

Elektronová mikroskopie – okno do nanosvětla

Jana Nebesářová, Jiří Týč

Žijeme v moři neviditelných předmětů, které nás ovlivňují a působí na nás. Příkladem mohou být viry, které jsou považovány za nejmenší organismy. Některé z nich mohou napadat člověka a působit mu zdra-

voťní obtíže, jako je třeba klíšťová encefalitida. Jejich velikost se pohybuje v intervalu od 16 do 300 nm (jeden nm je miliontina milimetru nebo jinak 10^{-9} m), jsou tedy pro lidské oko zcela neviditelné. K tomu, aby-

chom mohli studovat jejich strukturu nebo životní cyklus, potřebujeme velmi výkonné mikroskopy s dostatečnou rozlišovací schopností. Tu jsou schopny poskytnout pouze elektronové mikroskopy.

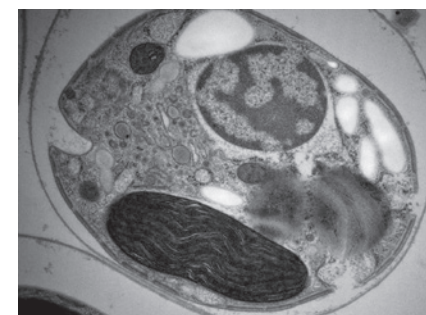
Prozařovací (transmisní) elektronová mikroskopie (TEM)

Prozařovací (transmisní) elektronová mikroskopie je metoda, která nám umožňuje vidět nejjemnější detaily vnitřního uspořádání buněk, bakterií, virů, ale i složek, z nichž se skládají, např. biologických makromolekul, jako jsou bílkoviny a nukle-

ním prohlížením vzorek zbavit veškeré vody a připravit jej v tenké vrstvě s tloušťkou pod 100 nm, což odpovídá zhruba jedné tisícině tloušťky archu běžného kancelářského papíru. Přičteme-li k tomu vliv rozkladných procesů u biologického materiálu, které probíhají velmi rychle, musíme téměř všechny biologické objekty upravit, fixovat, odvodňovat,

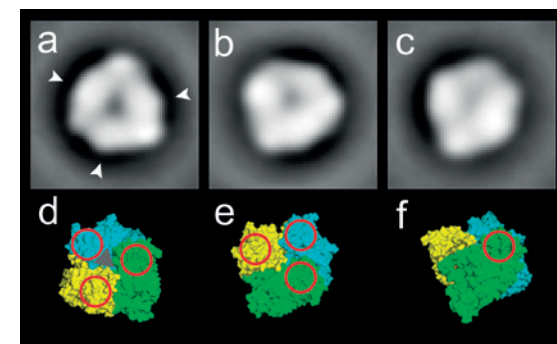
zalévat do pryskyřice a nakonec krájet do podoby ultratenkých řezů s tloušťkou mezi 50-70 nm. Další, modernější možností, která umožňuje zobrazit detailní buněčnou strukturu blíže živému stavu, je zmrazit vodu ve vzorku tak, aby vznikl amorfní nekrytalický led. Krystaly by totiž zničily ultrastrukturu vzorku. Led zároveň vzorek zpevní tak že jej lze ve zmrazeném stavu nakrájet do podoby ultratenkých kryo-řezů s požadovanou tloušťkou. Pro použití této metody musí být TEM vybaven chlazeným držákem vzorků, umožňujícím udržovat teplotu hluboko pod nulou, blízko teplotě kapalného dusíku. Výstupem z TEM je snímek pozorované oblasti v buňce nebo struktura daného makromolekulárního komplexu, které jsou zaznamenány digitálně pomocí speciálních kamer.

Dnešní TEM nabízí kromě běžného pozorování připravených vzorků i řadu technicky náročnějších metod, které umožňují najít v buněčné struktuře např. vybranou bílkovinu (imunolokalizace), zkoumat její prostorovou strukturu (jednočásticová analýza) nebo vytvořit třírozměrné zobrazení pozorované oblasti (elektronová tomografie). Pokud je mikroskop vybaven vhodným příslušenstvím, může nám poskytnout informace i o prvkovém složení našeho vzorku (EELS, EDX).

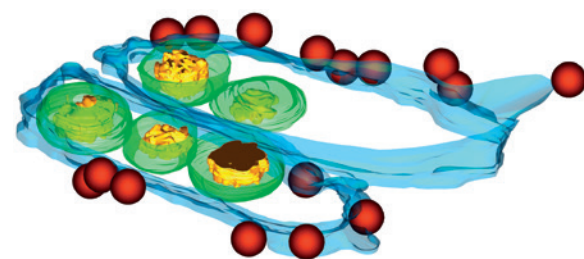


Obr. 1 - Vnitřní struktura řasy *Chromera velia* zobrazená v transmisním elektronovém mikroskopu připomíná smějící se rybičku. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).

ové kyseliny. Tyto informace nám zprostředkovává paprsek urychlených elektronů, které se vysokou rychlostí prohánějí elektronově optickým systémem TEM a procházejí připraveným vzorkem. Výsledkem je zobrazení místa na vzorku, kterým urychlené elektrony prošly, na obrazovce monitoru či pozorovacím stínítku mikroskopu ve velikém zvětšení a rozlišení, které může dosáhnout až desetin nm. Zobrazení biologických vzorků však není úplně jednoduché a je potřeba překonat několik zásadních překážek. Aby se urychlené elektrony mohly rozptýlit pouze na atomech tvořících vzorek, musí být vnitřní prostor TEM vyčerpán na poměrně vysokou hodnotu vakua a navíc musí být vzorek dostatečně tenký, aby jím mohly elektrony projít. V praxi to znamená, že musíme před vlast-



Obr. 3 - Model struktury proteinového komplexu SMO izolovaného ze sírné bakterie *Chlorobaculum tepidum*. Vizualizace pomocí metody jednočásticové analýzy v transmisním elektronovém mikroskopu s vysokým rozlišením. Částice po analýze jednotlivých projekcí nahoře, rentgenová analýza dole. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).



Obr. 2 - Trojrozměrný model endoplazmatického retikula neuronu, ve kterém se množí viry klíšťové encefalitidy. Model byl vytvořen pomocí elektronové tomografie. Viry žlutě, virové váčky zeleně, endoplazmatické retikulum modře a cytoplasmatické ribosomy červeně. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).

Řádkovací (rastrovací, skenovací) elektronová mikroskopie (SEM)

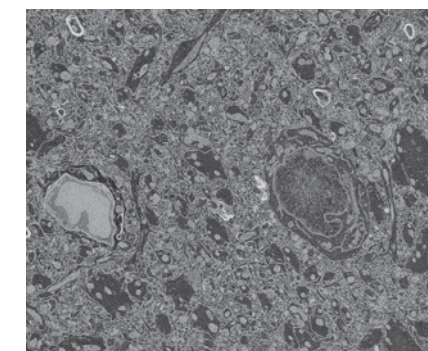
Tato mikroskopická metoda byla v nedávné minulosti určena především pro pozorování povrchové struktury vzorků ve velkém zvětšení a rozlišení. Pro velkou hloubku ostrosti umožňující získat zaostřený snímek i tak složitých objektů, jakými jsou například zástupci hmyzí říše, je v biologickém výzkumu velmi oblíbená. V sou-

hodnoty vakua. To znamená, že i v tomto případě by preparáty měly být bezvodé. Proto pro pozorování v SEM biologické vzorky musíme zafixovat, odvodnit a vysušit. Poté je nalepíme na vhodnou vodivou podložku a na jejich povrch naprášíme tenkou vrstvu dobře vodivého kovu, která zabrání nabíjení povrchu preparátu při jeho ozařování elektronovým paprskem a zvýší kontrast. Pokud nemůžeme vodu ze vzorku odstranit, můžeme použít postup zmrazení preparátu a jeho prohlížení ve zmrazeném stavu v kryo SEM. Další možností je použít SEM, který je schopný pracovat v režimu nízkého vakua, kdy je dokonce možné prohlížet i zcela zavodněný vzorek (environmentální SEM).

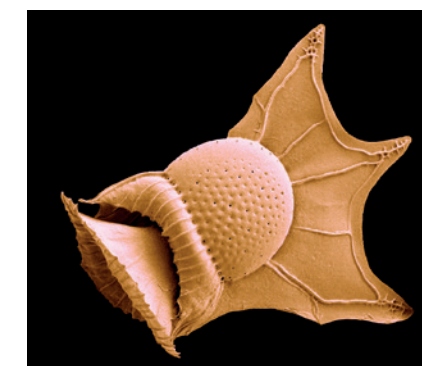
Současně řádkovací elektronové mikroskopy umožňují i uspořádání, při kterém je paprsek elektronů vychylován stejně jako ve standardním SEM, ale k tvorbě obrazu se používají elektrony, které prošly vzorkem (skenovací transmisní elektronový mikroskop STEM). V tomto případě vzorky musí mít podobu ultratenkých řezů a SEM musí být vybaven detektorem prošlých elektronů.

Nejmodernější technologie již umožňuje i trojrozměrné zobrazování. Pokud nás zajímá vnitřní uspořádání našeho vzorku, který má vhodnou velikost, můžeme použít několik metod, které jsou založeny na odkrojení tenkého řezu (metoda SBF SEM) či odprášení tenké vrstvy z povrchu vzorku pomocí

koncentrovaného svazku iontů (metoda FIB SEM) a nasnímání obrazu nově odhaleného povrchu pomocí SEM. Vzorek je takto postupně odkrájen či jeho část odprášena v komoře mikroskopu a v průběhu tohoto automatizovaného procesu je získána série snímků, které jsou podkladem pro 3D rekonstrukci odkrájeného či odprášeného objektu. Pro 3D analýzy je třeba vzorky připravit podobným způsobem jako pro TEM, tedy zpevnit je zalitím do pryskyřice, a potom odhalit oblast vzorku, která nás zajímá, odřezáním přebytečné pryskyřice a vzorku v ultramikrotomu.



Obr. 3 - Ultrastruktura mozkové tkáně myši, která je zobrazena ve skenovacím elektronovém mikroskopu Apreo VS pomocí zpětně odražených elektronů. V tomto zobrazovacím módu jsou velmi dobře viditelné struktury obsahující atomy těžkých kovů, např. osmia, které se do vzorku přidávají během přípravy. (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).



Obr. 1 - I když objekt na obrázku připomíná helmici římského bojovníka, jedná se o jednobuněčný organismus patřící mezi mořské obrněnky, který se nazývá *Ornithoecus Magnificus*. Velikost tohoto organismu je pod 100 μ m a určitě budete souhlasit se slovy jejího objevitele, který ji popsal jako jednu z nejužasnějších a nejpodivnějších zvířecích forem. (Počítačově kolorovaný snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu, Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice)

časnosti zažívá skenovací elektronová mikroskopie prudký rozvoj a současné přístroje nabízejí pro biologické objekty velké množství speciálních aplikací.

Tvorba obrazu v SEM je založena na vychylování paprsku primárních elektronů tak, že skenuje vybranou oblast povrchu preparátu. Zároveň se detegují signály uvolňované z povrchu preparátu při průběhu paprsku urychlených elektronů a jejich intenzita je podkladem k vytvoření obrazu na monitoru mikroskopu. Čím menší je průměr dopadajícího svazku elektronů a plocha, kterou skenujeme, tím větší rozlišení bude mít výsledný obraz z mikroskopu.

Signály, které jsou detegovány v SEM, nesou informace o vzorku. Sekundární elektrony nám umožňují dokonale vidět povrchovou strukturu preparátu, zpětně odražené elektrony prozradí, zda je vzorek složen z lehkých či těžkých prvků, a rentgenové záření dokáže dokonce tyto prvky identifikovat.

Stejně jako v případě TEM musí být i vnitřní prostor SEM vyčerpán na vysoké



Obr. 2 - Vysoce rozlišující skenovací mikroskop Apreo (Thermo Fischer Scientific), který je vybaven pro 3D rekonstrukce systémem VolumeScope, je instalován v Laboratoři elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice.