

Kombinování neslučitelného aneb jak získat to nejlepší ze světů fotonů i elektronů

Aleš Benda

Ideální mikroskop pro biology by spojoval specifitu a citlivost pro identifikaci jednotlivých molekul s možností zobrazit ultrastrukturu s nanometrovým rozlišením. Umožňoval by pozorovat velké množství živých buněk, ale i nejjemnější detaily. Takový mikroskop bohužel neexistuje, alespoň zatím ne. Specifitu, citlivost a možnost pozorovat živé buňky přináší optická fluorescenční mikroskopie, zatímco ultrastruktura s nanometrovým rozlišením je doménou mikroskopie elektronové.

Oba druhy mikroskopie lze kombinovat, ale úplně jednoduché to není. Živá hmota totiž obsahuje velké množství vody, která sice pro fluorescenční mikroskopii žádný problém nepředstavuje (fotony ve viditelné části spektra procházejí vodou téměř bez jakékoliv interakce), ovšem elektrony využívané při elektronové mikroskopii zcela pohlcuje. I vysoce urychlený elektron (na 120–300 keV) dokáže proniknout nanejvýš několika stovkami nanometrů biologického materiálu – a to pouze za předpokladu, že se k vzorku vůbec dostane. Pokud bychom měli v elektronovém mikroskopu nad vzorkem plyn, elektrony by byly tímto plynem absorbovány, nebo by se v něm rozptýlily, a ke svému cíli – vzorku a pak kameře – by nedorazily. Východiskem je vytvoření vysokého vakua v komoře elektronového mikroskopu – ovšem co biologické vzorky, které obsahují vodu? Ta se ve vakuu začne ihned vypařovat, vzorek se scvrkne a zdeformuje – a je po krásném obrázku. Řešením je vzorek citlivě zbavit vody ještě před tím, než se do mikroskopu vloží.

Bez přidání těžkých kovů, obvykle osmia nebo uranu, pro zvýšení kontrastu buněčných struktur, toho není v elektronovém mikroskopu moc vidět. Jenže pokud při tomto kontrastování není fluorofor přímo chemicky zničen, tak přítomnost těžkých kovů způsobuje zhášení fluorescence a tím i pokles specifického fluorescenčního signálu pod úroveň pozadí. Proto je nutné fluorescenční a elektronovou mikroskopii od sebe časově oddělit.

Při korelativní světelné a elektronové mikroskopii (CLEM) pozorujeme živý vzorek, často buněčné monokultury pěstované na sklíčku, klasickými optickými a fluorescenčními metodami. Je zde jen jeden drobný rozdíl: do sklíčka je vyrytý systém souřadnic, podobný šachovnici, který pomocí dvouznačkového kódu umožňuje zaznamenat pozice vybraných buněk. Jakmile pomocí optické mikroskopie najdeme a nasnímáme hledané buňky, obvykle buňky vykazující hledaný fenotyp či buňky, ve kterých právě probíhá studovaný proces, rychle vzorek zafixujeme, třeba směsí formaldehydu a glutaraldehydu nebo, moderněji, rychlým zamrazením za vysokého tlaku. V obou případech následuje klasické zpracování vzorku pro elektronovou mikroskopii – zejména odstranění problematické vody a přidání kontrastu v podobě sloučenin těžkých kovů, které jsou selektivně absorbovány různými organelami buňky. Zpracovaný vzorek ve formě bločku vložíme

do ultramikrotomu pro nakrájení ultratenkých řezů, nebo přímo do skenovacího elektronového mikroskopu. Vybrané buňky k podrobnému nasnímání nalezneme podle souřadnic ze sklíčka, na kterém byly buňky pěstovány – otiskly se do reliéfu bločku.

Proč potřebujeme mít stejnou buňku nafočenou jak v optickém fluorescenčním mikroskopu, tak v elektronovém? Jednou z motivací je zachycení a prostudování vzácných událostí či fenotypů buněk. Hledat je pomocí elektronové mikroskopie je časově i finančně velmi náročné. Druhou motivací je zjistit, jak vypadá ultrastruktura buňky, ve které dochází například k hromadění specifického proteinu, nebo která z membránových struktur je ta, v níž dochází k akumulaci například léčiva. V tomto případě nestačí buňku pomocí fluorescence jen najít, ale je třeba ji rychle a kvalitně nasnímat, aby bylo možné později proložit fluorescenční obrázek s elektronovým.

V rámci infrastruktury Czech-BioImaging Servisní laboratoř zobrazovacích metod v BIOCEVu kombinuje hlavně trojrozměrnou vícebarevnou klasickou nebo konfokální mikroskopii s trojrozměrným snímáním pomocí FIB-SEM elektronové mikroskopie a na Ústavu molekulární genetiky AV ČR kombinují fluorescenční snímání s transmisní elektronovou mikroskopii na ultratenkých řezech.

V budoucnosti se pravděpodobně obejdeme bez dehydratace vzorků a také bez těžkých kovů. Rychlé zamrazení vzorku do podoby amorfního ledu totiž velmi dobře zachovává jak fluorescenci, tak ultrastrukturu. Zároveň hluboce zmražený vzorek jen málo sublimuje, takže může být umístěn a snímán ve vakuu pomocí kryo-EM tomografie. Jedná se o nové, finančně i dovednostně velmi náročné technologie, které se našim uživatelům pokusíme zpřístupnit v nadcházejících letech.

