

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



Příprava preparátů pro SEM

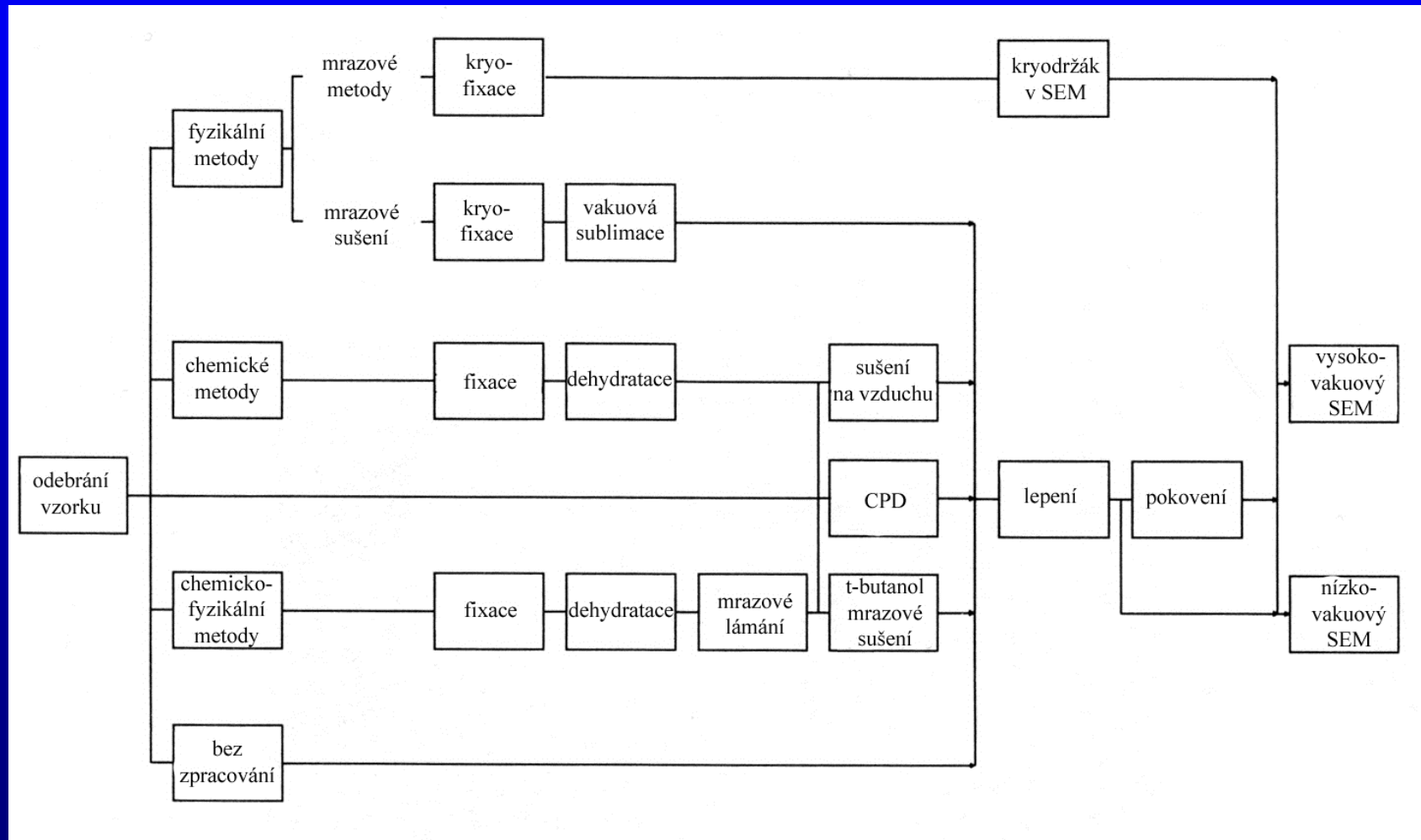
Jana Nebesářová

Biologické centrum AV ČR, České
Budějovice

Proč musíme připravovat biologické objekty pro SEM

1. Obsahují vodu - stabilita ve vakuu
 - pro vysokovakuové SEM **suché**
 - pro nízkovakuové - **do 70 % vody**
 - pro environmentální - **zavodněné**
2. Stabilita při ozáření primárními elektrony
3. Dostatečná produkce sekundárních elektronů
4. Zastavení změn souvisejících s odebráním a zpracováním vzorku

Možnosti přípravy biologického materiálu pro SEM



Standardní postup přípravy pro SEM:

1. Získání vzorku a v případě potřeby jeho očištění
2. Fixace preparátu
3. Promytí preparátu a následná dehydratace
4. Vysušení preparátu a jeho nalepení
5. Zvýšení povrchové vodivosti preparátu

Ad1: Velikost preparátu - omezena posuvem stolku v mikroskopu, při zmenšování pozor na deformace

Ad2: Očištění pod stereomikroskopem preparační jehlou, oplachy isotonickým roztokem NaCl, HCl, sonifikace, centrifugace, ofukování tlakovým vzduchem

Fixace

Chemická

Aldehydy - GA FA (1-4%); Oxid osmičelý (1%)

Pufry - kakodylátový, fosfátový

Odvodnění

Etanol, aceton, 2,2-dimetoxyproman

Řada se vzrůstající koncentrací org. rozpouštědla,
kontinuálně

Sušení

Metoda kritického bodu - vysušení preparátu bez jeho poškození fázovým rozhráním

Kritický bod - zahříváním kapaliny v omezeném objemu, kdy dojde k vyrovnání tenze páry a kapaliny a zmizí mezi oběma fázové rozhraní

Tab.1 - Kritický tlak a teplota některých sloučenin

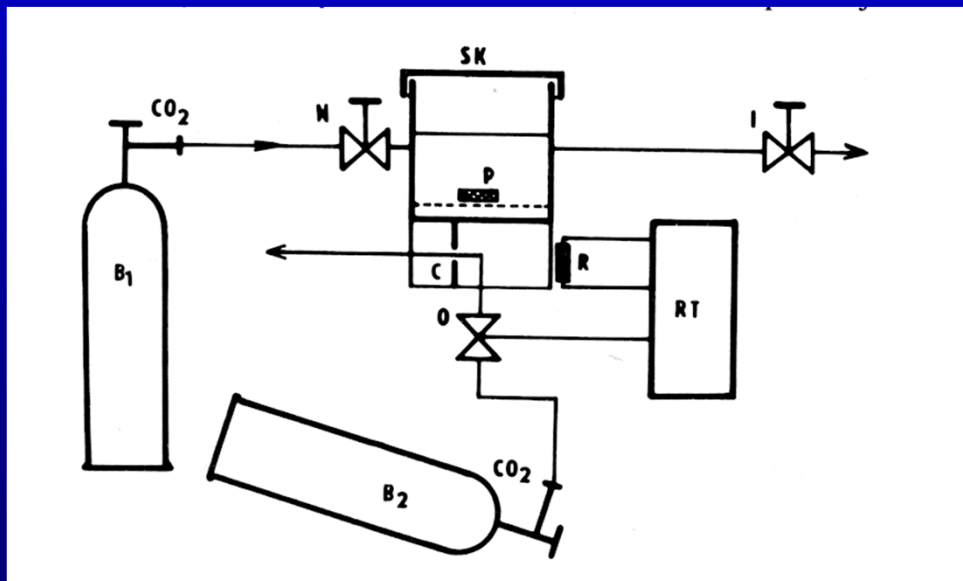
Sloučenina Rozpustnost Kritická teplota (°C) Kritický tlak (atm)

voda	----	374	217,7
oxid uhličitý	aceton, amylacetát	31,1	72,9
Freon 116	aceton	19,7	29,4
oxid dusný	----	36,5	70,8

Metoda kritického bodu

Držáky na vzorky

Schéma aparatury pro sušení preparátů
pomocí metody kritického bodu



Alternativní metody sušení

1. Na vzduchu:

Organická rozpouštědla s nízkým povrchovým napětím, dobře rozpustná v běžných rozpouštědlech, nízkým bodem varu a nereagující s preparátem -

hexametyldisilazan (HMDS), dimetoxypentan (DMP)

2. Vakuová sublimace:

látky, které tuhnou bez tvorby krystalů a za přijatelných teplot

t-butanol, PELDRI II

Lepení

Al- terče, speciální pásky - uhlíková, double tape
Lepidla - nesmí být hygroskopická a obsahovat vodu,
nesmí vzlínat, nesmí měnit vlastnosti ve vakuu, těkat,
- musí být el. vodivé, minimální emise elektronů

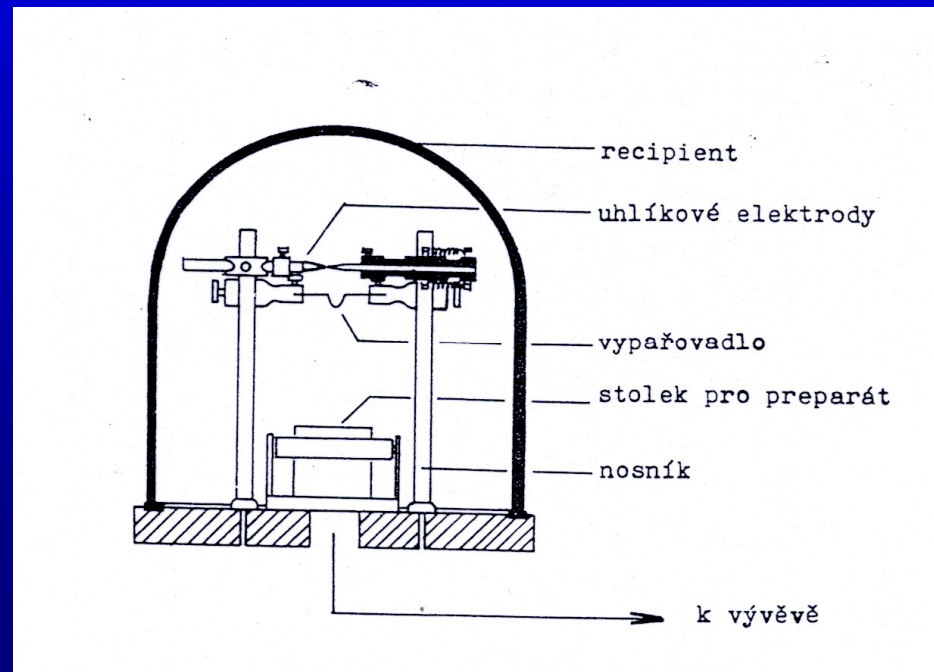


Zvýšení povrchové vodivosti preparátu

Minimalizace nbíjení, zvýšení tepelné odolnosti preparátu, zvýšení produkce sekundárních elektronů

1. Vakuovým napařováním

Tloušťka napařené
vrstvy:
 $T = W/4R^2d$



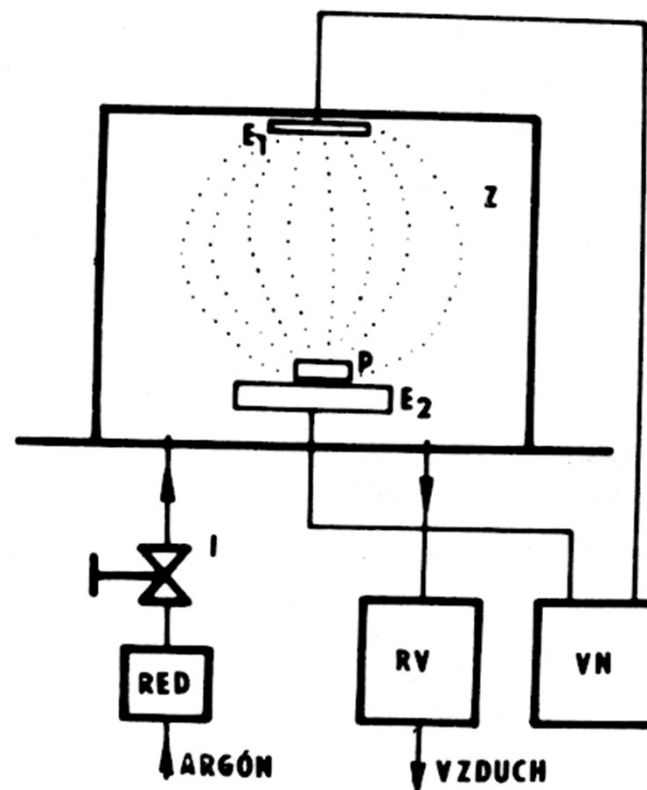
Zvýšení povrchové vodivosti

2. Iontové naprašování

$$T = A \cdot U \cdot t \cdot K$$

K plynová konst.

Pro Ar = 5



Zvýšení povrchové vodivosti

3. Impregnací - vytvoření nánosu kovu na povrchu preparátu chemickou cestou

reakce oxidu osmičelého s kyselinou tanovou (TAO)

reakce oxidu osmičelého s thiokarbohydrazidem (OTO)

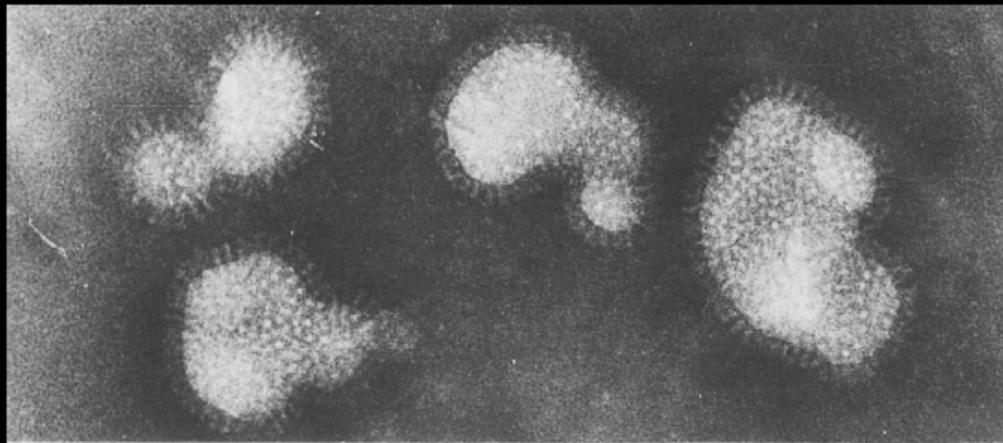
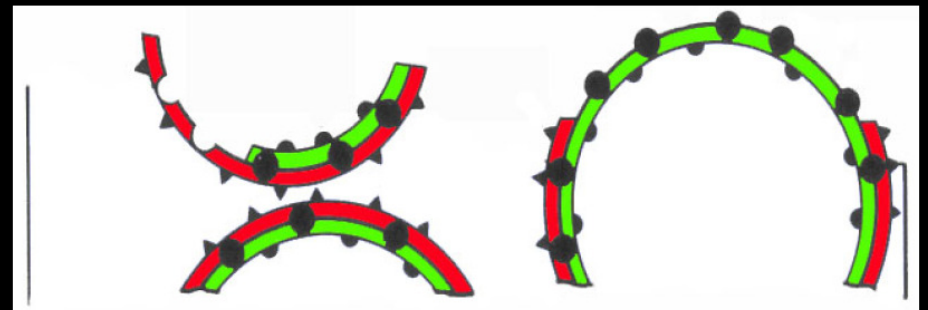
Mrazové metody

Mrazová fixace – přímé pozorování zmrazeného materiálu

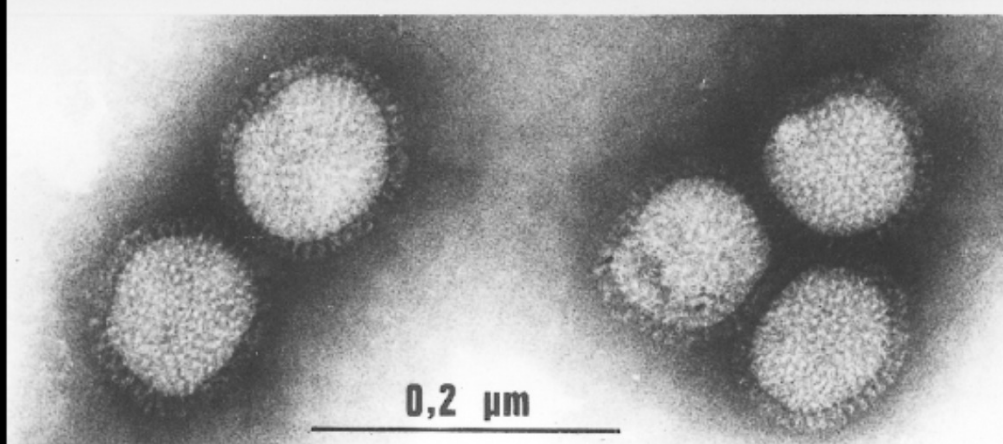
- mrazové sušení (freeze drying)
- mrazové leptání (freeze etching)
- mrazové lámání (freeze fracturing)

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

Mrazové sušení Freeze Drying



Air-dried

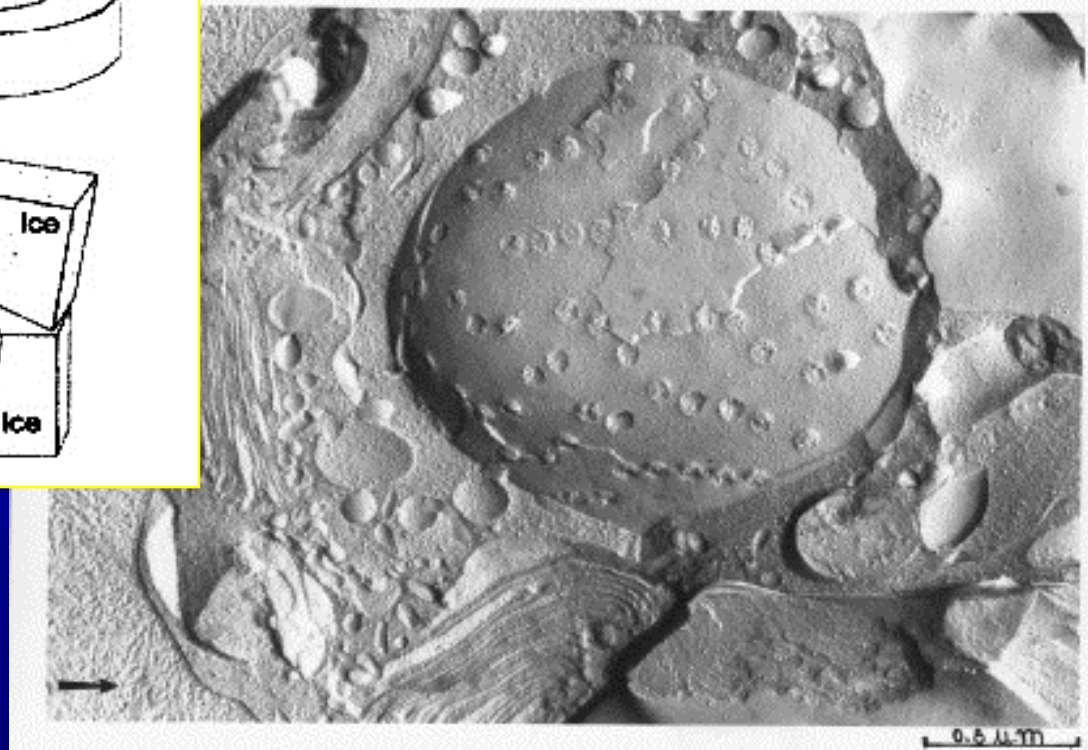
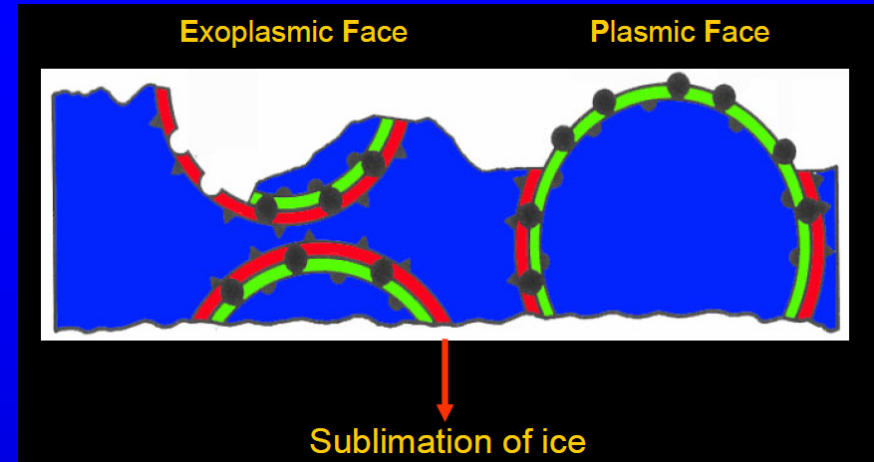
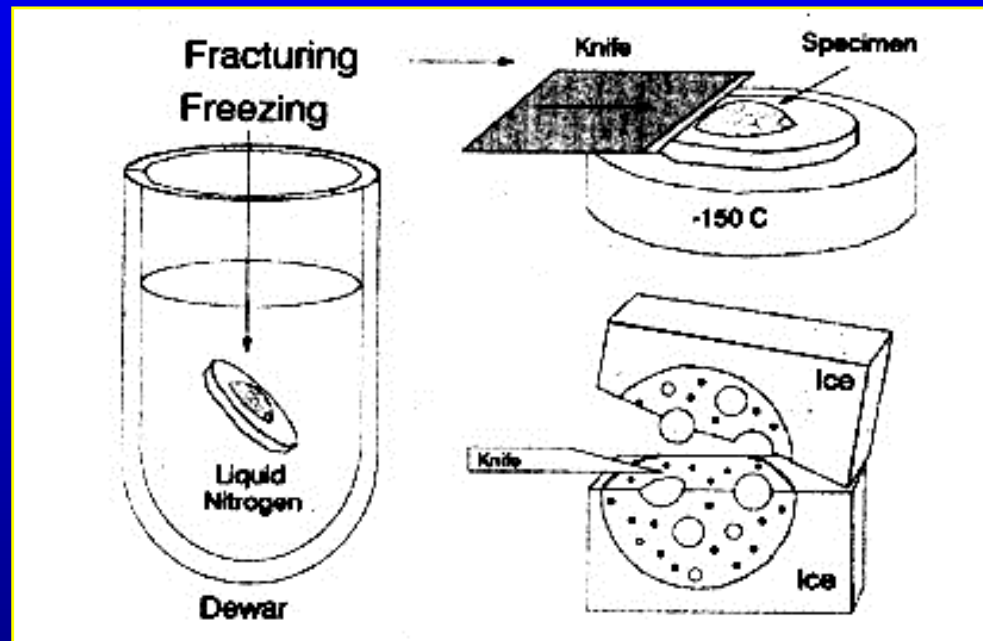


Freeze-dried

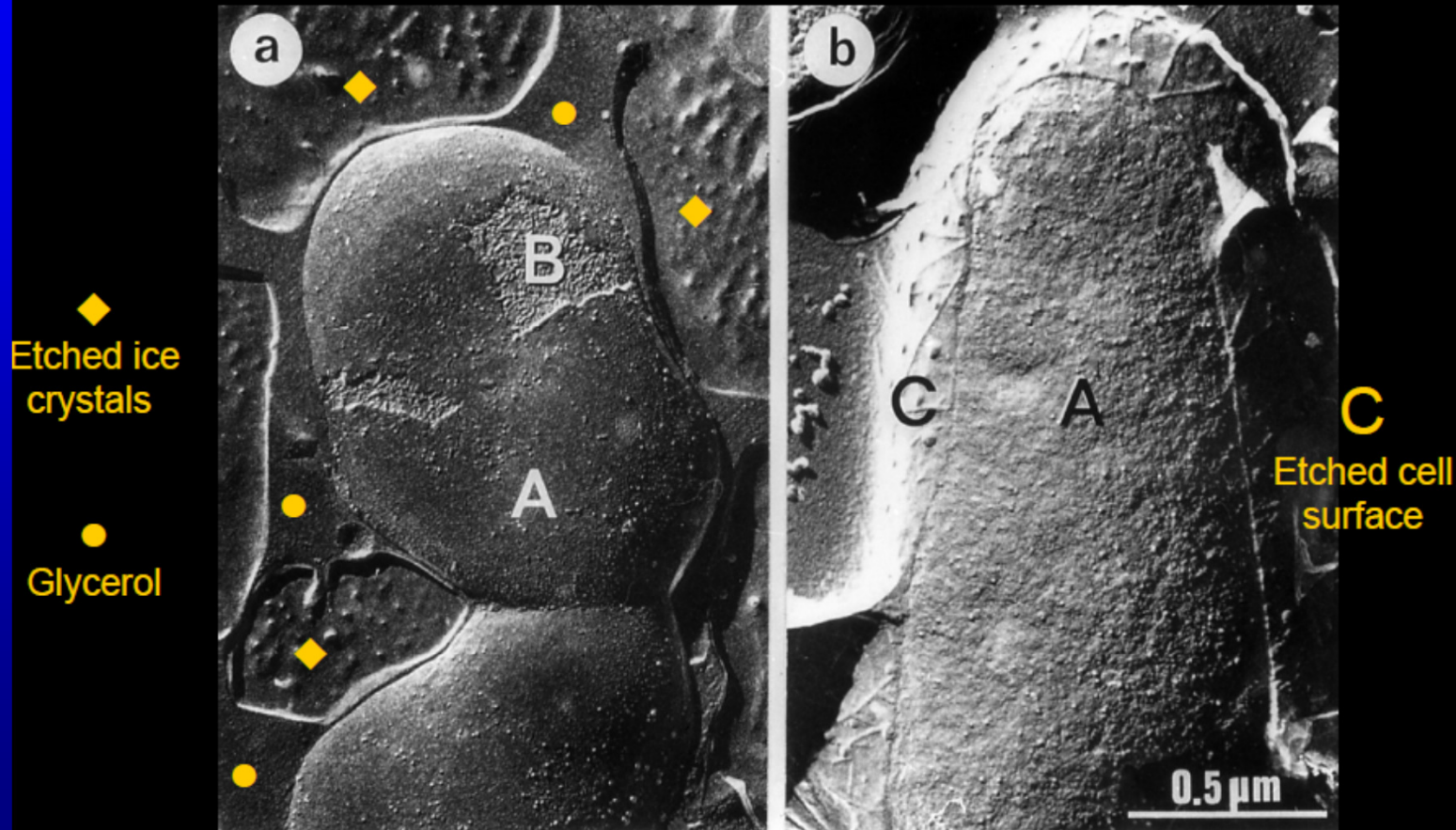
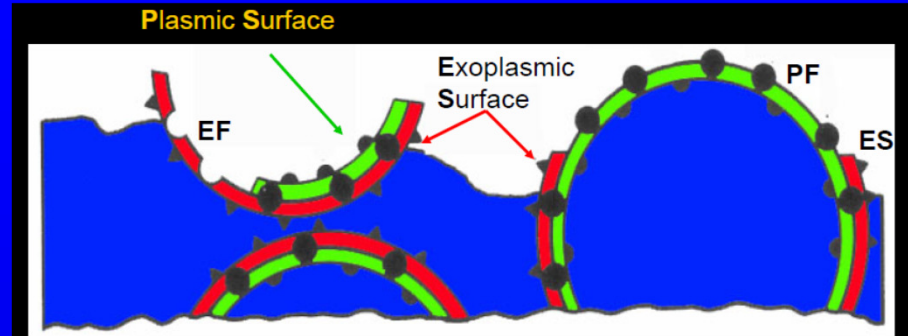
Nermut, M.V. and Frank, H. (1971) Fine structure of influenza A2 as revealed by negative staining, freeze-drying and freeze-etching. J. Gen. Virology 10, 37-51.

Mrazové lámání

Freeze Fracturing



Mrazové leptání Freeze Etching

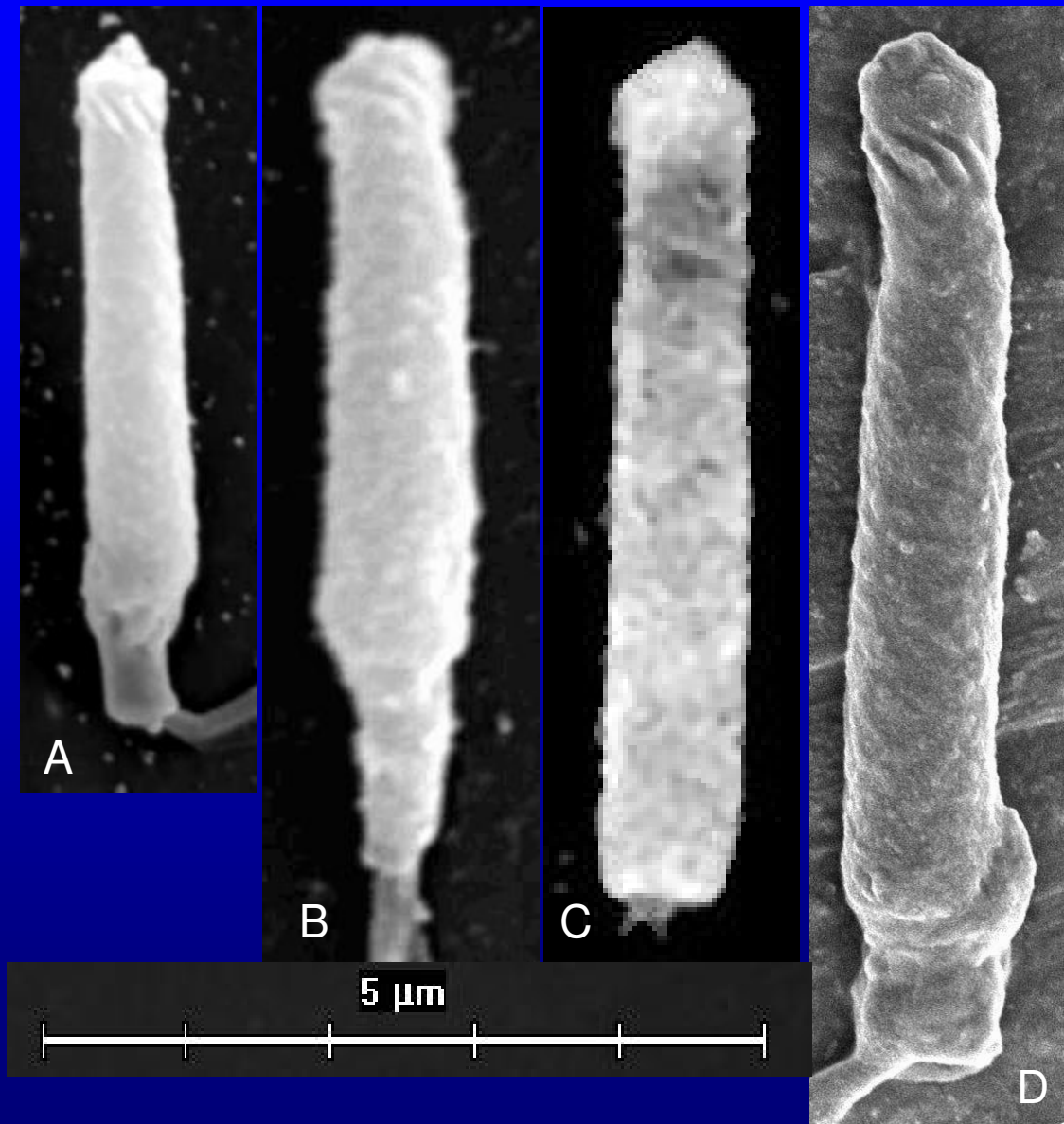


Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y. and Henning, U. (1978) Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the membran lipoprotein and other major outer membrane proteins. J. Bacteriol. 136, 280-285

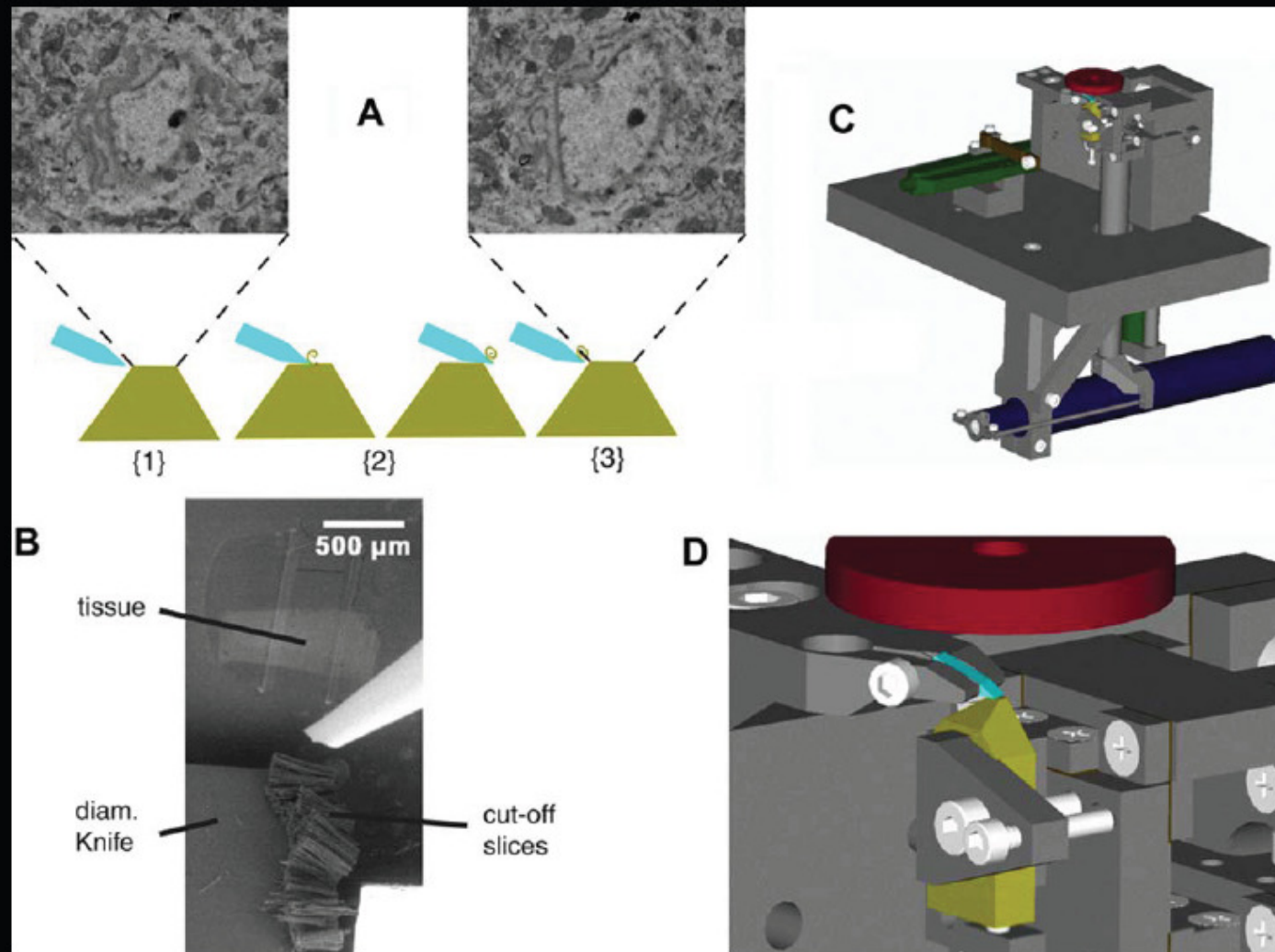
SEM

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) 1901-19009.

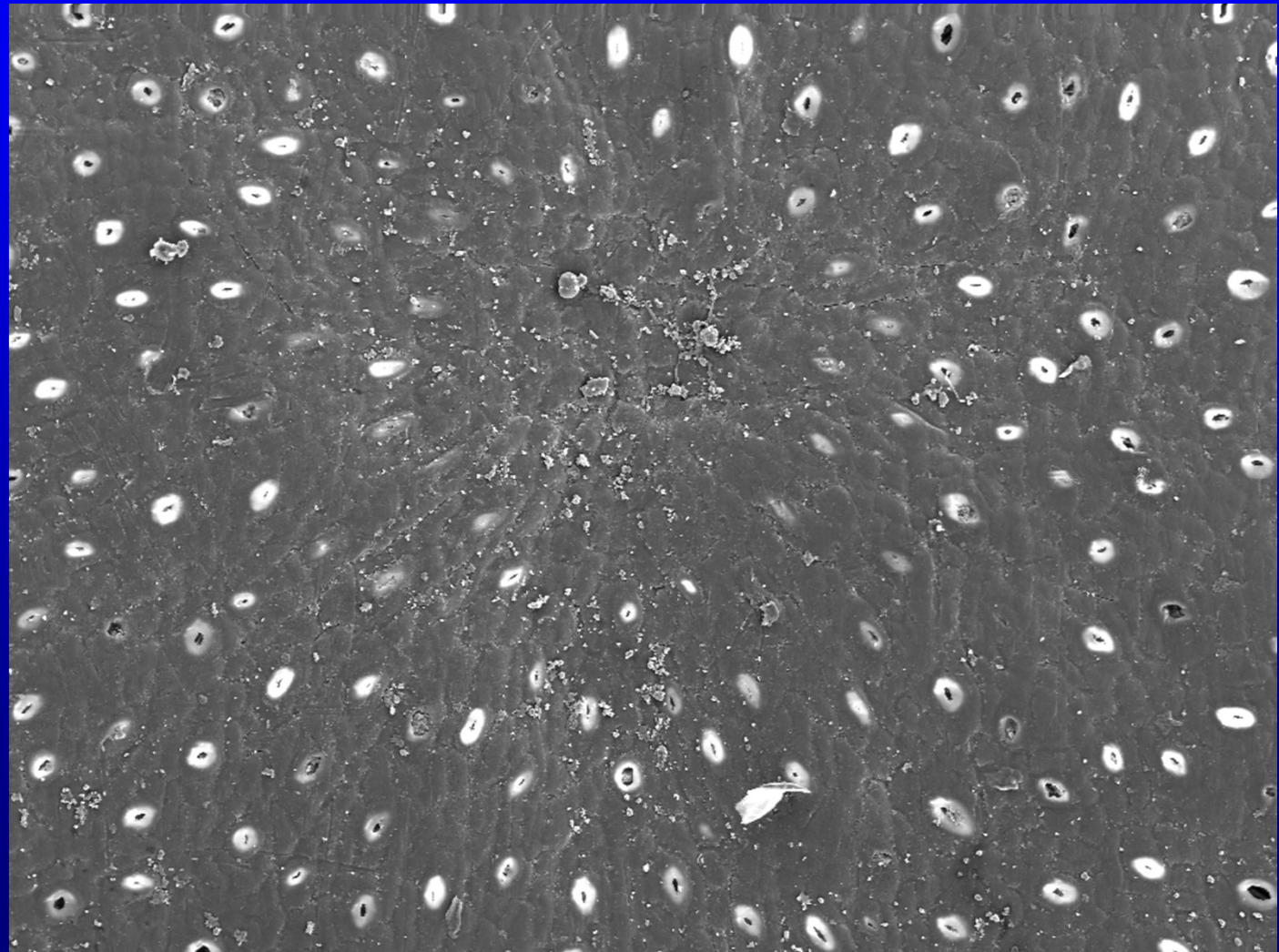
3D rekonstrukce v SEM

- 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)

Malá
mikroskopická
pohádka

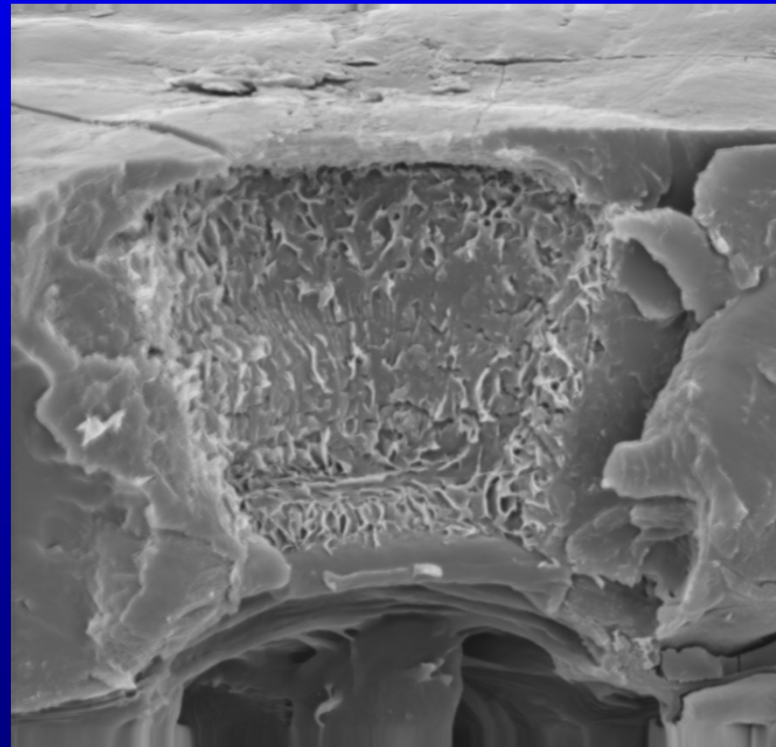
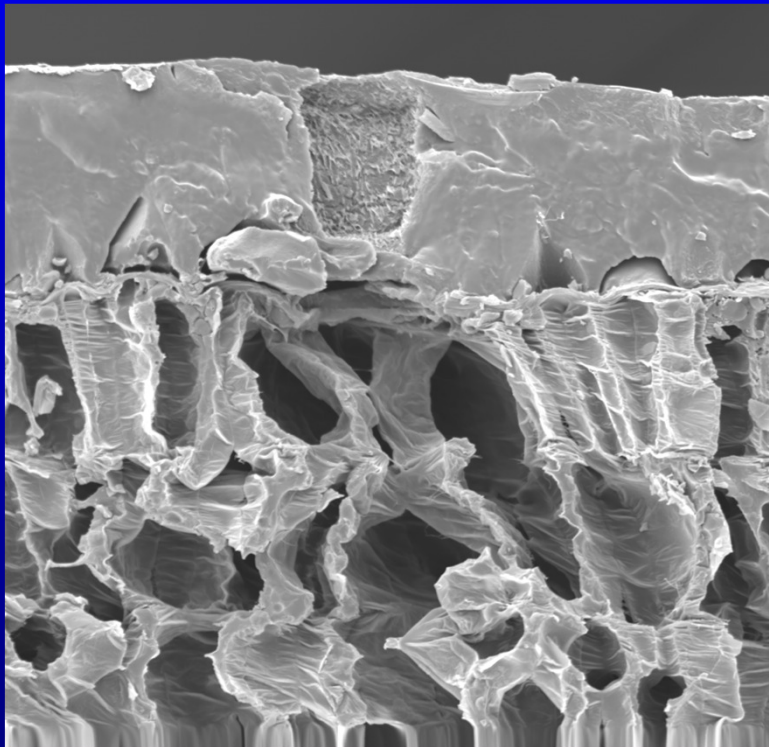
SEM JEOL 6300

Povrch suchého
Listu Eucalyptu
U = 15 kV
Pokovené Au
2 min



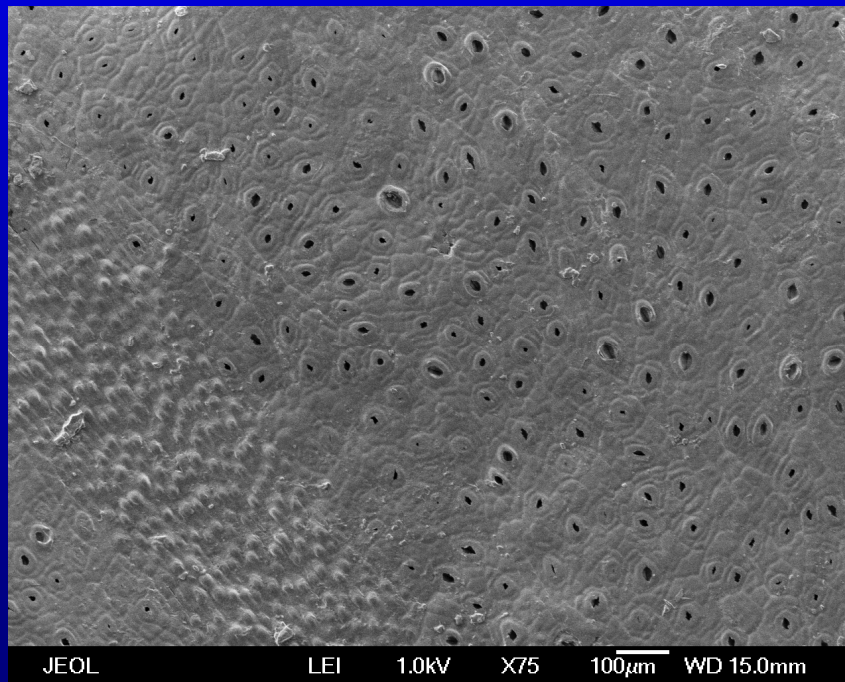
SEM JEOL 6300

List zmrazen, zlomen a pokoven Au, 3 min; U 15 kV

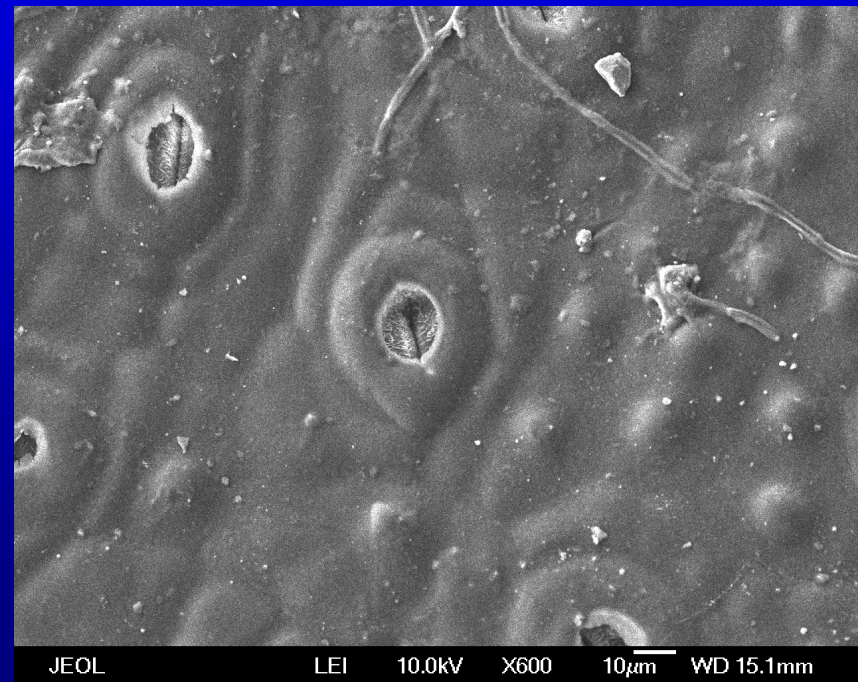


SEM JEOL 6700 FE

Suchý list, zmrazený,
nepokovený
U = 1 kV

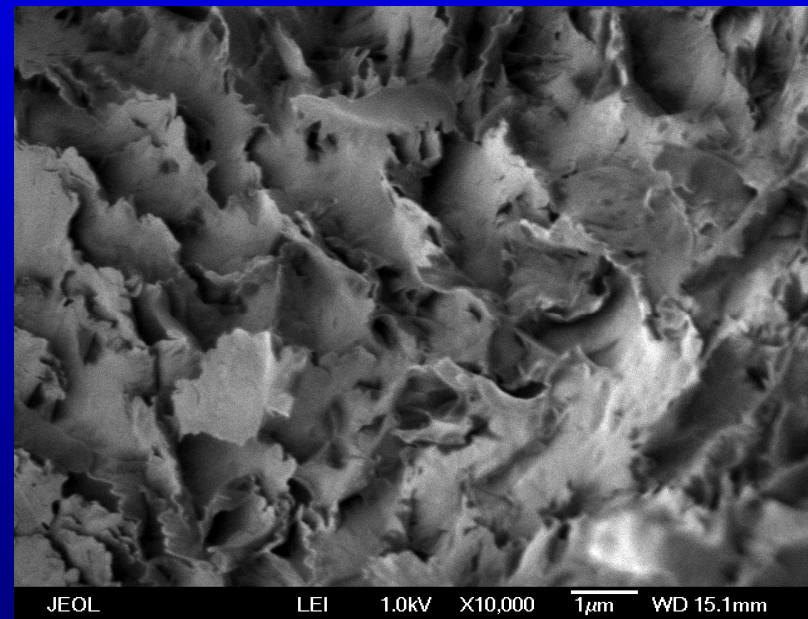
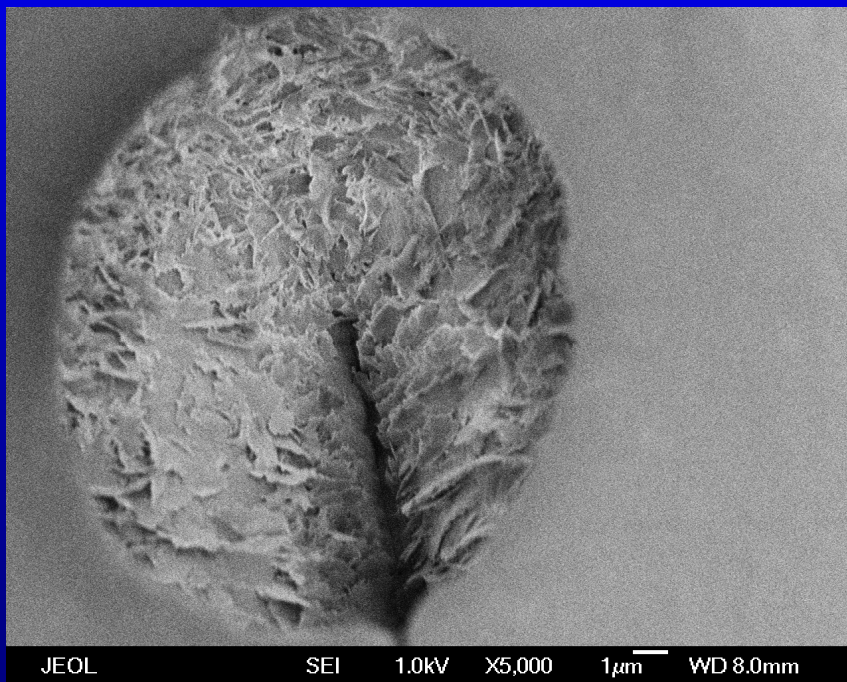


Suchý list, zmrazený,
pokovený
U = 1 kV



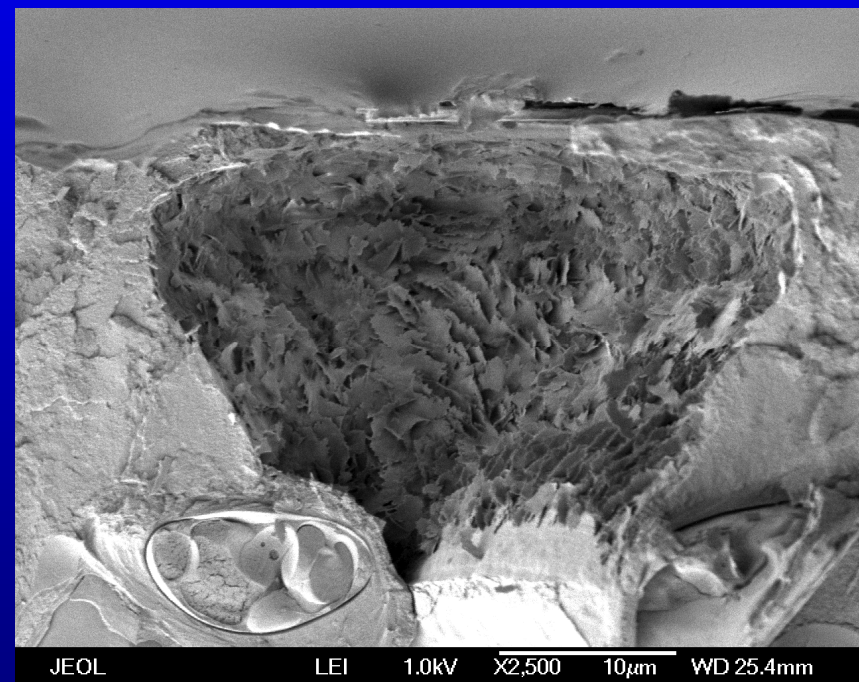
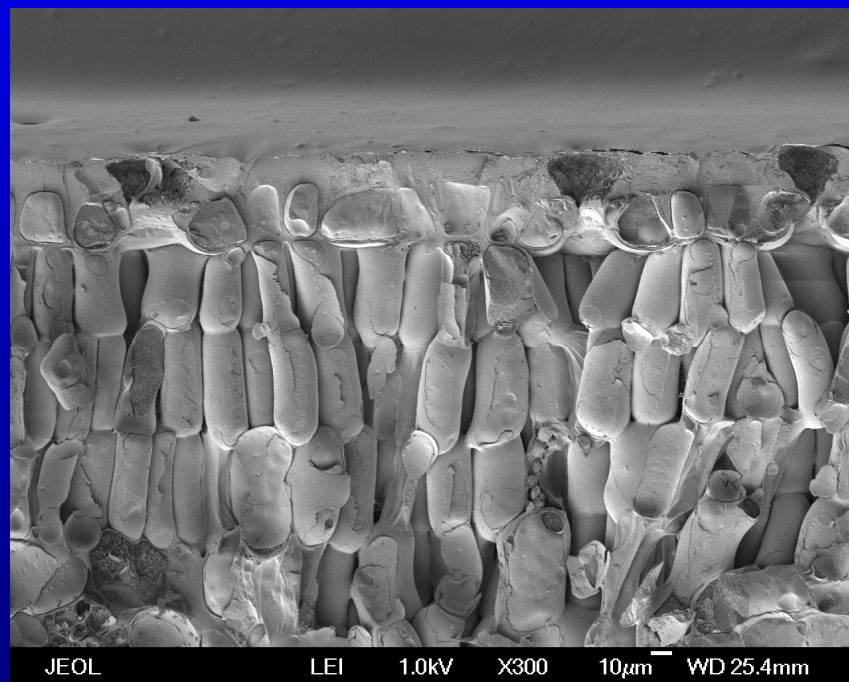
SEM JEOL 6700 FE

Detail uspořádání vosků v předprůduchové dutině
Zmrazený vzorek, pokovený, U = 1 kV



SEM JEOL 6700 FE

Suchý list, zmrazený a zlomený, pokovený, $U = 1 \text{ kV}$



Děkuji za pozornost!

