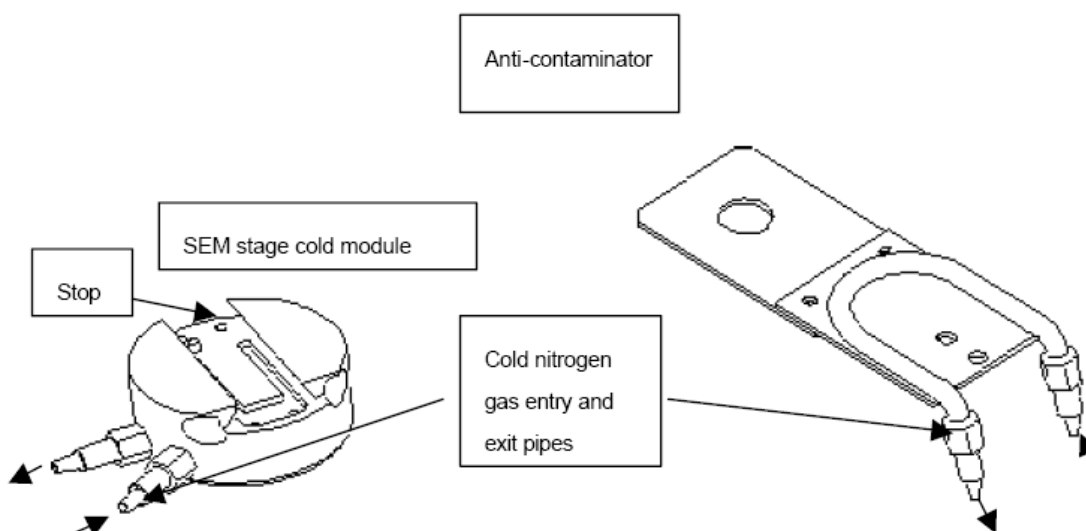
Kryokomora Alto 2500 je pevně propojena s preparátovou komorou SEM pomocí speciální redukce (lišící se podle typu mikroskopu). Komoru Alto lze spojit/odpojit (samozřejmě vzduchotěsně) s komorou SEM pomocí kruhového ventilu.

5.1.2 Klávesnice

Speciální klávesnice dovoluje uživateli ovládat pumpy a celý systém ventilů, pokovování i osvětlení. Na klávesnici také nalezneme kontrolky a displej pro kontrolu funkce celého zařízení. Popisu jednotlivých prvků klávesnice se budu věnovat při výkladu samotného ovládání celého zařízení v kapitole 7.

5.1.3 Komponenty pro komoru SEM

Obrázek 5.2: komponenty pro komoru mikroskopu [str. 8; 7]:



Nejdůležitější komponenty vidíme na Obrázku 5.2: anti-kontaminátor a chlazený upínací modul. Upínací modul je konstruován pro zasouvání speciálního držáku preparátu Gatan a je chlazen dusíkovými parami. Tento modul má integrované i

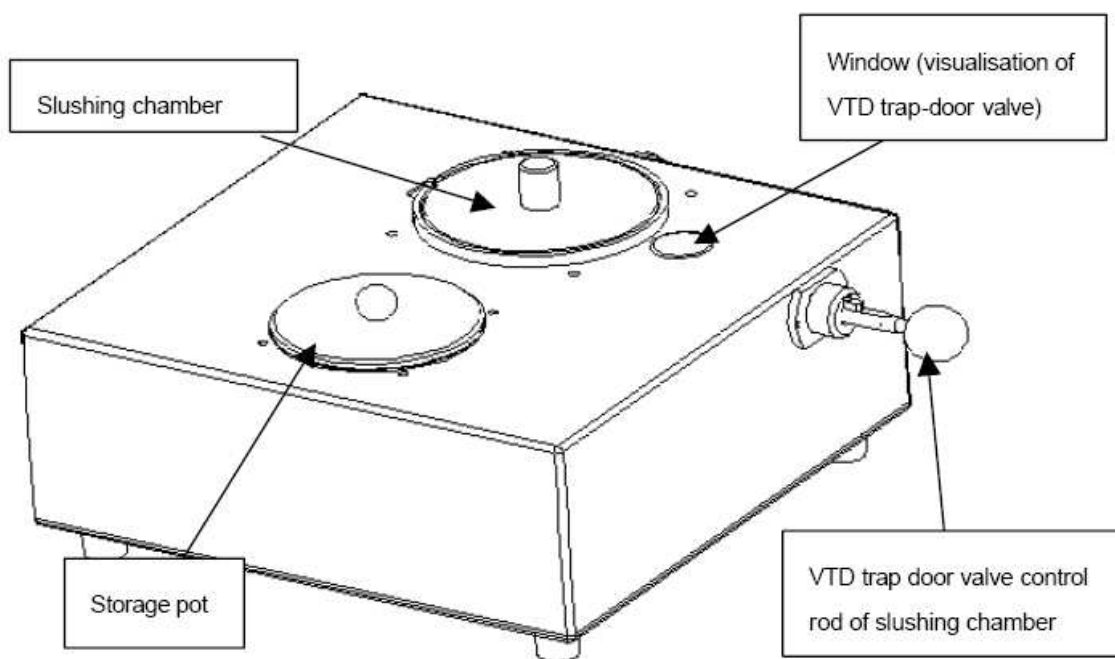
elektrické topení, pomocí kterého můžeme nastavit jeho přesnou teplotu a tím i teplotu preparátu přímo v preparátové komoře mikroskopu.

K této sadě komponent také patří plynové průchodky, průchodky pro elektrické kabely, kryotrubky pro přivádění kryogenu – v tomto případě dusíkových par a Dewarova nádoba se zásobou kryogenu.

5.1.4 Slushing station

Slushing station je zařízení, kde se preparát vkládá do chladicí substance (kryogenu) – v našem případě tekutého dusíku. Skládá se z storage boxu, vhodného pro vkládání preparátů do kryogenu a slushing chamber, kde může být tekutý dusík upraven do podoby dusíkové tříště (tzv. slush) pomocí vakuového odsávání dusíkových par a vzduchu.

Obrázek 5.3: základní popis částí slushing station [str. 9; 7]:



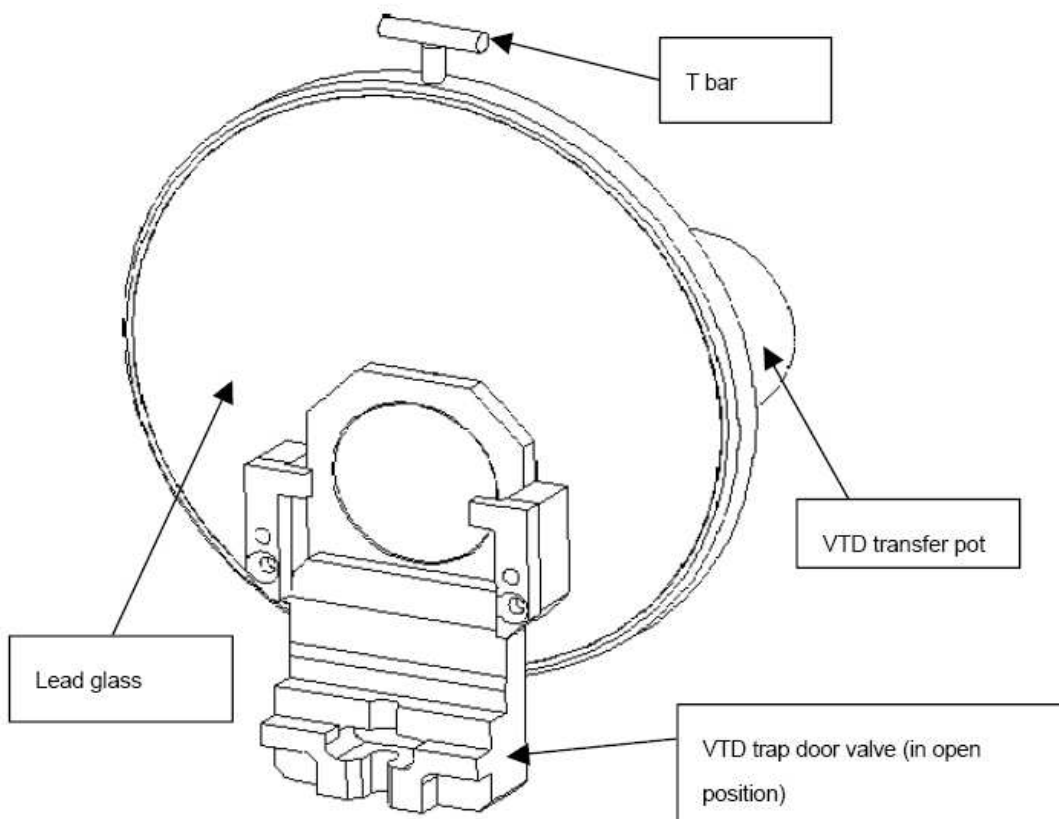
Vedle slushing chamber nalezneme malý skleněný průhled a z boku slushing station táhlo na ovládání záklopky vakuového transportního zařízení (VTD). Účelem průhledu je umožnit uživateli zjistit, zda je či není záklopka VTD otevřená nebo zavřená, což je velmi důležité při využívání tohoto systému, což bude popsáno později v kapitole 7 v postupu měření.

5.1.5 Vakuové transportní zařízení

Vakuové transportní zařízení (VTD), které vidíme na Obrázku 5.3, je možno jeho přírubou usadit přímo na slushing chamber, kde je v kryogenu zmrazen preparát a kde je možno odsát vzduch. Preparát je pak vtažením do transportní komůrky VTD připraven k přenosu do vakuované kryokomory Alto.

Tato transportní komůrka zaručuje, že preparát zůstává ve vakuu; chráněn před kontaminací. Záklopka komůrky je vyrobena z bílého PTFE a nedovoluje pouze hermetické uzavření VTD, ale odemyká také mosaznou klapku vzduchového uzávěru kryokomory. Přírubu VTD je totiž také možné usadit na vstup kryokomory (viz obrázek 5.2) a vytažení páky směrem dolů otevře jak VTD, tak i kryokomoru a můžeme držák s preparátem transportovat pomocí transportní tyče rovnou do kryokomory. Odtud pak po upravení preparátu (sublimace, mrazový lom a pokovení) posuneme preparát, rovněž pomocí transportní tyče, přímo do upínacího modulu (kapitola 5.1.3) do preparátové komory SEM.

Obrázek 5.4: na obrázku vidíme VTD z vakuované strany. Záklopka je zde v otevřené poloze, tj. stažená dolů, transportní tyč zde chybí z důvodu přehlednosti. T-tvar na vrcholu komponenty VTD zabraňuje jejímu náhodnému uvolnění z vzduchové uzávěru [str.10, 7]:



5.1.6 Vakuový systém

Vakuový systém se skládá z rotační pumpy a turbomolekulární pumpy.

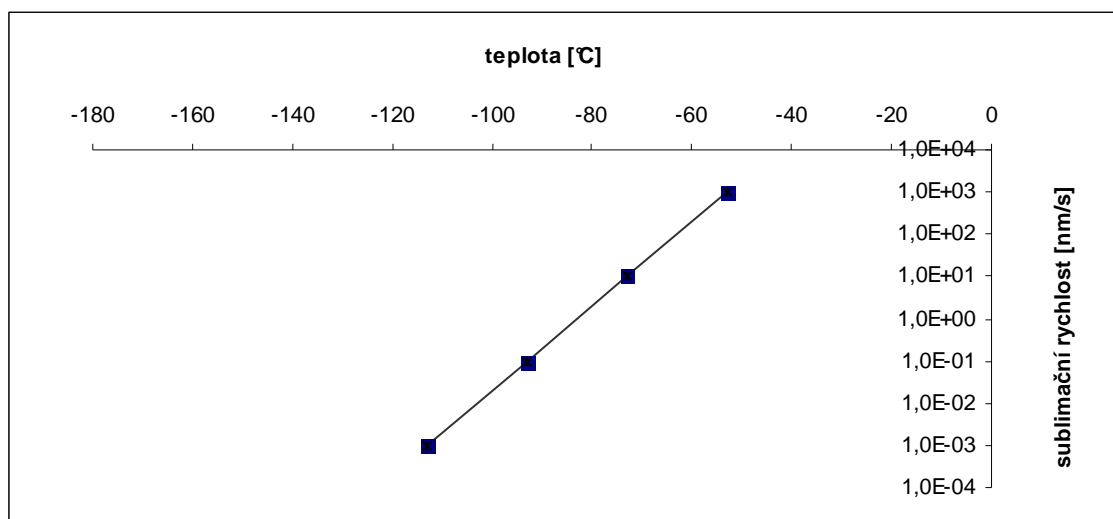
5.2 Sublimace vody v kryokomoře

O tom, jak rychle probíhá v komoře sublimace vody, se v originálním manuálu mnoho nezmiňuje. Výrobce dává k dispozici jeden graf (viz Graf 5.1, hodnoty pro graf jsou uvedeny v tabulce 5.1), bohužel neuvádí, jak byly tyto hodnoty naměřeny a z čeho byla voda sublimována. Proto i když tento graf vypadá zajímavě, v praxi tyto hodnoty příliš využitelné nejsou.

Tabulka 5.1: hodnoty sublimační rychlosti pro jednotlivé teploty [7]:

teplota [°C]	teplota [K]	sublimační rychlost [nm/s]
-73	200	1,0E+03
-93	180	1,0E+01
-113	160	1,0E-01
-133	140	1,0E-03

Graf 5.1: graf závislosti sublimační rychlosti na teplotě:



6. Popis mikroskopu JSM-7401F

V této kapitole bych chtěl stručně popsat skenovací elektronový mikroskop JSM-7401F od firmy JEOL. Zaměřím se však pouze na základní popis mikroskopu a stručnou charakteristiku jeho důležitých funkcí. Nebudu popisovat jeho ovládání a nastavení, protože to by vydalo na další samostatnou knihu a hlavně podrobný popis ovládání, nastavení a řízení je detailně popsán v původním obsáhlém manuálu.

6.1 Funkční charakteristika

Mikroskop JSM-7401F je skenovací elektronový mikroskop s vysokým rozlišením, využívající jako zdroj urychlených elektronů autoemisní (field-emission – FE) trysky. Velikost samotného zdroje elektronů je v tomto případě cca 5-10nm, což je podstatně méně než u klasické termoemisní trysky, u které má hrot velikost cca 10 μ m. Pro řízení elektronového paprsku a detekci povrchu preparátu využívá tento mikroskop nové technologie jako Gentle beam (GB) a r-filter. Kombinace GB módu, kónické objektivové čočky a autoemisní trysky silně zvětšuje rozlišovací schopnost při nízkých urychlovacích napětích. Na tomto zařízení tak můžeme dosáhnout rozlišení 1,5nm při velikosti urychlovacího napětí 1kV. Nejnižší urychlovací napětí při GB módu může být dokonce už 100V.

Při pozorování povrchu preparátu, s využitím urychlovacího napětí o hodnotách několika stovek voltů, je získání a zobrazení kvalitních informací možné pouze bez efektu nabíjení povrchu. Využitím technologie r-filter, selektivně detekujícího energetickou hladinu sekundárních elektronů emitovaných z preparátu, zredukujeme pro mnoho druhů vzorků efekt nabíjení.

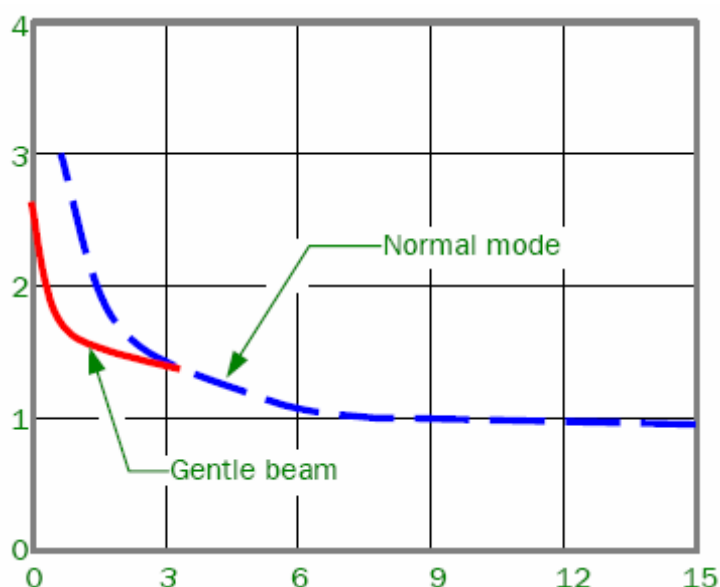
Mikroskop funkčně integruje detektor sekundárních elektronů, r-filter, zesilovač sekundárních elektronů, držák vzorků a detektor zpětně odražených elektronů do celku, který dokáže úspěšně získat kvalitní informace o preparátu i v případě ne zcela vhodných typů vzorků pro elektronovou mikroskopii. Tím jsou myšleny především preparáty, které pod běžným urychlovacím napětím (řádově desítky kV) rychle degradují.

6.1.1 Gentle beam

Gentle beam je metoda snižování rychlosti (brždění) elektronového svazku těsně před preparátem. Snížení energie dopadajících elektronů těsně před interakcí s

preparátem snižuje jeho degradaci, zatímco výsledné rozlišení (dané původní hodnotou urychlovacího napětí) zůstává zachováno. To je velmi důležité pro pozorování jemných struktur materiálů majících nízkou hustotu nebo malé atomové číslo. Samozřejmě, že tato metoda je závislá na konkrétním typu preparátu, především na jeho vodivosti. U biologických preparátů se tak stejně nevyhneme jemnému pokovení povrchu z důvodu zvětšení vodivosti. [8]

Obrázek 6.1: rozdíl mezi normálním (nebržděným) paprskem a paprskem s využitím gentle beam. Na ose x je urychlovací napětí v kV a na ose y rozlišení v nm [str.1-9; 8]:



6.1.2 R-filter

R-filter je energetický filtr, který umožňuje selektovat elektrony emitované z preparátu podle jejich energetické hladiny. Když elektronový svazek naráží na povrch preparátu, emitují se elektrony s různými energiemi. Multipletní statické pole ve filtru vybere a detekuje sekundární (a případně zpětně odražené) elektrony. R-filtr obsahuje: řídicí elektrodu sekundárních elektronů, řídicí elektrodu odražených elektronů a filtrační elektrodu. [8]

6.2 Komponenty mikroskopu

Mikroskop JSM-7401F, který vidíme na Obrázku 6.2, se skládá ze dvou základních částí: elektron-optického systému (electron optical system) a operačního a zobrazovacího systému (operation & display system).

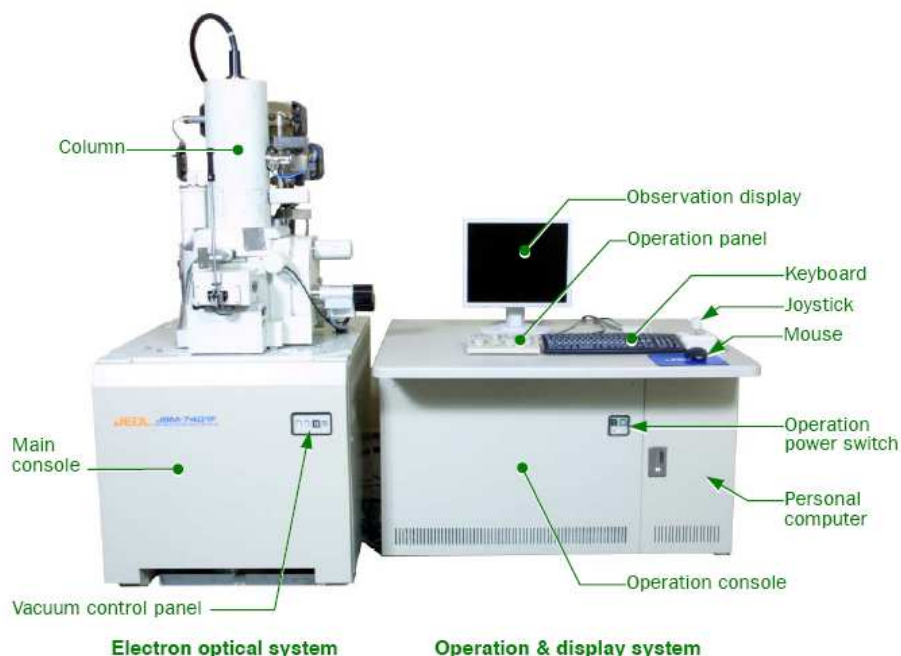
Elektron-optický systém obsahuje hlavní konzolu (main console) a hlavně optický sloupec (optical column), ve kterém je zdroj elektronů, elektronové optika a ve spodní části je umístěna preparátová komora. Hlavní konzola neslouží jen jako stabilní stolek pro optický sloupec, ale obsahuje především tlumič nárazů pro optický sloupec (viz Obrázek 6.4) a mimo jiné také olejovou difusní pumpu. Vlastní vakuový systém mikroskopu však bude popsán podrobněji v kapitole 6.3.

Operační a zobrazovací systém (operation & display system) obsahuje řídicí systém pro elektronovou optiku, ovládací elektroniku pro vakuový systém, tříosý motorový pohon pro posuvný stolek umístěný v preparátové komoře (ovládaný speciálním joystickem), osobní počítač, zdroj napájení, ovládací panel pro řízení systému čoček a samozřejmě klávesnici, myš a monitor (LCD).

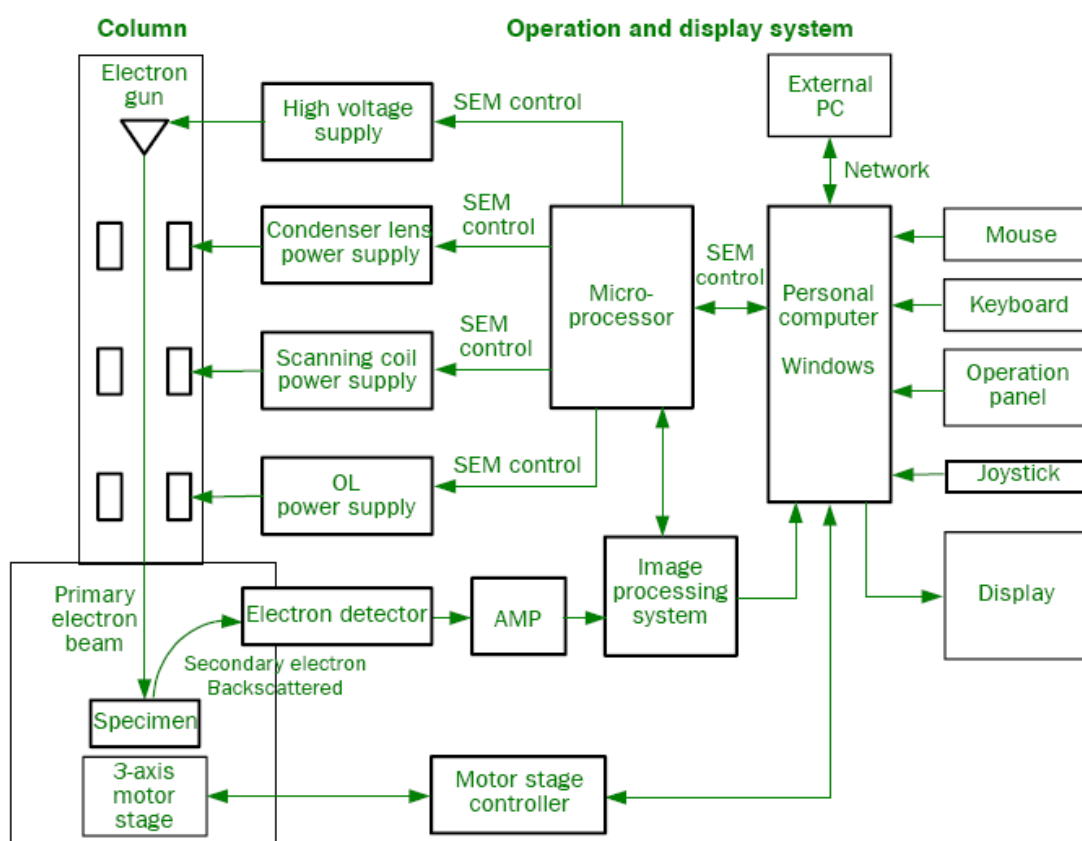
Za zmínku také stojí, že mikroskop má vodní chladicí systém, který je nutno napojit na externí pumpu a chladič.

Principiální schéma funkce mikroskopu, na základě kterého vzniká požadovaný obraz preparátu, si můžeme prohlédnout na Obrázku 6.3.

Obrázek 6.2: pohled na celý mikroskop, není vidět pouze box se zdrojem [str.2-1, 7]:



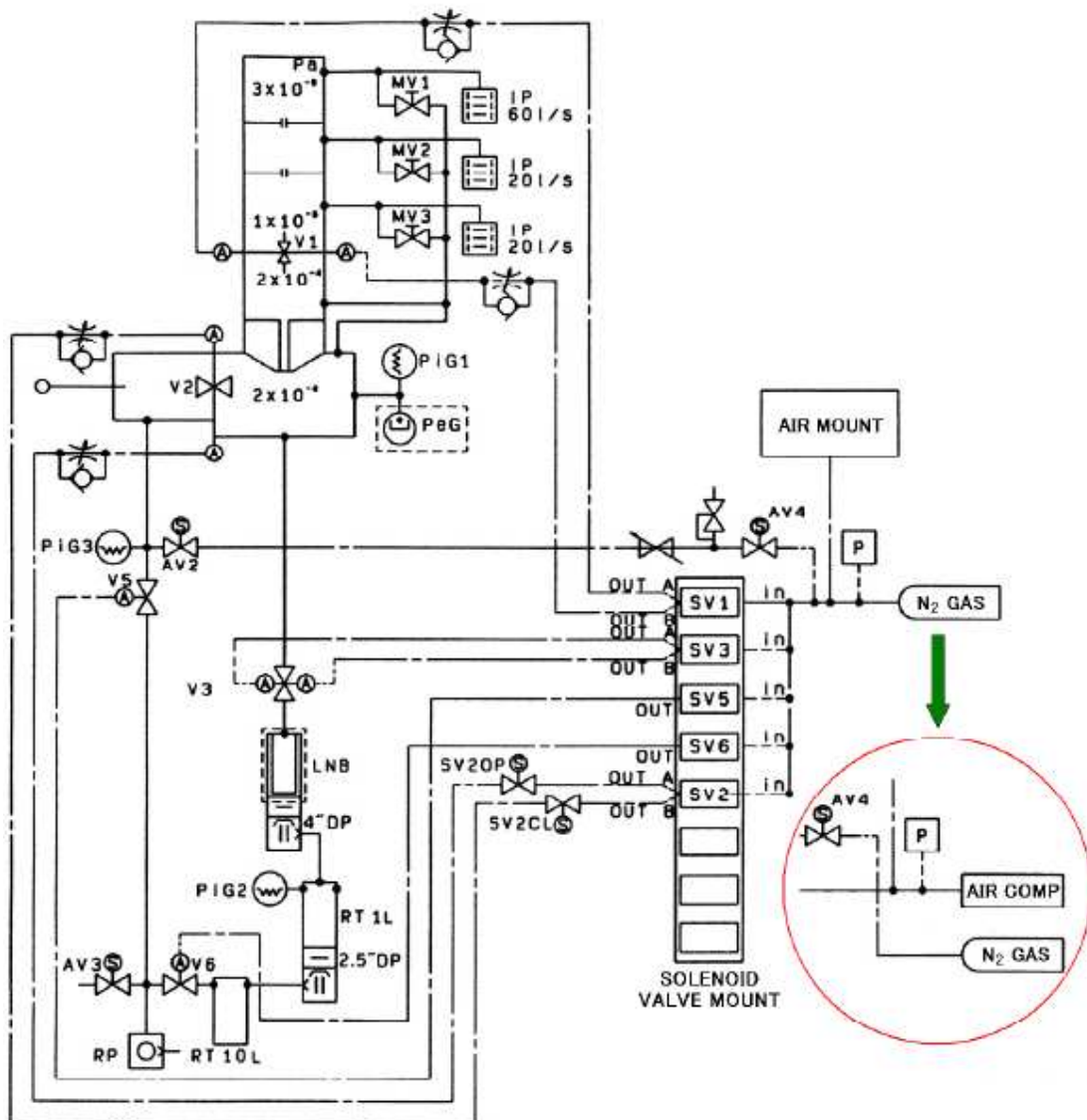
Obrázek 6.3: principiální schéma mikroskopu [str. 2-4, 7]:



6.3 Vakuový systém

Vakuový systém v mikroskopu JSM-7401F je poměrně komplikovaný (viz Obrázek 6.3) a to z důvodu nutnosti udržovat velmi vysoké vakuum. Pro autoemisní (field-emission) trysku je nutno udržovat tlak na úrovni 10^{-7} Pa, což je velmi vysoká hodnota i pro elektronovou mikroskopii. K udržování tak vysokého vakua nám slouží tři iontové pumpy, umístěné přímo na optickém sloupci. Preparátová komora už tak nízký tlak mít nemusí, zde si vystačíme s hodnotou 10^{-5} Pa, kterou nám zajišťuje olejová difusní pumpa.

Obrázek 6.4: schéma zapojení vakuového systému [str.2-22, 7]:



Popis symbolů na schématu:

AIR COMP – vzduchový kompresor

AIR MOUNT – tlumič nárazů pro optický sloupec

DP – olejová difusní pumpa

IP – iontová pumpa

MV – manuální ventil


N₂GAS – dusíkový plyn


PiG – Piraniho vakuová měrka


PeG – Penningova vakuová měrka


RP – olejová rotační pumpa


RT – vakuový reservoár


 – bezpečností vakuový vypínač

 – regulátor tlaku

 – pomocný tlakový ventil

 – pneumatický ventil

 – solenoidový ventil

 – regulátor toku

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7. Měření sublimace

Pro měření množství vysublimované kapaliny je nejzásadnějším problémem, jak ono malé množství vysublimované kapaliny kvantifikovat. Limitujícím faktorem je zde kryokomora ALTO 2500, ve které sublimace probíhá. V této komoře lze nastavit pouze teplotu, velikost vakua je prakticky konstantní (řádově na úrovni 10^{-3} až 10^{-4} Pa). Možnost vložit do komory nějaké další zařízení či detektor je velmi omezená, a to jak prostorově, tak technicky (komoře je vakuována a chlazená) a v neposlední řadě i finančně.

Proto jsem jako v podstatě jedinou možnou metodu kvantifikace množství vysublimované kapaliny vybral vážení na přesných analytických vahách mimo komoru. Ve stručnosti celý proces probíhá takto: malé množství vody (o známé hmotnosti) je zmrazeno kapalným dusíkem v slushing station, poté je vzorek přenesen ve vakuovém transportní zařízení do vychlazené kryokomory a tam je sublimován po určitý čas. Poté je vyjmut, opět zvážen a výsledný rozdíl nám dává množství vysublimované vody.

I když je tato metoda zdánlivě jednoduchá, v praxi bylo třeba vyřešit mnoho menších či větších problémů, než se podařilo metodu optimalizovat tak, že se výsledky dařilo bez problémů opakovat několik dnů po sobě.

7.1 Testovací pomůcka

Velikost a tvar testovací pomůcky pro přenesení malého množství kapaliny je jasně limitován velikostí vakuového transportního zařízení (VTD) a možností upnutí do něj. Využil jsem proto standardní duralový terčík pro biologické vzorky o tvaru válce s průměrem 1cm a výškou také 1cm. Materiál dural (slitina hliníku) se používá hlavně z důvodu velmi dobré tepelné vodivosti a nízké hmotnosti.

Do terčíku byl vyvrtán co největší otvor – o průměru 9,2mm, viz Obrázek 7.1. Takto upravený terčík byl upnut do standardního držáku dodávaného k transportnímu zařízení (VTD). Tyto dvě části tvořily během pokusů nedílný celek a i vážení vždy probíhalo společně. A to z toho důvodu, že montáž válečku zabírá určitý čas (změna času sublimace), tak i z důvodů možné kontaminace. Do pomůcky je možno nakápnout

maximálně cca 150 μl kapaliny, aniž by docházelo k vylití při transportu nezmrazené kapaliny.

Na terčíku tak mohla vzniknout plocha kapaliny o velikosti přibližně 66,5mm. Tato plocha přibližně odpovídá povrchu běžně užívaných malých biologických preparátů (např. kousek tkáně) o průměru cca 2-5mm. Zde totiž musíme brát v úvahu, že preparáty nejsou rovinné, ale zpravidla mají výšku 1-2mm.

Někdy se pozorují i větší preparáty, například hmyz, kde je plocha povrchu i řádově větší. Nepodařilo se mi však vyrobit žádnou pomůcku, kterou by bylo možné vytvořit větší plochu. Zde jsem narážel na to, že vytvořit například ledový krystal o různých tvarech a hlavně velkých plochách není problém, ale je prakticky nemožné vytvořit ho znovu stejný. Což je pro opakované měření malého množství vysublimované kapaliny při různých časech z přesně definované plochy problém zcela zásadní.

Obrázek 7.1: standardní držák terčků pro VTD a upravený terčik:

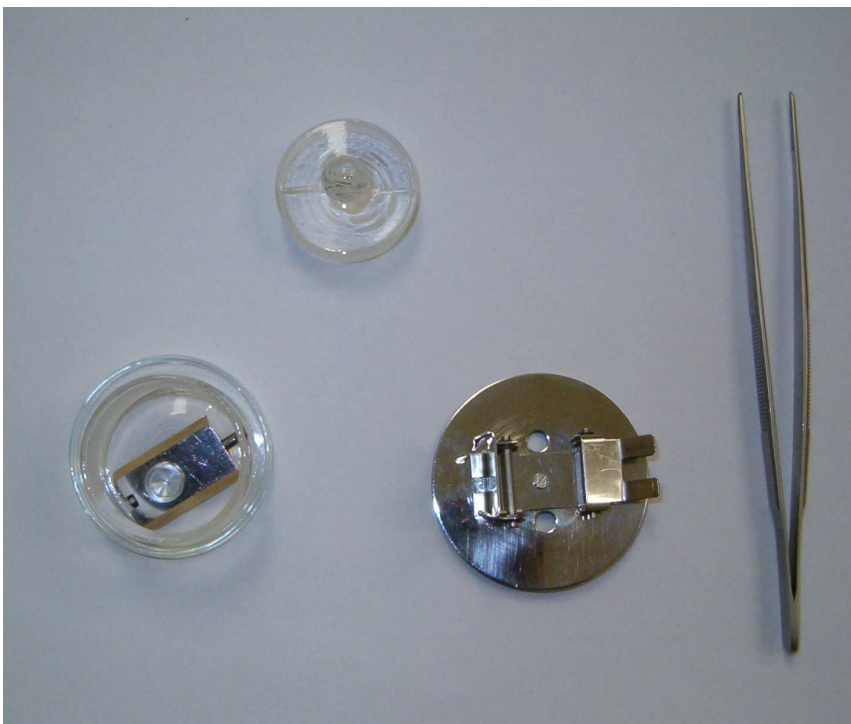


7.2 Pomůcky nutné k pokusu

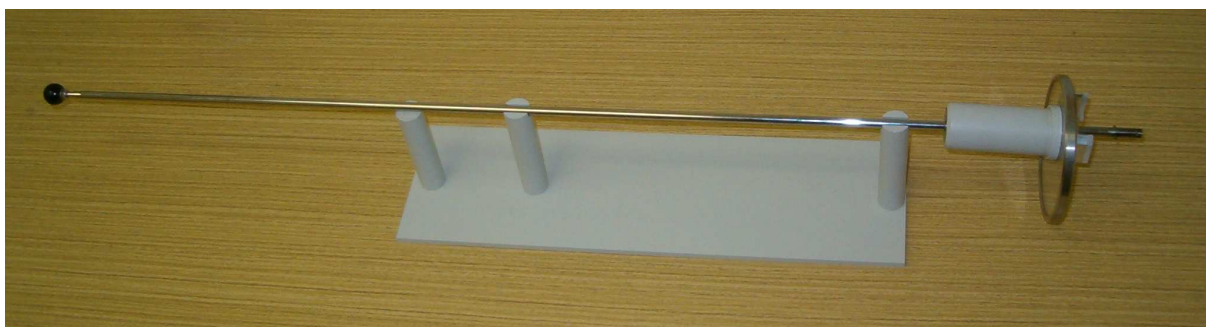
- Testovací pomůcka (Obrázek 7.4)
- Pipeta s jednorázovými špičkami (rozsah 1 – 1000 μl)
- Skleněná váženka
- Petriho miska
- Nádoba na testovanou kapalinu

- Pinzety
- Horkovzdušná stole (či fén)
- Vyklápěcí držák pro ponoření do dusíku (Obrázek 7.2)
- Destilovaná voda a ethanol na oplachování
- Chirurgické rukavice
- Stopky
- Trychtýř na nalévání LN₂
- Tekutý dusík (LN₂) v Dewarově nádobě (Obrázek 4.1)
- Polystyrénová nálevka na LN₂ (Obrázek 4.1)
- Kožené rukavice (pro manipulaci s LN₂)
- Přesné analytické váhy: Sartorius R 180 P, přesnost 0,04mg, rozsah 0,01mg – 182g (Obrázek 7.8)
- Kryzařízení Gatan Alto 2500 připojené k mikroskopu JEOL JSM-7401F
- Vakuové transportní zařízení (VTD) (Obrázek 7.3 a 7.4)

Obrázek 7.2: testovací pomůcka v otevřené váženě, vyklápěcí držák pro ponoření do LN₂ (zde vyklopený nahoru) a pinzeta:



Obrázek 7.3: vakuové transportní zařízení na odkládacím držáku:



Obrázek 7.4: testovací pomůcka nasazená na VTD:



7.3 Postup měření

7.3.1 Zprovoznění kryozariadení

K měření sublimací není třeba zprovoznit samotný mikroskop, ten ponecháme ve stand-by stavu. Postačí nám zprovoznit kryozariadení (kryoattachement) Alto 2500. Před zapnutím tohoto zařízení je třeba zkontrolovat některé ventily – viz manuál [7].

1. Zapneme kryoattachement hlavním vypínačem. Před tím ale zkontrolujeme, zda je turbomolekulární pumpa přepnuta na plný výkon (má dva režimy: 0 – poloviční výkon (stand-by) a 1 – plný výkon). Při zapínání je nutné podržet horní kryt komory (obsahující pokovovací hlavu) a to zejména, pokud byla komora předtím zavzdušněna.

2. Vyčkáme, dokud tlak v komoře neklesne alespoň na 10^{-5} mb ($=10^{-3}$ Pa). Jednotku milibar uvádím záměrně, protože právě v těchto jednotkách čteme hodnoty tlaku na displeji kryozariadení.
3. Sundáme kryty plnicích otvorů na dusík (Obrázek 5.1). Do pravého otvoru (to je ten, jehož krytka nemá otvor) poté začneme nalévat pomocí polystyrénové nálevky a trychtýře kapalný dusík. Nejdříve nalijeme zhruba 1 l, poté vyčkáme zhruba 5 min, než se komora alespoň částečně vychladí ($\leq 100^\circ\text{C}$) a poté nalijeme další litr. Při nalévání kapalného dusíku je vhodné použít kožené rukavice.
4. Vyčkáme, dokud se komora kompletně nevychladí. Na ovládacím panelu vidíme jak teplotu v komoře, tak po přepnutí i teplotu dekontaminátoru (po zchlazení cca -190°C). Poté nastavíme potřebnou teplotu k sublimaci na ovládacím panelu a zapneme topení (pomocí pravého tlačítka HEATER, levým se zapíná vytápění upínacího modulu umístěného v komoře SEM).
5. Po ustálení teploty v komoře na požadovanou teplotu můžeme začít provádět vlastní měření.

7.3.2 Měření sublimací

Důležité poznámky:

- Veškeré pomůcky je třeba mít dokonale čisté a vysušené z důvodu možné kontaminace!
 - Skleněnou váženku nikdy nepokládáme na stůl, ale vždy do Petriho misky a to z důvodu potenciální kontaminace nečistotami a následného ovlivnění vážení. S testovací pomůckou a váženkou vždy manipulujeme v chirurgických rukavicích a pinzetou.
 - Váhy je nutné zapnout dostatečně předem, ihned po zapnutí neváží zcela přesně. Rovněž si musíme uvědomit, že reakční doba vah při vážení je cca 30s.
 - Veškerá měření provádíme v klimatizované laboratoři.
1. Váženku umístíme do Petriho misky a vložíme testovací pomůcku (Obrázek 7.2). Do otvoru v terčíku poté nakápneme pomocí pipety 150 μl testované kapaliny a váženku uzavřeme.
 2. Váženku s testovací pomůckou přeneseme (přenášíme na Petriho misce) na analytické váhy a zvážíme (už samozřejmě bez misky).

3. Do kelímku umístěném v slushing chamber nalijeme kapalný dusík a velmi opatrně vyjmeme testovací pomůcku pinzetou z váženky a umístíme do vyklápěcího držáku (Obrázek 7.2).
4. Vyklápěcí držák spolu s testovací pomůckou pomocí dlouhé pinzety přeneseme do kelímku s kapalným dusíkem (Obrázek 7.5). Do dusíku ho spouštíme pomalu a držíme ho cca 2cm pod hladinou, protože rychlý pohyb by vytvořil na hladině testované kapaliny útvar ve tvaru kapky (nebo podobný). Žádoucí povrch zmrazené kapaliny je stejný, jakou měla kapalina před zmrazením, tj. rovný s okraji přilnutým ke stěnám otvoru.
5. Po vyrovnání teplot (dusík přestane vřít) spustíme držák na dno kelímku, ale stále ho držíme pevně pinzetou. Poté pomocí druhé pinzety vyklopíme část držáku směrem nahoru. Vyčnívající část testovací pomůcky zachytíme na bajonetový uzávěr vakuového transportního zařízení (VTD) a konečně můžeme pinzetu, kterou držíme držák, vytáhnout. Při této operaci je důležité, aby celá pomůcka zůstala umístěna pod hladinou dusíku (nebezpečí orosení), nebo abychom dokonce nepoškrábali pinzetami povrch zmrazené kapaliny.
6. Přírubu VTD pečlivě umístíme na přírubu slushing chamber. Z komory vyčerpáme vzduch pomocí tlačítka SLUSH/VENT. Při čerpání již můžeme pomůcku vytáhnout nad hladinu a nechat ji chladit pouze dusíkovými parami (Obrázek 7.6). Ještě než se nám začne z kapalného dusíku tvořit dusíková tříšť (slush), tak testovací pomůcku zcela zatáhneme do transportní komůrky. Až se nám hladina v kelímku zcela zakryje ledovou tříští, uzavřeme záklopku VTD. Poté ukončíme čerpání opět pomocí tlačítka SLUSH/VENT.
7. Sejmeme VTD (po vyrovnání tlaku) ze slushing station, urychleně přeneseme ke kryokomoře a přitiskneme okraj VTD na přírubu vkladací komory (Obrázek 7.6). Stiskem tlačítka LOAD/PUMP vyčerpáme předkomůrku na požadovanou hladinu vakua - na displeji kryokomory by se nám mělo zobrazit min. pět čárek.
8. Otevřeme záklopku VTD a tím se nám také otevře vstupní otvor komory (viz kapitola 5.1.5). Pomůcku zasuneme na označené místo ve středu komory. Poté ihned spustíme stopky s předem nastaveným požadovaným časem sublimace. Při zasunování/vysunování testovací pomůcky si můžeme v komoře rozsvítit světlo pomocí tlačítka LIGHT, ale nedoporučuji ho mít rozsvícené během celé doby sublimace, hrozí totiž ovlivnění měření vlivem tepla plynoucího z žárovky.

9. Po uběhnutí vybraného času vtáhneme testovací pomůcku zpátky do komůrky VTD a uzavřeme záklopku. Stiskneme, tentokrát dvakrát, LOAD/PUMP (s krátkou mezerou cca 1s) a sejmem VTD z příruby kryokomory.
10. Přeneseme VTD zpět do slushing station (tentokrát bez kelímku s dusíkem). Umístíme VTD na přírubu slushing chamber a otevřeme klapku. Z VTD rychle vysuneme vzorek a rychle ho pomocí pinzety přeneseme do přepravené otevřené váženky, kterou ihned po vložení vzorku uzavřeme. Toto je velmi riziková operace, ale lze ji zvládnout vcelku přesně pomocí nacvičených a zautomatizovaných pohybů a je samozřejmě nutné ji dělat vždy stejně dlouho.
11. Váženku se vzorkem přeneseme na analytické váhy (Obrázek 7.8). Toto vážení se liší od vážení v bodě 2 v tom, že není možno vážení libovolně opakovat a výsledek zprůměrnovat. Vzorek se nám totiž vlivem vzdušné vlhkosti orosí a tím se zvedne jeho váha! Já jsem postupoval takto: po vložení váženky jsem zaznamenal první hodnotu po 30s a dalších pět hodnot opět po 30s. Oněch šest hodnot proto, že po cca 3min se nárůst hmotnosti vlivem orosení zastaví a dále hmotnost velmi pomalu klesá.
12. Po zvážení vyjmeme testovací pomůcku z váženky, ohřejeme na laboratorní teplotu horkovzdušnou pistolí a pečlivě vyčistíme (opláchneme pomocí destilované vody a ethanolu). Poté váženku a vzorek pečlivě vysušíme opět pomocí horkovzdušné pistole. Rovněž orosené pinzety a držák musíme pečlivě osušit, neboť se na kovových věcech vyjmutých z kapalného dusíku tvoří led.
13. Před opětovným nalitím testované kapaliny si musíme uvědomit, že rozehráté pomůcky musíme nechat pomalu zchladnout na teplotu okolí (laboratoře).

Obrázek 7.5: ponoření testovací pomůcky do tekutého dusíku ve slushing station:



Obrázek 7.6: VTD nasazené na slushing station – probíhá čerpání komory a vzorek je vytažen nad hladinu dusíku:



Obrázek 7.7: kryokomora s nasazeným VTD – probíhá sublimace:



Obrázek 7.8: vážení testovací pomůcky ve váženice na laboratorních vahách:



7.3.3 Ukončení práce s kryoattechementem

1. Nejdříve vypustíme zbývající dusík z krykomory: ucpeme záslepkou levý nalévací otvor a do pravého vložíme speciální vylévací kovovou tyčinku (originální příslušenství Gatan). Do připravené polystyrénové nálevky poté zachytáváme tryskající dusík. Musíme být velmi obezřetní, protože tekutý dusík tryská okamžitě a velmi bouřlivě. Rovněž se nedotýkáme kovové tyčinky, ale jen plastové ucpávky – nebezpečí popálení od velmi studeného kovu.
2. Přepneme turbomolekulární pumpu na poloviční výkon.
3. Nastavíme topení (pravé tlačítko HEATER) na $+20^{\circ}\text{C}$ a vyčkáme, dokud se teplota uvnitř komory i teplota dekontaminátoru nevyrovnají na 20°C .
4. Po vyrovnání teplot je možné provést zavzdušnění komory, to by ale měl provést technik mikroskopu (postup je samozřejmě v originálním manuálu [7]).

8. Výsledky měření

8.1 Úvod do měření

V první fázi měření jsem na destilované vodě pouze vymýšlel a testoval metodu, jak vůbec lze sublimaci ledu změřit. Podařilo se mi sestavit metodu, kterou uvádím v předchozí kapitole. Teprve poté jsem mohl začít s vlastními experimenty při různých teplotách a časech, které měly vést k grafům, kde by byly závislosti odparu ledu různých kapalin na čase.

8.1.1 Chyba metody – vliv orosení

Chyba metody zde nebyla jenom samotná tolerance vah (viz kapitola 7.2), ale i například lehké orosení testovací pomůcky při vyndání z kryokomory a vložení na váhu. S problémem kolísání hodnot vlivem orosení jsem se snažil vypořádat jednak prací v klimatizované laboratoři, jednak následující metodou:

Při testovacích měřeních jsem vyzoroval, že orosení má vždy stejný průběh: hmotnost vzorku pomalu stoupá na určité maximum, které nastane zhruba 3 minuty po vložení vzorku na váhy. Čas přenosu z kryokomory na váhy byl vždy konstantní a činil $20 \pm 1,5$ s. Po vložení váženky s testovací pomůckou na váhy jsem spustil stopky a první hodnotu zaznamenal až po 30 s (reakční doby vah je právě 30 s). Další hodnoty jsem zapisoval vždy také po 30 s, takže jsem zapsal celkem šest hodnot. Z těchto hodnot jsem vypočetl aritmetický průměr. I když je tato metoda zdánlivě nepřesná, v praxi se velmi osvědčila a dávala hodnověrnější výsledky, než například zaznamenání pouhé jedné hodnoty z vah. Tím, že jsem zprůměroval hodnoty naměřené v určitém časovém intervalu, jsem vyloučil drobné rozdíly v orosení testovací pomůcky při jednotlivých pokusech.

Dokonce jsem pozoroval, že pokud je průběh orosení výrazně jiný než výše uvedený, téměř jistě bude výsledek pokusu výrazně odchýlen. Zpravidla to bylo zapříčiněno nějakou chybou v postupu, což bylo například striktní nedodržení práce při vakuování vzorku, dotknutí se (např. prstem) testovací pomůcky nebo nedostatečným vyčistěním testovací pomůcky či pinzety. Rovněž bylo nezbytně nutné po každém měření pečlivě vysušit (horkým vzduchem) skleněnou váženku a poté ji nechat pomalu zchladnout na laboratorní teplotu.

Při měření sublimací kryoprotektantů a pufru se mi mimoděk podařilo změřit velikost chyby metody. U nesublímujícího preparátu byla totiž změna úbytku hmotnosti (zde jde o kladný úbytek, tedy vlastně o přírůstek) rovna chybě metody. Tím myslím chybu vah a hlavně vliv orosení. Na sublimaci vody působil ještě jiný faktor a to vliv povrchu hladiny (viz kapitola 8.2).

Chybu metody naznačenou při pokusech s kryoprotektanty a pufrům jsem se rozhodl ještě ověřit a to následujícím způsobem: provedl jsem krátké kontrolní měření s prázdnou testovací pomůckou, které je popsáno v kapitole 8.5. Výslednou chybu metody jsem poté spočetl tak, že jsem vzal průměrné hodnoty úbytku sublimace z tabulek 8.2, 8.3, 8.4 a 8.5 a vypočetl jsem z nich průměrnou hodnotu. Ta nám pravděpodobně ukazuje hmotnost vody, která se nám vysrážela na testovací pomůcce při vážení a činí průměrně 0,00027g. Vzhledem k tomu, že tato hodnota by měla být při každém experimentu stejná, dále s ní nepracuji. Myslím si, že zde je důležitá závislost úbytku hmotnosti na čase (viz grafy) a křivku grafu tato hodnota neovlivní. Maximálně by posunula celý graf o něco málo níže. Ale i samotný rozptyl hodnot (vypočtená chyba měření – viz tabulky) je totiž vždy vyšší než tato vnořená chyba metody.

8.1.2 Použité hodnoty a způsob jejich výpočtu

Úbytek hmotnosti δm : $\delta m = m_1 - m_2$, kde:

- m_1 je hmotnost testovací pomůcky s nalitou kapalinou před sublimací.
- m_2 je hmotnost testovací pomůcky se zmrzlou kapalinou po sublimaci.

Průměrná hodnota $\overline{\delta m}$: $\overline{\delta m} = \frac{1}{n} * \sum_n \delta m_n$

Absolutní chyba ϑm : $\vartheta m = \sqrt{\frac{1}{n} * \sum_n (\overline{\delta m} - \delta m_n)^2}$

Relativní chyba Δm : $\Delta m = \frac{\vartheta m}{\overline{\delta m}} * 100$

8.2 Měření sublimace vody

Při prvních měřeních jsem zkoušel testovat různé teploty při stejném čase. Začal jsem testovat na -80°C a postupně jsem snižoval teplotu na -90°C , -100°C a -110°C . U teplot nižších než -80°C se mi nepodařilo naměřit hodnověrná a reprodukovatelná data, a to z důvodu velice nízké sublimace ledu při těchto teplotách. Naměřené hodnoty

úbytku vody se pochybovaly okolo samotné chyby měření a to i při velmi dlouhých sublimačních časech (2 hodiny). Proto jsem se zaměřil na teplotu -80°C , kterou lze ještě označit jako bezpečnou pro biologické vzorky, ale zároveň je zde možné naměřit hodnověrná data.

V Tabulce 8.1 nalezneme hodnoty z měření sublimace ledu při -80°C . Počet hodnot se u jednotlivých časů liší a kolísá mezi třemi a šesti. Počet hodnot jsem totiž měnil podle toho, jak blízko či daleko byly u sebe hodnoty úbytku hmotnosti. Vliv rovněž měla i velká časová náročnost experimentů, protože za den bylo možno provést přibližně čtyři experimenty (a některé se samozřejmě nepovedly).

Je také velmi důležité si uvědomit, co naměřené hodnoty úbytku hmotnosti znamenají: nejde přímo o přesnou hodnotu vody, která se v definovaném čase odpařila. Na tomto měření je podstatný postupně se zvyšující úbytek hmotnosti, který nám ukazuje Graf 8.2.

Na hodnoty měly vliv dvě nepříznivé okolnosti:

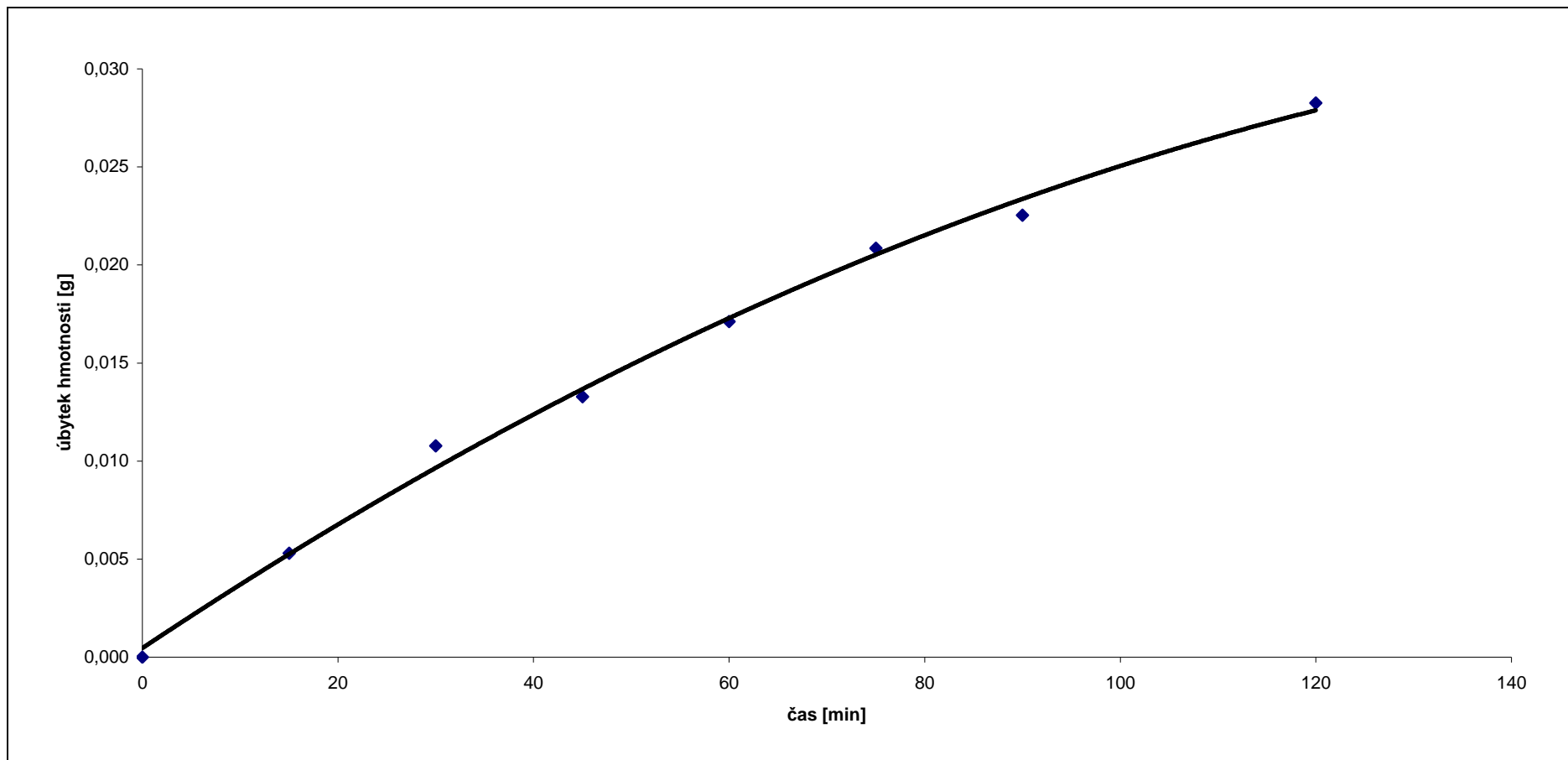
- orosení testovací pomůcky – viz kapitola 8.1.1
- vliv povrchu hladiny – i když mým cílem bylo vytvořit při zmrazování stejnou hladinu vzorku, nelze toho samozřejmě stoprocentně dosáhnout. Při průběhu sublimace bylo v kryokomoře vidět, jak led postupně praská a to pochopitelně vždy trochu jinak (zpravidla se objevily tři praskliny jdoucí od středu směrem k okrajům). Různé odlišnosti tohoto jevu podle mého názoru mohly způsobit chybu v řádu jednotek procent.

Průměrné hodnoty úbytku hmotnosti jsou v Grafu 8.1 vyznačeny znakem \diamond (to platí i pro ostatní grafy) a proloženy křivkou. Tato křivka byla vytvořena jako spojnice trendu typu polynom 2.řádu. Naměřené hodnoty by měly mít teoreticky lineární průběh, ale na grafu vidíme, že rychlost sublimace velmi lehce klesá s časem, proto jsem na proložení zvolil raději polynom, nikoliv lineární průběh (přímku).

Tabulka 8.1: tabulka hodnot pro měření sublimace vody:

Čas sublimace t [min]		0	15	30	45	60	75	90	120
Úbytek hmotnosti δm [g]	n								
	1		0,00681	0,00496	0,01312	0,01618	0,02106	0,02424	0,02196
	2		0,00782	0,01164	0,01642	0,01577	0,01880	0,01945	0,02938
	3		0,00266	0,01382	0,01187	0,01671	0,02271	0,02391	0,03514
	4		0,00716	0,01472	0,01340	0,01980			0,02655
	5		0,00203	0,00872	0,01350				
	6				0,01140				
Relativní chyba Δm [%]			20,6	14,8	4,9	4,6	4,4	5,6	9,8
Absolutní chyba ϑm [g]			0,00109	0,00160	0,00066	0,00079	0,00093	0,00126	0,00276
Průměrná hodnota $\overline{\delta m}$ [g]		0	0,00530	0,01077	0,01329	0,01711	0,02085	0,02253	0,02826

Graf 8.1: závislost změny hmotnosti vody na čase při teplotě -80°C:



8.3 Měření sublimace kryoprotektantů

Měření sublimace kryoprotektantů probíhalo podle stejného postupu, jako měření sublimace vodního ledu. Jako vzorek kapaliny byl použit 20% roztok kryoprotektantu v destilované vodě. Tento 20% roztok se totiž běžně používá k ochraně biologických preparátů před možným poškozením narůstajícími krystaly při zamrazování, kdy není zaručena dostatečně velká rychlost mrazení.

Pro experimenty jsem, si vybral dva typické zástupce obou skupin kryoprotektantů. Z nepenetrujících je to Dextran a z penetrujících glycerol. Jejich vlastnosti byly popsány v kapitole 4.2.1 (glycerol) a 4.2.2 (Dextran).

8.3.1 Sublimace Dextranu

Jak můžeme vidět v Tabulce 8.2, naměřených hodnot je zde výrazně méně než u měření sublimace vody. Nejsou uvedeny hodnoty relativní ani absolutní chyby měření, protože si myslím, že nemá smysl počítat chybu průměru z dvou hodnot.

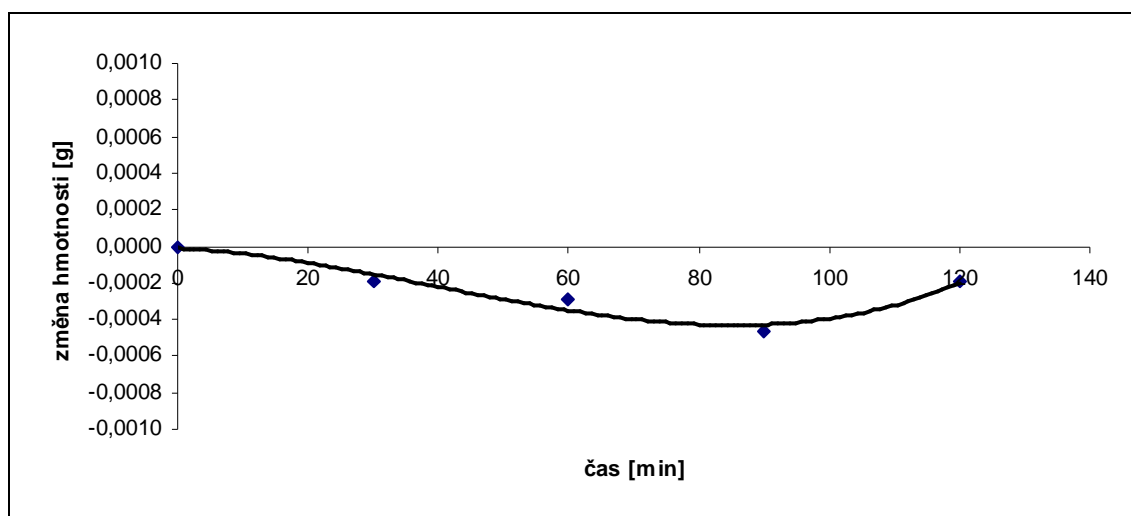
To nejpodstatnější ale je, že se podařilo prokázat, že 20% roztok Dextranu po zamrazení a umístění ve vakuu nesublimuje. Naměřené hodnoty, které vidíme v Grafu 8.2, se totiž pohybují lehce po nulou – úbytek kapaliny se nám zde stává přírůstkem. To nám neukazuje nic jiného, než samotnou chybu metody, kdy dochází k určitému orosení testovací pomůcky a tím určitému nárůstu hmotnosti.

V Grafu 8.2 jsou vyneseny průměrné hodnoty stejně jako u měření vody a také jsou propojeny křivkou, tentokrát polynomem 3. řádu. Což zde není příliš podstatné, protože nám tato křivka ukazuje pouze fluktuaci naměřených hodnot.

Tabulka 8.2: tabulka hodnot pro měření sublimace 20% roztoku Dextranu:

Čas sublimace t [min]		0	30	60	90	120
Úbytek hmotnosti δm [g]	n					
	1		0,00021	0,00014	0,00008	-0,00102
	2		-0,00059		-0,00101	0,00063
Relativní chyba Δm [%]						
Absolutní chyba ϑm [g]						
Průměrná hodnota $\overline{\delta m}$ [g]		0	-0,00019	-0,00030	-0,00047	-0,00020

Graf 8.2: závislost změny hmotnosti roztoku Dextranu na čase při teplotě -80°C:



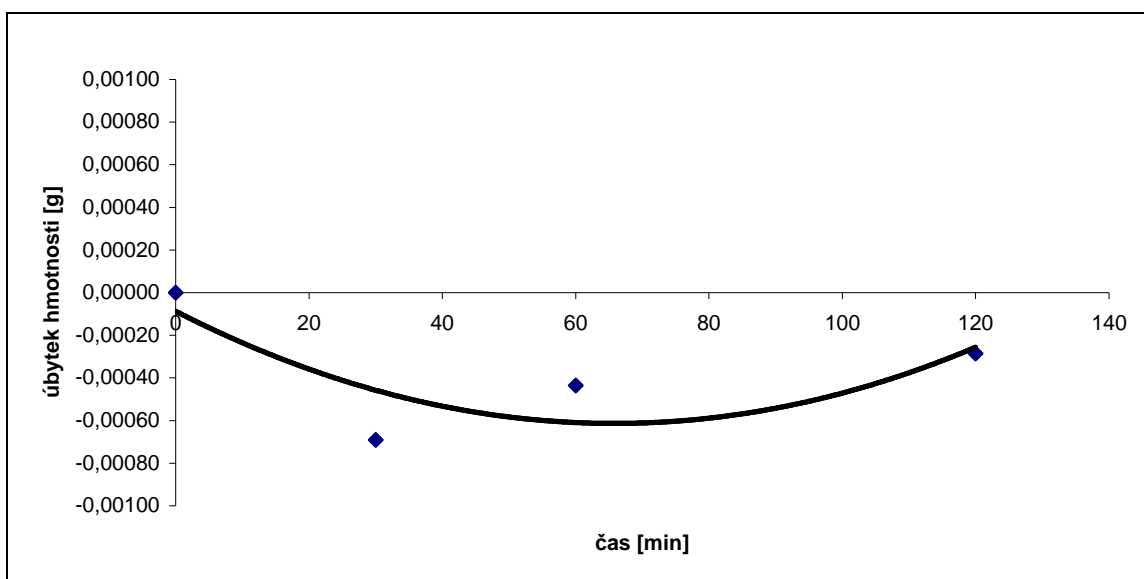
8.3.2 Sublimace glycerolu

Měření sublimace 20% roztoku glycerolu bylo velmi podobné, jako u roztoku Dextranu. I zde jsem naměřil pouze několik hodnot. A to ze stejného důvodu – prokázalo se, že roztok glycerolu ani po dvou hodinách sublimace prakticky nezměnil svou hmotnost. Naměřené hodnoty lze totiž v kontextu s ostatními měřeními prohlásit pouze za fluktuaci chyby měření. Nicméně i zde uvádím v Grafu 8.3 grafickou závislost změny hmotnosti na čase, proloženou polynomem 3. řádu.

Tabulka 8.3: tabulka hodnot pro měření sublimace 20% roztoku glycerolu:

Čas sublimace t [min]		0	30	60	90	120
Úbytek hmotnosti δm [g]	n					
	1		0,00021	-0,00098		-0,00078
	2		-0,00159	0,00011		0,00021
Relativní chyba Δm [%]						
Absolutní chyba ϑm [g]						
Průměrná hodnota $\overline{\delta m}$ [g]		0	-0,00069	-0,00044		-0,00029

Graf 8.3: závislost změny hmotnosti roztoku glycerolu na čase při teplotě -80°C:



8.4 Měření sublimace pufru

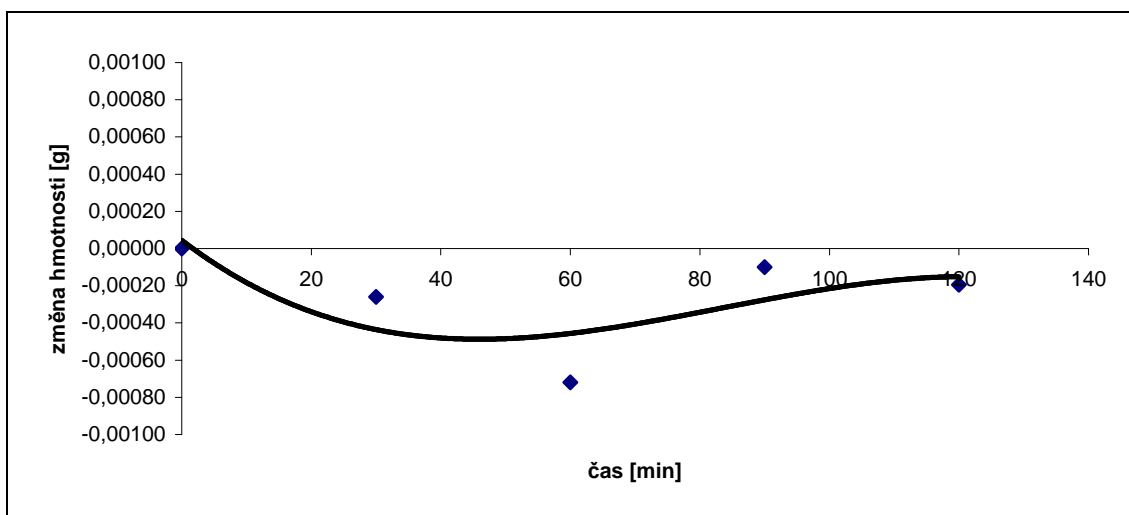
Jako poslední látku ke zkoumání sublimace ve vakuu jsem si vybral 0,2 molární roztok pufru PCB. Jak jsem popsal v kapitole 4.3.1, jde o látku využívanou jako vypírací či uchovávací roztok. Takže se často stává, že preparát, který chceme zkoumat pod mikroskopem (a před tím sublimovat v kryokomoře), byl v tomto roztoku naložen. Proto jsem se rozhodl otestovat ho stejně jako předešlé látky.

Jak vidíme na Grafu 8.4, tato látka ve vakuu při -80°C nesublimuje a naměřené hodnoty se pohybují v rámci chyby měření, podobně jako u kryoprotektantů. Což se dalo, vzhledem k tomu, že je to slabý solný roztok, teoreticky předpokládat. Nicméně jde o látku zatím v těchto podmínkách nezkoumanou a proto si myslím, že stála za experiment. I v tomto grafu, stejně jako u kryoprotektantů, jsem proložil body polynomem 3. řádu.

Tabulka 8.4: tabulka hodnot při měření sublimace 0,2M roztoku PBS:

Čas sublimace t [min]		0	30	60	90	120
Úbytek hmotnosti δm [g]	n					
	1		-0,00026	-0,00131	0,00011	-0,00123
	2			-0,00013	-0,00027	0,00084
	3				-0,00014	
Relativní chyba Δm [%]						
Absolutní chyba ϑm [g]						
Průměrná hodnota $\overline{\delta m}$ [g]		0	-0,00026	-0,00072	-0,00010	-0,00020

Graf 8.4: závislost změny hmotnosti 0,2M roztoku PBS na čase při teplotě -80°C :



8.4 Kontrolní test prázdného terčíku

Pro zajímavost, ale hlavně pro ověření teorie uvedené v kapitole 8.1.1, jsem se rozhodl měřit i prázdnou testovací pomůcku bez nalité kapaliny. Pokus probíhal podle stejného postupu, jako u měření všech ostatních sublimací, ale s tím rozdílem, že jsem ponechal prázdnou testovací pomůcku v kryokomoře pouhou minutu. A to z důvodu vyrovnání teplot mezi stolkem v kryokomoře a testovací pomůckou a také kvůli odsublimování zbytků dusíku na pomůcce. Sublimaci zbytků dusíku jsem pozorovat v kryokomoře pomocí binoklu – ta proběhla téměř okamžitě po vložení do komory.

Vypočtená průměrná hodnota u tohoto pokusu je velmi podobná hodnotám, která jsem zjistil při měření sublimace kryoprotektantů a pufry. Proto se domnívám, že

jsem dostatečně věrohodně potvrdil teorii, že údaje naměřené v kapitolách 8.3.1, 8.3.2 a 8.4 opravdu odpovídají chybě měření.

Tabulka 8.5: tabulka hodnot při kontrolním testu prázdného terčíku:

Čas sublimace t [min]		1
Úbytek hmotnosti δm [g]	n	
	1	0,00015
	2	0,00060
	3	0,00028
Relativní chyba Δm [%]		
Absolutní chyba ϑm [g]		
Průměrná hodnota $\overline{\delta m}$ [g]		0,00034

Závěr

Hlavní těžiště této práce spočívalo ve změření závislosti sublimace ledu na čase ve vakuované kryokomoře při určité teplotě. Ještě než jsem začal měřit samotné křivky sublimace pro různé látky, musel jsem vyřešit, jak ono malé množství vysublimované látky kvantifikovat.

Najít postup měření, který uvádím v kapitole 7, byla pravděpodobně nejnáročnější část mé práce. A i když výsledný postup vypadá jednoduše, jeho sestavení mi zabralo několik týdnů různých zkoušek a mnoho marných pokusů. Bylo třeba vyřešit mnoho jak zásadních věcí, což bylo například rozhodnutí, že úbytek měřené látky budu měřit úbytkem váhy, tak i věci drobné, ale pro výsledek experimentu potřebné. Což byly technické záležitosti jako správné vytahování testovací pomůcky z tekutého dusíku bez nežádoucí kontaminace, přendávání testovací pomůcky na váhy z VTD do váženky a následné zvážení a mnoho dalších.

Nejdůležitější látkou pro mé experimenty byla pochopitelně voda (destilovaná). U tohoto vzorku se mi podařilo změřit závislost sublimace ledu při -80°C a výslednou křivku uvádím v kapitole 8.2. Pokud se podíváme na výsledný Graf 8.1, tak výsledná křivka, proložená mezi naměřenými body, není přímka. I přes určitou chybu měření si myslím, že průběh není zcela lineární, ale při delších časech opravdu dochází k určitému zpomalení sublimace. To lze odůvodnit tak, že zpočátku sublimace se odpaří malá vrstva ledu, která má jinou strukturu než zbývající led uvnitř. Při pozorování během dlouhých časů (cca 60 – 120min) lze totiž pozorovat, jak se původně hladký povrch preparátu mění na viditelně strukturovaný a jsou vidět odhalující se krystaly. Což souhlasí i s teorií mrazení, neboť horní vrstvička vody je při ponoření do tekutého dusíku zmrazená ihned a může tak vzniknout jiný druh ledu, ale vnitřek preparátu zmrazne se zpožděním. Které pochopitelně narůstá směrem ke středu preparátu.

Bylo by asi zajímavé pozorovat a porovnávat rychlosti sublimace při různých teplotách. Bohužel moje technika měření a použité pomůcky a přístroje mi nedovolily naměřit množství vysublimovaného ledu při teplotách nižších než -80°C . Jak je totiž vidět v Grafu 4.1, už při teplotě -90°C probíhá sublimace ledu desetkrát pomaleji, než při teplotě -80°C . A teploty nad -80°C jsem neměřil z praktických důvodů – tyto teploty se při skutečné práci s biologickými preparáty nepoužívají z důvodu možného poškození preparátu.

Dalším pokusem bylo testování roztoků kryoprotektantů, respektive typických zástupců obou jejich hlavních skupin. Ze skupiny penetrujících kryoprotektatů jsem zvolil glycerol a z nepenetrujících Dextran. Zde se prokázal teoretický předpoklad, že kryoprotektanty po zmrazení a následném umístění do vakua nesublímují. Naměřené hodnoty uvádím v kapitole 8.3. Tento pokus měl však zajímavý výstup, a to změření vlastní chyby metody. Když totiž vzorek nesublímoval, bylo možné změřit orosení testovací pomůcky po vyjmutí z kryokomory a kvantifikovat ho. To jsem potvrdil i při kontrolním měření prázdné testovací pomůcky, které popisuji v kapitole 8.5. Samotnou chybu metody rozepisuji v kapitole 8.1.1.

Velmi zajímavým experimentem bylo testování pufru, konkrétně 0,2 molárního roztoku fosfátového pufru (PBS). Jde o látku v biologii velmi užívanou a pravděpodobnost, že do mikroskopu přijde preparát, který byl v tomto (nebo i jiném pufru) proprán či naložen, je velmi vysoká. Přitom se ale jedná o látku, u níž se její sublimační vlastnosti nikde neuvádějí. Proto jsem se rozhodl ji vyzkoušet za stejných podmínek jako předchozí kapaliny. Naměřené hodnoty najdeme v kapitole 8.4 a výsledný Graf 8.4 nám ukazuje, že roztok pufru PBS při -80°C nesublímuje a chová se stejně jako výše uvedené kryoprotektanty.

Použitá literatura

Typografie citací v textu:

[str. 3; 1] – citace je ze stránky 3 z knihy uvedené v seznamu literatury pod číslem [1]

[1]

ROBARDS, A.W., SLEYTR, U.B.: Low temperature methods in biological electron microscopy; Elsevier; ISBN: 0-444-80684-9; 1985

[2]

KULESHOVA, L.L., GOUK, S.S., HUTMACHER, D.W.: Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue – engeneered construct; Biomaterials 28; str. 1585-1596; ISSN: 0142-9612; 2007

[3]

CHAPLIN, M.: Water Structure and Science; <http://www.lsbu.ac.uk/water/phase.html>; London South Bank Univesity, Food Research Centre, Water and Aqueous Systems Research; 2007

[4]

Pharmacosmos A/S: Pharmacosmos Dextran Manufactured; <http://www.dextran.net>; 2007

[5]

Glycerol: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol>; 2007

[6]

Buffer solution: http://en.wikipedia.org/wiki/Buffer_solution; 2007

[7]

GATAN: Alto 2500, Operation Handbook; Alto2500.pdf; 2003

[8]

JEOL: JSM-7401F, Field Emission Scanning Electron Microscope, Operation Guide; SM7401F[E].pdf; 2005

[9]

Amorphous ice: http://en.wikipedia.org/wiki/Amorphous_ice; 2007