

SNOM AS A SUBSTITUTE FOR TEM IN THE OBSERVATION OF BIOLOGICAL SPECIMENS

Veronika Novotná

Bachelor Degree Programme (3), FEEC BUT

E-mail: xnovot62@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Alexandr Knápek

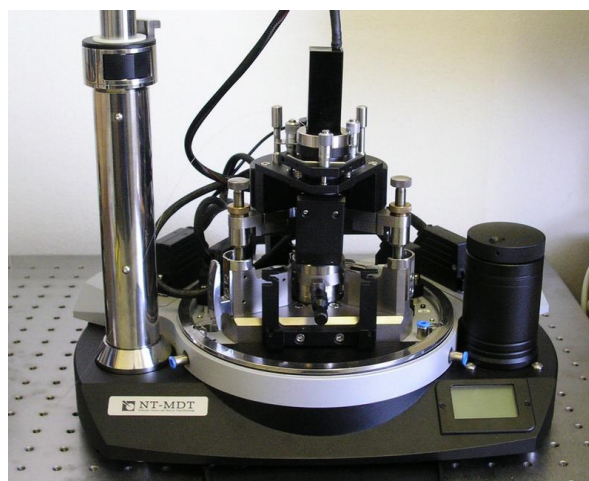
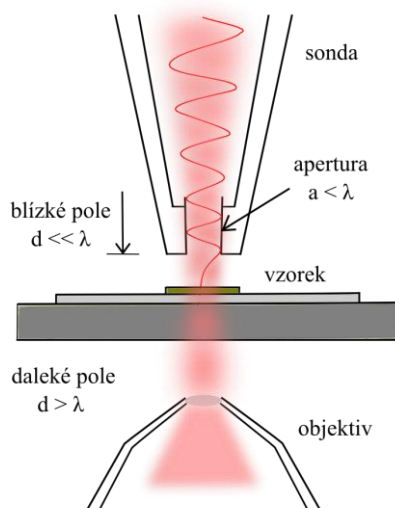
E-mail: xknape03@stud.feec.vutbr.cz

Abstract: Currently there is an idea to use scanning near-field optical microscope for biological research. There are various microscopic methods and techniques that allow us to examine more closely the structure of the micro-world. In this paper we try to use SNOM (*scanning near-field optical microscope*) as a cheaper option than TEM (*transmission electron microscope*) in the observation of biological specimens (human osteosarcoma cell line, U2OS).

Keywords: SNOM, TEM, U2OS cell line

1. ÚVOD

Principiálně je mikroskopovací technika SNOM založena na přivedení světelného svazku o vlnové délce λ co nejblíže k povrchu studovaného objektu. Sonda je přiblížena do vzdálenosti d tak, aby platilo $d \ll \lambda$. Dále je nutné svazek dostatečně zúžit, aby velikost výstupní apertury a , daná průměrem, byla menší než vlnová délka λ procházejícího záření, tedy $a < \lambda$. Pak se blížíme téměř bodovému zdroji světelného záření. Tento princip je ilustrován na obrázku (obr. 1Obrázek 1:a).



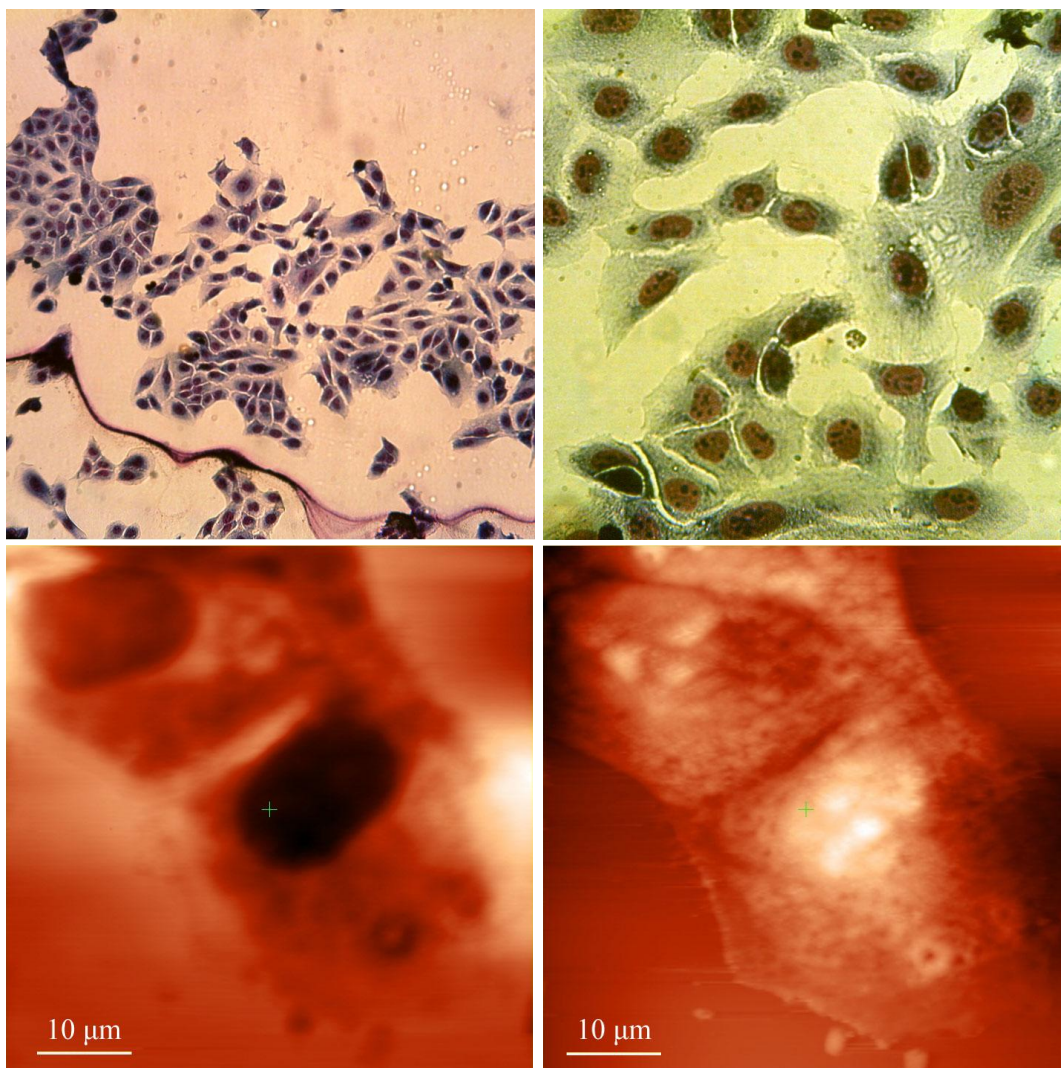
Obrázek 1: a) Principiální schéma mikroskopie blízkého pole [1] b) SNOM ÚFYZ-FEKT-VUT

Rozlišovací schopnost optického mikroskopu v blízkém poli nezávisí na vlnové délce použitého záření, ale pouze na velikosti hrotu sondy a na jeho vzdálenosti od povrchu vzorku. Pohybuje se v rozmezí 30 – 100 nm. SNOM může pracovat buď s osvětlením s vnějším odrazem, kde je sonda současně vysílačem i přijímačem nebo při vnějším šikmém osvětlení předmětu. Umožňuje analýzu všech typů předmětů, transparentních i netransparentních. Výhodou je, že toto osvětlení je izotropní [2]. Mezi další výhody SNOM patří absence difrakčních jevů v blízkém poli a především nižší pořizovací a provozní náklady, protože provoz SNOM není omezen použitím vakua jako v případě TEM. Tyto a mnohé další výhody vedou k tendenci využít SNOM nejen v materiálovém, ale i

v biologickém výzkumu. I přes existenci několika málo prací (viz [3]) se touto problematikou dosud nikdo hlouběji nezabýval. Ve srovnání se SNOM používá TEM svazek elektronů, místo skleněných čoček čočky magnetické či elektrostatické. Emitované elektrony jsou urychlovány polem anody a fokusovány v úzký svazek s malým vrcholovým úhlem. Ten je dále fokusován kondensorem na pozorovaný objekt umístěný v blízkosti objektivu. Při průchodu předmětem se elektrony srážejí s atomy látky a jsou rozptylovány, přičemž úhel rozptylu závisí na tloušťce a hustotě předmětu. Oblasti velké tloušťky a hustoty rozptylují elektrony ve velkém úhlu. Po průchodu objektivem procházejí rozptýlené elektrony aperturní clonkou uvnitř nebo za objektivem. Množství elektronů vycházejících z jednoho bodu předmětu, které prošly aperturou, závisí na úhlu rozptylu. Silně rozptýlené elektrony otvorem neprojdou a neúčastní se tedy vytvoření obrazu. Rozdělení intenzity světla na stínítku odpovídá rozdělení tloušťky a hustoty předmětu. Kontrast vzniklého obrazu je podmíněn rozptylem elektronů v různých bodech. Zvětšení závisí na ohniskové vzdálenosti objektivu a jeho vzdálenosti od obrazové roviny. Pro biologické aplikace jsme schopni s TEM dosáhnout rozlišovací schopnosti kolem 5 nm, ale pouze při speciálním zpracování vzorků [4].

2. PŘÍPRAVA VZORKŮ - EXPERIMENT

Postupy přípravy biologických preparátů pro TEM jsou známé, zatímco pro SNOM jsou stále výsledkem experimentu. Obecně se příprava vzorků skládá z několika etap – odběr materiálu, fixace, zalévání, krájení, barvení a montování řezů.



Obrázek 2: Optický mikroskop: a) 150x zvětšeno b) 600x zvětšeno
SNOM: c) odrazný režim d) topografie vzorku

Z pohledu preparátů je velkou výhodou SNOM to, že zde nedochází k radiačnímu poškození vzorku. V elektronovém mikroskopu je energie disipovaná v preparátu při krátkém ozařování elektrony o energii 100 keV odpovídající podmínkám, které se mimo mikroskop nacházejí jen v blízkosti epicentra jaderného výbuchu. Radiační poškození je způsobeno různými interakcemi dopadajících elektronů s atomy vzorku. Nelze je odstranit, pouze redukovat. Výhodou je také eliminace kontrastování sloučeninami těžkých kovů (např. octan uranuly, citrát olova), které se u TEM využívá pro zvýšení kontrastu biologických objektů, jež jsou tvořeny převážně nízkomolekulárními látkami [4]. Pro tuto práci jsme jako vzorek zvolili buněčné kultivace U2OS (lidské kostní nádorové buňky). Nechali jsme je narůst na krycích sklech v kultivačním médiu (DMEM s 4,5 g/l Glucose, L-Glutamine od PAN Biotech (č. kat. P03-0710), přidán NaHCO₃, + penicilin/streptavidin, + 10% FBS) po dobu 40 hodin. Poté jsme preparáty vyjmuli z média a nechali oschnout. K následnému barvení jsme použili barvicí set Diff-Quik od Medion Diagnostics, který poskytuje stejné výsledky jako barvení technikou Pappenheim (Giemsa-May-Grünwald). Vzorky byly postupně ponořovány v řadě roztoků (fixační roztok, první barvicí roztok, druhý barvicí roztok), v každém po dobu 5 sekund a nakonec opláchnuty v destilované vodě. Po oschnutí jsme některé preparáty zalili jednosložkovou epoxidovou pryskyřicí Epoxylite 6001-M a vytvrdili v píce. Vytvrzování probíhá ve dvou krocích. První fáze, kdy se zbavujeme rozpouštědel, trvá 3 hodiny při 100 °C. V druhé fázi se vytvrzuje povrch epoxidu 1 hodinu při 180 °C. Takto připravené vzorky jsme pozorovali pomocí optického mikroskopu LEICA EZ4 (obr. 2a, 2b) a SNOM NT-MDT-*Solaris* (Obrázek 2:c, 2d).

3. ZÁVĚR

Jak lze vidět na obrázcích pořízených pomocí SNOM, jsme schopni rozeznat jak tvary jednotlivých buněk, tak i intracelulární membránové struktury a to již při jednoduchém barvení. Tento výzkum je teprve v počátcích, ale skýtá velký potenciál. Použití SNOM oproti TEM s sebou nese mnoho výhod – nižší pořizovací a provozní náklady (vakuum, sloučeniny těžkých kovů), nedochází k radiačnímu poškození, rozlišovací schopnost závisí pouze na velikosti hrotu sondy a na jeho vzdálenosti od povrchu vzorku. V současné době TEM hraje významnou roli na poli biologického a medicínského výzkumu. TEM nám umožňuje zobrazit submikroskopickou strukturu buněk, nadmolekulárních komplexů, makromolekul i virů, které leží pod rozlišovací schopností optického mikroskopu. To vše je výsledkem dlouholetého výzkumu a experimentů zejména v oblasti přípravy vzorků.

PODĚKOVÁNÍ

Tento článek vznikl na Ústavu fyziky FEKT VUT za podpory Operačních programů EU CZ.1.05/2.1.00/03.0072 “Centrum senzorických, informačních a komunikačních systémů” (SIX) a OPVK CZ.1.07/2.2.00/15.0147 „Nanovědy pro elektroinženýry – inovace studijních programů“ (Nanovědy).

REFERENCE

- [1] ŠKODA, David. *Charakterizace 1-D nanostruktur metodami SPM*. Brno, 2010. 11-20 s. Diplomová práce. VUT BRNO.
- [2] FRANK, Luděk; KRÁL, Jaroslav. *Metody analýzy povrchů: Iontové, sondové a speciální metody*. Praha: Academia, 2002. 489 s. ISBN 80-200-0594-3.
- [3] ZWEYER, M., B. TROIAN, V. SPREAFICO a S. PRATO. SNOM on cell thin sections: observation of Jurkat and MDAMB453 cells. *Journal of Microscopy*. 2008, s. 440-446.
- [4] NEBESAŘOVÁ, Jana; VANCOVÁ, Marie; NEBESAŘ, Jan. *Elektronová mikroskopie pro biologi* [online]. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 13. 1. 2002 [cit. 2011-11-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.paru.cas.cz/lem/book/index.html>>.