

# **SPECIÁLNÍ HISTOLOGICKÉ TECHNIKY**

# **SPECIÁLNÍ TECHNIKY SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE**

# KONVENČNÍ HISTOCHEMIE

Histochemická reakce:  
hledané struktury se prozradí vytvořením  
**barevného reakčního produktu**  
*in situ*  
s původně nebarevnou reagensí

- Detekce
- prvků (iontů)
  - nukleových kyselin
  - lipidů
  - sacharidů
  - pigmentů
  - proteinů (aminokyselin) – dnes neobvyklé, nahrazeno imunohistochemickými metodami

# PŘÍKLADY HISTOCHEMICKÝCH REAKCÍ I

## prvky (ionty)

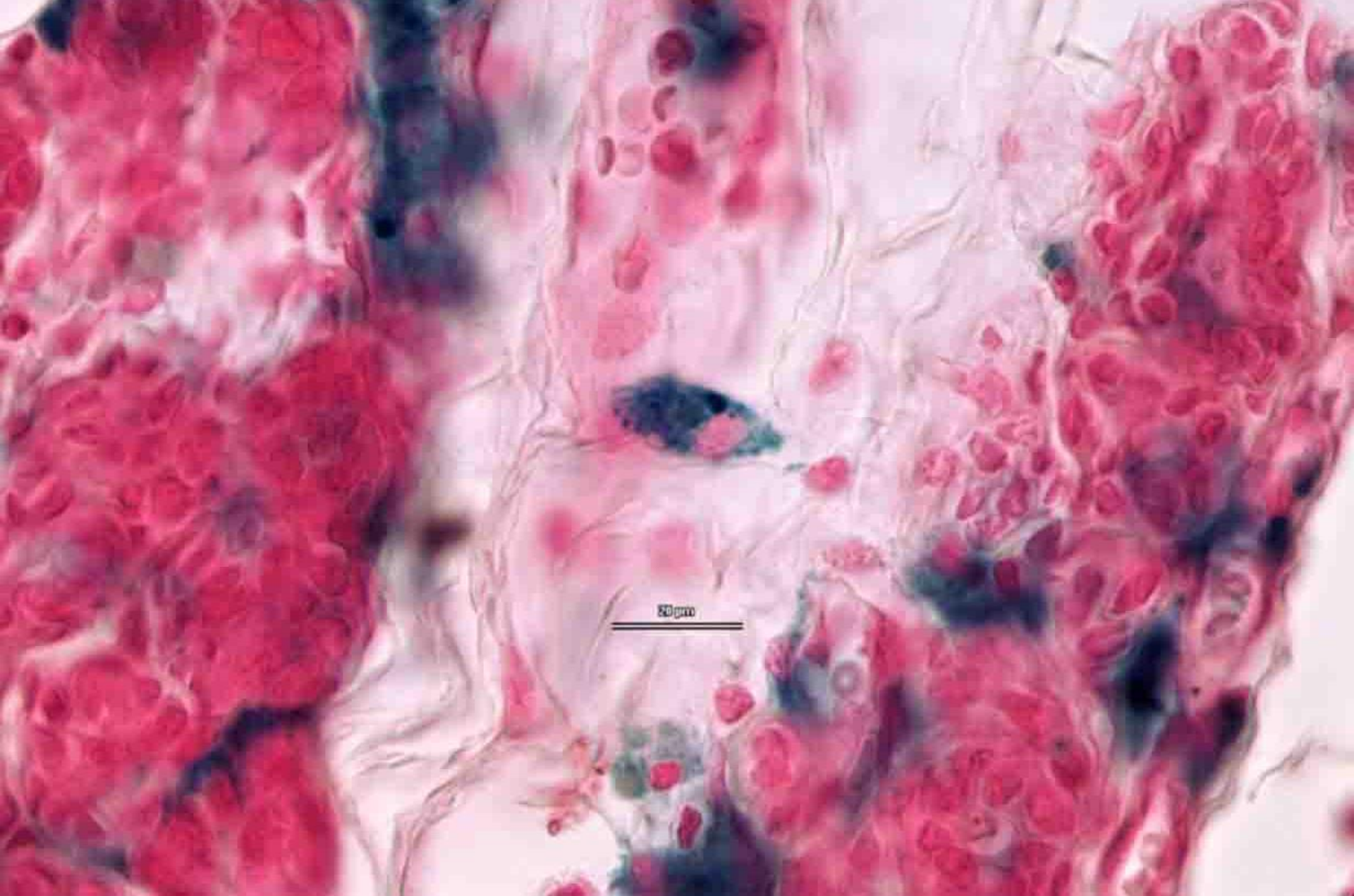
- Kossova reakce (substituce  $\text{AgNO}_3$ ) =  $\text{Ca}^{2+}$  (kalcifikace)
- Perlsova reakce (vznik Berlínské modři) =  $\text{Fe}^{3+}$  (hemosiderin)

## nukleové kyseliny

- Feulgenova reakce (HCl + Schiffovo reagens) = DNA

## lipidy

- PFAS reakce (PerFormic Acid + Schiffovo reagens) = průkaz dvojných vazeb (fosfolipidy, lipofuscin, také keratin)



**Perlsova reakce**

**hemosiderin - siderofágy**

# PŘÍKLADY HISTOCHEMICKÝCH REAKCÍ II

## sacharidy

- PAS reakce = polysacharidy s vicinálními glykoly (neutrální polysacharidy)
- diastáza nebo  $\alpha$ -amyláza + PAS = odlišení glykogenu
- HID (high iron diamine) = sulfatované glykokonjugáty
- Hale-Müller (koloidní Fe) = kyselé mukopolysacharidy

## pigmenty

- Gmelinova reakce (oxidace) = bilirubin, hematoidin

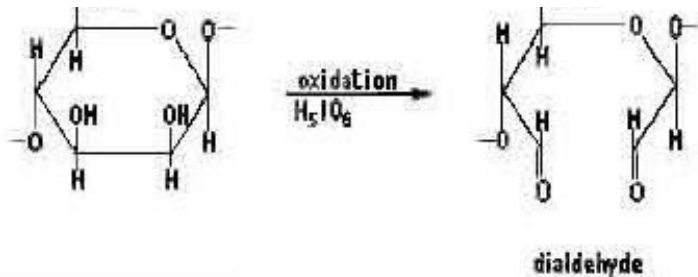
## proteiny (aminokyseliny)

- Millionova reakce = tyrosin
- Sakaguchiho reakce = arginin
- tetrazotová benzidinová reakce = tryptofan

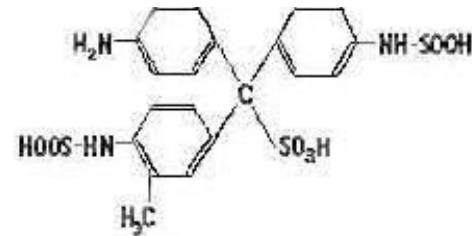
# PAS reakce (periodic acid – Schiff)

neúplně specifická oxidativní metoda pro průkaz **složených cukrů** v buňkách a tkáních

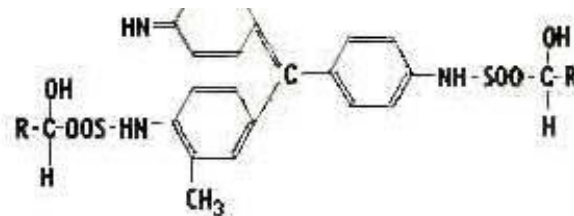
**1** oxidace sousedních (vicinálních) volných glykolových skupin kyselinou jodistou (**Malapradeho reakce**)



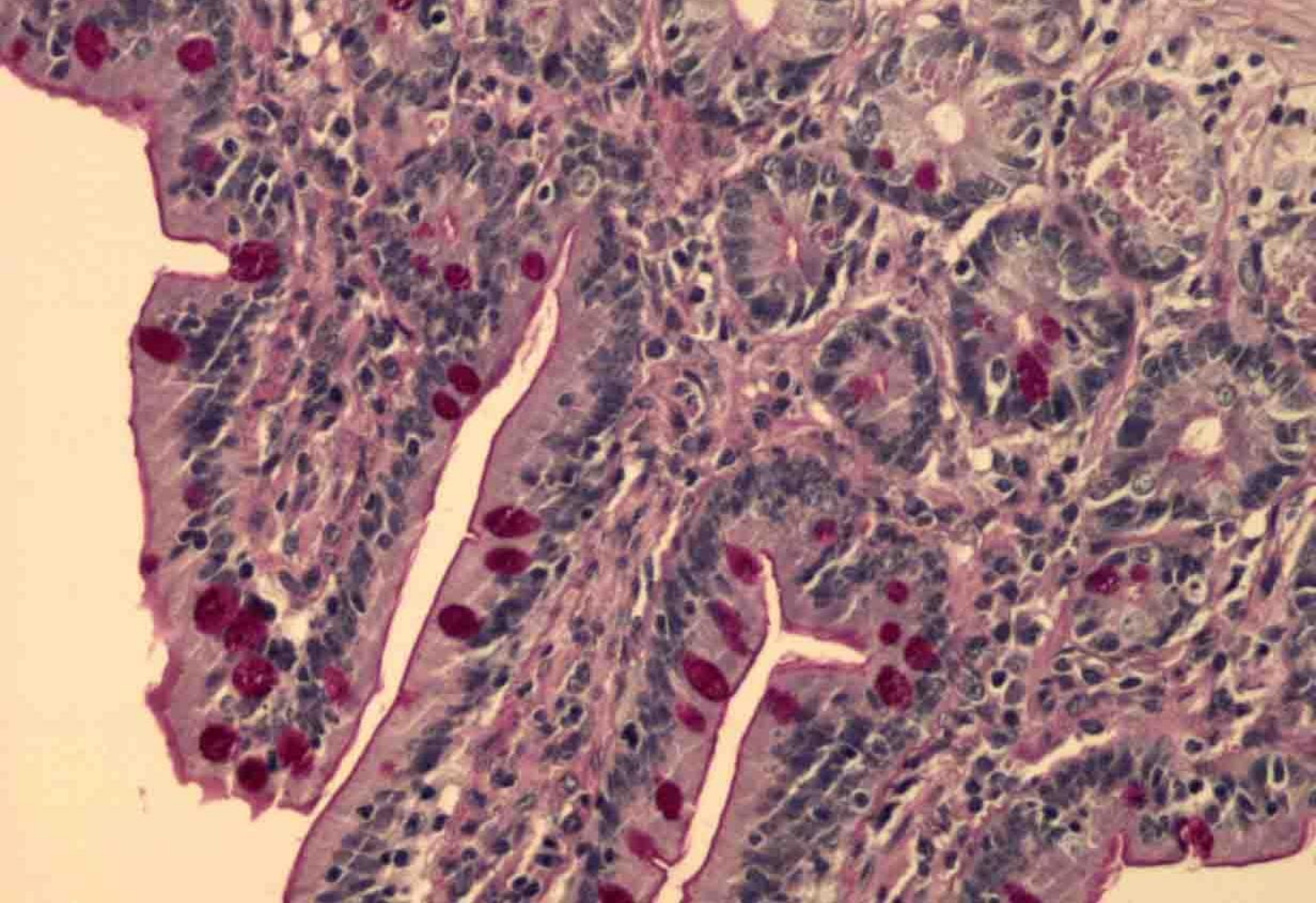
**2** průkaz přítomnosti nově vzniklých aldehydových skupin Schiffovým činidlem **Schiffovo činidlo** – leukoforma bazického fuchsínu (bezbarvá)



po reakci s aldehydy vzniká nová **červenofialová** sloučenina



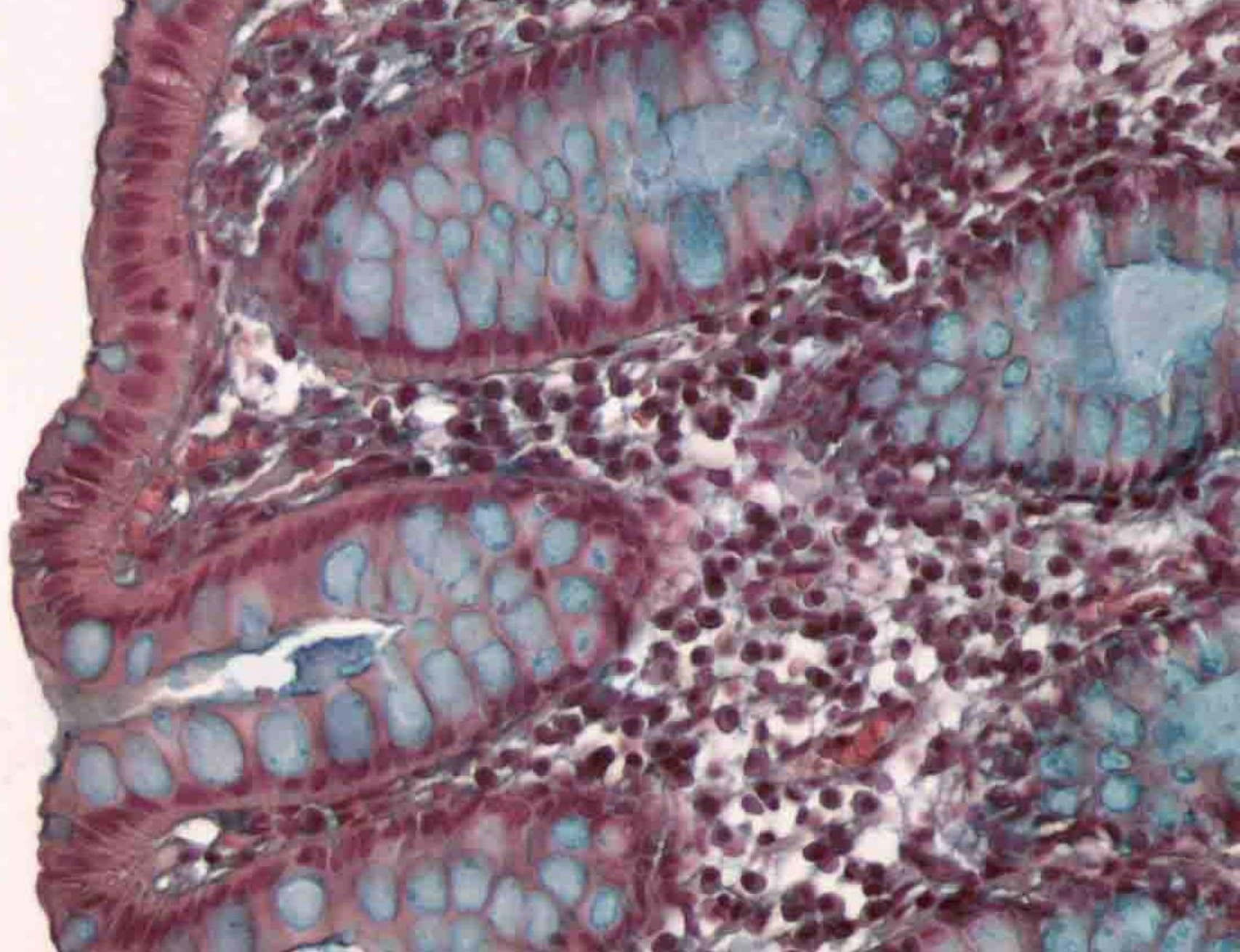




**PAS reakce**

**neutrální muciny**





**Hale-Müller**

**kyselý glykokonjugát**

# ENZYMOVÁ HISTOCHEMIE

## (katalytická)

hledáme **lokalizaci** a/nebo **aktivitu** určitého enzymu

- nejprve vznikne reakční produkt po zpracování **substrátu** hledaným enzymem,
- pak je reakční produkt zviditelněn (vizualizován) vytvořením **barevné sloučeniny *in situ***

Co musí být zachováno:

- aktivita enzymu („nativní“ vzorek, vhodné pH a teplota)
- stabilita reakčního produktu i finální barevné sloučeniny
- struktura tkáně

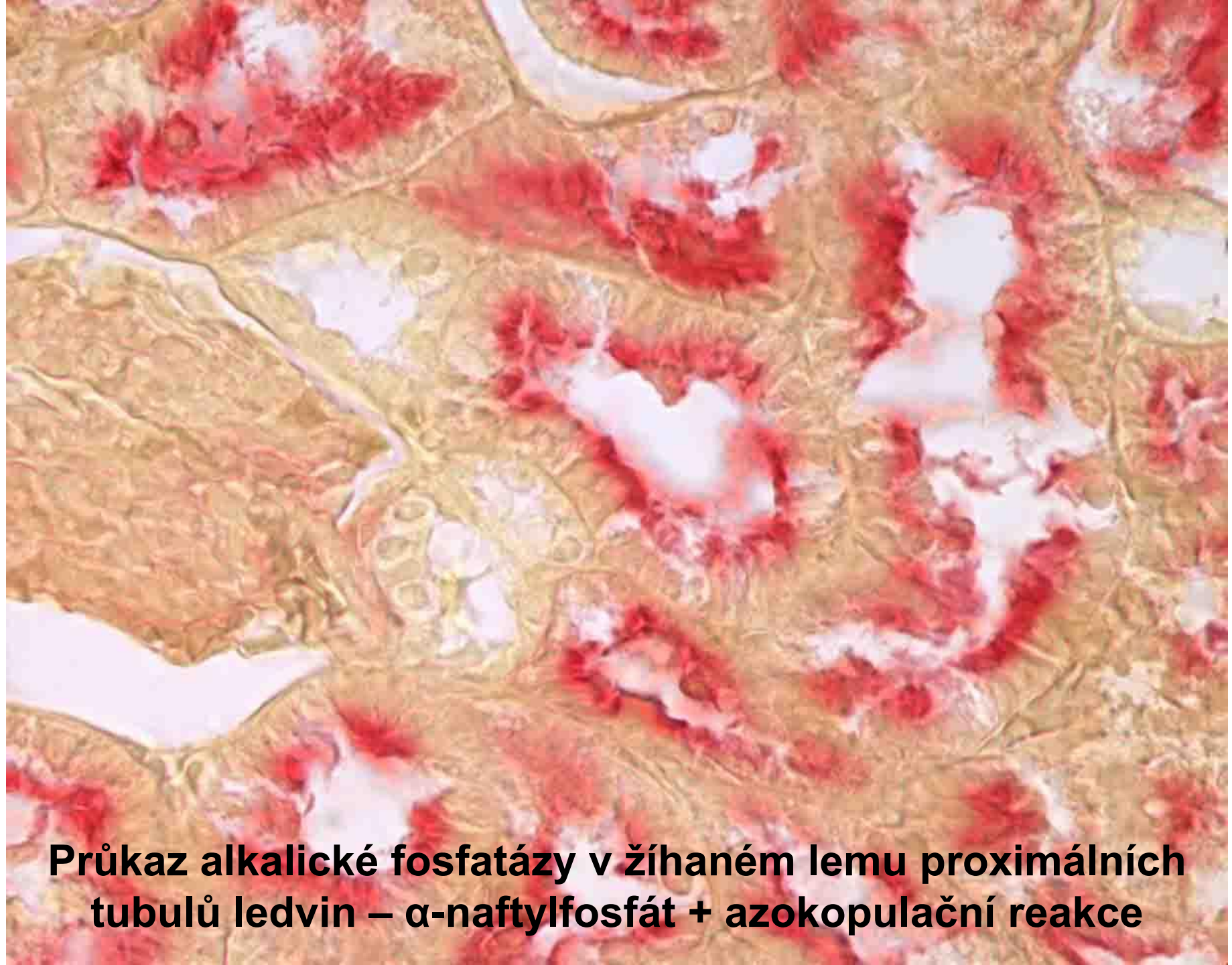
enzymu tedy nejprve nabídneme vhodný **substrát**, vznikne **reakční produkt**

- **fosfatázy** různé fosfáty - glycerolfosfát (zastaralé)
  - NP ( $\alpha$ -naftylfosfát)
  - BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát)
- **dehydrogenázy** oxidovatelný substrát odštěpující vodík
- **oxidázy** oxidovatelný substrát
- **peroxidázy** peroxid vodíku
- **esterázy** hydrolyzovatelný ester  
(specifické a nespecifické)
- **glykosidázy** glykosidická vazba  
(cukry, glykoproteiny i glykolipidy)
- **sulfatázy** sulfoestery
- **nukleotidázy** nukleotidový řetězec
- **reduktázy** redukovatelný substrát
- **proteázy** protein nebo peptid

pak se reakční produkt zviditelní **chromogenní** reakcí

- precipitační reakcí (barevné nerozpustné soli kovů Pb, Co, Sr, Ce – např. sulfáty)
- simultánní azokopulací (naftol odštěpený ze substrátu se převede diazoniovou solí na nerozpustné azobarvivo)
- indigogenní reakcí (indoxyl odštěpený ze substrátu je vzdušným O<sub>2</sub> oxidován na indigo)
- tetrazoliovou metodou (bezbarvá tetrazoliová sůl se redukuje na formazan)
- diaminobenzidिनovou reakcí (oxidace DAB na hnědou sraženinu)





**Průkaz alkalické fosfatázy v žíhaném lemu proximálních tubulů ledvin –  $\alpha$ -naftylfosfát + azokopulační reakce**



# ZYMOGRAFIE *in situ* (ISZ)

stanovujeme lokalizaci a/nebo aktivitu **proteázy**

metaloproteinázy (MMP-Zn)

serinové proteázy (chymotrypsin, trypsin, karboxypeptidáza, trombin, chymáza, tryptáza, kalikrein)

cysteinové proteázy (katepsiny, kalpainy, kaspázy, papainy, bromelain)

aspartátové proteázy (pepsin, chymosin, renin, retropepsin)

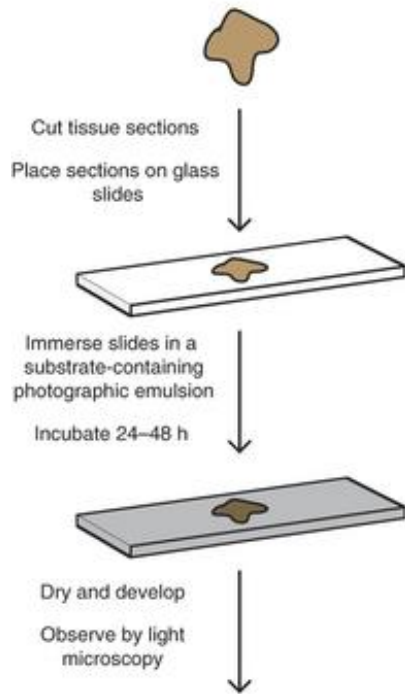
nezařazené proteázy (kedaracidin, chromoprotein, apoprotein)

ta se prozradí

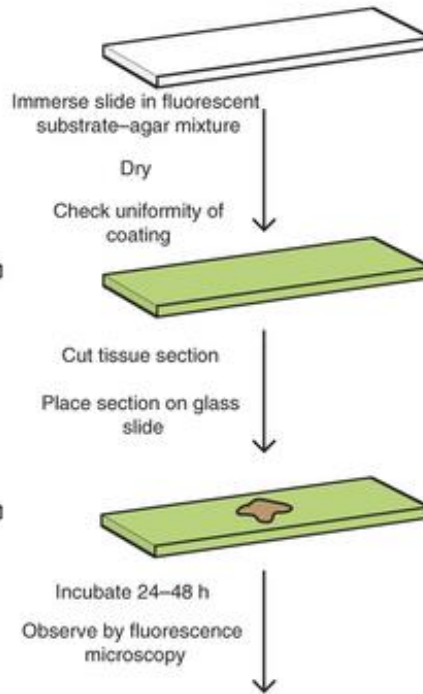
**strávením (rozštěpením) substrátu *in situ***

a je vizualizována buď **fotograficky**, nebo **fluorescenčně**

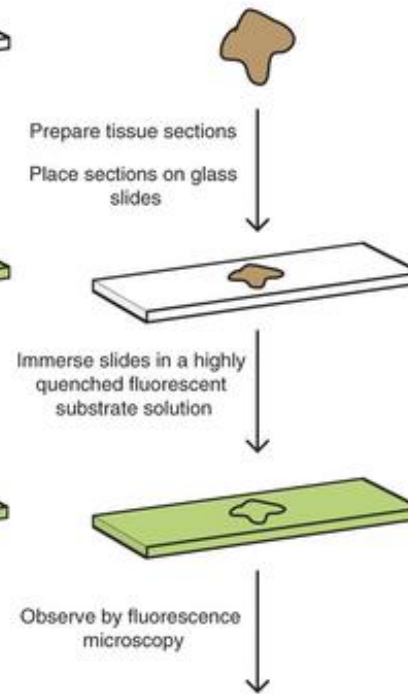
### ISZ založená na fotografické emulzi



### ISZ založená na fluorescenčně značeném substrátu



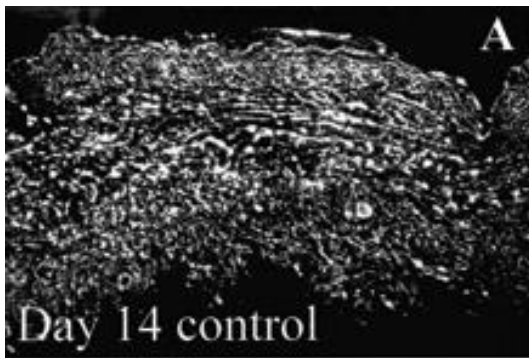
### ISZ založená na fluorescenčně značeném, ale „zhasnutém“ (quenched) substrátu



Fotografická emulze obsahuje substrát, který je stráven. Po vyvolání vidíme prázdná místa.

Sklo je potaženo substrátem konjugovaným s fluorochromem. Po strávení vidíme prázdná (nesvítící) místa.

Řez se inkubuje se substrátem konjugovaným s fluorochromem a jeho zhasěčem (quencher). Po strávení dojde k rozsvícení dosud blokováného fluorochromu.



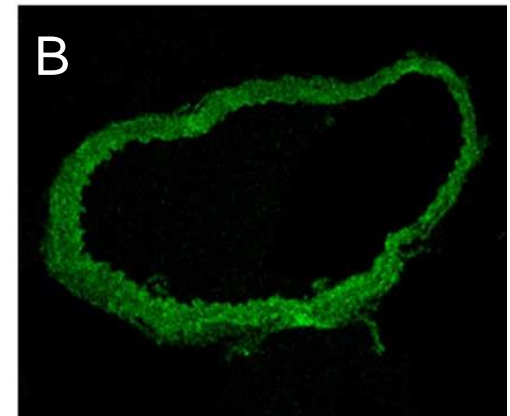
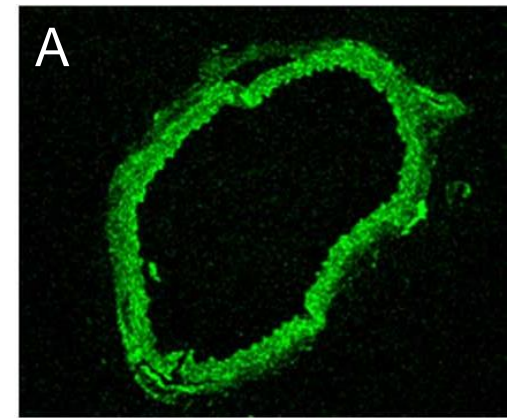
ISZ založená na fotografické emulzi. Bílé oblasti značí aktivitu metaloproteinázy ve stěně žíly (A). V pokusu B byl použit inhibitor metaloproteinázy TIMP-1.



No Inhibitor

TIMP-1

ISZ založená na fluorescenčně značeném substrátu. Tmavé oblasti značí aktivitu metaloproteinázy v buňkách lidského karcinomu prsu, tato aktivita byla inhibována TIMP-1.



ISZ založená na fluorescenčně značeném, ale „zhasnutém“ (quenched) substrátu. Zeleně fluoreskující oblasti značí aktivitu metaloproteinázy ve stěně myší aorty, která byla částečně inhibována na obrázku B.

# **AFINITNÍ HISTOCHEMIE**

# IMUNOHISTOCHEMIE

hledáme **lokalizaci určité látky** v buňce nebo v mezibuněčné hmotě

součástí molekuly hledané látky musí být nejméně jedna antigenní determinanta (**epitop**), hledaná látka se pak nazývá **antigen**

epitopem je specifický řetězec aminokyselin nebo monosacharidů, hledanou látkou tedy může být **protein, glykoprotein, polysacharid, lipoprotein** nebo glykolipid

na epitop se specificky váže uměle připravená **protilátka** (imunoglobulin)



Protilátka je označena **značkou**

- **fluorochrom**
- **enzym**
- **hapten** – malá neimunogenní molekula, která se stane imunogenní po vazbě na bílkovinu (biotin, digoxigenin)
- **těžký kov v EM**

**Značka je následně vizualizována**

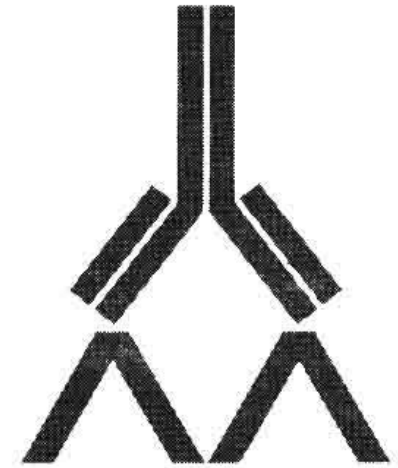
# OVlivNĚNÍ VAZBY PROtilÁTKY NA ANTIGEN

- inkubační teplota
- inkubační pH
- inkubační doba
- vlhkost prostředí při udržování řezu
- koncentrace protilátky
- osvětlení
- typ a průběh fixace

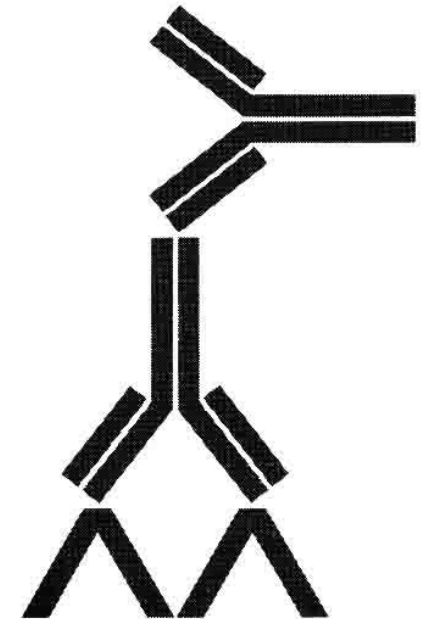
# PROTILÁTKY POUŽÍVANÉ PŘI IMUNOHISTOCHEMII

## 1/ rozdělení podle použití

**a/ primární protilátka** – protilátka reagující přímo s hledaným antigenem

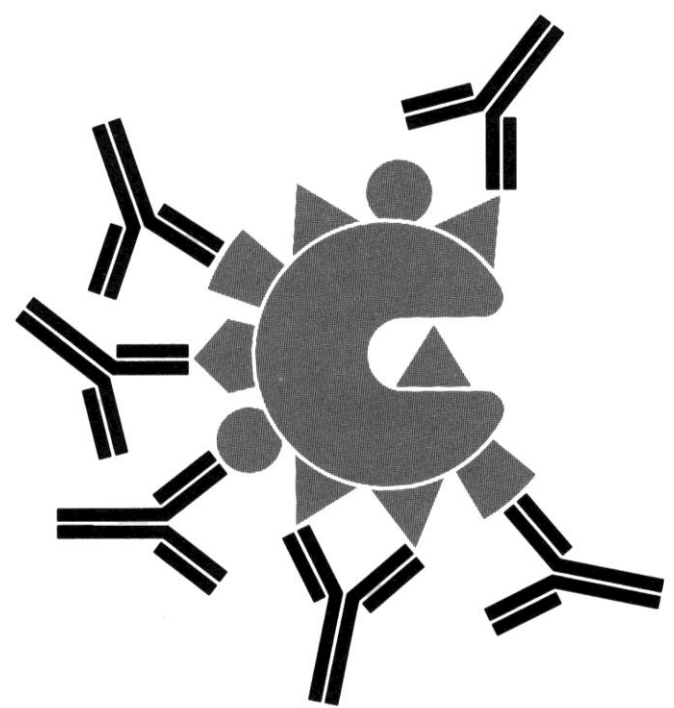


**b/ sekundární protilátka** - protilátka proti Ig živočišného druhu, z něž pochází primární protilátka

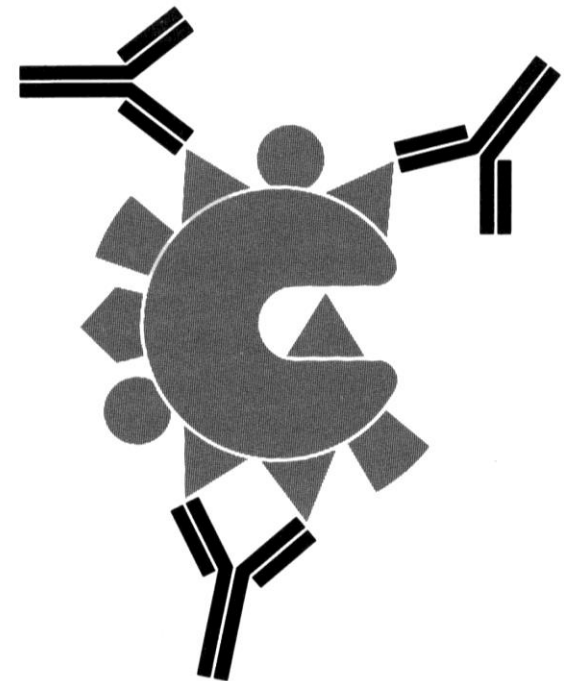


## 2/ rozdělení podle specifity

**a/ polyklonální protilátka –**  
protilátka připravená imunizací  
zvířete vybraným antigenem,  
reaguje s různými epitopy  
příslušného antigenu



**b/ monoklonální protilátka –**  
protilátka připravená hybridomovou  
technikou, reaguje jen s jedním  
epitopem



# POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

**imunizace** vybraného laboratorního zvířete  
(myš, králík, koza, potkan, prase, osel, pes, kůň)  
vybraným **antigenem**

frakce krevního séra (antisérum)

## **výhoda**

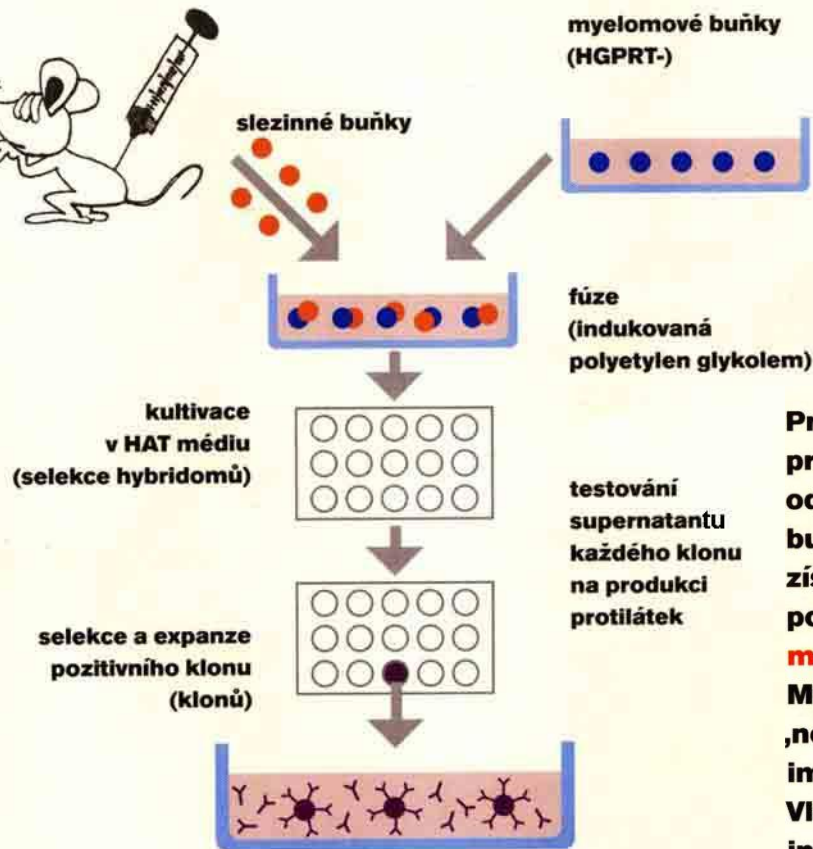
rychlost a jednoduchost

## **problém**

nespecifické křížové reakce se stejnými nebo podobnými epitopy na různých antigenech



# MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY



Princip přípravy hybridomových buněk, které produkují monoklonální protilátky s definovanou specificitou, vychází z kombinace vlastností dvou odlišných rodičovských buněk v buňce jediné. Jednou z rodičovských buněk je **B-lymfocyt** produkující rozpustné protilátky, který se prakticky získává ze sleziny imunizovaného zvířete (laboratorní kmeny myši či potkanů), druhou je laboratorně ustanovená nádorová linie (nazývaná **myelom**).

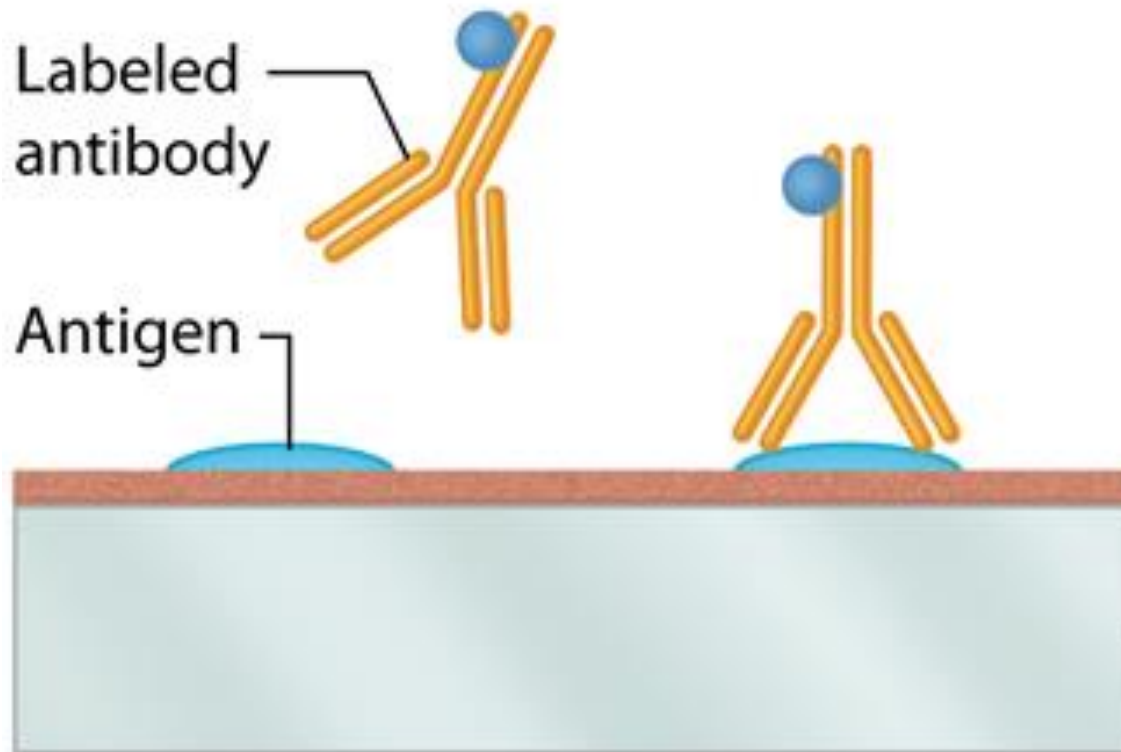
Myelom lze nekonečně dlouho kultivovat (takže daruje hybridomové buňce „nesmrtelnost“) a navíc neprodukuje nespecifické lehké či těžké řetězce imunoglobulinů.

Vlastní fúze slezinných B-lymfocytů a myelomových buněk je nejčastěji indukovaná vysokou koncentrací **polyethylen glykolu**. Hybridomy produkující specifické protilátky jsou následně selektovány ve speciálním růstovém médiu nazývaném **HAT médium** podle jeho složek (**H**ypoxantin, **A**minopterin, **T**hymidin).

Dělení myelomových buněk je v HAT médiu zablokováno, neboť hlavní biosyntetická dráha pro guanosin je inhibována aminopterinem a myelom neexprimuje enzym **hypoxantin-guanin fosforibosyl transferázu (HGPRT)**, který je nutný pro alternativní metabolickou dráhu syntézy guanosinu z hypoxantinu. Nezfúzované myelomové buňky tedy při kultivaci v HAT médiu rychle umírají.

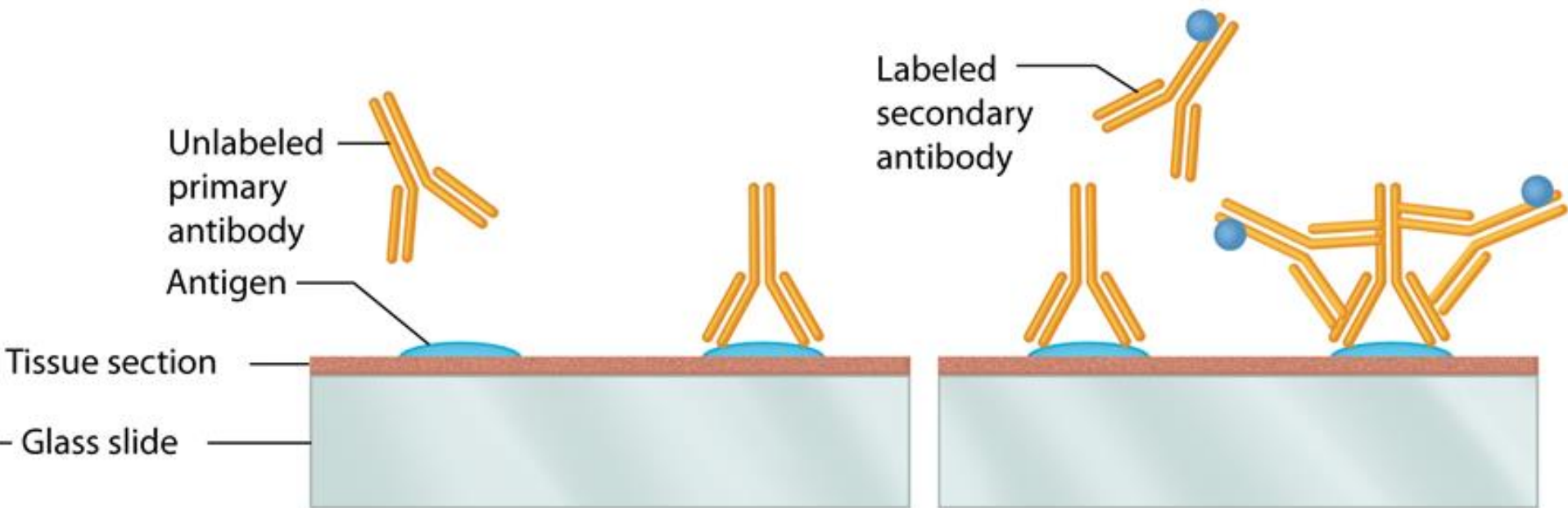
Normální slezinné buňky enzym HGPRT sice exprimují, ale nepřežijí v buněčné kultuře několik dní. Výsledkem selekčního tlaku HAT média jsou tedy pouze hybridomové buňky, které se dále klonují a testují na specificitu produkovaných monoklonálních protilátek.

Problém byl vyřešen teprve s objevem hybridomové technologie v roce 1975 (G. Köhler a C. Milstein za tento objev získali v roce 1984 Nobelovu cenu) a přípravou prvních přesně specifických monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátka je unikátní tím, že je produkována klonem jediné buňky (hybridomu). Proto se nazývá **monoklonální**. Z praktického hlediska to znamená, že všechny molekuly monoklonální protilátky z jednoho hybridomu jsou zcela identické a reagují s jediným epitopem (nemusí být známý) definovaného antigenu.



## **Přímá metoda**

značená **primární** protilátka reaguje přímo s tkáňovým (buněčným) antigenem

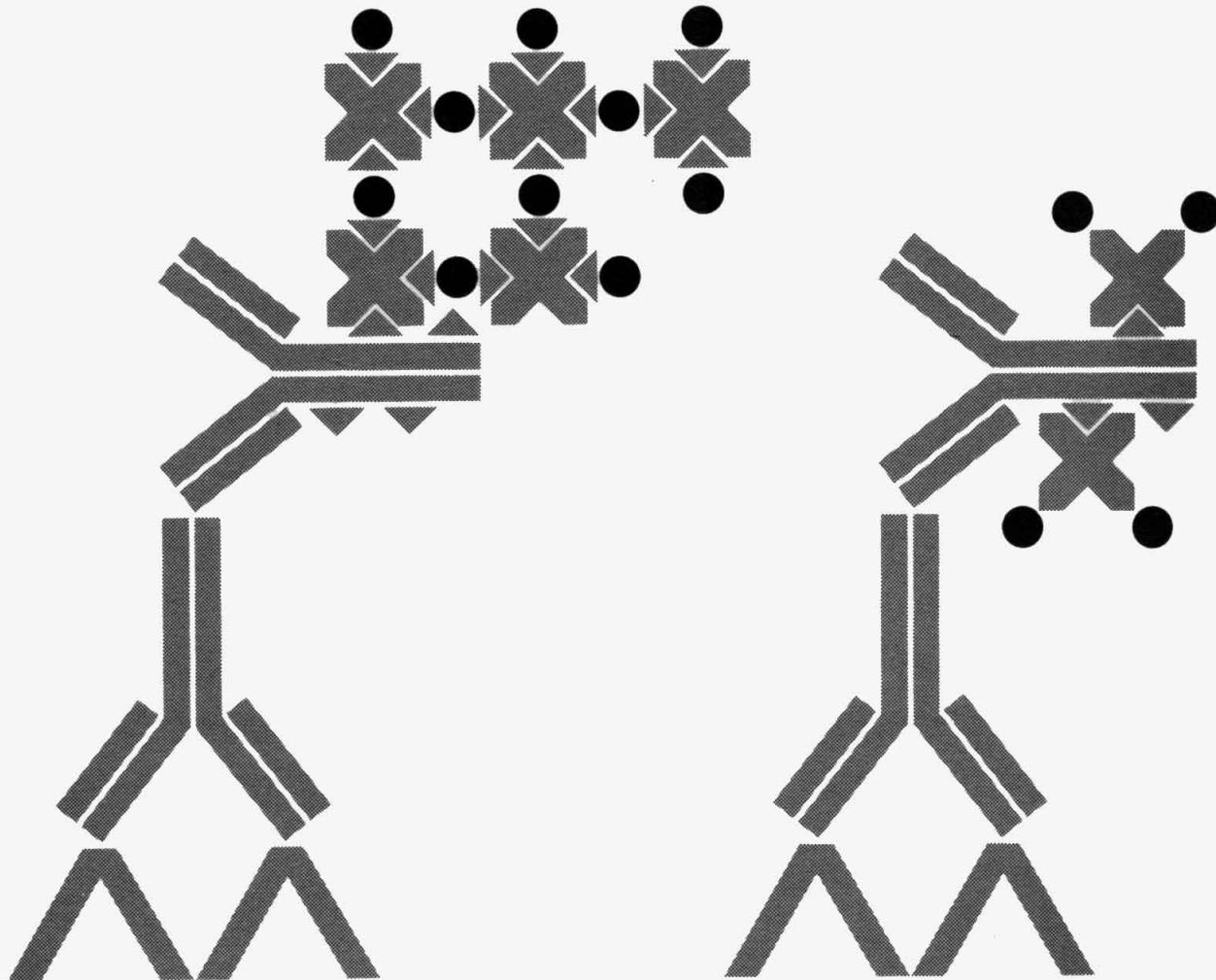


## Dvoustupňová nepřímá metoda

značená **sekundární** protilátka reaguje s **primární** protilátkou vázanou na tkáňový (buněčný) antigen

ABC METHOD

LAB METHOD



## Trojstupňové metody s avidinem-biotinem (haptén)

připravený komplex avidinu a biotinu (ABC) nebo avidin značený enzymem (LAB) reaguje s biotinylovanou **sekundární** protilátkou

## Provedení dvoustepňové nepřímé metody

1. kryostatový nebo parafínový (odparafínovaný a rehydratovaný) řez na podložním sklíčku
2. revitalizace antigenů (antigen retrieval)
- (3. blokování endogenních enzymů – při použití vizualizace pomocí enzymu)
4. blokování pozadí
5. inkubace s primární protilátkou
6. inkubace se značenou sekundární protilátkou
7. vizualizace
8. dobarvení
9. montování

# REVITALIZACE ANTIGENŮ (ANTIGEN RETRIEVAL)

Při zpracování tkáně může dojít k poškození epitopů působením fixace, projasňování, vysychání, přehřátí nebo opakovaného tání a mrznutí.

**K obnovení antigenních vlastností biologického materiálu může dojít:**

- **natrávením proteázami** (trypsin, pepsin, pronáza, ficin, bromelain)
- nebo
- **působením vysoké teploty a speciálního pufru** (citrátový, TRIS, EDTA)
  - vodní lázeň (95-98°C)
  - mikrovlnná trouba
  - tlakový hrnec

# BLOKOVÁNÍ POZADÍ

více příčin nespecifické nežádoucí reakce pozadí

- kontaminace řezů nebo reagensů
- nespecifická vazba - nekovalentní hydrofobní interakce
- elektrostatické interakce
- nespecifická vazba s Fc tkáňových Ig

řešení

jiná fixace

jiný pufr

**vysycení nespecifickým sérem (BSA, FCS)**

nebo mlékem

# BLOKOVÁNÍ ENDOGENNÍ AKTIVITY ENZYMŮ

důležité při vizualizaci enzymovou histochemií, kdy se jako značka používá křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza

i ve tkáních a buňkách jsou jejich vlastní peroxidázy a fosfatázy



falešná pozitivita

řešení: nabídneme enzymu jeho substrát (peroxid vodíku) nebo enzym zablokujeme (azid sodný, levamisol)



## VIZUALIZACE

Specifická vazba protilátky a antigenu na kryostatových, parafínových nebo pryskyřicových řezech je pak zviditelněna (vizualizována) vytvořením

**barevné sloučeniny *in situ* pomocí enzymové histochemie  
nebo  
fluorochromem**

# Příklady vizualizace fluorescenční

excitační světlo (UV, zelené nebo modré) vybudí elektrony v molekule barviva na vyšší energetickou hladinu, při návratu se energie uvolní v podobě fluorescenčního světla o delší vlnové délce, které pozorujeme fluorescenčním mikroskopem

nejčastější značky:

**fluoresceinizothiokyanát (FITC)**

**zelený**

**Alexa Fluor® 488**

**zelený**

**rhodamin (TRITC)**

**oranžovočervený**

**Alexa Fluor® 405**

**modrý**

**cyaninová barviva**

**Cy2**

**zelený**

**Cy3**

**oranžovočervený**

**Cy5**

**tmavě červený**

# Příklady vizualizace enzymovou histochemií

nejčastější značky

**alkalická fosfatáza** (Alkaline phosphatase - **AP**)

substráty a chromogeny:

bromo-chloro-indolylfosfát (**BCIP**)/nitrotetrazoliová modř (**NBT**)

**modročerná reakce** (nerozpustná)

$\alpha$ -naftylfosfát (**NP**)/**Fast Red**

**červená reakce** (rozpustná alkoholem a xylenem)

**křenová peroxidáza** (Horseradish peroxidase – **HRP**)

substráty a chromogeny:

peroxid vodíku/diaminobenzidin (**DAB**)

**černohnědá reakce** (nerozpustná, osmiofilní)

peroxid vodíku/aminoethylkarbazol (**AEC**)

**červená reakce** (rozpustná alkoholem a xylenem)


## DOBARVENÍ POZADÍ (COUNTERSTAINING)

Dobarvení jader: hematoxylin, jádrová červeň, metylzeleně,  
toluidinová modř

diamidinofenylindol (DAPI) **modrá fluorescence**

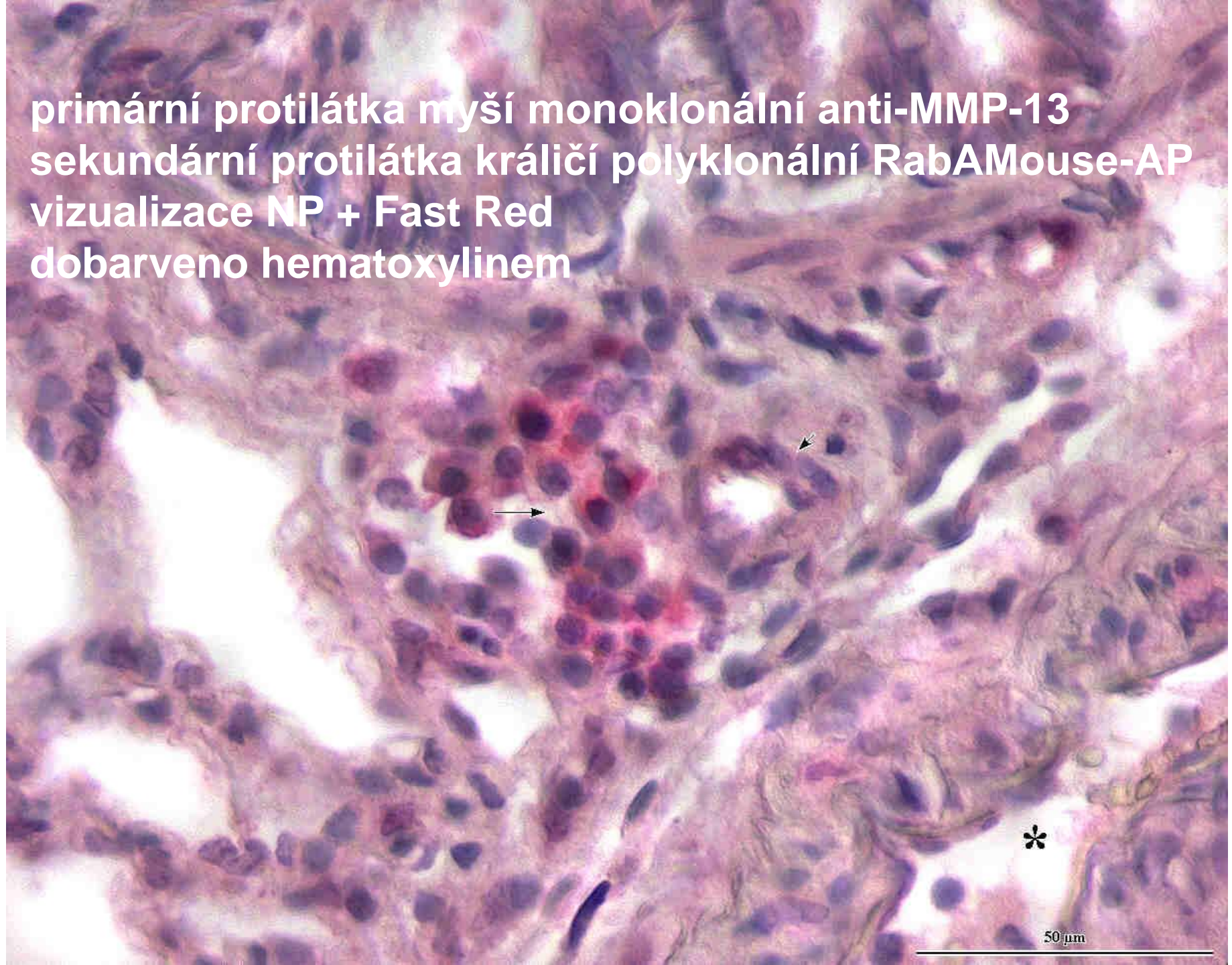
propidiumjodid (PI) **červená fluorescence**

Dobarvení cytoplasmy: např. světlá zeleň

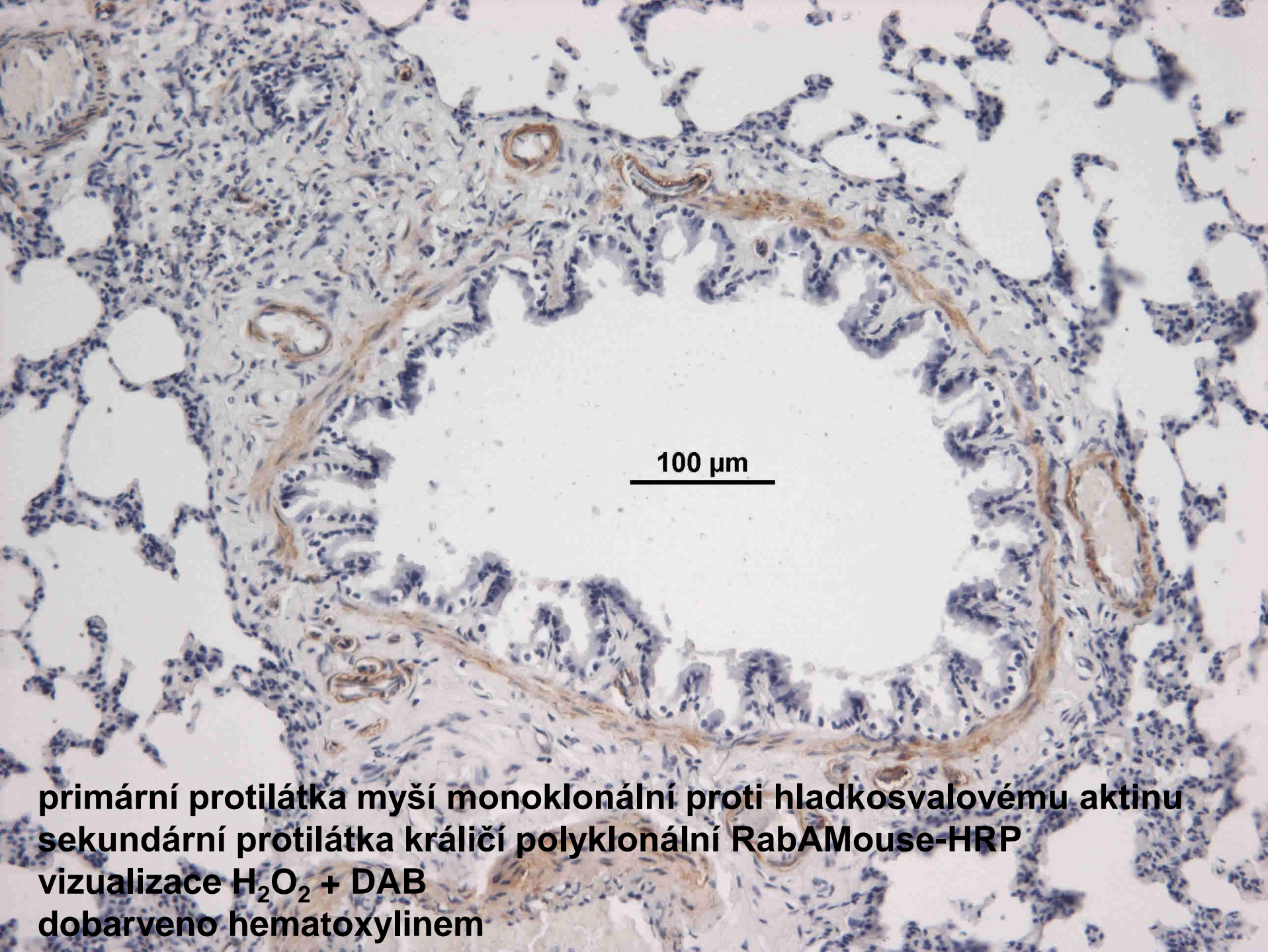
A fluorescence microscopy image showing a dense network of red-stained neural tissue. The staining highlights the primary and secondary somatosensory cortex, with the primary cortex appearing as a more continuous, wavy band and the secondary cortex as a more fragmented, punctate pattern. The background is dark, emphasizing the red fluorescence.

primární protilátka proti nestinu  
sekundární protilátka značená fluorochromem Cy3

primární protilátka myší monoklonální anti-MMP-13  
sekundární protilátka králičí polyklonální RabAMouse-AP  
vizualizace NP + Fast Red  
dobarveno hematoxylinem







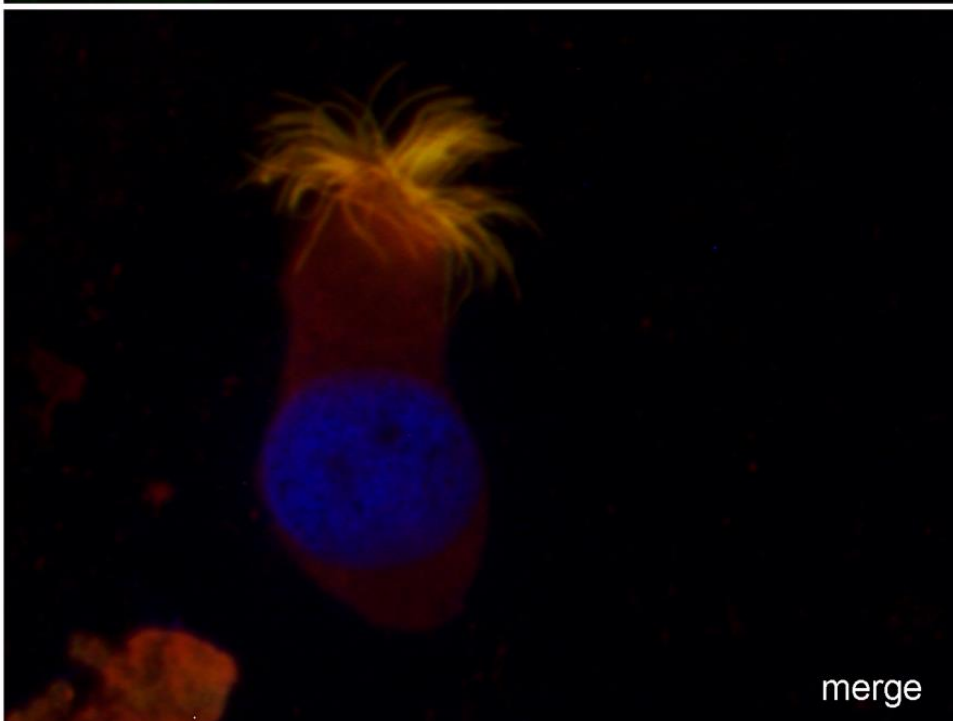
100 μm

**primární protilátka myší monoklonální proti hladkosvalovému aktinu  
sekundární protilátka králičí polyklonální RabAMouse-HRP  
vizualizace  $H_2O_2$  + DAB  
dobarveno hematoxylinem**

# Současná detekce více antigenů

- v ideálním případě by bylo možné porovnávat sériové řezy s průkazem jednotlivých antigenů – reálně je to těžko proveditelné  
proto použijeme raději na jednom řezu
- primární protilátky získané od různých živočišných druhů  
(např. Rb, Go, Sw)
- příslušné sekundární protilátky (např. SwARb, RbAGo, GoASw)  
pak musíme mít značené
  - různými fluorochromy
  - různě velkými částicemi koloidního zlata
  - různými enzymy
  - nebo stejným enzymem, ale použijeme odlišné substráty a chromogeny



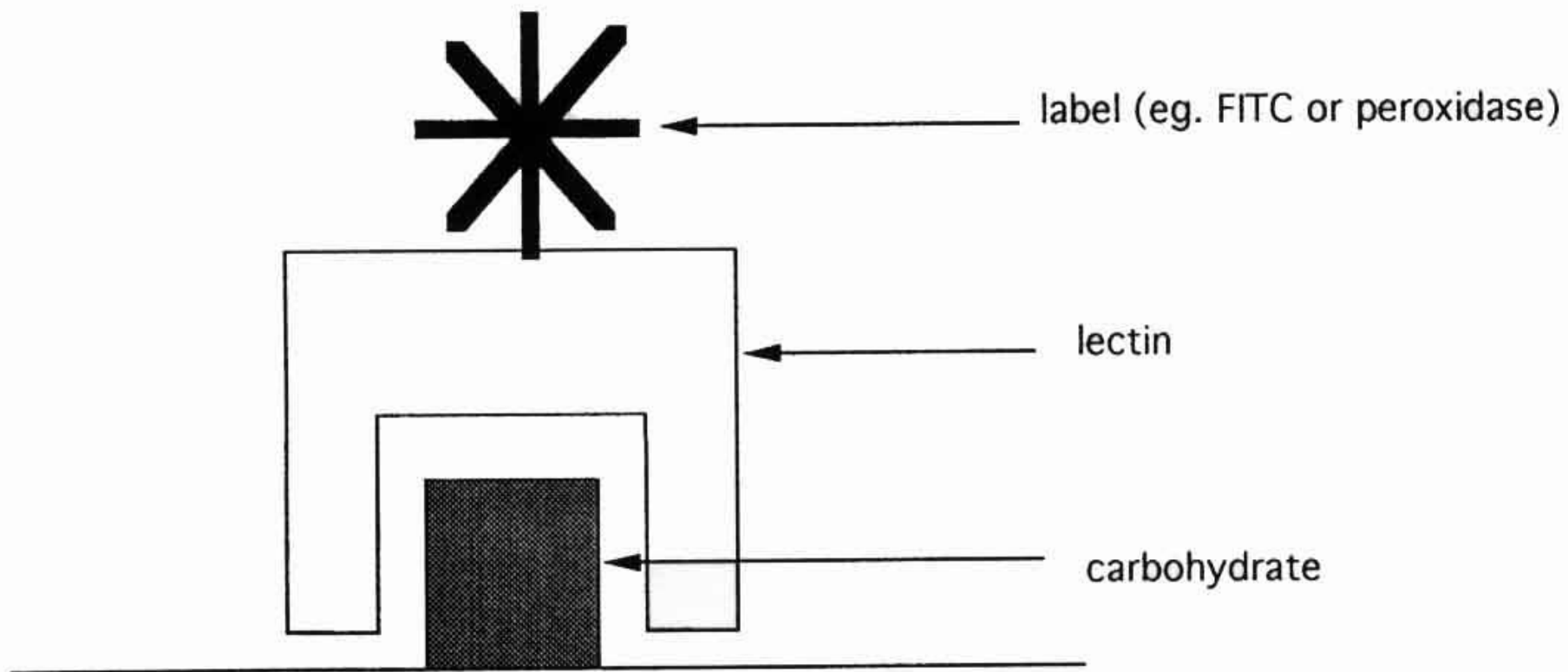


# LEKTINOVÁ HISTOCHEMIE

**Lektiny** - proteiny nebo glykoproteiny schopné specificky rozpoznat a navázat určité mono- nebo oligosacharidy. Přirozeně se vyskytují v tělech rostlin, živočichů nebo mikroorganismů – označují se latinským názvem druhu.

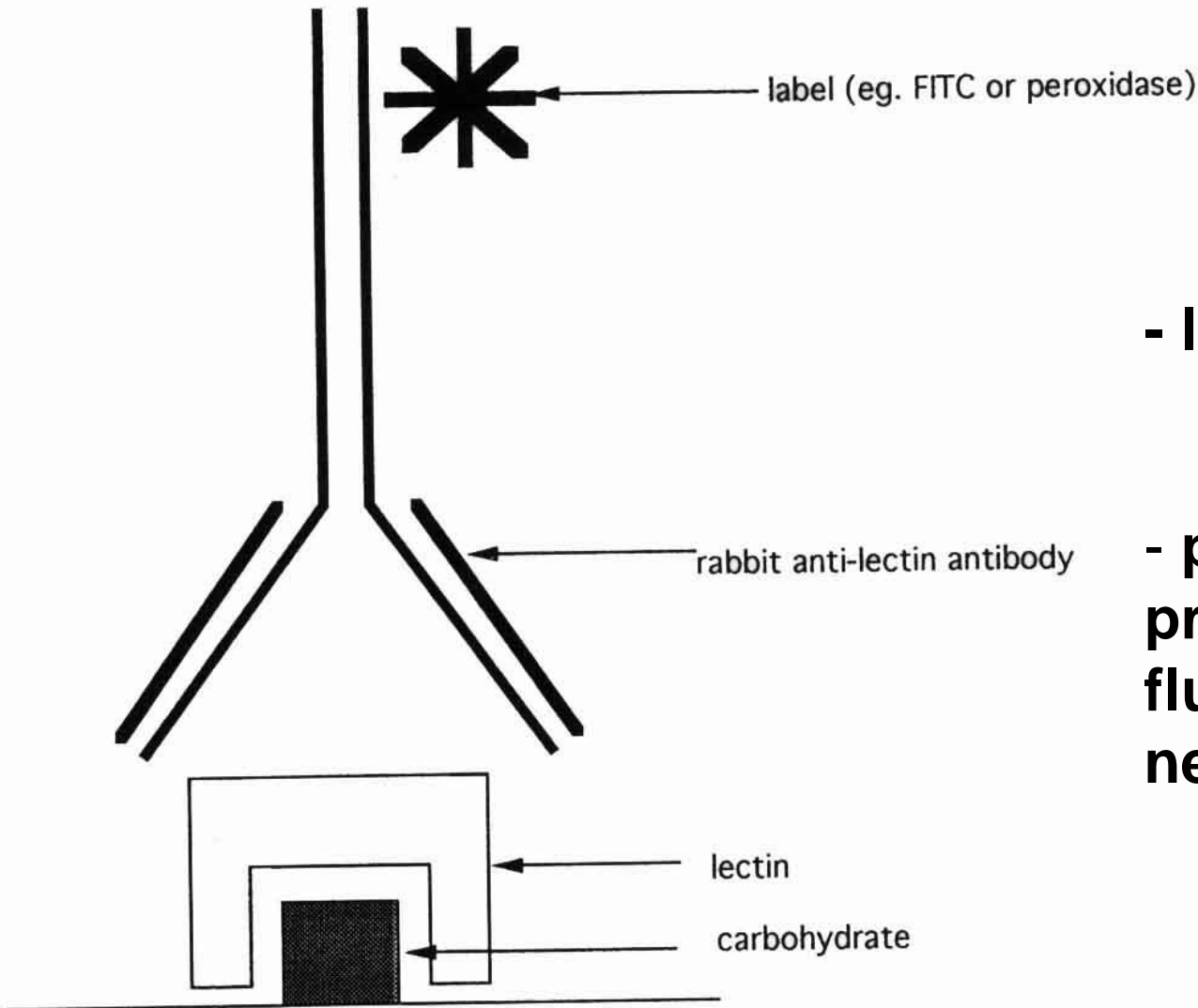
Použití: 1/ hledáme lokalizaci daného cukru (obvykle součást komplexní molekuly)  
2/ chceme analyzovat sacharidový řetězec *in situ*

specifická vazba cukru a lektinu je pak zviditelněna (vizualizována) vytvořením **barevné sloučeniny *in situ*** pomocí enzymové histochemie nebo **fluorochromem**



## 1 - Přímá metoda

**lektin je přímo označen fluorochromem nebo enzymem**



**- lektin není označen  
ničím**

**- primární protilátka  
proti lektinu značená  
fluorochromem  
nebo enzymem**

## **2 - Nepřímá protilátková metoda**

# Dva způsoby použití lektinů

1. hledáme konkrétní cukr v oligosacharidovém řetězci

=> používáme **specifický lektin**

2. nevíme přesně, které cukry oligosacharidový řetězec obsahuje

=> používáme **panel lektinů**

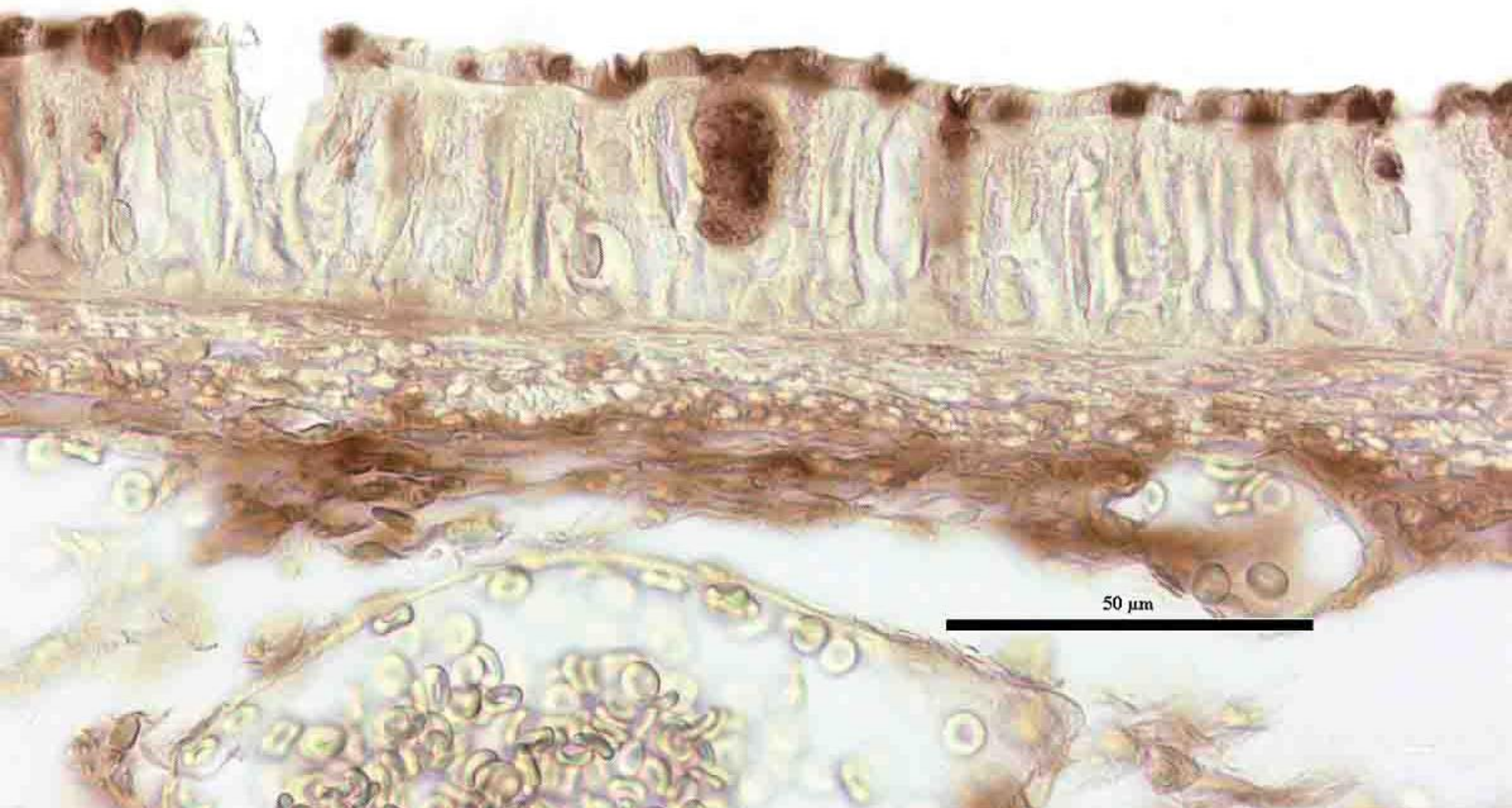
# Ukázka panelu lektinů (zkráceno)

zkratka	latinský název	český název	sacharidová specifita
AAA	<i>Allium ascalonicum</i>	Cibule šalotka	koncový trisacharid $\alpha$ -D-Man-(1-6)[ $\alpha$ -D-Man(1-3)]-Man
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Mísenka oranžová (houba)	L-Fuc
ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Pečárka dvojjvýtrusá	Gal a $\beta$ -D-Gal-(1-3)-GalNAc, Gal a $\beta$ -D-Gal-(1-3)-GlcNAc, GlcNAc na degalaktosylovaných N-glykanech
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	Laskavec ocasatý	$\beta$ -D-Gal-(1-3)-GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
AMA	<i>Arum maculatum</i>	Áron plamatý	$\beta$ -D-Gal-(1,4)-GlcNAc, desializovaný fetuin
Achatinin H (ATNH)	<i>Achatina fulica</i>	Oblovka dravá (plž)	úzká specifita pro 9-O-acetylované sialové kyseliny
AOL	<i>Aspergillus oryzae</i>	Kropidlák rýžový	$\alpha$ -L-Fuc-(1-6) vázaná na jádro N-vázaného oligosacharidu, méně pak $\alpha$ -L-Fuc-(1-2,3,4)
ASA I, ASA III	<i>Allium sativum</i>	Česnek kuchyňský	N-glykany s vysokým obsahem manózy
BanLec	<i>Musa sapientum</i>	Banánovník	vnitřní $\alpha$ -D-Glc-(1,3)-Man
BDA	<i>Bryonia dioica</i>	Posed dvoudomý	GlcNAc
BPL	<i>Bauhinia purpurea, alba</i>	Bauhinie	$\beta$ -D-Gal-(1-3)-GalNAc
CCL	<i>Ciborinia camelliae</i>		GalNAc
concanavalin A ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Kanavale mečovitá	$\alpha$ -manosylové větve (pokud není mezi nimi GlcNAc), glukosylované struktury, hybridní typy a biantenární komplexní typy N-glykanů
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	Mína dvoukvětá	$\alpha$ -D-GalNAc-Ser/Thr a $\alpha$ -D-GalNAc(1-3)-GalNAc (Forssmanův disacharid) > $\alpha$ -D-GalNAc-(1-3)[ $\alpha$ -L-Fuc-(1-2)-Gal (A-trisacharid)]
DSA	<i>Datura stramonium</i>	Durman obecný	poly-LacNAc a větvené LacNAc





**sialová kyselina Neu5Ac  $\alpha$ (2-6) terminálně na Gal nebo GalNAc  
lektin z bezu černého (*Sambucus nigra*, SNA) značený digoxigeninem  
protilátka proti digoxigeninu značená alkalickou fosfatázou (AP)  
vizualizace: 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát +nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT)**



**fukóza  $\alpha(1-2)$  terminálně nebo přivětvená  
lektin z hlodáše evropského (*Ulex europaeus*, ULE I) značený biotinem  
streptavidin značený křenovou peroxidázou (HRP)  
vizualizace: peroxid vodíku + diaminobenzidin (DAB)**

# *in situ* hybridizace (ISH)

hledáme lokalizaci nukleotidové sekvence  
(DNA – **geny**, RNA – **transkripty mRNA**, virová DNA a RNA)

**specifická vazba komplementárních nukleotidů**  
(A-T, A-U, C-G)

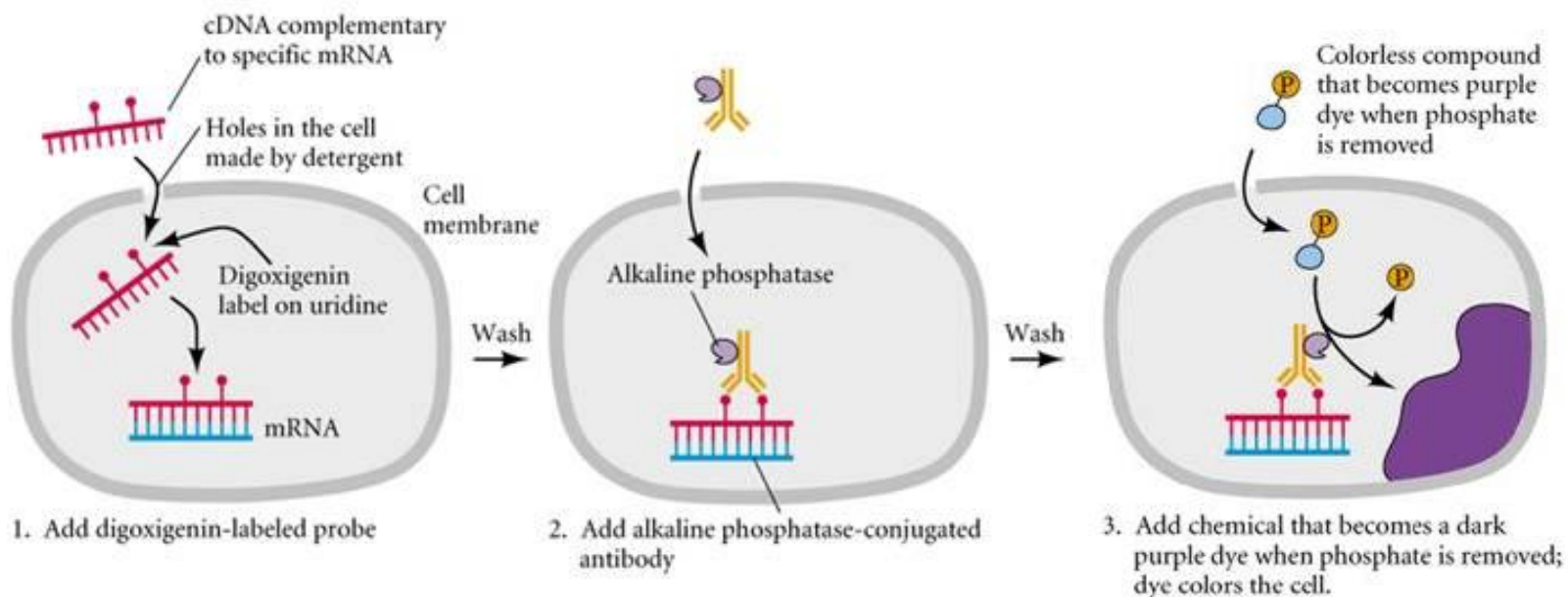
# PROBA (SONDA)

testovací sekvence, získaná synteticky, komplementární k sekvenci hledané

proba je pro vizualizaci značena např. digoxigeninem, biotinem, fluorochromem nebo radioizotopem (např.  $^{32}\text{P}$ )

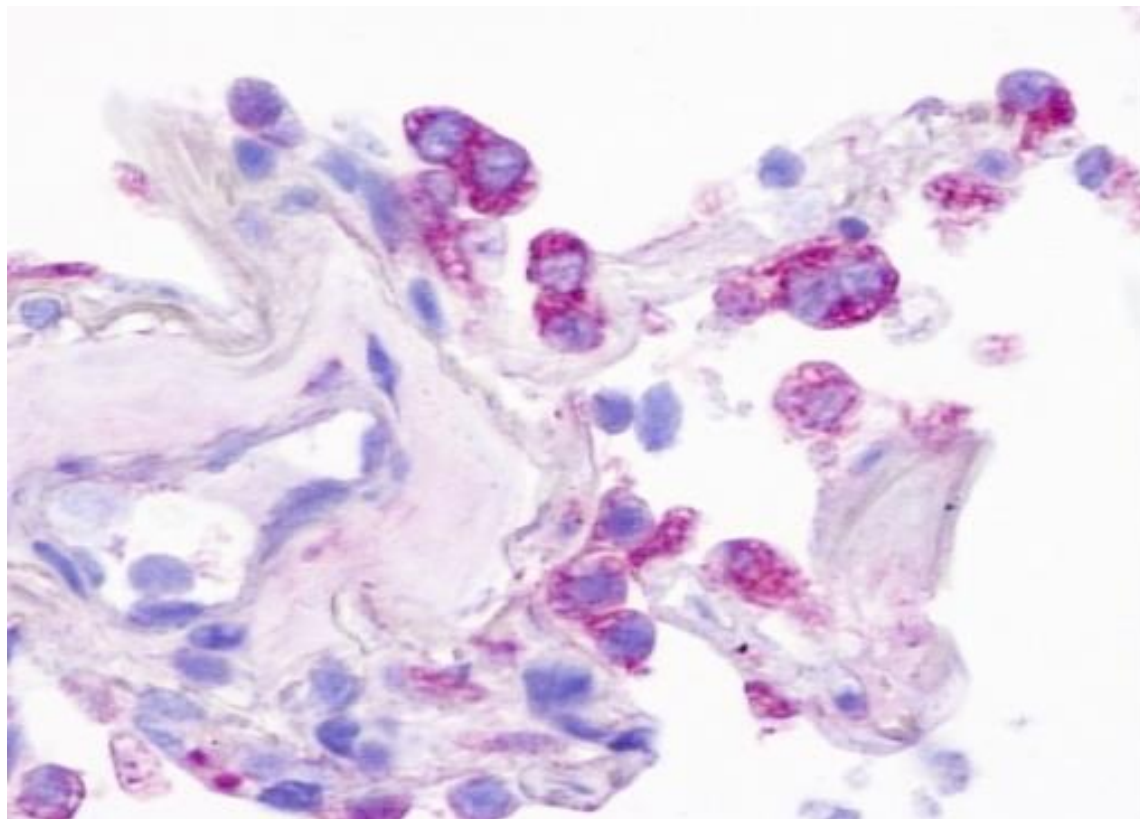
vizualizace pak proběhne vytvořením **barevné sloučeniny *in situ*** pomocí enzymové histochemie, nebo **fluorescenčně (FISH)**, případně **autoradiograficky**

# Příklad ISH detekce specifické mRNA pomocí sondy cDNA značené digoxigeninem

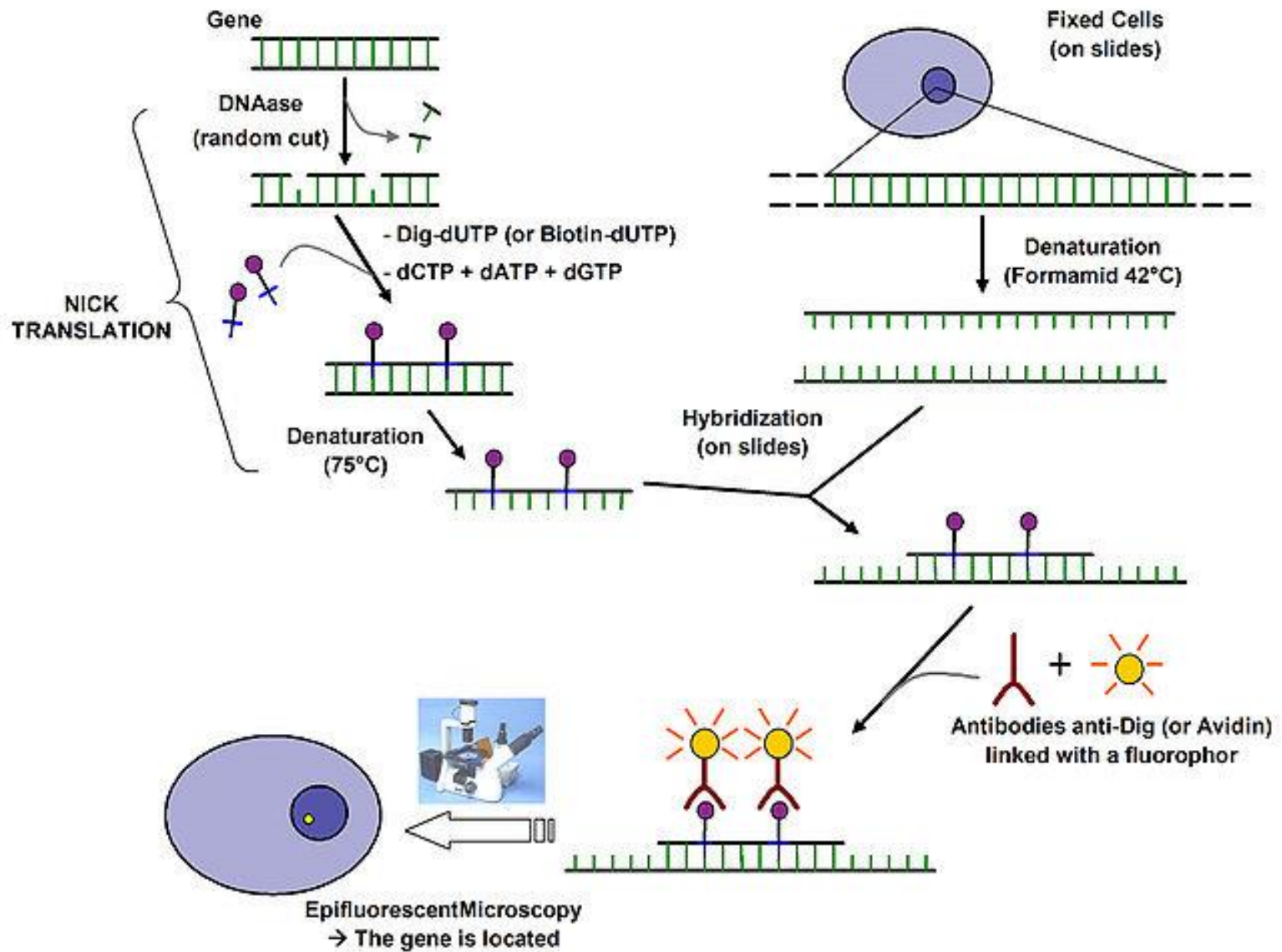




ISH s použitím 663 bp DNA-sondy komplementární k mRNA pro surfaktant-protein A značené digoxigeninem. Detekce v lidských plicích pomocí protilátky proti digoxigeninu konjugované s AP.



# FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

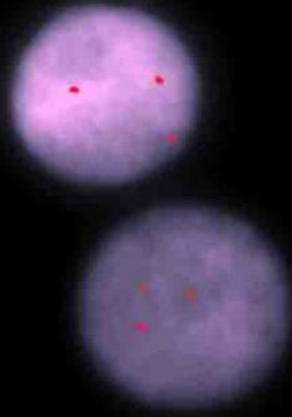




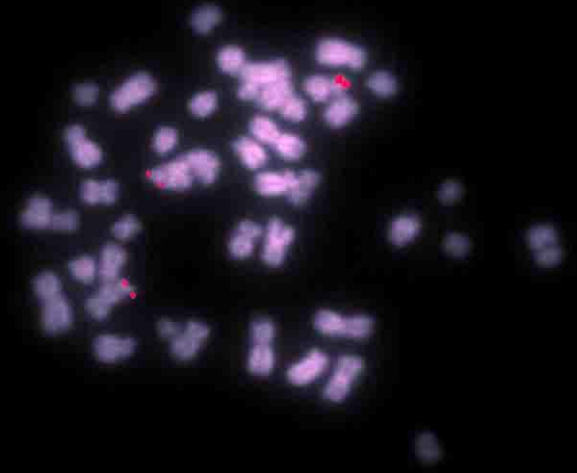
# Downův syndrom (trisomie 21)

připravena proba pro Down-specific region značená Spectrum Orange

dobarvení veškeré DNA pomocí DAPI



interfáze



metafáze

# **SPECIÁLNÍ TECHNIKY ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE**

# Způsoby fixace v TEM

- FYZIKÁLNÍ
  - **rychlé a hluboké ZMRAZENÍ (kryofixace)**
  - mikrovlny
- CHEMICKÉ
  - ROZTOKY chemických látek

# Kryofixace

- vzorky mohou být pozorovány v mikroskopu v jejich přirozeném extra a intracelulárním prostředí
- nedochází při ní k denaturaci enzymů a antigenů
- buňky jsou při kryofixaci imobilizovány ve zlomku vteřiny, což umožňuje sledovat časově závislé, dynamické děje
- riziko poškození buněk tvorbou krystalů ledu a zvětšováním objemu při mražení
- lze předejít rychlým zmražením, při kterém dojde k ztuhnutí vody rychleji než ke vzniku krystalů (případně za zvýšeného tlaku)

# Přístroj pro vysokotlakou kryofixaci



# Zpracování zmraženého preparátu

- kryokrájení – krájení ultramikrotomem vybaveným kryokomorou (cca  $-100^{\circ}\text{C}$ )
  - řezy na sítkách je možné pozorovat v TEM vybaveném kryodržákem (drahé a technicky náročné)
  - nebo vysušit řízenou sublimací ledu (vhodnější pro SEM)
  - nebo nechat roztát (rychlá autolýza)
    - autolýze se předejde, pokud se vzorek před zmražením fixuje chemicky (Tokuyasu)
- freeze substitution – led ve vzorku se nahradí organickým rozpouštědlem a následně akrylátovou pryskyřicí (až při  $-50^{\circ}\text{C}$ ), dále se se vzorkem pracuje za pokojové teploty



# Ultramikrotom s kryonástavcem





# Konvenční histochemie v EM

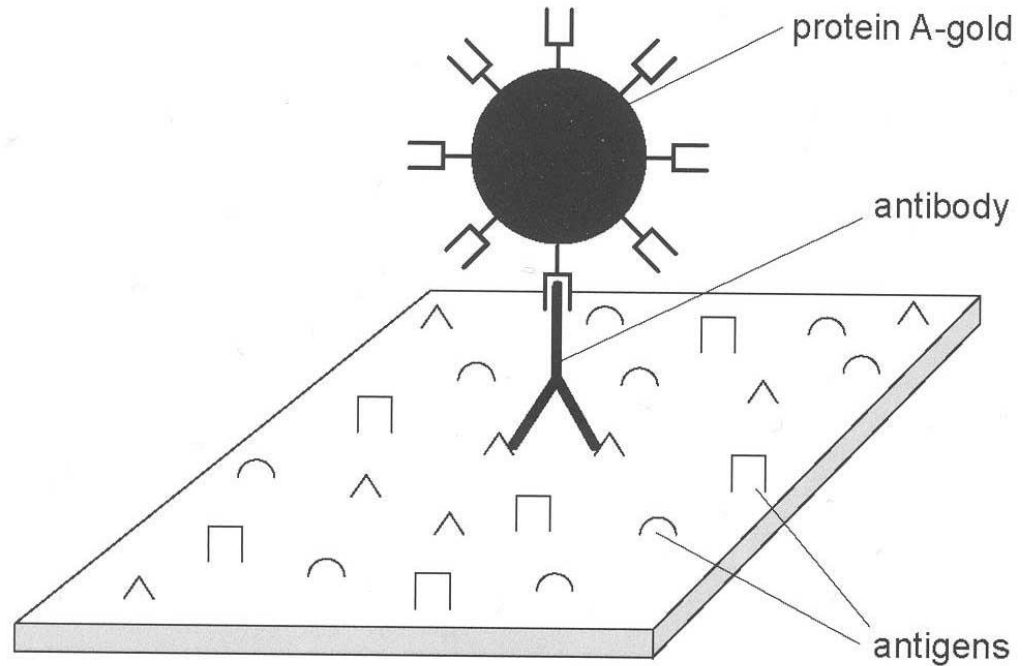
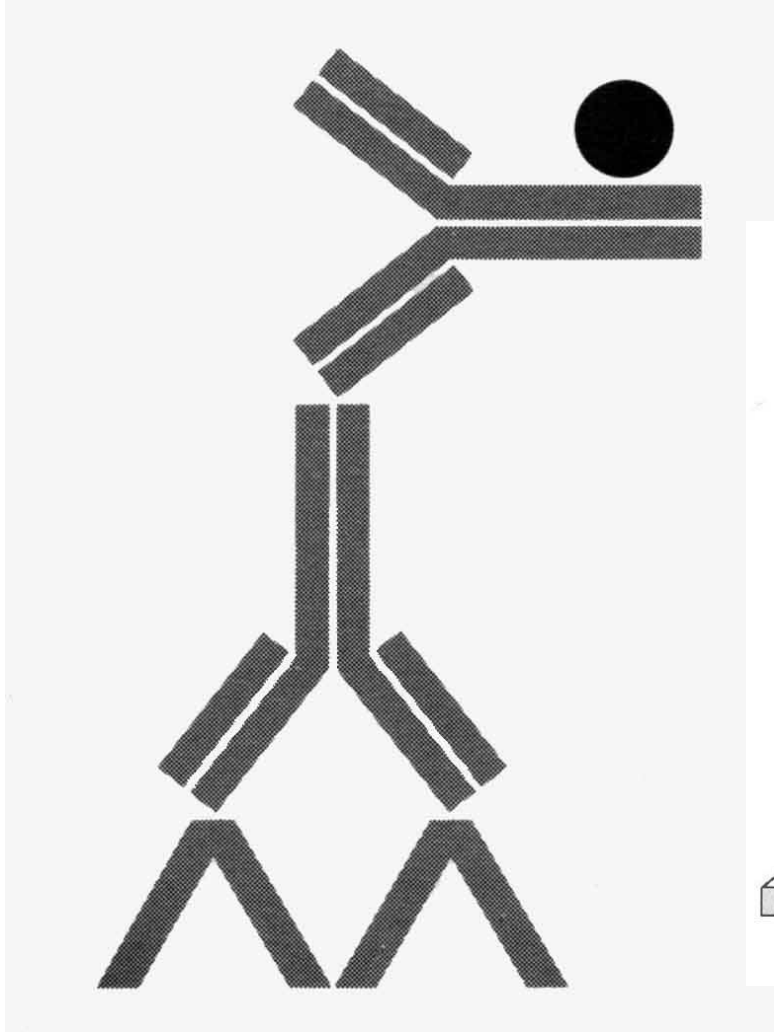
- všechny metody jsou založeny na vytvoření elektronově denzních reakčních produktů s obsahem kovových prvků např.
- průkaz polysacharidů (Thieryho reakce) – obdoba PAS, místo Schiffova činidla se používá proteinát **stříbra**
- průkaz sulfatovaných polysacharidů pomocí **rutheniové** červeni
- průkaz kyselých polysacharidů pomocí alciánové modři (**Cu**) nebo koloidního **železa** (modifikovaný Hale-Müller)
- průkaz produkce superoxidu pomocí diaminobenzidinu (DAB) (modifikovaná reakce podle Babbse) – oxidovaný DAB váže **osmium** (je osmiofilní)

**Průkaz produkce superoxidu pomocí diaminobenzidinu (DAB)  
Kultura buněk čočky, modifikovaná reakce podle Babbse**



# IMUNOHISTOCHEMIE V EM

- 1/ průkaz antigenu před zaléváním tkáně (pre-embedding)
- 2/ průkaz antigenu na řezech z pryskyřičných bločků (post-embedding)
- 3/ průkaz antigenu na zmražených řezech – metoda podle Tokuyasu



**Dvoustupňová nepřímá metoda – nejčastější možnost v EM**  
značená **sekundární** protilátka nebo **protein A** (protein ze *Staphylococcus aureus* reagující s většinou Ig) reaguje s **primární** protilátkou vázanou na tkáňový (buněčný) antigen

# Průkaz antigenu na pryskyřičných řezech (post-embedding metoda) v EM

- Fixace – nejlépe paraformaldehyd (glutaraldehyd denaturuje antigen)
- Zalití – akrylátová pryskyřice mísitelná s vodou (LR-White, Lowicryl)
- Na ultratenkých řezech: vysycení pozadí nespecifickým sérem (FCS)
- Primární protilátka
- Praní v pufru
- Sekundární značená protilátka (nebo Protein A)
- Praní v pufru a ve vodě
- Kontrastování – např. 2% uranyl acetát

# Průkaz antigenu na zmražených řezech – metoda podle Tokuyasu

- Fixace – nejlépe paraformaldehyd
- Kryoprotekce – prosycení vzorku koncentrovanou sacharózou
- Zmražení vzorku připevněného na kovový nosič v tekutém dusíku
- Krájení zmraženého vzorku na ultramikrotomu s kryonástavcem
- Přenesení ultratenkých zmrzlých řezů na síťku pomocí drátěné kličky ponořené do směsi metylcelulózy a sacharózy
- Další postup stejný jako s pryskyřičnými řezy
- Výhoda – antigeny nejsou narušeny při dehydrataci vzorku a zalévání



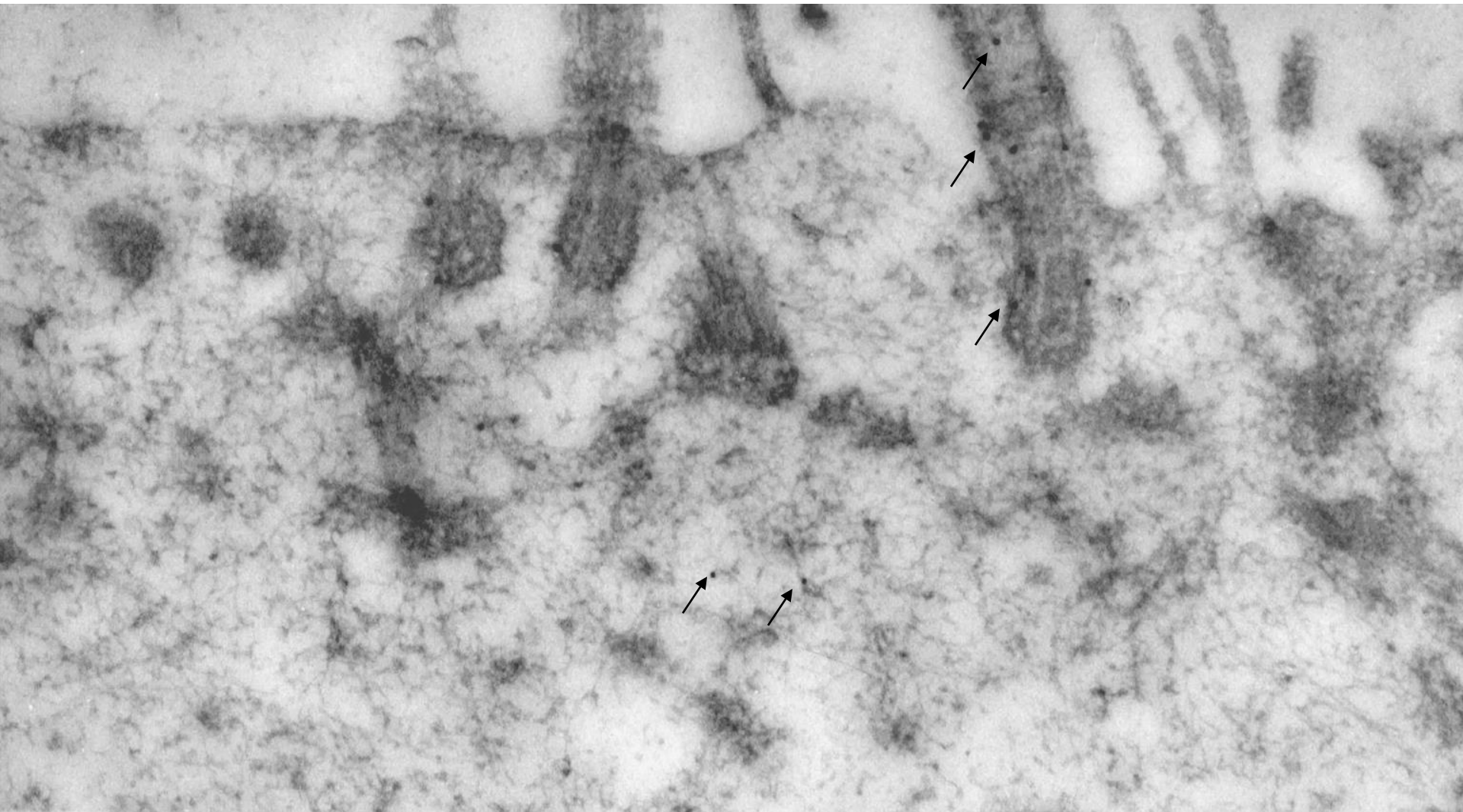
# VIZUALIZACE

Vazba protilátky na epitop antigenu je vizualizována pomocí **kovu** (vysoká atomová hmotnost → elektronová densita)

Standardní značka – částice koloidního zlata

Velikost částice – 5 – 30 nm → možnost vícenásobného značení několika antigenů na jednom preparátu

Alternativně lze využít značení protilátky křenuvou peroxidázou a vizualizaci pomocí DAB (osmiofílie)



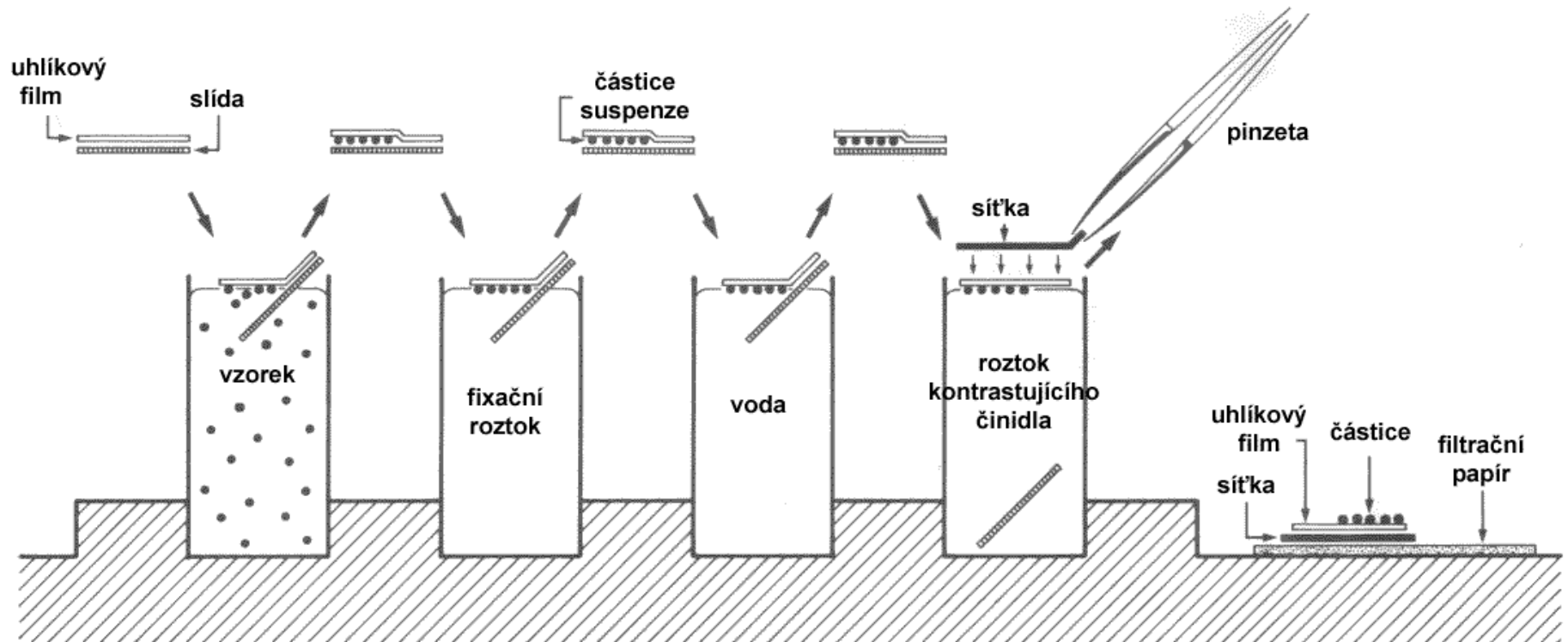
Imunohistochemický průkaz tubulinu  $\alpha$ , značeno koloidním zlatem 10 nm  
apikální část řasinkové buňky, trachea, králík

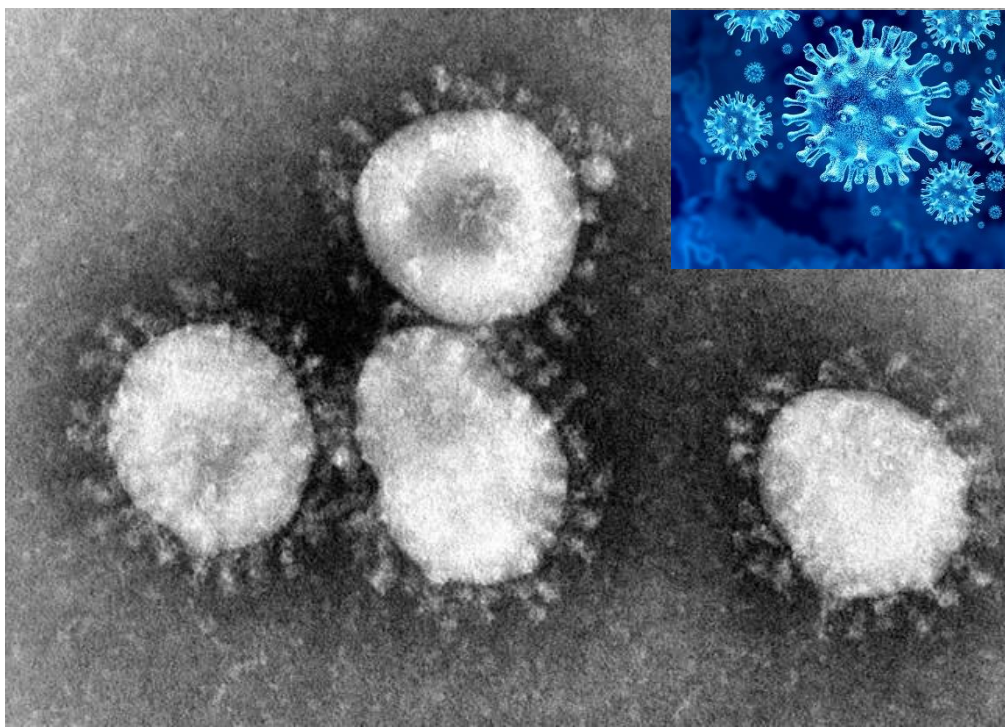
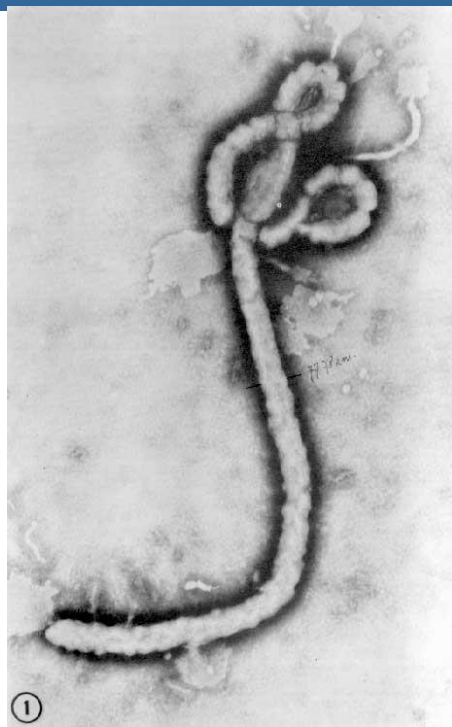
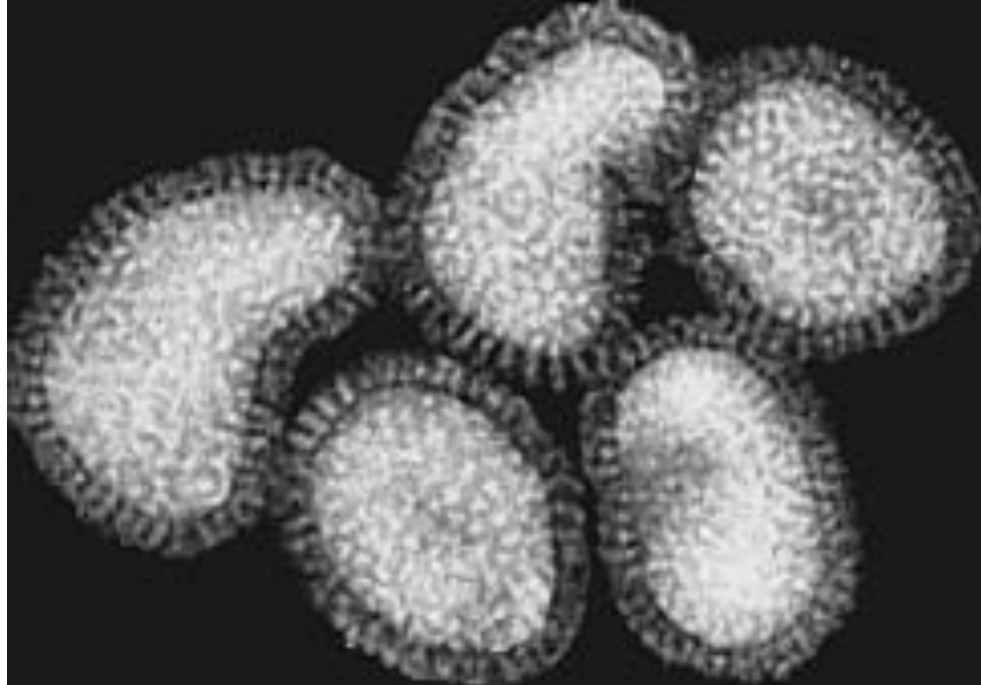
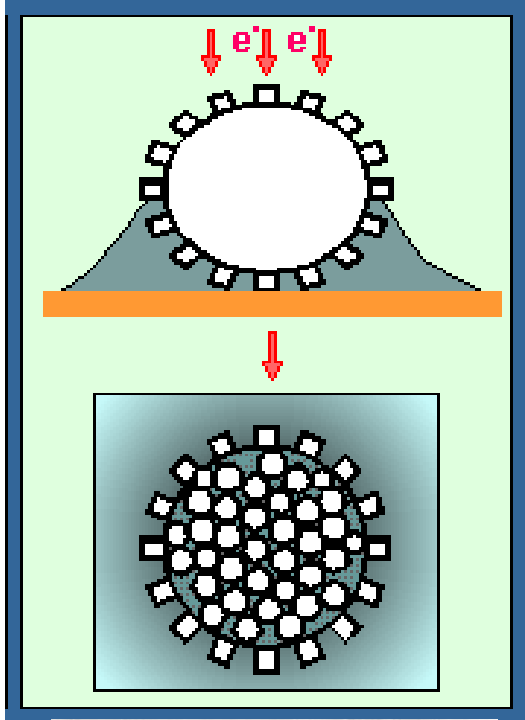
# NEGATIVNÍ KONTRAST

- pozorování vzorků, jejichž velikost je hluboko pod tloušťkou ultratenkých řezů
  - makromolekuly (proteiny, lipoproteiny, polysacharidy, nukleoproteinové komplexy)
  - izolované buněčné organely (mitochondrie, membránové systémy)
  - bakterie, **viry**
- zachycení vzorku na podložní fólii nataženou na síťce
- zalití vzorku barvivem, které obsahuje těžký kov
- barvivo obklopí vzorek a vytvoří temné pozadí, v němž se jednotlivé objekty jeví jako světlé, barvivo přitom pronikne do povrchových nerovností objektu, což umožňuje jejich pozorování.

Nejjednodušší způsob: kapka suspenze se smíchá s barvivem a směs se nanese na síťku potaženou formvarovou blánou. Po odsátí přebytečné tekutiny a po zaschnutí se vytvoří na bláně tenký film s částicemi obalenými barvivem.

Sofistikovanější způsob:





# Speciální metody zpracování vzorku pro SEM

- Kryofixace (stejná jako pro TEM)
- Mrazové lámání – dovoluje odhalit vnitřní povrchy odhalené rozlomením zmrzlého vzorku
- Mrazové leptání – zvýraznění struktury lomné plochy odpařením ledu za sníženého tlaku

ve všech případech se musí pozorovaný povrch preparátu nastínovat



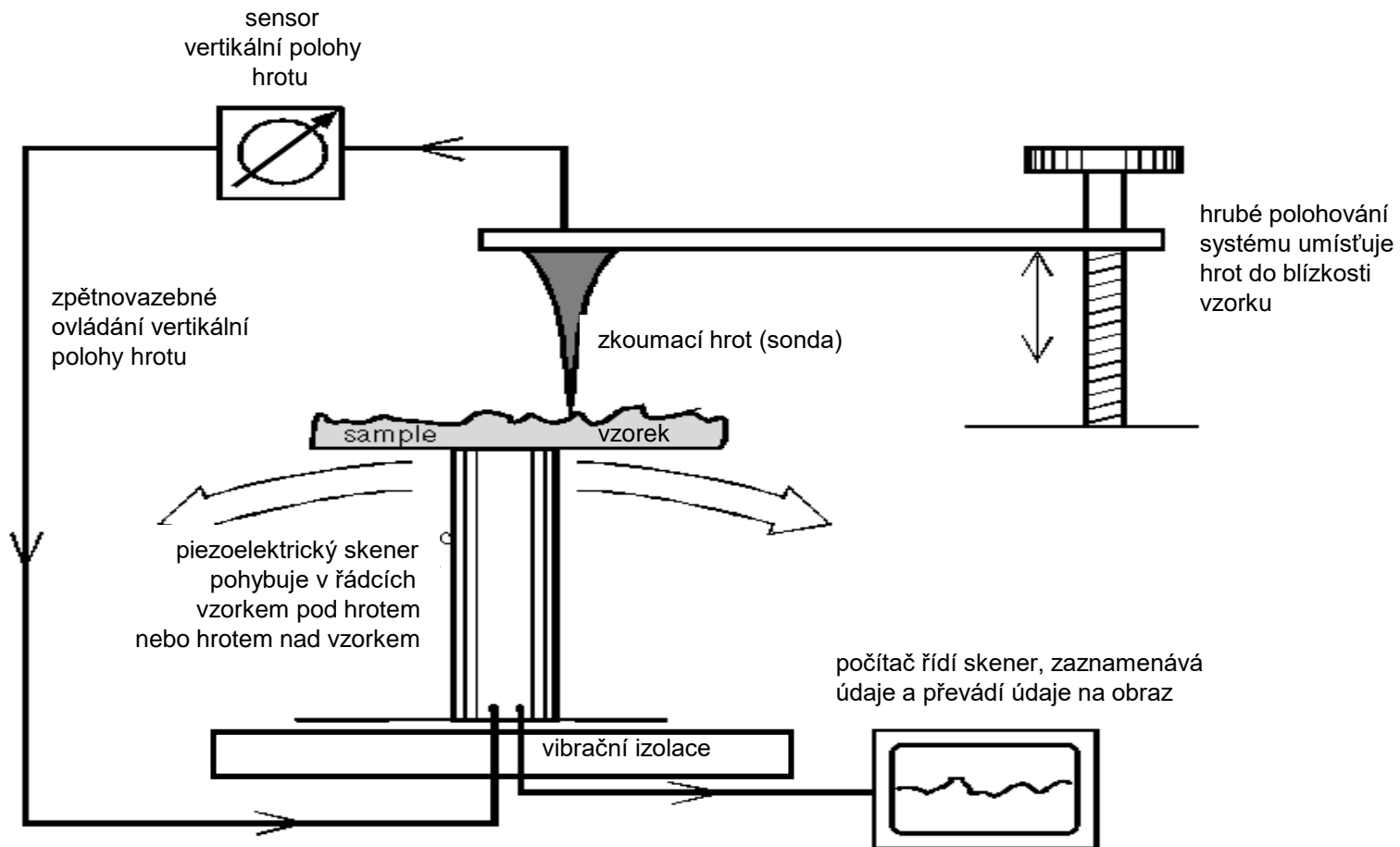
# Zonula occludens – mrazové lámání



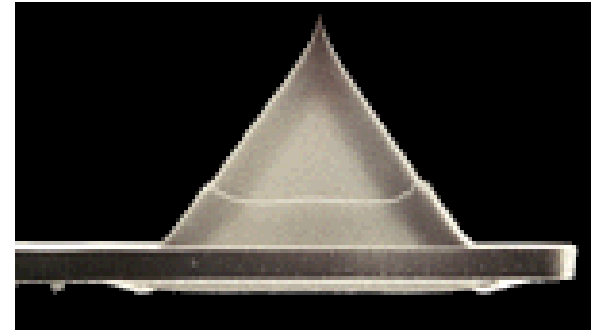
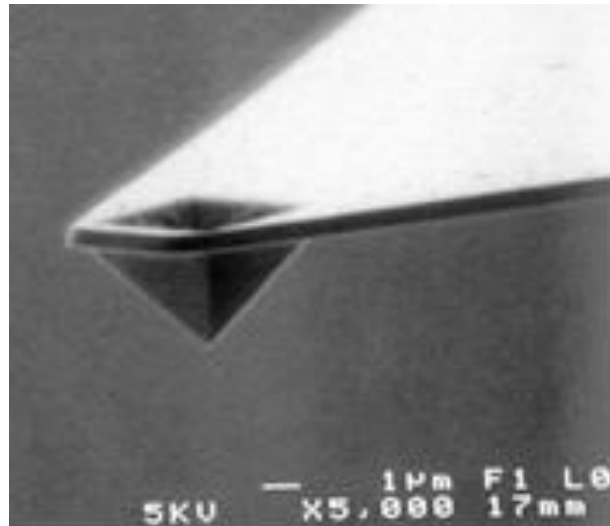
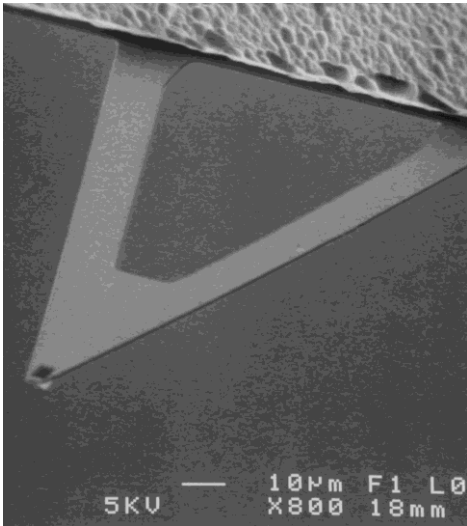
# Mikroskopie skenující sondou (Scanning Probe Microscopy – SPM)

- metody určené k pozorování struktury povrchu
- nejsou založené na žádném druhu světla nebo záření, ale na postupném skenování povrchu pomocí sondy
- řada variant lišících se fyzikálním principem snímání
  - **mikroskopie atomárních sil (AFM) – dnes nejvíce užívaná, vynalezena 1986, založená na přitažlivých a odpudivých silách mezi atomy**
  - skenovací tunelová mikroskopie (STM) – nejstarší varianta (1981), založena na průchodu el. proudu mezi vzorkem a sondou, vyžaduje vodivý vzorek a vakuum
  - mnoho dalších variant - mikroskopie laterálních sil (LFM), mikroskopie modulovaných sil (FMM), mikroskopie magnetických sil (MFM), mikroskopie elektrostatických sil (EFM), mikroskopie balisticky emitovaných elektronů (BEEM) .....

# Základní prvky SPM



# Mikroskopie atomárních sil (AFM)

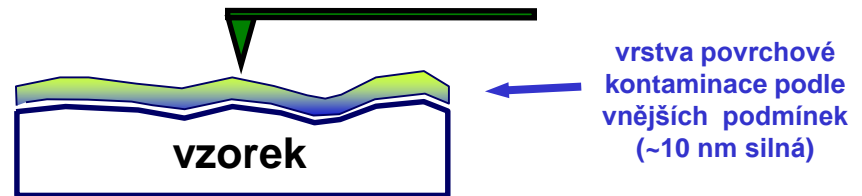


- **pružný nosník** (cantilever) a **sonda** vyrobená z  $\text{Si}_3\text{N}_4$
- pyramidovitý tvar s poloměrem hrotu asi 10-50 nm
- délka nosníku 50-500 µm
- pružná konstanta ~0,1 – 0,7 N/m
- kontakt možný ve vzduchu i v kapalině
- ke snímání polohy nosníku se užívá laser a fotodioda

# Režimy topografické AFM

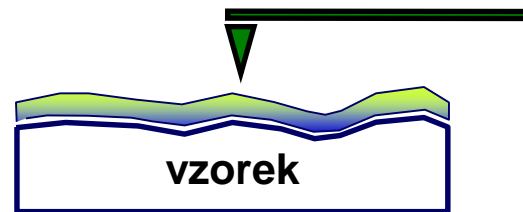
## Kontaktní režim

zpětná vazba “odpudivými” elektrostatickými silami



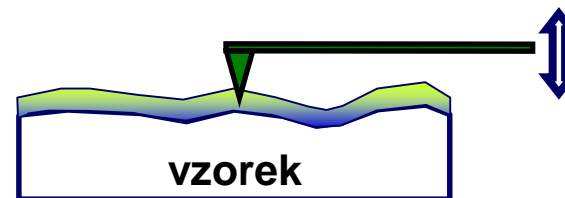
## Nekontaktní režim

zpětná vazba “přitažlivými” van der Waalsovými silami



## Pokleповý režim

sonda kmitá mezi nekontaktní a kontaktní oblastí  
nejvhodnější režim pro biologické vzorky





**červená krvinka**





SOLVER NEXT-MDT

SOLVER  
NEXT

000000  
TEMP=25.6°C

SOLVER  
NEXT