

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro  
imunoznačení v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu**

**Bc. Eliška Korandová**

**Vedoucí práce: Ing. Jana Nebesářová, CSc.**

**České Budějovice 2011**

## **Diplomová práce**

Korandová Eliška, 2011: Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunoznačení v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu. [Possibilities of using nanoparticles of different metals as markers for immunolabelling in the low voltage electron microscope. Mgr. Thesis, in Czech] - 74 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This master thesis deals with possibilities of using nanoparticles of different metals as markers for immunolabelling in the low voltage electron microscope. It presents the low voltage electron microscope LVEM 5 (DeLong Instruments, Brno, Czech Republic) as a new type of a table-size microscope specially designed for observation of specimens composed of elements with low atomic numbers.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Tato práce je součástí řešení projektu Nové nanočástice pro ultrastrukturální diagnostiku KAN200520704, jehož řešitelkou je Ing. Jana Nebesářová, CSc.

.....  
Bc. Eliška Korandová

V Českých Budějovicích 30. 4. 2011

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda vyjádřila upřímné poděkování své školitelce Ing. Janě Nebesářové, CSc., RNDr. Marii Vancové, Ph.D. a celému kolektivu Laboratoře elektronové mikroskopie za ochotu a mnohé cenné rady.



# Obsah

<b>1.</b>	<b>ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>2</b>
2.1.	Nanočástice v biomedicíně .....	2
2.2.	Elektronová mikroskopie .....	3
2.3.	Nízkonapěťový elektronový mikroskop .....	10
2.4.	Podložní blány v elektronové mikroskopii .....	17
2.5.	Imunolokalizace .....	21
2.6.	Konjugace .....	24
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
3.1.	Postup práce .....	30
<b>4.</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>31</b>
4.1.	Příprava vzorků nanočástic pro TEM a LVTEM.....	34
4.2.	Příprava ultratenkých řezů o tloušťce 20 nm pro LVTEM.....	39
4.3.	Elektrostatická konjugace .....	40
4.4.	Imunoznačení .....	41
4.5.	Pracovní podmínky mikroskopů .....	42
4.6.	Statistické zpracování .....	43
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚRY .....</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>71</b>

# 1. Úvod a cíle práce

Laboratoř elektronové mikroskopie byla založena na začátku sedmdesátých let jako servisní pracoviště s hlavním úkolem poskytovat služby v oboru biologické elektronové mikroskopie. V současnosti patří ke společným pracovištím Biologického centra AV ČR a Přírodovědecké fakulty jako součást Parazitologického ústavu.

Laboratoř elektronové mikroskopie dlouhodobě spolupracuje na projektu nízkonapěťového elektronového mikroskopu (LVTEM) a na vyvinutí nových nanočástic konjugovaných s protilátkami pro ultrastrukturální diagnostiku v biomedicíně. Nízkonapěťový elektronový mikroskop vyvinul prof. Armin Delong a pod jeho vedením firma Delong Instruments, a.s. tento typ mikroskopu vyrábí. V rámci spolupráce na uplatnění LVTEM mikroskopu v biologii má laboratoř elektronové mikroskopie zapůjčen mikroskop s označením LVEM 5 [1].

Cíle této diplomové práce jsou:

- Provést literární rešerši k dané problematice
- Zvládnout teoretické i experimentální základy práce s LVEM 5
- Vytipovat kovové nanočástice, které budou využitelné jako markery pro imunoznačení
- Navrhnout a vyzkoušet postup konjugace vhodných nanočástic s protilátkou
- Na vhodném modelovém systému provést s připravenou značenou protilátkou imunolokalizaci

Tato práce je financována z projektu Nové nanočástice pro ultrastrukturální diagnostiku KAN200520704.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Nanočástice v biomedicině

Pod pojmem nano si představíme jednotkovou předponu vyjadřující  $10^{-9}$  násobek základní fyzikální jednotky. Hlavním významem tohoto slova, které pochází z řečtiny, je malost - trpasličtí. Tento význam také platí pro termín nanoparticules, česky nanočástice [2,3].

Nanočástice v medicíně jsou zatím ve fázi úvah a testování. Uvažuje se o několika různých technologiích. Jednou z nich je použití materiálů se speciální strukturou na nanoskopické úrovni. Lehce odbouratelné nanoobaly by dokázaly vyhledat buňku, vstoupit dovnitř, uvolnit ze sebe lék a nechat se odbourat buňkou. Mezi nanotechnologie využitelné v medicíně bude možné zařadit i nanotechnologické stroje (či nanoroboty) pracující na biochemickém principu. Vytvořily by tunely skrz buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu cílové buňky. Tunely by umožňovaly přístup pouze specifickým látkám, tzn. že stejná látka vyskytující se přirozeně v organismu by neprošla, ale látka stejná a pouze speciálně označená (např. nanočásticí Au) by se bez problémů dostala dovnitř. Tyto tunely by regulovaly i množství a rychlost průchodu látek. Takové zařízení by se dalo použít například pro ničení rakovinotvorných buněk. Zatím však tento nápad zůstává jen relativně malým průmyslem s velkými překážkami. Čas takového pokroku je měřen v dekadách, ne v rocích [3].

Nanočástice jsou definovány jako struktury, u kterých nejméně jeden rozměr nepřesahuje velikost jednotek až stovek nanometrů. Nanostruktury lze dělit podle chemického složení na kovové (např. Au, Ag, Pd, Pt), polovodičové – kvantové tečky (např. QD) a nekovové (např. uhlíkové nanotrubičky). Ve své práci jsem se zaměřila nejprve na komerčně vyráběné Au, později na laboratorně připravené nanočástice Ag, Pd,  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  a polovodičové nanokrystaly quantum dots. K zobrazení nanočástic se používají elektronové mikroskopy [4].

Suspenze jemně rozptýlených nanočástic jsou označovány jako koloidy [6]. Koloidy nazýváme takové soustavy, kde jedna látka se vyskytuje v malých částicích (koloidní částice) a kde tyto částičky jsou rozptýleny v druhé látce. Tato směs tvoří koloidní systém (koloidní roztok, koloidní disperzi) [5]. V našem případě se jedná o

kovové nanočástice v rozmezí 5-15 nm, které jsou rozptýleny ve vodném roztoku. Využívá se metody, při které jsou nanočástice, které jsou nabitě, obalené ionty. Tím se jejich náboj vyruší, zůstávají v roztoku separované. Nanočástice jsou tak chráněné před rizikem ireverzibilních agregací při jejich syntéze, během skladování a při jejich používání. Kvůli elektrondenznímu charakteru jsou kovové nanočástice snadno rozpoznatelné v transmisním elektronovém mikroskopu a jsou tedy ideální značkou (markerem) při imunolokalizaci buněčných komponent – proteinů, enzymů, cukrů – v buněčné ultrastruktuře. Navíc jejich částicový charakter pomáhá při imunoznačení stanovit množství jednotlivých hledaných makromolekul v dané struktuře tím, že počtu nanočástic, které lze rozeznat v buněčné ultrastruktuře po provedení imunoznačení, odpovídá jejich počet díky specifické vazbě se značenou protilátkou. Pro přípravu komplexů protilátka-nanočástice v imunocytochemii používáme nanočástice se stanovenou velikostí a s úzkým velikostním rozpětím [6].

## **2.2. Elektronová mikroskopie**

### **2.2.1. Transmisní elektronová mikroskopie**

Transmisní (prozařovací) elektronová mikroskopie (TEM) v biologii přinesla v průběhu více než půl století mimořádné množství poznatků. Transmisní elektronový mikroskop (obr.1) slouží k pozorování a zvětšování velmi malých objektů, které již nejsou světelným mikroskopem zobrazitelné. Jakýkoliv mikroskop může maximálně rozlišit dva body ležící od sebe ve vzdálenosti přibližně poloviny vlnové délky zdroje osvětlení. Abychom mohli hlouběji proniknout do mikrosvěta, na který už světelný mikroskop nestačí, musíme proto použít záření s mnohem kratší vlnovou délkou než má viditelné světlo. Použití lineárního svazku urychlených elektronů se zdá jako nejlepší způsob řešení [7,8,9,26].

Konstrukčně se dá elektronový mikroskop považovat za analogii mikroskopu světelného. Základním rozdílem však je, že k zobrazení preparátu v elektronovém mikroskopu používáme proud primárních urychlených elektronů [8,26]. K úpravě procházejícího elektronového svazku tubusem se používají místo optických čoček elektromagnetické čočky, které vytváří vhodně tvarované magnetické pole. TEM potřebuje ke své činnosti i mnoho dalších systémů, které u světelného mikroskopu nejsou, např.

vysokonapěťové zdroje, elektroniku k řízení mikroskopu a výkonný vakuový systém pro vyčerpání jeho vnitřních prostor.

Současný transmisní elektronový mikroskop dosahuje rozlišovací schopnosti, která umožňuje zobrazit atomovou strukturu anorganických a proteinových krystalů. V případě zobrazování biologických objektů je situace horší, co se týče rozlišovací schopnosti. Důvodem je malý kontrast těchto objektů, protože biologický materiál se skládá z prvků s nízkým atomovým číslem (C, O, N, H, P). Prvky s nízkým atomovým číslem rozptylují elektrony v elektrickém poli jádra výrazně méně. Jelikož kontrast v TEMu vzniká převážně odstraněním pružně rozptýlených elektronů ze zobrazovacího svazku, je při energii používané v TEMu (100kV) kontrast nedostatečný. Pro jeho zvýšení u těchto vzorků přistupujeme ke kontrastování, kdy do vzorku přidáváme elektrondenzní kontrastující činidlo. Tyto kontrastující činidla obsahují sloučeniny atomů těžkých kovů jako je citrát olova nebo octan uranylu, na kterých dochází k lepšímu rozptylu primárních elektronů. Tento postup však může vnášet do pozorovaného vzorku nepřesnosti a artefakty. V určitých případech přináší kontrastování dobré výsledky, ale při narůstajících nárocích na rozlišení a pozorování biologického materiálu co nejbližší nativnímu stavu již nestačí [7,8,9].

V současné době pracnost přípravy preparátů, finanční náročnost této techniky s bouřlivě se rozvíjejícími metodami buněčné biologie vedla k určitému odchodu od metod transmisní elektronové mikroskopie. Vývoj však stále pokračuje, hledají se nové typy mikroskopů, mezi kterými je nízkonapěťový elektronový mikroskop.



**Obr.1.** Transmisní elektronový mikroskop JEOL 1010

## **2.2.2. Příprava vzorků pro TEM**

Vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii nesmí obsahovat vodu, protože v mikroskopu jsou vystaveny vysokému vakuu a z mokřých preparátů by se voda bouřlivě uvolňovala. To by vedlo jednak k jejich degradaci a za druhé k rozptylu primárních urychlených elektronů na molekulách plynné vody a k jejich zbrzdění. Proto je nutné biologický materiál, který obsahuje vysoké procento vody, před pozorováním v mikroskopu upravit tak, aby žádnou vodu neobsahoval. Druhou podmínkou, která vyplývá z penetrační schopnosti elektronů, je, že tloušťka preparátu nesmí překročit 100 nm. Silnějšími preparáty elektrony neprojdou, a pokud ano, nelze obraz dobře zaostřit [11,12]. Přípravu preparátů lze rozdělit do několika kroků:

### **1. Fixace**

Prvním krokem přípravy preparátů pro TEM je v naprosté většině případů fixace. Jejím cílem je zachovat buněčnou ultrastrukturu s minimem změn oproti nativnímu stavu, zabránit degradačním procesům a stabilizovat vzorek do dalších kroků přípravy. K fixaci biologických objektů se používají chemické metody nebo fyzikální jako je kryofixace nebo použití mikrovln [24].

Chemická fixace je založena na reakci některých chemických činidel se složkami biologických objektů, které vedou k jejich stabilizaci a imobilizaci bez větších ultrastrukturálních změn. Aditivní fixace nejlépe zachovává buněčnou ultrastrukturu z hlediska elektronové mikroskopie. Dochází k přeměně cytoplazmy v gel transparentní pro elektrony v důsledku vytvoření sítě vazeb mezi fixačním činidlem a molekulami vzorku. Příkladem fixačních činidel jsou glutaraldehyd a formaldehyd.

Glutaraldehyd obsahuje dvě aldehydické skupiny, díky kterým je schopen se zároveň vázat ke dvěma funkčním skupinám, a tak vytvářet můstky např. mezi dvěma bílkovinnými molekulami. Při fixaci reaguje převážně s peptidy a bílkoviny. Chemická reakce glutaraldehydu s bílkoviny probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku většina bílkovin začne po styku s glutaraldehydem do 30 vteřin vytvářet průzračné gely, ale reakce s proteiny zabudovanými v membránách a mikrofilamentech trvá několik hodin. Dokončení reakce je pomalé, proto se často pro zkvalitnění fixace používá kombinace glutaraldehydu s formaldehydem, kdy přítomnost formaldehydu zaručuje rychlou a glutaraldehyd zase kvalitní fixaci. Je to dáno tím, že formaldehyd má pouze jednu aldehydickou skupinu, kterou se váže na aminoskupiny bílkovin. Díky své malé molekule se tedy vyznačuje vysokou penetrační rychlostí. Je třeba udržovat velikost fixovaného materiálu v rozumných mezích a v případě větších vzorků v jejich středu očekávat častější výskyt artefaktů. Formaldehyd se v současné době používá většinou ke speciálním účelům, např. k přípravě preparátů pro následné imunozaření, protože lépe zachovává antigenicitu preparátu [9,13,14].

Oxid osmičelý má silné oxidační účinky, sám se redukuje a tvoří sloučeniny, ve kterých má nižší mocenství. Při reakci s organickými sloučeninami vzniká tzv. osmiová čern, která způsobuje zčernání preparátů po fixaci  $\text{OsO}_4$ . Velice ochotně reaguje s mastnými kyselinami v buněčných membránách. Důsledkem je vynikající fixace membrán a jejich zvýraznění v buněčné ultrastruktuře, protože navázané atomy osmia působí díky svému vysokému atomovému číslu (76) jako kontrastující činidlo a dobře rozptylují procházející primární elektrony. Naproti tomu nereaguje s glycidy a dalšími buněčnými komponentami, takže se v současné době používá jako sekundární fixační činidlo po primární fixaci aldehydy. Při této kombinaci je ultrastruktura vzorku většinou nejlépe zachována [9,13].

Fixační činidla se aplikují rozpuštěná v pufovacích roztocích. Důvodem je, aby se fixační roztok co nejvíce blížil svými vlastnostmi, jako pH, teplota apod., prostředí, ve kterém se vzorek nacházel do chvíle odebrání, a nedošlo k reakci fixovaného objektu na

změnu vnějšího prostředí, která by mohla vést k jeho poškození např. smrštění fixovaných buněk. Pufry v elektronové mikroskopii by měly mít dostatečnou tlumící kapacitu, aby nedošlo během fixace ke změně pH, protože systém se okyseluje vznikem kyseliny glutarové. Pufry by měly být chemicky stabilní a odolné proti degradaci enzymy a jinými biologicky aktivními látkami. Neměly by tvořit precipitáty, interferovat s fixačním činidlem, inhibovat nebo naopak stimulovat buněčné funkce. Mezi nejpoužívanější v současné době patří fosfátový a kakodylanový pufr a pufry označované zkratkami TRIS, PIPES, HEPES. Mezi jejich předností patří především nízký stupeň toxicity a kompatibilita s fyziologickými funkcemi buněk [9,13,14,23].

## **2. Dehydratace**

Po fixaci a promytí preparátu následuje jeho zalití do vhodné pryskyřice. Bohužel většina zalévacích médií rutině používaná pro přípravu vzorků pro TEM není mísitelná s vodou, a proto je nutné po fixaci nahradit volnou vodu ve vzorku kapalinou, která je mísitelná jak s vodou, tak se zalévacím médiem. K tomuto účelu slouží dehydratace, kdy vzorek je postupně umisťován do roztoků s rostoucím podílem dehydratačního činidla, až je jím nahrazena všechna voda v systému. Nejčastěji se jako dehydratační činidla používají etanol a aceton. Aceton je mísitelný se všemi pryskyřicemi, etanol pouze se Spurrem. Etanol je nejběžnější dehydratační činidlo, jehož nevýhodou je možnost reakce se zbytky  $\text{OsO}_4$  za vzniku precipitátů. Dále může způsobovat extrakci buněčného materiálu, ale v menším poměru než aceton [9,11].

## **3. Zalévání**

Účelem zalévání je dát vzorku takové vlastnosti, aby ho bylo možné rozřezat na ultratenké řezy o maximální tloušťce 100 nm. Jako zalévací médium se používají pryskyřice, na které je kladeno velké množství požadavků. Měly by vykazovat dostatečnou mechanickou pevnost v tenké vrstvě, být stabilní ve vakuu a při ozáření primárními elektrony. Neměly by rozptylovat primární elektrony, tedy nepřispívat obrazem vlastní struktury k výslednému obrazu na stínítku mikroskopu. Jejich polymerizace by měla být rovnoměrná bez objemových změn a poškození ultrastruktury. Pryskyřičné směsi by měly mít nízkou viskozitu a měly by být rozpustné v běžných dehydratačních činidlech, aby bylo možné preparát snadno a dobře pryskyřicí prosytit. Vzniklé bločky by měly mít přiměřenou tvrdost, aby se daly dobře krájet [9,11].



Pro ultrastrukturální účely a metodu imunoznačení se nejčastěji používají dva typy zalévacích médií: epoxidové a akrylátové pryskyřice. Výběr vhodné pryskyřice závisí na vlastnostech studovaného vzorku a zda je vzorek připravován např. pro ultrastrukturální studii či imunoznačení.

Epoxidové pryskyřice jsou vícesložkové pryskyřice dlouhodobě používané v elektronové mikroskopii. Jejich výhodou je rovnoměrná polymerizace bez větších objemových změn při 60° C. Jsou poněkud citlivější na osvit elektrony. Mezi nejčastěji používané patří Spurr [13]. Jeho největší předností je nízká viskozita, doporučuje se proto pro zalévání hůře infiltrovaných materiálů, jako je rostlinný materiál, ale používá se i pro hmyz a tkáňový materiál.

Akrylátové pryskyřice jsou zalévací média, která je možné používat i při velmi nízkých teplotách, a proto jsou vhodné pro imunocytochemické účely. Při polymerizaci jsou citlivé na obsah vzduchu. Pro zalévání při nízkých teplotách jsou nejvhodnější želatinové nebo polyetylenové kapsle a při iniciaci UV světlem je třeba se vyhnout postfixaci OsO<sub>4</sub>, která by mohla způsobit nerovnoměrné vytvrnutí bločku [9,11,13]. Mezi akrylátové pryskyřice patří LR- White a LR- Gold média. K jejich přednostem patří nízká viskozita a snadná infiltrace [11,13]. Lowicryly patří také k metakrylátovým pryskyřicím používaným pro imunocytochemické účely, protože jsou schopné polymerizovat za velmi nízkých teplot po iniciaci UV světlem. Lowicryl K4M je polární pryskyřice, která je schopna polymerizovat s obsahem vody do 5% a může být použita až do -35° C [9,13].

Nízkoteplotní zalévání je metoda, která se používá především při zalévání preparátů pro imunoznačení, aby se minimalizovala extrakce, agregace a přemístění buněčných komponent. Vychází se při ní z klasicky chemicky fixovaného vzorku, nejlépe směsí formaldehydu a glutaraldehydu. Dehydratace se provádí etanolem a začíná při 0° C. Teplota v dalších krocích klesá v závislosti na stoupající koncentraci etanolu až k -35° C nebo -50° C, přičemž nesmí dojít ke zmrznutí preparátu. Při požadované teplotě se provede infiltrace a UV světlem iniciovaná polymerizace. Pro tyto účely se dají použít pouze Lowicrylové pryskyřice. Tato metoda lépe zachovává antigenicitu studovaného vzorku [9,11,13].

#### **4. Příprava ultratenkých řezů**

Bloček je nejprve upraven do tvaru pyramidy a pomocí ultramikrotomu nakrájen na ultratenké řezy o tloušťce 80-100 nm. Na krájení ultratenkých řezů se používají skleněné

nebo diamantové nože. Zatímco skleněné nože jsou levné, je možné jich připravit jakékoliv množství a po použití je vyhodit, diamantové nože jsou drahé, jejich cena závisí na délce řezné hrany a při jejich poškození je nutné je znovu za poměrně vysokou cenu přebrousit. Skleněný nůž je schopen ukrojit z jednoho místa na řezné hraně asi 30 ultratenkých řezů, diamantový nůž nakrájí tolik řezů, kolik je třeba. Diamantový nůž poskytuje výrazně kvalitnější ultratenké řezy. Jeho cena odráží skutečnost, že diamant je nejtvrďší přírodní materiál, jehož opracování není snadné. Bločky se proto většinou předřezávají na skleněném noži a diamantový nůž se použije až na ultratenké krájení [9,15,25].

V dnešní době se používají nože s různým úhlem řezné hrany  $45^\circ$ ,  $35^\circ$  a  $25^\circ$ . Dále se používají nože s úhlem řezné hrany  $35^\circ$  a s oscilací. Pro přípravu 20 nm ultratenkých řezů je potřeba té nejjemnější techniky. Studerr a Kohl zavedli tento oscilující nůž, aby minimalizoval kompresi, protože při krájení se řez hodně deformuje. Ukázalo se, že tento vibrující nůž velice usnadňuje krájení 20 nm ultratenkých řezů [15].

Barva ultratenkého řezu charakterizuje jeho tloušťku. Dochází k odrazu světla na povrchu řezu a na vodní hladině, na kterou se řezy splavují. V důsledku interference mají řezy v závislosti na tloušťce určitou barvu. Pro pozorování v TEM jsou nejvhodnější stříbrno-zlaté až zlaté řezy (tloušťka cca 80 nm), pro pozorování v LVEM jsou řezy průhledné (tloušťka cca 20 nm) a nejsou vidět na hladině vody [9].

## 5. Kontrastování

Biologický materiál zalitý do pryskyřice má skoro stejnou hustotu jako zalévací hmota. Tato skutečnost je příčinou toho, že ultratenké řezy mají v TEM minimální kontrast. Nejvíce používaným způsobem kontrastování řezů je selektivní adsorpce těžkých kovů na buněčné orgány. Protože těžké kovy více rozptylují primární elektrony, zvyšují tak kontrast struktur, na které se adsorbovaly. K prvnímu kontrastování dochází při fixaci  $\text{OsO}_4$ . V ostatních případech se řezy kontrastují buď před zalitím, tzv. v bloku, nebo po nakrájení na ultratenké řezy přímo na sítkách. Nejčastěji používaná kontrastovací činidla jsou octan uranylu a citrát olova.

Octan uranylu ( $U$  = atomové číslo 92) se používá v podobě vodných nebo alkoholických roztoků a reaguje především s nukleovými kyselinami a proteiny. Citrát olova ( $Pb$  = atomové číslo 82) zvyšuje obecně kontrast membrán, proteinů, nukleových kyselin a glykogenu. Pokud se ke kontrastování použijí postupně obě látky, vzorek získá rovnoměrný kontrast všech buněčných struktur [13].

Vlastní kontrastování řezu se většinou provádí na hladině kontrastující látky. V prvním kroku se kontrastuje octanem uranyle, který reaguje se světlem za vzniku hnědé sraženiny, proto se musí zamezit přístupu světla. Ve druhém kroku se kontrastuje roztokem citrátu olova, který pro změnu reaguje se vzdušným  $\text{CO}_2$  za vzniku nerozpustného uhličitanu olovnatého. Proto je třeba při kontrastování minimalizovat kontakt roztoku olova se vzduchem. Přidává se proto NaOH nebo KOH do komůrky pro kontrastování, které snižují obsah  $\text{CO}_2$ . Kontrastování patří mezi velmi časté zdroje artefaktů díky časté tvorbě precipitátů jak v případě solí olova, tak uranyle [9,13].

## 2.3. Nízkonapěťový elektronový mikroskop

Nízkonapěťový elektronový mikroskop je nový typ elektronového mikroskopu, který umožňuje pozorovat biologické preparáty přibližující se skutečnému vzhledu pozorovaného objektu. Jeho nízké urychlovací napětí o hodnotě 5 kV stačí k rozptylu primárních elektronů i atomy lehkých prvků (C, O, N, H, P). Zvýšení kontrastu obrazu biologických vzorků je dosaženo snížením energie elektronů, čímž se zvýší počet interakcí mezi elektrony a zkoumaným vzorkem. Zvýšení kontrastu obrazu je tedy dosaženo i bez použití kontrastujících činidel, které mohou do pozorovaného biologického objektu vnášet artefakty. Z toho plyne, že jeho obrovskou výhodou je prohlížení vzorku blíže nativnímu stavu [16,17,18,39].

Po dlouhá léta se prováděly pokusy, kdy se pozorovaly biologické řezy při urychlovacích napětích od 5 do 15 kV. Tyto pokusy však skončily neúspěchem v důsledku řady technických problémů. Jedním z těchto problémů, který znehodnocoval kvalitu optiky, bylo nabíjení různých částí mikroskopu způsobené nedostatečným vakuem. Dalším problémem byl zdroj elektronů a detekce, kdy elektronové zdroje měly nízký jas a z tohoto důvodu byl obraz obtížně detekovatelný.

Až v devadesátých letech minulého století se profesor DeLong vrátil k myšlence LVTEM a pokusil se překonat tyto technické problémy. Realizace tohoto mikroskopu byla úspěšná. Zkonstruoval uživatelsky a cenově dostupný nízkonapěťový elektronový mikroskop ve stolním provedení, který pracuje při urychlovacím napětí 5 kV (obr.2) [19,20].



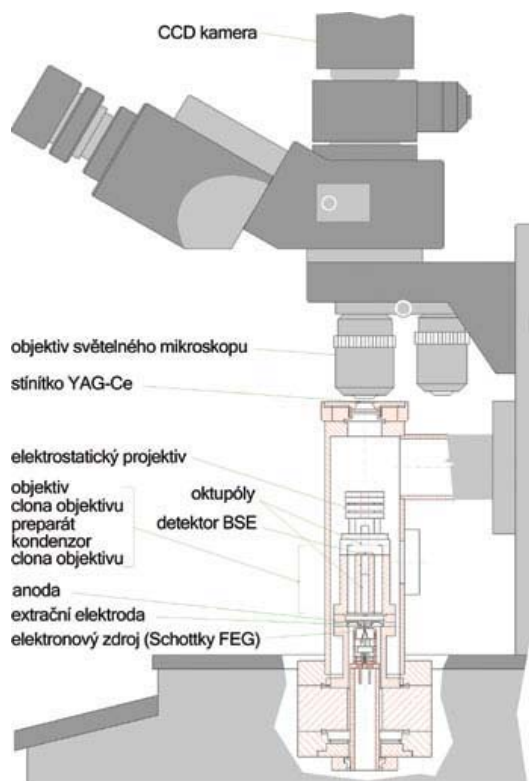
**Obr.2.** Nízkonapěťový elektronový mikroskop LVTEM 5

Zmenšením všech součástí mikroskopu se dosáhlo toho, že vzhledově se celý elektronový mikroskop podobá spíše mikroskopu světelnému. Zkrácením střední volné dráhy primárních elektronů urychlených napětím 5 kV byla umožněna miniaturizace tubusu elektronového mikroskopu tak, že bylo možné umístit ho pod optickou část mikroskopu. Zmenšení elektronové optiky umožnilo použití čoček tvořených permanentními magnety, které nevyžadují proudové zdroje a chlazení. Další technickou novinkou bylo luminiscenční stínítko z vysoce účinného monokrystalického YAG krystalu. Zdrojem elektronů je Schottkyho katoda, která je tvořena hrotem z wolframového monokrystalu, udržovaným na teplotě kolem 1 800 K a pokrytým tenkou vrstvou oxidu zirkoničitého  $ZrO_2$  [21,19,38].

Kromě zobrazení v transmisním režimu (TEM), kdy proud elektronů prochází preparátem a obraz vzniká na stínítku, je mikroskop schopen pracovat i v jiných zobrazovacích režimech jako je STEM (skenovací transmisní elektronový mikroskop) a SEM (skenovací elektronový mikroskop). STEM je režim pro objekty pro elektrony prostupné a režim SEM pro objekty pro elektrony nepropustné [16,19,20,27].

### 2.3.1. Konstrukce mikroskopu

Mikroskop je tvořen ze dvou základních částí. První částí je miniaturizovaný elektronový mikroskop obsahující elektron-optickou soustavu zakončený luminiscenčním stínítkem. Druhou částí je klasický světelný mikroskop, který slouží ke zvětšování a pozorování obrazu na luminiscenčním stínítku (obr.3) [18,19,22].



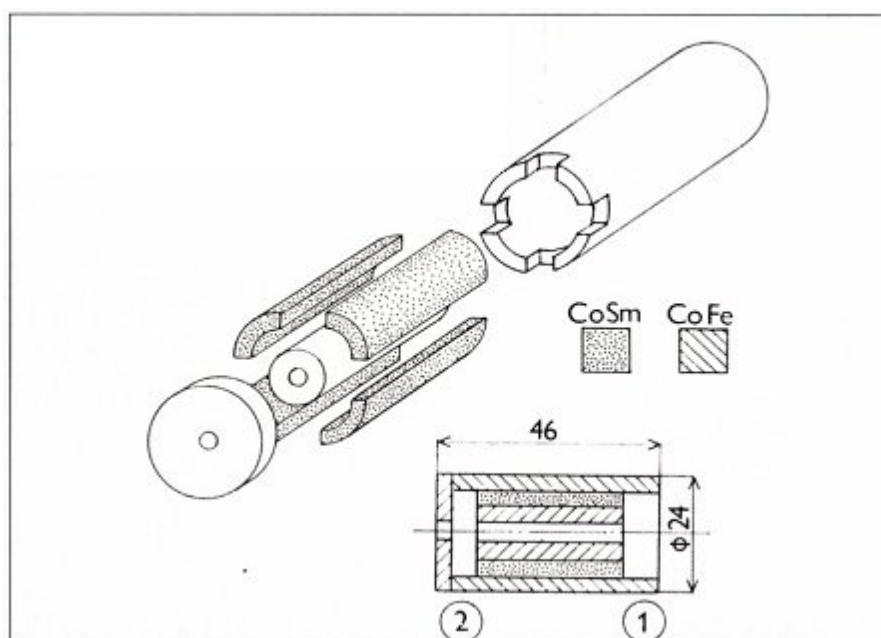
**Obr.3.** Zjednodušený řez nízkonapěťovým elektronovým mikroskopem, YAG – ytrium-hlinitý granát, BSE – detektor odražených elektronů, FEG – katoda s polem řízenou emisí [49].

Rozlišovací schopnost LVTEM se podle výrobce pohybuje v rozmezí od 2 do 2,5 nm, což dostačuje pro studium biologických vzorků. Maximální zvětšení, kterého tento mikroskop může dosáhnout je přibližně 145 000 krát (145 K). Výsledné zvětšení je dáno součinem zvětšení obou mikroskopů, kdy miniaturizovaný elektronový mikroskop dosahuje maximálního zvětšení 375x a světelný mikroskop 400x. Unikátností tohoto mikroskopu v porovnání se standardními přístroji pracujícími s urychlovacím napětím

100kV, rozlišovací schopností 0,4 nm a s max. zvětšením 600 krát (600 K) je, že dosahujeme přibližně dvacetinásobného kontrastu [28].

U nízkonapěťového elektronového mikroskopu jsou primární elektrony podstatně více rozptylovány atomy vzorku. Ty, které jsou elasticky rozptýlené, jsou odstraněny z obrazu clonou v objektivu, což výrazně zvyšuje kontrast ve srovnání s kontrastem obrazu vysokonapěťového TEM. Jednou z limitujících skutečností je, že snížením energie urychlených elektronů dochází ke zmenšení hloubky prostupnosti elektronů materiálem, a proto je nutné používat preparáty tloušťky 20-30nm [31,32,33].

Fokusaci elektronů během jejich průchodu tubusem zajišťují čočky. Elektronová optika LVTEM je založena na vytvoření elektronových čoček z permanentních magnetů. Uspořádání čoček s permanentními magnety se výrazně liší od čoček elektromagnetických, které se standardně používají u 100 kV transmisního elektronového mikroskopu. Elektronové čočky z permanentních magnetů nemohou být realizovány jako jednoduché čočky bez nežádoucího rozptylu magnetického pole. Řešením tohoto problému je zabudování magnetického obvodu s dvěma mezerami (obr.4). Nově vyvinuté elektronové čočky tvořené permanentními magnety umožňují přibližně desetinásobné zmenšení optiky, díky čemuž byla také uskutečnitelná miniaturizace elektronového tubusu [16,19]



**Obr.4.** Řez a parametry elektronové optiky dvojitě čočky z permanentních magnetů. Část 1 je integrována do prostoru katody a protilehlá část 2 do objektivové čočky [16].

Elektronový obraz vytvořený soustavou objektivových a kondenzorových čoček tvořených permanentními magnety je dále zvětšen projekční soustavou, kterou tvoří dvě elektrostatické čočky (projektorové čočky a mezičočky). Tento obraz je posléze převeden na světelný obraz pomocí luminiscenčního stínítka, které má 4 až 10 nm v průměru. Toto stínítko je vyrobeno z vysoce účinného materiálu tvořeného monokrystalem YAG (yttrium-hliníkový granát) a v porovnání s práškovými luminofory prakticky nemá žádnou mikrostrukturu [16,19]. Také se vyznačuje vysokou odolností k radiačnímu poškození. Ke konečnému zvětšení obrazu slouží optický mikroskop, který je spojen s výkonnou CCD kamerou. Nevýhodou tohoto systému je, že magnetická pole čoček jsou konstantní a měnit lze jedině urychlovací napětí a do určité míry pozici preparátu. Ovládání mikroskopu se tak dosti liší od postupů běžných ve 100 kV TEM.



**Obr.5.** Držák preparátu a komora preparátu nízkonapětového elektronového mikroskopu LVTEM 5

Dalším prvkem soustavy je držák preparátu (Obr.5). Velikost tubusu elektronového mikroskopu a komory preparátu umožňují vyčerpání mikroskopu k velmi vysokým hodnotám vakua. Hodnota pracovního vakua mikroskopu se pohybuje kolem  $10^{-7}$  Pa, což je více než hodnota vakua ve 100 kV transmisním elektronovém mikroskopu vybaveném termoemisní katodou. Díky tomu byly odstraněny problémy spojené s kontaminací a elektrickým nabíjením vnitřní části mikroskopu. Vysoká hodnota vakua je také nutná pro správnou

funkci Schottkyho katody, která poskytuje vysoce koherentní svazek elektronů. Vakuový systém zahrnují dvě malé iontové pumpy a turbomolekulární vývěva.

Konečným výstupem z nízkonapěťového elektronového mikroskopu je záznam obrazu pozorovaného vzorku. Snímek je zaznamenán digitálně pomocí slow-scan CCD kamery. Digitální záznam umožňuje sledovat získaný obraz v digitální podobě přímo na obrazovce monitoru počítače a také si jej uložit do paměti [16,19].

### 2.3.2. Interakce elektronového svazku s preparátem

Interakce elektronového svazku s hmotou preparátu je vlastním zdrojem obrazu. Podle průchodu elektronového svazku hmotou preparátu lze elektrony zjednodušeně rozdělit do tří kategorií:

- Elektrony, které projdou objektem bez interakce
- Elektrony, které jsou pružně rozptýleny na atomech vzorku bez ztráty energie, ale s výraznou změnou trajektorie (pružný rozptyl)
- Elektrony, které interakcí s elektrony atomů objektu ztratily energii (neelastický rozptyl)

**Pružný (elastický) rozptyl** – dochází k němu, když urychlený elektron prolétá elektronovým obalem atomu preparátu. Je vychýlen pod úhlem, který je tím větší, čím blíže míjí elektron jádro a čím větší je náboj jádra. Dokonce tento úhel může dosáhnout  $180^\circ$  a elektron může být zpětně odražen. Při těchto dějích se předpokládá, že se energie primárních elasticky rozptýlených elektronů nemění. Ta část elektronů, která je rozptýlena s dostatečně velkým úhlem, je zachycena objektivovou clonou a tím vyřazena z tvorby obrazu na stínítku. Vyřazení části elektronů způsobí změnu intenzity elektronového svazku a vzniká tak kontrast obrazu, který se označuje jako amplitudový. Kromě toho se na tvorbě obrazu podílí ještě fázový kontrast, který tvoří různé stupně šedi. Vzniká díky rozdílu drah elektronů, odchýlených pod různým úhlem. Co se týče nízkonapěťového elektronového mikroskopu, převládá při dopadu elektronů na preparát pružný rozptyl [8,7,34].



**Nepružný rozptyl** – vedou k němu srážky primárních elektronů s elektrony na orbitách atomů preparátu. Protože jde o srážku dvou částic o stejné hmotnosti, mohou při ní urychlené primární elektrony utrpět velkou ztrátu energie, ale nedojde k jejich odchýlení z původní dráhy. Tím pádem všechny elektrony projdou do zobrazovacího systému a podílejí se na tvorbě obrazu na stínítku. Protože změna energie a rychlosti přispěje ke změně jejich vlnové délky, mají vliv na ostrost obrazu. Jsou jedním ze zdrojů vad zobrazení. Jejich nepříznivý vliv roste s tloušťkou preparátu a s nižším urychlovacím napětím [8,7,34].

Optimální by pro transmisní elektronovou mikroskopii bylo, kdyby všechny elektrony byly rozptýleny jen pružně. Nepružně rozptýlené elektrony jsou nežádoucí. Jsou totiž jednak příčinou fatálního radiačního poškození, jednak v důsledku toho, že se nacházejí v blízkosti optické osy, se dostanou do konečného obrazu. V důsledku ztrát energie se u nich uplatňuje chromatická vada objektivu. Je-li jejich počet velký, vznikne kromě radiačního poškození i výrazná hranová neostrost a ztráta rozlišení [9,34].

### **2.3.3. Příprava preparátů pro LVTEM**

Nízké urychlovací napětí, používané v LVTEM, má za následek snížení penetrační schopnosti primárních elektronů, které jsou schopny projít ultratenký řez o tloušťce kolem 20 nm. Experimentálně bylo zjištěno, že optimální tloušťka je 15-20 nm pro objekty se specifickou hmotností  $1 \text{ g/cm}^3$ . Taková tloušťka je přibližně stejná jako střední volná dráha elektronů s energií 5 kV v organickém materiálu s výše uvedenou hustotou [35,36]. Podle velikosti se objekty pro nízkonapěťovou elektronovou mikroskopii rozdělují do dvou velkých skupin: Jeden typ, který převyšuje penetrační schopnost, se musí krájet do podoby ultratenkých řezů. Druhým typem jsou částice, které jsou dostatečně malé, aby byly svou velikostí pod penetračním limitem

- **Tenké řezy o tloušťce 20 nm**

Příprava ultratenkých řezů viz kapitola Příprava preparátů pro TEM (kroky 1-3) stejné. Krok 4 - kontrastování je v případě vzorků pro LVEM vynechán, díky schopnosti tohoto mikroskopu rozptylovat atomy lehkých prvků i bez přídavku atomů těžkých kovů. I nekontrastované preparáty vykazují v LVTEM dostatečný kontrast [17,37,38,33,39].

K přípravě ultratenkých řezů o tloušťce 20 nm se používá kvalitní ultramikrotom a oscilující diamantový nůž s řeznou hranou 45° a 35° [15]. Nejlépe se 20 nm řezy připravují z bločků zalitých do epoxidových pryskyřic, a sice z nejtvrdší varianty PolyBedu 812 a ze středně tvrdé varianty Aralditu. Spurr ve své nejtvrdší variantě se také dá nakrájet do podoby 20 nm řezů. Problémy při krájení vykazuje pryskyřice Durcupan a metakrylátové pryskyřice reprezentované LR Whitem a Lowicrylem HM 20. I když lze krájet 20nm ultratenké řezy standardně a reprodukovatelně, zůstává příprava takto tenkých řezů kritickým krokem a vzniká při něm řada artefaktů jako je např. „chatter“- periodické zesílení a zeslabení ultratenkého řezu [15,17,32,33].

- **Částice**

Částice nakápnuté na podložní nosné bláně. O typech blan používaných v elektronové mikroskopii pojednává následující kapitola 2.4.

- **Metoda negativního kontrastu**

Je určena pro pozorování vzorků, jejichž velikost je hluboko pod tloušťkou ultratenkých řezů, např. různých biologických makromolekul (proteinů, lipoproteinů, polysacharidů, nukleoproteinových komplexů), izolovaných buněčných organel (mitochondrie, membránové systémy) a celých buněk (bakterie, viry). Princip metody spočívá v zachycení vzorku na podložní fólii nataženou na síťce a jeho zalití kontrastujícím činidlem, které obsahuje těžký kov. Kontrastující činidlo obklopí vzorek a vytvoří temné pozadí, v němž se jednotlivé objekty jeví jako světlé díky menší schopnosti rozptylovat primární elektrony, přitom pronikne do povrchových nerovností objektu, což umožňuje jejich pozorování. Kontrastující činidlo by mělo být snadno rozpustné, vysoce elektrondenšní, nereagovat se vzorkem a mělo by být stálé při ozáření elektrony. Nejvíce využívána je kyselina fosfowolframová o koncentraci kolem 2%. [9,40]. Díky její stálosti je možné roztok dlouho skladovat.

## **2.4. Podložní blány v elektronové mikroskopii**

Blány, kterými se elektronmikroskopické sítěky pokrývají, slouží jako elektrontransparentní podklad pod vzorky. Je důležité, aby podložní blány byly co nejtenčí,

byly dobře smáčitelné, pevné při manipulaci a stabilní v proudu elektronů. Také by neměly vykazovat vlastní strukturu. Povrch blan by měl být hydrofilní. Nejvyšší hydrofilitu má povrch blan krátce po jejich zhotovení. V průběhu času však dochází k vytrácení povrchového náboje, blány se tak stávají hydrofobními a jsou tedy špatně smáčitelné [13, 43]. Nejčastěji používané blány v elektronové mikroskopii jsou formvarové a uhlíkové podložní blány. Formvarové blány nevyhovují svou tloušťkou LVEM. Uhlíkové blány představují vyšší kvalitu, je možné je připravit v tloušťkách 3-5 nm [13,42,43].

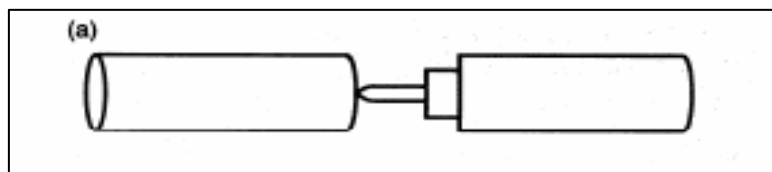
**Formvarová blána** – Formvar (polyvinyl formaldehyd) může být kousen ve formě prášku nebo již rozpuštěný v chloroformu nebo ethylen dichloridu jako 0,25 až 0,5 % roztok. Polyvinyl formaldehyd má schopnost vytvářet po zaschnutí na hladkých površích, např. skla, tenké filmy. Tloušťka formvarových blan se pohybuje v rozmezí 20 až 40 nm. Tloušťka blány závisí přímo úměrně na koncentraci formvaru v roztoku (čím je roztok koncentrovanější, tím bude blána silnější). Také tloušťku blány ovlivňuje rychlost vytažení podložního sklíčka z roztoku (čím rychleji, tím tenčí blána) [42,43,9].

**Uhlíková blána** – Tenká vrstva uhlíku se nanáší na síťky pomocí metody přímého a nepřímého napařování. Vlastní uhlíkové blány vynikají svou kvalitou a je možné je připravit v tloušťkách 2 až 10 nm. Vyznačují se dobrou tepelnou stabilitou, vysokou vodivostí, homogennou povrchu, jsou elektron-transparentní a lze je použít jako podložní blánu pod různé izolované částice stejně jako pod řezy. Nemají téměř žádnou strukturu ani při největších zvětšeních, proto se používají hlavně při práci, která vyžaduje nejvyšší rozlišení. Nevýhodou uhlíkových blan je, že jsou oproti jiným blánám více fragilní [8,9,42,].

### **2.4.1. Princip metody přípravy uhlíkových blan**

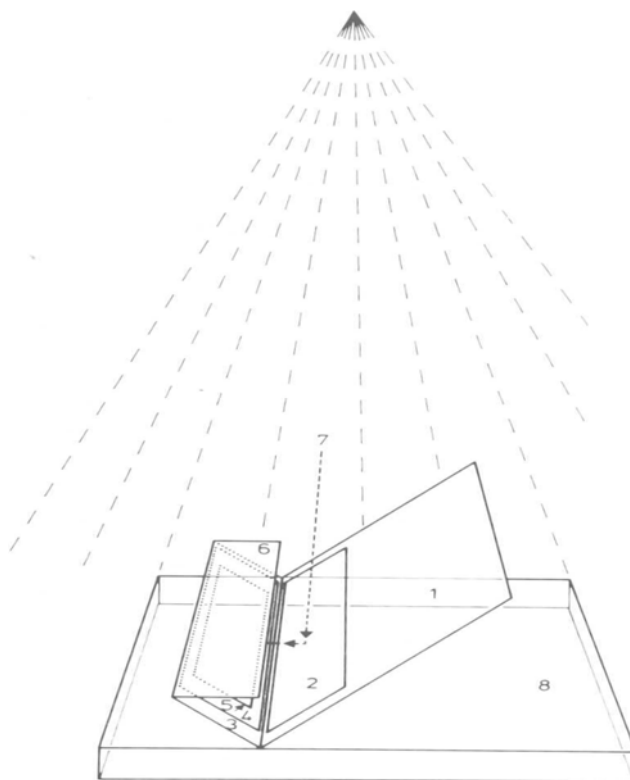
Uhlíkové blány se připravují napařováním atomů uhlíku na slídu v napařovací aparatuře. Do ní se umístí uhlíkové tyče, z nichž jedna má zúžený konec do hrotu a druhá má konec plochý (obr.6). K vytvarování uhlíkových elektrod se používají speciální ořezávátka. Upravené konce elektrod se o sebe opřou a při průchodu elektrického proudu

v místě zúžení dojde ke zvýšení odporu a v důsledku toho ke zvýšení teploty na hodnotu, při které se z daného místa začne vypařovat uhlík.



**Obr.6.** Nejčastější způsob ořezání a uspořádání uhlíkových elektrod [42].

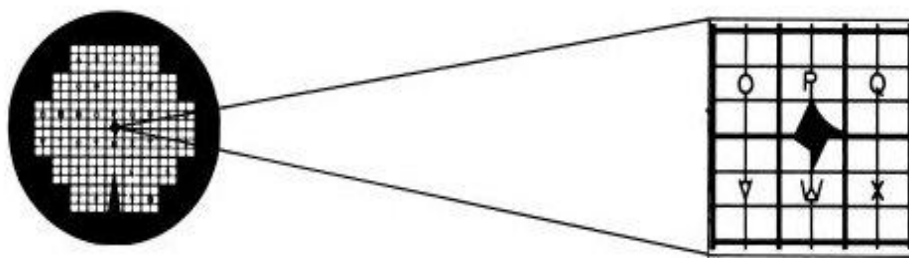
Celá procedura se provádí po vyčerpání prostoru napařovačky alespoň difúzní vývěvou. Vrstvička nanosená na slídě se splaví na vodní hladině. Proces napařování se provádí po vyčerpání prostoru napařovací aparatury na hodnotu  $1,3 \times 10^{-4}$  až  $1,3 \times 10^{-5}$  Pa. Uhlíkové blány můžeme připravovat dvěma způsoby. Prvním z nich je přímé napařování, při kterém je uhlík napařován přímo na slídu. Druhým způsobem je tzv. nepřímé napařování. Vypařené částice uhlíku jsou odraženy z povrchu podložního sklíčka nastaveného v určitém úhlu k elektrodám a dopadají na čerstvě odštípnutý kousek slídy, který je zastíněn před přímým dopadem částic C (obr.7) Při nepřímém napařování se tvoří více homogenní uhlíkové blány [43].



**Obr.7.** Pomůcka pro nepřímé napařování uhlíkových blan [43].

## 2.4.2. Elektronmikroskopické síťky

Síťky slouží v elektronové mikroskopii k pohodlné manipulaci s ultratenkými řezy. Vyrábějí se z mědi, niklu, zlata a dalších materiálů elektrogalvanickým leptáním. Jejich průměr se v současnosti ustálil na 3 mm a je možné na internetu najít celou řadu lišící se tvarem, velikostí a uspořádáním otvorů. Síťky s velkými otvory dovolují pozorovat větší plochu řezu, ale skrývá se zde nebezpečí, že se řez prohne a popraská. Pro běžnou práci se používají síťky 300-400 MESH. Tato zkratka (MESH) vyjadřuje počet otvorů na vzdálenost jednoho palce. Čím větší hodnota, tím větší počet menších otvorů. K zabránění rozpadu křehkých blan při manipulaci se vzorkem se používají síťky s velikostí otvorů 600-1000 MESH. Existují také elektronmikroskopické síťky se značenými otvory (obr.8). Uspadňují orientaci na preparátu v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu, protože práce s ním je odlišná a daleko obtížnější než s TEM [44,45].



**Obr.8.** Cu síťky se značenými loukotěmi [44].

Prohýbání řezů v důsledku osvitů elektronovým svazkem nebo příliš velkých ok použitých sítěk se dá zabránit potažením síťky tenkou blanou, která řez podepře. K těmto účelům se používají formvarové nebo uhlíkové blány. Jejich nevýhodou je, že poměrně rychle stárnou a stávají se hydrofóbními. To ztěžuje nabírání řezů a přináší i menší kontrast v mikroskopu. Navíc tloušťku blány je nutné přičíst k tloušťce řezu, takže řezy by měly být tenčí. Před použitím je potřeba síťky omýt, protože mohou být znečištěné prachem a zbytky roztoků, které se mohou v mikroskopu nabíjet a způsobit deformaci obrazu. Pro imunoznačení se nepoužívají měděné síťky. Je to způsobeno tím, že během postupu imunoznačení a promývání preparátu ve vodě by se síťka pokryla vrstvou měděnky, což by vedlo k znehodnocení vzorku. Používají se proto výhradně niklové síťky [43].

## 2.5. Imunolokalizace

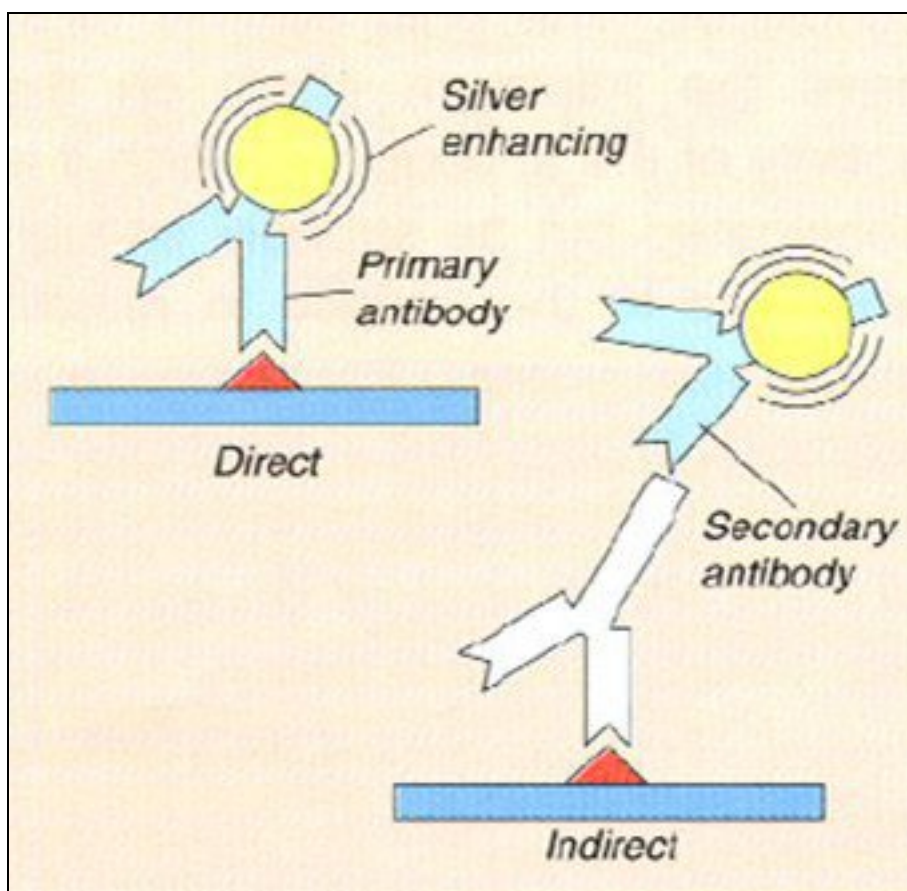
Imunolokalizace je metoda, která umožňuje lokalizovat antigeny na elektronmikroskopické úrovni pomocí protilátek, které nesou značky tzv. elektrodenzní markery. Nejčastěji se jedná o konjugáty koloidního zlata. Princip imunoznačení je dán vazebnou interakcí epitop - paratop, čili antigen – protilátka [47].

Mezi antigenem (Ag) a protilátkou (Ab) se uplatňují nekovalentní vazby zahrnující: vodíkové můstky, hydrofobní vazby a van der Waalovy síly. Protože jsou tyto vazby slabé, silná interakce Ag-Ab vyžaduje velké množství těchto vazeb. Kromě toho každá z těchto vazeb funguje na velmi malou vzdálenost (méně než  $1 \text{ \AA} = 10^{-7} \text{ mm}$ ), takže silná

vazba je podmíněna vysokou komplementaritou mezi Ag a Ab, s čímž souvisí vysoká specifita Ag-Ab interakce [46].

Komplex antigen-protilátka je reverzibilní. Poměr rychlostních konstant vzniku a rozpadu takového komplexu udává rovnovážná asociační konstanta  $K_{as}$ , která bývá pro typické komplexy antigen-protilátka v rozmezí  $10^4$ - $10^{11}$  l/mol. Převrácená hodnota  $K_{as}$  je disociační konstanta  $K_{dis}$ . Čím vyšší je  $K_{as}$ , tím vyšší je afinita protilátky k antigenu. Toto se týká interakce jednoho vazebného místa s jednoduchým antigenem. Když je komplexní Ag nesoucí mnoho epitopů smíchán s protilátkami nesoucími mnoho paratopů, interakce Ab s Ag na jednom místě zvýší pravděpodobnost reakce na dalším místě. Síla takovéto vazby mezi multivalentní protilátkou a antigenem je nazývána avidita. Výsledná avidita je mnohem vyšší než pouhý součet afinit jednotlivých protilátek a rovná se jejich součinu. Imunozaření je možné provést metodou přímého nebo metodou nepřímého značení [46,47,48].

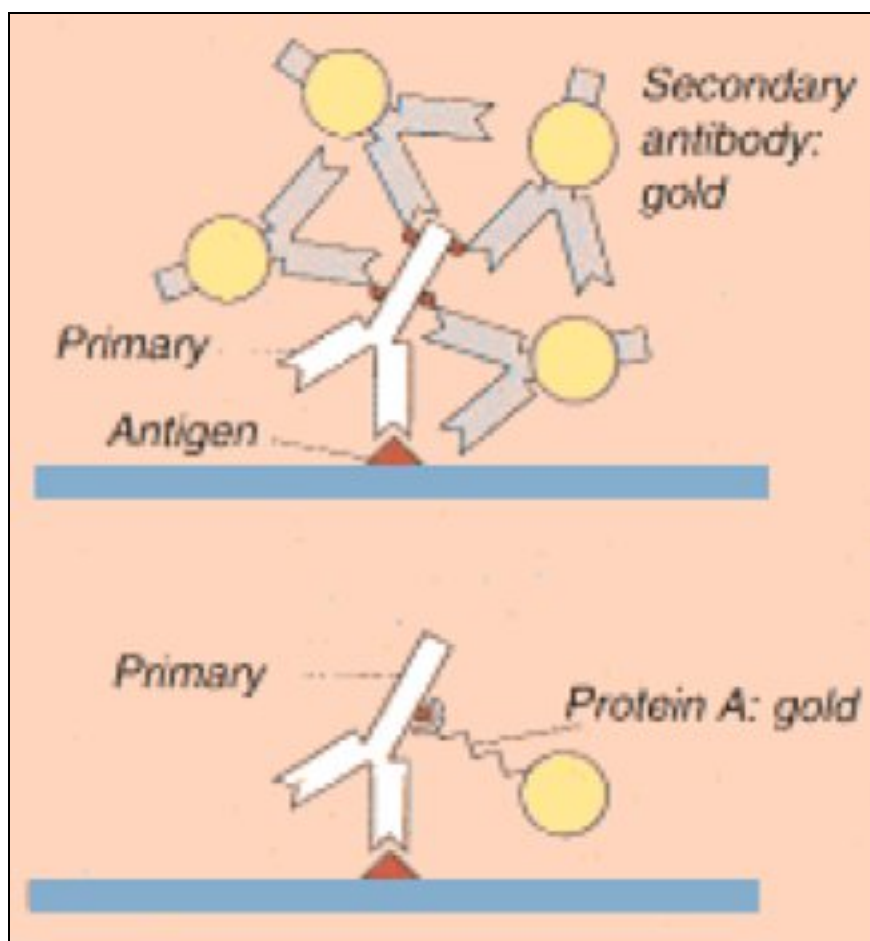
**Přímé značení** - Při přímém imunozaření se na preparát nanese primární protilátka, která se naváže na antigen. Primární protilátka je konjugovaná s markerem, nejčastěji se jedná o partikule koloidního zlata, a imunolokalizuje tak daný antigen (obr.9 vlevo) [6,29,61].



**Obr.9.** Přímé značení (vlevo) a nepřímé značení (vpravo) [56].

**Nepřímé značení** – Nepřímé imunoznačení je dvoustupňová někdy také nazývaná sendvičová metoda. Nejprve je použita protilátka proti studovanému antigenu tzv. primární protilátka. V dalším kroku se použije markerem označená protilátka proti primární protilátce, která se teď stává antigenem. Té se říká sekundární protilátka. Tato sekundární protilátka je většinou polyklonální a až několik molekul sekundární protilátky se může vázat na primární protilátku, každá na jinou část (obr.10). Tím dochází k amplifikaci signálu, protože jedna molekula antigenu je označena několika molekulami markeru. Tato metoda je specifitější. Místo sekundární protilátky se také může na primární protilátku vázat např. protein A, který se váže na Fc oblast (krystalizující fragment) protilátky [6,29,47,61].



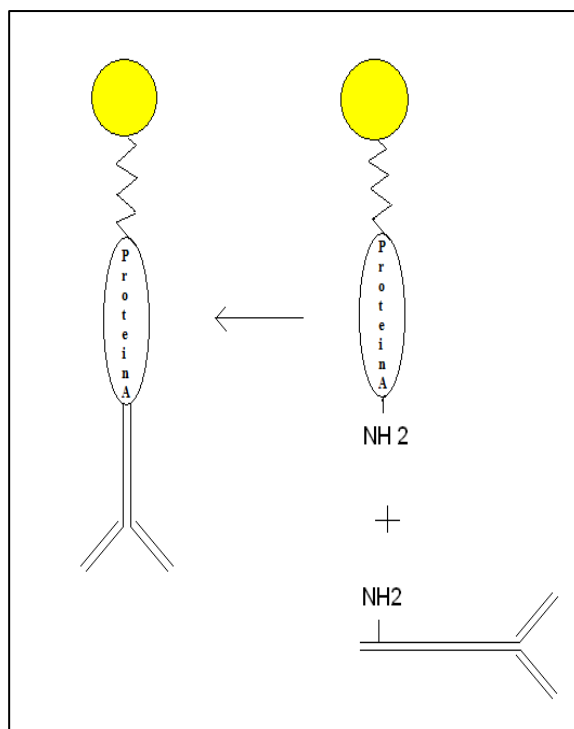


**Obr.10.** Nepřímé imunoznačení – zesílení signálu - molekula antigenu je označena několika molekulami markeru [56].

## 2.6. Konjugace

Koloidní zlaté nanočástice se nyní široce využívají při lokalizaci buněčných komponent pomocí imunocytochemických metod. Jsou populární díky své snadné rozpoznatelnosti v biologických preparátech a jejich schopnosti tvořit stabilní komplexy s mnoha makromolekulami používané v imunocytochemii. Mezi tyto makromolekuly patří řada proteinů, např. protein A, protein G, imunoglobuliny, lektiny a některé polysacharidy. Za vhodných podmínek se samovolně spojují s nanočásticemi zlata bez ztráty jejich specifických vazebných vlastností. Výsledkem je komplex, který může být použit v imunocytochemii jako zlatem označená protilátka. Takovýmto komplexem může být například protein A vázaný na nanočástice Au (obr.11). Protein A se pevně váže

k širokému okruhu imunoglobulinových tříd, a proto komplex protein A-Au může být použit k lokalizaci antigenu v buňce nebo ve tkáni díky vazbě Ag-Ab. V ultrastrukturálním obrazu imunoznačené tkáně odhaluje výskyt zlatých nanočástic distribuci hledaného antigenu ve tkáni [6,29,49].



**Obr.11.** Konjugát protein A + Au nanočástice

Konjugaci vybraných proteinů s kovovými nanočásticemi rozdělujeme na dva typy - elektrostatickou a kovalentní.

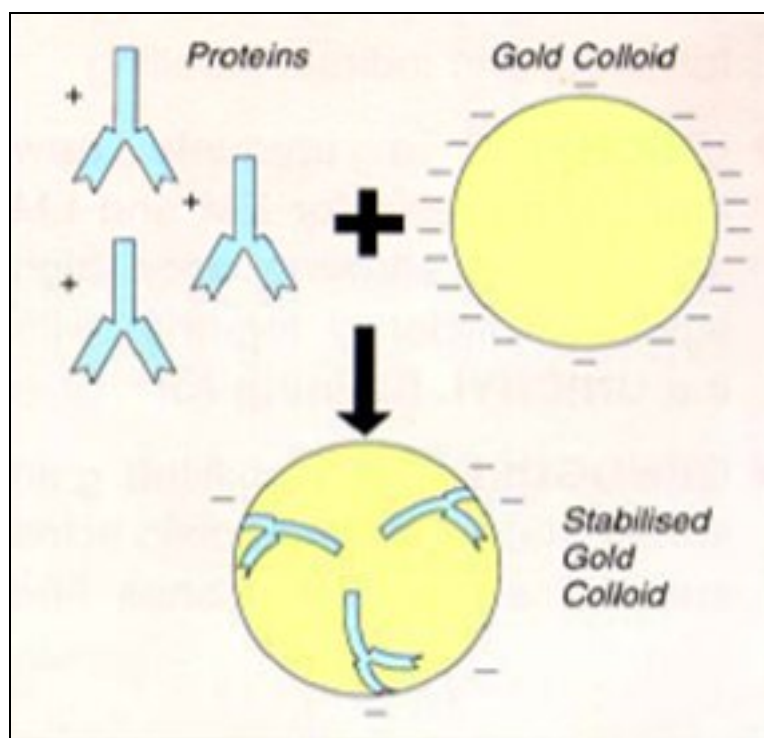
Elektrostatická konjugace závisí na 3 fyzikálních jevech:

- Záporný náboj nanočástice se váže s pozitivně nabitým proteinem (obr.12)
- Hydrofóbní adsorpce proteinu k povrchu nanočástice
- Nanočástice se váže na disulfidické můstky protilátky

Tímto způsobem se velmi snadno konjugují např. nanočástice Au. Aby byl výsledek konjugace co nejlepší, je třeba použít optimální množství reaktantů. Další

parametry, kterými jsou izoelektrický bod proteinu (pI), pH a množství proteinu, mají vliv na konjugaci. Ve vodném roztoku může ovlivnit pH vazebné interakce mezi proteinem a Au nanočásticemi [6,49]. Pravděpodobně se nejvíc proteinů naváže v jejich izoelektrickém bodě. To je hodnota pH, kdy je volný náboj proteinu nulový. Odpudivé a přitažlivé síly jsou vyrovnány. Když se hodnota pH přibližuje izoelektrickému bodu proteinu, stává se protein kompaktnějším a následkem je, že více molekul může „pasovat“ na povrch nanočástice. Proto tedy více proteinů bude tvořit komplex se Au nanočásticemi, když je pH blízko izoelektrickému bodu proteinu. Tento efekt je velmi dobře demonstrován na modelu protein A – Au. Počet molekul na jednu 11 nm částici se zvýšil z 9 při pH 7,2 na 13 při pH 6,1. Obecný postup elektrostatické konjugace [6,29,49,50]:

1. Vybrat si vhodnou velikost Au-nanočástic. Je třeba zvážit, že částice by měly být dobře viditelné na vzorku a že menší Au-komplexy mohou produkovat větší množství specifitějšího imunozaření.
2. Upravit pH roztoku proteinu a nanočástic. Užitečný startovní bod je vybrat protein, aby jeho pH se blížilo izoelektrickému bodu. pH Au nanočástic může být upraveno přidáním 0,1 M HCl nebo 0,1 M NaOH (je možné také použít  $K_2CO_3$ , protože má menší vliv na agregaci). pH Au-nanočástic je nejlepší měřit indikačním papírkem.
3. Přidat příslušný protein k roztoku nanočástic. Vše musí být pečlivě promícháno. Ke stabilizaci proteinu s navázanou nanočásticí se používá PEG (polyethylen glykol) nebo imunochemické blokující činidlo, jako je BSA (hovězí sérový albumin) nebo roztok ze sušeného mléka. Tyto blokující agens zabraňují agregaci a nespecifickým vazbám během konjugace. Nedostatečně obalené částice se sráží přidáním roztoku NaCl. Přebytky proteinu mohou být odstraněny odsátím supernatantu po centrifugaci modifikovaného koloidu.
4. Výsledkem elektrostatické konjugace je komplex protein s navázanou Au nanočásticemi, který se dále používá v imunozaření jako sekundární protilátka.



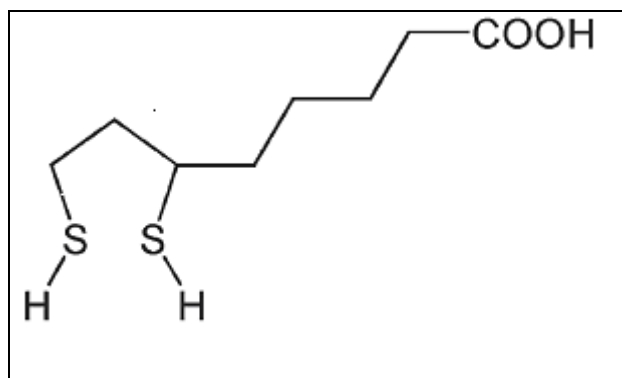
**Obr.12.** Záporný náboj Au nanočástice se váže s pozitivně nabitým proteinem [56].

### Kovalentní konjugace

Kovalentní konjugace je novější typ reakce vzniku komplexu protein - nanočástice. Je založena na pevných kovalentních silách mezi proteinem a nanočásticí. Podstatou je reakce funkčních skupin (-COOH, -SH, -NH<sub>2</sub>).

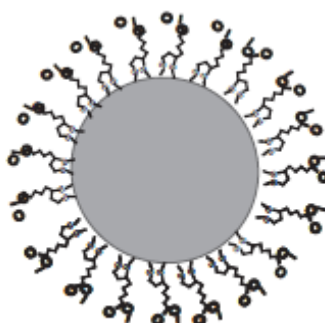
Při kovalentní konjugaci dochází k navázání koloidních nanočástic na protein pomocí látek, obsahující thiolové a karboxylové skupiny. Takové látky se svými thiolovými skupinami vážou na povrch nanočástice. Molekula obsahující thiolovou skupinu může interagovat s nanočásticemi a vytvořit kovalentní vazbu [29].

Jednou z těchto látek je kyselina dihydrolipoová (DHLLA). Je to průhledná, bezbarvá kapalina, která vzniká plnou redukcí kyseliny lipoové. Molekula kyseliny dihydrolipoové obsahuje dvě thiolové skupiny a jednu karboxylovou skupinu (obr.13). Karboxylová skupina pomáhá stabilizovat výsledné koloidy během elektrostatického odpuzování [51,52,53].



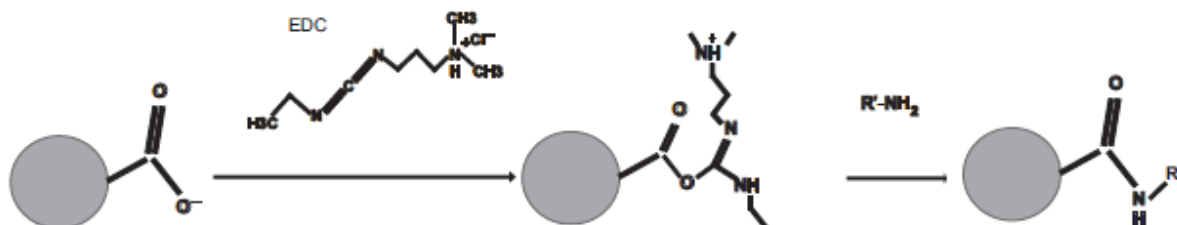
**Obr.13.** Vzorec DHLA (dihydrolipoové kyseliny) [53].

Molekuly obsahující thiolovou skupinu  $-SH$  mohou reagovat s kovovými nanočásticemi za vzniku kovalentní vazby. Nejedná se o běžnou kovalentní vazbu. Zvýšení pevnosti thiolové kovalentní vazby se vyskytuje v polyvalentních thiolech jako je DHLA. Nanočástice opatřené DHLA molekulami jsou dále konjugovány s proteiny, jako jsou např. avidin, streptavidin, protein A za použití konjugačního činidla EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karboimid hydrochlorid). EDC zajišťuje vazbu mezi látkami obsahující amino skupinu (protein) a karboxylovou skupinou. EDC je spouštěč kovalentní konjugace, rozštípe  $-SH$  můstky, vznikají fragmenty, které se vážou na nanočástice (obr.14) Vazba  $-SH$  s Au je pevná vazba[52,53].



**Obr.14.** Schéma DHLA fragmenty navázané na nanočástici [53].

Při použití DHLA se EDC jedním koncem váže na karboxylovou skupinu DHLA a svým druhým koncem na amino skupinu molekuly proteinu (obr.15).



**Obr.15.** Tvoření amidových vazeb mezi DHLA navázané s nanočásticí a proteinu, který obsahuje aminovou skupinu za použití EDC [53].

## **3. Experimentální část**

### **3.1. Postup práce**

1. Detekovat a měřit velikost různých typů nanočástic nejprve v TEM JEOL 1010 a LVTEM 5.
2. Statisticky vyhodnotit velikost a stabilitu nanočástic pod elektronovým svazkem hlavně v LVTEM 5 a porovnat s výsledky z TEM JEOL 1010.
3. Vybrat nanočástice, které mohou být použity jako markery v LVTEM 5 a pokusit se je konjugovat s vhodnou sekundární protilátkou.
4. Na vhodném modelovém systému provést imunozačnění.

## 4. Materiál a metody

V tabulce č.1. jsou uvedeny všechny nanočástice, které byly v práci použity. Au nanočástice jsou komerčně vyrobené firmou AURION. Nanočástice Au 5 nm, Pd, Ag a  $\text{Co}_3\text{O}_4$  vyprodukoval Dr. Šlouf z Ústavu makromolekulární chemie – Praha. Podrobný popis syntéz studovaných nanočástic je uveden v podaných přihláškách vynálezů a užitných vzorů [54,55]. Nanočástice  $\text{SiO}_2$  a  $\text{TiO}_2$  byly zakoupeny od firmy Aldrich, nanočástice QD od firmy Invitrogen.

Nanočástice a jejich velikost	Stav	Dodavatel	Průměrná velikost
Au (15, 10, 6 nm)	Roztok	AURION	Komerčně vyrobené
Au 5 nm	Roztok	ÚMCH - Praha	–
Pd 10 nm	Roztok	ÚMCH - Praha	–
Ag 10 nm	Roztok	ÚMCH - Praha	–
$\text{Co}_3\text{O}_4$ 18 nm	Roztok	ÚMCH - Praha	–
$\text{SiO}_2$ 5-15 nm	Práškový stav	Aldrich	10 nm
$\text{TiO}_2$ 25 nm	Práškový stav	Aldrich	25 nm
QD 10 nm	Konjugát QD + anti rabbit IgG	Invitrogen	–

**Tabulka č.1.** Přehled použitých nanočástic

- **Au (15, 10, 6 nm)**

Nanočástice Au dodané firmou AURION sloužily jako standardy, protože firma AURION testuje všechny nanočástice Au, které produkuje a uvádí jejich velikost a rozptyl velikostí. Data sheet nebyl k dispozici v průběhu mé experimentální práce, ale vycházela jsem z obecných údajů na internetu, který firma AURION udává. Nanočástice Au jsou monodisperzní s koeficientem variace  $< 15\%$ , ale ve většině případů  $< 10\%$ . Tyto produkty byly dodané v PBS s 15 mM  $\text{NaN}_3$  [56].



- **Au 5 nm**  
Chemické složení: Au  
Au jsou monodisperzní s koeficientem variace < 20 %  
Tyto produkty byly dodané v roztoku kombinací Na[BH<sub>4</sub>] a NH<sub>2</sub>OH roztoků.  
Tvar: sférické, izometrické nanočástice
- **Pd 10 nm**  
Paladiové nanočástice s velikostí v rozsahu 5 až 15 nm  
Chemické složení: Pd  
Podle protokolu přípravy by u daných nanočástic měla být směrodatná odchylka číselné distribuce velikostí (šířka číselné distribuce velikostí): < 3 nm  
Tvar: sférické, izometrické nanočástice
- **Ag 10 nm**  
Stříbrné nanočástice s velikostí v rozsahu 5 až 15 nm  
Chemické složení: Ag  
Podle protokolu přípravy by u daných nanočástic měla být směrodatná odchylka číselné distribuce velikostí (šířka číselné distribuce velikostí): < 3 nm  
Tvar: sférické, izometrické nanočástice
- **Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 18 nm**  
Nanočástice oxidu kovu s velikostí v rozsahu 5 až 20 nm  
Chemické složení: oxid kobaltnato-kobaltitý  
Podle protokolu přípravy by u daných nanočástic měla být směrodatná odchylka číselné distribuce velikostí (šířka číselné distribuce velikostí): < 3 nm  
Tvar: menší nanočástice s průměrem < 10 nm převážně sférické, s větším průměrem narůstá počet částic kubického tvaru, větší částice s průměrem > 15 nm převážně kubické.
- **SiO<sub>2</sub> 5-15 nm**  
Oxid křemičitý (SiO<sub>2</sub> - 5-15 nm) byl zakoupen v práškovém stavu od firmy Aldrich o průměrné velikosti 10 nm, čistotě 99,5%, MW 60,09.

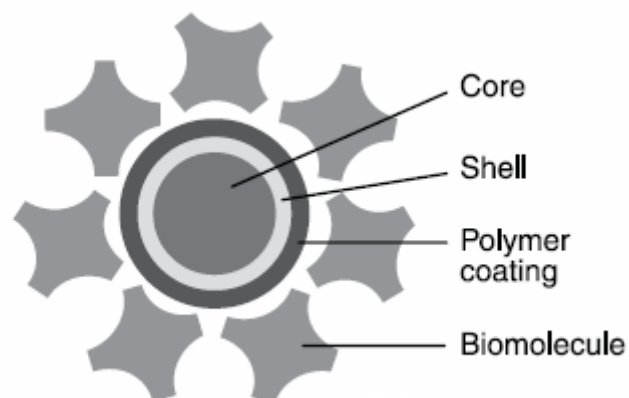
- **TiO<sub>2</sub> 25 nm**

Oxid titaničitý (TiO<sub>2</sub> - 25 nm) byl zakoupen v práškovém stavu od firmy Aldrich o průměrné velikosti 25 nm, čistotě 99,7% a MW 79,9.

### **Polovodičové nanokrystaly:**

- **Quantum Dots (OD + anti rabbit IgG - 10 nm)**

Kvantové tečky (= quantum dots) jsou polovodičové nanočástice skládající se z polovodičového jádra nejčastěji tvořeným kombinací prvku II. a VI. nebo III. a V. skupiny, které může být stabilizováno obalem z anorganických solí (např. CdS, ZnS) (obr.16). Rozpustnost ve vodě je zajištěna nabitými organickými molekulami, které jsou kovalentně vázány na povrch kvantové tečky pomocí thiolových skupin. Tyto molekuly mohou sloužit pro navázání dalších funkčních ligandů nebo biomolekul. Kvantové tečky nacházejí použití jako fluorescenční značky v analytické chemii, molekulární biologii a medicíně díky svým výborným optickým vlastnostem. Nejčastější biomolekulou je králičí IgG. Standardně se používá k imunoznačení v optické mikroskopii, protože je na něm navázána fluorescenční látka. Tento produkt byl dodán firmou Invitrogen o koncentraci 1 μM roztok v 1 M betainu, 50 mM boratovém pufru o pH 8,3 s 0,05 % azidem sodným pro konzervaci [4,57].



**Obr.16.** Schéma struktury QD - jádro (tvořené kombinací prvku II. a VI. nebo III. a V. skupiny) CdSe, obal (stabilizuje) ZnS a navázaná biomolekula [57].

## **4.1. Příprava vzorků nanočástic pro TEM a LVTEM**

### **4.1.1. Čištění elektronmikroskopických sítěk**

Nanočástice jsem nakapala na homogenní uhlíkovou blánu, která byla vytvořena na měděných elektronmikroskopických sítkách firmy Tesla o průměru 3 mm s velikostí otvorů 400 MESH. Nové sítky se před použitím musí dokonale umýt. Nejprve jsem je ponechala 5 minut v roztoku 50% kyseliny octové, poté jsem je umístila na 5 minut do jarové vody, následně promyla 5 minut v destilované vodě a dalších 5 minut v acetonu. Nakonec jsem je nechala usušit na filtračním papíru. Takto vyčištěné sítky se uskladní v Petriho miskách na suchém a čistém místě. Po delší době uskladnění je dobré sítky před použitím znovu promýt. Stačí 5 minut v acetonu a nechat oschnout.

### **4.1.2. Příprava uhlíkových podložních blan**

Uhlíkové blány se připravovaly v napařovací aparatuře JEOL JEE 4C (Obr.17). Atomy uhlíku byly napařovány na čerstvě odštipnutý povrch slídy. K napařování se

používaly uhlíkové elektrody z čistého uhlíku o průměru 5 mm a délce 10 cm od firmy Karbotechnik.



**Obr.17.** Napařovací aparatura JEOL JEE 4C

#### **4.1.2.1. Metoda přímého napařování**

V prvním kroku se připravila podle doporučeného návodu napařovací aparatura. Po předčerpání aparatury se po otevření zvonu recipientu upravily uhlíkové elektrody ořezáním ve speciálním ořezávátku (POLARON, Watford England). Konec jedné elektrody byl ořezán na hrot o průměru přibližně 1 mm, druhá elektroda byla zarovnána obroušením na smirkovém papíře do plochého konce. Konce upravených elektrod se o sebe opatrně opřely, aby nedošlo ke zlomení ořezaného hrotu. Dále se do zvonu umístil keramický střep s kapkou oleje pro orientaci, aby bylo vidět množství napařeného uhlíku. Pro zamezení kontaminací blan byla slída odštípnutá bezprostředně před uhlíkováním. Plátek slídy byl umístěn na otáčivý stolek napařovací aparatury stranou k uhlíkovým elektrodám bezprostředně po jeho odštípnutí. Povrch se čistí přiložením běžné lepicí pásky. Po strhnutí pásky je povrch plátku slídy v největší čistotě. Povrch slídy byl přibližně ve vzdálenosti 10 cm od elektrod.

Čerstvě odštípnutý kousek slídy zaručuje, že je povrch v maximální čistotě. Aby nedošlo k uvolnění slídy ze stolku, byla připevněna pomocí oboustranné uhlíkové lepicí pásky. Výhoda uhlíkové lepicí pásky je, že odvádí statickou elektřinu, je stabilní ve vakuu

a nemění v něm své vlastnosti. Zvon recipientu se přiklopil zpátky a podle návodu se pokračovalo v čerpání aparatury. Po vyčerpání prostoru zvonu na hodnotu  $1,3 \times 10^{-3}$  až  $1,3 \times 10^{-4}$  Pa, bylo možno začít uhlíkovat. Uhlíkové elektrody se začaly pomalu žhavit pozvolným přidáváním žhavicího proudu, který byl později ustaven na hodnotách mezi 30 - 40 A. Doba uhlíkování, podle empirického odhadu, byla 1 až 2 minuty v závislosti na velikosti žhavicího proudu. Čím větší proud, tím kratší doba. Po pouhlikování se kousky slídy z aparatury vyjmuly a splavily na hladině destilované vody.

Splavení se provedlo ve splavovací vaničce s výpustí. Uprostřed vaničky byl vyroben plíšek s otvory, na který se pokládá filtrační papír s elektronmikroskopickými síťkami. Vanička se naplnila destilovanou vodou cca 1 cm pod okraj. Pod vodní hladinu se pomocí pinzety ponořil kousek filtračního papíru, který se položil na plíšek s otvory. Na ponořený filtrační papír se pomocí pinzety poskládaly čisté elektronmikroskopické síťky těsně vedle sebe, aby byla snazší manipulace se splavováním uhlíkové blány. Pokud je uhlíková blána potřeba jen jako nosná blána pro nanočástice, nezáleží, zda je síťka umístěna matnou či lesklou stranou na filtrační papír, a tím pádem je jedno na jakou stranu elektronmikroskopické síťky bude blána splavena. Pokud má být blána použita jako podložní blána pod řezy, je důležité ji umístit na matnou stranu síťky.

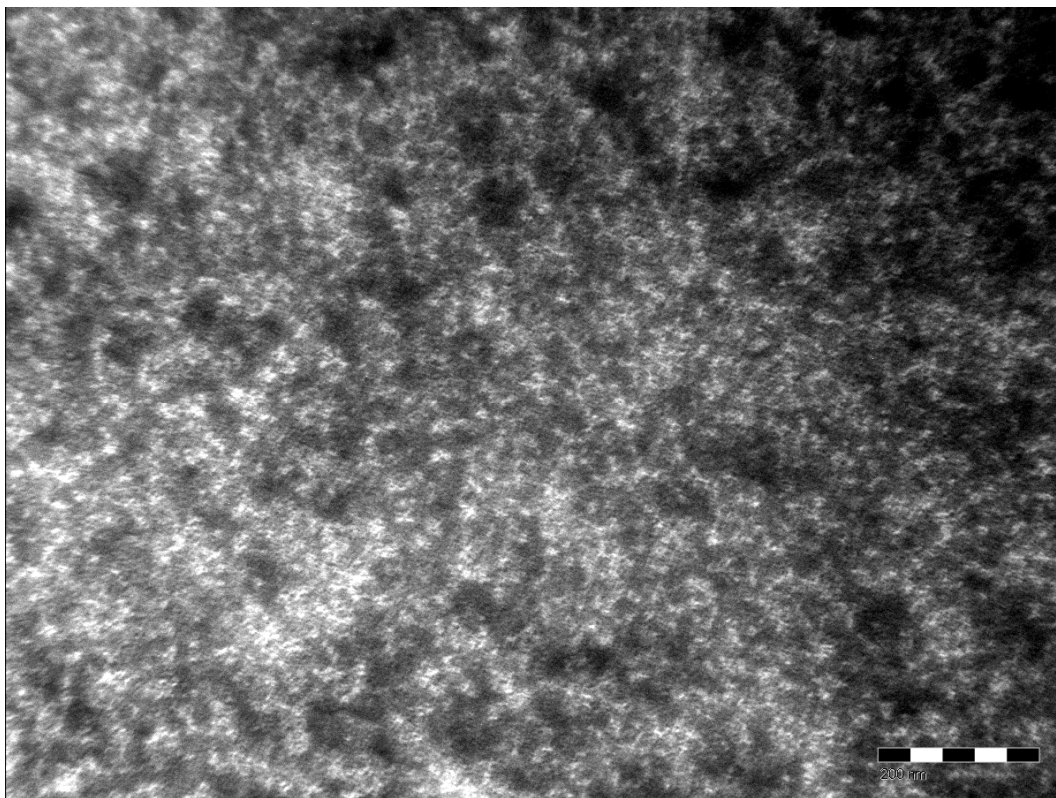
Následovalo samotné splavení uhlíkové blány. Slída s napařeným uhlíkem se pozvolna nořila do destilované vody pod úhlem  $45^\circ$ . Blána se pomalu oddělovala od povrchu slídy a zůstala plavat na vodní hladině. Po splavení se blána pomocí foukání navedla nad filtrační papír se síťkami a poté se otevřela výpust vody. Během vypouštění se kontrolovala poloha blány, aby nedošlo k jejímu přilepení k okrajům vaničky nebo dokonce k potrhání. Po vypuštění vody byl filtrační papír se síťkami s nanesenou uhlíkovou blánou umístěn do Petriho misky a ponechán vyschnout do druhého dne.

#### **4.1.2.2. Metoda nepřímého napařování**

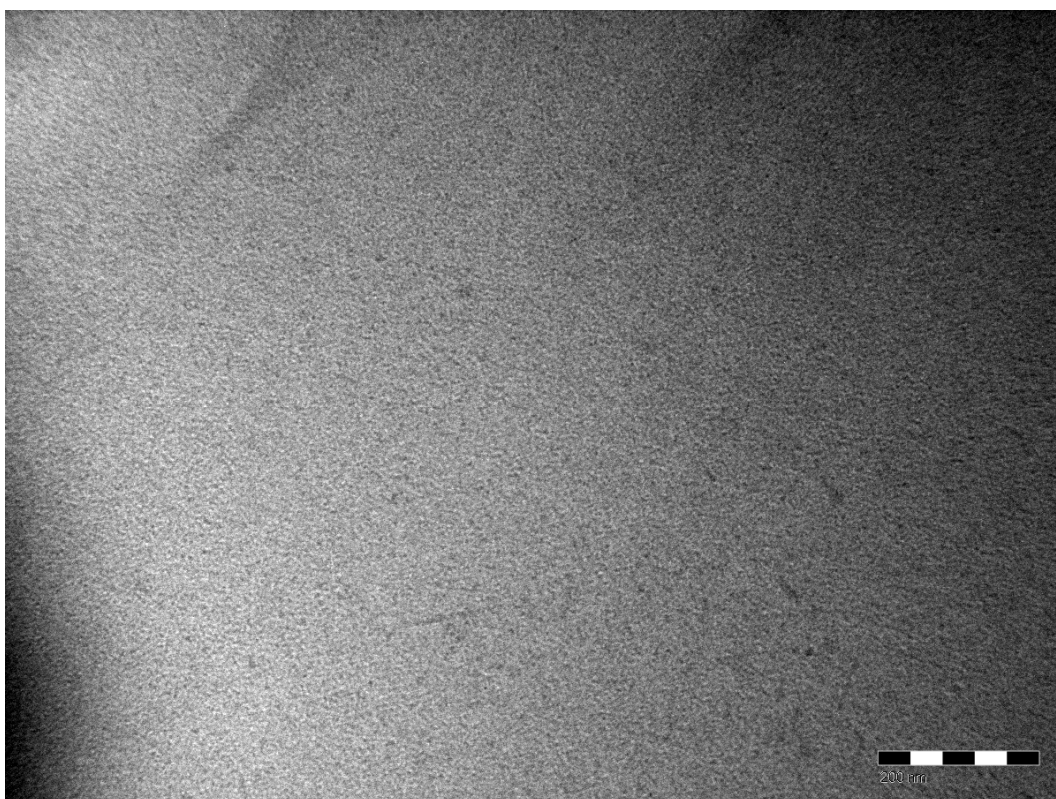
Metoda nepřímého napařování je velice podobná s předchozí metodou. Postup přípravy uhlíkových blan metodou nepřímého napařování byl převzat z knihy *Methods of Preparation for Elektron Microscopy*, D.G. Robinson, 1987. Rozdílem je, že odštípnutá slída se umísťuje do zákrytu, aby nedocházelo k přímému napařování atomů uhlíku. Tím se zajišťuje více homogenní povrch uhlíkové blány. Jako pomůcka pro nepřímé napařování slouží zvláštní držák vyrobený technikem Jiřím Vaněčkem z oddělení LEM. Do držáku se vložila dvě čistá podložní sklíčka. Obě strany, na které se sklíčka pokládají, jsou nakloněna

pod úhlem  $45^\circ$  k elektrodám. Pro kontrolu množství napařeného uhlíku slouží lehce přesahující papírek umístěný pod podložním sklíčkem. Intenzita černého zbarvení papírku nám ukazuje přibližnou tloušťku uhlíkové blány. Odštípnutá slída se položila na podložní sklíčko, ležící na straně, která je zastíněná před přímým dopadem atomů uhlíku. Druhé podložní sklíčko umístěné naproti slídě na nezakryté straně, bylo očištěno jarovou vodou a etanolem a buničitou vatou otřeno do sucha. Takto připravená pomůcka se položila na otáčecí stolek napařovací aparatury.

Při vlastním uhlíkování jsou vypařené částice uhlíku odráženy z povrchu čistého podložního sklíčka na nezakryté straně, nastaveného  $45^\circ$  úhlu k elektrodám, a dopadají na čerstvě odštípnutý kousek slídy. Po uhlíkování se blána ze slídy opět splavila ve splavovací vaničce, stejně jako v předchozím postupu, a filtrační papír se síťkami s nanesenou uhlíkovou blánou se nechal oschnout do druhého dne v Petriho misce. Abych získala homogenní blánu jako nosnou blánu pro nakapané nanočástice, používala jsem metodu nepřímého napařování. Když jsem potřebovala uhlíkovou blánu jako podpůrnou blánu pod řezy pro imunoznačení, použila jsem metody přímého napařování.



**Obr.18.** LVTEM 5 (145 K) uhlíková blána připravená metodou přímého napařování



**Obr.19.** LVTEM 5 (145 K) uhlíková blána připravená metodou nepřímého napařování

Uhlíkové blány vynikají svou kvalitou a je možné je připravit v tloušťkách 2 – 10 nm. Uhlíkové blány připravené nepřímým naprašováním mají homogenní povrch a jsou elektrontransparentní. Blány připravené metodou nepřímého naprašování byly použity jako podložní blány pod nakápnuté nanočástice. Nemají téměř žádnou strukturu ani při největších zvětšeních, proto se používají hlavně při práci, která vyžaduje nejvyšší rozlišení. Nevýhodou těchto uhlíkových blan oproti blánám připravených přímým naprašováním je, že jsou více fragilní. Těmito fotografiemi byl potvrzen rozdíl mezi nimi (obr.18 a obr.19).

### 4.1.3. Příprava vzorků nanočástic

Pro zobrazení v LVTEM 5 byly připraveny tyto kovové nanočástice Au (6, 10, 15 nm), Pd (10 nm), Ag (10 nm), oxidy  $\text{CO}_3\text{O}_4$  (18 nm),  $\text{SiO}_2$  (5-15 nm),  $\text{TiO}_2$  (25 nm) a polovodičové nanokrystaly QD. Byly nakápnuty 3  $\mu\text{l}$  těchto částic na podložní uhlíkovou blánu připravenou metodou nepřímého naprašování. Síťky byly za okraj uchyceny v křížových pinzetách. Nechaly se 10 min zaschnout a zbytek byl odsán velice opatrně filtračním papírem, aby se vzorek neporušil.

Nanočástice oxidu křemičitého a oxidu titaničitého byly k dispozici v práškovém stavu. Oba typy nanočástic byly rozpuštěny v etanolu a acetonu. Pokus rozdispergovat tyto nanočástice oxidů byl proveden pomocí sonifikace. Nejprve byly vzorky  $\text{SiO}_2$  a  $\text{TiO}_2$  rozpuštěné v etanolu a acetonu sonifikovány po dobu 1 hodiny. Poté se časový interval dalších vzorků prodloužil o další hodinu, takže vzorky byly celkem sonifikovány 2 hodiny. K prohlížení preparátů byl použit vysokonapěťový elektronový mikroskop TEM JEOL 1010 od firmy JEOL a nízkonapěťový elektronový mikroskop LVTEM 5 od firmy Delong Instruments.

## 4.2. Příprava ultratenkých řezů o tloušťce 20 nm pro LVTEM

Vzorek slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*, které sálo 72 hod byl připraven následujícím způsobem. Slinné žlázy z nasáté samice klíštěte *Ixodes ricinus* byly vypreparovány, promyty a fixovány v 4% formaldehydu a 0,5% glutaraldehydu po dobu 1 hodiny při 4 °C. Promytí slinných žláz bylo zpracováno pomocí moderní nízkoteplotní



techniky (PLT) s použitím zařízení EM CFD (Leica, Vienna, Austria). Materiál byl dehydratován se zvyšující se koncentrací etanolu za snižující se teploty (30% při 0 °C, 50% a 70% při – 20 °C, 100% při – 35 °C ), poté infiltrován a zalit do pryskyřice Lowicryl K4M (Polysciences) při – 35 °C a na závěr polymerizován UV zářením při – 35 °C po dobu 2 dnů. Řezy byly nakrájeny diamantovým nožem na ultramikrotomu LEICA [58]. Vzorek slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*, které sálo 72 hod mi poskytla laborantka Petra Masařová, která z něj rovněž připravila řezy o tloušťce 20 nm, protože připravit takto tenký řez vyžaduje dlouholeté zkušenosti.

### 4.3. Elektrostatická konjugace

Pro elektrostatickou konjugaci jsem vybrala Au o velikosti 5 nm a protein A. Nejprve jsem upravila pH nanočástic pomocí 25 mM  $K_2CO_3$  na pH 7. Ke 4 ml nanočástic Au o velikosti 5nm jsem přidala 200  $\mu$ l 25 mM  $K_2CO_3$ .

Dále jsem navázila 1 mg proteinu A a smíchala s 1 ml 5 mM pufru  $NaHCO_3$ . Abych vůbec mohla připravit kvalitní konjugát, provedla jsem nejprve vyřetřovací řadu tabulka č.2., která po vizuálním vyhodnocení potvrdila, že nejvíce stabilní konjugát je v případě, že protein a nanočástice reagují v poměru 1 : 1. Přidáním 10% roztoku NaCl jsem otestovala stabilitu konjugátu. V poměru 1 : 1 je po přidání NaCl roztok zakalen do červena. Tato barva vypovídá o tom, že při této koncentraci je konjugát stabilní. Ostatní koncentrace měly fialové zbarvení, což vypovídá o nefunkčnosti konjugátu, došlo k agregaci. Nejlepší reakční poměr je teoreticky 7  $\mu$ l roztoku nanočástic : 7  $\mu$ g proteinu A. Smíchala jsem 7  $\mu$ l roztoku proteinu A s 200  $\mu$ l roztoku nanočásti Au 5 nm, protože 200  $\mu$ l nanočástic Au odpovídá 7  $\mu$ g proteinu A. Vše bylo mícháno při pokojové teplotě.

Roztok jsem stabilizovala přidávkem 12  $\mu$ l 1% PEG. Poté jsem vzorek centrifugovala (Amicon Ultra 4) při 11 800 ot/min po dobu 30 minut. Výsledný roztok jsem nekonzervovala azidem sodným, protože jsem kvalitu vzniklého konjugátu stejný den ověřila imunozačením.

<b>Množství proteinu v µg</b>	21	14	10,5	7	3,5	0
<b>Množství nanočástic</b>	200 µl nanočástic ~ 7 µg proteinu A					
<b>Poměr protein/nanočástice</b>	3 : 1	2 : 1	1,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	0 : 1

**Tabulka č .2.** 35 µg proteinu odpovídá 1 ml nanočástic Au o hmotnosti nanočástic  $3,5 \cdot 10^{-5}$  g/ml.

## 4.4. Imunoznačení

K imunoznačení byl použit vzorek slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*, které sálo 72 hodin. Ze vzorku byly připraveny 20 nm řezy postupem popsaným v kapitole 4.2.. Cílem imunoznačení bylo lokalizovat ve slinných žlázách glykany. Na to byla použita primární protilátka Biotinylated Wheat germ Agglutinin (WGA) od firmy Vector. WGA patří mezi lektiny a značí glykany (N-acetyl glukosamin, N-acetyl neuraminová kyselina). Ke zviditelnění této vazby byla použita sekundární protilátka namířená proti primární protilátce. Jako sekundární protilátka byl použit konjugát, mnou vyrobený komplex protein A-Au5 nm, a komerčně vyrobený konjugát QD navázaný s králičím IgG.

Do velké Petriho misky byl dovnitř natažen parafilm, přitlačen, obložený mokrou buničinou a na něj bylo do sloupce nadávkováno několik kapek o objemu 50 µl bloku (TBS (Tris pufrovaný fyziologický roztok)/5 mg Tween 20/300 mg BSA (hovězí sérový albumin)/15 mg glycin), na které byly na povrch umístěny Ni-síťky s řezy. Celé bylo přikryto a dáno do lednice přes noc (nesmí dojít k úplnému odpaření, proto byl zvolen větší objem kapky).

Byla připravena první primární protilátka – vybraný Biotinylated Wheat germ Agglutinin naředěn 1 : 100 µl TBS. Pak se do sloupce naněsly kapky o objemu 25 µl a síťky se opatrně přenesly na povrch kapek. Na místa kontroly se dalo jen TBS, aby kontrola byla účinná. Vzorky byly ponechány v první primární protilátce 2 hod při pokojové teplotě přikryté Petriho miskou.

Pak byly síťky promývány a ponechány 2 min v 6 kapkách TBS s Tween 20. Byly použity zvláštní pinzety na kontroly, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků.

Byla připravena druhá primární protilátka – vybraný Rabbit IgG Anti Biotin byl naředěn 1 : 300  $\mu$ l TBS. Opět byly nanесeny 25  $\mu$ l kapky do sloupce na místa vzorků. Na místa kontroly bylo dáno jen TBS. Síťky byly ponechány 2 hod při pokojové teplotě přikryté Petriho miskou.

Následovalo promytí. Síťky byly promývány v 6-ti kapkách TBS s Tween 20. Znovu byly brány zvláštní pinzety na kontrolu, aby nedošlo ke kontaminaci a tím pádem k falešným výsledkům.

Byla připravena sekundární protilátka – vybraný mnou připravený konjugát protein A-Au 5 nm a komerčně vyrobený konjugát QD-rabbit IgG. Konjugát protein A-Au 5 nm byl naředěn 1 : 40 0,5% BSA. Komerčně vyrobený konjugát QD-rabbit IgG byl naředěn 1:20 0,5% BSA. Sekundární protilátky byly dány i na místa kontrol. Síťky byly ponechány 2 hod při pokojové teplotě přikryté Petriho miskou.

Následovalo promytí 3x 2 min v TBS s Tween 20 a 3x 2 min v TBS a 3x v H<sub>2</sub>O. Vzorky byly osušeny a ponechány na filtračním papíře v nové Petriho misce a připraveny k prohlížení.

## 4.5. Pracovní podmínky mikroskopů

### a) TEM JEOL 1010

Vzorky byly prohlíženy standardně v TEM JEOL 1010 vybaveném MegaView III kamerou s rozlišením 1024 x 1024 pixelů a snímacím softwarem AnalySIS 3.1. Snímky byly pořízeny v 16 bitovém formátu a pomocí programu AnalySIS převedeny do 8 bitového formátu. Mikroskop pracoval při urychlovacím napětí 80 kV.

### b) LVTEM 5 kV

Na mikroskopu LVEM 5 byl obraz snímán CCD kamerou Proscan HSS 1300 a softwarem ProDIA při urychlovacím napětí 5 kV. Mikroskop byl zčerpán do provozního vakua a kvalitně seřízen. Snímky byly pořízeny v 16bitovém formátu a pomocí programu Image J převedeny do 8bitového formátu.

## 4.6. Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu Image J. Tento program je volně dostupný na internetu [59]. Image J je využíván především v různých oblastech vědy a výzkumu, velmi hojně i v diagnostice v lékařství [60].

Nejprve je třeba zadat údaj o velikosti pixelu pro kalibraci daného snímku. Velikost pixelu se mění se změnou zvětšení v mikroskopu.. Kalibrace se provádí na měřítku ve snímku. Následuje prahování nebo-li výběr úrovně šedé pro odečtení pozadí a objektů. K tomu se používá funkce Treshold, ve které se nastaví stupeň šedi, nad který jsou objekty černé a pod který jsou objekty bílé. Poté jsou nanočástice analyzovány pomocí funkce Build, která automaticky detekuje a vyhodnocuje parametry nanočástic. U nanočástic byl průměr určován dvěma způsoby. Ekvivalentní průměr byl vypočítán jako průměr kruhu, který vznikl z plochy pixelů měřené nanočástice. Feretův průměr je maximální vzdálenost dvou pixelů v měřené nanočástici.

Tato data byla exportována do tabulky a v programu Microsoft Excel zpracována. V programu Microsoft Excel jsem pracovala se statistickými funkcemi – ekvivalentní průměr, počet, minimum, maximum, směrodatná odchylka a Feretův průměr. Výsledky statistického vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách a histogramech, což je sloupcový graf, který udává rozložení četnosti nanočástic na jejich velikosti.

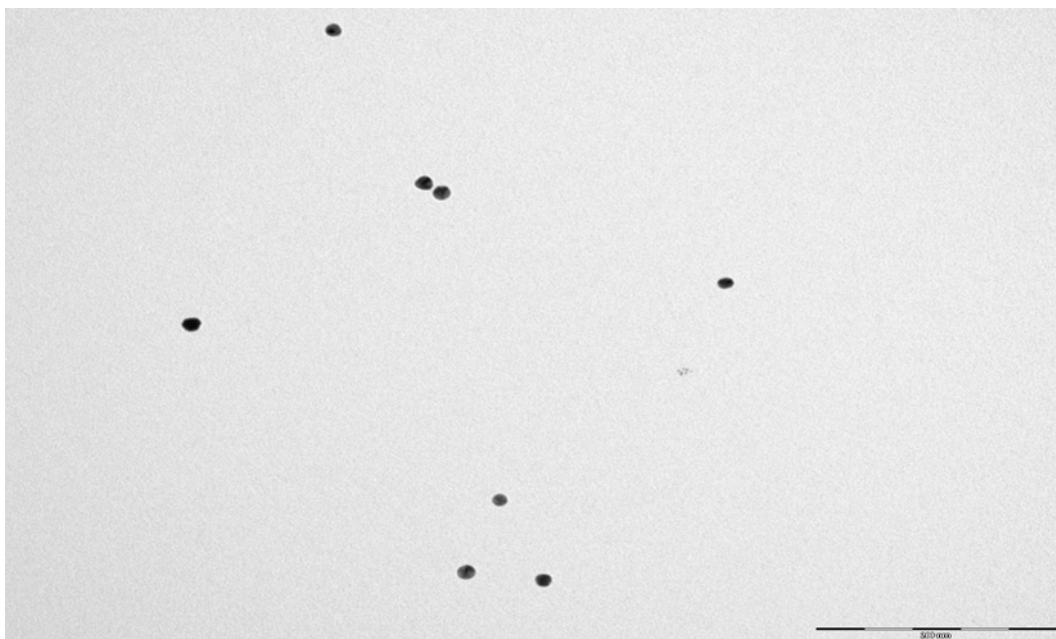
## 5. Výsledky

1. Detekovat a měřit velikost různých typů nanočástic nejprve v TEM JEOL 1010 a LVTEM 5
2. Statisticky vyhodnotit velikost a stabilitu nanočástic pod elektronovým svazkem hlavně v LVTEM 5 a porovnat s výsledky z TEM JEOL 1010

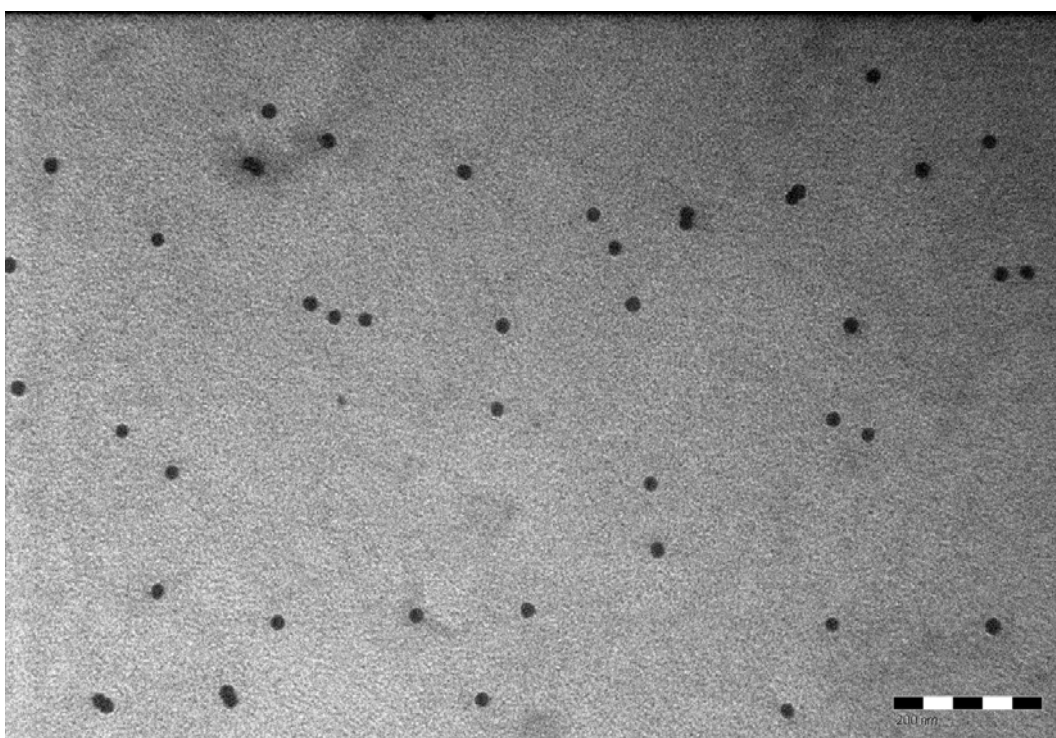
Prvním úkolem této experimentální části práce bylo detekovat vybrané nanočástice v TEM JEOL 1010 pracujícím při urychlovacím napětím 80 kV a poté se pokusit o vizualizaci těchto nanočástic v LVTEM 5 od firmy DeLong Instruments pracujícím při urychlovacím napětí 5 kV. Nejprve jsem použila komerčně vyrobené Au od firmy Aurion, protože o komerčně vyrobeném Au je známo, že velikostní rozpětí nanočástic není tak velké, proto slouží jako standardy. Preparáty jsem vždy pro kontrolu prohlédla nejprve v TEM JEOL 1010 a změřila velikost nanočástic. Poté jsem se ty samé nanočástice pokusila vizualizovat v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu LVTEM 5.

Detekce nanočástic v LVTEM 5 byla úspěšná, proto jsem provedla statistické vyhodnocení velikosti průměru nanočástic (Au 10 nm, Pd 10 nm, QD 10 nm) při zvětšení 150 tisíc krát (dále 150 K).

Začala jsem pracovat se Au o velikosti 15 nm (obr.20, 21).



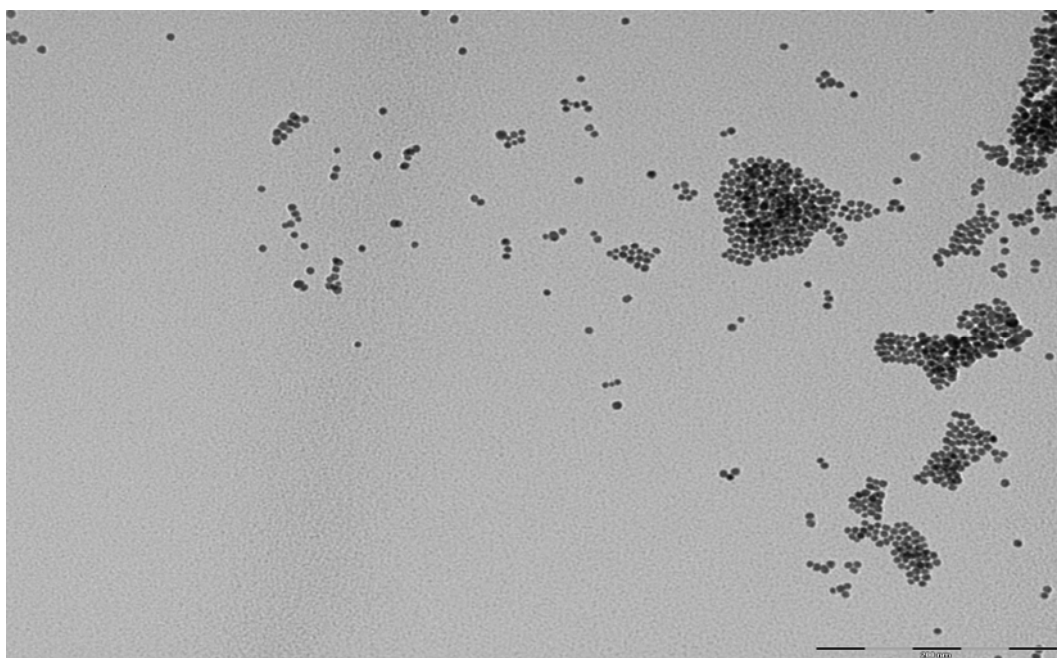
**Obr.20.** Snímek nanočástic Au (15 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K



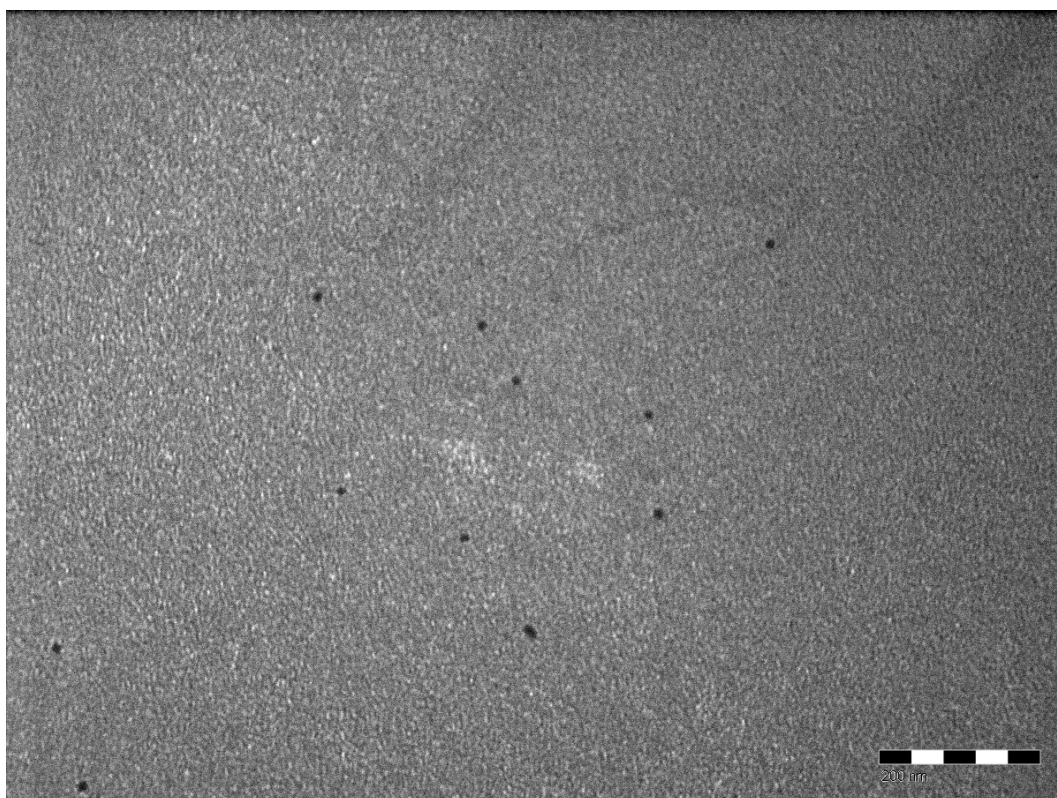
**Obr.21.** Snímek nanočástic Au (15 nm) v LVTEM 5, zvětšení 145 K

Nanočástice Au o velikosti 15 nm byly dobře detekovatelné a měřitelné jak v TEM JEOL 1010, tak v LVTEM 5. Dále jsem použila Au o velikosti 10 nm (obr.22, 23), abych

zjistila, zda je nízkonapěťový elektronový mikroskop schopen rozlišit nanočástice s ještě menší velikostí.

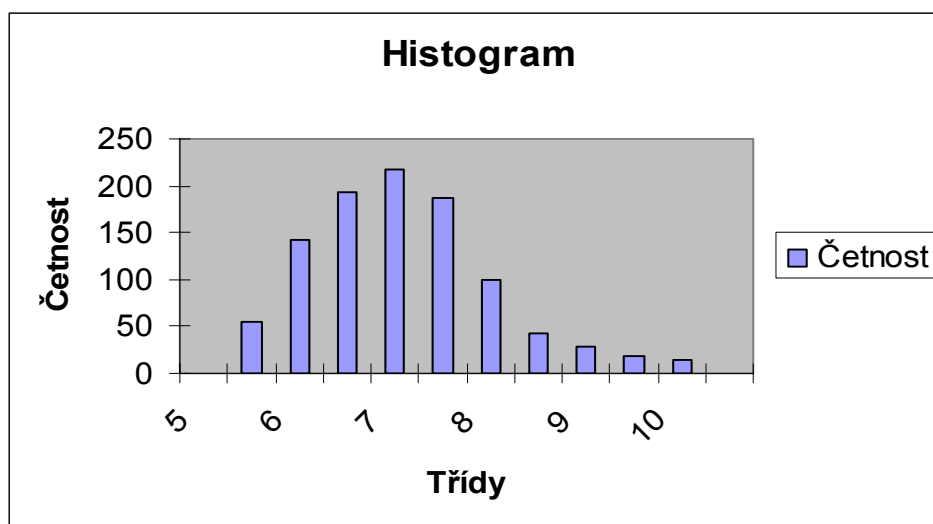


**Obr.22.** Snímek nanočástic Au (10 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K



**Obr.23.** Snímek nanočástic Au (10 nm) v LVTEM 5, zvětšení 145 K

Nanočástice Au o velikosti 10 nm byly dobře detekovatelné a měřitelné v obou typech mikroskopů. Statisticky jsem vyhodnotila velikost těchto nanočástic pomocí počítačového programu Image J. V TEM JEOL 1010 jsem provedla statistické vyhodnocení z počtu 1000 nanočástic (histogram č.1), kdežto z LVTEM 5 mikroskopu je velice obtížné takové množství nanočástic získat. Proto jsem data vyhodnotila z počtu 20 nanočástic (histogram č.2).



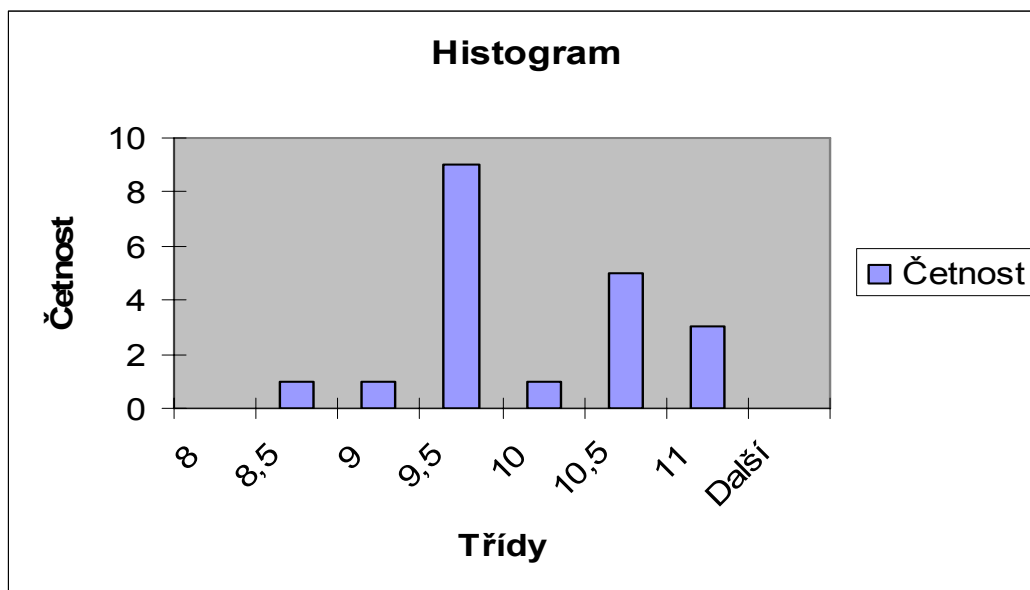
**Histogram č.1.** Velikost Au 10 nm v TEM JEOL 1010 (150 K)

<b>Průměr</b>	6,8	<b>Feret</b>	7,9
<b>Počet</b>	1000	<b>Počet</b>	1000
<b>Min</b>	5	<b>Min</b>	5,8
<b>Max</b>	10	<b>Max</b>	14,8
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,9	<b>Směrodatná odchylka</b>	1,2

**Tabulka č.3.** Statistické vyhodnocení měření Au 10 nm v TEM JEOL 1010 (150 K)

Bylo změřeno 1000 nanočástic Au o velikosti 10 nm a bylo zjištěno, že jejich průměrná velikost je 6,8 nm. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č.3.





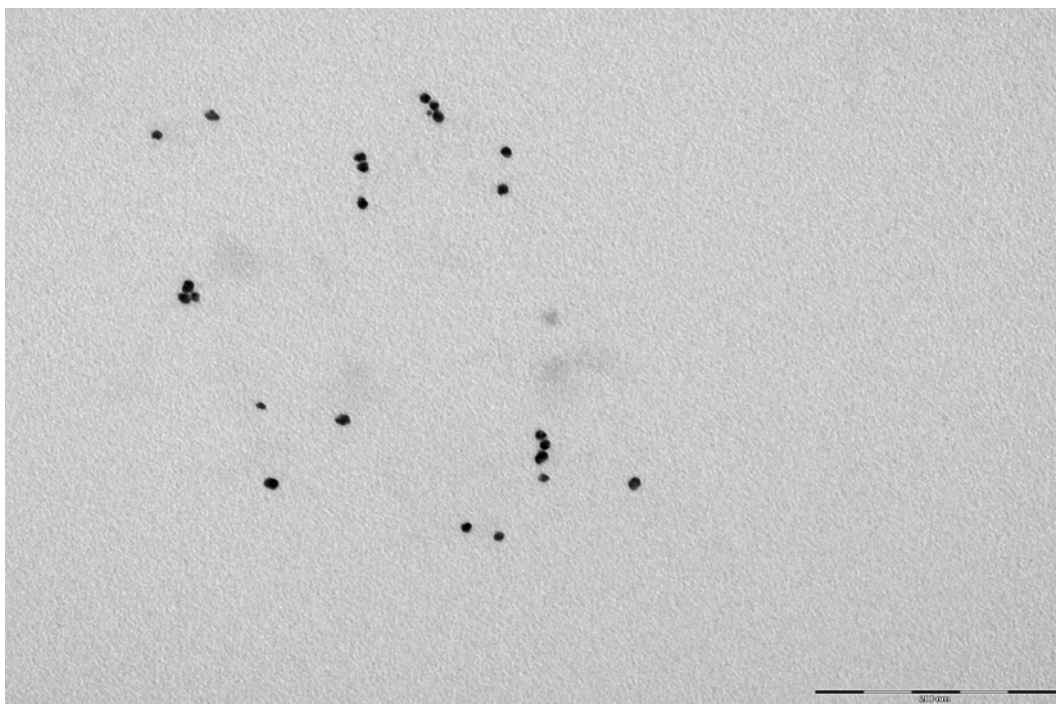
**Histogram č.2.** Velikost Au 10 nm v LVTEM 5 (145 K)

<b>Průměr</b>	9,7	<b>Feret</b>	9,7
<b>Počet</b>	20	<b>Počet</b>	20
<b>Min</b>	8,5	<b>Min</b>	8
<b>Max</b>	10,9	<b>Max</b>	12
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,7	<b>Směrodatná odchylka</b>	0,9

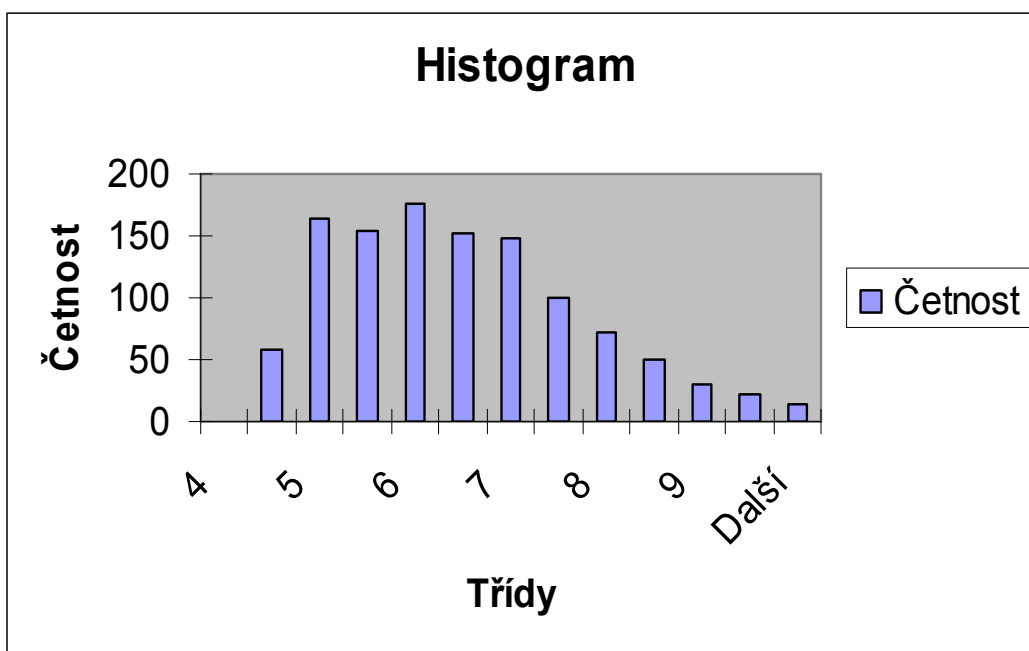
**Tabulka č.4.** Statistické vyhodnocení měření Au 10 nm v LVTEM 5 (145 K)

V LVTEM 5 bylo změřeno 20 nanočástic a zjistilo se, že průměrná velikost Au 10 nm je 9,7 nm. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č.4..

Výsledek detekce Au nanočástic o velikosti 15 a 10 nm byl kladný, a proto jsem zkusila použít další kovové nanočástice ležící nalevo od Au v periodické soustavě prvků. Pd a Ag patří svým atomovým číslem mezi lehké kovy. Použila jsem Pd (obr.24, 25) a Ag o velikosti 10 nm (obr.26,27).



**Obr.24.** Snímek nanočástic Pd (10 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K

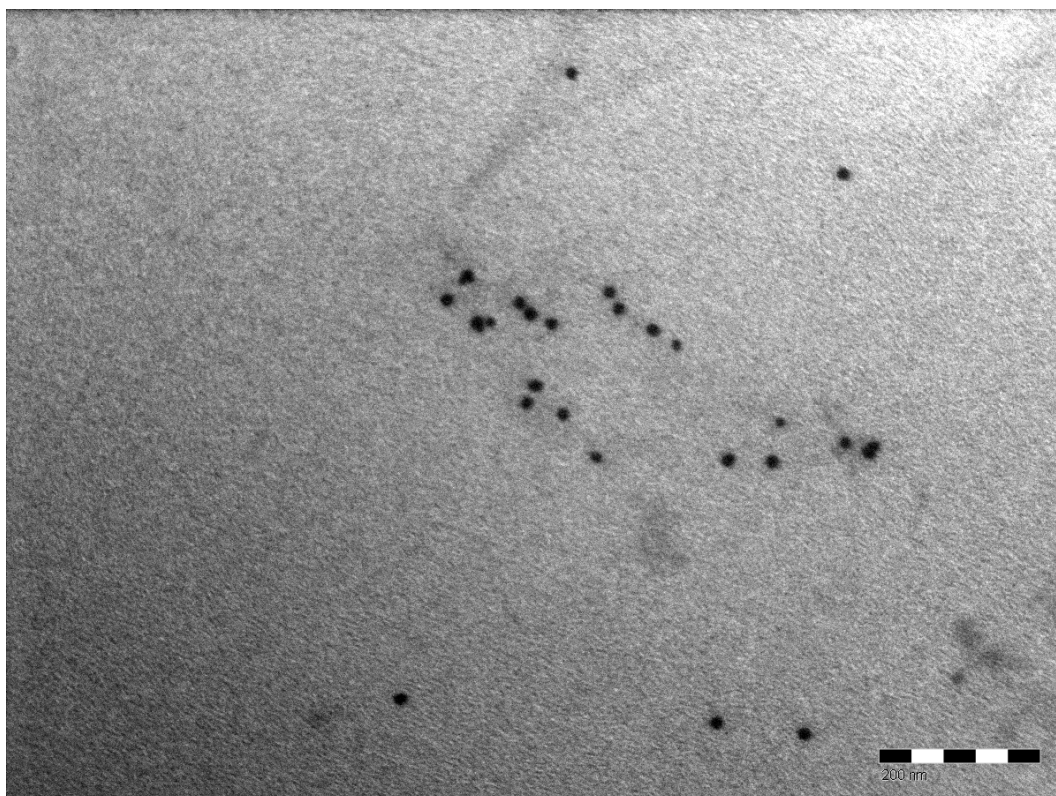


**Histogram č.3.** Velikost Pd 10 nm v TEM JEOL 1010 (150 K)

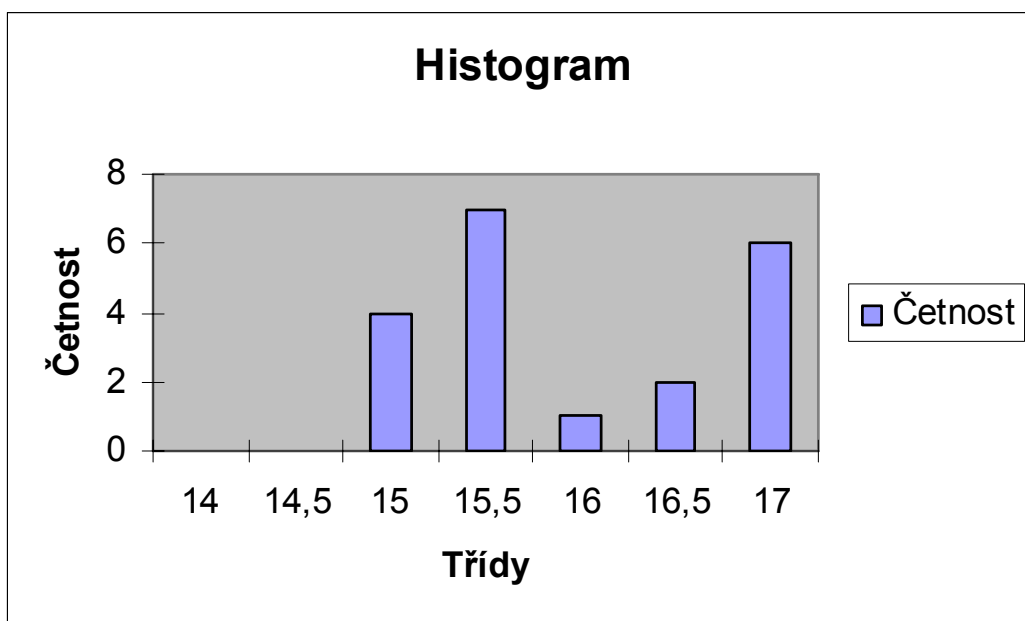
<b>Průměr</b>	8,5	<b>Feret</b>	9,9
<b>Počet</b>	1000	<b>Počet</b>	1000
<b>Min</b>	5	<b>Min</b>	6
<b>Max</b>	10	<b>Max</b>	12
<b>Směrodatná odchylka</b>	1,2	<b>Směrodatná odchylka</b>	1,4

**Tabulka č. 5.** Statistické vyhodnocení měření Pd 10 nm v TEM JEOL 1010 (150 K)

Pro statistické vyhodnocení bylo zpracováno 1000 částic Pd o velikosti 10 nm v TEM JEOL 1010. Průměrná velikost nanočástic v TEM je 8,5 nm (tabulka č.5.).



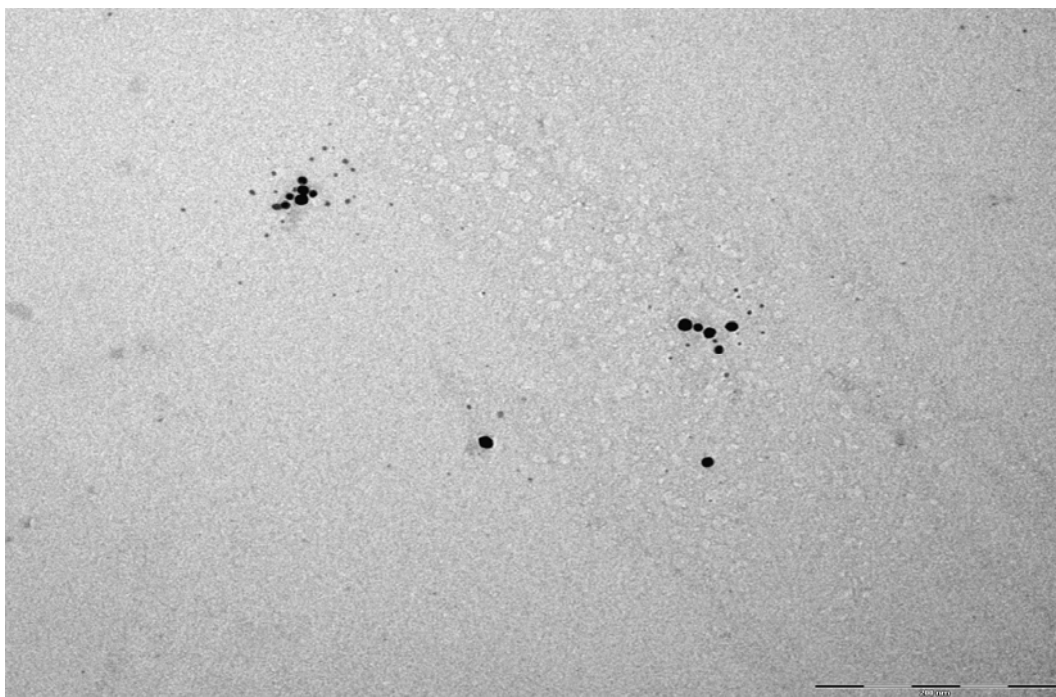
**Obr.25.** Snímek nanočástic Pd (10 nm) v LVTEM 5, zvětšení 145 K



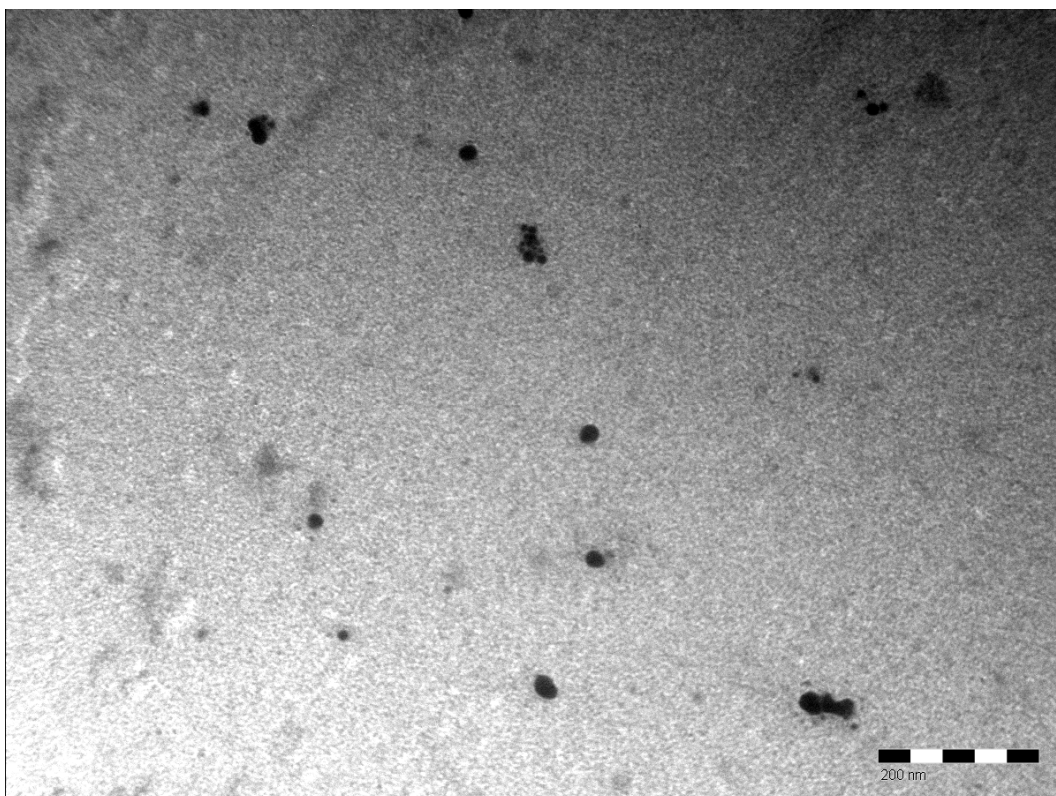
**Histogram č.4.** Velikost Pd 10 nm v LVTEM 5 (145 K)

<b>Průměr</b>	15,8	<b>Feret</b>	15,7
<b>Počet</b>	20	<b>Počet</b>	20
<b>Min</b>	14,6	<b>Min</b>	14,3
<b>Max</b>	16,8	<b>Max</b>	16,8
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,8	<b>Směrodatná odchylka</b>	0,7

**Tabulka č.6.** Statistické vyhodnocení měření Pd 10 nm v LVTEM 5 (145 K)



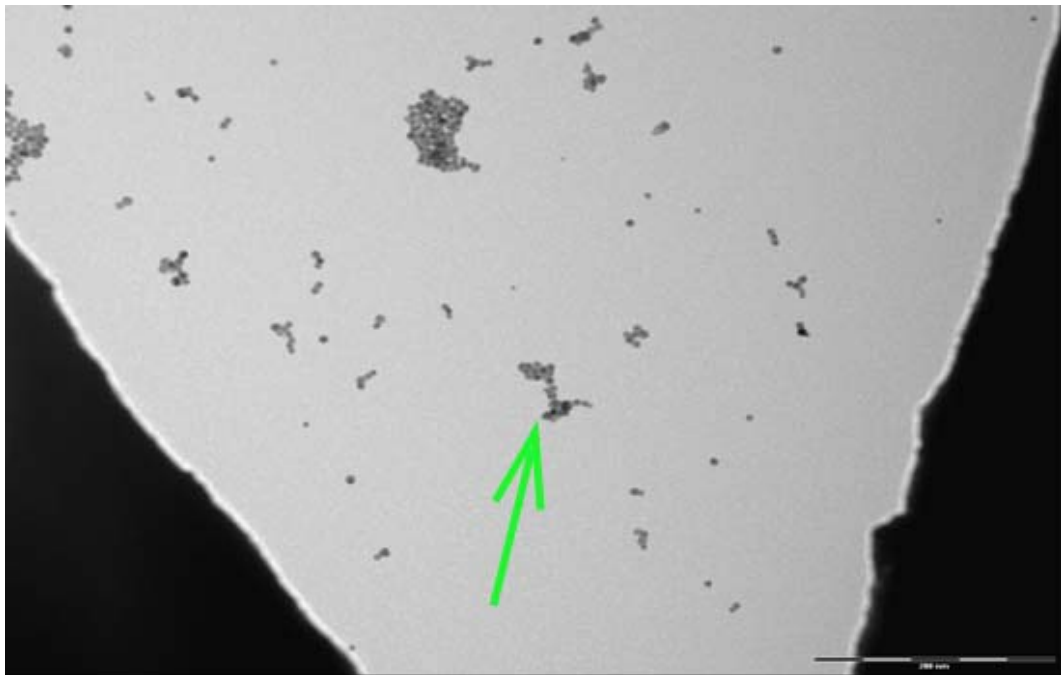
**Obr.26.** Snímek nanočástic Ag (10 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K



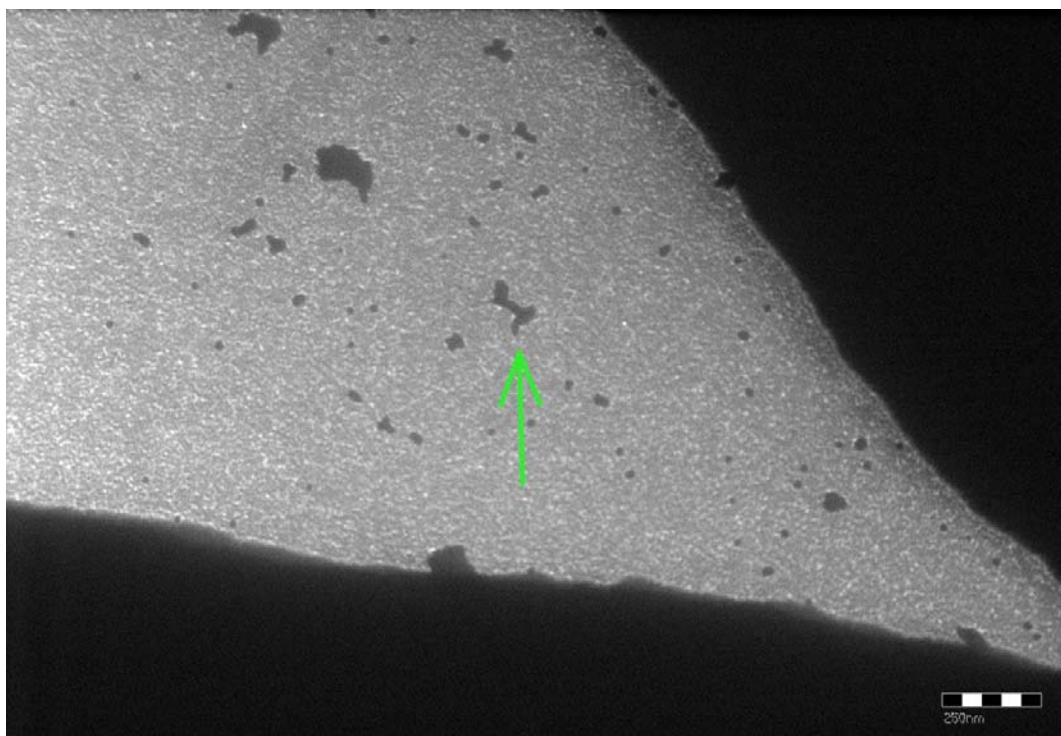
**Obr.27.** Snímek nanočástic Ag (10 nm) v LVTEM 5, zvětšení 145 K

Nanočástice Ag o velikosti 10 nm jsou dobře detekovatelné a měřitelné jak v TEM JEOL 1010, tak v LVTEM 5. I přesto, že Ag je lehký kov, nanočástice Ag byly stabilní po celou dobu pořizování snímků pro měření pod svazkem urychlených primárních elektronů. Nanočástice se chovaly stabilně, neměnily svůj objem ani nedocházelo k jejich odpařování. U těchto nanočástic bylo zjištěno, že rozpětí velikosti nanočástic je větší než u komerčně vyrobeného Au. To dokazuje (obr.26), kde velikostní rozpětí je zřetelné. Neprovděla jsem statistické vyhodnocení těchto nanočástic.

Jako nejmenší nanočástici jsem použila komerčně vyrobené Au o velikosti 6 nm, abych zjistila, zda rozlišení LVTEM 5 postačuje na vizualizaci takto malých nanočástic. Opět se podařilo tyto nanočástice detekovat a změřit jak v TEM JEOL 1010, tak v LVTEM 5 (obr.28, 29).



**Obr.28.** Snímek nanočástic Au (6 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K



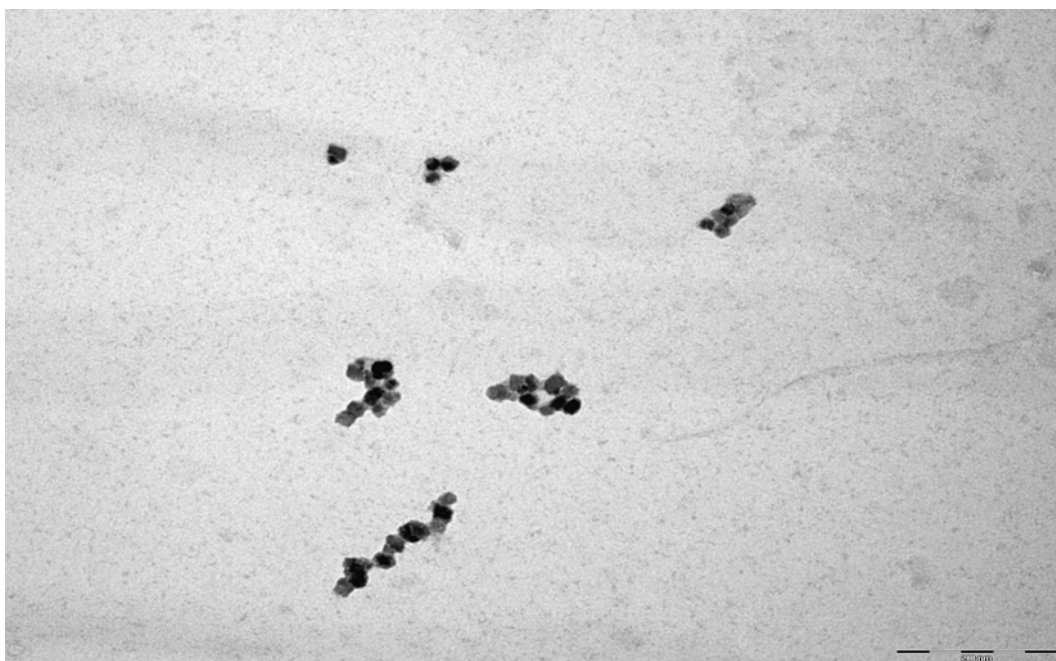
**Obr.29.** Snímek nanočástic Au (6 nm) v LVTEM 5, zvětšení 145 K

Dokonce se mi podařilo najít stejné místo na vzorku a získat tak stejný snímek z TEM JEOL 1010 a LVTEM 5. Najít stejné místo na vzorku mi umožnily měděné síťky

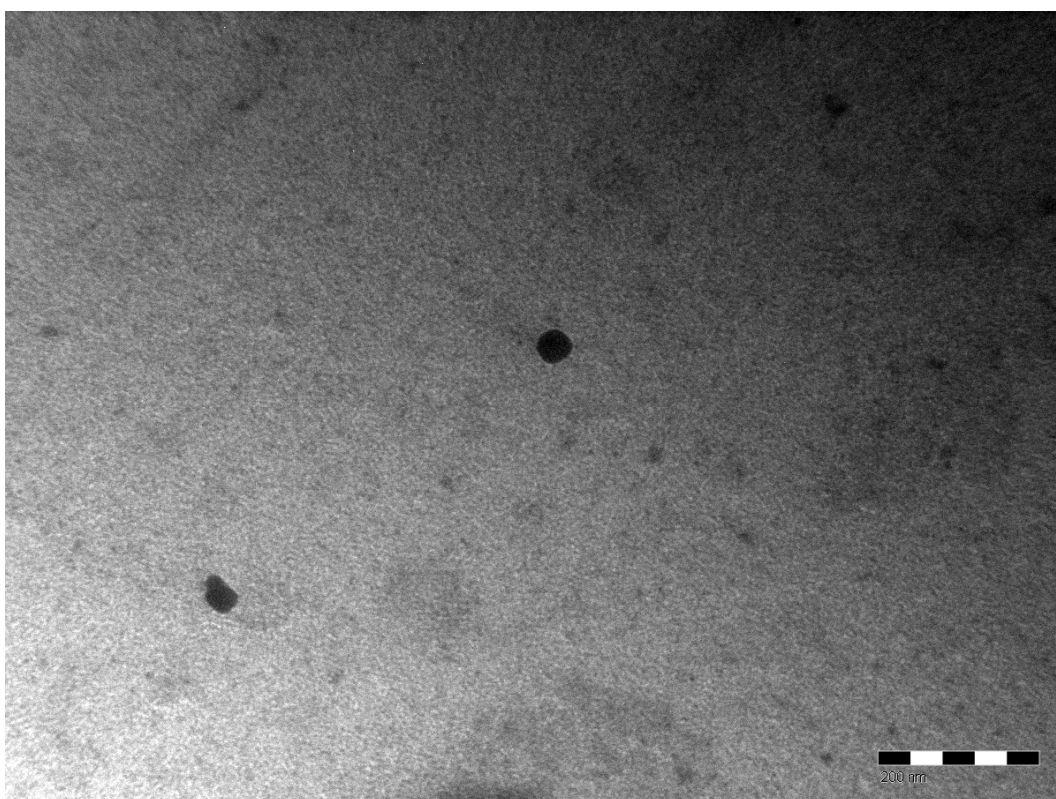
se značenými otvory (obr.30). Usnadňují orientaci na preparátu v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu, protože práce s ním je odlišná a daleko obtížnější než s TEM.

V dalším kroku jsem se snažila zobrazit nanočástice oxidu kobaltičitého (18 nm), oxidu křemičitého (5-15 nm) a oxidu titaničitého (25 nm). Vzorky byly připraveny metodou viz. kapitola 4.1.3. Ukázalo se jak v TEM JEOL 1010, tak v LVTEM 5, že nanočástice se vyskytovaly převážně ve shlucích, což je zřejmé z obrázků (obr.31,33). Oxid kobaltičitý je kubická 18 nm nanočástice. V projekci do výsledného snímku z TEM vypadají jako čtverečky.



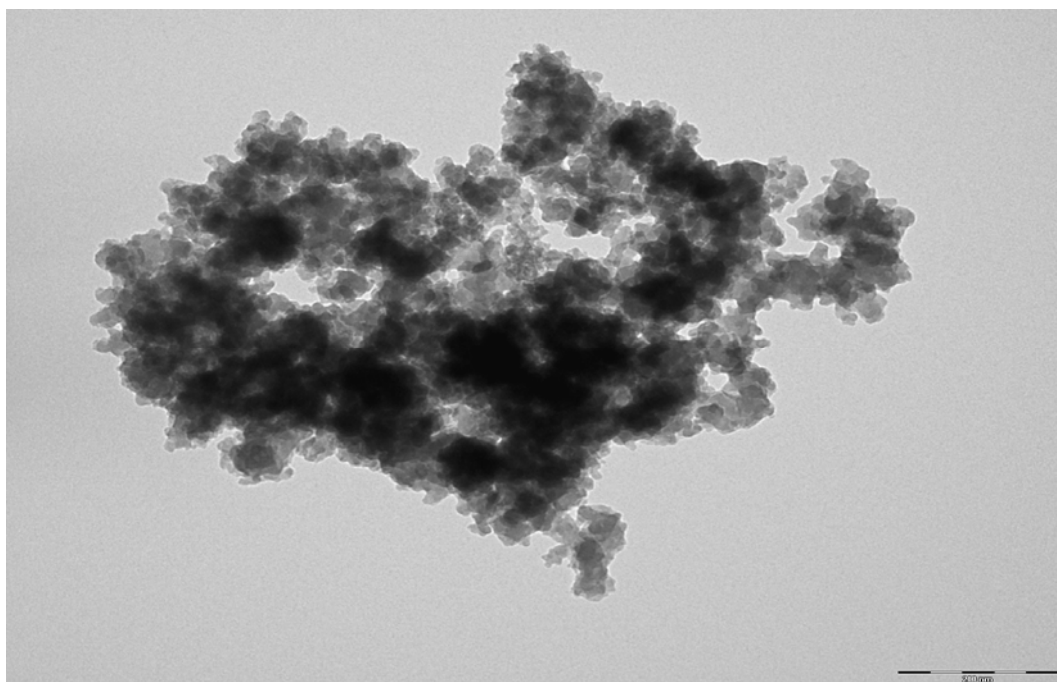


**Obr.31.** Snímek nanočástic  $\text{Co}_3\text{O}_4$  (18 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K



**Obr.32.** Snímek nanočástic  $\text{Co}_3\text{O}_4$  (18 nm) v LVTEM 5, zvětšení 145 K

Nanočástice oxidu křemičitého a oxidu titaničitého jsou komerčně dostupné v práškovém stavu. Tyto nanočástice byly rozpuštěny v acetonu a etanolu, vortexovány 1 hod, sonifikovány 1 hodinu, poté centrifugovány 10 min a odsátý supernatant byl sonifikován další hodinu. I přes tyto procesy se nepodařilo rozdispergovat tyto nanočástice oxidů a zbavit je agregátů.

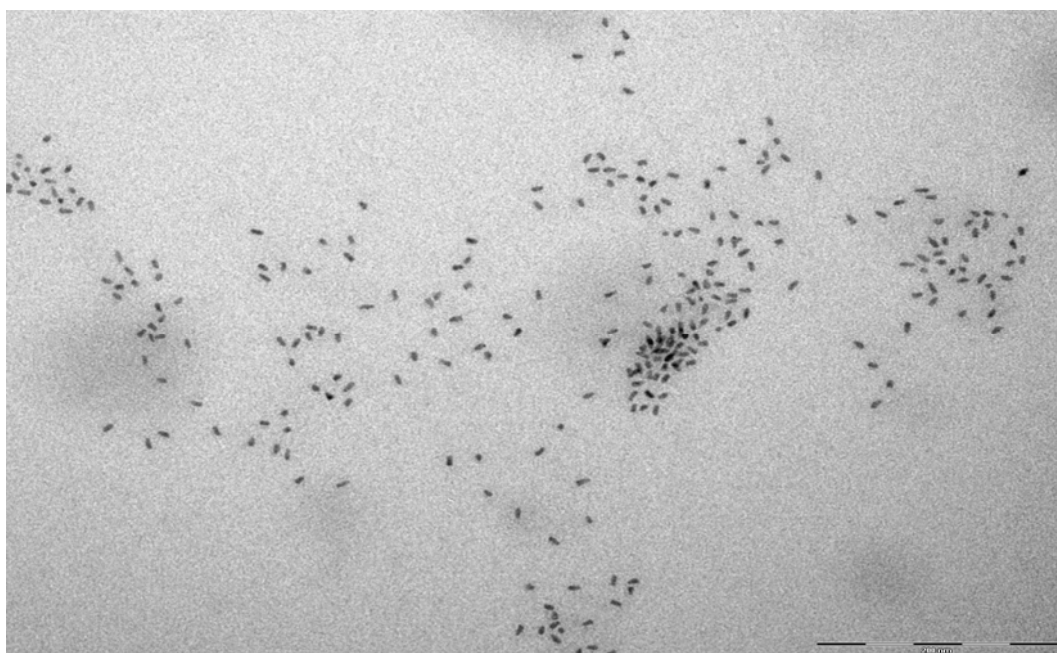


**Obr.33.** Snímek nanočástic SiO<sub>2</sub> (5-15nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K

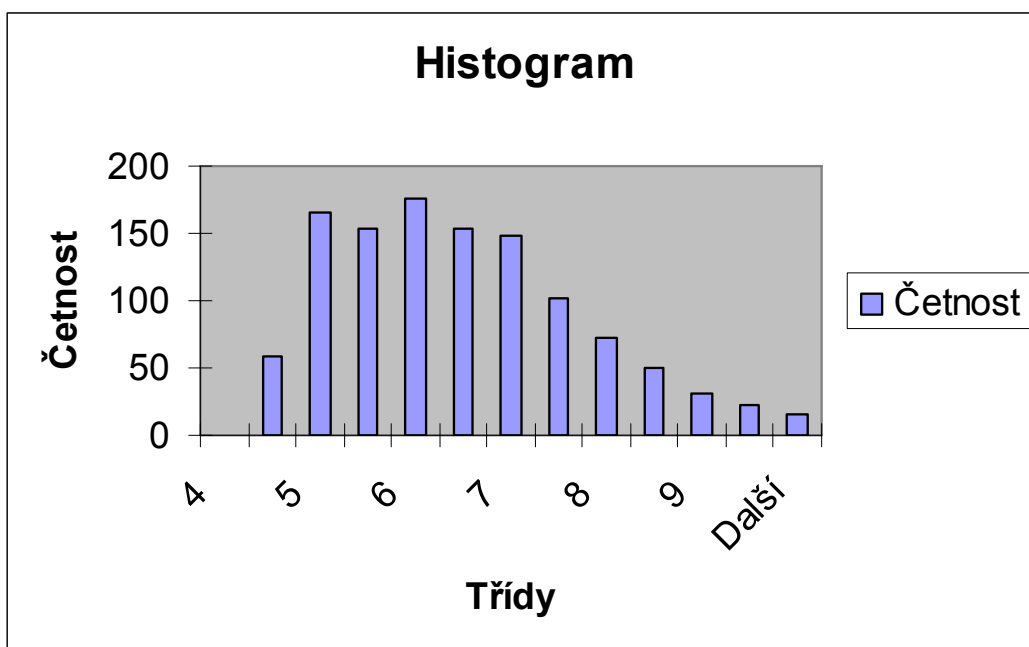
Z obrázku (obr.33) je zřejmé, že příprava těchto nanočástic oxidů nebyla úspěšná. Nepodařilo se mi zbavit se agregátů a výsledky jsou tedy neúspěšné. S největší pravděpodobností je to způsobeno nábojem na povrchu nanočástice a z tohoto důvodu má zřejmě tendenci agregovat. Vzhledem k tomu, že jsem nemohla rozlišit jednotlivé nanočástice, neprováděla jsem žádné statistické měření a vyloučila je z dalšího pozorování.

Na samém závěru testování nanočástic v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu jsem si vybrala zajímavou nanočástici, která se svou vrstevnatou strukturou liší od ostatních nanočástic. Quantum dots je složeno z jádra, které je tvořené kombinací prvků (II. a VI. nebo III. a V. skupiny) nejčastěji CdSe a obalu, který stabilizuje ZnS. Standardně se používá k imunoznačení v optické mikroskopii, protože je na něm navázána fluorescenční látka. Quantum dots je hůře viditelné v TEM JEOL 1010. Použila jsem QD, protože jsem předpokládala, že bude vykazovat v LVTEM 5 vyšší kontrast a bude tak

vhodnou volbou pro imunoznačení v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu. Také je o něm dobře známo, že má vysokou četnost (obr.34, 35).



**Obr.34.** Snímek nanočástic QD (10 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 150 K

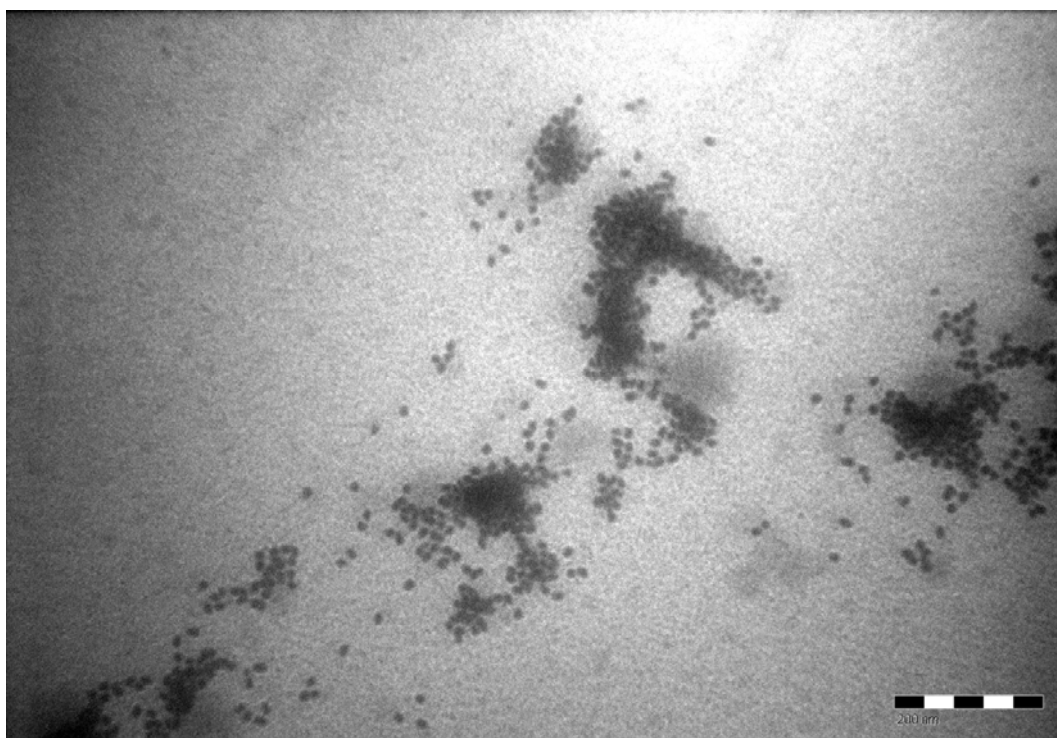


**Histogram č.5.** Velikost QD 10 nm v TEM JEOL 1010 (150 K)

<b>Průměr</b>	6,2	<b>Feret</b>	9,4
<b>Počet</b>	1000	<b>Počet</b>	1000
<b>Min</b>	4,3	<b>Min</b>	5,8
<b>Max</b>	10	<b>Max</b>	16,9
<b>Směrodatná odchylka</b>	1,2	<b>Směrodatná odchylka</b>	2

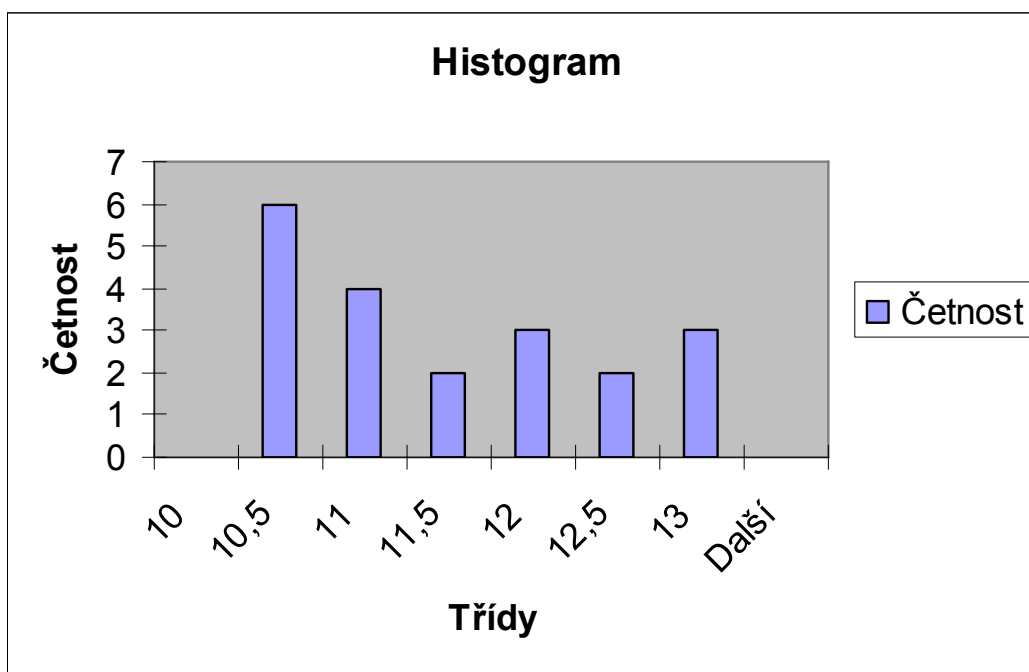
**Tabulka č.7.** Statistické vyhodnocení měření QD 10 nm v TEM JEOL 1010 (150 K)

V TEM JEOL 1010 se hodnota Feretova průměru výrazně liší od ekvivalentního průměru (tabulka č.7). Důvodem je, jak je zřejmé z obr. 34, že QD mají elipsoidní tvar. Hodnota Feretova průměru 9,4 – největší vzdálenost v ploše nanočástice se jeví jako velice dobrý výsledek.



**Obr.35.** Snímek nanočástic QD (10 nm) v LVTEM 5, zvětšení 145 K

V LVTEM 5 nanočástice QD měly zcela jiný tvar (obr.35). Nanočástice nebyly elipsoidní, ale vykazovaly kulatý tvar, což dokumentují i hodnoty naměřených průměrů – ekvivalentních i Feretova, které jsou stejné (tabulka č.8).



**Histogram č.6.** Velikost QD 10 nm v LVTEM 5 (145 K)

<b>Průměr</b>	11,2	<b>Feret</b>	11,2
<b>Počet</b>	20	<b>Počet</b>	20
<b>Min</b>	10	<b>Min</b>	9,8
<b>Max</b>	12,7	<b>Max</b>	13,4
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,8	<b>Směrodatná odchylka</b>	1

**Tabulka č.8.** Statistické vyhodnocení měření QD 10 nm v LVTEM (145 K)

Také jsem se pokusila zkoumat stabilitu nanočástic pod elektronovým svazkem v obou typech mikroskopu. Částice jsem vystavila působení elektronového svazku primárních urychlených elektronů o urychlovacím napětí 80 kV v TEM JEOL 1010 a o urychlovacím napětí 5 kV v LVTEM v 15ti minutových intervalech po dobu 2,5 hodiny. Při osvětlení nanočástic bylo velice těžké získat kvalitní snímek po 15. minutovém intervalu v LVTEM 5. Nepodařilo se mi zajistit, aby osvětlení vzorku primárními elektrony v LVTEM 5 byl v průběhu celého 15ti minutového intervalu stabilní. Z tohoto důvodu se nedalo porovnávat snímky pořízené v těchto intervalech. Mikroskop se před dalším získáním snímku musel znovu kvalitně seřadit a tím pádem porovnávat 15. minutové intervaly bylo

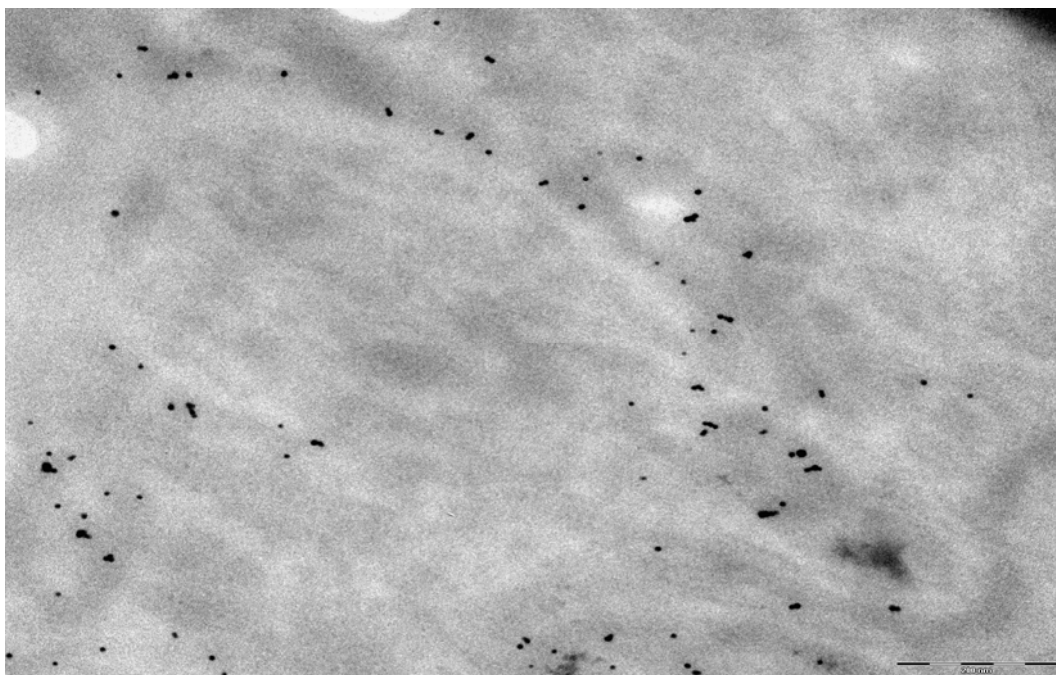
nepřesné, proto zde výsledky nebyly uvedeny. Statistické výsledky byly zatíženy příliš velkou chybou a nelze je použít.

3. Vybrat nanočástice, které mohou být použity jako markery v LVTEM 5 a pokusit se je konjugovat s vhodnou sekundární protilátkou.

Na základě detekce nanočástic v LVTEM 5 a statistických výsledků jsem usoudila, že nanočástice Au byly nejlepší, a proto jsem je použila v dalším kroku této práce. Vybrala jsem pro konjugaci s proteinem jako ideální marker nanočástice Au. Roztok nanočástic Au o velikosti 5 nm byl čerstvě vyrobený v laboratoři Dr. Šloufa. Využila jsem elektrostatické konjugace podle protokolu uvedeného v předchozí části (viz. kapitola 4.3.) Kvalitu konjugátu jsem posoudila imunozačením. Byl použit nejen vlastní konjugát protein A-Au 5 nm, ale pro kontrolu i komerčně vyrobený konjugát QD-Rabbit IgG.

4. Na vhodném modelovém systému provést imunozačení.

Slinné žlázy byly vypreparovány a podle standardního postupu byl připraven preparát pro transmisní elektronovou mikroskopii. Vzorky byly připraveny do podoby 20 nm řezů Nejprve jsem preparát zkontrolovala v TEM JEOL 1010, zda došlo k navázání připraveného konjugátu na primární protilátku.



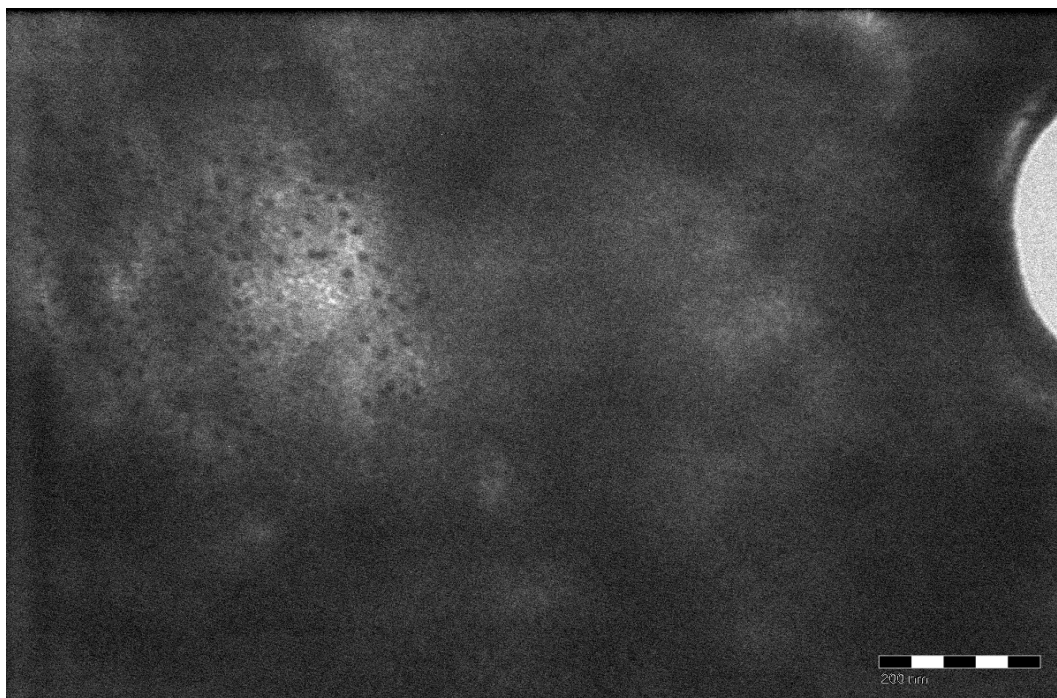
**Obr. 36.** Snímek imunoznačeného vzorku slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* – (konjugát protein A-Au 5 nm) v TEM JEOL 1010, zvětšení 100 K



**Obr. 37.** Snímek imunoznačeného vzorku slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* - konjugát (QD-Rabbit IgG) v TEM JEOL 1010, zvětšení 40 K



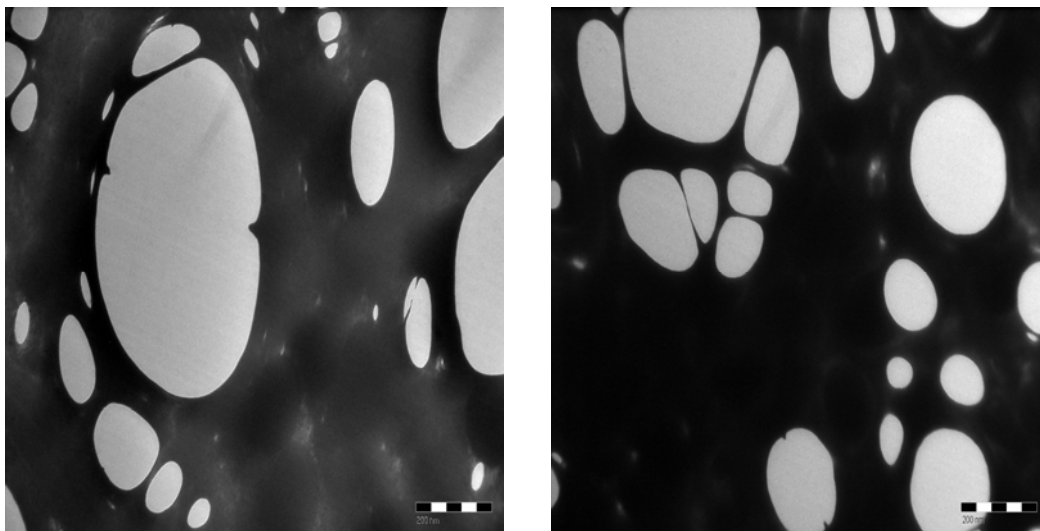
Obrázky č. 36,37 z TEM JEOL 1010 dokládají, že podle předpokladu se Au nanočástice vyskytují v oblasti Acinu III. typu, což vysvětluje, že se zde vyskytují značené glykany (N-acetyl glukosamin, N-acetyl neuraminová kyselina). 20 nm řezy byly velice potrhane. I při nejšetrnější manipulaci se sítkami s 20 nm řezy při provádění imunolokalizace se nepodařilo překonat technické potíže. Proto se mi z LVTEM 5 podařilo získat pouze jeden snímek (obr.38).



**Obr. 38.** Snímek imunoznačeného vzorku slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* - konjugát (QD-Rabbit IgG) v LVTEM 5, zvětšení 145 K

Tato fotografie je naprostý unikát. Připravit řezy o tloušťce 20 nm z Lowicrylového bločku bylo velmi obtížné a byly potrhane už před procesem imunoznačení, jak dokládá snímek č. 39, kde je vidět struktura 20 nm řezu v LVTEM 5 ještě před imunoznačením.





**Obr. 39.** Snímek 20 nm ultratenkého řezu v LVTEM 5 (zvětšení 25 K, 50 K)

## 6. Diskuze

Ve 21. století, kdy člověk udělal mnoho významných pokroků v oblasti biologie, medicíny a diagnostické techniky, se nabízí otázka, zda se v některých odvětvích dá dostat ještě někam dál. Před lety tato otázka vyvstala právě pro elektronovou mikroskopii, která se zdála být zmírajícím oborem, který už všechny své potenciály a možnosti vyčerpal. Časem se však ukázalo, že zatracovat elektronovou mikroskopii je předčasné. Technický a materiální pokrok umožnil dále zdokonalovat elektronové mikroskopy po konstrukční a funkční stránce. Také nové metodiky přípravy vzorků dovolily elektronové mikroskopii posunout se zase o něco dál [26,3].

Hlavním úkolem této práce bylo detekovat vybrané nanočástice nejprve v transmisním elektronovém mikroskopu pracujícím při urychlovacím napětí 80 kV. Poté se pokusit o vizualizaci těchto nanočástic v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu pracujícím při urychlovacím napětí 5 kV a měřit jejich velikost. Nízkonapěťový elektronový mikroskop ještě nikdo nikdy nepoužil k detekci a měření nanočástic, proto nemám žádný odkaz na literaturu a nemohu tedy výsledky porovnat s jinými autory. Jedná se o pilotní studii. Detekce nanočástic v LVTEM 5 byla úspěšná, proto jsem provedla statistické vyhodnocení velikosti průměru nanočástic (Au 10 nm, Pd 10 nm, QD 10 nm) při zvětšení 150 tisíc krát (dále 150K). V TEM JEOL 1010 je použito ke statistickému zpracování 1000 nanočástic, v LVTEM 5 jsou statistické hodnoty měřeny z 20 nanočástic. Nepodařilo se mi získat dostatečné množství snímků při stejných pracovních podmínkách mikroskopu. Z tohoto důvodu bylo porovnáváno jen 20 nanočástic, protože mikroskop se rozostřoval a měnila se jeho proudová intenzita. Měření byla provedena při stejném zvětšení, protože se změnou zvětšení se při digitálním záznamu mění počet pixelů vyznačujících plochu nanočástice. Z toho důvodu je žádoucí, aby plochu nanočástice o dané velikosti pokrýval přibližně stejný počet pixelů, aby chyba při prahování byla konstantní a srovnatelná pro všechny snímky.

Výrobce udává, že rozlišovací schopnost LVTEM 5 se pohybuje v rozmezí od 2 – 2,5 nm [30], což by pro detekci většiny nanočástic, které jsem měla k dispozici, mělo stačit. Abych měla jistotu, že uvidím hledané nanočástice, použila jsem k detekci nejprve nanočástice s větší velikostí (15 nm) a postupně jsem při testování nanočástic jejich velikost snižovala. U Au nanočástic jsem se dostala až na velikost 6 nm. Nejprve jsem

použila kovové nanočástice komerčního Au (15, 10, 6 nm), protože je známo, že komerčně vyrobené Au nemá tak velké rozpětí ve velikosti nanočástic. V TEM JEOL 1010 byly naměřené hodnoty ekvivalentního průměru 6,8 a Feretova průměru 7,9 menší než v LVTEM 5 – 9,7 pro oba průměry. Na druhou stranu se hodnota Feretova průměru projevila v TEM JEOL 1010 jako větší, což odpovídá tomu, že nanočástice Au 10 nm nebyly úplně sférické. Velká hodnota směrodatné odchylky 1,2 nasvědčuje občasnému překryvu dvou nanočástic, které jsou pak programem vyhodnocena jako jedna nanočástice. Snímek, na kterém se provádělo statistické vyhodnocování mohl být zatížen astigmatickou vadou. Pomocí LVTEM 5 byly stanovené průměry blíže těm očekávaným, ale zásadním problémem byl nízký počet nanočástic pro statistické vyhodnocování. Statistické výsledky proto mohou být zatíženy velkou chybou.

Dále jsem pracovala s Pd o velikosti 10 nm. Přesto, že je Pd kov s nižším atomovým číslem než Au, snímky Pd 10 nm vykazují dostatečný kontrast srovnatelný s Au 10 nm. Překvapila mě přesnost hodnot ekvivalentního průměru 8,5 a Feretova průměru 9,9 u nanočástic Pd naměřené v TEM JEOL 1010. Nanočástice byly laboratorně vyráběny, a proto se rozptyl velikosti nanočástic očekával větší. Hodnoty obou průměrů byly lepší než u komerčně vyrobených Au 10 nm nanočástic měřených v TEM JEOL 1010. Komerčně vyrobené Au nanočástice byly dodávány s tím, že distribuce velikosti je poměrně úzká, přesto měření velikosti ukázalo, že směrodatná odchylka je zhruba stejně velká jako pro Pd 1,2.

Ačkoliv je Ag lehký kov, nanočástice Ag o velikosti 10 nm byly po celou dobu testování a měření stabilní. Nanočástice Ag byly vyráběny laboratorně. Jak vyplývá z obr.26, rozptyl průměru nanočástic Ag byl velký, proto nebylo dále statisticky zpracováno.

Quantum dots se liší svou vrstevnatou strukturou od ostatních doposud testovaných nanočástic. Standardně se kvantové tečky používají k imunoznačení v optické mikroskopii, protože je na něm navázaná fluorescenční látka. Quantum dots je hůře viditelné v TEM JEOL 1010. Předpokládala jsem, že v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu bude vykazovat vyšší kontrast, což jsem potvrdila pořízenými snímky. Výsledky z TEM JEOL 1010 byly velice dobré. Hodnota Feretova průměru 9,4 vyšla vyšší než hodnota ekvivalentního průměru 6,2, což dokazuje, že nanočástice QD jsou tyčky a nejsou tedy sférické. V LVTEM 5 nanočástice QD měly zcela jiný tvar. Nanočástice nebyly elipsoidní, ale vykazovaly kulatý tvar, což dokumentují i hodnoty 11,2 obou naměřených průměrů. Výsledky jsou velice zajímavé, ale vysvětlení této skutečnosti je prozatím nejasné. Jedna

z možných příčin je, že v mikroskopu pracujícím o urychlovacím napětí 80 kV je vidět pouze jádro nanočástice QD (tvořené kombinací prvku II. a VI. nebo III. a V. skupiny) CdSe, kdežto v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu pracujícím o urychlovacím napětí 5 kV je zřejmě vidět i obal této nanočástice tvořený ZnS.

Abych mohla zmíněné nanočástice vůbec detekovat, musela jsem si pro ně připravit podložní blány. Z literatury od D.G.Robinsona jsem převzala metodu nepřímého napařování. Popisuje přípravu uhlíkových blan nepřímým napařováním atomů uhlíku. Zkusila jsem i metodu přímého napařování, ale po negativní zkušenosti jsem ji hned v začátku zavrhlá. Na výše uvedených snímcích (obr. 18,19) je struktura uhlíkové blány značně proměnná. Je to dáno rozdílným způsobem napaření uhlíku na povrch slídy. Kvalitnějšího homogenního povrchu blány jsem dosáhla metodou nepřímého napařování, kdy povrch slídy byl zastíněn před přímým dopadem atomů uhlíku. Během procesu napařování dochází k odpařování atomů uhlíku z elektrod, avšak kromě toho dochází také k uvolňování větších částic uhlíku, které na povrchu blan vytváří nehomogenní oblasti. Zastíněním slídy se zabrání přímému napaření těchto nestejně velkých částic uhlíku na blánu, protože vlivem své váhy se neodrazí od mikroskopického sklíčka tak snadno, jako mnohem lehčí atomy. Uhlíková blána připravená přímým napařováním vykazovala vlastní strukturu v LVTEM 5 a díky ní byly nanočástice na jejím povrchu hůře rozeznatelné, což bylo pro mou práci nežádoucí. Uhlíková blána připravená nepřímým napařováním byla nejvhodnější podložní fólií pro vizualizaci nanočástic v LVTEM 5.

Na základě vizualizace použitých nanočástic v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu a statistických výpočtů jsem jako nejlepší marker pro metodu imunoznačení v LVTEM 5 zvolila Au. Díky jeho elektrondenznosti je dobře rozlišitelné v TEM i LVTEM. Provedla jsem elektrostatickou konjugaci Au s proteinem A. Protein A se pevně váže k širokému okruhu imunoglobulinových tříd, proto jsem ho zvolila jako vhodnou protilátku k detekci antigenů. Jako další konjugát jsem zvolila komerčně vyrobené QD navázané s králičím IgG, pro případ, že by elektrostatická konjugace nebyla úspěšná.

Imunoznačila jsem na slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*, které sálo 72 hodin. Vzorek byl připraven podle kapitoly 4.2..Byl zalit do pryskyřice Lowicryl K4M, protože tento druh pryskyřice zachovává antigenicitu preparátu. Vzorek slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* o tloušťce 20 nm jsem imunoznačila standardním způsobem. Jako sekundární protilátku jsem použila mnou vyrobený konjugát Au 5 nm – protein A a komerčně vyrobený konjugát QD – rabbit IgG. Výsledky imunoznačení jsem nejprve pro kontrolu prohlédla v transmisním elektronovém mikroskopu. Zjistila jsem, že vzorek je

velice potrhaný. I přesto jsem se pokusila o prohlédnutí tohoto vzorku v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu. Podařilo se mi zhotovit pouze jeden snímek, což je naprostý unikát.

Došla jsem k závěru, že i když lze krájet 20 nm ultratenké řezy standardně a reprodukovatelně ze vzorků zalitých do epoxidových pryskyřic, zůstává příprava takto tenkých řezů kritickým krokem. Připravený řez je i před imunoznačením značně potrhaný. I přes velice šetrnou práci se nepodařilo řez zachovat do takové míry, aby snímek z nízkonapětového elektronového mikroskopu byl kvalitní.

Nízkonapětový elektronový mikroskop je velmi citlivý na tloušťku preparátu a na rozdíl od transmisního elektronového mikroskopu odhalí i nepatrné výkyvy v tloušťce preparátu. Tento problém by mohlo odstranit použití oscilujícího diamantového nože s řeznou hranou 45° a 35°. Tato technika se současně chová šetrně k řezanému materiálu tím, že minimalizuje jeho deformaci [15]. Dalším nedostatkem ultratenkých 20 nm řezů je nedostatečné prosycení preparátu pryskyřicí, které se projevuje dírami v řezu. Nepříjemným důsledkem je potom trhání řezu při jeho expozici primárními elektrony.

Nízkovoltový elektronový mikroskop má řadu vlastností, které by ho mohly předurčovat pro aplikaci v biologii a medicíně, ale i v polymerní chemii [36]. Představuje unikátní přístroj, který vzhledem k příznivé ceně je schopen v lékařském a biologickém výzkumu nahradit vysokonapětový TEM JEOL 1010. K jeho plnému využití je třeba dopracovat a optimalizovat postupy přípravy biologických materiálů a zvyknout si na odlišný ultrastrukturální vzhled studovaných preparátů. Jsou ve své podstatě bližší nativnímu stavu preparátu. Jak prokázal profesor Delong i Nebesářová a kol. ve svých pracech, LVTEM vykazuje dostatečný kontrast při pozorování biologických preparátů i bez použití negativních barviv. Do značné míry by mohl být používán i ke studiu nanočástic v některých oborech nanotechnologie. Prokázala jsem, že mikroskop má dostatečnou rozlišovací schopnost k detekci a měření velikosti nanočástic, které jsou v něm viditelné a stabilní. Příprava preparátů je navíc velmi jednoduchá, pokud jsou k dispozici uhlíkové blány s tloušťkou do 5 nm připravené nepřímým naprašováním. Suspenze nanočástic se jednoduše nakápnou na síťky potažené uhlíkovou membránou. Přebytek suspenze se po adsorpci nanočástic na povrch uhlíkové membrány odsaje a síťky se po uschnutí mohou bez kontrastování přímo prohlížet v LVTEM 5. Je pravděpodobné, že v blízké budoucnosti LVTEM 5 přinese nové možnosti např. v rozvoji nanotechnologie.

Experimentální práce potvrdila, že příprava 20 nm řezů z metakrylátových pryskyřic je problematická, reakce mohla být silná, ale nepodařilo se mi ji na potrhaných

řezech prokázat. Nepodařilo se překonat technické problémy při přípravě preparátů, a proto cestu v rozvoji imunometod na elektron-mikroskopické úrovni LVTEM 5 vidím zatím jako neschůdnou. V budoucnu je třeba ještě pracovat na přípravě preparátu a podložních blan.

Pokrok ve výzkumu nanočástic a rozvoji nanotechnologie je měřen v dekadách, ne v rocích.

## 7. Závěry

- LVTEM 5 je vhodným nástrojem pro měření a vizualizaci nanočástic. Mikroskop prokázal dostatečnou rozlišovací schopnost. Potvrdila jsem, že je možné jej použít k testování a měření nanočástic od 5 nm.
- Z hlediska chování pod elektronovým svazkem v LVTEM 5 se jako nejlepší markery jeví nanočástice Au a Pd. Na základě těchto výsledků bylo Au o velikosti 5 nm použito ke konjugaci s proteinem A a tento konjugát použit k imunoznačení.
- Imunolokalizace byla provedena na 20 nm řezu modelového systému slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*. Vzhledem ke špatné kvalitě řezů výsledky imunoznačení nebyly dobré. Při současných technologických možnostech přípravy 20 nm řezů není zatím možné tuto metodu standardně využívat k imunoznačení a je třeba najít jiný způsob přípravy těchto řezů.

## 8. Seznam použité literatury

- [1] - <http://www.paru.cas.cz/lem/cs/index> (14.2.2011)
- [2] - Elaissari A. Colloidal Nanoparticles in Biotechnology. John Wiley & Sons, Inc. 2008
- [3] - <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nanotechnologie> (13.1.2011)
- [4] - Jan Příklad, Ivona Svobodová, Věra Hezinová, Marcela Lišková, Denisa Maderánková, Karel Klepárník, František Foret (2009): Využití nanočástic ve fluorescenční mikroskopii a Ramanově spektrometrii
- [5] - Klementová Š. (2005): Obecná a fyzikální chemie pro biology, skriptá PŘF JČU
- [6] - John Lucocq (1988): Particulate Markers for Immunoelectron Microscopy
- [7] - Williams D. B., Carter C. B. (1996): Transmission elektron microscopy, Plenum press. New York
- [8] - Kalina T. (1981): Základy elektronové mikroskopie, Univerzita Karlova
- [9] - Nebesářová J.(2001): Elektronová mikroskopie pro biology <http://www.paru.cas.cz/lem/book/> (25.1.2011)
- [10] - Nízkovoltový elektronový mikroskop pro biologii a polymerní chemii (2001)
- [11] - Mráz, P., Polónyi (1988): Metódy elektronovej mikroskopie živočišných tkanív, Slovenská Akadémie Vied, Bratislava
- [12] - Proser, V. a kol. (1989): Experimentální metody biofyziky. Academia Praha
- [13] - Dykstra, J. M., Reuss, L. E. (2003): Biological electronmicroscopy (Theory, Techniques, and Troubleshooting), Kluwer Academic/Plenum Publisher, Second edition
- [14] - Kiernan J.A. (2000): Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*
- [15] - Studer D., Gnaegi H. (2000): Minimal compression of ultrathin sections with use of an oscillating diamond knife. *Journal of Microscopy* 197; 94-100
- [16] - DeLong A., Hladil K., Kolařík V.(1994): A low voltage transmission elektron microscope. *Eur. Micr. And Anal*; 27: 13-15
- [17] - Nebesářová J., Vancová M.(2006): Preparation of different biological objects for low voltage elektron microscope. *IMC16, Sapporo, Japan, 2006*; 500



- [18] - Štěpán P. (2005): Nízkovoltový prozařovací elektronový mikroskop. Vědecko-technický časopis 2: 52
- [19] - DeLong, A.(1992): Low voltage TEM, *Electron Microscopy, Volume 1. EUREM 92, Granada, Spain, 1992,*
- [20] - Wilska, A. P. (1960): Low voltage electron microscope, 1960
- [21] - DeLong, A. (2005): Jemná mechanika a optika, 2005, 02
- [22] - DeLong, A.(2005): Elektronový mikroskop dnes a zítra, Československý časopis pro fyziku, 2005
- [23] - Karnovsky, M.J., (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27
- [24] - Webster, P., (2007) Microwave-assisted processing and embedding for transmission electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 369
- [25] - Hagler, H.K., (2007) Ultramicrotomy for biological elektron microscopy. In: KUO J. (ed), electron microscopy: methods and protocols, 2nd edition, Humana Press, Totowa, New Jersey
- [26] - Vše, co chcete vědět o elektronové mikroskopii, FEI Company 030-MS 00111, 03/02
- [27] - DeLong, A., Coufalová, E., Štěpán, P. (2002): Low voltage STEM, ICEM-15 Durban 2002
- [28] - DeLong instruments s.r.o., Návod k LVTEM 5
- [29] - Hermanson T.G.(2008): Bioconjugate techniques, Elsevier
- [30] - Servisní manuál (1981): JEOL JEE 4C, Japan electron Optics Laboratory co.
- [31] - Nebesářová J., Vancová M. (2002): The first experience with biologic specimen preparation for LVTEM, In: Microscopy 2002. Proceedings of the 2nd Annual Meeting of the Czechoslovak Microscopy Society (Ed. L. Frank), Graphical Brno, Czech Republic, 35-36
- [32] - Nebesářová J., Vancová M. (2004): Proceedings of 13th EMC, I.403, Antverp 2004
- [33] - Nebesářová et al. (2005): Proceedings of Microscopy conference 2005, 6th Dreiländertagung, Davos, Switzerland, p.99, 2005
- [34] - Starý V., Nebesářová J. (2007): Contrast of carbon in low-voltage electron microscopy-Monte-Carlo simulation. *El. Micro.and Anal.* 2007: 1-4.
- [35] - Lawrence F. Drummy, et al. (2004): Low voltage electron microscopy of polymer and organic molecular thin films. *Ultramicro.* 2004; 99: 247-256.

- [36] - Lednický F., Coufalová E., Hromádková J., et al.(1999): Proc. 6th European Symposium on Polymer Blends, Mainz 1999, p. 61
- [37] - Nebesářová J., Vancová M. (2004): Proceedings of 13th EMC 2004, Antverp, Belgium, L403, 2004
- [38] - Nebesářová J., Vancová M., Svinenská S. (2009): Proceedings of EMC 2009, Graz-Austria, 159, 2009
- [39] - Vancová M., Nebesářová J., Vaněček J., et al.(2006): LP-58 Observation of Flagella and Viruses in LVTEM.
- [40] - Hayat M. A., Miller S. E. Negative staining. NY : *McGraw-Hill*. 1990.
- [41] - Coufalová E., DeLong A. (2000): Low voltage elektron microscope II.- Applications, Proc. EUREM 12, I183, 2000
- [42] - Robards A. W., Wilson A. J. (1993): Procedures in electron microscopy. John Wiley & Sons., 1993. 4:6.7-4:6.32.
- [43] - Robinson D.G., Ehlers U., Herken R., et al. (1987): Methods of Preparation for Electron Microscopy. Springer-Verlag. 1987; 16-19,76-80
- [44] - <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/grids/gilder.aspx> (15.3.2011)
- [45] - <http://www.grid-tech.com/product.htm> (8.4.2011)
- [46] - Kopecký J. (2005): Imunologie pro biology I., skripta PŘF JČU
- [47] - Griffiths G. (1993): Fine Structure Immunocytochemistry. Springer Verlag, 1993
- [48] - Faulk W., Taylor G. (1979): An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*.
- [49] - Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Interface Sci.* 1986
- [50] - Hermann R., Schwarz H., Müller M: High precision immunoscanning electron microscopy using Fab fragments coupled to ultra-small colloidal gold. *Journal of structural biology*. 1991
- [51] - Garcia B., Salomé M., Lemelle L., Bridot J., Gillet P., Perriat P., Roux S., Tillement O.(2005): Sulfur K edge XANES study of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles: dihydrolipoic acid is bound by both sulfur ends. *Chem. Commun.* 2005
- [52] - Roux S., Garcia B., Bridot J., Salomé M., Marquette Ch., Lemelle L., Gillet O., Blum L., Perriat P., Tillement O. (2005): Synthesis,

Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol. Langmuir. 2005

- [53] - Vancová M., Nebesářová J., Šlouf M.(2010): Application of new metal nanoparticles for multiple labelling in electron microscopy
- [54] - Preparation of stable Pd nanoparticles with tunable size and their conjugation with antibodies
- [55] - Palladium preparation and catalytic properties of particles of uniform size
- [56] - Data sheet AURION, AURION Conventional gold reagens, Immuno Gold Reagents & Accessories Custom Labelling
- [57] - <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html> (10.4.2011)
- [58] - Vancová M., Zacharová K., Grubhoffer L., Nebesářová J. (2006): Ultrastructure and lectin characterization of granular solivary cells from *Ixodes ricinus* females
- [59] - [http://www.stahuj.centrum.cz/grafika\\_a\\_design/tvorba\\_grafiky/bitmapove\\_editory/imagej/](http://www.stahuj.centrum.cz/grafika_a_design/tvorba_grafiky/bitmapove_editory/imagej/) (17.4.2011)
- [60] - <http://e7news.akamonitor.cz/2010/12/imagej-vynikajici-program-pro-upravu.html> (26.4.2011)
- [61] - Verkleij A. J., Leunissen J. L. M. (1989): Immuno-gold labeling in cell biology