

# Reforma a rozvoj výuky Biofyziky pro potřeby 21. století

Číslo výzvy: **IPo - Oblast 2.2 (výzva 15)**

Reg. č. projektu: **CZ.1.07/2.2.00/15.0215**



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Strategie přípravy biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii

Jana Nebesářová

Biologické centrum AV ČR a Přírodovědecká fakulta JU

České Budějovice

[nebe@paru.cas.cz](mailto:nebe@paru.cas.cz)



## **Proč biologické vzorky nejsou vhodné pro prohlížení v elektronových mikroskopech?**

- obsahují velké množství vody(70-90 %)
- jsou tvořeny lehkými prvky (C,H,O,N...)
- nejsou trvanlivé (autolytické posmrtné procesy)
- pro pozorování v TEM svoji velikostí často přesahují penetrační limit urychlených elektronů (totální preparáty, ultratenké řezy)
- pro pozorování v SEM nejsou suché biologické vzorky dostatečně elektricky a tepelně vodivé

**Je nutné je k pozorování v elektronových mikroskopech upravovat!**

# Jak se zbavit vody



Sušení



Zmrazení



# Sušení



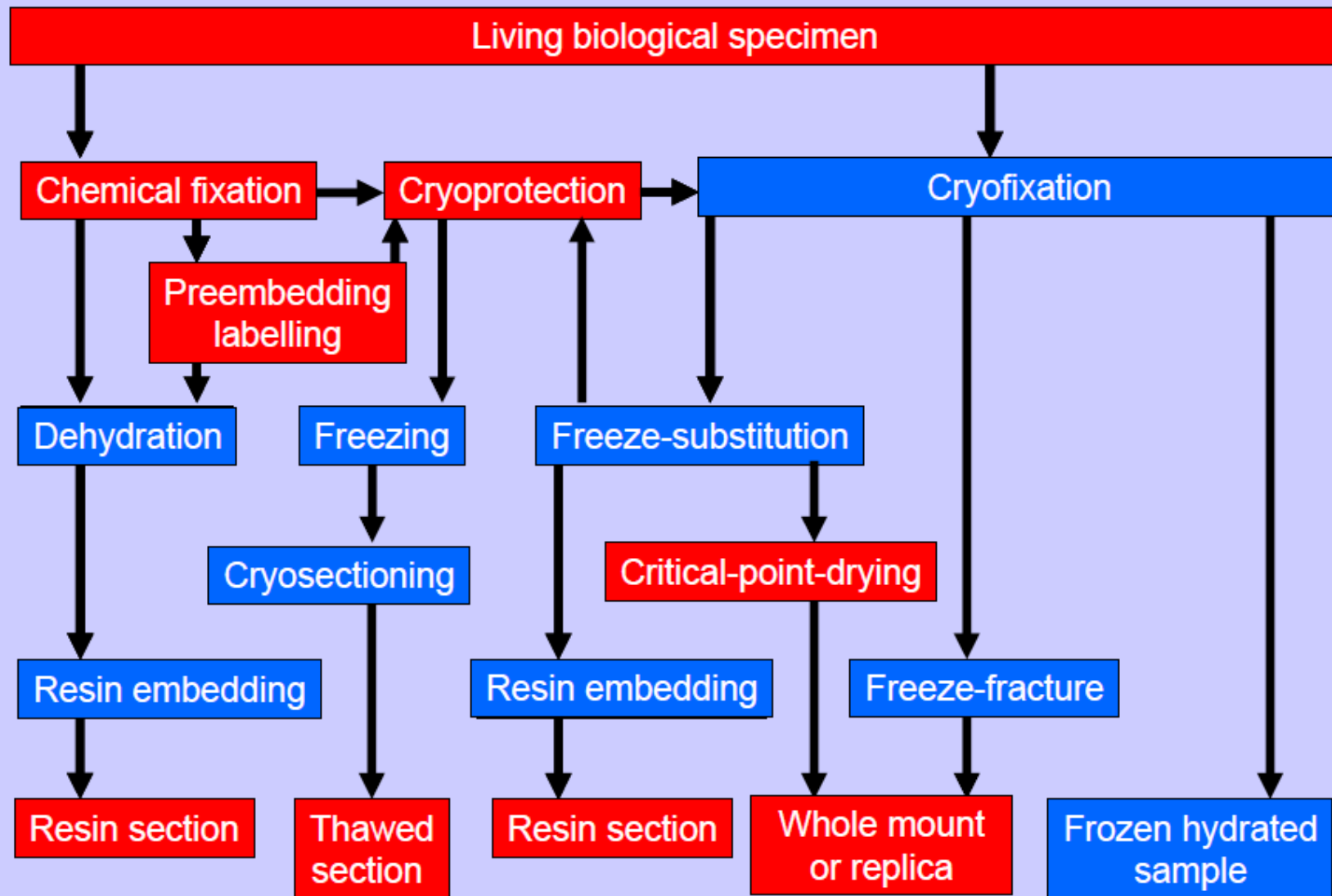
Kent McDonald, UC Berkeley



# Mrazení



Kent McDonald, Berkeley





# Chemické metody zpracování vzorku

**Fixace** - primární: aldehydy (glutaraldehyd), sekundární: oxidační činidla (oxid osmičelý)

**Dehydratace** - nahrazení vody organickými rozpouštědly (aceton, etanol, propylenoxid, amylacetát...)

**TEM**

**SEM**

**Infiltrace** - prosycení vzorku pryskyřicí

**Zalévání** - epoxidové pryskyřice (Epon, Spurr, Durcupan), akrylátové pryskyřice (LR White, Lowicryly)

**Příprava ultratenkých řezů** - z vybrané oblasti se nakrájí řezy tloušťky do 100 nm

**Kontrastování** - adsorpce atomů těžkých kovů na povrch ultratenkých řezů (citrát olova, acetát uranylu)

**Sušení** - metodou kritického bodu, mrazové sušení, alternativní metody

**Lepení**

**Pokovení** - naprášením tenké vrstvy kovu (do 20-30 nm), Au, Pt, slitina Pt a Pa

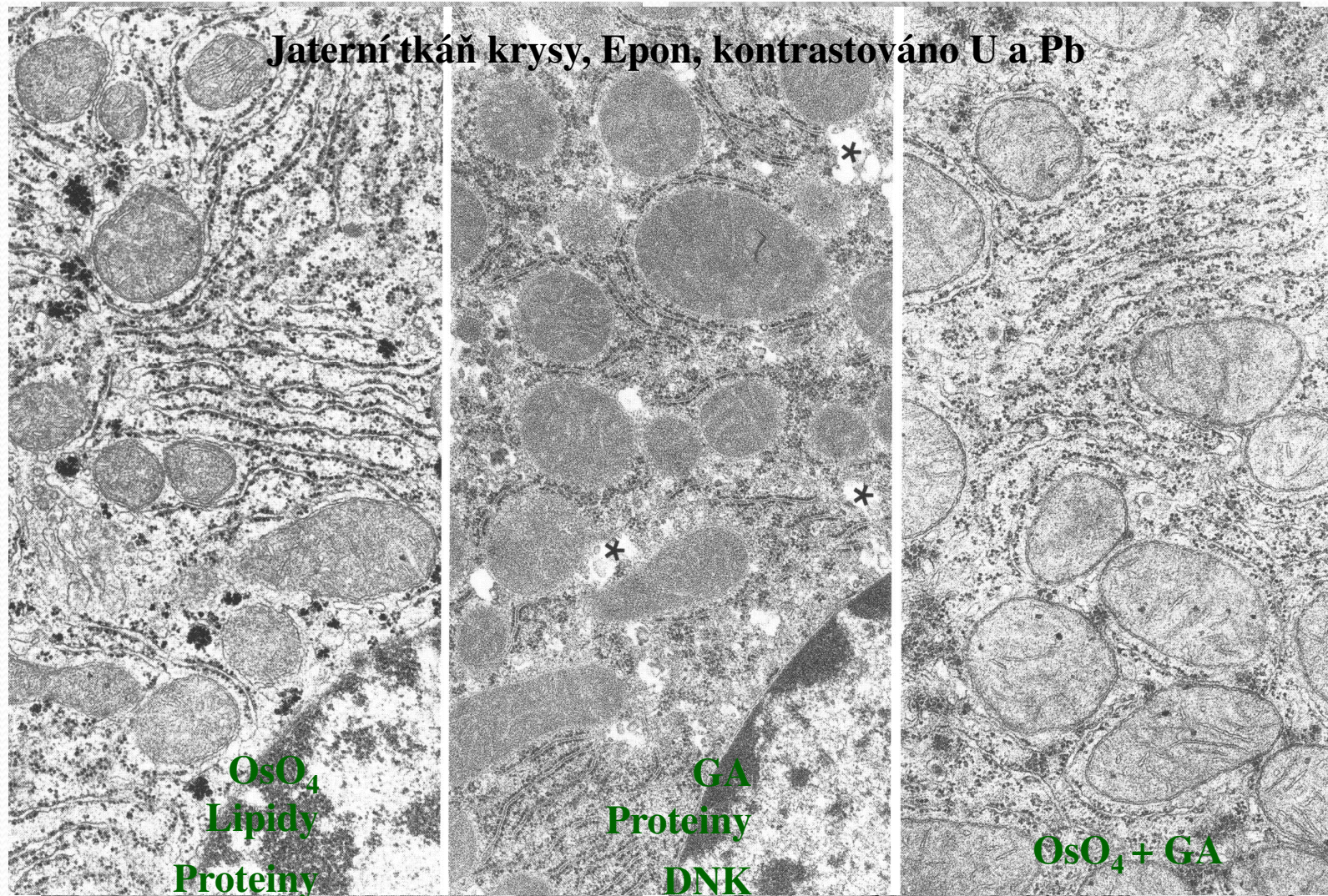
# Fixace

Kvalita fixace je ovlivněna řadou parametrů:

- výběr fixačního činidla, jeho koncentrace ve fixačním roztoku
- složení fixačního roztoku - výběr pufru a jeho koncentrace, přídavky látek ovlivňujících průběh fixace
- velikost fixovaného vzorku a množství fixačního roztoku
- teplota, osmolalita a pH fixačního roztoku
- způsob provedení fixace ( imerzní, perfúzní)
- doba fixace
- mikrovlnné ozáření



# Artefakty způsobené fixací



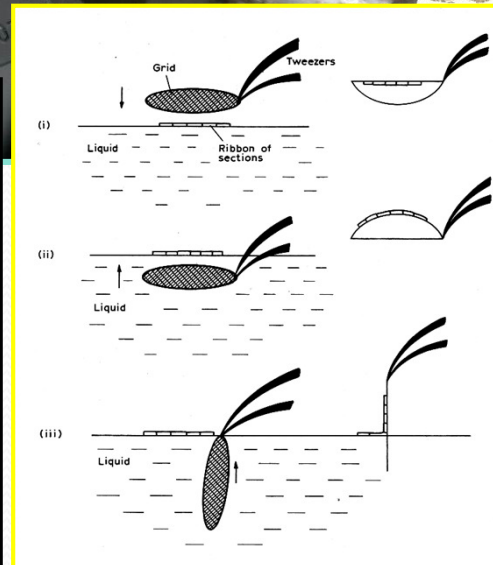
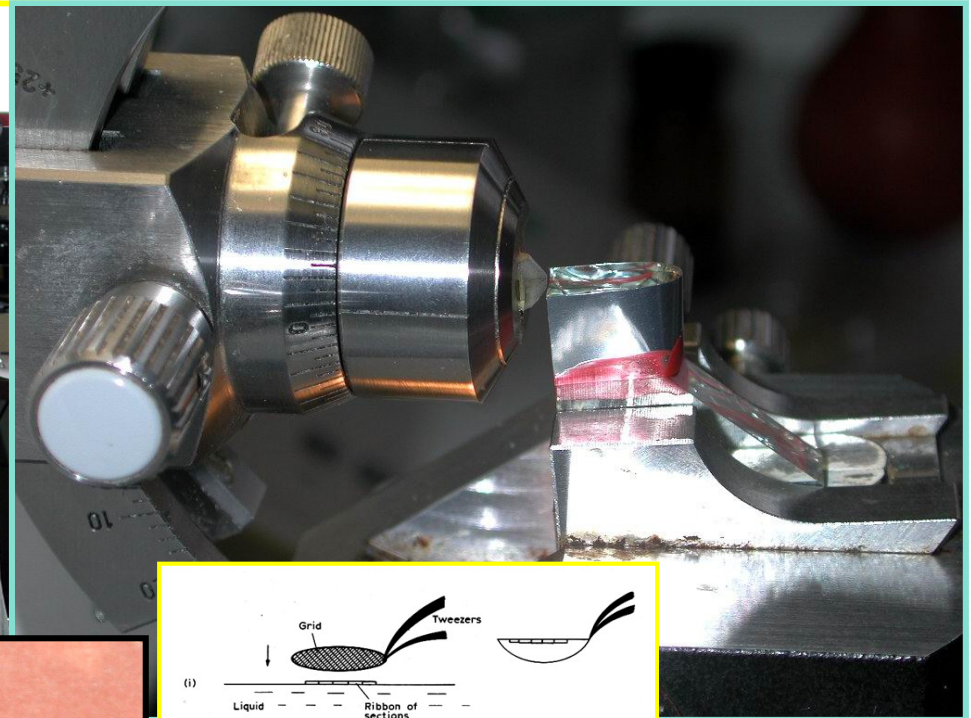


# Příprava ultratenkých řezů



Ultramikrotom

Diamantový a  
skleněný nůž

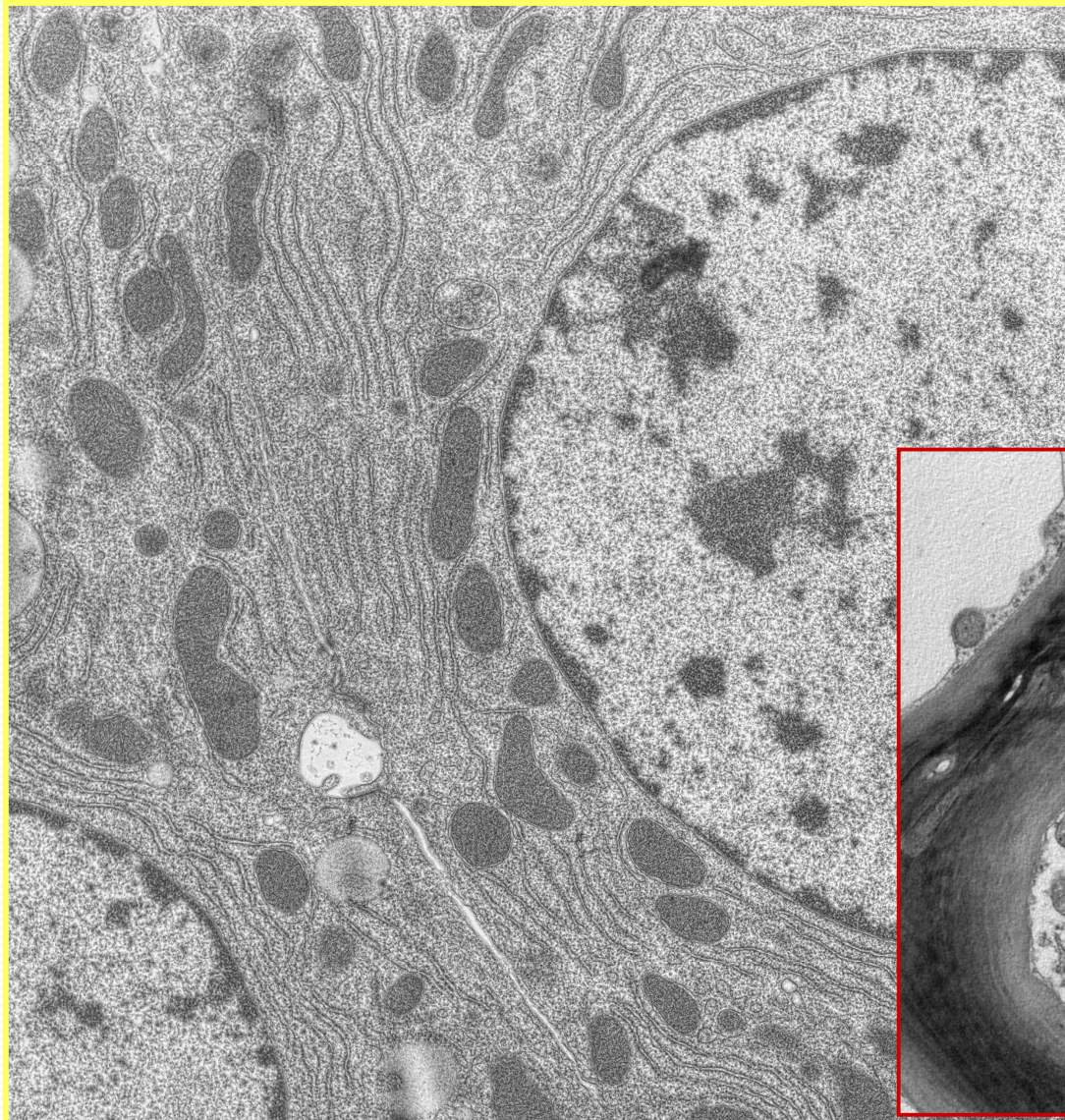


Držák  
Preparátu

Sbírání  
řezů



# Buněčná ultrastruktura



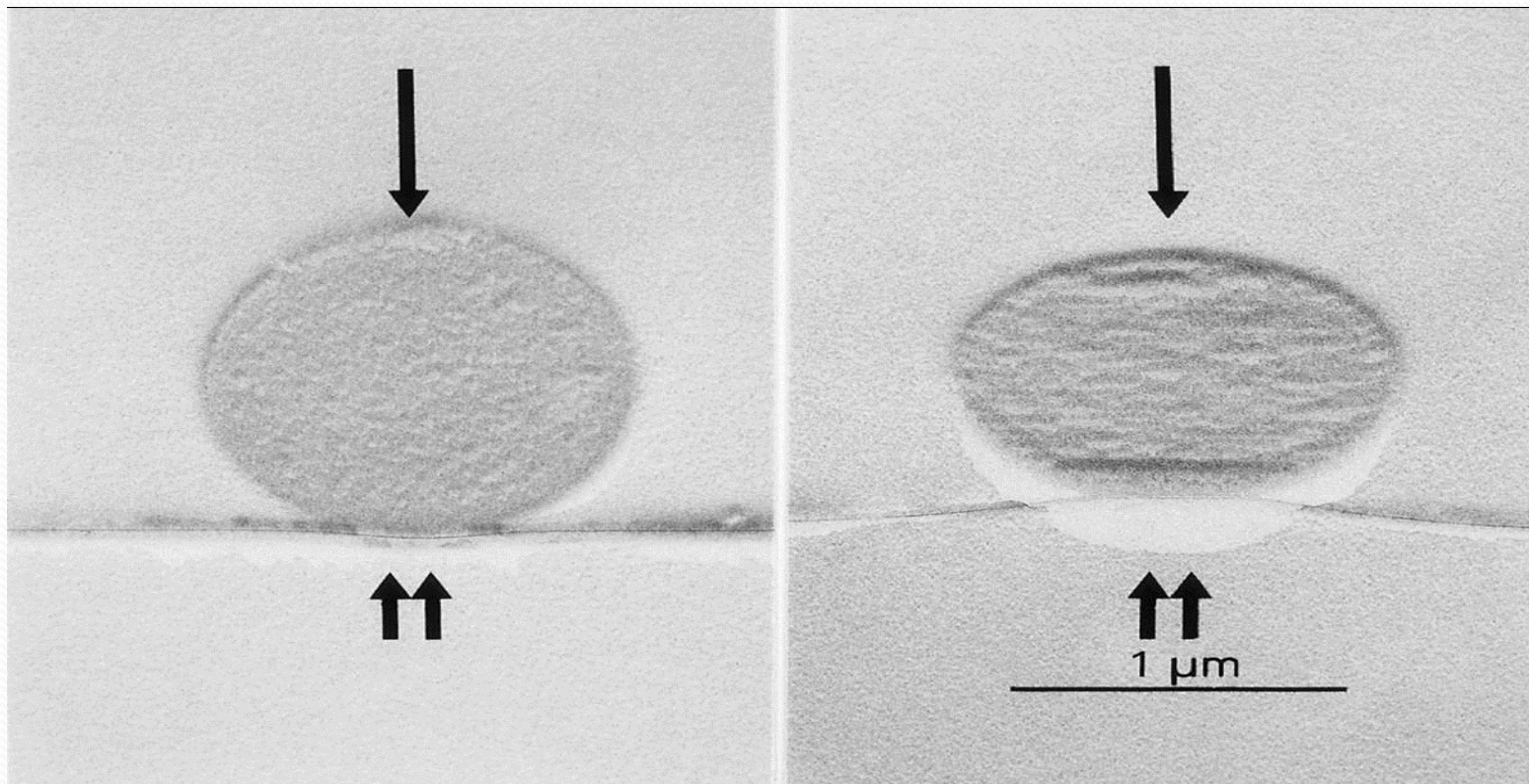
Jaterní buňka



Rostlinná buňka



# Příprava ultratenkých řezů - komprese



Polystyrenové kuličky zalité v Eponu, krájené diamantovým nožem s řezným úhlem 15° (vlevo) a 45° (vlevo) – autor H.Gnaegi

# Oscilující diamantový nůž

D. Studer, H. Gnaegi: Minimal compression of ultrathin sections with use of an oscillating diamond knife, J. of Microscopy, Vol.197, 94-100, 2000

**2005 – Diatome**

**Diamantový nůž s úhlem 35°**

**Oscilátor – nízkonapěťový  
piezoelektrický, vyvolává oscilaci  
nože při požadované frekvenci a  
amplitudě**

**Napětí 0-30 kV**

**Frekvence 25-45 kHz**

**Automatické nastavení rezonance**

**Rozkmit: 400 nm**

**Nůž určen pro krájení při pokojové  
teplotě pro řezy tloušťky 10-80 nm**



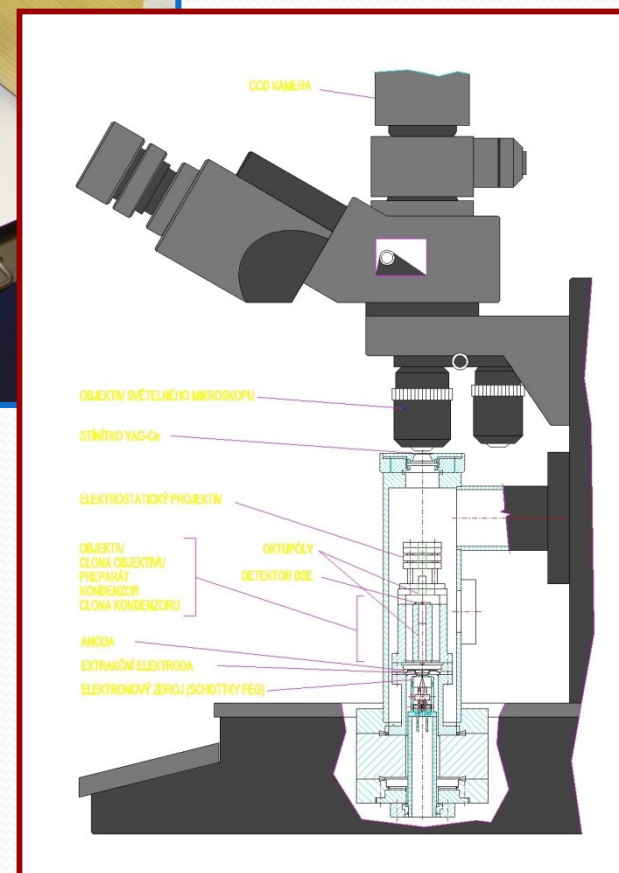
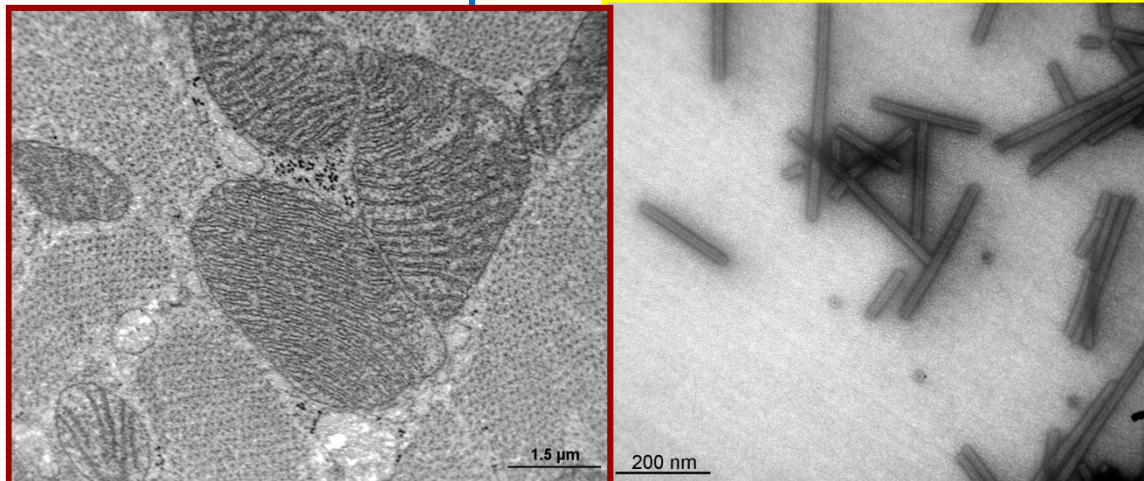


# Nízkonapěťový elektronový mikroskop

## LV EM 5

Ultrastruktura  
srdečního svalu  
myši

Virus tabákové  
mozaiky

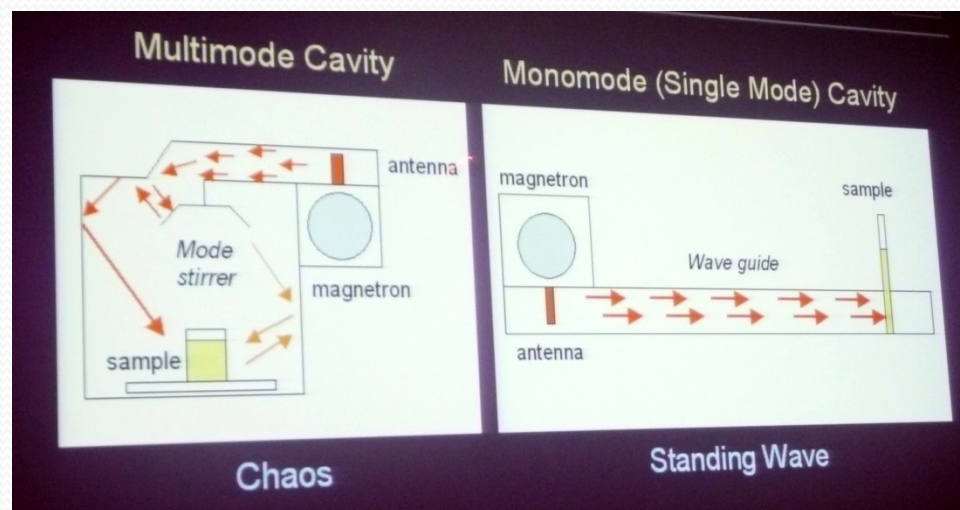




# Mikrovlnné ozáření



- ovlivňují penetrační rychlost chemických činidel
- zahřívají vzorek
- ovlivňují propustnost membrán
- problém: nerovnoměrná distribuce tepla ve vzorku, obtížné měření teploty uvnitř vzorku, reprodukovatelnost výsledků



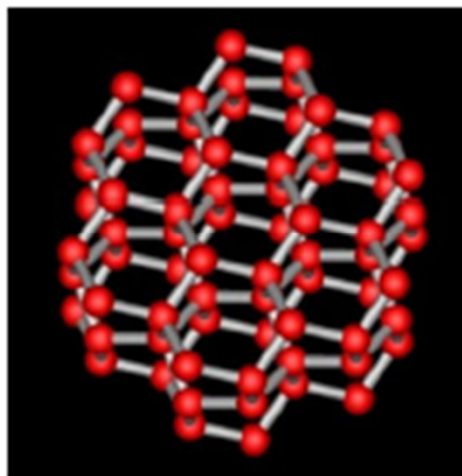
# Mrázové metody

- **Výhody:**
- Buňky mohou být prohlíženy v přirozeném extracelulárním prostředí
- Enzymy a antigeny nejsou denaturovány
- Vzorky jsou zmrazeny během zlomku vteřiny – možnost sledovat časově závislé děje
- Zmrazení zpevní vzorky, z nichž pak mohou být přímo nařezány ultratenké kryořezy pro TEM
- **Nevýhody:**
- Drahé vybavení
- Nutnost skladovat vzorky při teplotách kapalného dusíku

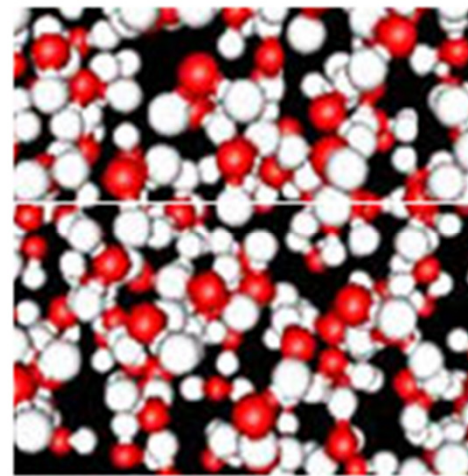


# Vitrifikace

(z latinského vitreum) transformace látky ve sklo



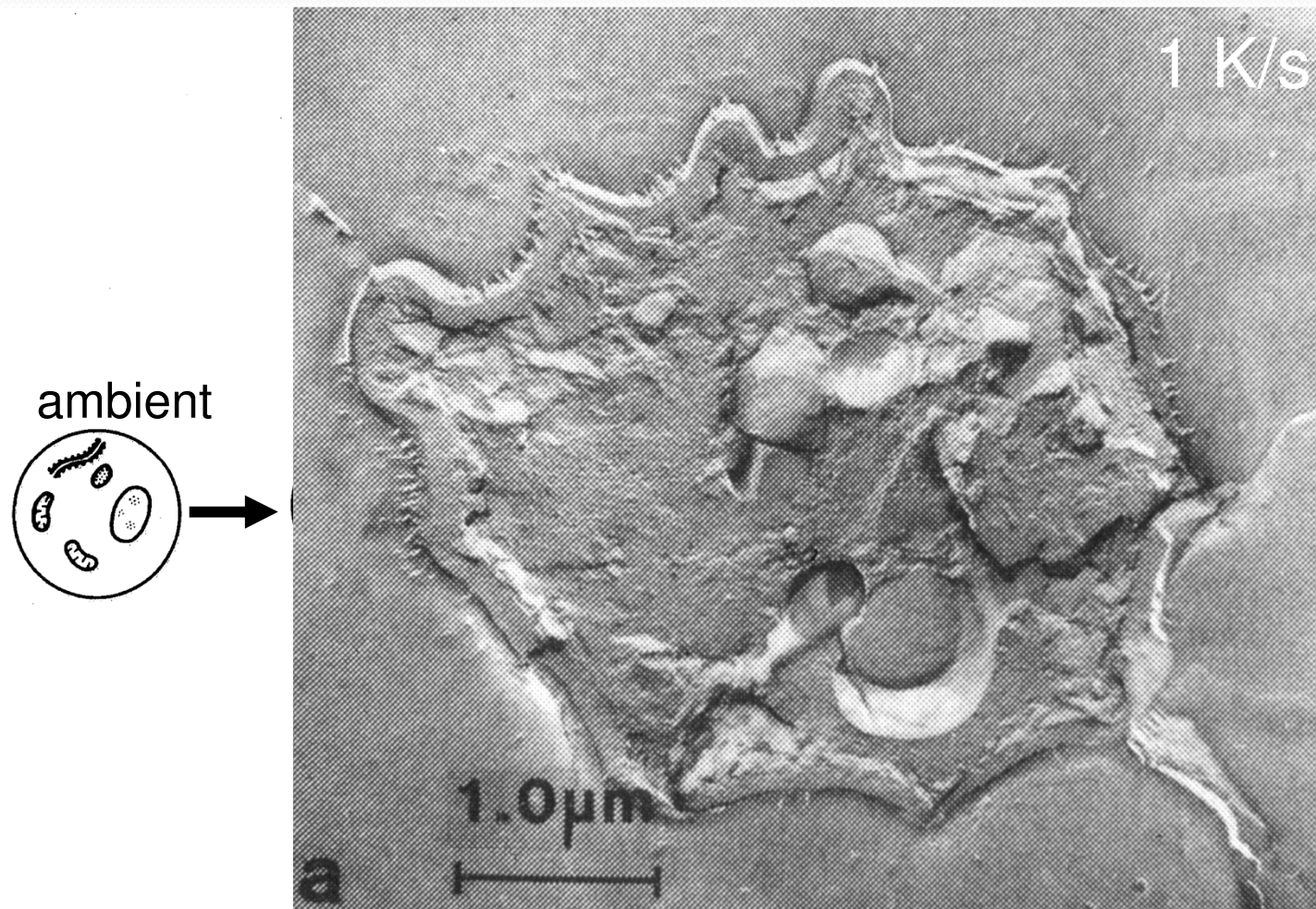
Krystalický led  
- nižší hustotu, větší objem  
než kapalná voda



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



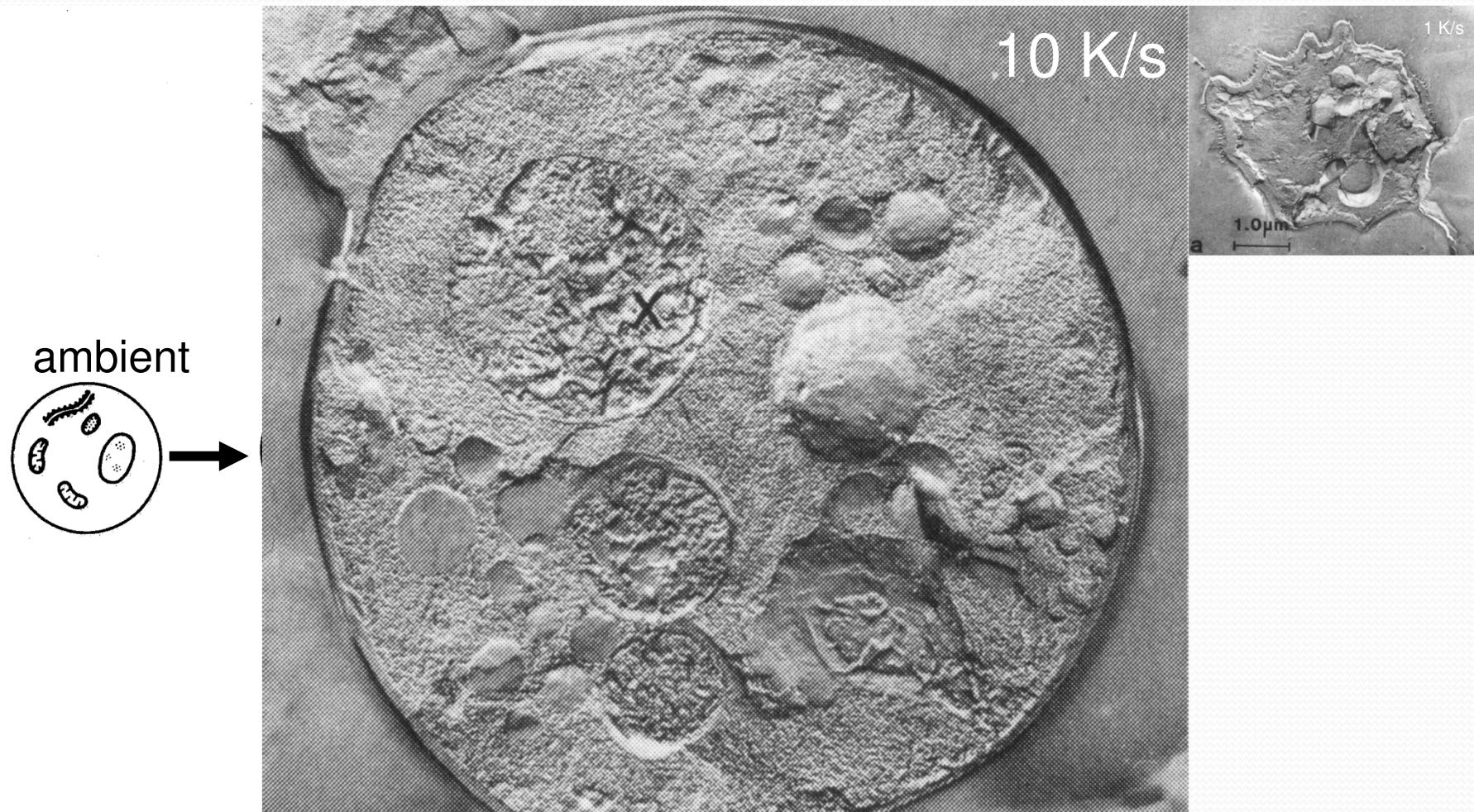
# Mrazení



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.



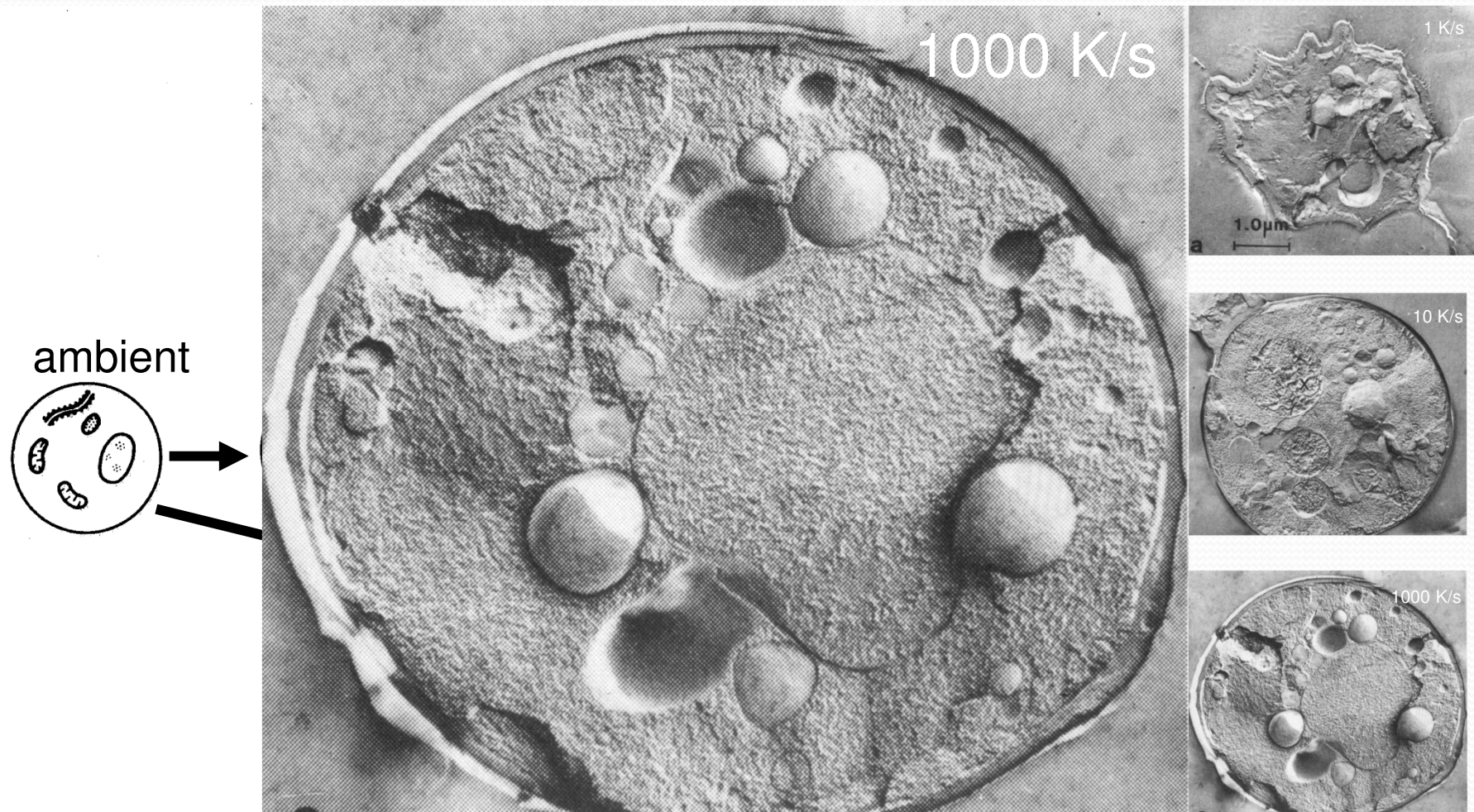
# Mrazení



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.



# Mrazení



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.



## Jak dosáhnout vitrifikovaného ledu?

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

Plunge freezing

2/ Mrazení při vysokém tlaku

High pressure freezing

3/ Použití kryoprotektantu během mrazení

Metoda Tokuyasu

# Výběr chladiva

- Kapalný dusík

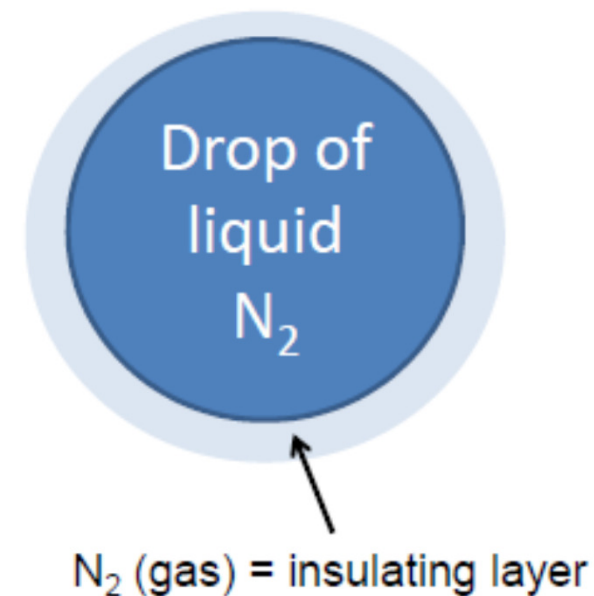
Bod varu:  $-196^{\circ}\text{C}$  Bod tuhnutí:  $-210^{\circ}\text{C}$

Nízká teplotní kapacita, chlazený materiál je obklopen vrstvou plynu - izolátor

- Kapalný etan:

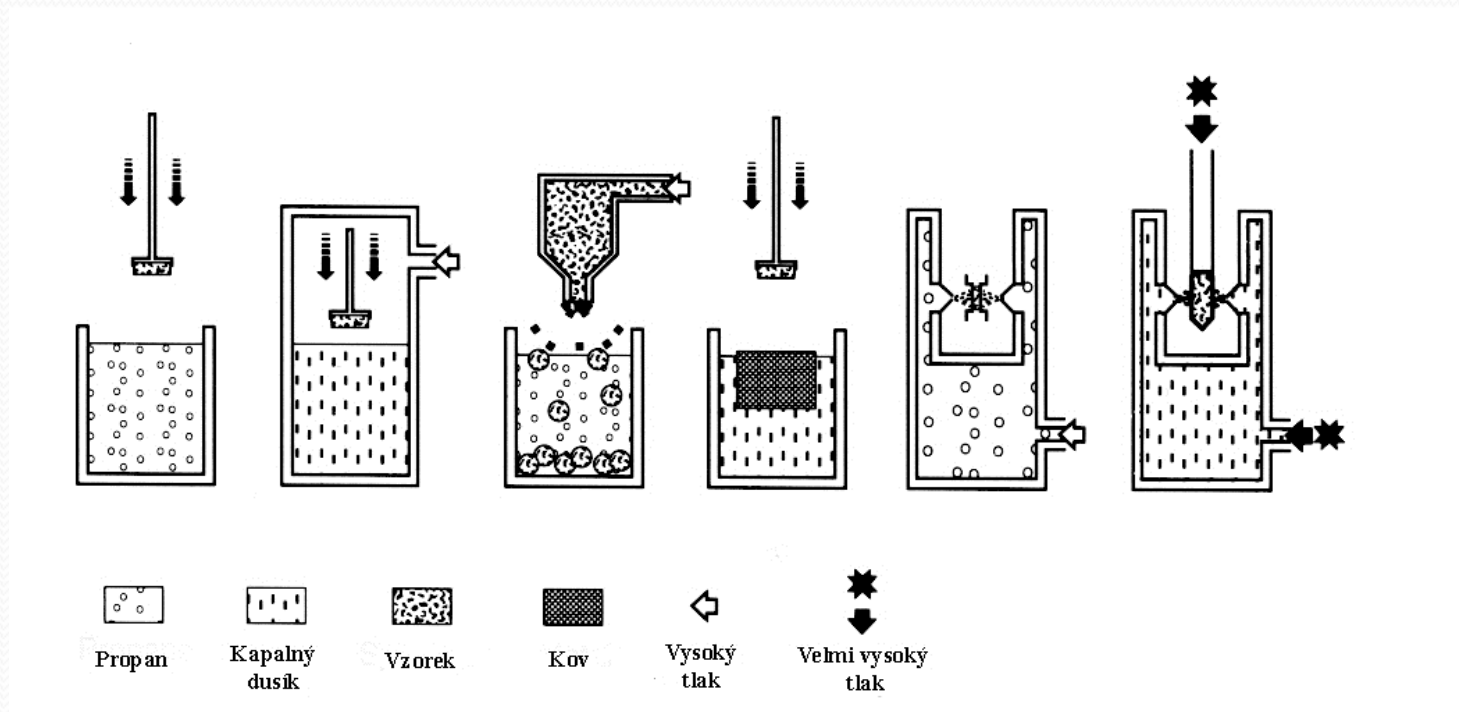
Bod varu:  $-88^{\circ}\text{C}$  Bod tuhnutí:  $-182^{\circ}\text{C}$

Vysoká teplotní kapacita



# Mrázová fixace

- Způsoby provedení



**Maximální hloubka kryofixace**

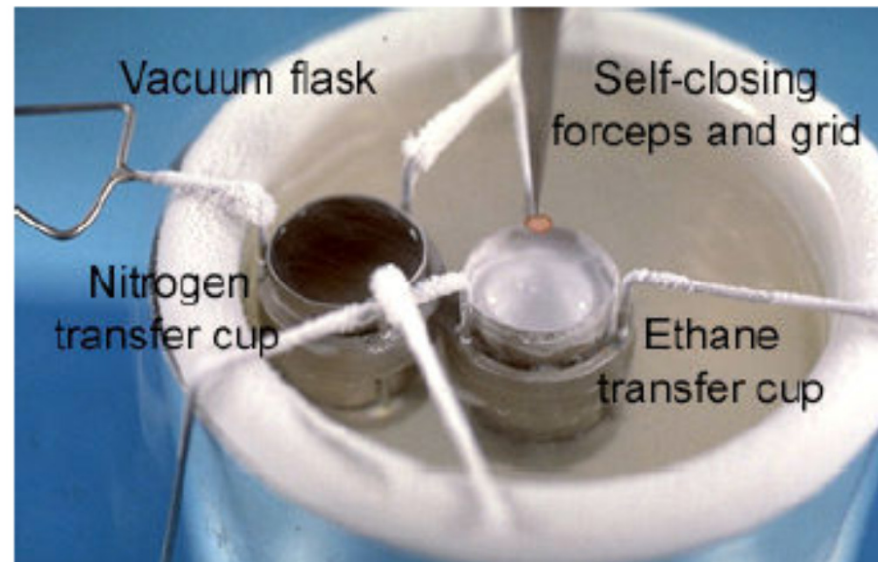
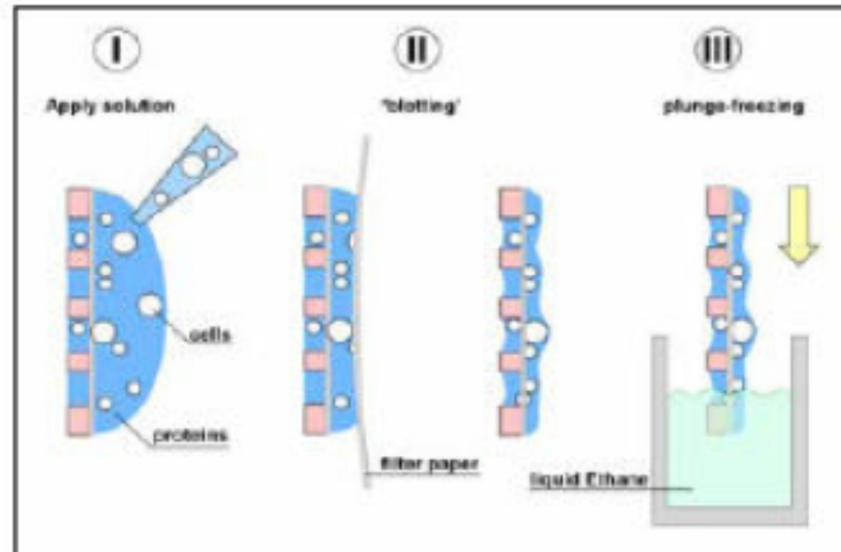
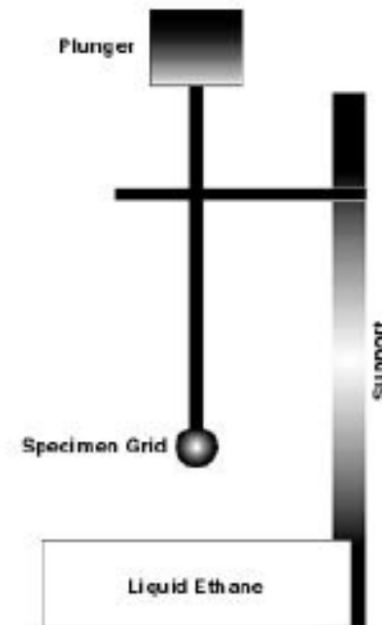
**10 - 20  $\mu\text{m}$**

**100 - 200  $\mu\text{m}$**



# Plunge-freezing

- Vitrification of the small drop (up to 1  $\mu\text{m}$ ) containing the sample by plunging it into liquid ethane (boiling point  $-88^{\circ}\text{C}$ )
- Vitrification up to 5  $\mu\text{m}$  (thickness of the sample)



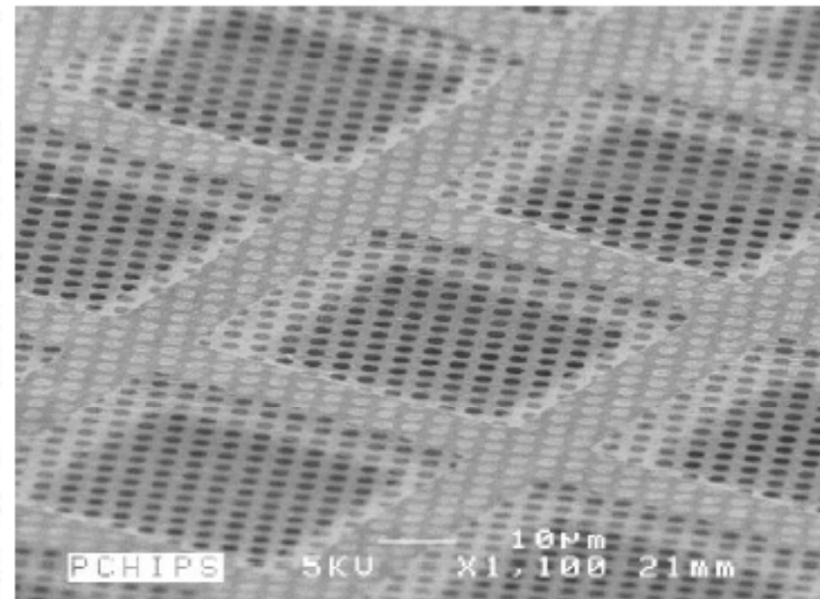
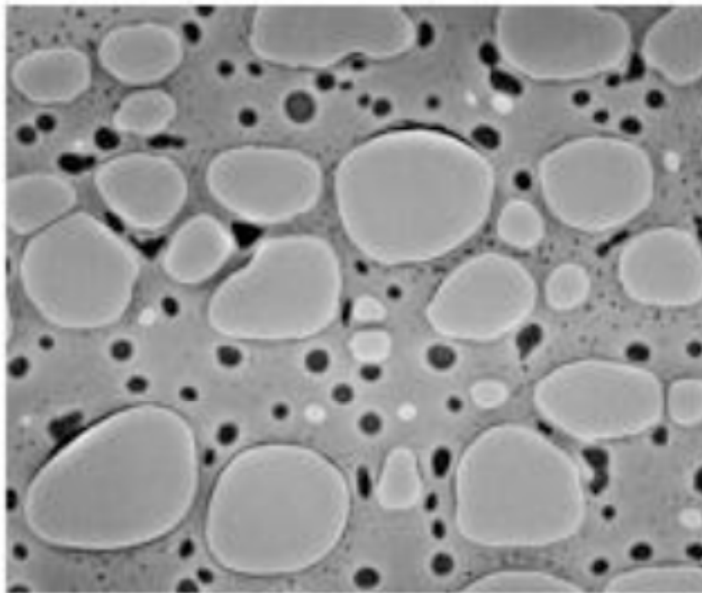
# Plunge-Freezing



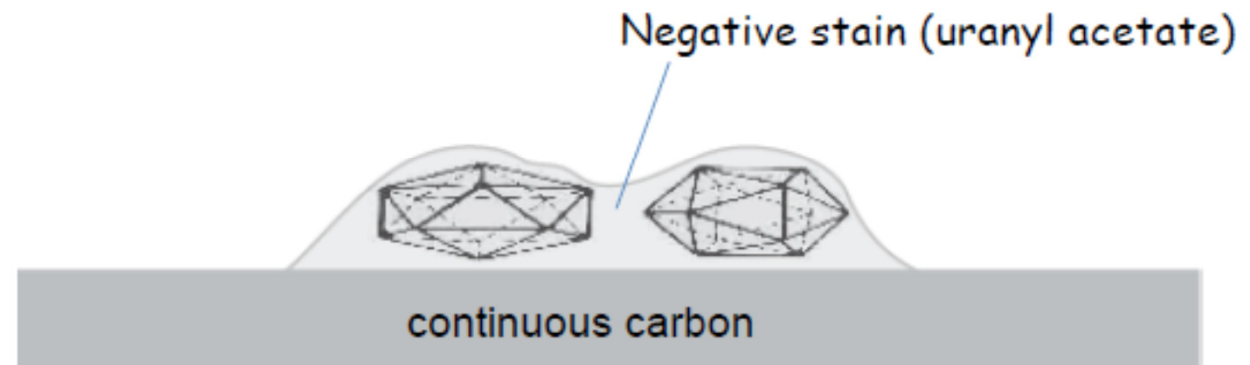


# Grids for plunge-freezing

- holey carbon coated grid
- C-flat, quantifoil (commercial)

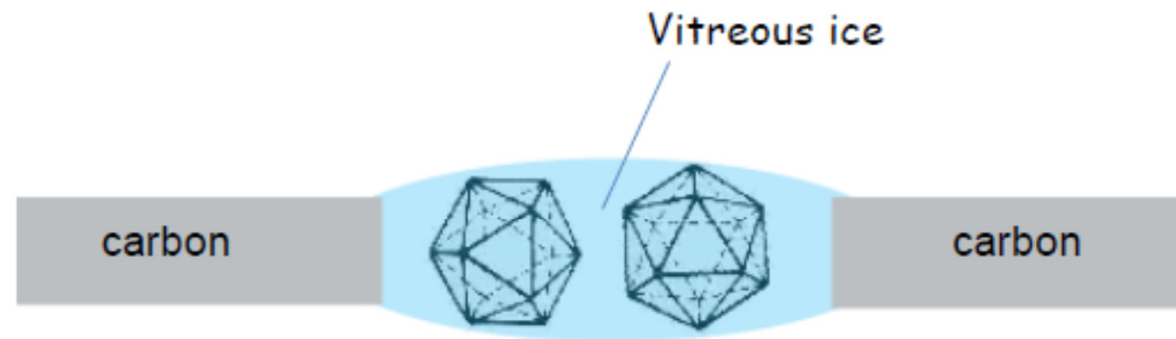


### Negative staining



- particles are compressed after drying

### Cryo



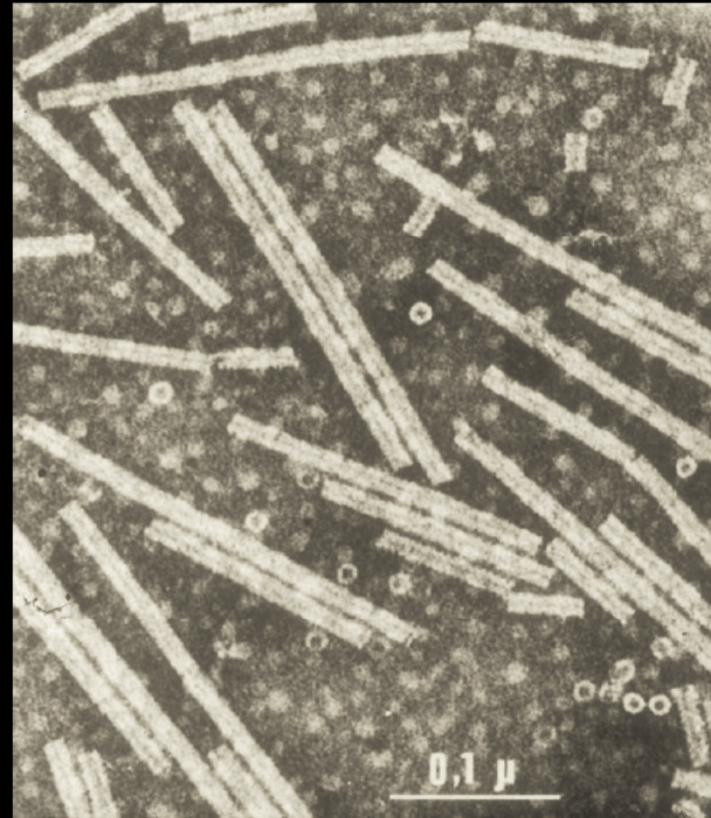
- particles are embedded in vitreous ice
- random orientation!!!

# Metoda negativního kontrastu

## TMV after shadowing and negative staining



with platinum



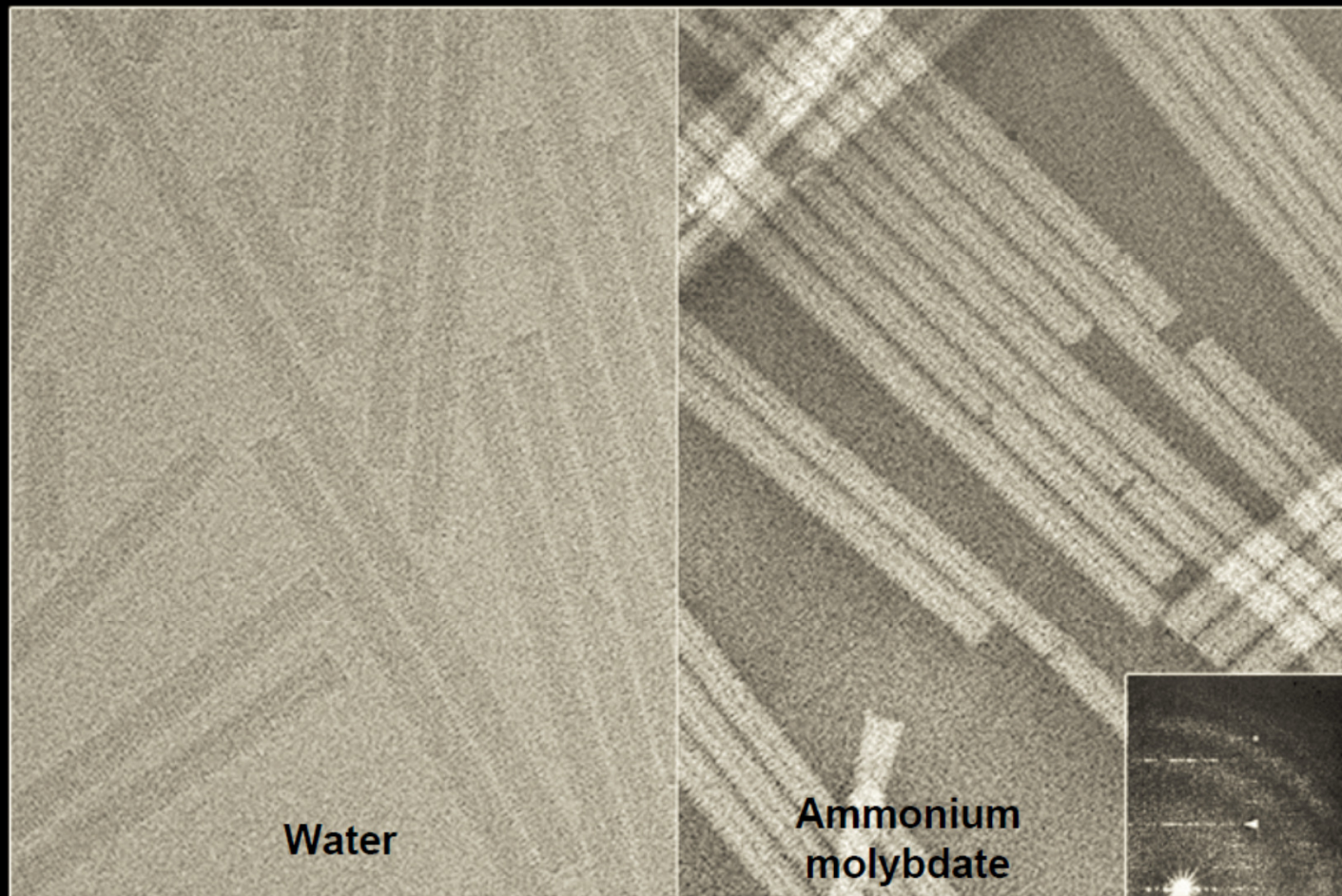
with phosphotungstic acid

Micrographs provided by Herrmann Frank, Tübingen



# Metoda negativního kontrastu

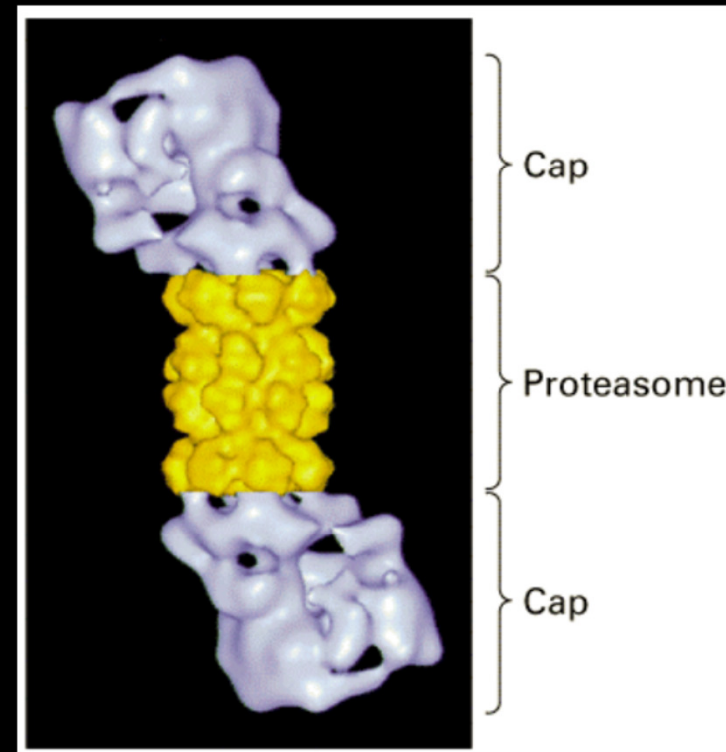
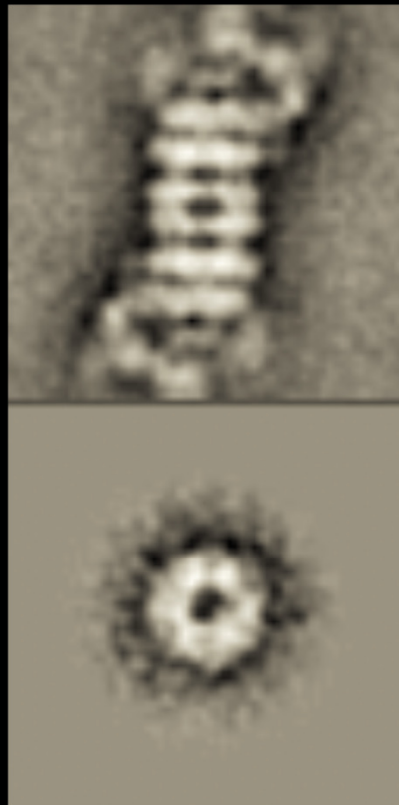
## Cryo TEM of Tobacco Mosaic Virus



Micrographs provided by Marc Adrian, Lausanne

# Metoda negativního kontrastu

## Cryo TEM of proteasomes



Max Planck Institute for Biochemistry, Dept. of Molecular Structural Biology  
<http://www.biochem.mpg.de/baumeister/>





Vitrifikace vzorků s tloušťkou nad  $5\mu\text{m}$



High Pressure Freezing  
(HPF)

## Freezing at ambient vs. high pressure

	0.1 MPa (atmospheric pressure)	210 MPa
Melting point	0°C (273 K)	-22°C (251 K)
Nucleation temperature (supercooling water limit)	-42°C (231 K)	-92°C (181 K)
Cooling rate necessary for vitrification (cell)	$>1 \times 10^5$ K/s	$1 \times 10^3$ K/s
Max. sample thickness which can be vitrified	$> 5 \mu\text{m}$	$> 200 \mu\text{m}$

# High Pressure Freezing (HPF) devices



Leica EM PACT II

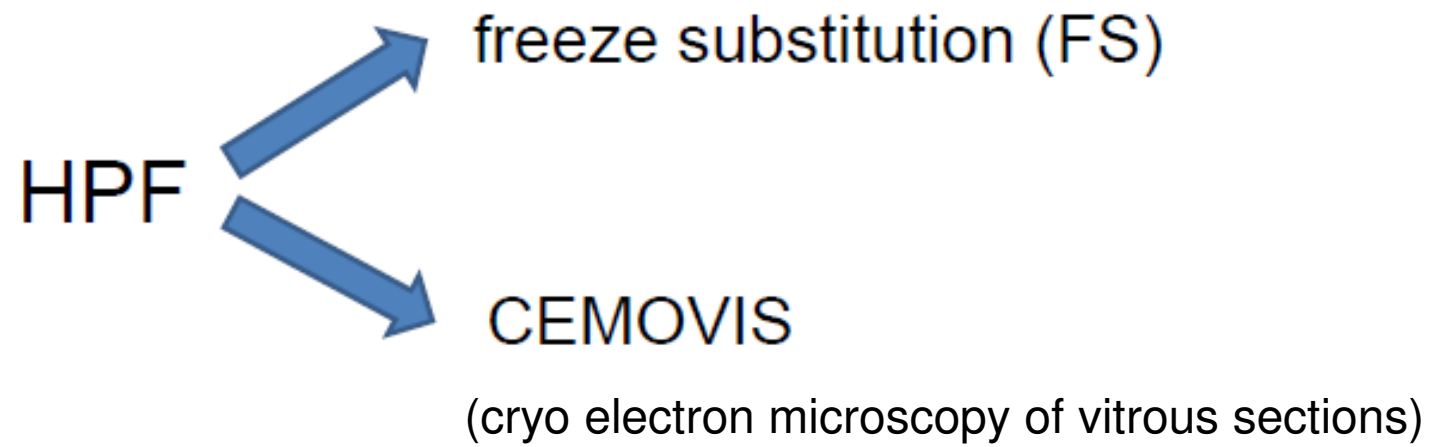


BAL-TEC HPM 010



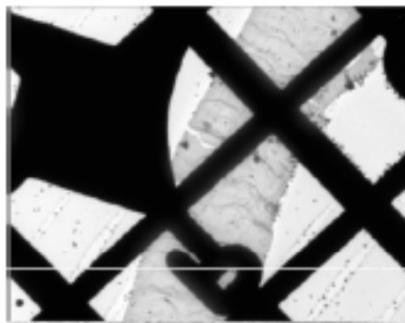
Leica HPM 100



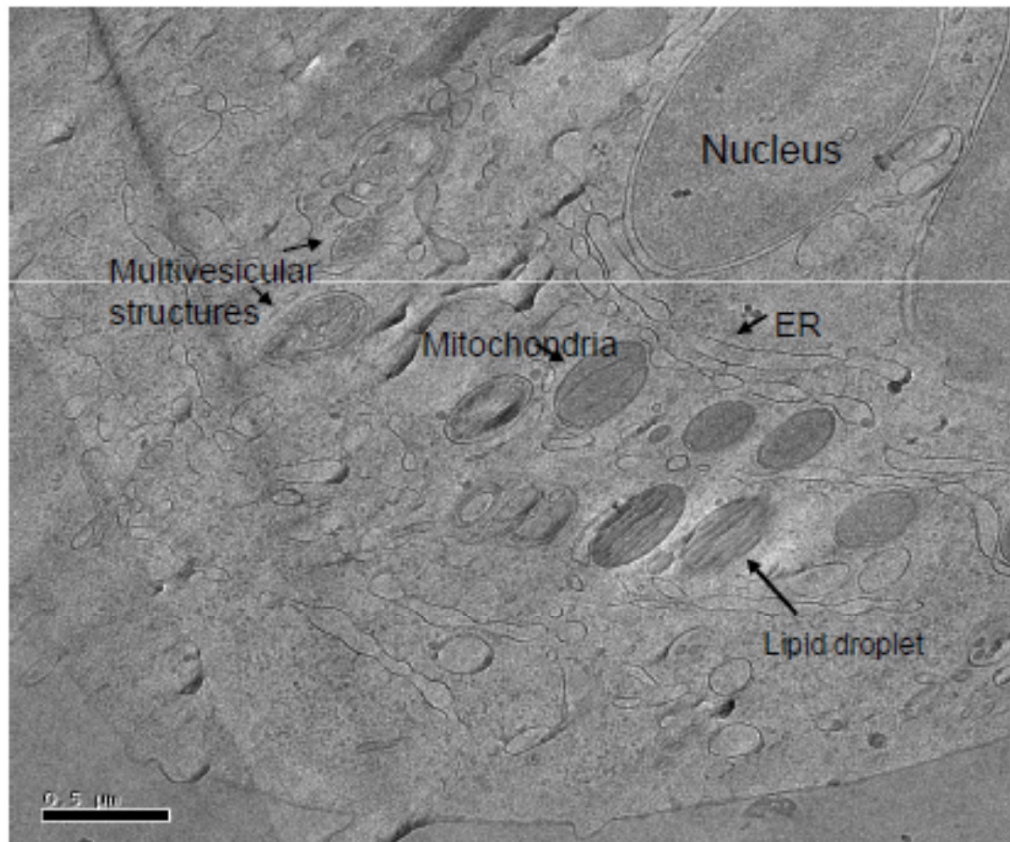


# Cryo-EM of vitreous sections (CEMOVIS)

HPF  $\longrightarrow$  cryo-sectioning ( $T < -135^{\circ}\text{C}$ )  $\longrightarrow$  cryo-EM

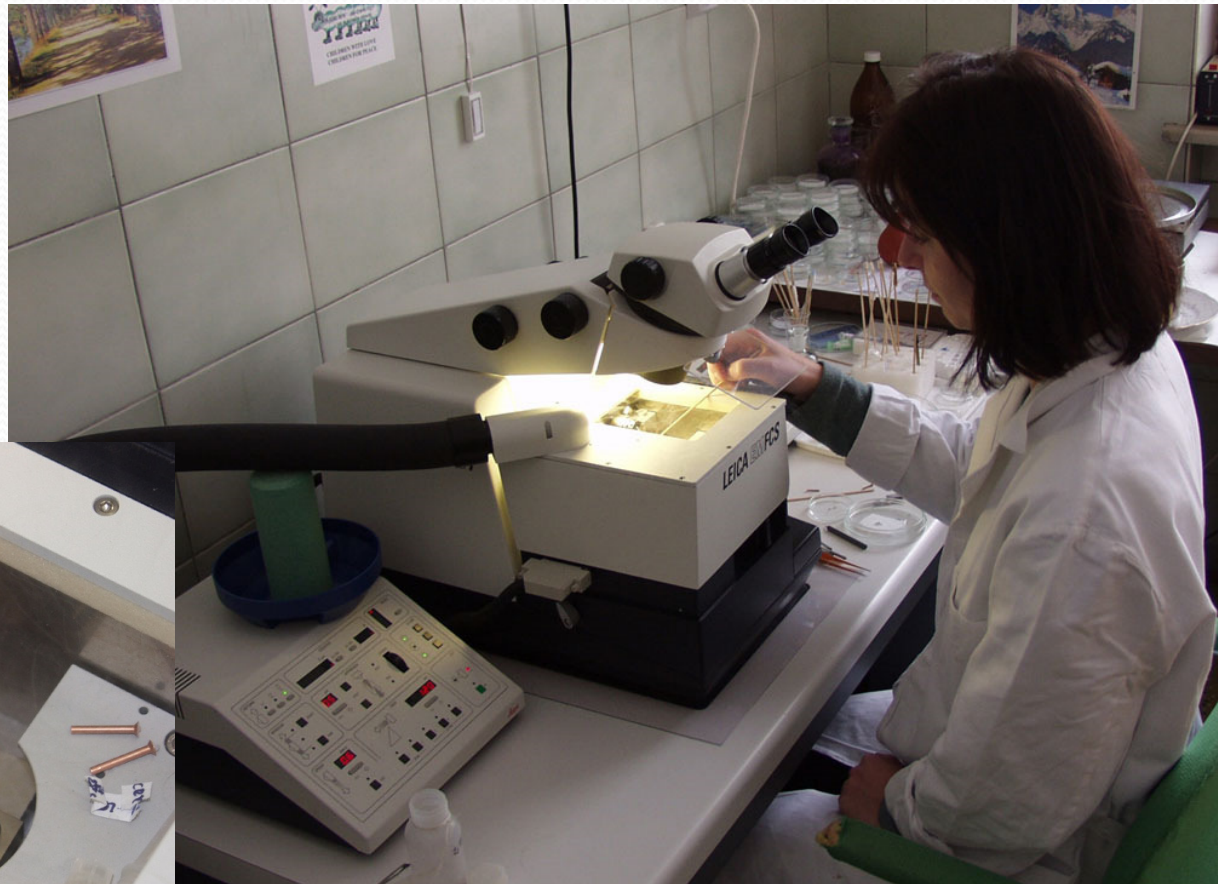
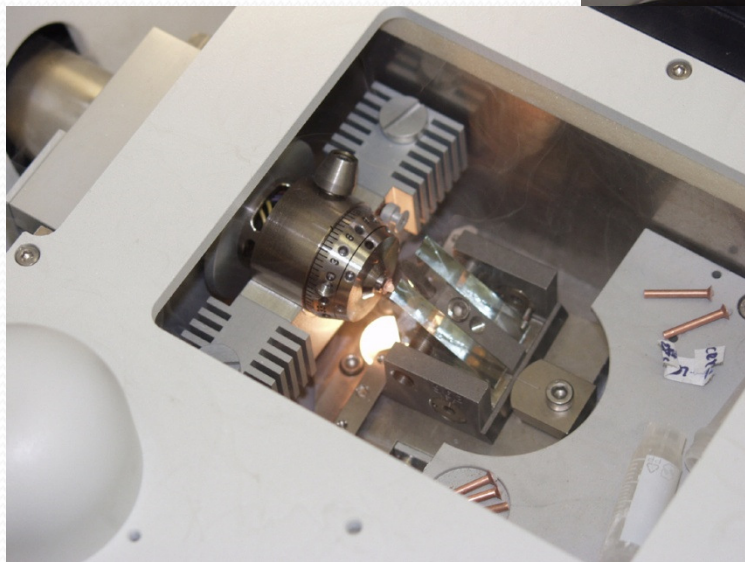


Leica, Ultramicrotome, FC6





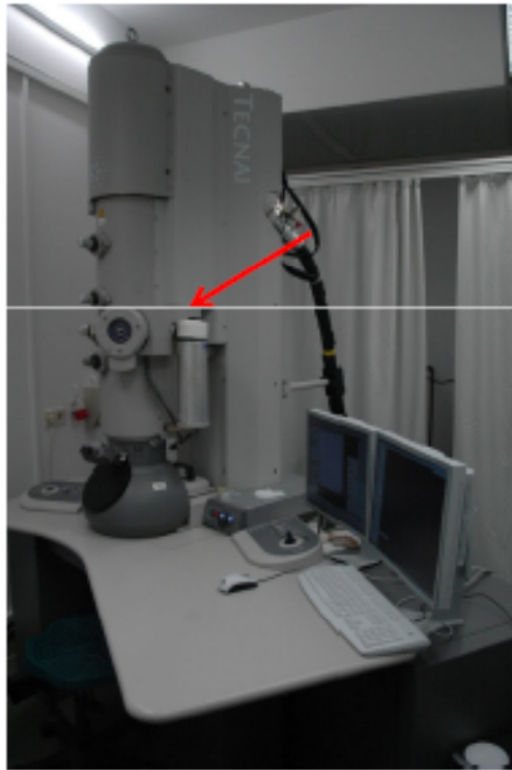
# Kryoultramikrotomie



Příprava ultratenkých řezů ze zmrazených preparátů při teplotách pod  $-80^{\circ}\text{C}$

# Cryo-electron microscopy

Transmission electron microscope operated at temperatures below  $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$   
(glass transition temperature)



Tecnai F30, FEI



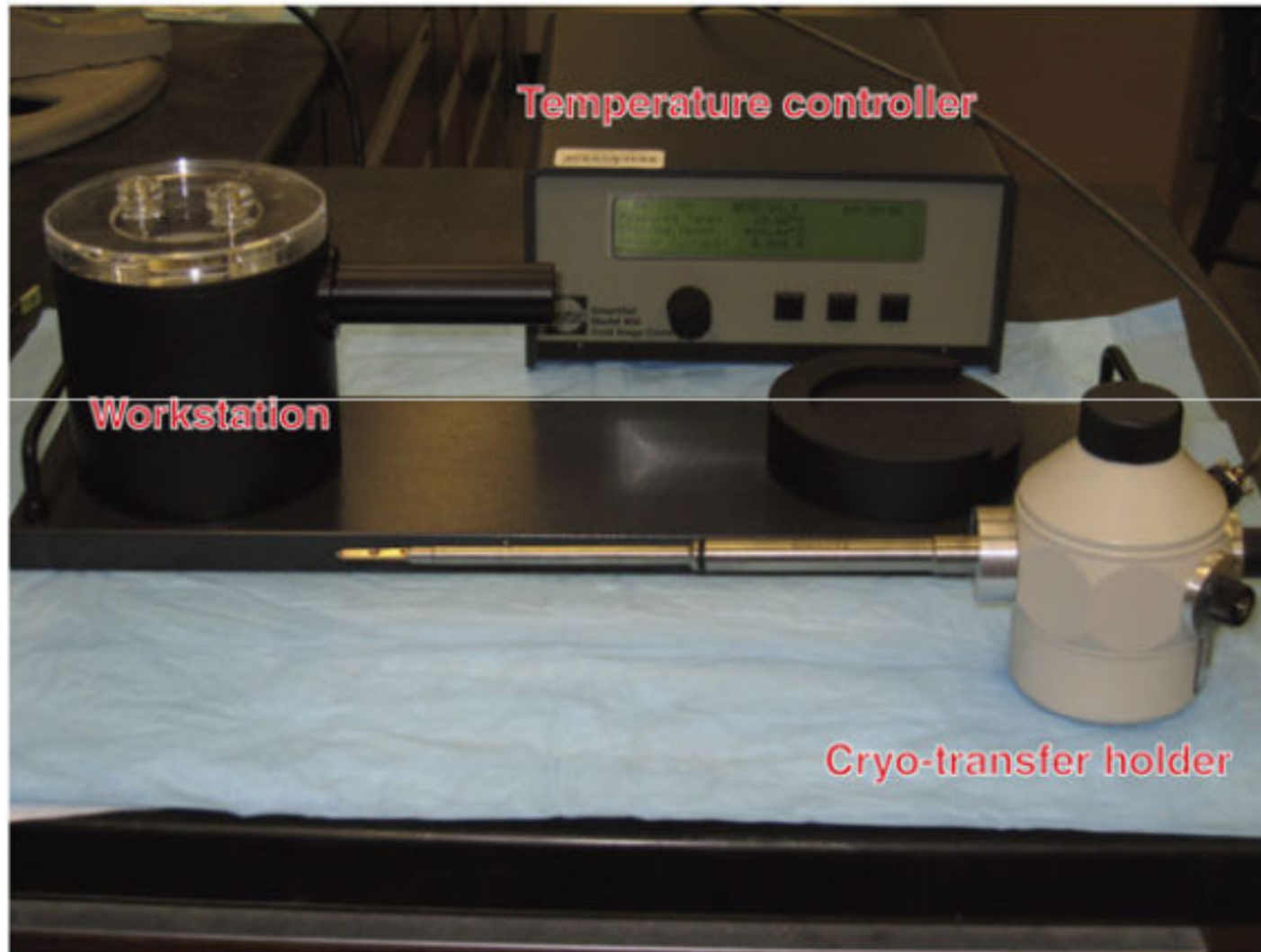
Polaris, FEI



Titan Krios, FEI

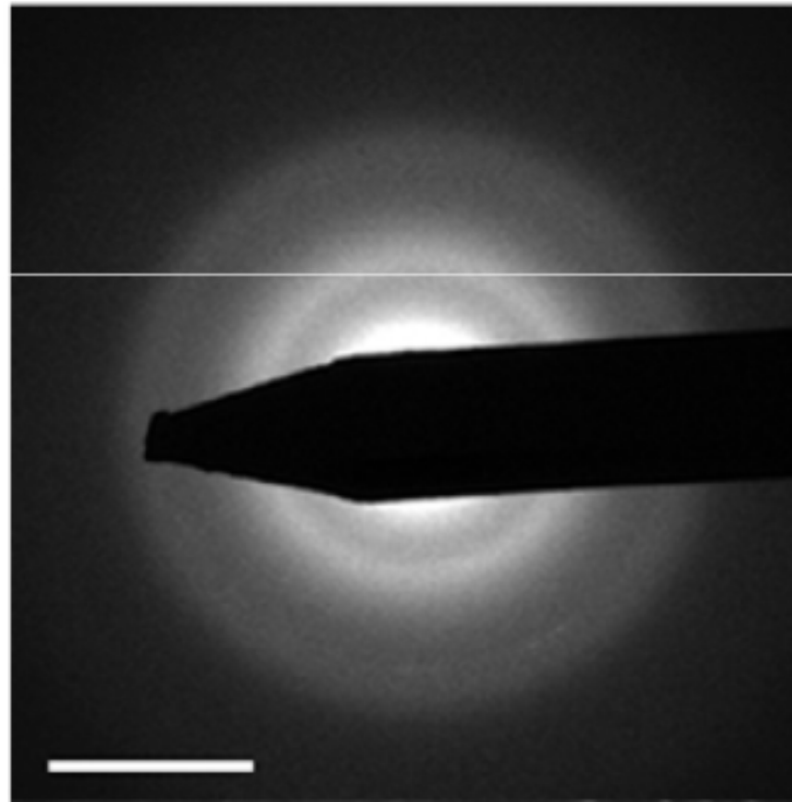


Keep the sample at low temperature! ( $<-135^{\circ}\text{C}$ )



# Is the sample vitreous?

diffraction pattern:



Al-Amouidi, 2002

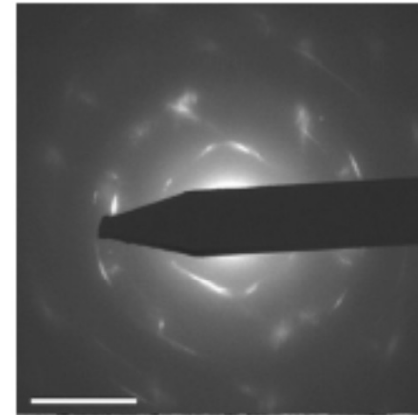
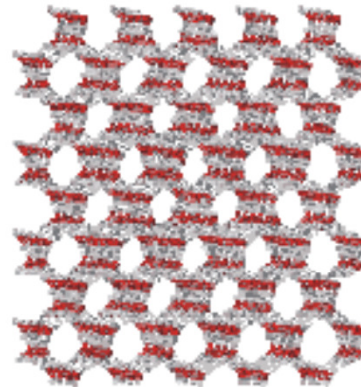


# Crystalline ice

## "The enemy of electron microscopists"

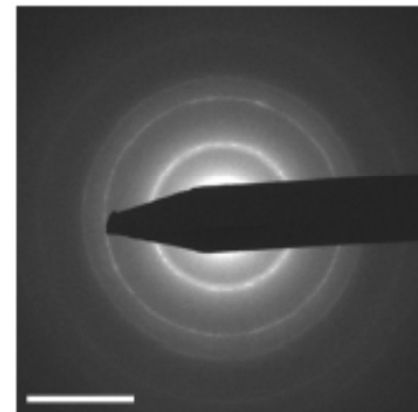
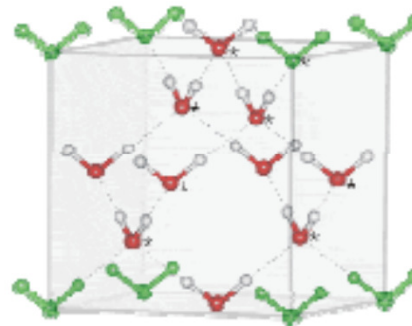
### Hexagonal ice

- most of the ice on the earth
- slow freezing



### Cubic ice

- metastable, formed at lower temperatures from vapor or at high pressures and low temp. from drops



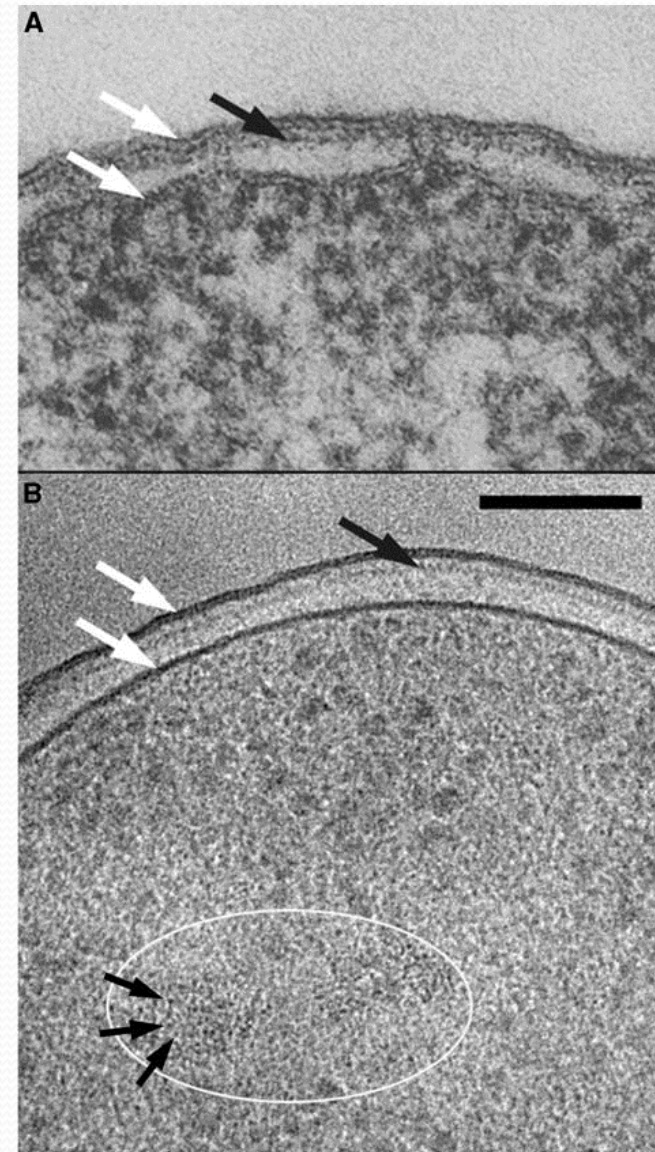
# CEMOVIS

The ultrastructure of outer membrane of  
gram negative bacteria:

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

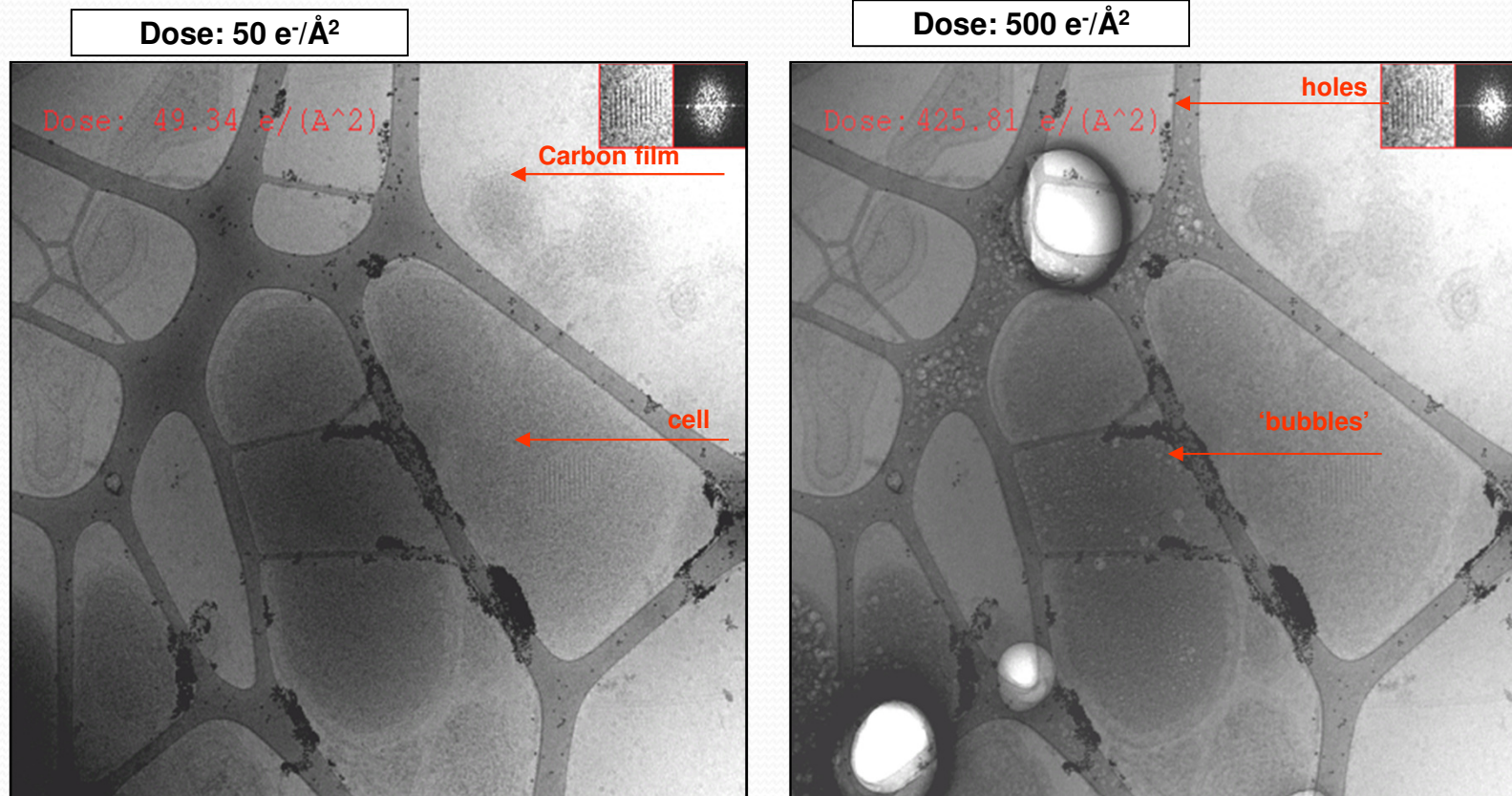
- A. Image of staining agent distribution
- B. Contrast of unaltered native specimen

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





# Cryo-electron microscopy



- Dose = current density per unit area  $j$  (A/cm<sup>2</sup>) multiplied by the exposure time  $t$  (s) (C/cm<sup>2</sup>, or e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>, e<sup>-</sup> = electrons)

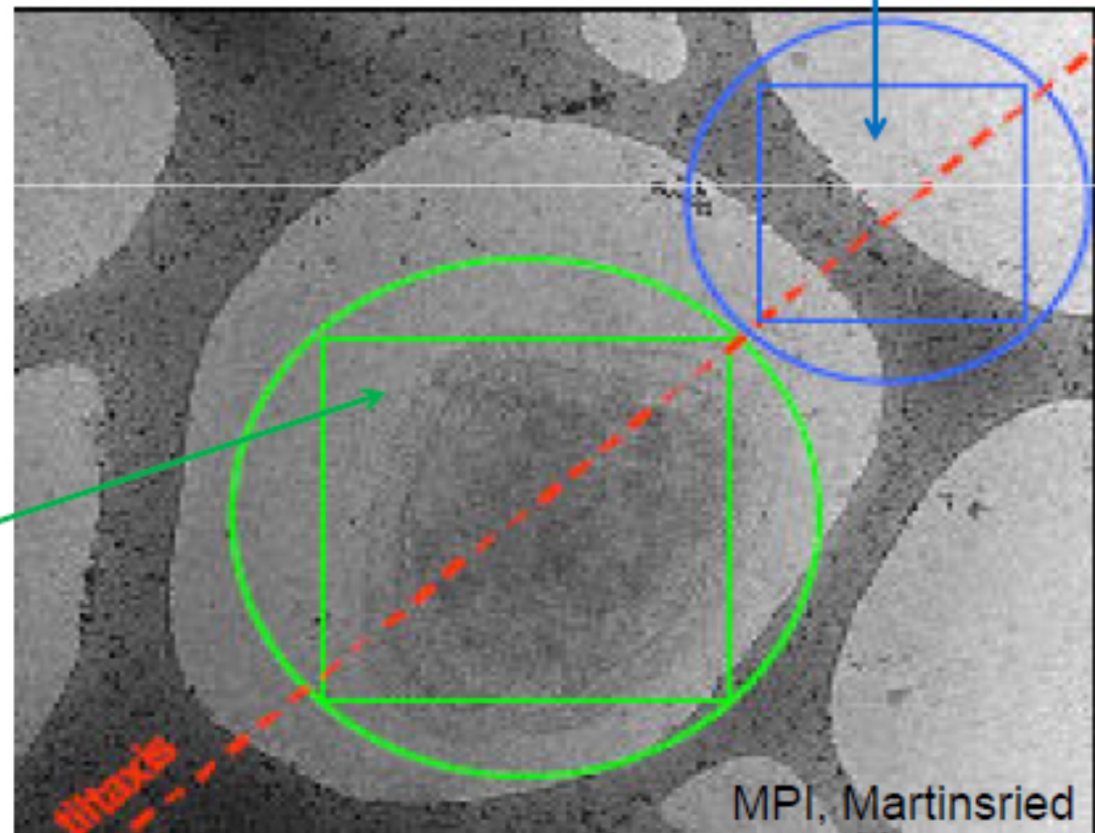
# Low dose mode

1. Search (low magnification)
2. Focusing (2-3  $\mu\text{m}$  away from the area of interest)
3. Record

Image: 6-10 electrons/ $\text{\AA}^2$

area of interest

focusing area



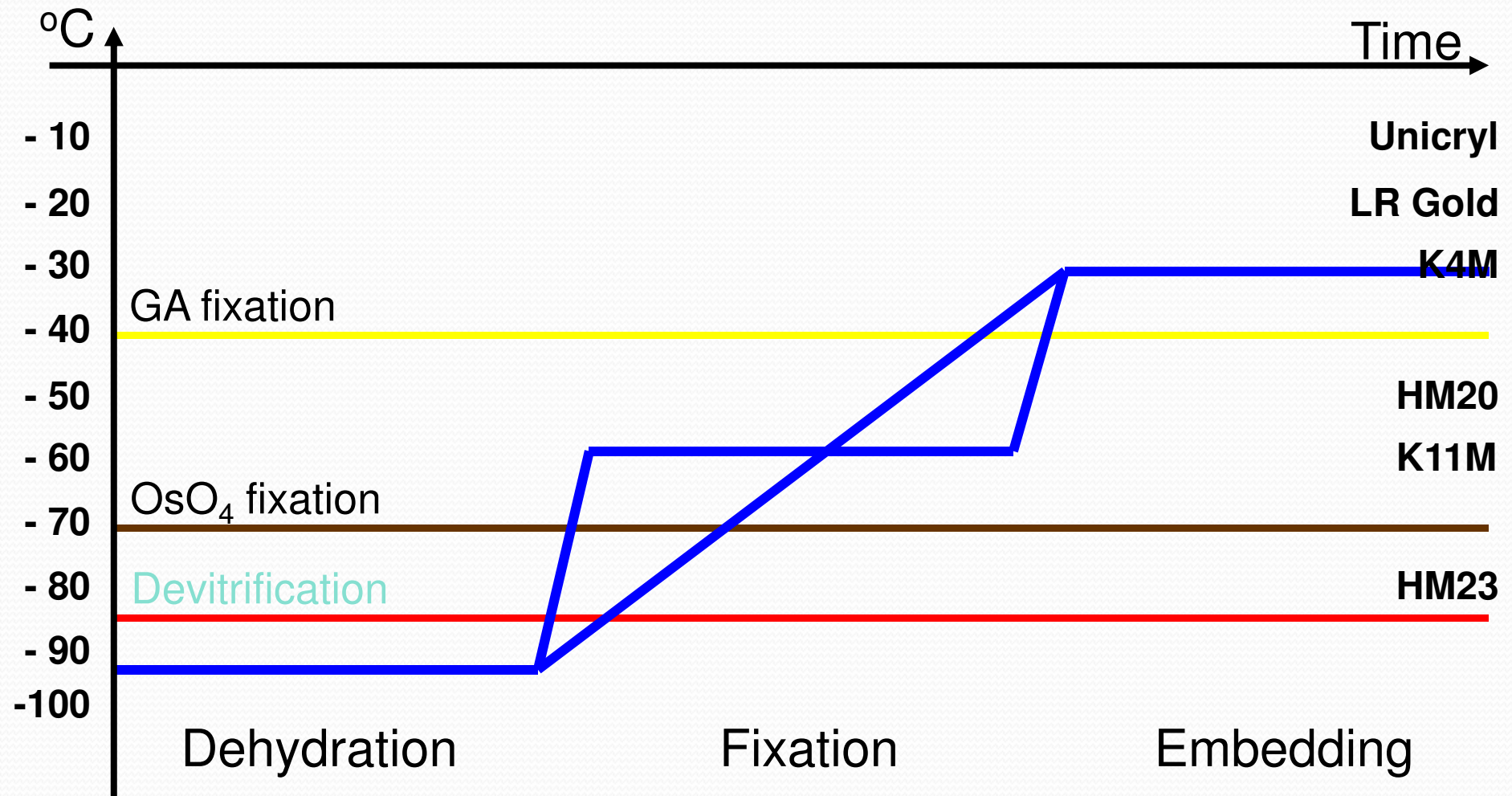


# Freeze substitution

- The combination of chemical methods with cryomethods
- The ice in a frozen specimen is replaced at low temperature by anhydrous organic solvent followed by infiltration of resins
- The organic solvent must be liquid below recrystallization point and dissolve additives such as osmium tetroxide, or GA
- Polymerization by UV



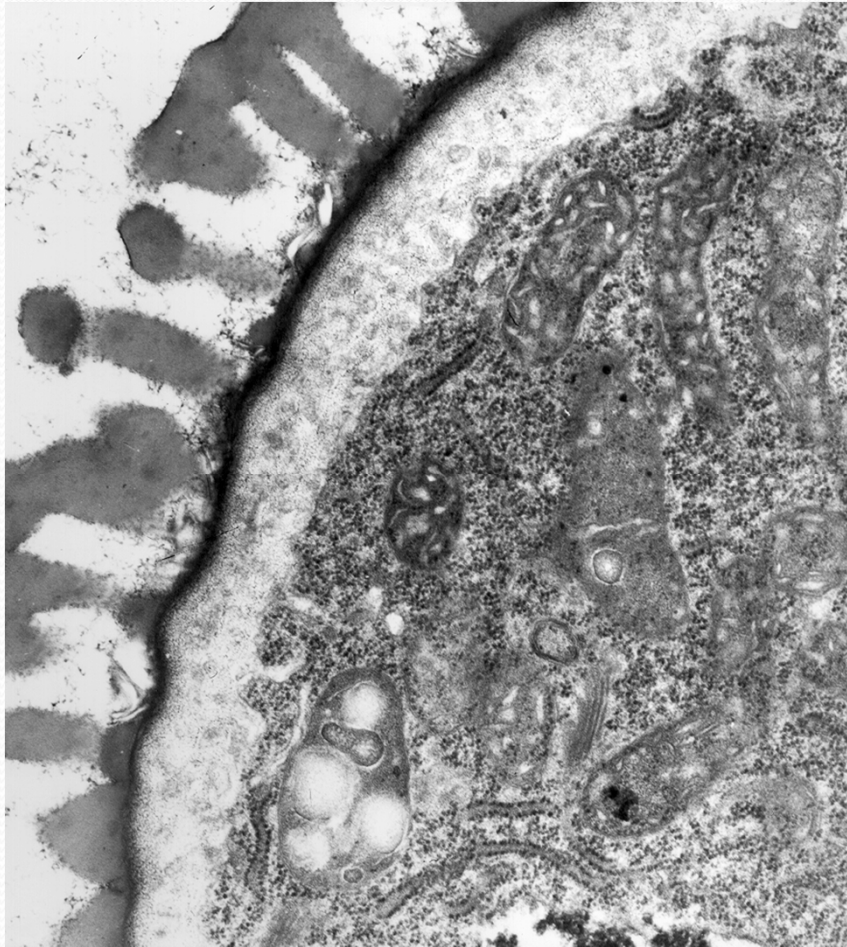
# Freeze-Substitution



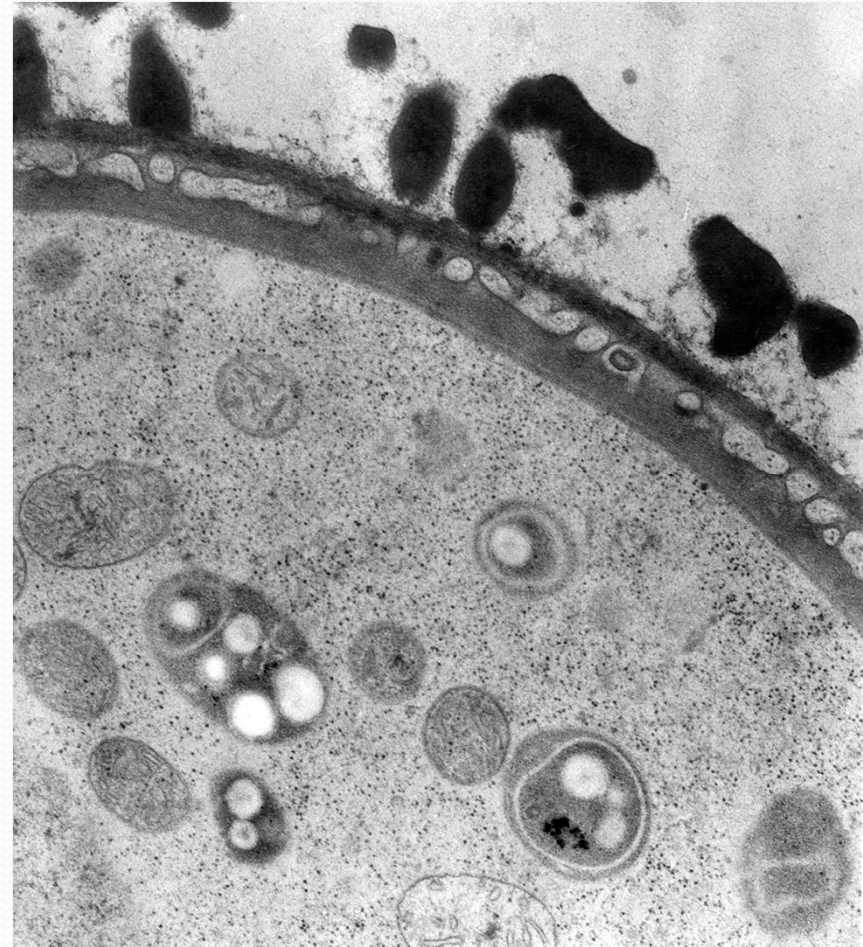


# *Arabidopsis thaliana*

Conventional



Freeze-substitution



A. Omedilla, University of Granada, Granada



# Kryofixace

- Výhody

Rychlost

Žádné cizorodé látky

Bez objemových změn

Snížení extrakce

buněčných komponent

Dynamické procesy

- Nevýhody

Kryoprotektant

Malý objem

Dlouhodobé skladování

Rekrystalizace ledu

Přístrojové vybavení



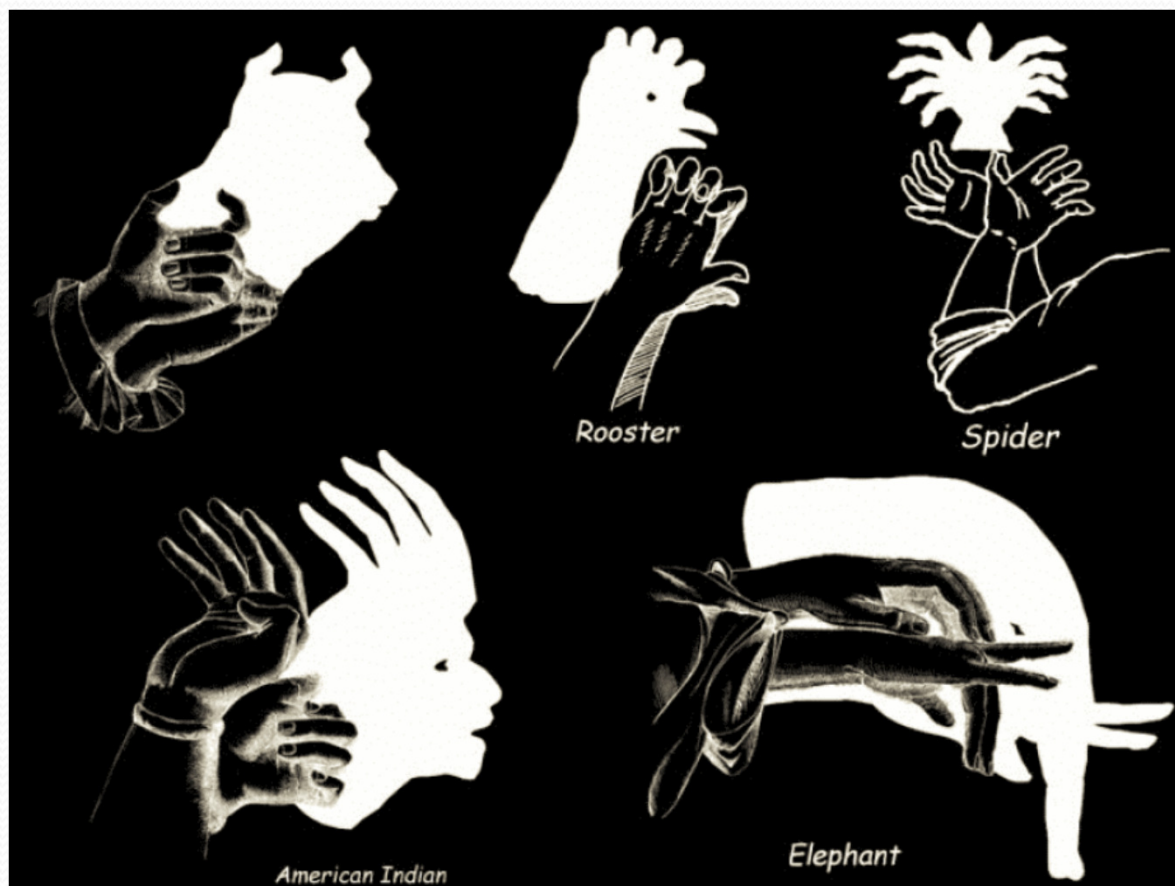


# Elektronová tomografie

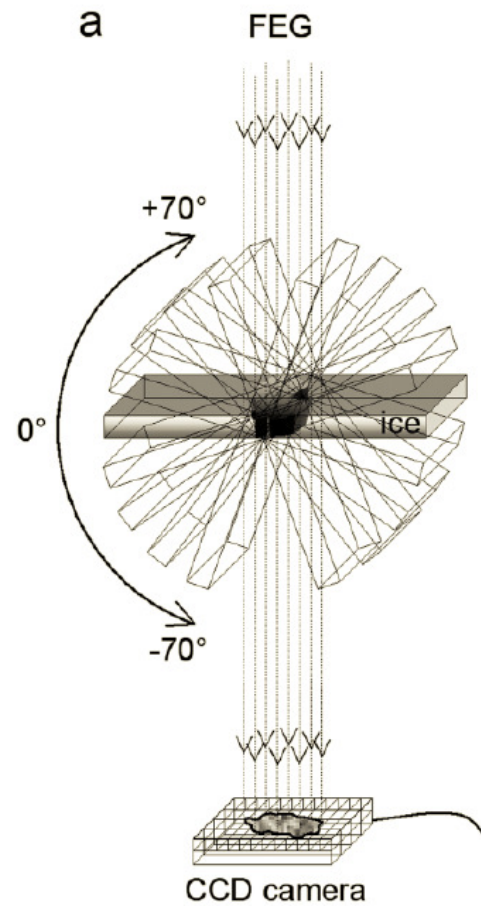
Technika umožňující zobrazení 3D struktur buněk a makromolekul

Původní idea:

R. G. Hart, Science,  
159 (1968) 1464-1467



# Elektronová tomografie



3D-object  $\Rightarrow$  set of 2D-projections

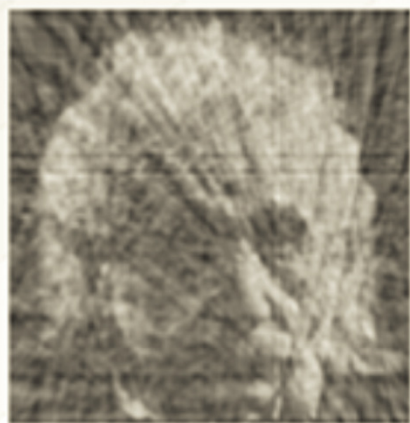


2D-projections  $\Rightarrow$  3D-reconstruction

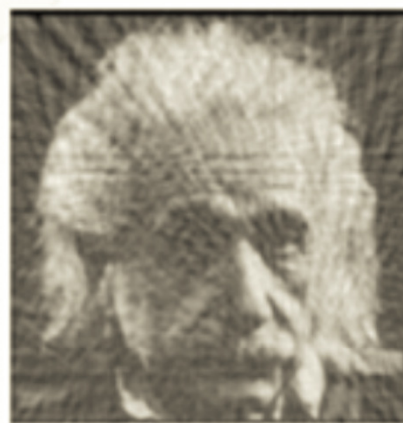




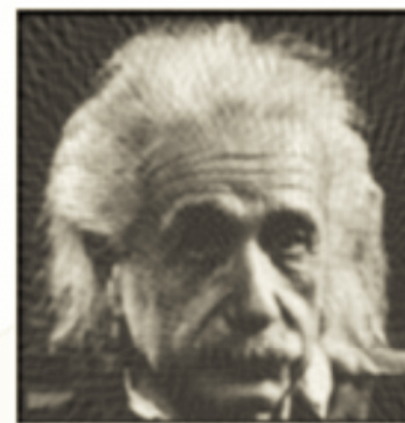
# Elektronová tomografie



18 proj. / 10 deg



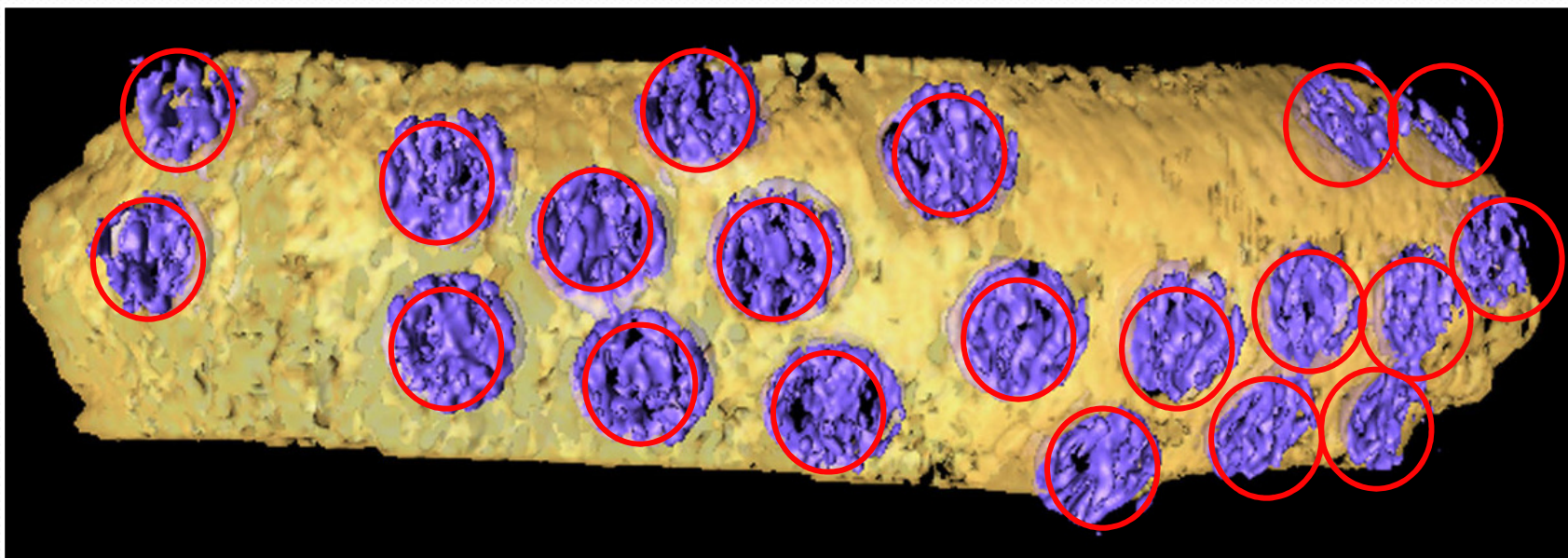
36 proj. / 5 deg



72 proj. / 2.5 deg

Sampling:  $\pm 60-70$  degrees, increment 1-2 degree

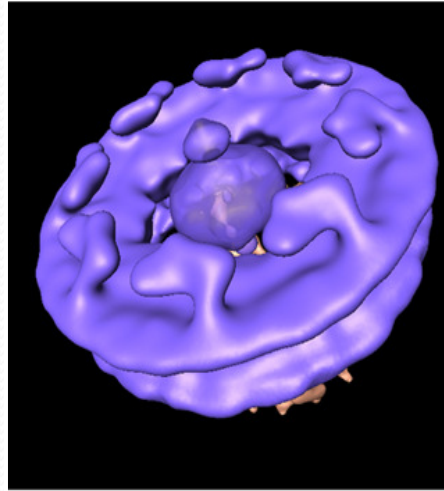
# Struktura jaderného póru



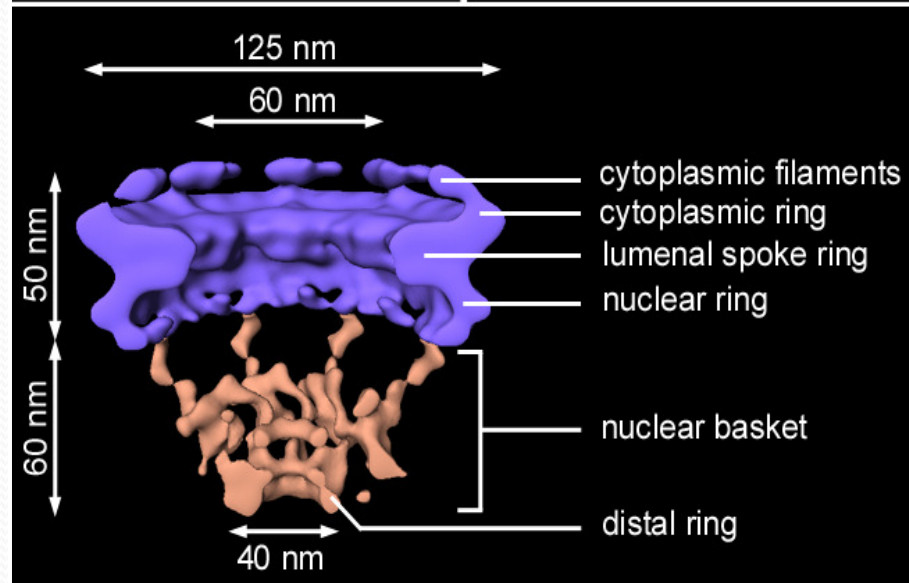
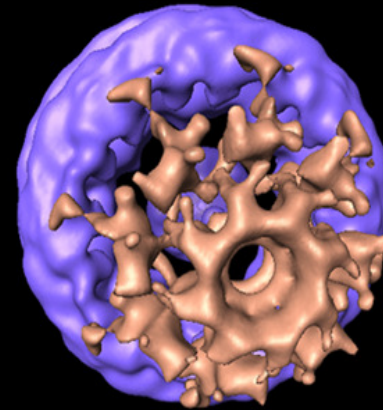


# Struktura jaderného póru

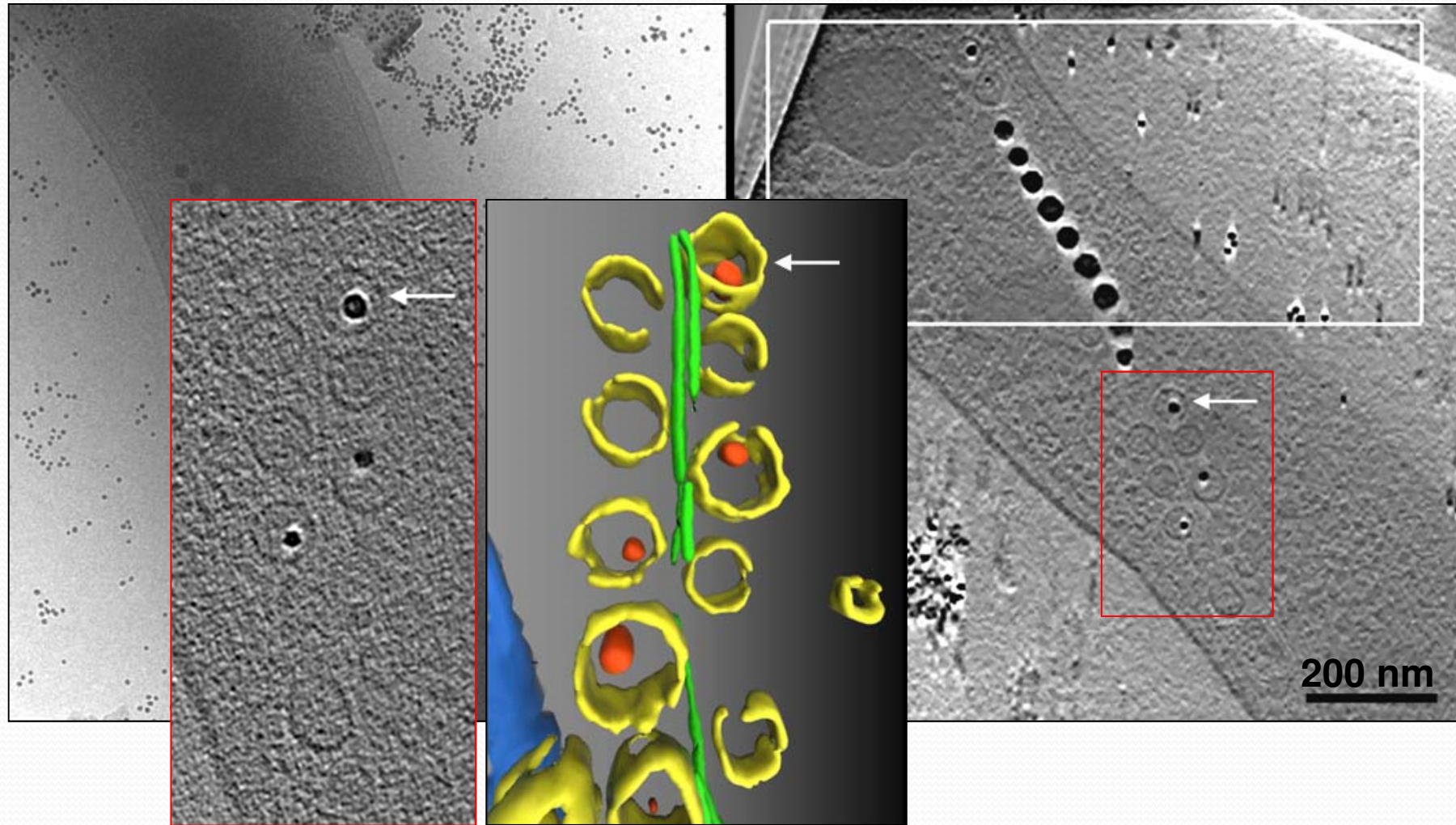
Cytoplasmic  
face



Nucleoplasmic  
face



# *Cryo-ET of Magnetospirillum*

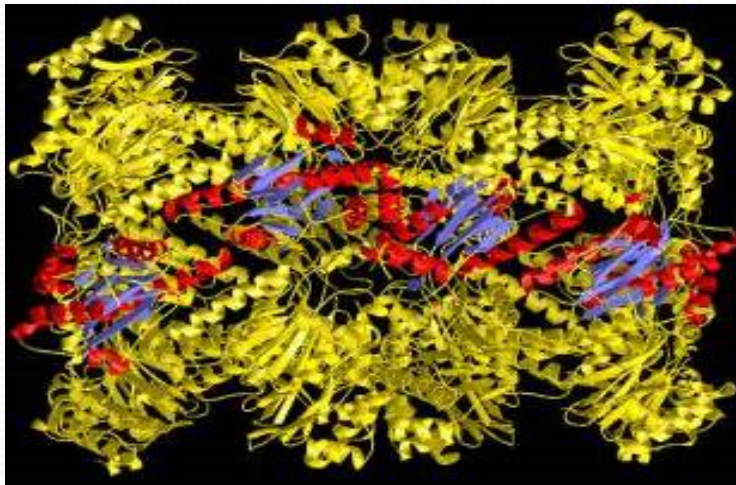




# Vizuální proteomika

Prof. Baumeister, Sapporo 2006

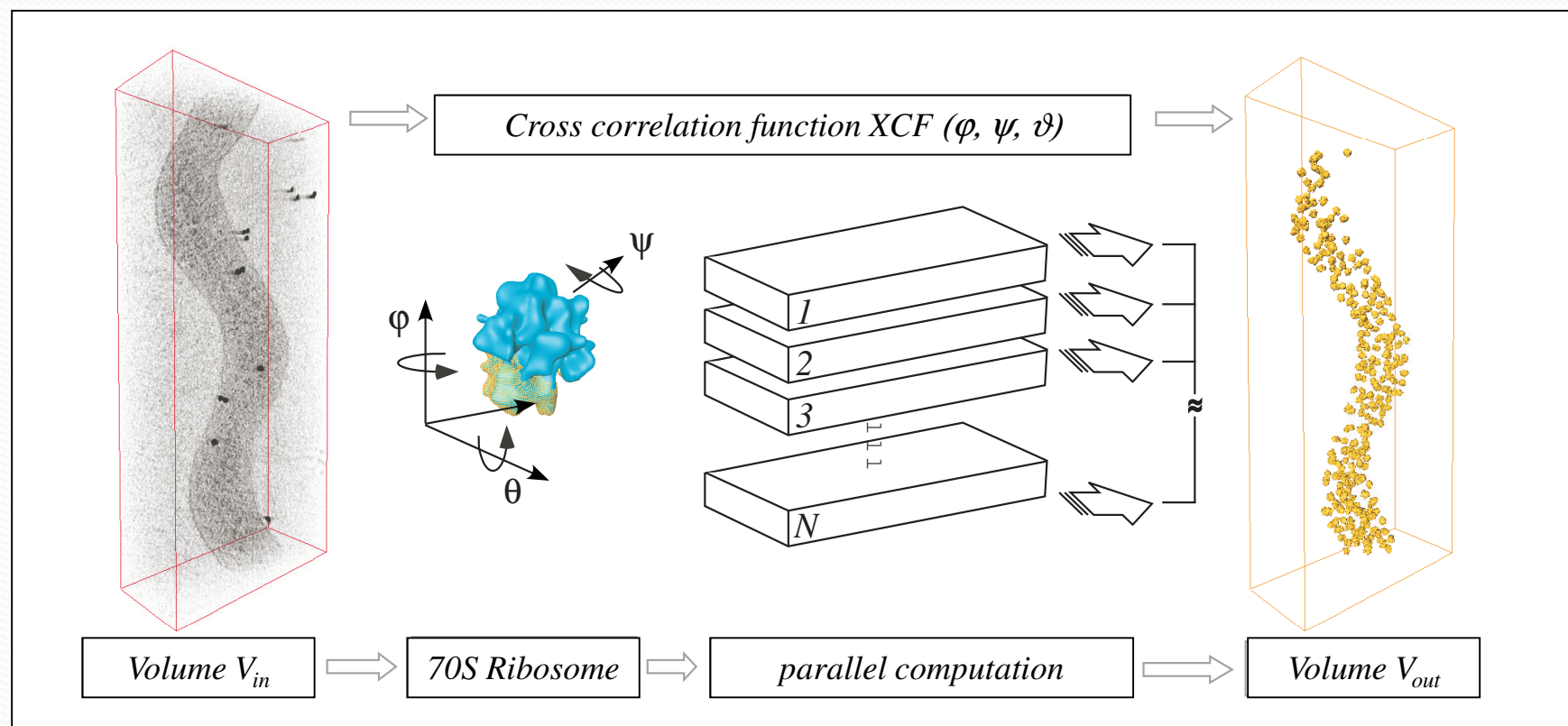
- Cílem vizuální proteomiky je vytvořit atlas biomolekul = soubor map popisujících prostorové uspořádání specifických skupin proteinů
- Kryo EM ve spojení s počítačovými metodami je schopna vytvořit tyto mapy s nanometrovou přesností



**20S Proteasome**

J. Löwe et al., Science 268 (1995) 533-539

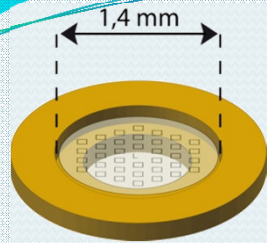
# Detekce a identifikace



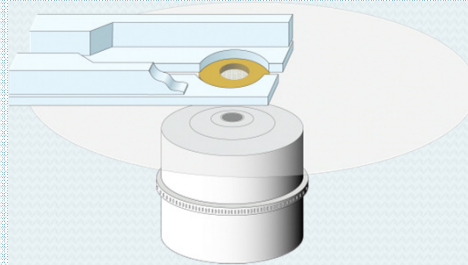


# CLEM on Cultured Cells

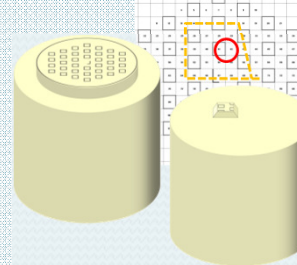
Spiegelhalter C. *et al.* PLoS One Feb 2010



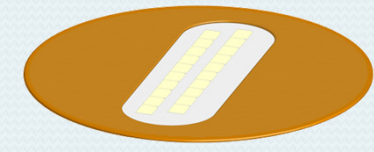
Culture substrate (aclar) with laser carved space coordinates.



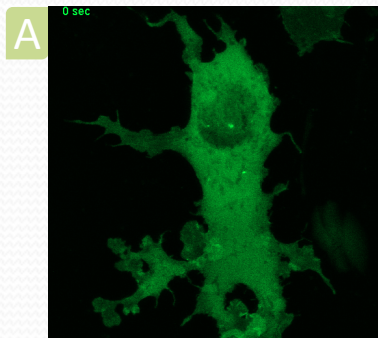
LM imaging on the HPF-ready cultured cells.



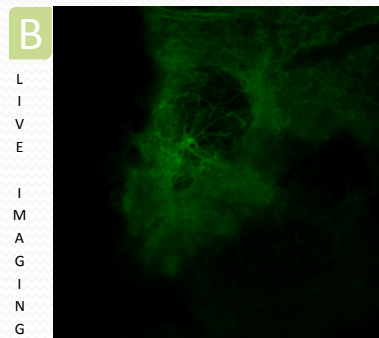
Targeted trimming and ultramicrotomy.



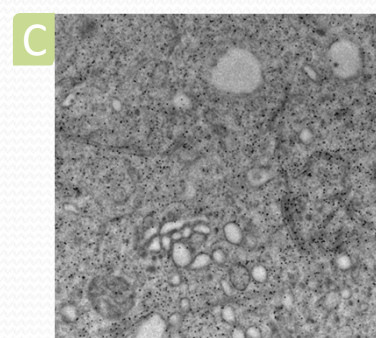
Serial IEM or TEM tomography .



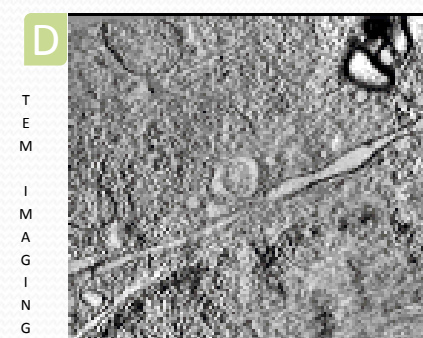
Hypo-osmotic choc in mtm1-GFP cos cells (time-lapse confocal).



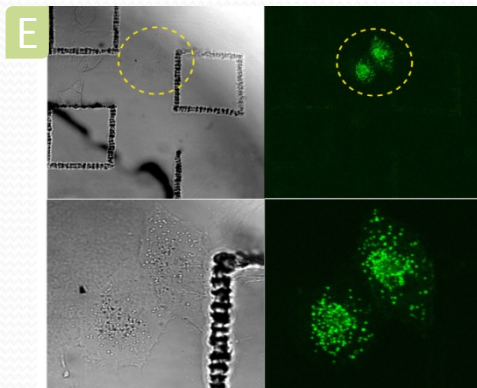
Bin-GFP tubules in cos cells (Z-stack confocal).



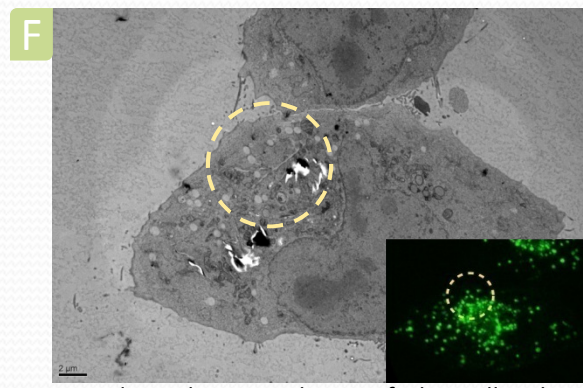
Immunogold @GFP on serial sections (bin1-GFP cos cells).



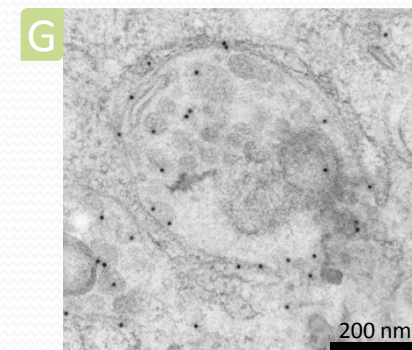
TEM tomography (bin1-GFP cos cells).



Cell of interest targetting with the laser patterned culture substarte.



Correlation between the LM of a live cell and a TEM section. (Hela cell, MLN64-gfp)



Immunogold @ gfp. The GFP signal is localised at the lysosome periphery.

# Příprava preparátů pro SEM

## Mrazové metody:

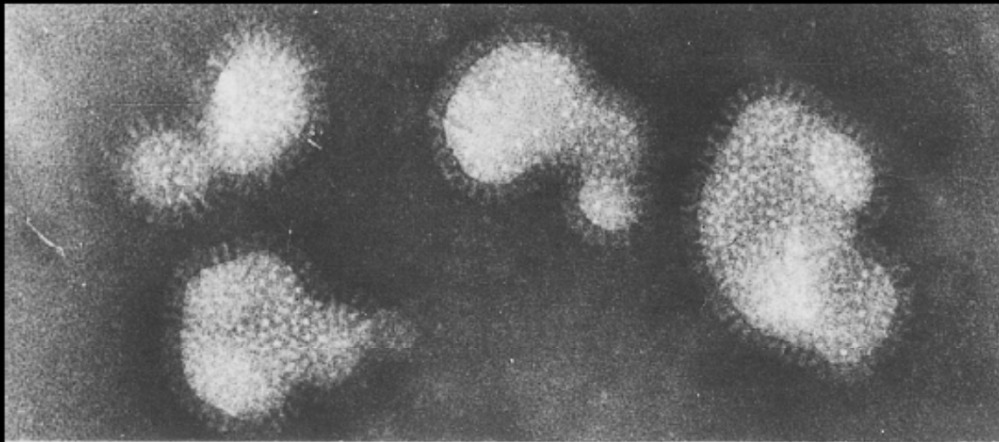
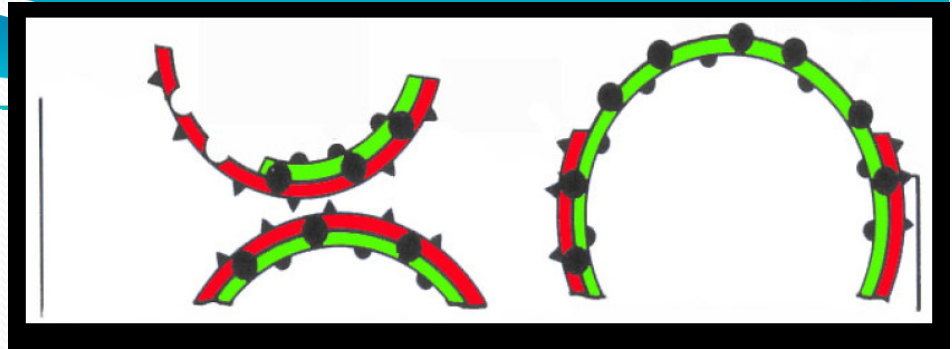
Nejlepší metody pro pozorování biologických vzorků v SEM blízko nativního stavu, dynamické děje

**Mrazová fixace** – přímé pozorování zmrazeného materiálu

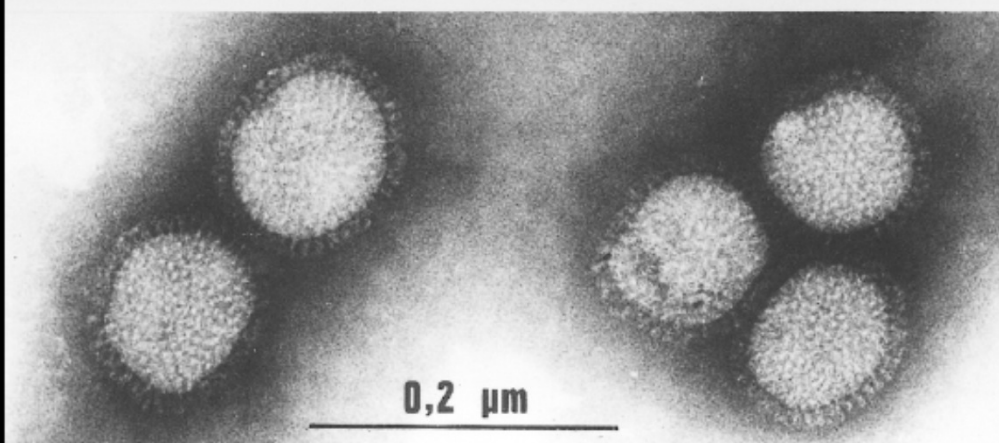
- mrazové sušení (freeze drying)
- mrazové leptání (freeze etching)
- mrazové lámání (freeze fracturing)



# Mrázové sušení Freeze Drying



Air-dried

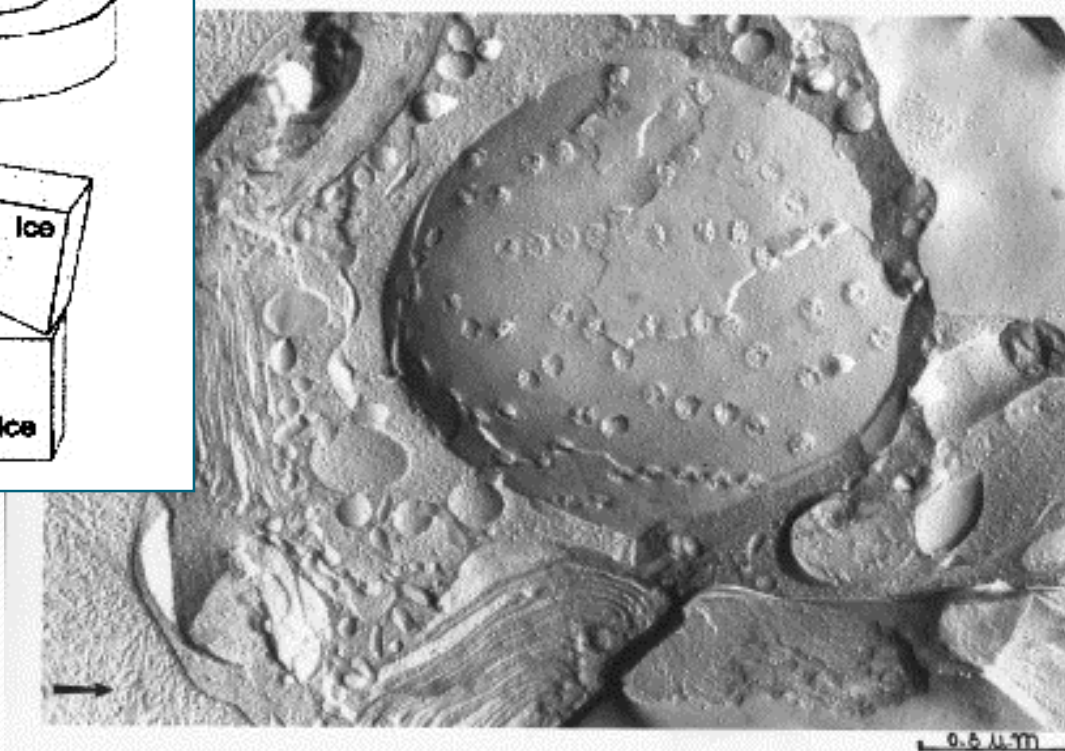
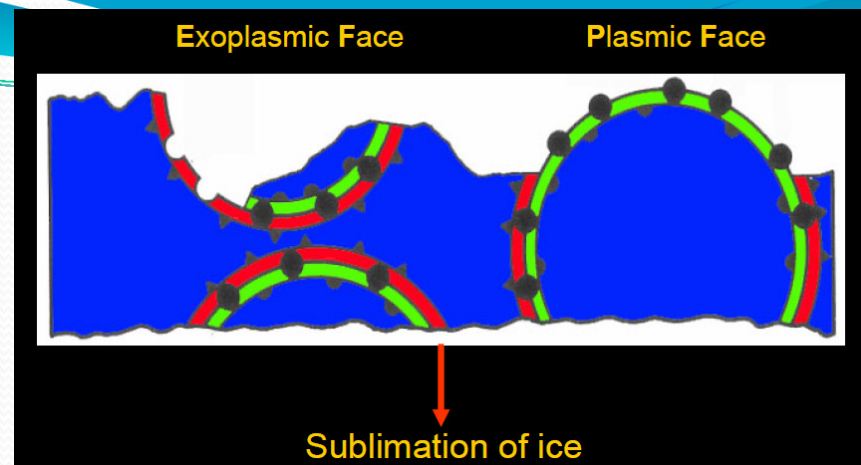
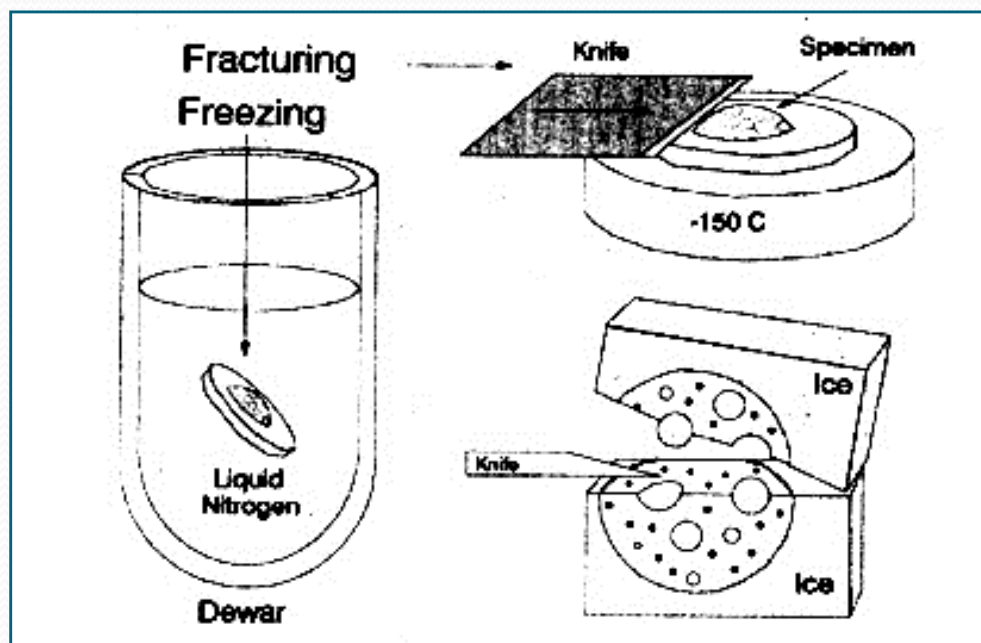


Freeze-dried

Nermut, M.V. and Frank, H. (1971) Fine structure of influenza A2 as revealed by negative staining, freeze-drying and freeze-etching. J. Gen. Virology 10, 37-51.

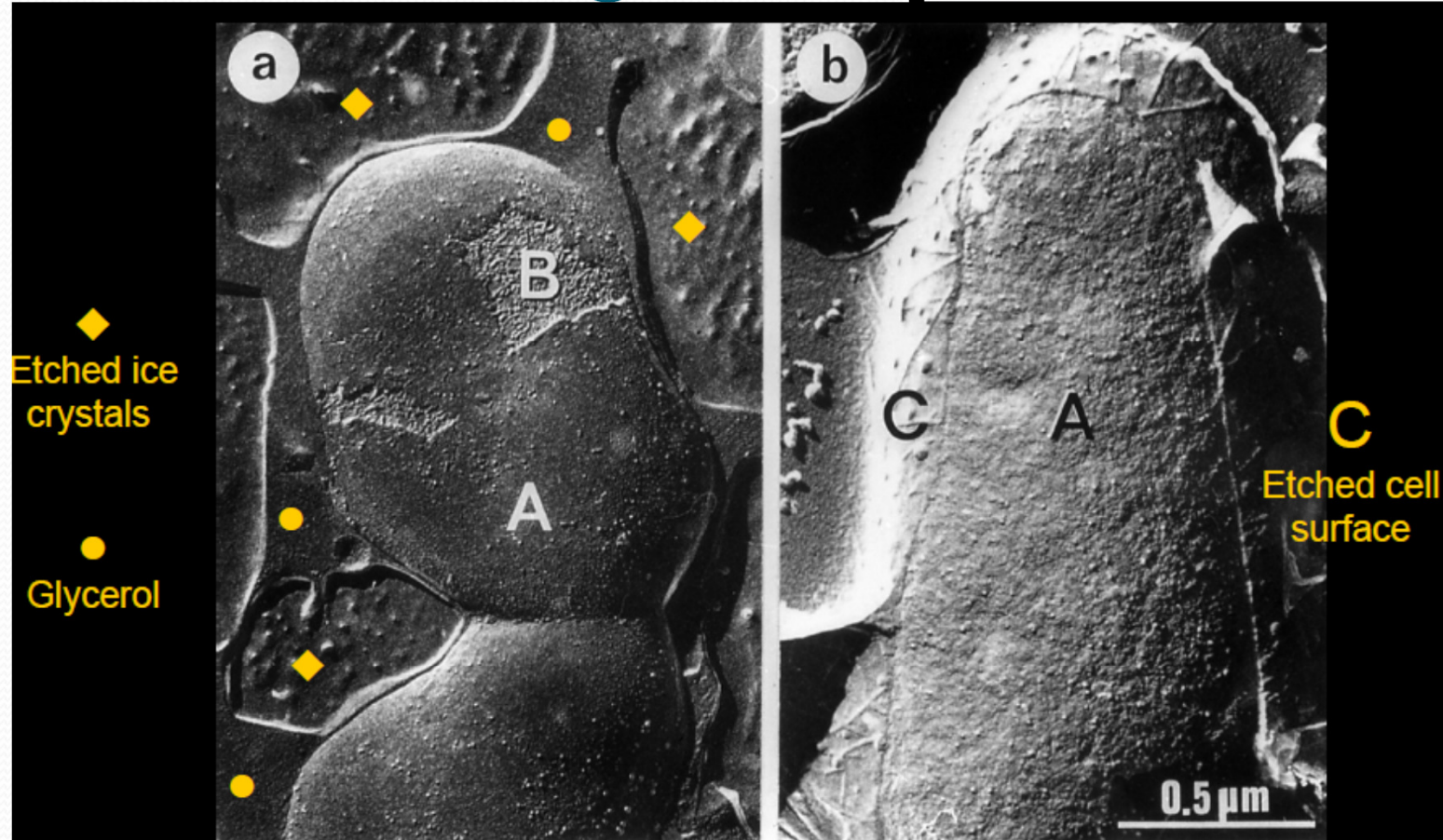
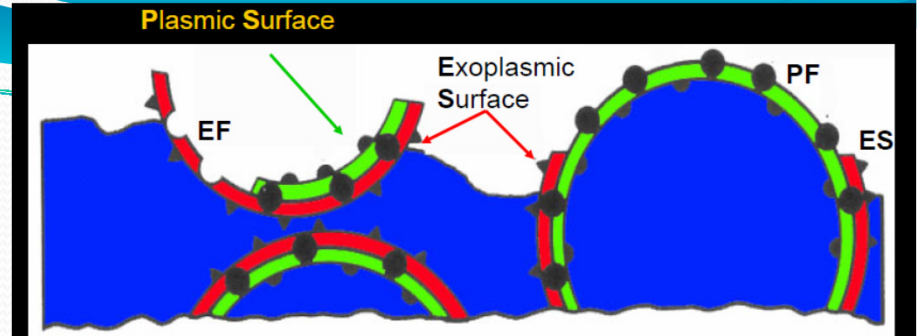
# Mrázové lámání

## Freeze Fracturing





# Mrázové leptání Freeze Etching

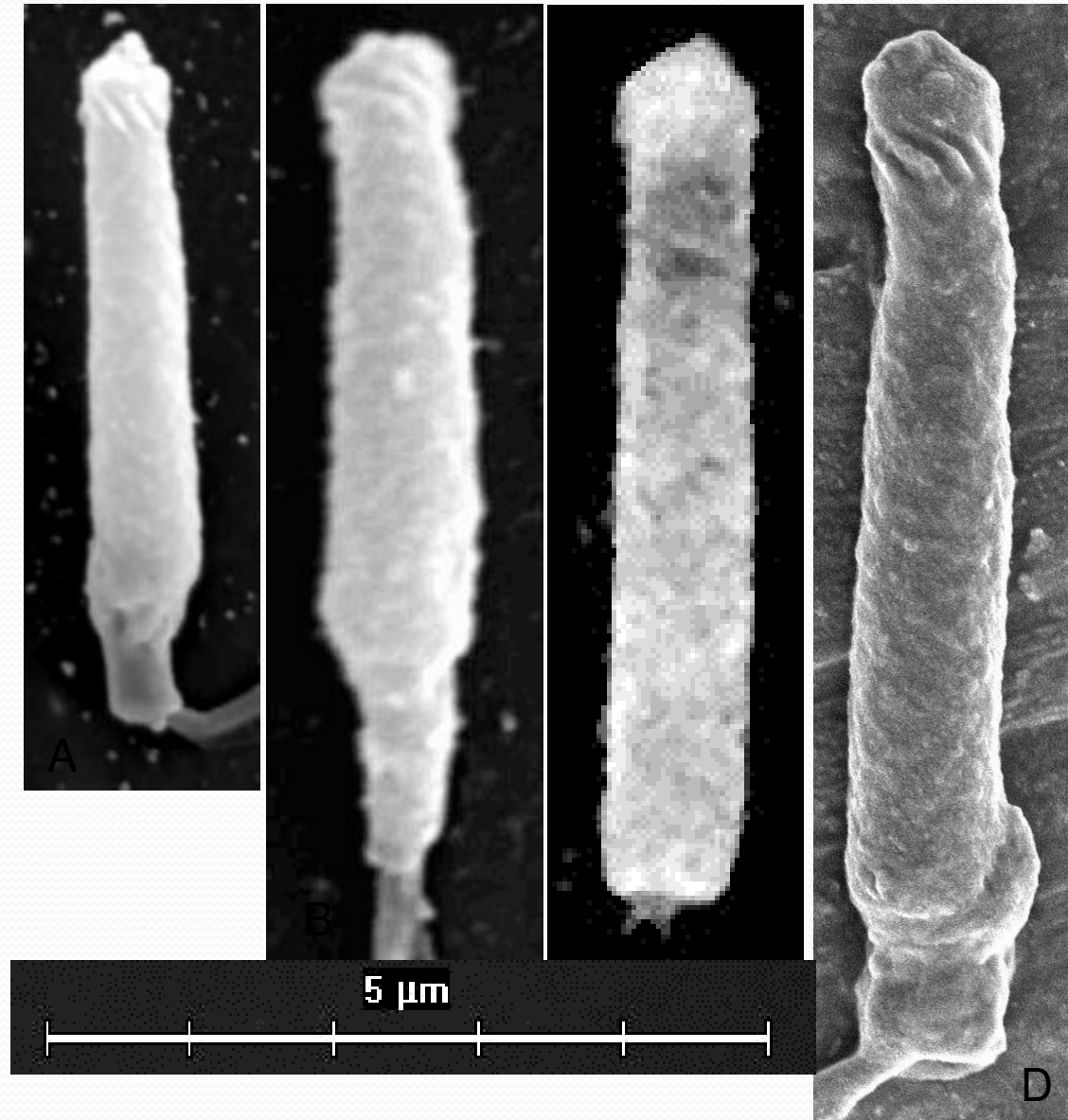


Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y. and Henning, U. (1978) Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the membran lipoprotein and other major outer membrane proteins. J. Bacteriol. 136, 280-285

# SEM

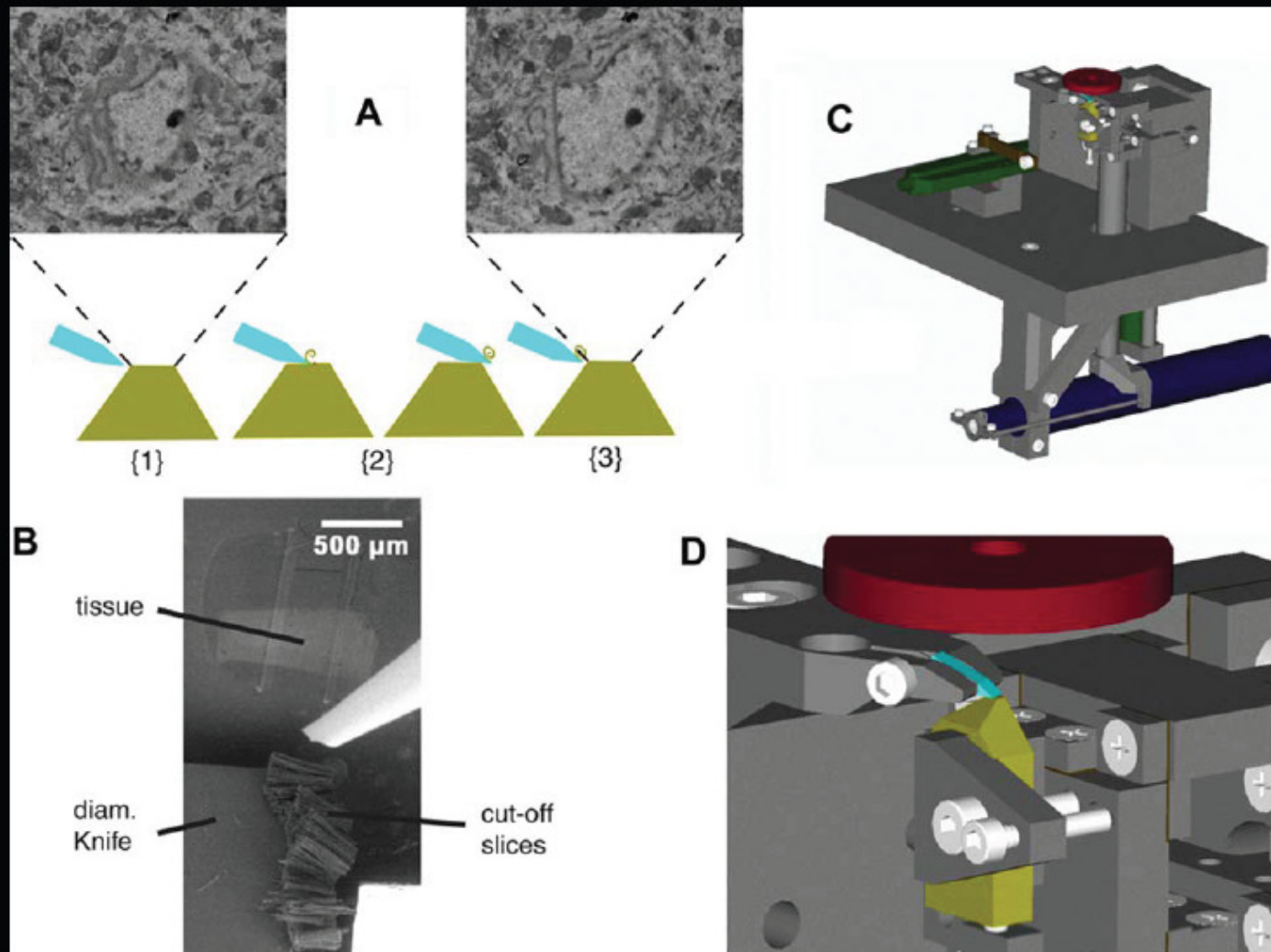
Distribuce velikosti  
spermie jesetera  
v závislosti na  
způsobu přípravy  
preparátu:

- A. Sušení CPD
- B. Sušení t-BA
- C. Bez vysušení –  
ESEM
- D. Zmrazený -  
KryoFESEM





# 3D rekonstrukce v SEM



Denk, W., and Horstmann, H (2004) Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. PLoS Biology 2(11) 1901-1909.

# 3D rekonstrukce v SEM

- FIB – použití fokusovaného svazku iontů Ga k odprašování/odřezávání povrchu bločku pro tomografii
- Korelativní mikroskopie: kombinace několika typů mikroskopických metod za účelem získání nových informací o studovaném vzorku v navazujících rozsazích zvětšení (fluorescenční – TEM)





# Děkuji za pozornost!

[www.microscopy.cz](http://www.microscopy.cz)

[www.paru.cas.cz/lem](http://www.paru.cas.cz/lem)

[www.natur.cuni.cz/lem](http://www.natur.cuni.cz/lem)