Mikrosvět živých systémů očima mikroskopie

RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.

Katedra Biofyziky
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého, Olomouc

Obsah

Světelná mikroskopie

- úvod a vznik světelné mikroskopie
- limitace rozlišení světelné mikroskopie
- fluorescenční mikroskopie
- konfokální mikroskopie
- super-rozlišovací mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie

- vznik a princip metody
- 2D analýza vzorků při pokojové teplotě
- 3D analýza vzorků při nízké teplotě - kryogenní mikroskopie a kryogenní tomografie

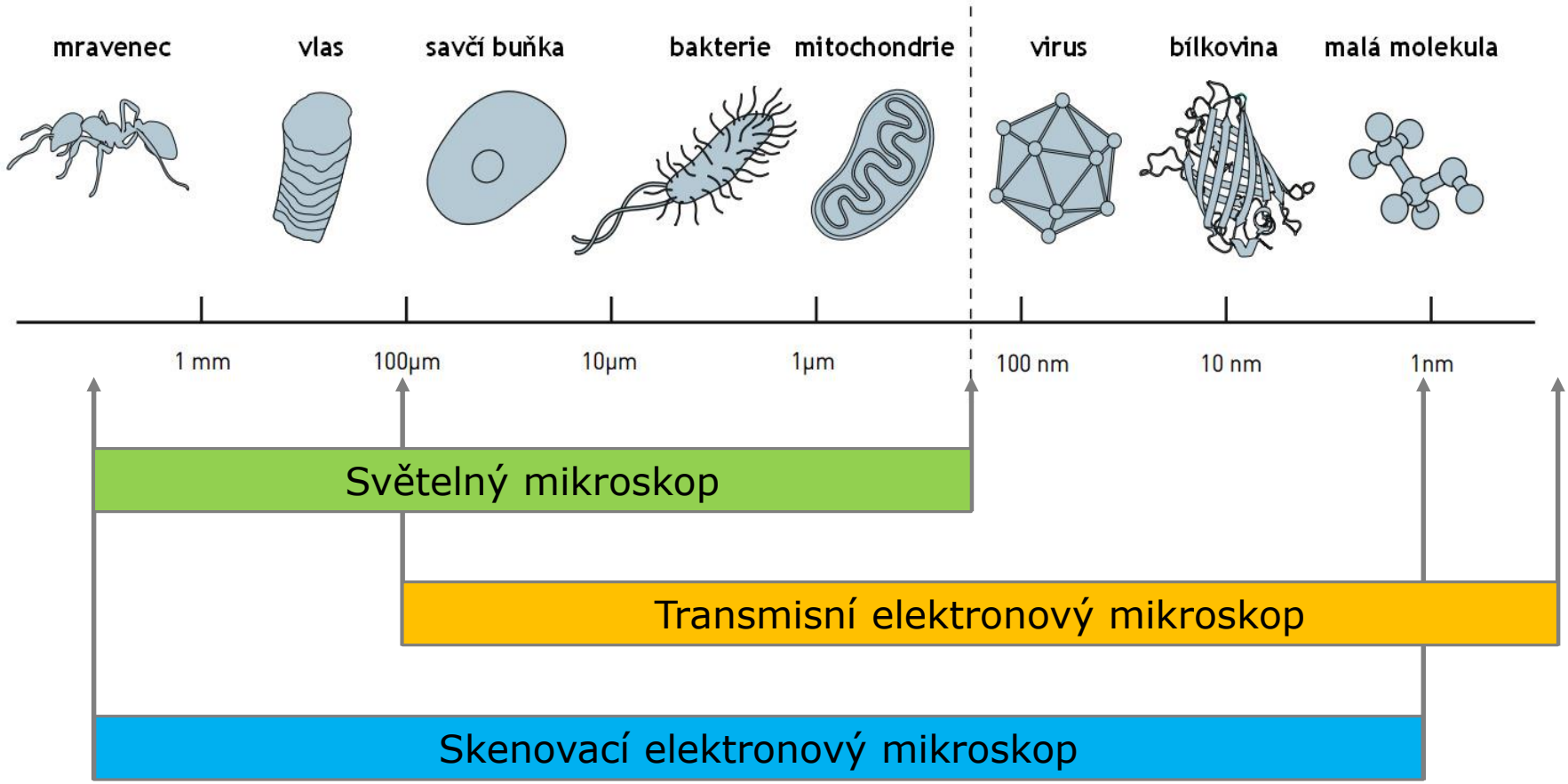
Skenovací elektronová mikroskopie

- princip a aplikace metody

Mikroskopie skenující sondou

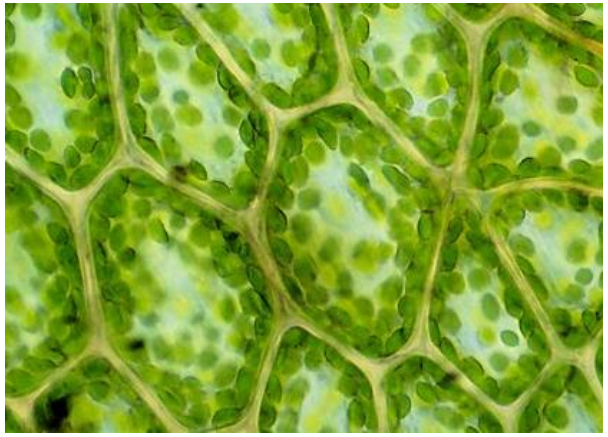
- princip a aplikace metody

Mikroskopie - vizualizace mikroskopických objektů



Mikroskopie - vizualizace mikroskopických objektů

Světelný mikroskop

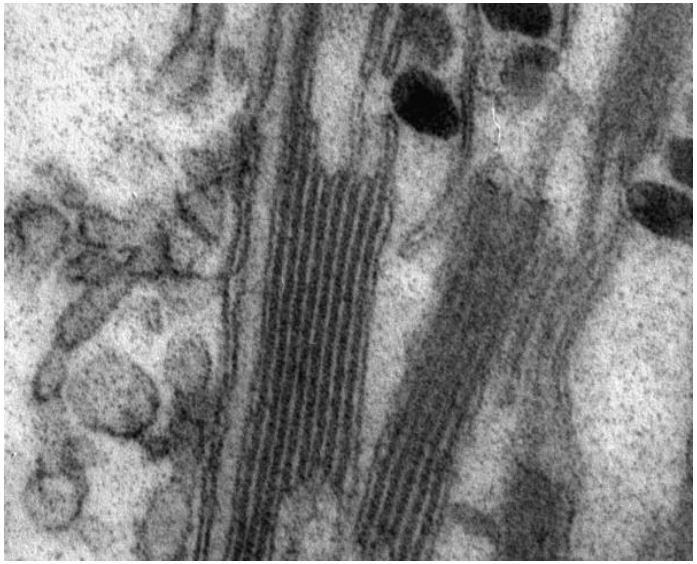


Rostlinné buňky s chloroplasty

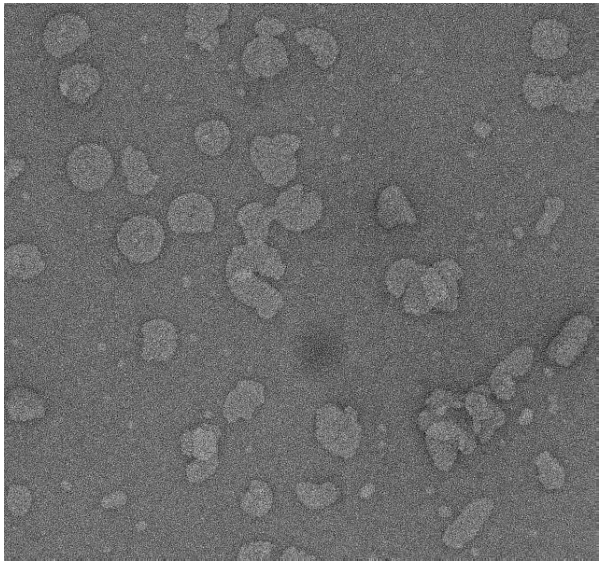
Skenovací elektronový mikroskop

Octomilka obecná, *Tardy et al. (2012) Fly*

Transmisní elektronový mikroskop



Řez: tylakoidní membrány



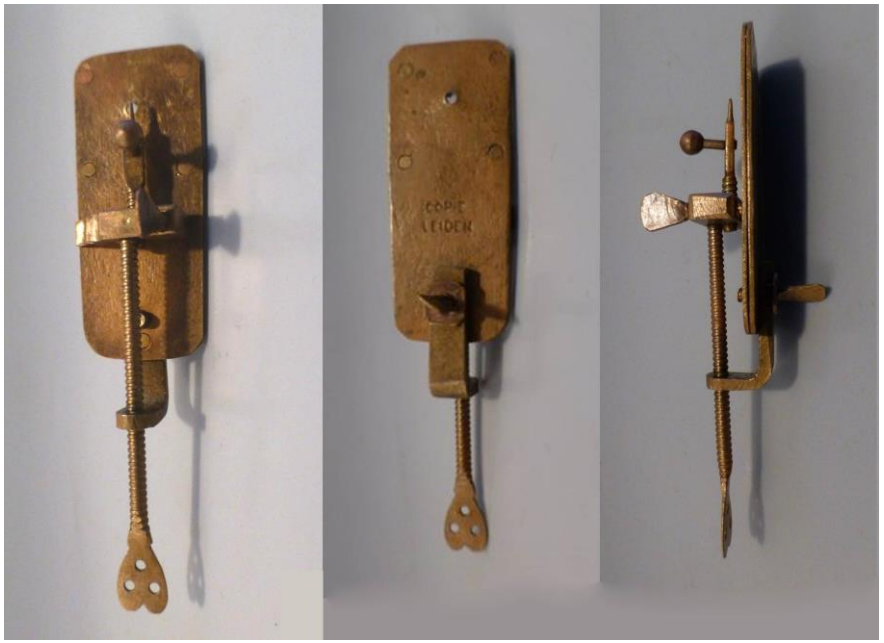
izolovaný fotosystém I ze sinic

Počátky mikroskopie = světelná mikroskopie

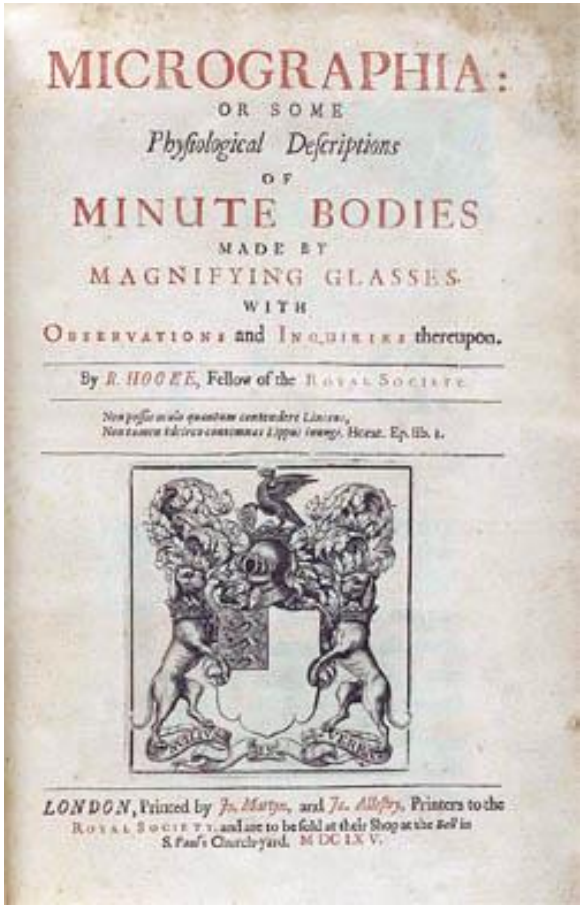
- zrak je dominantní smysl člověka
- světelná mikroskopie využívá viditelnou část spektra slunečního záření
- Robert Hooke (1665) a Antonie van Leeuwenhoek (1670) – zakladatelé světelné mikroskopie

Robert Hooke – první složený mikroskop

Replika Leeuwenhoekova mikroskopu
Boerhaave Museum, Leiden, Nizozemí



Mikrosvět očima Roberta Hooka

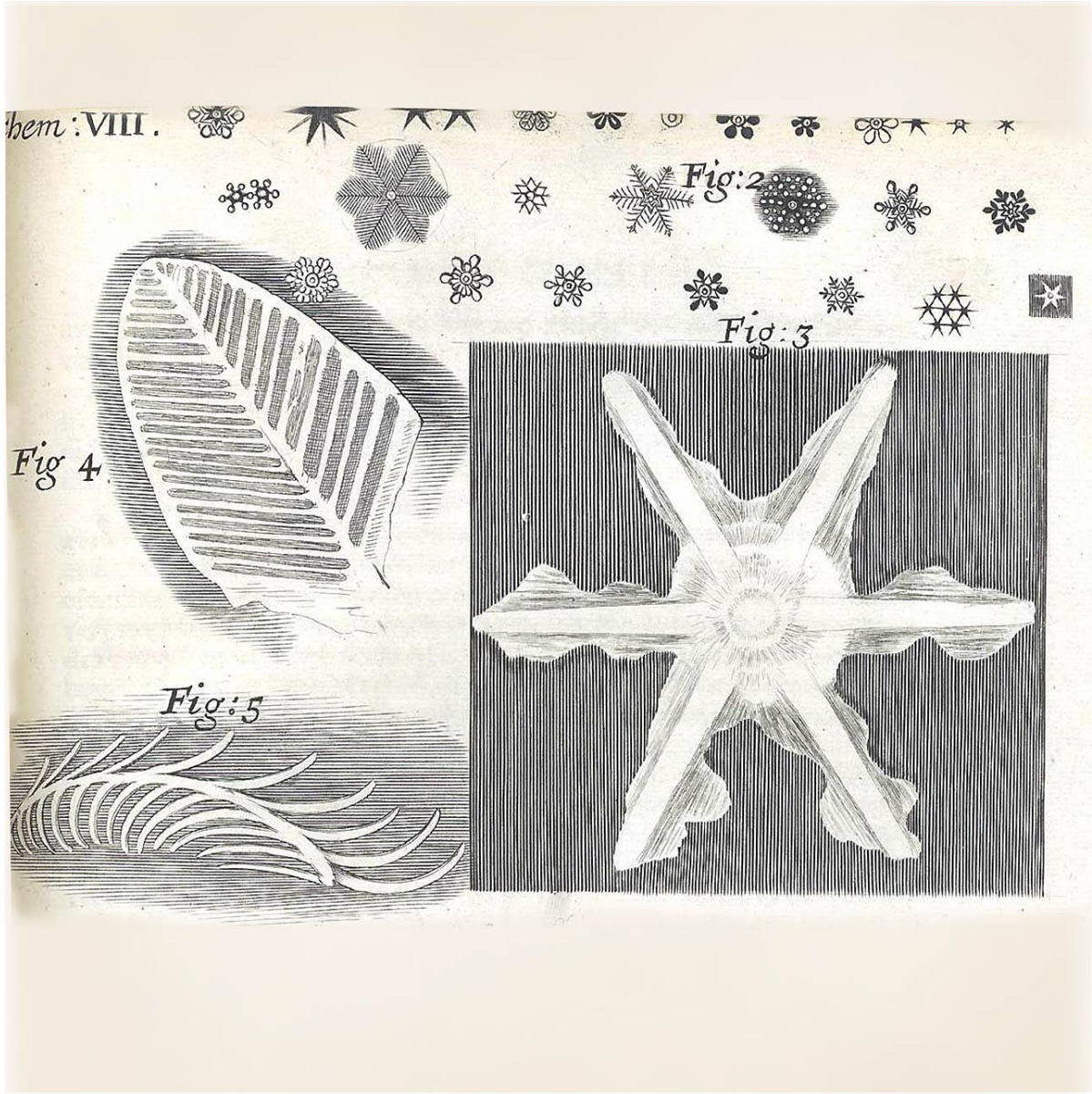


MICROGRAPHIA:
OR SOME
Physiological Descriptions
OF
MINUTE BODIES
MADE BY
MAGNIFYING GLASSES.
WITH
OBSERVATIONS and INQUIRIES thereupon.

By *R. HOOKE*, Fellow of the ROYAL SOCIETY.

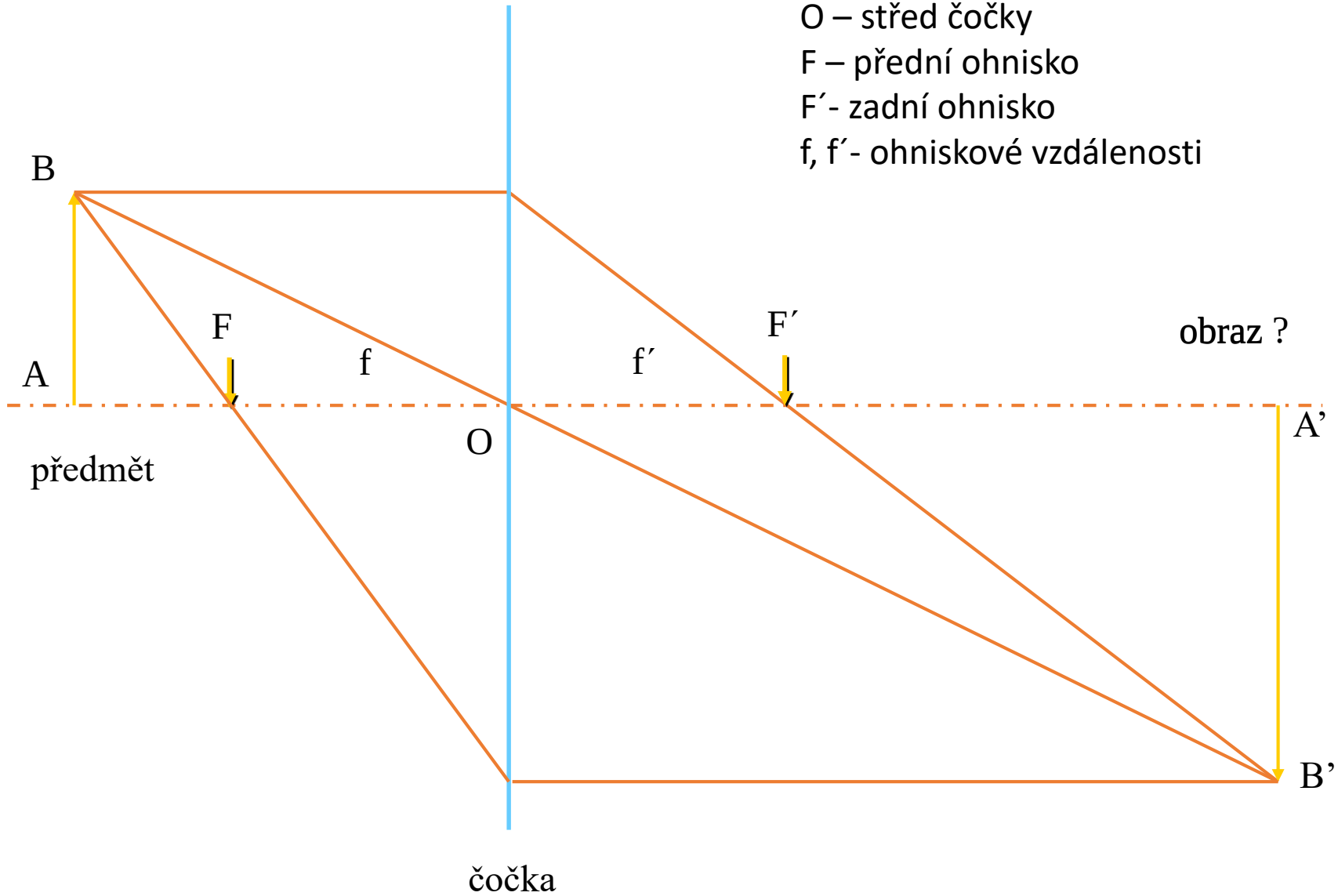
Non possum omnia quæ tentandæ Laudes,
Nec tamen iterum continuare Labor eadem. Horat. Ep. lib. 1.

LONDON, Printed by *Jo. Martyn*, and *Ja. Allestry*, Printers to the ROYAL SOCIETY, and are to be sold at their Shop at the Bell in S. Paul's Churchyard. MDCLXV.



Princip zobrazení předmětu skleněnými čočkami

O – střed čočky
F – přední ohnisko
F´- zadní ohnisko
f, f´- ohniskové vzdálenosti



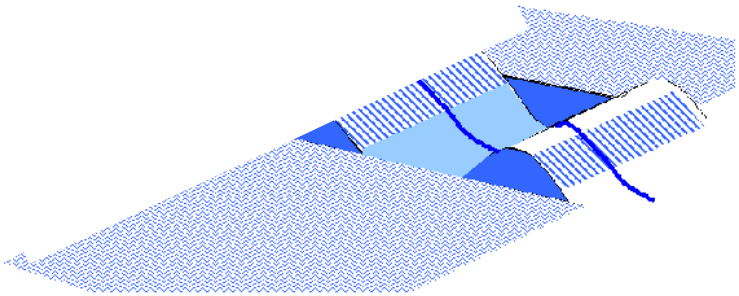
Limitace rozlišení světelné mikroskopie – ohyb světla

Difrakce světla

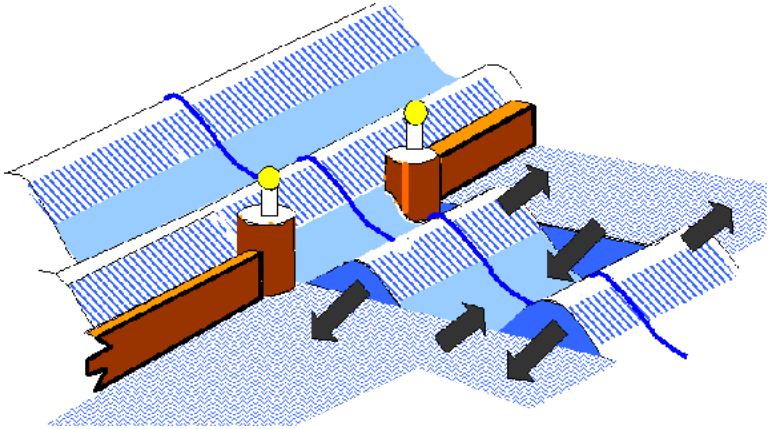
- k ohybu dochází, když vlnění při setkání s překážkou postupuje v jiných směrech, než ve směrech předvídaných zákony **přímočarého šíření**

Analogie difrakce světla s šířením mořských vln v přístavu

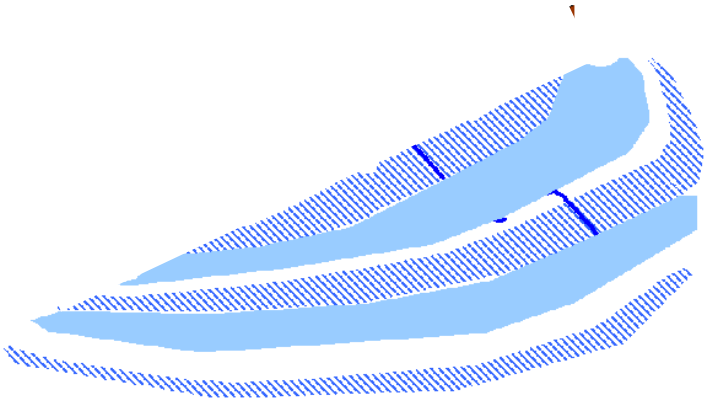
Nereálná situace



Reálná situace



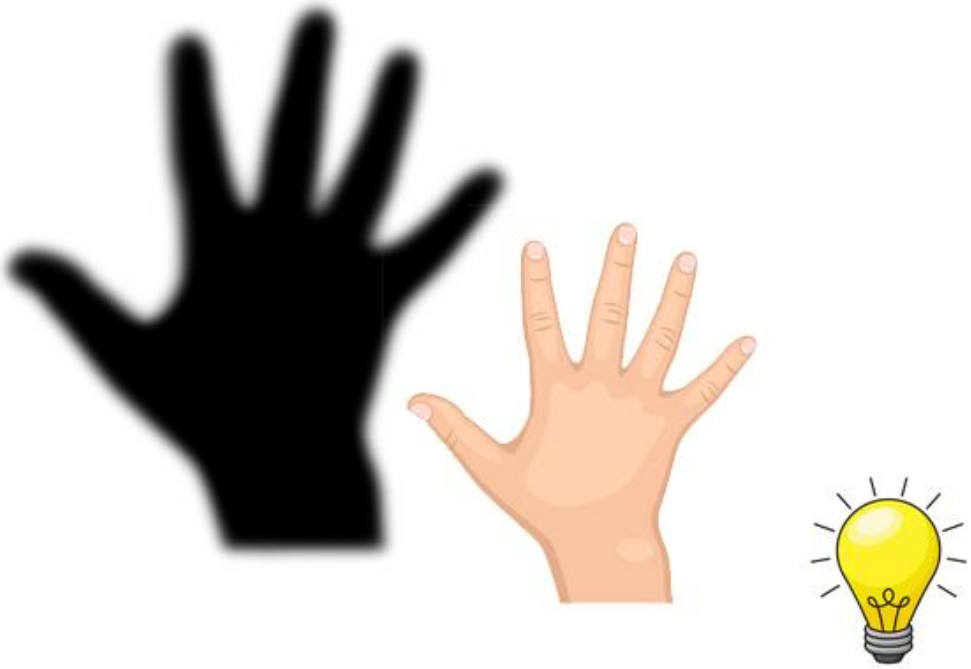
- difrakce světla „rozmaže“ obraz předmětu



Limitace rozlišení světelné mikroskopie – ohyb světla

Difrakce světla

- k ohybu dochází, když vlnění při setkání s překážkou postupuje v jiných směrech, než ve směrech předvídaných zákony **přímočarého šíření**



Při zobrazení předmětu limituje difrakce (ohyb) světla rozlišení v obraze.

Ernst Abbe – určení rozlišovací meze mikroskopu

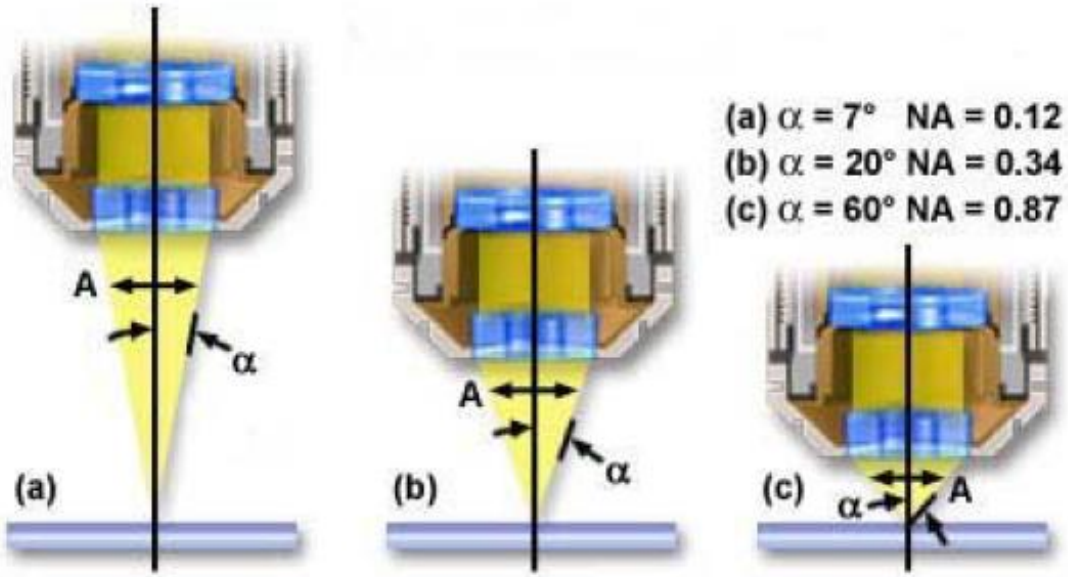
$$d_{min} = \frac{\lambda_0}{n.\sin\alpha_O}$$

λ_0 … vlnová délka světla

$\mathrm{NA} = n.\sin\alpha_O$ … numerická apertura objektivu

n – index lomu

α_0 – aperturní úhel

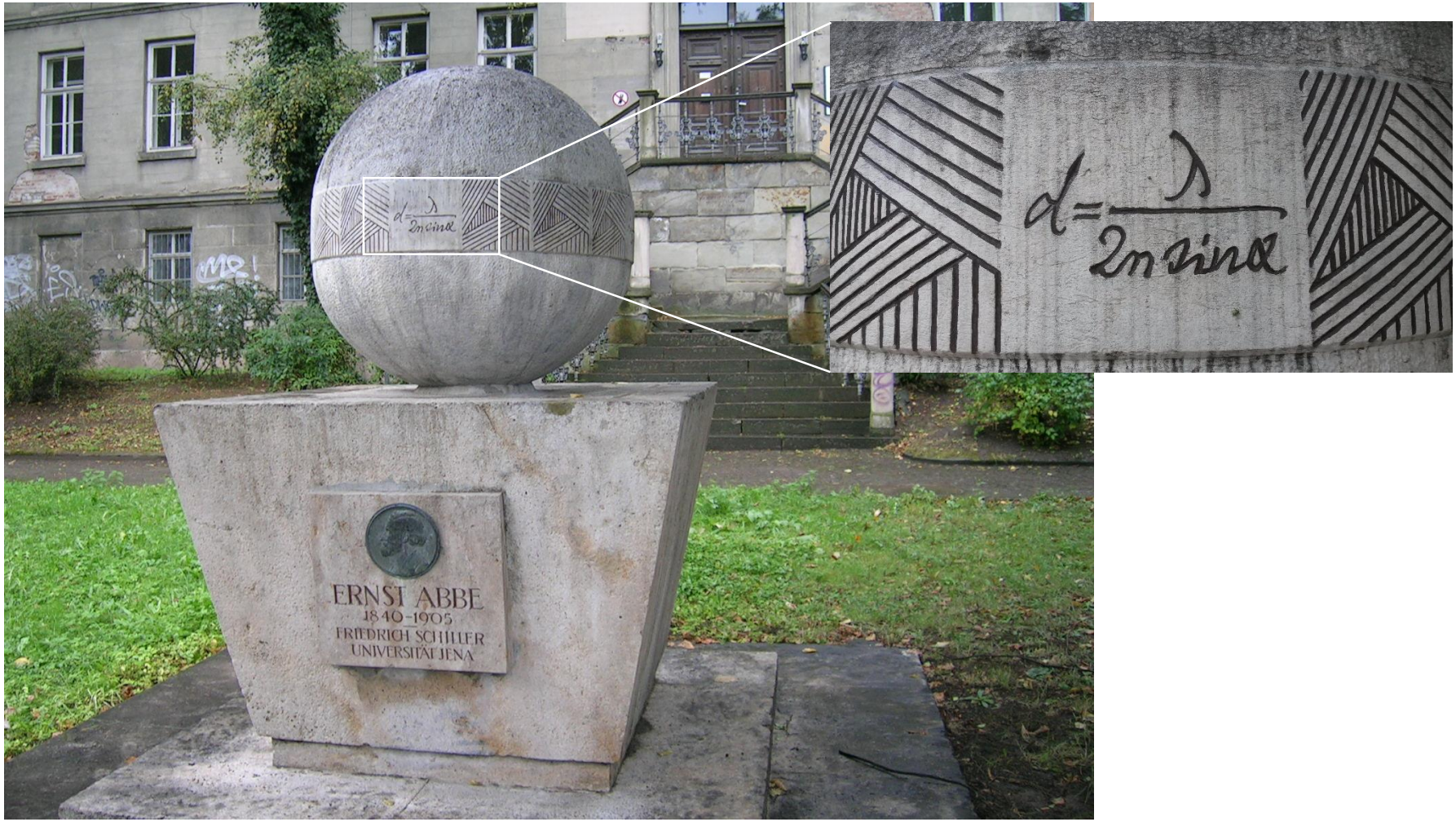


- **rozlišovací mez d_{min}** je minimální vzdálenost dvou bodů předmětu, které v obraze vytvořeným objektivem ještě rozlišíme (body jsou zobrazeny odděleně)

- d_{min} je limitováno vlnovou délkou použitého světla a hodnotou numerické apertury objektivu

Ernst Abbe – určení rozlišovací meze mikroskopu

Univerzita Friedricha Schillera Jena, Německo



*ve vztahu pro rozlišovací mez je zahrnuta numerická apertura objektivu i kondenzoru

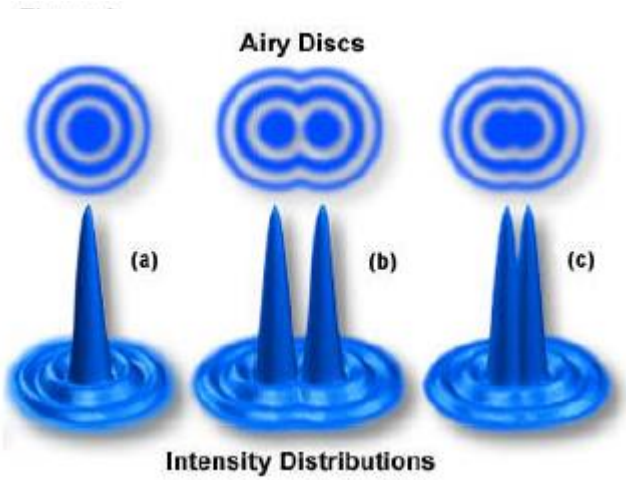
Rayleighovo rozlišovací kritérium

- díky ohybu světla se bod nezobrazí jako ostrý bod, ale jako kruhový disk obklopený difrakčním obrazcem
- při Fraunhoferově ohybu na kruhovém otvoru (apertura objektivu mikroskopu) je **průměr kroužku** promítnutý do roviny předmětu dán vztahem:

$$D = 1.22 \frac{\lambda_0}{NA_{obj}}$$

- dle Rayleighova kritéria, je minimální vzdálenost dvou bodů, které ještě rozlišíme, rovna **poloměru kroužku**

$$\boxed{d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{NA_{obj}} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n.\sin \alpha_O}}$$

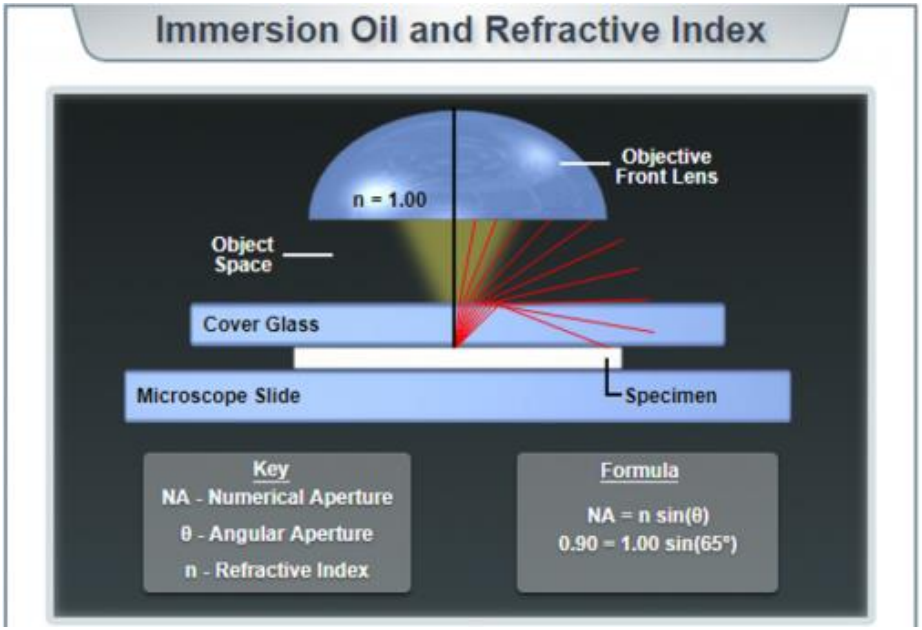


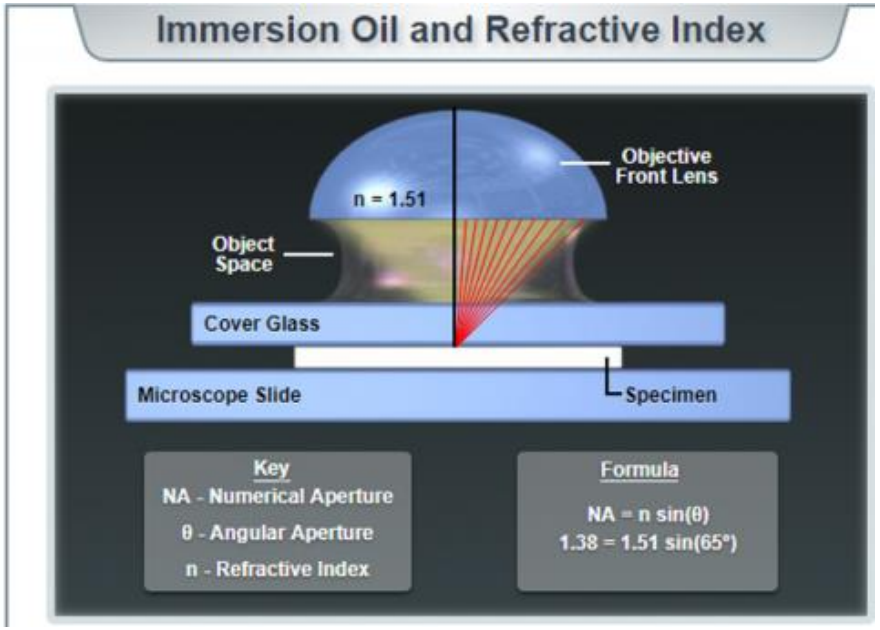
Numerická apertura objektivu a rozlišení

$$d_{min} = 0.61\frac{\lambda_0}{NA_{obj}} = 0.61\frac{\lambda_0}{n.\sin\alpha_O}$$

- snaha **maximalizovat hodnotu numerické apertury** objektivu pro vyšší rozlišení

Imersní metoda: **zvýšení hodnoty indexu lomu *n*** = vyšší rozlišení





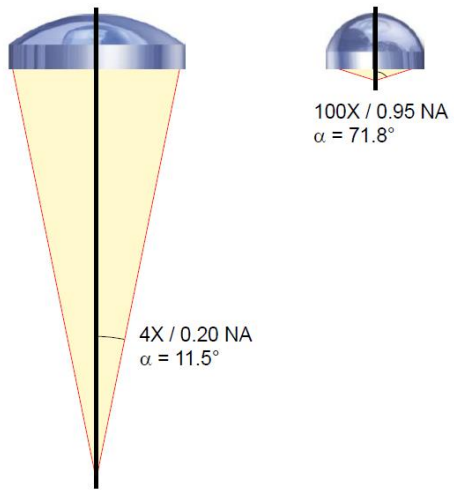
Nikon's MicroscopyU website

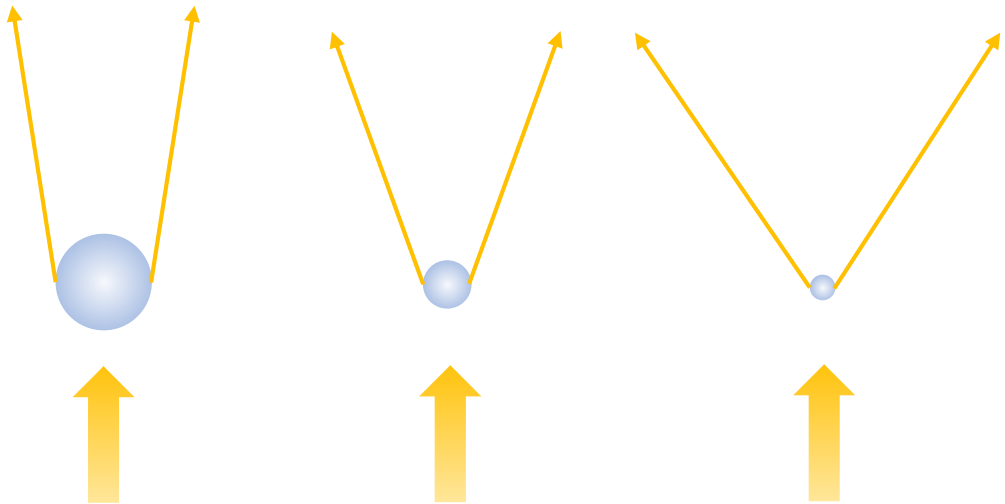
- imerzní olej zvýší hodnotu NA_{obj} a tudíž i rozlišení

Numerická apertura objektivu a rozlišení

$$d_{min} = 0.61\frac{\lambda_0}{NA_{obj}} = 0.61\frac{\lambda_0}{n.\sin\alpha_O}$$

Zvýšení hodnoty aperturního úhlu α = vyšší rozlišení



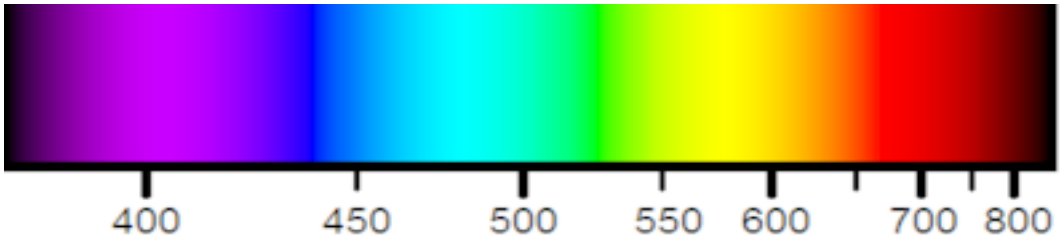


- objektivy s **větším zvětšením a kratší ohniskovou vzdáleností** „sbírají“ rozptýlené paprsky vzorkem pod větším úhlem α
- úhel rozptylu paprsků závisí na **velikosti rozptylujících objektů** (nárůst rozptylu, když se velikost objektu blíží hodnotě vlnové délky světla)
- paprsky rozptýlené pod **větším úhlem** nesou strukturní informaci o **menších částech vzorku** = větší rozlišení

Vlnová délka světla a rozlišení

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{NA_{obj}} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n.\sin\alpha_O}$$

- **vyšší rozlišení** dosáhneme při použití světla s **kratší vlnovou délkou**
- viditelná část spektra v rozmezí cca 380 – 740 nm



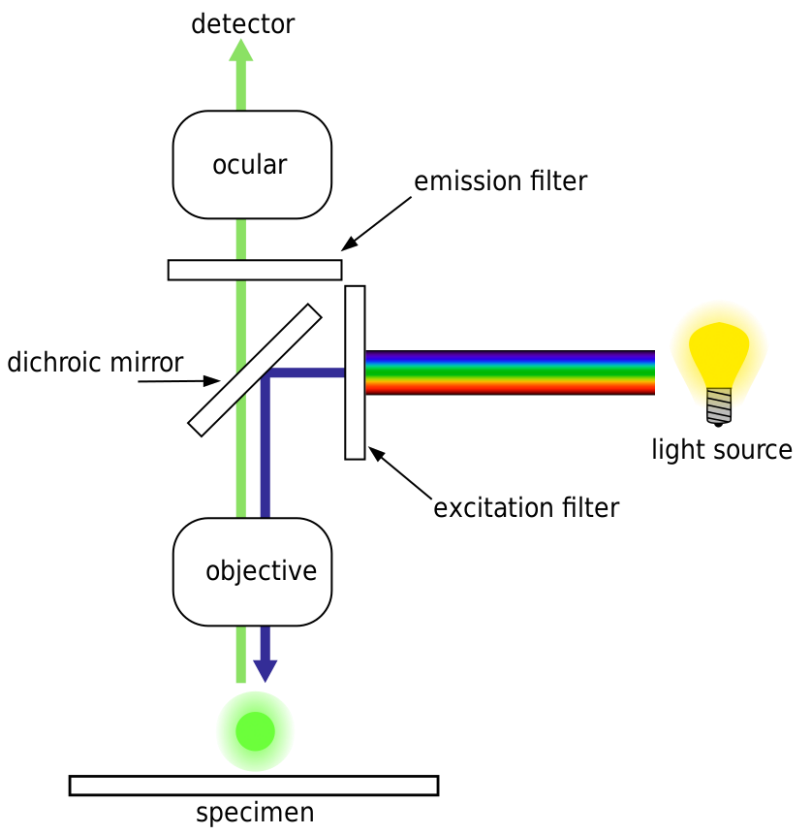
- maximální rozlišení ve světelné mikroskopii dosáhneme s použitím modrofialového světla

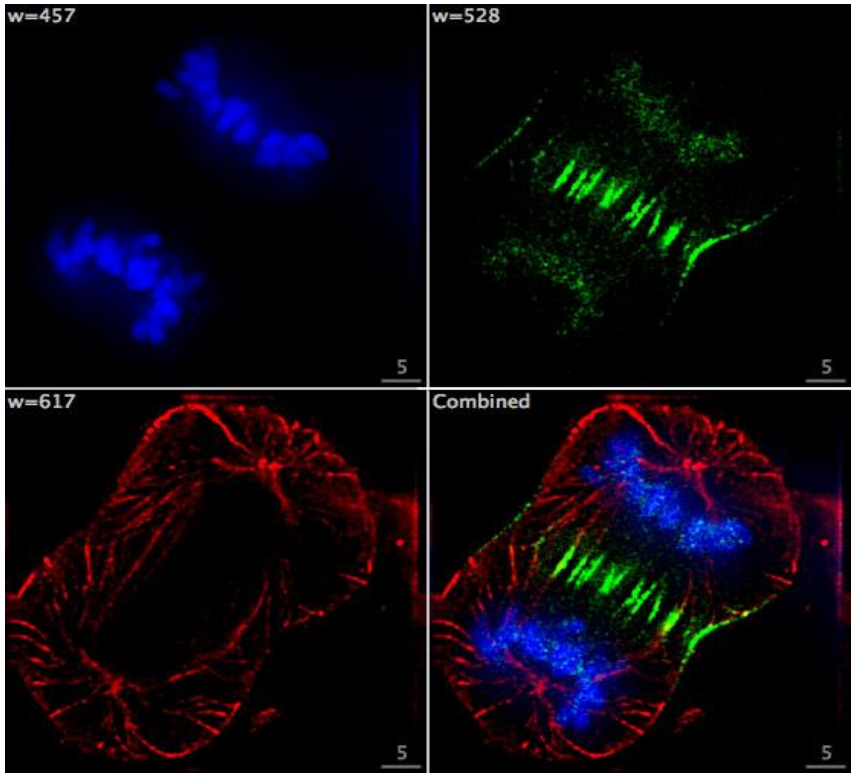
Vhodnou kombinací objektivu s maximální numerickou aperturou a modrofialového světla dosáhnout v klasické světelné mikroskopii rozlišení cca 200 nm.

- rozvoj alternativních metod snažících se obejít difrakční limit
- závislost rozlišení na vlnové délce záření vedla ke vzniku elektronové mikroskopie (vlnová délka elektronového svazku je menší o 5 řádů)

Využití fluorescence – počátek cesty k pokoření difrakčního limitu

Fluorescenční mikroskopie





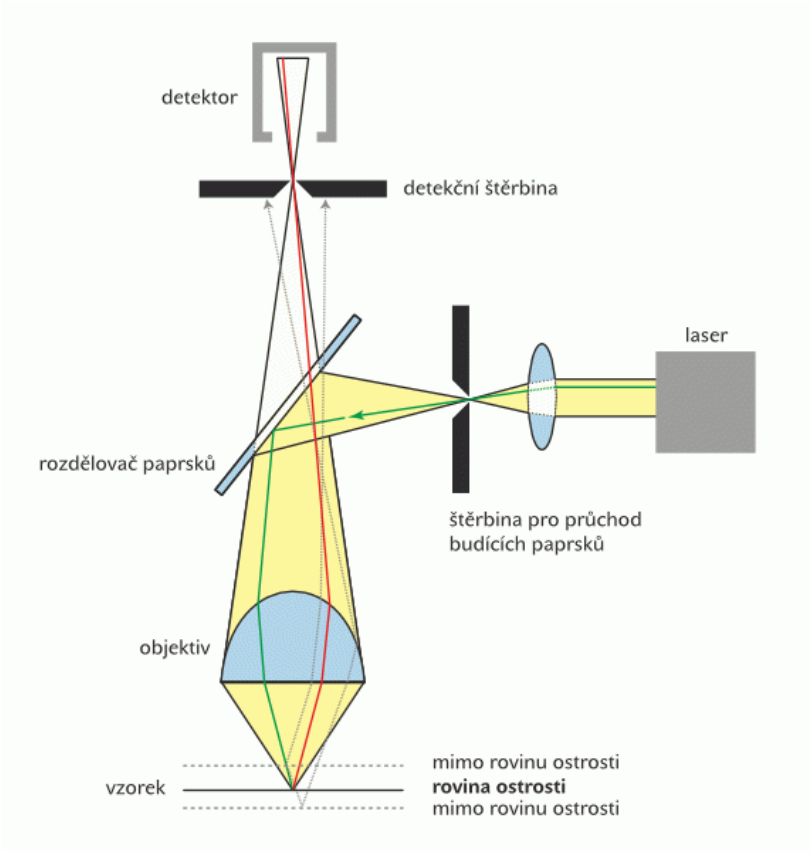
Dělící se buňka s obarvenou DNA pomocí fluorescenční molekuly DAPI (modrá), s obarvenou buněčnou bílkovinou INCENP (zelená) a tubulinem (na obrázku červeně)

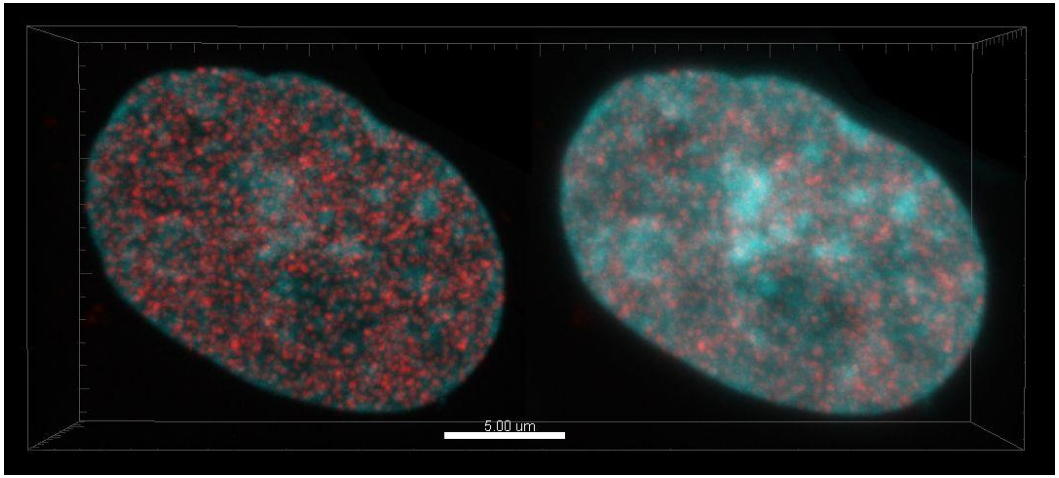
- studium fluorescenčních materiálů – preparát obsahuje fluorofor ⇒ **auto-fluorescence**
- sekundární fluorescence – dodání **fluorescenční značky** (imunologie nebo značkování na úrovni genu pomocí GFP, YFP, …)

Nevýhoda: fluorescenční signál pochází i z roviny nad a pod rovinou fokusace – nižší rozlišení

Využití fluorescence – počátek cesty k pokoření difrakčního limitu

Konfokální skenující laserová mikroskopie





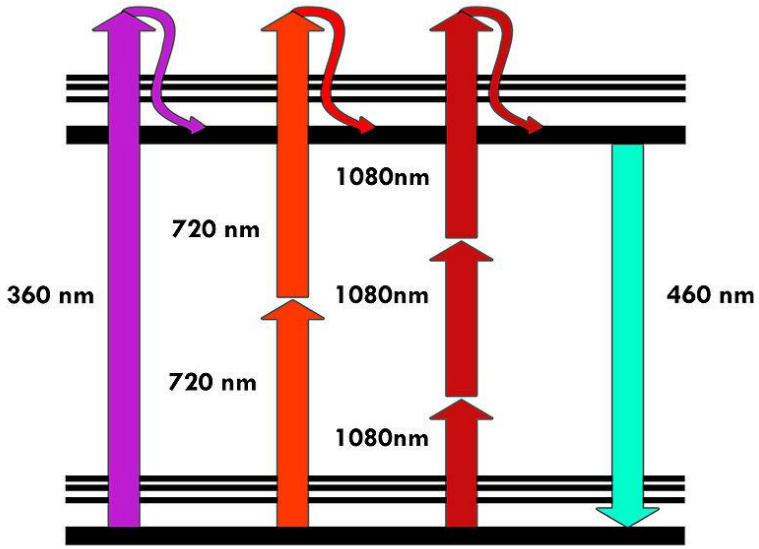
Steffen Dietzel

Srovnání 3D rekonstrukce fixovaného a obarveného jádra HeLa buňky získané pomocí konfokálního mikroskopu v konfokálním módu (vlevo) a nekonfokálním módu s vyřazenou detekční štěrbinou (vpravo)

- využívá fokusovaný laserový paprsek, který je postupně skenován v dané rovině *z* po povrchu vzorku
- dvě štěrbiny (pinhole) mechanicky odcloní neostrou informaci vznikající nad a pod rovinou ostrosti $\Rightarrow$ získání tenkého optického řezu vzorkem
- rekonstrukce 3D obrazu z více optických řezů

Využití fluorescence – počátek cesty k pokoření difrakčního limitu

Dvou-fotonová fluorescenční (excitační) mikroskopie



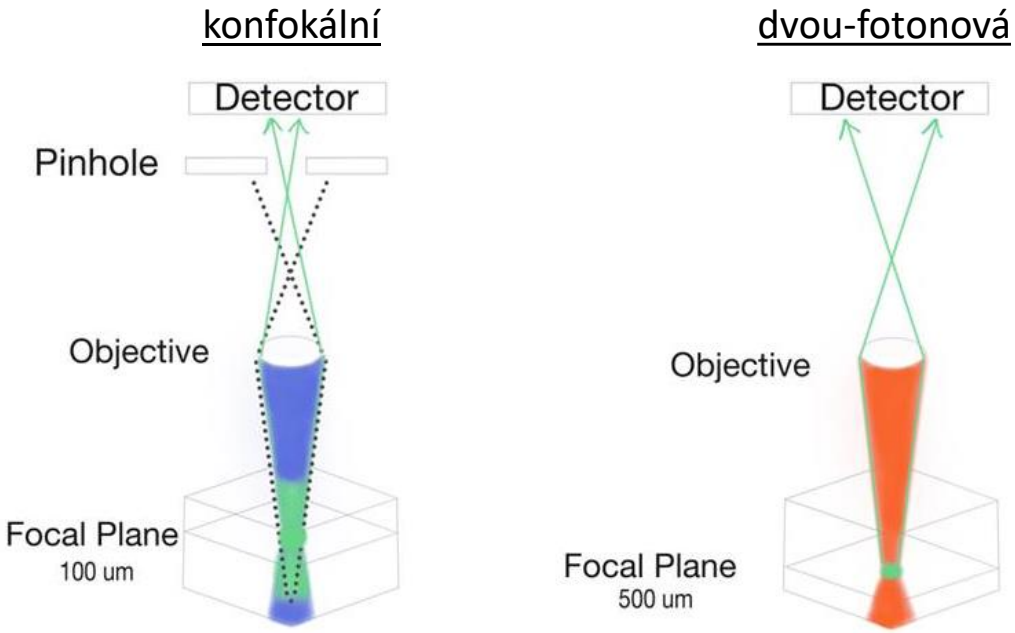
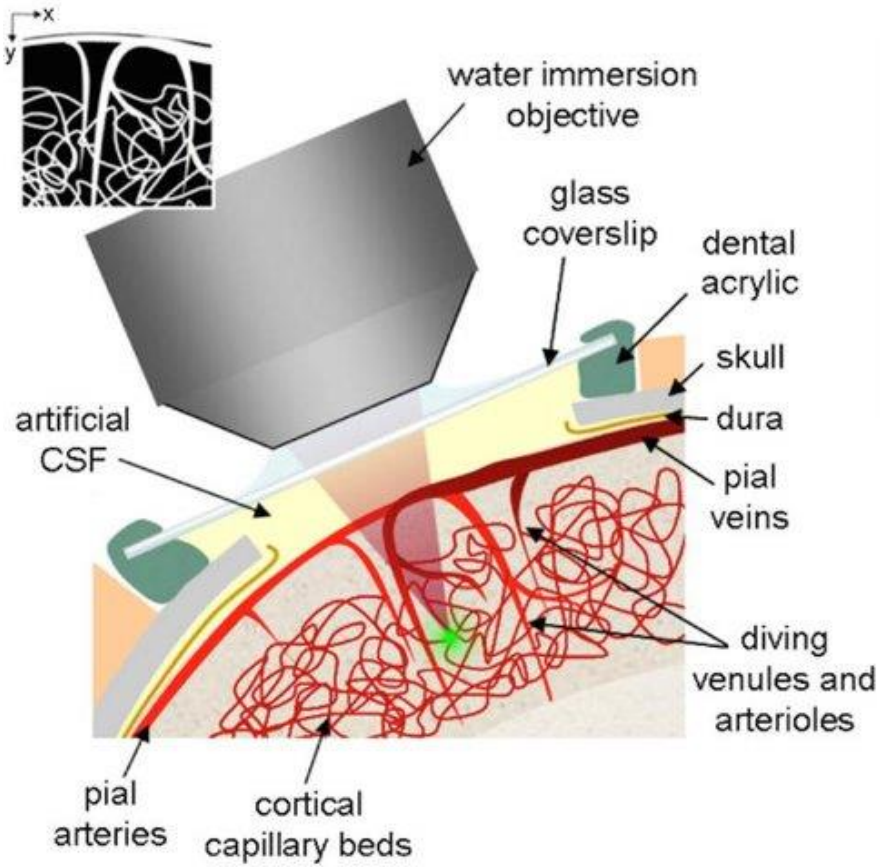


Image credit: Victoria Sun

- excitace fluoroforu díky absorpci dvou/třech fotonů o nižší energii
- pravděpodobnost dvou-fotonové excitace roste kvadraticky s intenzitou budicího záření ⇒ veškeré nežádoucí záření z nezaostřených rovin je zanedbatelné
- eliminuje se problém s fotodegradací fluorescenčních značek – mimo fokusované ohnisko je excitace molekul nízká
- dlouhovlnné excitační záření proniká vzorkem lépe ⇒ vhodné pro studium tlustých vzorků

Využití fluorescence – počátek cesty k pokoření difrakčního limitu

Dvou-fotonová fluorescenční (excitační) mikroskopie



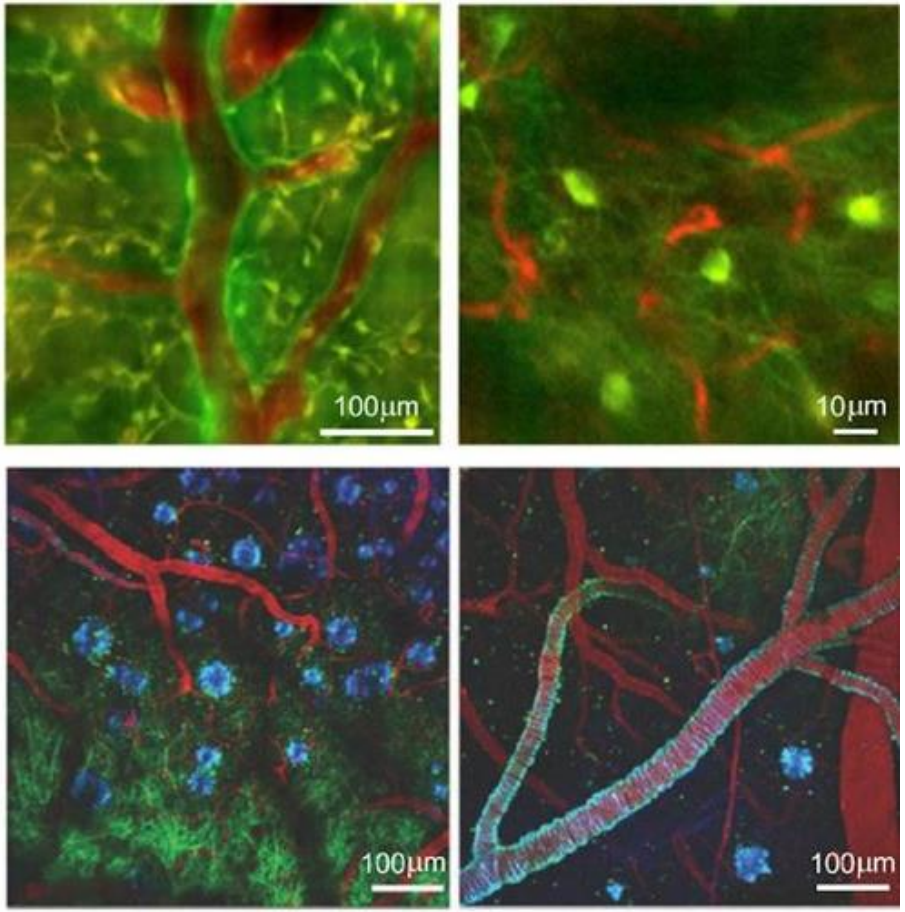
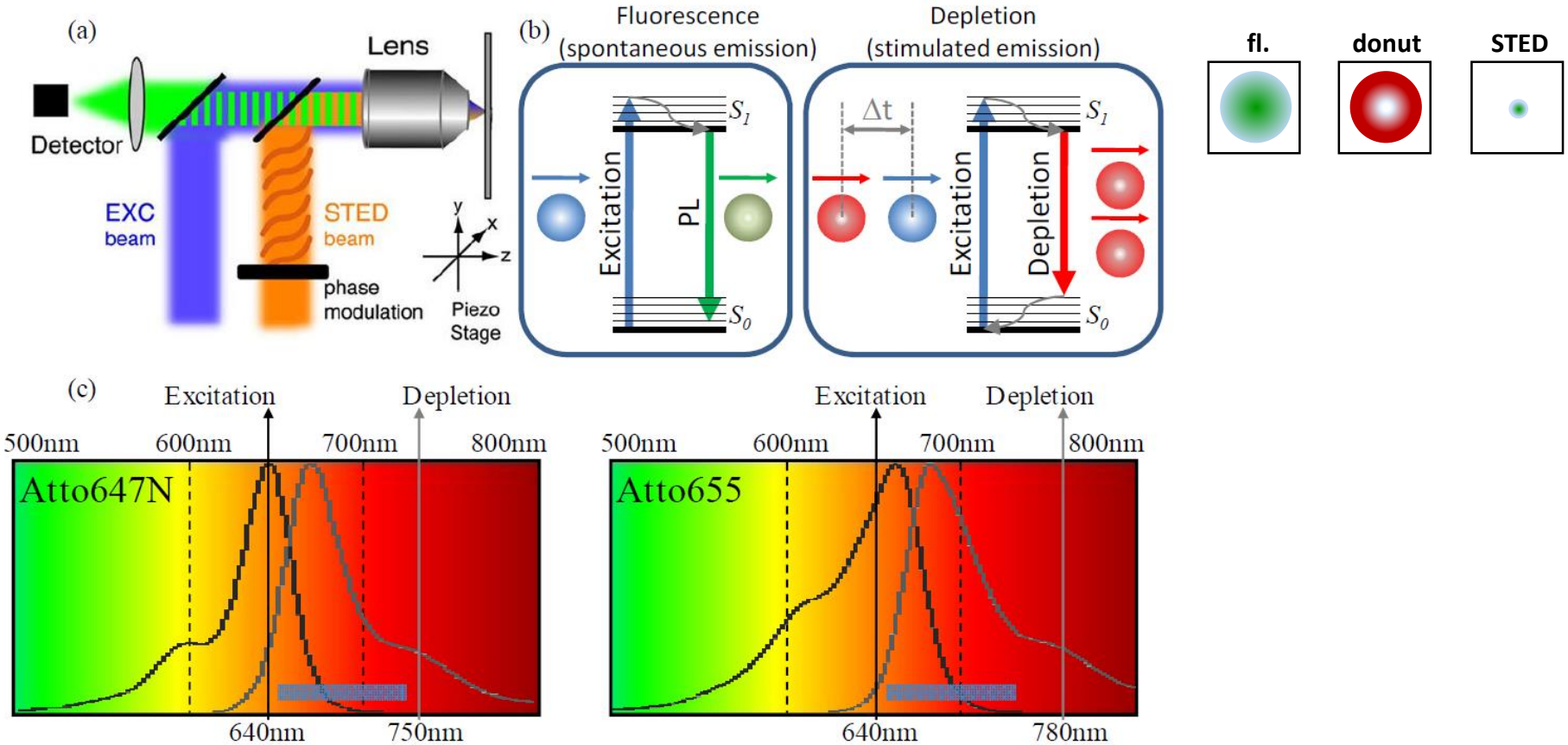


Schéma uspořádání mikroskopu a části myšího mozku pro dvou-fotonovou excitační mikroskopii.
Horní obrázky znázorňují neurony (zelená) a cévy (červeně). Spodní obrázky zobrazují navíc obarvený amyloid (modrá). Image credit: Elizabeth Hillman.

Super-rozlišovací mikroskopie STED – pokoření difrakčního limitu

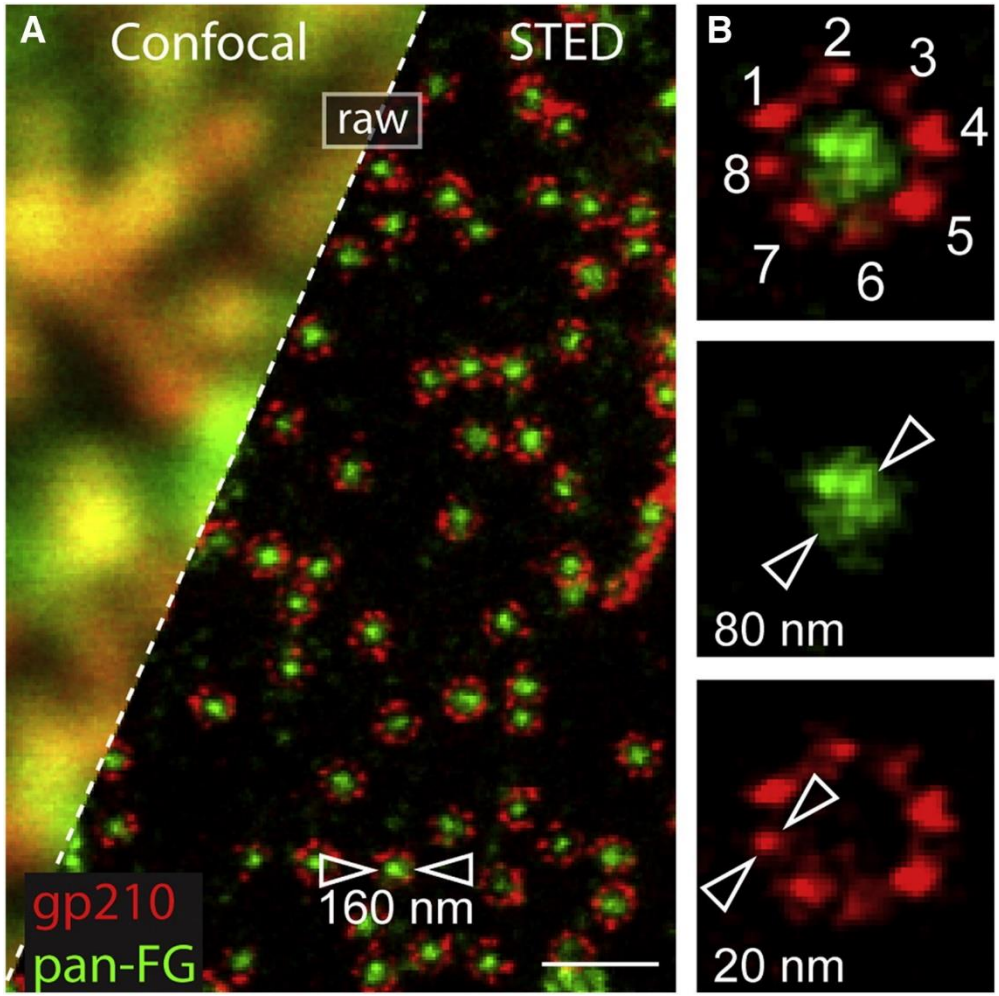
- STED obchází difrakční limit konfokální mikroskopie díky stimulované emisi fluoroforu

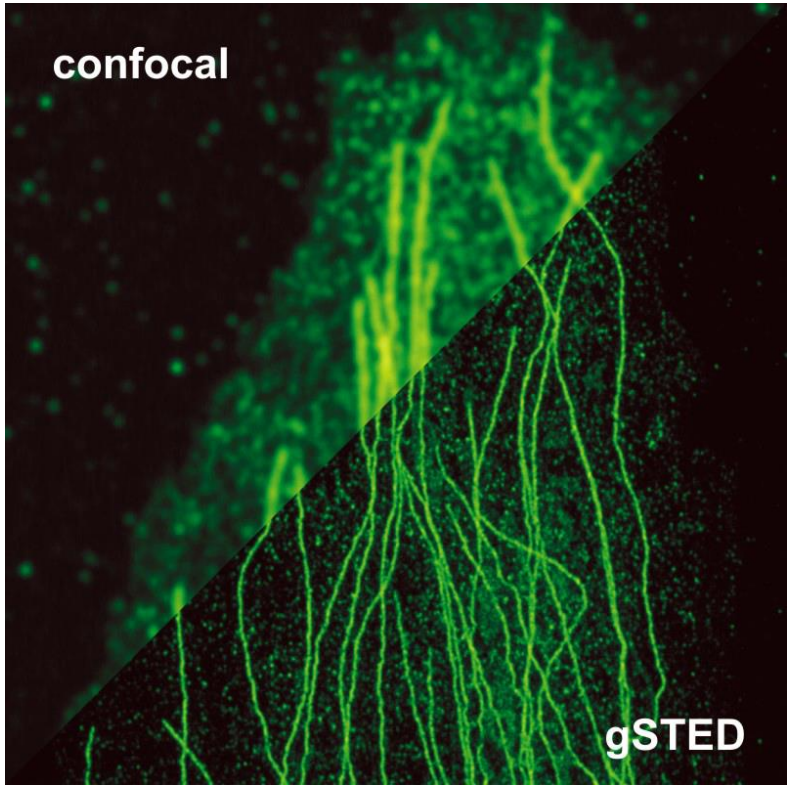


- laserový **EXC pulz** vyvolá spontánní fluorescenci – detekce fluorescence je limitována difrakčním limitem
- následný **STED pulz** (Δt a posunutý k delší λ) má tvar „donatu“ (díky průchodu speciální fázovou modulační destičkou) a vyvolá **stimulovanou emisi** fluorescence (o stejné λ jako **STED pulz**)
- stimulovaná fluorescence je mimo detekční okno spontánní fluorescence $\Rightarrow$ detekujeme spontánní emisi pocházející ze středu „donatu“ – **zpřesnění polohy fluoroforu – vyšší rozlišení**

Super-rozlišovací mikroskopie STED – pokoření difrakčního limitu

- pomocí STED lze dosáhnout o řád vyššího rozlišení (okolo 20 nm) v porovnání s klasickou světelnou mikroskopií





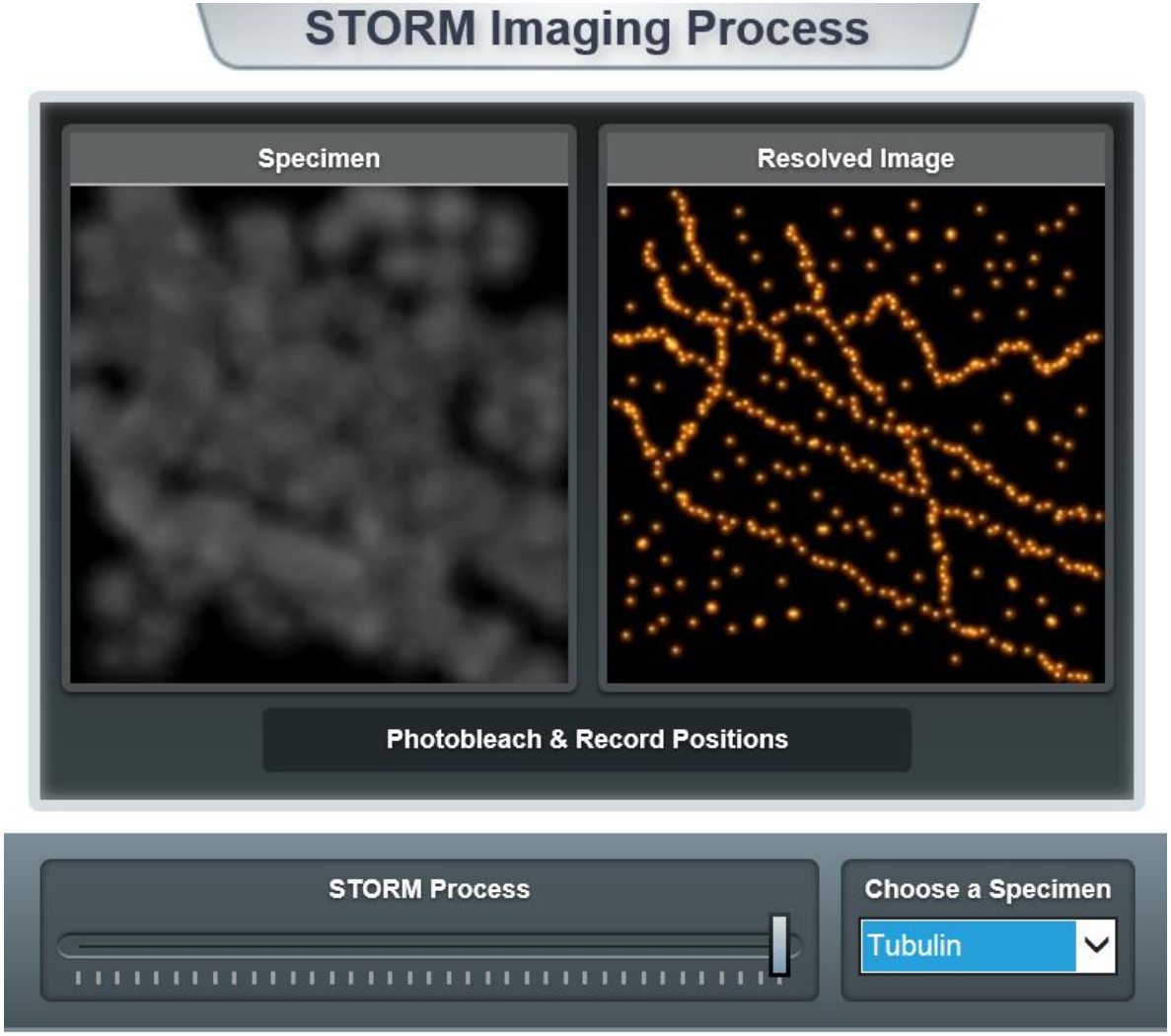
Srovnání zobrazení vláken tubulinu pomocí konfokálního a STED mikroskopie (www.picoquant.com).

(A) A near-infrared nanosecond-pulsed STED reveals immunolabeled subunits in amphibian NPC (nuclear pore complexes); raw data smoothed with a Gaussian filter extending over 14 nm in FWHM. The diameter of the octameric gp210 ring is established as ~160 nm. Scale bar, 500 nm. (B) Individual NPC image showing eight antibody-labeled gp210 homodimers as 20–40 nm sized units and a 80 nm-sized localization of the subunits in the central channel (Göttfert et al. (2013) Biophys J 105: L01-L03).

Super-rozlišovací lokalizační mikroskopie – pokoření difrakčního limitu

- metody GSDIM, STORM, PALM a FPALM využívají stejný princip pro přesnou lokalizaci fluoroforu ve snímku
- fluorofory mají dva stavy – fluorescenční (po excitaci molekuly) a temný (neaktivní)
- opakovaně se detekuje vždy pouze část fluoroforů (nízká intenzita excitačního pulzu)
- fotony nasnímané z jednoho fluoroforu jsou detekovány pomocí CCD – lokaci ovlivňuje rozptylová funkce (PSF, point spread function)
- matematicky určí střed PSF a danému fluoroforu se tím přiřadí přesnější pozice $\Rightarrow$ lze dosáhnout **rozlišení až v jednotkách nm**

Ukázka metody STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)



https://www.microscopyu.com/tutorials/stochastic-optical-reconstruction-microscopy-storm-imaging

Transmisní elektronová mikroskopie (EM)

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda_0}{n.\sin\alpha_O}$$

1897 J.J. Thomson objevil a popsal částici – elektron při studiu vlastností katodového záření. Nobelova cena za fyziku v r. 1906.

1924 Louis de Broglie navrhl princip duality částic a vlnění.
Vlnové vlastnosti popsal rovnicí: $\lambda = h/mv$
λ - vlnová délka, h – Planckova konst., m – hmotnost částice, v – rychlost částice
Nobelova cena za fyziku v r. 1929.

1926 Hans Busch ukázal, že symetrické elektromagnetické pole funguje jako čočka pro elektrony.

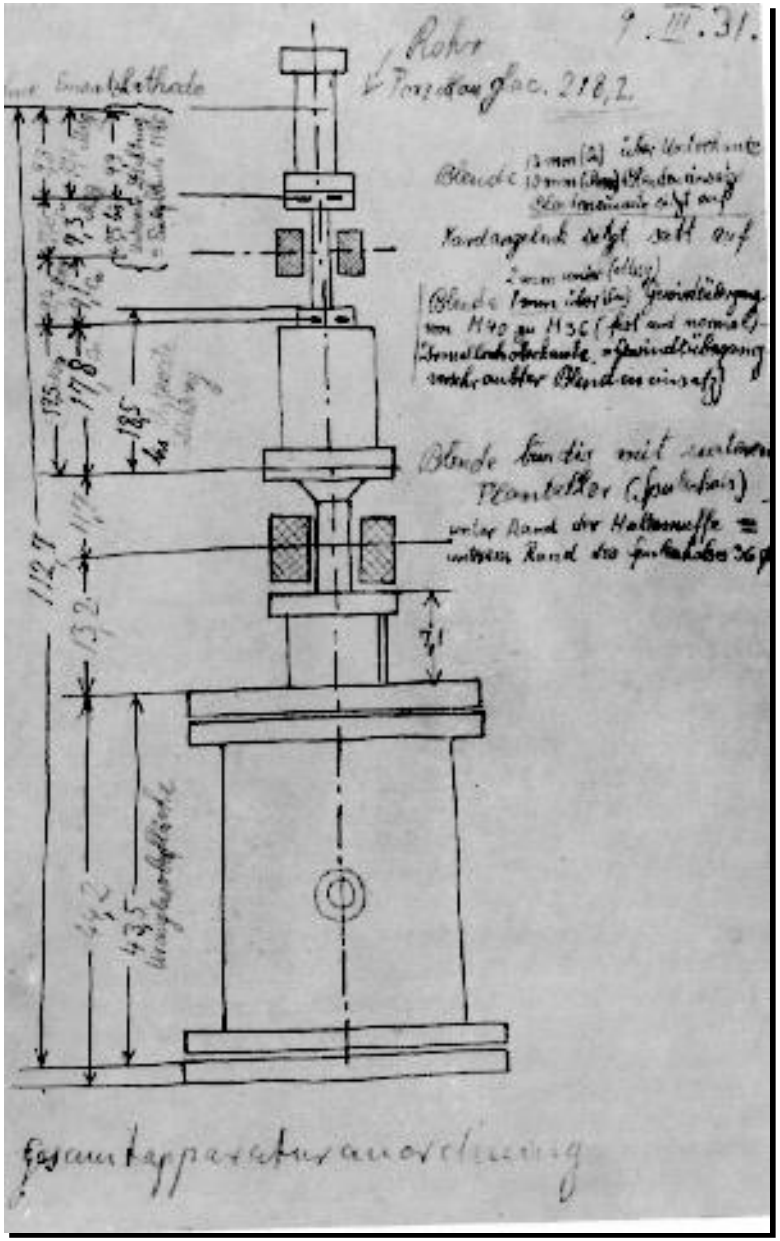
1931 Ernst Ruska a Max Knoll sestavili v Berlíně první elektronový mikroskop se zvětšením 150 – 400x. Nobelovu cenu za fyziku v roce 1986.

Rozlišení transmisní EM není limitováno vlnovou délkou.

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meU}} = \frac{h}{\sqrt{2\left(\frac{eU}{c^2}+m_0\right)eU}} = \frac{h}{\sqrt{2m_0eU\left(1+\frac{eU}{m_0c^2}\right)}} \cong \frac{h}{\sqrt{2meU}} \cong \frac{1.226}{\sqrt{U}}\ [nm]$$

EM s urychlovacím napětím U = 200 kV: λ = 0.0027 nm

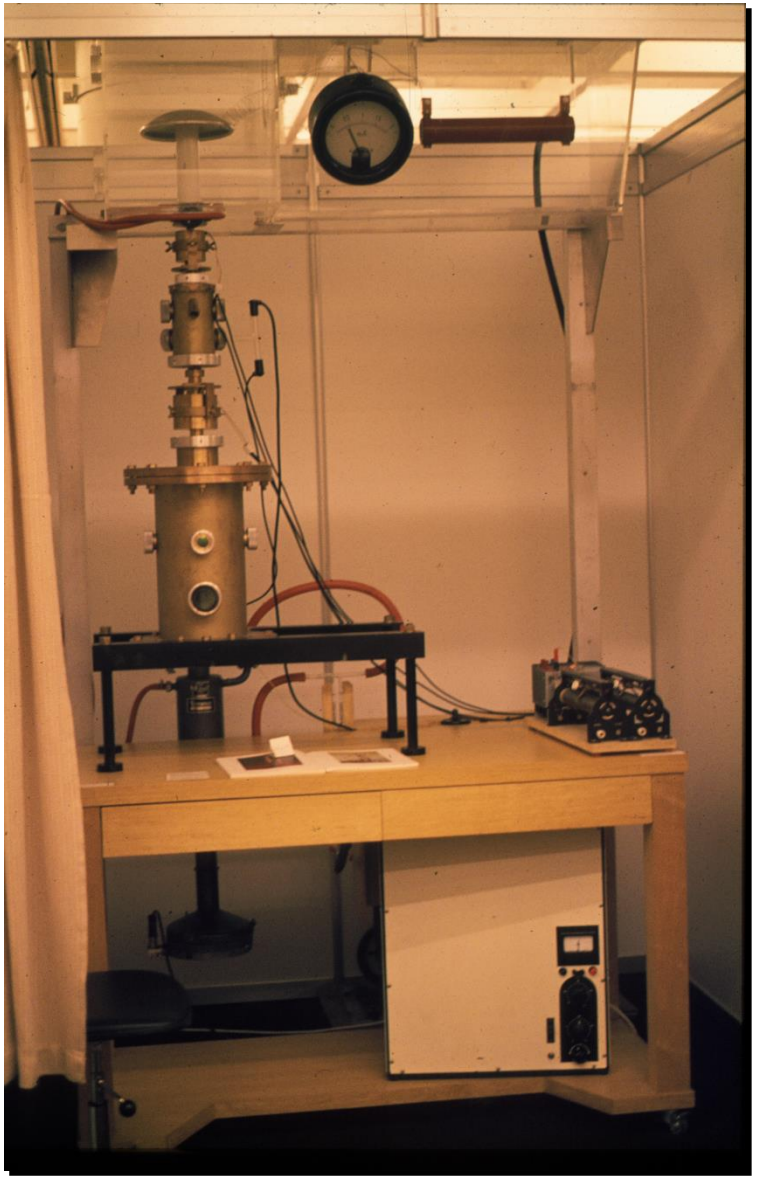
Konstrukce prvního transmisního EM



Konstrukce prvního transmisního elektronového mikroskopu: Ernst Ruska a Max Knoll (9.3. 1931).

Vývoj konstrukce transmisního EM

Replika prvního transmisního EM



Elektronové mikroskopy současnosti

Tecnai (FEI)

Titan Krios (FEI)

Konstrukce každé součástky TEM výsledkem dlouhodobého vývoje

Snímkování biologických vzorků pomocí EM

- biologické objekty jsou náchylné k **radiačnímu poškozením** způsobené **elektronovým svazkem**
- nutné používat nízké intenzity elektronového svazku a optimalizovat metodu přípravy vzorků

Použití nízké intenzity elektronového svazku

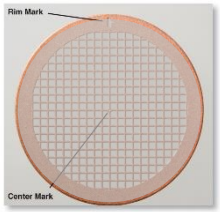
menší radiační poškození vzorku

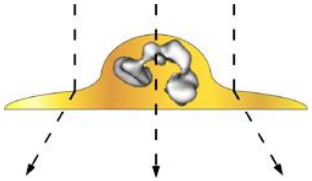
nízký kontrast vzorku, nutnost citlivé detekce

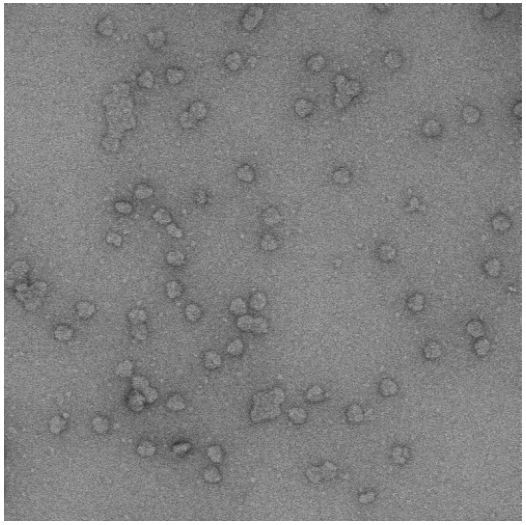
Zvýšení kontrastu metodou „negative staining“

kontrastování vzorku pomocí roztoku soli těžkého kovu (uranyl acetát)

Cu síťka s uhlíkovým filmem







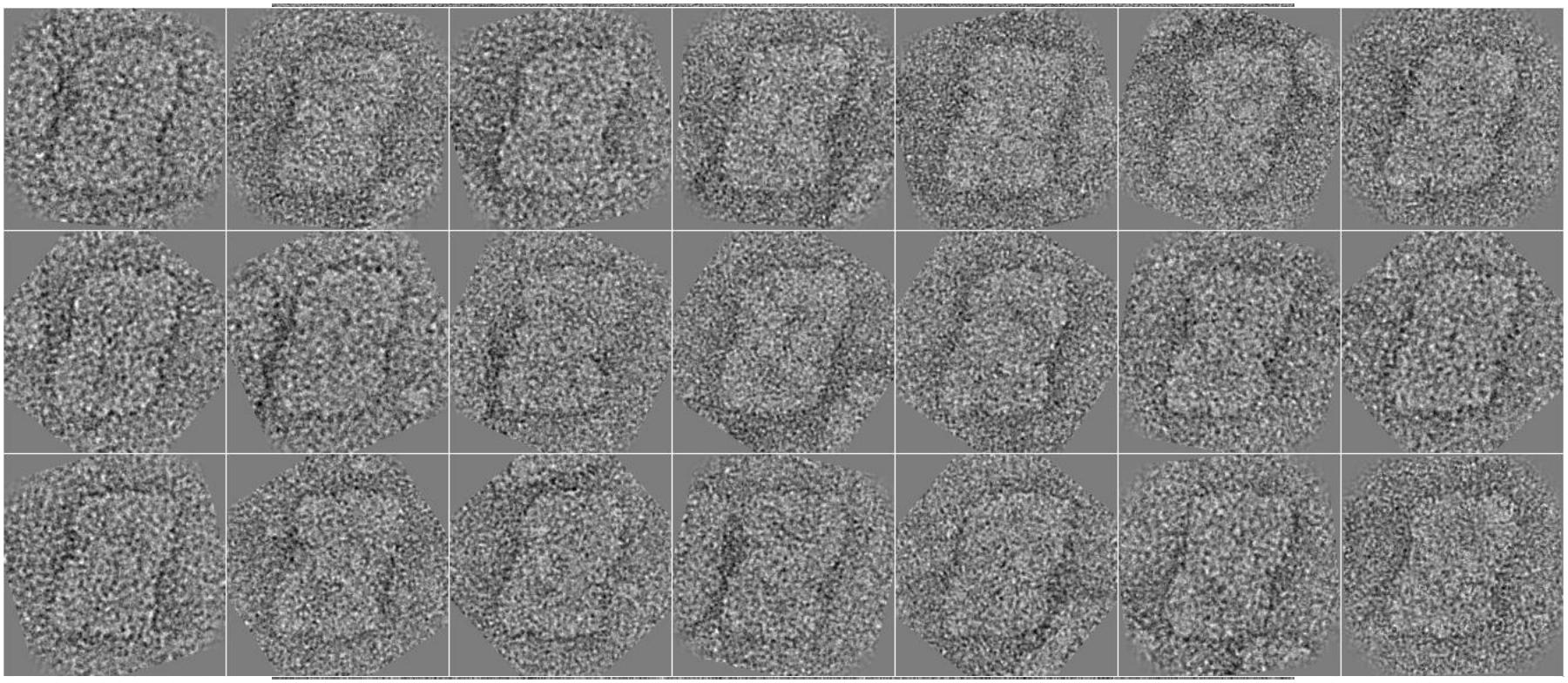
Obrazová analýza projekcí – nárůst poměru signál/šum

Projekce individuálních molekul – nízký poměr S/N, náhodná orientace

Výběr projekcí – datavý soubor > 20,000 projekcí

Srovnání projekcí – translace, rotace

Výpočet průměrné projekce – vyšší poměr S/N



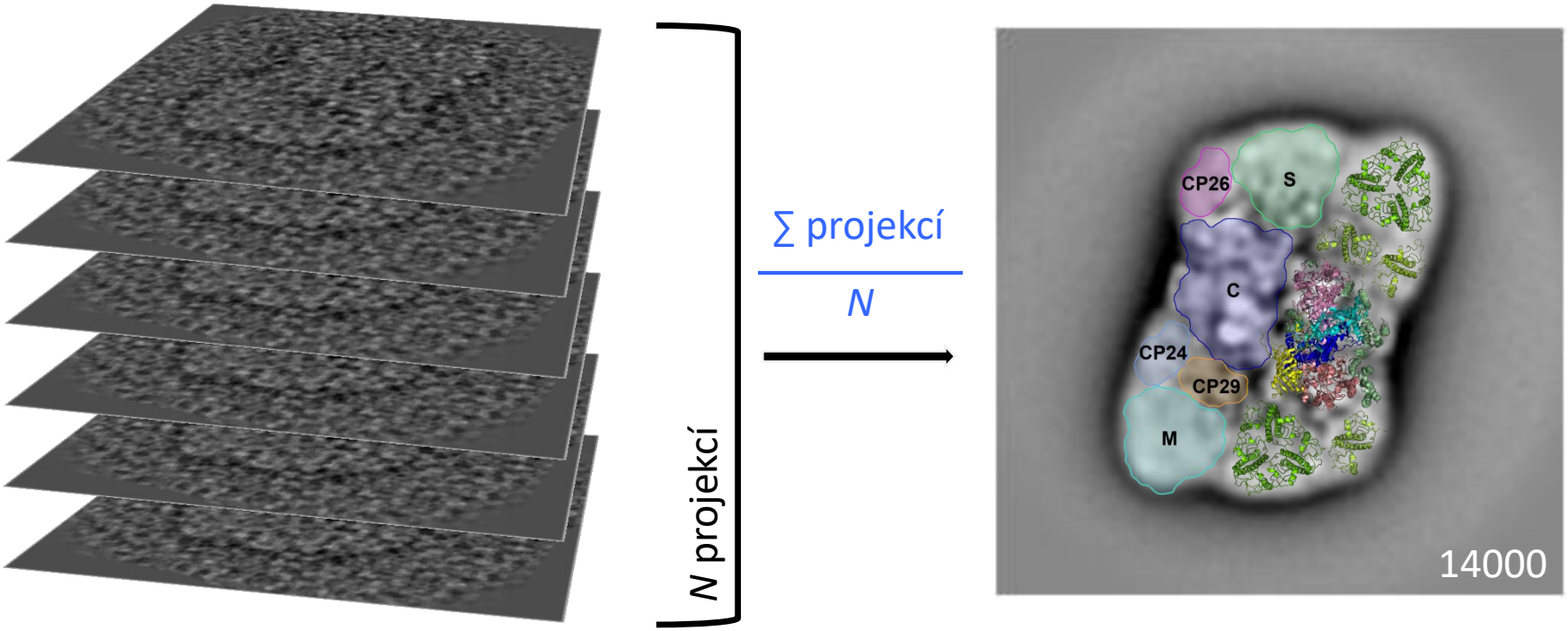
Obrazová analýza projekcí – nárůst poměru signál/šum

Projekce individuálních molekul – nízký poměr S/N, náhodná orientace

Výběr projekcí – datavý soubor > 20,000 projekcí

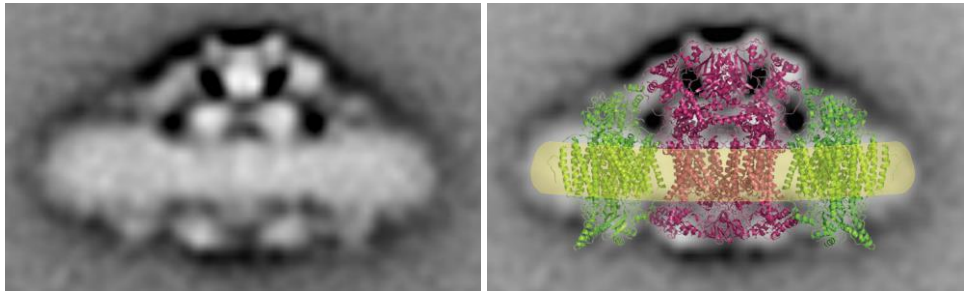
Srovnání projekcí – translace, rotace

Výpočet průměrné projekce – vyšší poměr S/N

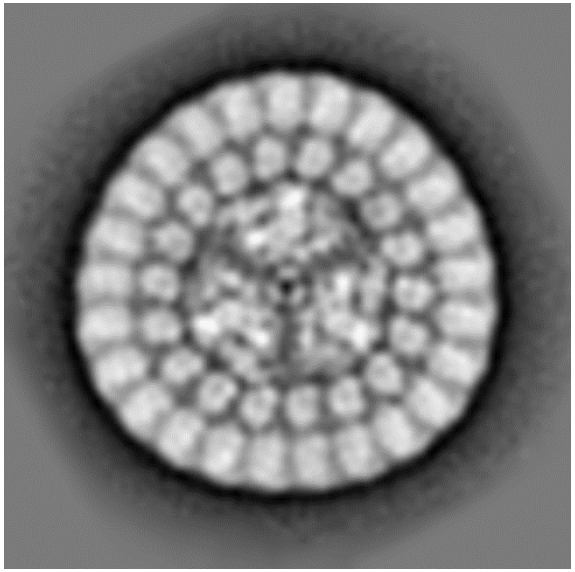


Single particle EM – analýza 2D projekcí individuálních molekul

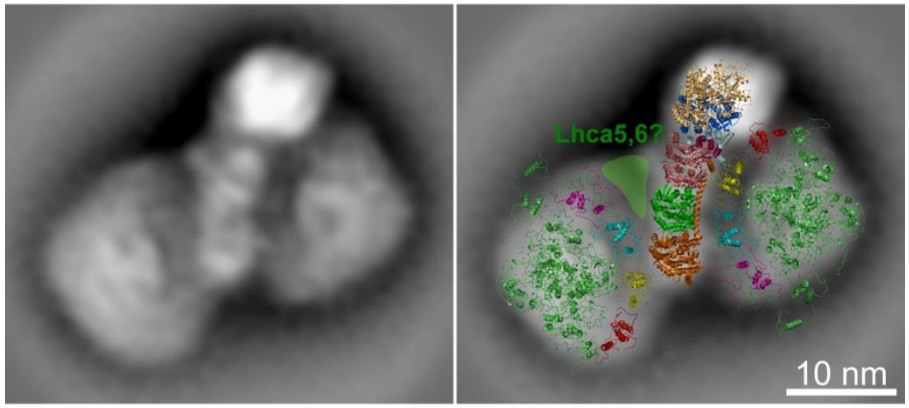
III_2+IV_2 superkomplex



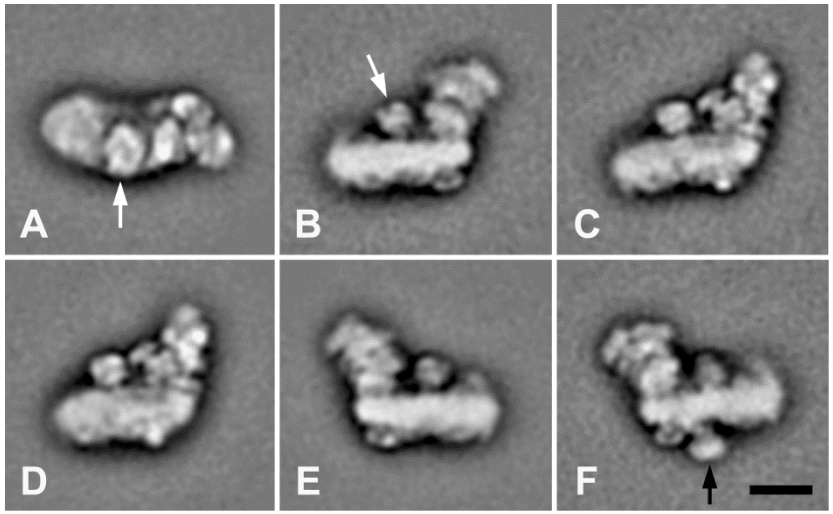
PSI-IsiA superkomplex



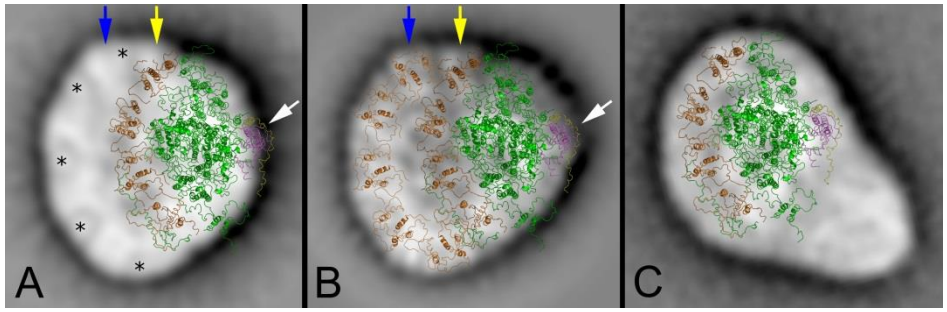
PSI-NDH superkomplex



Mitochondriální komplex I



PSI-LHCI superkomplex

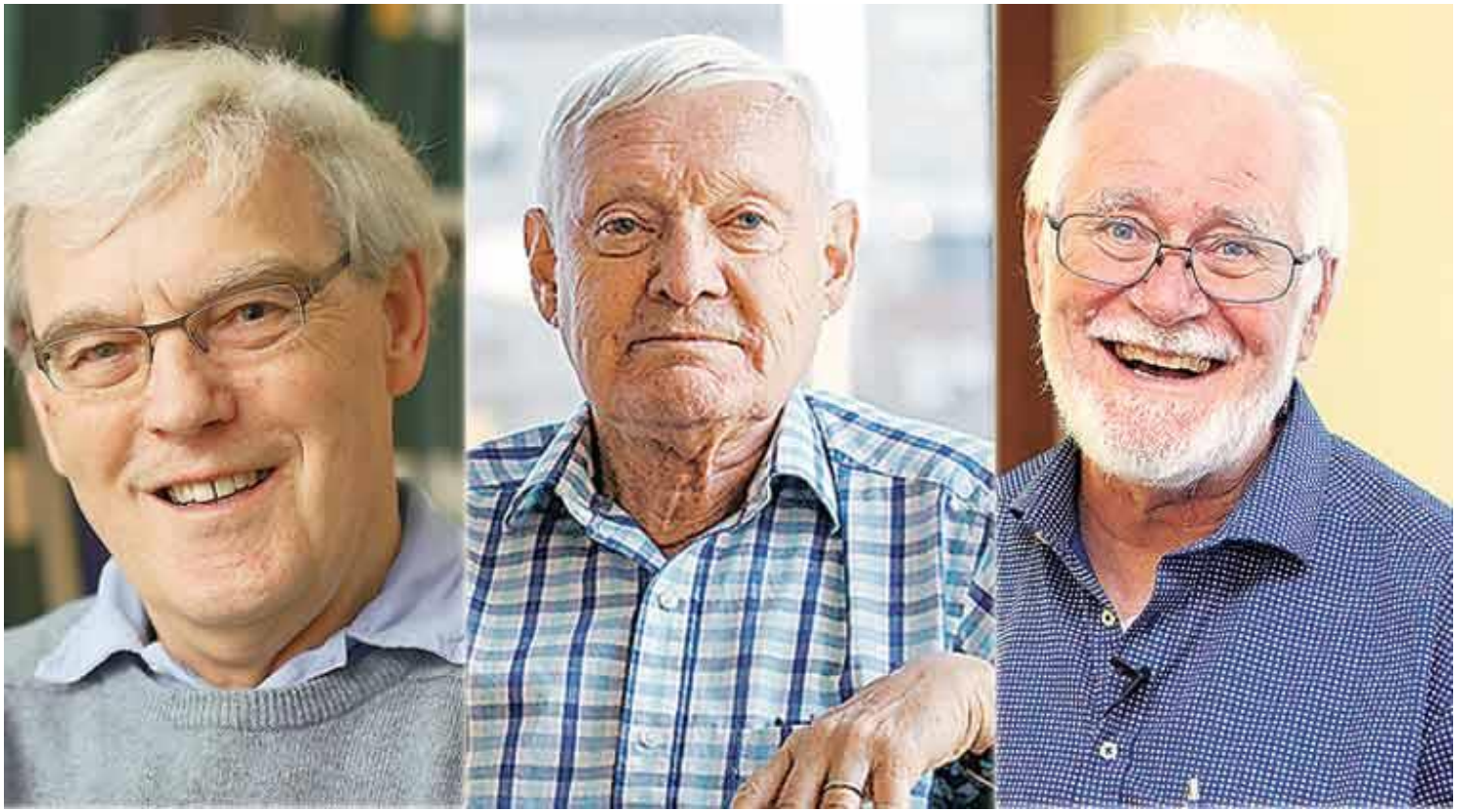


Kryogenní EM – studium 3D struktury molekul

- výhody studia vzorku ve zmraženém stavu : nižší radiační poškození a získání projekcí molekuly s náhodnou orientací

Nobelova cena za chemii v roce 2017

Vývoj kryogenní elektronové mikroskopie

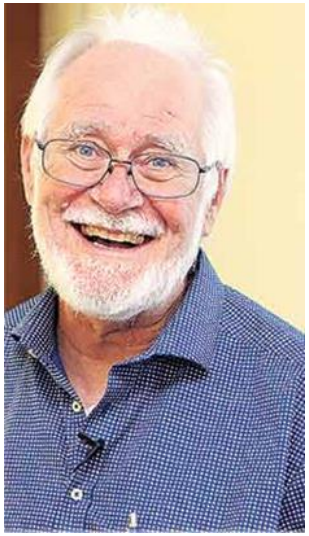


Richard Henderson Joachim Frank Jacques Dubochet

Současná metoda ***kryogenní elektronová mikroskopie*** umožňuje zjištění ***struktury biologických makromolekul*** při vysokém rozlišení bez nutnosti jejich krystalizace, jak je tomu u rentgenové strukturní analýzy.

Kryogenní EM – studium 3D struktury molekul

- výhody studia vzorku ve zmraženém stavu : **nižší radiační poškození a získání projekcí molekuly s náhodnou orientací**



Jacques Dubochet

Jak správně zmrazit kapalný vzorek s biologickým materiálem?

- nutné zabránit formování krystalků ledu ⇒ v EM se zobrazí jako temné objekty ⇒ znehodnocují vzorek
- zmrazení vzorku musí být velmi rychlé ⇒ vznikne amorfní led

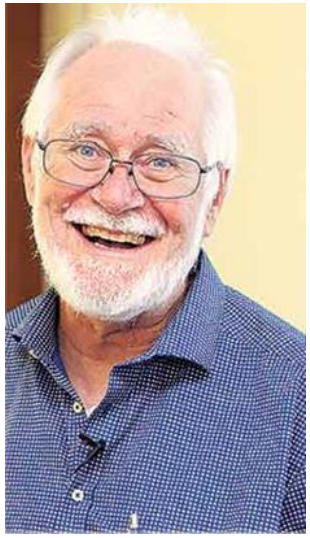
Kapalný dusík

- neumožňuje rychlé zmražení – vznikají krystalky ledu
- blízké hodnoty teploty tání (-210 °C) a varu (-196 °C)

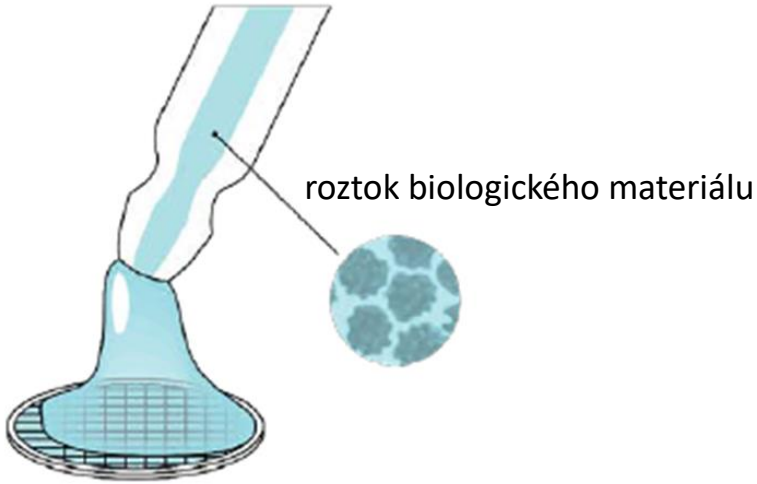
Kapalný etan

- vhodnější médium - teplota tání: -183 °C; teplota varu: -89 °C
- rychlé zmražení zabrání tvorbě krystalků ledu ⇒ voda zmrzne v amorfním stavu

Jak rychle zmražení vzorku zrealizovat?

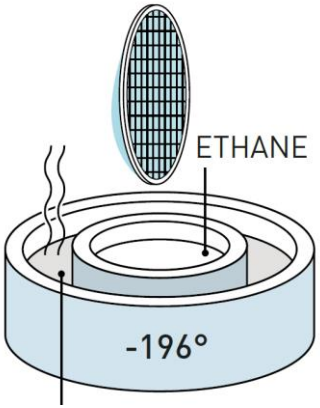


Jacques Dubochet



nosič vzorku - měděná síťka

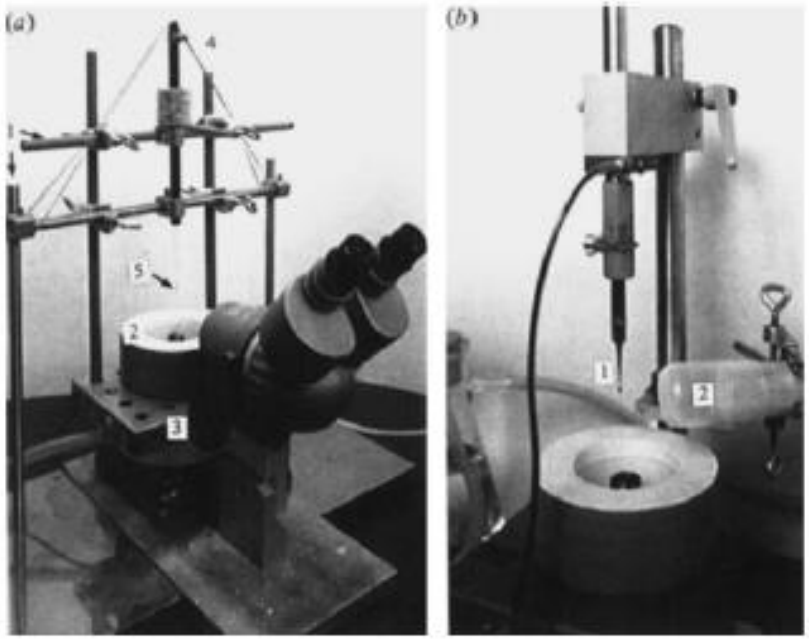
měděná síťka s kapkou vzorku



kapalný dusík

Aparatura pro rychlé zmražení vzorku

Původní verze jednoduché aparatury



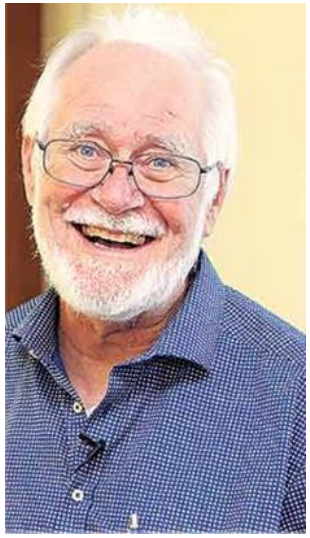
Dubochet et al. (1988)

Současná aparatura - Vitrobot

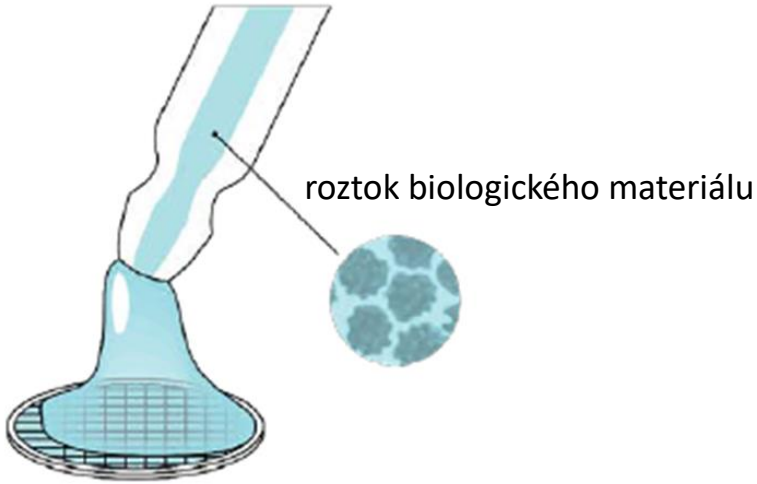
Dubochet a firma FEI

Zmražení vzorku pomocí Vitrobotu (FEI)

Jak rychle zmražení vzorku zrealizovat?

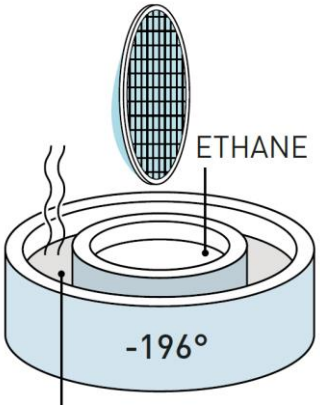


Jacques Dubochet

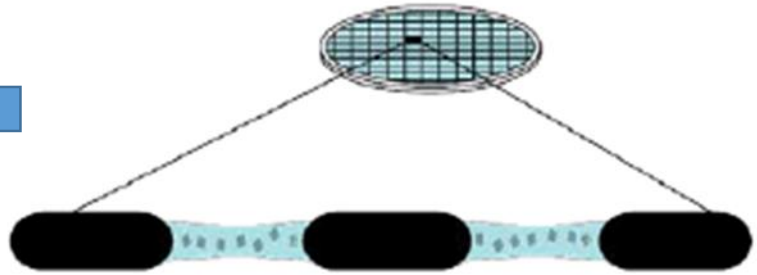


nosič vzorku - měděná síťka

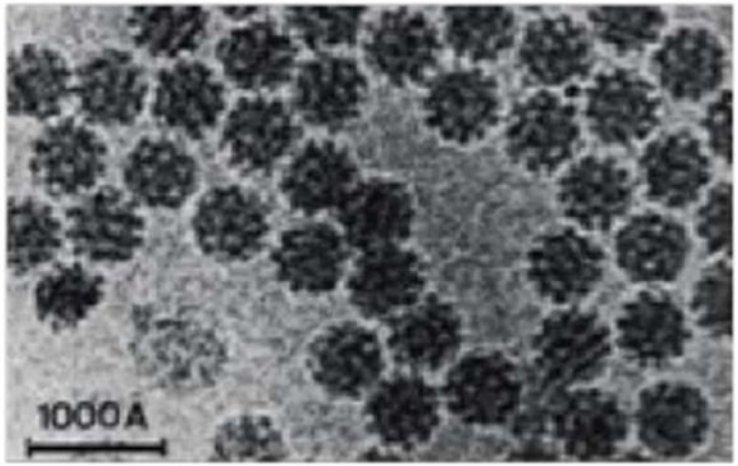
měděná síťka s kapkou vzorku



kapalný dusík

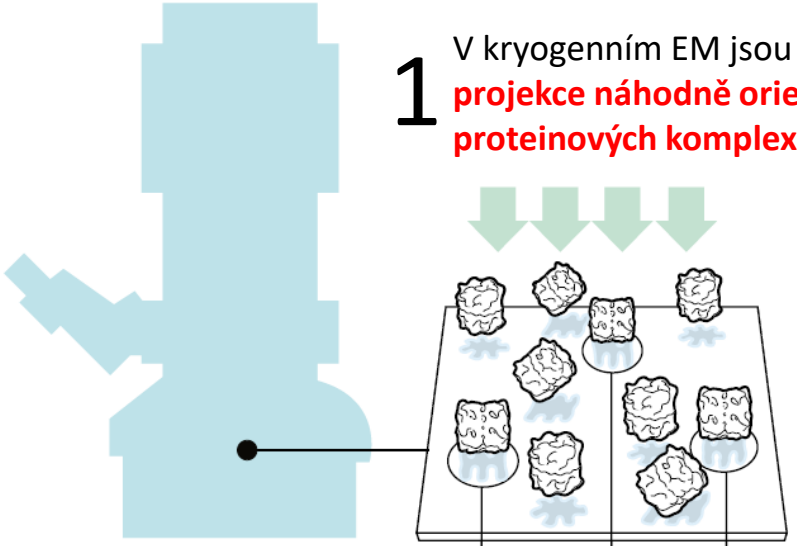


ideální tloušťka vrstvy ledu

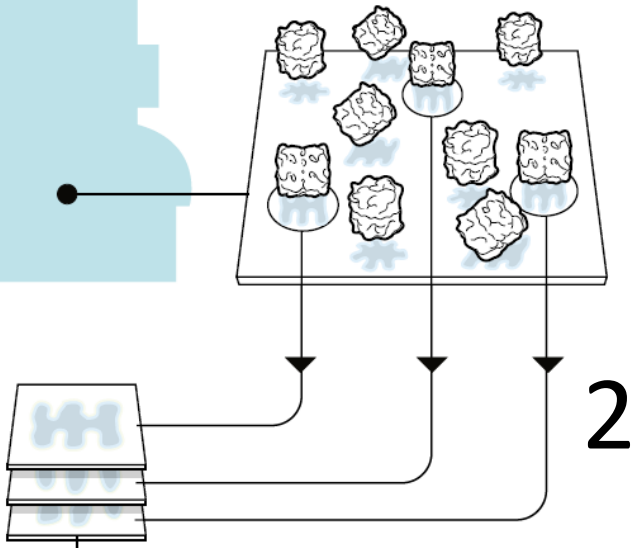


Kryogenní EM, obrazová analýza a 3D rekonstrukce

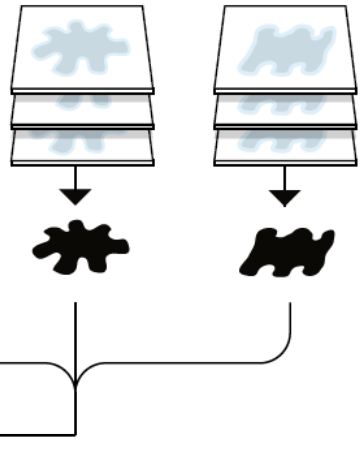
Joachim Frank



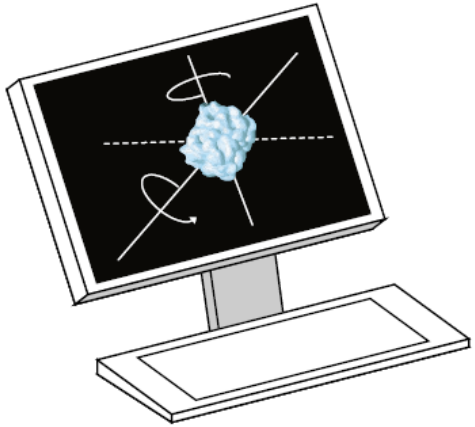
1 V kryogenním EM jsou detekovány **projekce náhodně orientovaných proteinových komplexů**



2 Počítačový program **sloučí podobné projekce do skupin**



3 Počítač obrazovou analýzou tisíců projekcí ve skupině vygeneruje průměrné **2D projekce**

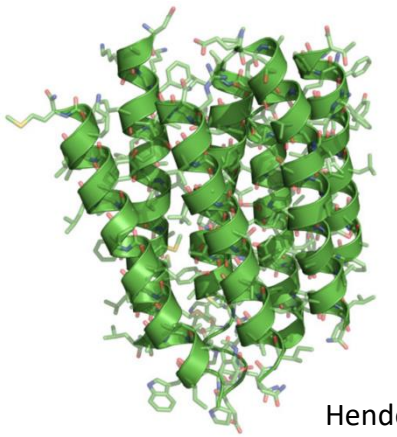


4 Počítač vypočítá prostorové vztahy mezi jednotlivými 2D projekcemi a vygeneruje **3D strukturu s vysokým rozlišením**

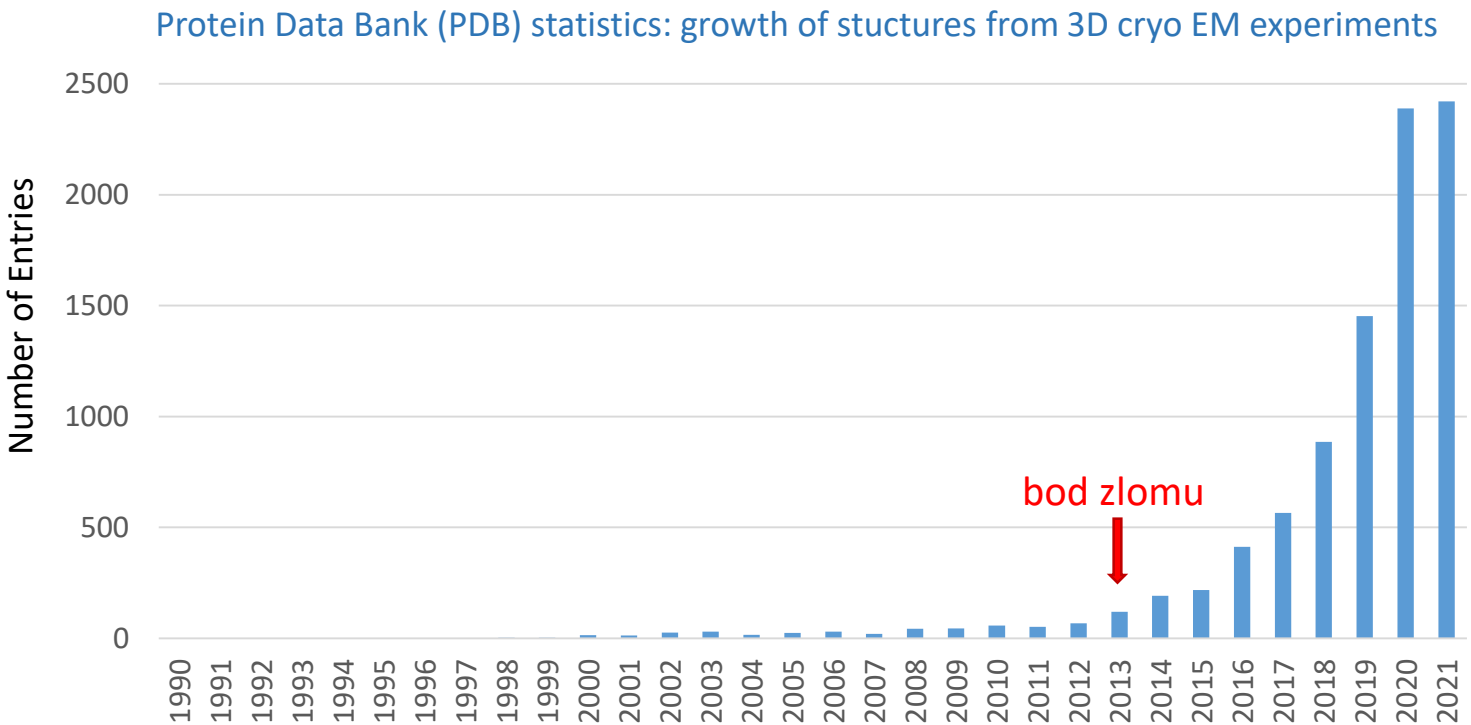
Aplikace kryogenní EM pro studium biologických vzorků

Richard Henderson

jako první prokázal ***potenciál kryogenní EM*** analýzou struktury bakteriorodopsinu při rozlišení 3.5 Å

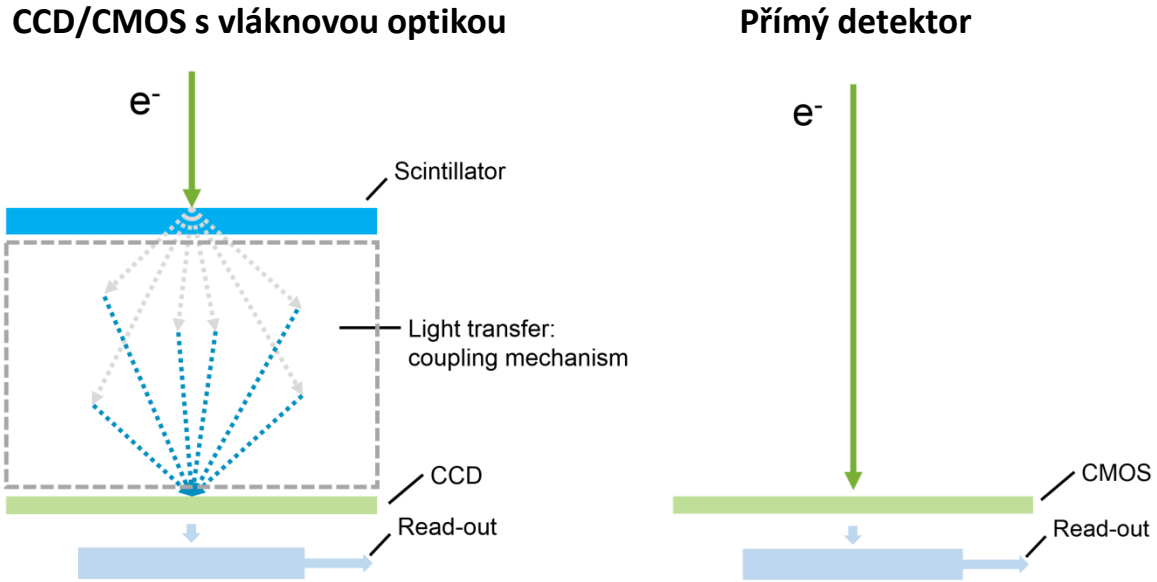


Henderson et al. (1990) JMB 213



Bod zlomu ve vývoji kryogenní EM

- zdokonalení vyhodnocovacích programů a nárůst výkonu počítačů
- **vývoj nových detektorů**
- přímé detektory elektronů způsobily doslova revoluci v kryogenní EM



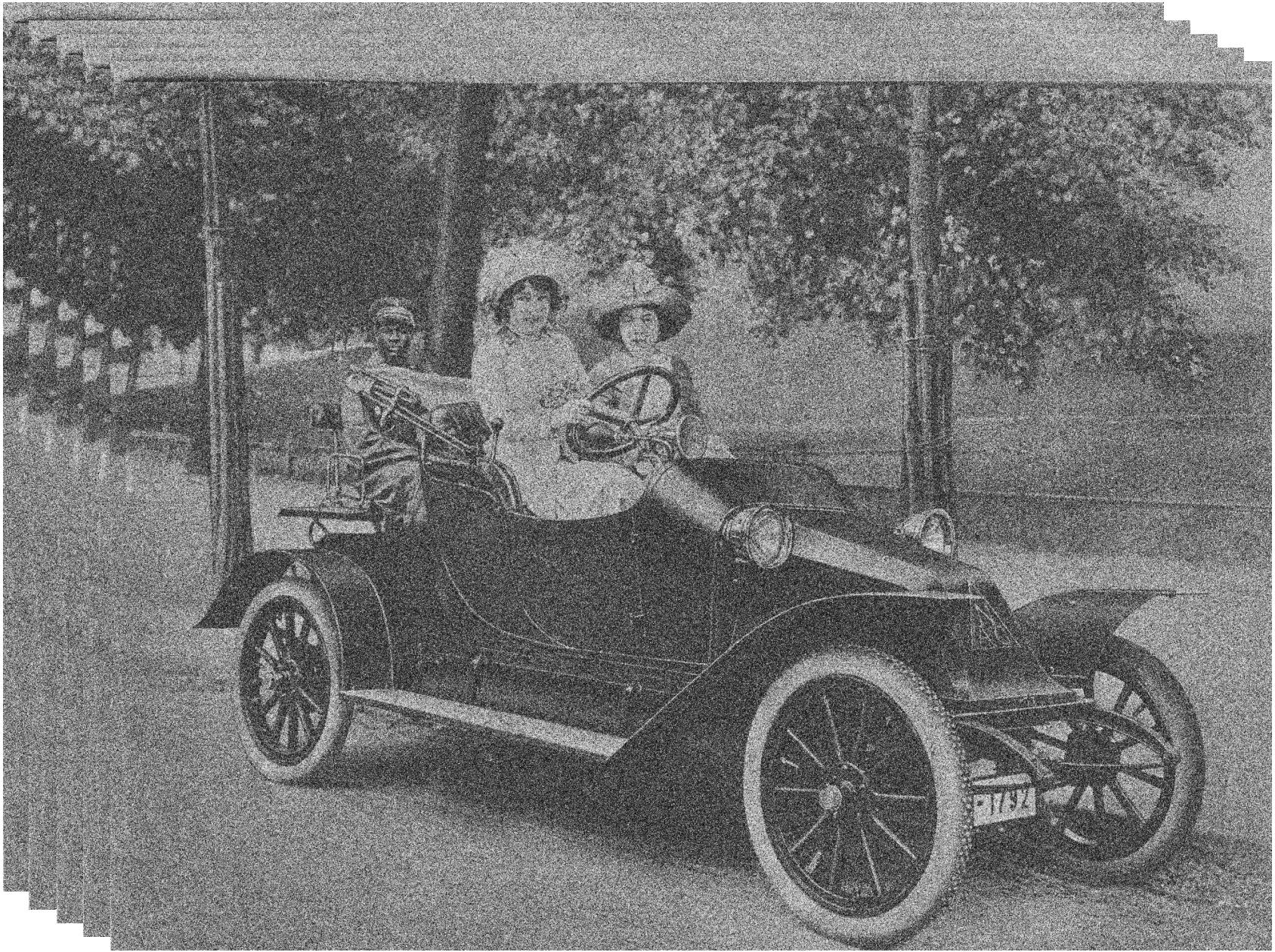
- nejnovější přímý detektor s rozlišením 24 MPx
- umožňuje záznam až 1500 snímků/sec ⇒ snímkování ve video modu
- eliminace „driftu“ vzorku umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení

Eliminace driftu díky přímému detektoru elektronů

Klasická CCD kamera s 1 sec expozicí – drift vzorku způsobí rozmazání obrazu

Eliminace driftu díky přímému detektoru elektronů

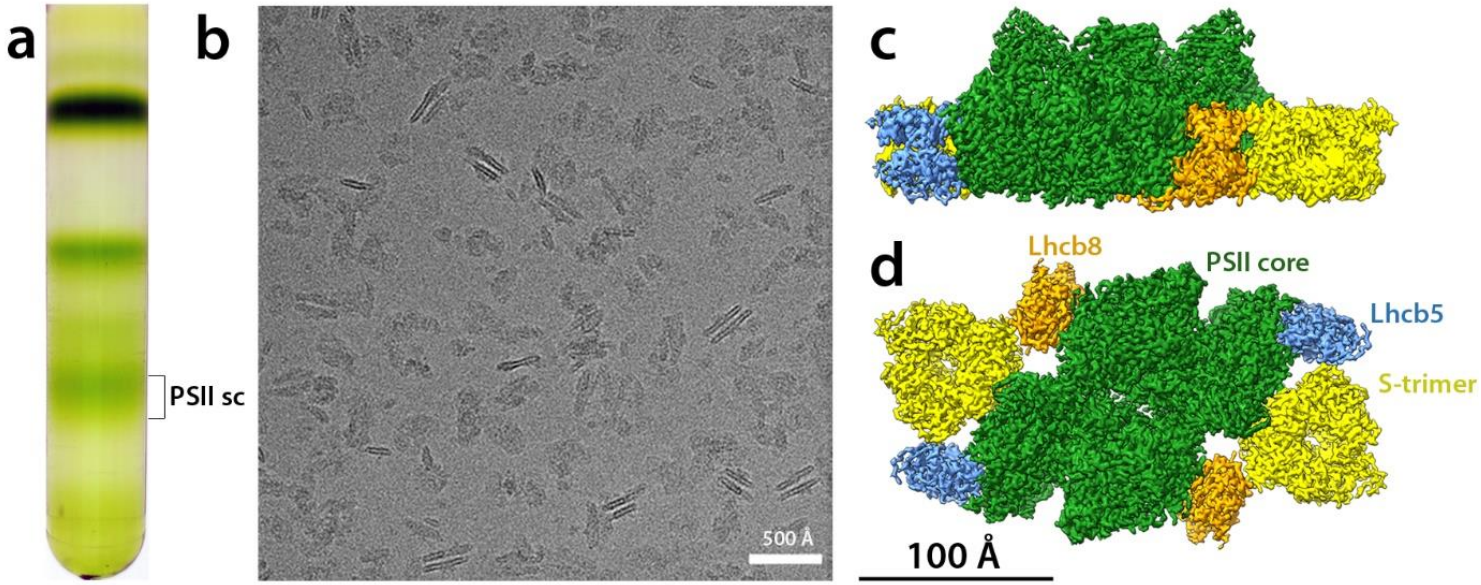
„movie-mode“ přímého detektoru – rozdělení 1 sec expozice do kratších expozic

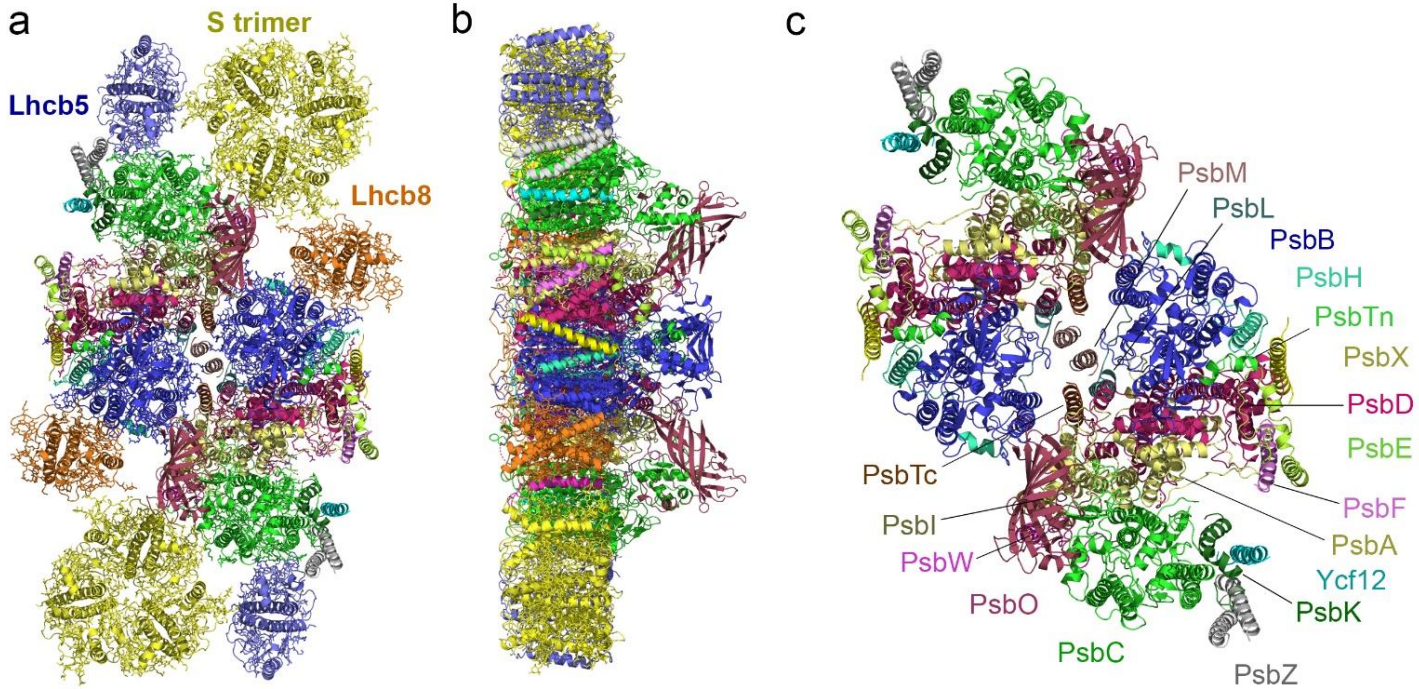


Eliminace driftu díky přímému detektoru elektronů

srovnání a zprůměrování jednotlivých snímků z „movie“ – **eliminace driftu**, tj. **vyšší rozlišení**

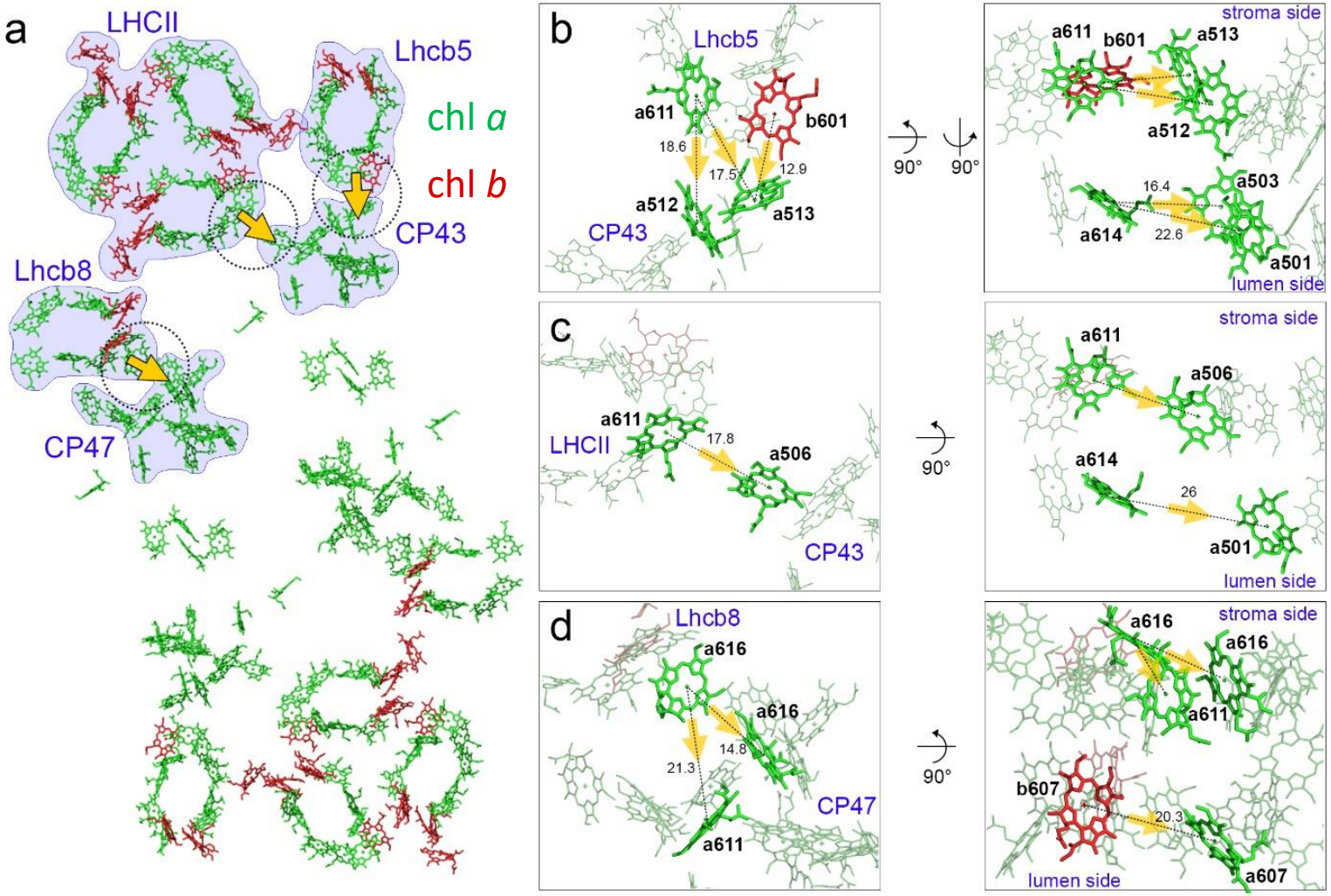
3D struktura fotosystému II ze smrku ztepilého pomocí kryogenní EM





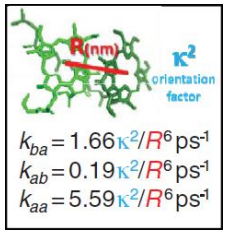
Opatíková a kol. (článek v přípravě)

Analýza přenosu excitační energie mezi chlorofyly fotosystému II



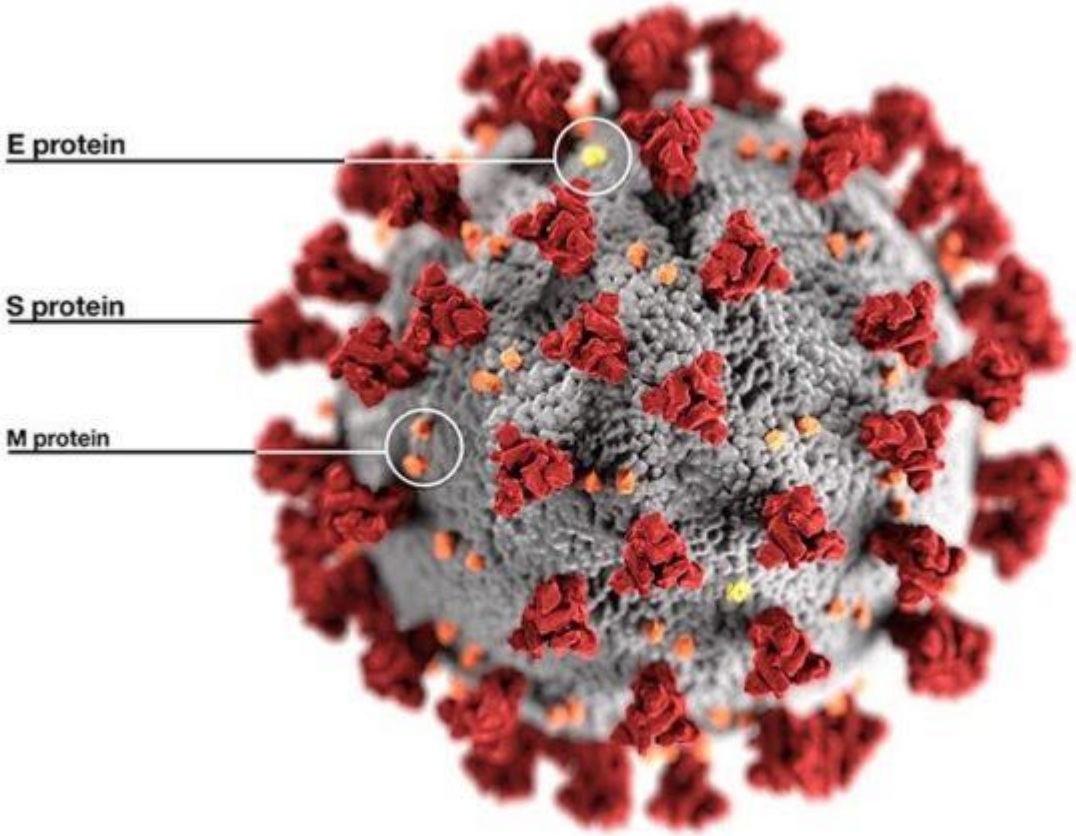
Opatíková a kol. (článek v přípravě)

- rychlostní konstanta přenosu závisí na vzdálenosti a orientaci molekul chlorofylů



Croce and Amerongen (2020) Science 369

Kryogenní mikroskopie ve studiu struktury SARS-CoV-2

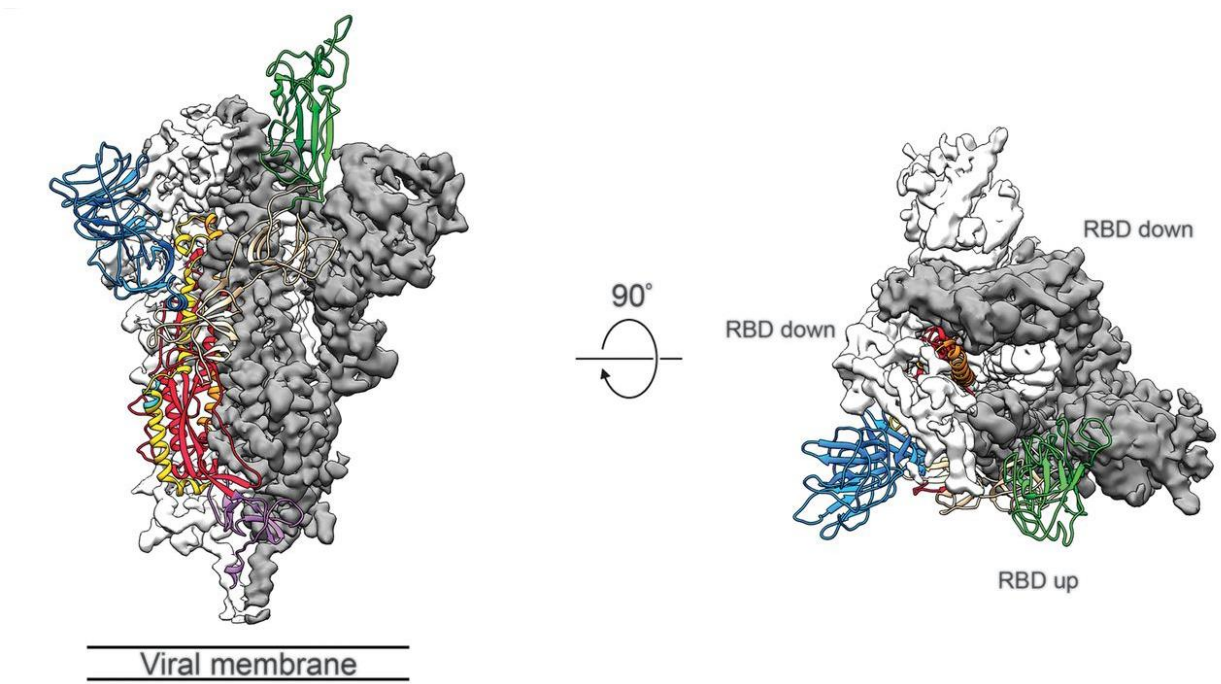


Model koronaviru s charakteristickými výběžky S proteinů (glykoproteiny), které využívají pro interakci a navázání na hostitelskou buňku. SARS-CoV-2 způsobující onemocnění COVID-19, patří do této skupiny koronavirů.

Kryogenní mikroskopie ve studiu struktury SARS-CoV-2

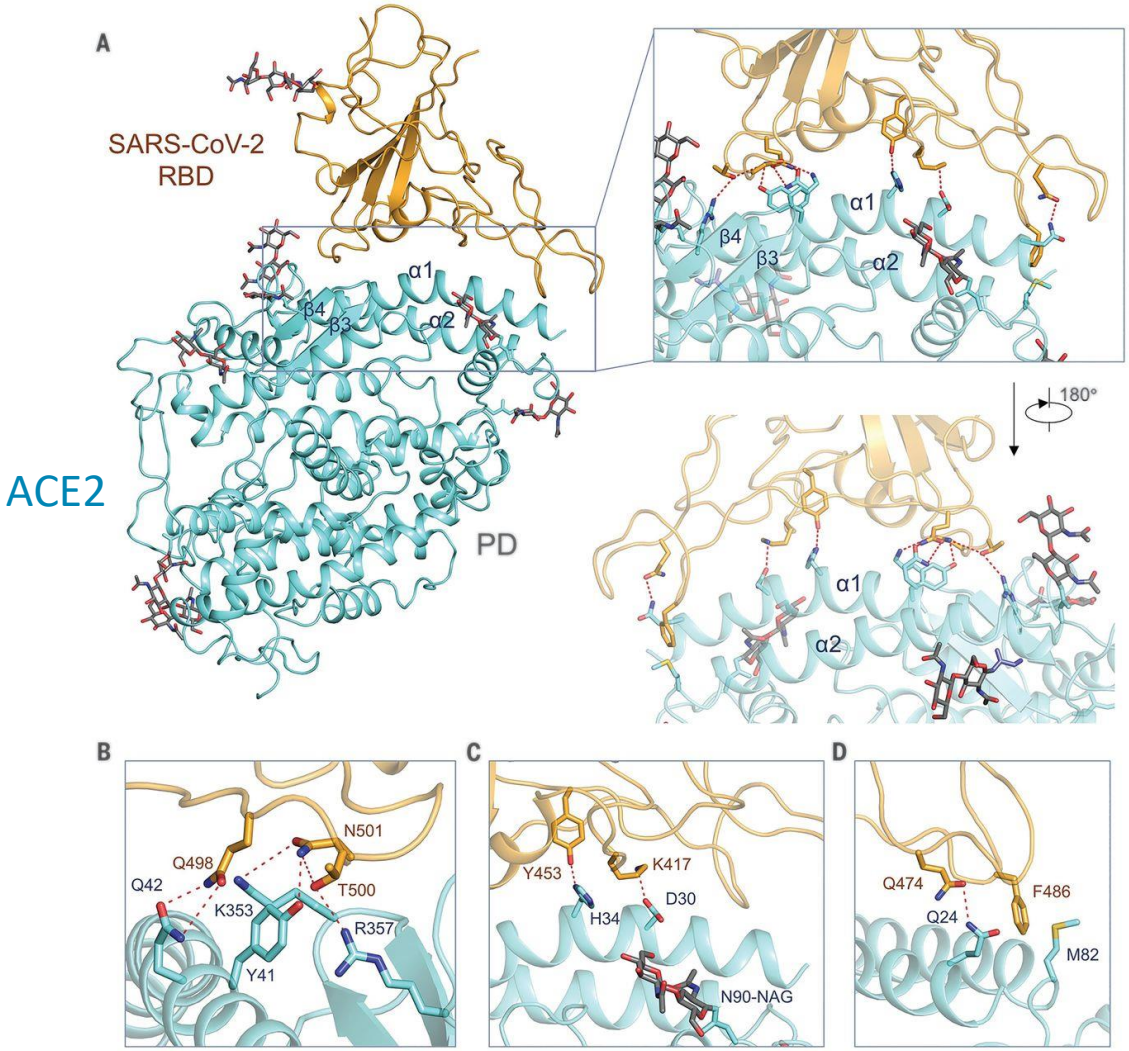
- přelom roku 2019/2020 – objevení spojitosti mezi koronaviry (SARS-CoV-2) a nákazou COVID-19

- 15.2. 2020 – zveřejnění 3D struktury SARS-CoV-2 „spike“ proteinu (S protein) pomocí cryo EM za méně něž 2 týdny (Wrapp D. et al. (2020) Sicence 367: 6484)



Kryogenní mikroskopie ve studiu struktury SARS-CoV-2

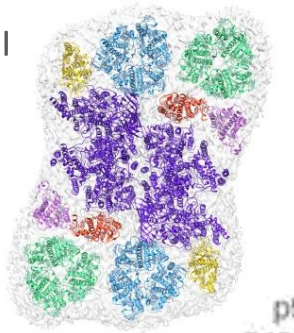
- 19. 2. 2020 – zveřejnění struktury SARS-CoV-2 a jeho vazby na lidský receptor ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2), což umožnilo začátek vývoje vakcín a protilátek (Yan R. et al. (2020) Science 367: 6485)

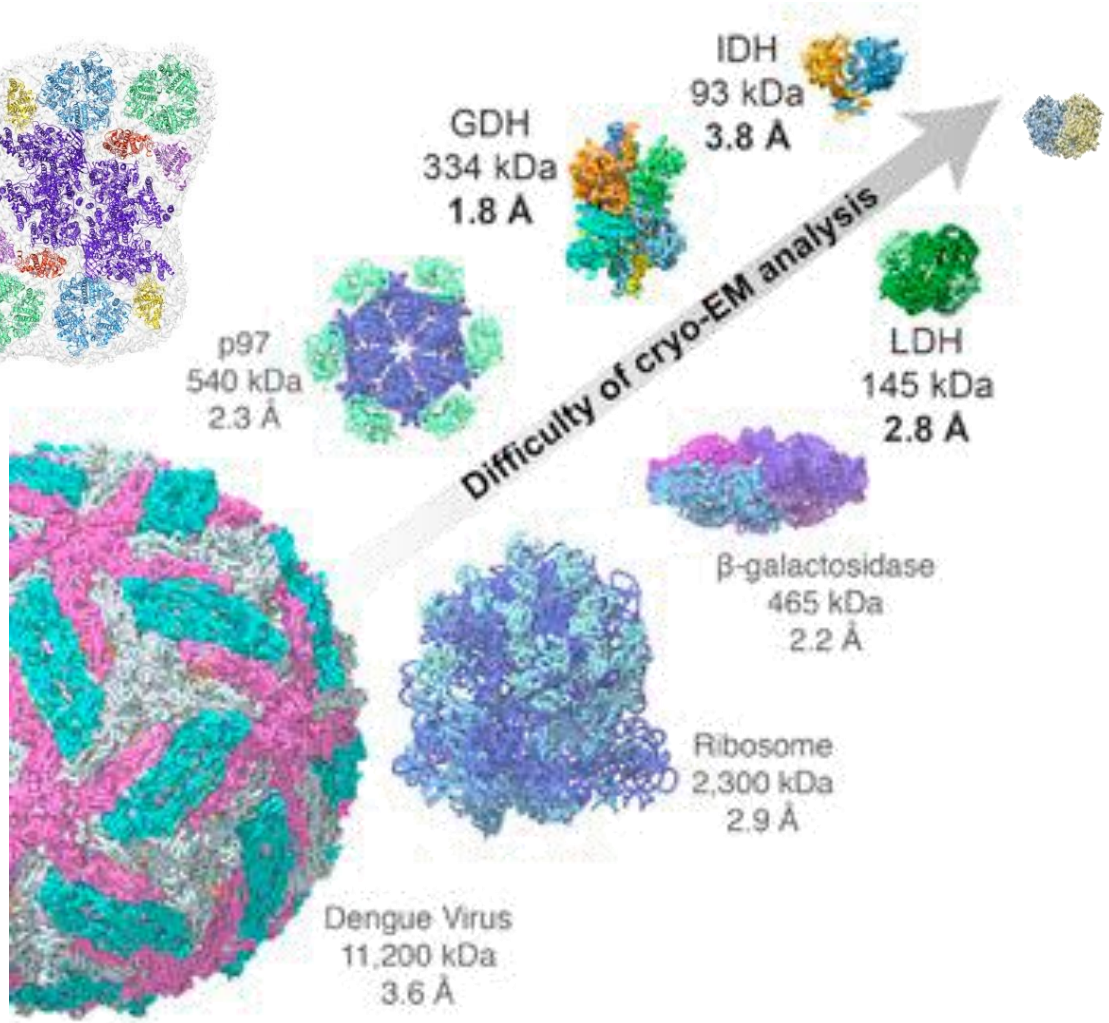


Vývoj kryogenní EM

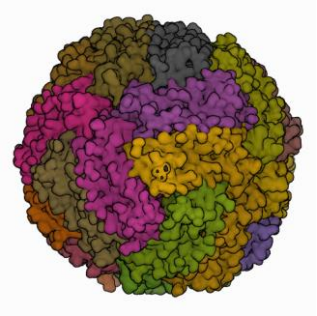
Aplikace kryogenní EM při studiu struktury široké škály proteinových komplexů

Photosystem II
1,400 kDa
5.3 Å





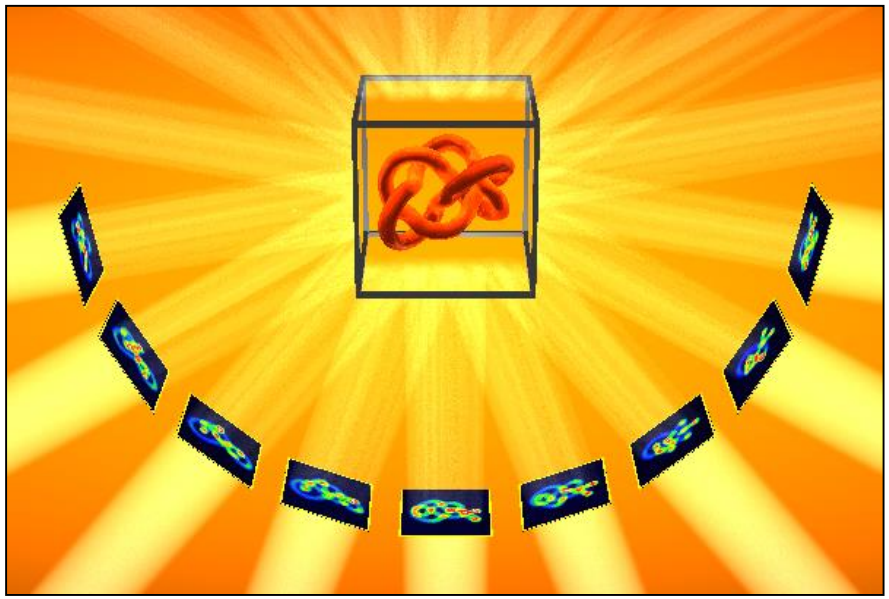
Haemoglobin
64kDa
3.2Å



Human apoferritin at 1.15 A
Yip et la. (2020) Nature

Princip elektronové tomografie: výpočet 3D struktury z 2D projekcí

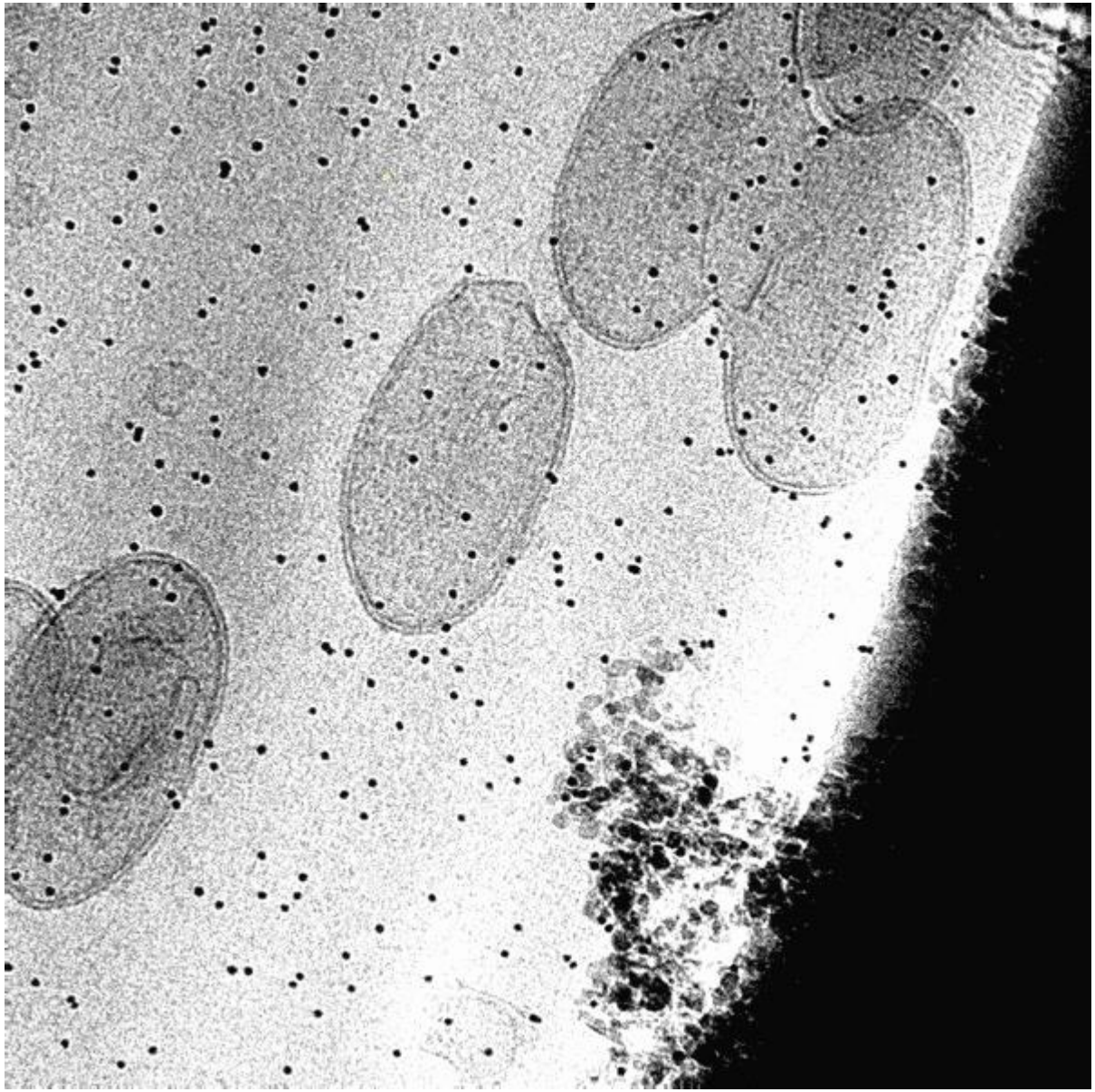
Nahrání tomografické série 2D projekcí 3D objektu



3D objekt je vypočítán z 2D projekcí pomocí metody zpětné projekce

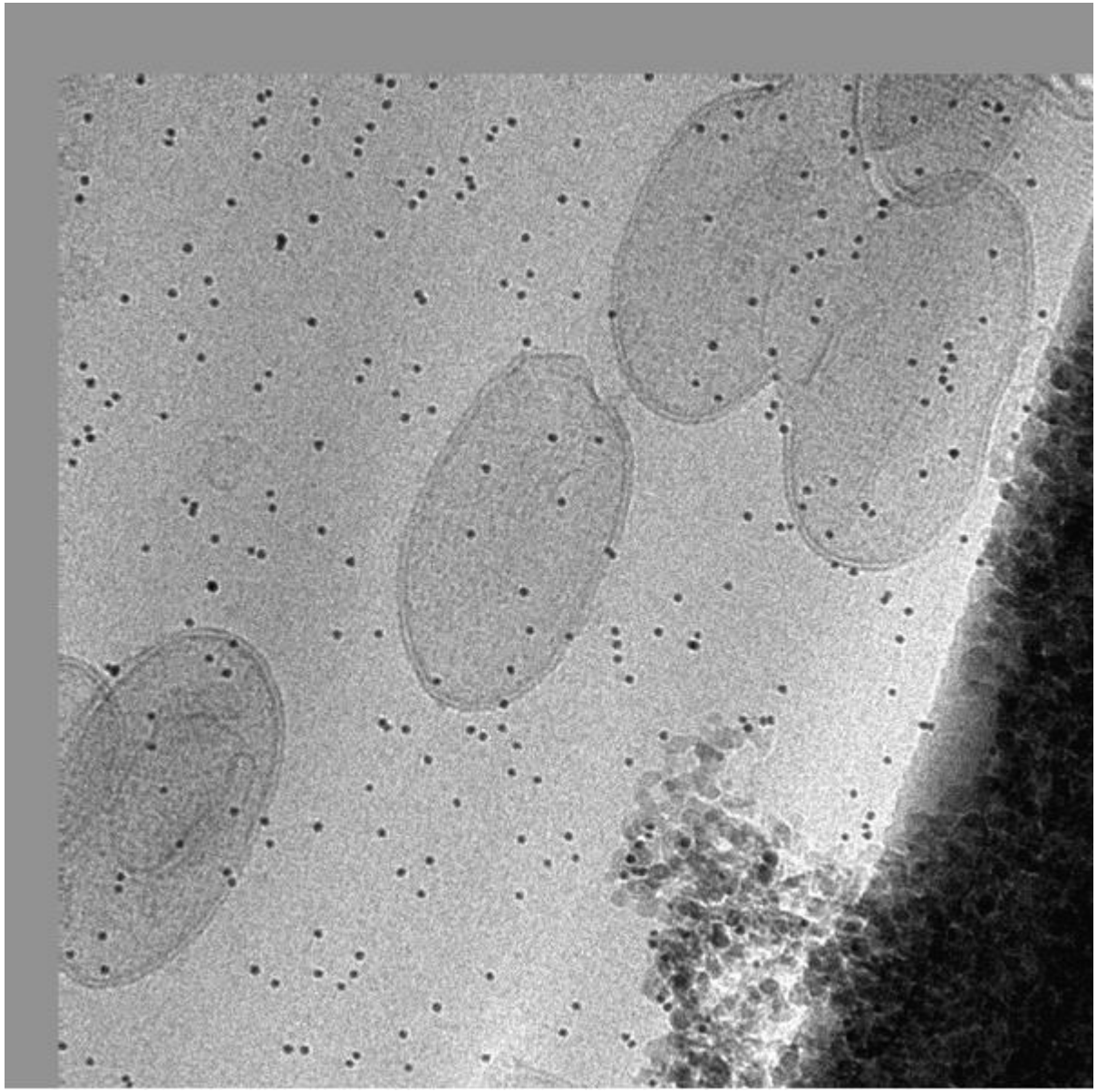
Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Záznam série snímků s postupně nakláněným vzorkem



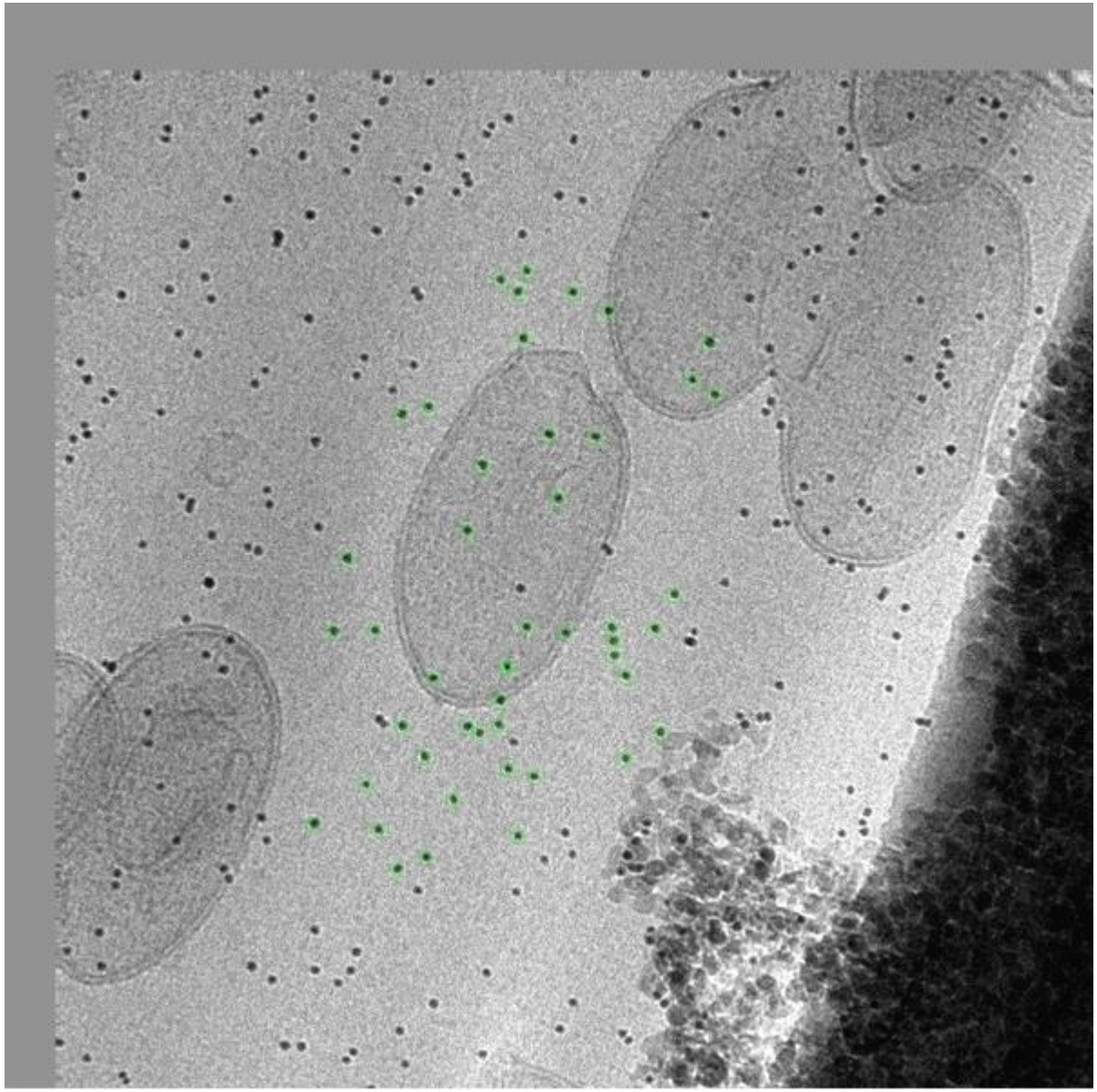
Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Srovnání série snímků pomocí vzájemné korelace



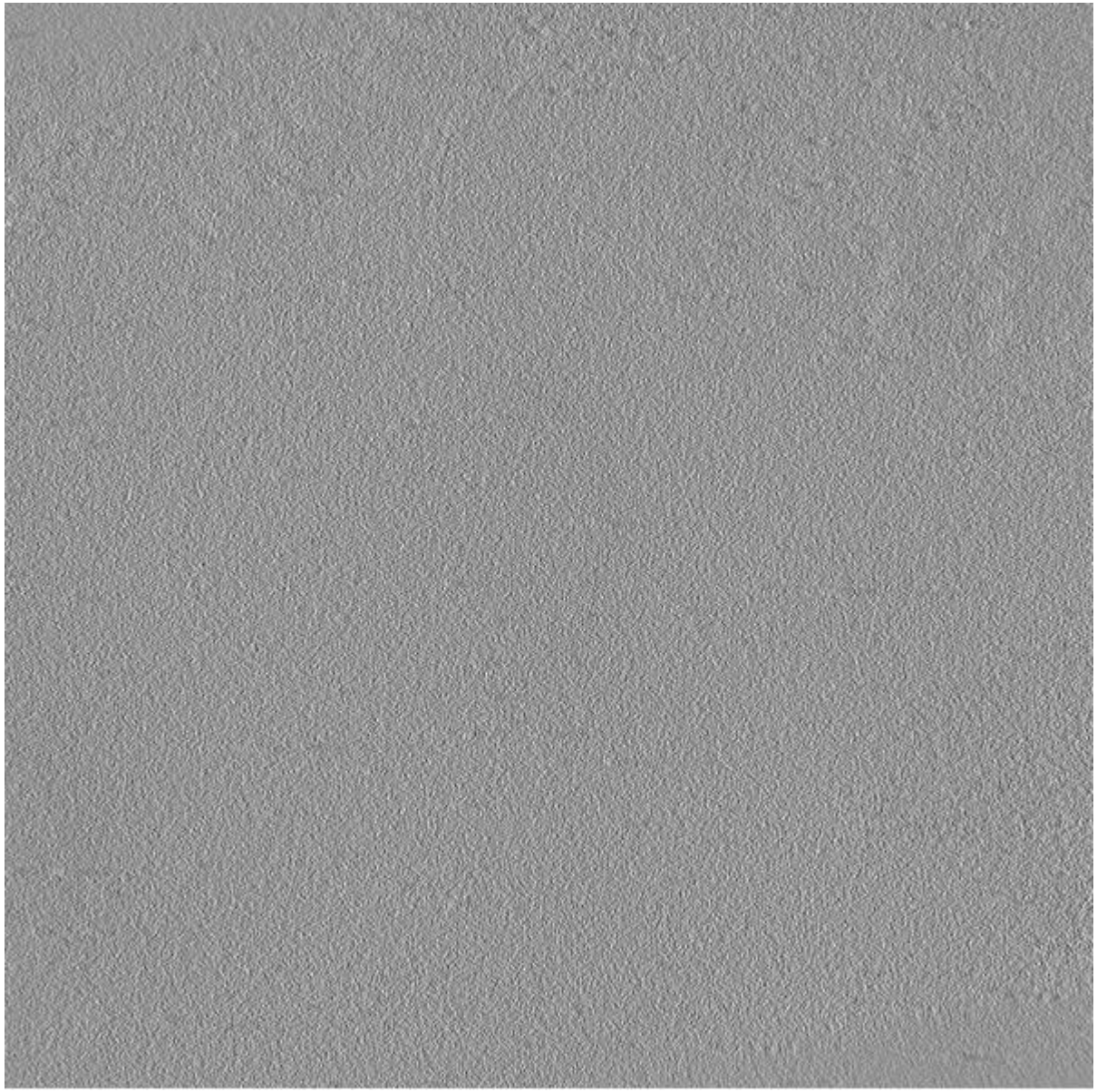
Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

Srovnání série snímků pomocí pozice zlatých nanočástic



Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

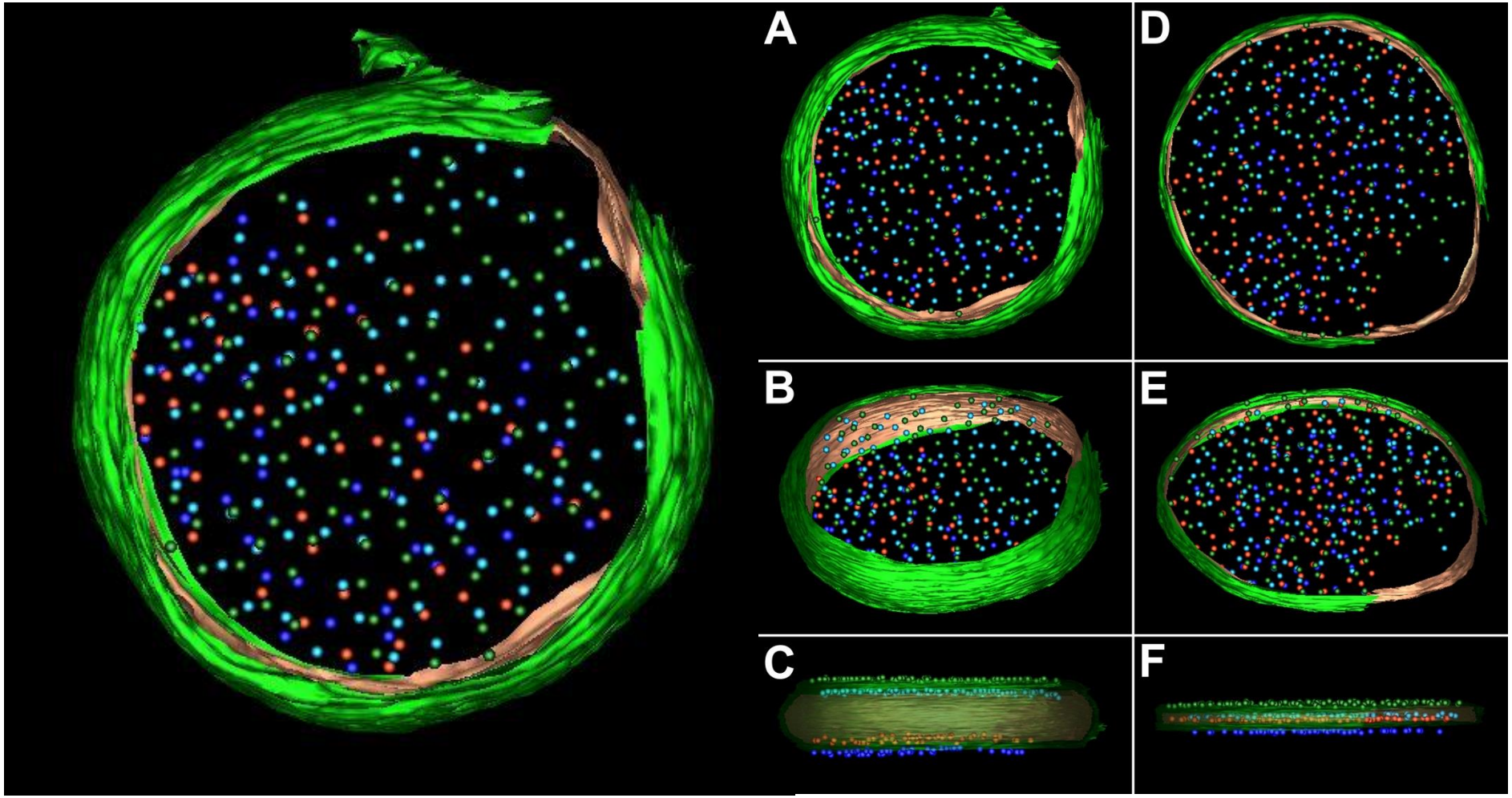
Rekonstrukce tomogramu



Kryogenní elektronová tomografie granální membrány

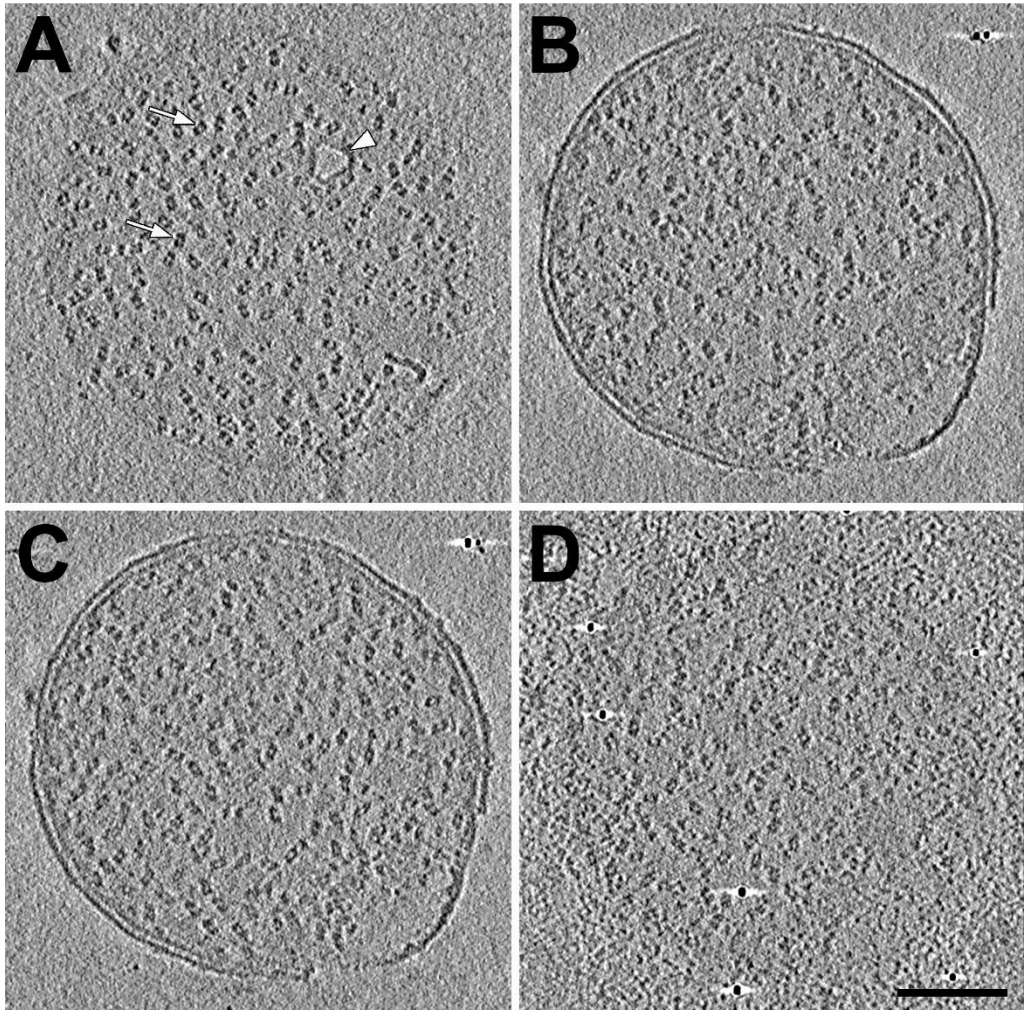
Rekonstrukce a vizualizace tomogramu

Modely granální membrány



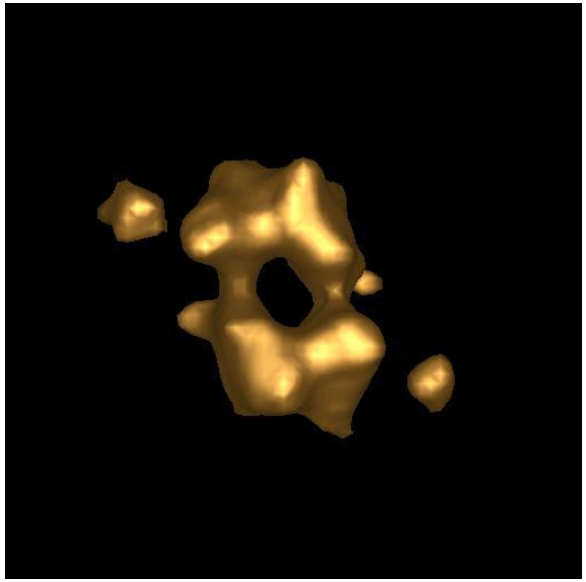
Tomografie odhaluje strukturu granální membrány a pozici fotosystémů II

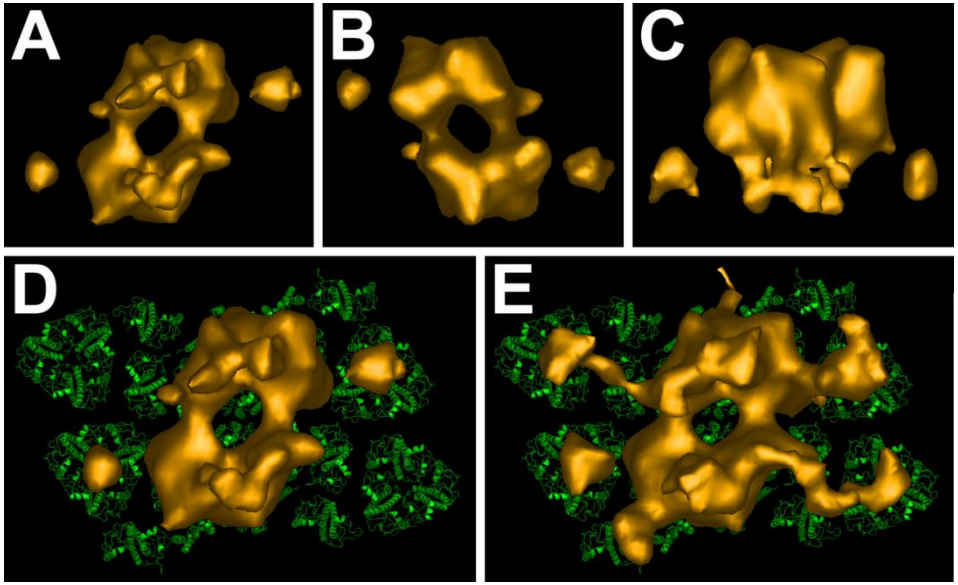
Tomografické řezy granální membrány



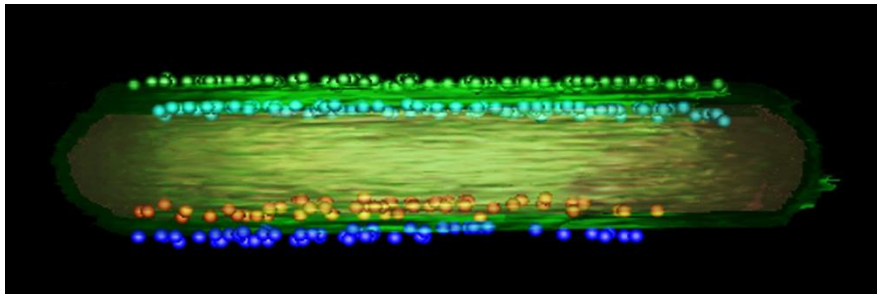
- 3D analýza PSII komplexů ⇒ orientace PSII komplexů v membráně

3D analýza PSII komplexů

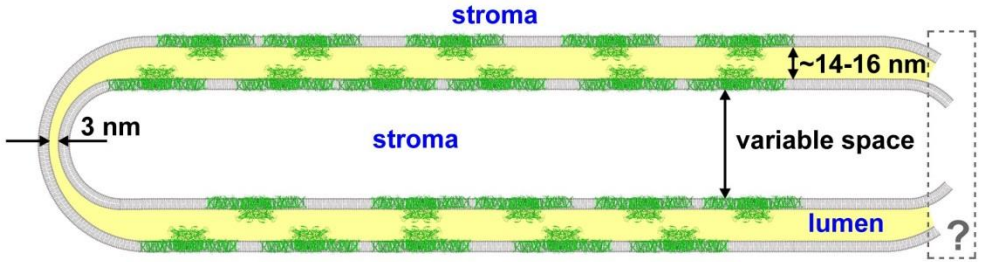




3D model PSII core complexu – analýza 100 sub-objemů



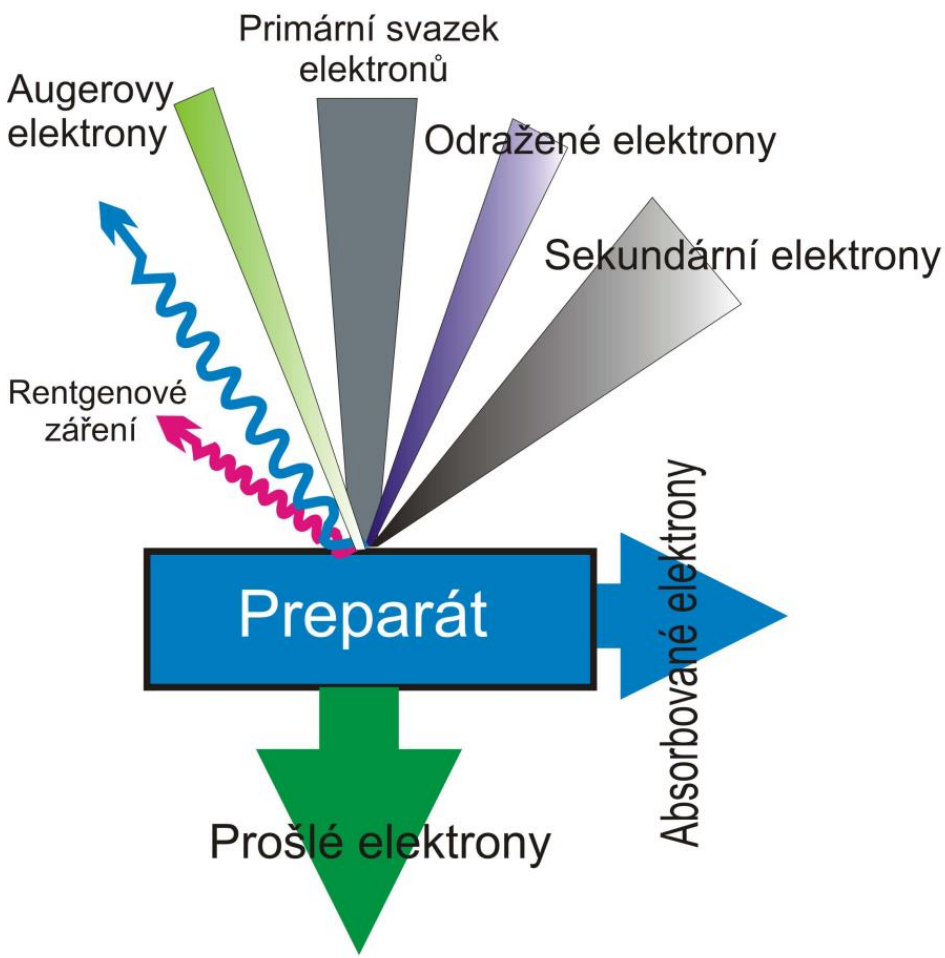
Model granální membrány



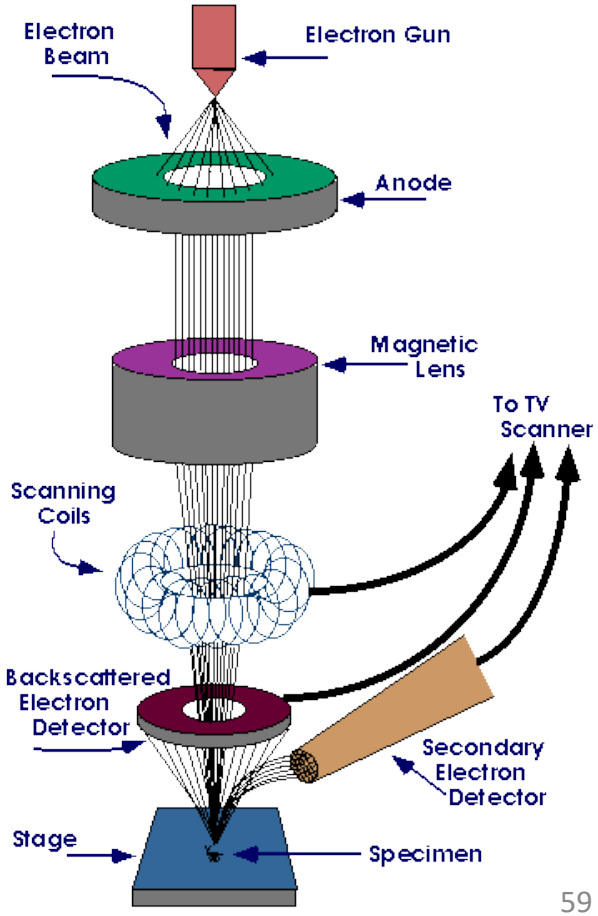
Kouřil a kol. (2011) BBA

Skenovací elektronová mikroskopie - SEM

- informace o povrchové vrstvě vzorku
- vhodné i pro silnější vzorky
- specifická detekce elektronů nad rovinou vzorku
- povrch vzorků musí být vodivý (výjimka pro environmentální SEM) – pokovování povrchu



Schema SEM



Skenovací elektronová mikroskopie

Pylová zrna

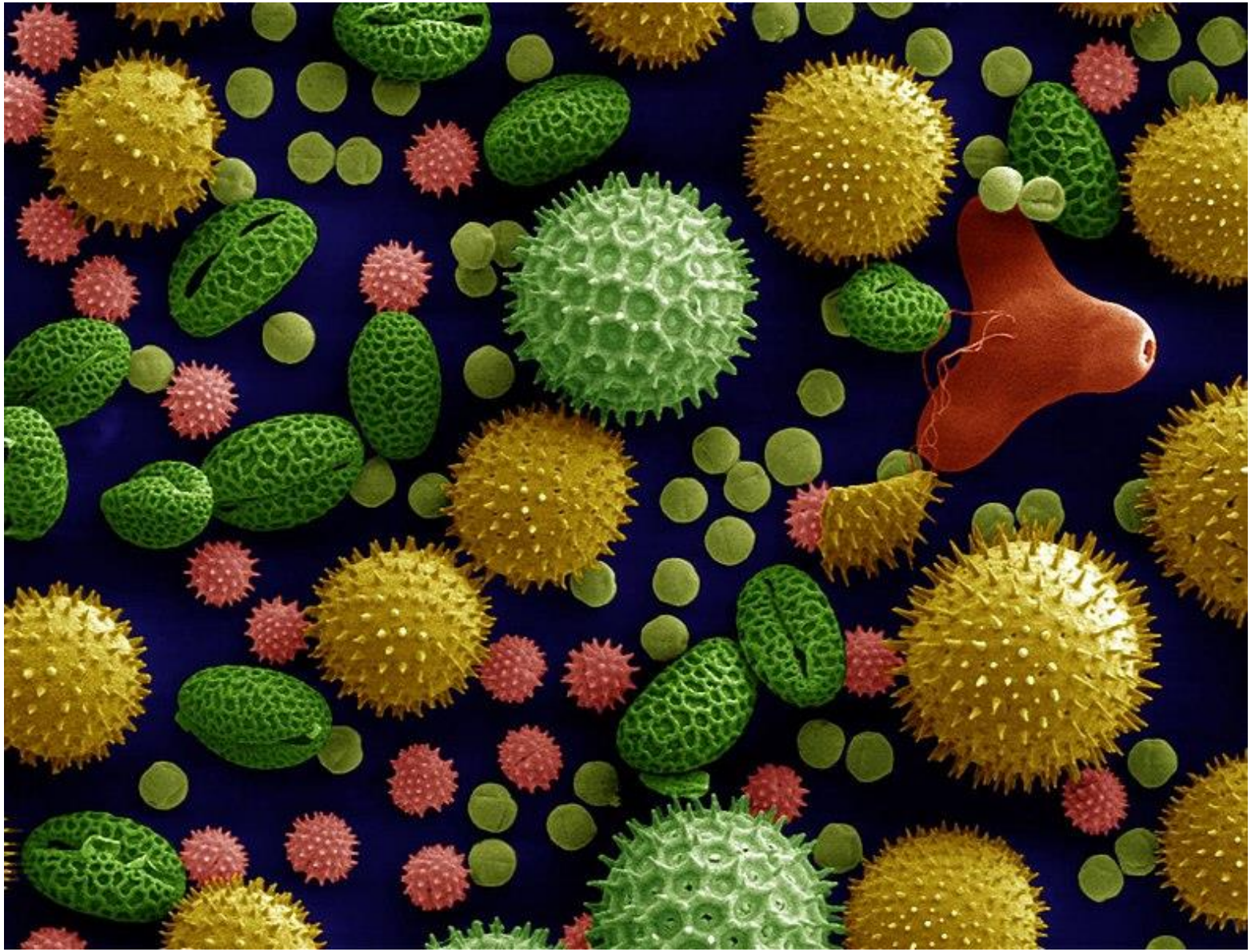


Image credit: Dartmouth Electron Microscope Facility, via Wikimedia Commons.

Skenovací elektronová mikroskopie

Hlava a ústa listonoha

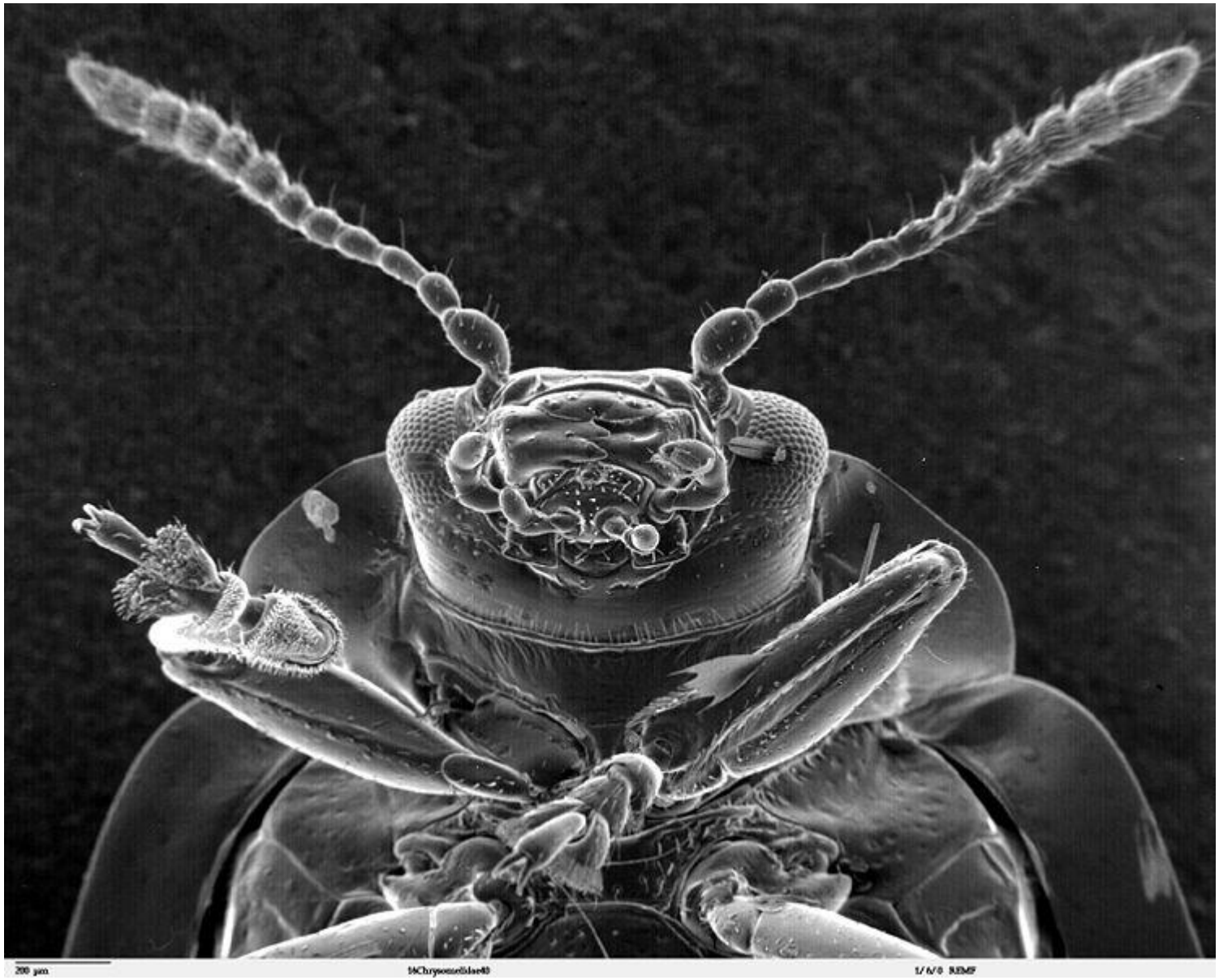


Image credit: Louisa Howard, Dartmouth Electron Microscope Facility, via Wikimedia Commons.

Skenovací elektronová mikroskopie

Detail oka octomilky

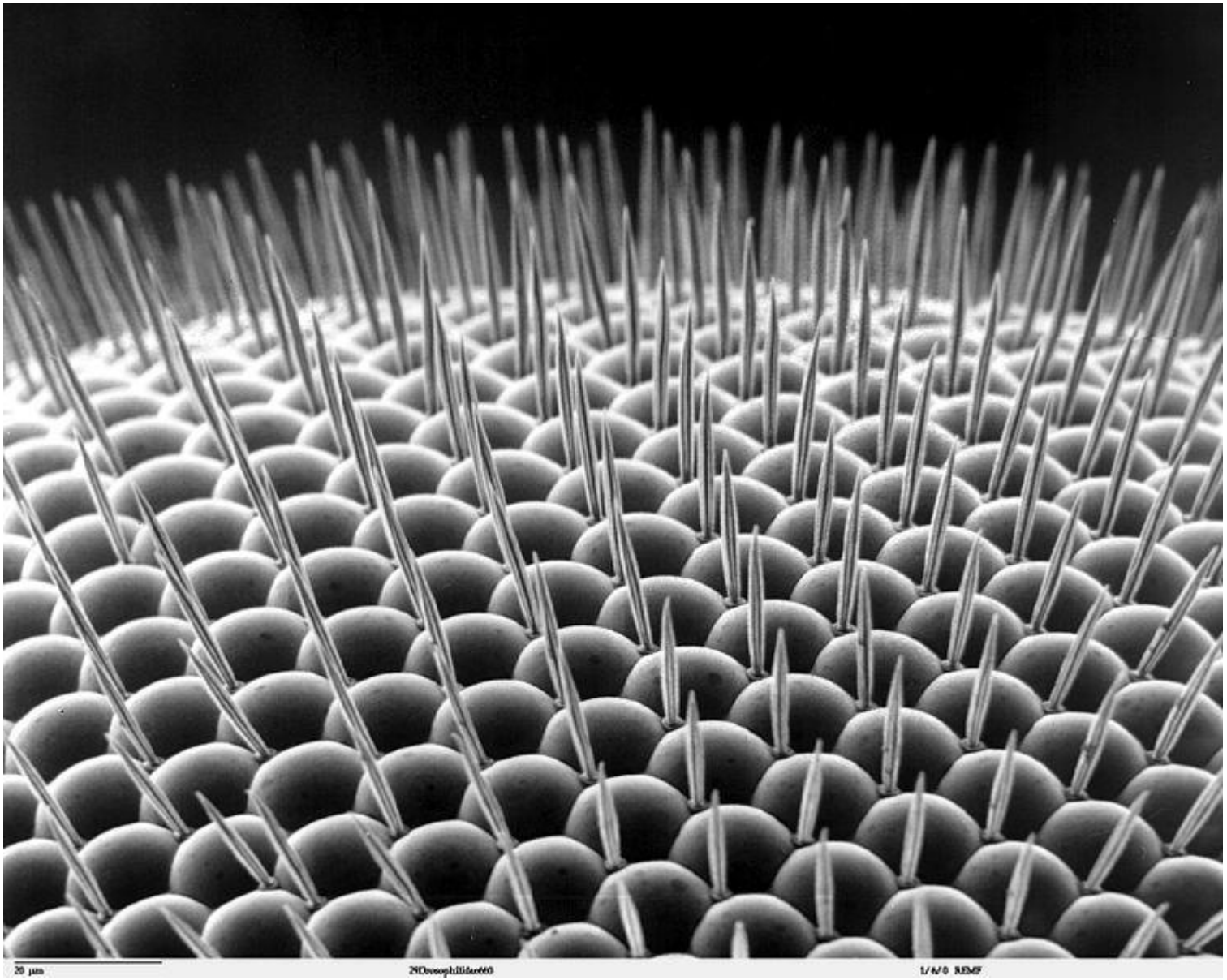


Image credit: Louisa Howard, Dartmouth Electron Microscope Facility, via Wikimedia Commons.

Skenovací elektronová mikroskopie

Napadení lidských buněk salmonelou

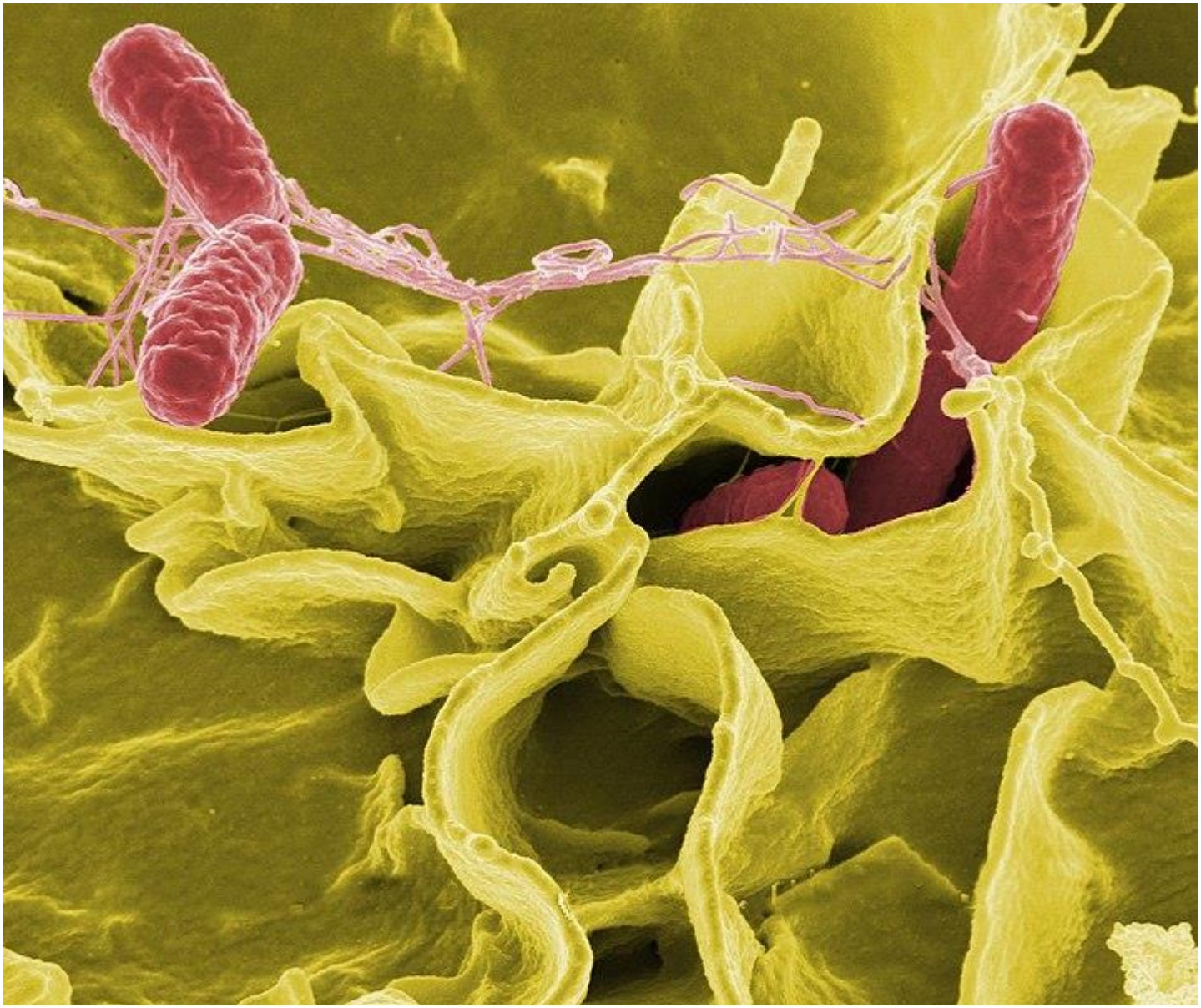
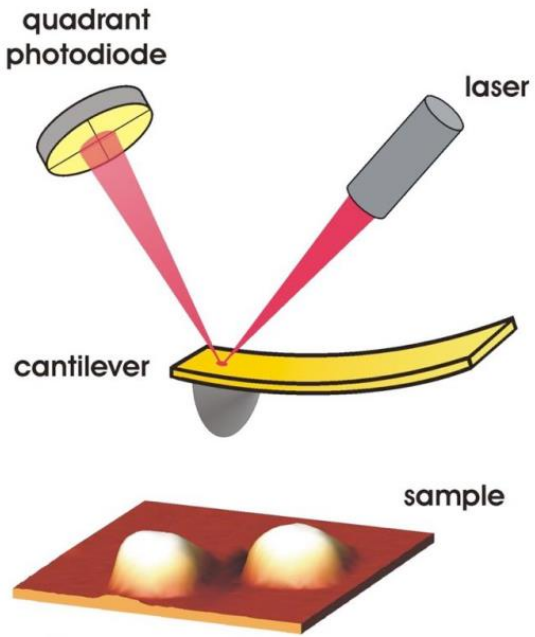


Image credit: Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, via Wikimedia Commons.

Mikroskopie atomárních sil

- specifická metoda mikroskopie skenující sondou



Průběh meziatomárních sil odvozených z Lennard-Jonesova potenciálu

Princip:

- velmi ostrý hrot se pohybuje nad vzorkem nebo je v dotyku s ním a je odpuzován/přitahován vzorkem
- využívá atomárních sil mezi atomy hrotu a vzorku
- hrot je upevněn na tenkém a pružném nosníku
- ohyb nosníku je detekován $\Rightarrow$ informace o velikosti interakce hrotu a vzorku

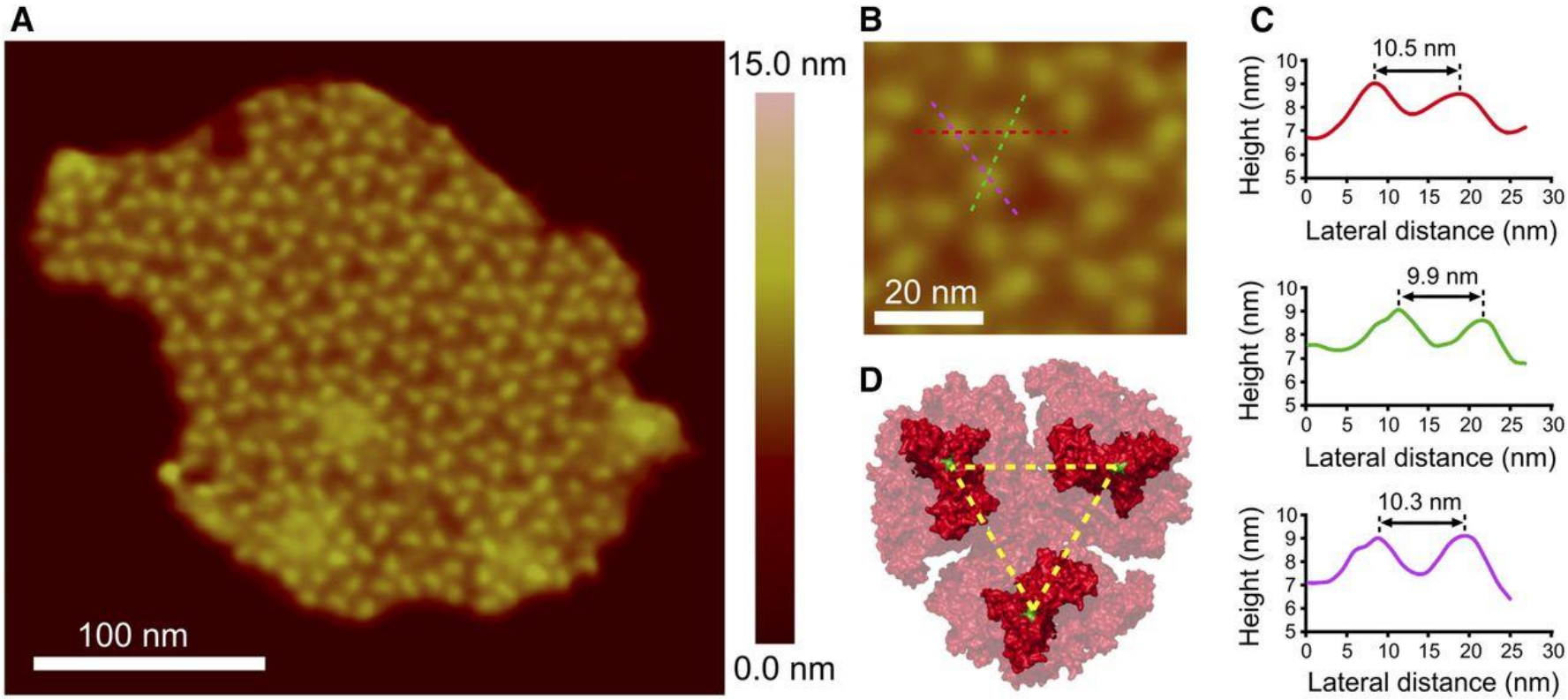
kontaktní režim – oblast odpudivých sil

bezkontaktní režim – oblast přitažlivých sil

Bezkontaktní režim AFM - ukázka

https://www.youtube.com/watch?v=Ha53tFTsmW8

Mikroskopie atomárních sil



MacGregor-Chatwin et al. (2017) Plant Cell 29: 1119-1136

AFM Imaging and Analysis of a Thylakoid Membrane Patch from T. elongatus That Contains Ordered Arrays of Trimeric Complexes.

(A) AFM topograph of a membrane patch.

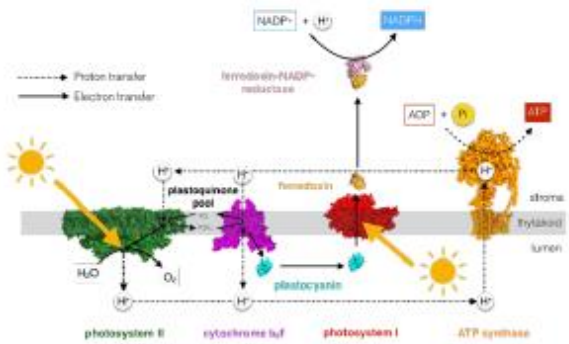
(B) Zoom to a single complex, with the positions of three height profiles shown (red, pink, and green dashed lines), taken across the approximate positions of maximum height.

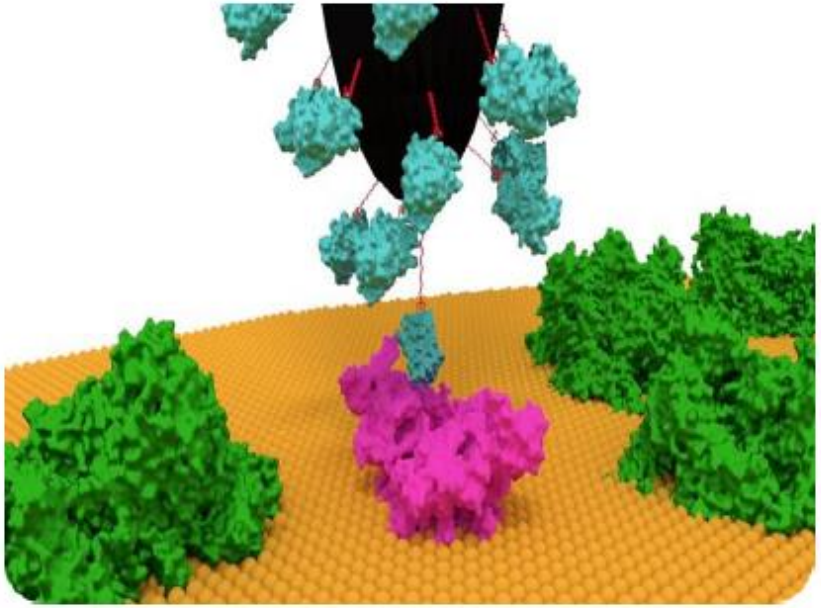
(C) Height profiles corresponding to the lines in (B), with lateral distances shown.

(D) Structure of the cytoplasmic face of the PSI complex taken from PDB:1JB0. The dashed yellow lines are drawn between proline 29 of the PsaC subunit on each monomer, shown in green, and represent a distance of 9.1 nm.

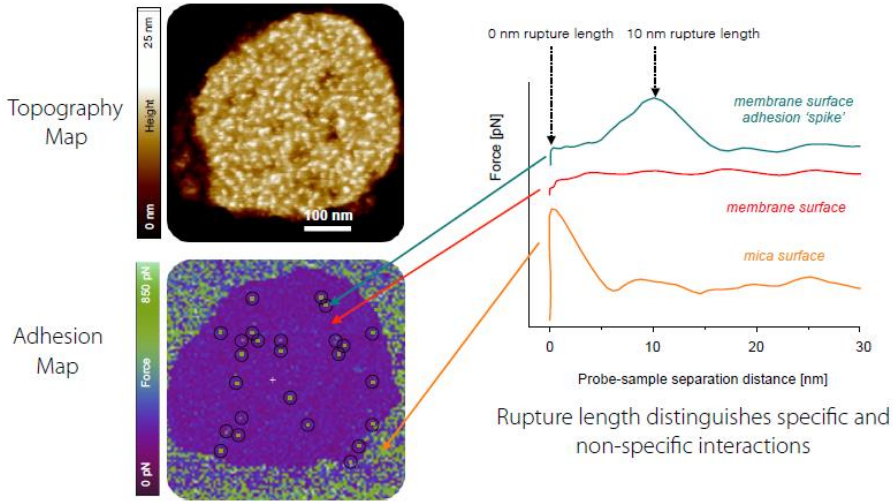
Mikroskopie atomárních sil

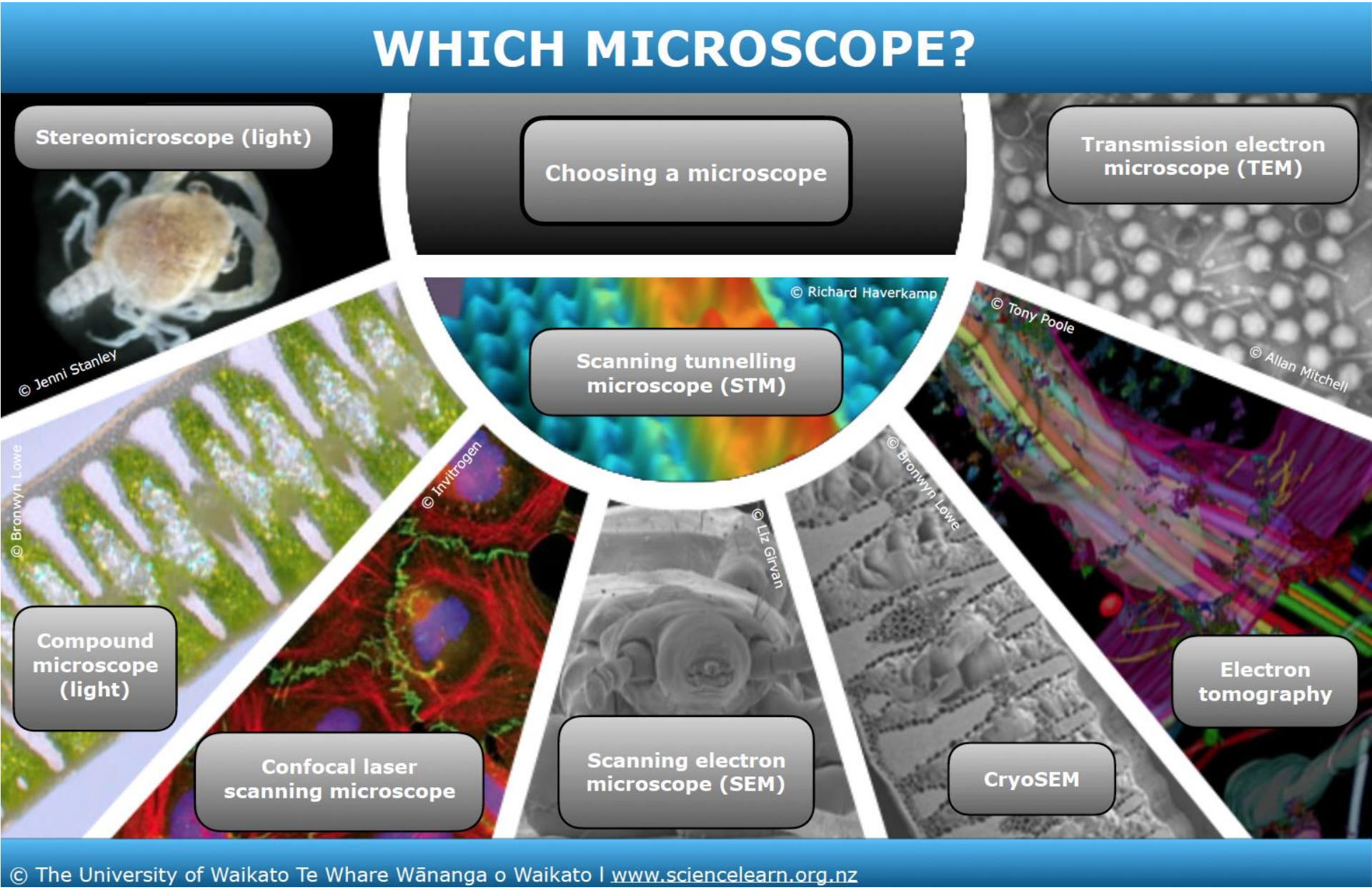
Lokalizace cytochromu b_6f komplexu v tylakoidní membráně pomocí aktivovaného hrotu





- molekuly plastocyaninu (Pc) navázány na hrot pomocí 10 nm PEG linkeru
- Pc je substrát pro cytochrome b_6f komplex
- vzorek skenován v poklepovém režimu
- v případě vazby Pc na cytochrom b_6f komplex je potřeba aplikovat větší sílu na odtržení hrotu



Johnson et al., 2014, Plant Cell

Závěrečné shrnutí