

Abstrakt

Příprava biologických vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii není triviální úkol. Vzorky musí odolat vakuu přítomném v mikroskopu, a proto je často nutné uplatnit nefyziologické postupy při jejich zpracování. Tyto postupy obvykle zahrnují fixaci na bázi aldehydů, nahrazení vody alkoholem (t.j. dehydrataci/substituci), a zalití do pryskyřice, která vytváří podporu pro následnou přípravu tenkých řezů, které pak mohou být vloženy do mikroskopu. V posledním desetiletí získala dominantní postavení v oblasti výzkumu buněčné biologie metoda kryo-fixace (vitřifikace) za pomoci ultrarychlého vysokotlakého zmrazování a následná kryo-substituce a zalití vzorků do pryskyřice při nízkých teplotách. Tímto způsobem byli úspěšně vitřifikovány různé biologické vzorky s tloušťkou až několik stovek mikrometrů do stavu, který byl srovnatelný s jejich *in vivo* strukturou. Kryo-fixace izolovaných biologických objektů (s omezenou tloušťkou do několika mikrometrů) je možná i v tenké vrstvě vitřifikované vody za pomoci imerzní kryo-fixace při normálním tlaku. V kombinaci s kryo-elektronovou mikroskopií se tato metoda stala nejefektivnějším a základním principem pro tvorbu elektron kryo-mikroskopických obrázků plně hydratovaných vzorků s velmi vysokým rozlišením na úrovni několika desetin nanometrů. Obě tyto metody jsou prezentovány v této práci. Pučící kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* zpracované kryo-fixací za pomoci vysokotlakého zmrazování a následné kryo-substituce byly vybrány jako biologický objekt pro jemné ultrastrukturální a imunocytochemické studie s využitím klasické transmisní elektronové mikroskopie; liposomy a jiné typy vezikulárních struktur zpracované imerzní kryo-fixací byly vybrány jako nanoobjekty pro elektron kryo-mikroskopické studie.

Klíčová slova: elektronová kryo-mikroskopie · imerzní kryo-fixace · kryo-fixace · mrazová substituce · transmisní elektronová mikroskopie · vitřifikace · vysokotlaké zmrazování