

Analýza struktury fotosystému II pomocí transmisní elektronové mikroskopie a obrazové analýzy

Cílem úlohy je praktická ukázka aplikace transmisní elektronové mikroskopie v kombinaci s obrazovou analýzou pro strukturní charakterizaci fotosystému II. Studenti se v rámci úlohy seznámí s přípravou vzorku pro elektronovou mikroskopii a s jeho analýzou v elektronovém mikroskopu. Mikroskopické snímky fotosystému II budou podrobeny obrazové analýze, jejíž výsledkem bude vizualizace 2D projekce struktury komplexu fotosystému II.

Teoretický úvod:

Co je transmisní elektronová mikroskopie?

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je jednou z nejvýkonnějších mikroskopických technik, která umožňuje nahlížet do atomárního světa s rozlišením dosahujícím úrovně jednotlivých atomů. Tato technika je založena na použití elektronů pro získání obrazu, na rozdíl od tradičních mikroskopů, které využívají světlo (fotony).

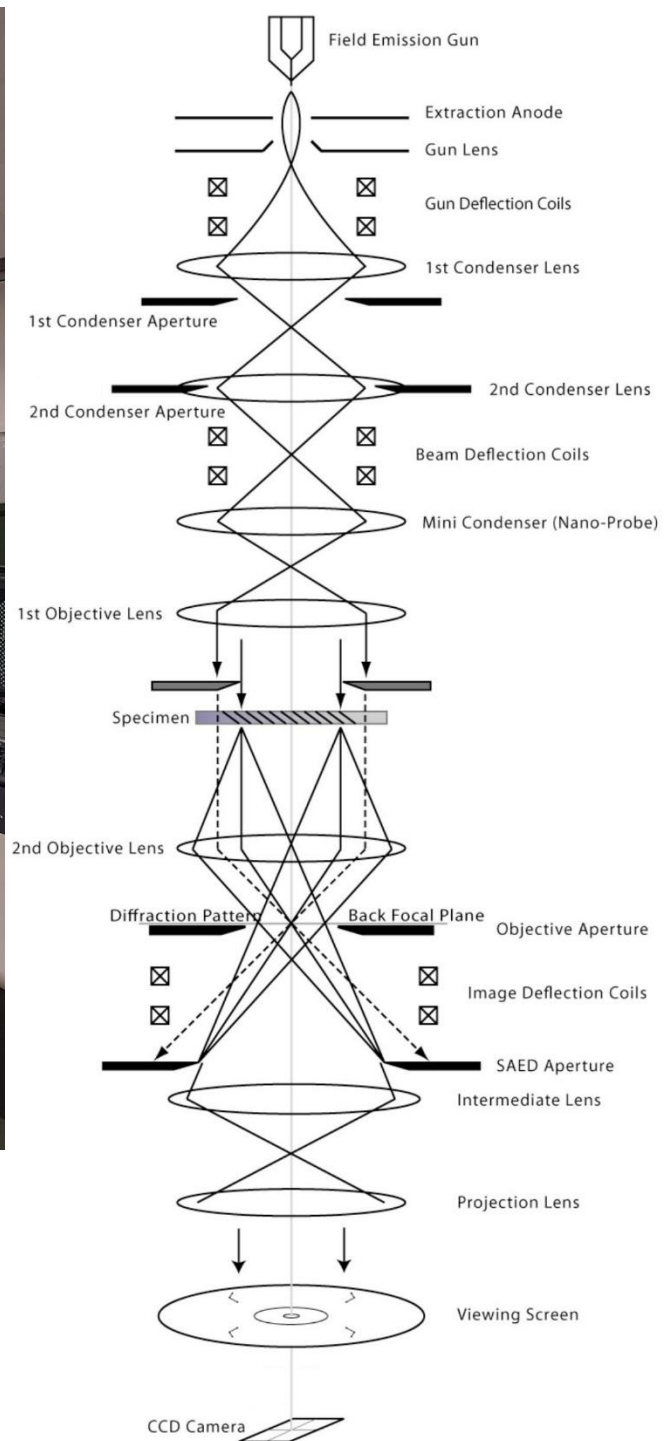
Jak TEM funguje?

V TEM jsou elektrony urychleny ve vakuu k velmi vysokým energiím, kdy urychlovací napětí se nejčastěji pohybuje mezi 80 až 300 kV. Tyto elektrony pak dopadají na vzorek, který musí být dostatečně tenký (většinou méně než 100 nanometrů), aby elektrony mohly vzorkem projít. Jak elektrony procházejí vzorkem, jsou různě rozptylovány v závislosti na atomární struktuře materiálu. Tento rozptyl elektronů je následně zachycen na detektoru, který převádí přijaté signály na obraz viditelný operátorem mikroskopu. TEM má zásadní význam ve vědeckém výzkumu, protože poskytuje mimořádně detailní obrazy, které jsou klíčové pro pochopení struktury a funkce materiálů na atomární úrovni. Díky tomu je TEM nepostradatelným nástrojem v různých oblastech biologie a materiálového inženýrství, protože umožňuje pozorovat a analyzovat struktury, které by jinak zůstaly neviditelné.

Klíčové komponenty TEM

Transmisní elektronový mikroskop se skládá z řady klíčových komponent, které zahrnují zdroj elektronů, optické prvky a dále zařízení pro detekci obrazu (obr. 1). Mimo tyto základní prvky může být mikroskop vybaven řadou dalších volitelných komponent (např. korektory aberací, energetický filtr, fázová destička, detektory prvkového složení, aj.) podle typu analýz a experimentálních požadavků.

- **Zdroj elektronů (elektronové dělo):** Obvykle se jedná o žhavené wolframové vlákno, LaB_6 katodu nebo autoemisní FEG zdroj (Field Emission Gun), který produkuje elektrony. Tyto elektrony jsou urychleny akceleračním napětím a vstupují do optické soustavy mikroskopu tvořené elektromagnetickými čočkami.
- **Elektromagnetické čočky a vychylovací čočky:** Tyto čočky jsou vlastně elektromagnety, které ovládají směr a ohnisko paprsku elektronů. Čočky, které promítají elektronový svazek na vzorek tvoří kondenzorovou soustavu. Objektová čočka vytváří primární obraz vzorku a čočky projektoru tento obraz dále zvětšují a promítají na stínítko nebo na detektor.
- **Držák se vzorkem:** Vzorek musí být extrémně tenký a často je umístěn na měděné síťce potažené tenkých uhlíkovým filmem. Tato síťka se umístí do držáku vzorku, který je následně vložen do mikroskopu.
- **Detektor:** Zachytává elektrony, které prošly vzorkem, a vytváří z nich obraz. V současné době je nejčastějším detektorem CCD kamera nebo technicky vyspělejší přímý detektor elektronů. Obraz lze také pozorovat na stínítku, i když nejnovější typy mikroskopů již stínítko nemají.



Obr. 1. Transmisní elektronový mikroskop a jeho klíčové komponenty. Snímek transmisního elektronové mikroskopu Tecnai G2 F20 (FEI) v laboratoři elektronové mikroskopie Katedry biofyziky PŘF UP (vlevo). Schematický řez elektronovým mikroskopem zobrazující jeho klíčové komponenty (vpravo).

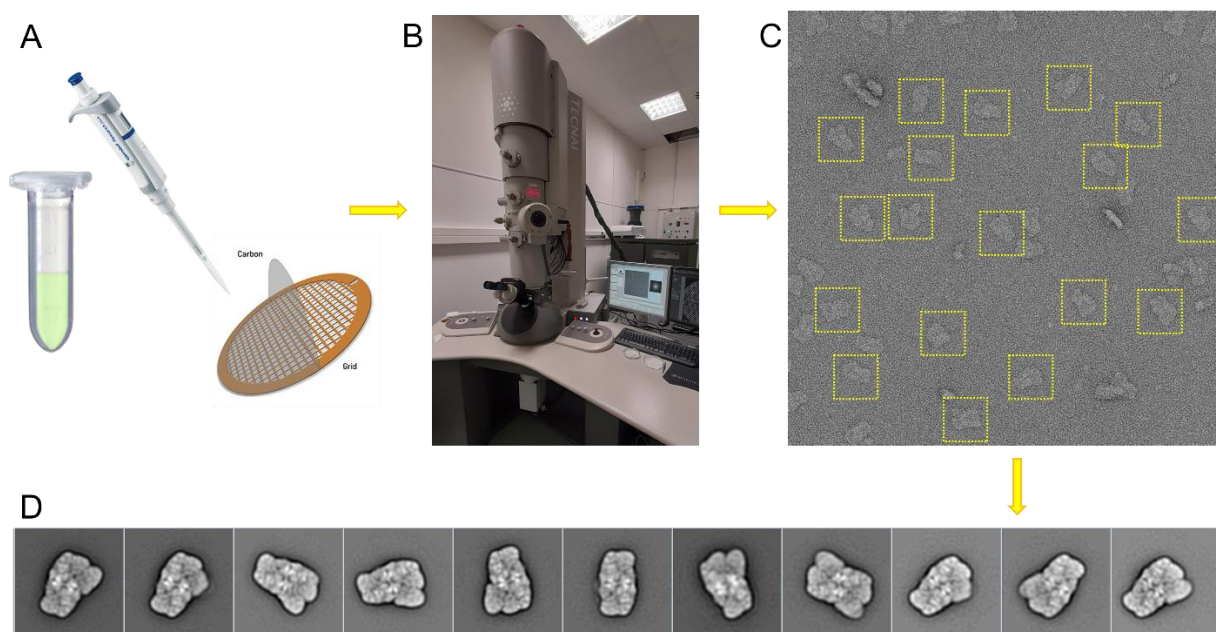
Příprava vzorku pro elektronovou mikroskopii

Nejběžnější metodou přípravy vzorku pro TEM z biologického materiálu je metoda tzv. negativního barvení („negative staining“). Jedná se o relativně rychlý a jednoduchý způsob, jak zvýšit kontrast biologických makromolekul, jako jsou proteiny nebo virové částice.

Malé množství biologického vzorku je nanášeno pipetou na speciálně připravenou měděnou sítku pokrytou tenkou vrstvou podpůrného uhlíkového filmu (obr. 2A). Po krátké inkubaci, která umožní proteinům přilnout k filmu, se přebytečný roztok odstraní jemným odsátím nebo dotykem sítiny k filtračnímu papíru.

Na sítku se poté aplikuje kontrastní činidlo, typicky roztok těžkého kovu, jako je např. 2% uranylacetát. Toto činidlo díky vysoké hodnotě protonového čísla svých komponent efektivně rozptyluje elektrony, čímž zvyšuje kontrast vzorku v elektronovém mikroskopu. Po nanesení se kontrastní činidlo nechá krátce působit, a pak se opět odstraní přebytek kapaliny.

Poté se síťka nechá zcela oschnout na vzduchu. Je důležité, aby byl vzorek před vložením do mikroskopu zcela suchý, protože přítomnost jakýchkoli kapalin by mohla v TEM způsobit pokles vakua a vypnutí zdroje elektronového svazku. Suchá síťka s připraveným vzorkem je následně umístěna do držáku vzorku mikroskopu a analyzována pomocí TEM (obr. 2B).



Obr. 2. Schematický pracovní postup přípravy a analýzy biologického vzorku pomocí transmisní elektronové mikroskopie. (A) aplikace roztoku biologického vzorku na měděnou sítku potaženou uhlíkovým filmem. (B) Držák se vzorkem umístěný v elektronovém mikroskopu. (C) Ukázka mikroskopického snímku biologického vzorku obsahující proteinové komplexy fotosystému II. Specifické projekce fotosystému II jsou vybrány pro obrazovou analýzu (žluté čtverce). (D) Ukázka výsledku obrazové analýzy velkého datového souboru obsahující různé projekce fotosystému II.

Analýza obrazu jednotlivých částic („single particle analysis“, SPA)

SPA je pokročilá metoda, která umožňuje studovat struktury makromolekulárních komplexů, jako jsou proteiny, bez potřeby krystalizace. Tato technika je založena na analýze velkého počtu dvoudimenzionálních (2D) projekcí rozličně orientovaných částic v mikroskopických snímcích, což nakonec umožňuje i rekonstrukci jejich trojdimenzionální (3D) struktury.

Základní princip této metodiky je uveden v následujících bodech:

1. Příprava vzorku a získání obrazů

SPA začíná analýzou biologického vzorku v TEM, která obnáší získání velkého množství snímků. Tyto snímky obsahují tisíce malých, náhodně orientovaných kopií stejného proteinového komplexu (obr. 2C).

2. Výběr a klasifikace 2D projekcí částic

V jednotlivých snímcích jsou identifikovány a vybrány jednotlivé projekce částic (obr. 2C). Tento proces může být automatizován pomocí softwaru, který detekuje jednotlivé proteinové komplexy. Následně jsou vybrané částice z jednotlivých snímků extrahovány, klasifikovány podle podobnosti a seskupeny do tříd, přičemž každá třída obsahuje obrazy s podobnou orientací.

3. Zarovnání a průměrování

Obrazy v každé třídě jsou translačně a rotačně srovnány do jedné pozice (orientace) a maximalizována jejich shoda. Ze srovnaných částic v rámci každé třídy se počítá průměrná projekce, čímž se zvýší poměr signál oproti šumu a získá se jedna "průměrná" 2D projekce pro každou třídu (obr. 2D). Tato průměrná projekce je jasnější a podrobnější než jednotlivé projekce částic. Tyto průměrné projekce jsou pak interpretovány a popsány pomocí strukturního modelu.

Pracovní postup:

Příprava vzorku fotosystému II

V rámci úlohy budou analyzovány molekuly fotosystému II, který byl separovaný pomocí nativní elektroforézy a následně eluován do pufru. Tento proteinový komplex se skládá z více jak 25 různých podjednotek a má obdélníkový tvar o rozměrech přibližně 18 x 28 nm.

Příprava vzorku pro elektronovou mikroskopii

Vzorek fotosystému II pro elektronovou mikroskopii připravíme na měděné síťce potažené slabým uhlíkovým filmem. Před aplikací vzorku upravíme uhlíkový film na síťce pomocí doutnavého výboje, což způsobí, že film nabude hydrofilních vlastností a zlepší své adsorpční vlastnosti pro proteinové komplexy. Po této úpravě nanese na síťku 5 μ l vzorku a po 1 min odsajeme přebytek vzorku filtračním papírem. Následuje krok kontrastování, kdy na síťku nanese 5 μ l 2% roztoku uranylacetátu („negative staining“). Po cca 1 min přebytek kontrastní látky odsajeme filtračním papírem a necháme vzorek uschnout.

Kontrola vzorku v elektronovém mikroskopu

Vedoucí úlohy umístí připravený vzorek do držáku a ten poté vloží do mikroskopu. Následuje kontrola vzorku při různých hodnotách zvětšení mikroskopu, která je zaměřena především na kontrolu optimální koncentrace komplexů fotosystému II a jeho kontrast. Dle potřeby se zásobní roztok fotosystému II může naředit pufrem, případně se upraví doba kontrastování vzorku. Na optimálním vzorku se pořídí série snímků.

Ukázka analýzy snímků z mikroskopu a získání 2D projekční mapy molekuly fotosystému II

Série snímků fotosystému II bude podrobena obrazové analýze, která zahrnuje výběr jednotlivých projekcí molekul fotosystému II a jejich následné srovnání, rozdělení do tříd a výpočet průměrných projekcí v jednotlivých třídách. Všechny tyto kroky jsou realizovány pomocí speciálního softwaru, jehož klíčové funkce budou stručně představeny v průběhu řešení úlohy.

Diskuze získaných výsledků

Výsledky obrazové analýzy budou diskutovány z hlediska typu projekcí molekul fotosystému II a dále z hlediska jeho rozlišení v jednotlivých třídách. Po této diskusi bude následovat obecnější debata o transmisní elektronové mikroskopii a obrazové analýze projekcí proteinových komplexů, během které budou zodpovězeny dotazy studentů.