

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Metoda negativního kontrastu pro diagnostiku virů a bakterií
v transmisním elektronovém mikroskopu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce:
RNDr. Marie Vancová, Ph.D.

Autor práce:
Tereza Šoberová

2009

The use of Negative Staining Method for Viral and Bacterial Diagnostic Using the Transmission Electron Microscope

Abstract

This bachelor thesis is focused on the negative staining method used in making diagnosis of viruses and bacteria in the transmission electron microscope (TEM).

Theoretical part provides general description of TEM, negative staining method and basic characteristics of viruses used in this project.

Detailed description of procedure designed for the preparation of specimens is the key part of this project. After their display in TEM, the thesis analyses the quality of virus images and comparison of effects of the most common staining agents, pH, trehalose and different times of staining on displaying the ultrastructure of biological specimens and on the size of individual viral particles. The conclusion of project contains staining agents providing the best imaging of objects that have been selected based on the evaluated results and recommendations for potential enhancement of staining properties in other agents.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci na téma „Metoda negativního kontrastu pro diagnostiku virů a bakterií v transmisním elektronovém mikroskopu“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Marii Vancové, Ph.D. za ochotu vést mou bakalářskou práci, trpělivost a cenné rady při jejím zpracování. Také za pomoc s obsluhou transmisního elektronového mikroskopu, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Poděkování patří i kolektivu laboratoře elektronové mikroskopie za praktické rady při přípravě preparátů.

OBSAH:

ÚVOD	7
1. SOUČASNÝ STAV.....	8
1.1. Historie elektronové mikroskopie	8
1.2. Transmisní elektronový mikroskop.....	9
1.2.1. Zdroj elektronů.....	10
1.2.2. Osvětlovací soustava.....	10
1.2.3. Zobrazovací soustava.....	10
1.2.4. Tvorba obrazu	11
1.2.5. Pozorování a záznam obrazu	11
1.2.6. Vakuový systém.....	12
1.3. Elektronová mikroskopie ve virologické diagnostice	12
1.3.1. Využití a výhody elektronové mikroskopie	13
1.3.2. Nevýhody elektronové mikroskopie	13
1.3.3. Budoucnost elektronové mikroskopie.....	14
1.4. Metoda negativního kontrastu	14
1.4.1. Podložní fólie	15
1.4.1.1. Formvarové a butvarové blány	16
1.4.1.2. Uhlíkové blány.....	17
1.4.2. Kontrastní činidla.....	18
1.4.2.1. Negativní kontrast s UA	18
1.4.2.2. Negativní kontrast s PTA.....	19
1.4.2.3. Negativní kontrast s AM.....	19
1.5. Viry.....	20
1.5.1. Klíšťová encefalitida.....	21
1.5.2. Tabáková mozaika	22
2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	23

2.1.	Cíl práce	23
2.2.	Hypotézy	23
3.	METODIKA	24
3.1.	Čištění sítěk	24
3.2.	Potažení sítěk formvarovou blánou	25
3.3.	Pouhlikování sítěk s formvarovou blánou	26
3.4.	Příprava kontrastních činidel pro metodu negativního kontrastu	26
3.4.1.	Příprava roztoku 2 % vodného roztoku uranyl acetátu (UA)	26
3.4.2.	Příprava 2 % vodného roztoku kyseliny fosfowolframové (PTA)	27
3.4.3.	Příprava kontrastních roztoků molybdenátu amonného (AM)	27
3.5.	Příprava preparátu	28
3.6.	TEM	29
3.7.	Měření virů	29
4.	VÝSLEDKY	30
5.	DISKUZE	47
6.	ZÁVĚR	49
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50
8.	KLÍČOVÁ SLOVA	56
9.	PŘÍLOHY	57

ÚVOD

Člověk byl odjakživa fascinován mikrosvětlem a proto se snažil vynalézt nástroje a přístroje, které by ho mohly k tomuto světu co nejvíce přiblížit. Jako první byl vynalezen světelný mikroskop, který dokázal zobrazit struktury o velikosti desítek μm . Člověk však šel ještě dál a díky jeho touze přiblížit se atomům, dal vznik transmisnímu elektronovému mikroskopu (TEM).

A právě i z těchto důvodů jsem si já zvolila toto téma. Od malička mě zajímaly věci a struktury, které nejsou vidět pouhým okem, a když jsem poprvé uslyšela o elektronovém mikroskopu, chtěla jsem si ho alespoň jednou vyzkoušet. Proto první nápad k tématu bakalářské práce se týkal elektronové mikroskopie.

Abychom mohli objekty v mikroskopu pozorovat, musíme využít různých zobrazovacích technik, které nám toto umožní. Jednou z nich je i metoda negativního kontrastu, kterou se ve své práci zabývám. Tato metoda je pro svou jednoduchost velice rozšířena a je považována za jednu ze základních metod elektronové mikroskopie.

Ale i přes jednoduchost provedení a četnost použití této metody není ještě v dnešní době přesně znám vliv jednotlivých podmínek na výsledný vzhled objektů.

Proto je cílem této bakalářské práce příprava virových preparátů s použitím různých druhů kontrastních činidel při různém čase kontrastování. Dále příprava vzorku při různém pH a koncentraci vybraného kontrastního činidla a následné sledování vlivu jednotlivých metod na výsledný vzhled objektů v TEM.

Vyhodnocení výsledků by mohlo pomoci v klinické praxi u diagnostiky virů a bakterií, při rozhodování o vhodném kontrastním činidle a mohlo by přispět k přesnějšímu zobrazení a rychlejšímu vyhodnocení pozorovaných objektů. Závěry této práce by mohly být využity i u identifikace nových virů a k jasnějšímu zobrazení jejich morfologických struktur a lepšímu určení zkoumaných virových partikulí.

1. SOUČASNÝ STAV

1.1. *Historie elektronové mikroskopie*

První myšlenku pro konstrukci moderního optického mikroskopu vyslovil E. Abbe, který koncem 19. století pomocí vlastních experimentů zjistil, že schopnost zobrazení detailu objektu je omezená vlnovou délkou světla použitého u optického mikroskopu jen na několik μm . Z Abbého závěru tedy vyplývalo, že pokud má přístroj dosáhnout větších zvětšení, je nutné použít záření s mnohem kratší vlnovou délkou, než má viditelné světlo. Na tuto myšlenku navázal A. Köhler, který roku 1893 vyvinul mikroskop využívající pro zobrazení objektu UV světlo. Tato vlnová délka si s sebou ale stále nesla určité omezení (15, 21, 25).

Další krok, který znamenal přiblížení se k objevu elektronového mikroskopu, učinil roku 1858 J. Plücker, který objevil paprsky vylétající z katody. O deset let později bylo zjištěno, že mají negativní náboj a lze je odchýlit magnetickým i elektrickým polem (21, 35).

Jeden ze základních kamenů pro sestavení elektronového mikroskopu však položil až roku 1897 J.J. Thomson, který se postaral o objev elektronu. Další významný krok vedoucí k praktickému využití elektronu učinil L. de Broglie roku 1927. Publikoval, že rychle letící částice mají nejen korpuskulární, ale i vlnový charakter, jako například viditelné světlo. V téže roce objevil H. Bush, že rotační magnetické pole působí na svazek elektronů jako magnetická čočka, přičemž ohnisková vzdálenost této čočky se mění podle intenzity magnetického pole. Na tyto teorie navázal tým vedený M. Knollem a E. Ruskou. Protože právě elektrony mají vlnovou délku o mnoho řádů menší než viditelné světlo, umožňuje tato vlastnost zobrazení v řádech několika nm. Roku 1931 byl tímto týmem zkonstruován první elektronový mikroskop, za který byla roku 1986 udělena E. Ruskovi Nobelova cena. Až roku 1939 vyrobila firma Siemens a Halske první komerční elektronový mikroskop (17, 18, 25, 35).

1.2. Transmisní elektronový mikroskop

Transmisní elektronový mikroskop (TEM) je složité technické zařízení, díky kterému jsme schopni zobrazit ultrastrukturu uvnitř materiálu v měřítku od několika jednotek až desetin nm (18, 25).

Předpokladem velkého rozlišení elektronového mikroskopu je použití svazku elektronů. Elektrony jsou urychleny vysokým napětím, které se obvykle pohybuje okolo 60 – 100 kV. S rostoucím urychlovacím napětím se zkracuje vlnová délka elektronů a dochází tak k snižování mezního rozlišení mikroskopu. Teoretická hranice rozlišení elektronového mikroskopu se uvádí 0,12 až 0,17 nm. V praxi pro studium biologických materiálů se však většinou dosahuje rozlišení kolem 2 nm (7, 17, 18, 19, 25).

TEM se skládá ze svislého tubusu, kde se nachází elektronová tryska, akcelerator elektronů, magnetické čočky osvětlovací a zobrazovací soustavy, fotografická a pozorovací komora. Dále z vakuového systému, který čerpá prostor tubusu na hodnotu vakua 10^{-3} až 10^{-5} Pa. Nejvyššího vakua je třeba okolo elektronové trysky a v prostoru vzorku, který se vkládá doprostřed tubusu. Vakuový systém je umístěn v základní skříni spolu s řídicí elektronikou. Napájecí skříň a vysokonapěťový zdroj jsou umístěny odděleně (19, 25).

Principem TEM je vytváření urychleného a usměrněného proudu elektronů, který uniká z jejich zdroje (katody). Proud elektronů je veden vakuem a prochází preparátem, který musí být tenký maximálně 0,1 μm . Při průchodu elektronů dochází k interakcím elektronů s atomy a molekulami tvořícími hmotu vzorku. Tyto elektrony jsou usměrněny pomocí magnetických čoček a vytvářejí „stínový obraz“ mikroskopovaného vzorku, který se zobrazí nejčastěji na fluorescenčním stínítku, monitoru počítače, nebo pomocí fotografické desky (7, 17, 23, 25).

1.2.1. Zdroj elektronů

Zdrojem elektronů v TEM je nejčastěji katoda vyrobená z wolframového drátku, který má tvar písmene V. Díky tomuto tvaru dochází v místě ohybu k porušení ultrastruktury drátku a to má za následek snadnější uvolňování elektronů (7, 19, 25).

Vlákno katody je soustředováno do otvoru Wehneltova válce. Díky jeho zápornému napětí je okolo hrotu katody vytvořen mrak elektronů. Pouze ty elektrony, které mají správný směr, pronikají dále k anodě, která elektrony přitahuje a dává jim dostatečné zrychlení potřebné na průlet tubusem mikroskopu (25).

1.2.2. Osvětlovací soustava

Urychlené elektrony, produkované elektronovou tryskou vstupují do magnetického pole kondenzorových čoček, které mají za úkol přenést elektronový paprsek na preparát. Většinou se používají kondenzorové čočky dvě. První vytváří obraz křížové a změnou její ohniskové vzdálenosti je možné měnit velikost obrazu. Druhá čočka tento obraz zaostřuje do roviny preparátu (25).

1.2.3. Zobrazovací soustava

Klíčovou součástí TEM je také objektivová čočka, která spolu s držákem preparátu, mezičočkami, projektivou a pozorovacím stínítkem tvoří zobrazovací soustavu mikroskopu.

Objektivová čočka je schopna největšího zvětšení a má také nejkratší ohniskovou vzdálenost. Na její kvalitě závisí rozlišovací schopnost a tedy i rozsah možností použití mikroskopu (19, 25).

1.2.4. *Tvorba obrazu*

Vzorek je v TEM ozařován elektrony, které se mohou od jeho povrchu odrazit nebo vzorkem proniknou. Při průniku elektronů vzorkem dochází k interakcím mezi elektrony a atomy vzorku. Díky těmto vzájemným působením dochází k pružnému a nepružnému rozptylu.

Při pružném rozptylu dochází jen k zanedbatelné výměně kinetické energie mezi elektrony a jádry atomů vzorku a elektron je vychýlen ze své dráhy pod určitým úhlem. Část elektronů s dostatečně velkým vychýlením je zachycena objektivovou clonou a na stínítku se nezobrazí. V důsledku toho se mění intenzita elektronového svazku a vzniká amplitudový kontrast obrazu (7, 19, 25).

Při nepružném rozptylu primární elektrony interagují s elektronovým obalem atomů vzorku a ztrácejí přitom určité množství energie. Při této srážce však nedojde k vychýlení elektronu z původní dráhy. Změna energie a rychlosti má vliv na změnu jejich vlnové délky, a proto po průchodu do zobrazovacího systému mají vliv na ostrost obrazu (18, 24).

1.2.5. *Pozorování a záznam obrazu*

Pro záznam obrazu je používáno CCD kamer, nebo fotografického záznamu. Přesto, že je snímání obrazu fotografickou cestou postupně vytlačováno CCD kamerami, je i nadále používáno, protože dosahuje vyšší rozlišovací schopnosti. V TEM je fotografická komora umístěna pod stínítkem, ve které je uložena zásoba fotografických filmů, uložených do speciálních zásobníků a pouzder. Pro záznam obrazu musí být použity speciální fotografické materiály, které mají citlivost upravenou pro vlnové délky urychlených elektronů (22, 25). CCD kamera se umísťuje v elektronovém mikroskopu místo zásobníků na filmy (25).

1.2.6. *Vakuový systém*

Vnitřní prostor TEM, ve kterém se pohybují elektrony, musí být evakuovaný, aby nedocházelo k náhodným srážkám urychlených primárních elektronů s molekulami vzduchu. Tyto srážky by měly za následek změnu energie elektronů, ale i vychýlení elektronu ze směru pohybu. Součástí mikroskopu proto musí být dostatečně výkonné vývěvy, díky nimž je dosaženo vakua o velikosti 10^{-3} - 10^{-5} Pa. K přečerpávání vzduchu je nejprve použita rotační vývěva, po níž následuje konečné přečerpání vývěvou difúzní, která dosáhne požadovaných hodnot vakua. Jeho kvalitu sleduje několik měrek a celý proces čerpání vzduchu je řízen automaticky (18, 19, 25).

1.3. *Elektronová mikroskopie ve virologické diagnostice*

Můžeme lépe porozumět přírodě, objektům, které ji tvoří, jestliže je sami můžeme spatřit. Dokud nespáříme virus způsobující určité onemocnění, nemůžeme si být nikdy jisti, zda je právě on původcem nákazy. Teprve obraz poskytuje potvrzení a jistotu (3).

Rozvoj elektronové mikroskopie přinesl řasu důležitých poznatků. Získali jsme informace o velikosti a morfologii virových partikulí. To vedlo k rychlé identifikaci infekčních agens a díky tomu k vytvoření klasifikace virů, která byla založena na kombinaci morfologických a genomových struktur. Elektronová mikroskopie se podílela na objevení např. viru hepatitidy B, C, pravých neštovic, některých herpes virů a viru způsobujícího SARS (1, 6, 13).

Později, díky uvedení techniky negativního barvení, začalo být využíváno elektronové mikroskopie i v rutinní diagnostice, například pro určování původců průjemových onemocnění (1).

1.3.1. Využití a výhody elektronové mikroskopie

Ačkoli elektronová mikroskopie není v diagnostice virových infekcí vždy metodou volby, je osvědčená jako rychlá a jednoduchá metoda pro vyšetření klinických vzorků a přímé zobrazení virových částíček (1, 13). Elektronová mikroskopie nám dává možnost odhalit inaktivované viry a viry pokryté protilátkami, jež mohou unikat sérologické diagnostice, nebo viry, jejichž dourčení běžnými metodami selhává. Zachycuje i viry, které jsou obtížně kultivovatelné, nebo nekultivovatelné. Jasný důkaz virové aktivity lze sice dokázat pomocí kombinace několika vyšetřovacích metod, případně spoluprací několika laboratoří, elektronová mikroskopie je však schopna tato vyšetření nahradit a centralizovat. Elektronová mikroskopie má také schopnost rozlišit viry s podobnou, nebo identickou morfologií, které mají rozdílné vlastnosti, a tak přesně určit hledaný virus (3, 31). Metoda elektronové mikroskopie přináší výsledky i několik dní před tím, než je možné použít k diagnostice jiných metod. Vhodné je využití elektronové mikroskopie v akutních epidemiologických, nebo klinických situacích, kdy velmi rychlá a přesná diagnostika ušetří čas při identifikaci nejen virových infekcí, ale i bakterií, mykoplazmat a hub. Elektronová mikroskopie je vhodná i pro diferenciální diagnostiku některých nádorů (1, 13, 27, 31).

Pro vyšetření mohou být použity vzorky přímo z místa poškození, biopsie po pomnožení agens, nebo i vzorky z okolního prostředí či z nejrůznějšího klinického materiálu (13, 27).

1.3.2. Nevýhody elektronové mikroskopie

Nevýhody elektronové mikroskopie nejsou zanedbatelné. Patří mezi ně zejména složitá obsluha elektronového mikroskopu, která vyžaduje speciálně vyškolený personál, vysoká pořizovací cena a drahý provoz přístroje. Nemalý problém představuje i složitá údržba a potřeba velkého prostoru pro umístění mikroskopu. Elektronový mikroskop také

není vhodný pro všechny typy virů a nehodí se pro screening většího množství vzorků. Z těchto důvodů není možné zařadit elektronovou mikroskopii do rutinního provozu běžné laboratoře (1, 2, 3).

1.3.3. Budoucnost elektronové mikroskopie

V dnešní době jsou stále objevovány nové druhy virů a předpokládá se, že další budou ještě objeveny. A právě pro rozpoznávání těchto virů není zatím známa jiná výhodnější, rychlá a přesná diagnostická metoda. Diagnostiku pomocí elektronového mikroskopu je stále možné zdokonalovat např. kombinací s jinými metodami (PCR, imunoznačení) a urychlovat, např. pomocí nových rychlejších metod přípravy vzorku. Proto bude mít elektronová mikroskopie stále důležitou úlohu v charakteristice mikroorganismů (3, 5, 6, 32).

1.4. Metoda negativního kontrastu

Biologické struktury jsou díky své nízké strukturní hustotě jen slabě ovlivňovány elektrony. Z tohoto důvodu se v elektronovém mikroskopu jeví jako málo kontrastní, bez strukturních detailů. Jednou z možností, jak docílit dostatečně velkého kontrastu a umožnit tak jejich vizualizaci, je negativní nebo pozitivní kontrast vytvořený pomocí iontů těžkých kovů (8, 13, 25).

Negativní kontrast je jednoduchá a rychlá metoda přípravy preparátů pro TEM. Je vhodná pro pozorování malých částecek v suspenzi, jejichž velikost je menší než tloušťka ultratenkých řezů. Mohou to být různé biologické makromolekuly, např. proteiny, lipoproteiny, polysacharidy nebo nukleoproteinové komplexy. Dále také izolované buněčné organely, např. mitochondrie a membránové systémy. Tuto metodu lze využít i pro větší a silnější objekty jako jsou bakterie (13, 25).

Principem metody negativního kontrastu je zalití virových partikulí do amorfního elektrodensního barviva, které obsahuje těžký kov. Negativní barvivo obklopí částice ve vzorku a vytváří temné pozadí, v němž se jednotlivé partikule, díky nižší schopnosti rozptylovat elektrony, jeví jako světlé v tmavém poli (6, 8, 25, 31).

V nejjednodušším provedení se kapka, např. virové suspenze, smíchá s barvivem a směs se nanese přímo na sítku s podpůrnou blánou. Nadbytek tekutiny je odstraněn pomocí filtračního papíru (4, 25).

Podobnou metodou přípravy vzorku je položení sítky přímo na kapku virové suspenze a poté na kapku kontrastního činidla. Při přenášení sítky z jedné kapky na druhou je nutné osušit preparát pomocí filtračního papíru (14).

Dalším způsobem je využití tzv. sprejovací techniky. Tato metoda nám zajistí rovnoměrné pokrytí sítky virovými částicemi. Provedení této metody je však složitější (20).

Pro dobré výsledky vyšetření je nutná čistota a vysoká koncentrace vzorku. U bakterií je požadováno, aby byla suspenze zakalená. U virové suspenze se udává jako optimální koncentrace $10^9 - 10^{12}$ částic v 1 ml. Proteinové roztoky by měly obsahovat 0,1 – 0,2 mg/ml, lipidové roztoky 0,1 – 0,5 mg/ml a buněčné suspenze 0,5 – 1,0 mg/ml. Materiál by měl být stabilizovaný 5 – 10 mM solným roztokem, nebo pufrem. Neměl by obsahovat sacharózu, která interferuje s kontrastními činidly (2, 8, 25).

1.4.1. Podložní fólie

Podložní fólie se v elektronové mikroskopii využívají jako podpůrné substráty pro zakrytí otvorů v sítkách. Jsou využívány jako podklad pro malé vzorky a suspenze virů. Při jejich nepřítomnosti by částičky pouze propadly otvory a jejich pozorování by bylo nemožné. Blány by měly být velice tenké. Jestliže je tloušťka blány příliš velká, zabraňuje průniku elektronového paprsku a z důvodu velkého rozptylu elektronů dochází ke snížení kontrastu vzorku. Proto by podložní fólie měly poskytovat dostatečnou pevnost i při

velice malé tloušťce. Nejčastěji využívanými jsou formvarové, butvarové nebo čisté uhlíkové fólie. Uhlík je často používán i jako pomocný stabilizátor blan vyrobených z prvních dvou materiálů. Povrch formvarové blány se poměrně rychle stává hydrofóbním, což zabraňuje rovnoměrnému nanesení vzorku a snižuje jeho kontrast. Z tohoto důvodu jsou tyto blány napařovány tenkou vrstvou uhlíku, která na jejich povrchu vytváří hydrofilní vrstvu (8, 25).

K napařování uhlíku dochází v napařovací aparatuře. Do ní se umístí uhlíkové nebo grafitové tyče, z nichž jedna má zúžený konec. Konce obou elektrod se o sebe opřou a při průchodu elektrického proudu v místě zúžení dojde k zvýšení odporu a v důsledku toho k zvýšení teploty na hodnotu, při které se z daného místa začne vypařovat uhlík. Celá procedura se provádí po vyčerpání prostoru napařovačky difúzní vývěvou, tedy ve vakuu, aby nedocházelo k hoření (25, 29).

Další možností, jak na povrchu blan vytvořit hydrofilní vrstvu, je doutnavý výboj. Jeho principem je ionizace atomů a molekul, ke které dochází mezi dvěma kovovými elektrodami ve vakuu. Ionty indukují náboj na povrchu blan a vytváří tak hydrofóbní nebo hydrofilní vrstvu. Hydrofilitu nebo hydrofobitu povrchu ovlivňuje složení prostředí, ve kterém k doutnavému výboji dochází. Po provedení doutnavého výboje by se měly sítěky použít co nejdříve, aby nedošlo k nežádoucím kontaminacím z okolního prostředí (12).

1.4.1.1. Formvarové a butvarové blány

Polyvinyl formaldehyd (formvar) je nejvíce využívaný pro tvorbu tenkých podpůrných blan. Jejich tloušťka se pohybuje okolo 20 – 40 nm a je přímo úměrná koncentraci tohoto roztoku. Ovlivňuje ji ale i rychlost vytažení skleněné tyče z roztoku a doba, po kterou je sklíčko v roztoku ponecháno (25, 26). Formvarová blána je stabilní při ozáření elektronovým paprskem a neinteraguje s elektrony. Formvar se připravuje smícháním 0,125 g formvarového prášku a 50 ml ethylendichloridu v zásobní lahvi. Poté

se láhev uzavře, roztok promíchá a nechá stát při pokojové teplotě. S delším používáním roztoku formvaru vzniká na blanách více nedokonalostí a jejich kvalita se snižuje. Roztok formvaru není vhodný k dlouhodobému skladování, narozdíl od již vytvořených formvarových blan. Blány je možné uchovávat v Petriho misce nebo uzavřené nádobě i několik měsíců. S časem se však zvyšuje jejich hydrofobita. Při manipulaci s formvarovým roztokem je nutné zabránit vdechování ethylendichloridu a jeho kontaktu s kůží (8).

Polymer butvar (polyvinyl butyraldehyd) je dalším z pomocných materiálů a je používán podobným způsobem jako formvar. Je dokonce více rezistentní k elektronovému paprsku než formvar. Síťky pokryté butvarovou blánou můžeme skladovat až devět měsíců (8, 30).

Nejčastější metoda pro výrobu těchto blan je splavením ze sklíčka na vodní hladinu. Jako skleněnou podložku je možno použít podložní sklíčko nebo skleněnou tyč. Na tomto postupu je nejdůležitější kvalitní příprava skleněné podložky a její pokrytí formvarem nebo butvarem. Pokud není skleněná destička dostatečně čistá, nemůže se blána dostatečně rychle oddělit od skla, nečistoty jsou přeneseny na blánu a vytvářejí početné nedokonalosti viditelné pod elektronovým paprskem TEM (8, 25).

1.4.1.2. Uhlíkové blány

Podpůrné blány vytvořené pouze uhlíkovou vrstvou se využívají hlavně tam, kde by nečistoty na polyvinyl formaldehydových blanách mohly rušit vyšetření a znehodnocovat výsledek. Svou strukturou neruší pozorování ani při největších zvětšeních. Uhlíkové blány mají vysokou teplotní stabilitu, vysokou vodivost a neinteragují s elektrony. Lze je použít jako podložní blánu pro různé izolované částice, ale i pod celé řezy. Síťky s těmito podložními blanami je vhodné umístit do uzavřené nádoby, aby se chránily před prachem nebo do exsikátoru, kde nemůže dojít ani k jejich navlhnutí. Podložní fólie je nutné použít

co nejrychleji. Uhlíkové blány jsou velice křehké. Aby nedošlo k jejich poškození, je důležitá velice citlivá manipulace. Nejsou vhodné pro výrobu ve větším množství (8, 16).

Uhlíkové blány je možné připravit v tloušťkách 3 – 5 nm. Připravují se napařováním uhlíku na slídu v napařovací aparatuře. Vrstvička nanesená na slídě se splaví podobně jako u formvarových blan na vodní hladinu. Pro přípravu zvláště homogenního uhlíkového filmu se využívá tzv. nepřímé napařování. Vypařené částice uhlíku jsou odráženy z povrchu mikroskopického podložního skla nastaveného v určitém úhlu k elektrodám a dopadají na čerstvě odštípnutý kousek slídy, zastíněný před přímým dopadem (25).

1.4.2. Kontrastní činidla

Ke zvýšení kontrastu u biologických struktur je nutné využít roztoky, které mají schopnost více rozptylovat primární elektrony a zvýšit tak kontrast struktur, na které se absorbovaly. Barvivo přitom pronikne do povrchových nerovností virových partikulí a umožní tak zobrazení strukturálních detailů až do velikosti 2 nm. Impregnace těmito ionty následně chrání vzorek i proti strukturálním deformacím, způsobeným elektronovým zářením (8, 13, 25, 31). Kontrastní činidlo by mělo být dobře rozpustné, vysoce elektrondensní, stále při ozáření elektrony a nemělo by reagovat se vzorkem. V literatuře se uvádí, že významný vliv na výsledný kontrast a dobré rozlišení detailů má i pH činidla. Nejvíce využívanými kontrastními činidly jsou vodný roztok uranyl acetátu (UA), vodný roztok kyseliny fosfowolframové (PTA), nebo molybdenátu amonného (AM) (6, 8, 13, 25, 26).

1.4.2.1. Negativní kontrast s UA

Nejčastěji se kontrastního činidla UA využívá pro znázornění makromolekul a glykoproteinů přítomných na obalech virů. Využívá se v 1 – 2 % koncentraci při pH mezi

2,0 a 4,5. UA vytváří větší kontrast než AM a PTA, má fixační účinky a je vhodný i pro kontrastování ultratenkých řezů pryskyřice a roztátých kryořezů. Nevýhodou pro pozorování je jeho velká zrnitost (8, 13, 25, 26).

Roztok UA patří do kategorie nestálých roztoků. Skladujeme ho v tmavých lahvích. Při skladování roztoku UA může docházet k tvorbě nerozpustných krystalů hydroxidu uranylu. Proto je vhodné ho těsně před použitím připravit čerstvý nebo přefiltrovat, aby nedocházelo k přenosu krystalů na povrch sítěk se vzorkem. Jestliže je roztok zakalený, není již vhodný pro další použití. Roztok UA obsahuje toxický těžký kov. Odpady by měly být likvidovány podle základních pokynů k likvidaci nebezpečného odpadu (8, 16).

1.4.2.2.Negativní kontrast s PTA

Negativního kontrastu vytvořeného pomocí PTA je obvykle využíváno pro mnoho typů vzorků. Výchozí koncentrace vodného roztoku bývá kolem 2% při pH 6,0 – 7,0. Roztok je možné díky své velké stálosti dlouhodobě skladovat v lednici. PTA pokrývá celý povrch sledovaných partikulí ve vzorku a dovoluje nám pozorovat např. virové kapsidy a bakteriální pili nebo bičíky. Tam kde dochází k interakcím mezi proudem elektronů a molekulami vzorku, můžeme vidět jemně granulární struktury. PTA obklopuje virové partikule a vytváří tak okolo nich černé pozadí (8, 13, 25, 26).

Vodný roztok PTA však obsahuje ionty těžkých kovů, které jsou toxické. Při manipulaci s nimi by nemělo docházet k vdechování jejich výparů a všechny odpady by měly být likvidovány podle základních pokynů pro likvidaci nebezpečného odpadu (8).

1.4.2.3.Negativní kontrast s AM

AM je kontrastní činidlo, které se nejčastěji využívá pro kontrastování roztátých kryořezů. Vzorky kontrastované AM mohou mít neutrální pH. AM vytváří na povrchu pozorované zmražené tkáně nebo buňky jemnou zrnitou strukturu (8, 26).

Jako u jiných kontrastních činidel obsahuje roztok AM těžký kov, který spadá do skupiny nebezpečných toxických prvků (8).

1.5. Viry

Viry jsou nejmenší dosud známé patogenní mikroorganismy, které lze pozorovat pouze v elektronovém mikroskopu. Skládají se z nukleové kyseliny (DNA, nebo RNA), obalené bílkovinnými molekulami, které se nazývají kapsomery. Soubor kapsomer charakteristicky uspořádaných nazýváme kapsida. Nukleové kyseliny tvoří s kapsidou nukleokapsid, na kterém může být u většiny virů ještě další obalová vrstva, tvořená bílkovinami, enzymy, cukry a tuky, které se v organismu chovají jako antigeny (28, 34).

Od sebe se viry navzájem odlišují způsobem replikace v hostitelských buňkách (jednořetězcové nebo dvouřetězcové DNA nebo RNA viry), tvarem a rozdílnými druhy hostitelů. Také velikost virů je variabilní. Malé viry měří přibližně 10 – 50 nm (např. virus dětské obrny, virus slintavky), střední viry 50 – 100 nm (např. virus chřipky) a velké viry 150 – 300 nm (např. virus neštovic) (9, 28, 34).

Od ostatních organismů se viry svými vlastnostmi velice liší. Nejsou organizovány jako buňky, ale jako částice. Lze je tedy považovat za organismy podbuněčné či nebuněčné. Nerostou na klasických kultivačních půdách, ale dají se pěstovat pouze na živých buňkách. Nejsou citlivé na běžná antibiotika, ale na speciální antivirotika. Viry se nemnoží dělením, ale syntézou svých složek a v této syntéze jsou závislé na ribosomech hostitelské buňky. Její energii využívají pro svůj metabolismus. Po vstupu do hostitelské buňky virus ztrácí svůj obal a uvolňuje virovou nukleovou kyselinu. Virové geny řídí a mění aktivitu hostitelské buňky, která vytváří nové virové částice. Ty se sestavují v buňce do nových virových partikulí, virionů. Viriony se pak z hostitelské buňky uvolňují a napadají další buňky. Jako jiní mikrobi jsou viry schopné spouštět imunitní reakci, vyvolávat onemocnění a šířit se v populaci (9, 28).

1.5.1. Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida je infekční virové onemocnění napadající mozek a mozkové blány. Nepatří mezi onemocnění s vysokým klinickým výskytem. Její význam je podmíněn spíše klinickou závažností. V mnoha případech probíhá lehce, v podobě lehkých bolestí hlavy a zvýšené teploty. Může však dojít k těžkému poškození centrální nervové soustavy, které vede k trvalým následkům v podobě různých neurologických poruch včetně přetrvávajících paréz, vzácně i k úmrtí. Obecně probíhá onemocnění hůře u dospělých než u dětí. Přenos původců onemocnění se uskutečňuje klíšťaty, nebo vzácně alimentární cestou. Typický je sezónní výskyt klíšťové encefalitidy od května do října. Souvisí s cykly aktivity klíšťat a expozicí lidí při pobytu v přírodě. V České Republice je mnoho ohnisek, kde jsou dobré podmínky pro život klíštěte a rezervoárových zvířat, na kterých klíšťata parazitují. Velká ohniska jsou v oblastech listnatých a smíšených lesů v povodí Vltavy a jejích přítoků, v okolí Brna a Ostravy. Největší výskyt je hlášen z jižních Čech (9, 28, 34, 36).

Viry přenášené specifickým způsobem pomocí klíšťat a komárů řadíme mezi arboviry. Virus klíšťové encefalitidy patří do čeledi Flaviridae a rodu flavivirů. Zde se s ním nacházejí také viry žluté zimnice, japonské encefalitidy a horečky dengue (34).

Flaviviry jsou RNA viry o velikosti 40 – 60 nm. Mají téměř hladký povrch s nepatrnými výběžky a jsou obalené lipidovým obalem, který obsahuje pouze tři různé strukturální proteiny. Protein C, M a E. Protein C vytváří kapsidu, ve které je uzavřena virová RNA. Proteiny M a E vytvářejí membránu, do které je celý virus zabalen. Obzvláště protein E vytváří povrch virové částice a je zodpovědný za tvorbu protilátek a indukci imunitních reakcí v infikovaném organismu (24, 34).

1.5.2. *Tabáková mozaika*

Virus mozaiky tabáku (TMV – tobacco mosaic virus) je vůbec prvním virem, který byl vědci formálně identifikován (33).

TMV patří do čeledi Tombusviridae, rodu Tobamovirů. Má tyčkovitý tvar a jeho velikost se pohybuje okolo 300 nm s průměrem 18 nm. TMV je tvořen proteinovou kapsidou, která vytváří obal okolo RNA(39).

TMV je jeden z nejzhubnějších patogenů rostlin. Je původcem nakažlivé choroby tabáku a jiných rostlin z čeledi lilkovitých včetně rajčat, lilků a brambor. Nejprve napadá mladé listy, na nichž způsobuje charakteristické vzorce. Do hostitelských buněk vstupuje např. prasklou stěnou rostlinné buňky a po pomnožení proniká do dalších buněk pomocí mikroskopických kanálů, plasmodesmat. Zatím nebyl prokázán vliv tohoto viru na člověka (33, 34, 38, 40).

2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1. *Cíl práce*

Cílem této práce bylo připravit preparáty pomocí metody negativního kontrastu. Použít různé kontrastující látky v rozdílných časech kontrastování, s rozdílnou koncentrací a pH. Následně porovnat vliv jednotlivých kontrastujících činidel a rozdílného pH a koncentrace na výsledný vzhled objektů v transmisním elektronovém mikroskopu.

2.2. *Hypotézy*

Předpokládaným výsledkem této práce je rozdílné zobrazení ultrastuktury preparátů. Rozdílná kvalita obrazu, různé rozlišení detailů a změny velikosti pozorovaných virových partikul při použití různých kontrastujících činidel.

3. METODIKA

Jako vzorky pro tvorbu preparátů byly použity suspenze virů klíšťové encefalitidy a TMV. Virus klíšťové encefalitidy byl získán jako částečný purifikát myší mozkové tkáně o neznámé koncentraci virových partikulí v 2 ml plastové mikrozskumavce (Eppendorf). Virus byl fixován 2,5 % roztokem glutaraldehydu v 0,1 M PB. TMV byl izolován z listu infikovaného tabáku. List byl rozetřen s malým množstvím fosfátového pufru o pH 7,4. Suspenze obou virů byly následně odděleny od živočišných a rostlinných buněk centrifugací.

Pro metodu negativního kontrastu byly použity tři druhy kontrastních činidel. Uranyl acetát (Spi Supplies), molybdenát amonný (Lachema) a kyselina fosfowolframová (Sigma – Aldrich).

3.1. Čištění sítěk

Pro tvorbu preparátu byly použity měděné sítě (Tesla) o průměru 3 mm s velikostí otvorů 300 MESH.

Nové sítě mohou být znečištěny prachem a zbytky roztoků z výroby, proto je třeba je ještě před pokrytím formvarovou blánou důkladně umýt a odmastit.

Do čisté kádinky vložíme filtrační papír a na něho klademe sítě. Nejprve promýváme 50 % kyselinou octovou podobu 1 – 2 min pomocí Pasterovy pipety. Poté kyselinu odsajeme a nahradíme ji destilovanou vodou s detergentem. Znovu po dobu 1 – 2 min sítě promýváme destilovanou vodou, která má za úkol odstranit zbytky 50 % kyseliny octové i jarové vody. Poslední krok je 1 – 2 min promývání ve 100 % acetonu. Po odsátí většiny acetonu vylijeme zbytky promývacího roztoku spolu se sítěmi do Petriho misky, ve které je umístěn filtrační papír. V částečně otevřené misce necháme zbytky acetonu vypařit.

3.2. Potažení sítěk formvarovou blánou

Pro přípravu formvarové blány potřebujeme skleněnou vaničku, podložní nebo jiné silnější sklíčko, odměrný válec s roztokem 0,3 % formvaru v chloroformu, diamant, čisté sít'ky, které budeme na formvarovou blánu pokládat a pinzetu. Pro poslední krok parafilm a Petriho misku.

Nejprve si připravíme skleněnou vaničku. Až po okraj ji naplníme destilovanou vodou, která je ohřátá na pokojovou teplotu. Připravené sklíčko odmastíme pomocí detergentu a pečlivě ho vysušíme a vyleštíme. Na čistotě sklíčka také závisí čistota formvarové blány. Sklíčko pomocí pinzety vložíme na 1 min do 0,3 % roztoku formvaru, který máme připravený v odměrném válci a zakrytý Petriho miskou. Zakrytím zabráníme vyprchání chloroformu a změně koncentrace roztoku, která by měla za následek vytvoření silnějších blan. Dbáme na to, abychom neponořili se sklíčkem i pinzetu, ze které by mohl po vytažení sklíčka roztok formvaru stékat a znehodnotit tak vytvořenou blánu. Po 1 min sklíčko plynulým, ale rychlým pohybem vyjmeme a necháme chvíli v parách chloroformu oschnout. Sklíčko opatrně uchopíme, abychom neponičili formvarovou blánu, která nám na povrchu vytvořila tenký film. Pomocí diamantu ořízneme sklíčko po jeho okrajích. Tímto krokem jsme odřízli formvarovou blánu, kterou následně od sklíčka oddělíme splavením na povrch vodní hladiny ve skleněné vaničce.

Formvarovou blánu splavujeme pomalým ponořováním sklíčka pod vodní hladinu pod úhlem 30°. Splavování provádíme velice pomalu a opatrně, abychom formvarovou blánu neponičili přehybem nebo nepotrhali. Pokud byla formvarová blána správně odříznuta, zůstává plavat na hladině. Na povrchu blány nesmějí být vidět nečistoty a musí mít všude stejnou barvu. Zabarvení formvarové blány nám přibližně určuje její tloušťku. Čím rychleji sklíčko vytáhneme, tím bude formvarová blána tenčí. Nedokonale připravená, nebo silná formvarová blána by později znepříjemňovala vyhodnocování výsledků v elektronovém mikroskopu.

Na oddělenou blánu opatrně klademe pomocí pinzety měděné síťky lesklou stranou vzhůru. Poté celou blánu i se síťkami překryjeme parafilmem kterým stáhneme formvarovou blánu z vodní hladiny. Pro sbírání sítěk je také možné použít sklíčko obalené parafilmem. Jeho výhodou je, že síťky s formvarovou blánou zůstávají rovně natažené. Síťky s blánou necháme uschnout v Petriho misce.

3.3. Pouhlikování sítěk s formvarovou blánou

Těsně před použitím síťky na formvarové bláně i s parafilmem pouhlikujeme. Díky tomuto kroku zajistíme, že jejich povrch bude hydrofilní a vzorek se bude moci na jejich povrch rovnoměrně rozptýlit a adherovat.

Síťky byly pouhlikovány napařováním uhlíku v napařovací aparatuře JEOL JE 4C (**příloha 9.1**) pomocí dvou elektrod z čistého uhlíku o průměru 5 mm od firmy Karbotechnik (**příloha 9.2**).

Nejprve z napařovačky sundáme zvon vakuového prostoru, připevníme elektrody a na preparátový stůlek položíme síťky potažené formvarovou blánou. Do stejné vzdálenosti od hrotu elektrod umístíme čistý porcelánový střep s kapkou oleje. Zvon uzavřeme. Vnitřní prostor zvonu přečerpáme rotační a dočerpáme difúzní vývěvou na požadovanou hodnotu vakua. Nažhavíme elektrody a napaříme lehkou vrstvu uhlíku na síťky při zapnuté rotaci stolku. Tloušťku uhlíkové vrstvy, která by měla být 3 – 5 nm, kontrolujeme podle zčernání porcelánového střepu okolo kapky oleje.

3.4. Příprava kontrastních činidel pro metodu negativního kontrastu

3.4.1. Příprava roztoku 2 % vodného roztoku uranyl acetátu (UA)

Roztok uranyl acetátu připravíme přidáním 2 g UA (SPI) do 100 ml deionizované vody. Roztok přefiltrujeme a dále uchováváme v tmavé lahvičce se zábrusem. Roztok

přefiltrujeme vždy znovu před použitím pomocí filtrů s 0,45 µm póry (Miller – HV Millipore) do mikrozkuhavky a zabalíme do alobalu. Světlo by mohlo způsobit vytvoření krystalů hydroxidu uranylu.

3.4.2. Příprava 2 % vodného roztoku kyseliny fosfowolframové (PTA)

Na předvážkách odvážíme 0.20 g PTA. Toto množství rozpustíme v 9 ml destilované vody a doplníme objem do 10 ml. Před použitím roztok přefiltrujeme filtrem s 0,45 µm póry (Miller – HV Millipore) a pomocí HCl a NaOH upravíme pH na pH 7. Hodnotu pH měříme skleněnou elektrodou.

3.4.3. Příprava kontrastních roztoků molybdenátu amonného (AM)

Příprava 2.5 % vodného roztoku (AM)

Na předvážkách odvážíme 0.25 g AM. Toto množství rozpustíme v 9 ml destilované vody a doplníme objem do 10 ml.

Příprava 5 % vodného roztoku AM

Na předvážkách odvážíme 0,5 g AM. Toto množství rozpustíme v 9 ml destilované vody a po úpravě pH doplníme objem roztoku do 10 ml.

Příprava 5 % vodného roztoku AM + 1 % trehalosy

Dále z předchozího roztoku (5% vodný roztok AM) odměříme 5 ml. K těmto 5 ml přidáme kapku 1 % trehalosy (Serva) s molekulovou hmotností 378,51 g/mol.

Každý z těchto tří různých roztoků rozdělíme na tři díly. U těchto dílů upravíme pH pomocí NaOH a HCl na pH 5.5, 7 a 9. Hodnotu pH měříme pomocí skleněné elektrody.

Takto připravené roztoky přefiltrujeme filtrem s 0,45 µm póry (Miller – HV Millipore)

3.5. Příprava preparátu

Nejprve si připravíme pracovní plochu pomocí parafilmu, jehož velikost odhadneme podle počtu preparátů, které chceme připravit. Díky svým vlastnostem přilne parafilm na navlhčený povrch stolu nebo dna Petriho misky a vytvoří rovnou, čistou pracovní plochu.

Pomocí pipety na připravený parafilm aplikujeme kapku (okolo 10-20 μ l) koncentrované virové suspenze klíšťové encefalitidy nebo tabákové mozaiky. Z důvodu hmotnosti virů odebíráme vzorek ze supernatantu, který je po centrifugaci zbaven větších nečistot. Zůstávají v něm pouze viry.

Na vytvořenou kapku virové suspenze položíme pomocí pinzety formvarovou síťku pouhlikovanou stranou dolů. Síťku v tomto stavu ponecháme u klíšťové encefalitidy 30 min a u tabákové mozaiky 10 min, aby viry mohly na formvarovou blánu adherovat v dostatečném množství. Poté síťku opatrně pomocí pinzety z kapky odejmeme a zbytky suspenze ze síťky důkladně odsajeme pomocí filtračního papíru. Filtrační papír přikládáme k nepouhlikované straně, aby nedošlo k odstranění již zachycených virových částíček na formvarové bláně.

V dalším kroku opět vložíme pomocí pinzety síťku pouhlikovanou stranou dolů na již připravenou kapku destilované vody (**příloha 9.3**). Dojde tak k promytí preparátu a odstranění posledních přebytečných zbytků virové suspenze. Po uplynutí 30 s síťky opět vyjmeme a již prováděným postupem důkladně osušíme.

Posledním krokem je přiložení síťky opět pouhlikovanou stranou dolů na kapku příslušného kontrastního činidla (2 % UA, 2,5 % AM a 2 % PTA) po dobu 30 s nebo 1 min. Po kontrastování vzorků síťky naposledy osušíme a necháme doschnout v uzavřené Petriho misce. Při nedostatečném odsátí kontrastního činidla může dojít k zalití virů tímto činidlem.

Kontrastování pomocí roztoků AM o různém pH, koncentraci a s přídavkem trehalosy provádíme pouze u viru tabákové mozaiky po dobu 30 s.

3.6. TEM

Vytvořené preparáty byly prohlíženy v TEM JEOL 1010 (**příloha 9.4**). Fotografie byly zhotoveny pomocí CCD kamery v programu Mega View III (Soft Imaging Software). Vše v Laboratoři elektronové mikroskopie Biologického centra AVČR (Parazitologický ústav).

3.7. Měření virů

Rozměry virů byly získány v programu Mega View III (Soft Imaging Software). Měření bylo prováděno od vnějších membrán virů. Objekty pro měření byly zvoleny náhodným výběrem. Výsledky průměrných hodnot velikosti virů a směrodatných odchylek byly vypočítány ze vzorců a ověřeny v programu Microsoft Excel.

Vzorec pro výpočet průměrných hodnot:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i$$

Vzorec pro výpočet směrodatných odchylek:

$$S^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

4. VÝSLEDKY

V mikroskopu byly porovnávány a dokumentovány změny ultrastruktury a zobrazení virů kontrastovaných různými kontrastními činidly, při rozdílném pH, koncentraci a s přídavkem trehalosy.

Celkem bylo zpracováno 21 preparátů metodou negativního kontrastu. Z toho 6 viru klíšťové encefalitidy a 15 TMV.

Nejprve byly vzorky kontrastovány vodným roztokem 2 % UA (**obr. 4.1 a 4.4**), vodným roztokem 2,5 % AM (**obr. 4.2 a 4.5**), a vodným roztokem 2 % PTA (**obr. 4.3 a 4.6**). V každém kontrastním činidle byly viry ponechány po dobu 30 s nebo 1 min. Přehledné uspořádání vzorků je uvedeno v **tabulce 4.1**.

Poté bylo vybráno jedno kontrastní činidlo, kterým byl AM. Toto kontrastní činidlo bylo připraveno jako 5 %, 2,5 % a 5 % roztok s 1 % trehalosou. Každý z těchto 3 roztoků AM byl upraven na 3 různá pH 5,5, 7 a 9. Těmito roztoky byly kontrastovány vzorky TMV po dobu 30 s (**obr. 4.7 – 4.9**). Přehledné uspořádání vzorků je uvedeno v **tabulce 4.2**.

Pro získání orientačního přehledu o vlivu kontrastního činidla na velikost pozorovaných částic bylo naměřeno celkem 180 hodnot.

Z toho 60 hodnot pro virus klíšťové encefalitidy. Zde byl měřen průměr jeho virionu. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 4.3** a graficky zobrazeny v **grafu 4.1**.

120 hodnot pro TMV. Zde byl měřen průměr a délka virionu. Hodnoty průměrů virionů TMV jsou uvedeny v **tabulce 4.4** a graficky zobrazeny v **grafu 4.2**. Hodnoty délek virionů TMV jsou uvedeny v **tabulce 4.5** a graficky zobrazeny v **grafu 4.3**.

Tabulka 4.1: Metoda s použitím UA, AM a PTA v různých časech kontrastování a AM u virů klíšťové encefalitidy a tabákové mozaiky

obrázek	vir	kontrastní činidlo	čas kontrastování
4.1 A – C	Virus klíšťové encefalitidy (E)	2% UA	30s
4.1 D – F			1 min
4.2 A – C		2.5% AM pH = 7.46	30s
4.2 D – F			1 min
4.3 A – C		2% PTA pH = 7.16	30s
4.3 D – F			1 min
4.4 A – C	Virus tabákové mozaiky (TMV)	2% UA	30s
4.4 D – F			1 min
4.5 A – C		2.5% AM pH = 7.46	30s
4.5 D – F			1 min
4.6 A – C		2% PTA pH = 7.16	30s
4.6 D – F			1 min

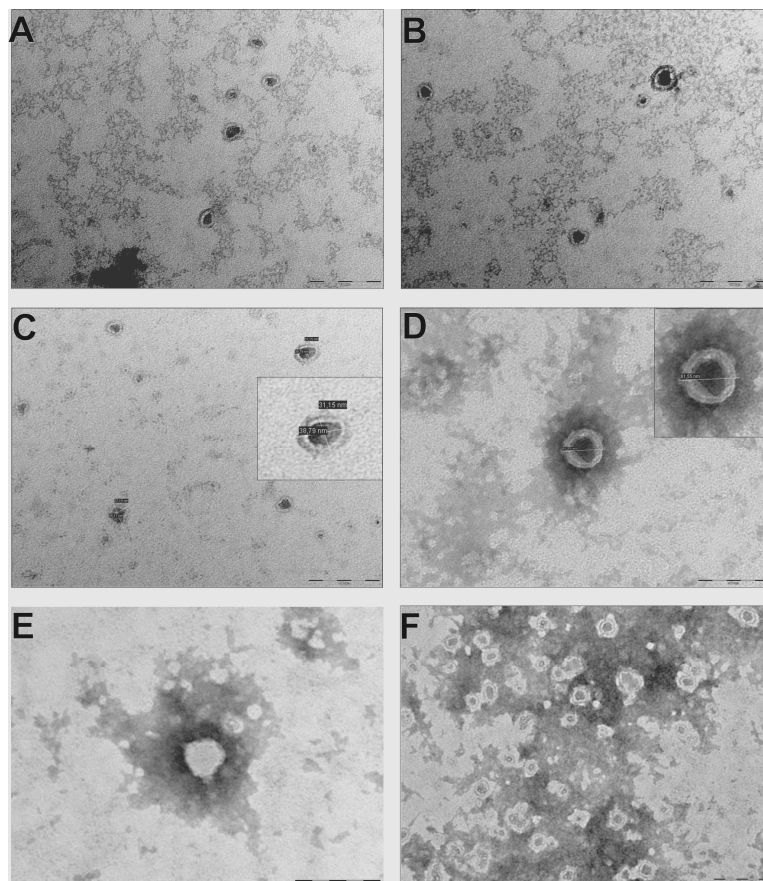
Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 4.2: Metoda s použitím různých druhů AM u viru tabákové mozaiky

obrázek	vir	kontrastní činidlo	pH	čas kontrastování
4.7 A – B	Virus tabákové mozaiky (TMV)	5% AM	5.54	30 s
4.7 C – D			7.3	
4.7 E – F			9.3	
4.8 A – B		2.5% AM	5.5	
4.8 C – D			7.1	
4.8 E – F			9,0	
4.9 A – B		5% AM + 1% trehalosy	5.5	
4.9 C – D			7.15	
4.9 E – F			9.25	

Zdroj: Vlastní výzkum

Obr. 4.1: Virus klíšťové encefalitidy kontrastovaný 2 % vodným roztokem UA, A – C po dobu 30 s , D – F po dobu 1 min



Zdroj: Vlastní výzkum

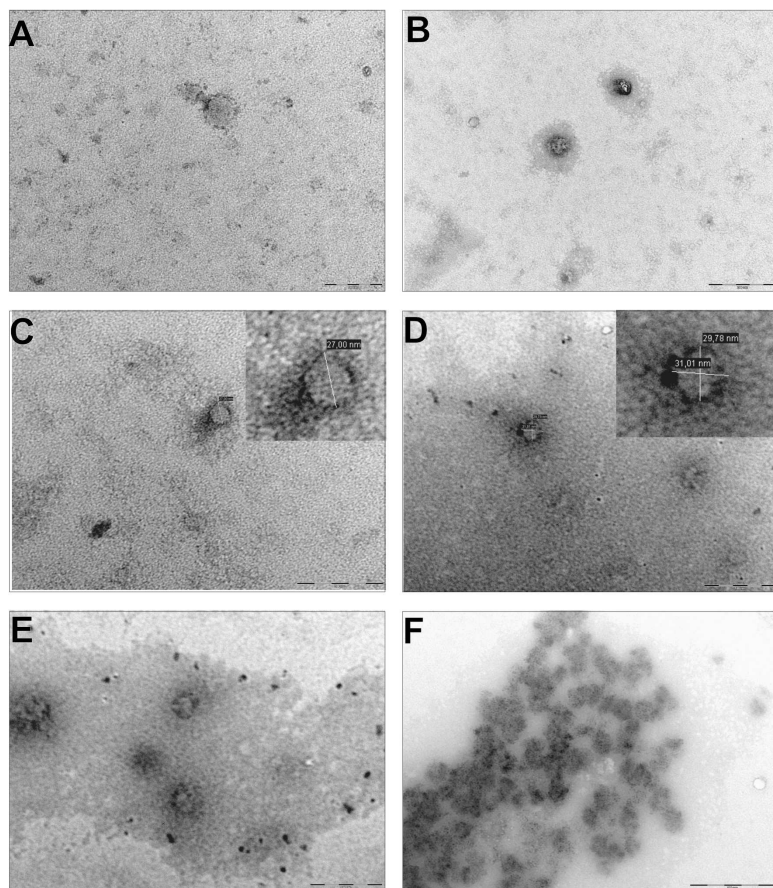
Obr. 4.1, A-C: viry byly pozorovány v dobrém rozlišení a s dobrým kontrastem. Zobrazení detailů se neměnilo ani při větším zvětšení vzorku. **Obr. 4.1, D – F:** Objekty zde byly příliš zality do kontrastního činidla. Struktury splývají a zobrazení je neostře.

A, B: Na této fotografii mohly být skvrny způsobeny nedostatečnou čistotou virové suspenze, která obsahovala zbytky proteinů.

A, B, C, D, F: Na těchto pozicích je vidět pouze prázdný virový obal bez RNA. Kontrastní činidlo zalilo vnitřní část viru a vytvořilo tak tmavý prostor obalený membránou. **E:** Na této fotografii je vidět kompletní virus klíšťové encefalitidy obsahující jak virovou membránu, tak RNA.

Měřítka u jednotlivých fotografií má velikost vždy 100 nm.

Obr. 4.2: Virus klíšťové encefalitidy kontrastovaný 2,5 % vodným roztokem AM, A – C po dobu 30 s, D – F po dobu 1 min



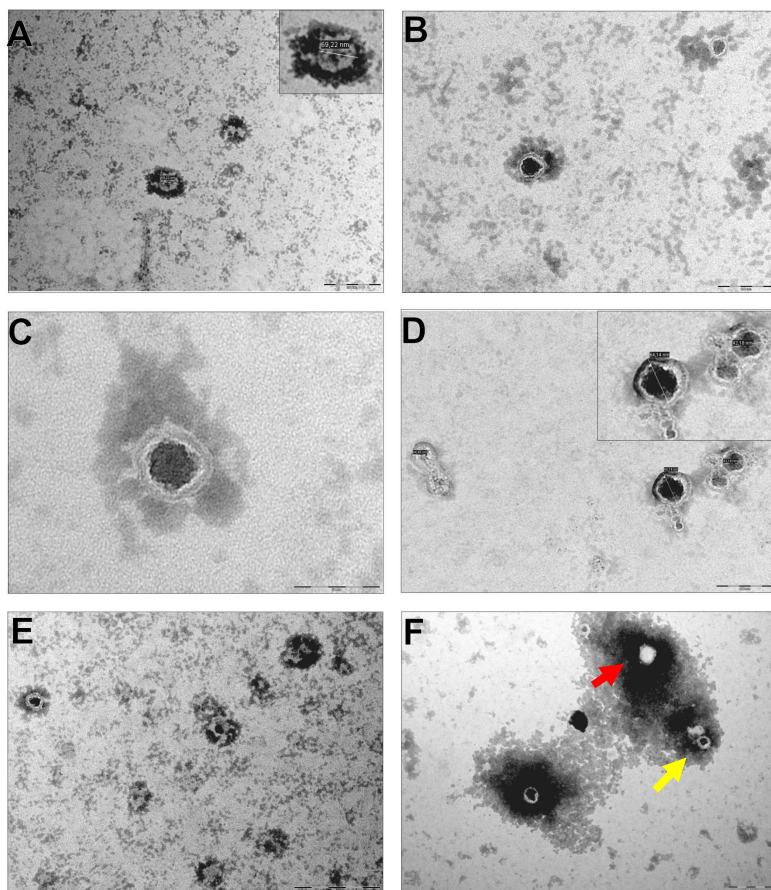
Zdroj: Vlastní výzkum

Obr. 4.2, A – C: Zde bylo obtížné zostřování objektů. Výsledný obraz byl zobrazen v malém rozlišení a objekty byly nedostatečně kontrastní. Roztok AM dostatečně obklopoval virové částice, které byly dobře odlišitelné od okolního prostředí. **Obr. 4.2, D – F:** Objekty byly příliš zalité v kontrastním činidle. Rozpoznání jednotlivých virových partikulí bylo složité, v některých částech vzorku až nemožné. Odlišení virových částic od okolního prostředí bylo velice nejasné.

Na všech obrázcích můžeme vidět kompletní virové partikule s membránou a RNA.

A, B, D, E: Velikost měřítka je 100 nm, **C, F:** velikost měřítka je 200 nm.

Obr. 4.3: Virus klíšťové encefalitidy kontrastovaný 2 % vodným roztokem PTA, A – C po dobu 30 s, D – F po dobu 1 min



Zdroj: Vlastní výzkum

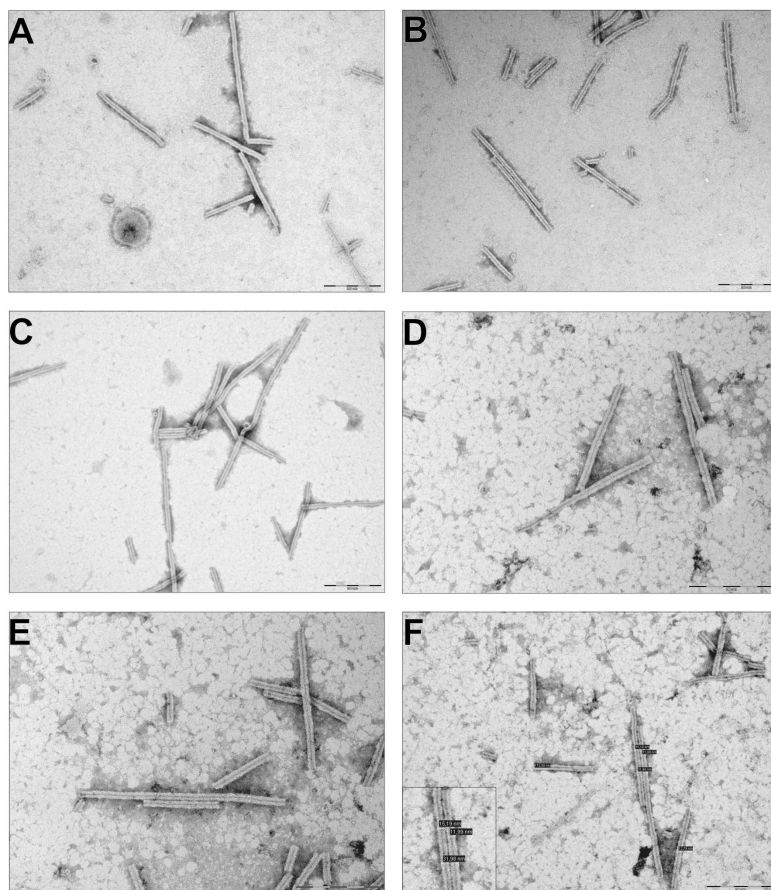
Obr. 4.3, A – C: Viry byly zobrazeny s dobrým kontrastem a v dobrém rozlišení. PTA nepřekrývala pozorované objekty a umožňovala tak jejich odlišení od okolních nečistot. **Obr. 4.3, D – F:** Viry byly na převládající části preparátu příliš zalité do PTA. Příliš velký kontrast znemožňuje dobré odečtení výsledku.

A, B, E: Na těchto fotografiích mohly být skvrny způsobeny nedostatečnou čistotou virové suspenze, která obsahovala zbytky proteinů.

F: Zde vidíme kompletní virion (červená šipka) a prázdný virion s kontrastním činidlem zalitým uvnitř membrány (žlutá šipka).

A, E, F: Velikost měřítka je 200 nm. **B, D:** Velikost měřítka je 100 nm. **C:** Velikost měřítka je 50 nm.

Obr. 4.4: TMV kontrastovaný 2 % vodným roztokem UA, A – C po dobu 30 s, D – F po dobu 1 min

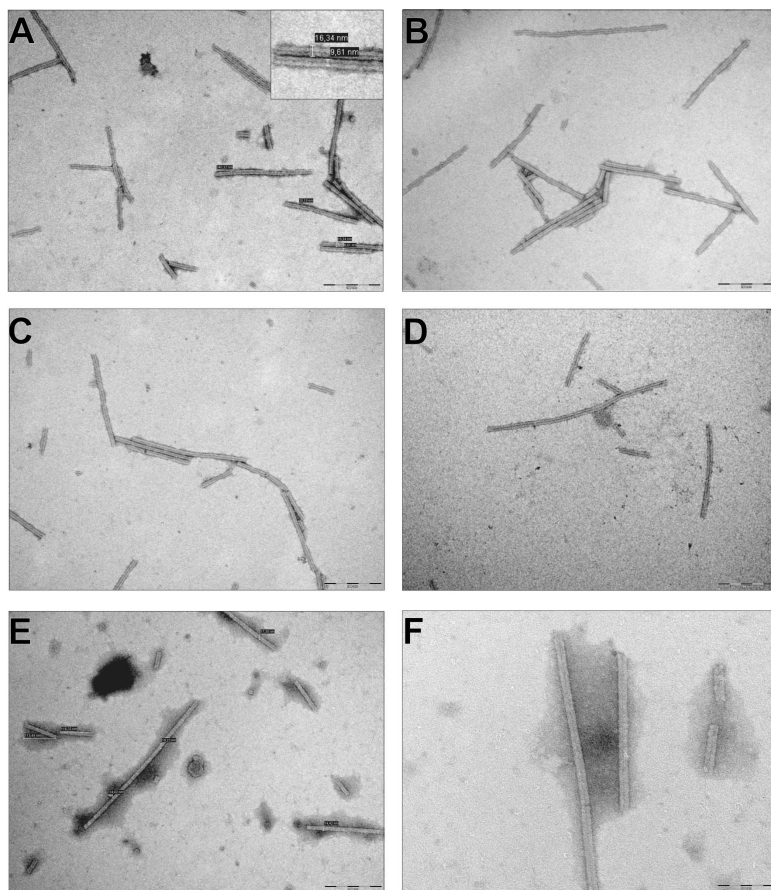


Zdroj: Vlastní výzkum

Obr. 4.4, A – C: Viry byly zobrazeny ve velice dobrém rozlišení. Ultrastruktury viru byly dobře viditelné, díky kontrastu, který UA vytvořil okolo těchto partikulí. UA nepřekrýval pozorované virové partikule. **Obr. 4.4, D – F:** Na tomto preparátu se činidlo pravděpodobně navázalo i na příměsné proteiny, které se v suspenzi nacházely. Viry byly zobrazeny v dobrém rozlišení a nedocházelo ke zkreslení jednotlivých detailů vzorku.

Měřítka u jednotlivých fotografií má velikost vždy 200 nm.

Obr. 4.5: TMV kontrastovaný 2,5 % vodným roztokem AM, A – C po dobu 30 s, D – F po dobu 1 min

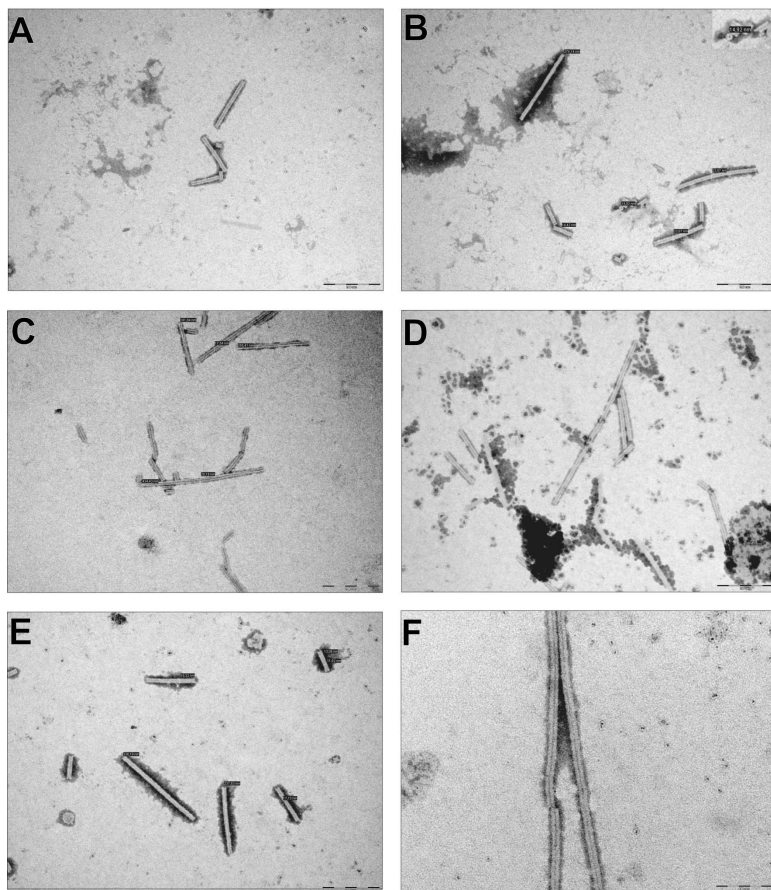


Zdroj: Vlastní výzkum

Obr. 4.5, A – C: Preparát měl malé rozlišení a byl nedostatečně kontrastní. Detaily vzorku byly obtížně rozpoznatelné. **Obr. 4.5, D – F:** Zde se vyskytovala místa jak s příliš malým kontrastem, tak místa, kde bylo kontrastního činidla příliš mnoho a docházelo ke splývání jednotlivých detailů pozorovaných virů. Objekty byly špatně zaostřitelné s malým rozlišením, které klesalo se stoupajícím zvětšením vzorku.

A, B, C, D, E: Velikost měřítka je 200 nm. **F:** Velikost měřítka je 100 nm.

Obr. 4.6: TMV kontrastovaný 2 % vodným roztokem PTA, A – C po dobu 30 s, D – F po dobu 1 min



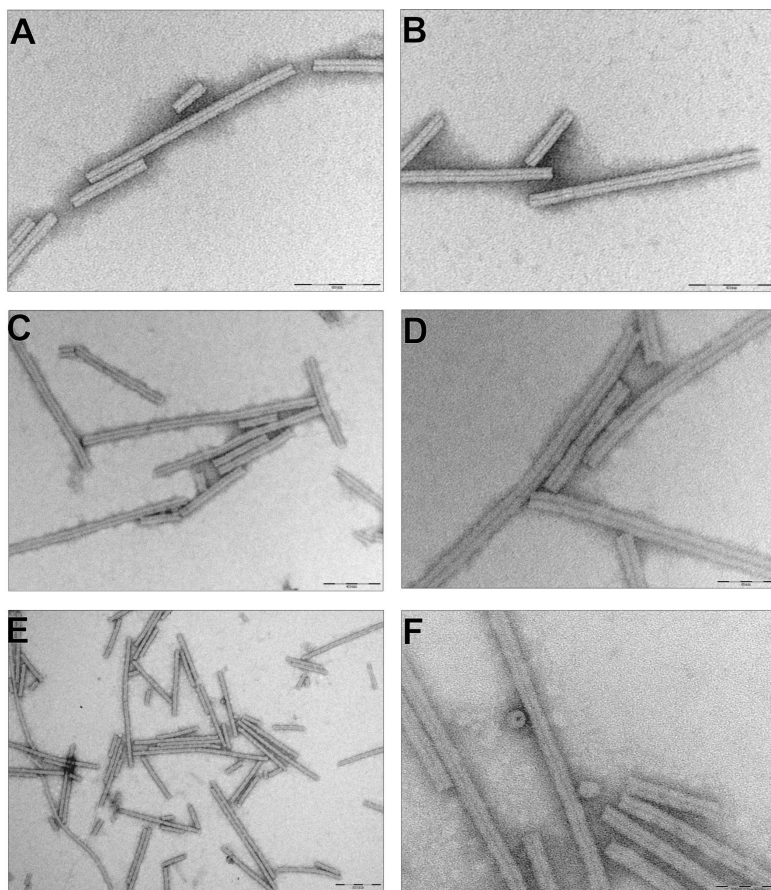
Zdroj: Vlastní výzkum

Obr. 4.6, A – C: PTA nám umožnila dobré odlišení virů od okolního prostředí. Rozlišení však bylo malé, s malým množstvím detailů. **Obr 4.6, D – F:** Zde byly objekty zobrazeny s dobrým kontrastem a v lepším rozlišení.

D: Na této fotografii jsou viditelné precipitáty kontrastního činidla.

A, B, C, D, E: Velikost měřítka je 200 nm. **F:** Velikost měřítka je 100 nm.

Obr. 4.7: TMV kontrastovaný 5 % vodným roztokem AM, A – B při pH 5,4, C – D při pH 7,3, E – F při pH 9,3

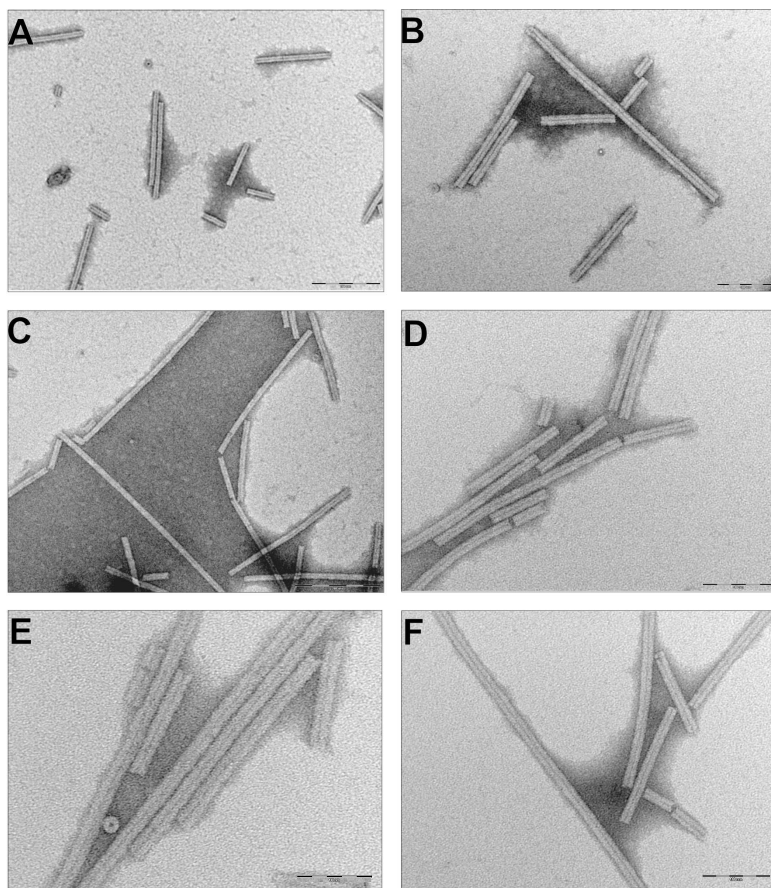


Zdroj: Vlastní výzkum

Obr. 4.7 A – F: Objekty byly pozorovány v dobrém rozlišení a s dobrým kontrastem. Zobrazení detailů se neměnilo ani při větším zvětšení vzorku. AM nepřekrýval pozorované viry a neznehodnocoval tak zobrazený výsledek. Roztok AM dostatečně obklopoval virové částice a dobře je odlišoval od okolního prostředí.

A, B, C, E, F: Velikost měřítka je 100 nm. **D:** Velikost měřítka je 50 nm.

Obr. 4.8: TMV kontrastovaný 2,5 % vodným roztokem AM, A – B při pH 5,5, C – D při pH 7,1, E – F při pH 9,0

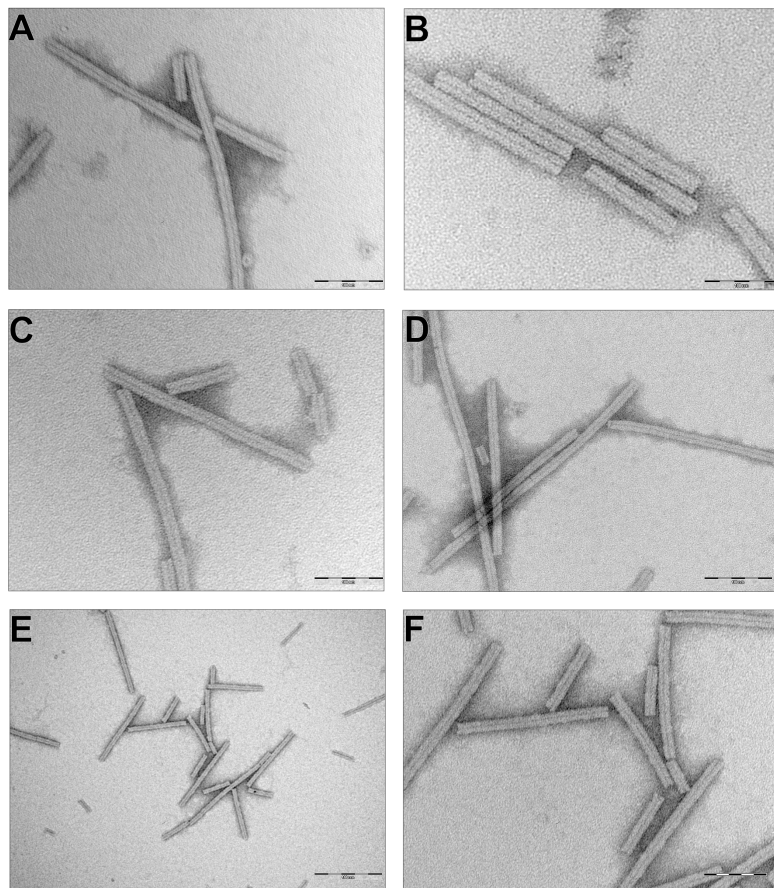


Zdroj: Vlastní výzkum

Obr. 4.8 A – F: Preparát byl dostatečně kontrastní. Zobrazené virové partikule byly viditelné s menším rozlišením a s horším zobrazením detailů. Nedocházelo k přílišnému překrývání virů kontrastním činidlem. Částice byly dobře odlišitelné od okolního prostředí.

A, B, C, D, F: Velikost měřítka je 100 nm. **E:** Velikost měřítka je 50 nm.

Obr. 4.9: TMV kontrastovaný 5 % vodným roztokem AM + 1 % trehalosy, A – B při pH 5,5, C – D při pH 7,15, D – F při pH 9,25



Zdroj: Vlastní výzkum

Obr 4.9 A – F: Objekty byly zobrazeny v dobrém rozlišení a s dobrým kontrastem. Kvalita rozlišení se neměnila ani při větším zvětšení vzorku. AM příliš nepřekrýval pozorované viry a nedocházelo tak k splývání objektů s okolním prostředím.

A, C, D, E, F: Velikost měřítka je 100 nm. **B:** Velikost měřítka je 50 nm.

Tabulka 4.3: Velikost virů klíšťové encefalitidy kontrastovaných různými kontrastními činidly v různých časech kontrastování.

Typ viru	Virus klíšťové encefalitidy					
činidlo	UA		AM		PTA	
doba kontrast.	30 s	1 min	30 s	1 min	30 s	1 min
velikost virů v nm	20,0	27,8	24,7	37,4	37,8	32,2
	20,3	28,0	27,6	39,6	41,5	38,4
	21,0	30,0	51,7	40,6	44,7	44,0
	21,1	30,4	53,3	42,1	45,5	45,5
	21,4	41,1	59,0	42,1	46,1	45,7
	23,2	44,0	60,4	47,1	48,5	46,6
	23,7	45,5	60,5	48,9	48,7	55,4
	23,7	49,9	61,6	53,5	49,2	56,1
	25,2	52,5	63,2	57,2	49,7	61,9
	26,0	56,2	69,4	58,1	55,7	63,4

Zdroj: Vlastní výzkum

Průměrná hodnota velikosti virů klíšťové encefalitidy kontrastovaných:

UA

AM

PTA

30 s = 22,5 nm

30 s = 53,1 nm

30 s = 46,7 nm

1 min = 40,5 nm

1 min = 46,7 nm

1 min = 48,9 nm

Směrodatná odchylka velikosti virů klíšťové encefalitidy kontrastovaných:

UA

AM

PTA

30 s = 2,1

30 s = 14,2

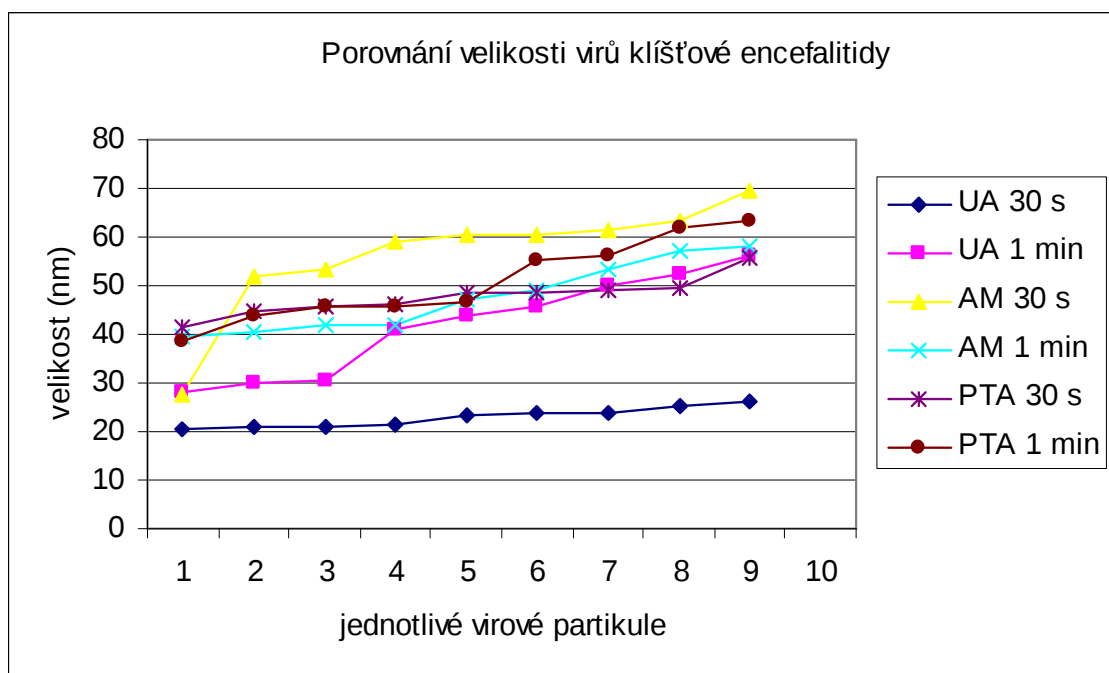
30 s = 4,9

1 min = 10,8

1 min = 7,5

1 min = 10,1

Graf 4.1: Porovnání velikosti virů klíšťové encefalitidy kontrastovaných různými kontrastními činidly v různých časech kontrastování



Zdroj: Vlastní výzkum

Z grafu je patrné, že viry kontrastované UA po dobu 30 s mají velikost menší, než viry kontrastované UA po dobu 1 min. Jejich hodnoty jsou znatelně menší i ve srovnání s výsledky ostatních kontrastních činidel. Velikost virů u AM (1 min) a PTA se pohybuje v relativně podobných hodnotách. Největších rozměrů, ale zároveň také směrodatné odchylky dosahují viry kontrastované AM po dobu 30 s.

Tabulka 4.4: Velikost průměru TMV kontrastovaných různými kontrastními činidly a v různých časech kontrastování

typ viru	TMV					
činidlo	UA		AM		PTA	
doba kontrast.	30 s	1 min	30 s	1 min	30 s	1 min
průměr virů v nm	19,0	12,6	17,9	17,4	17,7	16,5
	19,0	17,0	18,2	17,7	18,1	16,8
	19,1	17,2	18,3	18,2	18,4	17,7
	19,5	17,4	18,5	18,3	19,5	20,3
	19,8	18,7	18,7	18,4	19,5	20,6
	19,8	19,0	19,3	18,4	19,8	20,8
	20,3	19,2	20,0	18,7	20,3	21,8
	20,3	19,7	20,2	19,2	20,6	22,2
	22,9	20,3	20,2	19,3	20,6	23,1
	24,2	23,7	21,0	20,3	20,6	23,7

Zdroj: Vlastní výzkum

Průměrná hodnota průměrů TMV kontrastovaných:

UA

30 s = 20,4 nm

1 min = 18,5 nm

AM

30 s = 19,2 nm

1 min = 18,6 nm

PTA

30 s = 19,5 nm

1 min = 20,35 nm

Směrodatná odchylka průměrů TMV kontrastovaných

UA

30 s = 1,8

1 min = 2,8

AM

30 s = 1,1

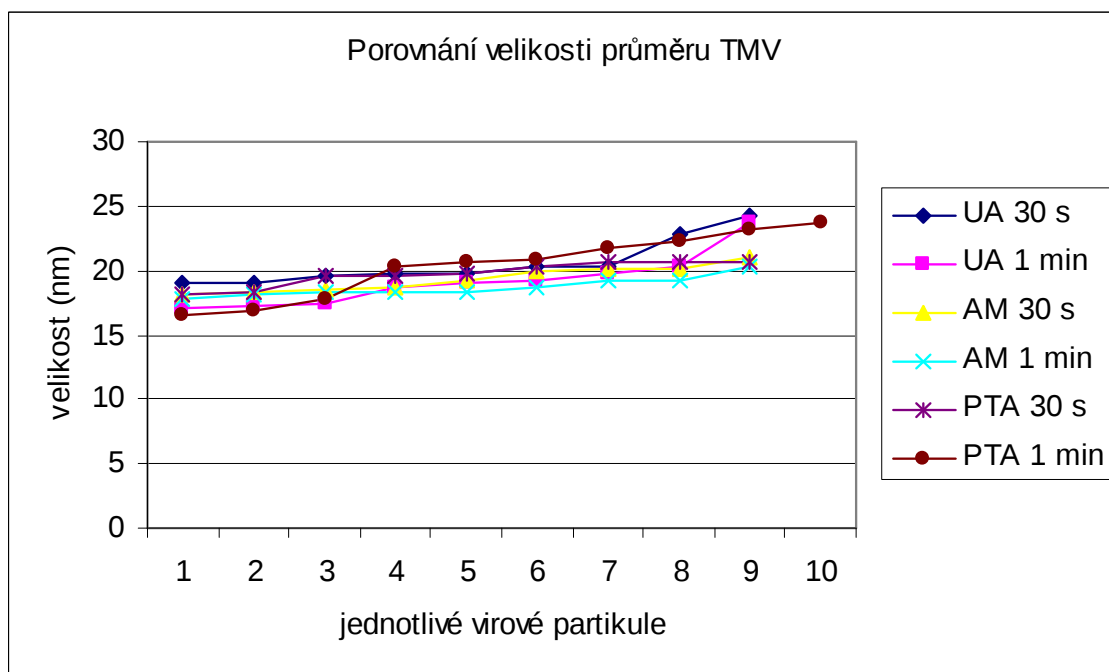
1 min = 0,8

PTA

30 s = 1,1

1 min = 2,6

Graf 4.2: Porovnání velikosti průměru TMV kontrastovaných různými kontrastními činidly v různých časech kontrastování



Zdroj: Vlastní výzkum

U TMV kontrastovaných UA, AM a PTA nejsou žádné podstatné rozdíly ve změnách velikosti průměru těchto virů. Průměrné hodnoty průměrů se od sebe příliš neliší. Směrodatné odchylky jednotlivých souborů hodnot nejsou velké.

Tabulka 4.5: Délka TMV kontrastovaných různými kontrastními činidly a v různých časech kontrastování

typ viru	TMV					
činidlo	UA		AM		PTA	
doba kontrast.	30 s	1 min	30 s	1 min	30 s	1 min
délka virů v nm	259,8	141,3	256,9	238,1	173,5	196,3
	260,6	187,3	263,8	257,6	202,1	236,9
	273,0	189,6	264,7	269,6	220,1	271,0
	280,3	206,5	268,8	273,0	248,0	292,2
	281,2	224,1	276,4	293,2	277,4	293,3
	296,1	234,3	277,1	296,8	290	294,3
	302,2	248,1	282,1	298,4	303,2	295,6
	318,4	248,9	288,9	300,5	317	295,7
	324,2	256,8	328,0	301,6	332,	305,8
	326,9	263,8	329,9	327,8	3343,8	327,1

Zdroj: Vlastní výzkum

Průměrná hodnota délek TMV kontrastovaných:

UA

30 s = 292,3 nm

1 min = 220,1 nm

AM

30 s = 283,7 nm

1 min = 285,7 nm

PTA

30 s = 270,7 nm

1 min = 280,8 nm

Směrodatná odchylka délek TMV kontrastovaných:

UA

30 s = 25,1

1 min = 12,2

AM

30 s = 25,6

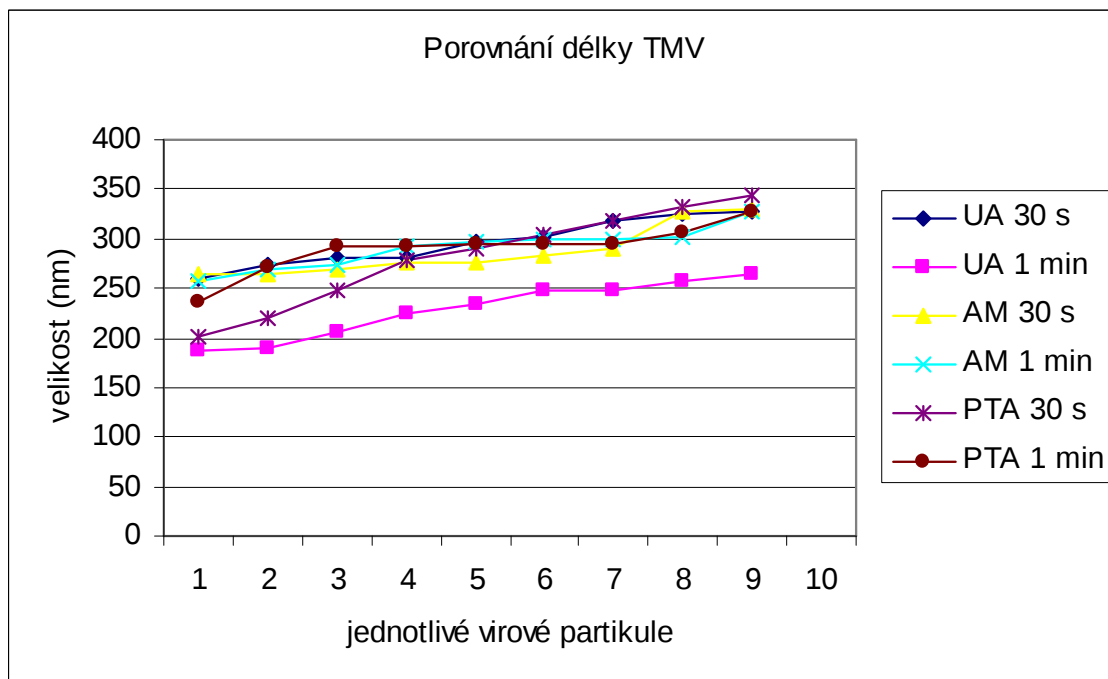
1 min = 26,0

PTA

30 s = 57,7

1 min = 37,8

Graf 4.3: Porovnání délky TMV kontrastovaných různými kontrastními činidly v různých časech kontrastování



Zdroj: Vlastní výzkum

Délka TMV při kontrastování UA (po dobu 30 s), AM a PTA se výrazně nemění. Nižších hodnot dosahuje pouze při kontrastování UA po dobu 1 min. Největší směrodatné odchylky dosahují TMV při kontrastování PTA po dobu 30 s.

5. DISKUZE

Po kontrastování vzorků a zhotovení fotografií jsem mezi sebou porovnávala kvalitu zobrazení detailů vzorku a rozdíly v dosaženém rozlišení. U jednotlivých druhů kontrastních činidel jsem zjistila také rozdíly ve vytvořeném kontrastu.

Při kontrastování vzorků UA bylo dosahováno nejlepších výsledků. Negativní vliv na pozorování a rozpoznání virů neměla ani jeho velká zrnitost popisovaná v literatuře (8). Viry klíšťové encefalitidy byly tímto kontrastním činidlem zobrazeny nejlépe.

Dalším použitým kontrastním činidlem byla PTA. Svými kontrastními vlastnostmi se podobala UA. Zaostřování objektů však bylo horší s menším kontrastem. Zobrazení detailů bylo, díky její menší zrnitosti (8) v porovnání s UA nepatrně lepší.

Posledním použitým kontrastním činidlem byl AM. Při kontrastování tímto roztokem bylo dosahováno nejhorších výsledků. U virů klíšťové encefalitidy bylo dokonce, kvůli nevhodnému kontrastu a malému rozlišení, obtížné odlišení virů od okolního prostředí. Ke změně kontrastních vlastností AM nedošlo ani při změně pH. Vliv na zobrazení neměla ani trehalosa, která by měla přispívat k lepší stabilitě negativně kontrastovaných proteinů (11). Příznivý vliv na zobrazení objektů však měla změna koncentrace roztoku. Při 5% koncentraci AM byly preparáty zobrazeny s lepším rozlišením a kontrastem.

Při porovnání různě dlouhé doby kontrastování dosahovaly lepších zobrazení preparáty ponechané v kontrastním činidle pouze 30 s. Vzorky zde byly dostatečně kontrastní, a nedocházelo k „překontrastování“ vzorku. Při ponechání vzorku v kontrastním činidle po dobu 1 min docházelo k přílišnému zalití vzorků do kontrastního činidla a vzniku příliš velkého kontrastu. V případě méně čistých vzorků byly více kontrastní i okolní nečistoty a příměsné proteiny. Právě v těchto případech je důležitá čistota vzorku (2). U vzorků viru klíšťové encefalitidy kontrastovaných AM docházelo dokonce k splývání virů s okolním prostředím. Jedinou výjimkou bylo kontrastování TMV pomocí PTA kdy se po 1 min příznivě zvýšil kontrast a lépe tak vynikly strukturní detaily virových partikulí.

Pro podrobnější popis vlastností kontrastních činidel byla provedena i orientační statistika, pro zhodnocení vlivu kontrastních činidel na velikost pozorovaných objektů.

Hodnoty virů kontrastovaných UA se vzájemně velice lišily. Viry Klíšťové encefalitidy dosahovaly nejmenších rozměrů při kontrastování po dobu 30 s. Průměrná hodnota velikosti těchto virů byla 22,5 nm a pohybovala se hluboko pod obecně udávanými hodnotami, které jsou 40 – 60 nm (36). Při kontrastování po dobu 1 min se jejich průměrná velikost zvětšila na 40,5, což je spodní hranice udávaných hodnot. Narozdíl od TMV, kde byly naopak nejmenší viry při kontrastování UA po dobu 1 min. Zde dosahovala délka virů průměrně 220,1 nm. Při kontrastování po dobu 30 s se průměrná délka zvýšila na 292,3 nm. Stejně tomu bylo i u průměrů virů, kdy byla průměrná hodnota při kontrastování po dobu 30 opět vyšší (20,4 nm) a při kontrastování po dobu 1 min dosahovala pouze 18,5 nm. Všechny hodnoty u TMV se pohybovaly blízko hodnotám udávaným v literatuře, kde byl uváděn průměr 18 nm a délka 300 nm (37).

U AM a PTA nedocházelo k žádným znatelným rozdílům ve velikosti virů klíšťové encefalitidy ani TMV a jejich hodnoty se vždy blížily hodnotám udávaným v literatuře.

Neshody ve výsledcích jednotlivých kontrastních činidel mohly být způsobeny malým množstvím naměřených hodnot. Rozptyl naměřených hodnot dokumentují vysoké směrodatné odchylky. Směrodatné odchylky byly nejmenší u průměrů TMV. Naopak největší u jejich délek. Tyto vysoké hodnoty směrodatných odchylek mohly být způsobeny velkou délkou těchto virů.

6. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na popis změn ultrastruktury a zobrazení biologických preparátů v TEM, způsobených použitím různých kontrastních činidel, při různém čase kontrastování, koncentraci a pH.

Zobrazení virů klíšťové encefalitidy bylo v porovnání s TMV, při použití stejného druhu kontrastního činidla, vždy horší s obtížnějším zaostřováním.

Na základě vyhodnocených výsledků bylo zjištěno, že nejvhodnější doba působení kontrastního činidla je 30 s, kdy byly virové partikule dobře kontrastní, ale nebyly v kontrastním činidle příliš zalité. Jako nejvhodnější kontrastní činidlo, se ukázal vodný roztok 2 % UA, ve kterém byly viry nejlépe zobrazeny. Nejhůře byly viry viditelné ve vodném roztoku 2,5 % AM. Jeho kontrastující vlastnosti se zlepšily pouze při zvýšení jeho koncentrace na 5%. Žádný vliv pH a trehalosy na výsledné zobrazení virů jsem nepozorovala.

Z rozdílných výsledků velikosti virů vyplývá, že typ kontrastních činidel, použitých v této práci, nemá žádný prokazatelný vliv na velikost virových partikulí. Pro přesnější informace by bylo vhodné provést statistické vyhodnocení s větším množstvím dat a s použitím více preparátů.

Předpokládaná hypotéza byla potvrzena pouze z části. Ke změnám ultrastruktury při použití různých kontrastních činidel nedocházelo. Měnila se však kvalita jejich zobrazení ve výsledném kontrastu a rozlišení detailů jednotlivých virových partikulí.

Práce by mohla být přínosem pro rozhodování o typu kontrastního činidla pro určitý druh požadovaného výsledku. UA je vhodné kontrastní činidlo pro prokázání přítomnosti viru ve zkoumaném materiálu, ale pro podrobnější popis ultrastruktury a lepší zobrazení detailů je vhodnější PTA. Tato volba by mohla vést k rychlejšímu a přesnějšímu určení zkoumaných virových partikulí.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ARCANGELETTI C. M., FLORA de CONTO, et al., *Electron microscopy as a reliable tool for rapid and conventional detection of enteric viral agents: a five-year experience report* [online], Acta Biomed 2005, roč. 76, č. 3, 165-170, http://www.actabiomedica.it/data/2005/3_2005/arcangeletti.pdf, ISSN 0392-4203.
2. BIEL S. S., GERDELBLOM H. R., *Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method* [online], Journal of Clinical Virology 1999, roč. 13, č. 1, 105 – 119, [http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532\(99\)00027-X/abstract](http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532(99)00027-X/abstract), [cit. 10. 1. 2009], ISSN 1386-6532.
3. BIEL S. S., MADLEY D., *Diagnostic virology – the need for electron microscopy: a discussion paper* [online], Journal of Clinical Virology 2001, roč. 22 č. 1, 1-9, [http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532\(01\)00151-2/abstract](http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532(01)00151-2/abstract), [cit. 10. 1. 2009], ISSN 1386-6532.
4. BRENNER S., HORNE R. W., *A Negative Staining Method for High Resolution Electron Microscopy of Viruses*, Biochimica et Biophysica Acta 1959, roč. 34, 103 – 110.
5. CURRY A., *Electron microscopy and the investigation of new infectious diseases* [online], International Journal of Infectious Diseases 2003, roč. 7, č. 4, 251 – 258, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656415?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log\\$citationsensor](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656415?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log$citationsensor), [cit. 10. 1. 2009], ISSN 1201-9712.

6. CURRY A., APPLETON H., DOWSETT B., *Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections : Present and future*, Micron 2006, roč. 37, č. 2, 91-106, ISSN: 0968-4328.
7. DUFKOVÁ M.: *Elektronový mikroskop* [online], 3 pól Magazín plný pozitivní energie 2005, <http://www.tretipol.cz/index.asp?clanek&view&327>, [cit. 20.11. 2008].
8. DYKSTRA M. J., REUSS L. E., *Biological electron microscopy: theory and troubleshooting*, 2. vyd., New York (USA), Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003, 241 – 281, ISBN 0306477491.
9. GÖPFERTOVÁ J., JANOVSÁ D. et al., *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*, 3. vyd., Triton 2002, 23 - 113, ISBN 80-7254-223-0.
10. HARRIS J. R., *Negative Staining of Thinly spread biological samples*, 2. vyd, Mainz, Germany, Humana Press 2007, 12 – 14, ISBN: 978-1-58829-573-6.
11. HARRIS J. R., GEBAUER W., MARKL J., *Keyhole Limpet Haemocyanin: Negative Staining in the Presence of Trehalose*, Micron 1995, roč. 26, č. 1, 25-33, ISSN: 0968-4328.
12. HAYAT M. A., *Principes and techniques of electron microscopy: biological applications*, 4. vyd, Cambridge, Cambridge University Press, 2000, 237 – 240, ISBN: 0521632870.
13. HAZELTON P. R., GERDELBLUM H.R., *Electron microscopy for rapid diagnostics of infectious agents in emergent situations* [online], Emerging Infectious

Diseases 2003, roč. 9, č. 3, 294-303, <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol9no3/02-0327.htm>, [cit. 10.1. 2009], ISSN 1080-6059.

14. HORNE R. W., *Methods in virology*, Accademic press New York – London 1967, 3. vyd., 521.

15. HOŠEK J.: *Přehled klasických a moderních mikroskopických metod* [online], Aplikovaná optika a mikroskopie 2008, <http://www.fsid.cvut.cz/cz/U2102/hosek/clanky/Mikroskopie.pdf>, [cit. 20.11. 2008].

16. KALINA T., *Základy elektronové mikroskopie*, Univerzita Karlova, 1981.

17. KAPOUN J.: *Věk elektronové mikroskopie* [online], Science World 2003, <http://scienceworld.cz/fyzika/vek-elektronove-mikroskopie-3018>, 27. květen [cit. 20.11. 2008].

18. KARLÍK M.: *Pohled na atomy: Vysokorozlišovací elektronová mikroskopie* [online], Rozhledy matematicko-fyzikální 1995, roč. 72, č. 4, 215 – 222, http://rumcajs.fjfi.cvut.cz/fyzport/FT/2004/Difrakce/Rozhledy_TEM_iso.htm, [cit. 20.11. 2008], ISSN 0035-9343.

19. KARLÍK M., *Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů* [online], Československý časopis pro fyziku, 2005, roč. 55, 457- 464, http://rumcajs.fjfi.cvut.cz/fyzport/FT/2004/Difrakce/05_Karlik_CsCAsFyz_manu.pdf, [cit. 20.11. 2008], ISSN 0009-0700.

20. KELLEN A. E., HATHWAY A. E., McLEOD D. A., *Rapid detection of australia – SH antigen and antibody by a simple and sensitive techniques of immunoelectronmicroscopy*, Ca. J. Microbiol 1971, roč. 17, č. 7, 993 – 1000.
21. KRAUS I.: *První století rentgenových paprsků* [online], Vesmír 1995, roč. 74, č. 9, 504. <http://www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=5051>, [cit. 20.11. 2008], ISSN 1214-4029.
22. KUBÍNEK R., *Elektronová mikroskopie* [online], 2003, <http://apfyz.upol.cz/ucebnice/down/elmikro.pdf>, [cit. 10.1. 2009].
23. LEDNICKÝ F.: *Pohledy do mikrosvěta* [online], 2005, <http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/32lednický.pdf>, [cit. 20.11. 2008].
24. MEDITORIAL, s.r.o., *Virus klíšťovky* [online], <http://www.klistovancefalitida.cz/virus-klitovky>, [cit. 24.3. 2009], ISSN 1802-5536.
25. NEBESÁŘOVÁ J.: *Elektronová mikroskopie pro biology* [online], <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/1.0.html>, [cit. 12.11. 2008].
26. OHI M., LI Y., et al., *Negative Staining and Image classifications – Poverful Tools in Modern Electron Microscopy* [online], Biol. Proced. Online 2004, roč. 6, č., 1 <http://76.162.25.80/bpo/arts/1/70/m70.pdf>, 23 – 34, [cit. 10.1. 2009], ISSN 14809222.
27. ORDÓÑEZ N. G., *The diagnostic utility of immunohistochemistry and electron microscopy in distiguishing between peritonel mesotheliomas and serous carcinomas: a comparative study*[online] , Modern pathology 2006, roč. 19, č. 3, 34 – 48,

<http://www.nature.com/modpathol/journal/v19/n1/pdf/3800471a.pdf>, [cit. 10.1. 2009],
ISSN 0893-3952.

28. PODSTATOVÁ H., *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*, Epava 2001, 18 – 138, ISBN 80-86297-07-1.

29. ROBINSON D. G., EHLERS U., HERKEN R., a kol., *Methods of Preparation for Electron Microscopy*, Berlin, Springer – Verlag, 1987, 76 – 80.

30. RÝC M., ČIAMPOR F., WAGNER M., *Elektronová a imunoelektronová mikroskopie ve virologii*, Avicentrum, Zdravotnické nakladatelství, Praha, 1989

31. SCHRAMLOVÁ J.: *Elektronová mikroskopie ve virologické diagnostice*, Zprávy CEM (SZÚ Praha) 2003, roč. 12, č. 1, 26-27.

32. SCHRODER J. A., GELDERBLOM H. R. et al., *Microwave – assisted tissue precessing for same – day EM – diagnosis of potential bioterorism and clinical samples*, Micron 2006, roč 37, č. 6, 577 – 590, ISSN: 0968-4328.

33. VONDRÁŠKOVÁ Š., *Virus mozaiky tabáku může produkovat přirozený isekticid* [online], Agronavigátor, 2008,
<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=74123&ids=117>, [cit. 29.3. 2009]

34. VOTAVA M. a kol., *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun 2003, 238 – 293, ISBN 80-902896-6-5.

35. WIKIPEDIE, *Transmission electron microscopy* [online],
http://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy, [cit. 20.11. 2008]
36. WIKIPEDIE, *Klíšťová encefalitida* [online],
http://cs.wikipedia.org/wiki/Kl%C3%AD%C5%A1%C5%A5ov%C3%A1_encefalitida,
[cit. 24.3. 2009]
37. WIKIPEDIE, *Virus tabákové mozaiky* [online],
http://cs.wikipedia.org/wiki/Virus_tab%C3%A1kov%C3%A9_mozaiky, [cit. 24.3. 2009]
38. WIKIPEDIE, *Tobacco mosaic virus* [online],
http://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco_mosaic_virus, [cit. 24.3. 2009]
39. WIKIPEDIE, *Virus* [online], <http://cs.wikipedia.org/wiki/Viry>, [cit. 24.3. 2009]
40. WIKIPEDIE, *Plasmodesma* [online], <http://cs.wikipedia.org/wiki/Plasmodesma>,
[cit. 24.3. 2009]

8. KLÍČOVÁ SLOVA

Formvar

Kyselina fosfowolframová (PTA)

Molybdenát amonný (AM)

Negativní kontrast

Transmisní elektronový mikroskop

Uranyl acetát (UA)

Virus klíšťové encefalitidy

Virus tabákové mozaiky (TMV)

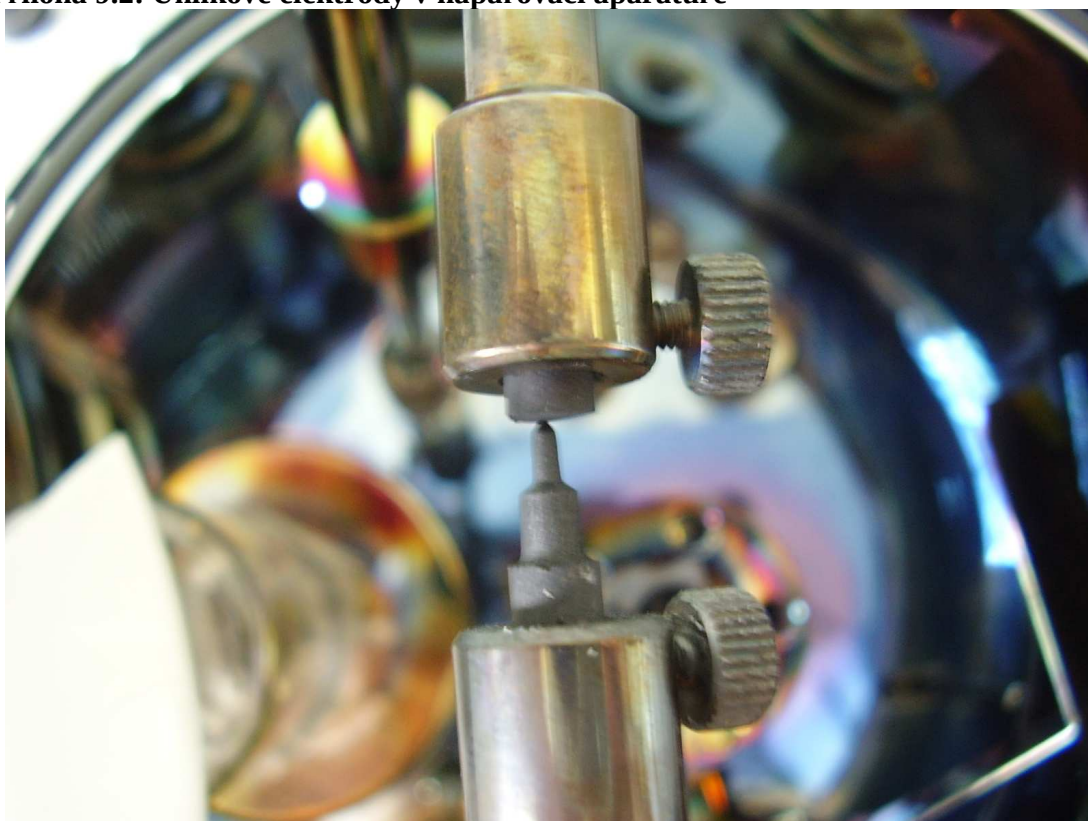
9. PŘÍLOHY

Příloha 9.1: Aparatura pro napařování uhlíku



Zdroj: Vlastní výzkum
(Laboratoř elektronové mikroskopie–Biologické centrum AVČR–Parazitologický ústav)

Příloha 9.2: Uhlíkové elektrody v napařovací aparatuře



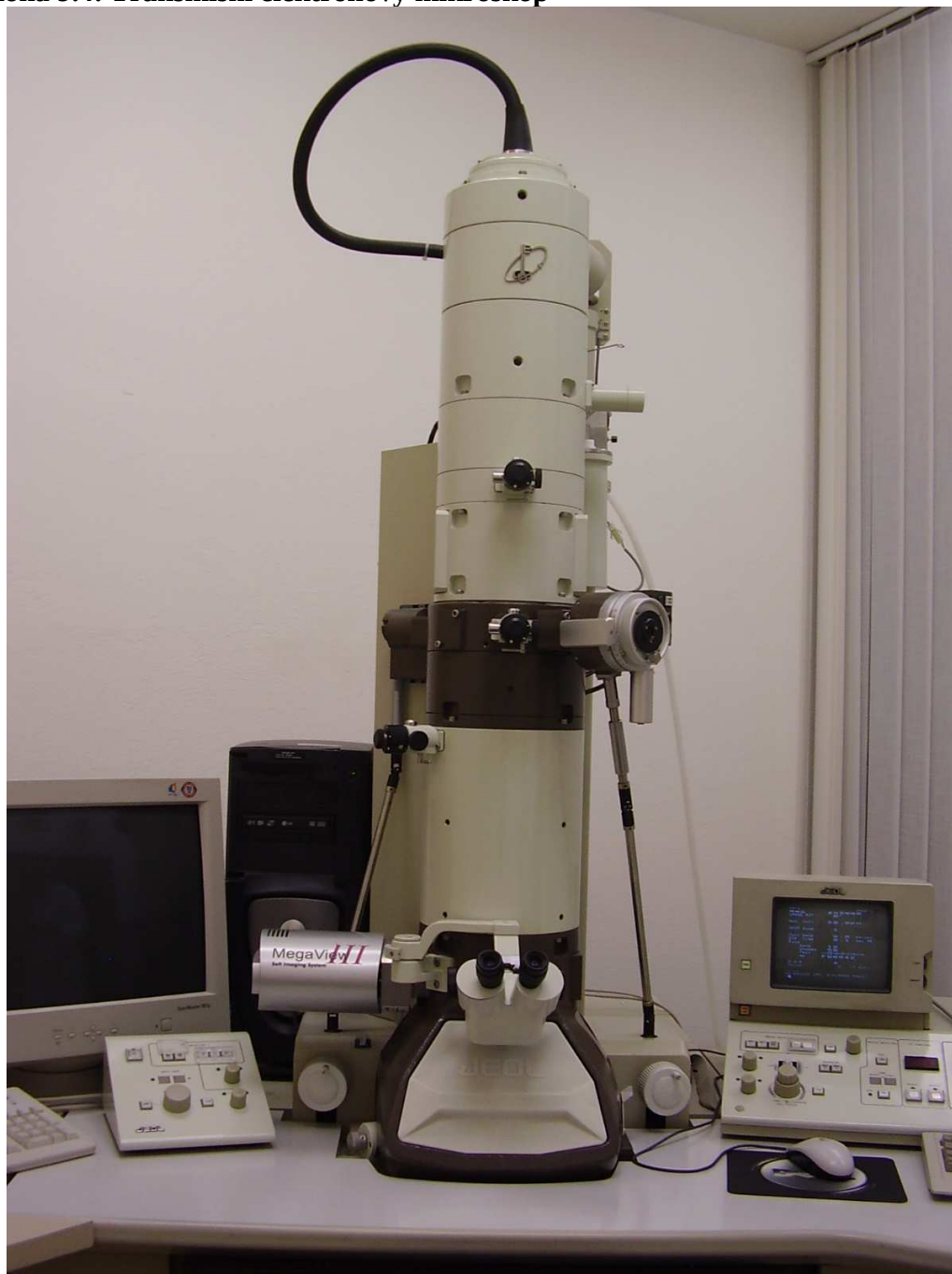
Zdroj: Vlastní výzkum
(Laboratoř elektronové mikroskopie–Biologické centrum AVČR–Parazitologický ústav)

Příloha 9.3: Měděná síťka na kapce destilované vody



Zdroj: Vlastní výzkum
(Laboratoř elektronové mikroskopie–Biologické centrum AVČR–Parazitologický ústav)

Příloha 9.4: Transmisní elektronový mikroskop



Zdroj: Vlastní výzkum
(Laboratoř elektronové mikroskopie–Biologické centrum AVČR–Parazitologický ústav)