




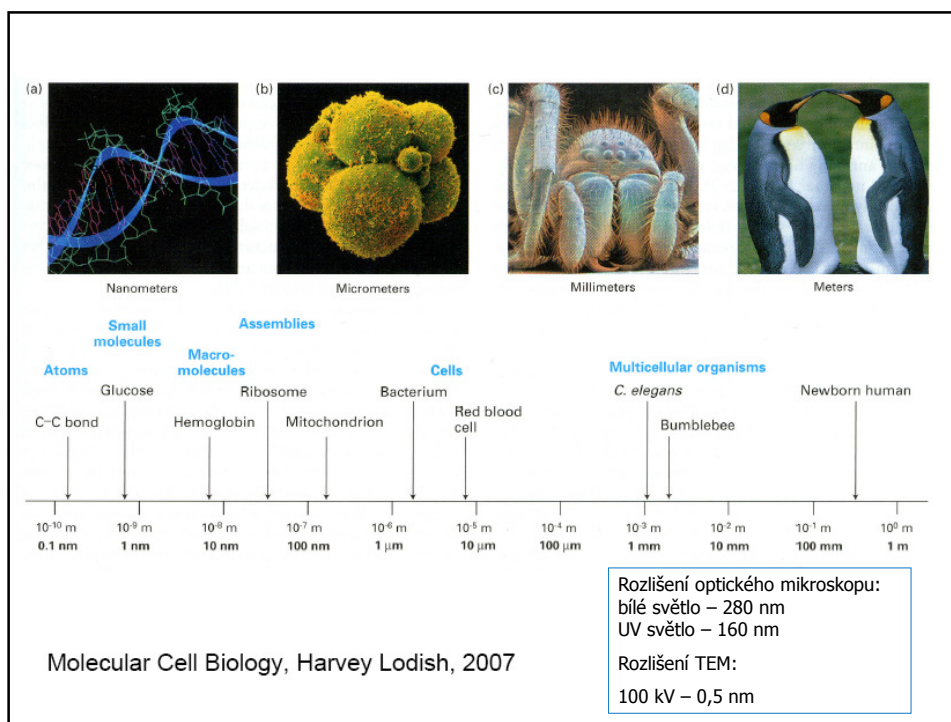
Biologická elektronová mikroskopie

Jana Nebesářová
Laboratoř elektronové mikroskopie
PřF UK Praha, BC AV ČR České Budějovice
E-mail: nebe@paru.cas.cz
<http://www.paru.cas.cz/lem/book/index.html>

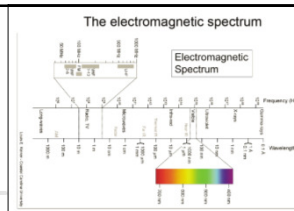


Co je to elektronová mikroskopie?

- Metoda, kdy se ke zkoumání vzorku používá svazku urychlených elektronů
- Získané informace – morfologie (TEM), topologie (SEM), kvalitativní a kvantitativní analýzy (rtg.mikroanalýza), krystalografické vl. (elektronová difrakce)
- Základní rozdělení – transmisní a skenovací elektronové mikroskopy



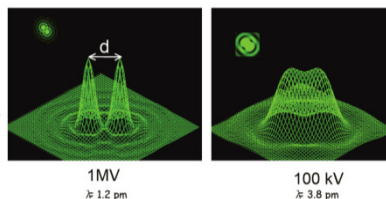
Rozlišovací schopnost mikroskopu



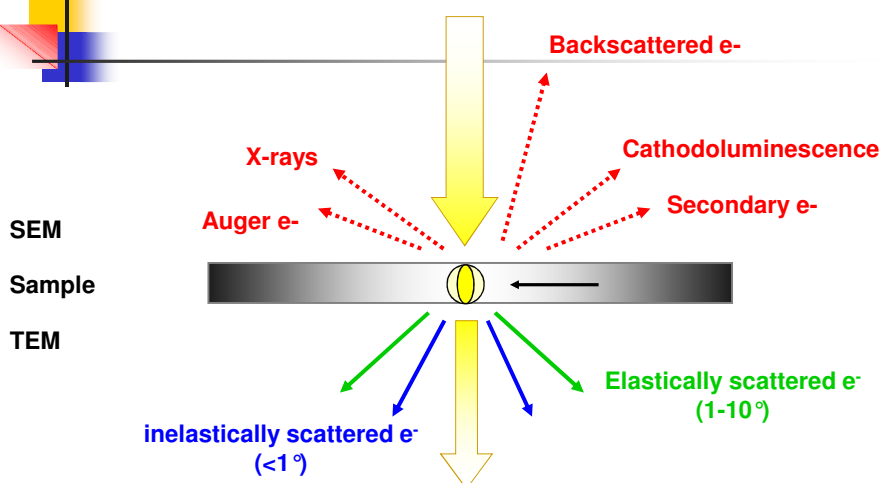
- Nejmenší vzdálenost dvou bodů (bodová) nebo čar (čarová), které je možné v obraze vhodného objektu danou optickou soustavou rozeznat jako oddělené
- Odpovídá zhruba polovině vlnové délky záření použitého k zobrazení objektu
- Abbého vztah: $d = \lambda / (2n \sin \theta)$

Proč elektrony

- Jednoduše získatelné
- Lehké
- Duální charakter:
$$\left. \begin{array}{l} eU = \frac{1}{2} mv^2 \\ \lambda = h/mv \end{array} \right\} \lambda = \frac{h}{(2meU)^{\frac{1}{2}}}$$
- Náboj – možnost ovlivňovat je elektrostatickým nebo elektromagnetickým polem
- Nevýhoda – volně pohybovat se mohou ve vakuu lepším než 10^{-4} torru



Interakce elektronů se vzorkem



Srovnání

	LIGHT MICROSCOPE	ELECTRON MICROSCOPE
<i>The source of illumination</i> ▶	The ambient light source is light for the microscope	Electrons are used to “see” - light is replaced by an electron gun built into the column
<i>The lens type</i> ▶	Glass lenses	Electromagnetic lenses
<i>Magnification method</i> ▶	Magnification is changed by moving the lens	Focal length is changed by changing the current through the lens coil
<i>Viewing the sample</i> ▶	Eyepiece (ocular)	Fluorescent screen or digital camera
<i>Use of vacuum</i> ▶	No vacuum	Entire electron path from gun to camera must be under vacuum

© 2013 FEI

1st TEM

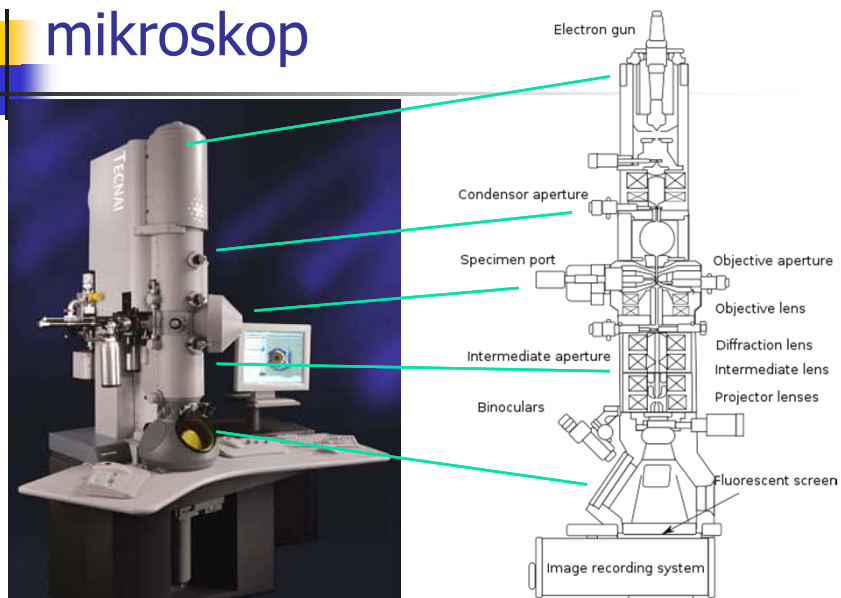


1931 by the German engineers [Ernst Ruska](#) and [Max Knoll](#)



Williams B D, Carter C B, Transmission Electron Microscopy

Transmisní elektronový mikroskop

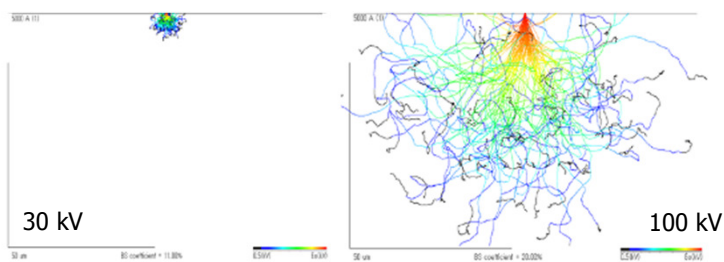


Příprava biologických vzorků pro TEM

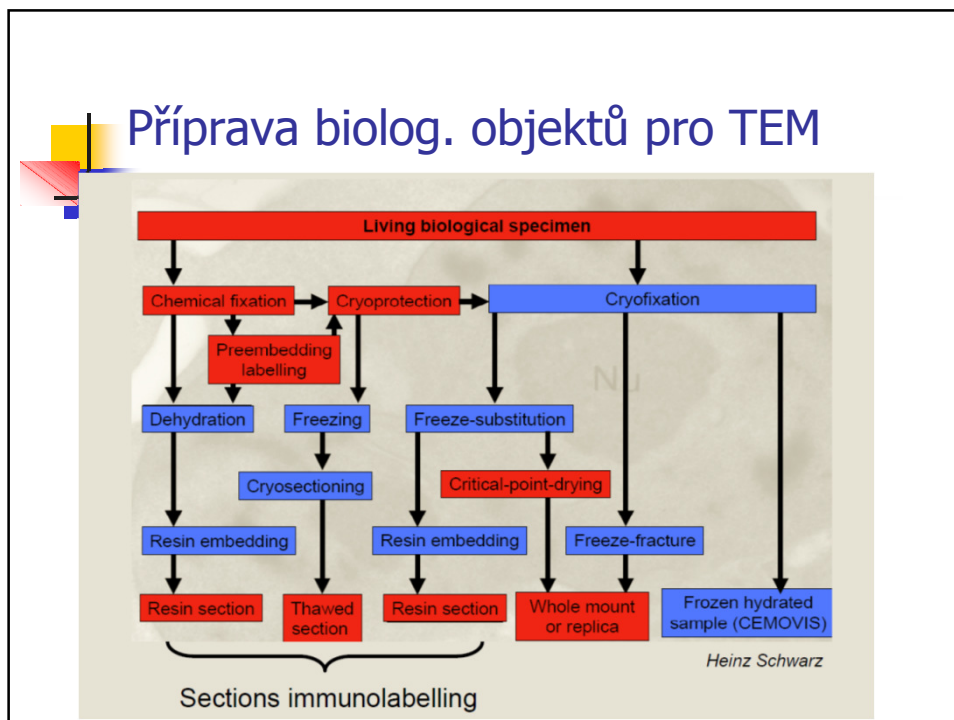
Vakuum uvnitř mikroskopu = nutnost zbavit preparát vody

Malá penetrační schopnost primárních elektronů v TEM =
tloušťka preparátu do 100 nm

- totální preparáty (bakterie viry, buněčné organely....)
- ultratenké řezy

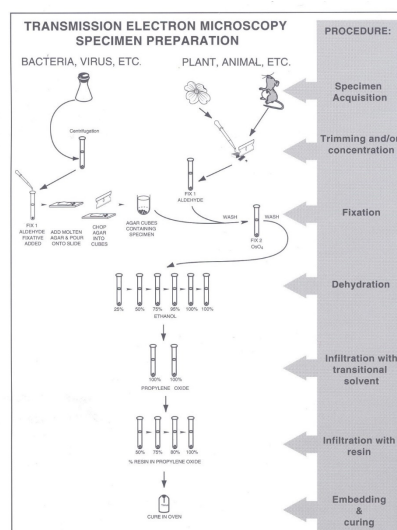


Příprava biolog. objektů pro TEM

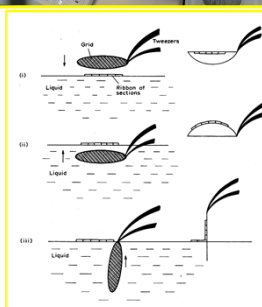
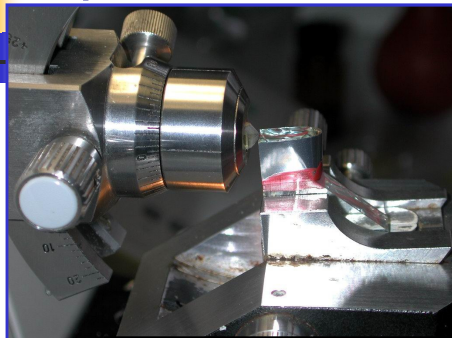


Chemické metody zpracování vzorku pro TEM:

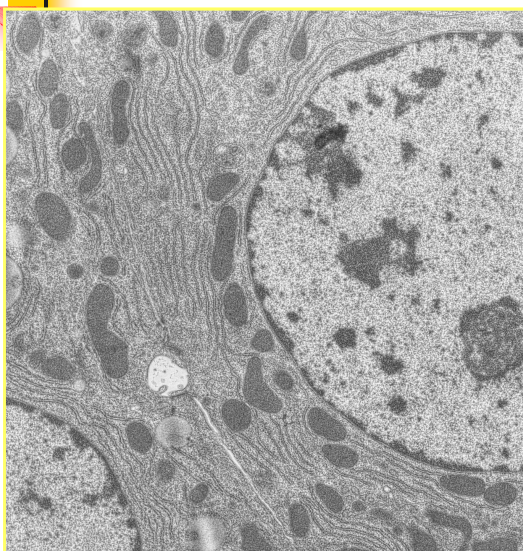
- Fixace
- Dehydratace
- Infiltrace
- Zalévání
- Příprava ultratenkých řezů
- Kontrastování



Příprava ultratenkých řezů



Aplikace: Buněčná ultrastruktura



Živočišná a rostlinná buňka



Aplikace: Imunolokalizace

Top side: HBA15nm

Bottom side: BSA6nm

11/28/2013	HV	WD	curr	HPW	det	mode	dwell	400 nm
12:14:00 PM	30.00 kV	5.9 mm	86 nA	2.07 um	STEM III	BF	10 us	Helios 7:10:53

Aplikace: 3D rekonstrukce

a

FEG

+70°

0°

-70°

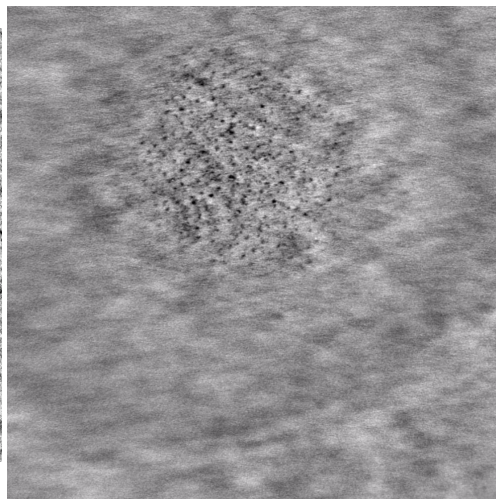
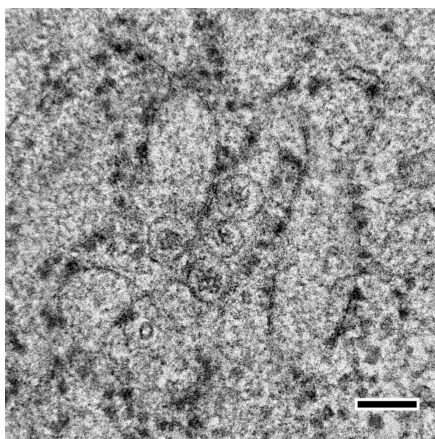
CCD camera

3D-object => set of 2D-projections

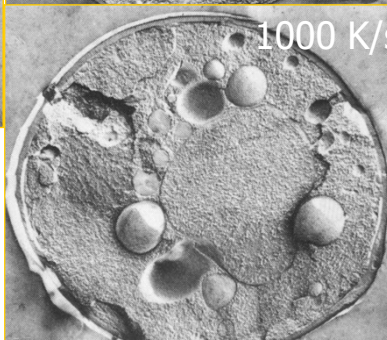
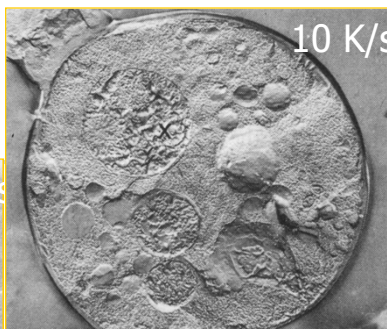
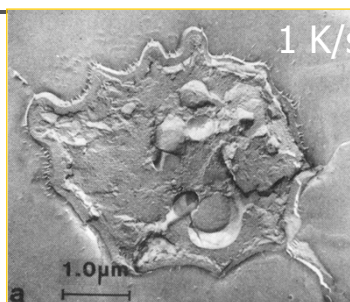
2D-projections => 3D-reconstruction

Grünwald et al, 2003

Aplikace: Elektronová tomografie



Mrazové metody

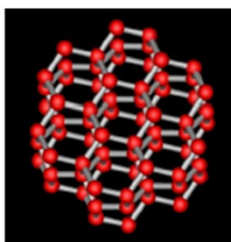


Rychlost mrazení $> 10^5$ K/s

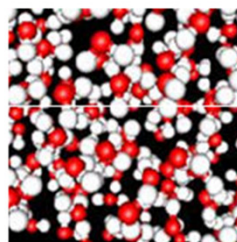
Robards AW, Sleytr UB, Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy. In: *Practical Methods in Electron Microscopy*, Glauert AM (ed), vol 10, Elsevier, Amsterdam, 1985.

Vitrifikace

(z latinského vitreum) transformace látky ve sklo



Krystalický led
- nižší hustotu, větší objem
než kapalná voda



Vitrifikovaný led
- zhruba stejnou hustotu
jako voda
-bez segregace rozpouštědla
a rozpuštěných látek

Jak dosáhnout vitrifikovaného ledu?

1/ rychlým mrazením ($>5 \times 10^{-5} \text{K/s}$) (teplota skelného přechodu -135°C musí být dosažena během milisekund)

Plunge freezing

2/ Mrazení při vysokém tlaku

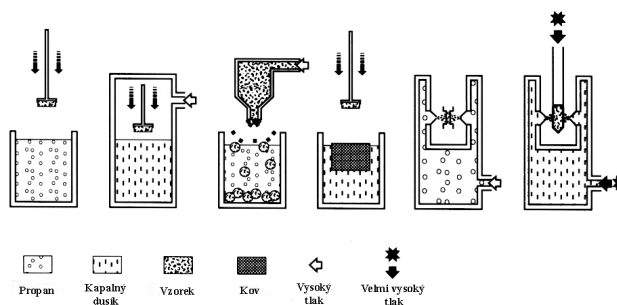
High pressure freezing

3/ Použití kryoprotektantu během mrazení

Metoda Tokuyasu

Mrazová fixace

Způsoby provedení



Maximální hloubka kryofixace

10 - 20 μm

100 - 200 μm

Kryoultramikrotomie



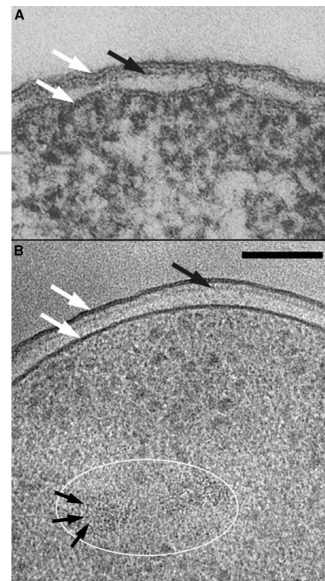
Příprava ultratenkých řezů ze zmrazených preparátů při teplotách pod -80°C

CEMOVIS

The ultrastructure of outer membrane of gram negative bacteria:

- A. *Escherichia coli*
B. *Pseudomonas aeruginosa*

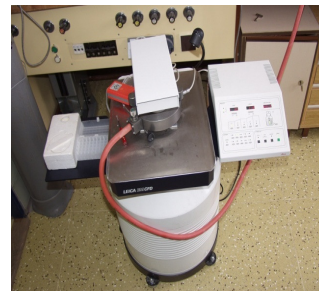
- A. Image of staining agent distribution
B. Contrast of unaltered native specimen

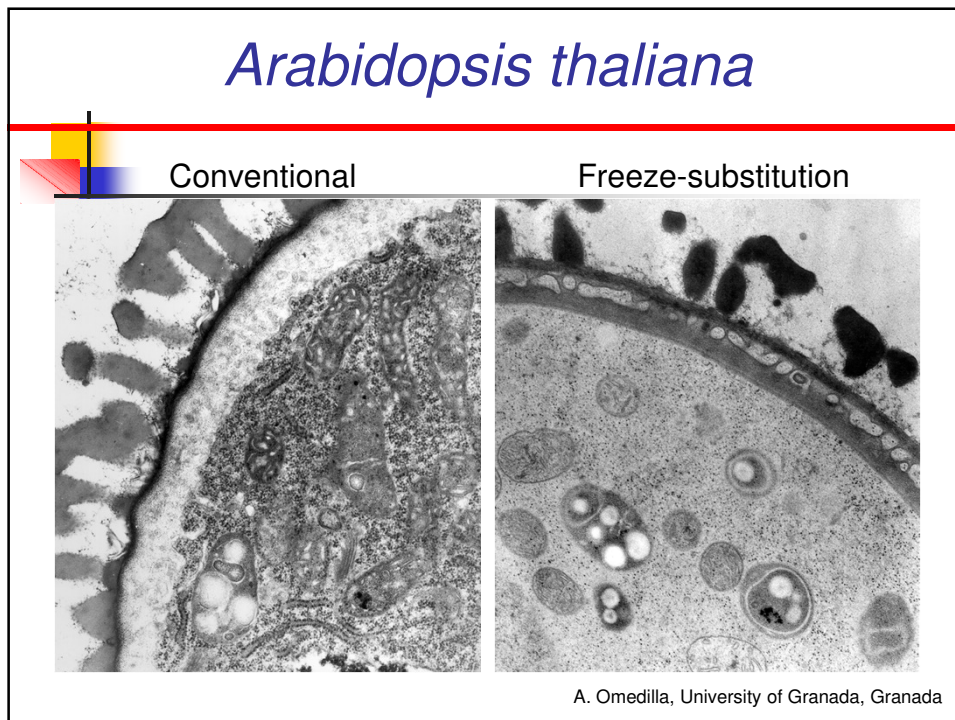
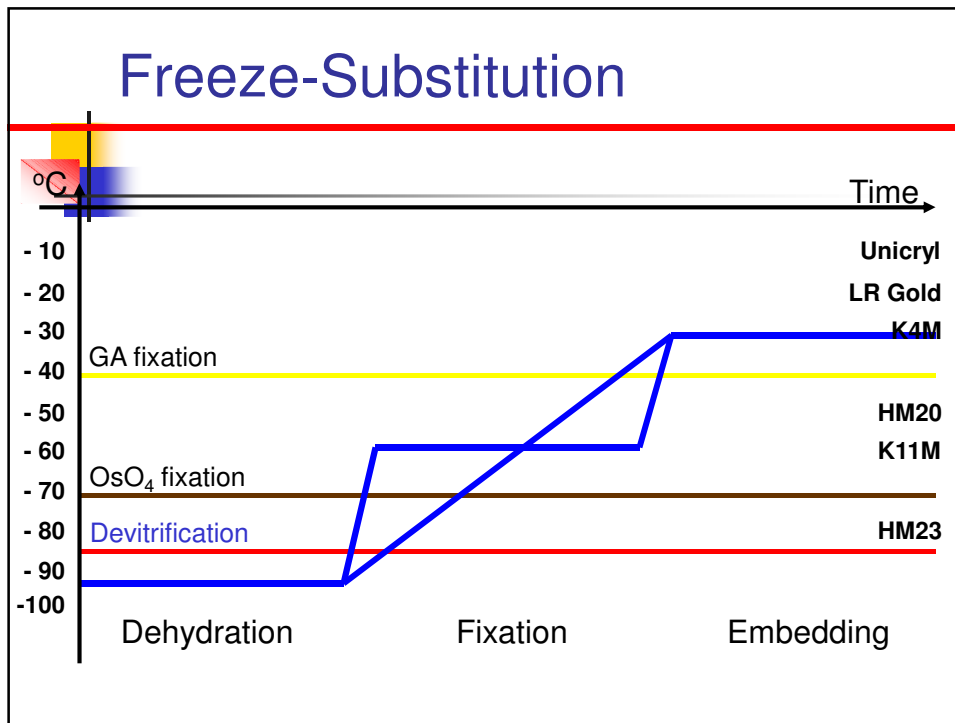


**A. Al-Amoudi et al.: Cryo-electron microscopy of vitreous sections
EMBO Journal (2004) 3583-3588**

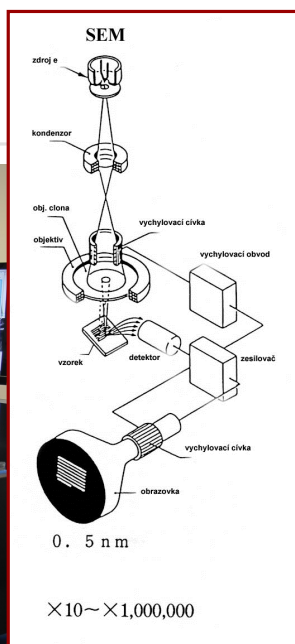
Freeze substitution

- Kombinace chemických a kryo metod
- Led v zmrazeném vzorku je nahrazen při nízkých teplotách bezvodým organickým rozpouštědlem a následně prosycen zalévacím médiem.
- Organické rozpouštědlo musí být kapalné pod rekrystalizační teplotou a musí se v něm rozpouštět fixační činidla jako GA nebo OsO_4
- Polymerizace pomocí UV

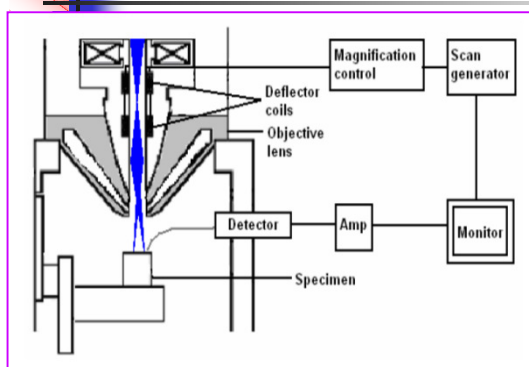




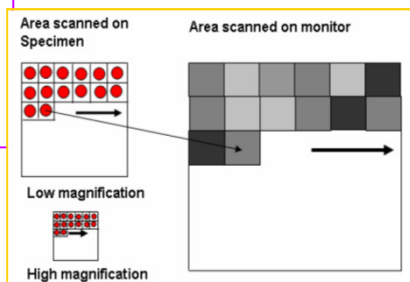
Skenovací elektronový mikroskop



Scanning electron microscope

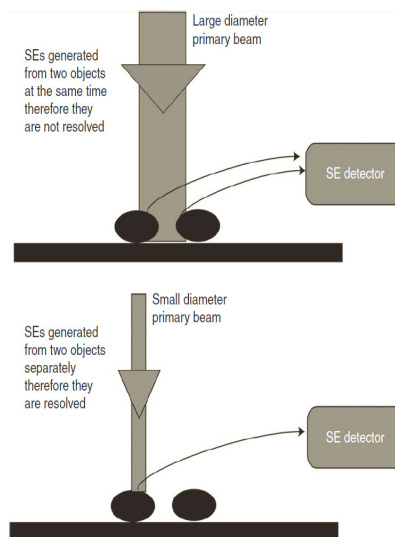
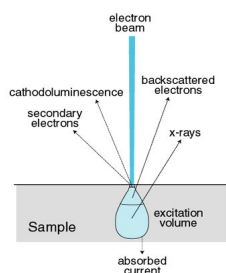


Magnification = area scanned on the monitor / area scanned on the specimen



Resolution of SEM

- Diameter of the primary electron beam
- High resolution = equipped with field emission cathode
- High vacuum 10^{-9} Pa



Goldberg M.W.: Methods in Cell Biology, Vol.88, 2008

Příprava biologických vzorků

Chemicky:

- Fixace
- Odvodnění
- Sušení
- Pokovení



Fyzikálně:

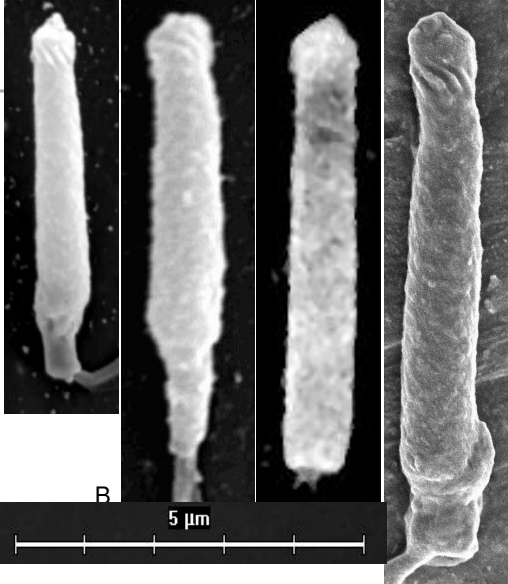
- mrazové metody



Comparison of sperm size

Size distribution of sturgeon sperms in SEM depends on the method of preparation:

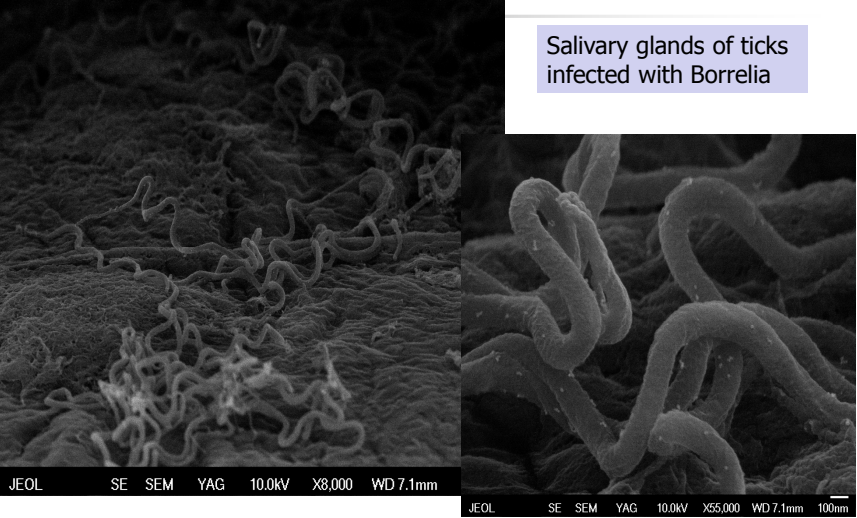
- A/ CPD drying
- B/ t-butylalcohol
- C/ ESEM
- D/ cryo-SEM



Pšenička et.al.: Micron, 41(5), 2010

Immunolocalisation:

Salivary glands of ticks infected with Borrelia



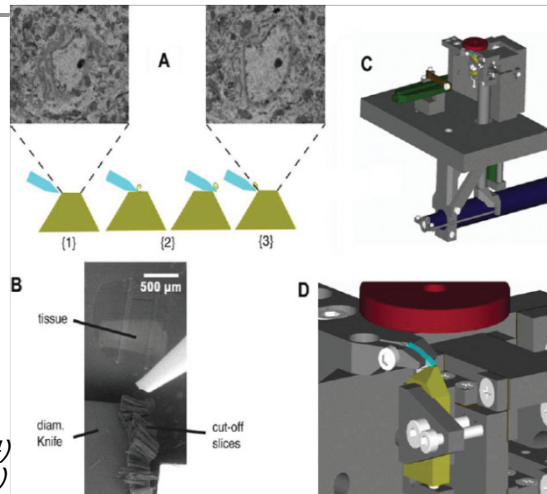
JEOL SE SEM YAG 10.0kV X8,000 WD 7.1mm

JEOL SE SEM YAG 10.0kV X55,000 WD 7.1mm 100nm

3D reconstruction

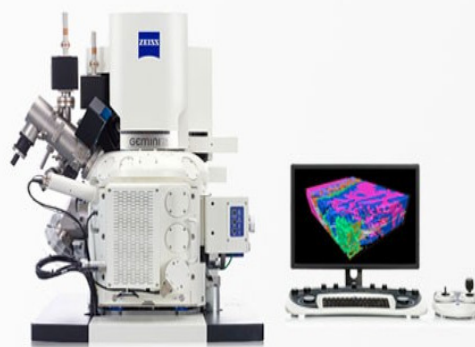
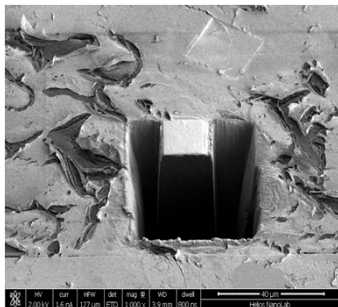
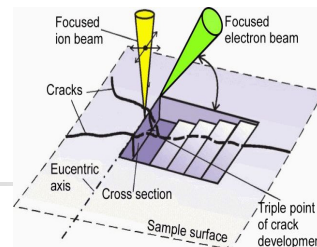
- Ultramikrotom v komoře SEM

(Denk W., Horsmann H. (2004) PloS Biology 2(11) 1901-1909)



3D reconstruction

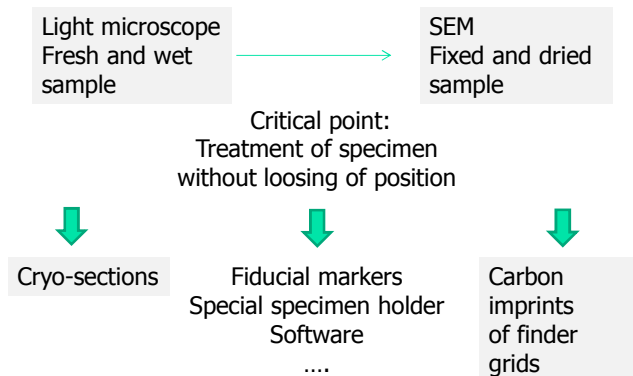
Using focused gallium ion beam (FIB) to thin/mill a specimen block or to create sections for tomography



3D imaging using dual beam



Correlative light and electron microscopy (CLEM)



CLEM

Cells

Fixation

Cryoprotection

Cryosectioning glass slides with carbon imprints - see Fig 2

Immunostaining 1 1st LCA biot 1st anti- α 1,3Fuc
2nd strept-FITC 2nd Ab-QDs

DAPI

FLM

Immunostaining 2 anti-FITC
10nm Au NP

Fixation

Postfixation OsO₄

Dehydration

Drying (CPD)

Carbon coating

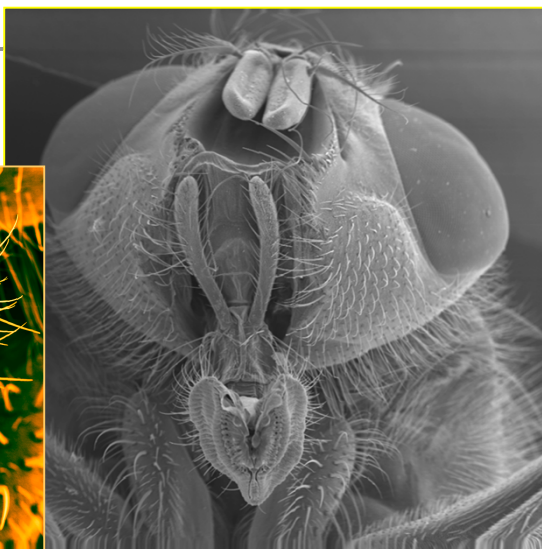
FE-SEM

CLEM

JEOL SE SEM YAG 5.0kV X150,000 WD 8.0mm 100nm

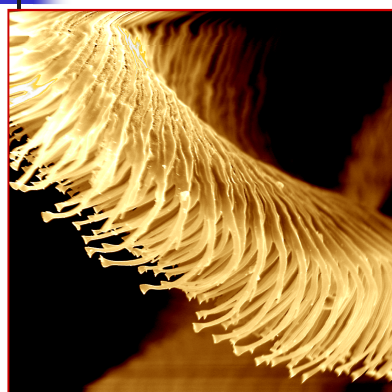
Mikrosvět kolem nás

Bzučivka obecná



Mikrosvět kolem nás

Bzučivka obecná





Děkuji za
pozornost

Cryo-SEM:
Larva Chymomyza
Costata (Drosophilidae)

