

Pozsgai Imre

Korrelatív fény- és elektronmikroszkópia a biológiában

FIZIKA FELSOROKON

TYPOTEX

Pozsgai Imre

Korrelatív fény- és elektronmikroszkópia a biológiában

Pozsgai Imre

Korrelatív fény- és elektronmikroszkópia a biológiában

Kézirat

© Pozsgai Imre, Typotex, Budapest, 2024

Engedély nélkül semmilyen formában nem másolható!

Tartalom

Előszó.....	9
I. Biológiai minták korrelatív fény- és elektronmikroszkópiájáról röviden.....	10
Irodalom.....	16
II. A fénymikroszkópia, mint a CLEM egyik komponense	18
II.1. Fluoreszcens fénymikroszkópia (FM)	19
II.1.1. Immunfluoreszcens mikroszkópia.....	22
II.2. Háromdimenziós fénymikroszkópia	23
II.2.1. Fluoreszcens AT-tomográfia (Fluorescent Array Tomography)	23
II.2.2. Optikai szeletelés: konfokális mikroszkópia és több-fotonos mikroszkópia	24
II.3. Élő sejtek vizsgálata fénymikroszkóppal.....	26
II.4. Krio-fluoreszcens mikroszkópia (krio-FM)	28
II.5 Szuperfelbontású fluoreszcens fénymikroszkópia (SRM).....	30
Irodalom.....	37
III. Az elektronmikroszkópia, mint a CLEM másik komponense.	40
III.1. Immun-elektronmikroszkópia	40
III.2. Nagy-léptékű, kétdimenziós leképezés pásztázó elektronmikroszkóppal	41
III.3. Térfogati elektronmikroszkópia (Volume EM).....	43
III.3.1. ssTEM (serial section TEM, sorozat-metszeteken végzett transzmissziós elektronmikroszkópia)	44
III.3.2. Elektronmikroszkópos AT-tomográfia	45
III.3.3. Soksugaras elektronmikroszkópos AT-tomográfia.....	45
III.3.4. SBF-SEM, (Serial Block-Face SEM, blokk-felszín sorozatos metszése és leképezése pásztázó elektronmikroszkópban)	46
III.3.5. FIB-SEM (Fókuszált ionsugárral kombinált pásztázó elektronmikroszkóp).....	47
III.3.5.1. Krio-FIB-SEM	49
III.3.5.2. PFIB-SEM (Plazmasugaras vékonyítás a pásztázó elektronmikroszkópban) ...	50

III.3.6. Elektrontomográfia	50
III.3.7. A térfogati elektronmikroszkópia módszereinek összehasonlítása.....	52
III.3.8. Gyors adatátvitelű elektronmikroszkópia	53
III.3.9. Krio-transzmissziós elektronmikroszkópia és krio-elektrontomográfia.....	55
Irodalom.....	57
IV. Összekötő elemek a fény- és elektronmikroszkópia között.....	61
IV.1. Képregisztráció.....	61
IV.2. Kétfunkciós (bimodális) markerek	61
IV.2.1. Kvantumpontok	61
IV.2.2. FluoroNanogold®.....	65
IV.2.3. Fluoreszcens nanogyémánt (FND)	69
IV.3. Fotóoxidáción alapuló jelölők (markerek)	76
IV.3.1. DAB fotóoxidáció GFP és GFP-szerű festékekkel.....	78
IV.3.2. DAB fotóoxidáció miniSOG-gal	79
IV.3.3. DAB fotóoxidáció FLaSH és ReAsH-val.....	81
Irodalom.....	82
V. Különálló és integrált mikroszkópok a CLEM-hez.....	86
V.1. Különálló fény- és elektronmikroszkóp CLEM-hez.....	86
V.1.1. Szimbólumokkal ellátott rács felhasználása a relokációhoz	86
V.1.2. Fluoreszcens mikro-gömböcskék, mint támpont markerek	90
V.1.3. Jelölés beégetése közeli infravörös fénnel	92
V.1.4. Környezeti pásztázó elektronmikroszkóp szekvenciális CLEM-hez.....	93
V.2. Integrált fény- és elektronmikroszkóp CLEM-hez	95
V.2.1. Fénymikroszkóp és transzmissziós elektronmikroszkóp integrálása.....	95
V.2.2. Fénymikroszkóp és pásztázó elektronmikroszkóp integrálása	97
V.2.3. Atmoszférikus SEM (ASEM), mint integrált fény- és elektronmikroszkóp.....	101
Irodalom.....	103

VI. CLEM szobahőmérsékleten	106
VI.1. CLEM transzmissziós elektronmikroszkópba integrált pásztázó lézer fluoreszcens mikroszkóppal	107
VI.1.1. Patkóbél vizsgálata	108
VI.2. CLEM AT-tomográfiával, (AT-CLEM)	109
VI.2.1. Agykéreg vizsgálata.....	110
VI.3. CLEM fénymikroszkóppal és ultramikrotommal felszerelt pásztázó elektronmikroszkóppal (SBF-SEM)	113
VI.3.1. Kromoszóma vizsgálatok.....	113
VI.4. CLEM fénymikroszkóp és FIB-SEM-kombinációjával.....	118
VI.4.1. Konfokális pásztázó lézer mikroszkóp és FIB-SEM	118
VI.4.1.1. Véredény vizsgálat.....	118
VI.4.2. CLEM kétfotonos fénymikroszkóppal és FIB-SEM-mel	122
VI.4.2.1. Agykéreg vizsgálat	122
VI.5. Szuperfelbontású CLEM (SR-CLEM): STED és SEM korrelációja	129
VI. 5.1. Hisztonok vizsgálata	129
VI.6. Szuperfelbontású CLEM (SR-CLEM): PALM és TEM korrelációja	130
VI.6.1. Mitochondriumok vizsgálata	131
Irodalom.....	132
VII. CLEM: minta-előkészítés alacsony hőmérsékleten, elektronmikroszkópia szobahőmérsékleten	135
VII.1. Tokuyasu-kriometszés alkalmazása CLEM-ben.....	135
VII.1.1. Tokuyasu-kriometszés.....	135
VII.1.2. Asztrociták vizsgálata.....	136
VII.1.3. Endocitózis vizsgálata	139
VII.2. Nagynyomású fagyasztás és fagyasztásos helyettesítés alkalmazása CLEM-ben...	142
VII.2.1. Nagynyomású fagyasztás	142
VII.2.2. Dehidráció fagyasztásos helyettesítéssel	143

VII.2.3. A CLEM munkamenete nagynyomású fagyasztás és fagyasztásos helyettesítés alkalmazásakor.....	143
VII.2.4 Vaccinia vírus vizsgálata.....	144
VII.2.5. SARS-CoV-2 vírus vizsgálata.....	147
Irodalom.....	149
VIII. Krio-CLEM: minta-előkészítés és elektronmikroszkópia alacsony hőmérsékleten.....	152
VIII.1. Krio-fluoreszcenciás mikroszkópia (krio-FM)	152
VIII.2. Krio-szuperfelbontású FM.....	157
VIII.3. Krio-elektronmikroszkópia.....	159
VIII.4 Krio-CLEM alkalmazások.....	161
VIII.4.1. Szinapszisok vizsgálata.....	161
VIII.4.2. HIV-1 vírusok vizsgálata	163
VIII.5. Krio-szuperfelbontású CLEM (csCLEM)	166
VIII.5.1. Aktin vizsgálata.....	166
VIII.5.2. Mitochondriumok vizsgálata.....	168
Irodalom.....	169
Összefoglalás	171
Néhány rövidítés angol és magyar jelentése.....	172

Előszó

Előszó, amit „használati utasításnak” is nevezhetnénk. A könyvben gyakran fordulnak elő zárójeles kifejezések, amelyek célja, hogy könnyítsék az olvasást. Alkalmazásuk a következő esetekben fordul elő:

– (NAGYBETŰ SZÁM) formátum az idézett irodalomra vonatkozik. Ezek egy része folyóiratokban fellelhető cikkek, ekkor a „NAGYBETŰ” az első szerző nevét, a „SZÁM” szó a cikk megjelenésének évét jelenti. Amikor a „NAGYBETŰ” intézményekre, cégekre vonatkozik, akkor az évszám hiányzik, mert a cégek az esetek túlnyomó többségében nem közölnek évszámot. A harmadik lehetőség az, hogy a „NAGYBETŰ” a YouTube-ra vagy a Wikipédiára utal, ekkor az évszám hiányát az információnak az internetről való letöltési ideje helyettesíti. A könyv nyolc fejezetéhez külön irodalom jegyzékek tartoznak.

– (kisbetűs zárójeles megjegyzések) a vizsgán nem számon kérendő információkat tartalmaznak. Például egy zárójeles (angol kifejezés) azt segíti elő, hogy az interneten utána lehessen keresni a szóban forgó témának angol nyelven. Másrészt számos olyan angol kifejezéssel találkozunk, amelynek eddig nem volt a magyar megfelelője. Ilyenkor az angol kifejezés kapcsolatot létesít az angol és a magyar szakirodalom között.

– (kisbetűs zárójeles megjegyzések) másik típusa kutatók, tudósok nevét vagy numerikus adatokat tartalmaz, vagy olyan információt, amelyek memorizálása szükségtelen. Ezek átugrása javíthatja az olvasás élményét.

A könyv sok rövidítést tartalmaz, amelyek angol és magyar kifejtése a könyv végén található. Egy idő után ezek a betűszavak lehelyettesíthetik a több szóból álló megnevezéseket.

Jó szórakozást!

A szerző

I. Biológiai minták korrelatív fény- és elektronmikroszkópiájáról röviden

A biológiai kutatás nagy mértékben támaszkodik a mikroszkópiára: fénymikroszkópot már a 17. században használt Leeuwenhoek mikróbák tanulmányozására, az elektronmikroszkópok pedig a 20. század 30-as éveitől kezdve segítik a kutatást.

A fénymikroszkópia előnyös tulajdonsága, hogy funkcionális és molekuláris információkat ad a biológiai mintákról és alkalmas élő sejtek vizsgálatára is. A fénymikroszkópián belül a fluoreszcens mikroszkópia tűnik ki a festés szelektivitásával, kontrasztos képeivel. Ez utóbbi annak köszönhető, hogy a sötét háttérben csak a fluoreszcensen megfestett részletek világítanak. A jó szelektivitás példaként említhetjük, hogy ugyanazon mintában a DNS és RNS különböző színűre festhető. A fénymikroszkópos vizsgálódásnak erős korlátot szab a diffrakció által korlátozott ~200 nm-es felbontási határ. Továbbá a fluoreszcens mikroszkópia csak a megfestett objektumról ad információt, annak környezetéről és a környezettel való összefüggéseiről nem.

Ezzel szemben az elektronmikroszkópia a 0,1–0,2 nm-es felbontásával jól mutatja a biológiai minta ultraszerkezetét és a vizsgált objektum környezetét is. Viszont hiányzik a funkcionális információ, amit a fénymikroszkóp tud adni. Az elektronmikroszkópia jelenleg élő sejtek vizsgálatára nem alkalmas. A fluoreszcens fénymikroszkópia és az elektronmikroszkópia tulajdonságainak összehasonlítását tömören az I.1. táblázat mutatja.

I.1. táblázat. *A fluoreszcens fénymikroszkópia és az elektronmikroszkópia összehasonlítása* (CORTESE 2009)

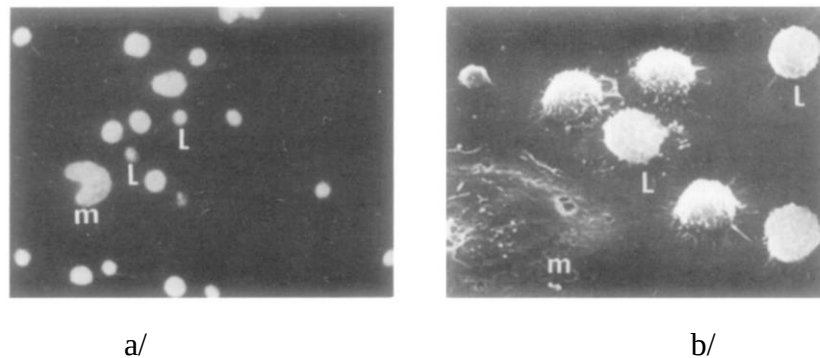
	Fluoreszcens mikroszkópia	Elektronmikroszkópia
Felbontás	+	+++
Élő sejtek megfigyelése	+	–
Megfestett szerkezetek azonosítása	+	+
Meg-nem festett szerkezetek azonosítása	–	+

A fenti összehasonlítást figyelembe véve előnyös a fény- és elektronmikroszkópia kombinált alkalmazása. A korrelatív fény- és elektronmikroszkópia (angolul Correlative Light and Electron Microscopy) a továbbiakban CLEM, számos fény- és elektronmikroszkópos módszer kombinációját, módszerek sokaságát foglalja magában.

Itt a CLEM-nek azt a definícióját fogjuk szem előtt tartani, hogy ugyanazon mintán ugyanazon mintatérfogatot vizsgál fény- és elektronmikroszkóppal (BUSHBY 2012).

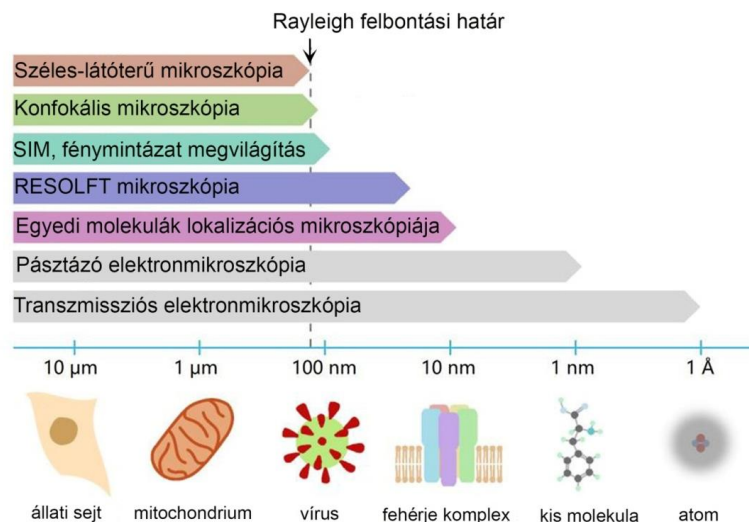
Amennyiben a vizsgálatokat különböző mintákon végzik, akkor összehasonlító (comparative) vizsgálatokról beszélünk (VERKADE 2020). Mi a korrelatív vizsgálatokkal és ezen belül is csak a biológiai alkalmazásokkal foglalkozunk.

Az I.1. ábra az első kombinált fény- és pásztázó elektronmikroszkópból származik. Az 1980-as évek tekinthetők a mai értelemben vett CLEM kezdetének (WOUTERS 1982, 1986, JONES 1982).



I.1. ábra. Ugyanazon csoport humán limfocita (L) és monocita (m) fény- és elektronmikroszkópos képe. A fluoreszcens fénymikroszkópos kép (a/ ábra) nagyítása 600x, a pásztázó elektronmikroszkóposé (b/ ábra) 2200x (WOUTERS 1982)

A fény és elektronmikroszkópos vizsgálatok méretskáláját az I.2. ábra mutatja:



I.2. ábra. Fény- és elektronmikroszkópos módszerek felbontása (TIAN 2021).

A RESOLFT mikroszkópiához tartozik pl. az első superfelbontású módszer a STED, az egyedi molekulák lokalizációs mikroszkópiához tartozik a második és harmadikként kidolgozott superfelbontású módszer a PALM és a STORM. (A rövidítések jelentését lásd a könyv végén)

Az I.2. ábrán megadott felbontások 2021-ben még igazak voltak, de a gyors fejlődésnek köszönhetően 2024-ben a fénymikroszkópos szuperfelbontású módszerek közül néhány már nanométernél jobb felbontásra képes.

A korrelatív fény- és elektronmikroszkópia célja, hogy kombinálják a két vizsgálati módszert annak érdekében, hogy a lehető legtöbb és legpontosabb információt nyerjék ki a vizsgált objektumból. A CLEM-et előnyösen alkalmazzák a következő esetekben:

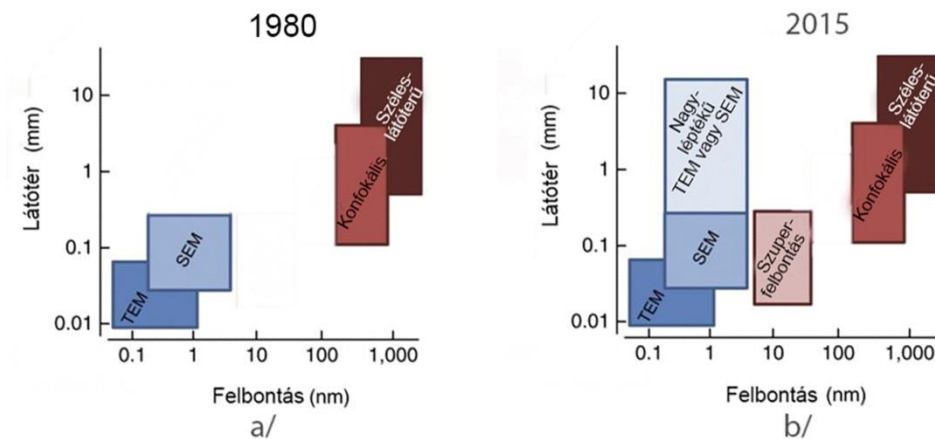
- az élő minták fénymikroszkópos vizsgálatakor kapott dinamikus információk kiegészítésére, nagyfelbontású, elektronmikroszkópos, ultrastrukturális információkkal,
- pontos információk nyerésére elektronmikroszkóppal a fluoreszcensen festett molekulák helyéről és állapotáról,
- olyan ritka események vizsgálatára, amelyek megtalálása pusztán elektronmikroszkóppal lehetetlen lenne. (ANDERSON 2020).

A CLEM fejlesztését valós igények hajtják. Vannak olyan ritka vagy tranziens folyamatok, amelyek megtalálása, detektálása nehézségekbe ütközik. Az ilyeneket „tű a szénakazalban” hasonlattal emlegetik a szakirodalomban. A CLEM többek között az ilyen ritka és/vagy tranziens folyamatok megtalálásában és tanulmányozásában nyújt segítséget. Nehezítő körülmény, hogy a sejtek háromdimenziósak és a folyamatok nem egy síkban, hanem a térben zajlanak le és a képalkotásnak ezt tükröznie kell.

Szerencsés viszont, hogy mind a fény-, mind pedig az elektronmikroszkópia képes háromdimenziós (3D) információt nyújtani. A fénymikroszkópiában többek között a konfokális mikroszkóp, a két- vagy több-fotonos mikroszkóp képes erre. Az elektronmikroszkópiában vagy a minta tényleges szeletelésével (ultramikrotommal) vagy optikai szeletelésével (elektrontomográfia) érhető el, hogy a két-dimenziós képekből háromdimenziós objektumokat rekonstruáljunk. Ezáltal megvan annak a lehetősége, hogy minta térfogatokat hasonlítsunk össze a fény és elektronok segítségével.

Nézzük meg, miben gyökereznek a fény- és elektronmikroszkópia összekapcsolásának nehézségei és mik voltak azok a tényezők, amelyet az összekapcsolódást lehetővé tettek.

Az egyik nehézség a két modalitás eltérő felbontóképessége és a mikroszkópban látható képmező (látótér) nagysága (I.3. ábra).



I.3. ábra. Új módszerek megjelenése 1980 és 2015 között, amelyek a fény- és elektronmikroszkópia felbontása és látótere közötti nagy különbségeket csökkentették (DE BOER 2015)

A fénymikroszkóp és a transzmissziós elektronmikroszkóp felbontása között egy kb. 100-szoros különbség van és a látóterek közötti különbség is legalább tízszeres. Nem is oly régen csak a széleslátóterű optikai mikroszkóp és a transzmissziós elektronmikroszkóp állt rendelkezésre (I.3. a/ ábra). A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) és a konfokális mikroszkóp, amelyek csökkentették a különbségeket csak 1965-ben, illetve 1980-as években váltak kereskedelmi termékké. A látótérbeli nagy különbség azt eredményezte, hogy az elektronmikroszkópban nehezen lehetett újra megtalálni a fénymikroszkópban vizsgált területet. Amint azt az I.3. b/ ábra mutatja a nagy-léptékű (large-scale) elektronmikroszkópia és a szuperfelbontású fénymikroszkópia megjelenése csökkentette a két platform közötti távolságot.

A fejlesztések (pl. Zeiss sok-sugaras MultiSEM) lehetővé tették, nagy mintaterületeket lehessen nagy felbontásban vizsgálni pásztázó elektronmikroszkóppal kis időráfordítással. Egy kijelölt nagy mintaterületen az elektronmikroszkóp sok sugárral sok képet vesz fel szinkronban, és egyetlen képpé fűzi össze szoftveres úton. Ezzel jelentősen csökkent a fény- és elektronmikroszkóp látótere közötti különbség. (III.2. fejezet). A fény- és elektronmikroszkóp által vizsgált térfogatok közötti különbség is csökkent azáltal, hogy a pásztázó elektronmikroszkópba beépítették ultramikrotomot vagy ionsugaras vékonyító forrást. A SEM-ben a leképezés után a minta vizsgált felszíni rétegét eltávolították ultramikrotommal vagy ionsugárral és leképezést végeztek a minta új felszínén. Az ily módon automatikusan készített újabb és újabb két-dimenziós felvételekből 3D objektumokat lehetett rekonstruálni (III.3. fejezet).

A SEM a felbontóképességének javulásával (főként a téremissziós katódok alkalmazása révén) olyan feladatok elvégzésére is alkalmassá vált, amelyeket korábban csak TEM-mel

lehetett elvégezni. Ezáltal a sorozat-metszetekkel operáló TEM-et (serial section TEM, ssTEM) sok esetben SEM-mel is lehetett helyettesíteni.

Visszaulva az I.2. ábrára, a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia ~10 nm-es detektálási határaival közelebb vitte a fénymikroszkópiát az elektronmikroszkópiához a felbontási határokat illetően, javítva a kettő közötti korreláció lehetőségét.

Komoly problémát jelentett a CLEM szempontjából a fény- és elektronmikroszkópos minta-előkészítési eljárások különbözősége. Rutin elektronmikroszkópos minta-előkészítés, és az elektronmikroszkóp elektronnyalábja megszünteti vagy nagy mértékben lecsökkenti a fénymikroszkópiára preparált minták fluoreszcenciáját. Másrésről a fénymikroszkópos minta-előkészítés gyakran megváltoztatja a minta ultraszerkezetét (DE BOER 2015).

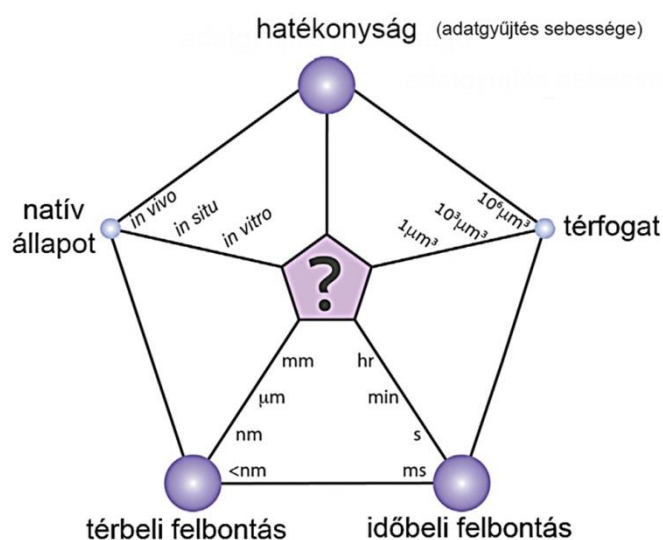
Egy új minta-előkészítési megoldás, az ultragyors merítéses fagyasztás, (angolul plunge freezing) jelentősen hozzájárult a TEM és ezáltal a CLEM fejlődéséhez. Dubochet felismerte, hogy minta kémiai fixálása helyettesíthető olyan gyors merítéses fagyasztással, hogy a mintában amorf jég keletkezzen, amely nem teszi tönkre a minta szerkezetét, mint a kristályos jég. Sőt, közel natív formában őrzi meg (DUBOCHET 1982).

A zöld fluoreszcens protein (GFP, Green Fluorescent Protein) felfedezése is (SHIMOMURA 1962) hozzájárult, hogy a fénymikroszkópia lehetőségei jelentősen megjavultak. Ugyanis a fluoreszcens festéket ezek után genetikai úton is be lehetett vinni a vizsgálandó mintába így az élő mintában végbemenő folyamatok célzottan vizsgálhatókká váltak. A GFP felfedezését követően a zöld színűn kívül sok más színű fluoreszcens fehérje felfedezése követte.

A fent felsorolt újítások közül több is olyan nagy jelentőségű volt, hogy három alkalommal kémiai Nobel-díjjal jutalmazták a feltalálókat. A zöld fluoreszcens fehérjével kapcsolatos vizsgálatokért 2008-ban (Martin Chalfie, Shimomura Oszamu és Roger Tsien), a szuper-felbontású fluoreszcens mikroszkópiáért 2014-ben (Eric Betzig, Stefan Hell és William Moerner), végül a krio-elektronmikroszkópiáért 2017-ben (Jaques Dubochet, Joachim Frank és Richard Henderson) adtak Nobel-díjat. Ezek a Nobel-díjak és az évszámok azt jelzik, hogy a mikroszkópia területén igen nagy fejlődés ment végbe az utóbbi évtizedekben.

A fény- és elektronmikroszkópia közötti különbözőség áthidalásában fontos szerepet játszott a mintapreparálás egyéb változtatásai is. Egyrészt kevésbé agresszív vegyszereket alkalmaztak az elektronmikroszkópos preparálásban, amelyek nem szüntetnek meg a fluoreszcenciát, másrészt olyan két-funkciós próbákat fejlesztettek ki, amelyek mind a fénymikroszkópban, mind pedig az elektronmikroszkópban láthatók.

Egy CLEM módszer kiválasztásában nehézséget okozhat a kezdő kutatónak, hogy sokféle fénymikroszkópos és sokféle elektronmikroszkópos módszer áll rendelkezésre a kombinációhoz. A kiválasztás fő szempontjának a megoldandó biológiai problémának kell lennie. Az I.4. ábra további segítségnek bizonyulhat a döntéshozatalban:



I.4. ábra. A vizsgálati módszer kiválasztásának szempontjai (SCHER 2020)

Az I.4. ábra szerint kompromisszumra kényszerülünk a kiválasztandó CLEM módszert illetően. Öt paramétert, a térbeli felbontást, az időbeli felbontást, az analizálandó mintatérfogatot, az adatgyűjtés sebességét és a minta natív állapotának megtartását kell szem előtt tartani. Sokszor egyszerű megoldásokat is választhatunk, ha tisztában vagyunk a kompromisszum adta lehetőségekkel.

Könyvünkben röviden áttekintjük azokat a fénymikroszkópos módszereket (II. fejezet) és elektronmikroszkópos módszereket (III. fejezet), amelyek a CLEM-ben szerepelnek, majd a két modalitást összekötő kapcsoló elemeknek szenteljük a IV. és V. fejezetet.

A CLEM-et három fejezetben tárgyaljuk és pedig olyan szempontok szerint, hogy

- a minta-előkészítést és az elektronmikroszkópos vizsgálatokat szobahőmérsékleten végzik (VI. fejezet)
- a minta-előkészítést alacsony hőmérsékleten, az elektronmikroszkópos vizsgálatokat szobahőmérsékleten végzik (VII. fejezet)
- a minta-előkészítés és az elektronmikroszkópos vizsgálatok krio-hőmérsékleten történnek (VIII. fejezet).

Krio-hőmérséklet alatt a $T < -140\text{ }^\circ\text{C}$ alatti hőmérsékleteket fogjuk érteni. A krio-módszereknél nincs kémiai fixálás, a szeleteléshez a mintákat krio-hőmérsékleten fagyasztják.

A szobahőmérsékleti módszerek fő jellemzője, hogy a minták fixálása kémiai úton, a szeletelésük pedig gyantába való beágyazás után történik.

A VII. fejezetbe két módszert soroltunk, amelyekben a szobahőmérsékleti és krio-hőmérsékleti módszerek jellemzői keverten jelentkeznek:

- a Tokuyasu-módszerben kémiai fixálás után amorf jégbe fagyasztják a mintát, ami lehetővé teszi a krio-metszést. A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatot felolvasztott mintán szobahőmérsékleten végzik.
- a másik módszerben a nagynyomású fagyasztást fagyasztásos helyettesítéssel kombinálják (HPF+FS). A fagyasztásos helyettesítést alacsony hőmérsékleten (kb. $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$) kezdik, majd a mintát lassan visszahozzák szobahőmérsékletre és ott végzik az elektronmikroszkópos vizsgálatot.

Irodalom

ANDERSON, K. *et al.* (2020): Challenges for CLEM from a Light Microscopy Perspective, in *Correlative Imaging* (eds.) Verkade P., Collinson L., 23-34.

BUSHBY, A. J. *et al.* (2012): Correlative Light and Volume Electron Microscopy: Using Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy to Image Transient Events in Model Organisms, in *Methods in Cell Biology* Vol. 111, 357-382.

CORTESE, K. (2009): Advanced Correlative Light/Electron Microscopy: Current Methods and New Developments using Tokuyasu Cryosections, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 57 (12), 1103-1112.

DE BOER, P. (2015): Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up!, *Nature Methods* 12, 6, 503-513.

DUBOCHET, J. *et al.* (1982): Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions, *Journal of Microscopy* 128, (3), 219-237.

JONES, S. *et al.* (1982): Combined light and electron microscope in routine histopathology, *J Clin Pathol* 35, 425-429.

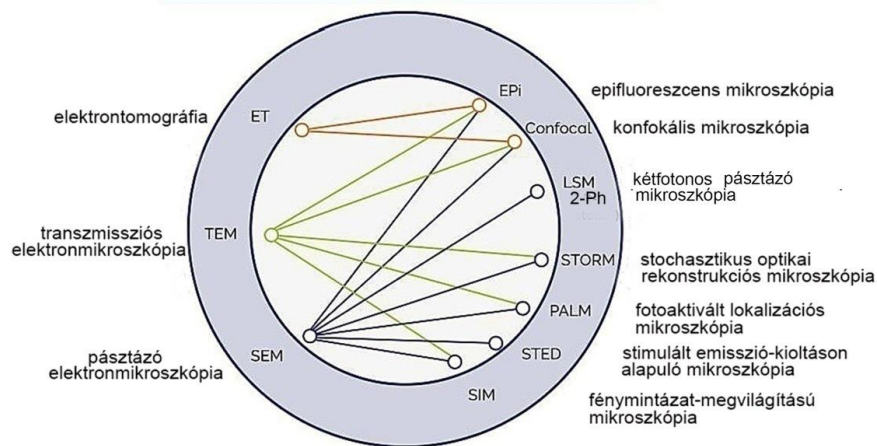
SCHER, N. *et al.* (2020): 50 Shades of CLEM: How to choose the right approach for you, *Methods in Cell Biology* Vol. 162. 1-11.

SHIMOMURA, O. *et al.* (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (3) 223-239.

- TIAN, B. *et al.* (2021): Cryogenic superresolution correlative light and electron microscopy on the frontier of subcellular imaging, *Biophysical Reviews*, 13, 1163-1171.
- VERKADE, P. *et al.* (2020): Preface in *Correlative Imaging* (eds.) Verkade P., Collinson L., XIII.
- WOUTERS, C.H. *et al.* (1982): Combined light and scanning electron microscope, a new instrument for cell biology, *Cell Biology International Reports*, 6, 10, 955-959.
- WOUTERS, C.H. *et al.* (1986): Quantitative DNA measurements in an instrument combining scanning electron microscopy and light microscopy, *Journal of Microscopy* 141,1, 40-53.

II. A fénymikroszkópia, mint a CLEM egyik komponense

A fénymikroszkópia és az elektronmikroszkópia szinte minden módszere összekombinálható egymással azzal a céllal, hogy a két platform előnyös tulajdonságait egyesítsük és a hiányosságait csökkentsük. A II.1. ábra a leggyakrabban megvalósított fény és elektronmikroszkópos kombinációkat mutatja. Az ábra bal oldalán az elektronmikroszkópos módszerek, a jobb oldalán a fénymikroszkópos módszerek vannak felsorolva.



II.1. ábra. A fény és elektronmikroszkópos módszerek gyakran alkalmazott kombinációi.

A rövidítések jelentéseit lásd alább (BEGEMAN 2016)

A II.1. ábrán látható rövidítések magyar megfelelői:

EPI – epifluoreszcens mikroszkópia,

LSM – (Laser Scanning Microscopy), pásztázó lézer mikroszkópia,

STORM – (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), stochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia,

PALM – (Photoactivated Localization Microscopy), fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia,

STED – (Stimulated Emission Depletion), stimulált emisszió-kioltás,

SIM – (Structured Illumination Microscopy), fénymintázat-megvilágítású mikroszkópia,

SEM – (Scanning Electron Microscopy), pásztázó elektronmikroszkópia,

TEM – (Transmission Electron Microscopy), transzmissziós elektron mikroszkópia,

ET – (Electron Tomography), elektrontomográfia.

A fénymikroszkópia előnyei a CLEM-ben röviden úgy foglalhatók össze, hogy lehetővé teszi az élő sejtek vizsgálatát, dinamikus és funkcionális információk nyerhetők vele. Viszont a felbontóképessége határt szab annak, hogy mit vagyunk képesek meglátni és azonosítani. Míg

egy baktérium elég nagy tud lenni, hogy részleteit láthassuk, egy megfestett vírus csak egy világító pont marad, mindenféle hasznos információ nélkül.

II.1. Fluoreszcens fénymikroszkópia (FM)

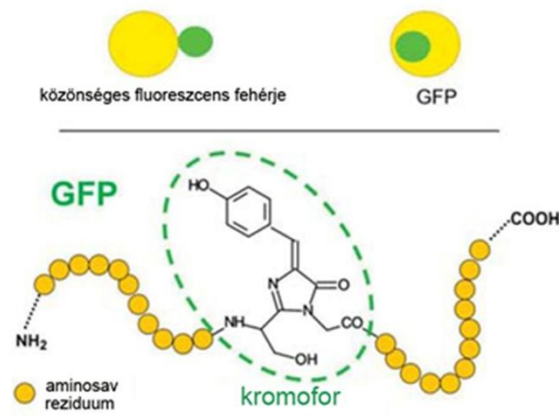
A CLEM-ben a fénymikroszkópiában használt módszerek közül különösen hasznosak a fluoreszcens módszerek. Ezekkel ugyanis specifikusan és szelektív módon lehet megfesteni sejtalkotókat, molekula csoportokat. Fluoreszcens módszerekkel sajnálatos módon nem kapunk információt a vizsgált objektum környezetéről és a környezettel való kölcsönhatásáról, még akkor sem, ha egyidejűleg többféle festést alkalmazunk. Az elektronmikroszkóp viszont a környezetről is ad információt, de az többnyire nem molekulárisan specifikus.

A fluoreszcens mikroszkópiát (FM) az is kiemeli a sorból, hogy a festék (egy fluoreszcens fehérje) genetikai úton is bejuttatható a vizsgálandó fehérjébe. Ez a lokalizációt pontosabbá teszi, mert nem egy távoli marker mutat rá a keresett objektumra, hanem maga az objektum világít.

A hagyományos és a superfelbontású fluoreszcens mikroszkópiáról (STORM, PALM, STED) magyar nyelvű tankönyv is kapható (POZSGAI 2019).

A fluoreszcens mikroszkópia egyik kulcsfontosságú eleme lett a zölden fluoreszkáló fehérje (GFP, Green Fluorescent Protein), amelyet 1962-ben O. Shimomura állított elő az *Aequorea victoria* nevű medúzzából. (Az *Aequorea victoria* egy átlátszó, csaknem színtelen medúza, amelyben két fontos fehérje található: az aequorin és a GFP. Az aequorin napfény hatására Ca^{2+} ionok jelenlétében kék fényt bocsát ki, amelyet egy másik fehérje, a GFP zöld fénné változtat át.)

A GFP (Green Fluorescent Protein) 238 aminosavból álló molekula, tömege 27 kD. 509 nm-es hullámhosszon zöld fényt emittál, amikor 395 nm-es vagy 475 nm-es hullámhosszú fénnel világítjuk meg.



II.2. ábra. A zöld fluoreszcens fehérje jellemzője, hogy a kromofor a fehérje belsejében található és nem kívülről konjugálják rá.

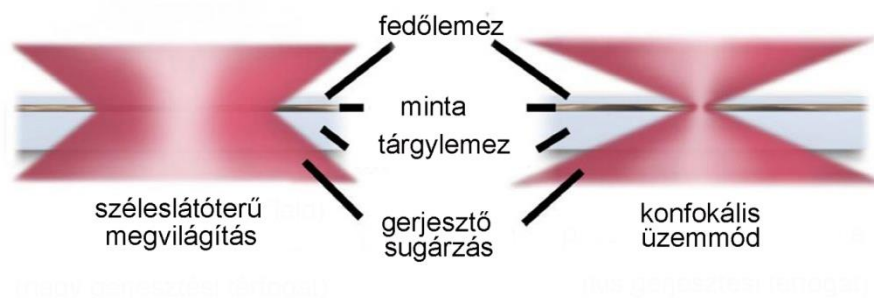
A zöldtől eltérő színű fluoreszcens fehérjéket Roger Tsien fejlesztette ki. A fluoreszcens fehérjékkel kapcsolatos vizsgálatokért Shimomura Oszamu, Roger Tsien és Martin Chalfie kémiai Nobel díjat kapott 2008-ban.

A GFP forradalmian változtatta meg a biológiai mikroszkópia lehetőségeit, mert lehetővé tette, hogy videó-mikroszkóppal nyomon követhessük az élő sejten belül végbemenő folyamatokat. A GFP nagy előnye, hogy a fluoreszcenciájához semmilyen enzimre nincs szükség, genetikai úton be lehet juttatni a vizsgálandó szervezetbe és a vizsgálatot élő szervezetben lehet végrehajtani.

A GFP-szerű festékek a GFP továbbfejlesztett változatai (EGFP, enhanced GFP) kedvezőbb fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a medúzából származó ún. wild type GFP (wtGFP.). Zöldtől eltérő színű fluoreszcens fehérjék egész sorát hozták létre: vöröset (RFP, red fluorescen protein), sárgát (YFP, yellow), kéket (EBFP, enhanced blue), ciánt (ECFP enhance cyan) stb.

A GFP alkalmazását korlátozza, hogy a minta formalinos fixálásakor vagy parafinba történő beágyazásakor elveszítheti fluoreszcenciáját. (SWENSON 2009). Viszont jól működik a DAB-bal (3-3' diaminobenzidin) való kombinációban (IV.3.1. fejezet).

A megvilágítás lehet széleslátóterű és konfokális.

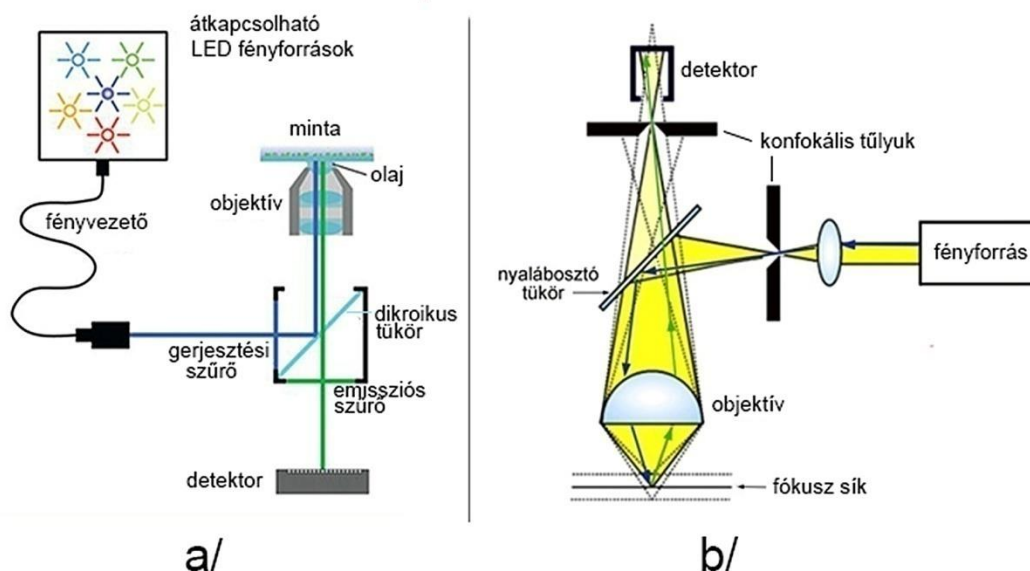


II.3. ábra. A széslátóterű és a konfokális üzemmód

Az epi-megvilágítás egy széslátóterű reflexiós üzemmódú megvilágítás.

Az epifluoreszcens és konfokális fluoreszcens mikroszkópok elvi sémáját a II.4. ábra mutatja.

Az epi-megvilágítást az jellemzi, hogy a megvilágítás és a detektor a minta ugyanazon az oldalán van. Nyalábosztó tükröt használnak mind az epi-fluoreszcens, mind pedig a konfokális fluoreszcens mikroszkópban a gerjesztő és a gerjesztett sugárzás elválasztására. Az epifluoreszcens mikroszkópokban korábban széles spektrumú ív-fényforrást használtak, a mai modern berendezésekben 4–6 különböző színű LED lámpa biztosítja a csaknem monokromatikus megvilágítást a különböző hullámhosszokon.



II.4. ábra. a/ Epifluoreszcens fénymikroszkóp, b/ konfokális fluoreszcens mikroszkóp sémája

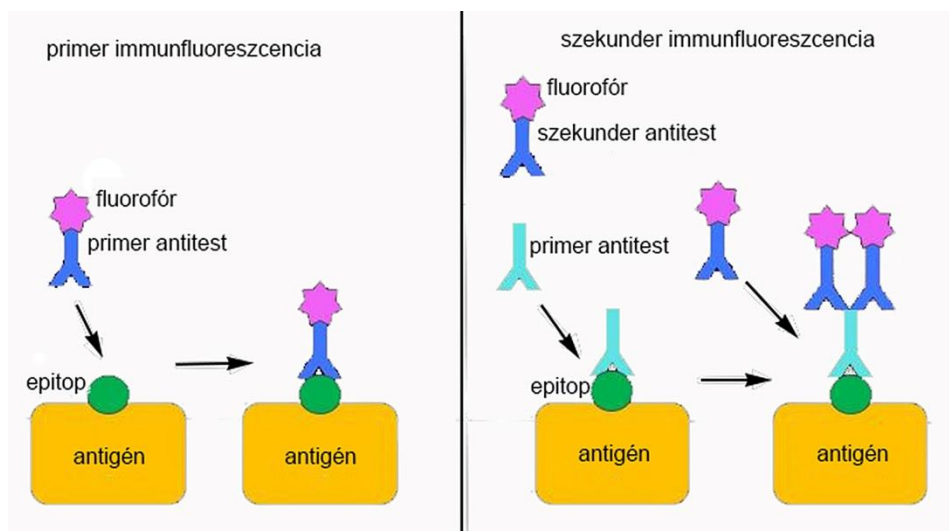
A konfokális mikroszkópokban többnyire lézert alkalmaznak fényforrásnak és két tűlyuk segítségével érik el, hogy a detektorba csak a fókusz sík egy pontjából érkezzen fény az ún. „pont-detektorba”, ami gyakran egy fotoelektron-sokszorozó vagy lavina fotodióda (APD, Avalanche Photo Diode). A két tűlyuk kizárja a fókusz-sík alatti vagy feletti szórt sugárzást.

A konfokális mikroszkópban a képalkotáshoz pásztázásra van szükség, így a mikroszkópot konfokális lézer pásztázó mikroszkópnak nevezik és CLSM rövidítéssel jelölik. (Confocal Laser Scanning Microscope). Az epifluoreszcens mikroszkópoknál nincs szükség pásztázásra, detektorként kétdimenziós CCD kamerát, vagy elektronsokszorozó CCD kamerát (EMCCD, Electron Multiplying Charge Coupled Device) vagy sCMOS kamerát (scientific Complementary Metal Oxid Semiconductor) alkalmaznak. Az utóbb említett két detektor előnye a nagy fényérzékenység, így a vizsgálandó mintát kímélni lehet azáltal, hogy a besugárzó fény intenzitását lecsökkentjük.

A konfokális mikroszkóp valamivel jobb felbontást ad, mint az epifluoreszcens mikroszkóp, de a diffrakciós határa konfokális mikroszkópnak is határt jelent.

II.1.1. Immunfluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópia egyik elterjedt alkalmazását az immunológiában találjuk meg ahol az alkalmazás alapja a specifikus antigén-antitest kölcsönhatás. Ennek segítségével az immunfluoreszcens mikroszkópia képes fehérjéknek szöveteken belüli lokalizálására, megjelenítésére. Az immunfluoreszcens festés két lehetőségét a II.5. ábra mutatja.



II.5. ábra. *Primer (direkt) és szekunder (indirekt) immunfluoreszcencia*

A primer immunfluoreszcenciában a megfestett primer antitest megtalálja a célzott antigénjét, pontosabban annak epitopját. A szekunder immunfluoreszcenciában először egy primer antitestet kötünk az antigén epitopjához és ehhez kötjük a fluoreszcens festékekkel (fluorofor) ellátott szekunder antitesteket. A gyakorlatban a szekunder immunfluoreszcencia az elterjedtebb, több ok miatt. Egyrészt azért, mert a megfestett szekunder antitest szelektívebben azonosítja a megcélzott antigént. Másrészt a primer antitestre több szekunder antitestet és több

fluorofort lehet kötni. Ez megnöveli a detektálható fluoreszcens fény intenzitását, növeli a detektálás érzékenységét. Harmadrészt a szekunder antitestek használata sokkal olcsóbb, mint a primereké.

Az immunfluoreszcens vizsgálatokat mindaddig csak fixált mintákon lehetett végezni, míg fel nem fedezték a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP), amit genetikai úton lehetett a vizsgálandó mintába juttatni. Ettől kezdve az immunfluoreszcens vizsgálatokat már élő mintán is el lehetett végezni.

II.2. Háromdimenziós fénymikroszkópia

Folytatjuk az immunfluoreszcens mikroszkópiánál elkezdett gondolatmenetet. A detektáló antitestek nem tudnak a sejtmembránon áthatolni és elég mélyen a mintába behatolni. A keresett protein helyzetének térbeli meghatározását megnehezíti a fénymikroszkóp 500–700 nm-es mélységi felbontása is. (Ez sokkal rosszabb, mint a laterális ~200 nm-es felbontása.) A problémák megoldhatók a minták ultramikrotómos szeletelésével vagy optikai szeleteléssel.

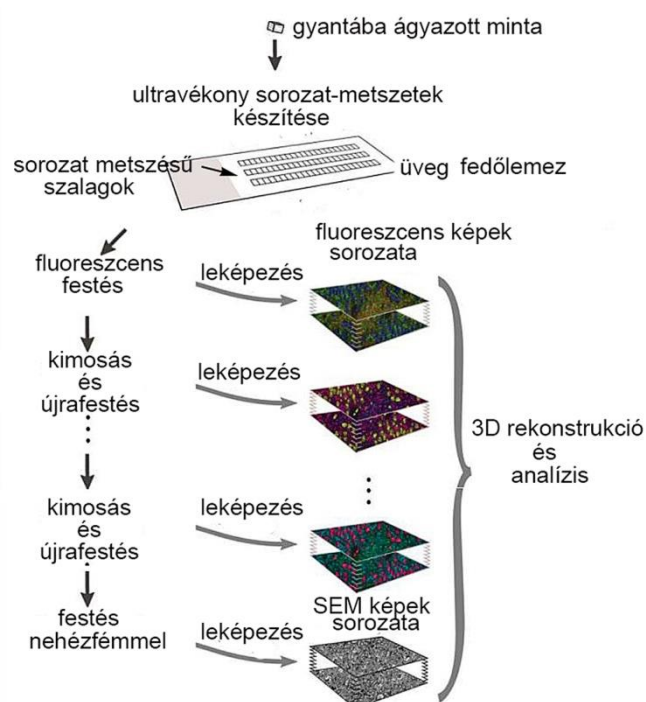
II.2.1. Fluoreszcens AT-tomográfia (Fluorescent Array Tomography)

Az *AT-tomográfia* a leképezési módszereken átívelő ultramikrotómos szeletelési eljárás, amely a beágyazott ultravékony szeleteket olyan rendezett formában tartja, hogy segítségével 3D rekonstrukciót lehet végrehajtani mind fénymikroszkópos, mind pedig elektronmikroszkópos úton (II.6. ábra) (MICHEVA 2007). A CLEM fénymikroszkópos komponenseinek felsorolásakor a címben a fluoreszcens AT-tomográfiát emeltük ki, de könyvünk szempontjából az AT-tomográfiával megvalósított korrelatív fény- és elektronmikroszkópia lesz a fontos.

(Megjegyzés: az array angol szó rendezett halmazt jelent, a tomográfia pedig a háromdimenziós képnek a kétdimenziós szeletekből (görögül tomosz) való előállítását.) Az array tomographyt magyarul AT-tomográfiának fogjuk nevezni.

A II.6. ábrán látható szövet mintákat akril (LR White) gyantába ágyazták be, majd ultramikrotómmal ultravékony (70-200 nm) szeletekre vágták. Az egymás után előállított szeletek „szalagot” képeztek, amelyeket üveg fedőlemezre rögzítettek. A szalagokat vagy fluoreszcens antitestekkel vagy más fluoreszcens festékekkel festették majd a 2D képek sorozatából 3D képeket készítettek számítógépes úton. Egy-egy metszetsorozatot ki lehet mosni és újrafesteni és a 2D képek felvételét újra kezdeni és újabb 3D képet rekonstruálni. Az utolsó lépésben a metszet-sorozatot nehéz fémmelel festették meg és pásztázó elektronmikroszkópos felvételsorozatot készítettek. A 2D képekből számítógépes úton 3D rekonstrukciót végeztek.

A II.6. ábra megmutatja, hogy az AT-tomográfia magában hordozza a korrelatív fény- és elektronmikroszkópia lehetőségét.



II.6. ábra. AT-tomográfia (array tomography) (MICHEVA 2007)

Az AT-tomográfia jelentős előrelépés a korábbi technikákhoz képest, mert javították a konfokális fénymikroszkóp axiális (z-irányú) felbontását azáltal, hogy ultravékony metszeteken dolgoztak. A szeletek rendezettsége révén javultak a 3D rekonstrukció lehetőségei. Az antigének térbeli eloszlását elektronmikroszkóposan nagy térfogatban nagy felbontással meg tudták határozni.

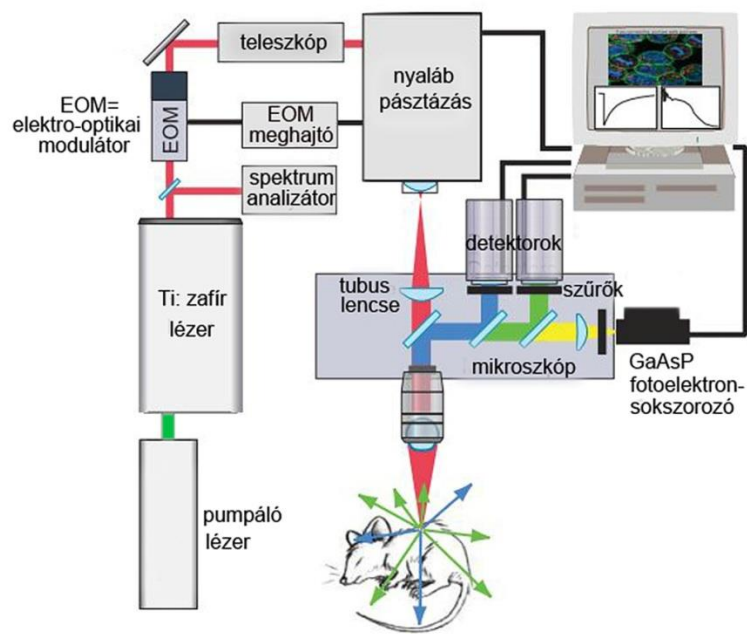
Micheva egy későbbi közleményében (MICHEVA 2010) részletesebben leírja az általa kidolgozott AT-tomográfiát. Az érdeklődőknek ajánljuk Wacker és munkatársainak közleményét is (WACKER 2013), akik az AT-tomográfiában a szeletelés után pásztázó elektronmikroszkópot használtak leképezésre. A Youtube-on és a jove.com weboldalon található videóban élvezetesen bemutatják hogyan zajlik az AT-tomografia. Az AT-tomográfiához visszatérünk az III. fejezetben.

II.2.2. Optikai szeletelés: konfokális mikroszkópia és több-fotonos mikroszkópia

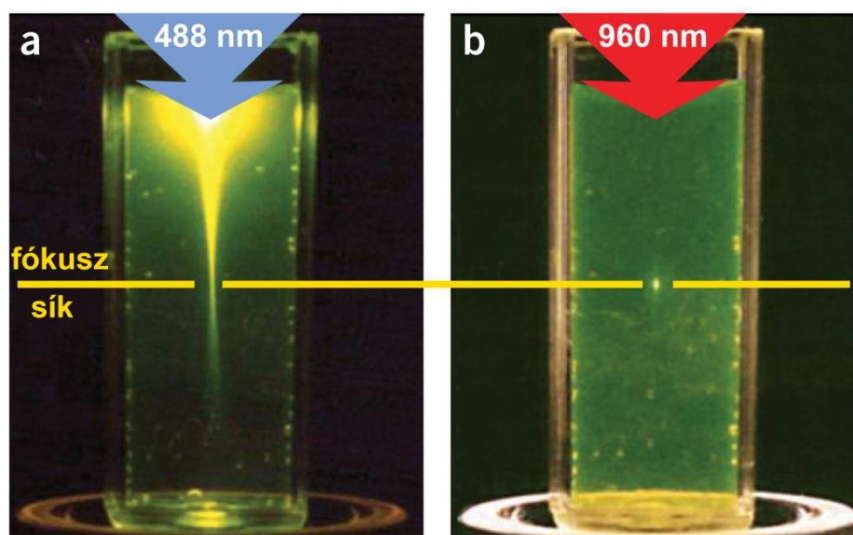
A CLEM szempontjából jelentősége van annak, hogy a konfokális mikroszkóppal a fókuszsík helyzete változtatható az objektív lencse függőleges, piezoelektromos mozgatása révén. Az így felvett kép-sorozatból háromdimenziós kép készíthető. Erre szükség van, mert a sejtek

háromdimenziósak. A 3D CLEM-ben a háromdimenziós fény- és elektronmikroszkópos képeket korrelálják.

Nem a konfokális mikroszkóp az egyetlen lehetőség háromdimenziós fénymikroszkópos képek készítésére. A több-fotonos mikroszkópok is adnak lehetőséget erre. Vegyük pl. a kétfotonos mikroszkópot (DENK 1990). A kétfotonos mikroszkóp (2PLSM, Two-Photon Laser Scanning Microscope) fényforrása olyan nagyfrekvenciás lézer (femtosekundos Ti: zafir lézer), amelynek segítségével el lehet érni, hogy két azonos (vagy közel azonos) energiájú foton olyan kölcsönhatásba lépjen egy besugárzott molekulával, mintha egyetlen, de kétszer akkora energiájú foton abszorbeálódott volna. Ez akkor lehetséges, ha két foton egyidejűleg (0,1 femtosekundumon belül) abszorbeálódik a molekulában. Így a kétfotonos mikroszkópiában a konfokális mikroszkópnál szükséges túlyuk apertura nélkül is el lehet érni, hogy a megvilágító fény csak egy pontban gerjessze a fluoreszcens festéket. (II.8. ábra)



II.7.ábra. A kétfotonos mikroszkóp sémája (ZIPFEL 2003)



II.8. ábra. Egyfotonos és kétfotonos gerjesztés összehasonlítása fluoreszcein segítségével.
a/ egy-fotonos gerjesztés, fókuszált 488 nm-es fénnyel, b/ fókuszált kétfotonos, femtoszekundumos megvilágítás 960 nm hullámhosszúságú fénnyel (ZIPFEL 2003)

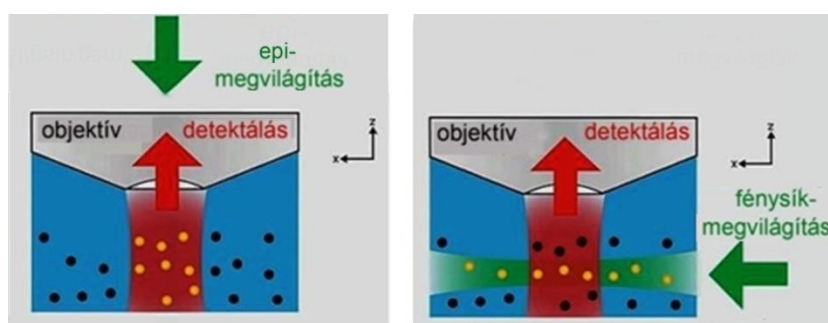
II.3. Élő sejtek vizsgálata fénymikroszkóppal

Az élő sejteket, mikrobákat már a XVII. században Antonie van Leeuwenhoek is vizsgált állóvizekből vett mintákban. (Őt tekintik a mikrobiológia atyjának.) Manapság statikus mikroszkópos képeken kívül, digitális mikroszkóp kamerával készítenek mozgóképet élő mintákról, vagy időugrásos technikával (time-lapse microscopy) rögzítik a hosszabb ideig tartó folyamatokat. Az élő szervezetben lezajló folyamatok dinamikájának követése alapvetően befolyásolja a korábban csak statikus képekből ismert folyamatok megértését. Régen video-rekordert, manapság digitális mikroszkóp kamerát használnak képrögzítésre. Különböző feladatokhoz különböző mikroszkóp kamerákra van szükség. Azon túlmenően, hogy vannak monokróm és színes kamerák, a gép által elérhető felvételi sebességeknek is meg kell felelniük a vizsgálandó biológiai folyamatoknak. Fluoreszcens vizsgálatokhoz monokróm kamerát használnak, a megfelelő kamera kiválasztásához jó alapismeretekkel kell rendelkezniük. (Ehhez ajánljuk a Zeiss tudásbázisát.) Az élő sejtek mikroszkópos vizsgálatához sok alapismeretet tartalmaz Cuny áttekintő közleménye (CUNY 2022).

Korábban erősek voltak a korlátok, hogy mennyi ideig lehet egy mintát videózni, manapság az inkubátorokkal egybeépített fénymikroszkópok és az idő-ugrásos technika akár több napos megfigyeléseket is lehetővé tesznek. Az időugrásos mikroszkópiában viszonylag hosszú időn át vesznek fel képeket, majd felgyorsítva lejátsszák. A minta fényterhelése szempontjából kedvező, hogy a minta csak a felvétel készítése idejére van megvilágítva.

Az inkubátorokban minden olyan paramétert be lehet állítani, amely a minta optimális életben maradásához szükséges: hőmérséklet, CO₂ tartalom, pH, tápoldat stb.

Különböző fénymikroszkópos technikákat (pl. a fluoreszcens mikroszkópia számos módszerét) lehet bevetni a megfigyeléshez, de fontos szempont, hogy a megvilágítás ne károsítsa a mintát és a normál sejt működést se zavarja. Az erős fény megzavarja a sejtek normál működését: ezt fotoméregzésnek, fototoxicitásnak nevezik. A fotokifakulás (angolul photobleaching) a fluoreszcens mikroszkópia zavaró velejárója (kivéve a FRAP és FLIP módszereket, amelyek hasznosítják a kifakulás jelenségét). A fotokifakulás fokozatos kontraszt-gyengülésben nyilvánul meg és a fluoreszcens fényemisszió végleges elvesztéséhez vezet. Oka az, hogy a fluoreszcens fényemisszió olyan reaktív oxigént termel, ami a sejteket elpusztítja. (A reaktív oxigén termelése a fluoreszcens emisszió kívül magának a sejt működésének is a következménye.) Vannak olyan fluoreszcens festékek, amelyeknek a fotokifakulása csekély pl. az Alexa Fluor festékek, de a fluoreszcens kvantum pontok világítása ebből a szempontból még kedvezőbb.



II.9. ábra. Az epi-fluoreszcens megvilágítás és fénysík-megvilágítás összehasonlítása (ZEISS 1)

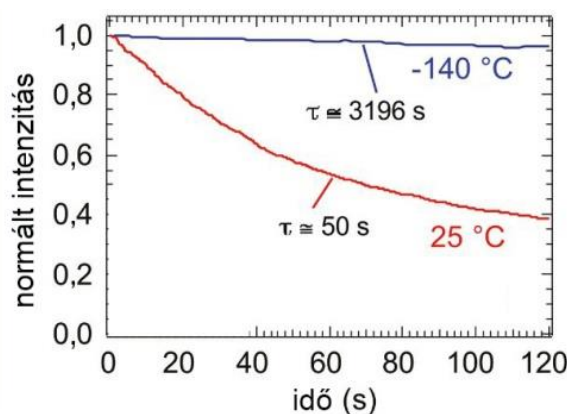
A II.9. ábra azt mutatja, hogy a minta fényterhelése csökkenthető, ha olyan fénysíkkal világítják meg a mintát, amelynek iránya merőleges a detektálás irányára. Fénysík-megvilágításkor a detektáló optika fókuszsíkja egybeesik a megvilágító fény síkjával és fluoroforok csak ebben a síkban gerjesztődnek.

Stelzer szerint (STELZER 2015) az élő minták mikroszkópos vizsgálatához felhasznált fényenergiának összhangban kell lenni a Napból a Földre érkező energiasűrűséggel, ami az egyenlítő környékén 1,4 kW/m². Ezt átszámolva a mikroszkópiában használt egységekre, a minta megvilágításakor az 1 nW/μm² értéket nem szabad túllépni. Minél nagyobb és vastagabb a vizsgált objektum és minél hosszabb ideig vizsgáljuk, annál több fényenergia nyelődik el benne.

Az élő sejtek mikroszkópiája a zöld fluoreszcens fehérje (GFP, Green Fluorescent Protein) felfedezésével virágzott fel.

II.4. Krio-fluoreszcencens mikroszkópia (krio-FM)

A fénymikroszkópiának az elektronmikroszkópiával való korrelációhoz kell, hogy a fénymikroszkópban megfigyelt folyamat egy adott pillanatát elektronmikroszkópban nagy felbontásban is vizsgálni lehessen. Ehhez meg kell állítani a folyamatot, fixálni kell a mintát. Erre kétféle lehetőség van: vagy kémiai vagy fagyasztásos fixálás. A fénymikroszkópban rögzített állapotnak időben a lehető legközelebb kell lennie az elektronmikroszkópban megfigyelt állapothoz. Ebből a szempontból a krio-fixálás bizonyult gyorsabbnak a kémiai fixáláshoz képest, ráadásul krio-fixáláskor kevesebb a műtermék a fixáló vegyszerek hiánya miatt. Kedvező az is, hogy alacsony hőmérsékleten a fluoreszcens festékek fotokifakulása jelentősen lassabb, mint szobahőmérsékleten (SCHWARTZ 2007, HULLEMAN 2018, FAORO 2018).



II.10. ábra. Élesztőbe expresszált zöld fluoreszcens fehérje (GFP) fotokifakulásának időfüggése szobahőmérsékleten és $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Nagyon nagy a különbség a fluoreszcens élettartamokban (τ) (FAORO 2018)

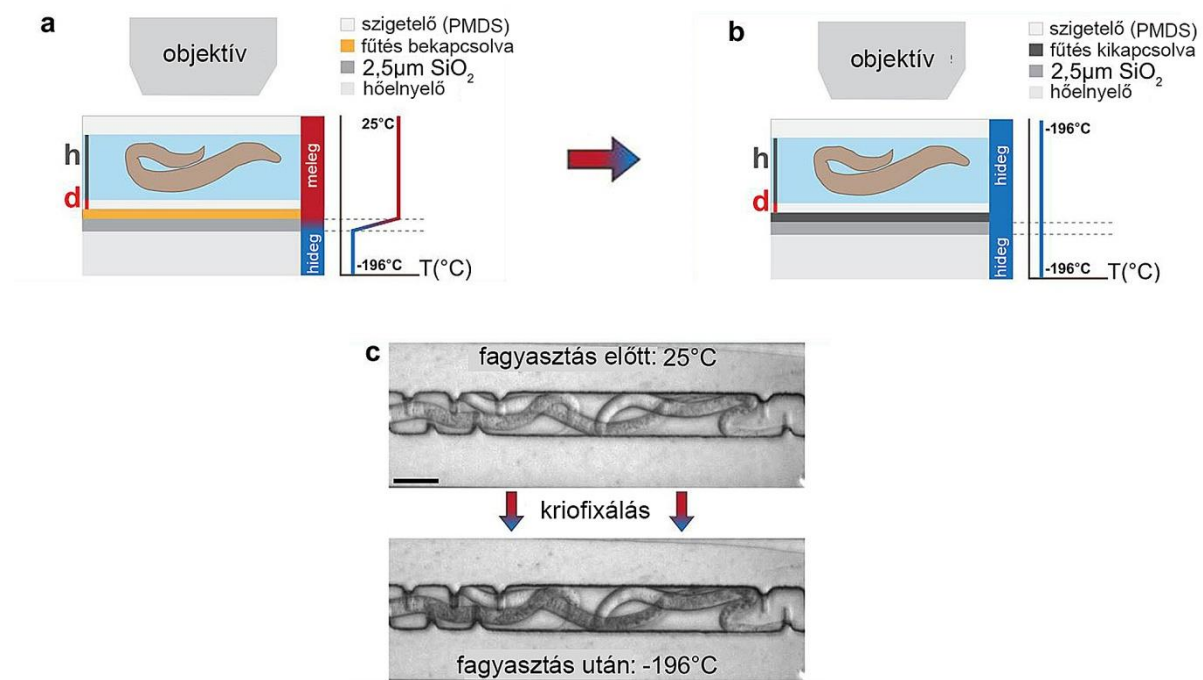
A krio-fénymikroszkópia lehetővé teszi a vizsgálandó mintaterületek azonosítását a krio-elektronmikroszkópiához.

A krio-elektronmikroszkópiánál részletesebben kitérünk arra, hogy az évtizedekkel korábban alkalmazott fagyasztási eljárásoknál a mintában kristályos jég keletkezett. (A hangsúly a kristályoson van.) A víz fagyasztáskor kiterjed és a jégkristályok tönkre teszik a vizsgálandó biológiai mintát. Dubochet érdeme, hogy manapság olyan ultragyors merítéses fagyasztási eljárással (plunge freezing) dolgoznak az elektronmikroszkóposok, amelynél a vizsgálandó mintában $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatti hőmérsékleten amorf (üvegszerű) jég keletkezik, amely hidratáltan, közel natív állapotban őrzi meg azt (DUBOCHET 1982).

A fénymikroszkópiában a CLEM-hez még egy másik gyors fagyasztás eljárást is alkalmaznak fixálásra, amelyre a mikrofluidika adott lehetőséget.

A mikrofluidika kis csatornában mozgó, kis térfogatú (akár femtoliternyi) folyadékok vizsgálatával és alkalmazásával foglalkozik. A csatornák keresztmetszete a $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ nagyságrendbe esik. Meglepően széleskörű az alkalmazásuk, amelyek közül legismertebb a tintasugaras nyomtatók feje (MIKROFLUIDIKA, WIKIPÉDIA).

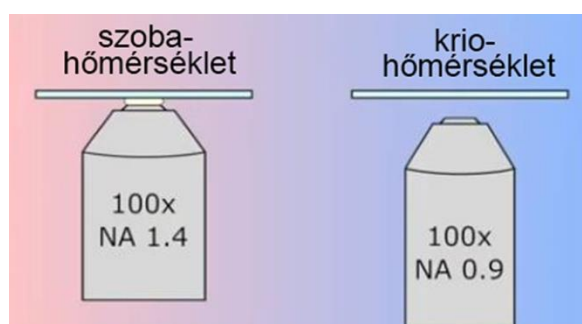
CLEM példaként olyan mikrofluidikai kísérleti elrendezést mutatunk be, amelyben a fagyasztott állapot csak 10 msec-ot késik a fixálás pillanatához képest.



II.11. ábra. Az in situ mikrofluidikai kriofixálás elvéhez (FUEST 2019)

A miniatűr (PDMS, polidimetilsziloxán) mintatartó kamra a fénymikroszkóp objektív lencséje alatt található (II.11. ábra). A bal oldali ábrán a vizsgálandó minta (*C. elegans*) 25 °C-on van. A hőmérsékletet fűtéssel állítják be, mert a minta alatt található cseppfolyós nitrogén fürdő alacsony hőmérsékletet eredményezne. A fűtőtest és a cseppfolyós nitrogénnel hűtött hőelnyelő között $\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ -nél vastagabb SiO₂ réteg van. A fűtés kikapcsolása után (jobb oldali ábra) a minta hőmérséklete hirtelen $-140\text{ }^\circ\text{C}$ alá süllyed és a kriofixálás végbemegy. Ahhoz, hogy a mintában lévő jég amorf állapotban fagyjon meg, a kritikus paraméter a lehűtés sebessége, amelyre első közelítésben $20\,000\text{ }^\circ\text{C/sec}$ -ot becsülték a csatorna teljes mélységére (FUEST 2019). A vizsgálatokról 1250 képkocka/sec sebességű videofelvételeket készítettek. A gyors lehűlés kis hő-tehetetlenségű rendszert igényel, ezért az ábrán késsel jelölt folyadék (fagyásgátló glicerinnel kevert M9 oldat) magassága legfeljebb $20\text{ }\mu\text{m}$ lehet. A krio-fénymikroszkópos vizsgálat után a minta a krio-elektronmikroszkópba kerül a korrelatív vizsgálatok céljából.

Tekintettel arra, hogy a felbontást a fény hullámhosszán kívül a numerikus apertúra (NA) határozza meg ($d = \lambda / 2NA$), vannak törekvések arra nézve, hogy 1-nél nagyobb numerikus apertúrájú immerziós objektíveket fejlesszenek ki. ($NA = n \sin \alpha$, ahol n a törésmutató, α az objektív lencse nyílásszögének a fele). Szobahőmérsékleten az immerziós olajok révén az NA $\sim 1,3$ – $1,4$ is lehet, krio-hőmérsékleten az immerziós folyadékok hiánya miatt NA rendszerint kisebb, mint 1. Egy egyszerű ábra a DELMIC oktató filmjéből, amelyen a szobahőmérsékletű és krio-hőmérsékletű objektív látható:

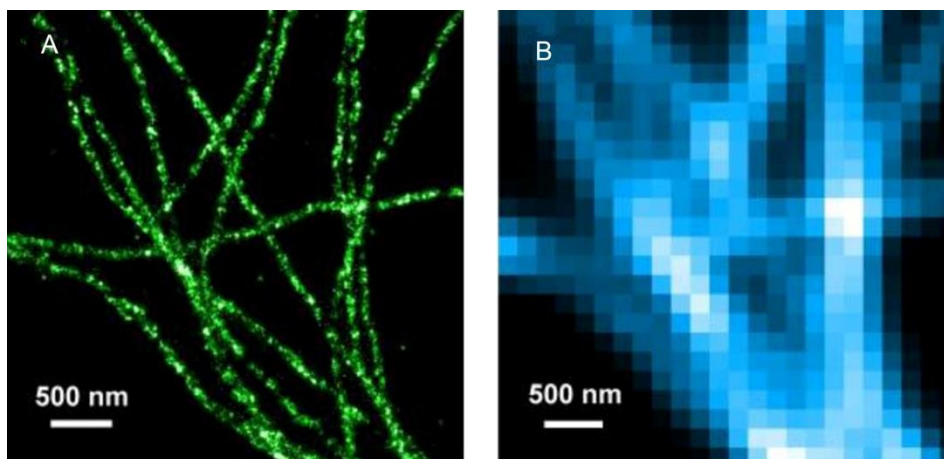


II.12. ábra. Objektívek, szobahőmérsékleten immerziós olajjal és krio-hőmérsékleten immerziós olaj nélkül (<https://www.youtube.com/watch?v=KqtqrbwTRHc&t=23s>)

A krio-fénymikroszkópiában különös jelentőségű egy olyan krio-immersiós lencse megalkotása, amely nagyfelbontású és torzításmentes képet ad (FAORO 2018). A krio-FM-ről bővebben a VIII.1. fejezetben írunk.

II.5 Superfelbontású fluoreszcens fénymikroszkópia (SRM)

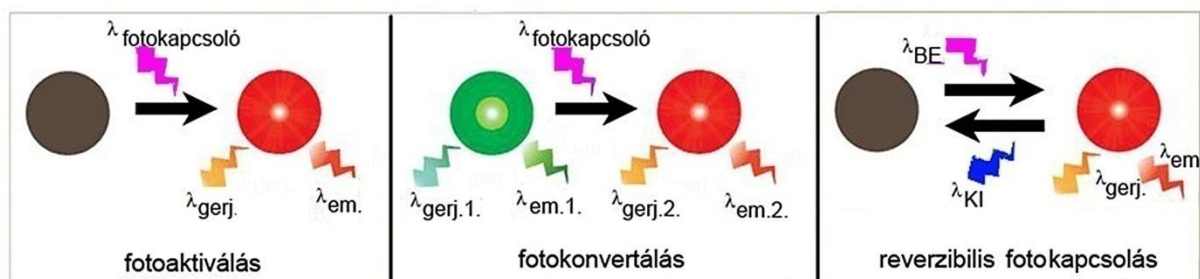
A superfelbontású fluoreszcens fénymikroszkópiát nanoszkópiának is nevezik. A látvány, hogy a superfelbontás mennyire különbözik a hagyományos fénymikroszkópos felbontástól, mindennél többet mond (II.13. ábra).



II.13. ábra. Ugyanazon terepen lévő mikrotubulusok képe superfelfeltárásban (A) és konvencionális felbontásban (B) (BATES 2007)

Szuperfelfeltárásnál a fluoreszcens festékeknek (fluoroforok) nagyobb szerepe van, mint a hagyományos fluoreszcens mikroszkópiában. Egy-egy superfelfeltárású módszer csak speciális festékekkel működik.

A fény hatására végbemenő fluoreszcens változásoknak három alapvető folyamatát különböztetjük meg: fotoaktiválást, fotokonvertálást és reverzibilis fotokapcsolást (II.14. ábra).



II.14. ábra. Fény hatására bekövetkező folyamatok. A fotoaktiválás és fotokonvertálás irreverzibilis, a fotokapcsolás reverzibilis. (Rövidítések: gerj., gerjesztés, em., emisszió) (SYDOR 2015)

A fotoaktiválás irreverzibilis kémiai folyamat. A fotoaktiválható (photoactivatable) festék kezdeti állapotában nem (vagy nagyon kevésbé) fluoreszcens. A kezdeti állapotot inaktív vagy sötét állapotnak nevezik. Ultraibolya, ibolya vagy kék sugárzással aktívvá tehető a festék. Ezután egy másik színű fénnel fluoreszcenciára gerjeszthető.

A fotokonvertálható (photoconvertible) fluorofor kiindulási állapotában is fluoreszcens. A fotokonvertálás hatására megváltozik a fluorofor gerjesztési és emissziós hullámhossza a konvertálási előtti állapothoz képest. A fotokonvertálás is irreverzibilis folyamat.

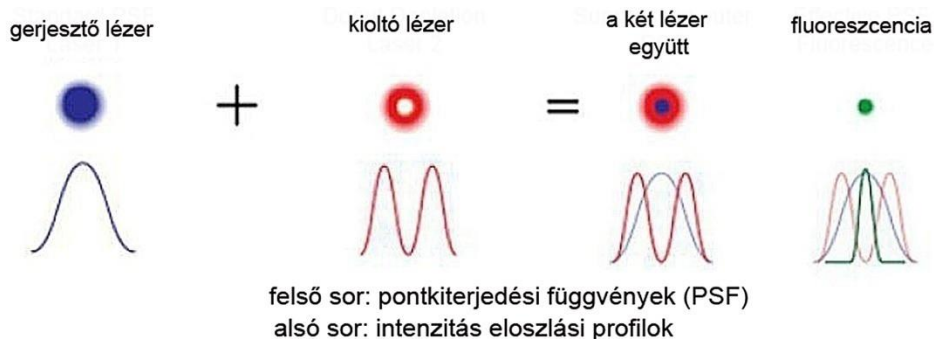
A fotokapcsolható (photoswitchable) fluorofor reverzibilisen ki-be kapcsolható. A bekapcsolás ultraibolya fénnel történik. Ezután a fluorofor gerjesztés hatására világít. A

kikapcsolás többnyire kék fénnel történik. A fotokapcsolás reverzibilis folyamat és többször végrehajtható, mielőtt a fluorofor véglegesen kifakul (megszűnik világítani).

A szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópos módszerek két nagy csoportra oszthatók. Az egyik a molekulacsoportok leképezésén, a másik az egyedek molekula leképezésén alapul. Az előbbire példa a STED (a STimulated Emission Depletion, magyarul stimulált emisszió-kioltásnak nevezzük), az utóbbira példa a PALM (Photoactivated Localization Microscopy, fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia). A szakirodalomban SMLM rövidítés (Single-Molecule Localization Microscopy, egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia) honosodott meg, amely a PALM-mal rokon (STORM, dSTORM, iPALM, PALMIRA és sptPALM) módszereket jelöli.

Alább bemutatjuk STED, a PALM a STORM és MINFLUX szuperfelbontású módszerek elvét.

A STED mikroszkópban a fluoreszcens emissziót lézer sugárral gerjesztik, és a gerjesztő folt egy részén a nem kívánatos emissziót egy másik lézerrel kioltják (II.15. ábra). A fluoreszcenciát gerjesztő lézer foltját kék, a kioltó lézer (angolul STED) foltját piros szín jelzi. A kioltó, fánk alakú folt, úgy illeszkedik a gerjesztő folt, hogy annak peremét kioltja. A kioltó nyaláb közepén lévő zérus intenzitású pontban a fluoreszcencia (zöld) megengedett, azon kívül nem.



II.15. ábra. A kioltó (STED) lézer lecsökkenti a gerjesztő lézer folt-méretét

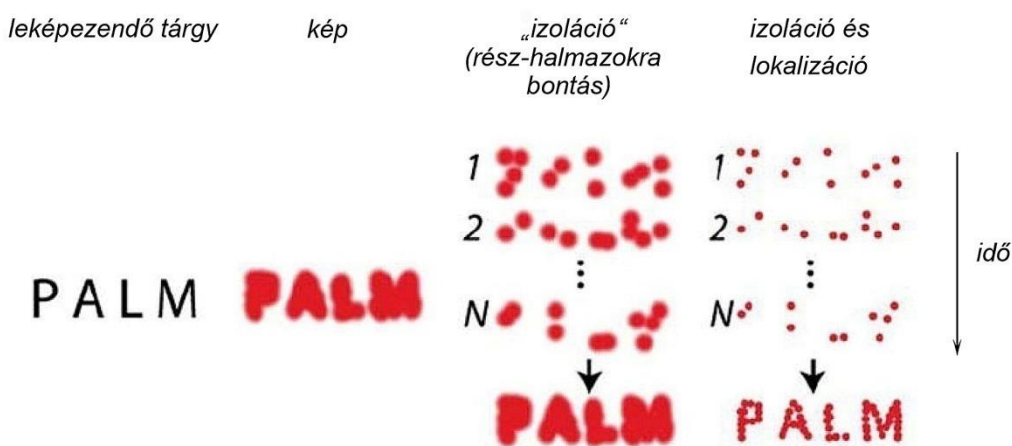
Az első STED-mikroszkópos felvételek a felbontást a laterális síkban kétszeresen (244 nm-ről 104 nm-re), az axiális irányban ötszörösen (490 nm-ről 97 nm-re) javították meg. Azóta a STED mikroszkóp számos javított változatát dolgozták ki, amelyek könnyebb kezelhetőséget, kisebb besugárzó áramot és jobb felbontást eredményeztek. A gyors fejlődésre jellemző, hogy STEDYCON feltétellel egy epifluoreszcens mikroszkópból 3 perc alatt működőképes STED mikroszkópot lehet készíteni (<https://www.youtube.com/watch?v=BGPhhhS7OC8>).

A PALM (fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia) a STED mikroszkópia mellett a másik szuperfelbontású módszer volt, amely a 2014-es kémiai Nobel-díjat kiérdemelte. (Eric Betzig,

Stefan Hell és William Moerner). A PALM-mal 10-20 nm-es felbontás érhető el. Stefan Hell 1994-ben, Eric Betzig 1995-ben írta le a STED illetve a PALM mikroszkópiáról való elképzeléseit. A STED esetében 6, a PALM esetében 11 évet kellett várni a gyakorlati megvalósításra. Érdekesség, hogy a lokalizációs mikroszkópia első három módszerét (PALM, FPALM és STORM) 2006-ban négy hónapon belül publikálták.

A PALM-ban a molekulákat aktiváció segítségével rövid ideig láthatóvá lehet tenni, helyüket meghatározni, majd kioltani (vagy maguktól kialszanak). A következő aktiváláskor a már lokalizáltak „sötétben maradnak” és mások jelennek meg helyettük. Ezeket ismét lokalizálni lehet; a folyamatot több ezerszer meg kell ismételni, majd a képeket összefűzni.

A II.16. ábra azt szemlélteti, hogy a leképezendő tárgy (1. oszlop) nem ad éles képet (2. oszlop) a diffrakció korlátozó hatása miatt. Ha leképezendő terepet részekre bontjuk, amelyeken belül kevés molekula található (3. oszlop), attól még az időben egymás után felvett N kép összefűzés után is diffrakció-korlátozott marad. Viszont, ha minden egyes izolált képen belül elvégezzük a lokalizációt, (azaz meghatározzuk a molekulakép középpontjának helyét), (4. oszlop), és utána fűzzük össze, akkor a végső kép már sokkal jobb felbontású lesz, mint a 2. oszlopban látható kép.

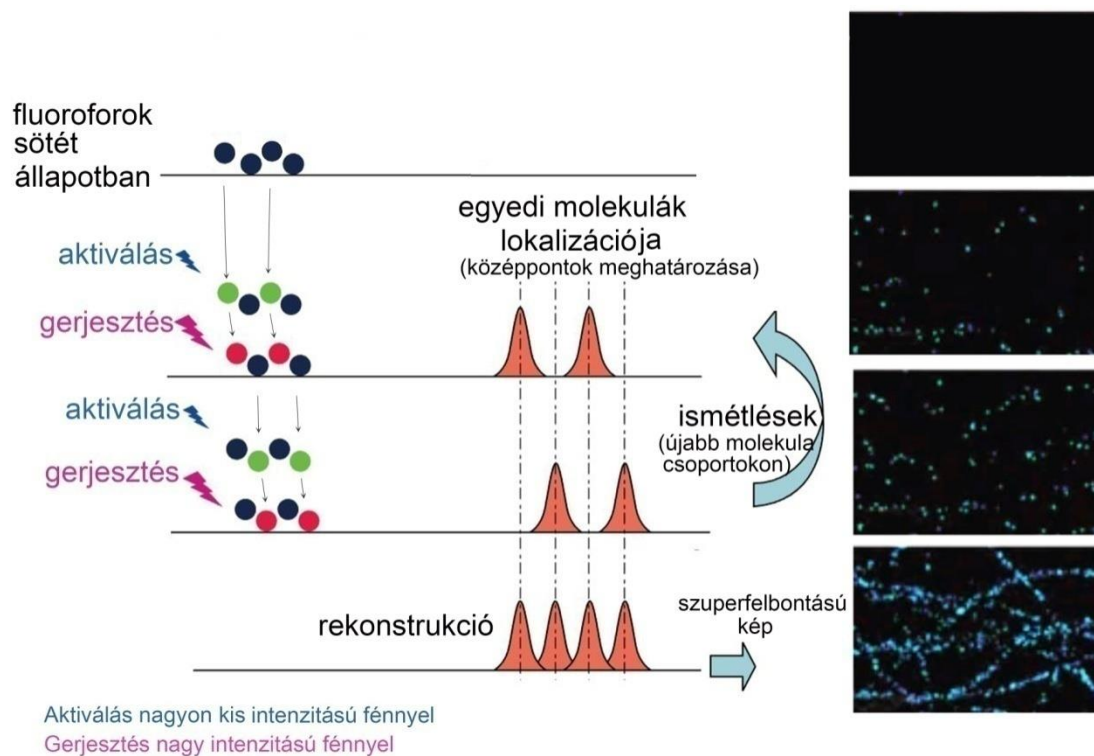


II.16. ábra. A lokalizációs mikroszkópiában a nagyszámú, de képenként kevés fotoaktivált molekulát tartalmazó képeket összefűzik (TEMPRINE 2015)

A folyamat végeredménye egy olyan valószínűségi eloszlási térkép, amelyet renderelt (kiszámított pozíciójú) molekulákból állítanak össze és amelyben a pontok fényessége arányos azzal a valószínűséggel, hogy egy fotoaktivált molekula (fluoreszcens fehérje vagy szerves fluorofor) az adott helyen van.

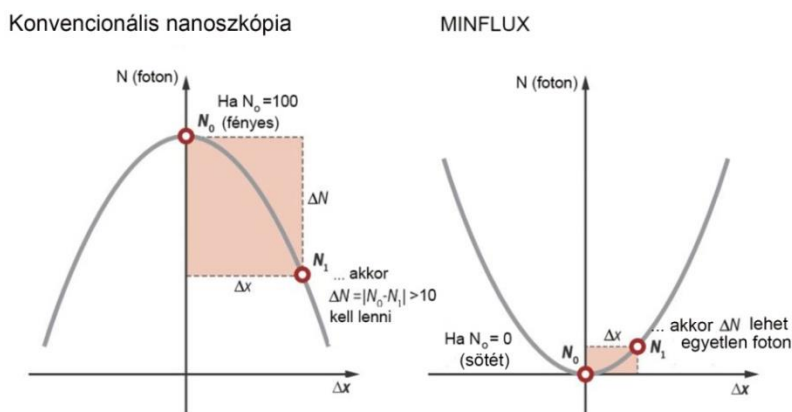
A STORM szuperfelbontású módszer alapja szintén a lokalizáció. A II.17. ábrán azt szemléltetjük, hogy a fluoreszcens fehérjét vagy szerves fluorofort először kis intenzitású

fénnyel aktiváljuk (alkalmassá tesszük, hogy fluoreszcenciára gerjeszthető legyen), majd nagy intenzitású fénnyel gerjesztjük, akkor a PALM-nál ismertetett lokalizációt és kép-összefűzést kell alkalmaznunk (rekonstrukció), hogy szuperfelbontású képet kapjunk.



II.17. ábra. A STORM (stochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia) elvének sémája (NIKON)

A MINIFLUX szuperfelbontású mikroszkópiát (BALZAROTTI 2017) feje tetejére állított nanoszkópiának is nevezik (XIAO 2017), mert bár ez is fánk alakú megvilágítással rendelkezik, mint a STED, de lokalizációra nem a fluoreszcens világítás maximumát használják, hanem a minimumát (II.18. ábra). Nagy különbség az is, hogy a STED-ben a kioltó nyaláb fánk alakú, itt pedig a gerjesztő nyaláb.



II.18. ábra. A konvencionális nanoszkópia és MINFLUX elvének összehasonlítása egy dimenzióban.
(Lásd a szöveget!) (XIAO 2017)

A II.18. ábra bal oldalán látható görbe azt mutatja, hogy a konvencionális nanoszkópiában pl. STED-ben a fánk alakú kioltó görbéje miatt a fluoreszcens intenzitás a fánk közepén a legnagyobb (II.15. ábra). A gerjesztett fotonok Poisson-eloszlást mutatnak és ennek megfelelően a fotonszám változásnak $\Delta N = N_0 - N$ nagyobbak kell lenni $\sqrt{N}$ -nél (a Poisson-eloszlás zajánál), hogy a molekula elmozdulását Δx -et mérni tudjuk. (Más szóval itt a lokalizálás pontosságáról van szó, ami a felbontást meghatározza. Később képlettel is mutatjuk). Ha nagy fluoreszcens intenzitásokkal (N_0) dolgozunk, akkor $\sqrt{N}$ is nagy lesz, következésképpen Δx is. Ha viszont az ábra jobb oldalán lévő, a MINFLUX-ra vonatkozó görbét tekintjük, amikor is a „fánk” közepén a legkisebb a fluoreszcens intenzitás ($N_0=0$), akkor már egyetlen foton megjelenése is elég a Δx meghatározásához. A fenti gondolatmenet szerint ez jóval kedvezőbb felbontáshoz vezet.

Az SMLM felbontása (R) nm

$$R \geq 2,33\sigma_{lok} = 2,33 \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

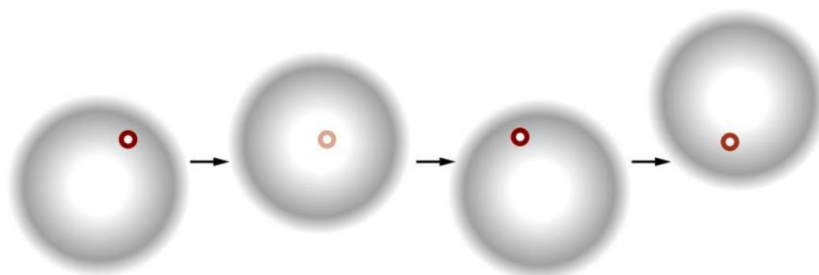
ahol

σ_{lok} – a lokalizáció pontossága,

σ – a ponteloszlási függvény (PSF) Gauss-eloszlásként modellezett képének standard deviációja (LELEK 2021).

A konvencionális lokalizációs mikroszkópiában egy-egy superfelbontású képhez több tízezer felvételt készítenek, amelyekben több százezer lokalizációt végeznek el automatikusan szoftverek segítségével (PEDDIE 2017). Ezzel szemben a MINFLUX-ban néhány száz vagy néhány ezer lokalizáció elegendő.

A MINFLUX kivitelezéséről a II.19. ábra ad információt:



II.19. ábra. MINFLUX kivitelezése. A gerjesztendő molekulát piros kör jelzi az ábrán. A gerjesztő „fánk” kétdimenziós képében a legkisebb az intenzitás a fánk közepén. Minél szürkébb a kör, annál nagyobb a gerjesztő intenzitás. A fánk körkörös mozgást végez a lokalizálandó piros molekula körül. A molekula abban a pontban van, ahol legkisebb a fluoreszcens intenzitása. Az első lépésben olyan megvilágítást (diffrakció határ felett) alkalmaznak, hogy biztos legyenek abban, hogy az adott területen van molekula és a fánk átmérőjének szűkítése csak ezután kezdődik (XIAO 2017)

A MINFLUX-hoz hasonlóan bevezették a „fánk” körkörös pásztázását a STED-be is, ennek a módszernek MINSTED lett a neve és a ~200 nm-es diffrakciós határ 100-szoros javítását érték el (WEBER 2021).

II.1. táblázat. Szuperfelbontású módszerek összehasonlítása

Típus	PALM egyedi molekulák leképezése széles látóterű kamerával	STORM egyedi molekulák leképezése széles látóterű kamerával	STED soros pásztázás konfokális detektálással, egyedi molekulák vagy molekula csoportok leképezése	MINFLUX körkörös pásztázás konfokális detektálással, egyedi molekulák leképezése
Adatfeldolgozás	lokalizáció a mérés után	lokalizáció a mérés után	nem szükséges	egyidejű lokalizáció és optimalizáció a mérések alatt
Szerves festékek	nem	igen	igen	igen
Fluoreszcens fehérjék	igen	nem	igen	igen
Élő sejtek vizsgálata	igen	nem	igen	igen
Felbontás	+++	+++	++	(szub-nanométer) ++++
Sebesség kis terepen	+	+	+++	+++++
Sebesség nagy terepen	+++	+++	++	+
A gerjesztéshez szükséges fotonok száma	nagy	nagy	közepes	nagyon kevés

A nagyszámú superfelbontású módszert fejlesztettek ki, ismertetésük egy másik könyvet igényelne. A II.1. táblázat négy jelentős superfelbontású módszerről ad jó áttekintést. (Abberior GmbH cégtől származik)

Felhívánk a figyelmet arra, hogy a PALM és a STORM abban különböznek, hogy a PALM-ban fluoreszcens festékeket használnak és ennek következtében élő sejtek vizsgálatára is alkalmas (festés genetikai módosítással). A STORM-ban ez nem áll fenn. Még egy érdekes vonás a táblázatban, hogy a MINFLUX nanométernél jobb felbontásra képes, kis terepen rendkívül gyors, ezért mozgások nyomkövetésére alkalmas és relatíve kevés foton szükséges a gerjesztésre, így a vizsgálandó mintát kíméli.

Az egyedi molekulák lokalizációs mikroszkópiájához Lelek összefoglaló cikkét ajánljuk (LELEK 2021). A fluoreszcens fehérjék superfelbontású mikroszkópiában való alkalmazására javasoljuk Nienhaus összefoglaló munkáját (NIENHAUS 2014). A fluoreszcens fehérjék jelentősége azért kiemelkedő, mert genetikai úton bevihetők a mintába és ez által a lehető legközelebb vannak a vizsgálandó molekulához.

A superfelbontású fluoreszcens krio-mikroszkópiáról a VIII.2. fejezetben írunk.

Irodalom

ABBERIOR GmbH, <https://abberior.rocks/>

BALZAROTTI, F. *et al.* (2017): Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxis, *Science* 355, 606-612.

BATES, W. M. *et al.* (2007): Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes, *Science* 317 (5845), 1749-1753.

BEGEMANN, I. *et al.* (2016): Correlative Light Electron Microscopy: Connecting Synaptic Structure and Function, *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, Vol. 8. Article 28, doi: 10.3389/fnsyn.2016.00028

CUNY, A. P. *et al.* (2022): Live cell microscopy: From image to insight, *Biophysics Rev.* 3, 021302, doi: 10.1063/5.0082799

DENK, W. *et al.* (1990): Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy, *Science*, 248, 4951, 73-76.

DUBOCHET, J. *et al.* (1982): Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions, *Journal of Microscopy* 128, (3), 219-237.

FAORO, R. *et al.* (2018): Aberration-corrected cryoimmersion light microscopy, *PNAS* 115, 6, 1204-1209.

- FUEST, M. *et al.* (2019): *In situ* Microfluidic Cryofixation for Cryo Focused Ion Beam Milling and Cryo Electron Tomography, *Scientific Reports* 9:19133, doi:10.1038/s41598-019-55413-2
- HULLEMAN, C.N. *et al.* (2018): Photon yield enhancement of red fluorophores at cryogenic temperatures, *ChemPhysChem* 10.1002/cphc.201800131
- LELEK, M. *et al.* (2021): Single-molecule localization microscopy, *Nature Reviews, Method Primers*, Article citation ID: (2021) 1:39
- MICHEVA, D. K. *et al.* (2007): Array tomography. A new tool for imaging the molecular architecture of neural circuits, *Neuron* 55 (1) 25-36.
- MICHEVA, D. K. *et al.* (2010): Array tomography: High-Resolution Three-Dimensional Immunofluorescence, *Cold Spring Harb Protoc*, doi: 10.1101/pdb.top89.
- NIENHAUS, K. *et al.* (2014): Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution, *Chem Soc Rev*, doi: 10.1039/c3cs60171d
- NIKON, The principle of stochastic optical reconstruction microscopy, <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products/super-resolution-microscopes/n-storm-super-resolution/the-principle-of-stochastic-optical-reconstruction-microscopy>, Letöltés ideje 2023. január 5.
- PEDDIE, C. J. *et al.* (2017): Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy using conventional fluorescent proteins *in vacuo*, *J Struct Biol.* 199, 2, 120-131, doi: 10.1016/j.jsb.2017.05.013.
- POZSGAI, I. (2019): A fluoreszcens mikroszkópia hagyományos és szuperfelbontású módszereinek alapjai, TYPOTEX kiadó, ISBN 978 963 493 072 3.
- SCHWARTZ, C. L. *et al.* (2007): Cryo-fluorescence microscopy facilitates correlations between light and cryo-electron microscopy and reduces the rate of photobleaching, *Journal of Microscopy* 227, 2, 98-109.
- STELZER, E. H. K, (2015): Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology, *Nature Methods*, 12 (1), 23-26.
- SWENSON, E. S. *et al.* (2009): Limitations of Green Fluorescent Protein as a Cell Lineage Marker, *STEM CELLS*, 25, 2593-2600.
- SYDOR, A. M. *et al.* (2015): Super-Resolution Microscopy: From single Molecules to supramolecular assemblies, *Trends in Cell Biology* 25 (12), 730-748.
- TEMPRINE, K. *et al.* (2015): Three-dimensional photoactivated localization microscopy with genetically expressed probes, *Methods Mol. Biol.* 1251, 231-261.
- WACKER, I. *et al.* (2013): Array tomography, *Journal of Microscopy*, doi:10.1111/jmi.12087

- WEBER, M. *et al.* (2021): MINSTED fluorescence localization and nanoscopy, *Nature Photonics*, 15, 361-366.
- XIAO, J. *et al.* (2017): Flipping nanoscopy on its head, *Science* 355, 6325, 582-584.
- ZEISS 1, Webinar in Vivo Cleared Tissue Imaging with Light Sheet Fluorescence Microscopy.mp4, <https://www.youtube.com/watch?v=vKHQudCKVGc>, Letöltés ideje: 2023. január 5.
- ZIPFEL, W. R. *et al.* (2003): Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences, *Nature biotechnology*, **21**, 11, 1369-1377.

III. Az elektronmikroszkópia, mint a CLEM másik komponense.

Ebben a fejezetben az elektronmikroszkópok (pásztázó elektronmikroszkóp (SEM), transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM), és krio-transzmissziós elektronmikroszkóp (krio-TEM)) szerepét világítjuk meg a CLEM szemszögéből. A pásztázó elektronmikroszkópiáról és a krio-elektronmikroszkópiáról magyar nyelvű tankönyv is megjelent (POZSGAI 2016, 2023).

Az elektronmikroszkópiának nagy szerepe van a biológiában, mert a fénymikroszkópiával nyerhető funkcionális információt ki tudja kiegészíteni ultrastrukturális információval. Nanométeres felbontásban mutatja például a neurális hálózatot, sejt-szervecskéket, mikrotubulusokat, mitokondriumokat, endoplazmikus retikulumokat, sejten kívüli vezikulumokat és sok minden mást.

Tudománytörténeti érdekesség: Ernst Ruska, Gerd Binnig és Heinrich Rohrer 1986-ban megosztva kapta meg a fizikai Nobel-díjat az első elektronmikroszkóp, illetve az első pásztázó alagút elektronmikroszkóp megalkotásáért; Ruskanak 55 évet kellett várni az elismerésre, míg Binnignek és Rohrernek csak 5 évet.

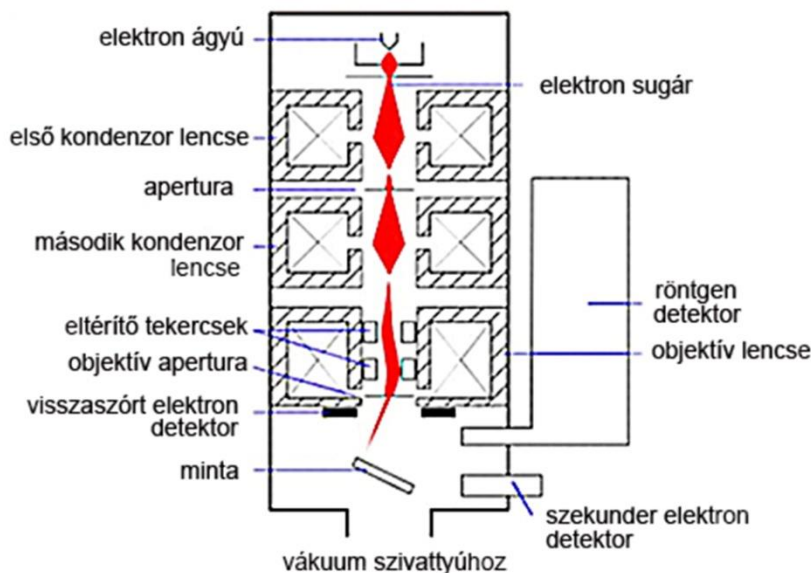
III.1. Immun-elektronmikroszkópia

Az immun-elektronmikroszkópia az immunfluoreszcens fénymikroszkópia analógja abban az értelemben, hogy ez is specifikus antigén-antitest reakción alapul, de riporter molekulaként nem fluorofórt, hanem kolloidális arany részecskéket használ az elektronmikroszkópos vizsgálatokban. Ezen arany részecskék mérete az 1–150 nm tartományba esik. A nagy rendszámú arany erősen szórja az elektronokat, ezért jól detektálható az antitesthez konjugált arany részecske az elektronmikroszkópban. Az analógiát követhetjük, ha II.5. ábrán a lilával jelölt fluorofórokat arany szemcsével helyettesítjük le. Miként az immunfluoreszcens mikroszkópiában az indirekt jelölés terjedt el, az ott felsorolt okok miatt, hasonlóképpen az indirekt jelölés használatos az immun-elektronmikroszkópiában is. A többféle fehérje egyidejűleg történő azonosítására különböző méretű arany szemcséket konjugálnak az alkalmazott többféle antitesthez.

Az immun-elektronmikroszkópiáról kitűnő áttekintést ad László Lajos a magyar nyelvű tankönyvében így annak megismétlésétől eltekintünk. (Lásd a Minta-előkészítés speciális TEM vizsgálatokra és Immuncitokémia fejezeteket, LÁSZLÓ 2012.)

III.2. Nagy-léptékű, kétdimenziós leképezés pásztázó elektronmikroszkóppal

A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM, Scanning Electron Microscope) vázlatos felépítését mutatja a III.1. ábra.



III.1. ábra. A pásztázó elektronmikroszkóp sémája

Egy modern pásztázó elektronmikroszkóp egy vizsgáló laboratóriumnak felel meg. A szekunder elektronok a minta topográfiáját mutatják, a visszaszórt elektron képek kémiai összetételi információkat tartalmaznak a visszaszórás rendszámfüggése miatt. A feltétként alkalmazott hullámhossz-diszperzív vagy energia-diszperzív detektorokkal pontos összetételi információt lehet nyerni. Még folytathatnánk a sort, de bennünket a CLEM szempontjából két másik feltét az ionsugaras mintavékonyító és a ultramikrotom fog jobban érdekelni.

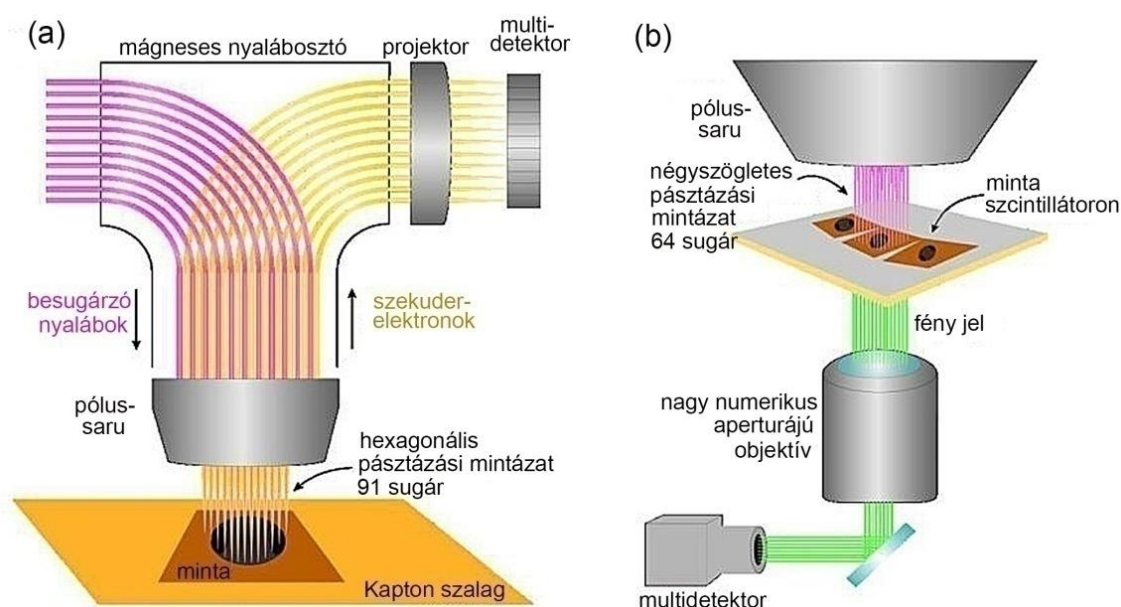
A pásztázó elektronmikroszkóp felbontását az elmúlt évtizedekben annyira feljavították (<1 nm), hogy ma már több olyan feladatot SEM-mel végeznek el, amelyet korábban csak TEM-mel lehetett.

A CLEM kapcsán meg kell ismerkednünk a kétdimenziós, nagy-léptékű (large-scale) elektronmikroszkópia, a térfogati elektronmikroszkópia (Volume EM) és a nagy adatsebességű (High-Throughput EM) elektronmikroszkópia fogalmával, tekintettel arra, hogy a fény- és elektronmikroszkóp korrelációjakor térfogatokat kell tudni összehasonlítani.

A nagy-léptékű elektronmikroszkópiában igyekszünk áthidalni a fénymikroszkópos és az elektronmikroszkópos képek látómezeje közötti különbséget úgy, hogy közben ne veszítsük el az elektronmikroszkóp nagy felbontóképességét. A SEM-mel is lehetett nagy látómezejű (kis nagyítású) képet készíteni, de ekkor fel kellett áldoznunk a fénymikroszkóphoz képest sokkal

jobb felbontást. Újabban azonban lehetséges nagy felbontású és nagy látómezejű (más néven nagy-léptékű, (angolul large-scale) SEM képek készítése ún. sok-sugaras berendezésekkel. Két példát említünk a kereskedelmi fogalomban kapható ilyen tulajdonságú pásztázó elektronmikroszkópra (III.2. a/ és b/ ábra)

A Zeiss MultiSEM 505 mikroszkóp egyidejűleg 61 párhuzamos sugárral, az 506 típus 91 sugárral dolgozik. Mindegyik sugár egy hatszögletű terepet pásztáz, a sugarak szinkronban mozognak és a végső szekunderelektron kép az egyes sugarak által előállított képek összefűzéséből áll elő. A végső nagyfelbontású kép mérete a MultiSEM 505 típusnál $108\ \mu\text{m} \times 94\ \mu\text{m}$, a MultiSEM 605 típusnál $165\ \mu\text{m} \times 143\ \mu\text{m}$. (Pixelméret $4\ \text{nm}$). A képeket a ZEN szoftver állítja össze. A nagy látóterű képekbe bele lehet zoomolni, hasonlóan a Goole Earth programhoz. Mint a III.2. a/ ábrán látható, a vizsgálandó minta kapton szalagon foglal helyet.



III.2. ábra. a/ Zeiss MultiSEM és b/ DELMIC FAST-EM többsugaras pásztázó elektronmikroszkópok (KIEVITS 2022)

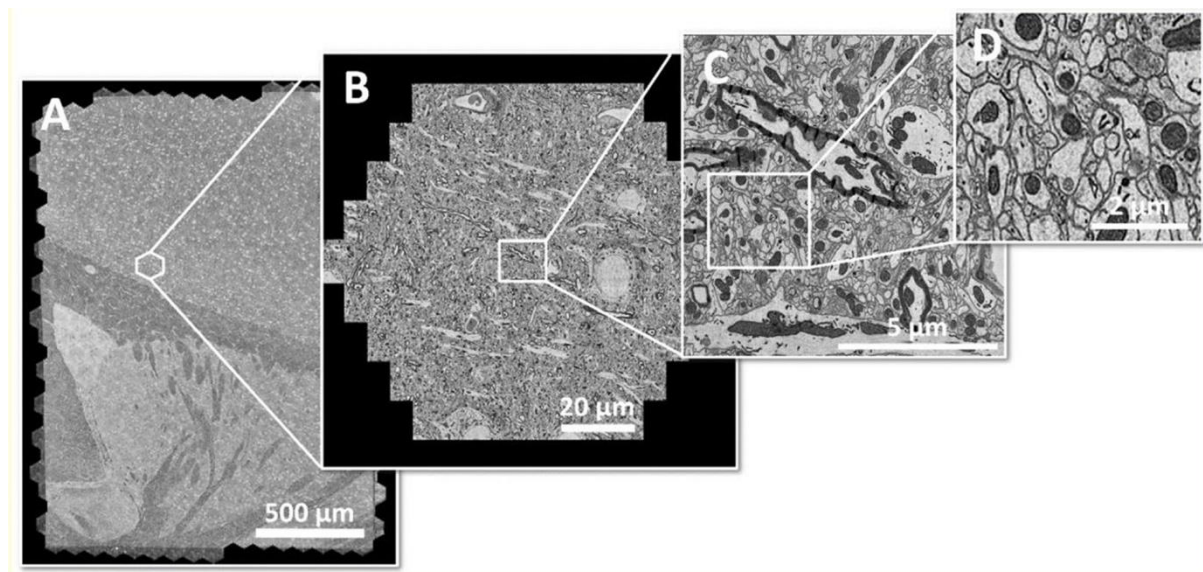
A III.2. b/ábrán látható FAST-EM tulajdonképpen egy olyan jól automatizált transzmissziós üzemmódú SEM, amely százszor gyorsabban működik, mint egy konvencionális SEM. 64 elektron sugárral működik és téglalap alakú területeket pásztáz. Az elektron jeleket szcintillátor segítségével fénné alakítják át és a fényt egy multidetektor detektálja. A végső kép itt is az egyes elektronsugarak által felvett képek összefűzéséből áll össze.

A III.3. ábrán egér agyáról Zeiss MultiSEM 505-tel készült felvételeket mutatunk be. A teljes kép (A ábra) mintegy $3\ \text{mm}^2$ területet fed be és 290 GB méretű. 492 darab olyan

hexagonális képből áll, amilyen a (B) ábrán látható. A MultiSEM-re a térfogati elektronmikroszkópiánál és a nagy-adatsebességű SEM-nél még visszatérünk.

Egysugaras pásztázó elektronmikroszkópok is képesek nagy léptékű képeket előállítani pl. a Thermo Scientific cég Apreo VS mikroszkópja.

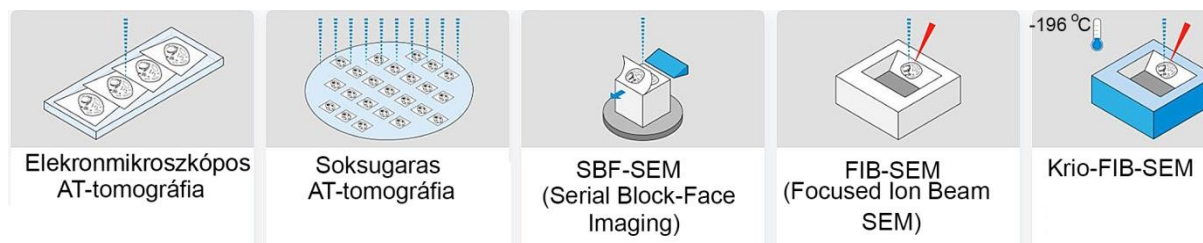
Amikor az elektronmikroszkópiát metszetkészítéssel kombináljuk és nem két-dimenziós, hanem háromdimenziós képeket állítunk elő, akkor térfogati elektronmikroszkópiáról beszélünk.



III. 3. ábra. Példa nagy-léptékű pásztázó elektronmikroszkópos leképezésre, amely a Zeiss MultiSEM 505 készülékével készült egér agyi metszetén (EBERLE 2018)

III.3. Térfogati elektronmikroszkópia (Volume EM)

A III.4. ábra a térfogati elektronmikroszkópia leggyakrabban használt módszereit mutatja sematikus.

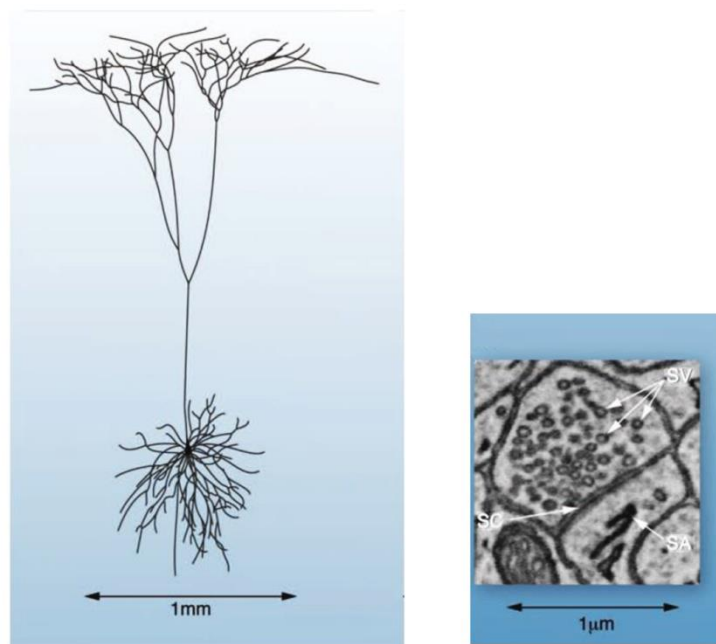


III.4. ábra. A térfogati elektronmikroszkópia módszerei (ZEISS 2)

A kék szaggatott vonalak az elektronsugarat, a pirosak a mintavékonyító ionsugarat jelzik. A középső ábrán pedig a pásztázó elektronmikroszkópba beépített ultramikrotom késére történik utalás.

A térfogati elektronmikroszkópia meglehetősen új terület, mint azt Peddie 2014 cikkének címe sugallja: „A térfogati elektronmikroszkópia nagykorúvá vált.” (PEDDIE 2014). A térfogati elektronmikroszkópiában SEM-et és TEM-et egyaránt alkalmaznak.

A térfogati EM szükségességét érzékelteti Lichtman egy képsorozattal, mely szerint az agy és a szinapszisok közötti méretkülönbség hat nagyságrendet ölel fel (LICHTMAN 2011). Ábraszorozatából kettőt kiragadva (III.5. ábra) azt mutatjuk, hogy az idegsejt és a szinapszisok mérete között három nagyságrend különbség van.



III.5. ábra. Idegsejt és szinapszis közötti méretkülönbség. (SV – szinaptikus vezikulum, SC – szinapszis rés) (LICHTMAN 2011)

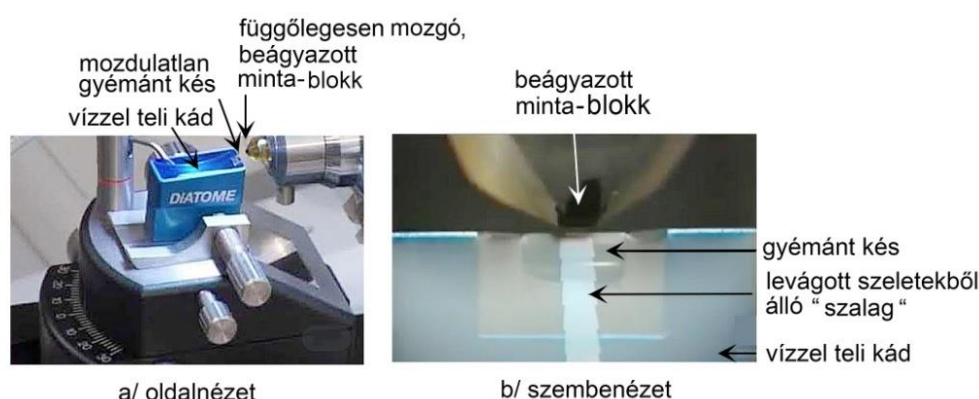
A térfogati elektronmikroszkópia fontosságára utalunk a következő adatokkal. Amikor az emberi agy idegi összeköttetései feltérképezését elkezdték (mindössze 1 mm³ anyagról van szó) 61 sugaras Zeiss MultiSEM 505 elektronmikroszkópot használtak (SHAPSON-COE 2021). Az 5000 darab 30 nm-es vastagságú metszetről készült képek mérete 1,4 petabájt (1,4 millió gigabájt) tett ki, ami a teljes konnektom elkészítéséhez szükséges adatmennyiség egy milliomod része.

Bár a III.4. ábrán nem történik utalás a kevésbé modern ssTEM-re, mint térfogati elektronmikroszkópos módszerre, tárgyalásunkat mégis ezzel kezdjük.

III.3.1. ssTEM (serial section TEM, sorozat-metszeteken végzett transzmissziós elektronmikroszkópia)

Az alább taglalt módszer a legrégebbi, ezért meghagytuk az eredeti ssTEM elnevezését.

A sorozat-metszet készítés biológiai mintákból, majd azt követő TEM vizsgálat az 1950-es évekre nyúlik vissza. Jó minőségű gyémánt késsel ellátott ultramikrotómmal szeletelik fel a mintát. A vízfürdő felszínéről manuálisan halásszák le a metszeteket és a 2D TEM képek sorozatából rekonstruálják a 3D objektumot (SJÖSTRAND 1956, STEVENS 1980). Az ssTEM nagy gyakorlatot igényel, meglehetősen időigényes és sok műtermék forrása lehet: a metszetek zsugorodhatnak, kitágulhatnak, vagy hiányozhatnak a sorozatból (WHITE 1986).



III.6. ábra. Leica UC7 ultramikrotom Diatome gyémánt késsel a/ oldalnézet b/ szembenézet, amely a gyémánt késről leváló szeletekből álló „szalagot” mutatja

(<https://www.youtube.com/watch?v=Hx8CcYMHkA>)

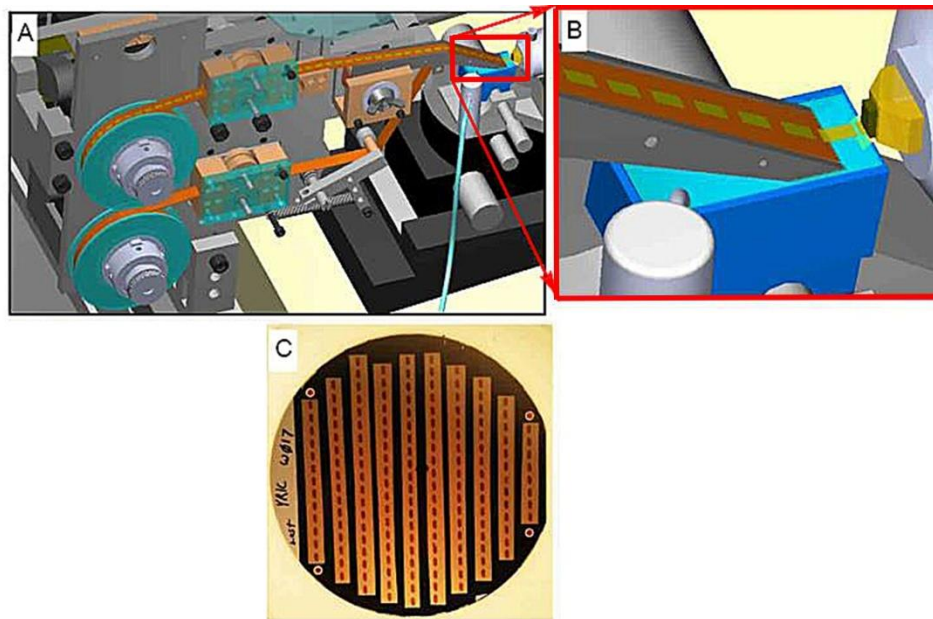
III.3.2. Elektronmikroszkópos AT-tomográfia

Az AT-tomográfiát (Array Tomography) illetve annak fluoreszcens változatát már említettük a II.2.1. fejezetben. Az elektronmikroszkópos AT-tomográfiához az elkészített metszet-sorozatokat („szalagokat”) rögzítik átlátszó és elektromosan vezető indium-ónoxid (ITO) filmmel bevont üveg fedőlemezekre vagy szilícium lapkákra (wafer). Ezt követi a SEM-ben történő automatizált leképezés (WACKER 2013). A másik lehetőség, hogy a metszetek mikrostélyra kerülnek és TEM-mel vizsgálják őket. A SEM vizsgálat automatizált és kevésbé munkaigényes, mint a TEM-re való preparálás.

III.3.3. Soksugaras elektronmikroszkópos AT-tomográfia

A III.4. ábrán balról a második kép a soksugaras AT-tomográfiára vonatkozik. Olyan soksugaras pásztázó elektronmikroszkópot alkalmaznak a vizsgálatokhoz, mint amilyenek a III.2. ábrán láthatók. Ezek használatát az teszi szükségessé, hogy olyan nagy számú mintát kell összegyűjteni, leképezni és analizálni, hogy egy konvencionális mikroszkóppal a vizsgálatok elfogadhatatlanul hosszú időt vennének igénybe. (pl. 1 mm³ agy vizsgálata éveket vehet igénybe LICHTMANN 2011, SHAPSON-COE 2021). A soksugaras SEM-en kívül a metszetek

gyűjtését is automatizálják. Az ATUM mikrotomból (Automated Tape Collecting Ultramicrotome) a metszeteket kapton futószalagon gyűjtik össze, majd a szalagok szilícium lapkán kerülnek rögzítésre és ezek kerülnek be a SEM-be vizsgálatra (III.7. ábra) (SCHALEK 2012, HAYWORTH 2014). A fejlesztés motívációja a neurális hálózatnak nagy térfogatban és nagy felbontásban történő feltérképezése volt. Humán agy-vizsgálatokhoz (SHAPSON-COE 2021) is ATUM mikrotomot használtak sok-sugaras SEM vizsgálattal kombinálva.



III.7. ábra. Automatikus metszet-gyűjtés (ATUM) szénrel bevont kapton szalagon az ultramikrotomból (A és B), majd a szalagok rögzítése szilícium lapkán (C) (HAYWORTH 2014)

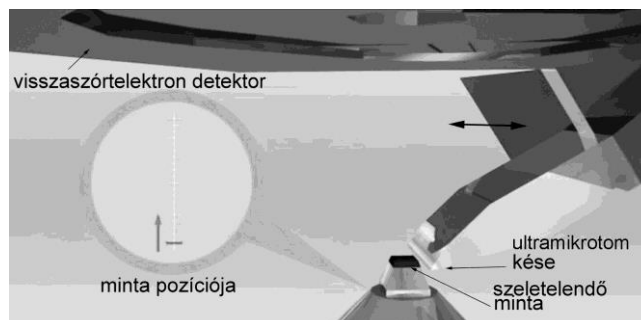
Az agy vizsgálatának területén végbement nagy fejlődés okaként a szerzők soksugaras SEM-et jelölik meg és a mesterséges intelligencia alkalmazását a képfeldolgozásban és analízisben.

Az ATUM részletes leírását megtaláljuk Baena és munkatársai közleményében (BAENA 2019).

III.3.4. SBF-SEM, (Serial Block-Face SEM, blokk-felszín sorozatos metszése és leképezése pásztázó elektronmikroszkópban)

Az SBF-SEM az 1980-as évektől ismeretes eljárás, amikor is az ultramikrotomot a pásztázó elektronmikroszkópba építették be (LEIGHTON 1981). Jelentősége tovább nőtt a téremissziós katódú pásztázó elektronmikroszkóp (FE-SEM, Field Emission SEM) kifejlesztése után (JOY 1991). Az ssTEM-től eltérően itt nem a levágott szeletek kerülnek vizsgálatra, hanem a vágás után megmaradt (beágyazott) minta-felszín (block-face). Minden metszést automatikusan

leképezés követ (slice and view) és ezekből a képekből történik a számítógépes háromdimenziós rekonstrukció.



III.8. ábra. Ultramikrotommal felszerelt pásztázó elektronmikroszkóp (SBF-SEM)

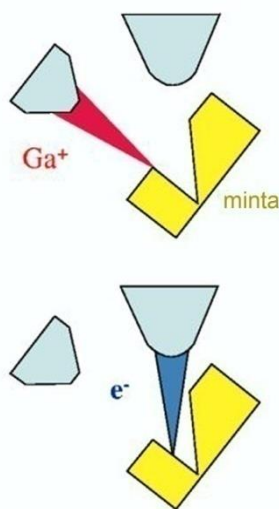
Jó példa a SBF-SEM-re a Gatan cég 3View, és a ThermoFisher Scientific cég Volumescope SEM elnevezésű elektronmikroszkópjai. A mintatérben a nyomás változtatható, az elektronokkal létrehozott ionok csökkentik a gyantába beágyazott minta elektromos feltöltődését. Ugyancsak a feltöltődés csökkentésére alacsony gyorsító feszültségen dolgoznak. Az említett metszés-képkészítés cikluson kívül választható lehetőség van arra, hogy minden egyes metszés után automatikusan több különböző nagyítású képet készítsünk. Továbbá lehetséges minden egyes metszés után több képből álló montázst készíteni. A végül pedig a számítógép 2D képekből 3D képeket rekonstruál.

A Zeiss Volutome-ja olyan hardware, amelyet a Zeiss GeminiSEM vagy SIGMA elektronmikroszkópokba építve SBF-SEM-et kapunk. Újdonság, hogy a minta elektromos feltöltődésének elkerülésére a nyomást nem az egész vákuumtérben, hanem csak a minta közvetlen közelében növelik meg nitrogén gáz beeresztésével a Focal Charge Compensation szabadalom alapján. A képek felvételétől kezdve a 3D animációig mindent automatikusan, szoftveres úton végeznek a Zeiss ZEN core-ral. A visszaszórt elektronképek felvételéhez 2 kV-nál alacsonyabb gyorsító feszültséget állítanak be.

III.3.5. FIB-SEM (Fókuszált ionsugárral kombinált pásztázó elektronmikroszkóp)

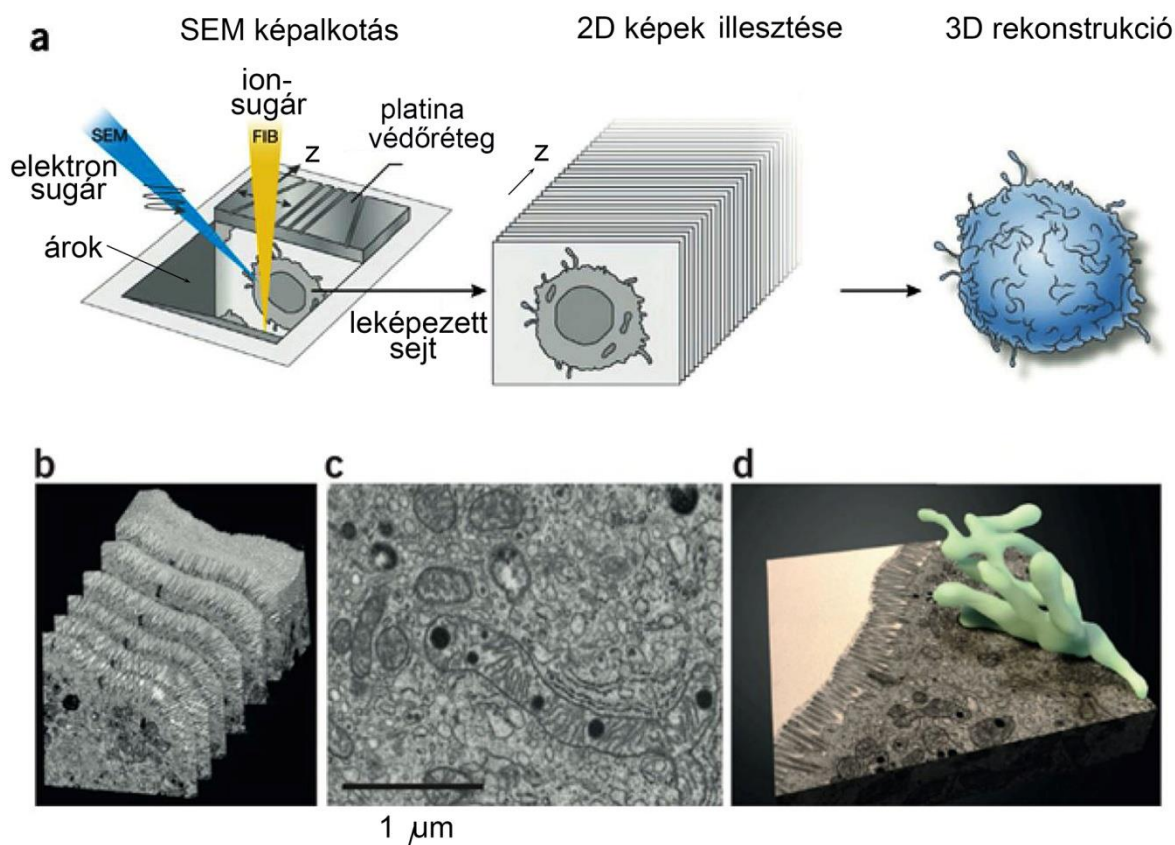
A következő minta-szeletelési lehetőség a fókuszált ionnyalábbal (FIB, Focused Ion Beam) történő maratás, mintavékonyítás (angolul ion milling) a pásztázó elektronmikroszkópban. A módszer az anyagtudományból került át a biológiába. Gallium ionnyalábbal eltávolítanak (elporlasztanak) a gyantába ágyazott minta felületéről egy vékony réteget (amelyek vastagsága jellemző módon az 5 nm és 100 nm közötti tartományba esik) és a frissen képződött mintafelszín képezik le. Újabb maratást újabb automatikus leképezés követ. A képsorozatból számítógépes úton történik a 3D rekonstrukció. Az elektronnyaláb és az ionsugár általában

52°–54°-os szöget zár be, de vannak olyan berendezések, ahol ez a szög 90°. A FIB-SEM-et gyakran Dual Beam SEM-ként említik a szakirodalomban (III.9. ábra). A FIB-SEM-ről sok alapvető információt találunk pl. Narayan és Baena közleményében (NARAYAN 2015, BAENA 2021), videóval ellátott protokolt viszont Knott cikkében találunk (KNOTT 2011). A FIB-SEM mélységi (z-irányú) felbontása jobb, mint a ultramikrotomos vágással működő SBF-SEM-é, kevesebb a keletkező műtermék és további előnye, hogy izotróp 3D-rekonstrukciót tesz lehetővé. Hátránya a porlasztás lassúsága az SBF-SEM szeleteléséhez képest. A FIB-SEM sebessége megnövelhető, ha gallium ionnyaláb helyett valamilyen gázból (pl. oxigén, argon stb.) plazmasugarat állítanak elő és azzal végzik a porlasztást.



III.9. ábra. Fókuszált ionsugárral működő kétsugaras pásztázó elektronmikroszkóp (FIB-SEM) sémája. A Ga ionsugárral porlasztott felületet vizsgálják elektronnyalábbal. Ahhoz, hogy az elektronnyaláb „lássa” a vizsgálandó felületet, előbb egy árkot kell készíteni a mintában. A minta döntése az ionsugárral való leképezéshez is lehetőséget ad (HEYMANN 2006)

A FIB-SEM képkészítést majd az azt követő háromdimenziós rekonstrukciót szemléletesen mutatja a III.10. ábra.



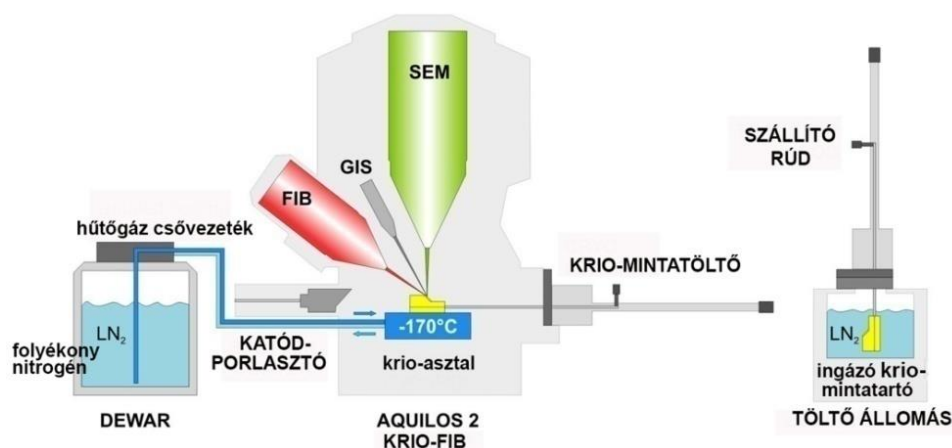
III. 10. ábra. Egér-bélen készített FIB-SEM képek és 3D rekonstrukció. A sárgával jelzett gallium ionsugár elmetszi a mintát. A keletkezett felületet azért látja az elektron sugár, mert előtte árkok készültek. A minta egy részét platina réteg fedi, ami védi a gallium nyalábtól. A vágási folyamat *z* irányban halad előre. A b/, c/ és d/ ábra az a/ ábrán látható séma megvalósítását mutatja. A d/ ábrán egy szétágazó mitokondrium szegmentált képe látható (HARTNELL 2016)

III.3.5.1. Krio-FIB-SEM

A fókuszált ionnyaláb nemcsak gyantába beágyazott, hanem fagyasztott minták vékonyítására is alkalmas (krio-FIB-SEM). Ehhez azt kellett bizonyítani, hogy a gallium ionnyaláb nem emeli a minták hőmérsékletét $-137\text{ }^{\circ}\text{C}$ fölé, amikor az amorf jég kristályos jéggé válik (MARKO 2006). Az amorf jég kristályosodása károsítaná a vizsgálandó biológiai minta szerkezetét. A krio-FIB-SEM-et vázlatosan a III.11. ábra mutatja (KUBA 2021). A SEM a maratás után maradt felületet képezi le, hasonlóan a SBF-SEM-hez.

A berendezéssel vékony ($<200\text{ nm}$) lamellák is készíthetők fagyasztott biológiai mintákból krio-TEM vizsgálatokhoz és krio-elektron tomográfiához (III.12. ábra). Ezekre igény van amiatt, hogy a FIB a lehető legkevesebb műterméket produkálja szeleteléskor a többi módszerhez viszonyítva és a krio-TEM biztosítja a legjobb felbontóképességet ($\sim 0,15\text{ nm}$). (A szférikus aberrációra korrigált TEM felbontása $0,05\text{ nm}$ is lehet nem biológiai mintákon).

Az ábrán jelzett katódporlasztó berendezéssel vékony vezető platina réteget visznek fel a minta felületére, az elektromos feltöltődésének elkerülésére. A gázbeeresztő rendszerrel (GIS, Gas Injection System) viszont vastag platina réteget visznek a minta felszínére az ionmaratás (milling) megkezdése előtt, hogy a minta ne károsodjon.



III.11. ábra. A krio-FIB-SEM vázlatosan (KUBA 2021)

A korrelatív vizsgálatokkor visszatérünk a krio-FIB-SEM-nek a fluoreszcens vizsgálatokkal való összekapcsolására (VIII.1. fejezet).

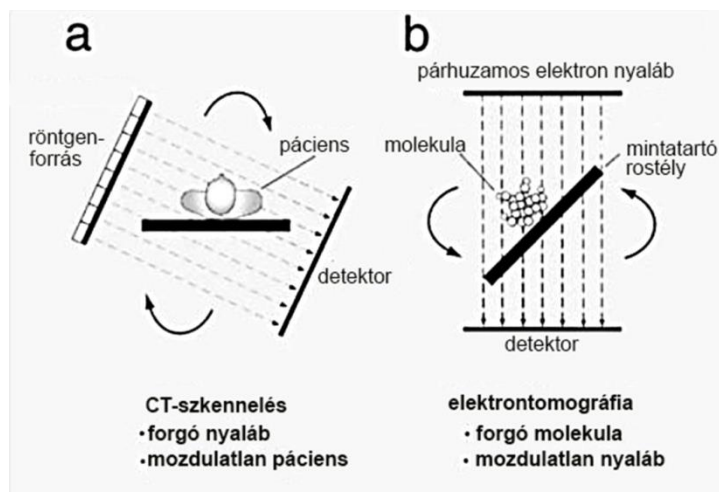
III.3.5.2. PFIB-SEM (Plazmasugaras vékonyítás a pásztázó elektronmikroszkópban)

A 2022-es esztendő óta van kereskedelmi forgalomban plazmasugaras PFIB-SEM (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/electron-microscopy/products/dualbeam-fib-sem-microscopes/helios-5-pfib-dualbeam.html>). A gallium ionsugarat valamilyen gázból (Xe, Ar, O) előállított fókuszált ionsugár helyettesíti. A PFB-SEM-ben az ionsugár átmérője és a porlasztási sebesség is nagyobb, mint a gallium sugaras FIB-SEM-ben. További előnye, hogy a vékonyítandó mintába nem implantálódnak gallium ionok. A PFIB-SEM krio-hőmérsékleten működik, nincs szükség a minta beágyazására. A Thermo Scientific Artic Cryo-Plasma FIB-SEM-jébe fluoreszcens fénymikroszkóp is be van építve, így CLEM-re is alkalmas (THERMO SCIENTIFIC).

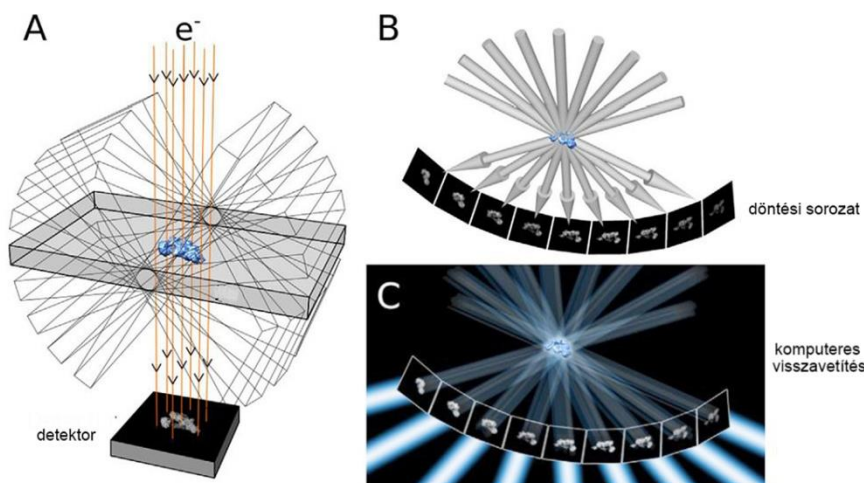
III.3.6. Elektrontomográfia

A térfogati elektronmikroszkópia eddig ismertetett módszerei valós metszetkészítésen alapulnak, szemben az elektrontomográfiával, ahol a vékony mintán csak optikai metszés van. A hétköznapiakban a CT, a kórházi komputertomográfia (angolul computerized tomography,) révén találkozunk az elektrontomográfiával analóg módszerrel. CT kép felvételekor mozgó röntgenforrással készítenek kétdimenziós képeket nyugalmi helyzetben lévő páciensről és a 2D

képekből háromdimenziós képet rekonstruálnak. Az elektrontomográfia kis túlzással a CT mikroszkópikus változata, amely elektronokkal történik a TEM-ben, és a vizsgálandó minta beesési szögét változtatják az álló elektron nyalábhoz képest. Az így felvett képsorozatból rekonstruálják a minta háromdimenziós képét. A 3D rekonstrukció matematikai alapjait még a múlt században vetették meg (RADON 1917).



III.12. ábra Az orvosi röntgen komputertomográfia hasonlósága az elektrontomográfiával (FRANK 2006)



III.13. ábra. Az elektrontomográfia elve sematikusán. A. Az elektronokra átlászó minta döntésekor vetületek sorozatát készítjük. B. A döntéskor előálló képsorozat. C. A háromdimenziós kép rekonstruálása komputeres visszavetítés módszerével (KONING 2018)

Az elektrontomográfia hátránya, hogy 300 nm-nél vastagabb mintákra nem alkalmazható.

III.3.7. A térfogati elektronmikroszkópia módszereinek összehasonlítása

Az SBF-SEM és a FIB-SEM összehasonlításakor azt kell figyelembe vennünk, hogy ha viszonylag nagy térfogatok vizsgálatára van igény, akkor az SBF-SEM- részesítik et előnybe 25–200 nm-es szeletei miatt. Azonos idő alatt vastagabb réteget lehet eltávolítani a mikrotómmal, mint a gallium ionsugárral. Viszont, ha nagy mélységi felbontásra, azaz nagyon vékony rétegek eltávolítására van szükség, akkor a FIB-SEM előnyösebb (3–10 nm). A FIB-SEM adja a legjobb mélységi felbontást és a felbontása izotróp. A sorozat-metszetekkel dolgozó módszerek (ssTEM, AT-tomográfia, ATUM-SEM) előnye az SBF-SEM-hez és FIB-SEM-hez képest az, hogy a levágott metszetek megőrizhetők és újra vizsgálhatók. Az ssTEM gyakorlati nehézségeit már említettük, az AT-tomográfiával viszont nem lehet olyan jó mélységi felbontást elérni, mint a SBF-SEM-mel és a FIB-SEM-mel.

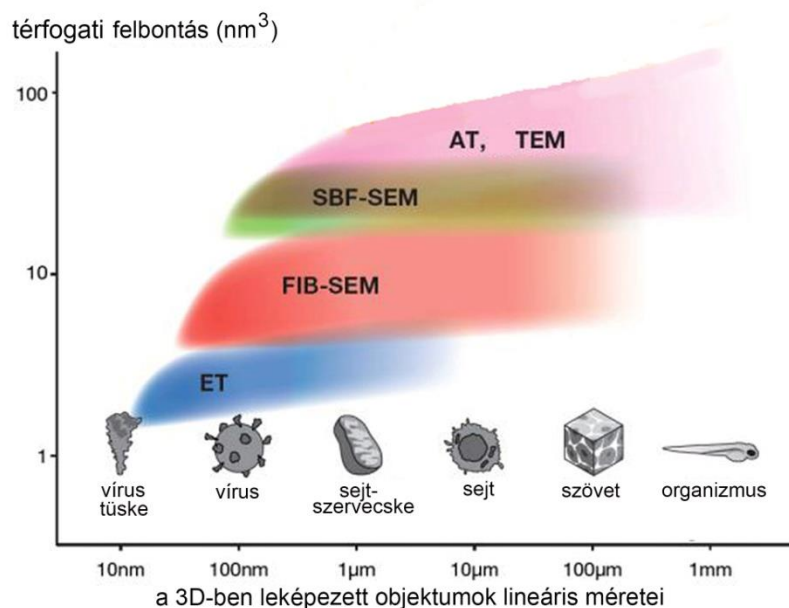
A térfogati elektronmikroszkópia eddig ismertetett módszereit összehasonlítjuk a III.1. táblázatban a laterális, axiális és térfogati felbontás szempontjából.

III.1. táblázat, (KIEVITS 2022)

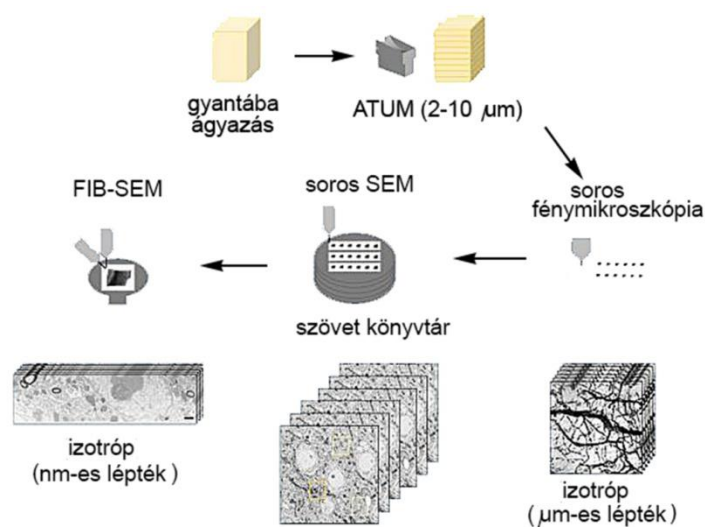
Módszer	Tipikus felbontás		térfogati (μm^3)
	x-y irányban (nm)	z- irányban (nm)	
Sorozat-metszet TEM (ssTEM)	4	50	$10^3\text{--}10^4$
SBF-SEM, (Serial block-face SEM)	10	30	$10^5\text{--}10^7$
FIB-SEM (Fókuszált ionsugaras SEM)	5	5	$10^2\text{--}10^5$
AT-tomográfia (Array tomography)	4	30, 60	$10^4\text{--}10^6$
ATUM-SEM	rugalmas	60	$10^7\text{--}10^{10}$
Elektron tomográfia	2–10	2–10	$10^2\text{--}10^3$

A III.1. táblázathoz hasonló információt mutat a III.14. ábra is, amelyet a szemléletessége miatt érdemes megmutatni. Az ábra szerzője (BAENA 2021) megjegyzi, hogy a FIB-SEM egy fontos hézagot tölt be a többi térfogati elektronmikroszkópos módszer között.

Bár a III.1. táblázatból és a III.14. ábrából sem látszik, de azok megjelenése előtt Kislinger kidolgozott egy ATUM-FIB-nek nevezett hibrid eljárást (KISLINGER 2020). Ebben az eljárásban az első lépésben fél-vastag metszeteket (2–10 μm) állítanak elő ATUM-mal (III.7. ábra), majd egy második lépésben ezeket FIB-SEM-ben 5 x 5 x 5 nm-re vékonyítják. Az eljárás előnye, hogy a fél-vastag metszeteket fénymikroszkópos és SEM vizsgálatnak vetik alá, mintegy metszet-könyvtárat készítve, amelyből kiválasztják, mely metszeteket vékonyítják tovább FIB-SEM-mel.



III.14. ábra. A térfogati elektronmikroszkópos módszerek összehasonlítása térfogati felbontás szempontjából (BAENA 2021)



III.15. ábra. Az ATUM-FIB folyamata (KISLINGER 2020)

III.3.8. Gyors adatátvitelű elektronmikroszkópia

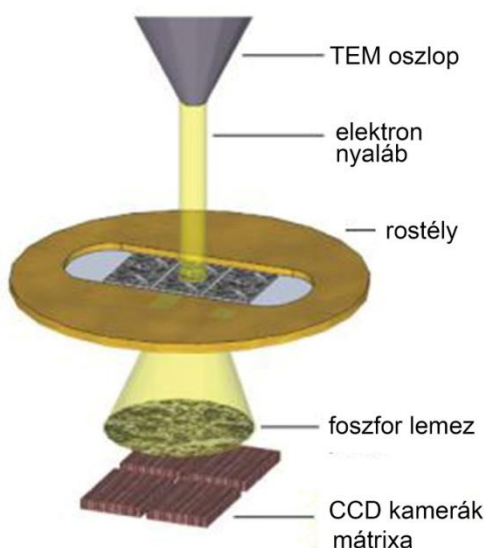
Számos mérésnek korlátot szab a biológiai elektronmikroszkópiában a végrehajtás ideje. Különösen igaz ez a neurobiológiára és a sejtbiológiára. Ha egy mérés hónapokig vagy évekig eltart (EBERLE 2018), akkor az a közel múltig kivitelezhetetlen volt. A gyors adatátvitelű elektronmikroszkópia (angolul high-throughput electron microscopy) alatt azt értjük, hogy a mikroszkóp sok sugár és automatizálás révén nagy mintatérfogatot nagy felbontásban, elfogadható idő alatt leképez, raktároz és feldolgoz. A nagy-léptékű és térfogati

elektronmikroszkópiát már fentebb tárgyaltuk, de a gyors adatátvitelhez szükség van többek között még automatizálásra is. Például a ZEISS MultiSEM a hét minden napján, napi 24 órán keresztül, emberi beavatkozás nélkül végezi a mérést! A soksugaras mikroszkópok az adatok felvételének sebességét növelik, de szükség van stabilitásra és valós időben történő kiértékelésre is.

A Delmic a zebrahal neurális hálózatának vizsgálatát (HILDEBRAND 2017) elemezve arra a következtetésre jutott, hogy míg egy normál sebességű pásztázó elektronmikroszkóp (5 megapixel/sec) 18000 metszetet 650 nap alatt tudta volna leképezni, addig a Delmic FAST-EM gyors adatátviteli mikroszkópja ezt százszor gyorsabban el tudta volna végezni ugyanolyan felbontásban (4 nm). (Delmic FAST-EM). A Zeiss MultiSEM 506-ra 1 terapixel/ óra (azaz 280 megapixel/sec) adatgyűjtési sebességet adnak meg 3,5 nm-es felbontásra. (ZEISS MULTISEM 505/506)

Transmissziós elektronmikroszkópokat is alakítottak át gyors adatátvitelre (YIN 2020). Hat TEM-et működtettek párhuzamosan a hét minden napján, napi 24 órában, egyenként 600 megapixel/sec adatgyűjtési sebességgel. (Járulékos műveleteket pl. asztalmozgatást is figyelembe véve egy-egy mikroszkóp adatgyűjtési nettó sebessége 100 megapixel/sec.) Így 2 petabájt (2 millió gigabájt) adatot gyűjtöttek be egér neokortexének $\sim 1 \text{ mm}^3$ -jéről rövidebb mint 6 hónap alatt.

A projekt piTEAM néven ismeretes (Parallel Imaging using Transmission Electron Automated Microscopy) és a mikroszkópok TEMCA (Transmission Electron Microscope Camera Array) típusúak voltak (BOCK 2011), amelyek sémáját a III.16. ábra mutatja:



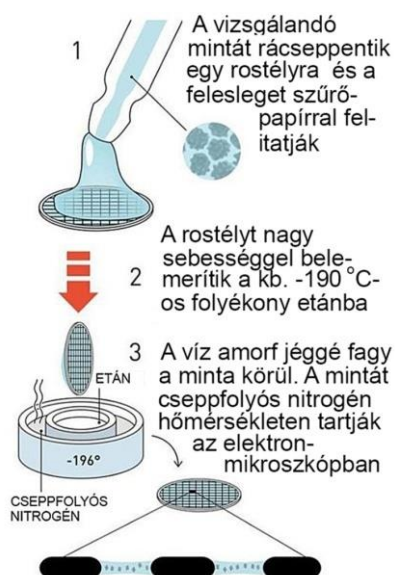
III.16. ábra. A CCD kamerákból alkotott mátrix párhuzamos detektálást biztosít a TEMCA rendszerben (BRIGGMAN 2012)

Mint a III.16. ábrán látható a mikroszkópos rostély egy lyukú és a szcintillátor lemezen létrejött képeket négy nagy sebességű CCD kamerából álló multidetektor detektálja.

A fenti szám adatok csak a műszerezettség fejlettség szintjének érzékeltetésére szolgálnak és a technika fejlődésével gyorsan változnak.

III.3.9. Krio-transzmissziós elektronmikroszkópia és krio-elektromtomográfia

A krio-elektronmikroszkópia alapjait Jacques Dubochet felfedezése vetette meg. Felismerte, hogy a biológiai minták igen gyors lehűtéssel (plunge freezing) úgy fagyaszthatók meg, hogy a bennük lévő víz amorf formában fagy meg, ami nem roncsolja a mintákat, mint a kristályos jég (DUBOCHET 1982). A krio-elektronmikroszkópia kifejlesztéséért és az oldatban lévő biomolekulák nagyfelbontású szerkezetmeghatározásáért Jacques Dubochet, Richard Henderson és Joachim Frank 2017-ben kémiai Nobel-díjat kapott.

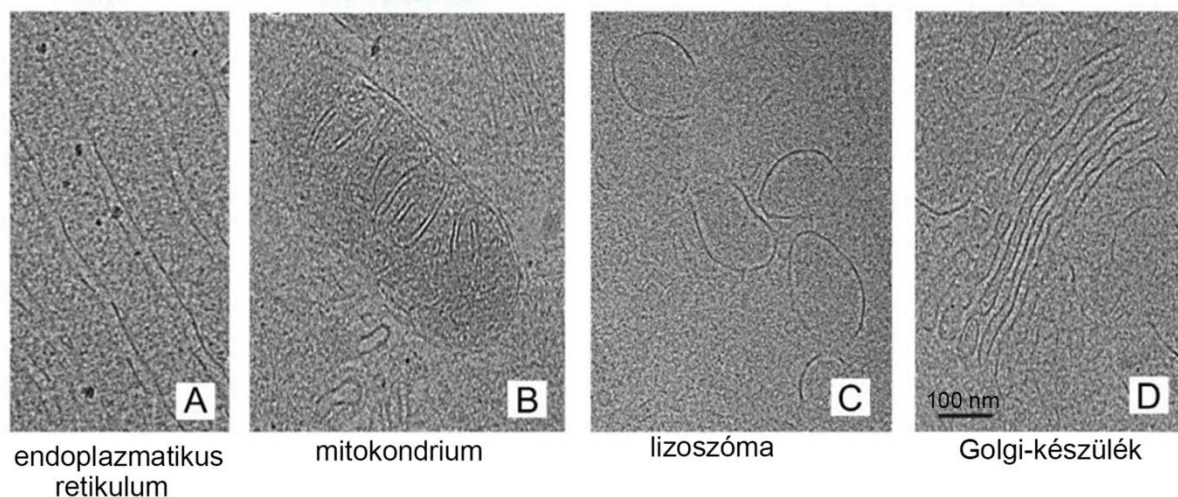


III.17. ábra. Az ultragyors merítéses fagyasztás (*plunge freezing*) sémája (KÉMIAI NOBEL-DÍJ 2017)

Az ultragyors merítéses fagyasztás sémáját mutatja a III.17. ábra. A felfedezés nagy hatással volt a biológiai minták elektronmikroszkópiájára, mert a mintákat hidratált formában, közel natív állapotban lehetett megőrizni. Márpedig a sejtek víztartalma elérheti a 70%-ot is.

A gyors fagyasztáson túlmenően a siker fontos tényezője volt a direkt elektron detektorok (Direct Electron Detectors, DED) kifejlesztése. Ez a detektortípus nem állít elő elektronokból fényt, majd a fényből ismét elektronokat, mint a CCD kamerák, hanem közvetlenül detektálja az elektronokat. Jelentősen javította a képekben a jel/zaj viszonyt a korábbi detektortípusokhoz képest, ezáltal hozzájárult a felbontóképesség javulásához. Jelenleg már atomi felbontás érhető el krio-EM-mel. A 2020-ban felállított felbontási rekord 1,25 angström (YIP 2020).

A krio-TEM a konvencionális TEM-től a képalkotás mechanizmusában is eltér. Míg a konvencionális TEM-re a (festés miatti) amplitúdó-kontraszt, addig a krio-TEM-re a fáziskontraszt jellemző. A III.18. ábrán néhány sejtalkotó krio-TEM képe látható.



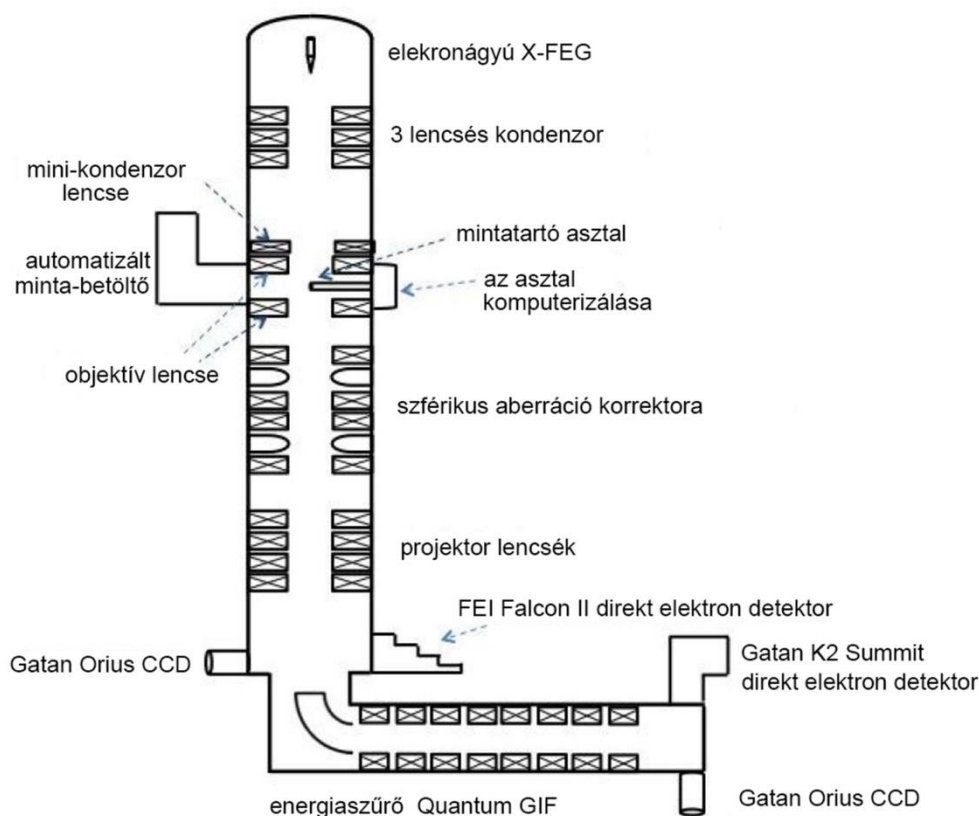
III.18. ábra. *Néhány sejtalkotó krio-TEM képe (BOS 2014)*

A krio-EM, mint a röntgenkristallográfia alternatívája a biomolekulák szerkezetének 3D meghatározásában különösen népszerűvé vált a direkt detektorok 2013 utáni elterjedését követően. A fehérjék szerkezetét az elmúlt 60 évben röntgensugarakkal tanulmányozták, amihez a fehérjéket ki kellett kristályosítani. Azonban sok fehérje nehezen vagy egyáltalán nem kristályosítható. Ez motíválta a krio-elektronmikroszkópos fejlesztéseket, tekintettel arra, hogy a krio-EM-hez nem szükséges, hogy a vizsgálandó minta kristályos legyen.

A COVID-19 járvány idején a SARS-CoV-2 vírus szerkezetét először krio-TEM-mel határozták meg és a következő három publikáció ebben a témában szintén krio-TEM-es volt (WRAPP 2020, LIU 2020, WALLS 2020, YAN 2020).

A krio-EM-re példaként bemutatjuk a 300 kV-os gyorsító feszültségű Titan Krios elektronmikroszkópot (III.19. ábra).

A Titan Krios krio-TEM nemcsak a komputerizált hűthető mintatartójával tér el a konvencionális TEM-től, hanem abban is, hogy szférikus aberrációra van korrigálva a rendszer, kettő helyett három kondenzor lencséje van és direkt elektron detektorokkal van felszerelve. Sajnos egy krio-TEM ára 7–8 millió US dollár, a hozzá szükséges infrastruktúra kiépítése és a mikroszkóp működtetése is nagyon költséges. Ezért több helyen vannak olyan központok (Európában is), ahova a biológusok elviszik a feladatot és jól képzett szakemberek segédkeznek a krio-elektronmikroszkópos mérések kivitelezésében. Hazánkban is folyamatban van egy krio-EM beszerzése a Richter Gedeon RT és a Pécsi Tudományegyetem összefogásában.



III.19. ábra. Titan Krios 1 krio-elektronmikroszkóp sémája (THERMO FISHER SCIENTIFIC 2)

A 10 μm -nél vékonyabb mintákat ultra gyors bemerítéssel, a 10–200 μm tartományba esőket nagynyomású fagyasztással készítik elő. A kereskedelmi forgalomban kapható nagynyomású fagyasztókban 200–210 MPa nyomáson a mintát két oldalról cseppfolyós nitrogén sugárral hűtik. A minták metszése krio-mikrotommal történik $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatti hőmérsékleten.

A dönthető mintatartó miatt a szobahőmérsékletű elektrontomográfiához hasonlóan krio-hőmérsékleten is végezhető metszeteken. A krio-elektrontomográfia (krio-ET) gyakran az utolsó lépése a krio-CLEM-nek. A krio-elektronmikroszkópiáról még a VIII. 3. fejezetben írunk.

Irodalom

BAENA, V. *et al.* (2019): Serial-section electron microscopy using automated tape-collecting ultramicrotome (ATUM), *Methods in Cell Biology*, Vol. 152, ISSN 0091-679X, doi: 10.1016/bs.mcb.2019.04.004.

- BAENA, V. *et al.* (2021): FIB-SEM as a Volume Electron Microscopy Approach to Study Cellular Architectures in SARS-CoV-2 and Other Viral Infections: A Practical Primer for a Virologist, *Viruses*, 13, 611. doi: 10.3390/v13040611.
- BOCK, D. *et al.* (2011): Network anatomy and *in vivo* physiology of visual cortex neurons, *Nature* 471 (7337), 177-182. doi: 10.1038/nature09802.
- BOS, E. *et al.* (2014): Vitrification of Tokuyasu-style immuno-labelled sections for correlative cryo light microscopy and cryo electron tomography, *Journal of Structural Biology* 186, 273-282.
- BRIGGMAN, K. L. *et al.* (2012): Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction, *Current Opinion in Neurobiology*, 22, 154-161.
- DELMIC FAST-EM Fundamentals, <https://www.delmic.com/en/techniques/fast-electron-microscopy>. Letöltés ideje: 2023. augusztus 15.
- DUBOCHET, J. *et al.* (1982): Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions, *Journal of Microscopy* 128, (3), 219-237.
- EBERLE, A. L. *et al.* (2018): Multi-Beam Scanning Electron Microscopy for High-Throughput Imaging in Connectomics Research, *Frontiers in Neuroanatomy* Vol.12. Article 112, doi: 10.3389/fnana.2018.00112.
- FRANK, J. (2006): Electron Tomography, Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell, Springer kiadó, (Frank, J. ed.) ISBN-10: 0-387-31234-X, 1-463.
- HARTNELL, L. M. *et al.* (2016): Imaging cellular architecture with 3D SEM, *Encyclopedia of Cell Biology*, Vol.2, 44-50.
- HAYWORTH, K. J. *et al.* (2014): Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits, *Frontiers in Neural Circuits*, doi: 10.3389/fncir.2014.00068.
- HEYMANN, J. A. W. *et al.* (2006): Site-specific 3D imaging of cells and tissues with dual beam microscope, *J Struct Biol.* 155(1), 63-73.
- HILDEBRAND, D. G. C. *et al.* (2017): Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish, *Nature*, doi: 10.1038/nature22356.
- JOY, D. C. (1991): The Theory and Practice of High Resolution Scanning Electron Microscopy, *Ultramicroscopy*, Vol.37, Issues 1-4, 216-233.
- KIEVITS, A. J. *et al.* (2022): How innovations in methodology offer new prospects for volume electron microscopy, *J. Microsc.* 287, 114-137.

- KISLINGER, G. *et al.* (2020): Multiscale AUTUM-FIB Microscopy Enables Targeted Ultrastructural Analysis at Isotopic Resolution, *iScience* 23, 101290, doi: 10.1016/j.isci.2020.101290.
- KNOTT, G. *et al.* (2011): Focussed Ion Beam Milling and Scanning Electron Microscopy of Brain Tissue, *J. Vis. Exp.* (53) e2588, doi: 10.3791/2588.
- KONING, R. I. *et al.* (2018): Advances in cryo-electron tomography for biology and medicine, *Annals of Anatomy* 217 82-96.
- KUBA, J. *et al.* (2021): Advanced cryo-tomography workflow developments – correlative microscopy, milling automation and cryo-lift out, *Journal of Microscopy*, 281, 2, 112-124.
- LÁSZLÓ, L. (2012): Minta-előkészítés speciális TEM vizsgálatokra és Immunocitokémia fejezetek a *Szöveti és sejtbőlőgi vizsgálmódszerek* című könyvben (szerk. dr. László Lajos), <https://ttk.elte.hu/dstore/document/896/book.pdf>
- LEIGHTON, S. B. (1981): SEM images of block faces, cut by a miniature microtome within the SEM – a technical note, *Scan Electron Microsc.* 2, 73-76.
- LICHTMAN, J. W. *et al.* (2011): The Big and the Small: Challenges of Imaging the Brain's Circuits, *Science* 334, 618-623.
- LIU, C. *et al.* (2020): Viral Architecture of SARS-CoV-2 with Post-Fusion Spike Revealed by Cryo-EM, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.02.972927.
- Marko, M. *et al.* (2006): Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative to cryo-ultramicrotomy of frozen-hydrated biological samples, *Journal of Microscopy*, 222, 1, 42–47.
- NARAYAN, K. *et al.* (2015): Focused ion beams in biology, *Nat Methods*, 12(11), 1021-1031, doi: 10.1038/nmeth.3623.
- PEDDIE, C. J. *et al.* (2014): Exploring the third dimension: Volume electron microscopy comes of age, *Micron* 61, 9-19.
- POZSGAI, I. (2016): Képalkótás, kémiai analízis és szerkezetvizsgálat a korszerű pásztázó elektron mikroszkópban, TYPOTEX Kiadó, ISBN 978 963 279 908 7, ISSN 1788-2494,
- POZSGAI, I. (2023): A krio-elektronmikroszkópia és a koronavírus, TYPOTEX Kiadó, ISBN 978 963 493 070 9,
- RADON, J. (1917): Radon transform, Wikipedia

- SCHALEK, R. *et al.* (2012): ATUM-based SEM for High-Speed Large-Volume Biological Reconstruction, *Microsc. Microanal.* 18 (Suppl 2), Microscopy Society of America, doi: 10.1017/S1431927612004710
- SHAPSON-COE, A. *et al.* (2021): A connectomic study of a petscale fragment of human cerebral cortex, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.05.29.446289.
- SJÖSTRAND, F. S. (1956): The ultrastructure of Cells as Revealed by the Electron Microscope, *International Journal of Cytology* 5, 455-533.
- STEVENS, J. K. *et al.* (1980): A systematic approach to reconstructing microcircuitry by electron microscopy of serial sections, *Brain Research Reviews*, 2, 265-293.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC, Arctis Cryo-Plasma-FIB Brochure
- THERMO FISHER SCIENTIFIC 2,
<https://www.janelia.org/support-team/cryo-microscopy/equipment>
- WACKER, I. *et al.* (2013): Array tomography, *Journal of Microscopy*, doi:10.1111/jmi.12087
- WALLS, A. C. *et al.* (2020): Structure and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein, *Cell* 180, 281-292 April 16, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- WHITE, J. G. *et al.* (1986): The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis Elegans*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B314, 1-340.
- WRAPP, D. *et al.* (2020): Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, Published online 19 February 2020, doi: 10.1126/science.abb2507. Nyomtatásban *Science*, 367, 1260-1263.
- YAN, R. *et al.* (2020): Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2, *Science* 367, 6485, 1444-1448. doi: 10.1126/science.abb2762.
- YIN, W. *et al.* (2020) A petascale automated imaging pipeline for mapping neuronal circuits with high-throughput transmission electron microscopy, *Nature Communications*, 11, 4949, <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18659-3>.
- YIP, K. M. *et al.* (2020): Breaking the next Cryo-EM resolution barrier – Atomic resolution determination of proteins!, *bioRxiv*, preprint.
- ZEISS 2, Volume EM Methods and Techniques,
<https://www.zeiss.com/microscopy/en/applications/life-sciences/volume-em.html>
 Letöltés 2023. március 5.
- ZEISS MultiSEM 505/506, The World's Fastest Scanning Electron Microscopes,
<https://www.zeiss.com/microscopy/en/products/sem-fib-sem/sem/multisem.html?vaURL=www.zeiss.com/multisem>

IV. Összekötő elemek a fény- és elektronmikroszkópia között

IV.1. Képregisztráció

A CLEM szerves része a fény és elektronmikroszkópos képek egymásra illesztése. Képregisztráció az a folyamat, amikor ugyanazon helyről, különböző módszerekkel vagy különböző módon felvett adatokat egy közös koordináta rendszerbe transzformálunk (WIKIPEDIA, Image registration).

A CLEM két különböző modalitásával, fénnel és elektronokkal előállított képek egymásra illesztése a képregisztráció tipikus esete. A képregisztráció segítségével keressük meg az elektronmikroszkópban a fénymikroszkóppal vizsgált objektumot vagy területet. Végző soron így illesztjük az elektronmikroszkópos és fluoreszcens képet.

Az angol nyelvű szakirodalom különbséget tesz a registration és az alignment között. A registration szót ugyanazon metszet ugyanazon részeinek, különböző módszerrel készült képeinek egymásra illesztésére, az alignment kifejezést a különböző metszetekből készült képeinek megfeleltetésére használja (COLLMAN 2015).

A továbbiakban olyan kétfunkciós markerekről lesz szó, amelyek mindkét modalitással, azaz fény-, és elektronmikroszkópiával is detektálhatók. Összekötő elemeknek számítanak az integrált mikroszkópok is, amelyek egy készüléken belül lehetővé teszik a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzését.

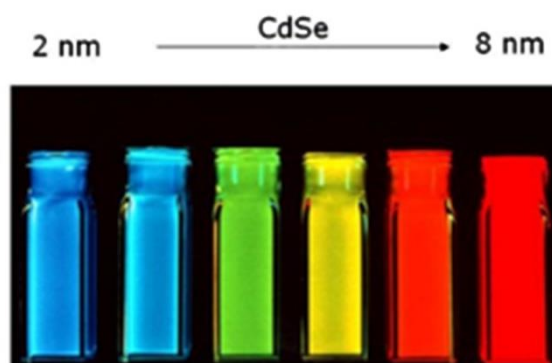
IV.2. Kétfunkciós (bimodális) markerek

IV.2.1. Kvantumpontok

A kvantumpontok (angolul quantum dots, rövidítve QD) 2–10 nm méret tartományba eső szervesetlen, félvezető nanokristályok. Fluoreszcenciára képesek és kontrasztot adnak az elektronmikroszkópos képen, így alapvetően alkalmasak a korrelatív fény és elektronmikroszkópiára. A kvantumpontok által kibocsátott fluoreszcens fény színe függ a pontok méretétől, ezáltal a szín a kvantumpontok méretének változtatásával hangolható. Ez teszi lehetővé több fehérje egyidejű jelölését. A kvantumpontok rendkívül ellenállóak a fotokifakulással (photobleaching) szemben. A felsorolt tulajdonságok kedvezően hatnak a QD-k CLEM alkalmazásában.

A IV.1. ábrán CdSe kolloidok láthatók, amelyekben a monodiszperz nanokristályok mérete 2–8 nm tartományban változik. A kisebb szemcseméretű tartályban kék a nagyobb szemcseméretű tartályban vörös a fluoreszcens sugárzás. A kolloidok megvilágítása ugyanazzal

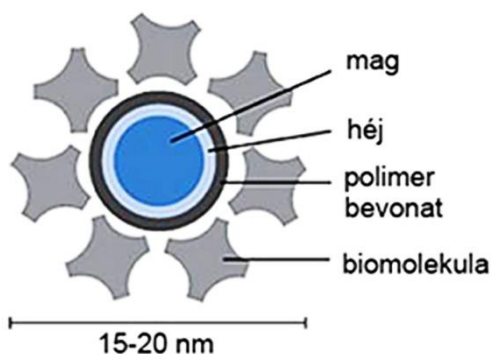
az ultraibolya színű fényforrással történt. A kvantumpontok színe (fluoreszcenciájuk hullámhossz függése) az energia sáv szélességnek és a dielektromos állandónak a szemcseméret függésére vezethető vissza.



IV.1. ábra. *CdSe kvantumpontok színének függése a nanokristályok méretétől a 2-8 nm tartományban, ultraibolya sugárzással történő megvilágításkor (RESEARCH GATE)*

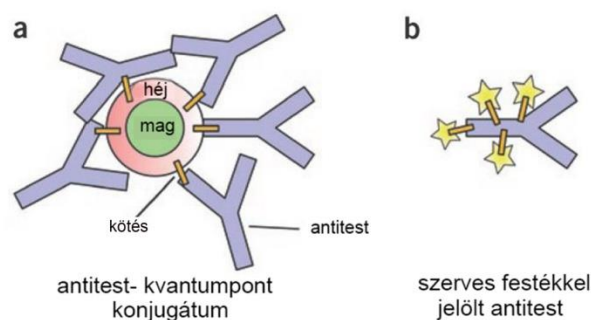
A fluoreszcens kvantumpontok nagyon sok félvezető anyagból előállíthatók, pl. az A(II)-B(VI) típusú félvezetőkből, de nem korlátozódnak félvezetőkre, lehetnek tiszta fémek is, mint pl. arany vagy ezüst nanokristály is. (Az A(III)-B(V) típusú félvezetők többnyire az infravörös tartományban sugároznak). A nagyméretű tömeggyártásuk kolloid vagy por formájában megoldott, miként a kadmium-mentes és nehézfém-mentes kvantumpontok gyártása is.

A kvantumpont fluoreszcens mikroszkópiai alkalmazására mutat tipikus példát a „mag-héj” konstrukció (IV.2. ábra). A mag anyaga és mérete határozza meg a kvantumpont által kibocsátott élénk, fényes színt. A burok a magnál szélesebb tiltott sáv szélességű anyag, növeli a fluoreszcencia hatásfokát és passziválja a mag felületén lévő nem-sugárzó rekombinációs helyeket. A polimer bevonat védi a mag-héj konstrukciót. Végül olyan biomolekulákkal veszik körbe, amelyek elősegítik a vizsgálandó makromolekulákkal való konjugációt, pl. antitestek, peptidek, polietilén-glikol (PEG), stb.



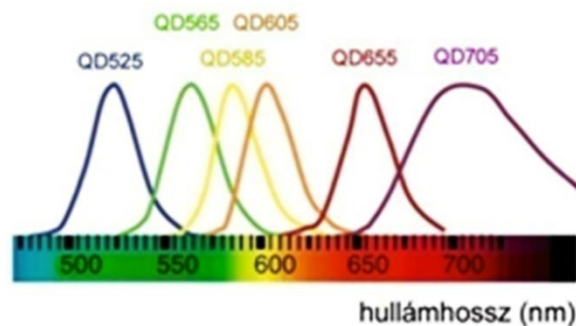
IV.2. ábra. *Qdot® nanokristály konjugát (THERMOFISHER)*

A kvantumpontok olyan fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek a szerves fluoroforok (pl. Alexa Fluor, Cy3, FITC, rodamin) versenytársává teszik: 1–2 nagyságrenddel fényesebbek és 2–3 nagyságrenddel nagyobb a fotostabilitásuk. Hátrányuk viszont a lokalizáció szempontjából, hogy méretük nagyobb, mint a szerves fluoroforoké (IV.3. ábra).



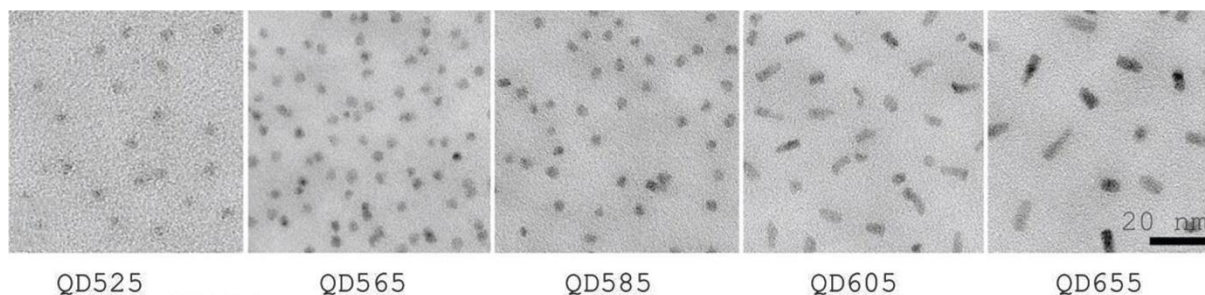
IV.3. ábra. Kvantumponttal illetve szerves fluoreszcens festékekkel jelölt antitest méretaránya sematikus (RESCH-GENGER 2008)

A Thermo Fisher különböző méretű és színű kvantumpontokat árul sztreptavidinhez vagy biotinhoz konjugáltan. Kapható hat különböző színű kvantumpontokat tartalmazó készlet (kit) is. Ezek emissziós spektruma látható a következő ábrán:



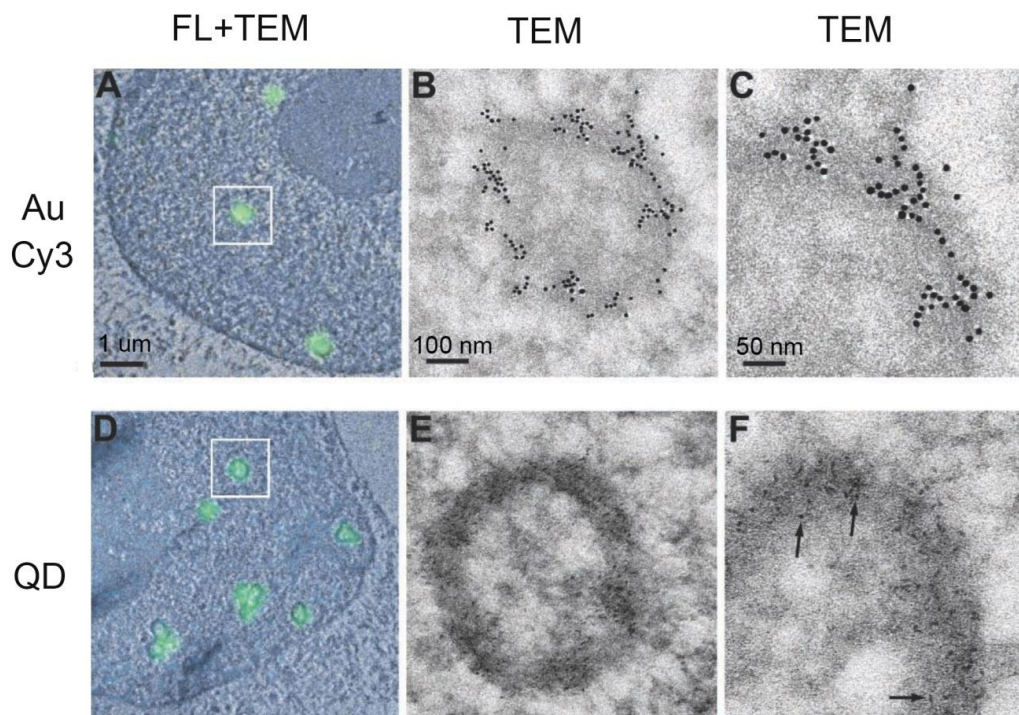
IV.4. ábra. Thermo Fisher CdSe/ZnS kvantumpontok emissziós hullámhosszai (GIEPMANS 2005)

A nagyobb, 5–6 nm átmérőjű kvantumpontok narancs vagy piros színűek, a kisebb, 2–3 nm átmérőjűek kék vagy zöld fényt emittálnak. Az elektronmikroszkópban szögletesnek vagy téglalap alakúnak látszanak. A kvantumpont magja nagyobb rendszámú elemet tartalmaz, mint a héj vagy a polimer bevonat, ezért nagyobb kontrasztot ad.



IV.5. ábra Kvantumpontok TEM képei (DEENRINCK 2008)

A IV.6. ábra PML testek (promyelocytic leukemia protein) CLEM vizsgálatára vonatkozik. A PML egy olyan tumor-gátló fehérje, amely sokféle sejtmagban megtalálható, gazdag RNS-ben és a gén-kifejeződésben játszik szerepet. A PML testek részt vesznek a programozott sejthalálban, sejt osztódás szabályozásában és vírusellenes hatásuk is van (WIKIPEDIA, Promyelocytic leukemia protein), (BOISVERT 2000).



IV.6. ábra. Korrelatív fluoreszcens és elektronmikroszkópia kvantumpontokkal (alsó sor) kolloidális arannyal és Cy3 fluoroforral (felső sor). Az arany és a kvantumpontok mérete is 10 nm.

A/ ábra fluoreszcens felvétel és TEM kép egymásra helyezve. PML test bekeretezve fehérrel,

B/ ábrán kinagyítva TEM képen. C/ ábra: a B/ ábrán látható terep egy részének nagyítása.

D/ábra: CLEM kvantumpontokkal, fluoreszcens és elektronmikroszkópos kép egymásra helyezve.

A fehérrel bekeretezett PML test kinagyítva TEM felvételen E/ ábrán látható.

A TEM kép egy részletének tovább nagyítása az F/ ábrán. A nyílak kvantumpontokra mutatnak

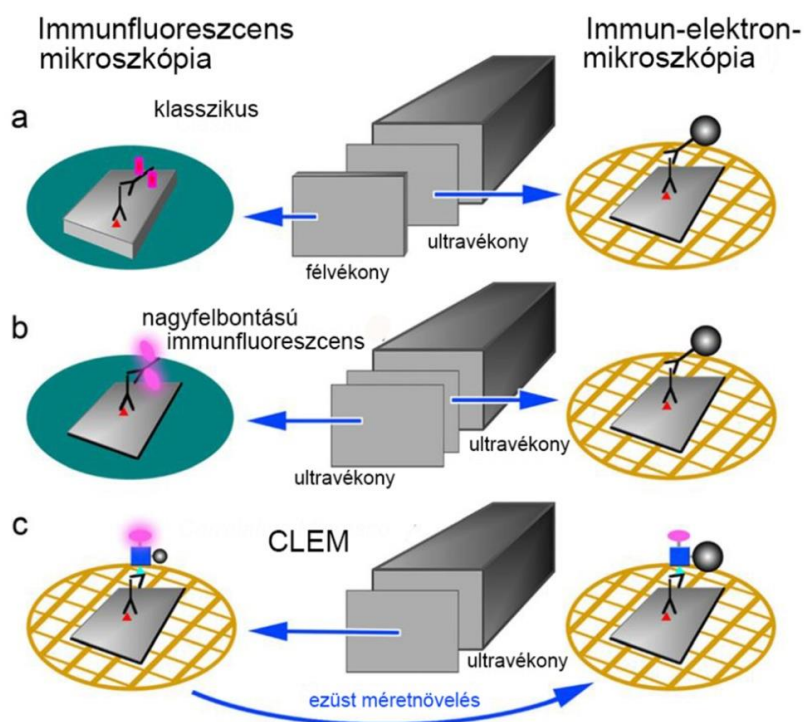
(NISMAN 2004)

A kvantumpontokkal történő CLEM a IV.6. ábra alsó sorában (D, E, F, ábra), a kolloidális arannyal és Cy3 fluoroforral végzett CLEM a felső sorban (A, B, C, ábra) látható. Az utóbbit összehasonlítás céljából mutatjuk. A kvantumpontok a kolloidális aranyhoz viszonyítva kisebb méretűnek látszanak, jóllehet névelgesen ugyanolyan méretűek, de külső peremük gyenge kontrasztot ad.

A kvantumpontok különösen előnyösen alkalmazhatók CLEM-re, ha a TEM elektron-energia szűrővel (pl. Gatan Filter) van ellátva, mert az energia-szűrt képek jellemzőek a keresett objektumra és a kvantumpontokat alkotó kémiai elemekre.

IV.2.2. FluoroNanogold®

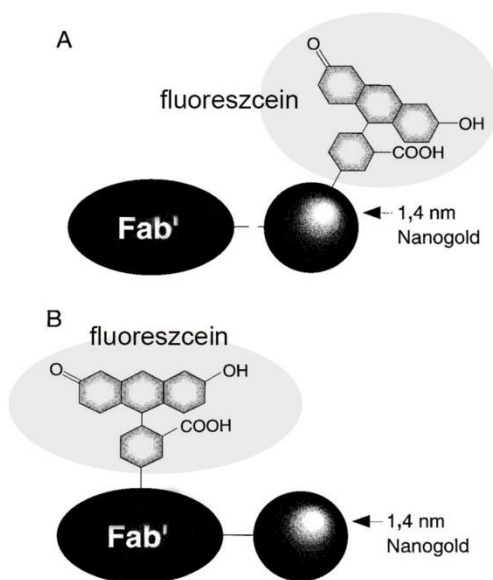
Az immunológiai vizsgálatokban célszerűnek látszott a fluoreszcens markerek kombinálása kolloidális arannyal, hogy a kettős jelöléssel a korrelatív fény és elektronmikroszkópos vizsgálatok ugyanazon a mintán megvalósíthatók legyenek. A kísérletek kezdetben nem sok sikerrel jártak, mert a kolloidális arany lecsökkentette vagy megszüntette a fluoreszcens jelet (DE BRABANDER 1986). Lehetséges magyarázatként a fluoreszcens rezonancia energiaátvitelhez (Fluorescent Resonance Energy Transfer, FRET) hasonló jelenséget (Nanosurface Energy Transfer, NSET) adták meg, ami szerint az nano-arany elviszi a fluorofor gerjesztéshez szükséges energiát (JENNINGS 2006, KARREMAN 2009 és 2013).



IV.7. ábra. Az immun-fluoreszcens mikroszkópiával összekötött immun-elektronmikroszkópia (lásd a szöveget) (TAKIZAWA 2015)

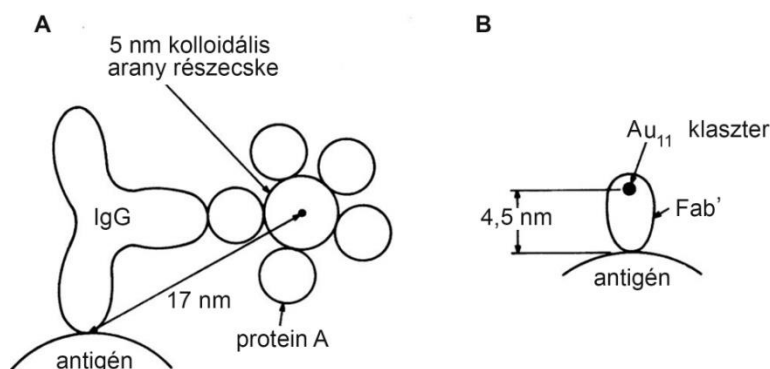
Az immunfluoreszcens mikroszkópiával (IFM) kapcsolt immun-elektronmikroszkópia (IEM) három módon valósulhat meg (IV.7. ábra). Klasszikus esetben külön mintán végzik az IFM és az IEM vizsgálatot: az IEM vizsgálatához félvékony (0,2–2,0 μm), az IEM-hez ultravékony (50–100 nm) mintát használnak. (IV.7. a. ábra). Az ilyen típusú vizsgálatot komparatívnak és nem korrelatívnak nevezik. Amennyiben nagy felbontású IFM vizsgálatokat akarnak végezni, akkor ultravékony mintát kell használni (IV.7. b. ábra). A korrelatív vizsgálat (CLEM) (IV.7. c. ábra) abban különbözik az előző kettőtől, hogy a vizsgálatokat ugyanazon az ultravékony mintán végzik. A CLEM-ben az immunfluoreszcens vizsgálat után a FluoroNanogold szemcsék (lásd alább) méretét ezüst vagy arany felvitelével megnövelik (silver enhancement vagy gold enhancement), azért, hogy a nagyon kisméretű arany gömböcskéket könnyen meg lehessen találni rutin TEM üzemmódban.

Az immunfestéshez konvencionálisan használt, nanorészecskékből álló kolloidális arany nem azonos a vízben oldható, arany klaszterekből álló Nanogold® és FluoroNanogold® vegyületekkel. A FluoroNanoGold (FNG) tulajdonképpen egy olyan Nanogold (NG) vegyület, amelyhez antitestet és fluorofort konjugáltak. A szóban forgó antitest lehet teljes IgG vagy egy Fab' fragmentum. (Az Fab' jelölést illetően lásd a Wikipedia Fragment antigen-binding szócikkét)



IV.8. ábra. A FluoroNanoGoldról (FNG) szóló első közleményből. A Fab'-höz egy fluorofort (fluoreszcein) és 1,4 nm nanoaranyt kovalensen konjugáltak. Ez a vegyület (FNG) a fluoreszcens mikroszkópban gerjesztés hatására fényt emittál, elektronmikroszkópban pedig kontrasztot ad az arany miatt. Az ábrán nincs feltüntetve, hogy az antigénhez egy primer antitest kapcsolódik és pedig a Fab' fragmentum bal oldalán. Az FNG korrelatív fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatot tesz lehetővé (POWELL 1997)

Az 1,4 nm-es nanogold, kis mérete miatt közel kerül a vizsgálandó antigénhez és ez által nagyon jó a lokalizáció pontossága, ellentétben azzal, ami a IV.7. a. ábrán látható szekunder antitest és kolloidális arany kombinációjakor valósul meg. Egy korábbi közlemény 0,8 nm-es aranyról (ún. undecagold) szólt, amely mindössze 11 darab arany atomból áll (HAINFELD 1987).



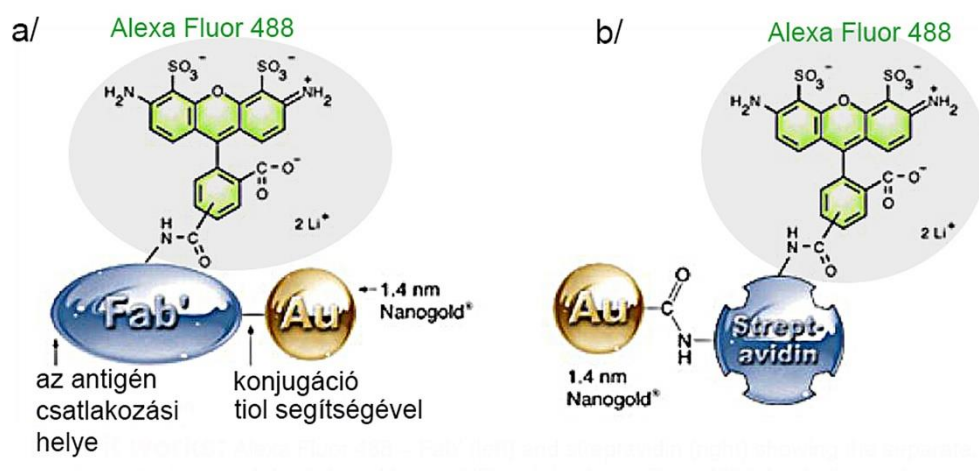
IV.9. ábra. Antitestekkel történő jelölések méretének összehasonlítása. A/. Konvencionális esetben, amikor a protein-A az IgG F_c tartományához kötődik, akkor a jelölés teljes mérete legalább 25 nm. 5nm-nél nagyobb arany részecskék esetén még ennél is több. B/ Au₁₁ klasztert használva a jelölés teljes mérete 5 nm (HAINFELD 1987)

A 0,8 nm-es nanogold elvileg még jobb lokalizációs pontosságot biztosít, mint az 1,4 nm-es, de kis mérete miatt a rutin TEM vizsgálatokban nehezen lehet megtalálni, ezért használata nem terjedt el. (Pásztázó transzmissziós elektronmikroszkóppal (STEM) kapcsolatban mégis használják, mert a körgyűrű alakú sötétlátóterű detektor (ADF, Annular Dark Field) jobb rendszámkontrasztot biztosít, mint a TEM).

Az arany-klaszter immunpróbák (NG) előnyei a kolloidális arany immunpróbákhoz viszonyítva (ROBINSON 2000):

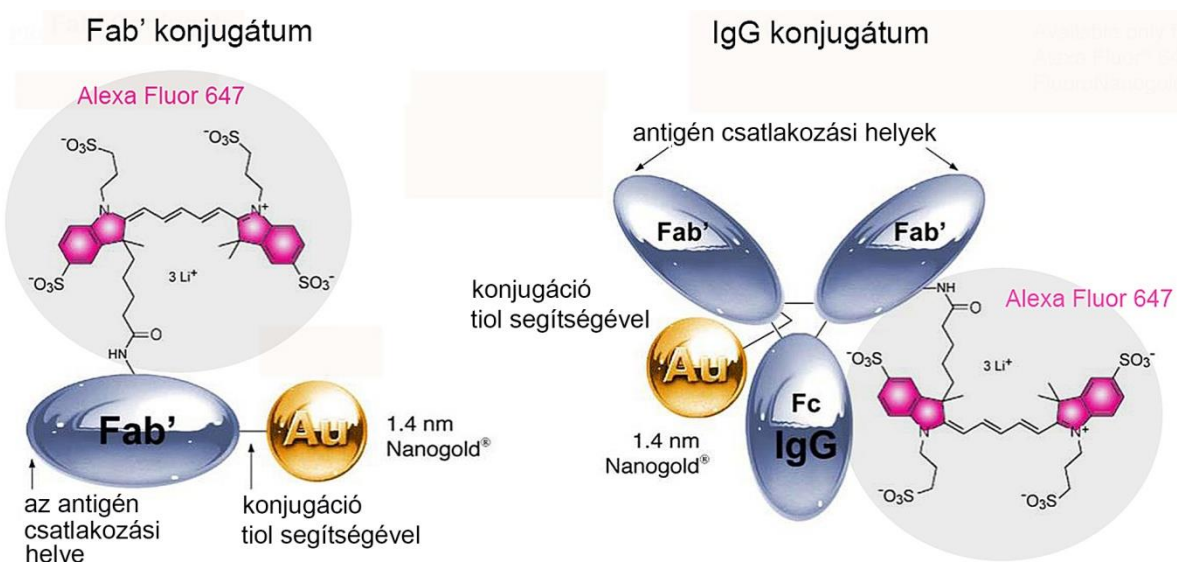
- azonos méretű 1,4 nm átmérőjű arany magot tartalmazó vegyületek,
- a legkülönbözőbb makromolekulákhoz kapcsolhatók. Amikor a Fab' fragmentumokhoz kapcsolódnak, akkor a rendelkezésre álló legkisebb próbák közé tartoznak,
- stabilabbak, mint az antitesthez konjugált kolloidális arany próbák, mert kovalens kötéseik,
- nem hajlamosak aggregálódásra,
- jobban behatolnak a sejtekbe és szövetekbe, mint a kolloidális arany,
- rutin fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokban is használhatók ezüsttel történő méretnöveléssel. Méretnövelés nélkül pedig nagyfelbontású elektronmikroszkópiában,

- korrelatív fény- és elektronmikroszkópiára használhatók,
- nagyobb a jelölésük hatékonysága, mint a kolloidális aranyé.

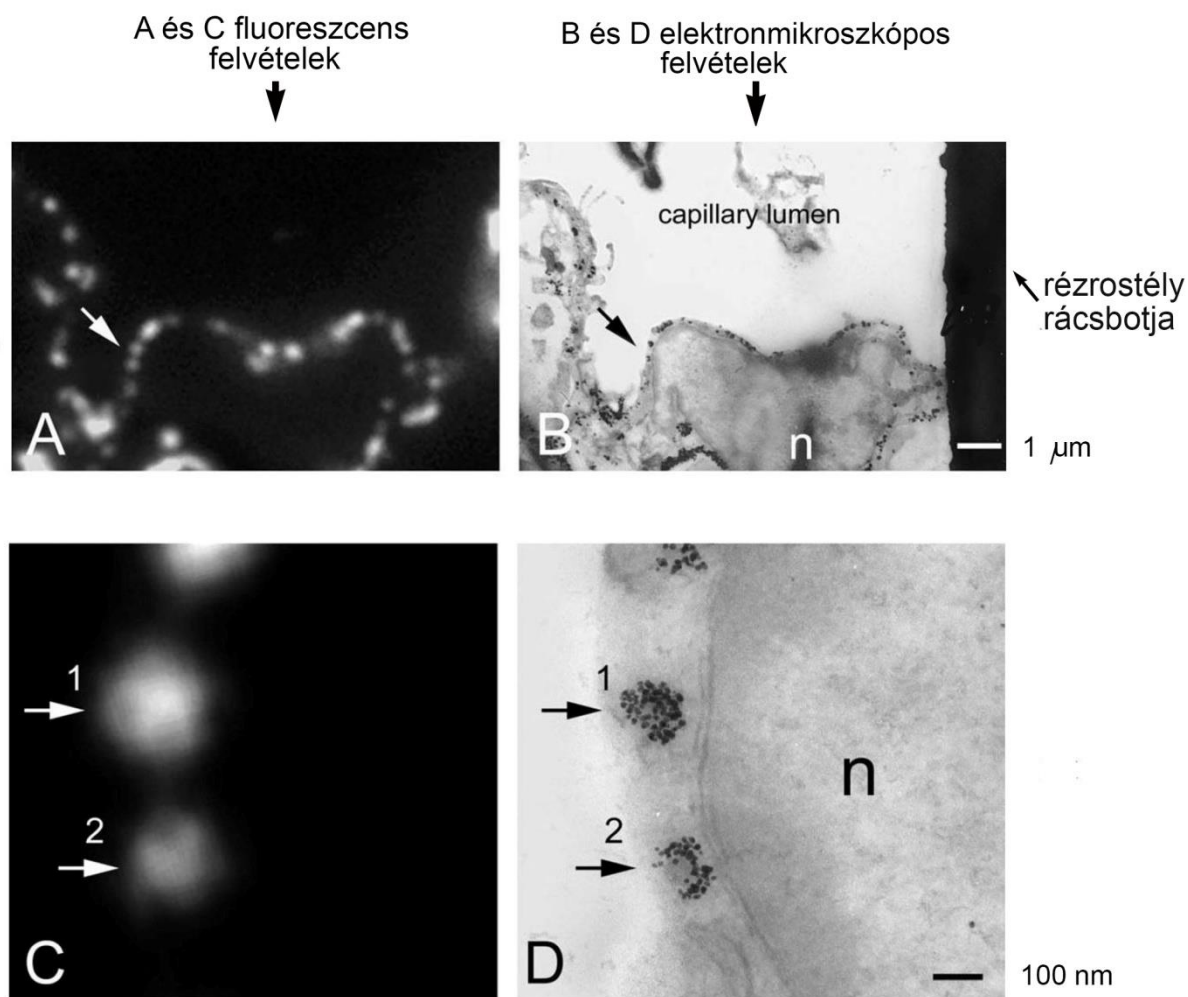


IV.10. ábra. FluoroNanogold® CLEM alkalmazásának két példája zöld Alexa Fluor 488 festékekkel (a Nanoprobes vállalat termékei). A Nanogold® az elektronmikroszkópos detektálást segíti.
a/ zölden fluoreszkáló Alexa Fluor 488-FluoroNanogold-Fab' konjugátum. Az antigén a Fab' bal oldalához kapcsolódik az ábrán. b/ Alexa Fluor 488-FluoroNanogold-sztreptavidin konjugátum. Az antigén biotinon keresztül kapcsolódik a sztreptavidinhez

A pirosan fluoreszkáló Alexa Fluor 647 FluoroNanogold kétféle formában is kapható a kereskedelmi forgalomban, Fab' fragmentumhoz és teljes IgG-hez konjugálva (IV.11. ábra):



IV.11. ábra. FluoroNanogold® CLEM alkalmazásának két példája piros Alexa Fluor 647 festékekkel (a Nanoprobes vállalat termékei). A Nanogold® az elektronmikroszkópos detektálást segíti



IV.12. ábra. *FluoroNanoGold* alkalmazása korrelatív fény és elektronmikroszkópiára

A IV.12. ábrán egy speciális integrális membrán fehérje, a kaveolin (CAV1 α) vizsgálata látható. Az A és C ábrák fluoreszcens felvételek. Az A ábrán nyíllal jelölt két pötty látható. nagyobb nagyításban a C ábrán. A B és D ábrák elektronmikroszkópos felvételek ugyanarról a terepről készültek, mint az A illetve C ábra. A B ábra képe nagyobb nagyításban a D ábrán látható. Az A és B felvételek nagyítása, valamint a C és D felvételek nagyítása megegyezik. A fény- és elektronmikroszkópos képek közötti kitűnő korrelációt a FluoroNanoGold biztosítja. „n” a sejtmagot, a „*” a mikrostély rácshotját jelöli (TAKIZAWA 2003).

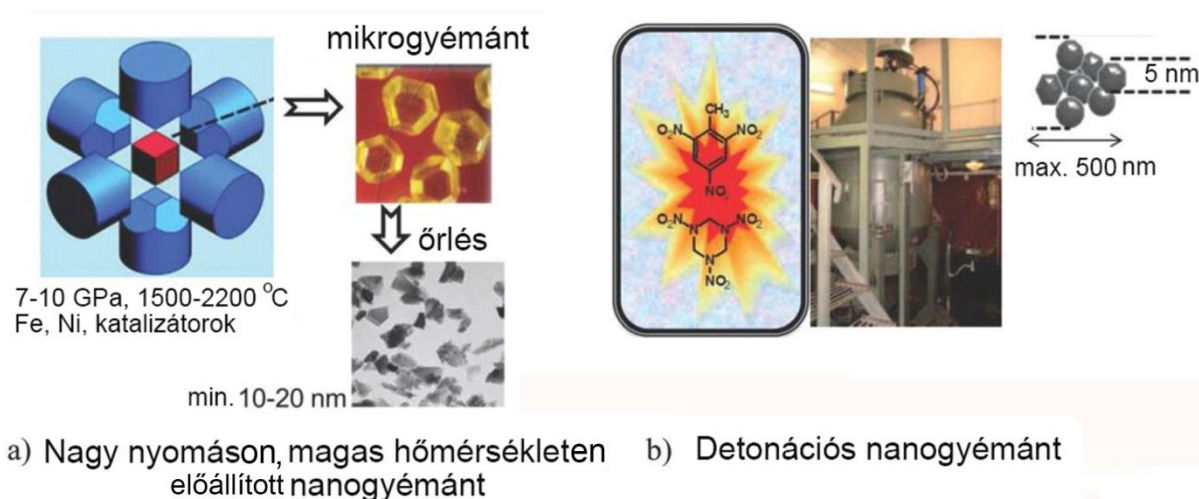
IV.2.3. Fluoreszcens nanogyémánt (FND)

A nanogyémántok mérete 1 mikrométernél kisebb. Több évtizede ismertek, de fluoreszcens változataikról az első közlemény csak 2005-ben jelent meg (YU 2005). A fluoreszcens nanogyémántok (a továbbiakban FND, az angol Fluorescent Nano Diamond nyomán) a CLEM

szempontjából a legigéretesebb próbákhoz tartoznak, tekintettel arra, hogy fény és elektronok hatására is világítanak.

Terminológiai szempontból a lumineszcencia fogalma a fényváltozásokkal kapcsolatos jelenségek tág körét foglalja magában. Ezen belül a fotolumineszcencia a fény hatására bekövetkező jelenségeket jelenti, úgymint a fluoreszcenciát és foszforeszcenciát. Az elektronok hatására bekövetkező fényváltozások a katódlumineszcencia tárgykörébe tartoznak. Az FND-k fluoreszcensek és katódlumineszcensek is. A CLEM-ben a fluoreszcencia a fénymikroszkópban, a katódlumineszcencia az elektronmikroszkópban hasznosul.

A nanogyémántokat vagy szintézissel állítják elő, amelyek nagynyomású és magashőmérsékletű eljárások (IV.13. a/ ábra), vagy robbantásos eljárásokkal (IV.13.b/ ábra).

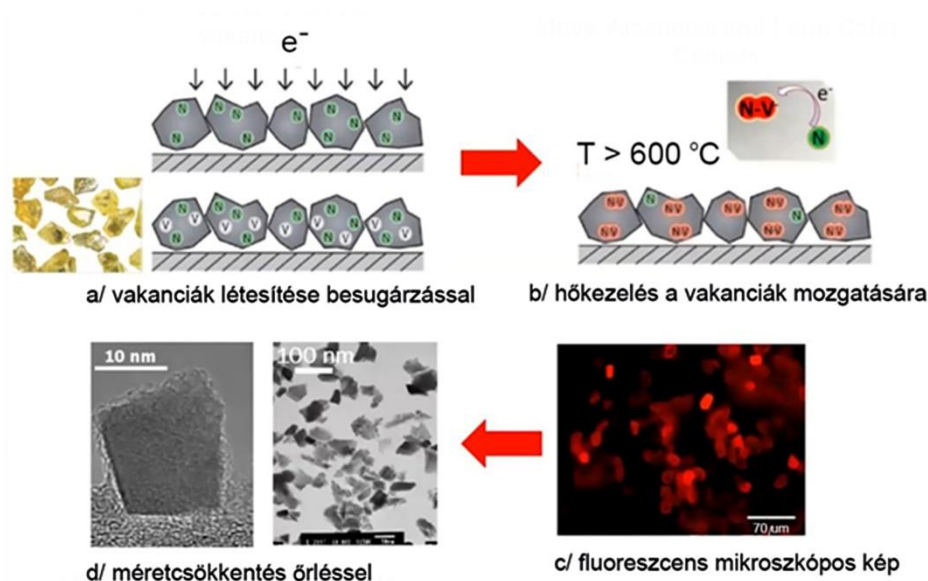


IV.13. ábra. Szintetikus nanogyémántok előállítási eljárásai (SHENDEROVA 2015)

A b./ ábra szerinti detonációs eljárásban robbanóanyagok keverékét (lásd a TNT és RDX képletét az ábrán) robbantják fel kontrolált körülmények között. Ennek eredményeként relatíve nagy nitrogén tartalmú (akár 10 000 ppm) gyémánt aggregátumok keletkeznek, amelyeket kb. 5 nm átmérőjű gyémánt szemcsékre diszpergálnak. A nagy nitrogén tartalom ellenére ezek az aggregátumok optikailag inaktívak. CLEM -hez egyelőre csak a IV.13. a/ ábrán mutatott nagy nyomáson és magas hőmérsékleten előállított fluoreszcens nanogyémántokat használják. Ezeknek az Ib típusú gyémánt szemcséknek a nitrogén tartalma 100–200 ppm. A gyémántoknak típusokba osztását lásd a Wikipédiában (Wikipedia, Diamond type).

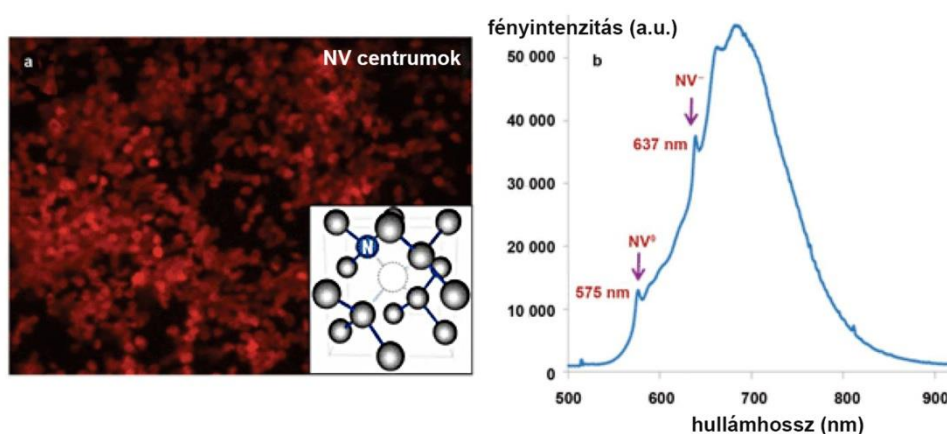
A fénykibocsátás szempontjából a tetragonális gyémántrácsban lévő hibahelyek (vakanciák) és a nitrogén atomok játszanak szerepet. A hibahelyeket a gyémánt szemcsékben utólagos besugárzással (például 10 MeV nagyságrendű elektronokkal, vagy 10 keV nagyságrendű protonokkal, He ionokkal) hozzák létre. Ezekről az eljárásokról Hsiao cikkében

találunk egy összefoglaló táblázatot (HSIAO 2016). Szükséges, hogy a nitrogén atomok eljussanak a vakanciákhoz, ezt hőkezeléssel érik el (IV.14. ábra).



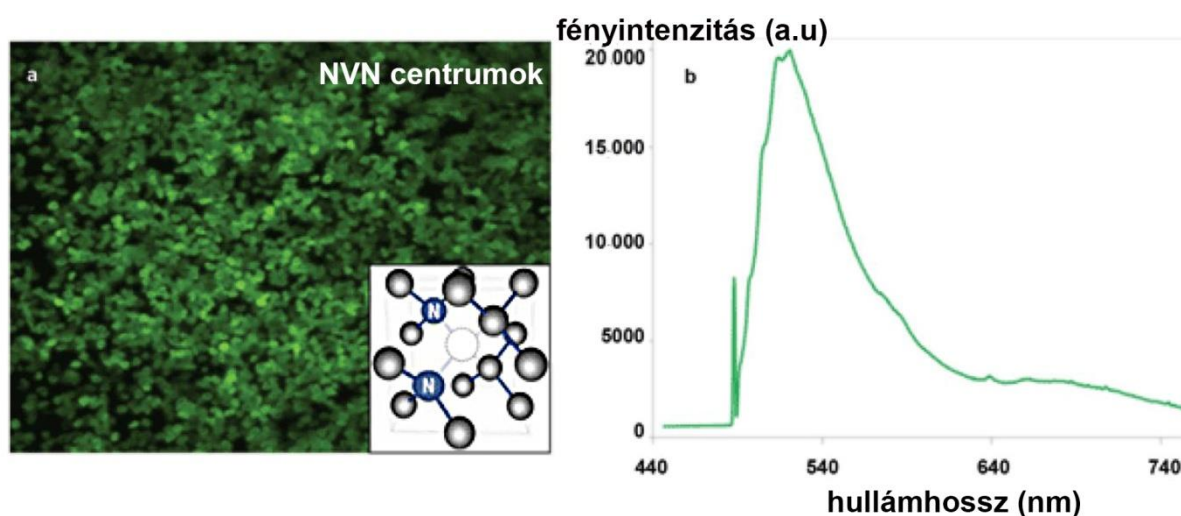
IV.14. ábra. A fluoreszcens nanogyémántok előállításához (ADÁMAS)

A fluoreszcens mikroszkópiában egyrészt pirosan fluoreszkáló FND-ket alkalmaznak, amelyekben nitrogén és vakancia komplexek (NV centrumok, színcentrumok) világítanak (IV.15. ábra). Másrészt a mikroszkópos szempontból fontos FND zölden fluoreszkál és színcentrumát két nitrogén atom és egy vakancia alkotja (IV.16. ábra).



IV.15. ábra. a/ 100 nm méretű fluoreszcens nanogyémánt szemcsék képe epifluoreszcens mikroszkópban. Az ábra jobb alsó sarkában a gyémántrácsban lévő NV centrum kristályszerkezete látható. b/ NV-centrum fluoreszcens spektruma, gerjesztési hullámhossz 532 nm (SHENDEROVA 2015)

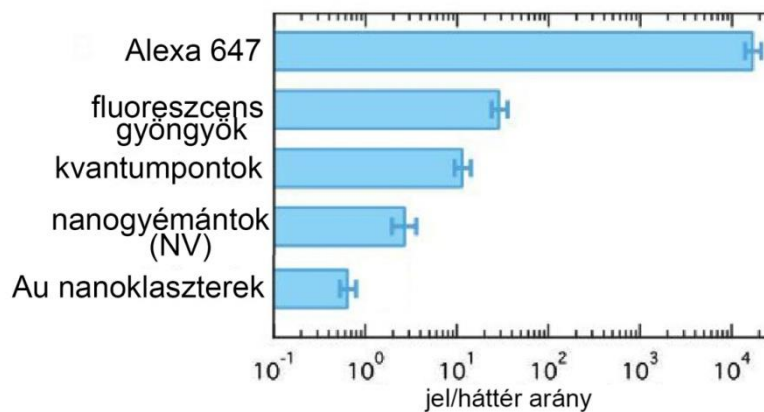
A 685 nm emissziós maximumú NV centrumok (IV.15. ábra) sugárzásának 70%-a a közeli-infravörös tartományba (870-890 nm) esik, amely a biológiai szövetekbe 2 mm-nél mélyebbre hatol be.



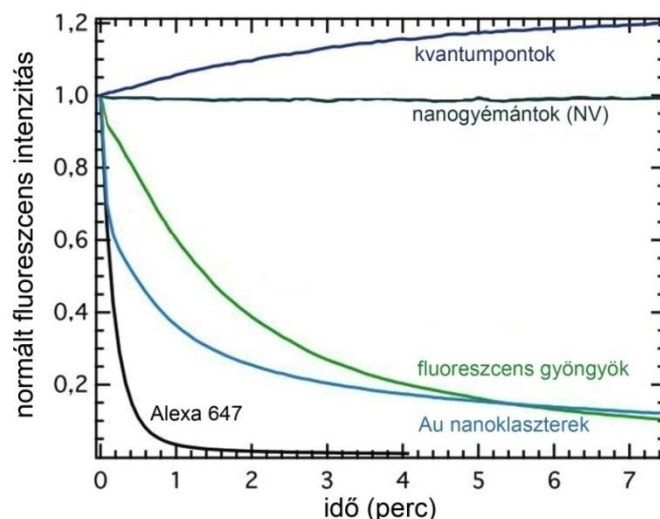
IV.16. ábra. a/ 70 nm méretű fluoreszcens nanogyémánt szemcsék képe epifluoreszcens mikroszkópban. Az ábra jobb alsó sarkában a gyémántrácsban lévő NVN centrum kristályszerkezete látható. b/ NVN-centrum fluoreszcens spektruma, gerjesztési hullámhossz 442 nm (SHENDEROVA 2015)

Nézzük meg melyek az FND-knek azok a tulajdonságai, amelyek a CLEM szempontjából oly kedvezőek:

- a fluoreszcenciájuk fényes és stabil. Nem lép fel foto-kifakulás (photobleaching) vagy villódzás (blinking) (HSIAO 2016). Az FND-k fényesség szempontjából alulmaradnak a szerves festékekhez (pl. Alexa Fluor festékek) vagy a kvantumponthoz képest, de a fotokifakulás hiánya kompenzálja ezt a hátrányt.

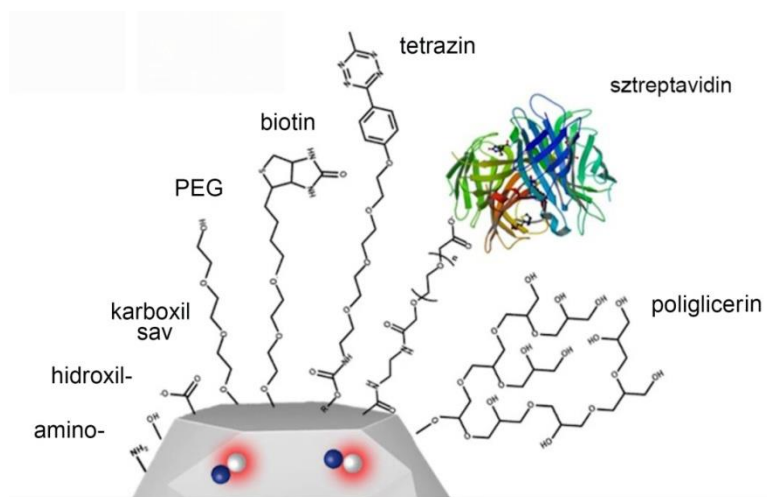


IV.17. ábra. A fluoreszcens sugárzás jel/háttér viszonya különböző anyagokra (REINECK 2016)



IV.18. ábra. a/ A fluoreszcens nanogyémántoknál fotokifakulás nem lép fel (REINECK 2016)
 (A fotokifakulás (angolul photobleaching) az a jelenség, amikor egy fluoreszcensen világító objektum, a gerjesztés hatására véglegesen elveszíti fénykibocsátó képességét. Ez a fluoreszcens képalkotó eljárások többségében káros.)

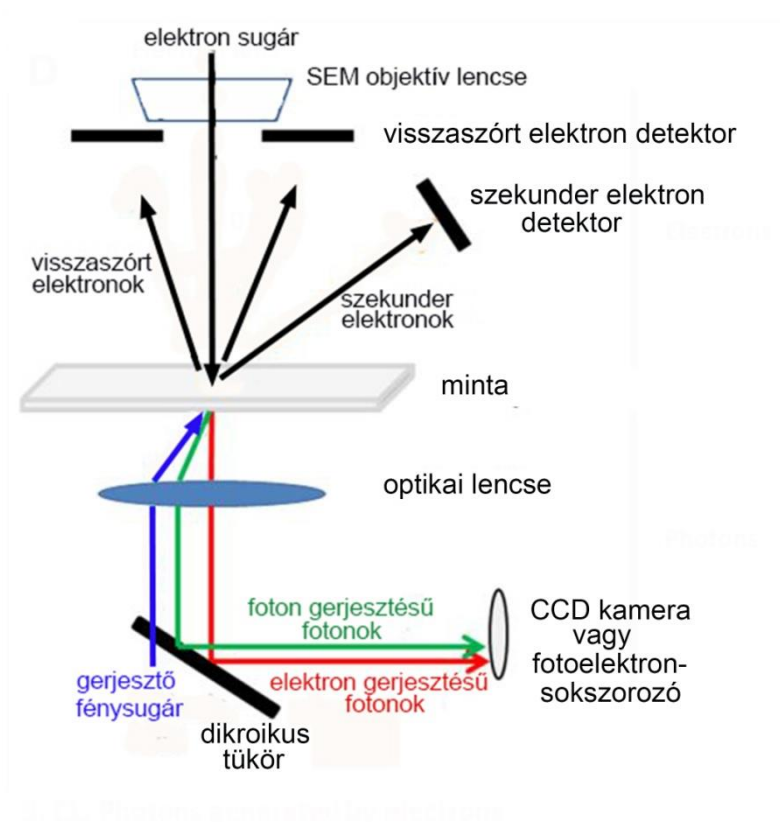
- nem toxikusak, *in vitro*, *in vivo* biokompatibilisek, (MOORE 2016), ami az élő sejtek fluoreszcens vizsgálatánál fontos,
- funkcionális csoportok könnyen kapcsolhatók az FND felszínére és a funkcionális FND-k kereskedelmi forgalomban kaphatók (Adamas Nanotechnology),



IV.19. ábra. Fluoreszcens nanogyémántokhoz kapcsolt funkcionális csoportok (ADÁMAS)

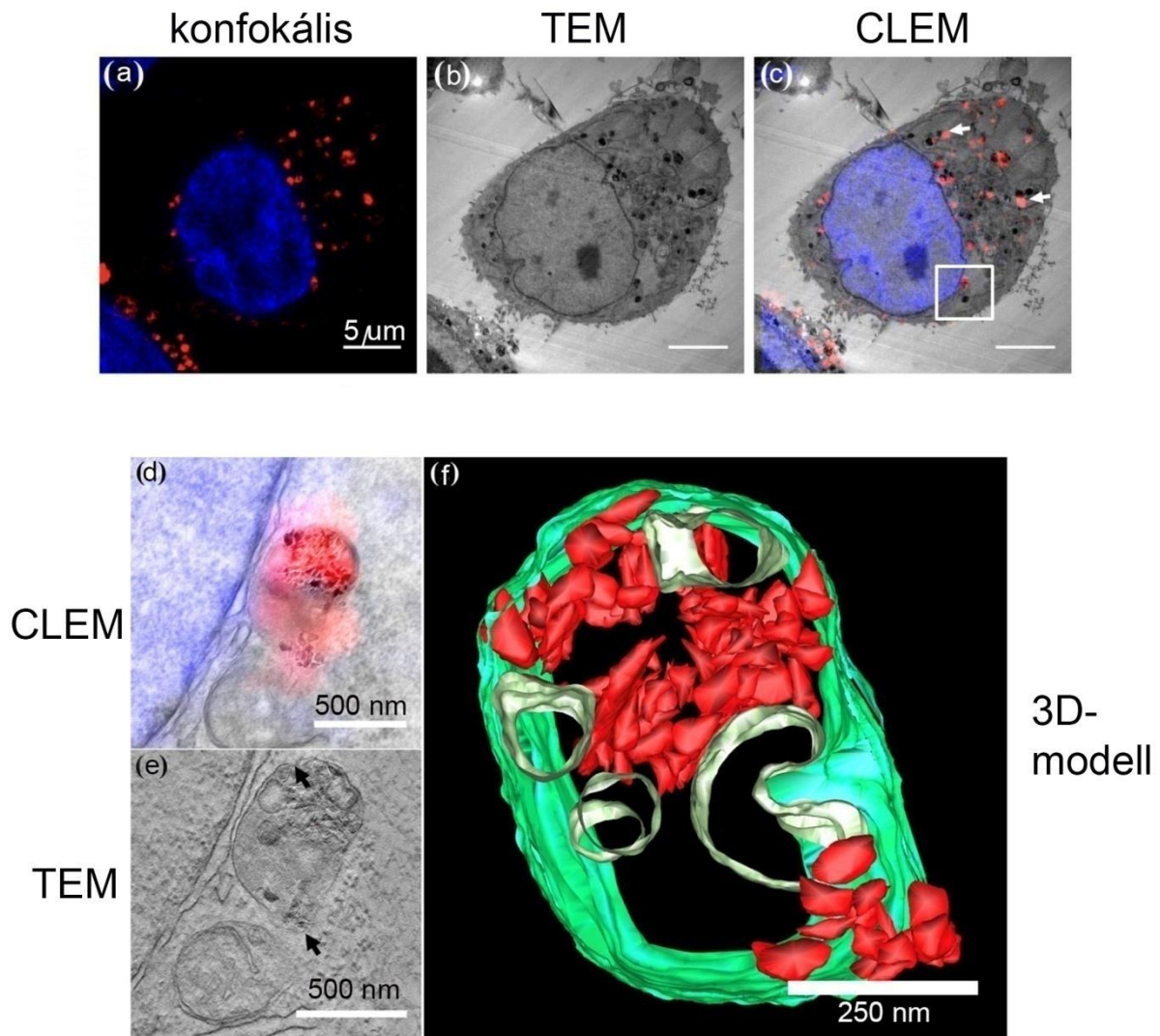
- az FND gyémánt magja fizikai és kémiai szempontból is ellenálló. Jól viseli azokat a vegyszereket, amelyeket elektronmikroszkópos minta előkészítéskor használnak pl. glutaraldehydet vagy ozmiumtetroxidot. Jól viselik a hőhatást, amely a kétfotonos gerjesztéskor vagy a szuperfelbontású STED mikroszkópiában érheti az FND-eket.

A CLEM FND-k segítségével integrált módon megvalósítható egy pásztázó elektronmikroszkópban az alábbi elrendezés szerint (IV.20. ábra):



IV.20. ábra. Pásztázó elektronmikroszkópos mérési elrendezés korrelatív fény és elektronmikroszkópiához (CLEM) (HAMELAAR 2017)

A következő ábrán azt mutatjuk, hogyan lehet a fény és elektronmikroszkópos kép korrelációját megvalósítani FND-k segítségével (HAN 2019)



IV.21. ábra. Konfokális lézermikroszkópos kép korrelálása TEM-ben felvett tomográfiás képpel fluoreszcens nanogyémánt szemcsék segítségével (lásd a szöveget) (HAN 2019)

A IV.21. a/ ábrán HeLa sejtek konfokális lézer pásztázó mikroszkópos képe látható. Az FND piros, a megfestett sejtmag kék színű (Hoechst festék). A konfokális és a TEM kép egymásra illesztését az FND-k segítségével valósították meg (c/ ábra). A c/ ábrán fehérrel bekeretezett rész CLEM képe a d/ ábrán, TEM képe az e/ ábrán látható. A TEM kép egy tomográfiás képsorozatból származik, amelyből rekonstruálták a 3D modellt (f) ábra). Az endoszomális vezikulumban az FND-k pirosak, a sejtmembrán pedig zöld.

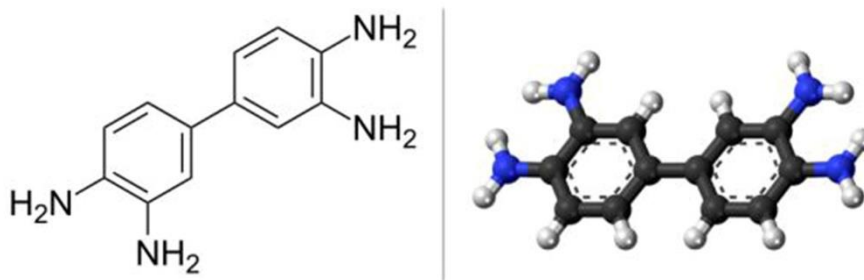
Az FND-kkel kapcsolatosan számos kiváló áttekintő jellegű cikk található az irodalomban (SHENDEROVA 2015, HSIAO 2016, REINECK 2016, HAN 2019).

IV.3. Fotóoxidáció alapuló jelölők (markerek)

A DAB (3-3' diaminobenzidin) egy benzin származék, a korrelatív fény és elektronmikroszkópia fontos segédeszköze. Fluoreszcens festékek fluoreszcenciájának következtében juthat a DAB reaktív, szinglet oxigénhez, amitől polimerizálódik, megbarnul és elektronokra-átlátszatlan apró szemcsés csapadékká válik. Ezt a tulajdonságát az elektronmikroszkópiában lehet hasznosítani.

A DAB polimerizációját és kontrasztváltozását az irodalom fotóoxidáció néven nevezi. Helytelen fotókonverzió elnevezés, amely szintén előfordul az irodalomban. A fotókonverzió elnevezés azért nem szerencsés, mert a fluoreszcens mikroszkópiában fotókonverzió alatt azt értik, amikor egy fluorofor gerjesztési és emissziós hullámhossza is megváltozik külső besugárzás („fotókapcsoló”) hatására (MEISLITZER-RUPPITSCH 2009). Például fotókonverzió után egy korábban zölden világító festék pirosan világít.

A DAB (3,3'-diaminobezidin) képletét a IV.22. ábra mutatja:



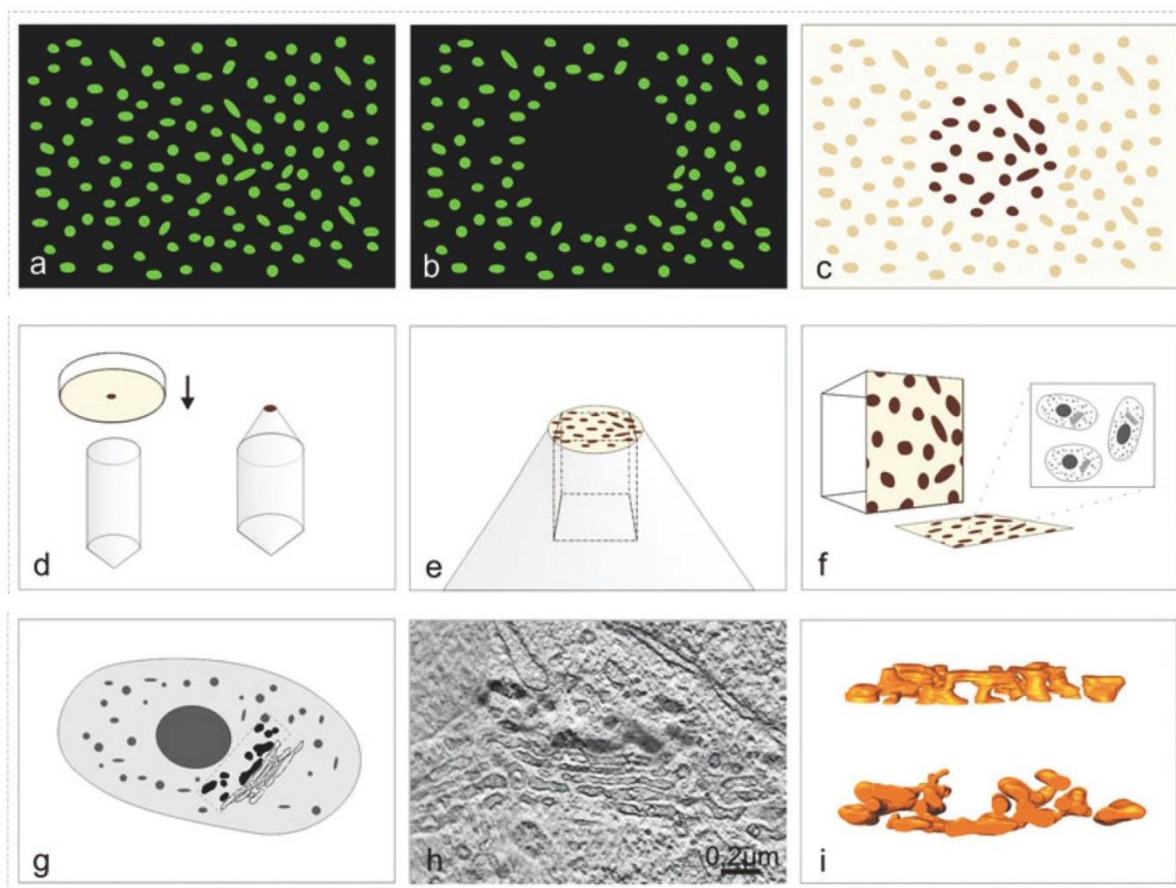
IV.22. ábra. DAB (diaminobenzidin) (WIKIPEDIA)

A DAB-bal történő fotóoxidáció egyik részvevője egy fluoreszcens festék, amely intenzív megvilágításkor, oxigén jelenlétében, fluoreszkálása közepette, reaktív oxigént (szinglet oxigén párhuzamos spinekkal, $^1\text{O}_2$) termel. Ennek hatására a DAB oxidálódik, nagyon kis szemcsés, oldhatatlan barna polimerré válik. A fluoreszcens festék és a környezeti oxigén jelenléte fontos a reaktív oxigén létrejöttéhez. Minden olyan esetben, amikor a környezeti oxigént argonnal, (DEERINCK 1994), nitrogénnel (SANDELL 1988) vagy más gázokkal helyettesítették le, a fotóoxidáció nem ment végbe.

A reaktív oxigén rövid élettartama miatt a fluoreszcensen jelölt tárgy és a DAB polimer helye egybeesik. A DAB polimerizálódása nemcsak elektronmikroszkópban, de fluoreszcens mikroszkópban és világos-látóterű fénymikroszkópban is nyomon követhető a folyamatban résztvevő festék fluoreszcenciája miatt. A DAB csapadék elektronmikroszkópos kontrasztját ozmiumtetroxiddal növelik, mert a DAB aktívan kötődik az ozmiumhoz (ozmiofil).

A DAB fotóoxidációját először Maranto használta: lucifer sárga fluorokrómot injektált intracellulárisan piócák idegsejtjeibe és a DAB-ból keletkezett barna polimert vizsgálta elektronmikroszkóppal (MARANTO 1982).

A DAB fotóoxidációján alapuló CLEM sémája IV.23. ábrán látható:



IV.23. ábra. A DAB fotóoxidációján alapuló CLEM fő lépései vázlatosan
(MEISSLITZER-RUPPITSCH 2009)

a/ fluoreszcensen világító sejt kultúra fedőlemezen fotóoxidáció előtt, b/ fotóoxidáció után megszűnik a fluoreszcencia a besugárzott kör alakú területen, c/ barna DAB precipitátumok keletkeztek a korábban megvilágított területen, d/ ozmiumtetroxidos kezelés és víztelenítés után, a DAB-os területet Epon-gyantával töltött kapszulára helyezik, e/ a vizsgálandó terület a megkötött gyanta, csonka kúp alakúra trimmelt tetején, f/ minták szeletelése fény- és elektronmikroszkópos vizsgálathoz, g/ a vizsgálandó terület képe, h/ tomográfiás szelet mutatja a Golgi-kompartment egy részét DAB precipitátumokkal, i/ a Golgi-kompartment modelljének vetületei

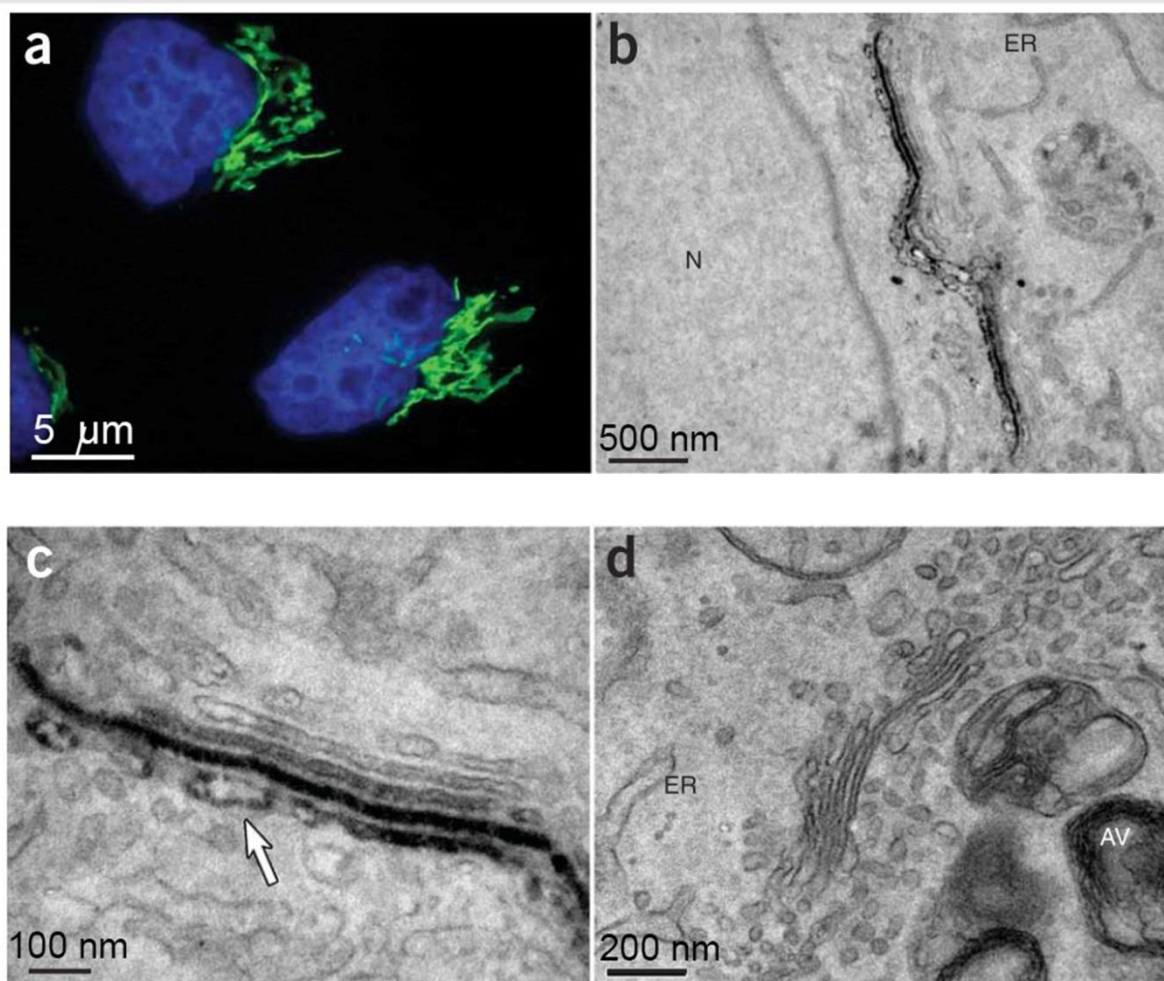
A DAB kereskedelmi forgalomban kapható. (Hello Bio, Vector Laboratories, Cell Signaling Technology). Óvatosan kezelendő feltételezett rákkeltő hatása miatt. A fotóoxidáció

részletesebb megismeréséhez ajánljuk Meisslitzer-Ruppitsch és munkatársainak 2009-es és 2012-es közleményét (MEISSLITZER-RUPPITSCH 2009 és 2012).

A DAB a lucifer sárga fluoreszcens festéken kívül például eozinnal is használható (DEERINCK 1994). Sandell 10 fluoreszcens festéknek és a DAB-nak a kapcsolatát vizsgálta (SANDELL 1988). Mi itt csak a DAB-bal leggyakrabban kombinált festékeket, a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) és származékait, a miniSOG-ot és a ReAsH-t emeljük ki.

IV.3.1. DAB fotóoxidáció GFP és GFP-szerű festékekkel

GFP és DAB kombinációját először Grabenbauer használta fel korrelatív fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokra. (GRABENBAUER 2005). Vizsgálati módszerét GRAB-nak nevezte el a GFP Recognition After Bleaching kifejezés alapján. A módszer nem tér el attól, amit fent leírtunk: a GFP megvilágításakor: a fluoreszcenciája reaktív oxigént fejleszt, ami oxidálja a DAB-ot. Ez ozmiumtetroxid (OsO_4) hatására elektronokra átlátszatlaná válik. ezáltal ultrastrukturális vizsgálatokat tesz lehetővé az elektronmikroszkópban. Biológiai szempontból a reaktív oxigén termelése több élőlénynél az anyagcsere természetes következménye. (Az oxidáció magát a fluoreszcens sugárzást elhalványítja, fotókifakulást (bleaching) okozva.)

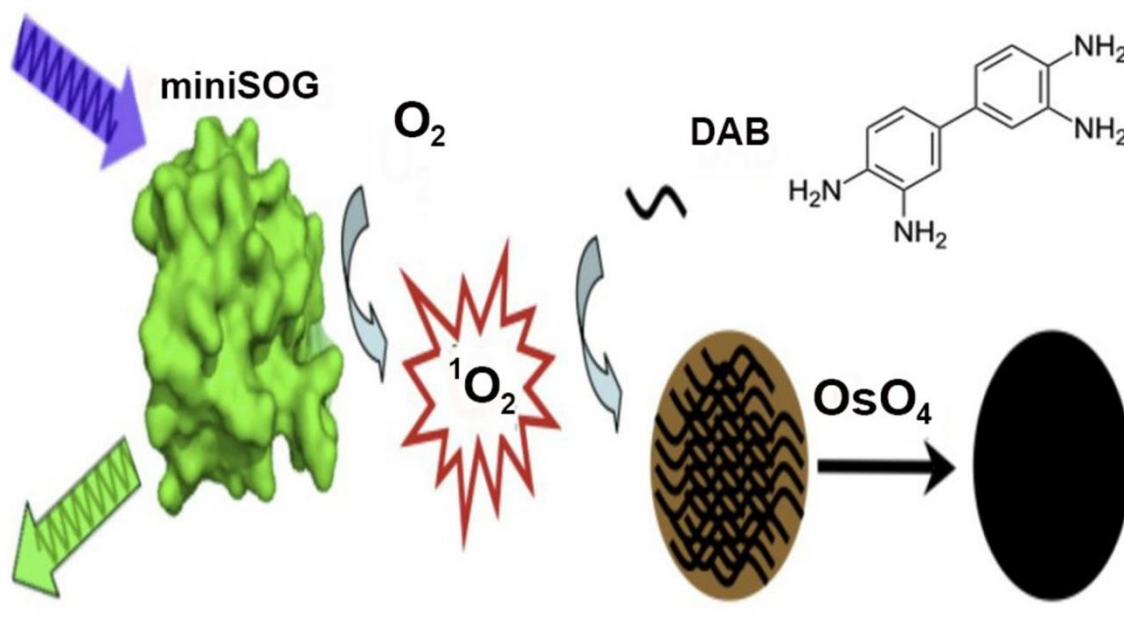


IV.24. ábra. Az EGFP fotóoxidációja polimerizálja a DAB-ot elektronmikroszkópban is látható csapadékká. (GRABENBAUER 2005)

a/ HeLa sejtekben lévő GalNAc-T2 és EGFP fúziós fehérjéjének zöld fluoreszcens képe. (A GalNAc-T2 enzim jelenléte a Golgi-készülékre jellemző.) (WIKIPEDIA, GALNT2), b/ Fotóoxidáció és eponba való beágyazás után a DAB azonosítható az elektronmikroszkópban. (N- sejtmag, ER- endoplazmatikus retikulum), c/ A kép megerősíti a jószolt GalNAc-T2 topológiát (nyíl jelzi), d/ A kontrollmérés EGFP nélkül nem mutat precipitátumot a Golgi-készülékben megvilágítás után

IV.3.2. DAB fotóoxidáció miniSOG-gal

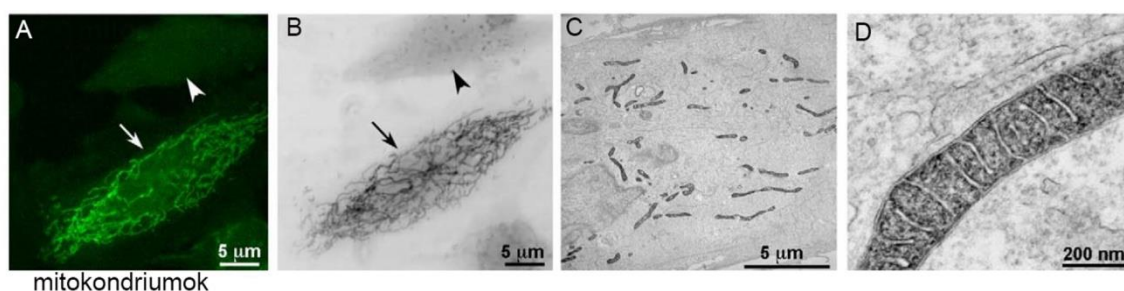
Minthogy a GFP oxidációs képessége a DAB-ot illetően nem túl nagy, ezért kifejlesztettek egy más, erősebben oxidáló fehérjét, a miniSOG-ot (Mini Singlet Oxygen Generator) (SHU 2011). A miniSOG egy 106 aminosavból álló, 13,9 kD tömegű, fluoreszcens flavoprotein, fotoreceptor, amelyet *Arabidopsis phototropin 2*-ből készítettek.



IV.25. ábra. MiniSOG és DAB (PERKINS 2014).

Amikor O_2 jelenlétében kék fénnel gerjesztik a miniSOG-ot, akkor az szinglet oxigént termel ($^1O_2$), amely az O_2 -nek egy reaktív, rövid élettartamú gerjesztett állapota. Ez a szinglet oxigén oxidálja és polimerizálja a diaminobenzidint (DAB) egy lokalizált, ozmiumra érzékeny anyaggá. Az ozmiumtetroxidnak (OsO_4) a DAB-hoz való hozzáadása növeli az elektronmikroszkópos kontrasztot

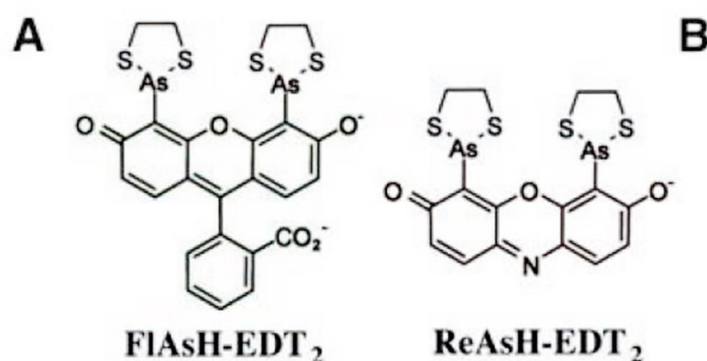
(A miniSOG-nak még szüksége van egy flavin mononukleid (FMN) kofaktorra is, ami a riboflavin vitaminból származik, de ez a mitokondriális sejtek vizsgálatakor mindig jelen van a sejtben.) A miniSOG-ot is genetikai úton kódolják a vizsgálandó mintába, mint a GFP-t.



IV.26. ábra. Mitokondrium korrelatív fény és elektronmikroszkópos vizsgálata miniSOG segítségével (SHU 2011). A/ Két mitokondrium képe fluoreszcens mikroszkópban fotóoxidáció előtt. A lefelé mutató nyíl egy miniSOG-gal transzfektált mitokondriumot mutat. A felfelé mutató nyílfeje egy nem transzfektált mitokondriumot jelöl. B/ Konfokális fénymikroszkópos kép az A/ ábrával megegyező terepen fotóoxidáció után. C/ és D/ elektronmikroszkópos képek, amelyek a sejtmaghoz közeli kromatin szálakat mutatnak kisebb (C) és nagyobb nagyításban (D)

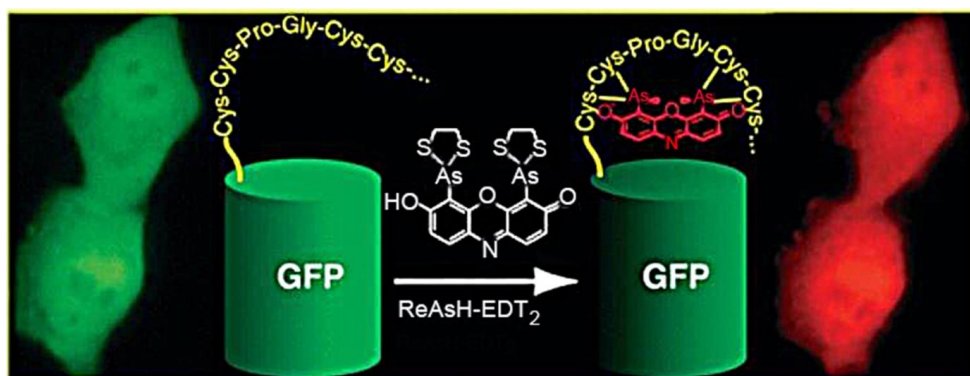
IV.3.3. DAB fotóoxidáció FAsH és ReAsH-val

A GFP viszonylag kismértékű reaktív oxigén termelését a miniSOG-on kívül más módon is lehetett növelni, például FAsH és ReAsH segítségével. (GAIETTA 2006, GIEPMANS 2005). A FAsH és ReAsH két arzéntartalmú festék. Fluoreszcencia szempontjából hasonló a viselkedésük, ezért együtt tárgyaljuk őket. A molekulák jellemzője a két arzén és a négy kén atom (IV.27. ábra):



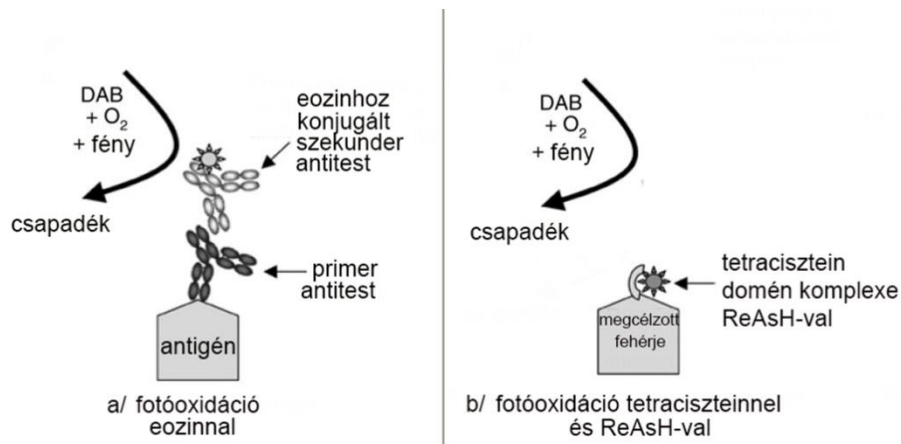
IV.27. ábra. Két oxigén-termelésben közreműködő fluoreszcens vegyület

A FAsH a fluorescein, a ReAsH pedig rezorufin származéka. Mindkét jelölő reagens szintelen és csak akkor válik fluoreszcensé, ha találkozik egy tetracisztein motívummal. A motívum négy cisztein aminosavon (Cys) kívül még két aminosavat tartalmaz. Optimális esetben az aminosavak sorrendje Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys. Ezt a motívumot genetikai úton juttatják be a GFP-be. azzal a céllal, hogy a GFP reaktív oxigén termelését növelje. (GRIFFIN 1998). A IV.28. ábra azt mutatja, hogy a GFP-be genetikailag kódolt cisztein motívum a ReAsH hatására vörös fényben fluoreszkál.



IV.28. ábra. Fotooxidáció tetraciszteinnel és ReAsH-val. (ADAMS 2002)

Ha CLEM-re akarjuk használni a FIASH-t vagy a ReASH-t, akkor a DAB jelenléte is szükséges. A FIASH és a ReASH is membrán-permeábilis, így permeabilizálásra nincs szükség. A következő ábra azt szemlélteti, hogy a ReASH az eozin-hoz képest kisebb méretű, ezáltal pontosabb lokalizációt tesz lehetővé.



IV.29. ábra. DAB fotóoxidációja a/ eozinnal, illetve ReASH-val b/ (SOSINSKY 2007)

Irodalom

- ADÁMAS, Adámas Nanotechnology, Intro to Fluorescent Nanodiamonds, https://www.youtube.com/watch?v=aD3A_BbGT1Q, Letöltés 2022. szept. 5.
- ADAMS, S. R. *et al.* (2002): New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological application, *J. Am. Chem. Soc.* 124,21, 6063-6076.
- BOISVERT, F-M. *et al.* (2000): Promyelocytic Leukemia (PML) Nuclear Bodies Are Protein Structures that Do Not Accumulate RNA, *The Journal of Cell Biology* Vol.148, Number 2, 283-292.
- COLLMAN, F. *et al.* (2015): Mapping Synapses by Conjugate Light-Electron Array Tomography, *The Journal of Neuroscience*, 35(14), 5792-5807.
- DE BRABANDER, M. *et al.* (1986): The Use of Submicroscopic Gold Particles Combined With Video Contrast Enhancement as a Simple Molecular Probe for the Living Cell, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 6, 105-113.
- DEERINCK, T. J. *et al.* (1994): Fluorescence Photooxidation with Eosin: A Method for High Resolution Immunolocalization and In Situ Hybridization Detection for Light and Electron Microscopy, *The Journal of Cell Biology*, 126,4, 901-910.

- DEERINCK, T. J. *et al.* (2008): The Application of Fluorescent Quantum Dots to Confocal, Multiphoton, and Electron Microscopic Imaging, *Toxicol Pathol.* 36(1), 112-116. doi: 10.1177/0192623307310950
- GAIETTA, G. M. *et al.* (2006): Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy, *PNAS* 103, 47, 17777-17782.
- GIEPMANS, B. N. G. *et al.* (2005): Correlated light and electron microscopic imaging of endogenous proteins using Quantum dots, *Nature Methods* 2, 10, 743-749.
- GRABENBAUER, M. *et al.* (2005): Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation, *Nature Methods*, 2,11, 857-862.
- GRIFFIN, B. A. *et al.* (1998): Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells, *Science* 281, 269-271.
- HAINFELD, J. F. (1987): A Small Gold-Conjugated Antibody Label: Improved Resolution for Electron Microscopy, *Science* 236, 450-453.
- HAMELAAR, S. R. *et al.* (2017): Nanodiamonds as multi-purpose labels for microscopy, *Scientific Reports*, doi: 10.1038/s41598-017-00797-2.
- HAN, S. *et al.* (2019): High-Contrast Imaging of Nanodiamonds in Cells by Energy Filtered and Correlative Light-Electron Microscopy: Toward a Quantitative Nanoparticle-Cell Analysis, *Nano Lett.* 19, 2178-2185.
- HSIAO, W. W-W. *et al.* (2016): Fluorescent Nanodiamond: A Versatile Tool for Long-Term Cell Tracking, Super-Resolution Imaging, and Nanoscale Temperature Sensing, *Acc. Chem. Res.* 49, 400-407.
- JENNINGS, T. L. *et al.* (2006): Fluorescent Lifetime Quenching near d=1.5 nm Gold Nanoparticles: Probing NSET Validity, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5462-5467.
- KARREMAN, M. A. *et al.* (2009): Discovery of a new RNA-containing nuclear structure in UVC-induced apoptotic cells by integrated laser electron microscopy, *Biol. Cell* 101, 287-299.
- KARREMAN, M. A. *et al.* (2013): Novel Contrasting and Labeling Procedures for Correlative Microscopy of Thawed Cryosections, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 61(3), 236-247.
- MARANTO, A. R. (1982): Neuronal Mapping: A Photooxidation Reaction Makes Lucifer Yellow Useful for Electron Microscopy, *Science*, 217, 953-955.
- MEISLITZER-RUPPITSCH, C. *et al.* (2009): Photooxidation technology for correlated light and electron microscopy, *Journal of Microscopy*, 235(3), 322-335.

- MEISSLITZER-RUPPITSCH, C. *et al.* (2012): Photooxidation technology for correlated light and electron microscopy, D.J. Taajes and J. Roth (eds), *Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 931, 423-436, doi: 10.1007/978-1-62703-056-04_21.
- MOORE, L. *et al.* (2016): Biocompatibility Assessment of Detonation Nanodiamond in Non-Human Primates and Rats using Histological, Hematologic, and Urine Analysis, *ACS Nano*, 10, 7385-7400.
- NISMAN, R. *et al.* (2004): Application of Quantum Dots as Probes for Correlative Fluorescence, Conventional, and Energy-filtered Transmission Electron Microscopy, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 52(1), 13-18.
- PERKINS, G. A. (2014): The Use of miniSOG in the Localization of Mitochondrial Proteins, *Methods in Enzymology* Vol. 547, 165-179, ISSN 0076-6879, doi: 10.1016/B978-0-12-801415-8.00010-2.
- POWELL, R. D. *et al.* (1997): A Covalent Fluorescent-Gold Immunoprobe: Simultaneous Detection of Pre-mRNA Splicing Factor by Light and Electron Microscopy, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45(7), 947-956.
- REINECK, P. *et al.* (2016): Brightness and Photostability of Emerging Red and Near-IR Fluorescent Nanomaterials for Bioimaging, *Adv. Optical Mater.* doi: 10.1002/adom.201600212.
- RESCH-GENGER, U. *et al.* (2008): Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, *Nature Methods* Vol.5. No.9, 763-775,
- RESEARCH GATE, Fluorescence image of CdSe quantum dots as a function of size, https://www.researchgate.net/figure/Fluorescence-image-of-CdSe-quantum-dots-as-a-function-of-size-Courtesy-Bawendi-MIT_fig1_47643023
- ROBINSON, J. M. *et al.* (2000): Application of gold cluster compounds in immunocytochemistry and correlative microscopy: comparison with colloidal gold, *Journal of Microscopy*, 199, 3, 163-179.
- SANDELL, J. H. *et al.* (1988): Photoconversion of Some Fluorescent Markers to a Diaminobenzidine Product, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 36,5, 555-559.
- SHENDEROVA, O. *et al.* (2015): Science and engineering of nanodiamond particle surfaces for biological applications (Review), *Biointerphases* 10(3), 030802-1 - 030802-23. doi: 10.1116/1.4927679

- SHU, X. *et al.* (2011): A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms, *PLoS Biol* 9(4): e1001041, doi: 10.1371/journal.pbio. 1001041.
- SOSINSKY, G. E. *et al.* (2007): Markers for Correlated Light and Electron Microscopy, *Methods in Cell Biology*, Vol.79. 575-591. doi: 10.1016/ S0091-679X(06)79023-9.
- TAKIZAWA, T. *et al.* (2003): Correlative Microscopy of Ultrathin Cryosections is a Powerful Tool for Placental Research, *Placenta* 24, 557-565.
- TAKIZAWA, T. *et al.* (2015): FluoroNanogold: an important probe for correlative microscopy, *J Chem Biol* 8, 129-142.
- THERMOFISHER , Qdot® Nanocrystal Technology Overview,
<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/qdot/technology-overview.html>.
- YU, S-J. *et al.* (2005): Bright Fluorescent Nanodiamonds: No Photobleaching and Low Cytotoxicity, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 17604-17605.

V. Különálló és integrált mikroszkópok a CLEM-hez

A CLEM végrehajtására két lehetőség van, az egyik esetben külön fénymikroszkópban és külön elektronmikroszkópban végzik a mérést (szekvenciális CLEM), a másik esetben az integrált CLEM-ben egybe építik a fény- és az elektronmikroszkópot.

A szekvenciális CLEM előnye, hogy nem kell speciális berendezést építeni vagy vásárolni, hanem a rendelkezésre álló mikroszkópokat lehet használni. Továbbá az is előny, hogy a fény- és elektronmikroszkópos minta-előkészítési eljárások közzé, amelyek gyakran nem kompatibilisek egymással, olyan lépéseket iktathatunk be, amelyek ezeket a problémákat csökkentik vagy megszüntetik. Hátránya viszont, hogy olyan jelölésekről kell gondoskodni a fénymikroszkópos vizsgálatban, hogy a fénnel vizsgált mintaterület könnyen és pontosan újra megtalálható legyen az elektronmikroszkópban. A mintának a fénymikroszkópból az elektronmikroszkópba való áthelyezése veszélyeztetheti a minta tisztaságát, eredeti állapotát.

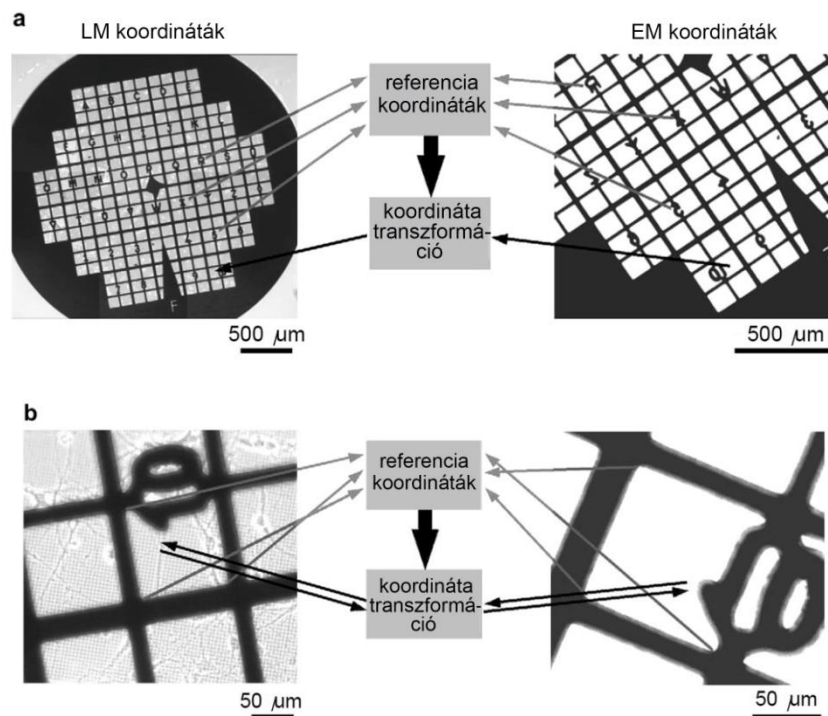
Az integrált megoldás előnye, hogy a mintát nem kell egyik berendezésből a másikba áthelyezni, a szennyeződések elkerülhetjük és a megcélzott terület újra megtalálása nem jelent problémát.

V.1. Különálló fény- és elektronmikroszkóp CLEM-hez

V.1.1. Szimbólumokkal ellátott rács felhasználása a relokációhoz

Különálló fény- és elektronmikroszkóp CLEM-hez való alkalmazásakor szükség van a fénymikroszkópban vizsgált terepnek az elektronmikroszkópban való újra megtalálására (relokációjára). Erre számos módszert fejlesztettek ki, ezek közül mutatunk be néhányat. Általánosságban elmondhatjuk, hogy amikor a CLEM-ben SEM-et alkalmaznak, akkor a keresésre szolgáló rács a fedőlemez üvegbe van bemarkatva, amikor TEM-et alkalmaznak, akkor a szimbólumokkal ellátott mintatartó mikrostély segít a tájékozódásban.

Lucic és munkatársai egy szoftver alapú korrelációs módszert mutatnak be, amelyet számokkal és betűkkel ellátott elektronmikroszkópos mikrostélyon kalibrálnak két lépésben.



V.1. ábra. Korreláció létrehozása különálló fény- és elektronmikroszkóp esetén (lásd a szöveget)
(LUCIC 2007)

Az első lépésben (V.1.a ábra) fénymikroszkóp alatt kis nagyításban (10x-20x) meghatározzák a szimbólumokkal ellátott teljes mikrostély (angolul finder grid) három szimbólumának a koordinátáit. Ezek után megméri az elektronmikroszkópban ugyanezen szimbólumok koordinátáit. Ebből meghatározzák a koordináta transzformációt, benne három paraméterrel, a nagyítással, a translációval és a rotációval.

A második lépésben (V.1.b ábra) a vizsgált terephez közeli rács sarkainak koordinátáit méri meg az előzőnél nagyobb nagyításban és tekintik referencia értéknek. Ezáltal egy pontosabb korrelációhoz jutnak. A transzformáció képletét lásd az idézett közleményben (LUCIC 2007).

Amennyiben a fénymikroszkópos vizsgálat megelőzi a beágyazással járó elektronmikroszkópos vizsgálatot, akkor célszerű a mintaelőkészítéskor olyan üveglemezt használni, amelybe szimbólumokkal jelölt rácsot maratnak. Ugyanis a fénymikroszkópozást követő minta-beágyazáskor a beágyazó gyanta képes az üvegbe maratott rácsot és a szimbólumokat is átvinni az elektronmikroszkópba. A MatTek cég termékei olyan műanyag csészék, amelynek alján maratással jelölt rácsot tartalmazó üveg fedőlemez helyezkedik el (V.2. ábra).



V.2. ábra. a/ Műanyag MatTek csészék, b/ rácsos mintázat a csészék alján elhelyezett üveg fedőlemezen (MATTEK)

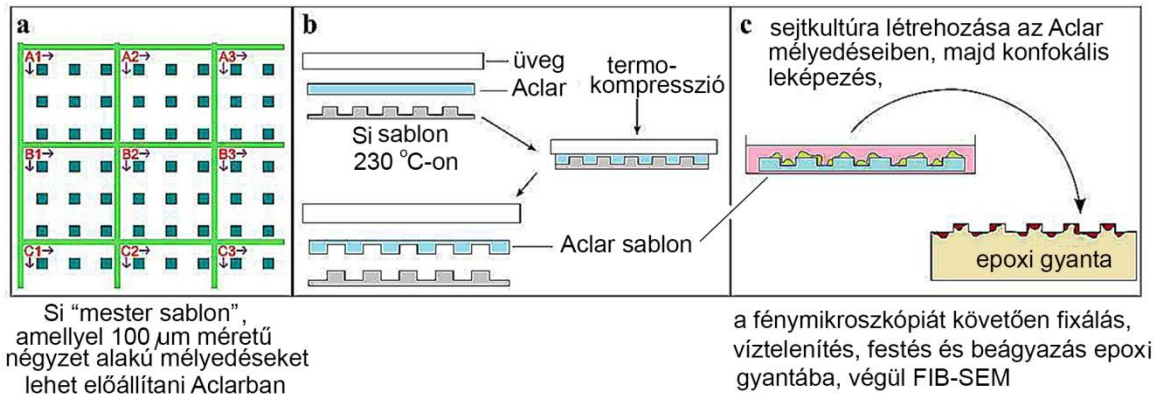
A V.3. ábrán mutatunk egy sémát a rácsos aljzatú MatTek csésze alkalmazására CLEM-hez.



V.3. ábra. MatTek csésze alkalmazása fény- és elektronmikroszkópos vizsgálat közötti korreláció meghatározására (lásd a szöveget) (POLISHCHUK 2012)

A MatTek csészében elvégzik a sejtnövesztést, a fluoreszcens festést, és a konfokális fénymikroszkópos vizsgálatot. Ezt követi az arannyal való jelölés, ami az immun-elektronmikroszkópia címszó alatt került leírásra. Az antitesthez kötött arany szemcséket az antigén-antitest kölcsönhatás segítségével juttatjuk el a megcélzott helyre. A minta beágyazása során a csésze alján lévő rácshálózat megőrződik a beágyazó gyantán. A gyanta mikrotomos szeletelése után a rács segít abban, hogy a korábban fénymikroszkóppal vizsgált terepet az elektronmikroszkópban megtaláljuk.

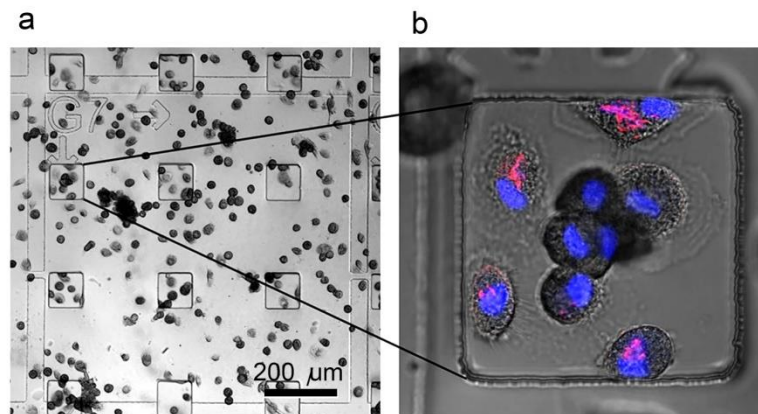
Nagyon hasonló a hőre lágyuló aklár műanyag alkalmazása, amikor is egy szilícium lapkáról kerül át egy referencia koordináta rendszer az aklárra termokompresszió segítségével (V.4. ábra).



V.4. ábra. Jelölésekkel ellátott Si sablon és aklár alkalmazása a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálat közötti korrelációhoz (BECKWITH 2015)

A 100 mikron méretű mélyedésekkel teli aklár sablonban történik a sejtnövesztés, konfokális mikroszkópos vizsgálat, majd a minta- előkészítés (fixálás, víztelenítés, festés, epoxi gyantába történő beágyazás) az elektronmikroszkópos vizsgálatához.

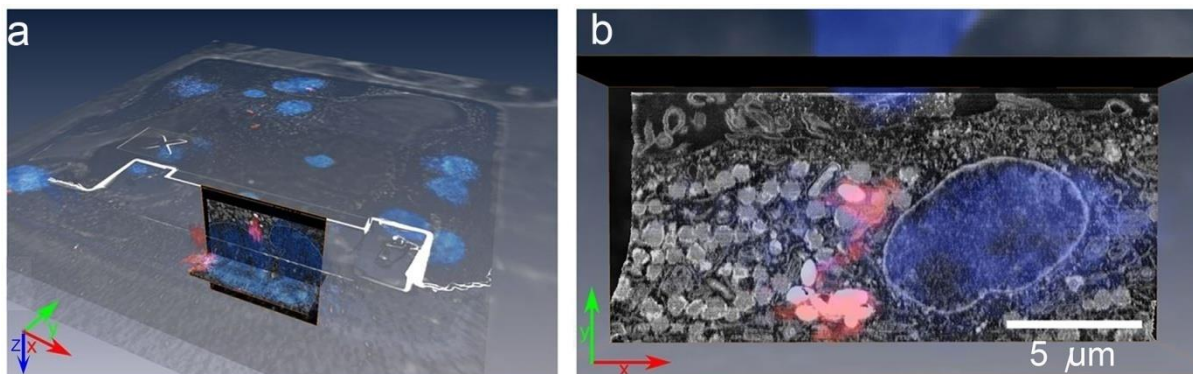
Egy konkrét példában Beckwith és munkatársai aklár hordozón humán makrofágokat tenyésztettek és fertőztek meg CFP-vel (Cyan Fluorescent Protein) genetikai úton megfestett *Mycobacterium avium*-mal, hogy ezeket a baktériumokat vizsgálni tudják. (BECKWITH 2015)



V.5. ábra. Aklár sablonon növesztett és CFP-vel megfestett *Mycobacterium avium* fénymikroszkópos képei fixálás és beágyazás előtt. a/ DIC (differenciális interferencia kontraszt) kép, a bal felső sarkában látható a terep azonosítására szolgáló G7 szimbólum. b/ konfokális fluoreszcens mikroszkópos képre helyezett DIC felvétel. A sejtmagok kéken, a baktériumok pirosan láthatók. A konfokális fénymikroszkópos felvételek után következett a minta preparálása FIB-SEM-re az V.4.c/ ábra) szerint (BECKWITH 2015)

Mind a konfokális mikroszkóp, mind pedig a FIB-SEM alkalmas a harmadik dimenzió feltárására. A konfokális képek (x-y sík) és a FIB-SEM képek (x-z sík) iránya merőleges

egymásra (V.6. a/ ábra). Az a/ ábra két foltokkal díszített része a korábbi egyetlen aklár „gödör”-ből származó gyanta blokk.

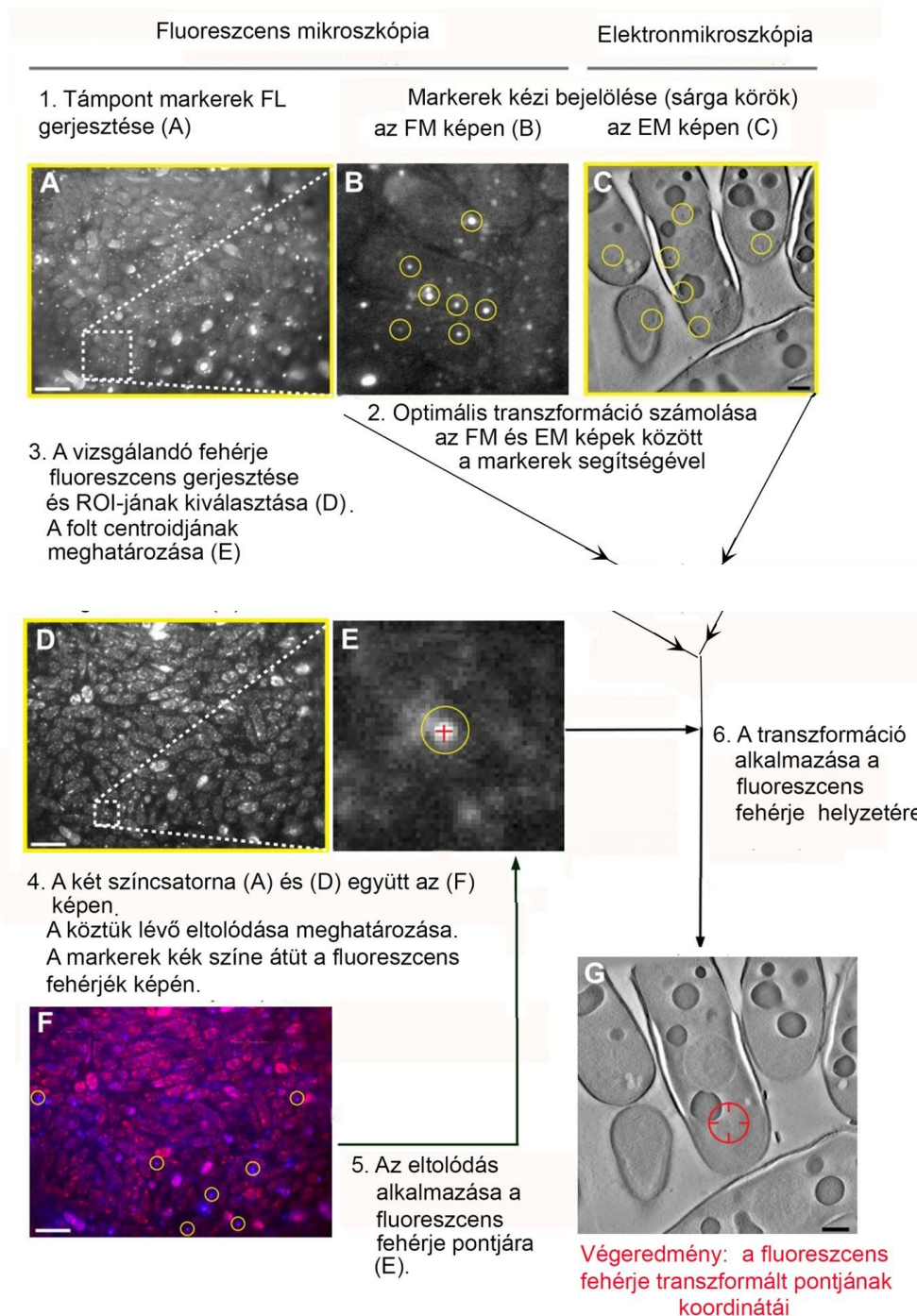


V.6. ábra. A CFP-vel megfestett *Mycobacterium avium*-mal fertőzött makrofágok konfokális fluoreszcens és FIB-SEM képének korrelálása, három dimenzióban (a/ ábra) és két dimenzióban (b/ ábra). A sejtmagok kék a baktériumok piros színűek

A 3D és 2D korrelációt Avizo szoftverrel végezték. A képfeldolgozás és analízis szempontjából fontos Avizo és Amira programokat (AVIZO, WIKIPEDIA és AMIRA, WIKIPEDIA) a ThermoFisher Scientific árusítja. A „rokon” programok (közös fejlesztők) közül az egyik az anyagtudományban a másik a biológiai tudományokban élvez elsőbbséget. A CLEM korrelációhoz szükség volt nemcsak FIB-SEM szekunderelektron képeire, de a porlasztó ionnyaláb által készített ionképekre is. Továbbá felhasználták mind a fény- mind pedig az elektronmikroszkópos képeken a 100 μm széles blokk élétől mért távolságokat is.

V.1.2. Fluoreszcens mikro-gömböcskék, mint támpont markerek

Nagy pontosságú (jobb, mint 100 nm) lokalizációra találunk protokollt Kukulski munkájában (KUKULSKI 2012). A korrelációra támpont markerként (fiducial marker) fluoreszcens mikro-gömböcskéket használtak, amelyek láthatók mind a fény- mind pedig az elektronmikroszkópban. A vizsgálandó fehérjébe vörös fluoreszcens fehérjét juttattak, és a mintát hidrofíli Lowicryl gyantába ágyazták be. Az V.7. A/ ábrán a (kék) fluoreszcens támpont markerek képe látható fluoreszcens mikroszkópban fekete-fehérben. A B/ és C/ ábrán kézzel bejelölték a fluoreszcens mikro-gömböcskéket a fény- és elektronmikroszkópos felvételen. Ezek lehetőséget adnak a két rendszer közötti transzformáció meghatározására. A D/ ábrán a vizsgálandó fehérje terepének kiválasztása látható a fluoreszcens mikroszkóp vörös színcsatornájában. A markerek mérése a kék színcsatornában történt. A pontosság növelése érdekében meghatározzák a vörös folt centroidját (E/ ábra).

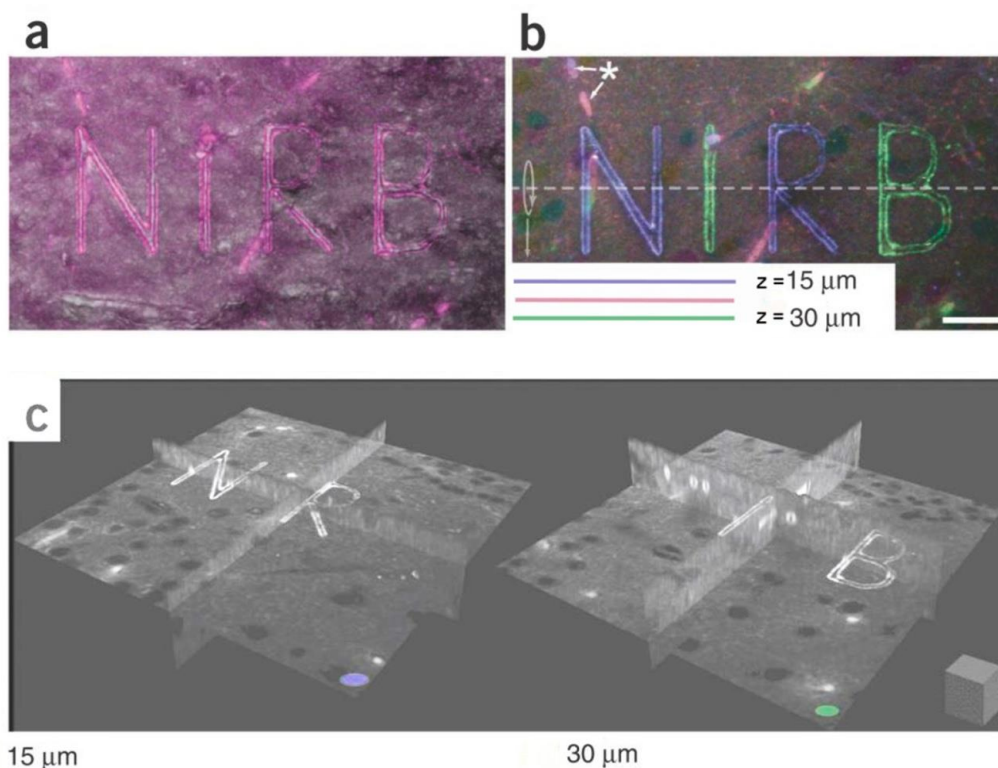


V.7. ábra. Fluoreszcens támpont markerek (mikro-gömböcskék) alkalmazása a fény és elektronmikroszkóp közötti korreláció meghatározására (KUKULSKI 2012) (lásd a szöveget)

A támpont markerek kék és a vizsgált fluoreszcens fehérje vörös színcsatornája közötti eltérést az F/ábrán látható, egymásra helyezett felvétel segítségével korrigálják. Ezt az eltérést veszik figyelembe a B és C ábra segítségével megállapított transzformációban. A végeredmény a vörös fluoreszcens fehérje elektronmikroszkópos koordinátái (G ábra)

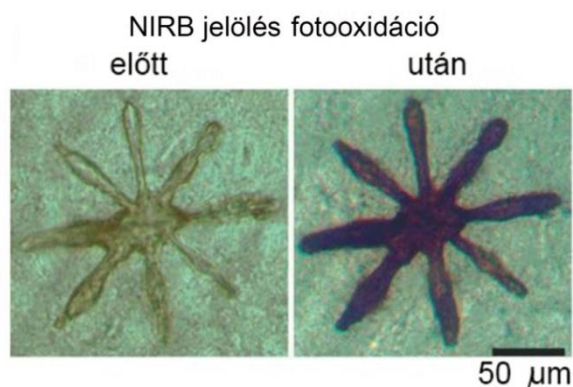
V.1.3. Jelölés beégetése közeli infravörös fénnel

Infravörös lézerrel beégetett jel is szolgálhat háromdimenziós támpont markerként az FM és EM közötti korreláció létrehozására. A módszer az irodalomban NIRB néven található meg,



V.8. ábra. Lézeres beégetéssel készült támpont markerek három különböző mintamélységben (z). Az a/ és b/ ábra mesterséges színezésű kétfotonos felvételek, egér agykérgéből vett, glutáraldehiddel fixált mintán. Az N és R betűk 15 μm , I és B betűk 30 μm mélységben lettek beégetve. A magenta színnel jelölt rész 15 és 30 μm között található. A c/ ábra a markerek háromdimenziós megjelenítésben (BISHOP 2011)

amely a Near Infrared Branding (beégetés közeli infravörös fénnel) kifejezés rövidítése (BISHOP 2011). A kétfotonos mikroszkópiában, a markerek beégetéshez femtoszekundumos titán-zafír lézert használtak és DAB fotooxidáció révén (IV.3. fejezet) tették a jeleket kontrasztossá az elektronmikroszkópos vizsgálat számára. A jelöléseket, amelyek autofluoreszcensek, a vizsgálandó területhez közel égetik be.



V.9. ábra. NIRB támpont marker transzmissziós fénymikroszkópos felvétele DAB (diaminobenzidin) fotooxidációja előtt és után (BISHOP 2011)

V.1.4. Környezeti pásztázó elektronmikroszkóp szekvenciális CLEM-hez

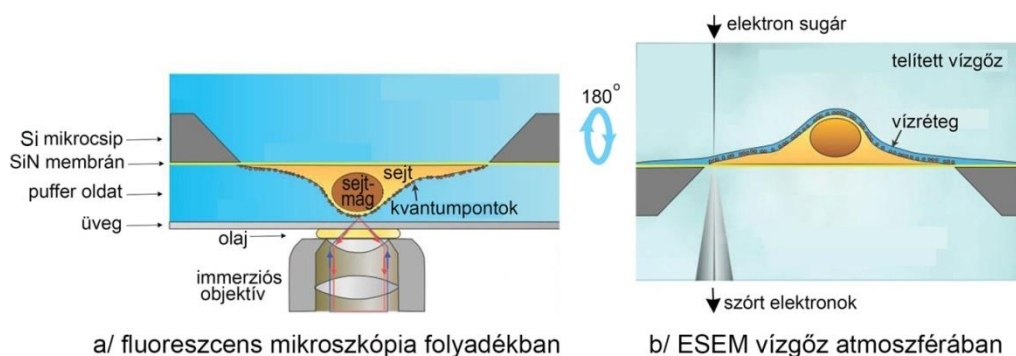
A környezeti pásztázó elektronmikroszkóp (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM) lehetővé teszi, hogy élő biológiai mintákat eredeti nedves állapotukban, a mikroszkóp telített vízgőzében vizsgálhassunk. Nem szükséges a mintákat dehidrálni, szénnel vagy fémmelel bevonni. A vízgőz megakadályozza, hogy a minta kiszáradjon.

Bizonyítékként élő atkákról ESEM-ben készített videofilmeket láthatunk az interneten http://www.danilatos.com/ESEM_videos.htm címen.

Az ESEM-ben a mikroszkóp belső terét két nyomáscsökkentő apertúrával három részre osztották és szekunder elektron detektor helyett a nedves minták vizsgálatára is alkalmas gáz-alapú detektort fejlesztettek ki. (Az ESEM definíciójához tartozik, hogy a nagyvákuumtól 609 Pa nyomástartományban működjön a leképezés. A 609 Pa úgy került a definícióba, hogy ennyi a desztillált víz telítési gőznyomása 0 °C-on.)

Mielőtt példát mutatunk be a fluoreszcens vizsgálatokat követő korrelatív ESEM vizsgálatokra, még egy pár szót az ESEM-ről és az ASEM-ről.

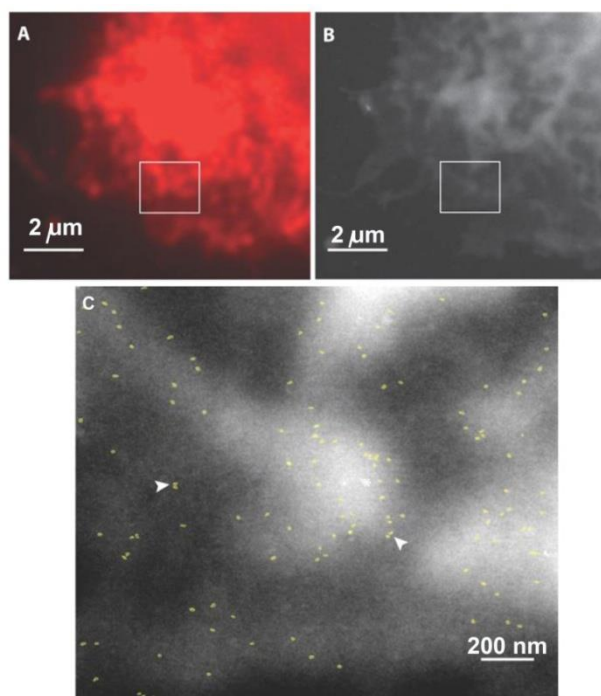
Az ESEM az atmoszferikus SEM (ASEM, Atmospheric Scanning Electron Microscope) utódja. Mindkettőt Danilatos szabadalmaztatta: az ASEM-et 1979-ben, az ESEM-et 1988-ban. (DANILATOS 1979, 1988). Az ASEM-re az integrált CLEM-nél visszatérünk.



V.10. ábra. Fény-és elektronmikroszkópia korrelálása folyadékban végzett fluoreszcens (a/) és környezeti elektronmikroszkóp (ESEM) vízgőzében végzett (b/) vizsgálatokkal (PECKYS 2015)

Peckys és munkatársai a HER2 (más néven ErbB2) transzmembrán fehérjék dimerizációját vizsgálták, tekintettel a HER2-nek az rákot okozó SKBR3 sejtvonalban betöltött erősítő szerepére. (NAGY 2002) A HER2 monomert biotinhoz, a fluoreszcens kvantumpontokat sztreptavidinhez kötötték, így a biotin-sztreptavidin kötésen keresztül kapcsolódhattak a kvantumpontok a HER2-höz. A V.10. a/ ábrán annak a kísérleti elrendezésnek a sémája látható, amelyben a kvantumpontokkal jelölt sejteket folyadékban olaj-immerziós fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálták. A mintát alulról üveg, felülről 50 nm vékony SiN membrán választotta el a külvilágtól. A SiN membrán ebben a vastagságban átlátszó az elektronokra. Az ilyen SiN membránt tartalmazó Si mikrocsippek kereskedelmi forgalomban kaphatók (<https://www.labtech.com>).

A fluoreszcens vizsgálatot követően a minta a mikrochippel együtt fejjel lefelé került az ESEM mikroszkópba, ahol 3 °C-on, 720–740 Pa nyomású telített vízgőzben vizsgálták 30 keV-es elektronokkal. (V.10. /b ábra). A mintát egy nagyon vékony vízréteg is fedte. A SEM-ben a minta alatt detektorként a STEM-ben használt körgyűrű alakú sötétlátóterű detektort alkalmaztak (annular dark-field detektor, AD-FD), mert annak jó az érzékenysége a mintában lévő rendszámkülönbségekre. 3 nm-es felbontást értek el.



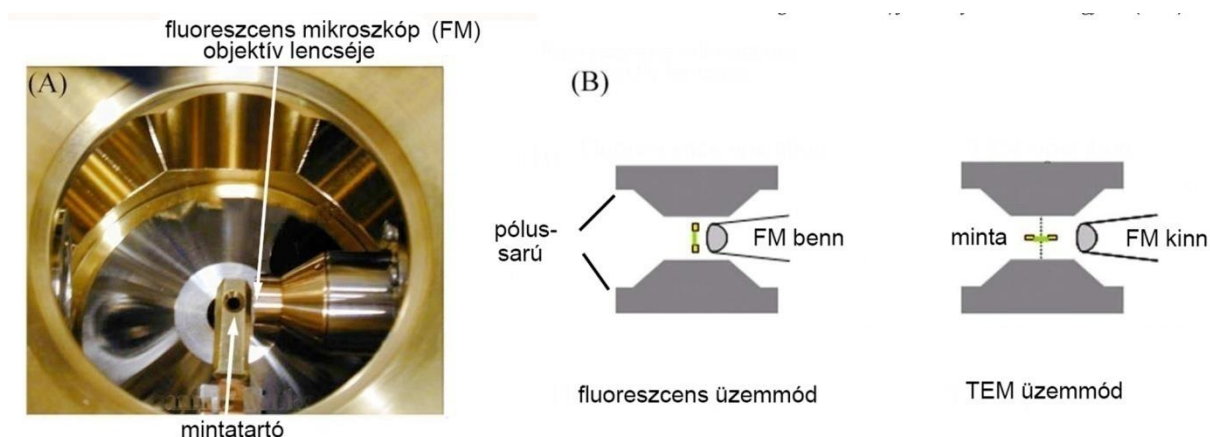
V.11. ábra. Szekvenciális korrelatív fény- és elektronmikroszkópos vizsgálat SKBR3 sejteken lévő, kvantumpontokkal jelölt HER2-n. a/ fluoreszcens kép. b/ ugyanazon terület ESEM képe. c/ a fehér négyzettel bekeretezett terület ESEM képe nagyobb nagyításban. Utólagosan sárgával lettek színezve az automatikusan detektált kvantum pontok. A két fehér nyíl dimer HER2-re mutat. A dimerizációnak jelentősége lehet a metasztázisban

V.2. Integrált fény- és elektronmikroszkóp CLEM-hez

Az integrált CLEM egyetlen berendezésbe egyesíti a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatot. A teljesség igénye nélkül bemutatunk négy kísérleti elrendezést, amelyek közül hármat kereskedelmi termékké fejlesztettek. Mint említettük, az integrált CLEM előnye a különálló fény- és elektronmikroszkóppal végzett mérésekhez képest az, hogy az egyik módszerrel vizsgált területnek a másikkal történő újra-megtalálásával (relokálásával) nincs probléma.

V.2.1. Fénymikroszkóp és transzmissziós elektronmikroszkóp integrálása

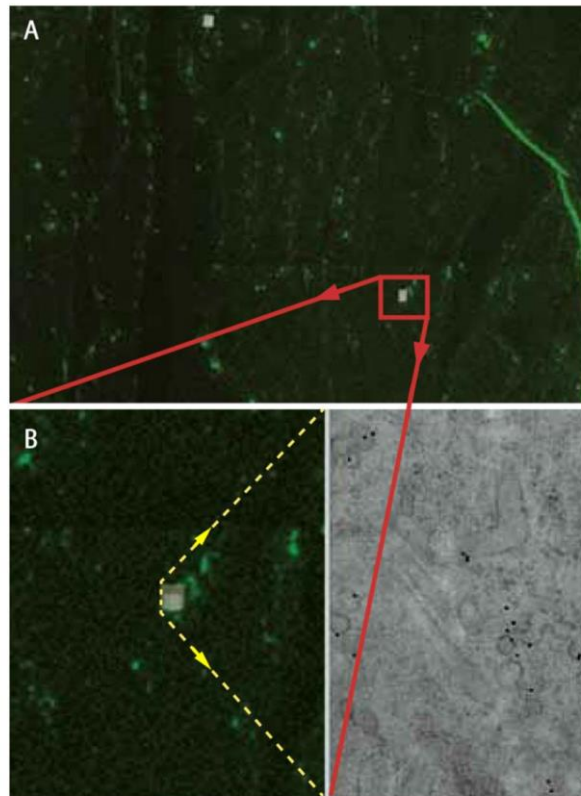
A transzmissziós elektronmikroszkóp és a pásztázó lézer fluoreszcens mikroszkóp egybeépítésére láthatunk példát az V.12. ábrán (AGRONSKAIA 2008). A fénymikroszkóp objektívje egy FEI Tecnai 12 típusú elektronmikroszkóp objektív pólussarújának 9 mm-es részében helyezkedett el (V.12. B/ ábra).



V.12. ábra. Integrált fény- és transzmissziós elektronmikroszkóp (AGRONSKAIA 2008)

TEM üzemmódban kihúzták a fénymikroszkópot az elektron sugármenetéből. Fénymikroszkópos üzemmódban a minta síkját párhuzamosra állították a TEM tengelyével és a fénymikroszkóp objektív lencséjét közelebb tolták a mintához. A minta gerjesztése lézerrel történt, a kijövő fluoreszcens fényt pedig dikroikus tükörrel választották el a gerjesztő fénytől. Detektálásra nagyérzékenységű lavina fotódiódát használtak. A vákuumban végzett fluoreszcens vizsgálatok során kisebb mértékű fotókifakulást találtak, mint ami levegőn szokott lenni. Ugyanis a fotókifakulás a szinglet oxigén következménye, ahhoz pedig normál oxigén is szükséges. Az integrált elrendezés gyors és pontos korrelációt eredményezett.

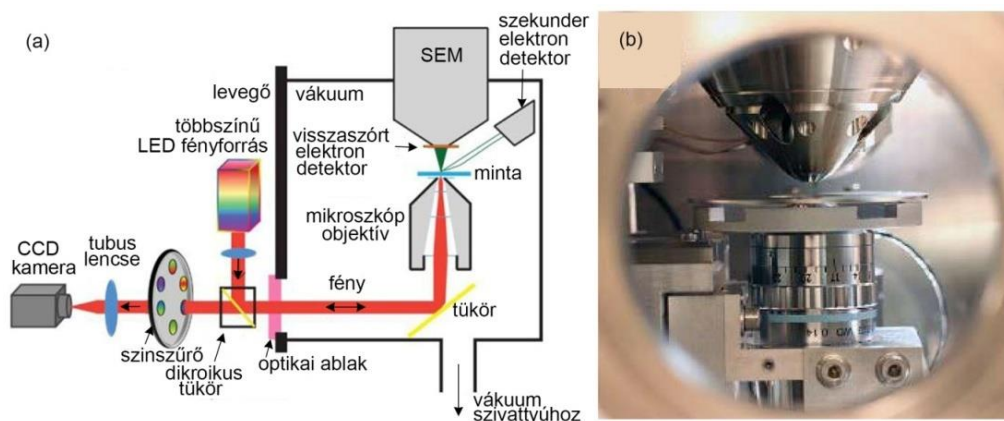
Az ismertett fény- és elektronmikroszkóp kombináció sikeres volt és a FEI vállalat (ma ThermoFisher) iCorr néven kereskedelmi terméket fejlesztett ki a Tecnai G² TEM-családot használva. Az iCorr gyors, pontos és automatizált korrelációt biztosít a fény és elektronmikroszkópos képek között. A fluoreszcens fénymikroszkópos feltét a TEM paramétereit nem rontotta. A FEI az integrálás lehetőségét krio-EM-re is kiterjesztette.



V.13. ábra. A/ A FEI Tecnai iCorr szoftvere automatikusan ráhelyezi a TEM képet a fluoreszcens képre. B/ mutatja a korrelált fény és elektronmikroszkópos képet, amelyre zoomolva a nagyfelbontású TEM kép látható (FEI Product Flyer)

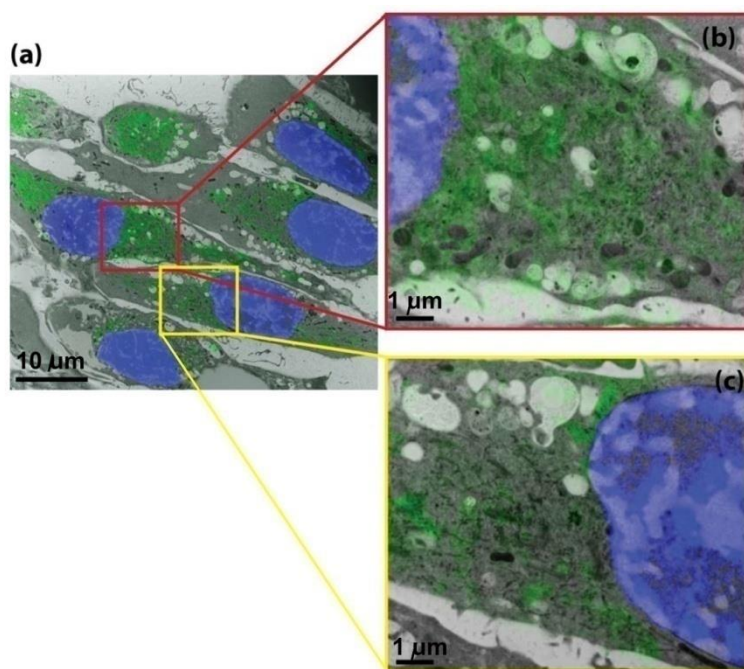
V.2.2. Fénymikroszkóp és pásztázó elektronmikroszkóp integrálása

A fénymikroszkópnak és a pásztázó elektronmikroszkópba (SEM) integrálását az V.14. ábra mutatja (LIV 2014 A).



V.14. ábra. a/ A fénymikroszkóp és a pásztázó elektronmikroszkóp integrálásának sémája. b/ A SEM kamrájának belseje: a SEM objektív lencséje alatt a minta és a fénymikroszkóp objektívje látható (LIV 2014 A)

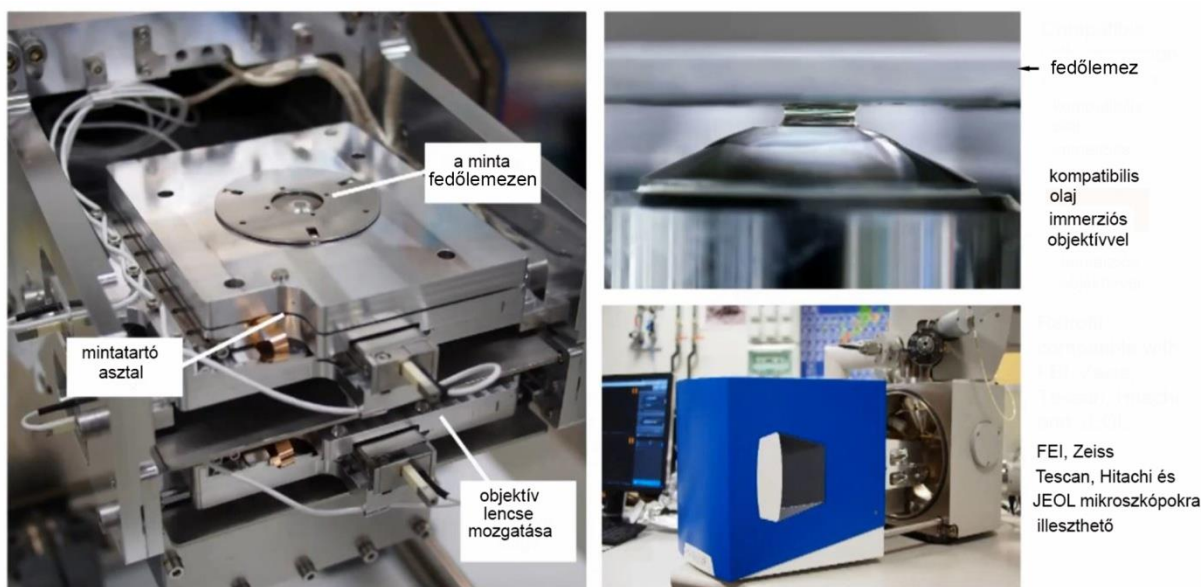
A szerzők többszínű SCLEM névvel illeték berendezésüket (multi-color Simultaneous Correlative Light-Electron Microscope). A több színű fluoreszcens gerjesztést LED fényforrások biztosították. Nagy numerikus apertúrájú (NA=1,4) olaj-immériós objektívet használtak az epifluoreszcens elrendezésű fénymikroszkópjukhoz. Alkalmazásként ló arteritis vírusának CLEM vizsgálatát mutatjuk, amelyben a vírusba GFP-t genetikai úton vitték be (zöld szín az V.15. ábrán), a sejtmagokat Hoechst festék festette kékre. Mindhárom (a/, b/ és c/) ábrán a két fluoreszcens és az elektronmikroszkópos kép egymásra van illesztve. A kisebb nagyítású a/ ábra azt a célt szolgálta, a megfelelő területre lehessen navigálni a nagyobb nagyítású képek (/b és c/ ábra) elkészítéséhez.



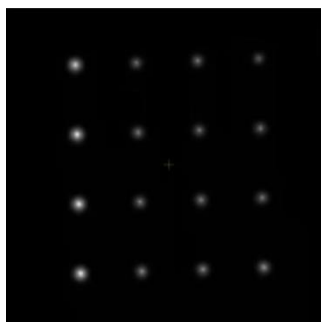
V.15. ábra. Ló arteritis vírusának SCLEM képe két nagyításban (lásd a szöveget) (LIV 2014 A)

A SCLEM mintatartó asztalából és a fénymikroszkópos feltétéből a DELMIC vállalat SECOM néven kereskedelmi terméket készített. (V.16. ábra)

A korreláció a fény- és a elektronmikroszkópos kép közt gyors, pontos és automatizált. A korrelációhoz azt használják ki, hogy a mintát tartó fedőlemezen az elektronsugár katódlumineszcens sugárzást vált ki és ezzel ideiglenes támpont markereket generálnak (V.17. ábra). A módszer korrigálja a translációt, rotációt és a nagyítást is.



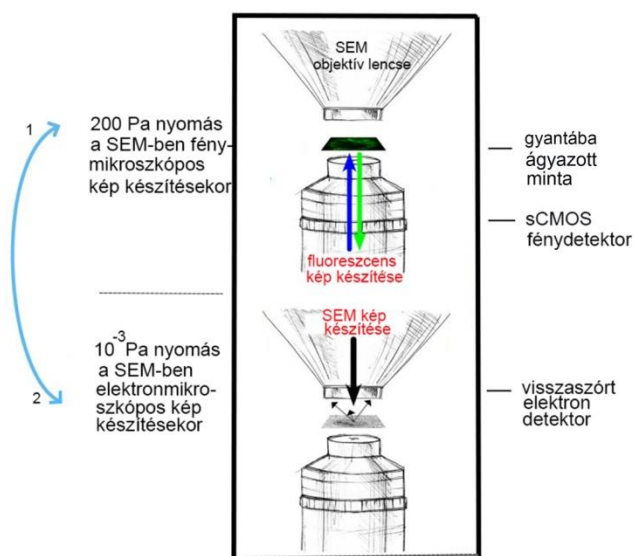
V.16. ábra. A SECOM feltét asztala és a fénymikroszkópos feltét objektívje CLEM-hez. A berendezés többféle SEM-re (pl. FEI, Tescan, Hitachi és JEOL) feltétként csatlakoztatható (DELMIC SECOM)



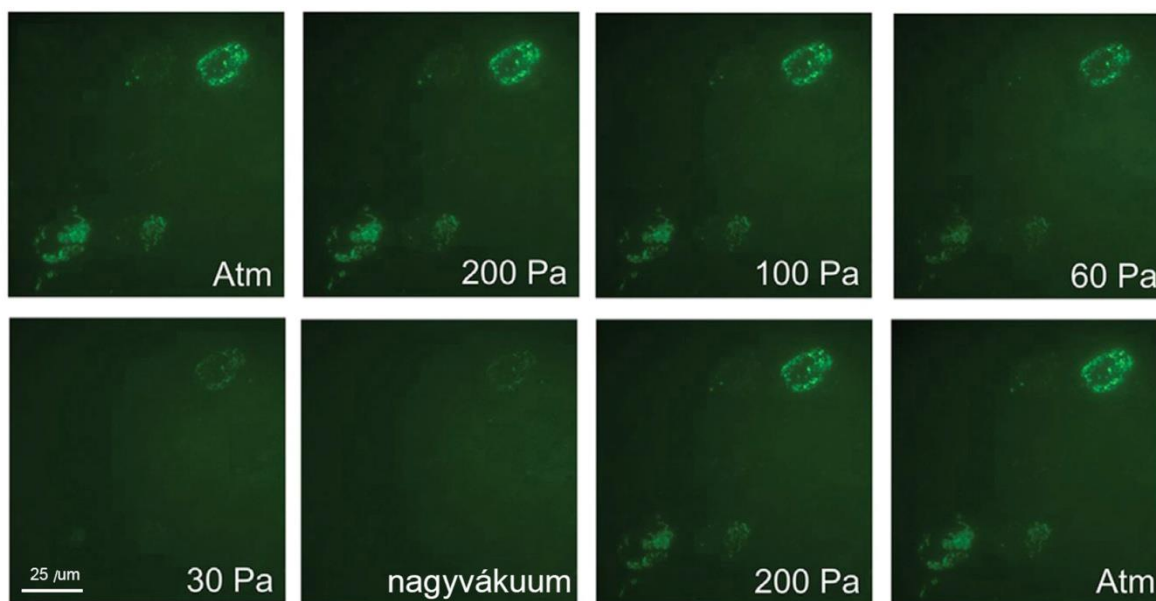
V.17. ábra. Üveg fedőlemezen kiváltott katódlumineszcens kép a fény és elektronmikroszkópos kép korrelálásához (DELMIC SECOM)

ILSEM (Integrated Light and Scanning Electron Microscope) néven Peddie és Brama írt le egy CLEM-re alkalmas integrált mikroszkópot (PEDDIE 2014 Ultramicroscopy, BRAMA 2015). (A minta-beágyazás körülményeire, nagynyomású fagyasztásra és fagyasztásos helyettesítésre a VII.2. fejezetben térünk ki.) Néhány standard fluoreszcens fehérje (pl. GFP, YFP) azon tulajdonságára jöttek rá, hogy a mikroszkóp vákuumában vízgőz hatására visszaállítható fluoreszcencia. Ezáltal az egyfunkciós fluoreszcens fehérje kétfunkciós fluoreszcens fehérjévé válik, azaz fény és elektronmikroszkópban egyaránt használható. Az V.18. ábra szerinti 200 Pa parciális nyomású vákuumrendszerben a fluoreszcens vizsgálat elvégezhető. 488 nm hosszúságú lézer fény hatására a GFP fluoreszkál. A nyomás csökkentésekor 10^{-3} Pa nyomáson elkészíthető az elektronmikroszkópos kép ugyanazon mintaterepről visszaszórt elektron detektorral. A nyomásnak 200 Pa-ra való visszaállításakor egy újabb terület vizsgálható

fluoreszcens leképezéssel. A nyomás visszaállítására vizgőzt használnak. Sem oxigén, sem pedig nitrogén hatására nem áll vissza a fluoreszcencia jelensége.



V.18. ábra Integrált fény- és elektronmikroszkóp ILSEM (BRAMA 2015)



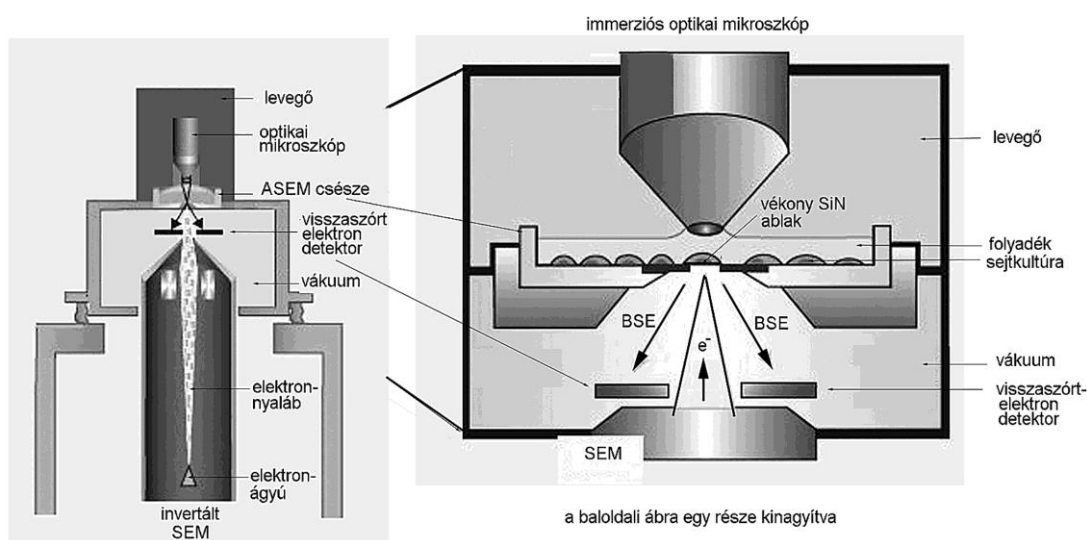
V.19. ábra. A GFP-C1 fluoreszcens intenzitásának függése a vákuum-rendszer vizgőzének parciális nyomásától. A képeken balról jobbra a 200 Pa-nál kisebb nyomáson egyre csökken a fluoreszcencia intenzitása, majd a nagyvákumban csaknem nulla. A 200 Pa parciális vizgőznyomás visszaállításakor a fluoreszcencia visszatér. Az atmoszferikus nyomáson a fluoreszcencia intenzitása ugyanakkora, mint a 200 Pa nyomáson (PEDDIE 2014)

Ezekre a vizsgálatokra a VII.2.3. pontban visszatérünk.

V.2.3. Atmoszférikus SEM (ASEM), mint integrált fény- és elektronmikroszkóp

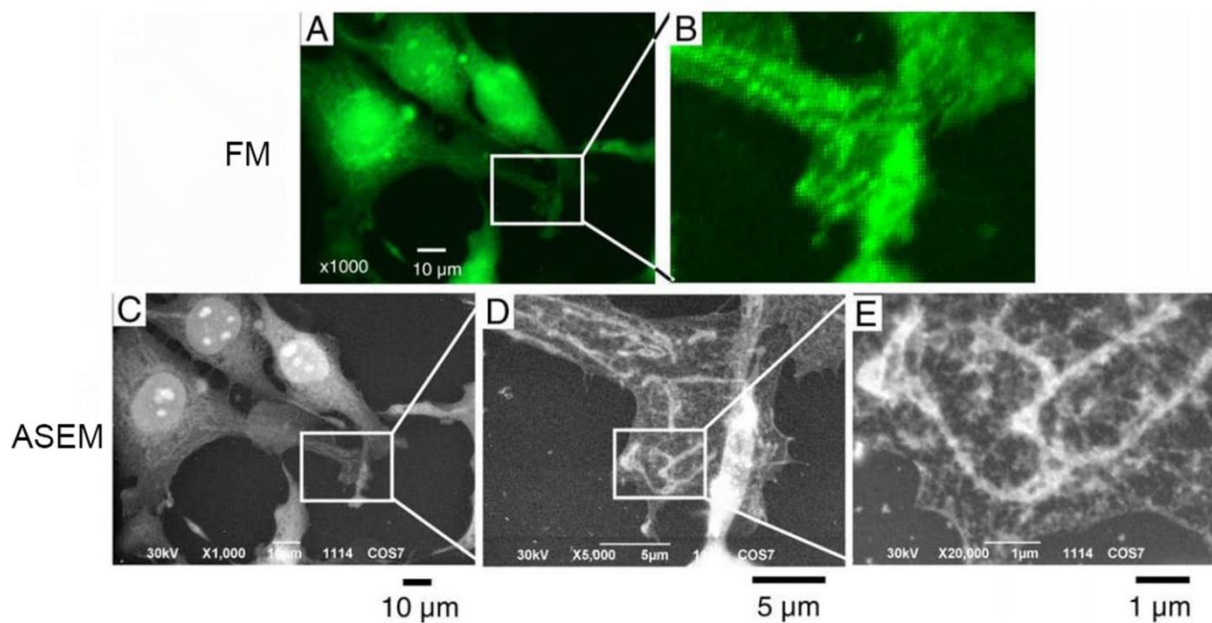
Nishiyama úgy integrálta a fénymikroszkópot egy fordított állású pásztázó elektronmikroszkóphoz, hogy elektronokra átlátszó, vékony SiN membrán ablakkal választotta el az atmoszférikus nyomáson lévő fénymikroszkópot a vákuumban működő SEM-től (NISHIYAMA 2010, MORISSON 2012, HIRANO 2013). Detektálásra visszaszórt elektron detektort használtak. A fénymikroszkóp és a SEM mechanikailag egymáshoz vannak centrálva, a mintatartó mozgatható az x-y síkban. A mintatartó Petri csészében sejtenyészetet vagy szöveteket nemcsak levegőn, de CO₂ atmoszférában vagy nedves környezetben is lehet vizsgálni. 100 nm vastagságú SiN membránt használva 30 KV-os gyorsító feszültségen optimális esetben 8 nm-es felbontást tudtak elérni (NISHIYAMA 2010).

A berendezést a JEOL ClairScope® néven hozta kereskedelmi forgalomba. A konstrukció célja volt áthidalni a fénymikroszkópia és az elektronmikroszkópia közötti szakadékot.



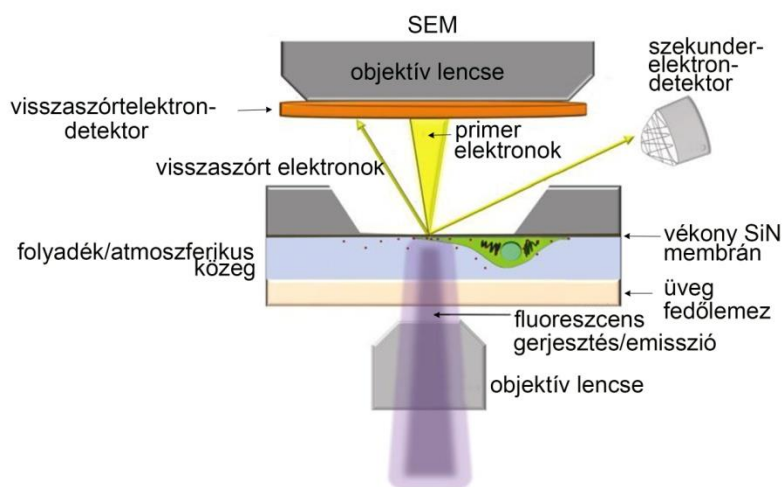
V.20. ábra. Atmoszférikus SEM (ClairScope®) korrelatív fény és elektronmikroszkópos vizsgálatot tesz lehetővé az elektronokra átlátszó SiN membrán ablak miatt (TERAMOTO 2010)

Az ASEM alkalmazásaként COS7 sejtek (lásd COS cells WIKIPEDIA) endoplazmatikus retikulumának vizsgálatát mutatjuk. A fénymikroszkóp felbontása nem elég jó a részletek felderítésére, mint az Alexa Fluor 488-cal festett fluoreszcens képen látható (V.21. ábra). A fluoreszcens vizsgálatot követő platina kék festés után a SEM képek jelentősen javították a részletek láthatóságát.



V.21. ábra. COS7 sejtek endoplazmatikus retikulumának fluoreszcens mikroszkópos (FM) és pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálata ASEM berendezésben (NISHIYAMA 2010)

Sok tekintetben az ASEM-re emlékeztet Liv 2014-es CLEM konstrukciója 180-os elfordításban (V.22. ábra).



V.22. ábra. A SEM vákuumától vékony SiN membránnal elválasztott minta szimultán vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal és elektronmikroszkóppal (LIV 2014 B)

Liv és munkatársai (LIV 2014 B) SiN vagy SiN₄ membránok vastagságának függvényében vizsgálták a folyadékban lévő arany nanorészecskék és kvantumpontok detektálhatóságát. Azt tapasztalták, hogy ezek a 10 nm-nél nem kisebb átmérőjű részecskék visszashórt elektronokkal detektálhatók, ha a membrán vastagsága a 20 és 50 nanométer vastagságtartományba esik.

Festetlen egész sejteket vizsgálva a membrán kamra használatának előnyeit a következőkben összegezték:

1. A fluoreszcens mikroszkópiában alkalmazott minta-előkészítési protokoll változtatás nélkül használható a SEM vizsgálatokban is.
2. Az atmoszferikus mintatartó kamra megvédi a mintát a vákuum által előidézhető szerkezeti változásoktól.
3. A folyadékkal töltött mintatartó kamra közel-natív állapotot biztosít a minta számára.

Irodalom

AGRONSKAIA, A. V. *et al.* (2008): Integrated fluorescence and transmission electron microscopy, *Journal of Structural Biology* 164, 183-189.

AMIRA WIKIPEDIA, [https://en.wikipedia.org/wiki/Amira_\(software\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Amira_(software))

AVIZO WIKIPEDIA, [https://en.wikipedia.org/wiki/Avizo_\(software\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Avizo_(software))

BECKWITH, M. S. *et al.* (2015): Seeing a Mycobacterium-Infected Cell in Nanoscale 3D: Correlative Imaging by Light Microscopy and FIB/SEM Tomography, *PLoS ONE*, doi: 10.1371/journal.pone.0134644.

BISHOP, D. *et al.* (2011): Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy, *Nature Methods* 8, 7, 568-572.

BRAMA, E. *et al.* (2015): Standard fluorescent proteins as dual-modality probes for correlative experiments in an integrated light and electron microscope, *J. Chem. Biol.* 8, 179-188.

COS cells WIKIPEDIA

DANILATOS, G. D. (1979): Method and Apparatus for an Atmospheric Scanning Electron Microscope, *U.S. Patent* No. 4,596,928, filed May 14, 1984, (priority date July 3, 1979, Australia PD9433)

DANILATOS, G. D. (1988): [Integrated electron optical/differential pumping/imaging signal detection system for an environmental scanning electron microscope](#). *U.S. Patent* No. 4,823,006, filed Feb. 19, 1988.

DELMIC SECOM, In Situ Correlative Microscopy Webinar Featuring the DELMIC SECOM, <https://www.youtube.com/watch?v=X65OmzYrALI>

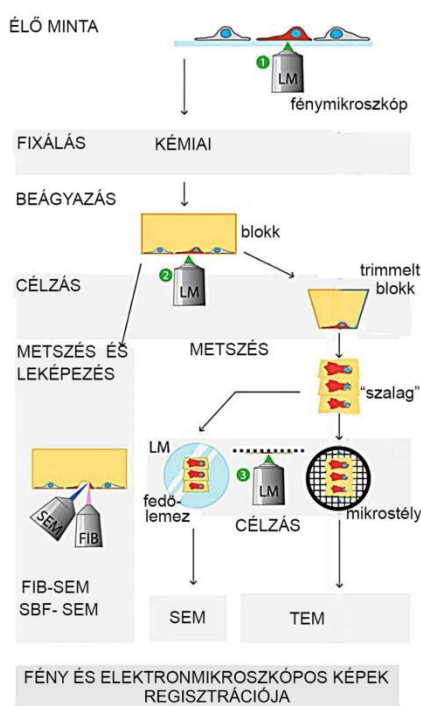
FEI, Introducing the world's first commercially available light and transmission electron microscope. Tecnai™ with iCorr™: a fast accurate and automated solution for correlative light and electron microscopy, Product Flyer.

- HIRANO, K. *et al.* (2013): Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM, *Ultramicroscopy*, doi: 10.1016/j.ultramicroscopy.2013.10.010.
- KUKULSKI, W. *et al.* (2012): Precise, Correlated Fluorescence Microscopy and Electron Tomography of Lowicryl Sections Using Fluorescent Fiducial Markers, *Methods in Cell Biology*, 111, 235-257, doi: 10.1016/B978-0-12-416026-2.00013-3.
- LIV, N. (2014 A): Simultaneous Correlative Light and Electron Microscopy of Samples in Liquid, ISBN 978-94-6186-362-1.
- Liv, N. *et al.* (2014 B): Scanning electron microscopy of individual nanoparticle bio-markers in liquid, *Ultramicroscopy*, 93-99.
- LUCIC, V. *et al.* (2007): Multiscale imaging of neurons grown in culture: From light microscopy to cryo-electron tomomography, *Journal of Structural Biology* 160, 146-156. doi: 10.1016/j.jsb.2007.08.014.
- MATTEK, <https://www.mattek.com/>
- MORISSON, I. E. G. *et al.* (2012): Atmospheric Scanning Electron Microscope for Correlative Microscopy, *Methods in Cell Biology* 111, 307-324. doi: 10.1016/B978-0-12-416026-2.00016-9.
- NAGY, P. *et al.* (2002): Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2, *Journal of Cell Science*, 115, 4251-4262, doi: 10.1242/jcs.00118.
- NISHIYAMA, H. *et al.* (2010): Atmospheric scanning electron microscope observes cells and tissues in open medium through silicon nitride film, *Journal of Structural Biology* 169, 438-449.
- PECKYS, D. B. *et al.* (2015): Local variations of HER2 dimerization in breast cancer cells discovered by correlative fluorescence and liquid electron microscopy, *Sci. Adv.* 1:e1500165. doi: 10.1126/sciadv.1500165.
- PEDDIE, C. J. *et al.* (2014): Correlative and integrated light and electron microscopy of in-resin GFP fluorescence, used to localise diacylglycerol in mammalian cells, *Ultramicroscopy*, 143, 3-14.
- POLISHCHUK, E. V. *et al.* (2012): Correlative Light-Electron Microscopy as a Tool to Study In Vivo Dynamics and Ultrastructure of Intracellular Structures, D.J. Taatjes and J. Roth (eds.) *Cell imaging Techniques: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 931, 413-422. doi: 10.1007/978-1-62703-056-4_20.

- TERAMOTO, K. (2010). Rapid Characterization of Bacteria Using ClairScope™ and SpiralTOF™, *JEOL News* 45,1, 38-41.
- WOUTERS, C. H. *et al.* (1986): Quantitative DNA measurements in an instrument combining scanning electron microscopy and light microscopy, *Journal of Microscopy* 141,1, 40-53.

VI. CLEM szobahőmérsékleten

Először azokat a CLEM vizsgálatokat tárgyaljuk, amelyeknél a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok szobahőmérsékleten történnek, továbbá a minta-előkészítés is szobahőmérsékleten vagy felette történik. A munkafolyamatok jellemzője a minta kémiai úton történő fixálása, epon- vagy akril-alapú gyantába történő beágyazása metszetkészítés céljából. Illusztrációként Bykov egy ábráját használjuk fel, de gondolatmenetünknek megfelelően annak csak a szobahőmérsékletű vizsgálatokra vonatkozó részletét (VI.1. ábra).



VI.1. ábra. A szobahőmérsékleten végzett CLEM munkamenete, 2016

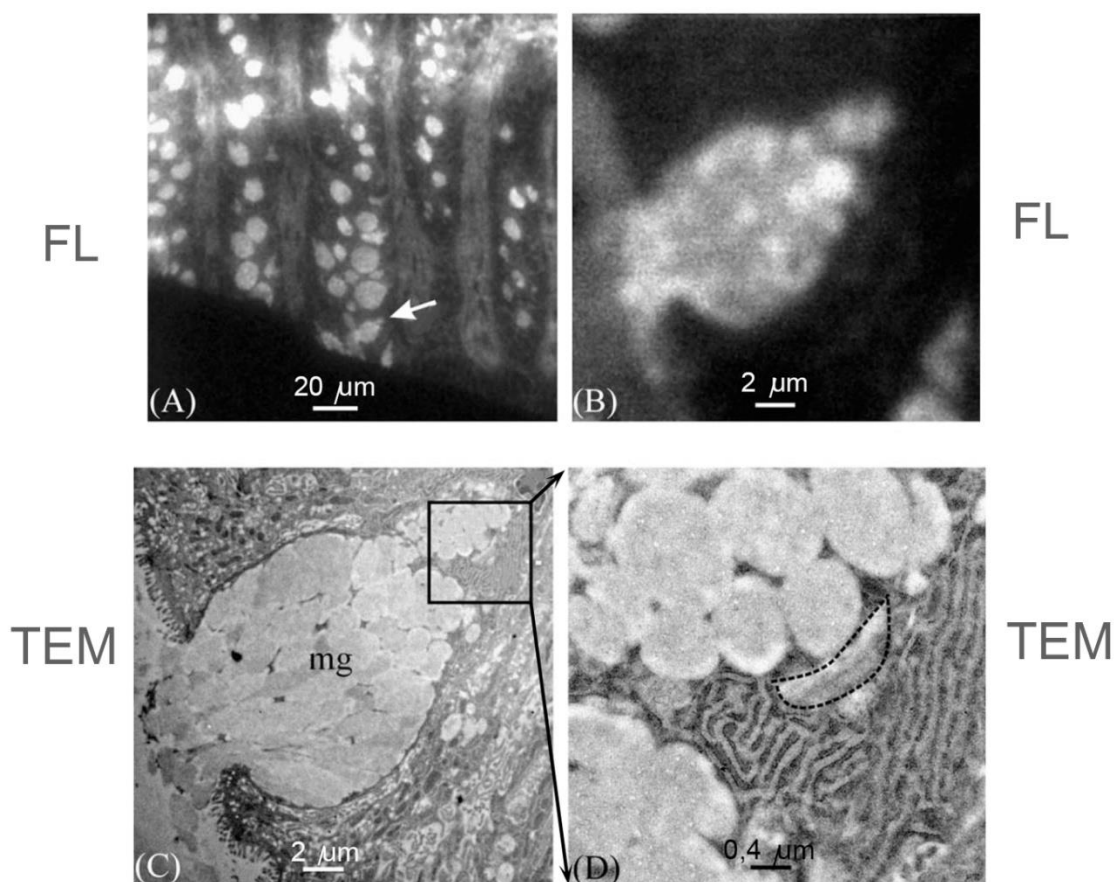
A VI.1. ábrából (fentről lefelé) látható, hogy a CLEM vizsgálatok a fénymikroszkópos vizsgálatokkal kezdődnek, majd az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal folytatódnak. A fénymikroszkópos vizsgálatok a CLEM három fázisában is szerephez juthatnak. Az a lehetőség, hogy a folyamat kezdetén az élő sejtekben lezajló dinamikus folyamatokat nyomon lehet követni, a fénymikroszkópiát egyedülálló módszerré teszi. A szobahőmérsékleti CLEM jellemzője a kémiai fixálás (az alternatív lehetőséget a krio-fixálást lásd a VII. és VIII. fejezetekben) és ezt követi az elektronmikroszkópiában szokásos dehidráció és beágyazás. A beágyazással keletkezett „blokkot” ultramikrotómmal felszeletelik és a metszeteket SEM-ben vagy TEM-ben vizsgálják.

A konvencionális mintaelőkészítés fluoreszcens mikroszkópiára és elektronmikroszkópiára nem kompatibilis egymással. Az elektronmikroszkópos minta-preparáció csökkenti a minta fluoreszcens sugárzásának intenzitását vagy gyakran teljesen megszünteti, másrészt a fluoreszcens mintaelőkészítés károsíthatja a minta ultraszerkezetét. Ezért a CLEM-ben olyan megoldásokat keresnek, amelyben a fluoreszcens jel többé-kevésbé megmarad az elektronmikroszkópban és/vagy a fluoreszcencia helyén elektronmikroszkópos kontraszt is létrejön (IV.2. és IV.3. fejezet).

VI.1. CLEM transzmissziós elektronmikroszkópba integrált pásztázó lézer fluoreszcens mikroszkóppal

Különálló fény- és elektronmikroszkóp esetén a mintának az egyik berendezésből a másikba való átvitele veszélyeztetheti a minta épségét. Az V. fejezetben bemutattuk, hogyan integrálta Agronskaia a fluoreszcens mikroszkópot a transzmissziós elektronmikroszkópba, amiből később iCorr néven kereskedelmi berendezés lett (AGRONSKAIA 2008). Az integrálás előnye a különálló fény- és elektronmikroszkóphoz képest abban áll, hogy a megkönnyíti a CLEM egyik fő problémáját a két különböző modalitású kép egymásra helyezését. A fénymikroszkópban vizsgálatra kiválasztott terepet (ROI, Region of Interest) könnyű újra megtalálni a kis nagyítású, nagy látóterű elektronmikroszkópos képben. A nagyítás növelésével pedig (kisebb látótérben) a nagy felbontást hasznosíthatjuk az ultrastrukturális részletek megismerésére.

VI.1.1. Patkóbél vizsgálata



VI.2. ábra. Lowicryl HM20-ba ágyazott patkány patkóbél metszetnek korrelatív fluoreszcens és transzmissziós elektronmikroszkópos képei. A metszet festése Alexa488 festékkel történt, amelyhez búzacsíra agglutint konjugáltak a kehelysejtben lévő fehérjék detektálására. ER, endoplazmatikus retikulum (lásd a szöveget) (AGRONSKAIA 2008)

A méréseket TECNAI 12 típusú elektronmikroszkópban végezték, amelynek TWIN lencségei között 9 cm-re távolság volt, ahova a fénymikroszkóp objektív lencsáját be lehetett tolni (V.12. ábra). A méréseket 80 kV gyorsító feszültségen szobahőmérsékleten végezték.

A fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos koordináta rendszerek között transzformációt 0,2 μm méretű fluoreszcens latex gyöngyök segítségével ellenőrizték. A fluoreszcens és elektronmikroszkópos képek közötti megfelelés pontossága $\pm 0,5 \mu\text{m}$ volt x-y irányban. Tekintettel arra, hogy ez a pontosság egy 2 μm x 2 μm látóterű képre vonatkozott, a keresett részletnek az elektronmikroszkópos képben való újra megtalálásához elegendő volt.

A fluoreszcens kép abban segített, hogy a megfelelő orientációjú kehelysejteket válasszák ki, ahol a TEM kép részletei a Golgi-készülék trans- és cis- oldalát is mutatják.

A bemutatott integrált elrendezés előnye a mérés rövid ideje volt. Mindössze 20 percre tellett a mikrostélyt végig pásztázni fénymikroszkóppal a megfelelő pozíciójú kehelysejtek kiválasztására. Különálló fény- és elektronmikroszkóp esetén ennek a feladatnak az elvégzése néhány órába tellett (DRIEL 2008), míg fluoreszcens mikroszkóp nélkül néhány napig (VALENTIJN 2007).

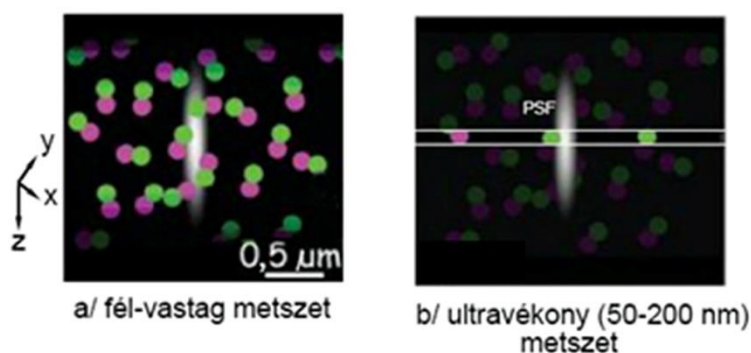
VI.2. CLEM AT-tomográfiával, (AT-CLEM)

A Micheva által 2007-ben kifejlesztett Array Tomography-t AT-tomográfiának fogjuk nevezni (II.2.1 fejezet). Az AT-tomográfia jellegzetes vonása, hogy a beágyazott ultravékony metszetek ismételt festésnek és leképezésnek vethetők alá. Az AT-tomográfia használható külön a fénymikroszkópiában, külön az elektronmikroszkópiában és a kettő korrelációjában a CLEM-ben is.

A beágyazott ultravékony (70-200 nm) metszetek AT-tomográfiájának két előnyös tulajdonsága van, amely a CLEM-ben is érvényesül. Az egyik az, hogy a fénymikroszkópos mélységi felbontás jelentősen javul a diffrakció által korlátozott mélységi felbontáshoz képest a minták vékonysága miatt. A másik előny a immunfluoreszcens mikroszkópiában jelentkezik a konvencionális megoldáshoz képest: a festő antitesteknek a vizsgálandó mintába való korlátozott behatolása nem merül fel az ultravékony metszetek miatt.

A konfokális mikroszkópnak, miként a többi diffrakció által határolt fénymikroszkópnak a laterális felbontása 200-250 nm, a mélységi felbontása ~ 700 nm (PAWLEY 1995).

Az ultravékony metszetek a fénymikroszkópos mélységi felbontást azáltal javítják, hogy vékonyságuk korlátozza a pontkiterjedési függvény (PSF, Point Spread Function) z-irányú (mélységi) kiterjedését (VI.3. ábra). Az ultravékony metszeten elérhető mélységi felbontás felülmúlja a két-fotonos mikroszkópokkal elérhető mélységi felbontást is.

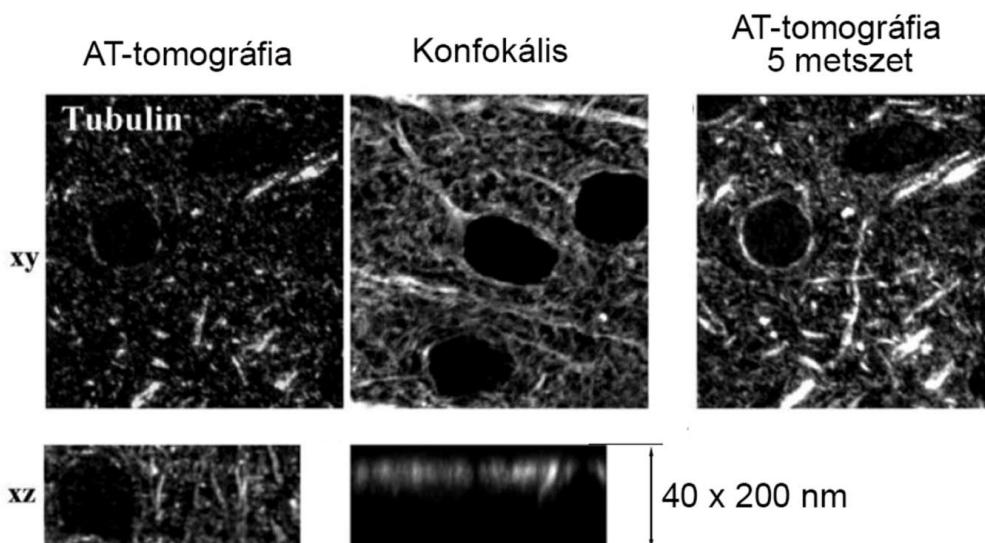


VI.3. ábra. A konfokális mikroszkóp pontkiterjedési függvényének (PSF) képe (a/) félvastag metszeten ($\sim 1-2 \mu\text{m}$). A z-irányú felbontás jelentősen javul az ultravékony metszeten a fél-vastaghoz képest, mert a PSF-nek csak a metszet által korlátozott része játszik szerepet. (b/) (MICHEVA 2007)

VI.2.1. Agykéreg vizsgálata

Egér agykéregének immunfestésekor két primer antitest (szinapszin és tubulin) behatolási mélységét $\sim 6 \mu\text{m}$, illetve $\sim 4 \mu\text{m}$ -nek találták. Az ultravékony metszeteket egyidejűleg, homogén módon festik (postembedding staining, azaz beágyazás utáni festés), így az egyenetlen immunfestés problémája nem áll fenn.

Micheva hidrofil LRWhite-ba beágyazott egér neocortexéből 40 darab 200 nm-es ultravékony sorozat metszetet vizsgált. Ezzel párhuzamosan vastag mintán 40 darab 200 nm-es optikai metszetet is készített konfokális mikroszkópban oly módon, hogy a mikroszkóp fókuszsíkját 200 nm-enként tolta a minta belsejébe. A 40 darab sorozat metszet képből, illetve 40 darab 200 nm-enként felvett konfokális képből rekonstruálta a fluoreszcens jel mélységi eloszlását (VI.4. ábrán xz képek). Az eredmény egyértelműen bizonyítja, hogy a sorozat metszés jobb mélységi felbontást ad, mint az optikai metszés. Az immunfluoreszcens festéskor a primer antitest tubulin volt. A szekunder antitesthez festékként Alexa 488-t vagy FITC-t használtak. Mint a VI.4. ábrán látszik a vékony metszetből készített kép az xy-síkban gyengébb kontrasztot ad, mint a vastag mintán készített konfokális kép. Viszont az 5 ultravékony metszetből összegzett kép (jobb oldalon) kontrasztja már jobb, mint a konfokális képé.

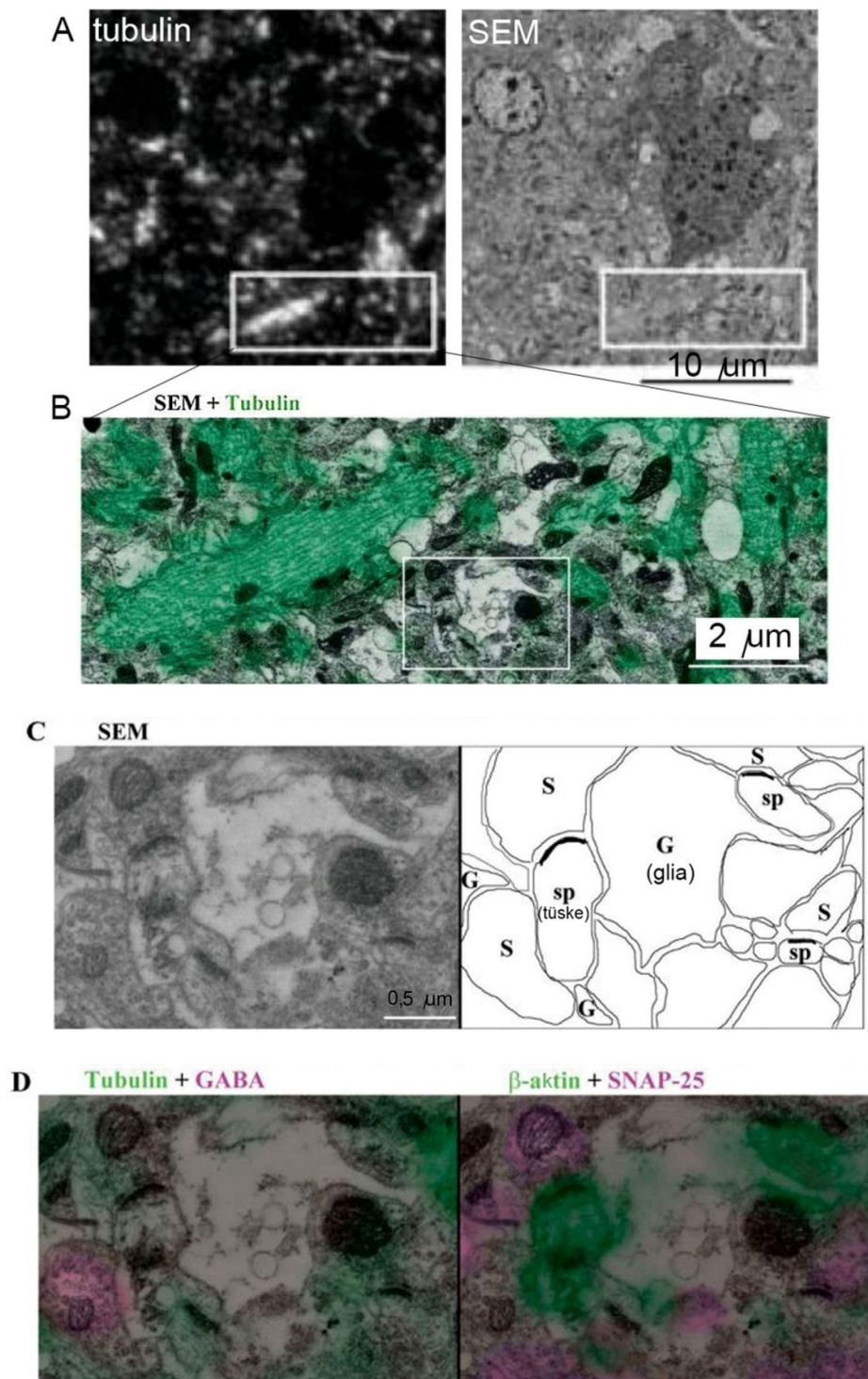


VI.4. ábra. A sorozat metszés (AT-tomográfia) és az optikai metszés (konfokális mikroszkóp) összehasonlítása mélységi felbontás szempontjából (lásd a szöveget) (MICHEVA 2007)

A hidrofil LRWhite beágyazó anyaggal készült ultravékony metszetek számos kedvező tulajdonságot mutattak: pl. az immunfluoreszcencia megmaradt beágyazás után, jóllehet az elektronmikroszkópiában szokásos glutáraldehides fixálást alkalmazták. Egy másik előny volt, hogy a natív YFP (Yellow Fluorescent Protein, a GFP sárga változata) fényesen fluoreszkált, ha az etanolos víztelenítést nem 100%, hanem csak 95% etanolig folytatták.

Most pedig térjünk a CLEM vizsgálatokra. Az üveg hordozón lévő ultravékony metszeteket beágyazás előtt az elektronmikroszkópiában szokásos paraformaldehides és glutáraldehides fixálásnak vetették alá, majd ozmiumtetroxidos fixálást és kontrasztnövelést is alkalmaztak. Az ozmiumtetroxidra azért van szükség, hogy stabilizálják a zsírokat a víztelenítés előtt. A szerzők megjegyzik, hogy ez az eljárás nem optimális az antigenecitás megőrzése szempontjából, mert az ozmiumtetroxid a felhasználható antitestek számát korlátozza. Mindazonáltal négy antitesttel történő immunfestést kombináltak pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálattal. Először tubulin és GABA antitest festést alkalmaztak immunfluoreszcens kép készítéshez. A leképezés után az említett antitesteket kimosták, majd újrifestették béta-aktinnal és SNAP-25-tel, amit újabb fluoreszcens leképezés követett. Végül egy uranilacetátos és ólomcitrátos utófestés után SEM-ben megkeresték ugyanazt a terepet és elektronmikroszkópos képet készítettek róla.

A publikált négy kis nagyítású fluoreszcens képekből csak a tubulin képét mutatjuk a VI.5. A/ ábrán a kis nagyítású SEM képpel együtt. A fehér kerettel szegélyezett terep fluoreszcens mikroszkópos és SEM képének egymásra helyezése látható a B/ ábrán immár nagyobb nagyításban. (A konfokális mikroszkóp fekete-fehér képet készít, a színt utólag adják hozzá a detektáló csatorna hullámhossz-tartományának megfelelően). A B/ ábrán fehérrel bekeretezett terep látható a C/ és D/ ábrán még nagyobb nagyításban az értelmezéssel együtt. A fluoreszcens képek és a SEM egymásra illesztéséhez jellegzetes képrészleteket (pl. sejtmagot) használtak fel. A /D ábra színes képeinek a /C ábrán látható vázlattal való összevetése megmutatja, hogy melyik antitest melyik alkotórészt festi meg. Bár a végső nagyítás nem érte el a transzmissziós elektronmikroszkópban alkalmazott nagyításokat, a CLEM képek így is sok értékes információt nyújtottak mind a fénymikroszkópos mind az elektronmikroszkópos képekhez viszonyítva.



VI.5. ábra. Egér agykérgéből AT-tomográfiával készült ultravékony (70 nm vastag) metszet. Ugyanazon terepen felvett 4 immunfluoreszcens és SEM kép, valamint ezek korrelációja. (lásd a szöveget!) (MICHEVA 2007)

A/ tubulin antitest kis nagyítású immunfluoreszcens képe és ugyanazon terep SEM képe. B/ Az A/ ábrán fehérén bekeretezett terep nagyobb nagyításban. C/ A B/ ábrán bekeretezett terep SEM képe nagyobb nagyításban (S –preszinaptikus bouton). D/ Négy immunfluoreszcens kép (tubulin és GABA, valamint béta-aktin és SNAP-25) korrelálása a C/ábrán látható SEM képpel

Az AT-tomográfiára vonatkozó protokollokat a következő helyeken találjuk meg: a rágsálók agyának fixálása és beágyazása (MICHEVA 2010a), rendezett sorozat-metszetek készítése (MICHEVA 2010b), immunfestés és antitest kioldás (MICHEVA 2010c), festett sorozat-metszetek leképezése (MICHEVA 2010d), fél-automatizált kép-illesztés (MICHEVA 2010e). Micheva eljárásától eltérő AT-tomográfiás protokollt találunk énekesmadarak agyának CLEM vizsgálata kapcsán (OERTI 2011). Ebben epoxi gyantát használnak beágyazásra és az első fluoreszcens festés után alkalmaznak még egy immunfluoreszcens festést az első festés fluoroforjai ellen, hogy a fluoreszcens jelet megerősítsék.

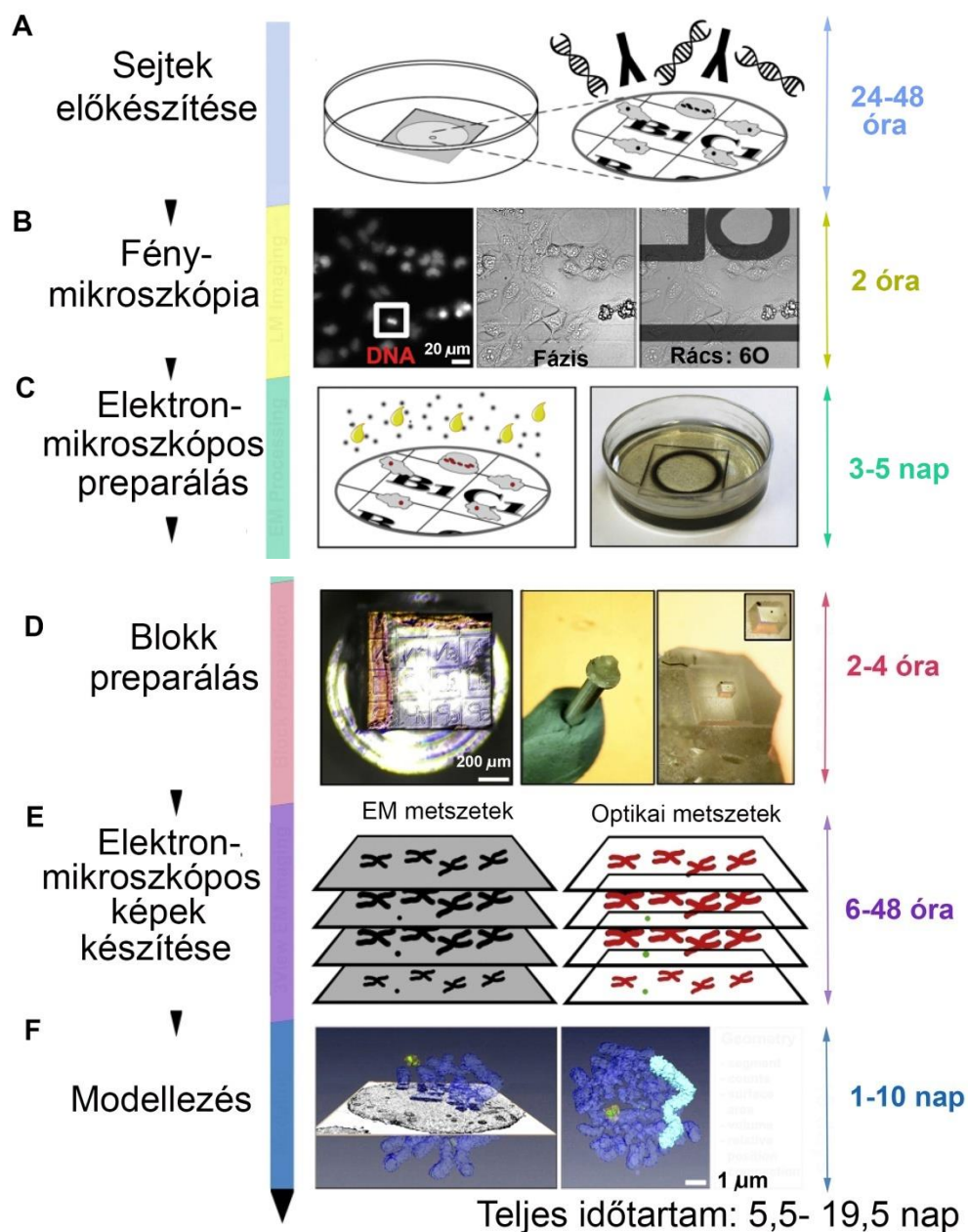
Az LRWhite-nál is kedvezőbben őrizte meg az ultraszerkezetet a Lowicryl HM20 beágyazóanyag, de a mintákat alacsony hőmérsékleten preparálták (NANGUNERI 2012). Hasonlóképpen alacsony hőmérsékleten történt a mintaelőkészítés, amikor az AT-tomográfiát szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópiával kombinálták (MARKERT 2016).

VI.3. CLEM fénymikroszkóppal és ultramikrotommal felszerelt pásztázó elektronmikroszkóppal (SBF-SEM)

A SBF-SEM-et (Serial Block Face Imaging) már érintettük a térfogati elektronmikroszkópia címszó alatt (III.3.4.), itt viszont a CLEM-ben történő alkalmazásáról lesz szó. A SBF-SEM lényege, hogy az ultramikrotom a pásztázó elektron mikroszkópba van beépítve; a minta metszése és a keletkezett metszési felület leképezése automatikusan, ciklikusan ismétlődik. Végül a 2D képekből 3D objektumot rekonstruálnak. A lemetszett mintadarab nem kerül hasznosításra, ebben különbözik az AT-tomográfiától vagy a sorozat-metszéssel kombinált TEM vizsgálatoktól (ssTEM)). Az SBF-SEM laterális felbontóképessége 1–2 nm, az axiális (vagy mélységi) felbontás 25–30 nm, ez utóbbit a metszési vastagság korlátozza.

VI.3.1. Kromoszóma vizsgálatok

Booth és munkatársainak (SBF-SEM-mel és SEM-en kívüli fénymikroszkóppal végrehajtott) kromoszóma vizsgálataival mutatjuk be az általuk 3D-CLEM-nek nevezett módszer menetét. (BOOTH 2016)



VI.6. ábra. Fénymikroszkóppal és SBF-SEM-mel megvalósított 3D-CLEM munkamenete. (részleteket lásd a szövegben) (BOOTH 2016)

A VI.6. ábrán A-val jelölt szakasz tartalmazza a vizsgálandó sejtek tenyésztését a ráccsal és szimbólumokkal jelölt MatTek csészében, fluoreszcens fehérjékkel történő transzfekcióját, glutaraldehides fixálást, majd sejtfestést (pl. DNS festést DAPI-val) vagy antitestekkel való jelölést.

A VI.6. ábrán B-val jelölt részben mind fluoreszcens, mind pedig fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat történik. Ez utóbbi a vizsgálandó részletek koordinátáinak rögzítésére szolgál.

A VI.6. ábrán C-vel jelölt elektronmikroszkópos preparálás magába foglalja kontraszt-növelést (ozmiumtetroxiddal, uranilacetáttal és csersavval), víztelenítést és gyantába való beágyazást, a gyanta megszilárdítását. Az alkalmazott vegyszerek koncentrációja nem azonos a konvencionális EM-preparálásban alkalmazottal, ezeket a CLEM-hez kellett igazítani. A VI.6. ábrán látható folyamatok protokollját megtaláljuk az idézett közleményben (BOOTH 2016).

A VI.6. ábrán D-vel jelölt rész első képén láthatjuk, hogy a megszilárdult gyanta magával hozta a MatTek csésze jelölését. Ez segíti a vizsgálandó terület újra megtalálását az elektronmikroszkópban. A gyanta-blokkból csonka gúlát faragnak, türe erősítik, majd felszínét arany vagy platina párologtatással elektromosan vezetővé teszik, hogy a SEM-ben az elektrosztatikus feltöltődést elkerüljék.

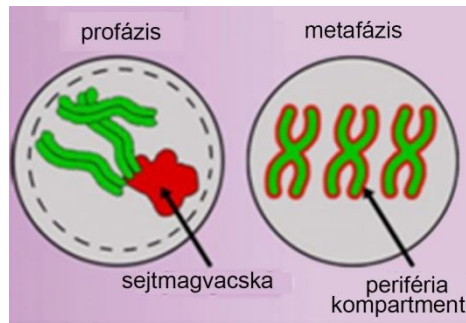
A VI.6. ábrán E-vel jelölt részben a leképezés a Gatan cég 3View típusú elektronmikroszkópjában történt, alacsony vákuumban és alacsony gyorsító (2,5 kV) feszültségen. (A Gatan később az EDAX cégbe olvadt bele.) Ezek a paraméterek szintén arra szolgálnak, hogy a minta elektrosztatikus töltődését elkerüljék. A fény- és elektronmikroszkópos képek koordinátáit rögzítik, és ennek segítségével történik a fény- és elektronmikroszkópos képek egymásra illesztése (itt regisztrációnak nevezik), és ezt követi a 3D rekonstrukció az ingyenes ImageJ program volume viewer-ével.

A VI.6. ábrán F-fel jelölt részben Amira szoftverrel modellezik és szegmentálják a minta egyes alkotórészeit és meghatározzák azok geometriai méreteit (lásd alább). (Az Amira a FEI szoftvere. A FEI most a Thermo Fisher Scientific leányvállalata.)

A fenti technikai részleteken túlmenően szeretnénk megmutatni az eljárás hasznosságát a mitotikus kromoszómák vizsgálata kapcsán.

A mitotikus kromoszómákat Walther Flemming írta le 1875-ben (FLEMMING 1875, PAWELETZ 2001), és a sejtosztódás azóta is sok vizsgálat tárgyát képezte. A CLEM-es vizsgálat mégis tudott újat mondani, miként a közlemény címe is mutatja: „A 3D-CLEM feltárja, hogy a mitotikus kromoszómák legnagyobb része nem kromatin” (BOOTH 2016).

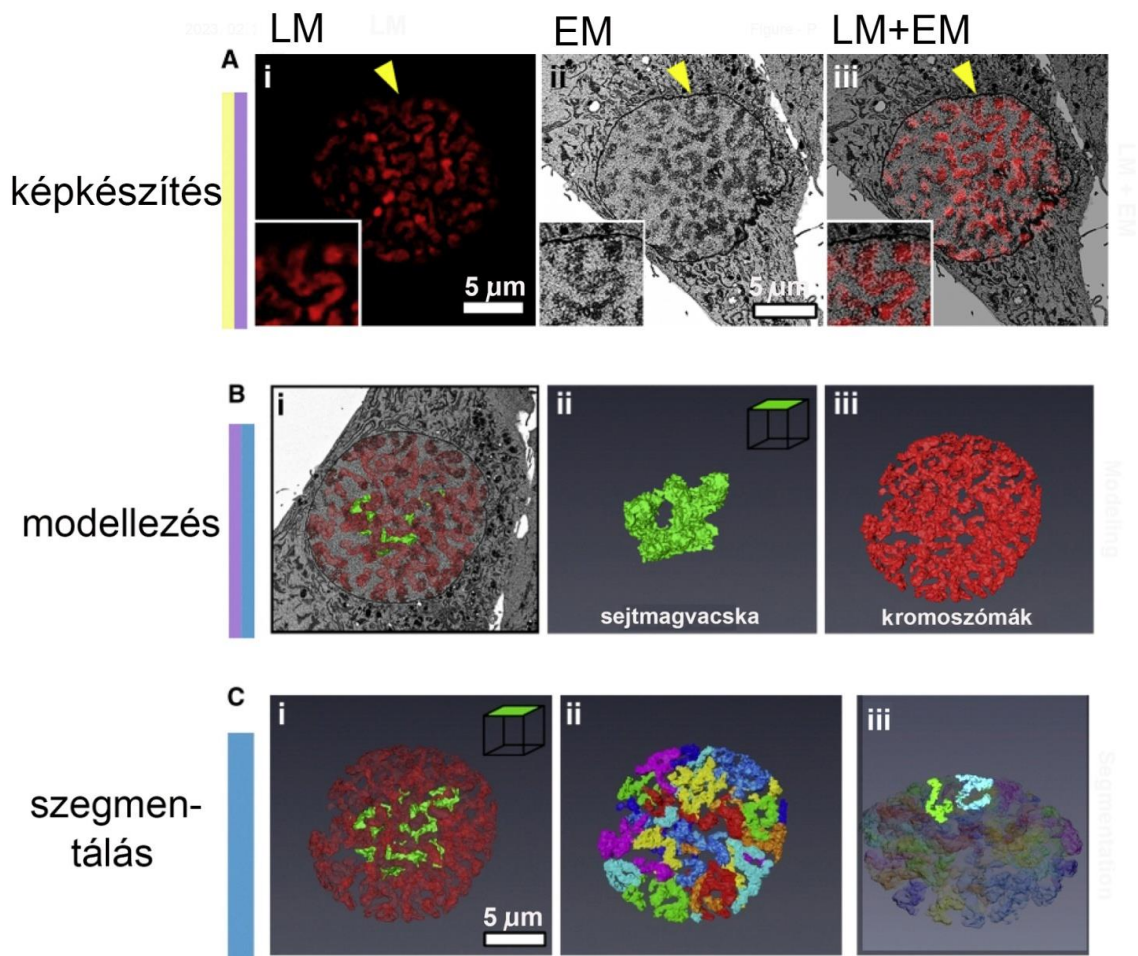
A cikk grafikus összefoglalója azt mutatja, hogy a profázisban még jelenlévő sejtmagvacska tartalma a metafázisban a kromoszómák periferiájára vándorol (VI.7.ábra). A periferiába kerül a Ki-67 fehérje, ami a sejtburjánzásban játszik szerepet, a rák egyik gyakori markere az immunhisztokémiában.



VI.7. ábra. A profázisban még jelenlévő sejtmagvacska tartalma a metafázisban már a kromoszóma periferiáján található meg (BOOTH 2016)

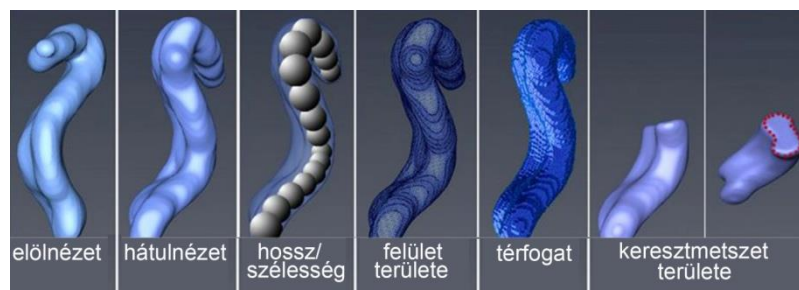
A szerzők mind a 46 kromoszómát megvizsgálták profázisban és metafázisban is retina pigment epitélium sejteket felhasználva. Mi itt csak a profázisú képeket mutatjuk (VI.8. ábra). A DAPI festék a DNS-t megfesti (VI.8. ábrán piros szín), de a sejtmagvacskákat nem (zöld). Az A/ ábrán a kromoszómákat láthatjuk fény- és elektronmikroszkópos képen, valamint a kettőt egymásra helyezve. A sárga nyíl egy egyértelműen regisztrált kromoszómára mutat. A képek bal alsó sarkában a nagyobb nagyítású képek láthatók.

A második sorban (B/ ábra) az Amira programmal modellezett sejtmagvacska és kromoszómák láthatók. A szegmentálás (C/ ábra) után meghatározhatók az egyes kromoszómák geometriai paraméterei.



VI.8. ábra. Profázis kromoszóma CLEM képei, feldolgozásuk modellezéssel és szegmentálással. A zöld fedelű kocka jelzi, hogy az ortogonális metszetekből melyik szerepel a modellben. A 46 kromoszómából 43-t sikerült szeparálni (BOOTH 2016)

A 4. kromoszóma modellje kapcsán mutatjuk meg, hogyan a kromoszómák mely szerkezeti paramétereit határozták meg 3D-CLEM-mel (VI.9. ábra).



VI.9. ábra. A 3D-CLEM-mel meghatározott 4. kromoszóma szerkezeti paramétere (BOOTH 2016)

A CLEM vizsgálatok megállapították, hogy a profázisú kromoszómák térfogata 38%-kal kisebb, mint a metafázisban lévők, amiért valószínűleg a profázisból még hiányzó periféria térfogata felelős. A számítások szerint a periféria egy 70 nm vastag Ki-67 réteget tartalmaz.

VI.4. CLEM fénymikroszkóp és FIB-SEM-kombinációjával

VI.4.1. Konfokális pásztázó lézer mikroszkóp és FIB-SEM

A szobahőmérsékletű CLEM-ben gyakran alkalmaznak FIB-SEM-t. A fókuszált gallium ionsugárral való mintavékonyítások (ion milling) és az azt ciklikusan követő pásztázó elektronmikroszkópos felvétel-készítések a harmadik dimenzió megragadását jelenti az elektronmikroszkópiában. A fénymikroszkópiában is szükséges a harmadik dimenzió, ezt a konfokális lézermikroszkóppal vagy a két-fotonos pásztázó lézer mikroszkóppal (2PLSM) valósítják meg. A szobahőmérsékletű FIB-SEM jellemzője, hogy a mintát be kell ágyazni.

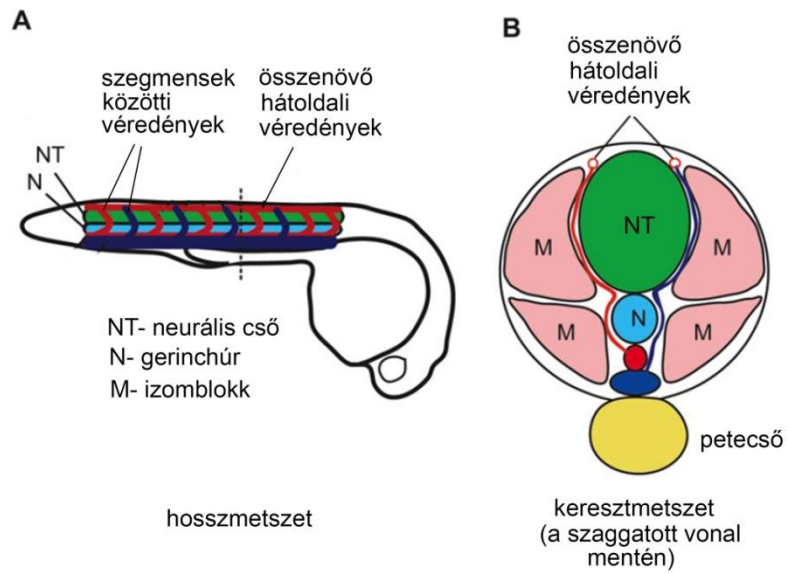
Alternatív megoldás a minta fagyasztása és a krio-FIB-SEM-ben történő vékonyítás.

A FIB-SEMről és az SBF-SEM-mel való összehasonlításáról már írtunk a III.3.7. fejezetben, azt itt nem ismételjük meg. Attól, hogy bizonyos vizsgálatokra CLEM-et alkalmaznak, nem zárja ki, hogy az előzetes vizsgálatokban nem-korrelatív fény- és nem-korrelatív elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végezzenek. Ilyenkor derítik fel, hogy melyek azok az ismeretek, amelyek a korrelatív vizsgálatok nélkül nem, vagy csak nehezen szerezhetők meg.

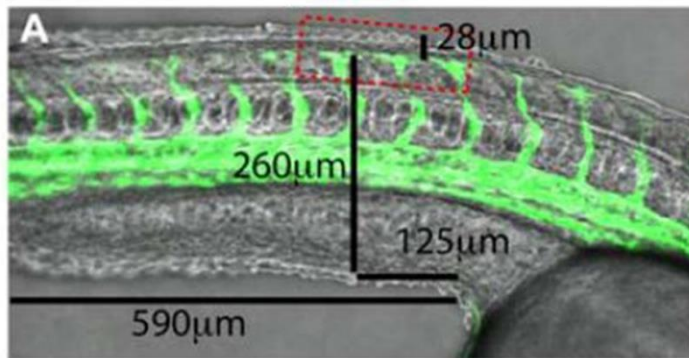
VI.4.1.1. Véredény vizsgálat

A FIB-SEM alkalmazását a CLEM-ben a zebrahal-embrió vizsgálatára kapcsán mutatjuk be.

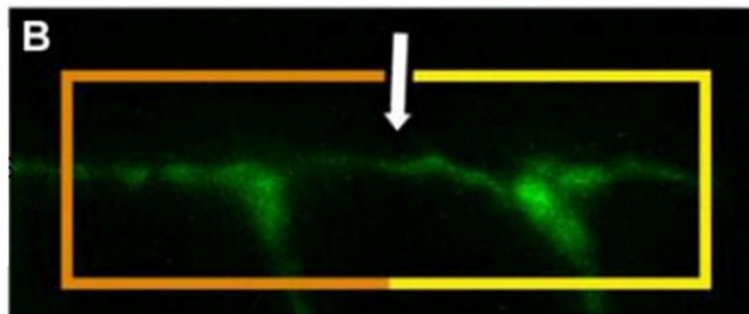
A véredények kifejlődése és összekapcsolódása zebrahal embrióban tranziens folyamat és bár *in vivo* videó-mikroszkópiával, időugrásos technikával nyomon követhető, de a felbontás nem elég nagy. (ARMER 2009). Az ultrastrukturális részletek rejtve maradnak. Minthogy a véredények nem egy síkban futnak, a feltérképezésükhöz a háromdimenziós vizsgálatok szükségesek mind a fény- mind pedig az elektronmikroszkópos esetben. A zebrahal embrió vázlatos felépítését a VI.10. ábrán mutatjuk.



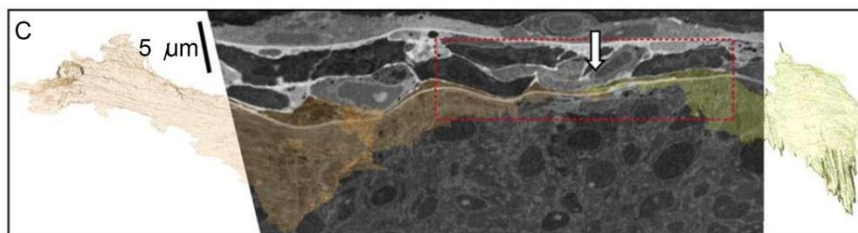
VI.10. ábra. 48 órás zebrahal-embrió sematikus ábrázolása A/hosszmetszet, B/ keresztmetszet.
A szegmensek közötti véredények sarjadása, növekedése és mozgása vezet a hátoldali véredények létrejöttéhez (ARMER 2009)



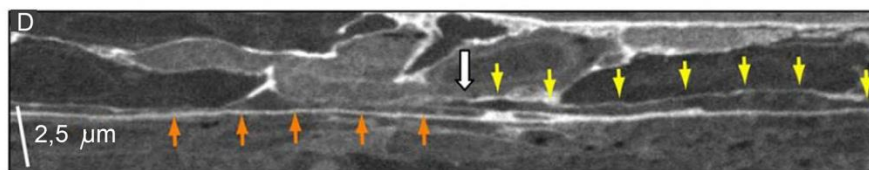
A/ konfokális kép + fáziskontraszt kép



B/ Az A/ ábrán pirossal bekeretezett rész kinagyítva



C/ Két véredény (narancssárga és citromsárga) összenövése
FIB-SEM kép

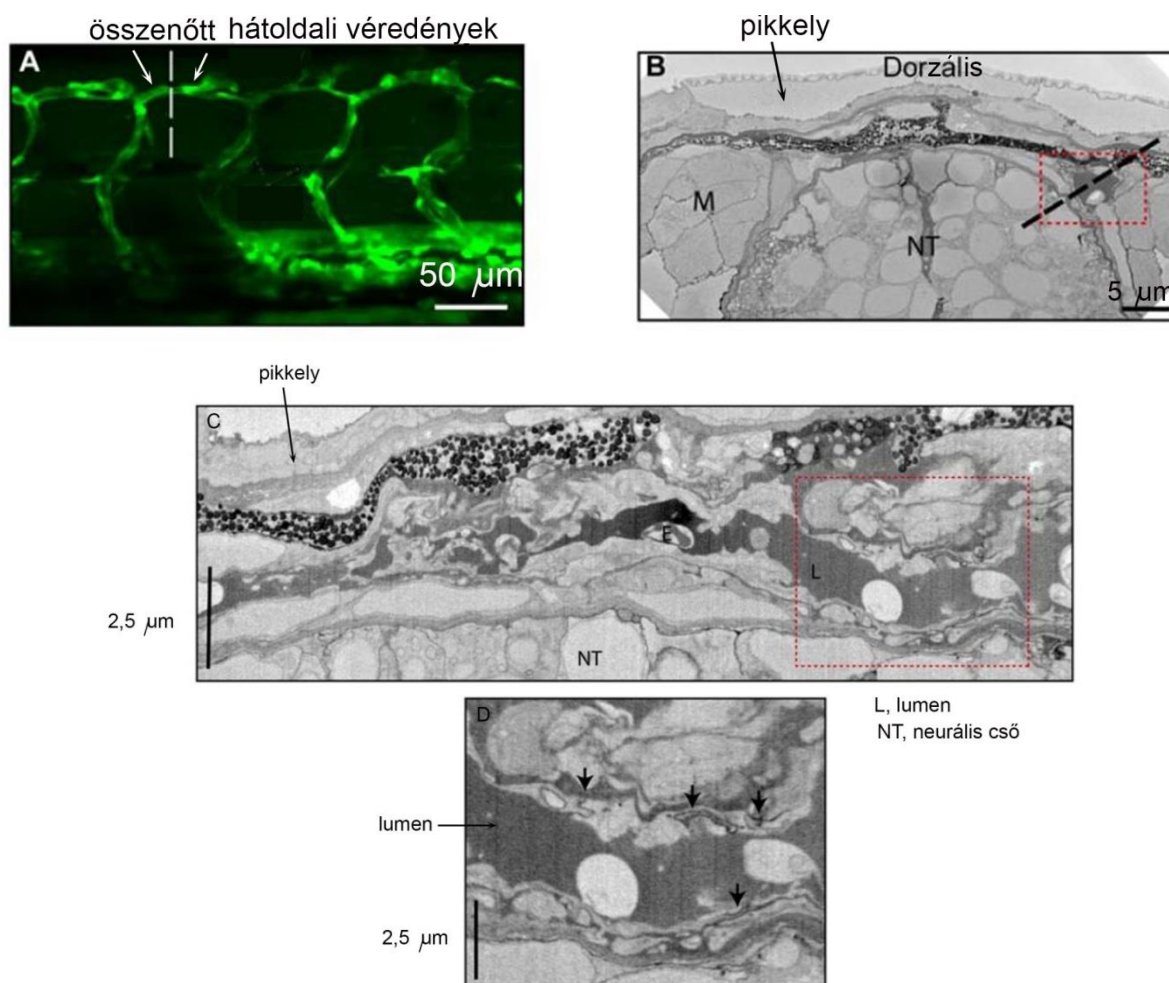


D/ A C/ ábrán pirossal bekeretezett rész kinagyítva

VI.11. ábra. 28 órás transzgenikus zebrahal embrió anasztomózisának CLEM vizsgálata. A C/ és D/ ábra FIB-SEM vizsgálatok alapján készült Amira szoftverrel. A fehér nyíl a véredények összenövési pontját jelzi (lásd a szöveget)

A zebrahal-embrió tranziens véredény-fúziójának CLEM vizsgálatát Armer és munkatársai vizsgálatai alapján mutatjuk be (ARMER 2009). A véredények képződésekor az endoteliális sejtek hosszú filopodiumokat növesztenek, majd a szomszédos sejtekből kinövő filopodiumok összenőnek. A folyamatot anasztomózisnak nevezik. Ebben a folyamatban üreges véredények képződnek, amelyek a véráramlást lehetővé teszik.

Az endoteliális sejtekből kinövő filopodiumok összenövése a VI.11.A/ ábra pirossal bekeretezett részében látható. A konfokális fluoreszcens (zöld) és fáziskontraszt (szürke) képet egymásra helyezve látjuk. A véredények megfestése géntechnikai úton történt EGFP-vel (Enhanced Green Fluorescent Protein), amelynek gerjesztéséhez argon lézert használtak ($\lambda=488$ nm). A képregisztráláshoz (fény- és elektronmikroszkópos egymásra illesztéséhez) a fluoreszcens felvételeken kívül szükség van egy fáziskontraszt vagy DIC (Differential Interference Contrast) képre is.



VI.12. ábra. 72 órás transzgenikus, zöld fluoreszcens fehérjével festett (EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein) zebrahal-embrió ultraszerkezete FIB-SEM felvételek alapján. A konfokális fluoreszcens felvétel szerint (A/ ábra) a hátoldali véredények teljesen kifejlődtek. A B/ ábra az A/ábrán szaggatott vonallal jelzett helyre vonatkozik. A C/ és D/ábrák az előző ábrákon pirossal bekeretezett területeken készültek. A D/ ábrán nyilakkal jelölt sötét vonalak sejtek közötti összekapcsolódások lehetnek. A véráramlás az L-lel jelölt lumenekben megy végbe (ARMER 2009)

Az A/ ábrán összenövő két véredény kinagyított képe látható a B/ ábrán. A kiválasztott terepet, a ROI-t (Region of Interest) FIB-SEM-ben vizsgálva jutottak a C/ ábrán mutatott képhez.

A narancssárgával és citromsárgával jelzett két véredényt FIB-SEM felvételek alapján rekonstruálták Amira szoftverrel. A C/ábrán pirossal bekeretezett ROI látható a D ábrán. A ferde vonallal jelölt távolság-markerek csak az adott irányra vonatkoznak, a görbülő síkok megjelenítését szolgáló szoftver miatt.

Az idézett közlemény komplex vizsgálataiban a FIB-SEM-en kívül idő-ugrásos (time lapse) videókat vettek fel, SBF-SEM-et és TEM-et is alkalmaztak. Mi itt csak a FIB-SEM-re vonatkozóan említünk néhány adatot: egy-egy leképezés között $400 \times 5 \mu\text{m}$ méretű terepen 72 nm vastag rétegeket távolítottak el Ga ionsugárral 7 nA-es ionárammal. A SEM képeket visszaszórt elektron üzemmódban vették fel 5 kV-os gyorsítófeszültség és 1,3 nA elektronáram mellett. 1778 felvétel készült ~87 óra alatt. Egyéb részleteket a közleményben találjuk (ARMER 2009). A FIB-SEM minta-előkészítésre, műszerezettségre és egyéb technikai részleteire Baena közleményét ajánljuk (BAENA 2021)

VI.4.2. CLEM kétfotonos fénymikroszkóppal és FIB-SEM-mel

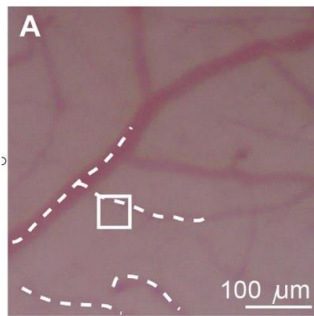
A CLEM vizsgálat két összetevőjét a kétfotonos mikroszkópiát (2PLSM, Two-Photon Laser Scanning Microscopy) és a FIB-SEM-et már a II. illetve a III. fejezetben röviden bemutattuk. Közös vonásuk, hogy képesek a harmadik dimenziót is megragadni.

VI.4.2.1. Agykéreg vizsgálat

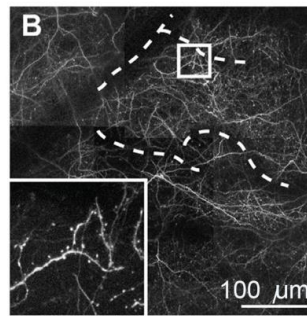
Egér agykérgének vizsgálata kapcsán (MACO 2013) azt kívánjuk bemutatni, hogyan lehet a két módszert összekapcsolni úgy, hogy a fénymikroszkópos vizsgálatához kiválasztott területet (ROI, Region of Interest) az elektronmikroszkópban újra meg lehessen találni. A folyamatot néhány képpel a VI.13. ábrán röviden magyarázzuk, de ezekhez a magyarázatokhoz további kiegészítéseket fűzünk a szövegben.

A felnőtt egér agyszövetének kétfotonos fluoreszcens vizsgálatához az állatot géntechnikai úton festették meg fluoreszcens fehérjével: a serkentő agykérgi neuronokat zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) vagy a gátló neuronokat tdTomato-val. A koponyán vágott ablakon keresztül készült a VI.13.A/ ábra. Ezután az agyszövetet perfúziós úton fixálták aldehidekkel a konvencionálistól eltérő módon, úgy, hogy az ultraszerkezetet megőrizték az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. A szövet felszeletelése után következett a két-fotonos fénymikroszkópos vizsgálat. Az A/ ábrán látható piros erek itt sötét árnyékként jelentkeztek (a B/ ábrán szaggatott vonallal jelölve) és mint ilyenek természetes tájékozódási markerként felhasználhatók. A vizsgálandó terep fehér négyzetekkel van jelölve az A/ és B/ ábrán, illetve kinagyítva is látható a B/ábra bal alsó sarkában. Ugyanez a kinagyított terep látható a C/ ábrán is, de már két lézerrel beégetett vonallal együtt (sárga nyílak mutatnak rá). A lézeres beégetéssel

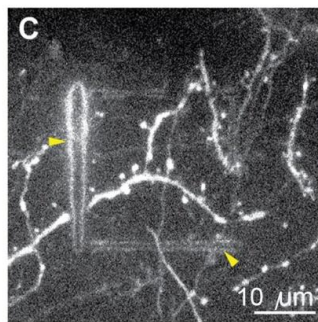
történő jelölést az V.1.3. pontban tárgyaltuk. A beégetés infravörös lézerrel történik, innen az elnevezés NIRB (Near Infrared Branding), célja, hogy a fénymikroszkóppal vizsgált terepet könnyen megtaláljuk az elektronmikroszkópban. A beégetés mélysége megegyezett a vizsgálandó neuritok síkjával. A DAB segítségével történő kontrasztosításra (IV.3. fejezet) itt nem volt szükség, mert a beégetett csíkok autofluoreszcensek, világítottak a kétfotonos mikroszkópban. Az elektronmikroszkópiához szükséges nehéz fémes festés és beágyazás után az agyszövetből a fluoreszcencia eltűnt, így a gyanta felületére is égettek be vonalakat a halovány NIRB vonalakhoz közel, amelyek transzmissziós fénymikroszkópban (VI.13. D/ ábra) és a FIB-SEM-ben is jól láthatók voltak. Ezt követően a minta blokk trimmelése és ionsugaras vékonyítása úgy történt, hogy a fénymikroszkópban vizsgált tartományt meg lehetett találni az elektronmikroszkópban is. (E/ és F/ ábra) A vizsgálatok protokollja megtalálható itt (MACO 2014).



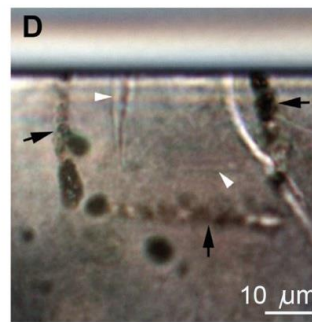
A/ fénymikroszkópos kép élő egér agykérgéről. Az erek természetes támpontként szolgálnak a neurológiai vizsgálatokhoz.



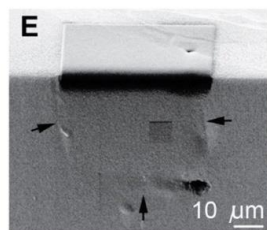
B/ Kétfotonos fluoreszcens kép. Az erek szaggatott vonallal jelölve. A kis négyzet által jelölt terület a bal alsó sarokban van kinagyítva.



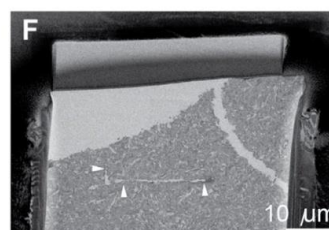
C/ Kétfotonos fluoreszcens kép. A lézer jelölés (NIRB) (sárga nyilak jelzik) az autofluoreszcencia miatt látható.



D/ Gyantába ágyazott metszet transzmissziós fénymikroszkópos képe. A NIRB-re fehér nyilak mutatnak. Lézer maratást fekete nyilak jelzik.



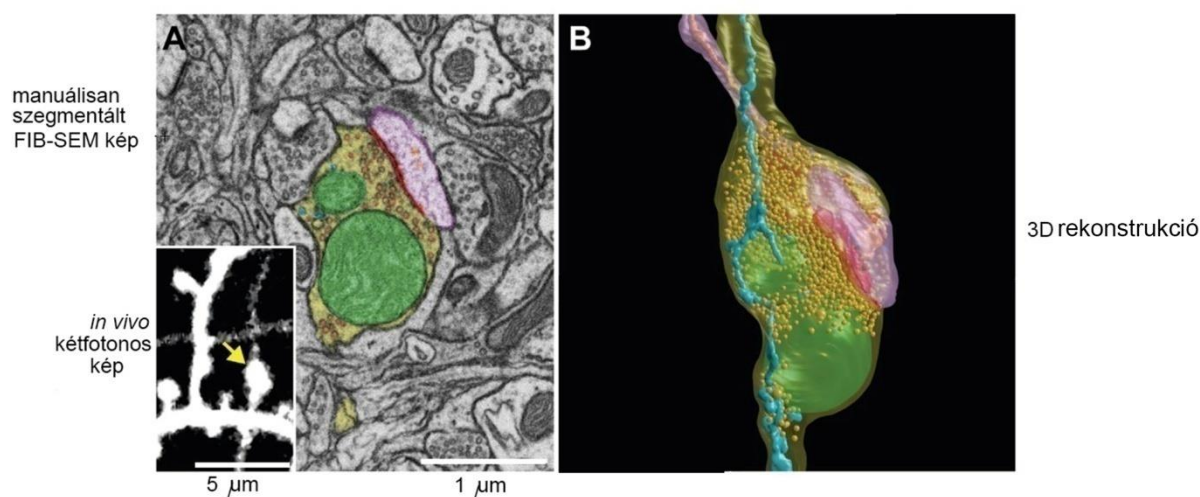
E/ FIB-SEM kép. A lézer maratást itt is fekete nyilak jelzik.



F/ FIB-SEM kép. A fehér nyilak a lézer jelölésre (NIRB) mutatnak.

VI.13. ábra. Egér agykérgének *in vivo* kétfotonos leképezése, lézer jelölés beégetéssel (NIRB) és szövetpreparálás FIB-SEM-hez (lásd a szöveget) (MACO 2013)

A NIRB jelölésnek köszönhetően a FIB-SEM-ben könnyebben megtalálhatók a kétfotonos mikroszkóppal leképezett neuronok. Példaként mutatunk egy szinaptikus gombot (bouton) a VI.14. ábrán.



VI.14. ábra. Egér agykérgéből származó axonvégződés, (szinaptikus gomb, (bouton)) és kapcsolatainak képe. A/ ábra kézzel szegmentált FIB-SEM, bal alsó sarkában egy *in vivo* kétfotonos képpel. A B/ ábra a rekonstruált bouton a környező sejszervecskékkal: axon bouton (sárga), mitochondrium (zöld), szinapszis (piros), szinaptikus vezikulum (aranyssárga), endoplazmatikus retikulum (kék), dendrittüske (rózsaszín), dendrites endoplazmatikus retikulum (narancssárga) (MACO 2013)

A kézzel való szegmentálás (VI.14. ábra) időigényes, ezért többnyire az interaktív, gépi úton tanuló ilastik programot (interactive learning and segmentation toolkit vagy más néven interactive machine learning for (bio) image analysis) használták szegmentálásra.

Az ilastik egy ingyenes, egyszerű, felhasználó-barát programcsomag interaktív képosztályozásra, szegmentálásra és analízisre (www.ilastic.org). Mind fénymikroszkópos, mind pedig elektronmikroszkópos képek feldolgozására alkalmas, 2D-ben és 3D-ben is. Nem igényel jártasságot sem a képfeldolgozásban, sem pedig a gépi tanulásban. A gépi tanulás abban áll, hogy a felhasználó kézzel bejelöl a képen egy objektumot és a háttérrel, ebből a program megtanulja, hogy mit kell keresnie. Az interaktív tanulás (tréning) azt jelenti, hogy ha nem vagyunk elégedettek az eredménnyel, akkor újabb objektumot és újabb háttérrel jelölünk be és a program finomítja az addigi eredményeit. Néhány objektum bejelölése után a szoftver jól azonosítja a keresett objektumot nagyszámú képen.

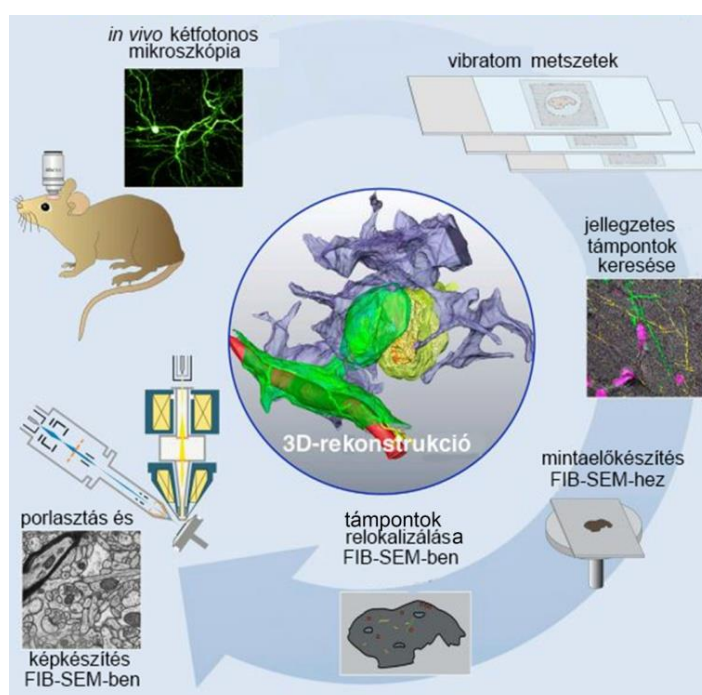
Az idézett közleményben (MACO 2013) a GFP-vel festett 1275 darab FIB-SEM képet és a 1505 darab tdTomatoval festett FIB-SEM képet illesztették össze a Fiji programban a (StackReg nevű) regisztrációs plug-in-nel egyetlen stack file-ba (képhalom fájl).

A Fiji szintén ingyenes, nyílt forráskódú, képfeldolgozásra szolgáló programcsomag, amely az ImageJ2-n alapul és sok plug-in-t (kiegészítő programot) tartalmaz (<https://imagej.net/software/fiji/>). Az ImageJ2 a képfeldolgozáson kívül kolokalizációra,

dekonvolúcióra, regisztrációra, szegmentációra, nyomkövetésre, vizualizációra és sok más egyébre is használható.

A szegmentálást és 3D rekonstrukciót az ilastik programmal végezték. Végül a szintén ingyenes Blender szoftvert használták a 3D modellezés képi megjelenítésére (<https://www.blender.org>).

A kétfotonos mikroszkóp és FIB-SEM kombinációjával megvalósított CLEM javított formáját találjuk Luckner közleményében (LUCKNER 2018), amely a fentebb tárgyalt vizsgálathoz (MACO 2013) hasonlóan, szintén egéragy vizsgálatára vonatkozik. A különbség az, hogy a NIRB jelöléshez szükséges költséges femtoszekundumos Ti: zafir lézer helyett több belső támpontot és egy új, ún. vékony beágyazást használ. A CLEM vizsgálat menetét a VI.15. ábra mutatja.



VI.15. ábra. Egéragy korrelatív fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatának menete az óramutató járásának megfelelő irányban (LUCKNER 2018)

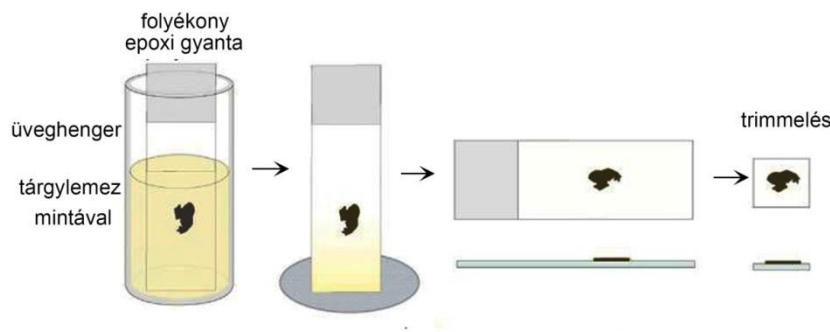
Az *in vivo* kétfotonos vizsgálatokban kiválasztják a FIB-SEM-ben tanulmányozandó dendritet. A minta vibratomos szeletelését követően többféle *ex vivo* konfokális vizsgálatot végeznek, amelyben jellegzetes belső támpontokat keresnek a FIB-SEM képpel való korrelációhoz.

A „vékony beágyazás” célja az, hogy

- ne kelljen külső támpont markereket használni, amelyek az ultraszerkezetet károsíthatják, vagy maszkolhatják,

- a beágyazó anyag olyan vékony legyen, hogy a fénymikroszkópos felvételeket közvetlenül illeszteni lehessen a kis nagyítású, de már beágyazott mintán készült SEM felvételekkel,
- az ionvékonyítás folyamatát meggyorsítsa.

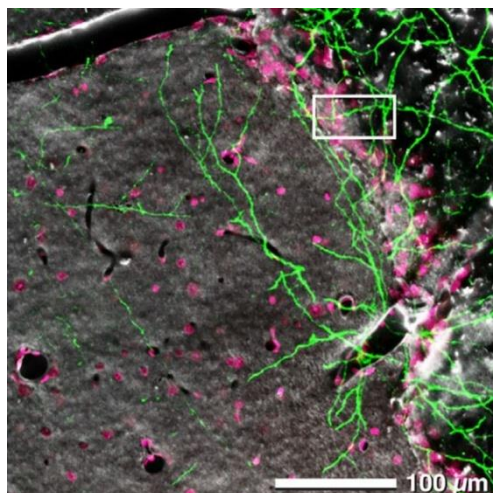
A „vékony beágyazás” egyszerűsített vázlata a VI.16. ábrán látható.



VI.16. ábra. A „vékony beágyazás” egyszerűsített sémája (LUCKNER 2018) (lásd a szöveget)

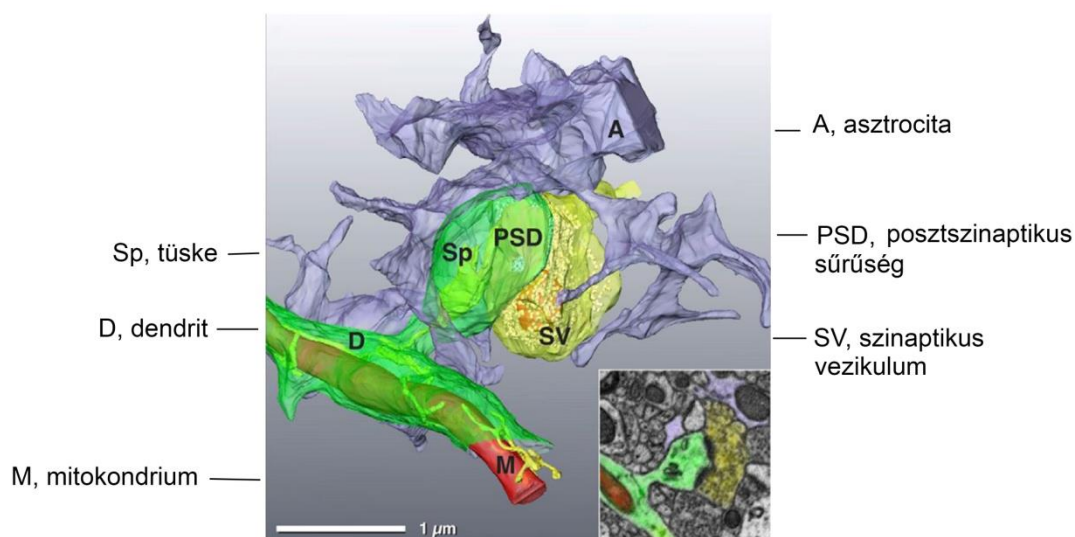
A „vékony beágyazás” kezdetén (VI.16. ábra) a vibratómmal készített agyi metszetet (~50 μm vastag) tárgylemezre helyezik, távtartóval elválasztva fedőlemezrel lefedik. A minta foszfáttal puffertelt sóoldatban (PBS) van. Fénymikroszkópos vizsgálat után a fedőlemez eltávolítják és nehézfém (ozmium és platina) vegyületekkel fixálják és dehidrálják. Ezt követi a folyékony epoxi gyantával való átitatás. A feleslegben lévő gyanta eltávolítása majd polimerizáció után a tárgylemezt méretre vágják (trimmelés). A tárgylemezt koloidális ezüsttel kötik a SEM mintatartóhoz majd szénnel bepárologatják (15–20 nm), hogy a minta elektromos feltöltődését a SEM-ben elkerüljék.

A fény és elektronmikroszkópos képek illesztésénél nemcsak a véredények és nukleuszok helyzetét vették figyelembe a vizsgálandó dendrit helymeghatározása szempontjából, hanem a hozzá sokkal kisebb távolságra lévő axonok hálózatát is, ezzel biztosítva a mikrométer körüli korrelációs pontosságot a SEM-mel.



VI.17. ábra. Zöld fluoreszcens fehérjével (EGFP) festett dendritek, DRAQ5-tel festett nukleuszok (magenta) konfokális fluoreszcens képe SEM felvétellel helyezve. A fehérrel bekeretezett dendrit került nagyfelbontású vizsgálatra. (LUCKNER 2018)

A dendrittüskék élettartama és asztrocita-fedettségük közötti összefüggések ismertetése túlhaladja a könyv célkitűzéseit, de azt megmutatjuk, hogy az ultrastrukturális vizsgálatok eredményeként a sok képből álló FIB-SEM képhalomból (image stack) milyen 3D képet rekonstruáltak egy háromrészes szinapszist illetően.



VI.18. ábra. Háromrészes szinapszis rekonstruált képe FIB/SEM képek alapján. A jobb alsó sarokban egyetlen SEM felvétel abból a képhalomból (image stack), amelyből a rekonstrukció készült. (A dendrittüske zöld, a preszinapszis sárga, és az asztrocita lila.) (LUCKNER 2018)

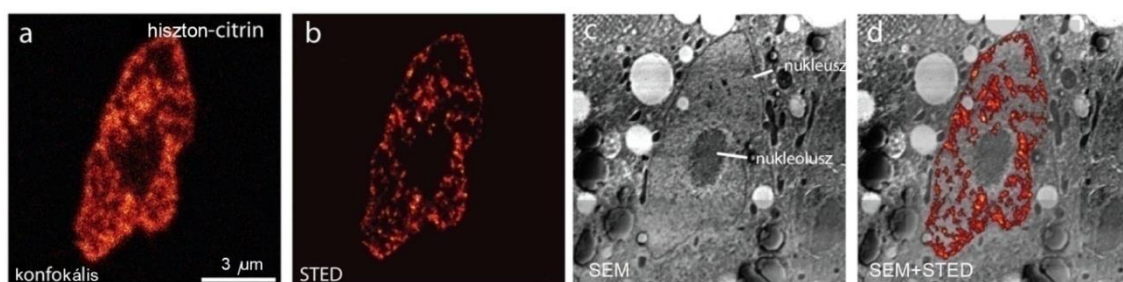
A vékony beágyazásról és az ultravékony beágyazásról többet megtudhatunk Lucknernek a mitózissal kapcsolatos CLEM vizsgálataiból (LUCKNER 2018B).

VI.5. Szuperfelbontású CLEM (SR-CLEM): STED és SEM korrelációja

A szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia mind két válfaját (a molekula csoportok és az egyedi molekulák leképezése, lásd a II.5. fejezetet) alkalmazta Watanabe és csoportja a korrelált STED és SEM, illetve a PALM és SEM vizsgálatokra (WATANABE 2011). Mi itt csak a STED+SEM vizsgálatokra térünk ki, a PALM-nak az SR-CLEM-ben való alkalmazását a következő paragrafusban tárgyaljuk.

A szuperfelbontású fénymikroszkópia és az elektronmikroszkópia között a felbontási szakadék kisebb, mint a konvencionális fénymikroszkópia és az elektronmikroszkópia között. A fénymikroszkópiának a ~200 nm-es felbontása szuperfelbontású módszerek alkalmazásával 10–20 nm-re javítható. A szuperfelbontású mikroszkópia a fehérjéknek a sejten belüli lokalizációját szolgálja nagyobb pontossággal, mint a nem-szuperfelbontású megfelelője.

VI. 5.1. Hisztonok vizsgálata



VI.19. ábra. Hisztonok vizsgálata *Caenorhabditis elegans*-ban fúziós citrin segítségével 120 nm vastag mintán: a/ konfokális mikroszkóppal, b/ szuperfelbontású STED-del, c/ pásztázó elektronmikroszkóppal. A d/ ábra a korrelált SEM+STED képet mutatja (WATANABE 2011)

A VI.19. ábrán bemutatott felvételekhez citrinnel jelölt, fixált és beágyazott mintát használtak 120 nm vastagságú metszeten. A felvételeken jól látható, hogy a H2B hiszton a sejtmagban foglal helyet, a nukleoluson kívül, de a felbontás (60–80 nm) nem elég jó ahhoz, hogy még pontosabb információkhoz jussunk a hisztonok elhelyezkedését illetően.

Az SR-CLEM előrelépést jelent az immun-elektronmikroszkópiához képest, mert antitestekkel kapcsolatos nehézségek az SR-CLEM-ben nem jelentkeznek és a beágyazott metszetben viszonylag mélyen fekvő fluoreszcens fehérjék is jól lokalizálhatók.

A közlemény négyféle hidrophil akril beágyazó anyagot jellemez (Lowicryl K4M, LR Gold, LR White és GMA (glikol-metakrilát)) a CLEM szempontjából. A mindegyik vizsgált akril gyantához adtak 2–5% vizet. A VI.19. ábrán látható minta GMA-ban lett beágyazva.

Vizsgálták a fixáló anyagok szerepét is. Nem az elektronmikroszkópiában szokásos glutáraldehidot és az 1%-os ozmium-tetroxidot használták, mert mindkettőről ismert, hogy erősen csökkenti a fluoreszcenciát. A fluoreszcencia és az ultraszerkezet megőrzése szempontjából optimálisnak bizonyult a 0,001%-os ozmiumtetroxid és a 0,1%-os kálium-permanganát elegye.

Végül a SEM és TEM szerepét elemzik az SR-CLEM-en belül és arra a következtetésre jutnak, hogy bár a TEM élesebb (jobb felbontású) képet ad, a SEM alkalmazása mégis sok előnyt kínál a TEM-hez képest. Indoklásként a minták rögzítésére szolgáló üveg fedőlemez használatát és a minták vastagságát adják meg. Az üveglemezen nagyon sok minta gyűjthető össze „szalag” formájában AT-tomográfiás vizsgálatokhoz. A fluoreszcens vizsgálatok szempontjából fontos 70–120 nm mintavastagság alkalmas SEM-re, de TEM-re kevésbé. A viszonylag vastag minta (120 nm) azért kell, hogy elég intenzív fluoreszcens jelet adjon. Ennél a vastagságnál viszont a TEM-ben az ultraszerkezet elmosódik. Ezzel szemben a pásztázó elektronmikroszkópban alacsony gyorsító feszültség alkalmazásával el lehet érni, hogy a mintának csak a felső 30 nm-es rétegből jöjjenek elektronok. (GOLDSTEIN 2003). (A VI.19. ábrán látható SEM kép készítésekor 5 kV gyorsító feszültséget és visszaszórt elektron detektort alkalmaztak.) A ~70 nm vastagság azért alsó korlát, mert akril beágyazó anyagból nehéz ennél vékonyabb metszetet készíteni.

VI.6. Szuperfelbontású CLEM (SR-CLEM): PALM és TEM korrelációja

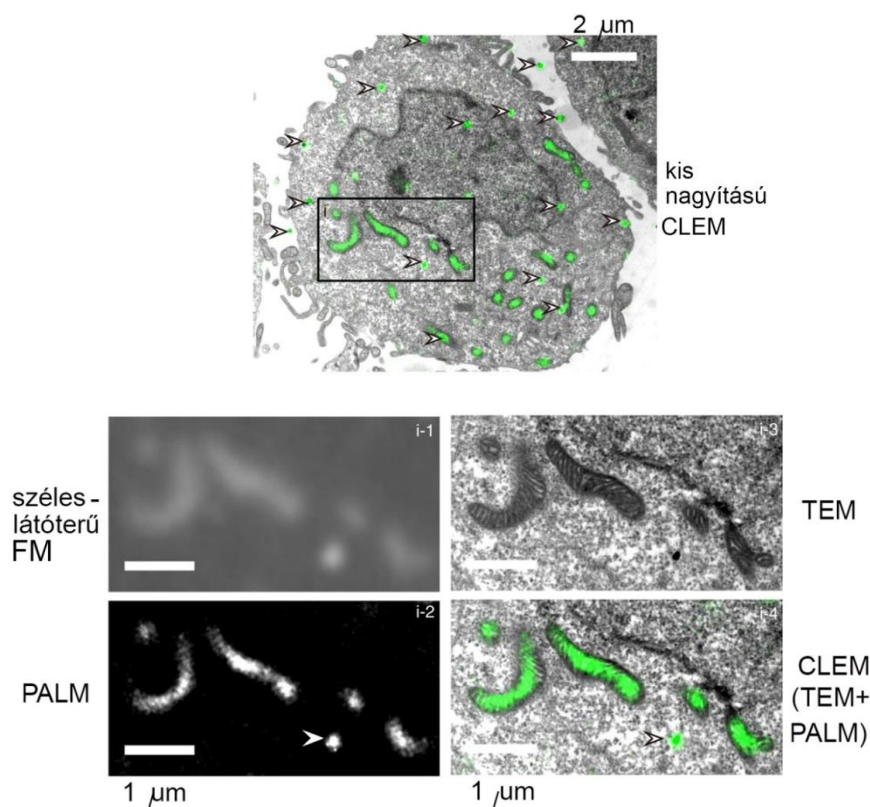
A PALM-ban (fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia) alkalmazott fotoaktiválható (photoactivatable) festék kezdeti állapotában nem (vagy nagyon kevésbé) fluoreszcens. A fotoaktiválás egy irreverzibilis kémiai folyamat: ultraibolya, ibolya vagy kék sugárzással aktívvá tehető a festék, ezután egy másik színű fénnel fluoreszcenciára gerjeszthető (II.14. ábra).

Az alább ismertetendő SR-CLEM fő problémája megegyezik az előző paragrafusban ismertetettel: a fluoreszcens intenzitás, az elektronmikroszkópos kontraszt és az ultraszerkezet megőrzése között kell optimális megoldást találni. Fu-nak és munkatársainak (FU 2020) sikerült olyan fotoaktiválható fluoreszcens fehérjét kifejleszteniük (mEosEM), amely nem veszíti el fluoreszcenciáját az elektronmikroszkópiához kedvező 1%-os ozmium-tetroxidos fixálás és hidrofób epoxi gyantába (Epon) való beágyazás után!

Röviden az Eos fluoreszcens fehérjéről: zölden világító fluoreszcenciája ($\lambda=516$ nm) vörösbe vált át ($\lambda=581$ nm) ultraibolya sugárzás ($\lambda\sim390$ nm) hatására. Az „m” betű a fluoreszcens fehérjék előtt monomert jelent. Az eredetileg korallból előállított Eos tetramer volt.

Az mEosEM az EM utótagot onnan kaphatta, hogy az elektronmikroszkópos minta-előkészítést is elviseli.

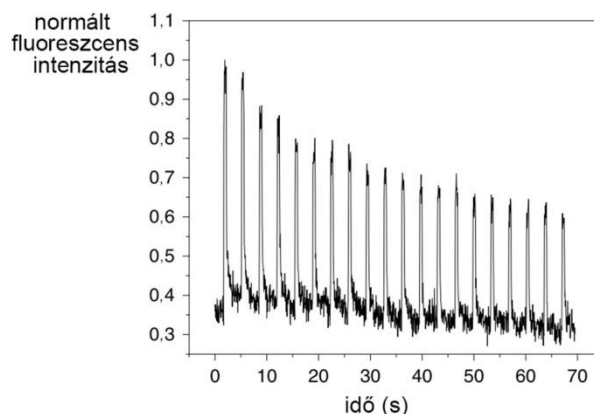
VI.6.1. Mitochondriumok vizsgálata



VI.20. ábra. Szuperfelbontású CLEM Epon-ba beágyazott minta 100 nm-es metszetén. A minta kínai hörcsög petefészek sejtje, a mitokondriumot mEosEM-mel festették meg géntechnikai úton. A vízszintes nyílhegyek a kis nagyítású képen és az alsó sor két képén arany nano-részecskékre mutatnak. A konvencionális széleslátóterű képen a részletek elmosódottak, de a szuperfelbontású képen (PALM) fényesebbek és élesebbek. (FU 2020)

A VI.20. ábrán bemutatott mintát fixálták, teljesen víztelenítették és Eponba ágyazták be. Az mEosEM-mel megfestett mitokondriumokat mind fénnel, mind elektronokkal jól lehetett leképezni.

Az mEosEM az Eponba történt beágyazás után nem mutatja a zöldből a vörösre váltást, mint előtte, hanem a folyamatos 488 nm-es kék és a pulzált 405 nm-es ibolya-kék fény hatására fotókapcsolóként viselkedik zöld színben (VI.21. ábra). A közlemény szerzőinek nincs egyértelmű magyarázatuk a jelenségre.



VI.21. ábra. Az Eponba ágyazott mEosEM fotókapcsoló tulajdonságúvá válik folytonos 488 nm-es kék és pulzáló 415 nm-es ibolyakék fény hatására. Az ábrán látható periodicitás nem egyezik meg a pulzáló megvilágítás periodicitásával (FU 2020)

Az epoxi alapú gyanták (Epon, Durcupan) keményebbek, mint az előző paragrafusban említett akril alapú gyanták, könnyebben vághatóak, kevesebb kompressziós műterméket eredményeznek és a TEM alkalmazásban jobban megőrzik a kontrasztot (BYKOV 2016).

A képek regisztrálása arany nanorészecskék, mint támpont markerek segítségével történt (VI.20. ábra) az ingyenes, nyílt forráskódú eC-CLEM (easy cell-correlative light and electron microscopy) program (HEILIGENSTEIN 2017) felhasználásával.

Irodalom

- AGRONSKAIA, A. V. *et al.* (2008): Integrated fluorescence and transmission electron microscopy, *Journal of Structural Biology*, 164, 183-189.
- ARMER, H. E. J. *et al.* (2009): Imaging Transient Blood Vessel Fusion Events in Zebrafish by Correlative Volume Electron Microscopy, *PLoS ONE* 4,11, e7716. doi: 10.1371/journal.pone.0007716.
- BAENA, V. *et al.* (2021): FIB-SEM as a Volume Electron Microscopy Approach to Study Cellular Architectures in SARS-CoV-2 and Other Viral Infections: A Practical Primer for Virologist, *Viruses* 13, 611. doi:10.3390/v13040611.
- BOOTH, D. G. *et al.* (2016): 3D-CLEM Reveals that a Major Portion of Mitotic Chromosomes is Not Chromatin, *Molecular Cell* 64, 790-802.
- BYKOV, Y. S. *et al.* (2016): Correlative light and electron microscopy methods for the study of virus-cell interaction, *FEBS Letters* 590, 1877-1895.

- DRIEL, V. L. F. *et al.* (2008): Fluorescent labeling of resin-embedded sections for correlative electron microscopy using tomography-based contrast enhancement, *J. Struct. Biol.* 161, 372-383.
- FLEMMING, W. (1875): Studien über die Entwicklungsgeschichte der Najaden, *Sitzungsgeber. Akad. Wiss. Wien* 71, 81-147.
- FU, Z. *et al.* (2020): mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM, *Nature Methods, Brief Communication*, doi: 10.1038/s41592-019-0613-6.
- GOLDSTEIN, J. I. *et al.* (2003): Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, A Text for Biologists, Material Scientists and Geologists, 3rd edition, Springer New York, ISBN 978-0-306-47292-3. doi:10.1007/978-1-4615-0215-9
- HEILIGENSTEIN, X. *et al.* (2017): eC-CLEM: a multidimension, multimodel software to correlate intermodal images with a focus on light and electron microscopy, *Methods in Cell Biology* 140, 336-346, ISSN 0091-679X, doi: 10.1016/bs.mcb.2017.03.014.
- LUCKNER, M. *et al.* (2018): Label-free 3D-CLEM Using Endogenous Tissue Landmarks, *iScience* 6, 92-101.
- LUCKNER, M. *et al.* (2018B): Precise and economic FIB/SEM for CLEM: with 2 nm voxels through mitosis, *Histochemistry and Cell Biology* 150, 149-170.
- MACO, B. *et al.* (2013): Correlative *in Vivo* 2 Photon and Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy of Cortical Neurons, *PLoS ONE* 8,2, e57405. doi: 10.1371/journal.pone.0057405.
- MACO, B. *et al.* (2014): Correlative *in Vivo* 2-Photon and Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy: 3D Analysis of Neuronal Ultrastructure, *Methods in Cell Biology* 124, ISSN 0091-679X, doi: 10.1016/B978-0-12-801075-4.00016-1.
- MARKERT, S. M. *et al.* (2016): Filling the gap: adding super-resolution to array tomography for correlated ultrastructural and molecular identification of electrical synapses at the *C. elegans* connectome, *Neurophotonics* 3,4, 041802. doi: 10.1117/1.NPh.3.4.041802.
- MICHEVA, K. D. *et al.* (2007): Array Tomography. A new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits, *Neuron* 55,1, 25-36.
- MICHEVA, K. D. *et al.* (2010a): Rodent Brain Fixation and Embedding, *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5523.
- MICHEVA, K. D. *et al.* (2010b): Array Tomography: Production of Arrays, *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5524.

- MICHEVA, K. D. *et al.* (2010c): Array Tomography: Immunostaining and Antibody Elution, *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5525.
- MICHEVA, K. D. *et al.* (2010d): Array Tomography: Imaging Stained Arrays, *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5526.
- MICHEVA, K. D. *et al.* (2010e): Array Tomography: Semiautomated Image Alignment, *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5527.
- NANGUNERI, S. *et al.* (2012): Three-Dimensional, Tomographic Super-Resolution Fluorescence Imaging of Serially Sectioned Thick Samples, *PLoS ONE* 7,5,e38098. doi: 10.1371/journal.pone.003098.
- OERTI, D. *et al.* (2011): Projection neuron circuits resolved using correlative array tomography, *Frontiers in Neuroscience*, 5, 50. doi: 10.3389/fnins.2011.00050.
- PAWELETZ, N. (2001): Walther Flemming: pioneer of mitosis research, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 2,72-75.
- PAWLEY, J. B. (1995): Handbook of biological confocal microscopy, Plenum Press, New York.
- VALENTIJN, J. A. *et al.* (2007): Novel localization of Rab3D in rat intestinal goblet cells and Brunner's gland acinar cells suggests a role in early Golgi trafficking, *Am. J. Physiol. Gastrotest. Liver Physiol.* 2006, 00520.
- WATANABE, S. *et al.* (2011): Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy, *Nat Methods* 8, 1, 80-84.

VII. CLEM: minta-előkészítés alacsony hőmérsékleten, elektron-mikroszkópia szobahőmérsékleten

VII.1. Tokuyasu-kriometszés alkalmazása CLEM-ben

Ebben a VII: fejezetben két olyan módszert tárgyalunk, amelyben a minta-előkészítése alacsony hőmérsékleten, de az elektronmikroszkópos vizsgálat szobahőmérsékleten történik. Az egyik módszer a Tokuyasu-kriometszést alkalmazza, a másik módszerben a mintát nagy nyomáson fagyasztják és a fagyasztásos helyettesítés után emelik a minta hőmérsékletét szobahőmérsékletre az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. Azokat a vizsgálatokat, amelyekben az elektronmikroszkópos vizsgálat is alacsony hőmérsékleten zajlik, a VIII. fejezetben krio-CLEM címszó alatt tárgyaljuk. Először bemutatjuk a gyakran használt elektronmikroszkópos preparációs technikát a Tokuyasu-kriometszést.

VII.1.1. Tokuyasu-kriometszés

Tokuyasu 1973-ban dolgozott ki egy olyan minta-előkészítési eljárást szövetekre és szuszpenzióban lévő sejtekre, amely az addig használt gyantába történő beágyazási módszerek hátrányait hivatott kiküszöbölni (TOKUYASU 1973). többek között a gyantába ágyazás időigényességét és az antitesteknek a beágyazott mintába való nehéz behatolását. Az eljárás jó kompromisszumot jelent az ultraszerkezet és az antigenecitás megőrzése között.

A Tokuyasu-kriometszést vázlatosan a VII.1. ábrán mutatjuk.

- aldehides fixálás
- cukor oldattal való átitatás
- fagyasztás (vitrifikálás)
- ultravékony metszés
- EM mikrostélyra helyezés
- öblítés
- immunfestés
- metilcellulózzal és uranilacetáttal való átitatás
- transzmissziós EM szobahőmérsékleten

VII.1. ábra. A Tokuyasu-kriometszés (immunfestéssel kiegészítve) (BOS 2014)

Az aldehides fixáláshoz enyhe, 0,1-0,2%-os glutáraldehidet használnak. Az erős fixálók, melyek sok kereszt kötést hoznak létre, csökkentik az antigenecitást. (A formaldehides fixálást illetően lásd Tokuyasu 1986-os közleményét (TOKUYASU 1986). A cukoroldat védőközegként (cryoprotectant) szerepel, a jégkristályok képződését akadályozza meg a minta fagyasztásakor. További szerepe, hogy fagyasztáskor a minta keménységét, plaszticitását úgy

befolyásolja, ahogy a fagyasztás hőmérsékletének változtatásával egyedül nem lehetne elérni. A cukoroldat alkalmazásának lényege, hogy az oldat kis molekulású és behatol a sejtekbe. (TOKUYASU 1980). A mintának a metszéshez szükséges homogenitását még zselatinba való beágyazással szokták növelni, az ugyanis a nagyobb üregeket kitölti, de a molekuláinak nagy mérete miatt a sejtekbe nem tud behatolni. Metszés után a mintából könnyen kimosható.

A fagyasztás cseppfolyós nitrogénbe merítéssel történik, a vitrifikálás elnevezés az üvegszerű (vitróz), amorf jég képződésére utal. A másik lehetséges fagyasztási eljárás a nagy nyomású fagyasztás (High Pressure Freezing, HPS) kombinálva fagyasztásos helyettesítéssel (Freeze Substitution, FS), amit a következő pontban tárgyalunk. A merítéses fagyasztás vékony minták ($<10\text{ }\mu\text{m}$), a HPS pedig vastag, de $<200\text{ }\mu\text{m}$ -nél vékonyabb minták fagyasztására alkalmas.

A Tokuyasu-kriometszést követően a mintát szobahőmérsékletűre felolvasztják, leöblítik és következhet az immunarany-festés és a szobahőmérsékleten történő mikroszkópos vizsgálat, többnyire TEM. A metilcellulóz oldattal történő átitatás biztosítja, hogy a sejtmembránok ne zsugorodjanak szárításkor, az uranilacetát pedig a TEM kontrasztosításhoz szükséges.

A Tokuyasu-metszés sokkal gyorsabb, mint a gyantába való beágyazás és a minta hidratált állapotban marad, továbbá megőrzi az antigenecitást. Ezért gyakran alkalmazzák immun-elektronmikroszkópiával kombinálva.

A cukoroldat koncentrációját, a metszés hőmérsékletét és a metszet vastagságát illetően a számértékek nincsenek köbe vésve. (Tájékoztató jellegű adatok: 2,3 mólos cukoroldatot használnak, $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on metszenek, a metszetvastagság 70 nm TEM minták esetén). A Tokuyasu-kriometszés fejlesztését nyomon követhetjük az idézett közlemények alapján (TOKUYASU 1980, 1986), (SLOT 2007). Slot közleménye protokollt is tartalmaz a kriometszésről és az immunfestésről (SLOT 2007).

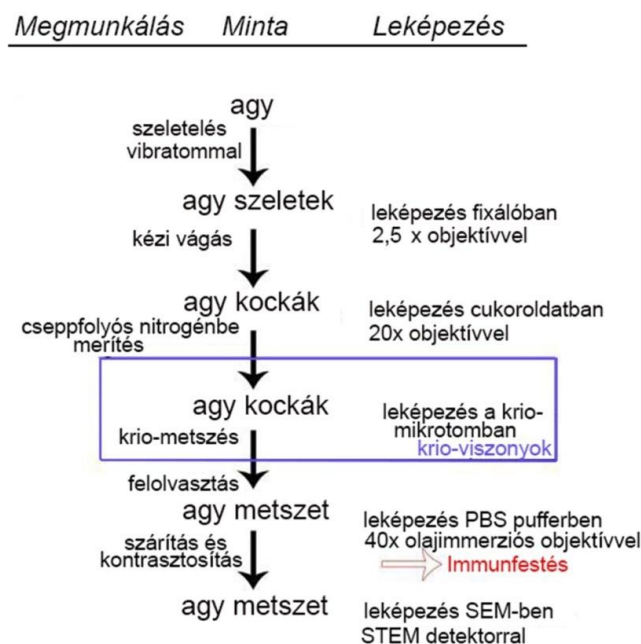
VII.1.2. Asztrociták vizsgálata

A népszerű Tokayasu-kriometszés CLEM-mel kombinált alkalmazására hozzuk példaként Fonta és munkatársainak munkáját, akik modell rendszerként GFP-vel megfestett transzgenikus egerek agyának asztrocitáit vizsgálták. Az ultra vékony metszeteken *ex vivo* fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat, majd immunarany festést végül elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztek (FONTA 2015). A vizsgálatok célja olyan protokoll kidolgozása volt, amely segít a fluoreszcensen megjelölt objektumnak az elektronmikroszkópban való újra megtalálásában, azonosításában és nagyobb felbontásban való tanulmányozására.

Azért a Tokayasu-kriometszést választották minta-előkészítésre, mert alkalmas immun-lokalizációra és a GFP fluoreszcenciája megmarad a vizsgálatok során az elektron-

mikroszkópozás előtti utolsó lépésig, a szárításig, nem lévén a folyamatokban dehidrálás és gyantába ágyazás. A nedvesség jelenléte különösen fontos a GFP fluoreszcenciájának megmaradásában (TSIEN 1998, SLOT 2007, PEDDIE 2014).

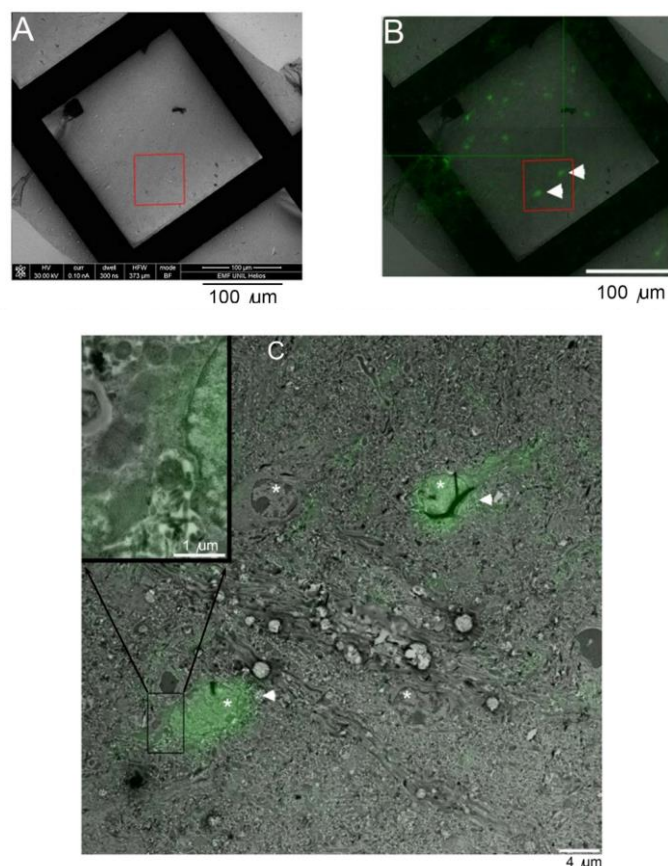
A CLEM vizsgálataik különlegessége volt, hogy úgy kellett a kísérleti berendezéseiket átalakítani, hogy a minta-blokk elkészítése és a metszetkészítés alatt is lehessen fénymikroszkópos felvételeket készíteni, azért, hogy a blokk vagy a metszet tartalmazzon legalább egy GFP-vel jelölt asztrocitát. A CLEM folyamatát a VII.2. ábra mutatja.



VII.2. ábra. Minta-előkészítés Tokuyasu-technikával és leképezések. Munkamenet a szobahőmérsékleten történő korrelatív fény- és elektronmikroszkópiához (FONTA 2015)

A vizsgálandó mintát a cseppfolyós nitrogénbe való bemerítését (plunge freezing) megelőzően cukoroldatba helyezték (VII.2. ábra), kristályos jég képződésének meggátolására. A krio-metszést követően a mintát felolvasztották szobahőmérsékletűre. Mint látjuk az ábrán, egy elágazó lépés az immun-arany festés, amelynek célja a GFP-nek az elektronmikroszkópban immunarany által történő azonosítása volt. Többféle antigén azonosítása lehetséges ugyanazon mintán, amennyiben különböző méretű arany szemcséket használnak. A preparáció utolsó lépéseként az ultravékony (70–100 nm) metszeteket metilcellulóz és uranilacetát oldattal kezelték. Az előbbi meggátolja a sejtmembránok összezsugorodását a szárításkor, az utóbbi az elektronmikroszkópos kontrasztosítást szolgálja. Sajnálatos módon ez a lépés kialszítja a GFP fluoreszcenciáját (KARREMAN 2009), ezért is szükséges a fluoreszcens és elektronkép regisztrációjához („egymásra helyezésére”) arany szemcsék igénybevétele.

A Tokuyasu-metszeteket szobahőmérsékleten TEM-ben szokták vizsgálni, itt viszont SEM-ben, transmissziós üzemmódban STEM detektorral történt a felvételek készítése. Az ok, hogy a felhasznált MAPS szoftver (FEI cég terméke) csak SEM-eken használható. A csempe-elrendezésű képeket MAPS segítségével automatikusan vették fel és a „csempéket” MAPS-al (vagy Photoshoppal) fűzték össze. Az így kapott nagy látóterű képen belül az érdekes terület kikereshető és tovább nagyítható.



VII.3. ábra. Egér agyának metszete: A/ ábra STEM kép. B/ ábra STEM plusz fluoreszcens kép. A C/ ábra az A/ és B/ ábrán pirossal bekeretezett résznek felel meg. Nagy minta-terület ($66\ \mu\text{m} \times 57\ \mu\text{m}$) elektronmikroszkópos leképezése Maps szoftver „csempekészítő” opciójával. A kép 6×6 „csempéből” készült, amelyet Photoshop-pal fűzték egybe. Erre helyezték rá a fluoreszcens képet. A C ábrán négy * látható, amelyből csak kettő mutatja a GFP fluoreszcenciáját (fehér nyilakkal jelölve a B/ és C/ ábrán). A C/ ábrán látható, vizsgálatra érdemes területen a nagyítást tovább növelve az arany jelölés is láthatóvá válik (kép a bal belső sarokban). Ez bizonyítja, hogy jól korrelál a GFP fluoreszcencia és az immunarany jelölés a Tokuyasu-módszerrel készült ultravékony ($70\ \text{nm}$) metszeten (FONTA 2015)

A VII.3. ábrán látható eredmény nem kézenfekvő, mert előfordul, hogy a fluoreszcens nanorészecskék sugárzását a kolloidális nehézfém részecskék pl. arany, kioltják (KANDELA

2003) vagy a fluoreszcens nanorészecskék a CLEM-ben az arany részecskékkel nem kolokalizálnak (MILES 2017).

VII.1.3. Endocitózis vizsgálata

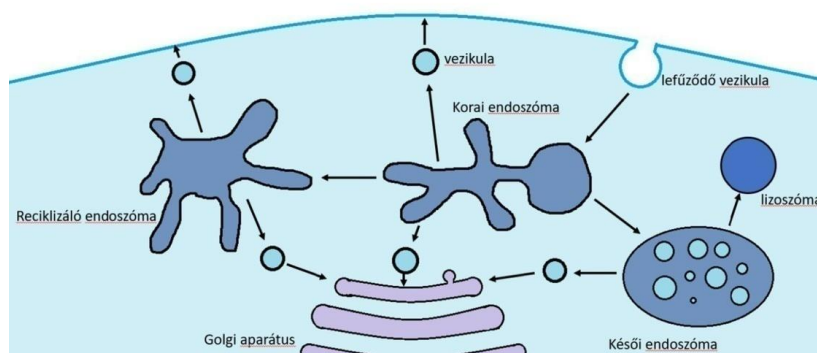
A Tokuyasu-kriometszésnek a CLEM-ben való alkalmazásáról Fermie endocitózis-vizsgálatát mutatjuk be (FERMIE 2021).

A CLEM egyik legnehezebb feladata a fluoreszcens képen látható markernek az EM képen látható megfelelő szerkezethez (objektumhoz) való pontos hozzárendelése (regisztrálása).

A hangsúly a pontosságon van, mert egyébként többféle lehetőség áll a vizsgáló rendelkezésére a képek közötti kapcsolatok megállapítására. Ilyenek például a minták jellegzetes morfológiai vonásai, véredény-elágazások, sejtmagok, járulékosan felvitt jelölések, pl. lézerrel történő beégetés, maga a mintát hordozó rács pozíciói stb., de ezek nem biztosítanak 50–150 nm-es korrelálási pontosságot.

Fermie és munkatársai olyan nagypontosságú kétfunkciós (bimodális) endocitotikus markert alkalmaztak, amely kiválóan alkalmas 3D CLEM-re Tokuyasu-kriometszetek, gyantába ágyazott és krio-EM metszetek esetén is. Mi itt csak a Tokuyasu-kriometszéssel kapcsolatos eredményeire térünk ki, abból is csak a 2D CLEM-re (FERMIE 2021). A kétfunkciós markerek (IV.2. fejezet) mind a fénymikroszkópban, mind pedig az elektronmikroszkópban jól láthatók, így hasznosak a CLEM-ben.

Mint ahogy a vizsgálatok a korai és késői endoszómákra és lizoszómákra vonatkoznak, felidézzük az endoszómákra vonatkozó ismereteket (VII.4. ábra).

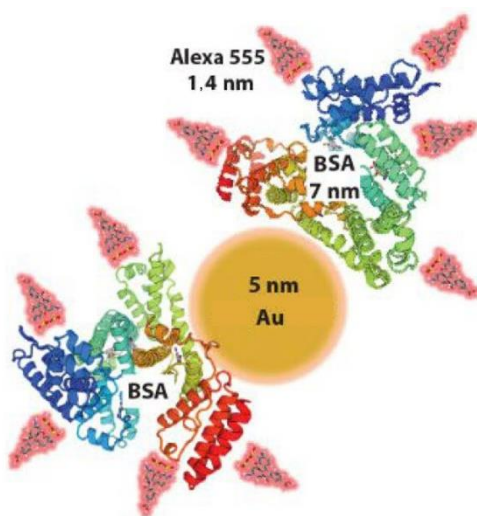


VII.4. ábra. Az endoszóma életének különböző szakaszai: először egy korai endoszóma alakul ki, amely fogadja és küldi a vezikulákat. A korai endoszóma átalakulhat reciklikáló endoszómává, illetve multivezikuláris testként lizoszómával egyesülve endolizozómává alakul

(WIKIPÉDIA, ENDOSZÓMA)

Az endocitotikus nyomkövetők közül régóta használják a dextránt, albuminokat és nanorészecskéket, amelyekhez vagy fluorofort vagy kolloidális aranyat konjugáltak (HANAKI 2003, GEOFFROY 1984, ZHANG 2013, CHITHRANI 2006, CONNOR 2005).

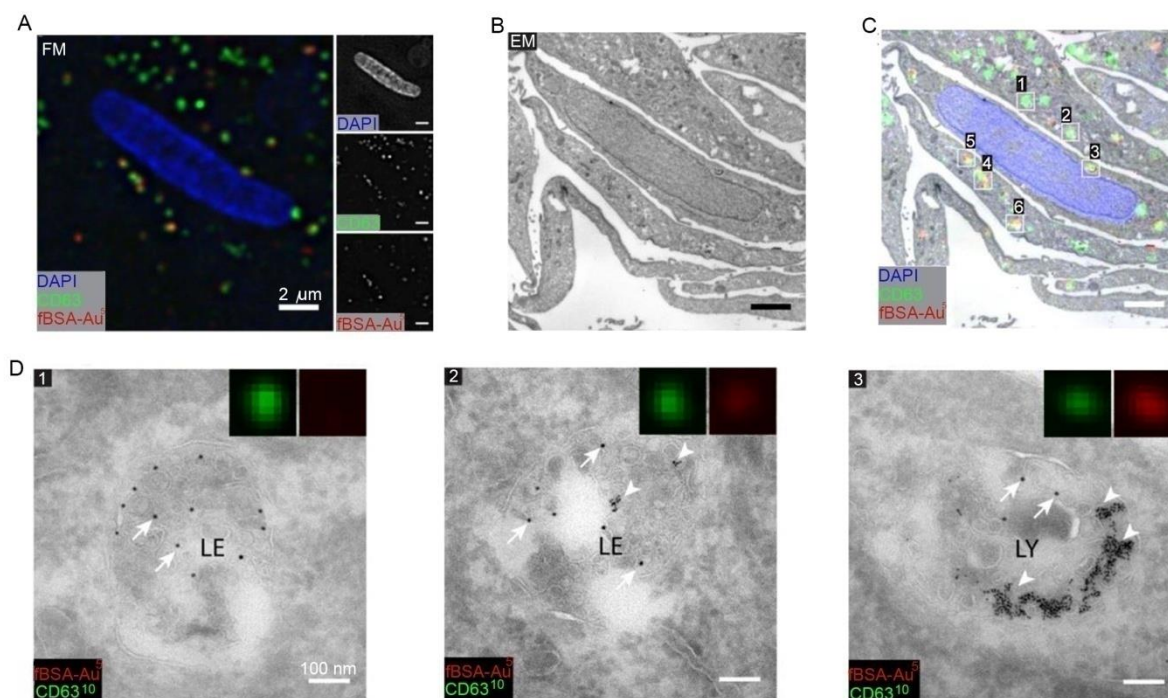
Az fBSA-Au kétfunkciós marker kolloidális aranyból áll, amelyet fluoreszcens szarvasmarha-szérum albuminnal stabil, monodiszperz anyaggá alakítottak. Az fBSA-Au jelölésben az „f” a fluoreszcenciára, a BSA a szarvasmarha-szérum albumin angol nevére (Bovine Serum Albumin) utal. Az egyik változatban arany gömböcskék 5 nm-esek (ezt fBSA-Au⁵-tel jelölték), a másik változatban 10 nm-esek (jelölése fBSA-Au¹⁰) és támpont markerként (fiducial) szolgálnak a 2D és 3D CLEM-ben (VII.5. ábra).



VII.5. ábra. Kétfunkciós endocitotikus marker (fBSA-Au⁵) 5 nm-es arany szemcsével és fluoreszcens szarvasmarha-szérum albuminnal (FERMIE 2021)

Az fBSA-Au⁵ kis mérete miatt hatékonyan vesz részt az endocitózisban, a fluoreszcens jel és az arany kontrasztja az elektronmikroszkópban jól korrelál és kompatibilis más immun-elektronmikroszkópos módszerekkel is. Az arany azért nem oltja ki a fluoreszcens jelet, mert a BSA elég nagy távolságot biztosít az arany szemcse és a fluoreszcens Alexa555 festék között.

Az endocitózisban az EAA1 (Early Endosome Antigen 1) a korai endoszómában, a LAMP-1 a lizoszómában található meg, a CD63 pedig a késői endoszómában és a lizoszómában. Ezeket krio-metszet felolvasztása után immunfestéssel festették, amely 10 nm-es kolloidális konjugált aranyat tartalmazott. A vizsgálat tárgyát képező fBSA-Au⁵-ben pedig 5 nm-es arany gömböcskék voltak, így az 5 nm-es és 10 nm-es aranyszemcsék jól megkülönböztethetők a TEM-ben. Az eredményt a VII.6. ábra segítségével magyarázzuk.



VII.6. ábra. CLEM kétfunkciós $f(\text{BSA-Au}^5)$ markerrel HeLa sejtek olyan kompartmentumaiban, amelyek CD63-ra pozitívak (FERMIE 2021)

A/ Ultra vékony metszet (70 nm) fluoreszcens mikroszkópos felvétele, amely (Alexa488 és Au^{10} -el) immunfestett CD63 és fluoreszcens (Alexa55-öt tartalmazó) $f\text{BSA-Au}^5$ együttes képét mutatja.

B/ Az A/ ábra terepének megfelelő elektronmikroszkópos kép. C/ Az A/ és B/ ábra egymásra helyezése.

D/ A C/ ábrán 1-el, 2-vel és 3-mal jelölt részei kinagyítva. (Az eredeti közleményben a 4,5,6, jelű terek kinagyított képei is szerepelnek.) LE késői endoszóma (late endosome), LY lizoszóma

A fenyér nyilak a CD63 10 nm-es arany gömböcskéire, a szár nélküli nyílhegyek az $f\text{BSA-Au}^5$ 5 nm-es arany gömböcskéire mutatnak (lásd a szöveget)

A VII.6. A/ábrájában az eredetileg fekete-fehér fluoreszcens felvételeket utólag színezték. A C/ ábra szerint nagyon jó a fluoreszcens és elektronmikroszkópos felvételek megfelelése. A D/ ábrák képeinek jobb felső sarkában látható színes képeken a zöld szín a CD63 fluorszcenciáját, a piros szín az $f\text{BSA-Au}^5$ fluoreszcenciáját jelzi. A D1 ábrán csak immunfluoreszcencia van, a piros szín hiányzik ott késői endoszómák vannak. A D3 ábrán a zöld és piros szín intenzitása erős jelezvén, hogy ezen a terepen az immunfluoreszcencia és az $f\text{BSA-Au}$ fluoreszcenciája intenzív. A nyilak és a szár nélküli nyílhegyek arra utalnak, hogy itt az 5 és 10 nm méretű Au gömböcskék is jelen vannak.

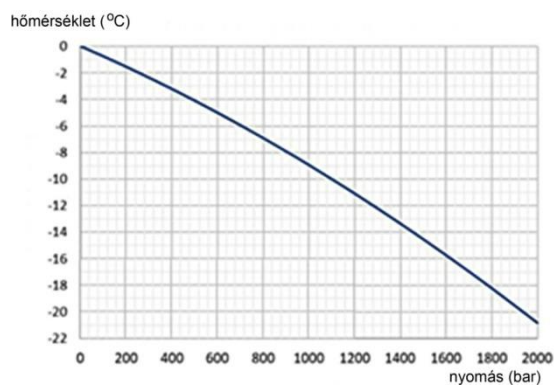
A tanulmányban az $f\text{BSA-Au}^5$ támpontmarkerként szerepel, amely elősegíti a fluoreszcens és elektronmikroszkópos képek regisztrációját (illesztését), amely az ingyenes és nyílt forráskódú Icy szoftver eC-CLEM (easy cell-correlative light to electron microscopy)

plugin-jével történt. Az eC-CLEM képes nemcsak merev koordináta rendszerek egymásba transzformálására, de nem-merev transzformációra is 2D és 3D-CLEM-ben egyaránt (PAUL-GILLOTEAUX 2017).

VII.2. Nagynyomású fagyasztás és fagyasztásos helyettesítés alkalmazása CLEM-ben

VII.2.1. Nagynyomású fagyasztás

A nagynyomású fagyasztást (High Pressure Freezing, HPF) 200–210 MPa nyomáson végzik, úgy, hogy a mintát két oldalról cseppfolyós nitrogén sugárral hűtik (kb. $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on). Nagy nyomás alkalmazásakor azt a térfogat-növekedést gátolják meg, ami a víznek jéggé való átalakulásakor fellép. A víz nagy nyomáson $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletig megtartható folyékony, túlhűtött állapotban (VII.7. ábra). (A tiszta jég olvadáspontja definíció szerint $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atmoszféra nyomáson. A nyomás egysége a pascal (Pa): $10^5\text{ Pa} = 1\text{ bar} = 0,987\text{ atmoszféra}$).



VII.7. ábra. A víz fagyáspontjának csökkenése a külső nyomás függvényében

(www.engineeringtoolbox.com)

A minta fagyasztását vitrifikálásnak nevezzük, ha a víz a mintában amorf, üvegszerű formában fagy meg. A vitrifikálásnak milliszekundum (!) nagyságrendű idő alatt kell végbemenni ahhoz, hogy a jég amorf formában jöhessen létre. A gyors hűtéssel a minta alkotórészeinek mozgását meggátoljuk, ezért ezt a fagyasztás krioфикálásnak is nevezik. A krioфикálás kulcsfontosságú tényezője és egyben egyik nagy előnye a konvencionális kémiai fixálással szemben a minta lehülésének nagy sebessége: a vizsgálandó minta alkotórészeinek nincs idejük elmozdulni natív helyzetükből.

A gyors merítéses fagyasztás maximum $10\text{ }\mu\text{m}$ mintavastagságig alkalmazható, vastagabb minták esetében a nagy nyomású fagyasztást kell igénybe venni. A nagy nyomású fagyasztást $200\text{ }\mu\text{m}$ -nél vastagabb mintákra nem használják. A mikroszkópba kerülő mintáknak

300–500 nm-nél vékonyabbnak kell lennie, ezért a nagy nyomású fagyasztást az esetek többségében krio-ultramikrotómos metszés követi. A metszésnél modernebb eljárás a fókuszált ionnyalábbal történő vékonyítás (FIB, Focused Ion Beam, III.3.5. fejezet).

A nagy nyomású fagyasztás kifejlesztése Moor és Riehle nevéhez fűződik, akik 100–200 μm vastag mintákat tudtak fagyasztani kristályos jég képződése nélkül (MOOR 1968). Az általuk kifejlesztett első nagynyomású fagyasztó berendezés részletes leírását megtaláljuk Moor későbbi cikkében (MOOR 1987). A nagynyomású fagyasztásra manapság kereskedelmi berendezések szolgálnak.

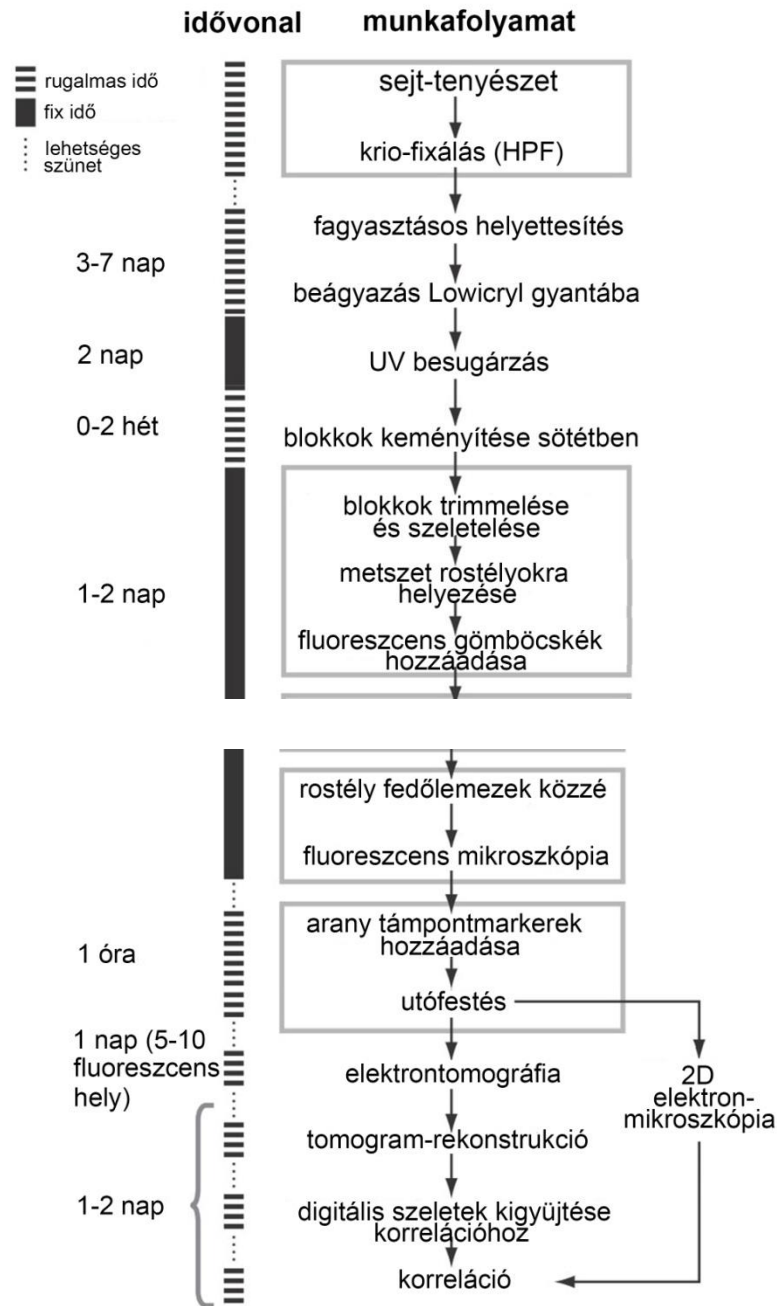
VII.2.2. Dehidrálás fagyasztásos helyettesítéssel

A nagynyomású fagyasztást az esetek túlnyomó többségében a minta víztelenítése követi, amikor is a mintában lévő amorf jeget szerves oldószerrel (alkohollal vagy acetonnal) eltávolítják, miközben a mintát lassan szobahőmérsékletre hozzák (Freeze Substitution, FS). A szerves oldószerekhez glutáraldehid és ozmiumtetroxid is adható, hogy a kémiai keresztkötéseket létrehozzák. A fagyasztásos helyettesítés után a mintát epoxi-gyantába vagy akril-alapú gyantába ágyazzák be (MCDONALD 2014). Kereskedelmi forgalomban kapható olyan berendezés, amely a fagyasztásos helyettesítést, majd az azt követően epoxi-gyantával való átitatást (60 °C-on) vagy akril alapú gyantával (–40 °C-on) automatikusan elvégzik. Az utóbbi esetben a gyanta megszilárdítása ultraibolya sugárzással történik.

VII.2.3. A CLEM munkamenete nagynyomású fagyasztás és fagyasztásos helyettesítés alkalmazásakor

A nagynyomású fagyasztást és fagyasztásos helyettesítést (HPF+FS) rendszerint alacsony hőmérsékleten akril-alapú gyantába (pl. Lowicryl, LR White, HM20) való beágyazás követi, amikor is a gyantát ultraibolya sugárzás segítségével keményítik meg. Az elektronmikroszkópos vizsgálat szobahőmérsékleten történik. A problémát a fluoreszcens sugárzásnak a beágyazás utáni megőrzése jelenti, mert az elektronmikroszkópos preparálásban alkalmazott kontrasztnövelő nehézfémek (uranilacetát, ozmiumtetroxid) a szokásos koncentrációkban megszüntetik a fluoreszcenciát (PERKOVIC 2014). Ezért lehetőleg kis koncentrációban alkalmazzák ezeket, ami viszont nem biztosít elég kontrasztot a membránok számára. Kukulski kis koncentrációjú (0,1%) uranilacetát segítségével oldotta meg a problémát (KUKULSKI 2012). E mellett szüksége volt támpont markerek alkalmazására is.

Alább bemutatjuk azt a munkafolyamatot, amelyet Kukulski a HPF+FS segítségével történő CLEM-ben alkalmazott (VII.8. ábra). A lépések sorrendjét jól nyomon követhetjük és láthatjuk a feladat idő igényességét is.



VII.8. ábra. Nagynyomású fagyasztással és fagyasztásos helyettesítéssel történő minta-előkészítés CLEM-hez. Az ábra bal oldalán az egyes lépésekhez szükséges idő van feltüntetve (KUKULSKI 2012)

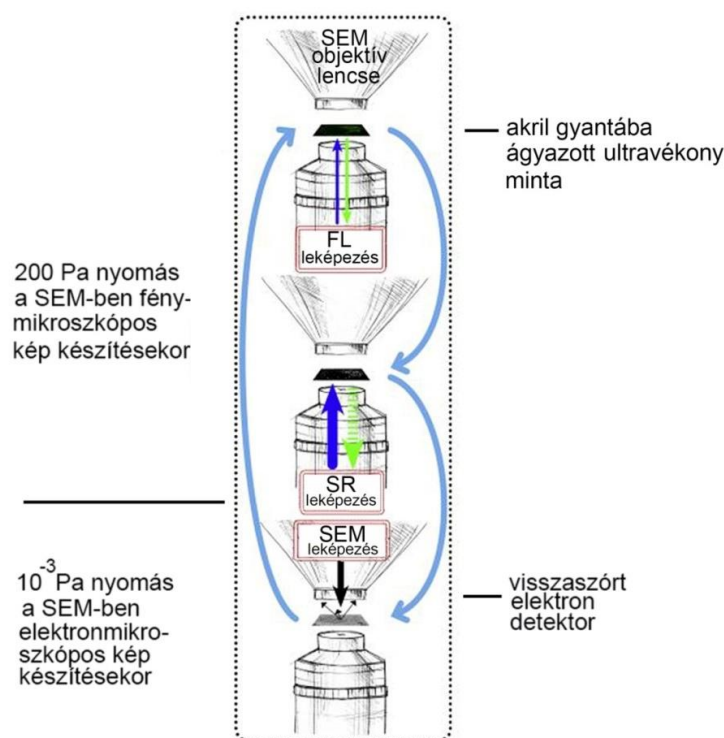
A következő krio-CLEM fejezetben összevetjük a HPF+FS-t a CEMOVIS-nak nevezett módszerrel, (amelyben a minta elektronmikroszkópos vizsgálata is alacsony hőmérsékleten történik), amely lényegesen gyorsabb, mint a HPF+FS.

VII.2.4 Vaccinia vírus vizsgálata

Peddie vaccinia vírus vizsgálatát hozzuk példaként arra, amikor a CLEM-ben minta-előkészítéskor nagynyomású fagyasztást és fagyasztásos helyettesítést alkalmaznak (PEDDIE

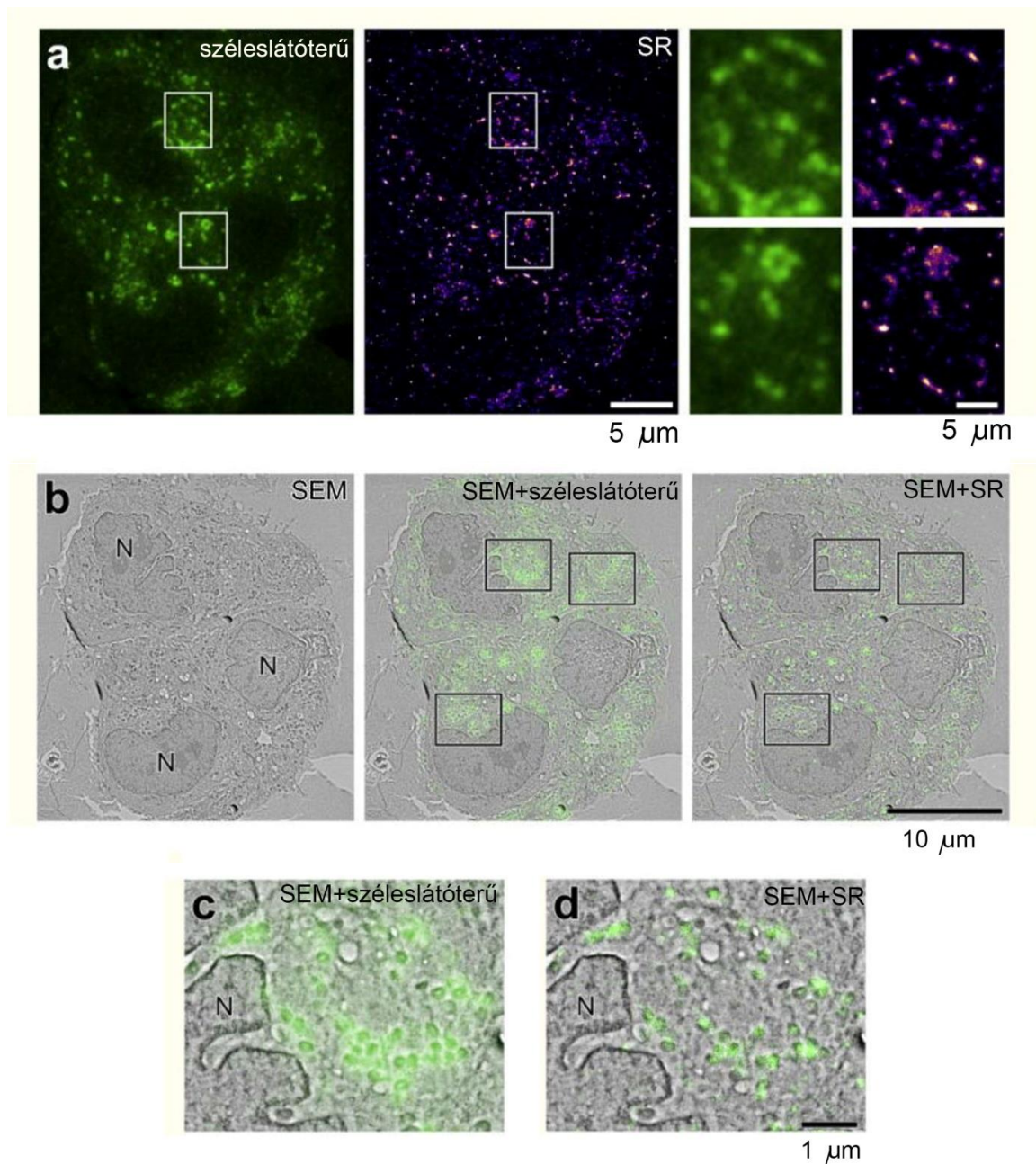
2017). A közlemény nemcsak a minta-előkészítés szempontjából érdemel figyelmet, hanem amiatt is, hogy sikerült a konvencionális fluoreszcens fehérjék (GFP és YFP) fluoreszcenciáját megtartani beágyazott metszetben a vákuum körülményei között. A gerjesztő lézersugár intenzitásának növelésekor egy bizonyos érték felett mind a GFP, mind pedig az YFP fluoreszcenciája villódzásba ment át. A villódzás jelensége (blinking) alkalmas a szuperfelbontású lokalizációs mikroszkópiára.

Munkájuk kulcsfontosságú eleme az integrált fény- és elektronmikroszkóp (ILSEM, (Integrated Light and Scanning Electron Microscope), amit az V.18. ábrán bemutatunk (PEDDIE 2014 Ultramicroscopy, BRAMA 2015). Itt továbbfejlesztésre került úgy, hogy szuperfelbontású fluoreszcens vizsgálatokat is lehessen az integrált pásztázó elektronmikroszkópban elvégezni (VII.9. ábra).



VII.9. ábra. A széles-látóterű fluoreszcens, a szuperfelbontású fluoreszcens és pásztázó elektronmikroszkópos munka-folyamat illusztrálása (lásd a szöveget) (PEDDIE 2017)

A VII.9. ábra szerint az integrált fény- és elektronmikroszkópban elvégezték a fluoreszcencia és szuperfelbontású fluoreszcens leképezést 200 Pa nyomáson, majd a vákuumot 10^{-3} Pa-ra javították a SEM vizsgálatához. Az akril gyantába ágyazott 200 nm-es metszetet indium-ón-oxiddal bevont fedőlemezre helyezték, ami azután egy SECOM típusú mintatartóba került. (Az indium-ón-oxid (ITO) átlátszó, elektromosan vezető réteg. A SECOM cégnév). A VII.9. ábrán lévő kék nyilak azt jelzik, hogy a leírt vizsgálatok ciklikusan is elvégezhetők.



VII.10. ábra. A széles-látóterű és szuperfelbontású fluoreszcens képek felbontásának összehasonlítása YFP-A3 vaccinia vírussal fertőzött HeLa sejteken (YFP sárga fluoreszcens fehérje, A3 vaccinia vírus fehérje). a/ Széles-látóterű fluoreszcens kép, az YFP-A3 lokalizációja HeLa sejten belül. Az SR-rel jelzett szuperfelbontású kép 30 000 felvételtől készült, amely 728076 lokalizációt tartalmaz. A jobb oldali kinagyított részletek jól mutatják a konvencionális és szuperfelbontású képek felbontása közötti különbséget. b/ Az a/ ábrán látható terület SEM visszaszórt elektron képe, és a képre illesztett széles-látóterű (középen) és szuperfelbontású (jobbra) képpel. (N jelöli a sejtmagokat). A feketével bekeretezett három terep közül a bal felsőt mutatjuk nagyobb nagyításban a c/ és d/ ábrákon. (Az eredeti közlemény mindhárom bekeretezett területet megmutatja nagyobb nagyításban) Míg a c/ ábra a szorosan egymás mellett lévő virion csoportokat mutatja zölden a citoplazmán belül, addig a d/ ábra az egyes vírusok pontosabb lokalizációját teszi lehetővé (PEDDIE 2017)

A fény- és elektronvizsgálat végrehajtásakor alkalmazott vákuum-különbségekre magyarázatot találunk az V.19. ábrán. A fluoreszcens fehérjék (pl. GFP és YFP) fluoreszcenciájához szükség van vízgőzre és a fluoreszcencia „visszahozható”, ha a 10^{-3} Pa nyomásról visszakapcsolunk a 200 Pa nyomásra. Ez lehetővé teszi, hogy több minta-területen ismételjék a vizsgálat-sorozatot anélkül, hogy a fluoreszcencia megszűnne.

A szuperfelbontású lokalizációs mikroszkópos módszerek csoportjába tartozik a PALM, (fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia) és a STORM (stochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia) is, amelyek jelentősen csökkentik a fény és elektronmikroszkópia felbontása közötti több száz nanométeres távolságot. Peddie NIKON N-STORM mikroszkópot használt szuperfelbontású felvételek készítésére, rekonstrukciójukra pedig a ThunderSTORM programot. A ThunderSTORM (OVESNY 2014) az ingyenes ImageJ program plug-in-je, amely STORM vagy PALM módszerekkel nyert adatok automatikus feldolgozására, analízisére és képi megjelenítésére alkalmas. Dokumentációval együtt letölthető a <https://code.google.com/p/thunder-storm/> címről.

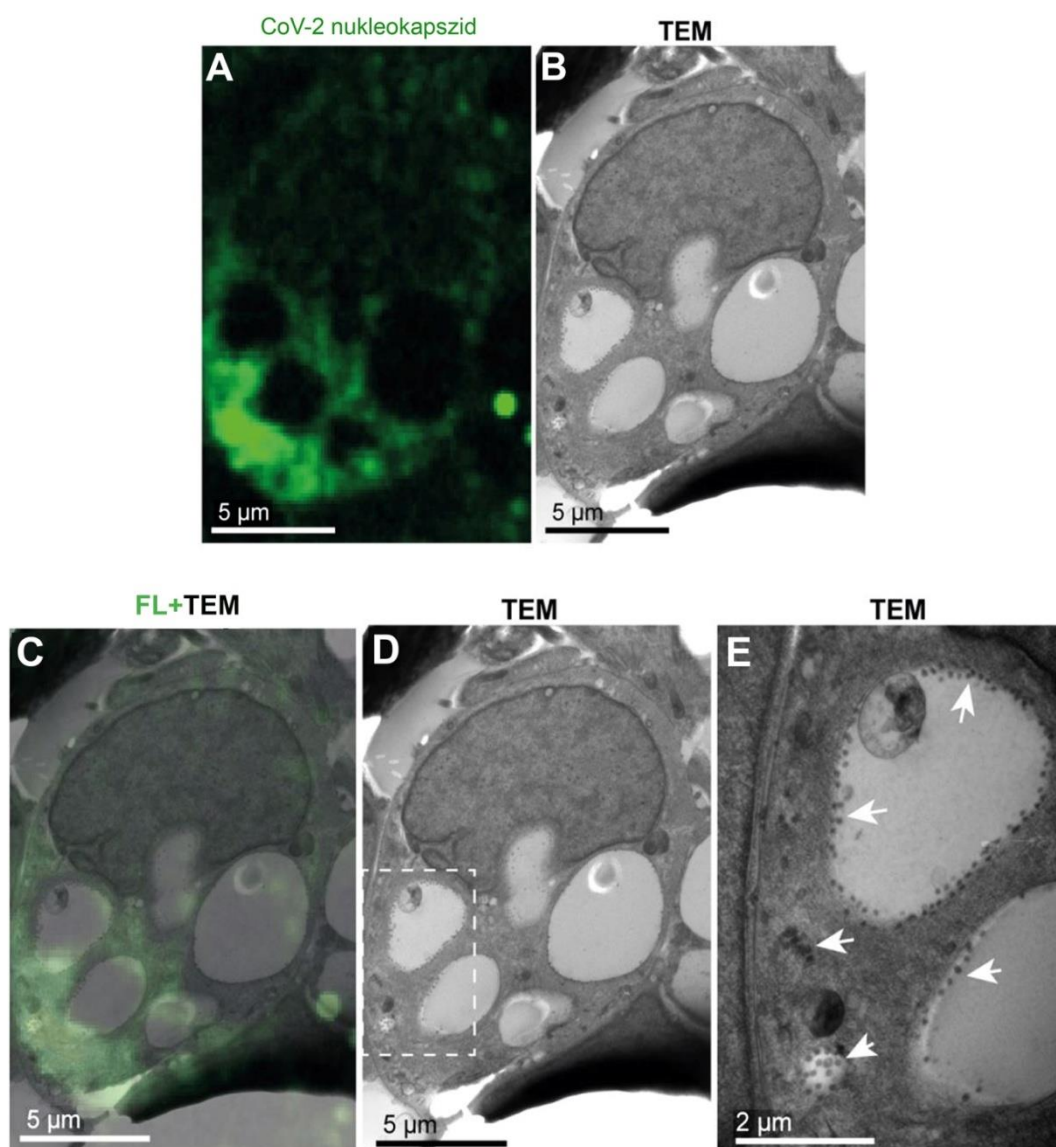
VII.2.5. SARS-CoV-2 vírus vizsgálata

A SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) elnevezése alapján súlyos akut légzőszervi szindrómát jelent, azonban a vírus a szervezet egyéb részeit is megtámadja nemcsak a tüdőt. Idegrendszeri tünetektől kezdve a máj és akut vese megbetegedéseket is okoz. (LAMERS 2020, QIU 2020). Jansen és munkatársai a vese-fibrózis esetek számának növekedését találták boncoláskor COVID-19-ben elhunyt betegekben. (JANSEN 2022). Egy klinikai tanulmány szerint (PINERO 2021) az intenzív kezelésre felvett COVID-19 betegek 21,2%-ánál fejlődött ki 2 vagy annál magasabb fokozatú akut vesebetegség. Nemcsak COVID-19-ben elhunytak vesemintáit, de SARS-CoV-2-vel megfertőzött, humán pluripotens őssejtek segítségével előállított vese-organoidokat is vizsgáltak.

Jansen és munkatársai széleskörű vizsgálatokat végeztek, amelynek csak egy részét képezte a CLEM. (JANSEN 2022, SUPPLEMENT). Ezek a vizsgálatok példaként szolgálnak a nagynyomású fagyasztás és fagyasztásos helyettesítés alkalmazására. A vese-organoid mintákat nagynyomású fagyasztás után műanyagba (R221) ágyazták, majd automatikus fagyasztásos helyettesítő készülékbe (LEICA AFS2) helyezték, amely -90 °C-ról kezdve végezte a visszamelegítést. A műanyagba ágyazott mintablokkokon végezték a fluoreszcens vizsgálatokat a COVID-pozitív tartományok megkeresését (Zeiss LSM 90 konfokális mikroszkóp).

A beágyazott minta-blokkból ultramikrotommal ~100 nm vastag metszeteket készítettek, formvárral fedett mikrostélyra helyezték és vizsgálták transzmissziós elektronmikroszkópban. A TEM vizsgálatok előtt a metszeteket uranil-acetáttal és ólomcitráttal kontrasztosították.

A vizsgálatok részletes leírását megtaláljuk (JANSEN 2022) közleményben.



VII.11. ábra. CLEM a SARS-CoV-2 vírussal fertőzött vese-organoidról. A fluoreszcens és elektron kép nem ugyanarról a fókuszsiokról készült. A/ CoV-2 nukleokapszid fehérje fluoreszcens képe (zöld). B/ Az A/-val azonos terület TEM képe. C/ A fluoreszcens és TEM kép egymásra van helyezve. D/ A vírussal fertőzött rész kiválasztása a TEM képen (szaggatott vonallal bekeretezve). E/ A D/ ábrán bekeretezett terület nagyobb nagyításban. A nyílak a vacuolákban elhelyezkedő vírus részecskékre mutatnak (JANSEN 2022 SUPPLEMENT)

Irodalom

- BOS, E. *et al.* (2014): Vittrification of Tokuyasu-style immuno-labelled sections for correlative cryo light microscopy and cryo electron tomography, *Journal of Structural Biology* 186, 273-282.
- CHITHRANI, B. D. *et al.* (2006) Determining the size and shape dependence of gold particle uptake into mammalian cells, *Nano Lett.* 6, 662-668.
- CONNOR, E. E. *et al.* (2005): Gold nanoparticles are take up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small* 1, 325-327.
- FERMIE, J. *et al.* (2021): Bimodal Endocytic Probe for Three-Dimensional Correlative Light and Electron Microscopy, *bioRxiv* preprint, doi: 10.1101/2021.05.18.444466.
- FONTA, C. L. *et al.* (2015): Analysis of acute brain slices by electron microscopy: A correlative light-electron microscopy based on Tokuyasu cryo-sectioning, *Journal of Structural Biology* 189, 53-61.
- GEOFFROY, J. S. *et al.* (1984): Endocytosis by endothelial phagocytes: uptake of bovine serum albumin-gold conjugates in bone marrow, *J. Ultrastructure Res.* 89, 223-239.
- HANAKI, K. I. *et al.* (2003): Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 496-501.
- JANSEN, J. *et al.* (2022): SARS-CoV-2 infects the human kidney and drives fibrosis in kidney organoids, *Cell Stem Cell* 29, 217-231.
- JANSEN, J. *et al.* (2022): SARS-CoV-2 infects the human kidney and drives fibrosis in kidney organoids, SUPPLEMENT on line, doi: 10.1016/j.stem.2021.12.010.
- KANDELA, I. K. *et al.* (2003): Fluorescence Quenching by Colloidal Heavy Metals: Implications for Correlative Fluorescence and Electron Microscopy Studies, *Microsc. Microanal* 9, 2, 1194-1195. doi: 10.1017/S1431927603445972.
- KARREMAN, M. A. *et al.* (2009): Discovery of a new RNA-containing nuclear structure in UVC-induced apoptotic cells by integrated laser electron microscopy, *Biol. Cell* 101, 287-288.
- KUKULSKI, W. *et al.* (2012): Precise, Correlated Fluorescence Microscopy and Electron Tomography of Lowicryl Sections Using Fluorescent Fiducial Markers, *Methods in Cell Biology*, 111, 235-257, doi: 10.1016/B978-0-12-416026-2.00013-3.
- LAMERS, M. M. *et al.* (2020): SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes, *Science*, 369, 50-54.

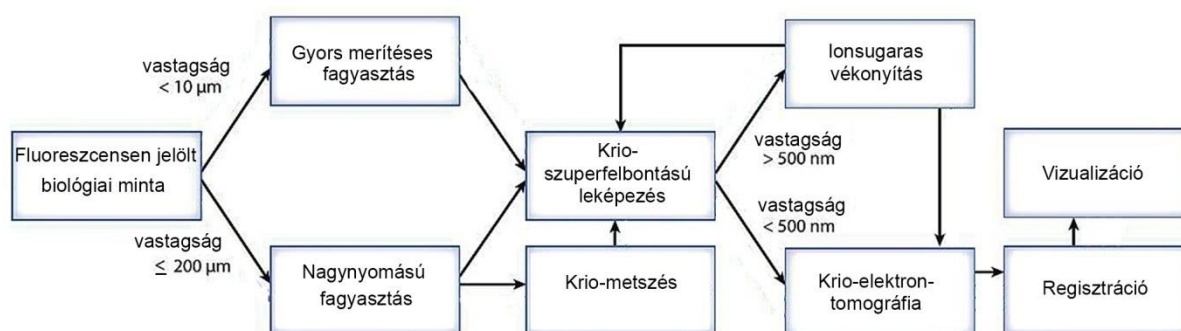
- MCDONALD, K. L. *et al.* (2014): Out with the old and in with the new: rapid specimen preparation procedures for electron microscopy of sectioned biological materials, *Protoplasma* 251, 429-448.
- MILES, B. T. *et al.* (2017): Direct Evidence of Lack of Colocalisation of Fluorescently Labelled Gold Labels Used in Correlative Light Electron Microscopy, *Scientific Reports* 7, 44666. doi: 10.1038/srep44666.
- MOOR, H. *et al.* (1968): Snap-freezing under high pressure: A new fixation technique for freeze-etching. in Steve Bocciarelli D. (ed.) *Electron Microscopy 2. Proc. 4th Eur Reg Conf Electron Microsc.* Rome 33-34.
- MOOR, H. (1987): Chapter 8, Theory and Practice of High Pressure Freezing, in *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*, Steinbrecht, R.A. and Tierold K. (eds), Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- OVESNY, M. *et al.* (2014): ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging, *Bioinformatics*, 30, 16, 2389-2390.
- PAUL-GILLOTEAUX, P. *et al.* (2017): EC-CLEM: Flexible multidimensional registration software for correlative microscopies, *Nature Methods* 14, 102-103.
- PEDDIE, C. J. *et al.* (2014): Correlative and integrated light and electron microscopy of in-resin GFP fluorescence, used to localise diacylglycerol in mammalian cells, *Ultramicroscopy* 143, 3-14.
- PEDDIE, C. J. *et al.* (2017): Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy using conventional fluorescent protein *in vacuo*, *J Struct Biol.* 199, 2, 120-131.
- PERKOVIC, M. *et al.* (2014): Correlative Light- and Electron Microscopy with chemical tags, *J. Struct Biol.* 186,2, 205-213.
- PINERO, G. J. *et al.* (2021): Severe acute kidney injury in critically ill COVID-19 patients, *J. Nephrol.* 34, 285-293.
- QIU, H. *et al.* (2020): Acute on chronic liver failure from novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), *Liver Int.* 40, 1590-1593.
- SLOT, J. W. *et al.* (2007): Cryosectioning and immunolabeling, *Nature Protocols* 2, 10, 2480-2491.
- TOKUYASU, K. T. (1973): A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues, *The Journal of Cell Biology* 57, 551-565.
- TOKUYASU, K. T. (1980): Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections, *Histochemical Journal*, 12, 381-403.

- TOKUYASU, K. T. (1986): Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry, *Journal of Microscopy* 143, 2, 139-149.
- TSIEN, R. Y. (1998): The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- ZHANG, Y. *et al.* (2013): Evaluation of nanoparticles as endocytic tracers in cellular microbiology, *Nanoscale* 5, 9296.

VIII. Krio-CLEM: minta-előkészítés és elektronmikroszkópia alacsony hőmérsékleten

A VI. és VII. fejezetben tárgyalt CLEM módszerekben az elektronmikroszkópos vizsgálatok szobahőmérsékleten történtek. Ebben a fejezetben olyan CLEM módszerekről lesz szó, ahol az elektronmikroszkópos vizsgálatokat -140 °C -nál alacsonyabb hőmérsékleten végzik. A fluoreszcens vizsgálatokat végezhetik szobahőmérsékleten vagy alacsony hőmérsékleten, gyakran mind a kettőt megteszik.

A krio-CLEM lehetséges munkafolyamatait Dahlberg ábrájának egyszerűsített formájában mutatjuk be. (VIII.1. ábra)



VIII.1. ábra. A krio-CLEM lehetséges munkafolyamatai (DAHLBERG 2021) nyomán

Az ábra szerint a fluoreszcens festést és mikroszkópozást a fagyasztásnak két lehetséges változata követi a kiindulási minta vastagságának megfelelően (merítéses fagyasztás vagy nagynyomású fagyasztás). Ezt követheti a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia, majd a vékony minta készítésének két lehetséges módszere az ionsugaras vékonyítás vagy a krio-metszés. Ezután a minta TEM-be kerül, többnyire több dőlés szög alatt készülnek a felvételek, azaz elektrontomográfiát végeznek rajta. Végül az FM és EM képek összehangolása a regisztráció, kiértékelés és képi megjelenítés.

A krio-CLEM-hez bevezetésként röviden áttekintjük a munkafolyamatot alkotó elemeket: a krio-fluoreszcens mikroszkópiát, szuperfelbontású krio-fluoreszcens mikroszkópiát és a krio-elektronmikroszkópiát.

VIII.1. Krio-fluoreszcens mikroszkópia (krio-FM)

A krio-fluoreszcens mikroszkópiát már egyszer érintettük a II.4. fejezetben. Most újabb részletekkel egészítjük ki. A krio-fixálás a kémiai fixálásnál gyorsabb, a vizsgálandó minta alkotórészei közelebb maradnak a natív állapothoz, mint kémiai fixálás esetén. A szokásos

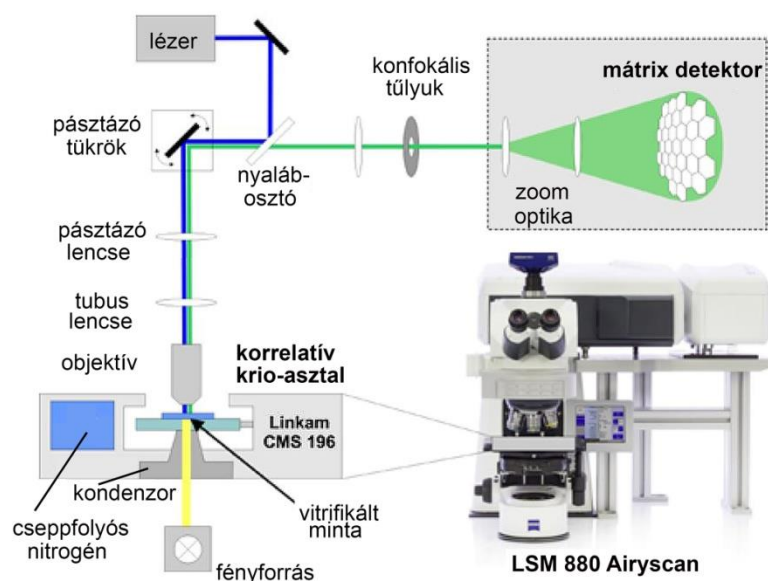
szobahőmérsékleti minta-előkészítéskor az alkalmazott vegyszerek óhatatlanul műtermékeket hoznak létre, krio-fixáláskor ez a veszély nem áll fenn. Fennáll viszont annak a veszélye, hogy a lézer besugárzás $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ fölé emeli a hőmérsékletet és ekkor az amorf jég nem kívánatos átkristályosodása (devitrifikáció) következik be. A besugárzó lézer intenzitásának megfelelő megválasztásával ez a veszély elhárítható.

Megkülönböztetünk széles látókörű és konfokális mikroszkópiát. A konfokális mikroszkóp előnye a széles-látóterűhöz képest az optikai szelektelés és az ezt követő 3D rekonstrukció lehetősége.

A krio-FM célja a krio-CLEM vizsgálat specifikusságának megalapozása. Specifikusság alatt most azt értjük, hogy olyan molekuláris vagy funkcionális információkat adjon meg, amely elősegíti az adott objektum megtalálását és nagy felbontású vizsgálatát az elektron mikroszkópban. Az alacsony hőmérsékleten mind az FM, mind pedig az EM jobban teljesít, mint a szobahőmérsékleten. A krio-FM-ben a fluoreszcens sugárzás elhalványodása (photobleaching, II.10. ábra) kisebb, mint szobahőmérsékleten, a krio-EM-ben pedig az amorf jég védi a mintát és tartja hidratált formában.

A konvencionális fluoreszcens mikroszkóp átalakítható krio-FM mikroszkóppá egy krio-mintatartó asztal hozzáadásával. Először bemutatunk két kereskedelmi forgalomban kapható konfokális krio-elektronmikroszkópot, majd utalunk a házi készítésű krio-mintatartó asztalokra.

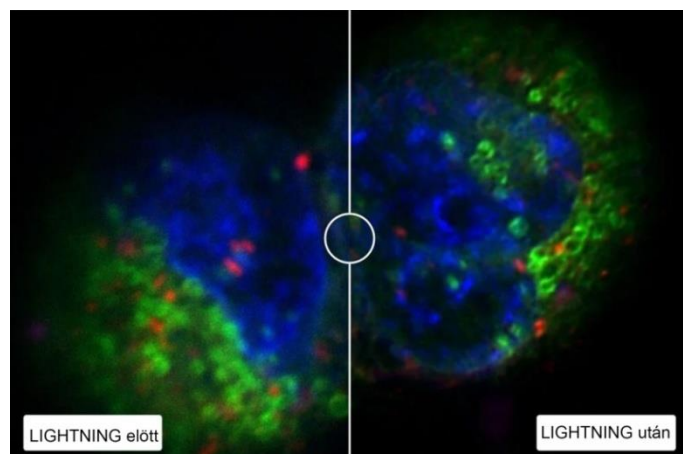
A Zeiss konfokális krio-mikroszkópja (VIII.2. ábra) a 32 csatornás Airyscan detektornak és a szoftvernek köszönhetően 1,4x javulás tapasztalható a felbontásban az egycsatornás detektáláshoz képest, már szobahőmérsékleten is. Az ábrán bemutatott elrendezésben az objektív nagy fókusz távolságú, 1-nél kisebb numerikus apertúrájú. A krio-mintatartó asztal a Linkam cég terméke, amely egy teljes krio-CLEM-folymatra (krio-FM-ből krio-FIM-SEM-be lamella készítésre, onnan krio-TEM-be) lett kifejlesztve. Az LSM jelölés az ábrán a Laser Scanning Microscope-ra utal. Az irodalomban a konfokális LSM-re mind az CLSM, mind pedig az LSCM rövidítés is elterjedt.



VIII.2. ábra. Konfokális krio-fluoreszcens mikroszkóp sémája (ZEISS)

A Leica Microsystemnek is van konfokális krio-fluoreszcens mikroszkópja, a Stellaris 5 Cryo, krio-mintatartó asztallal és minta-transzfer rendszerrel. Az objektívje 50x nagyítású, 0,9 numerikus apertúrával. Ez a krio-FM is szervesen illeszkedik be a krio-CLEM-be, beleértve a krio-FIB-SEM-et és a krio-EM-et.

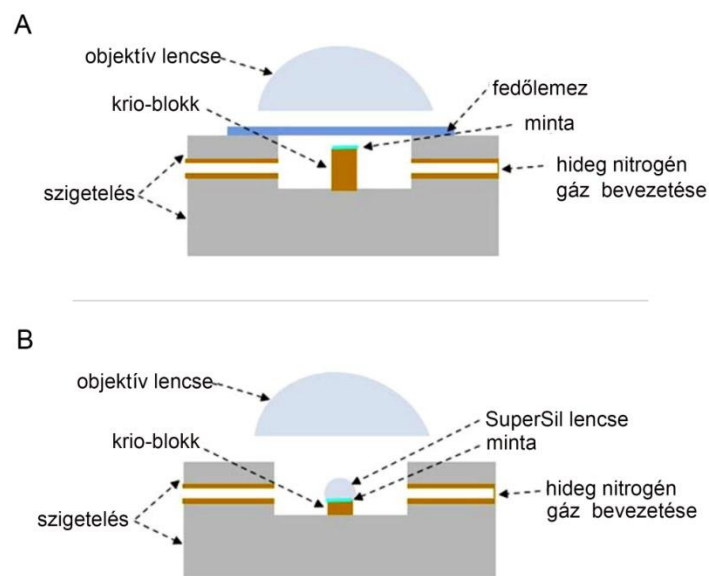
Két szoftver, a Lightning és a TauSense segít a képek minőségének javításában. (Mint ismeretes a fénymikroszkópban a kép a tárgynak a pontkiterjedési függvényével (PSF, Point Spread Function) való konvolúciója. A PSF ismeretében dekonvolúciót lehet végrehajtani, ezzel megszabadítva a képet a torzításoktól.) A Leica Lightning programja jobb dekonvolúciót végez, mint a korábbi tradicionális programok, azáltal, hogy nem egyetlen PSF-fel operál, hanem a képet több apró térfogati egységre (voxelekre) osztva végzi el a dekonvolúciót, mindenütt figyelembe véve a lokális háttér és lokális zaj torzító hatását.



VIII.3. ábra. A Leica LIGHTNING szoftver hatásának szemléltetése konfokális, fluoreszcens felvételen. Humán emlőrák sejtek (Sum 159 sejtek): a kék szín, sejtmagokat jelez, Blue-Hoechst festéssel festve. Zöld szín, mitokondriumok, MitoTracker festés. Piros szín, lipid cseppecskék, Bodipy festés (LEICA)

A TauSense program nevében a Tau a fluorofor élettartamára utal (ezt jelölik görög τ -val). A τ karakterisztikusabb mennyiség, jobban jellemző a fluoroforra, mint az intenzitás. Az élettartam mérésével nyernek ki járulékos információt, olyan részletek válnak láthatóvá, amelyek az intenzitás mérésével rejtve maradnának.

Bemutatunk két nem kereskedelmi forgalomban lévő krio-mintatartó asztallal felszerelt krio-FM-et, az egyiknél $NA < 1$ (VIII.4. A/ ábra), a másikonál $NA > 1$ (B/ ábra).

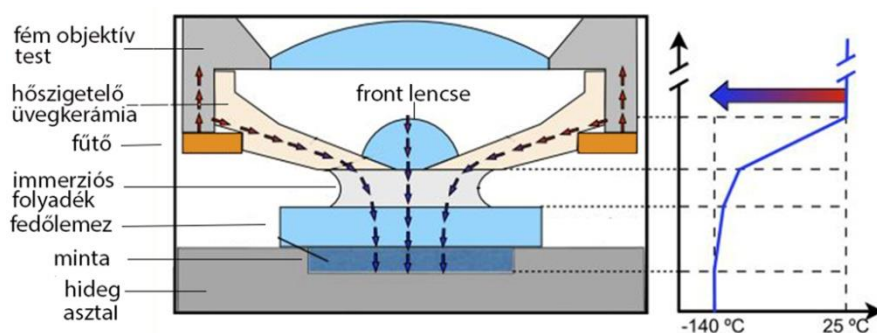


VIII.4. ábra. Krio-mintatartó asztalok sémája krio-fluoreszcens mikroszkóphoz (DeROSIER 2021).

A/ numerikus apertura kisebb 1-nél, B/ numerikus apertura nagyobb 1-nél a szilárd, immerziós superSIL lencse miatt (WANG 2019)

A VIII.4. A/ ábrán látható megoldás nem igényel magyarázatot, az objektív lencse szokványos nagy fókusz távolságú lencse ($NA < 1$), a mintát hideg nitrogén gázzal hűtik. A B/ ábrán a minta fölött található egy csonka gömb-lencse, ami szilárd immerziós közegként működik. (SIL Solid Immersion Lens). Segítségével megnő a numerikus apertura a felette lévő nagy fókusz távolságú objektív lencse számára, ami így 2,17 is lehet. (WANG 2019) A superSIL egy virtuális képet készít a minta alatt és ezt nagyítja meg a felette lévő objektív lencse. A superSIL használata nehezebb, mint a $NA < 1$ tulajdonságú objektívé. Felmerül az igény a mikrosztélyon lévő minták vizsgálatára is, amire pillanatnyilag a superSIL nem alkalmas.

A krio-fénymikroszkópiában különös jelentőségű egy olyan krio-immersiós lencse megalkotása, amely nagyfelbontású és torzításmentes képet ad (FAORO 2018). Az objektív lencse és a fedőlemez közötti immerziós folyadék megnöveli a numerikus apertúrát (NA) ezáltal javítja a felbontást ($d = \lambda / 2 NA$) a képletnek megfelelően. Az immerziós folyadék nélküli „száraz” objektív törésmutatója kisebb, mint 1, az idézett munkában felhasznált objektív törésmutatója 1,15.

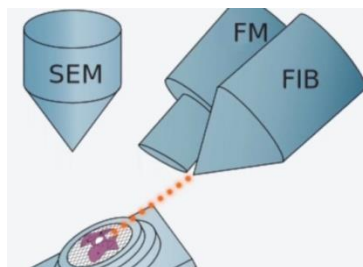


VIII.5. ábra. Aberrációra korrigált immerziós krio-objektív lencse. A nyilak színe a hideg, illetve meleg áramlásának megfelelően változik (FAORO 2018)

Szükséges, hogy az immerziós folyadék törésmutatója egyezzen meg az objektív lencse törésmutatójával., ellenkező esetben a képben torzulások lépnek fel. Az immerziós krio-objektív lencse újdonsága, hogy egy kereskedelmi forgalomban kapható objektív lencse (Zeiss W2010) fém kerete alá átlátszó, hőszigetelő üveg-kerámiát építettek be (ennek neve Macor, a Corning Glass Inc. terméke). Az objektív felső részének fűtésével és a hőmérséklet folyamatos mérésével elérték, hogy a minta és az immerziós folyadék (HFE-7200, hidrofluoroéter) stabil hőmérsékleten (-140 °C) maradjon.

Egyéb megoldásokat az NA növelésére alacsony hőmérsékleten, találhatunk DeRosier összefoglaló cikkében (DeROSIER 2021).

A krio-fluoreszcens vizsgálatokat gyakran követi mintavékonyítás a krio-FIB-SEM-ben, így gondolni kell transzport eszközre is, amivel a vitrifikált mintát át lehet vinni a fluoreszcens mikroszkópba. A fénymikroszkópból az elektronmikroszkópba való minta-átvitel növeli a devitrifikáció, szennyezés és minta-károsodás valószínűségét. Szerencsére kapható a kereskedelmi forgalomban olyan fluoreszcens mikroszkóp (Delmic cég Meteor nevű terméke, NA=0,9), amely a krio-FIB-SEM-re feltétként felszerelhető, jelentősen megkönnyítve a lamella készítését a krio-TEM-hez. A FIB vékonyítást segíti a fluoreszcens kép alapján történő pozicionálás és a mikroszkóphoz tartozó nyílt forráskódú, professzionális szoftver. Néhány FIB-SEM, amelyekre a Delmic Meteor fluoreszcens mikroszkóp felszerelhető: a Thermo Fisher Scientific termékei közül az Aquilos, Helios, Scios, a Zeiss mikroszkópjai közül a Crossbeam 550, Crossbeam 550L.



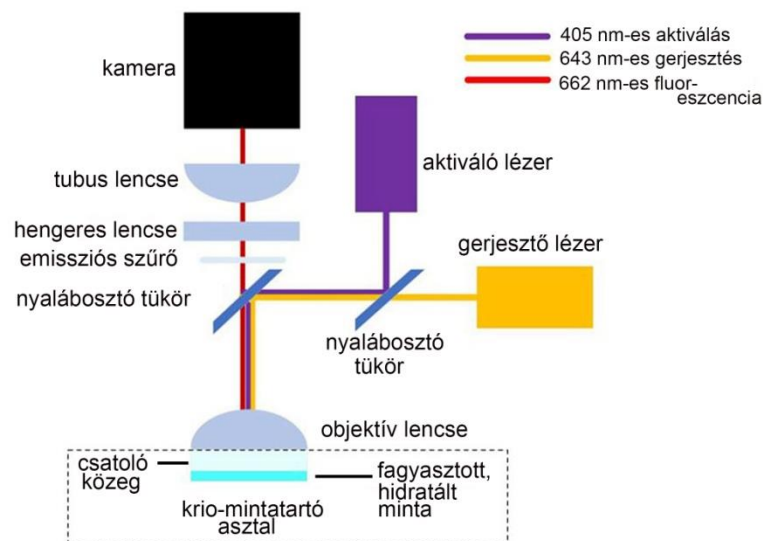
VIII.6. ábra A DELMIC Meteor krio-fluoreszcens mikroszkóp több kereskedelmi forgalomban lévő FIB-SEM-hez csatlakoztatható

A DELMIC-hez hasonló, krio-FIB-SEM-re szerelhető krio-fluoreszcens mikroszkópot fejlesztettek ki Gorelick és munkatársai PIE-scope néven (Photon Ion Electron microscope, a névben az ion szó a FIB-re utal) (GORELICK 2019). Arról viszont nem található információ az interneten, hogy a termék kereskedelmi forgalomba került volna.

VIII.2. Krio-szuperfelbontású FM

A szuperfelbontású módszerek legalább egy 2-es faktorral javítják a felbontást a konvencionális fénymikroszkóp detektálási határához (~200 nm) képest. Ezért ide sorolják a fénymintázat-megvilágítású mikroszkópát is (SIM, Structured Illumination Microscopy), amely teljesíti ezt a 2-es faktort, de többet nem. A többi szuperfelbontású módszer gyakran a 10–20 nm-es felbontási tartományt is eléri. (A nem-konvencionális szuperfelbontású MINFLUX és MINSTED legalább még egy nagyságrenddel javítják a felbontást, de ezeknek a CLEM-ben való alkalmazásukra nem találtunk közleményeket.) A szuperfelbontású FM módszerek a nem szuperfelbontású FM módszerektől eltérően nagy pontossággal mutatják meg az elektronmikroszkópban megcélzandó területet. Egy krio-szuperfelbontású fluoreszcens

mikroszkóp sémája csak egy aktivációs lézerrel tér el egy nem szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkóptól. (VIII.7. ábra)



VIII.7. ábra. Szuperfelbontású krio-mikroszkóp sémája. Ez a sugármenet jellemző a lokalizációs mikroszkópokra, mint például a PALM vagy STORM (DeROSIER 2021)

A II.5 fejezetben ismertettük a szuperfelbontású STED, PALM és STORM működési elveit. Ezek a módszerek használhatók krio-hőmérsékleteken is. Az említett módszerektől független a SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging, szuperfelbontású optikai fluktuációs képalkotás), amely a fluoreszcens molekulák villódzásán (blinking) alapul.

A SOFI-hoz nem szükséges kívülről szabályozott fotokapcsolás, sem pedig fotoaktiválás. Nem tartozik az egyedi molekulák lokalizációs módszerei közé. Míg a többi módszer megkívánja, hogy a fluoreszkáló pontok egymástól legalább a diffrakció által korlátozott felbontásnak megfelelő távolságra legyenek egymástól, a SOFI-nál nincs ilyen korlátozás. Az első közlemény a SOFI-ról „Gyors, háttérsugárzás nélküli 3D szuperfelbontású optikai fluktuáción alapuló leképezés” Dertinger-től származik 2009-ből, amikor a STED, PALM és STORM már ismertek voltak (DERTINGER 2009).

A közlemények között legritkábban a krio-STED fordul elő, gyakoribb a krio-PALM és krio-STORM alkalmazása. A PALM és STORM az egyedi molekulák lokalizációs módszerek kategóriájába tartoznak és gyakran csak SMLM rövidítéssel hivatkoznak rájuk (Single Molecule Localization Microscopy). Ezek egyik előnye, hogy egyedi molekulákról adnak információt, és az optikai elrendezés meglehetősen egyszerű. A devitrifikáció ezen módszereknél is veszélyt jelent, de kevésbé, mint a STED-nél.

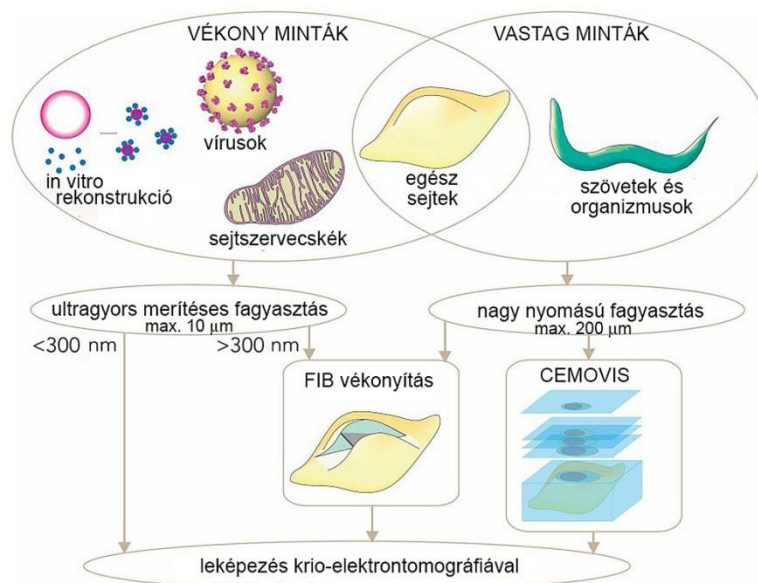
A STORM és a SOFI összehasonlításáról jelent meg közlemény (GEISSBUEHLER 2011), amely szerint bár a STORM jobb felbontást ad, mint a SOFI, de az alkalmazható fluoreszcens molekulákra erősebb kötöttségeket kíván meg, mint a SOFI. Ilyen kötöttség, hogy a molekula fotokapcsolható legyen, hosszú sötét állapottal, viszonylag nagy jel/zaj viszonytal. A SOFI kisebb jel/zaj viszonyt enged meg, átlapoló molekulákról is ad információt és nagy sebességű szuperfelbontású mikroszkópiát tesz lehetővé. Legnagyobb előny, hogy a SOFI 3D-s módszer.

VIII.3. Krio-elektronmikroszkópia

A krio-TEM-et és krio-elektrontomográfiát (krio-TEM), mint a krio-CLEM egyik összetevőjét a III.3.9. pontban ismertettük. Most egy pár mondattal kiegészítjük a minta-előkészítés szemszögéből.

Tekintsük a krio-ET-t, mint a krio-EM szerves részét. Különböző döntési szögek alatt készítenek TEM képeket a 3D rekonstrukció érdekében. A közlemények jelentős részében nem hivatkoznak TEM-re csak ET-re.

Bár a biológiai minták fagyasztása az első pillanatra természetesnek tűnik, de a vitrifikációhoz (üvegszerű amorf jég képződése) szükséges hűtési sebesség nem az. Dubochet a tiszta víz vitrifikációjánál fellépő hűtési sebességet 10^6 °C/másodpercre becsülte (DUBOCHET 1988). Épp a nagy hűtési sebesség az, ami meggátolja, hogy a minta összetevői elmozduljanak helyükről, így közel natív állapotban fagynak meg (kriofixálás). Ez jelentős különbség a kémiai fixálás és a kriofixálás között. Az alacsony hőmérsékleten végrehajtott elektronmikroszkópos vizsgálatok nagy előnye, hogy az amorf jég megvédi a mintát a vákuum és az elektronsugár káros hatásaitól. Az amorf jég átváltozik kristályos jéggé -140 °C körüli hőmérséklet felett, és ez a jég térfogat-növekedését és a biológiai minta károsodását vonja maga után. Ezért a -140 °C feletti hőmérséklet elkerülendő. A krio-EM/ET-hez történő minta-előkészítés sémáját a VIII.8. ábra mutatja.



VIII.8. ábra. *Minta előkészítés krio-elektronmikroszkópiához és krio-elektron tomográfiához*
(HUTCHINGS 2018)

A fagyasztott mintát vagy krio-ultramikrotómmal szeletelik vagy krio-FIB-SEM-mel vékonyítják a krio-TEM vagy krio-ET vizsgálatokhoz. A metszetek vastagságának 300 nm-nél vékonyabbnak kell lenni.

Az amorf jégbe ágyazott metszetek elektronmikroszkópiáját CEMOVIS néven nevezik (Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Section) és ez több tekintetben különbözik az előző fejezetben említett nagynyomású fagyasztás (HPF) és fagyasztásos helyettesítés (FS) minta-előkészítésétől. A CEMOVIS-t is megelőzi a nagynyomású fagyasztás, de a fagyasztásos helyettesítés elmarad. Ebből következően a CEMOVIS-nál nincs kémiai fixálás, beágyazás és dehidráció, továbbá a nehézfémrel történő festés is hiányzik és a minta-előkészítés ideje is jelentősen rövidebb. A nehézfémrel történő festés hiánya miatt nem az amplitúdó-kontraszt, hanem a fáziskontraszt a képalkotás alapja. Mindezek a különbségek táblázatos formában láthatók alább (HURBAIN 2011).

VIII.1. táblázat. *A nagynyomású fagyasztás és fagyasztásos helyettesítés (HPF+FS) összehasonlítása az amorfjégbe ágyazott (vitreous) metszetek elektronmikroszkópiájával (CEMOVIS, Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Section) (HURBAIN 2011)*

Munka-folyamat	HPF+FS	CEMOVIS
Minta-előkészítés	hosszadalmas (akár 2 hét)	2-3 nap gyakorlott személyeknek
Fixálás és dehidráció	kémiai fixálás és dehidráció alacsony hőmérsékleten	krio-fixálás, nincs dehidráció
Beágyazás	zsugorodás gyantába ágyazáskor	nincs beágyazás
Metszet készítés	kevesebb kompresszió a CEMOVIS-hez képest	metszési műtermékek
Kontraszt	amplitúdó kontraszt a nehézfémekkel történő festés miatt	fázis kontraszt, nincs nehézfém festés
TEM vizsgálat	közepes felbontás (5 nm), nagy jel/zaj viszony, kevésbé érzékeny a sugárkárosodásra	nagy felbontás (jobb, mint 5 nm), kis jel/zaj viszony, érzékeny a sugárkárosodásra
Immunfestés	kompatibilis	nem kompatibilis
Tomográfia	kompatibilis	nem kompatibilis

A 2011-ből származó táblázatban a nagy felbontásra megadott érték jelentősen megváltozott: az 5 nm alatti érték 0,25–0,3 nm-re változott 2023-ra. Ez már az atomi felbontás szintje. A jelenleg krio-TEM-mel elérhető legjobb felbontás biológiai mintákra 0,175 nm (azaz 1,75 Angström). E javulás mögött a direkt elektron detektorok kifejlesztése és a TEM szférikus aberrációjának a korrigálása rejlik. A krio-TEM a korábban egyeduralkodó röntgen diffrakció konkurensévé vált a biológiai molekulák szerkezetének meghatározásában. A röntgen diffrakcióhoz a biológiai mintákat ki kell kristályosítani, ami nehéz feladat, sok esetben pedig lehetetlen. A krio-TEM vizsgálatokhoz nem szükséges, hogy a minta kristályos legyen.

VIII.4 Krio-CLEM alkalmazások

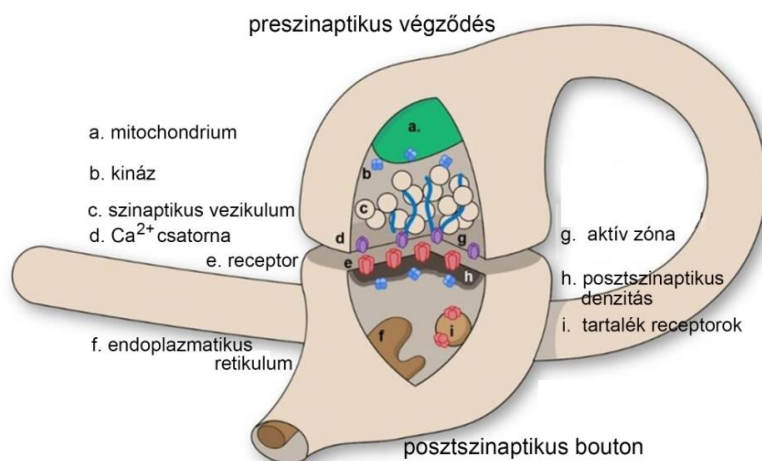
VIII.4.1. Szinapszisok vizsgálata

A krio-CLEM alkalmazásai közül Tao és munkatársainak a neuronális hálózatra vonatkozó munkájának egy részletét mutatjuk be: a serkentő és gátló szinapszisokat vizsgálják krio-FM és krio-EM/ET segítségével (TAO 2018). A patkány hippocampus neuronjaiba transzfektáltak két fluoreszcens fehérjét, a zöld PSD-95-EGFP-t és a piros mCherry-gephyrin.

A PSD-95 poszt-szinaptikus denzitás fehérje (WIKIPEDIA DLG4). Az „E” a GFP előtt azt jelenti, hogy enhanced, javított, az „m” a Cherry előtt pedig azt, hogy monomer. A gephyrin a gátló szinapszisokat szabályozó fehérje (GROENEWEG 2018).

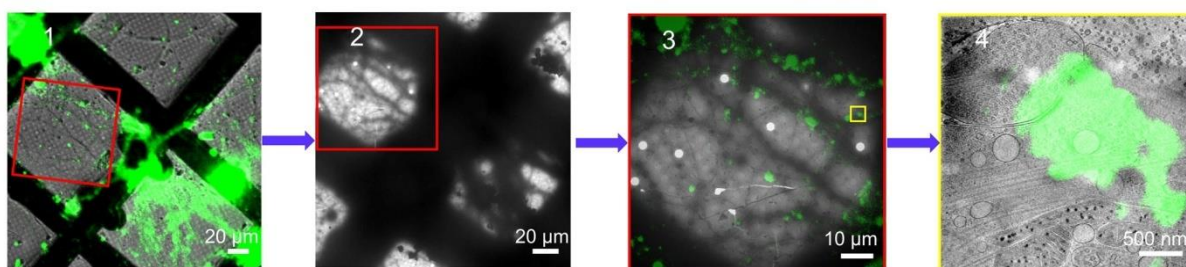
A krio-CLEM műszaki felszereltsége a következő volt: A krio-FM-re házi készítésű krio-kamrát, Olympus IX71 invertált fluoreszcens mikroszkópot (<https://www.youtube.com/watch?v=UezGLiiwRIw>) használtak. A mikroszkóp száraz objektívje 40x nagyítású, numerikus aperturája 0,6. A Olympus mikroszkóphoz sCMOS kamerát (s jelzi, hogy scientific) csatlakoztattak. GATAN 626 EM krio-mintatartót, Tecnai F20 és Titan Krios elektron-mikroszkóppal dolgoztak. A felsorolt berendezések jellemzői megtalálhatók az interneten.

A képek regisztrálására, illesztésére, feldolgozására, 3D rekonstrukciójára az ingyenes, nyílt forrás-kódú IMOD szoftver csomagot (WIKIPEDIA, IMOD) és szintén ingyenes ImageJ programokat használták. Mielőtt bemutatnánk a krio-CLEM felvételeket, emlékeztetünk arra, hogy hol helyezkedik el a posztszinaptikus denzitás a szinaptikus kapcsolaton belül: sötét színnel és világos „h” betűvel jelezve a VIII.9. ábrán (ANGOL WIKIPEDIA-ból).



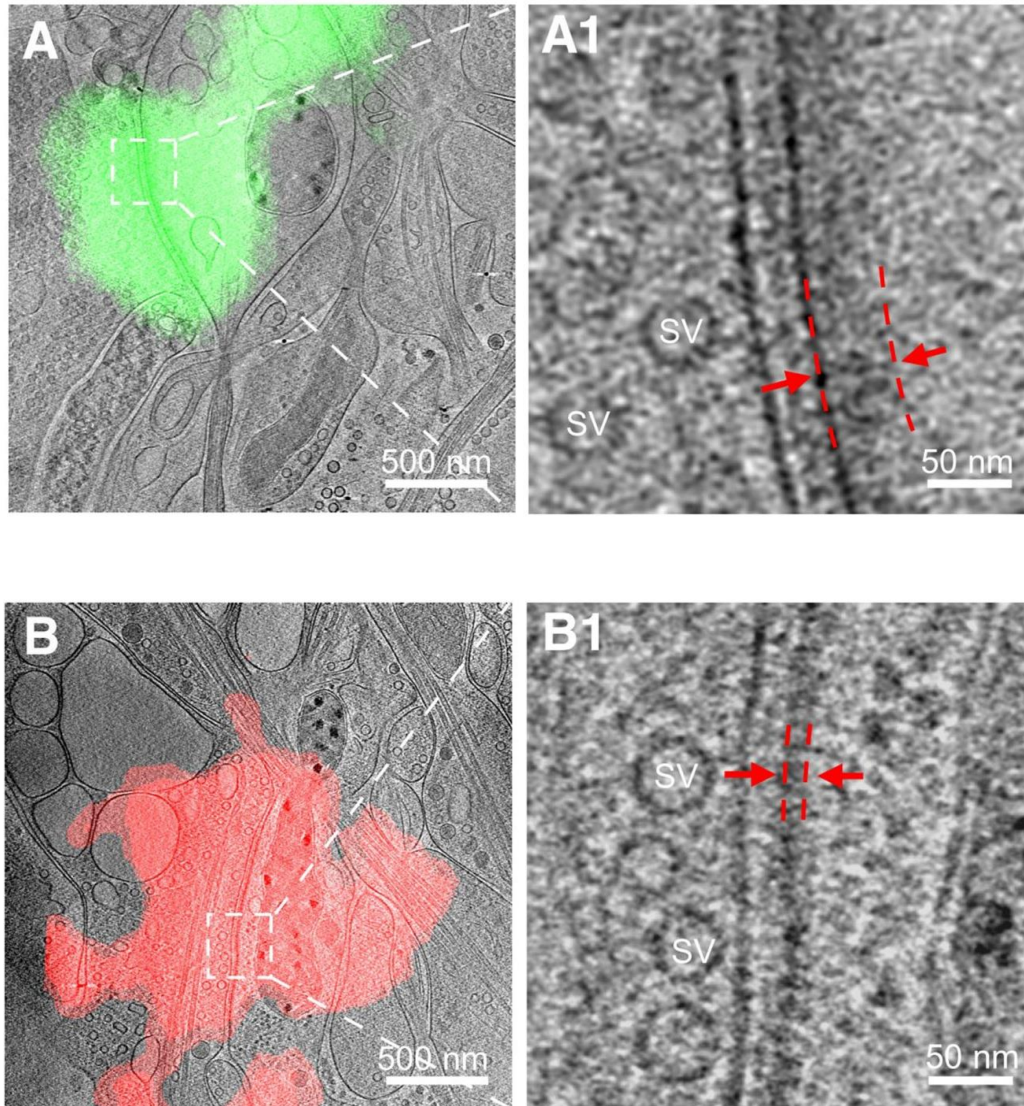
VIII.9. ábra. A posztszinaptikus denzitás helyzetéhez (WIKIPEDIA)

A krio-CLEM munkafolyamatát mutatja a VIII.10. ábra.



VIII.10. ábra. A kryo-CLEM munkafolyamatának képei hippocampalis neuronok vizsgálatában (TAO 2018). 1. kryo-fluoreszcens és kryo-széleslátó terű képek egymásra helyezve. 2. Az 1-képen pirossal bekeretezett részének kis nagyítású kryo-EM képe. 3. Az 1 és 2 képeken pirossal bekeretezett terep egymásra helyezve. 4. A 3-as képen sárgával bekeretezett része nagyobb nagyításban: egy tomográfiai szelet és a kryo-fluoreszcens kép finoman egymásra hangolva

A kettős festés (EGFP és mCherry), amelyek különböző molekulákhoz kapcsolódtak a transzfektálás során, lehetővé tette a serkentő és gátló szinapszisok megkülönböztetését és nagy felbontású krio-ET tanulmányozását (VIII.11. ábra).

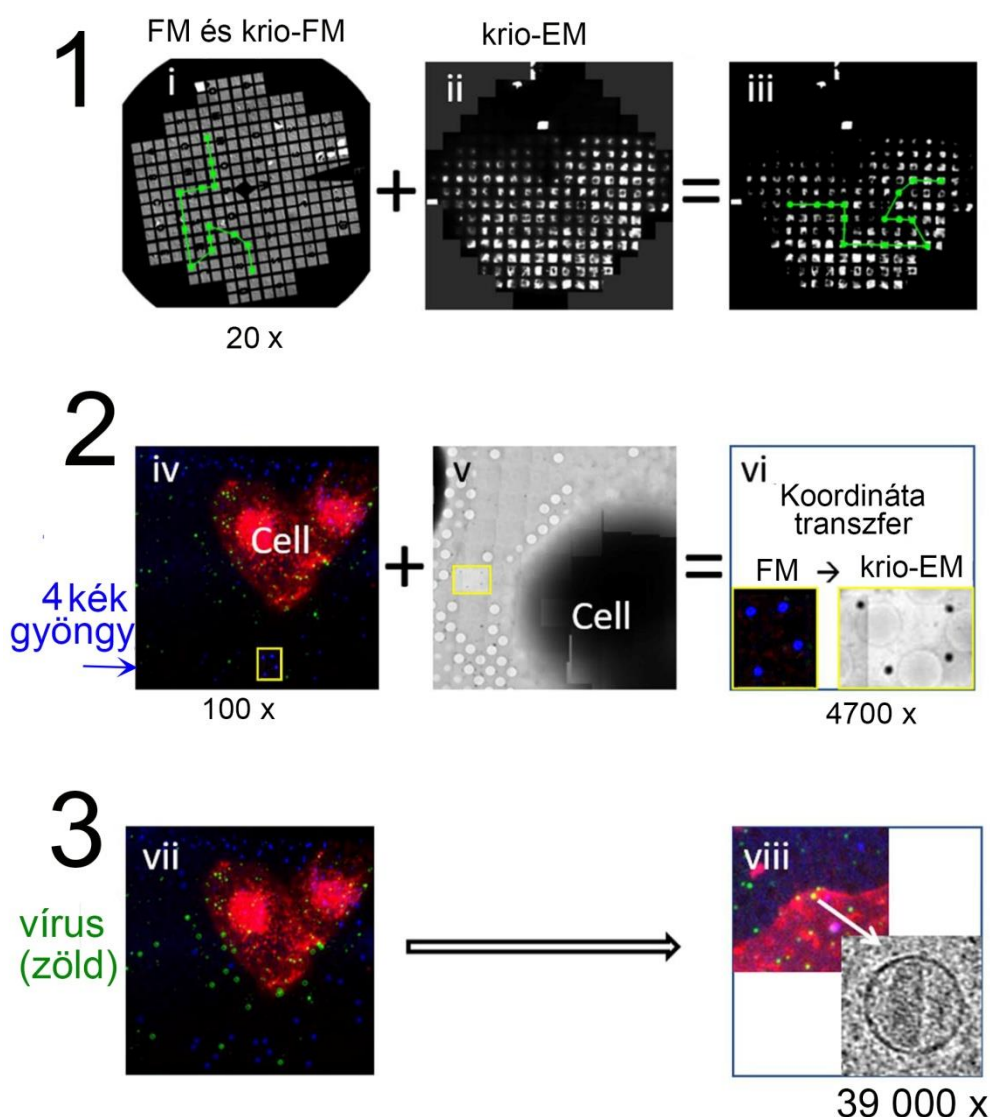


VIII.11. ábra. *Serkentő (A) és gátló (B) szinapszisok azonosítása krio-CLEM képek alapján. A kolokalizált PSD-95-EGFP zöld és mCherry-gephyrin piros színű. A jobb oldali tomogrammok (elektronmikroszkópos képek) a bal oldali ábrákon fehérrel bekeretezett terek nagyított képei. Az A képek vastag, a B képek vékony posztszinaptikus denzitásokat mutatnak, amelyeket piros szaggatott nyilak jeleznek. (SV szinaptikus vezikulum) (TAO 2018)*

VIII.4.2. HIV-1 vírusok vizsgálata

Fu és munkatársai a krio-CLEM vizsgálatokat automatizálták (FU 2019). A korábbi fejezetekben is láthattuk, hogy a CLEM-ben a legnehezebb feladat éppen a korreláció és ezt többnyire két lépésben oldják meg manuálisan. Először az FM és kis nagyítású EM képek

között teremtik meg a kapcsolatot, majd nagyobb nagyításban nagyobb pontosságú kapcsolatot létesítenek a két modalitás közt. Az említett munkában is ez történt csak automatizált (vagy félig automatizált) módon.



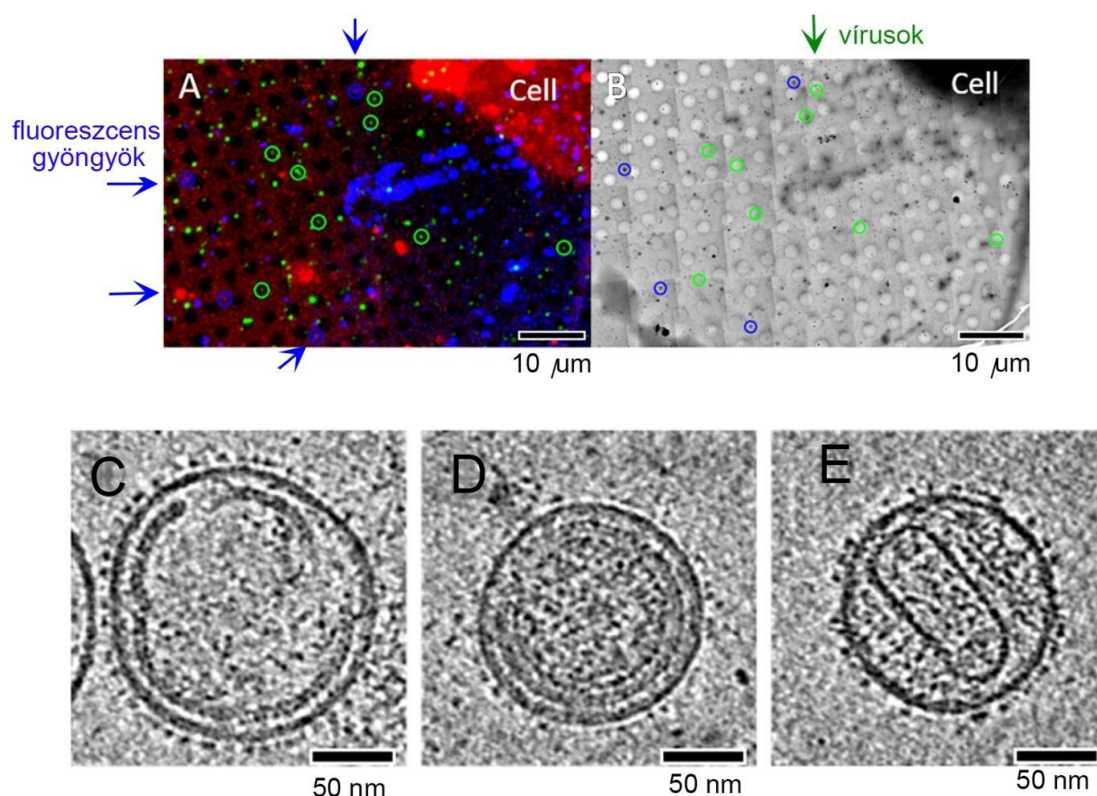
VIII.12. ábra. AutoCLEM-nek nevezett automatikus krio-CLEM munkafolyamata (FU 2019).

1. sor. A mikroszkóp rács áttekintő képe FM/krio-FM és krio-EM üzemmódban. A 11 kijelölt zöld rácsnégyszetet az FM és EM között automatikusan korrelálják.
2. sor. A 100 x-os nagyítású FM képen a sárga kereten belüli 4 kék pont (fluoreszcens gyöngyök) szolgál a 4700 x-os nagyítású krio-TEM kép közötti pontosabb korreláció meghatározására. Ennek alapján egy korrelációs mátrixot generálnak.
3. sor. A 2. sorban jelzett korrelációs mátrix alapján találják meg a HIV-1 vírust és készítik nagy felbontású (39 000 x) krio-ET képet

Az AutoCLEM-nek elnevezett rendszer tartalmaz egy nagy sebességű, élősejt vizsgálatára alkalmas konfokális mikroszkópot, amely a mikrostélyről kis nagyítású rácsképet (atlasz)

készít, majd fagyasztás után egy krio-FM képet. Mindezt automatikusan összekapcsolják a krio-EM által készített atlasz képpel (VIII.12. ábra első sora).

Az FM-ben megcélzott terület koordinátáit automatikusan átkonvertálják a krio-EM koordinátaiba, majd kék támpont marker gyöngyök segítségével finomítják a koordináta transzformációt (VIII.12. ábra 2. sora). A leírt folyamat meggyorsítja az élő sejt FM és a krio-EM közötti megfeleltetést. Az AutoCLEM szemléltetése HIV-1 (1-es típusú humán immundeficiencia-vírus) vizsgálatán keresztül történt. A minta előkészítéshez Quantifoil-lal fedett Au vagy Ni mikrostélyokat használtak. A kétféle modalitásban történő vizsgálatokhoz a FluoSphere nevű fluoreszcens gyöngyökből leginkább a 200 nm-es méretűek feleltek meg.



VIII.13. ábra. Automatikus (fél automatikus) korreláció a fluoreszcens gyöngyök és a HIV-1 vírus részecskék között. A sejtek piros, a vírusok zöld, a fluoreszcens gyöngyök kék színűek.

Négy fluoreszcens gyöngy van kijelölve a krio-FM és krio-EM közötti korrelációra. Az A ábra krio-FM, a B ábra krio-EM kép. A C ábra egy éretlen, a D egy éretlen és hibás, végül az E ábra érett HIV-1 részecskét mutat krio-EM felvételeken (FU 2019 ábrája nyomán)

A VIII.13. ábra eredeti változatában részletesebben magyarázzák, hogyan történt a két modalitás közötti kapcsolat létesítése és a nagy felbontású HIV-1 képekből nyolcat mutatnak az itteni hárommal szemben. A közlemény lényege, hogy a krio-CLEM automatizálásával, a vizsgálatok sebességének megnövelésével jelentősen több szakmai eredményt érhetünk el.

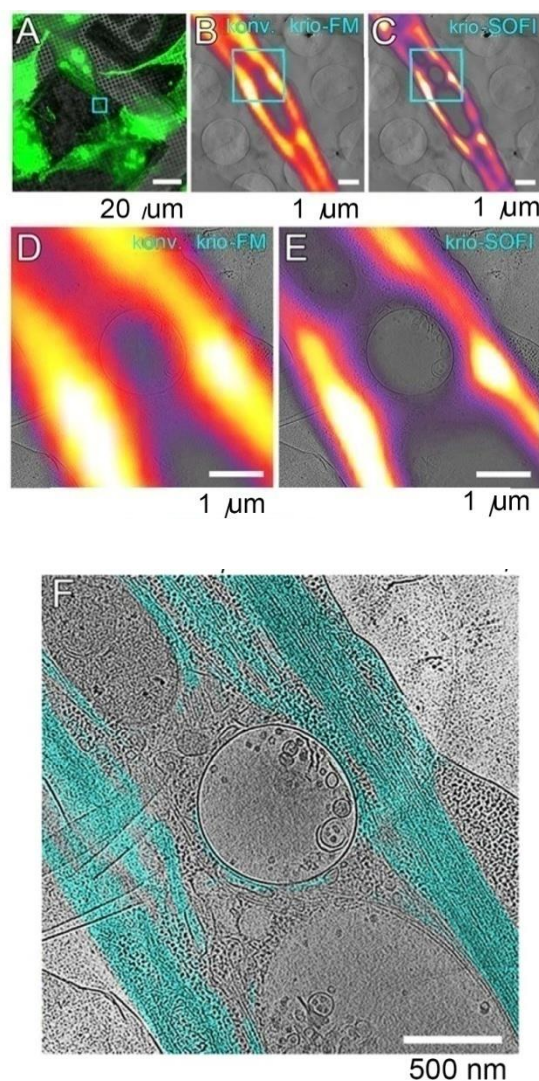
VIII.5. Krio-szuperfelbontású CLEM (csCLEM)

VIII.5.1. Aktin vizsgálata

Moser és munkatárai aktin vizsgálata kapcsán mutatják be, hogy milyen előnyökkel jár az a krio-CLEM-ben, ha nem konvencionális szuperfelbontású FM-t, hanem krio-SOFI-t korrelálnak krio-EM-mel (MOSEER 2019). A krio-SOFI előnye a konvencionális szuperfelbontású módszerekhez képest, hogy alacsony lézer intenzitással működik, és általános megoldást nyújthat a krio-szuperfelbontású mikroszkópiában jelentkező devitrifikáció (a kristályos jég képződésének) elkerülésére. Igaz, hogy az általuk elért 135 nm-es felbontás csak 3-as faktorral múlja felül a konvencionális krio-FM-et, és felbontás tekintetében alulmarad a többi szuperfelbontású krio-FM-nek. Viszont a krio-SOFI-ban alkalmazott minta-előkészítési eljárás teljesen kompatibilis a krio-TEM minta-előkészítésével.

Mint többször ismételtek a nagyfelbontású krio-TEM-ben egyes fehérjék azonosítása a meglehetősen zsúfolt és zajos képen nehézségekbe ütközik. Másrészt az FM a specifikusan jelölt fehérjék azonosításában kiváló, de hiányzik a szükséges felbontóképesség. Ez indokolja a krio-CLEM létrehozását az egymást kiegészítő előnyök alapján.

A csCLEM-hez a Dendra2-Lifeact-tel transzfektált XC sejteket (patkány Rous sarcoma sejtvonal) használtak, amelyeket gyors merítéses eljárással fagyasztottak. (A Dendra2 fotoaktiválható fluoreszcens fehérje (CHUDAKOV 2018), a Lifeact pedig 17-aminosavból álló peptid, amelyet F-aktin vizualizálására használnak (RIEDL 2008)). A mintát lyukas szénhártyával fedett EM mikrostélyon növesztették.



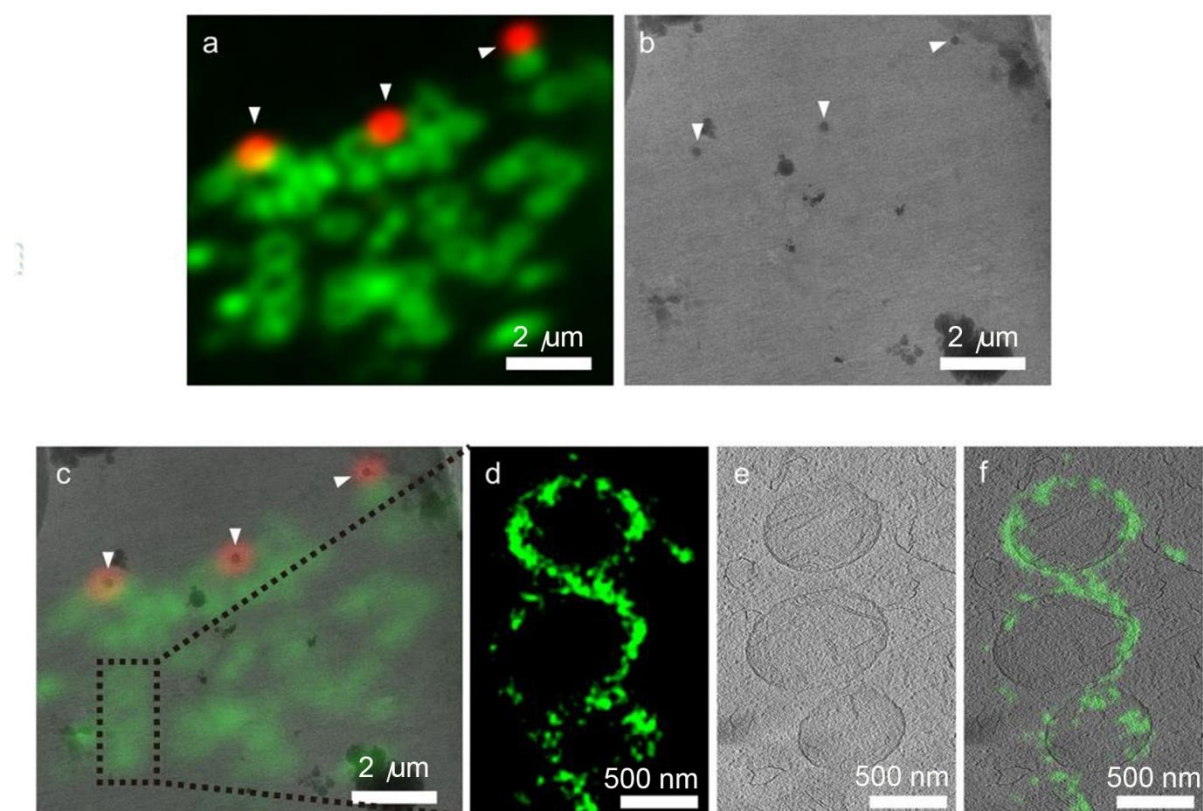
VIII.14. ábra. Aktin vizsgálata szuperfelbontású krio-CLEM-mel (MOSER 2019).

A/ egymásra helyezett konvencionális krio-FM (zöld) és reflexiós fénymikroszkópos (szürke) felvétel látható. B/ konvencionális krio-FM és krio-ET kép egymásra helyezve az A/ ábrán bekeretezett terep nagyítása. A minta vastagsága 23 nm. C/ krio-SOFI és krio-ET kép, az A/ ábrán bekeretezett terep nagyítása. D/ konvencionális krio-FM és krio-ET kép egymásra helyezve, a B/ábrán bekeretezett terep nagyítása. E/ krio-SOFI és krio-ET kép, a C/ ábrán bekeretezett terep nagyítása, F/ krio-SOFI (kékes zöld) és krio-ET kép, az E/ ábrán látható kép nagyítása. Az F-aktinonon (kékes zöld) kívül a kép bal felső sarkában egy mitochondrium, a kép közepén és a jobb alsó sarkában egy-egy nagy vezikulum látható

A szerzők a SOFI-val történő krio-CLEM jó használhatóságát még két másik mintán, más transzfekcióval a mitochondriumok és az endoplazmatikus retikulumok vizualizálásával is bizonyították.

VIII.5.2. Mitochondriumok vizsgálata

Tian a krio-szuperfelbontású CLEM-ről írt review cikkében (TIAN 2021) elemzi a krio-szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópiát és a krio-TEM-et, mint a csCLEM két összetevőjét, az intracelluláris részletek megismerésében. Alkalmazási példaként mitochondriumok vizsgálatát hozza immortalizált HEK 239 sejtekben (HEK, Human Embryonic Kidney). A genetikailag megfestett TOM 20 fehérje (TOMM, translocase of the outer mitochondrial membrane) a VIII.15. ábra tanúsága szerint is a mitochondriumok külső membránjában található.



VIII.15. ábra. Fluoreszcens fehérjét (TOM20-Dronpa) expresszáló HEK293 sejtek szuperfelbontású krio-CLEM képei (TIAN 2021). a/ széleslátóterű fluoreszcens felvétel, a TOM20-Dronpa zöld színű, a támpontmarkerként szolgáló fluoreszcens gyöngyök pirosak. (A TOM20 mitochondriális fehérje, a Dronpa fotoaktiválható fluoreszcens fehérje.) b./ az előző terep krio-EM képe. c/ fluoreszcens kép (a/ ábra) és krio-EM kép (b/ ábra) egymásra helyezve. d/ szuperfelbontású fluoreszcens kép a c/ ábrán bekeretezett terepről. e/ krio-EM felvétel a d/ ábrával egyező terepről, három és fél mitochondriumot mutat. f/ a szuperfelbontású fluoreszcens kép (d/ ábra) és a krio-EM kép (e/ ábra) egymásra helyezve

- CHUDAKOV, D. M. *et al.* (2018): Using photoactivatable fluorescent protein Dendra 2 to track protein movement, *Biotechniques* 42,5. doi: 10.2144/000112470.
- DAHLBERG, P. D. *et al.* (2021): Cryogenic Super-Resolution Fluorescence and Electron Microscopy Correlated at Nanoscale, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 72, 253-278.
- DeROSIER, D. J. (2021): Where in the cell is my protein?, *Quarterly Reviews of Biophysics* 54, e9, 1-12. doi: 10.1017/S003358352100007X.
- DERTINGER, T. *et al.* (2009): Fast, background-free 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI), *PNAS* 106, 52, 22287-22292.
- DUBOCHET, J. *et al.* (1988): Cryo-electron microscopy of vitrified specimens, *Quarterly Review of Biophysics* 21,2, 129-228.
- FAORO, R. *et al.* (2018): Aberration-corrected cryoimmersion light microscopy, *PNAS* 115, 6, 1204-1209.
- FU, X. *et al.* (2019): AutoCLEM: An Automated Workflow for Correlative Live-Cell Fluorescence Microscopy and Cryo-Electron Tomography, *Scientific Reports* 9, 19207. doi: 10.1038/s41598-019-55766-8.
- GEISSBUEHLER, S. *et al.* (2011): Comparison between SOFI and STORM, *Biomedical Optics Express* 2,3, 408-420.
- GORELICK, S. *et al.* (2019): PIE-scope, integrated cryo-correlative light and FIB/SEM microscopy, *eLife*, 6, e45919. doi: 10.7554/eLife.45919.
- GROENEWEG, F. L. *et al.* (2018): Gephyrin a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond, *Histochemistry and Cell Biology* 150, 489-508.
- HURBAIN, I. *et al.* (2011): The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells, *Biol. Cell* 103, 405-420. doi: 10.1042/BC20110015.
- HUTCHINGS, J. *et al.* (2018): Fine details in complex environments: the power of cryo-electron tomography, *Biomedical Society Transactions* doi: 10.1042/BST20170351.
- LEICA, (2022): New Imaging Tools for Cryo-Light Microscopy.
- MOSER, F. *et al.* (2019): Cryo-SOFI enabling low-dose super-resolution correlative light and electron cryo-microscopy, *PNAS* 116,11, 4804-4809.
- RIEDL, J. *et al.* (2008): Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin, *Nat Methods* 5, 7, 605. doi: 10.1038/nmeth.1220.

- TAO, C-L. *et al.* (2018): Differentiation and Characterization of Excitatory and Inhibitory Synapses by Cryo-electron Tomography and Correlative Microscopy, *The Journal of Neuroscience* 38, 6, 1493-0510.
- TIAN, B. *et al.* (2021): Cryogenic superresolution correlative light and electron microscopy on the frontier of subcellular imaging, *Biophysical Reviews* 13, 1163-1171. doi: 10.1007/s12551-021-00851-4.
- WANG, L. *et al.* (2019): Solid immersion microscopy images cells under cryogenic conditions with 12 nm resolution, *Communications Biology* 2, 74. doi: 10.1038/s42003-019-0317-6.
- ZEISS, Cryo-Confocal Imaging with Airyscan, Zeiss Application Note.

Összefoglalás

A korrelatív fény és elektronmikroszkópia (CLEM) a fény és elektronok által közvetített információkat nyeri kis egy közös kis mintatérfogatra vonatkozóan. A 2000. év előtt több akadálya volt ennek: a fény és elektronmikroszkóp eltérő látómezője, nagyon különböző felbontása és a két modalításban alkalmazott minta-előkészítés inkompatibilitása. Az elektronmikroszkópia látóterét növelték sok kis terület („csempe”) automatikus felvételével, amelyeket össze lehetett fűzni nagyfelbontású nagylátóterű képpé. A fénymikroszkópia felbontását javították a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia kidolgozásával. A minta-előkészítések inkompatibilitását megszüntették dual markerek, többek között fluoreszcens fehérjék kifejlesztésével, amelyek mindkét modalításban láthatók. Kisebb koncentrációjú vegyszereket alkalmaznak az elektronmikroszkópos minta-előkészítésben, amelyek a fénymikroszkópban vizsgált minták fluoreszcenciáját nem szüntetik meg. Kifejlesztettek olyan fénymikroszkópokat, amelyek feltétként csatlakoztak az elektronmikroszkópra. Külön igény a 3D vizsgálat a CLEM-ben, minthogy a biológiai sejt háromdimenziós. A fénymikroszkópia ezt az igényt teljesíteni tudja a konfokális, a két- és több-fotonos mikroszkópia révén. A TEM-ben a sorozatmetszés (ssTEM) és elektrontomográfia, valamint a SEM-be beépített ultramikrotómmal és fókuszált ionnyalábbal (SBF-SEM és FIB-SEM) szintén lehetséges a harmadik dimenzió megragadása. A legnagyobb probléma a fény és elektronmikroszkópos felvételek pontos egymásra illesztése: erre támpont markereket fejlesztettek ki, amelyek fénymikroszkóp alatt fluoreszkálnak, elektronmikroszkópban pedig rendszám-kontrasztot adnak. A biológiai minták előkészítésének nagy akadályát hárította el az amorf jégbe történő beágyazás, a krio-fixálás, amely a Tokuyasu-eljárásban és a nagynyomású fagyasztásban is szerepet kap. Így lehetővé vált az élő minták fénymikroszkópos vizsgálatával kezdődő sor végigvitele a krio-TEM vizsgálatokig. A krio-hőmérsékletek alkalmazása kedvezően hat a fényvizsgálatokra és az elektronmikroszkópos vizsgálatokra is: az első esetben csökkenti a fotokifakulás mértékét, a második esetben pedig szükségtelenné teszi a minta fixálásához szükséges vegyszerek alkalmazását és lehetővé teszi a minta hidratált, közel natív állapotban történő vizsgálatát. A CLEM sikerének jelentős tényezője az időközben végbement technikai fejlődés: 50-szeres sebességnövekedés a soksugaras mikroszkópok révén, a folyamatok automatizálása és a számítástechnika nagymértékű alkalmazása. A felsorolt lehetőségek alá vannak rendelve a biológiai minta vizsgálati céljainak.

Néhány rövidítés angol és magyar jelentése

2PLSM, Two-Photon Laser Scanning Microscope, kétfotonos pásztázó lézer mikroszkóp

ASEM, Atmospheric Scanning Electron Microscope, atmoszférikus pásztázó elektronmikroszkóp

CCD, Charge-Coupled Device, töltéscsatolt eszköz

CEMOVIS, Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Section, amorf jégbe ágyazott metszetek krio-elektronmikroszkópiája

CLEM, Correlative Light and Electron Microscopy, korrelatív fény- és elektronmikroszkópia

CLSM Confocal Laser Scanning Microscope, konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (Ugyanaz, mint a LSCM)

csCLEM, cryo-super-resolution CLEM, krio-szuperfelbontású CLEM

DAB, diaminobenzidin

dSTORM, direct STORM

eC-CLEM, easy Cell-Correlative Light and Electron Microscopy (szoftver)

EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein, javított GFP

EMCCD, Electron Multiplying Charge Coupled Device, elektronsokszorozó CCD kamera

ER, endoplazmatikus retikulum

ESEM, Environmental Scanning Electron Microscope, környezeti pásztázó elektronmikroszkóp

ET, Electron Tomography, elektrontomográfia

FE-SEM, Field Emission SEM, téremissziós SEM

FIB-SEM, Focused Ion Beam SEM, fókuszált ionsugárral kombinált pásztázó elektronmikroszkóp

FM, Fluorescence Microscopy, fluoreszcens (fény)mikroszkópia

FND, Fluorescent Nanodiamond, fluoreszcens nanogyémánt

FNG, FluoroNanoGold, fluoreszcens nanoarany

FS, Freeze Substitution, fagyasztásos helyettesítés

GFP, Green Fluorescent Protein, zöld fluoreszcens fehérje

HPF, High Pressure Freezing, nagynyomású fagyasztás

IEM, Immuno-Electron Microscopy, immun-elektronmikroszkópia

IFM, Immuno-Fluorescence Microscopy, immun-fluoreszcens mikroszkópia

ILSEM, Integrated Light and Scanning Electron Microscope, integrált CLEM

krio-ET, cryo-Electron Tomography, krio-elektron tomográfia

krio-FM, cryo-Fluorescence Microscopy, krio-fluoreszcens mikroszkópia

LSCM, lásd CLSM

LSM, Laser Scanning Microscopy, pásztázó lézer mikroszkópia,

miniSOG, Mini Singlet Oxygen Generator, mini szinglet-oxigén generátor

NG, Nanogold, nanoarany

PALM, Photoactivated Localization Microscopy, fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia

STED, Stimulated Emission Depletion, stimulált emisszió-kioltás

PFIB-SEM, Plasma FIB-SEM, plazmasugaras vékonyítás a pásztázó elektronmikroszkópban

piTEAM, parallel imaging using Transmission Electron Automated Microscope, párhuzamos sugarakkal működő, automatizált TEM

sCMOS, scientific Complementary Metal Oxid Semiconductor, tudományos, komplementer, fém-oxid félvezető

SEM, Scanning Electron Microscopy, pásztázó elektronmikroszkópia

SIL, Solid Immersion Lens, szilárd immerziós lencse

SIM, Structured Illumination Microscopy, fénymintázat-megvilágítású mikroszkópia

SMLM, Single-Molecule Localization Microscopy, egyedi molekulák lokalizációs mikroszkópiája

SOFI, Super-resolution Optical Fluctuation Imaging, superfelbontású optikai fluktuációs képalkotás

SR-CLEM, Super-Resolution CLEM, superfelbontású CLEM

SRM, Super-Resolution Microscopy, superfelbontású (fluoreszcens fény) mikroszkópia

ssTEM, serial section TEM, sorozat-metszetekkel operáló TEM

STED, Stimulated Emission Depletion, stimulált emisszió-kioltás

STORM, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, stochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia,

TEM, Transmission Electron Microscopy, transzmissziós elektron mikroszkópia

TEMCA, Transmission Electron Microscope Camera Array, mátrix-elrendezésű kamerákkal működő TEM.