

ÚSTAV



PŘÍSTROJOVÉ TECHNIKY

Akademie věd České republiky



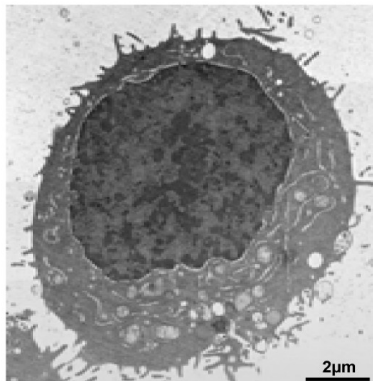
# Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) a její aplikace v biologii

Vladislav Krzyžánek

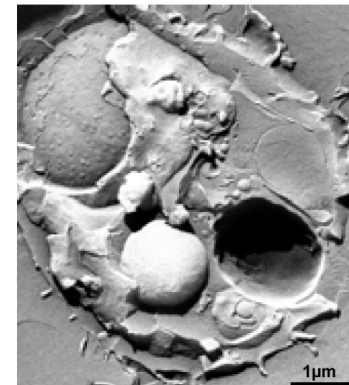
- Tato přednáška, která byla plánována na 23. 4. 2020, se kvůli pandemii neuskuteční. Samotná prezentace bude snad dostatečně srozumitelná i bez mluveného slova.
- K prezentaci přikládám doplňující poznámky, kde můžete najít i další zajímavé odkazy či podrobnější vysvětlení dané problematiky.

- 1. Princip SEM**
2. Příprava biologických vzorků pro SEM
3. Vybrané aplikace SEM
4. Speciální techniky SEM

Prozařovací elektronový mikroskop (TEM)  
mikroskop (SEM)

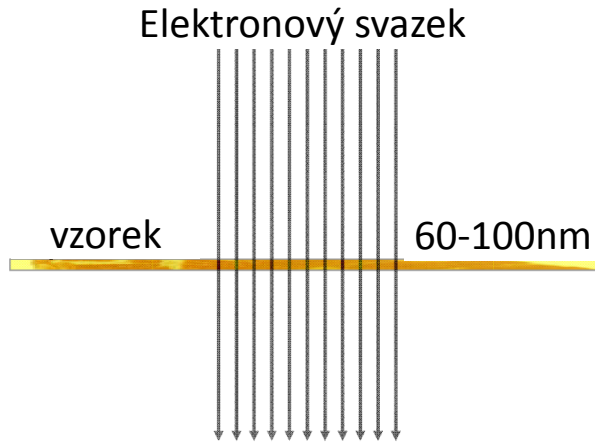


Rastrovací elektronový

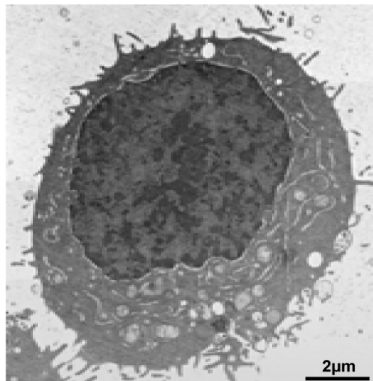




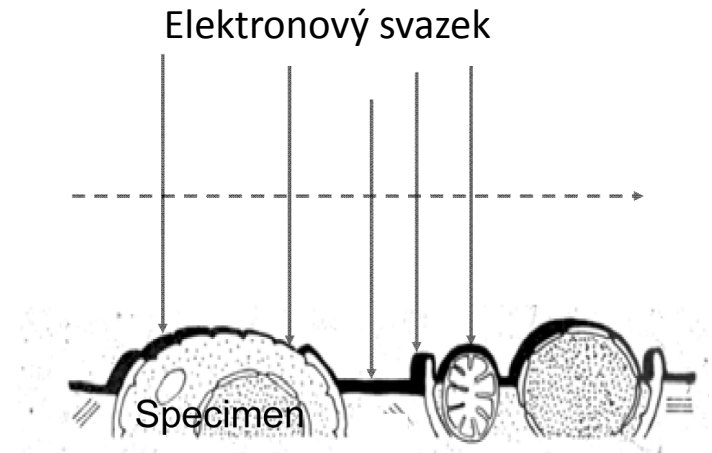
## Prozařovací elektronový mikroskop (TEM) mikroskop (SEM)



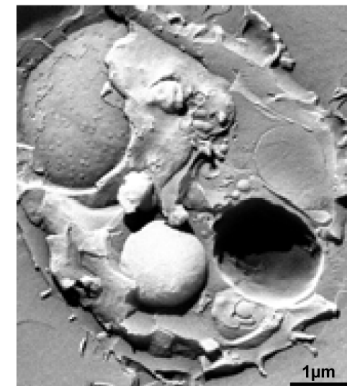
Projekce



## Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

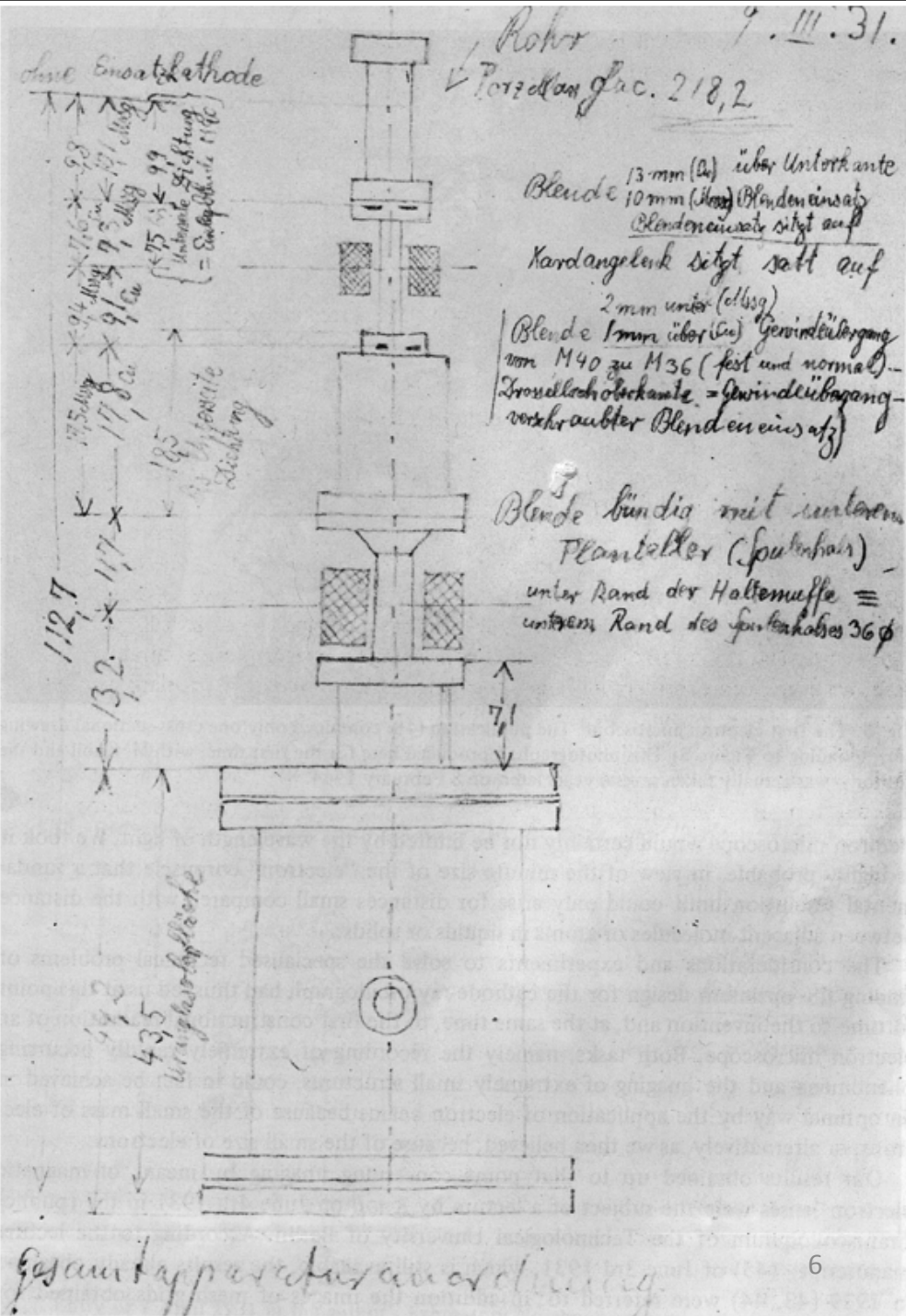
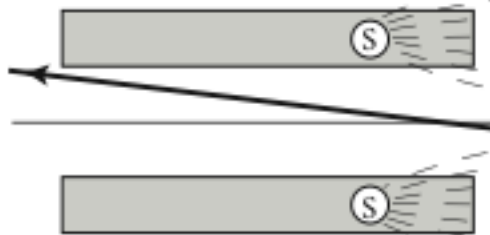


Povrch



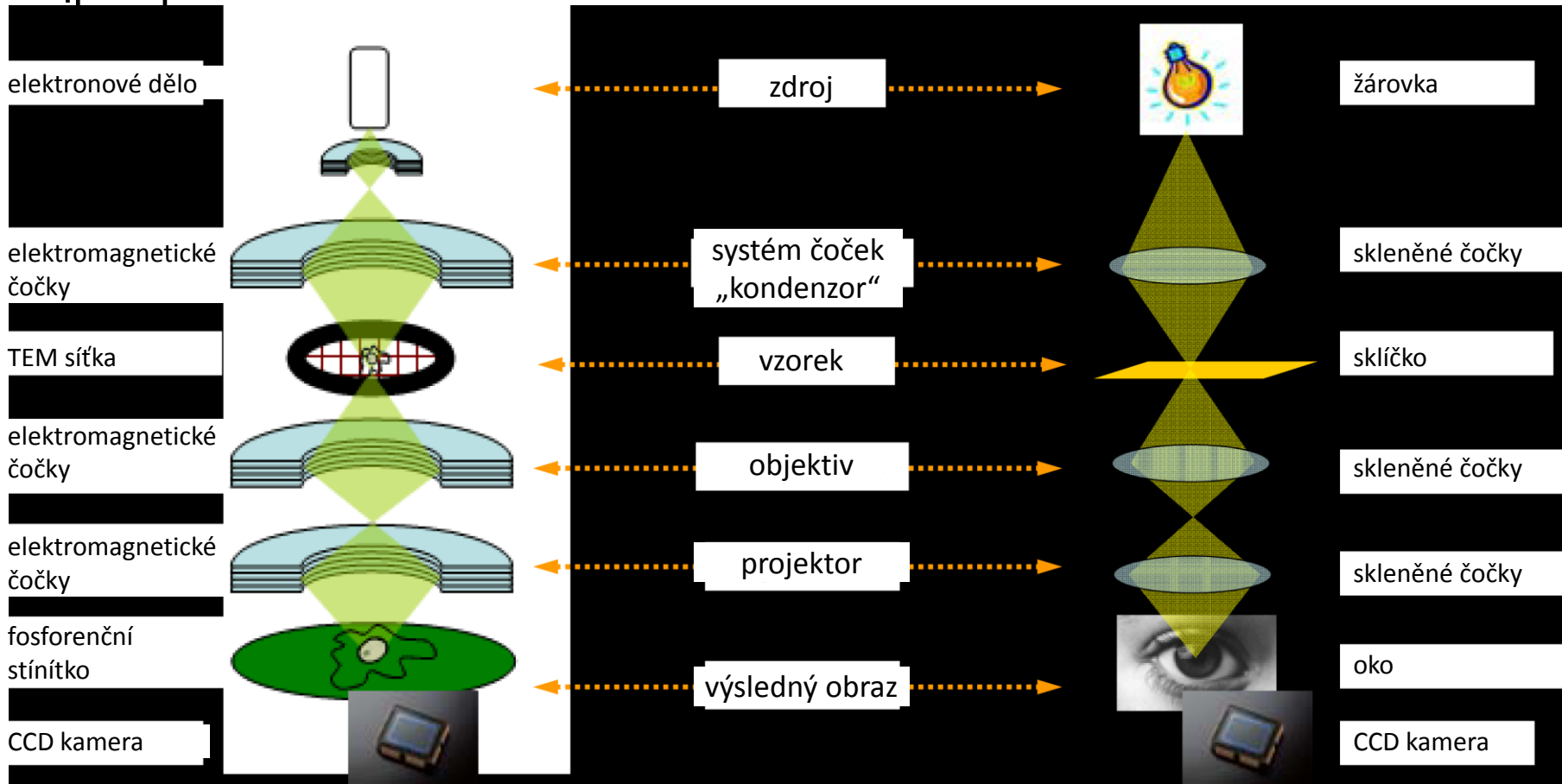
- 1897: John Joseph Thomson –
- 1924: Louis de Broglie zavedl v pohybuující se částice má vlnové
- 1926: Heisenberg
- elektronický
- 1931: Max Knoll (TEM)
- 1934: L. Reimer (TEM: sun)
- 1937: Manfred von Ardenne (SEM)
- 1939: Siegfried Knoll (SEM)
- 1964: (Cambridge Instruments)
- 1986: Ernst Ruska získal Nobelovu cenu za rastrovací tunel
- H. Rohrerem za rastrovací tunel
- 1990: Harald Rose popsal hexamer
- 2003: Aberačně korigovaný HRTEM
- ...

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$



## prozařovací elektronový mikroskop (TEM)

## světelný



## rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

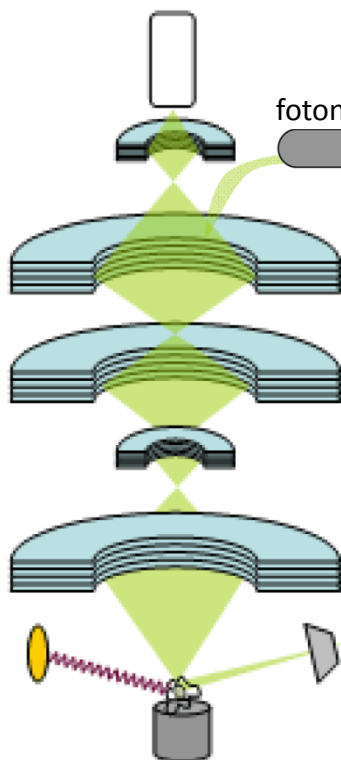
elektronové dělo

elektromagnetické  
čočky

elektromagnetické  
čočky

elektromagnetické  
čočky

detektory  
elektronů,  
světla



fotonásobič

zdroj

detektor

systém čoček  
„kondenzor“

rastrovací systém

objektiv

vzorek

## konfok. rastr. laser.

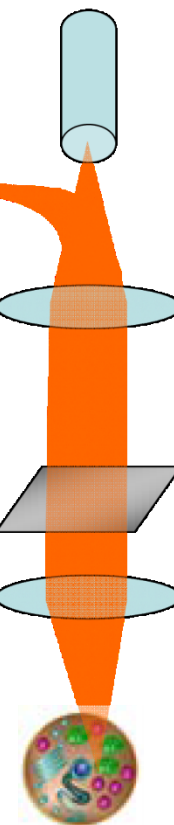
laser

skleněné  
čočky

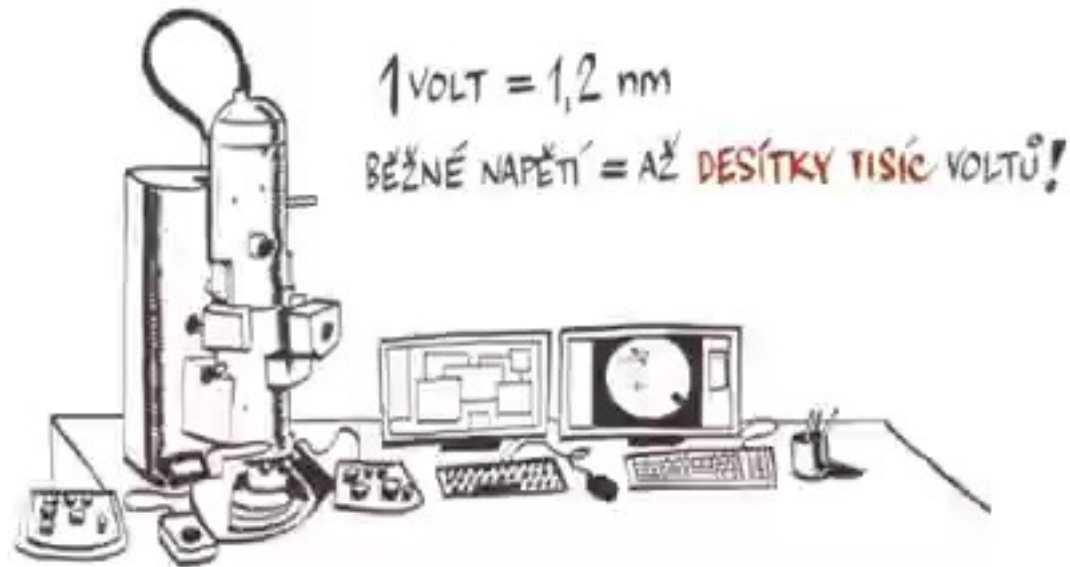
zrcadlo

skleněné  
čočky

fotonásobič

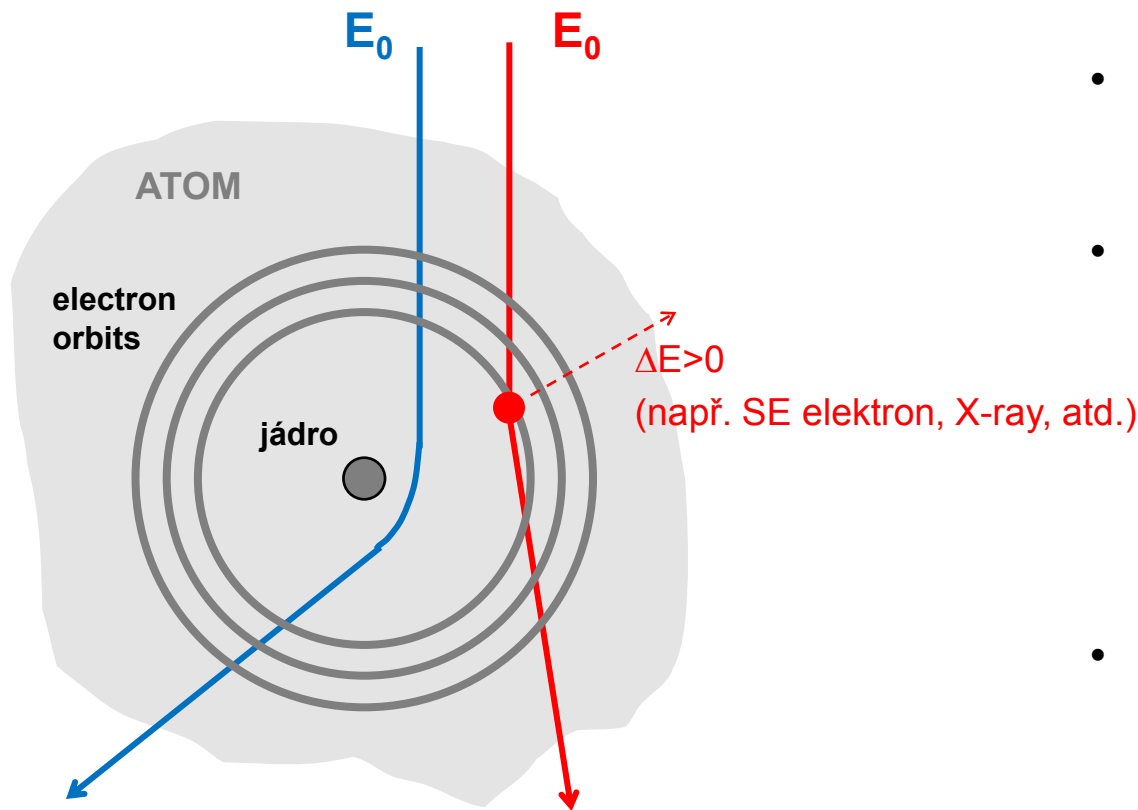


## ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP



- Část videa z cyklu [NEZkreslená věda](#), na němž se podíleli kolegové z ÚPT. Plná verze zde: <https://youtu.be/2vYquoVWLqQ>
- Nyní prosím „trpaslíky“ zaměňte za elektrony!

# Jak elektrony interagují s látkou?



**Pružný rozptyl**

$$E_{el} = E_0$$

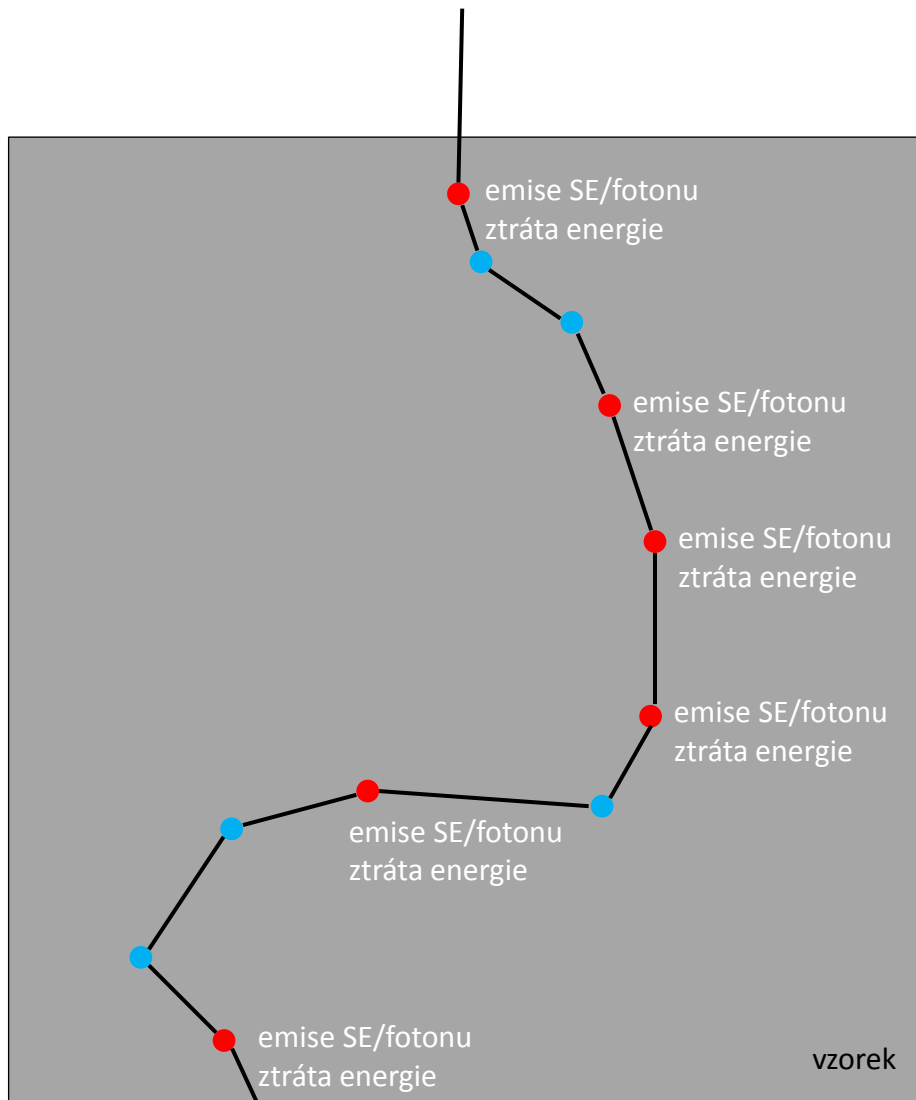
**Nepružný rozptyl**

$$E_{in} = E_0 - \Delta E$$

$$\langle \Theta_{el} \rangle \gg \langle \Theta_{in} \rangle$$

- Nerozptýlené elektrony, tj. žádná kolize (není znázorněno na obrázku)
- Pružný rozptyl na jádrech atomu látky
  - primární elektron mění jen směr pohybu o úhel  $\Theta_{el}$
  - často zpětně odražené elektrony
- Nepružný rozptyl
  - primární elektron mění mírně směr pohybu o úhel  $\Theta_{in}$  a ztrácí část energie  $\Delta E$
  - emise záření, sekundárního elektronu, ...

# Obvykle dochází k násobnému rozptylu!

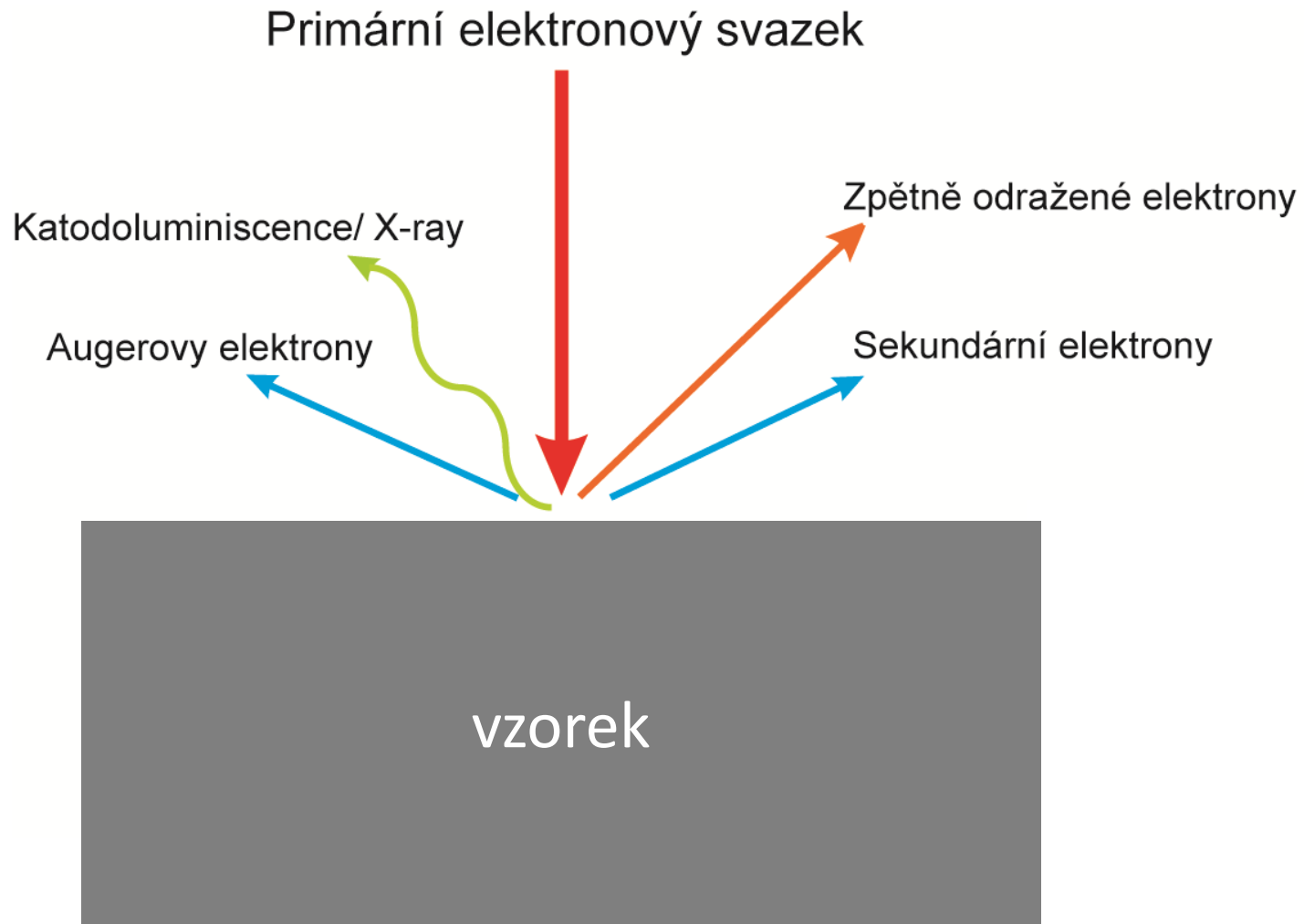


- Příklad dráhy elektronu vstupujícího do vzorku
- V závislosti na materiálu vzorku a energii elektronu dochází k rozptylu
- Primární elektron se může „odrazit“ zpět nad vzorek (zpětně odražený)
- Sekundární elektrony (SE) mají velmi malou energii a tudíž jen ty u povrchu se dostanou ze vzorku ven
- Vlivem ztráty energie během nepružných rozptylů primární elektron může být ve vzorku absorbován (tzv. elektronový dolet)

● nepružný rozptyl

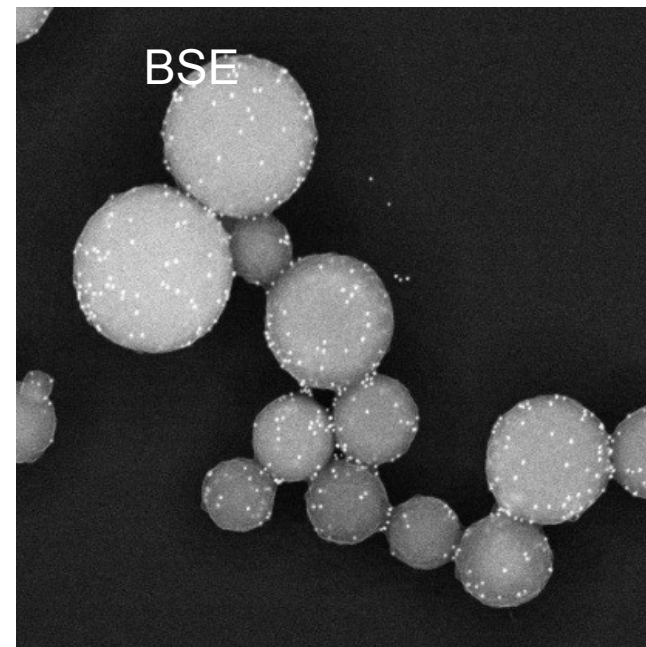
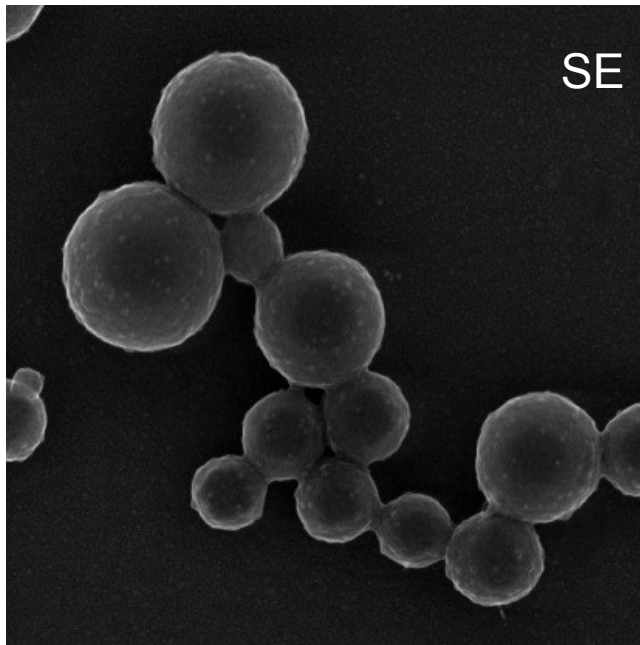
● pružný rozptyl







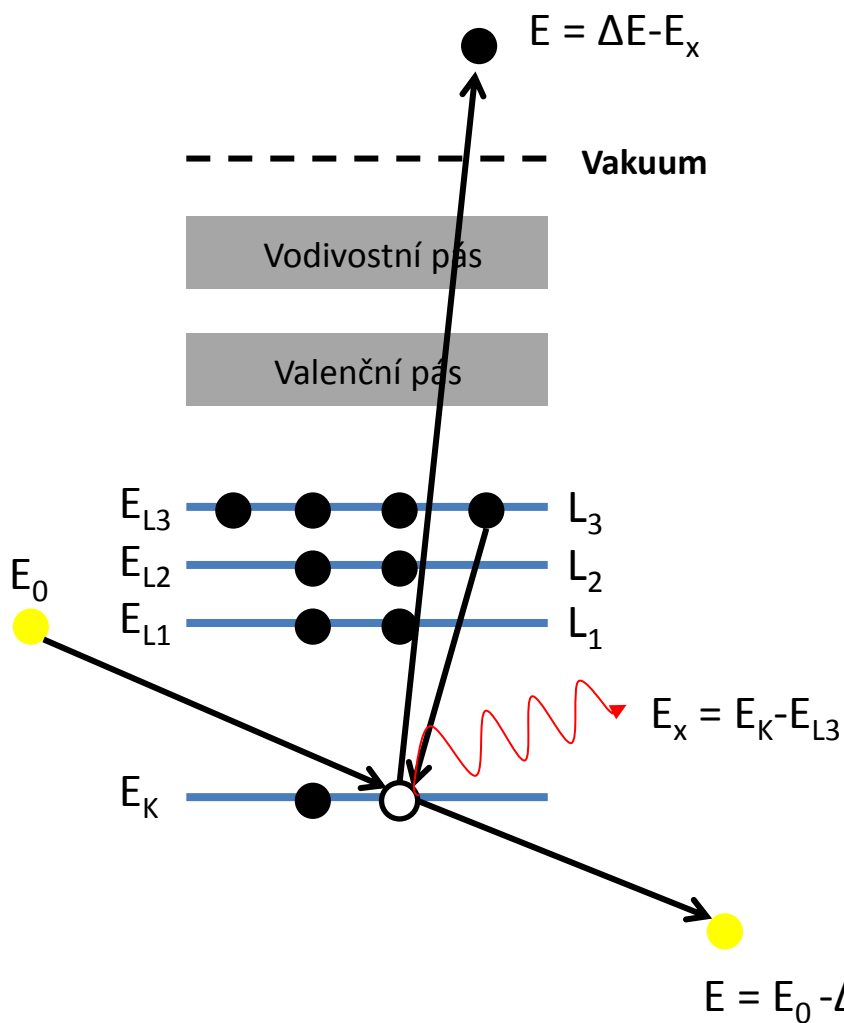
- Imunoznačení povrchových proteinů (kaučukové nanočástice izolované z *Taraxacu*)



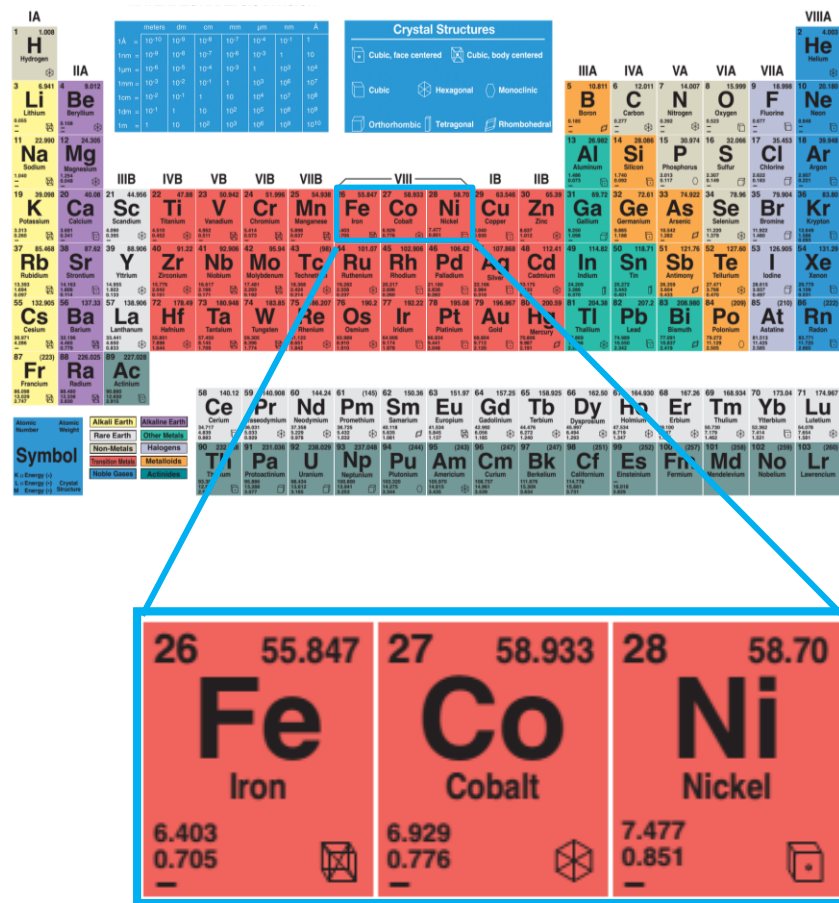
SE= sekundární e., informace o povrchu vzorku

BSE= zpětně odražené e., díky cílenému imunoznačení (nanočástice zlata vázané na imunoglobulin) možnost identifikace specifických částí vzorků-> Au poskytuje jiný signál než C

## Charakteristické rentgenové záření

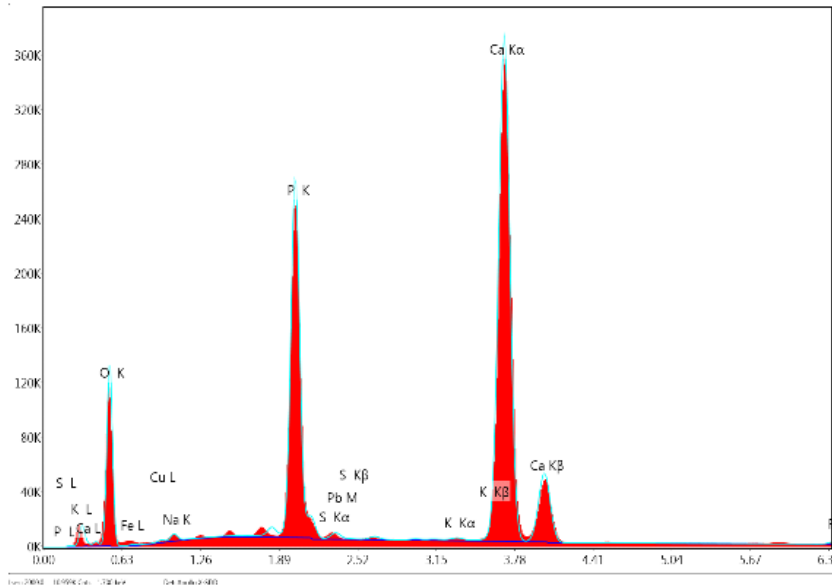


## Hodnoty pro jednotlivé prvky jsou známe



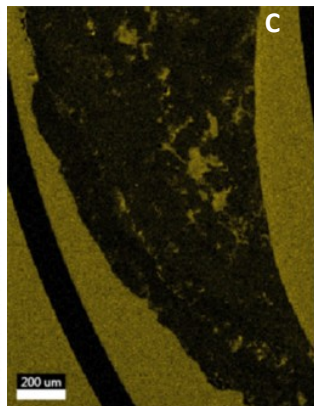
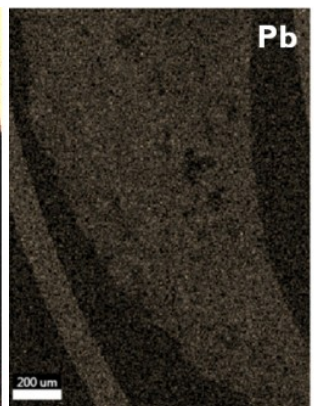
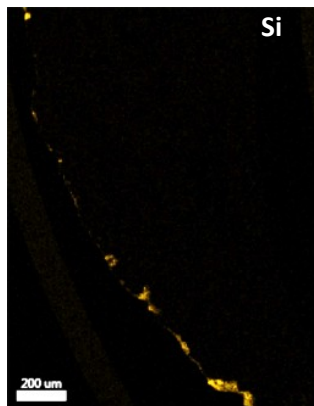
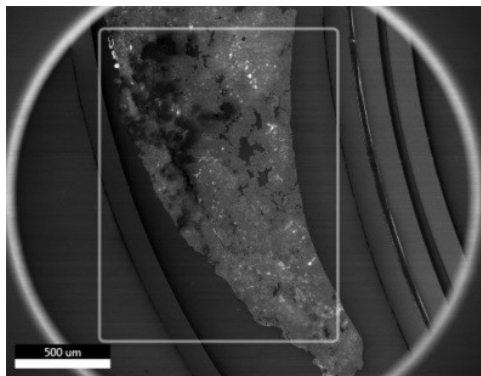
Energie je charakteristická pro daný prvek

Spektrum zaznamenané z oblasti nebo bodu = všechny prvky v jednom místě



Element	Wt %	Atomic %	Error %	Net Int.	Net Error %
O K	42.04	63.00	9.71	368.04	0.13
Na K	0.60	0.63	9.20	15.80	1.28
P K	15.20	11.76	2.79	1119.15	0.08
S K	0.06	0.04	10.32	3.98	7.24
Pb M	0.57	0.07	5.27	17.70	2.23
K K	0.13	0.08	7.62	8.86	5.97
Ca K	39.54	23.65	1.53	2026.68	0.05
Fe K	1.44	0.62	2.70	33.46	1.04
Cu K	0.42	0.16	6.01	6.04	4.37

Barevná reprezentace vybraných prvků ve vzorku = jeden prvek na všech místech



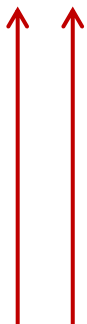
## Povrch vzorku

- Sekundární elektrony

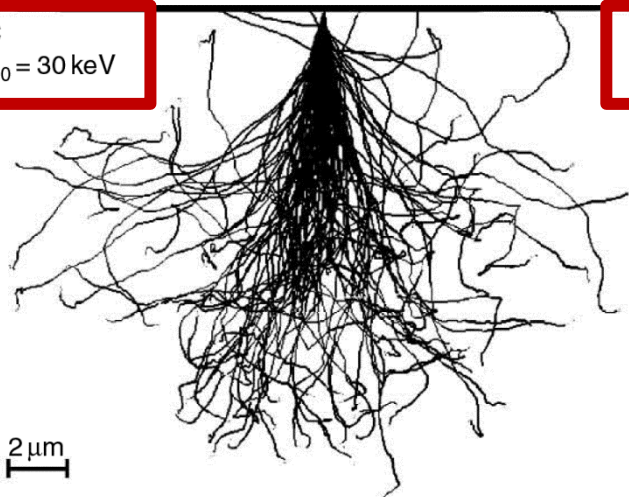
## Složení vzorku

- Zpětně odražené elektrony
- Augerovy elektrony
- Katodoluminiscence
- Charakteristické rentgenové záření

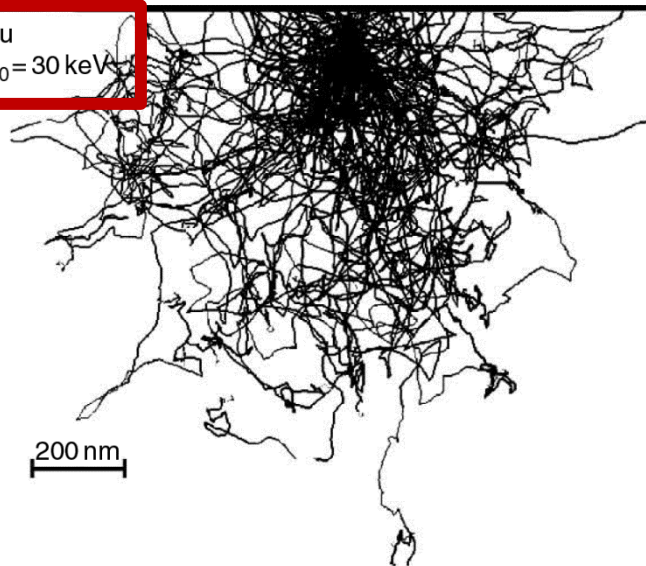
Interakční objem  
Energie elektronů



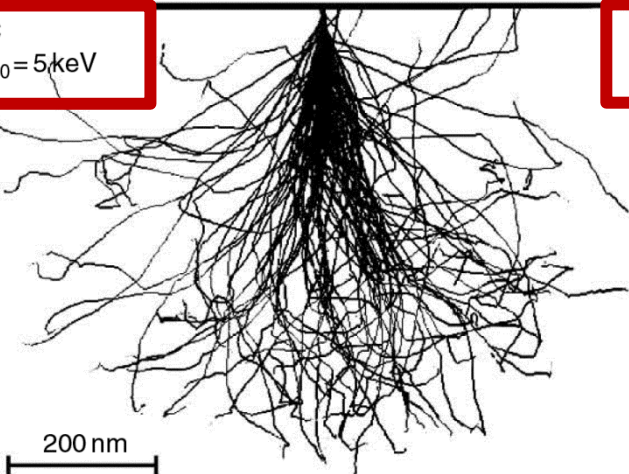
C  
 $E_0 = 30 \text{ keV}$



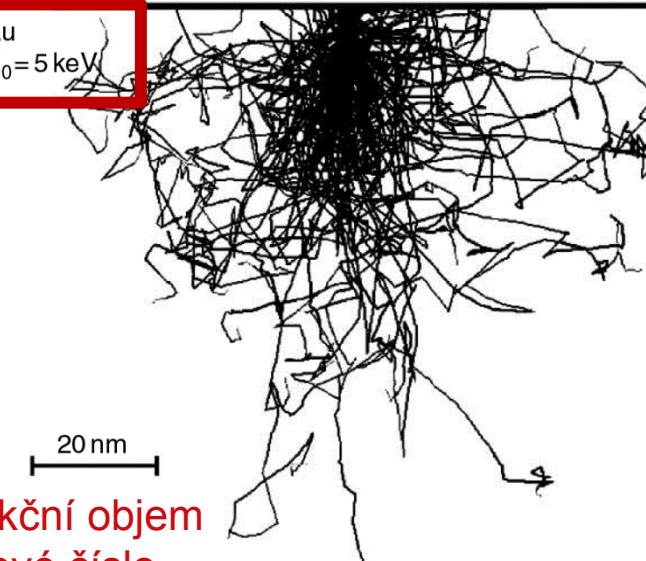
Au  
 $E_0 = 30 \text{ keV}$



C  
 $E_0 = 5 \text{ keV}$



Au  
 $E_0 = 5 \text{ keV}$

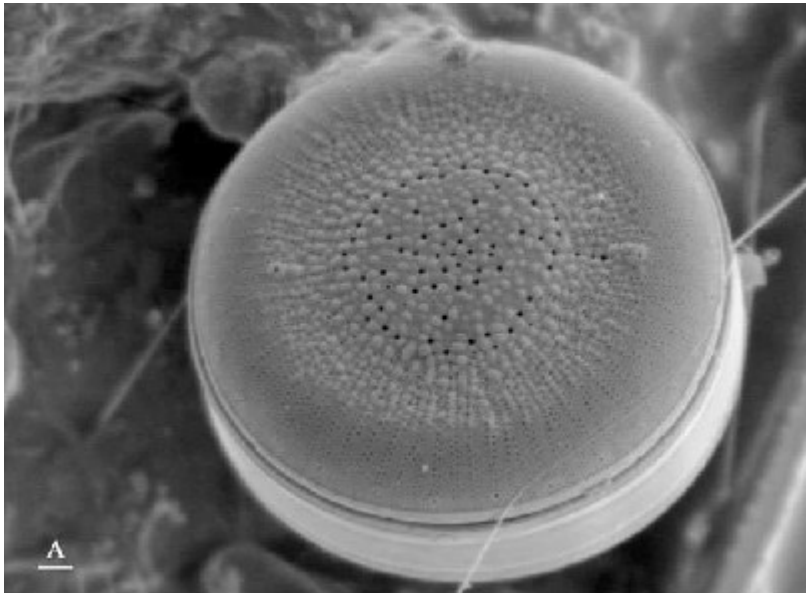


← Interakční objem  
→ Atomové číslo

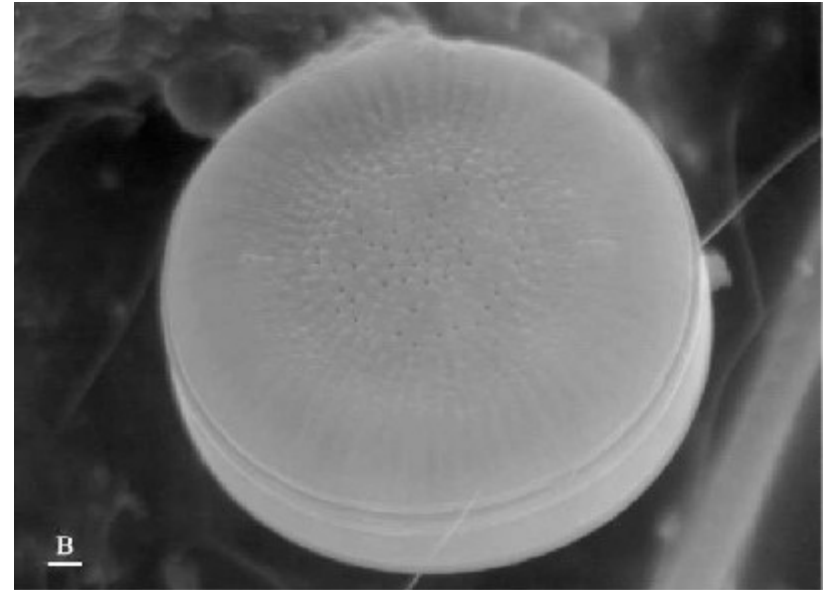


- Rozsivky (jednobuněčné fotosyntetizující organismy s dvojdílnou křemičitou schránkou, hnědé řasy)

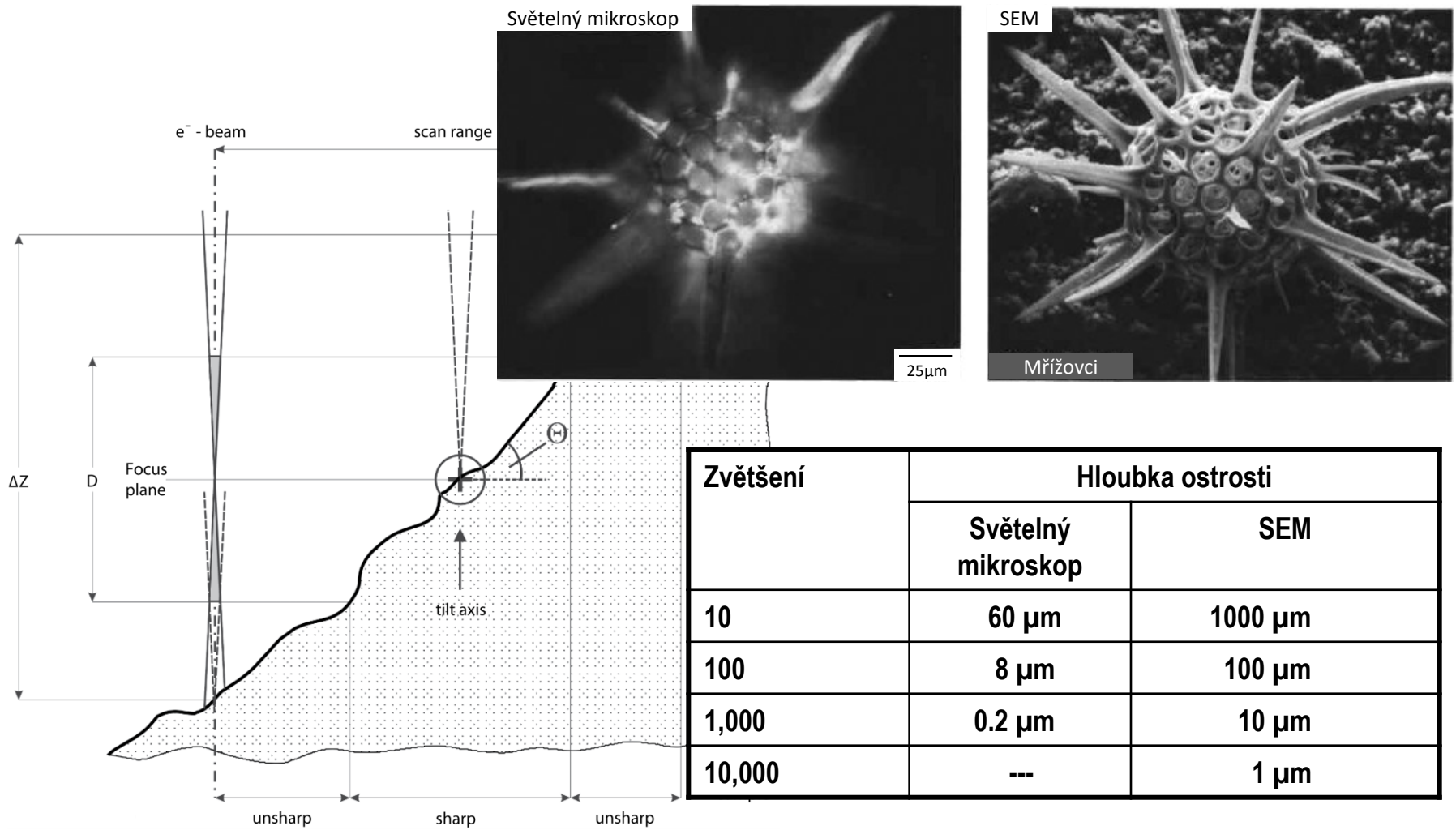
5 kV



20 kV



Měřítka: 1  $\mu$ m



1. Princip SEM
- 2. Příprava biologických vzorků pro SEM**
3. Vybrané aplikace SEM
4. Speciální techniky SEM



Čerstvý vzorek



Vzorek vysušený na vzduchu



„Chemická“ příprava

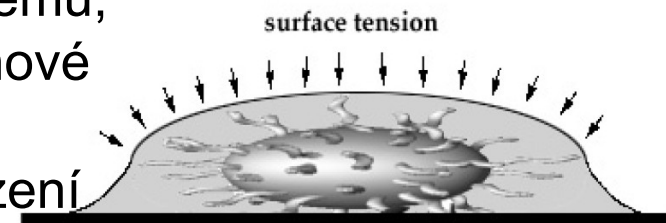
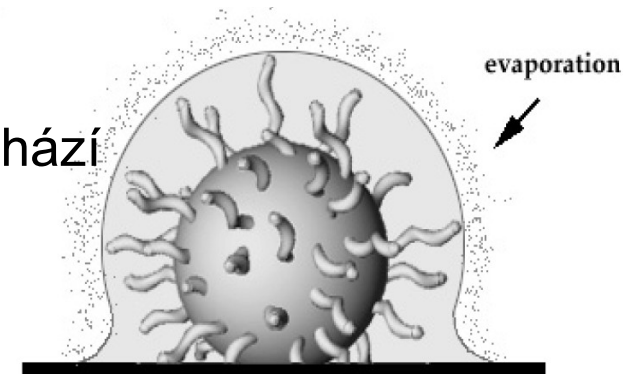


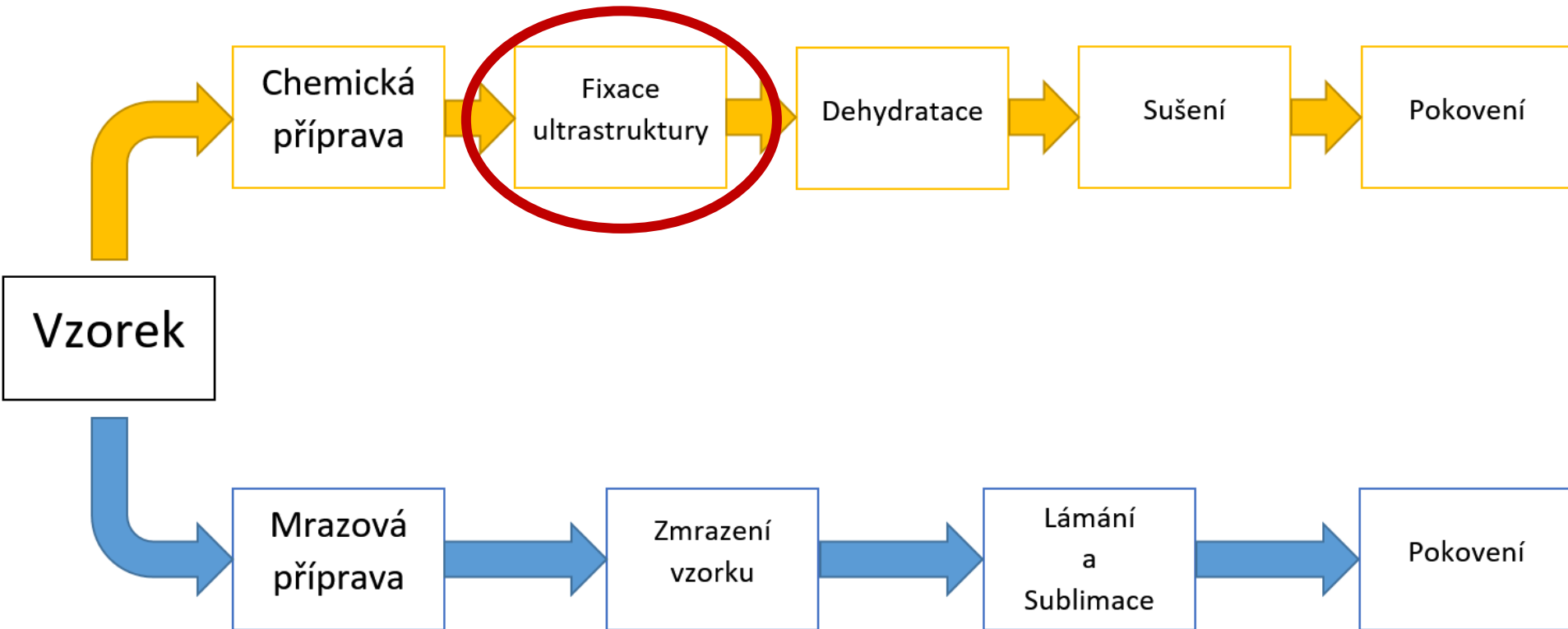
„Kryo“ příprava



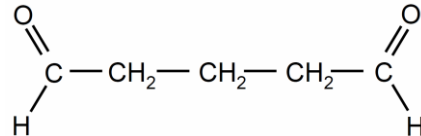
Dva hlavní problémy biologických vzorků pro jejich pozorování v SEM:

- **jsou nevodivé** (nedostatečně odvádí náboj)
  - Řešení: pokovení vzorku, použití nižší energie primárních elektronů, vyššího tlaku v komoře vzorku
- **obsahují vodu** (vložením vzorku do vakua dochází k intenzivnímu odpařování těkavých složek)
  - malý obsah těkavých složek (změny vzorku nemusí být pozorovány)
  - velký obsah těkavých složek (změny objemu, reliéfu povrchu, zborcení původní povrchové struktury)
  - Řešení: speciální příprava vzorku, zmrazení vzorku, 100% vlhkost v komoře mikroskopu

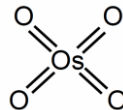




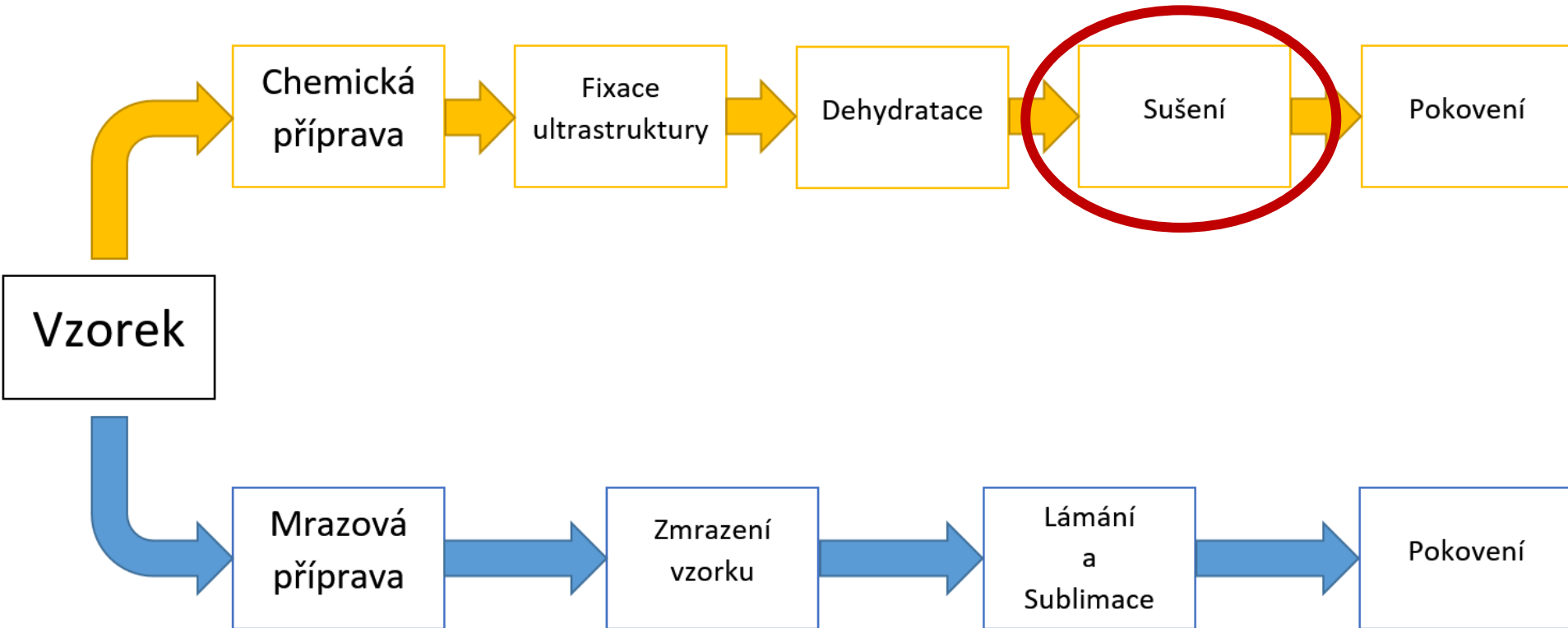
- Aldehydy: Glutaraldehyd (1-4%)



- obsahuje dvě aldehydické skupiny, díky kterým je schopen se zároveň vázat ke dvěma funkčním skupinám a tak vytvářet můstky, např. mezi dvěma bílkovinnými molekulami
  - reaguje převážně s peptidy a bílkovinami
- Oxid osmičelý (1%)

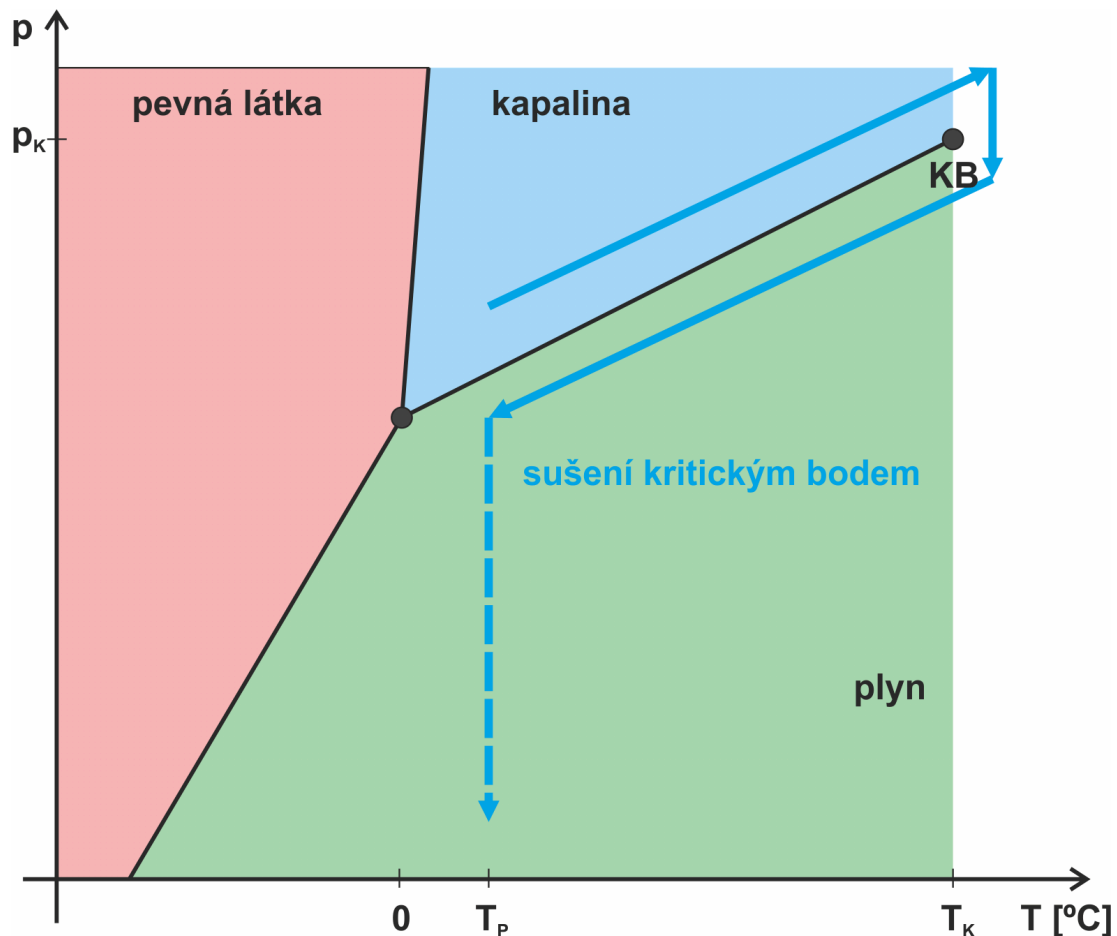


- reaguje s  $\alpha$ -aminokyselinami, s dvojnými vazbami olefinových uhlovodíků a mastných kyselin
- fixuje lipidy, membrány
- zpravidla se používá jako sekundární fixační činidlo



## Sušení vzorku metodou kritického bodu

- V KB mizí fázové rozhraní => struktura vzorku není při sušení poškozena povrchovým napětím kapaliny
- Nutnost dehydratace etanolovou nebo acetonovou řadou
- Nahrazení organického rozpouštědla kapalným CO<sub>2</sub>
- Postupné zvyšování teploty v komoře až do kritického bodu => Nulové povrchové napětí
- Převodění CO<sub>2</sub> na plyn => vysušený vzorek



	$T_{\text{kritická}}$	$p_{\text{kritický}}$
voda	374°C	218 bar
oxid uhličitý	31.5°C	73 bar

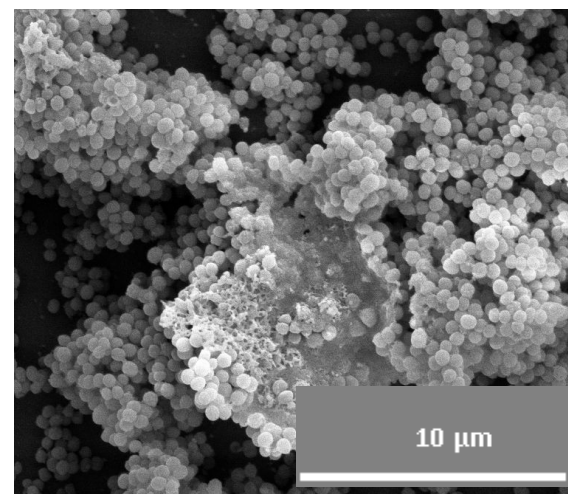
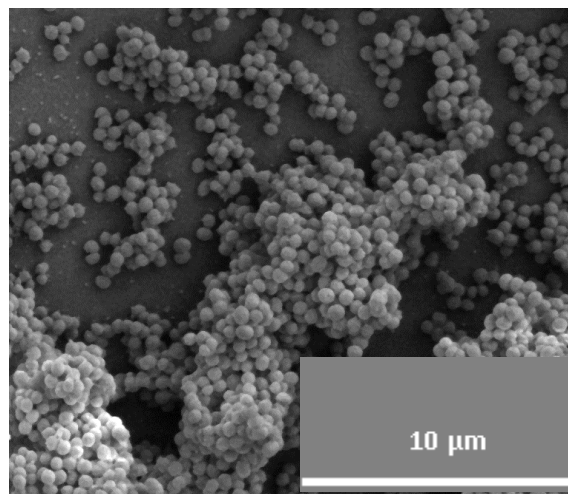
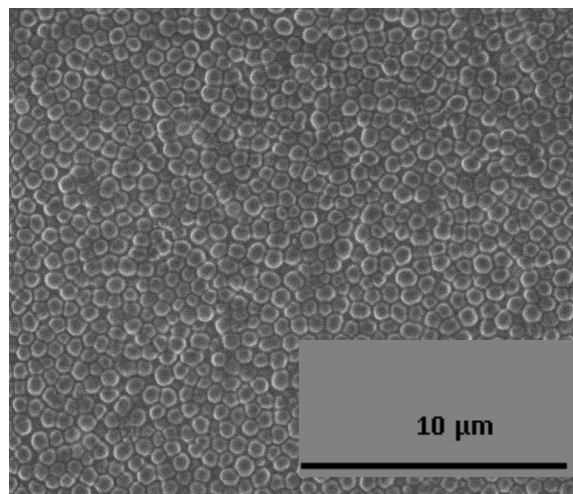


sušení na vzduchu

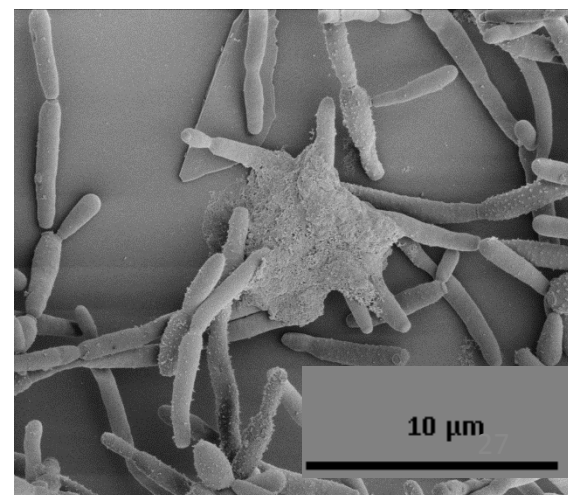
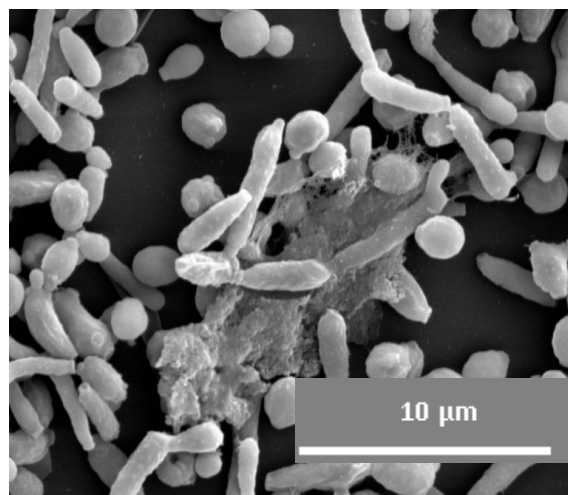
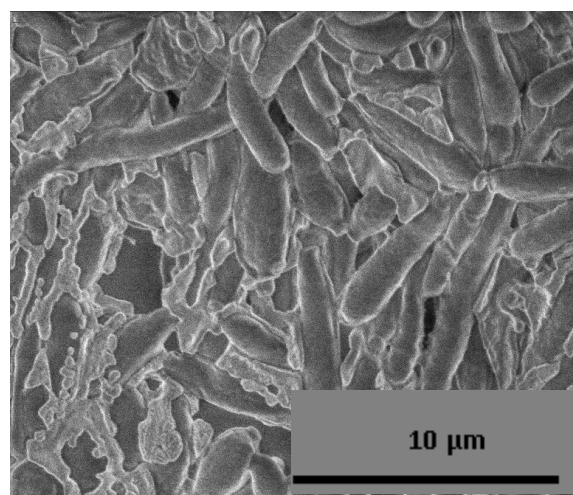
sušení pomocí kritického bodu

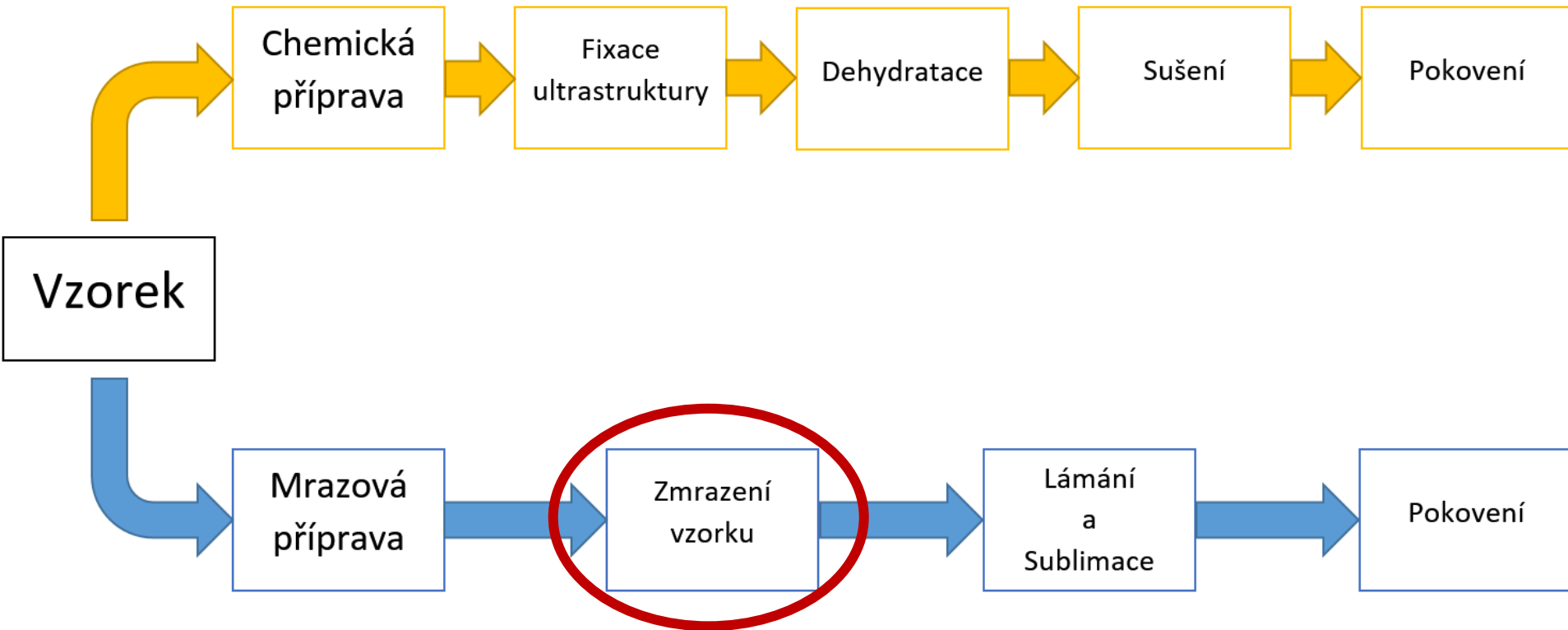
sušení v HMDS  
(hexamethyldisilazane),  
kapalině s nízkým  
povrchovým napětím

*Staphylococcus epidermidis*



*Candida parapsilosis*

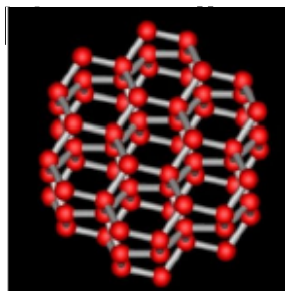






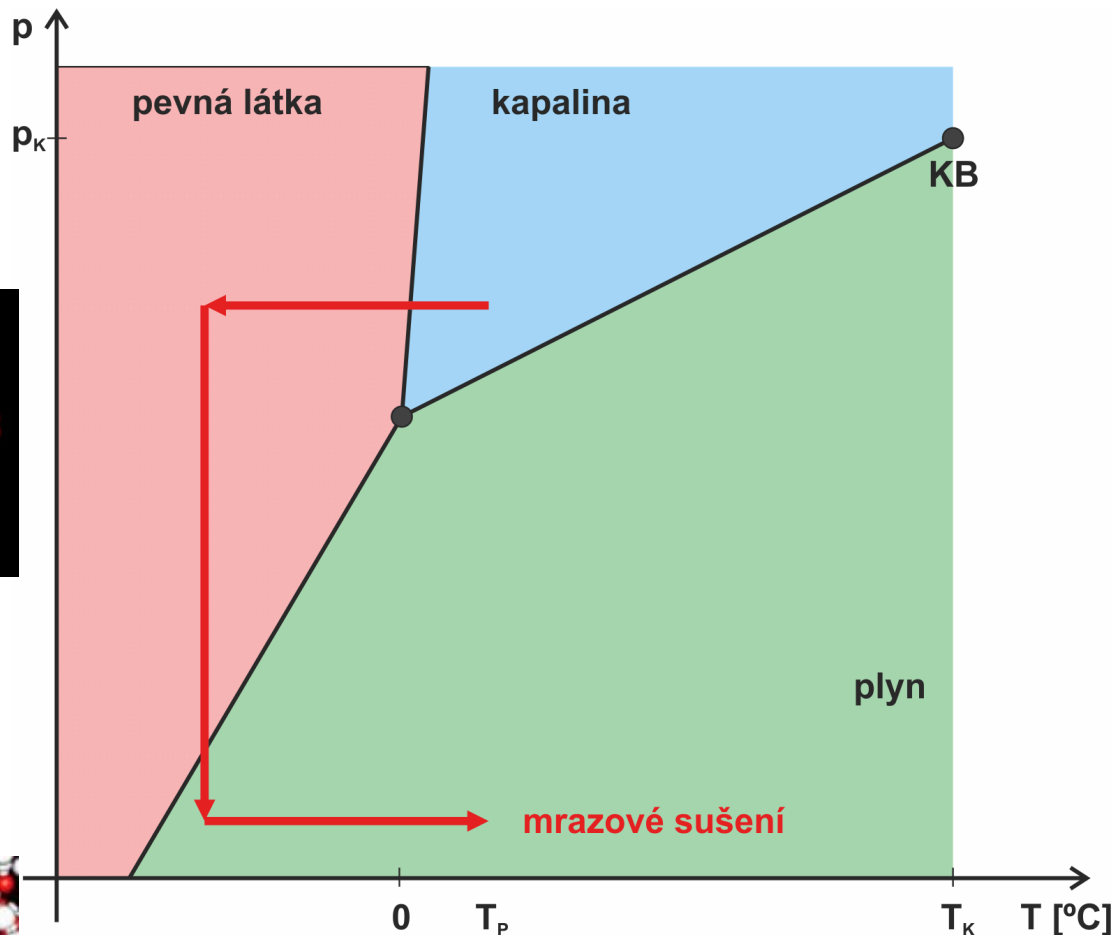
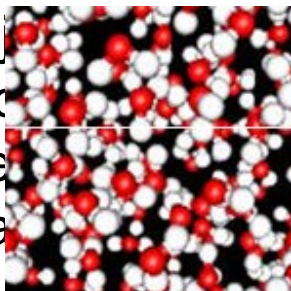
## Mrazové metody (cryo)

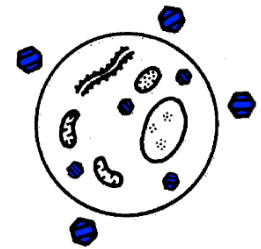
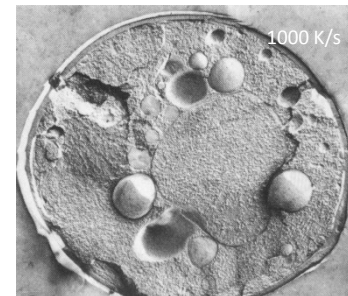
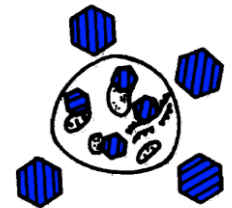
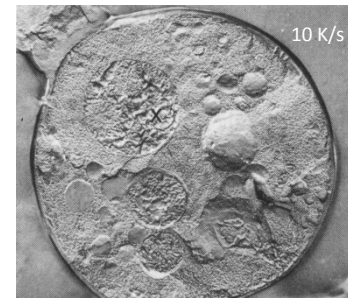
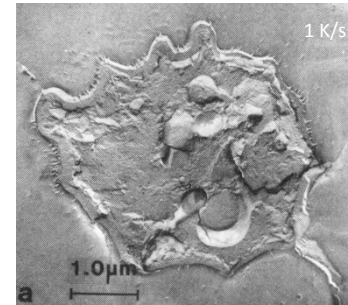
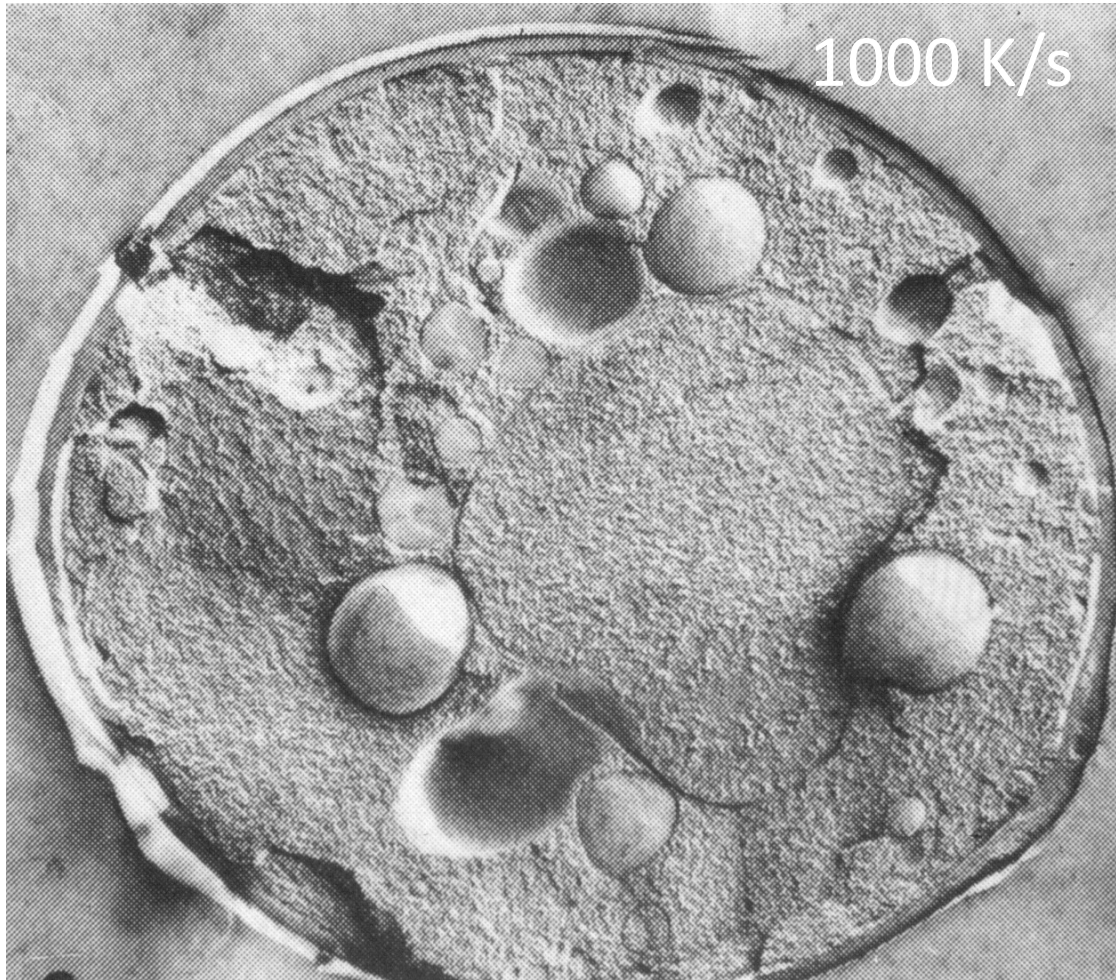
- Problém krystalizace ledu !  
... krystalický led má nižší hustotu, větší objem než kapalná voda



- **Vitrifikace** (z lat. vitreum) transformace látky ve sklo  
... vitrifikovaný led:

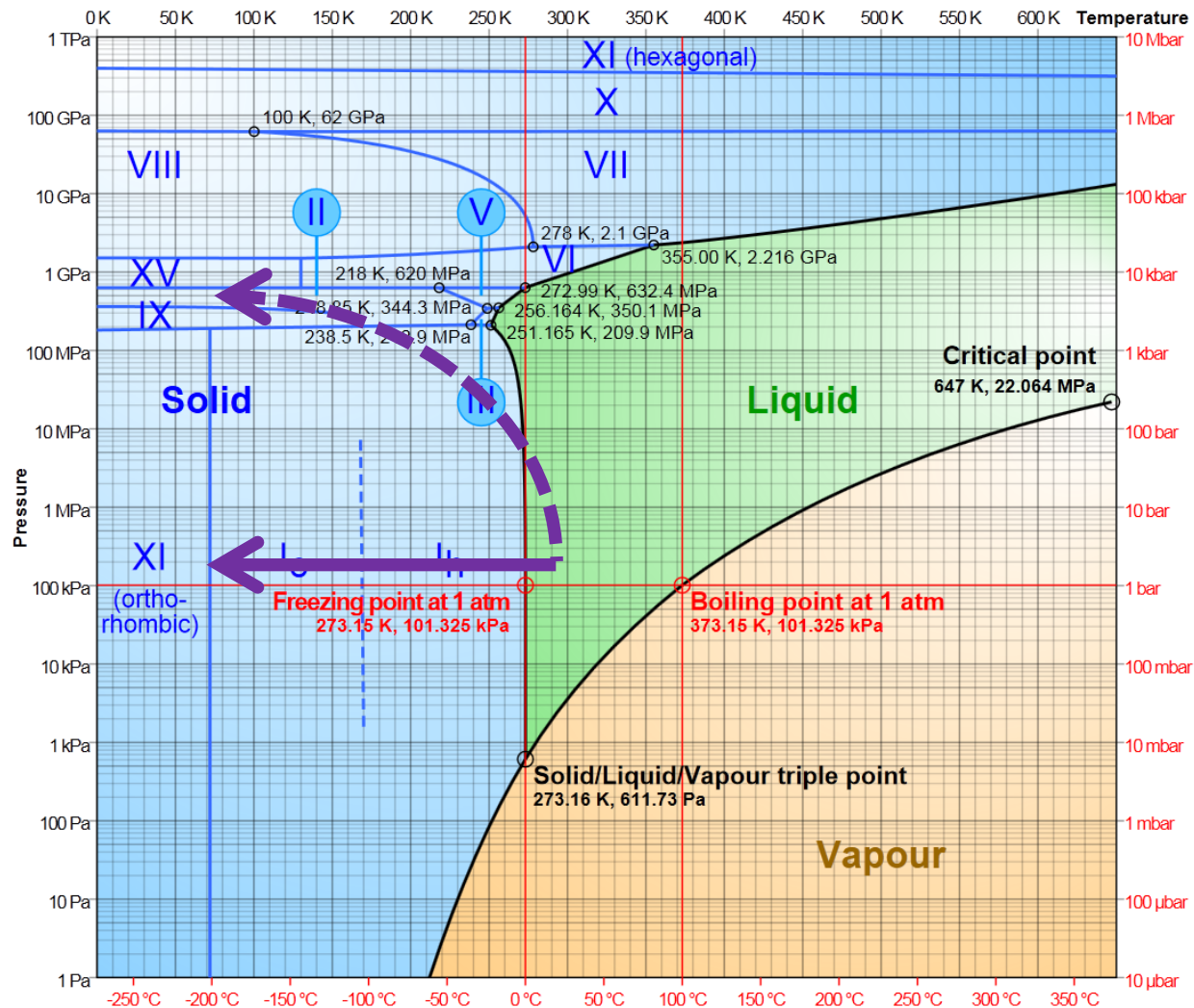
- má zhruba stejnou hustotu jako voda
- bez segregace rozpouštědla a rozpouštěných látek







Cílem je zamrazit vzorek tak, aby nedošlo ke krystalizaci ledu, která vede k destrukci ultrastruktury vzorku [http://www1.lsbu.ac.uk/water/water\\_phase\\_diagram.html#intr2](http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_phase_diagram.html#intr2)



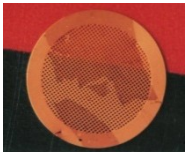
## Cryo-fixace:

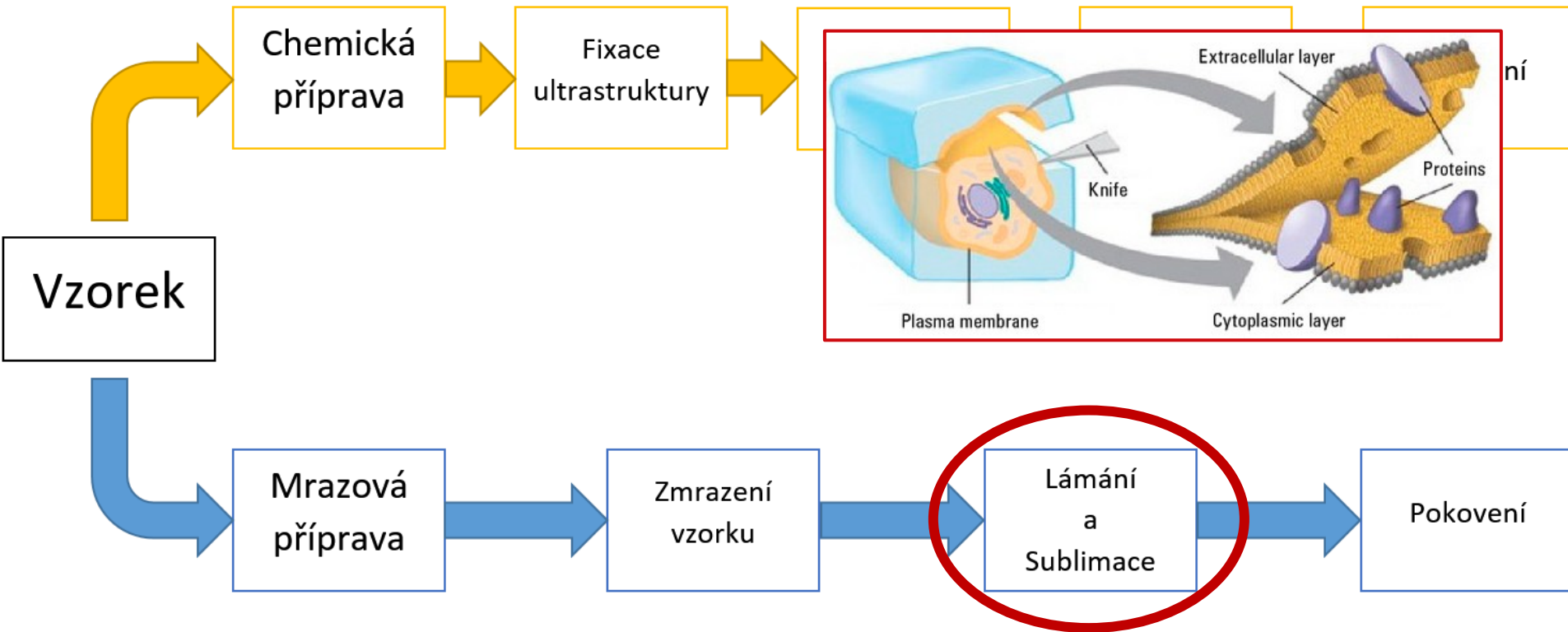
Rychlé ponoření do tekutého dusíku (propanu, etanu)

- Rychlé, levné, vhodné pro tenké vzorky – Leidenfrostův efekt

High pressure freezing (HPF):

- Rychlé, efektivní, vhodné pro většinu vzorků, velmi drahé



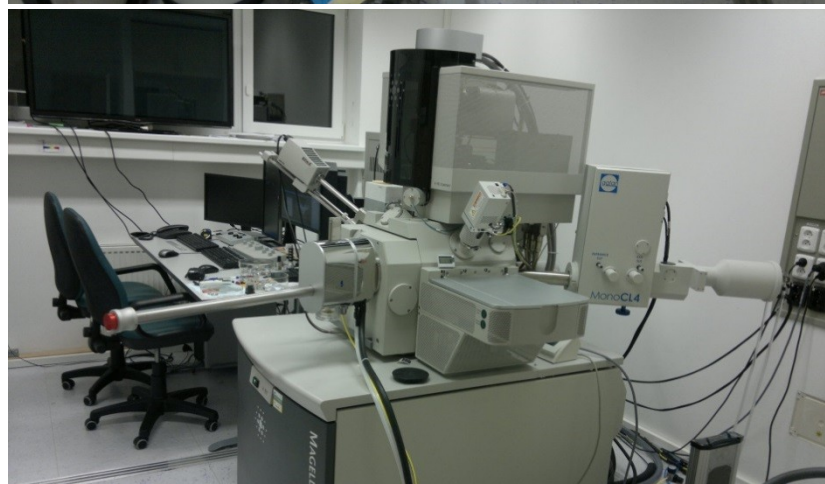




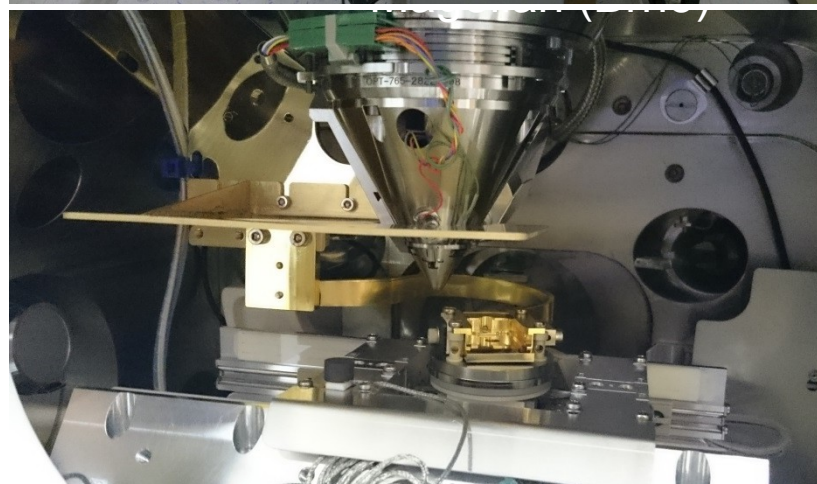
Loading station



Cryo-vakuová komora  
ACE600 & VCT100



SEM Magellan 400L (FEI)  
vybavený pro cryo-SEM

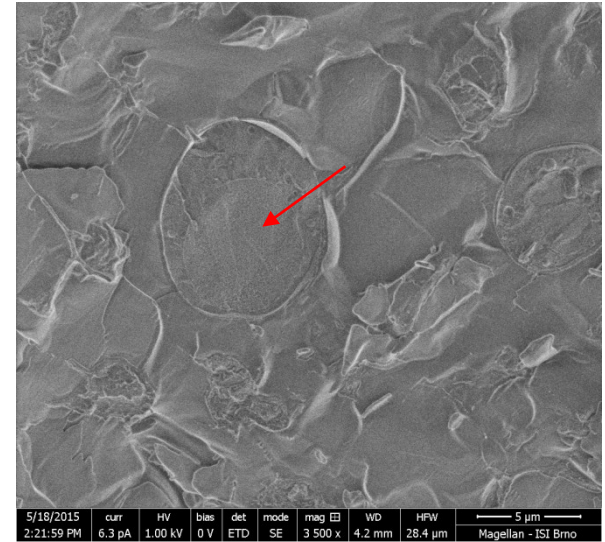
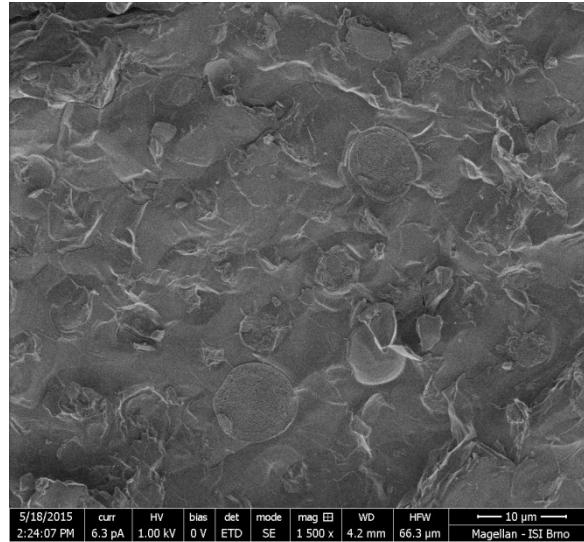


pohled do komory SEM  
vybaveného cryo-stolkem

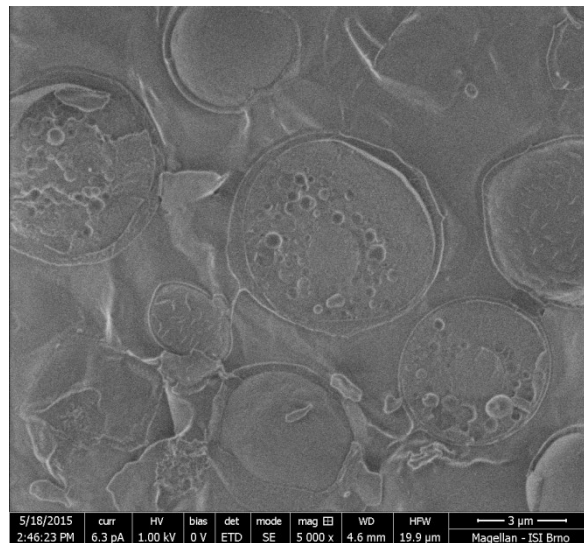




Kontrola

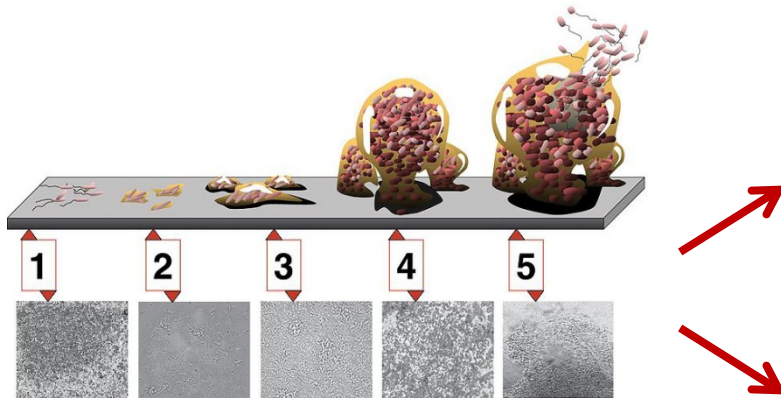


Vzorek s tukovými váčky

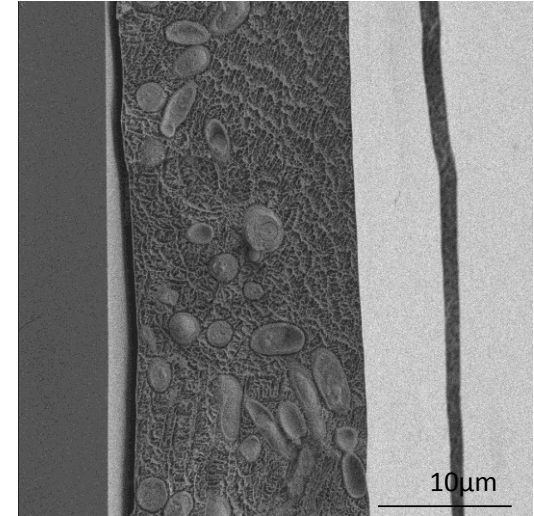




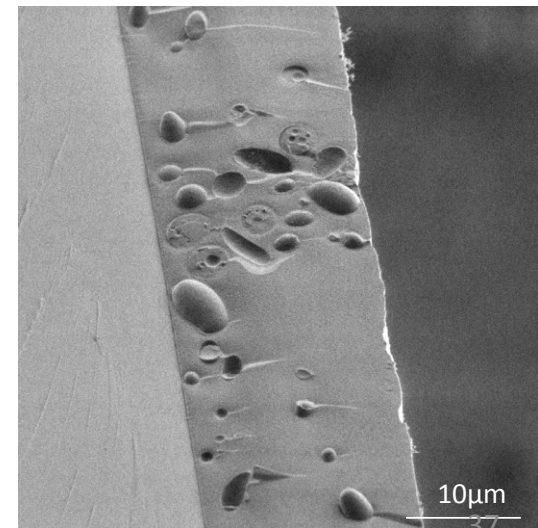
Kultivace mikrobiální kultury



Fixace  
plungingem  
do tekutého  
kryogenu



Fixace pomocí  
HPF



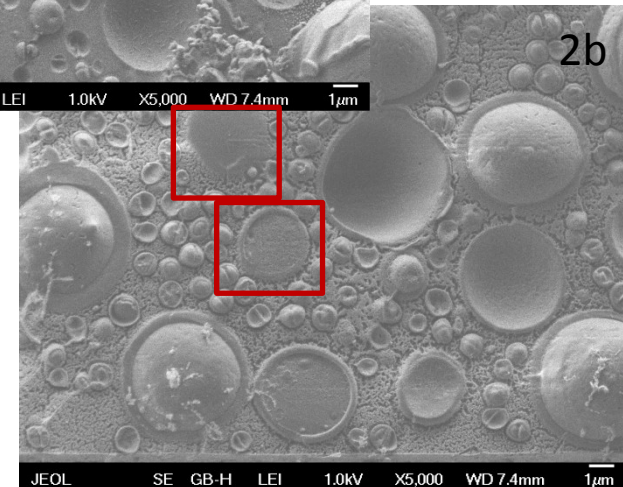
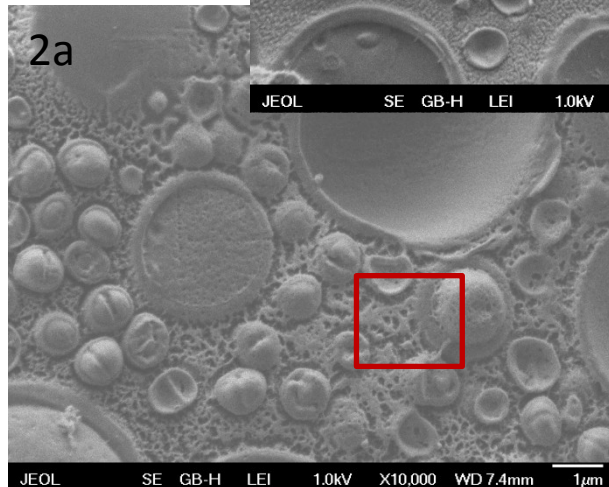
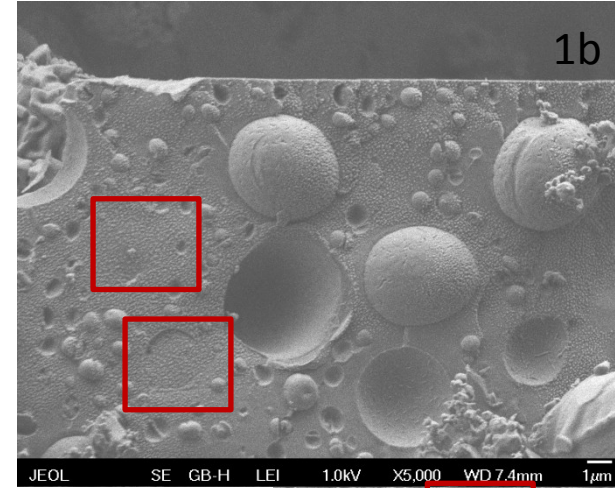
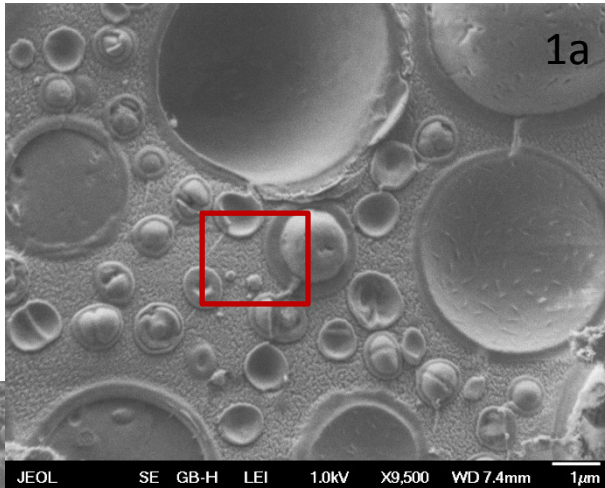
[10.1016/j.micron.2018.04.006](https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.04.006)

[10.3390/s18124089](https://doi.org/10.3390/s18124089)



Různé typy vzorků (bakterie, rostliny, živočišné buňky, minerály, polovodiče, nanomateriály, materiály pro výzkum) jsou připraveny v kryo-SEM (mrazový lom) pro pozorování v 60 kV. Pro přípravu vzorků se používá speciální postup, který zahrnuje mražení vzorku v dusíku, následně v ledu a nakonec v dusíku. Tento proces umožňuje zachování struktury vzorku a jeho pozorování v SEM. Vzorok je umístěn na speciálním držáku a připraven pro pozorování v SEM. Vzorok je umístěn na speciálním držáku a připraven pro pozorování v SEM.

- Vysokotlaké mražení (HPF) a sublimační experimenty



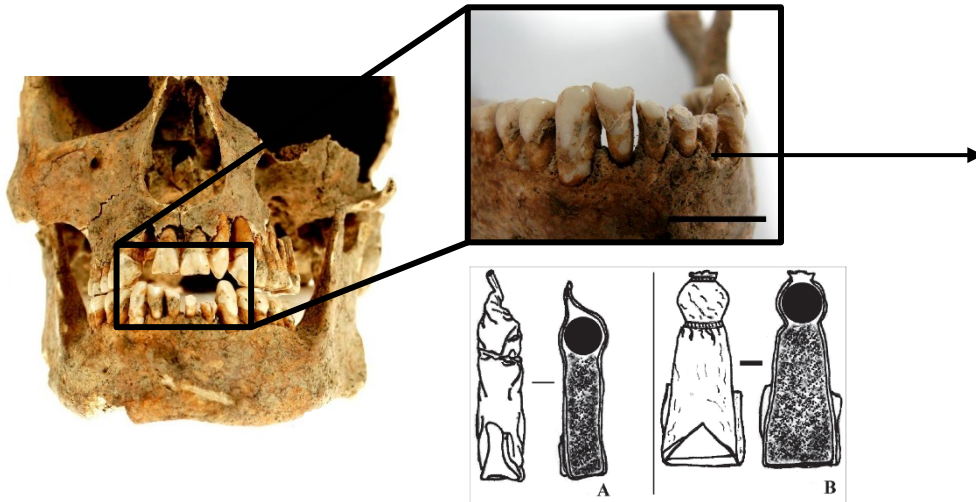
Obr. 1a, b: Cryo-SEM biofilmů *C. albicans* a *S. epidermidis* po minutové sublimaci při  $-96^{\circ}\text{C}$ .

Obr. 2a, b: Cryo-SEM biofilmů *C. albicans* a *S. epidermidis* po 7 minutách sublimace při  $-96^{\circ}\text{C}$ ;

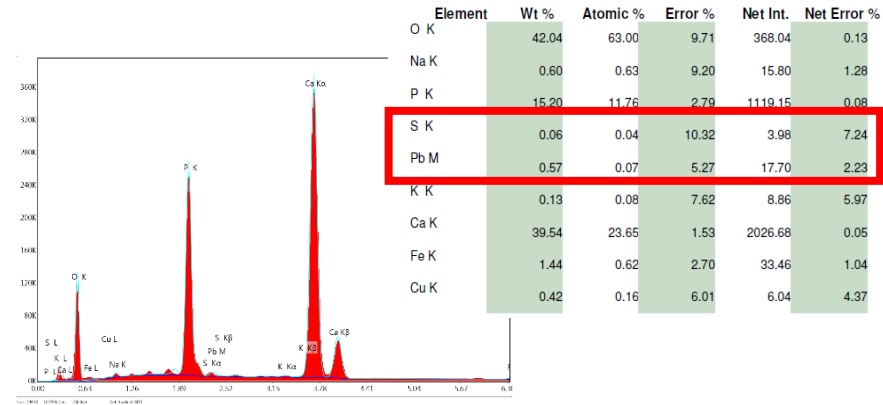
Porovnání oblastí blízkého okolí mikrobů a kultivačního média (červené boxy).

1. Princip SEM
2. Příprava biologických vzorků pro SEM
- 3. Vybrané aplikace SEM**
4. Speciální techniky SEM



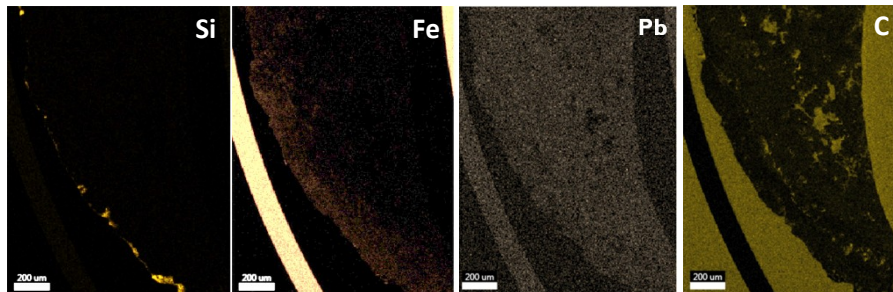
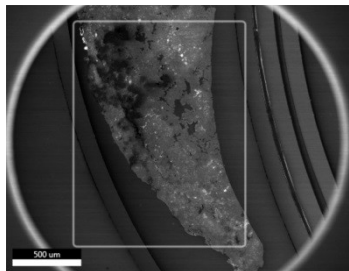


Obr. 4: A – náboj požívaný na začátku 19. století, B – náboj požívaný v polovině 19. století.  
Kresba: Lukáš Šim.



- Kosterní pozůstatky vojáka z období napoleonských válek – prokázáno antropologicky
- Hypotéza o poškození zubů v důsledku otevírání papírových kartoší s nábojem do pušky

	Inside			Outside			Soil		
	Wt %	Atomic %	Error %	Wt %	Atomic %	Error %	Wt %	Atomic %	Error %
Si	0,00	0,00	5,21	3,22	2,28	5,53	43,94	32,82	4,45
Al	0,00	0,00	6,66	1,23	0,91	7,98	2,92	2,27	6,99
Mn	5,62	2,38	2,84	0,42	0,15	12,08	0,00	0,00	0,00
Fe	2,26	0,94	4,17	1,10	0,39	5,02	3,24	1,22	3,32
Ca	36,61	21,29	1,42	24,25	12,05	1,51	1,04	0,54	8,02



- Kontaminace je jasně rozlišitelná v případě Si, Fe
- Uhlík ukazuje na místa s vyšší koncentrací organického materiálu

Chlazení vzorku na kryo teploty – omezení kontaminace povrchu spolu s vyšší odolností vůči elek. svazku

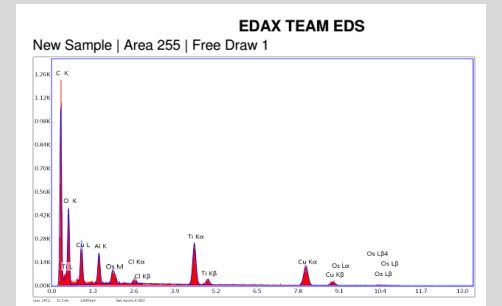
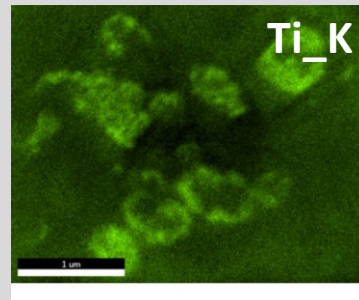
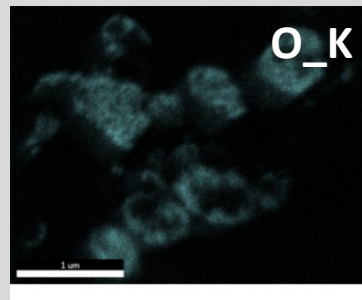
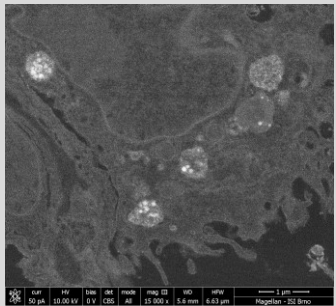
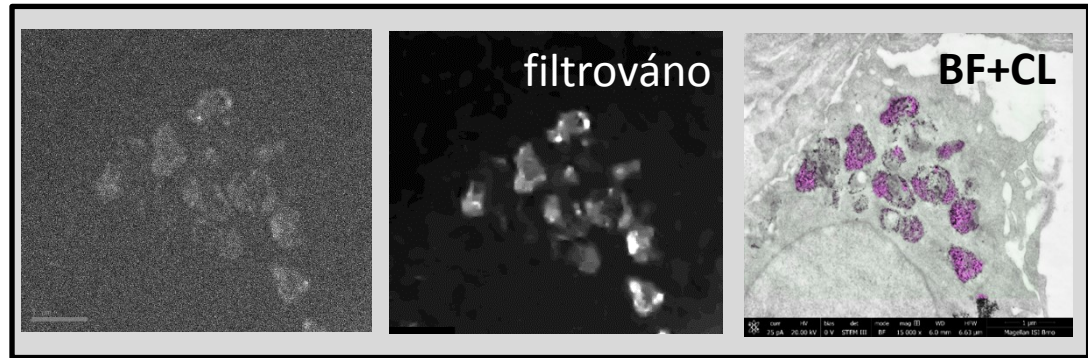
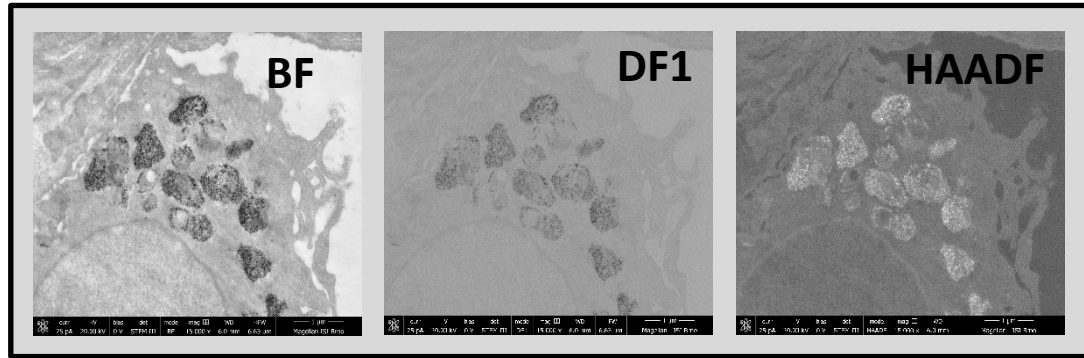
**VZOREK**  
Titanové částice v plicních buňkách

BSE

STEM

CL

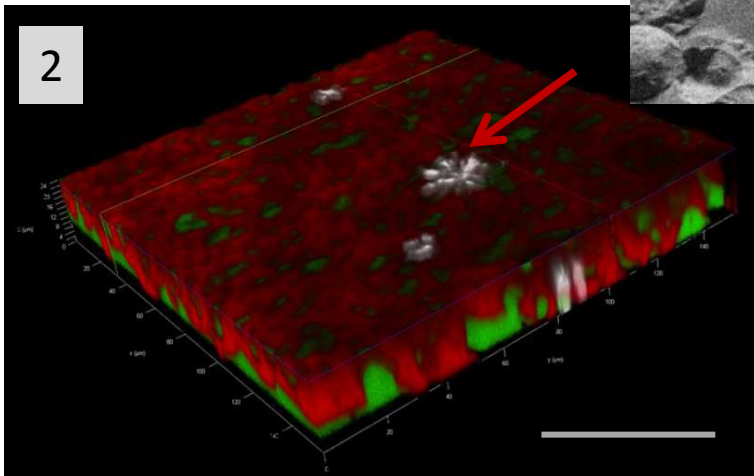
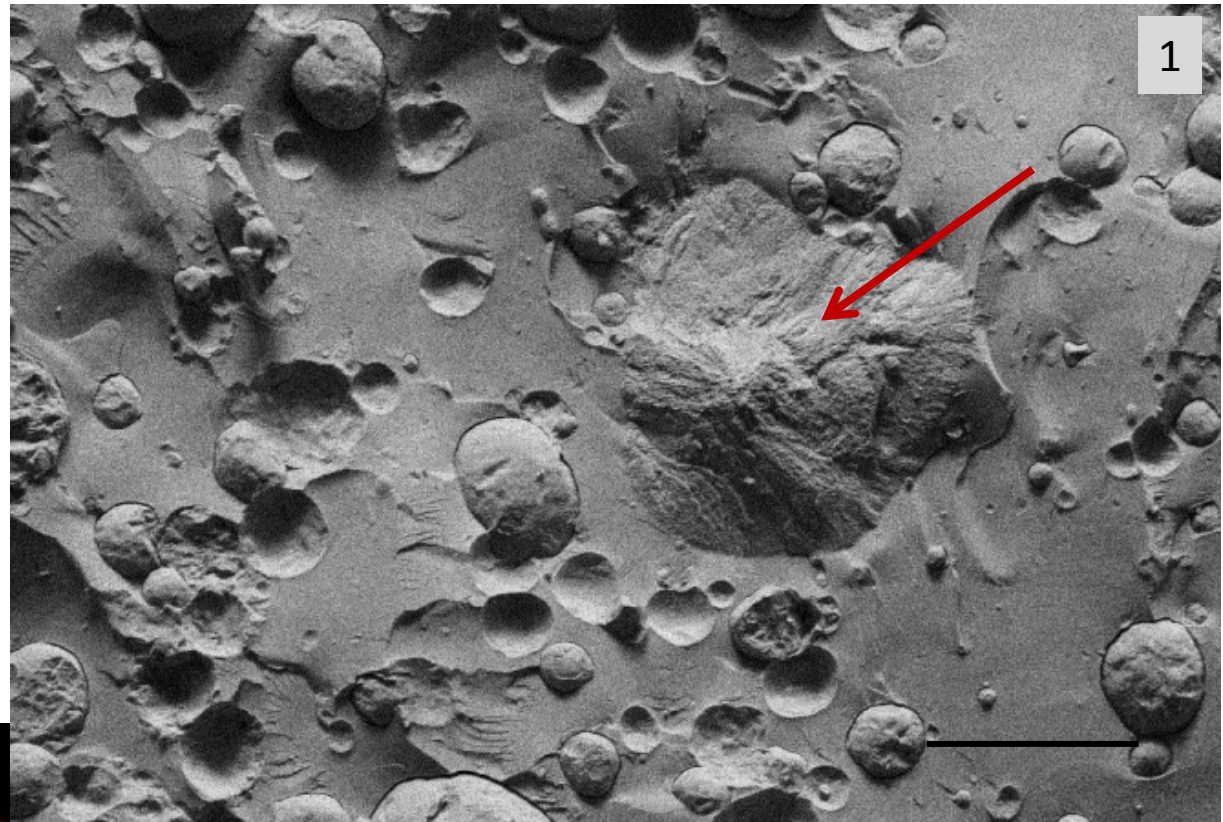
EDX





Struktura sýru byla studována různými mikroskopickými technikami ve spolupráci s Teagasc Food Research Centre, Irsko.

Cíl: klasifikace jednotlivých parametrů (podíl proteinů, tuku, bakterií, procesu výroby a zrání) s cílem optimalizace výroby a dosažení co nejlepší kvality sýrů.



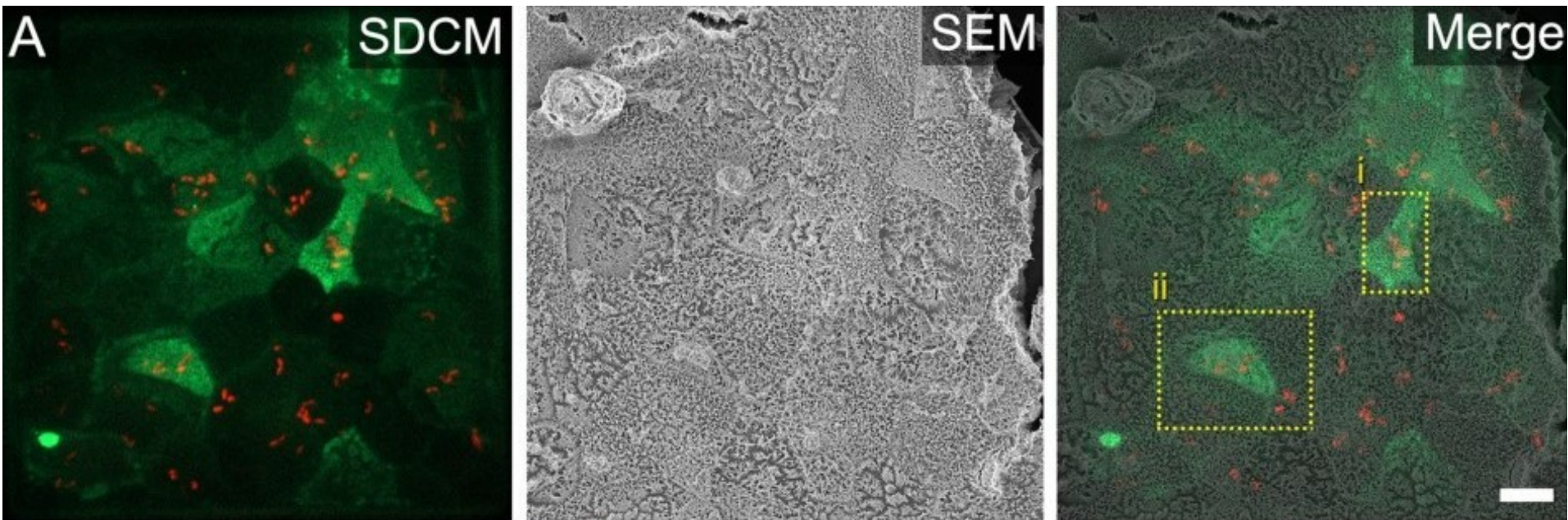
Obr. 1: Cryo-SEM obraz ukazující krystalickou inkluzi v mikrostruktuře sýru, měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

Obr. 2: 3D rekonstrukce z CLSM, měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

Burdikova et al: *Microsc. Microanal.* 20, S3 (2014) 1336



Studium průběhu infekce buněk bakterií *Salmonella enterica*. Zeleně (eGFP) značené buňky byly vystaveny bakteriální infekci (červená-mCherry). Pomocí korelace pak byla konkrétní místa infekce blíže studována pomocí SEM.



Konfokální mikroskop

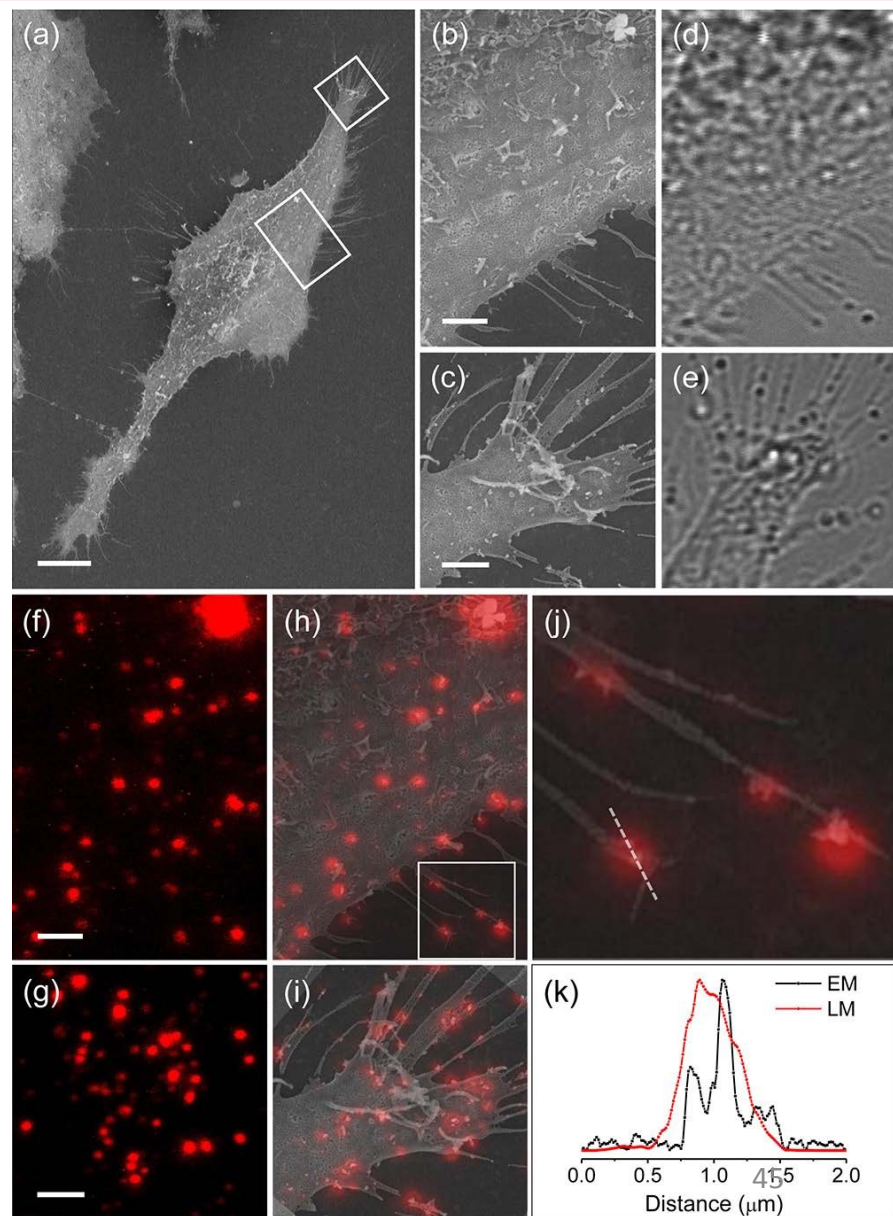
Skenovací elektronový  
mikroskop

Korelace CLSEM

10.1038/s41598-019-53085-6

Nanodiamanty (FND), jako fluorescenční značky, byly enkapsulovány lipidy a použity pro značení HeLa buněk vazbou na CD44. Enkapsulace umožnila specifické vazby fluorescenčních značek a zabránila koagulaci jednotlivých částic. Fixované HeLa buňky byly vystaveny biotinilovaným anti-CD44 protilátkám a na ty se dále vázaly FND.

- a) SEM HeLa buněk
- b, c) Zoom vybraných částí SEM
- d, e) bright-field světelné mikroskopie
- f, g) fluorescenční snímky
- h, i) CLEM snímky vybraných míst z a) značených bílými obdélníky
- j) Zvětšení h)
- k) Profily intenzit bílé přerušované čáry z j)



1. Princip SEM
2. Příprava biologických vzorků pro SEM
3. Vybrané aplikace SEM
- 4. Speciální techniky SEM**

## FIB SEM

### Focused Ion Beam SEM

- Využití fokusovaného svazku iontů k opracování povrchu vzorku a odhalení vnitřních struktur

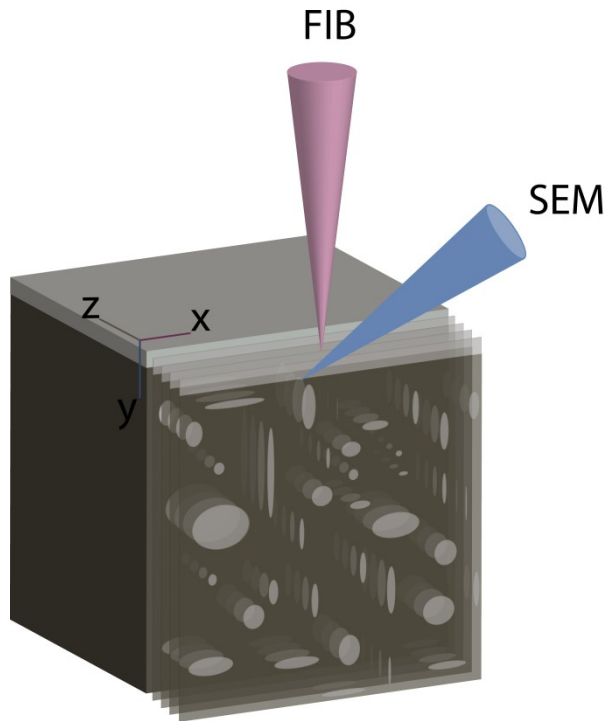
## SBF SEM

### Serial Block-Face SEM

- Využití ultramikrotomu umístěného v komoře mikroskopu pro odkrojení ultratenkých řezů z povrchu vzorku

## Využití dvou různých svazků

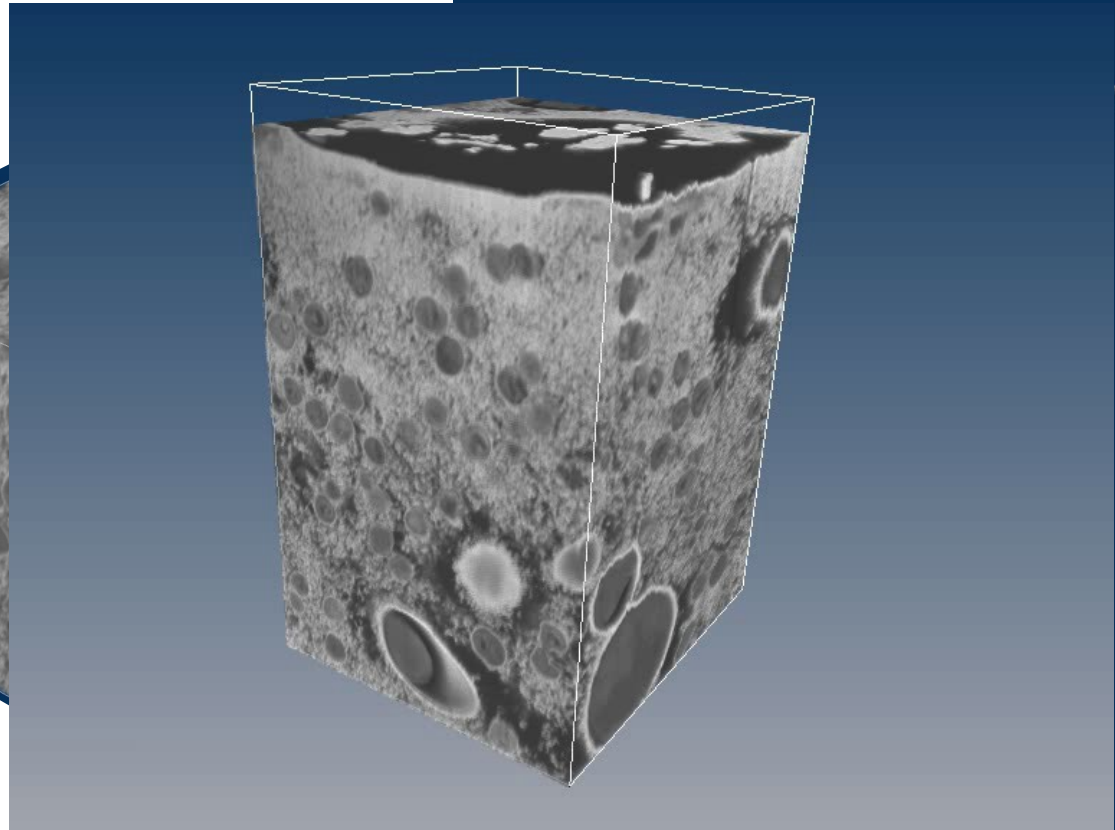
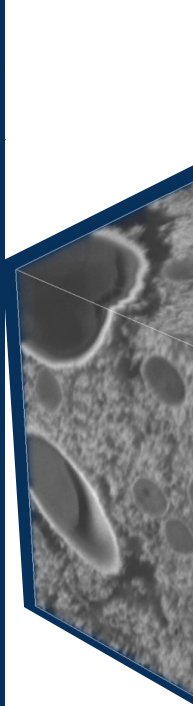
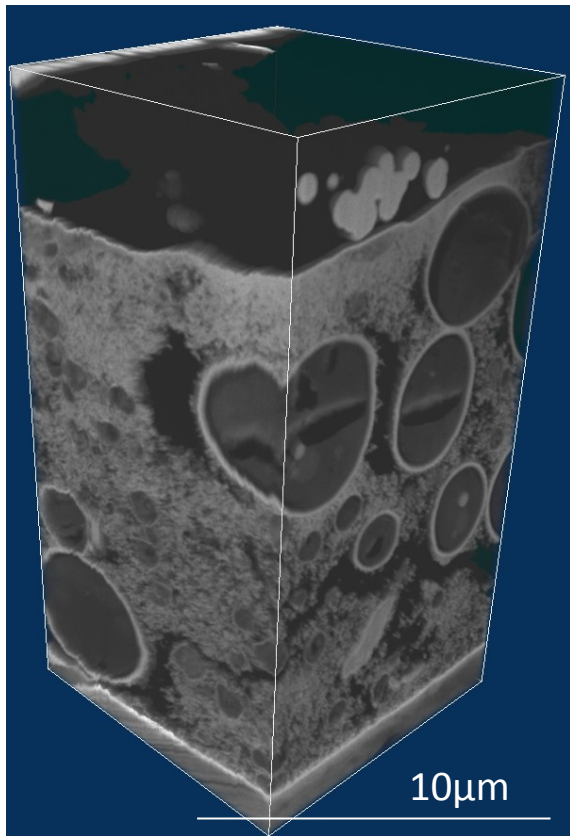
- Ionty pro opracování vzorku (milling)
- Elektrony pro pozorování povrchu



## Milling (etching)

- Mechanické odstranění svrchní vrstvy vzorku pro zobrazení vnitřních struktur  
-> 3D rekonstrukce
- Využití např. iontů galia

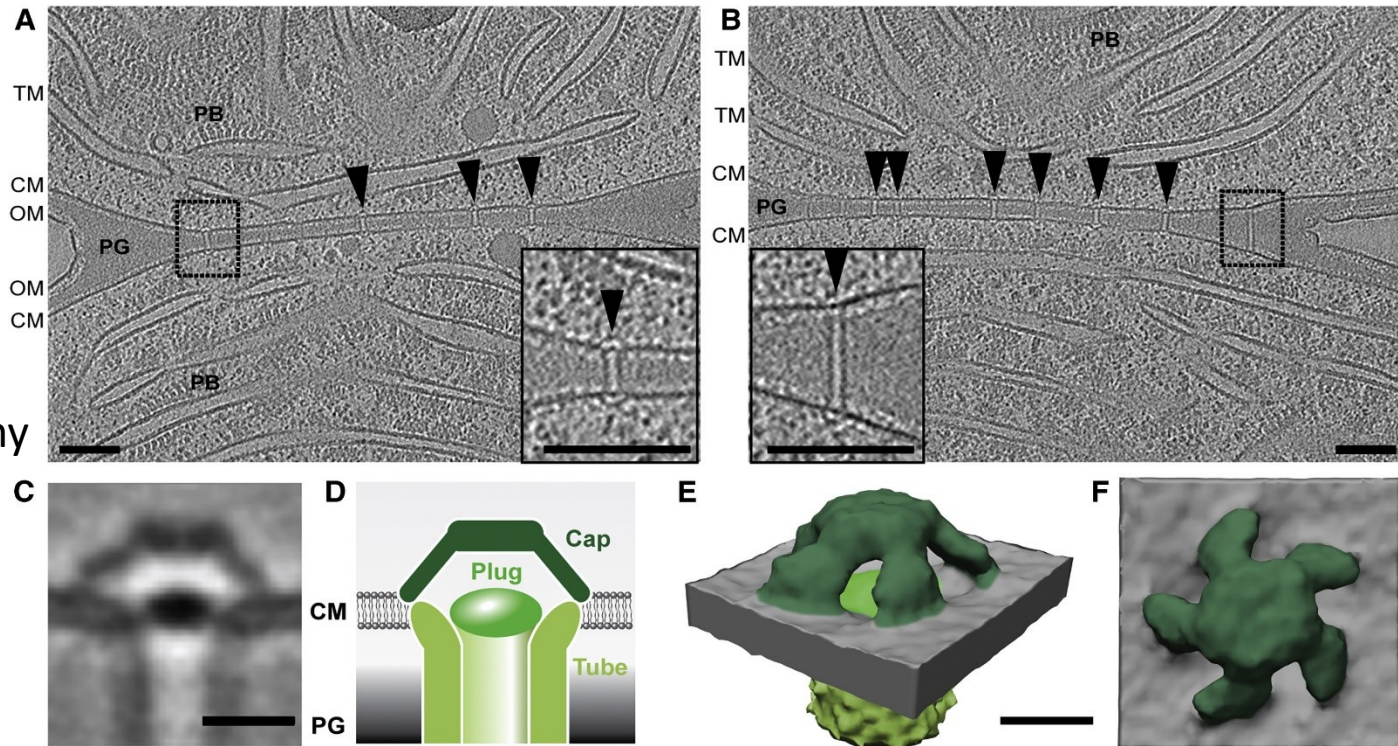




Biofilm *Candida albicans* + *Staphylococcus epidermidis* po 2 dnech kultivace

Rekonstrukce septal junctions (SJ), „nanopórů“ umožňujících molekulární výměnu mezi buňkami pomocí difuze, u mnohobuněčných sinic *Anabaena* sp. PCC 7120 pomocí cryo elektronové tomografie. Vzorek nanesený na sítku byl zmražen pomocí metody plunge freezing a lamely byly připraveny pomocí cryo FIB milling.

SJ značeny šipkami,  
 CM, cytoplazmatická  
 membrána;  
 OM, vnější membrána;  
 PB, fykobilisomy;  
 PG, septal peptidoglykan;  
 TM, thylakoidní membrány



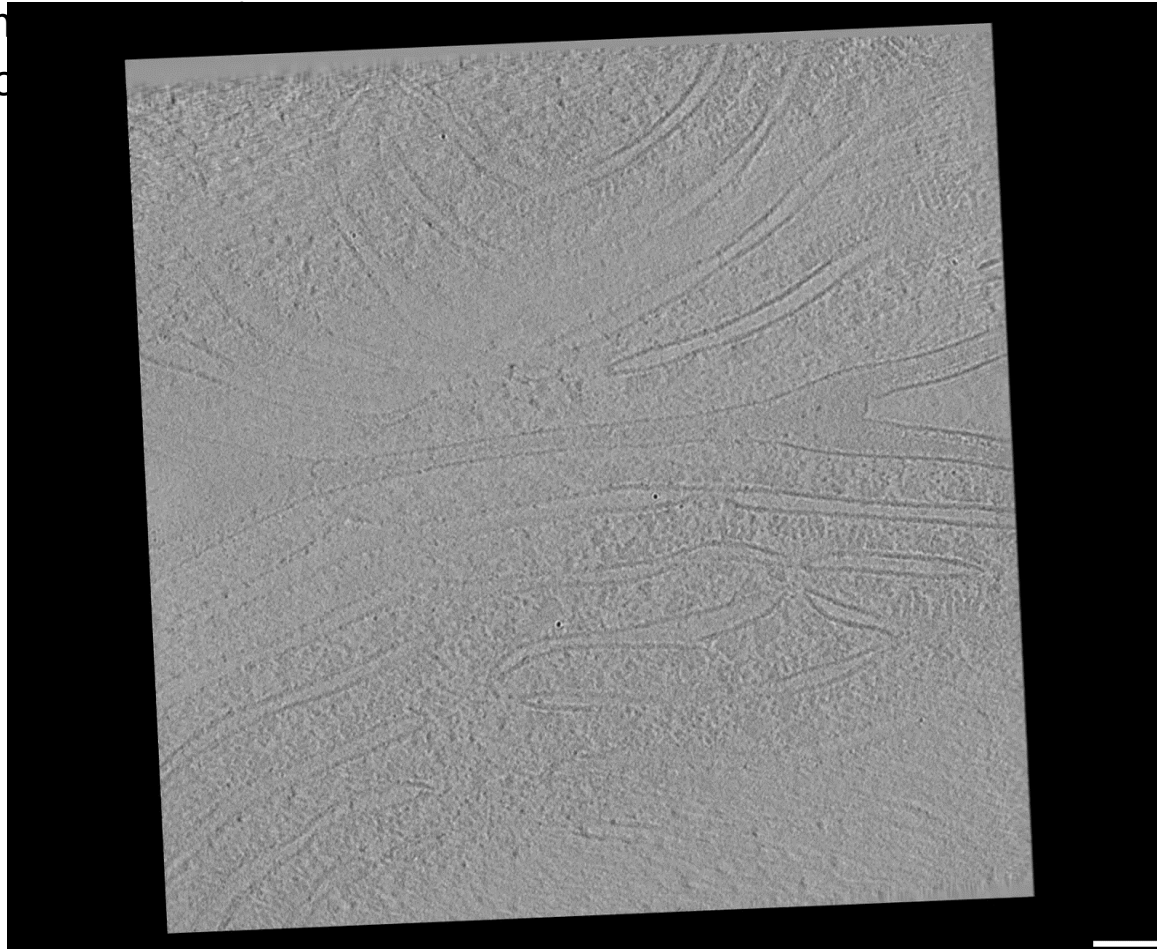


Rekonstrukce septal junctions (SJ), „nanopórů“ umožňujících molekulární výměnu mezi buňkami pomocí difuze, u mnohobuněčných sinic *Anabaena* sp. PCC 7120 pomocí cryo elektronové tomografie. Vzorek namražený pomocí cryo freezing a lamely byly připraveny pomocí cryo EM.

Cryotomogram oblasti septa cyanobakterie *Anabaena*

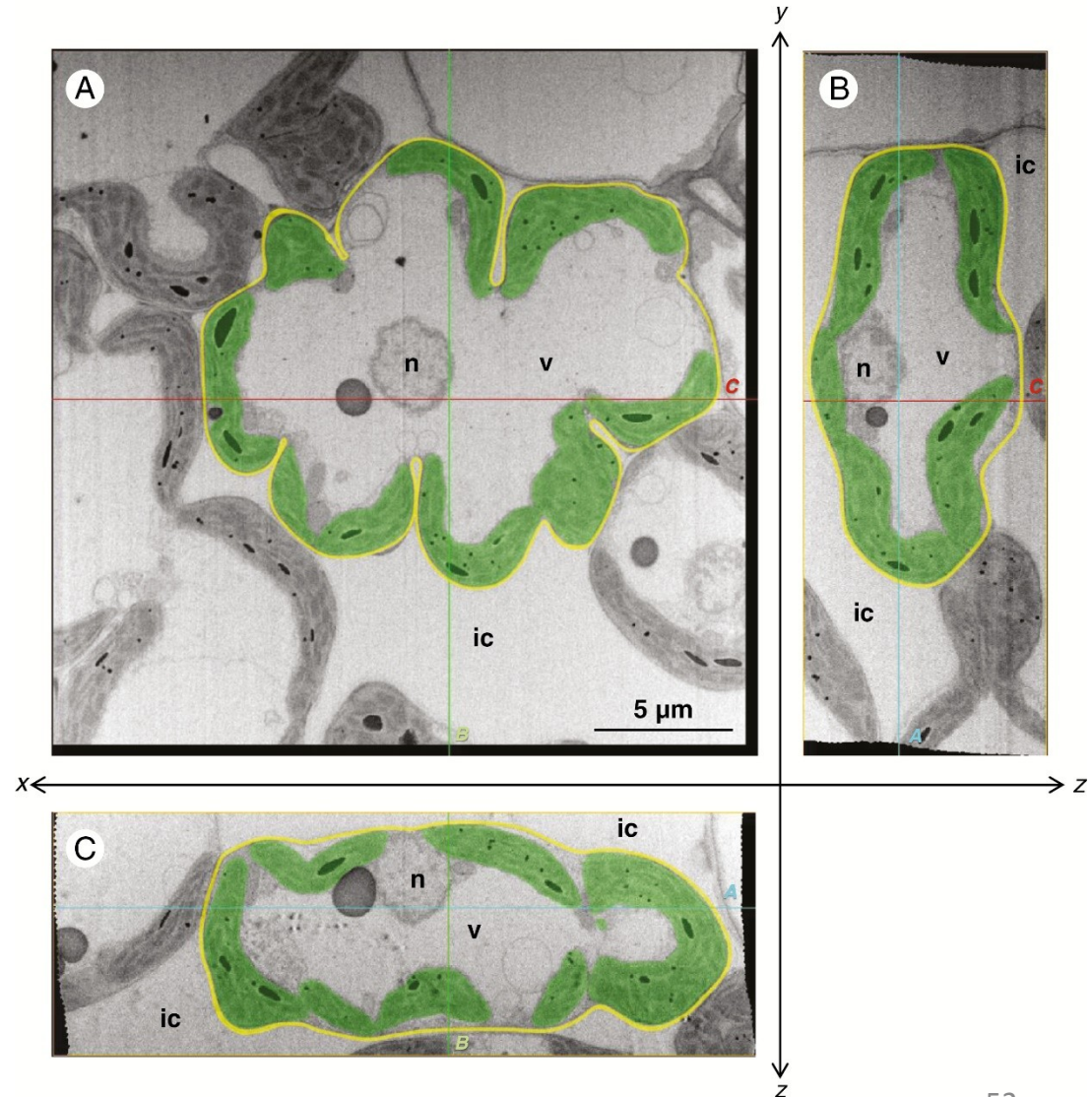
Septal junctions: světle zelená;  
 Thylakoidní membrány: tmavě zelená;  
 Peptidoglykan: šedá;  
 Vnější a cytoplazmatická membrána: hnědá;  
 Granule: žlutá;

Měřítko 100 nm



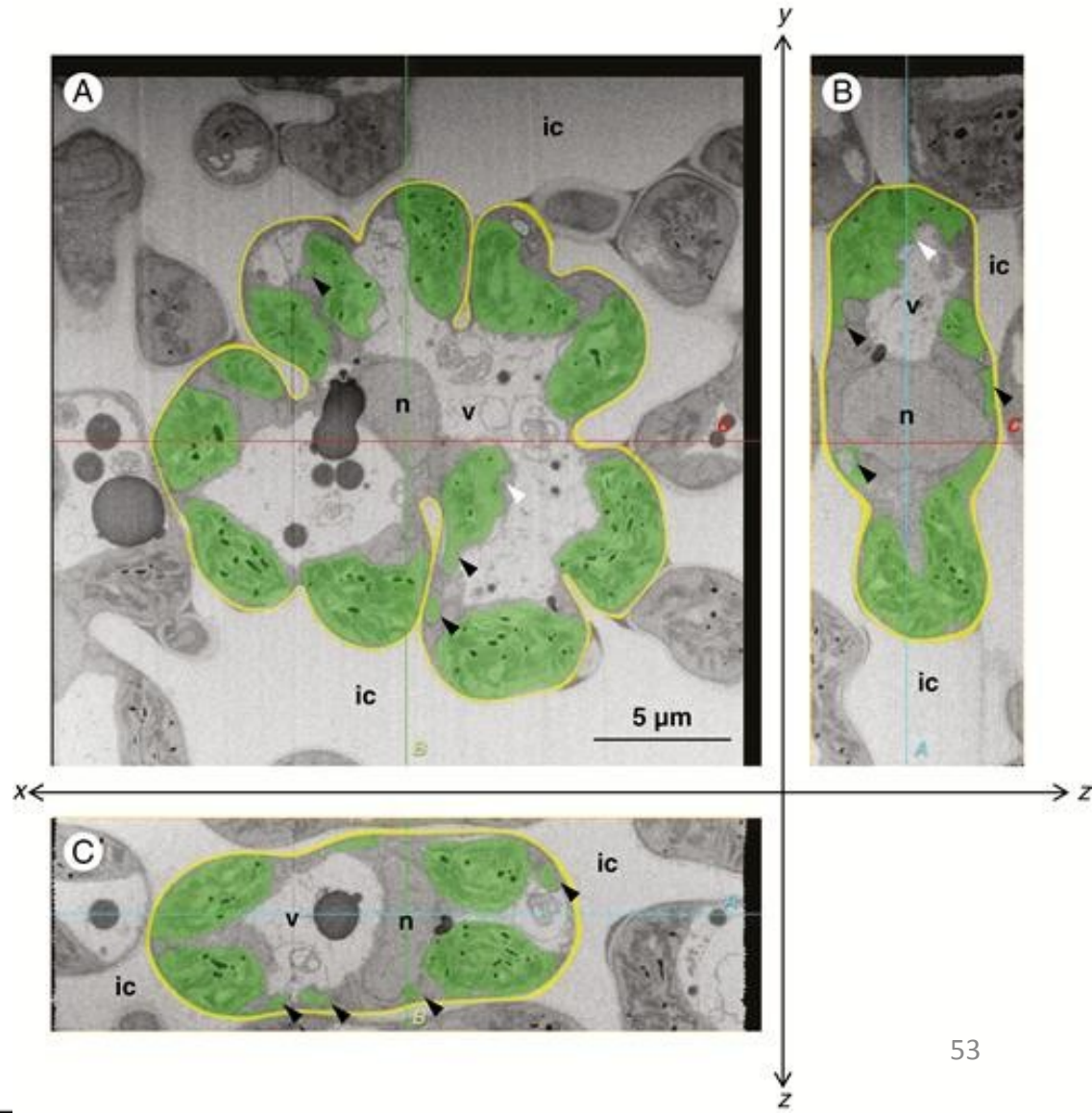
Listy rýže byly vystaveny vysoké koncentraci soli a následně pomocí FIB-SEM byly zrekonstruovány tvary chloroplastů.

Kontrolní vzorky obsahují (zeleně značené) chloroplasty tvaru čočky umístěné v blízkém kontaktu se sousedními chloroplasty.



Listy rýže byly vystaveny vysoké koncentraci soli a následně pomocí FIB-SEM byly zrekonstruovány tvary chloroplastů.

Vzorky vystavené působení NaCl obsahovaly chloroplasty oválného tvaru bez kontaktu s dalšími chloroplasty. Celkový objem chloroplastů ale zůstal nezměněn.





Listy rýže byly vystaveny vysoké koncentraci soli a následně pomocí FIB-SEM byly zrekonstruovány tvary chloroplastů.

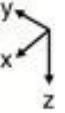
A

3D rekonstrukce jednotlivých chloroplastů u kontrolního vzorků bez vystavení stresu (C1-C3) a u vzorků s působením vysoké koncentrace NaCl (N1-N3)

C1



N1



C2



N2



C3

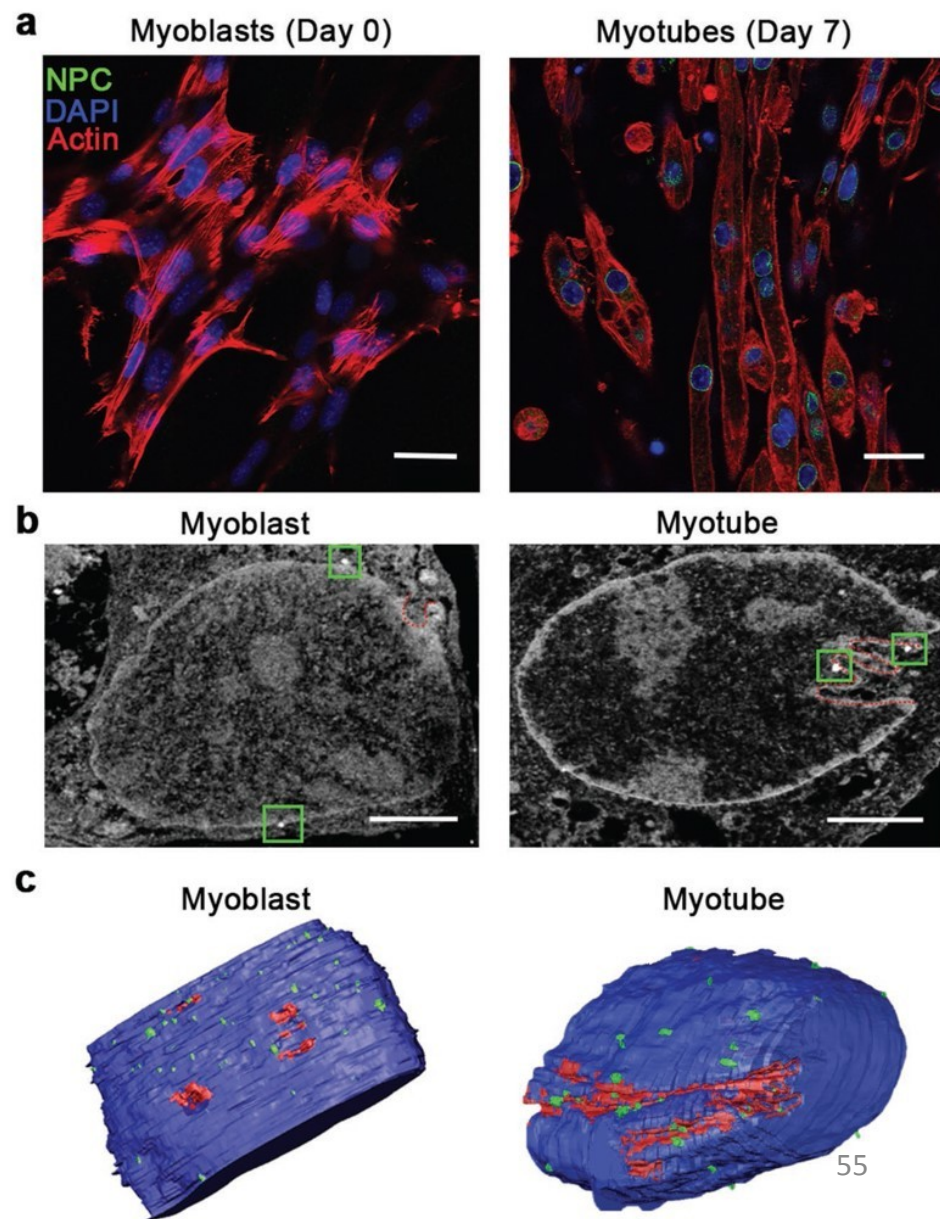


N3



Využití imunoznačení pro studium proteinů tvořících jaderné póry (NPC). Buňky byly značeny pomocí zlatých nanočástic vázaných na sekundární protilátky a fluorescenčního barviva pro korelaci se světelnou mikroskopií.

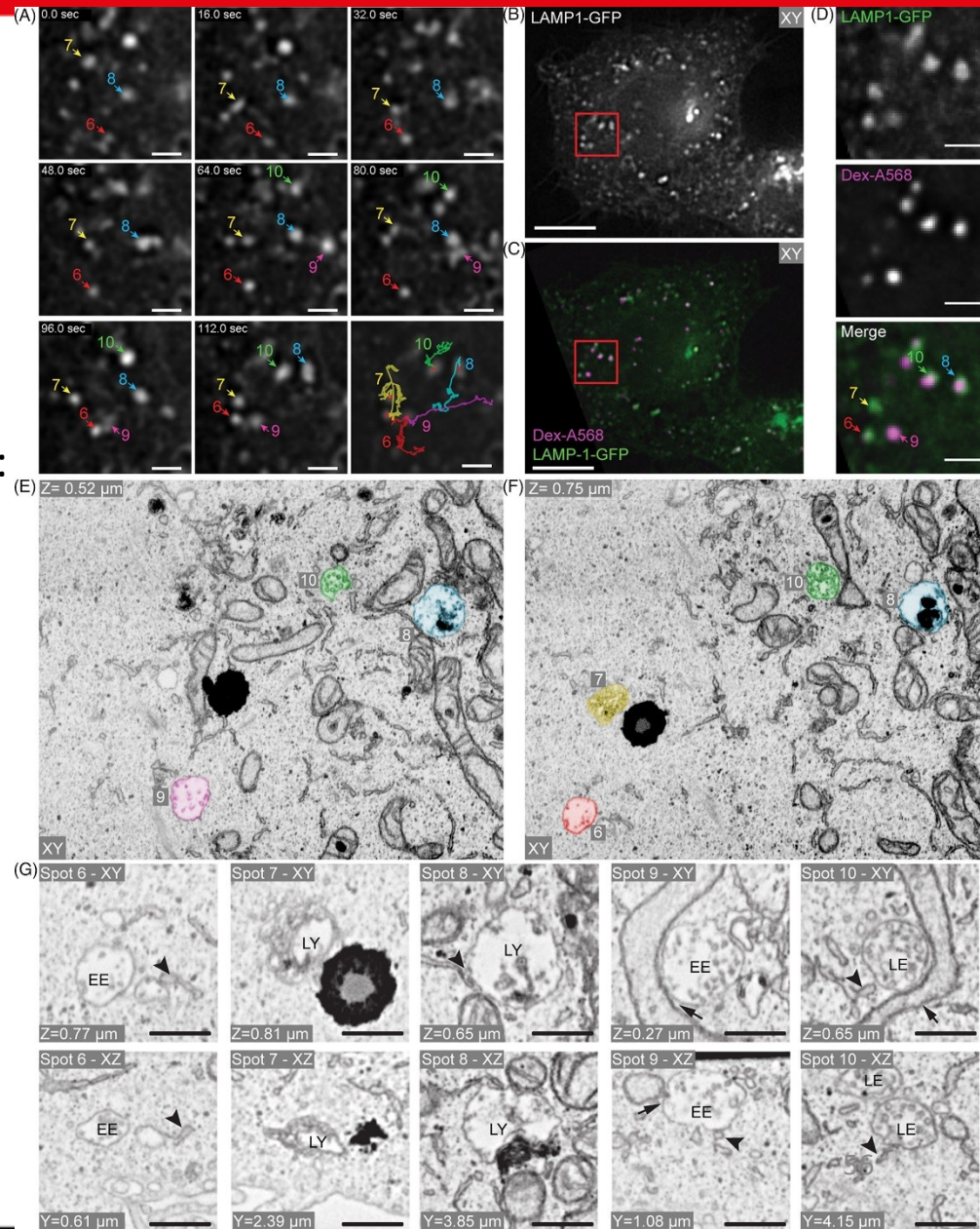
- Snímky z konfokálního fluorescenčního mikroskopu zobrazující myoblasty a myotubuly značené zeleně pro NPC, modře pro DNA a červeně pro aktin
- Vybrané snímky z FIB-SEM zobrazující imunoznačené NPC
- 3D rekonstrukce jádra se zeleně značenými NPC



Pro studium organel pomocí světelné mikroskopie a FIB-SEM byly HeLa buňky značeny pomocí fluorescenčního LAMP1-GFP (zelená) a konjugátu dextranu s barvivou Alexa568/647 (fialová). Po lokalizaci konkrétních endosomů pomocí fluorescenčních barviv byly tyto organely následně pomocí FIB-SEM identifikovány jako:

- 6) Časný endosom
- 7) (Auto)lysosom
- 8) Lysosom
- 9) Pozdní endosom
- 10) Pozdní endosom

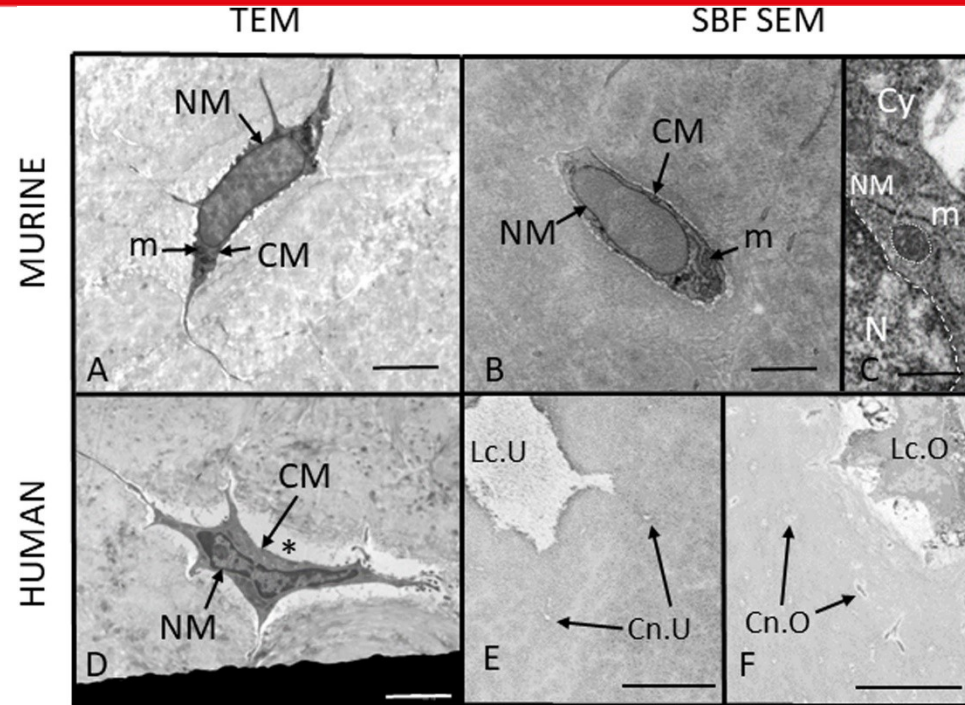
[10.1111/tra.12557](https://doi.org/10.1111/tra.12557)





Byl stanoven specifický protokol pro přípravu vzorků kostí pro analýzu SBF-SEM. Na obrázku je možné porovnat snímky z TEM a SBF kostí myši po perfuzní fixaci a dekalifikaci a lidských kostí po imerzní fixaci a dekalifikaci

- a) Osteocyt myši s nepoškozenými membránami a bez změny objemu buňky
- b) Snímek z SBF ukazuje dostatečné rozlišení a kontrast pro zobrazení ultrastruktury
- c) Detail jádra
- d) Lidský osteocyt s neporušenými membránami, ale zvětšeným pericellulárním prostorem naznačující smrštění buňky
- e, f) vyplněné a nevyplněné lakuny a canaliculi osteocytů zobrazené v SBF-SEM



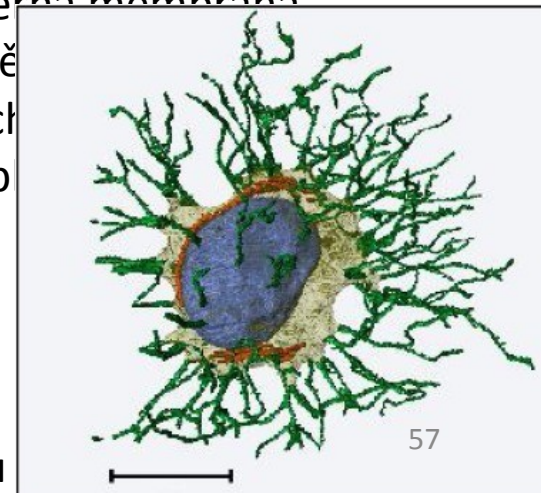
NM=jaderná membrána

CM=buně

m=mitoch

Cy=cytop

N=jádro





- Brno je světové centrum elektronové mikroskopie
  - tři firmy vyvíjející a produkující elektronové mikroskopy (z Brna pochází asi 35 % světové produkce elektronových mikroskopů)





- několik významných vědeckých institucí  
ÚPT AVČR, CEITEC-MU, CEITEC-VUT, VUVEL, ...
- V Brně se organizují pravidelné akce
  - každý březen: Dny elektronové mikroskopie (firmy a instituce organizují zajímavé přednášky pro veřejnost a exkurze)
  - každý listopad: v rámci Týdne vědy AV ČR bývají dny otevřených dveří pro veřejnost



Vladislav Krzyžánek  
[krzyzanek@isibrno.cz](mailto:krzyzanek@isibrno.cz)