

Metoda: Elektronová mikroskopie

Tereza Rydrychová, ZL3

Školitelé: Gabriela Suchá, Petr Ferczadi, DiS

Princip:

Elektronová mikroskopie je metoda umožňující studium mikrostruktury objektů.

Mikrostrukturu zkoumáme ve vakuu za pomoci svazku elektronů, který vzniká emisí elektronů z katody, které jsou dále urychlovány k anodě. Svazek je dále směřován vhodným elektrickým, nebo magnetickým polem.

Elektronovou mikroskopii dělíme na dva typy. Jedná se o transmisní a skenovací elektronovou mikroskopii. Vlnové délky urychlených elektronů jsou o mnoho řádů menší, než vlnové délky fotonů viditelného světla. Díky tomu má elektronový mikroskop větší rozlišovací schopnosti a může dosáhnout většího zvětšení (až 1 000 000x).

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

Elektrony pronikají vzorkem, s kterým interagují a jsou tak odchylovány od původního směru. Konečný obraz je tvořen z většiny neodchýlenými elektrony na zobrazovací systém.

Celková tloušťka preparátu nesmí přesahovat 100 nm.

Proces odvodnění vzorku a prosycení epoxidovými pryskyřicemi, se provádí manuálně po dobu 3 dní a je následováno zalitím vzorku do směsi epoxidových pryskyřic.

Zhotovujeme tzv. polotenské řezy. Předem si popíšeme podložní skla a krájíme na ultramikrotomu. Bloček upravíme pomocí pilníku do tvaru pravidelné pyramidy, kterou následně nahrubo skrojíme a pomocí žiletky ho upravíme do tvaru čtverce. Používáme skleněné nože naplněné redestilovanou vodou. Krájíme řezy tenké 810 – 850 nm, řez by měl mít zelenkavou až růžovou barvu. Řezy nanese pomocí pátradla (řasa) do připravených kapek na podložním skle, které jsme vytvořili pomocí injekční stříkačky. Poté řezy necháme schnout na sušící plotně (98°C), kde se odpaří přebytečná voda a obarvíme je toluidinovou modří. Obarvené řezy zkontrolujeme pod mikroskopem. Nejlépe vypadající řez předložíme lékaři.

Podle lékařem označeného místa na řezu se bloček opět skrojí na pravidelný čtverec 2 mm x 2 mm. Poté krájíme tzv. ultratenké řezy o síle 70 – 90 nm, měli by mít stříbrnou až zlatavou barvu. Před natažením ultratenkých řezů je potřeba vyčistit měděné sítky, na které se řezy natahují. Pomocí pátradla natrháme nakrájenou pásku po 2 – 3 řezech a natáhneme na sítku. Je potřeba zaplnit 2 – 3 sítky po 4 – 12 řezech, záleží na jejich velikosti. Sítky s nataženými řezy vložíme do Petriho misky s čistým filtračním papírem.

K barvení ultratenkých řezů se používá kontrastování, což je zvyšování kontrastu různých struktur pomocí solí těžkých kovů uranyl acetátu a leadcitrátu. Tento proces se musí chránit před světlem, barvení proto provádíme v krabičce, která brání průniku světla.

Uplatnění metody:

TEM - tato metoda je v histologii používána za účelem zobrazit mikrostruktury buněk, jednotlivé orgány a další. V praxi se tato metoda využívá při zpracování svalových biopsií a biopsií ledvin.

Úskalí metody:

Nákladné vybavení a prostorová náročnost. Dále je také nutné, aby vzorek byl velmi tenký a preparát musí být umístěn ve vakuu, což neumožňuje pozorovat živé organismy.

Přístrojové vybavení:

Elektronový mikroskop, mikroskop, ultramikrotom, sušící plotna, ultrazvuková čistička.

Odběr a transport:

Punkční biopsie ledviny se provádí v lokální anestézii, pod ultrazvukovou kontrolou za pomoci punkční jehly. Vzorek získáme ve formě úzkého válečku. Vzorek je do laboratoře dopraven ihned po odebrání v nefixovaném stavu a je přinesen v Petriho misce položené na ledu. V misce je gáza namočená fyziologickým roztokem, protože hrozí vyschnutí vzorku na vzduchu a tím jeho znehodnocení.