

Princip a metody elektronové mikroskopie

Mikroskopie

- **Světelná mikroskopie** (Z: 1 000x, RS: cca 200 nm)
různé způsoby zobrazení podle požadavků a
barvitelnosti
- **Elektronová mikroskopie** (Z: 1 000 000x, RS: 0,2 nm)
 - Transmisní (TEM)
 - Skenovací neboli rastrovací (SEM, REM)
 - Skenovací-transmisní (STEM)

Historie

objevu elektronového mikroskopu

1897 – **Joseph J. Thompson** – existence negativně nabité částice (později nazvané elektron)

1924 – **Luis de Broglie** – elektron se chová jako vlna

1926 – **Hans Busch** – průkaz fokusace elektronů cylindrickou magnetickou čočkou

Historie TEM

1931 - Ernst Ruska, Max Knoll
první elektronový mikroskop
tzv. prozařovací
transmisní EM
(zvětšoval 400x)

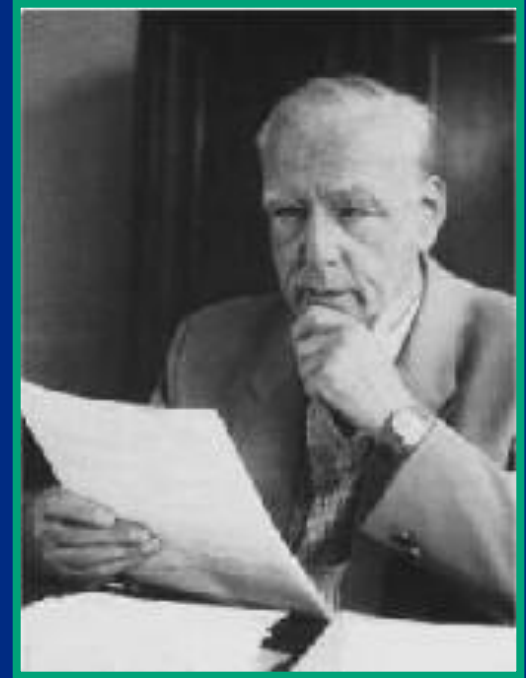
TEM – Transmission Electron Microscope

1937 – Ernst Ruska - první obrázek viru

1986 – Nobelova cena za fyziku a práce na poli elektronové optiky

V Československé republice

1949 – první český EM v Tesle Brno prof. Armin Delong se spolupracovníky



Ernst Ruska
(1906 – 1988)



TEM
z roku 1938

Historie SEM

1935 – Max Knoll – první publikace o SEM

1937 – Manfred von Ardenne – první experimenty (teoretický základ)

1942 – první skutečný **skenovací EM**

(RS: 50 nm; Z: 8 000x)

(Američané **Vladimír A. Zworykin, Hillier, Snijder**)

1969 - první komerční SEM Philips EM200

SEM – Scanning Electron Microscope

Druhy informací z EM

- **Morfologie vzorku:**
tvar a velikost struktur tvořících objekt (TEM)
- **Topologie vzorku:**
povrchové vlastnosti objektů, textury apod. (SEM)
- **Prvkové složení vzorku:**
tj. prvky a sloučeniny, z nichž je objekt složen
(Analytická EM - AEM)
- **Krystalografické vlastnosti vzorku:**
uspořádání atomů v objektu (Elektronová difrakce)

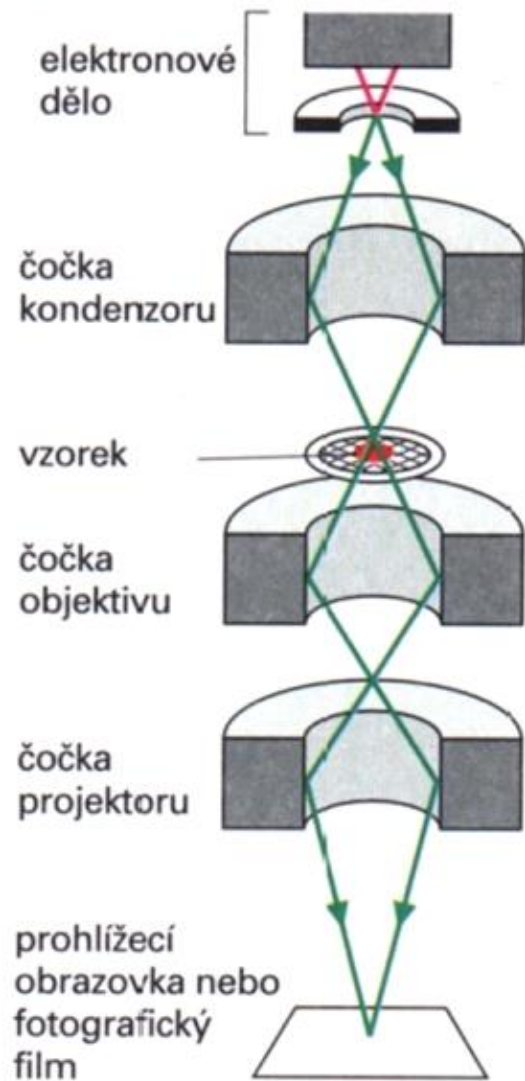
Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

- K zobrazení používá procházející svazek elektronů s asi 100 000x menší vlnovou délkou než λ světelného paprsku
 λ elektronu $\pm 0,004$ nm (= 0,04 Å) při cca 80 kV - závisí na urychlovacím napětí mikroskopu
(λ viditelného světla = 380-780 nm)
- Max. zvětšení 1 000 000x
(mez užitečného zvětšení 100 000 - 200 000x)
- Max. RS 0,1 nm (v praxi kolem 2 nm)
- Preparáty: nejčastěji kontrastované ultratenké řezy (tloušťka 20 – 100 nm)

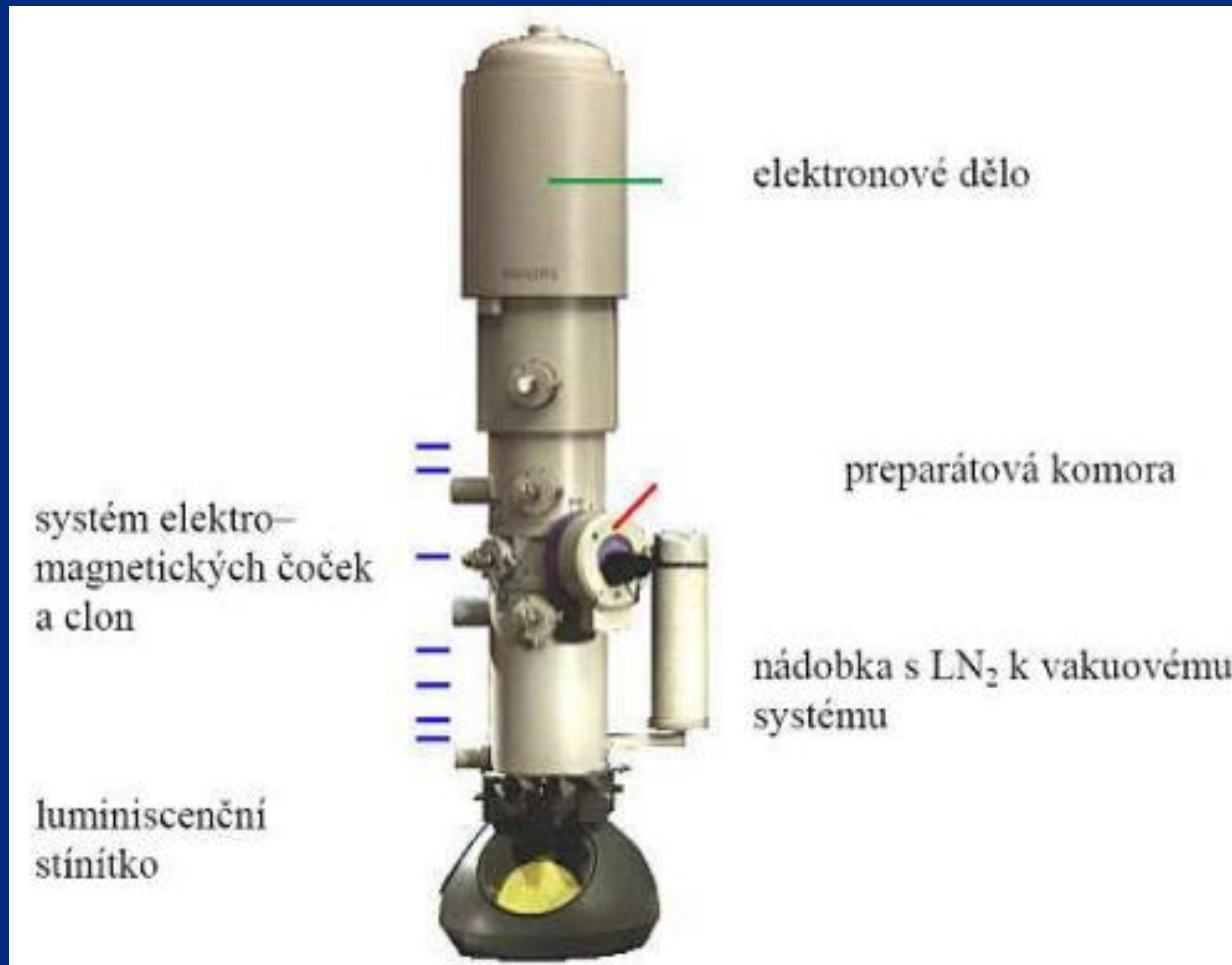
Základní části TEM

- Tubus
- Vakuový systém
- Elektronika
- Software

TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE



Konstrukce transmisního elektronového mikroskopu



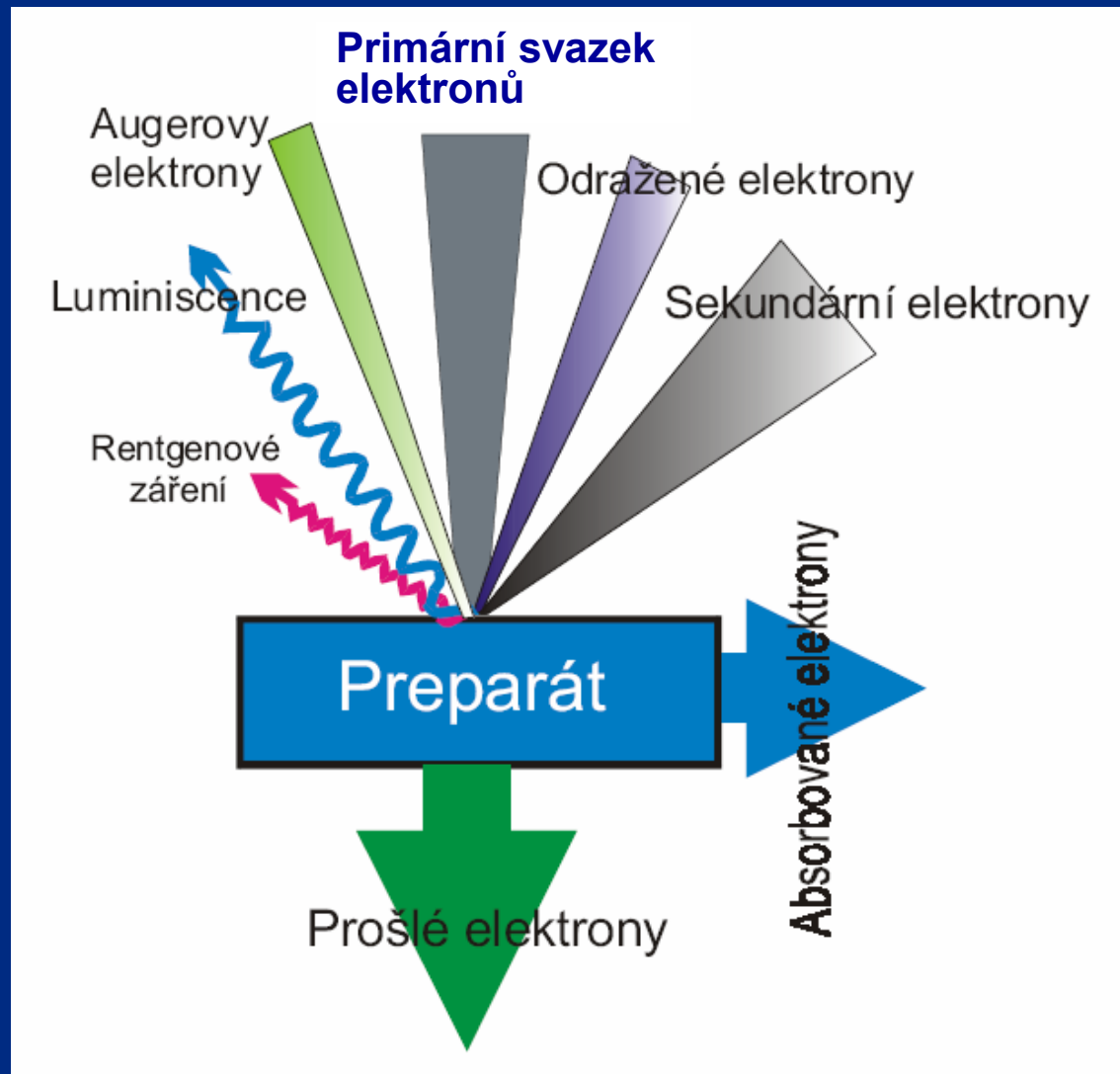
Základní části TEM

- **Wolframová katoda** – zdroj elektronů urychlované elektrickým polem o napětí 50 – 200 kV
- **Kondenzor** – usměrňuje paprsek elektronů na preparát (ultratenký řez)
- **Objektiv** – vytvoří první obraz
- **Projektiv** – zvětší tento obraz a promítne jej na fluorescenční stínítko (nebo fotografickou desku, příp. obrazovku počítače)

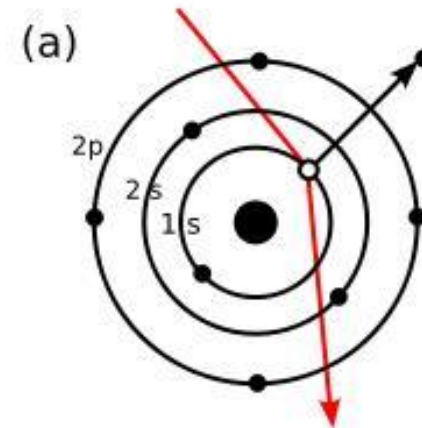
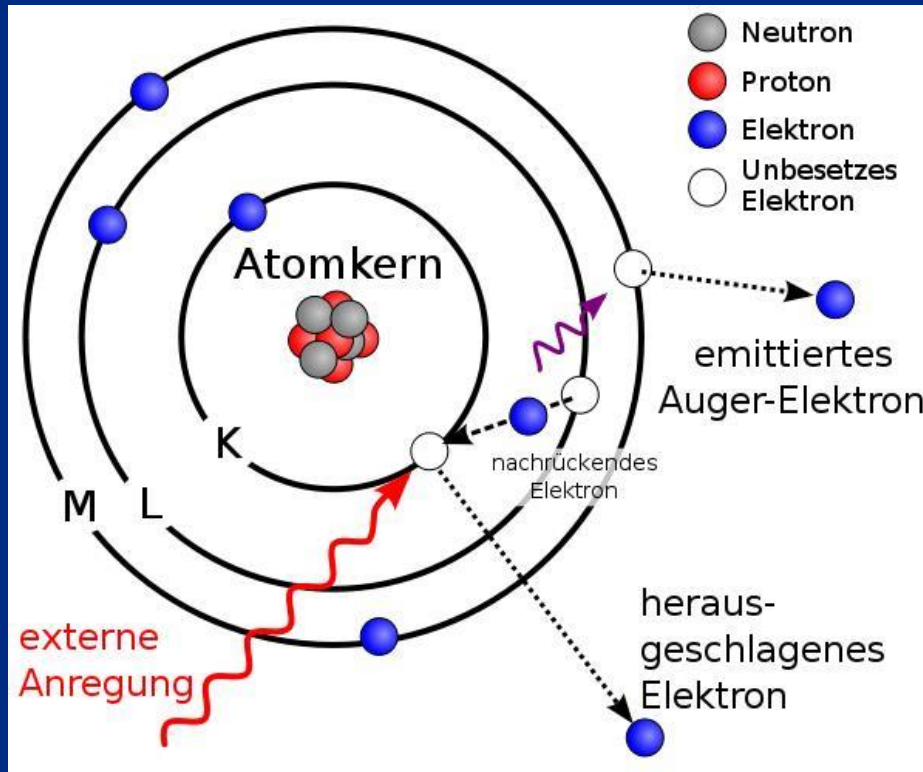
- konečný obraz je pozorován okénkem, často za pomoci pomocného okuláru

Umístění ve vakuu

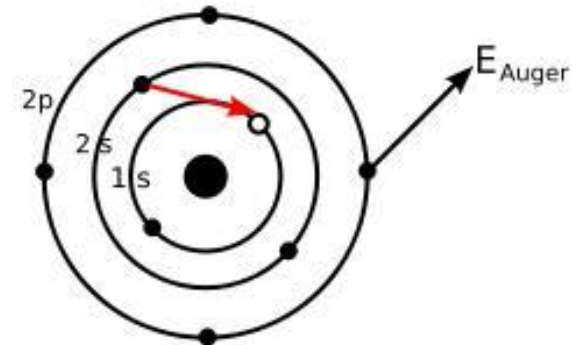
Interakce elektronů s preparátem



Augerovy elektrony



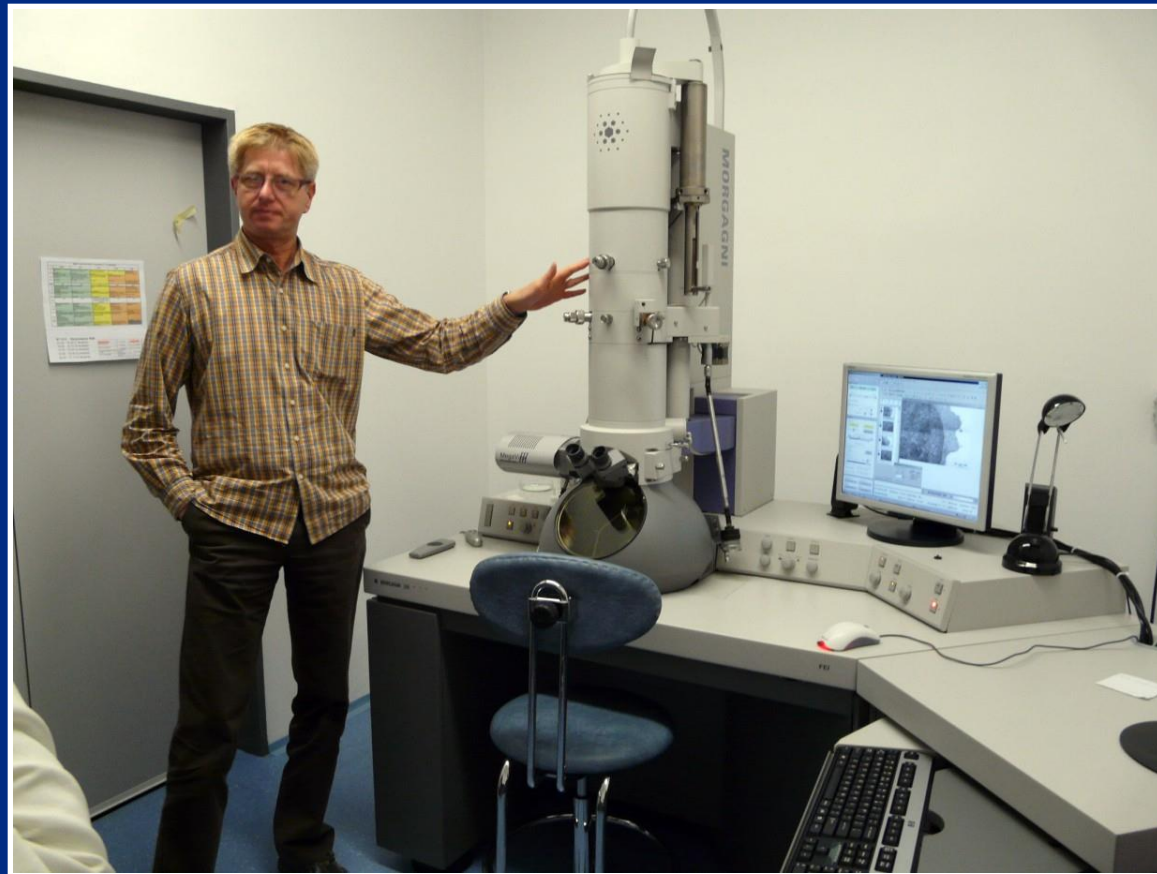
Electron collision



Auger electron emission

EM ÚMG AV ČR Praha-Krč

doc. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

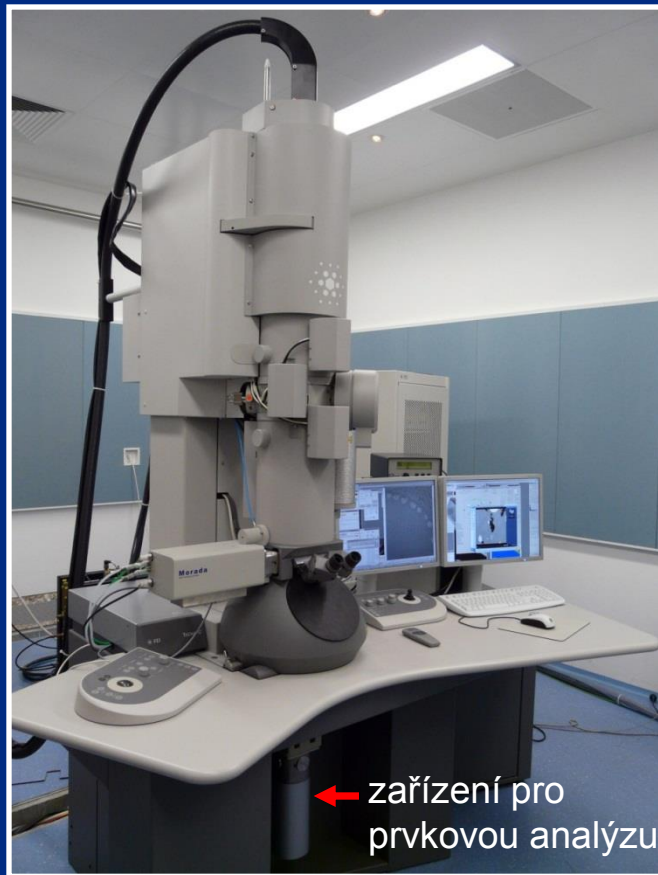


TEM – FEI - Morgan

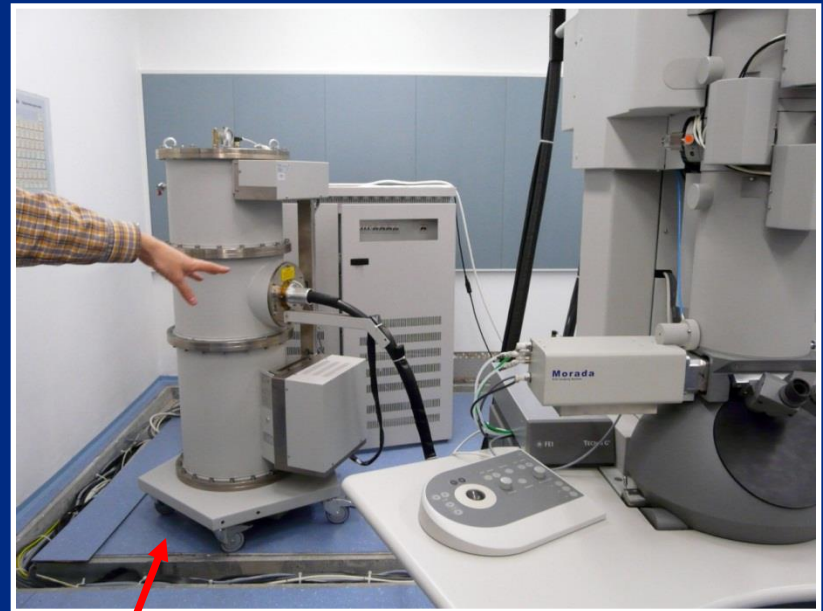
80 kV

Z: 180 000x – vhodné pro biology
(při 25 000x - zrníčka Au = 10 nm)

EM ÚMG AV ČR Praha-Krč



← zařízení pro
prvkovou analýzu vzorků



200 kV (λ el. = 0,0025 nm)
RS: 0,1 nm
prvková analýza vzorků

FEI – TECHNAIG²TEM + kryozariadení

Záznam obrazu v TEM

Dříve:

- **Plochý film**

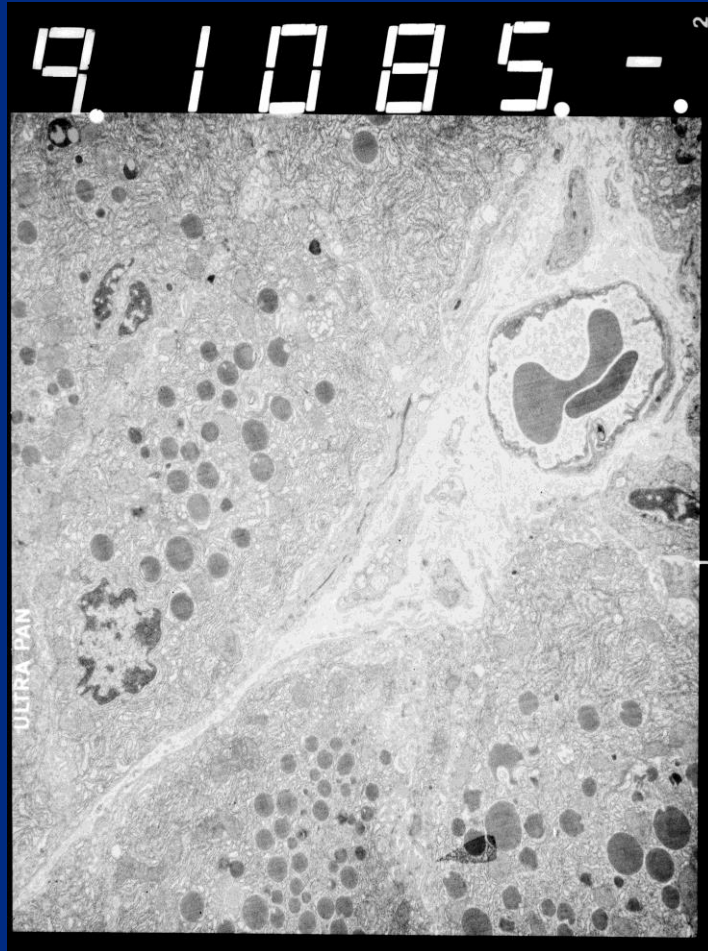
většinou 65 x 90 mm/ 50 snímků v 1 kazetě

- **35 mm film bez perforace**

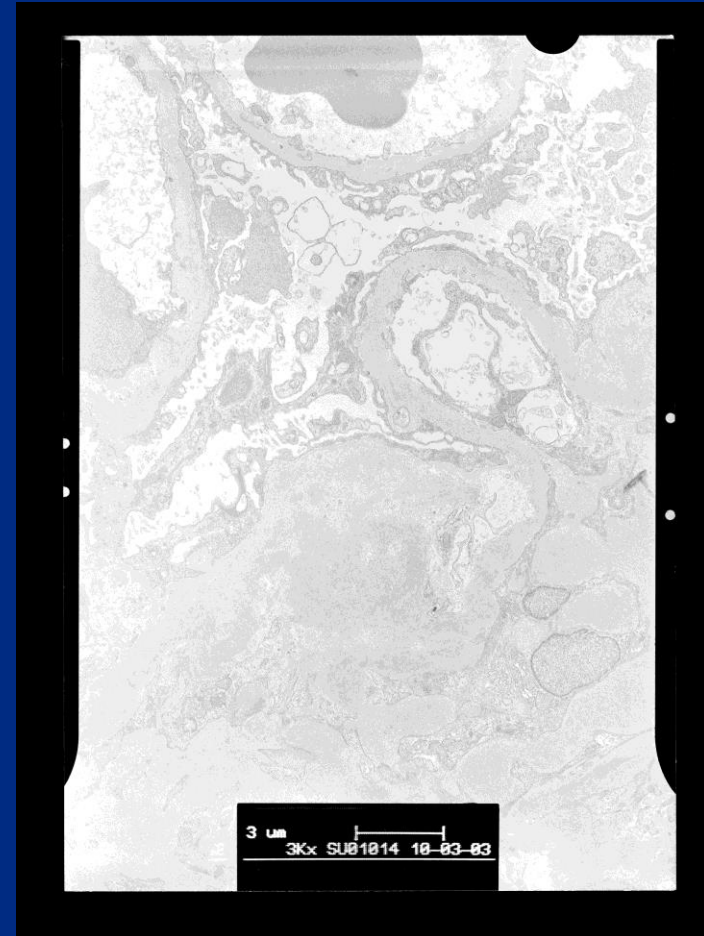
Nyní:

- **Digitální kamera (CCD)**

Záznam negativ - pozitiv

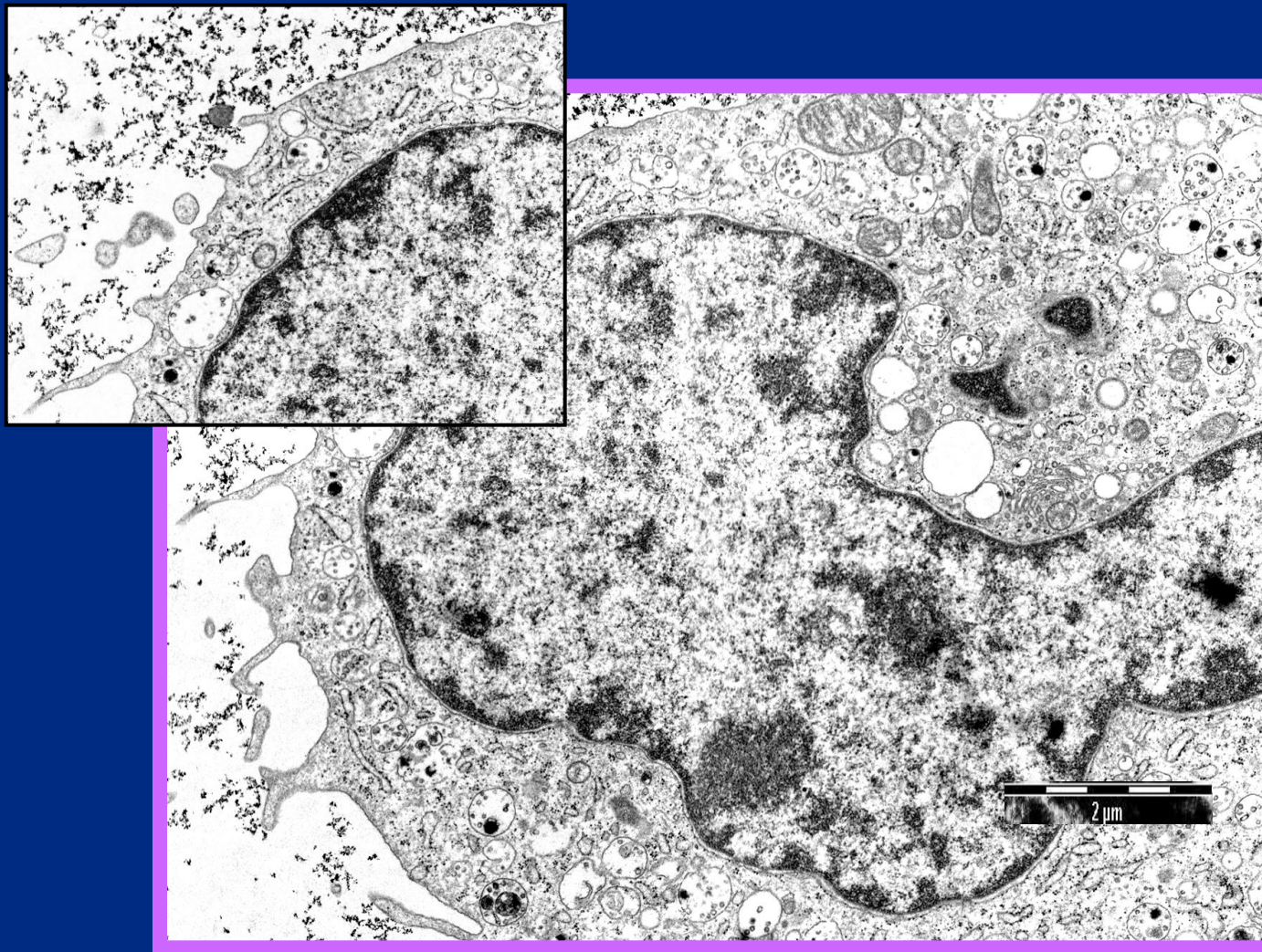


**Svitkový film BII
(formát 60x85 mm)**



a plochý film 65x90 mm

Digitální kamera – obraz složený ze 4



Metody TEM

Příprava preparátů pro TEM

- Metoda ultratenkých řezů
- Metoda negativního barvení
- Imunoznačení pomocí koloidního zlata
- Repliky (otisky povrchových struktur)
- Stínování (šikmo napařenou vrstvou kovu)
- Mrazové lámání
- apod.

Příprava preparátů pro TEM metodou ultratenkých řezů

- **Fixace**
- **Postfixace**
- **Odvodnění** (postupné a šetrné zbavení tkáně vody)
- **Prosycení a zalití do pryskyřice** (opora při řezání)
- **Polymerizace**
- **Řezání pro svět. mikroskop** – kontrola a výběr oblasti (tloušťka řezu 0,5 – 1 μm)
- **Krájení pomocí ultramikrotomu na ultratenké řezy** (tloušťka řezu 60 – 70 nm)
- **Zachycení na EM síťku** (většinou z Cu, Ni)
- **Kontrastování** (zvýšení kontrastu; uranyl acetát, citrát olova)
- **Prohlížení v EM a záznam**

Fixace

- Slouží pro **zachování ultrastruktury** buněk co nejvíce odpovídající **nativnímu stavu** (konzervace koagulací bílkovin)
- Nejčastěji používaný
roztok **glutaraldehydu** (0,5 – 10%), proniká rychle do tkání (několik mm za hodinu)
nebo roztok **formaldehydu**

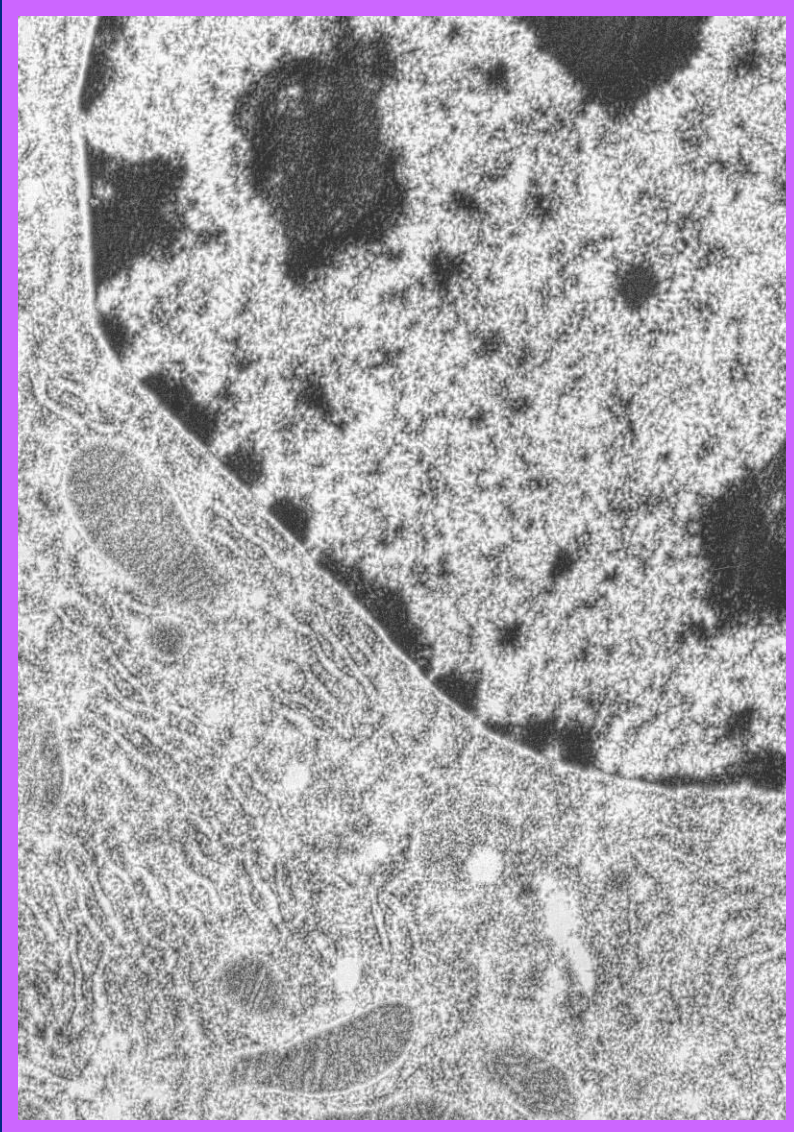
a **jejich směsi** (slučují jejich dobré vlastnosti)

Postfixace

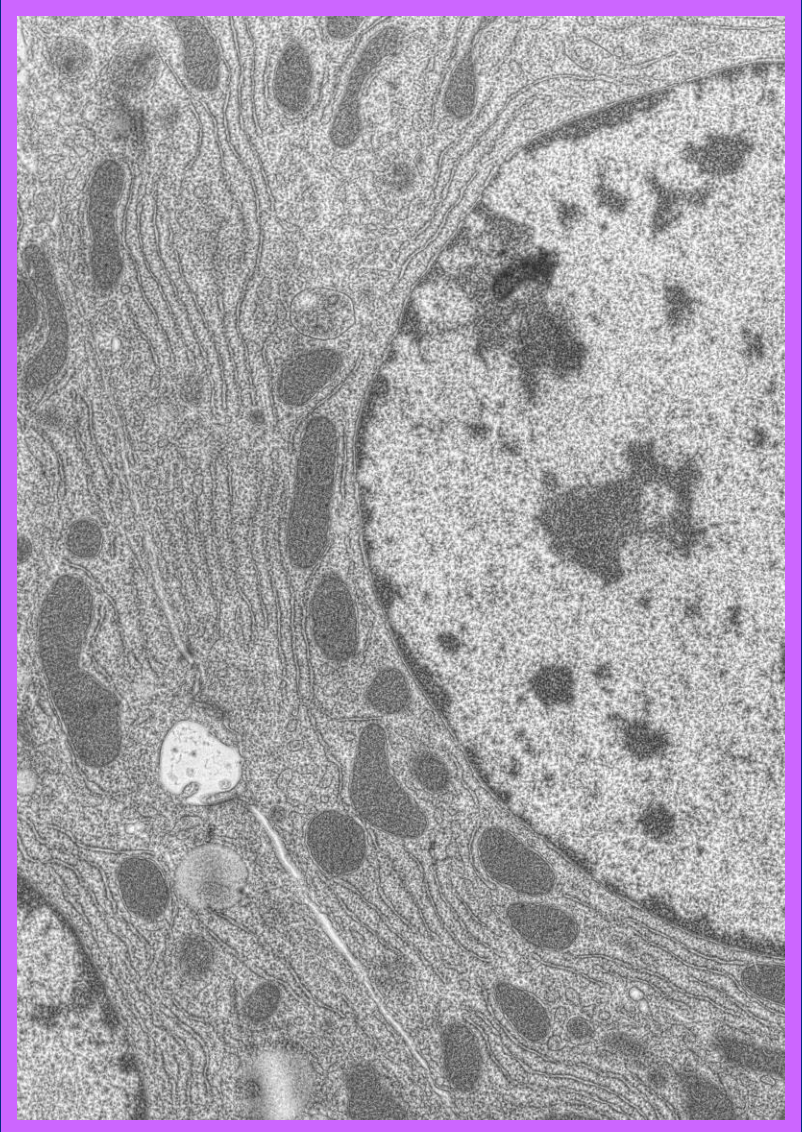
- Zvyšuje celkovou kvalitu uchování odebrané tkáně
- Zvyšuje kontrast cytoplazmatických membrán
- Nejčastěji se používá
0,5 - 2% pufrovaný roztok **oxidu osmičelého**

OsO_4 - zvlášť nebezpečný jed !!!

Vliv postfixace na výsledný obrázek

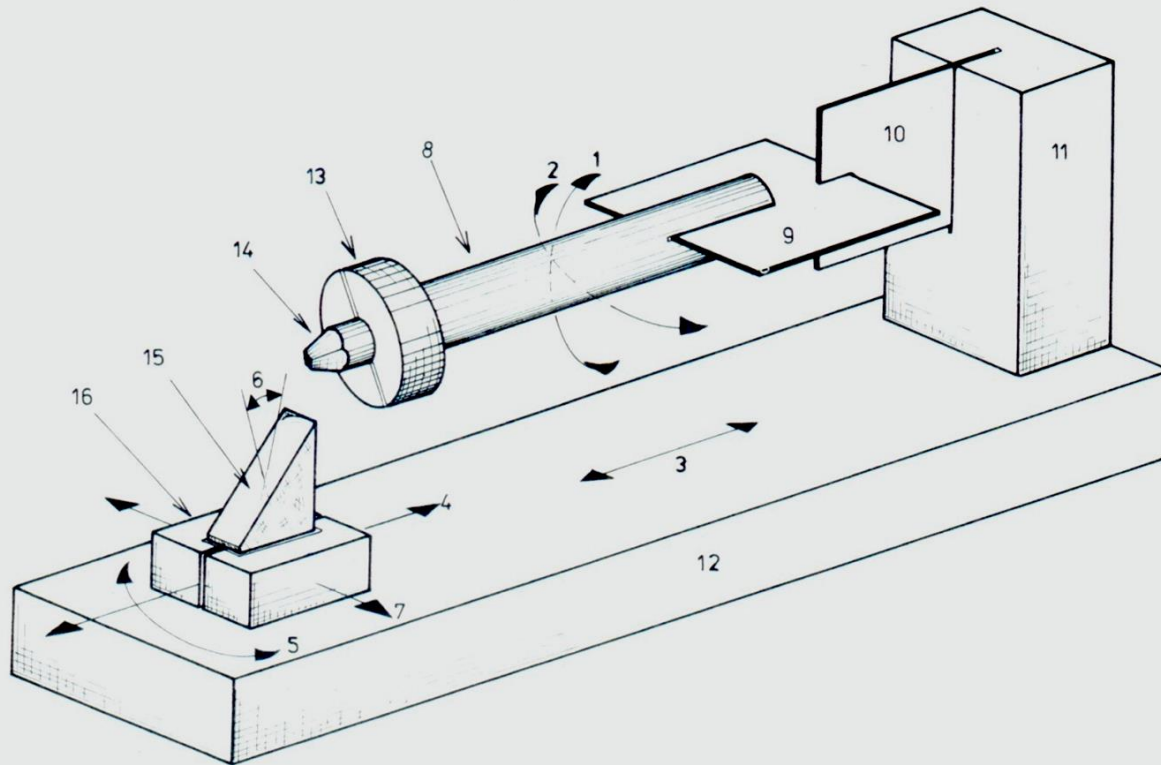


bez OsO_4



viditelné membrány s OsO_4

Schéma ultramikrotomu



Obr. 12. Ultramikrotóm a jeho najdôležitejšie časti

1, 2 – vertikálny a horizontálny smer výkyvu ramena, 3 – podstavec, 4, 5, 6, 7 – posuvy a možné výkyvy noža, 8 – rameno, 9, 10, 11 – nosiče ultramikrotómu s výkyvným zariadením, 12 – telo podstavca, 13 – držiak objektu, 14 – objekt, 15 – nôž, 16 – držiak noža

Skleněné nože ultramikrotomu

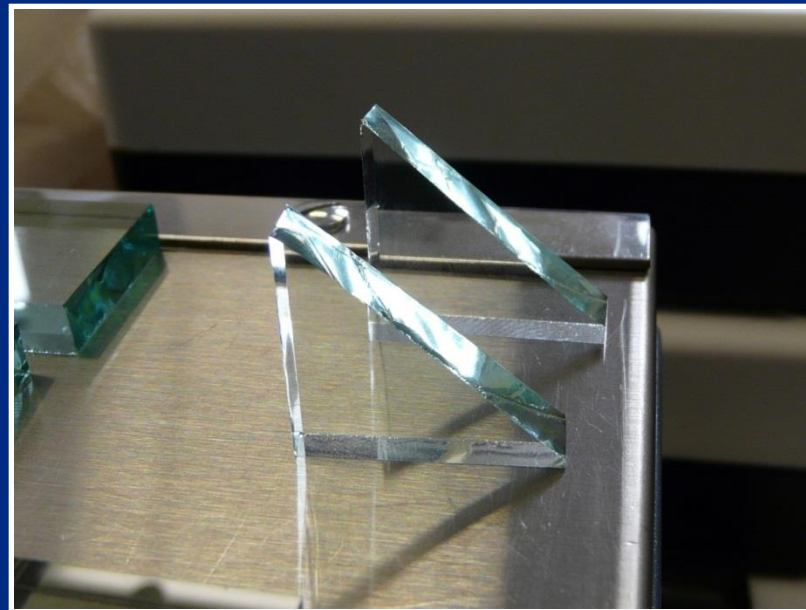
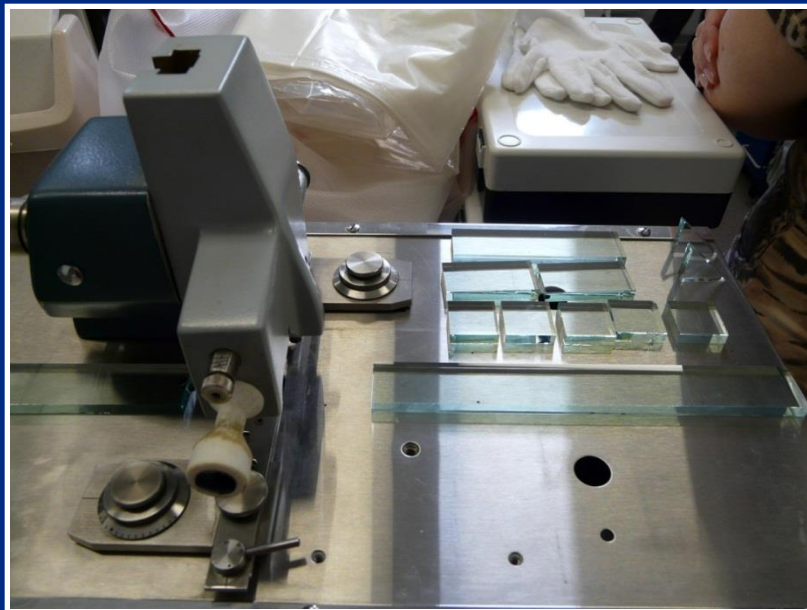


Foto P. Válová

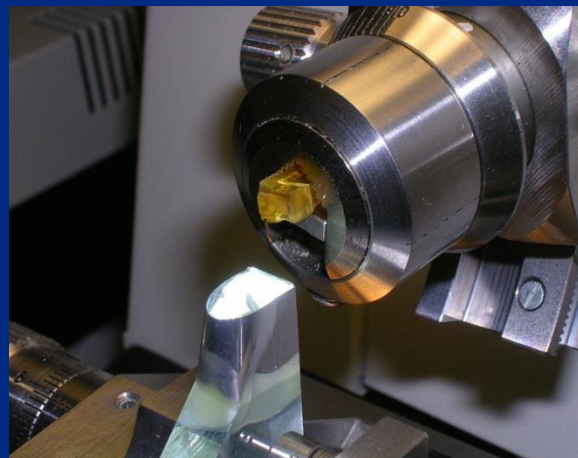
Ultramikrotom



Foto P. Válová



Foto P. Válová



Pomůcky k ultramikrotomu

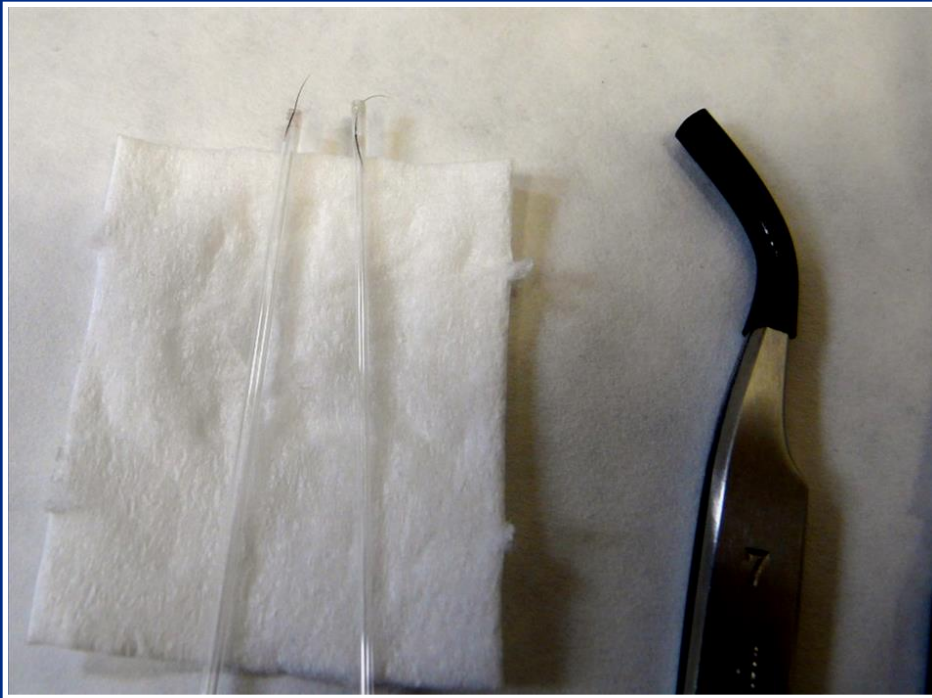


Foto P. Válová

Sít'ky na preparáty pro EM

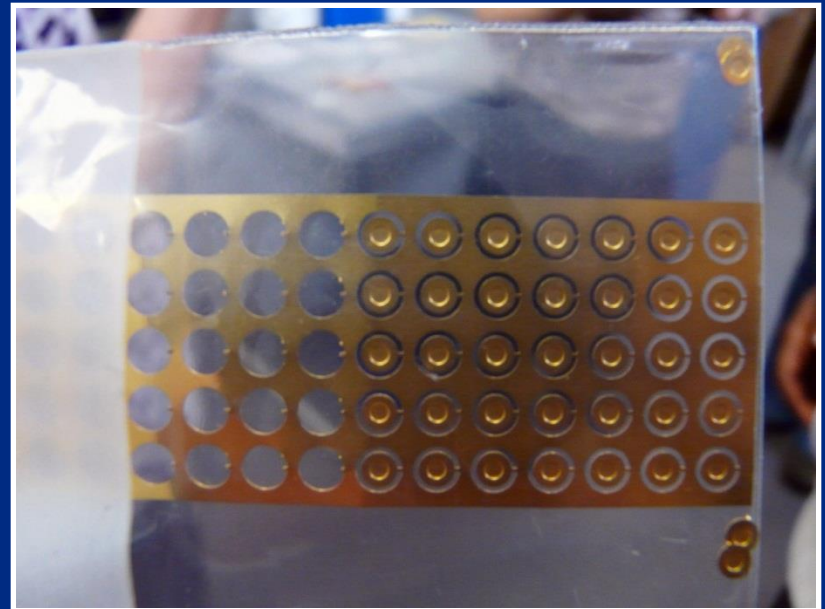


Foto P. Válová

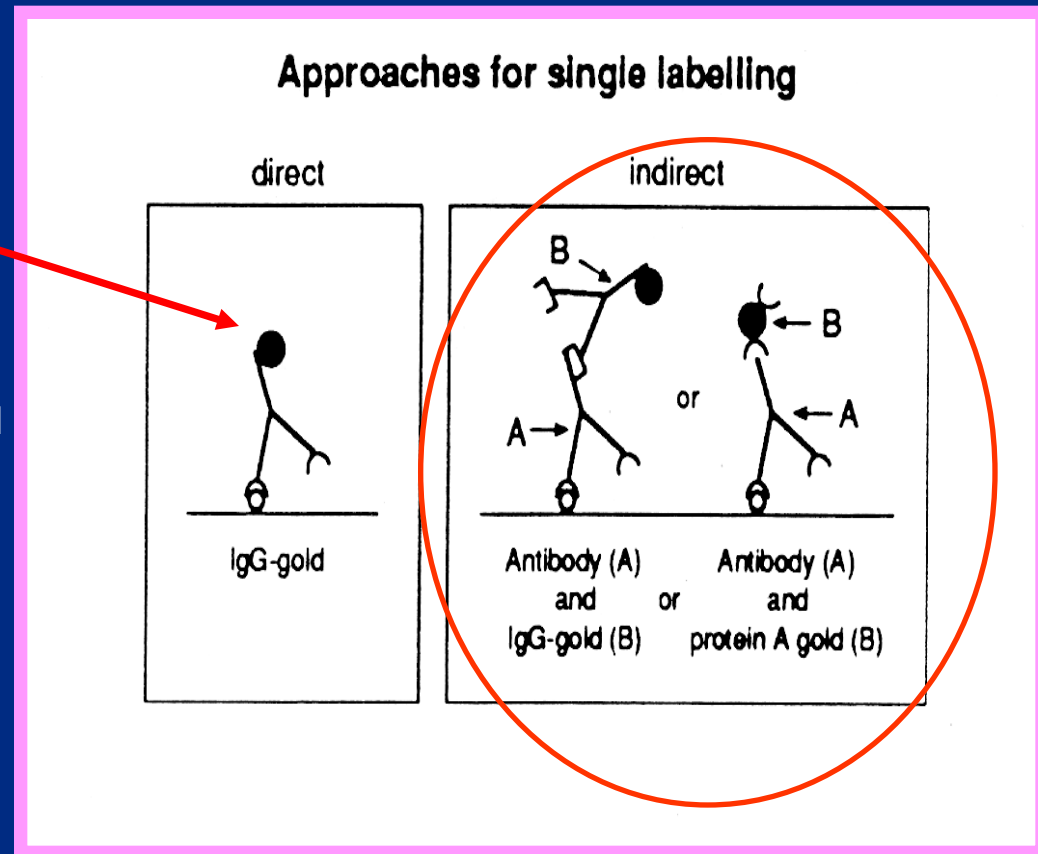
Příprava preparátů pro TEM – imunogold značení

- Značení nejčastěji na ultratenkých řezech
- Fixace vhodným fixativem aby zůstala zachována vazebná schopnost Ag (antigen) – protilátka
- Prosycení a zalití do akrylátové pryskyřice při snižující se teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Polymerace UV světlem při odpovídající teplotě
- Příprava ultratenkých řezů běžným způsobem

Příprava preparátů pro TEM – imunogold značení - schéma

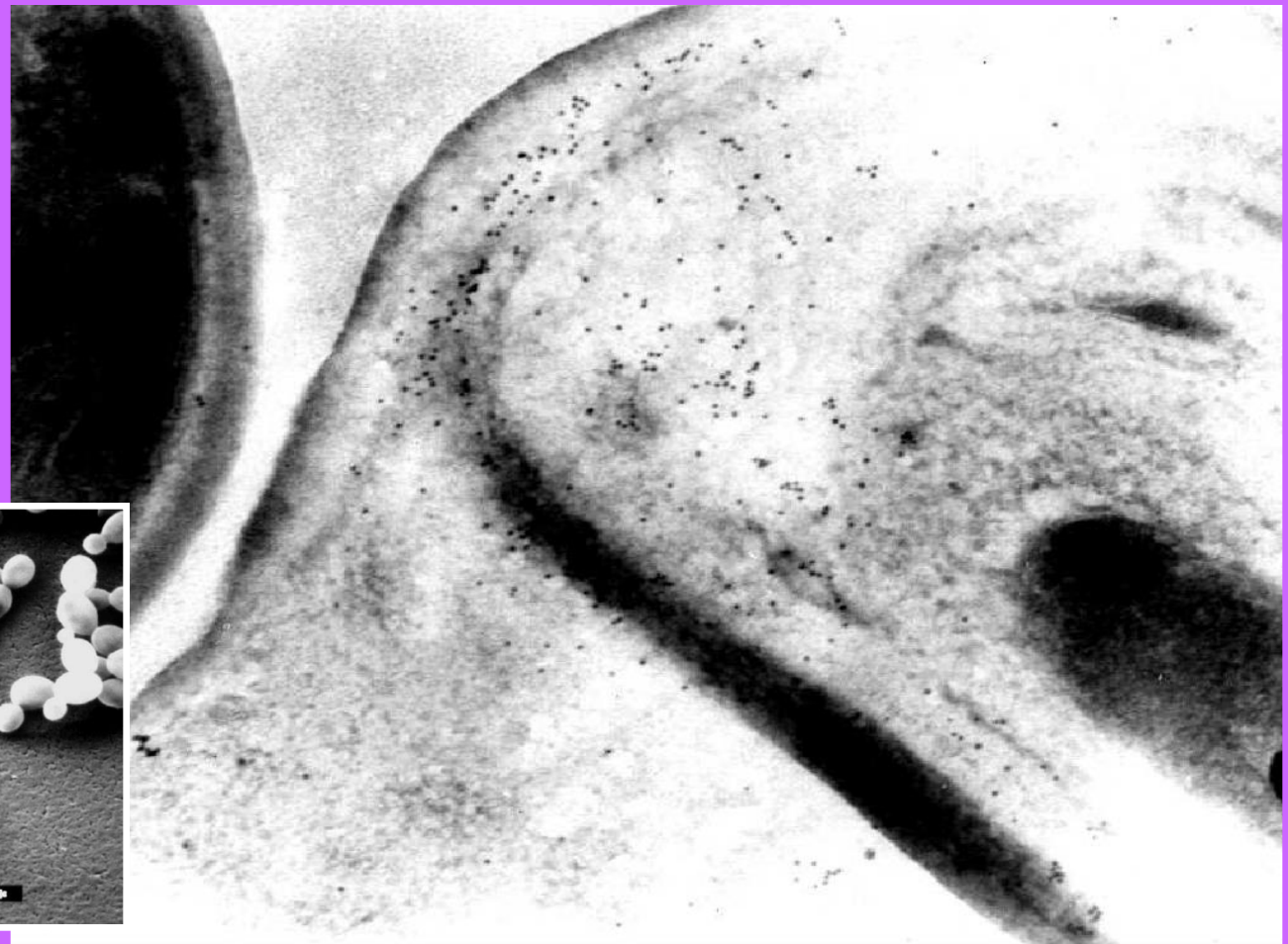
Značení jednoho antigenu na ultratenkých řezech

- **Přímé** – každá protilátka má navázané zlato
- **Nepřímé** – protilátkou bez zlata (A) označíme hledaný antigen, následně ve druhém kroku označíme již navázanou protilátku
 - buď pomocí **komplexu sekundární protilátka - zlato** (B) (dochází k zesílení signálu)
 - nebo **protein A – zlato** (B) (je možná kvantifikace)



Příklad imunogold značení

Candida albicans
v SEM



Ultratenký řez kvasinkou *Candida albicans*

Metoda značení pomocí komplexu lektinu s koloidním zlatem (černé tečky) - ukazuje hustotu ukládání chitinu v buněčné stěně kvasinky. Zvětšení 4 400x.

Skenovací elektronová mikroskopie

S E M

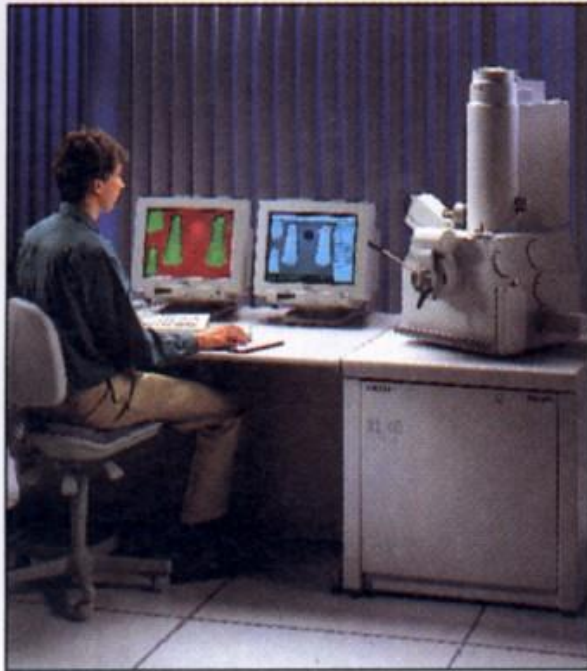
Pozorování povrchu preparátu

(odvodněných a většinou pokovených – Au, uhlík)

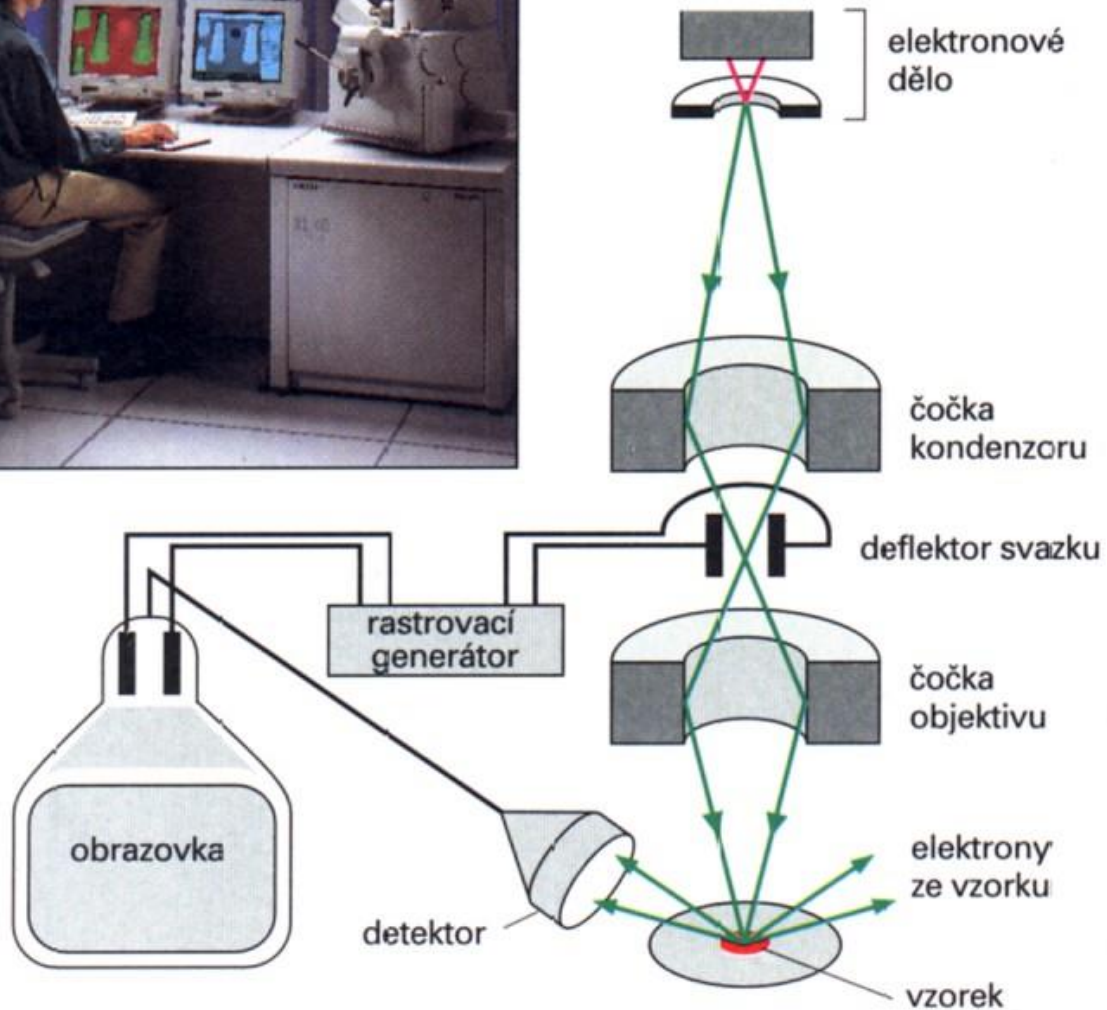
- Ke zobrazení používá **rastrovací paprsek elektronů** (cca 1 nm silný), který postupně bod po bodu dopadá na povrch preparátu
- Vznikající signál ze **sekundárních elektronů** slouží ke složení výsledného obrázku
- Max. zvětšení asi **200 000x (400 000x)**
(užitečné zvětšení 15 – 50 000x, nejčastěji 10 000 – 20 000x)
- RS: maxim. **1 nm**, v praxi 2 - 5 nm

Složení S E M

- **Wolframová katoda** – zdroj elektronů
- **Kondenzor** – usměrňuje paprsek elektronů do šířky 1 - 2 nm
- **Mechanická clona** – vybírá pouze část elektronů, které dopadnou na preparát
- **Projekční čočka** – zaostřuje svazek elektronů na preparát



RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE





S E M, JSM-6700F, Jeol

<http://www.isibrno.cz/lem/jeol.html>



Nový autoemisní rastrovací mikroskop Hitachi SU6600

- proměnlivě nastavitelný tlak v komoře
- nové elektronové dělo
- unikátní regulace vakua

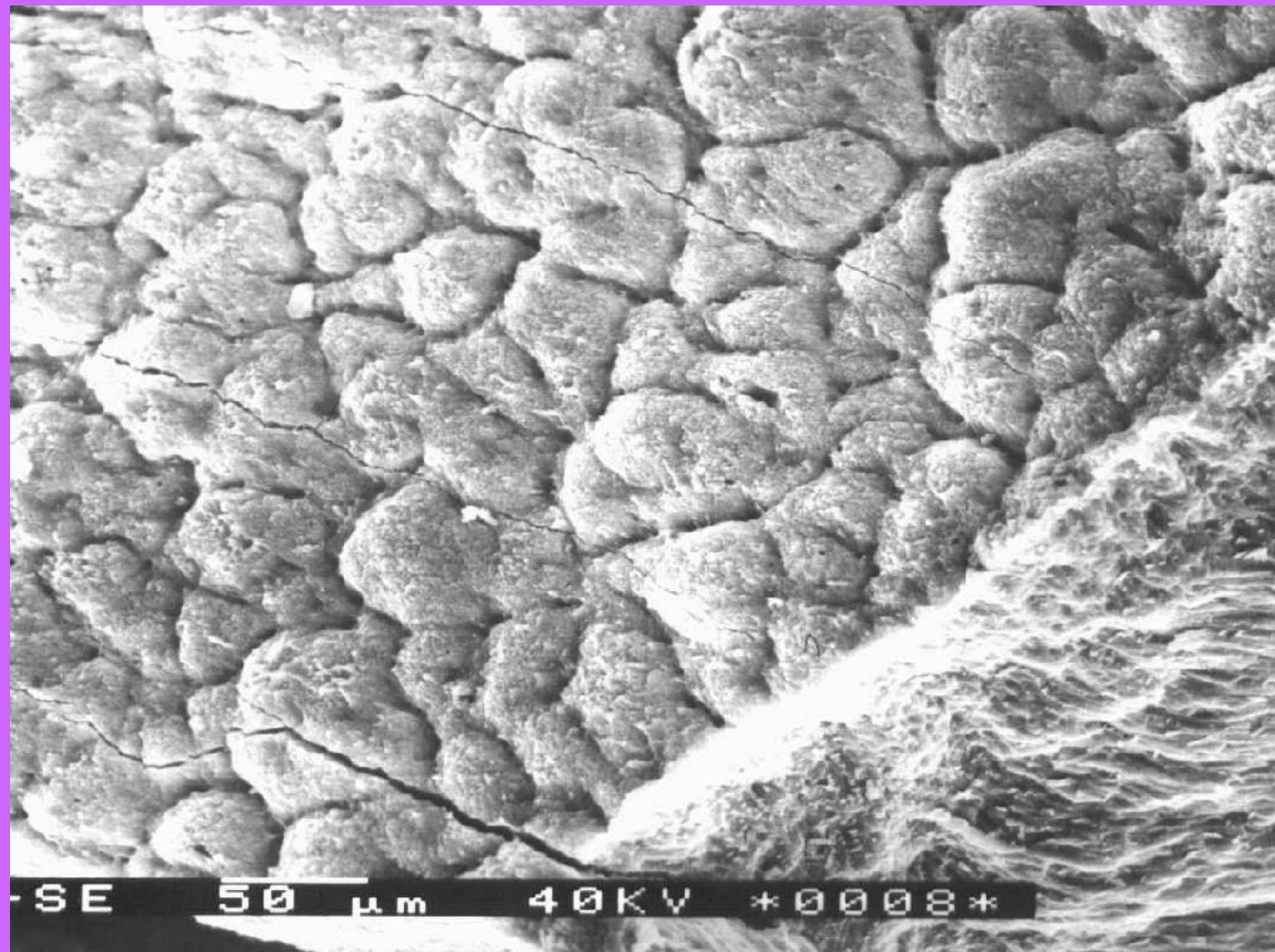
Rychlá a přesná analýza chemického složení

Candida albicans v SEM

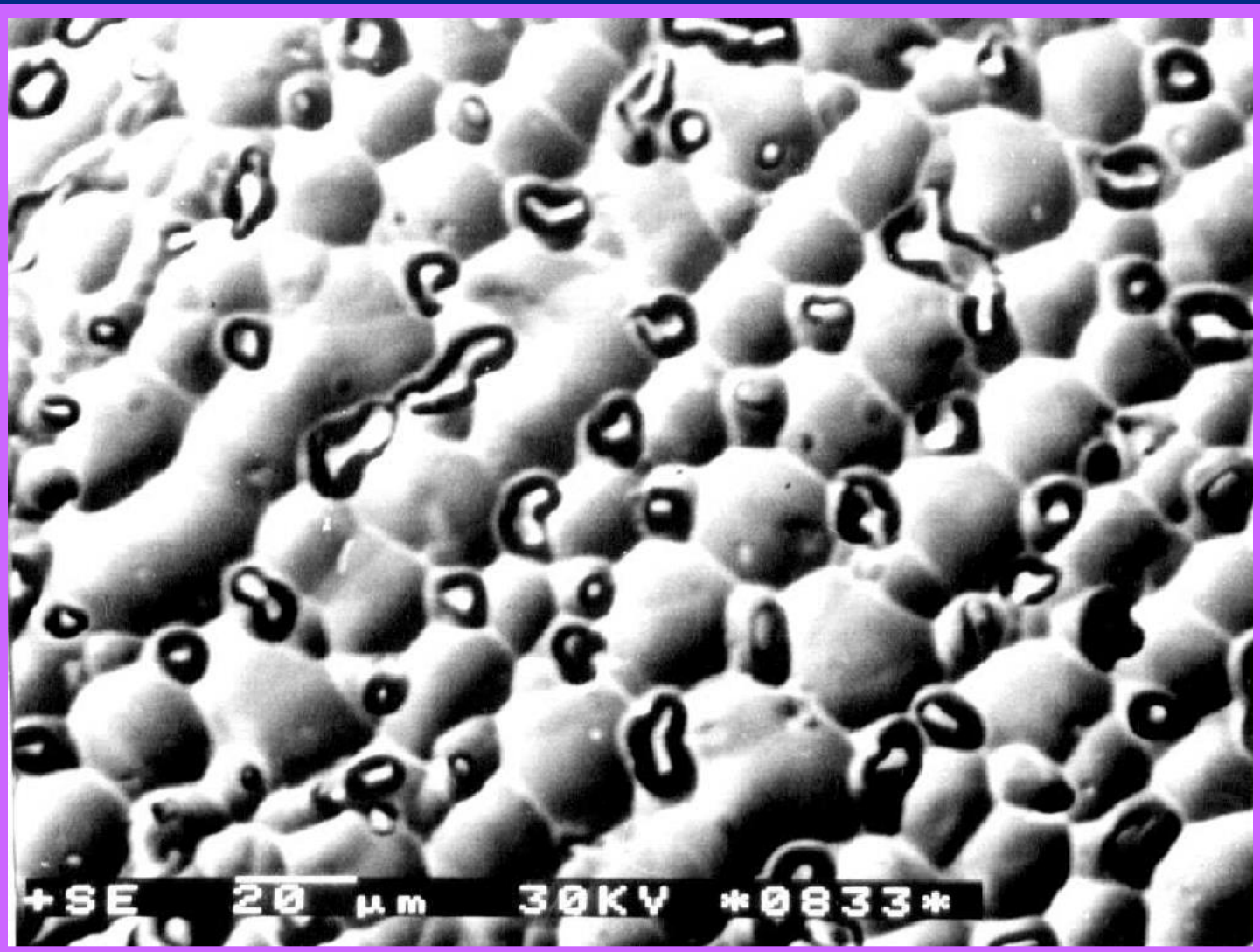


Candida albicans, kvasinka, často používaná jako modelový organismus v biologii (foto Radko Novotný)

Příklad preparátu s malým obsahem vody



Lomový preparát zubem - dentino-sklovinná hranice
(foto Radko Novotný)



Povrch leptané plochy jednoho ze **zubních výplňových materiálů**. Je vyhodnocována zrnitost materiálu.

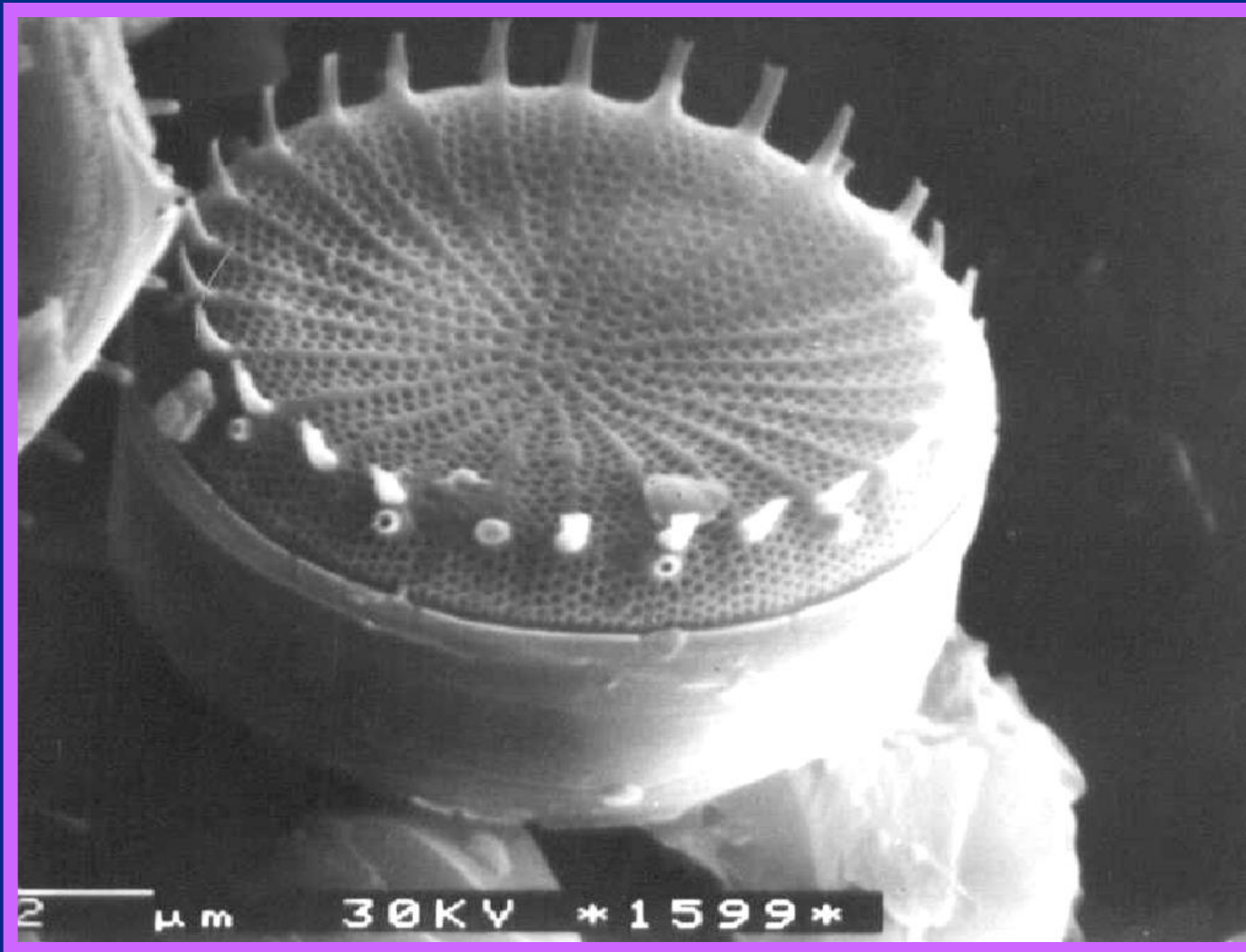
(foto Radko Novotný)



Pavouk pokrytý zlatem v SEM mikroskopu.

(obr. <http> – wikipedia)

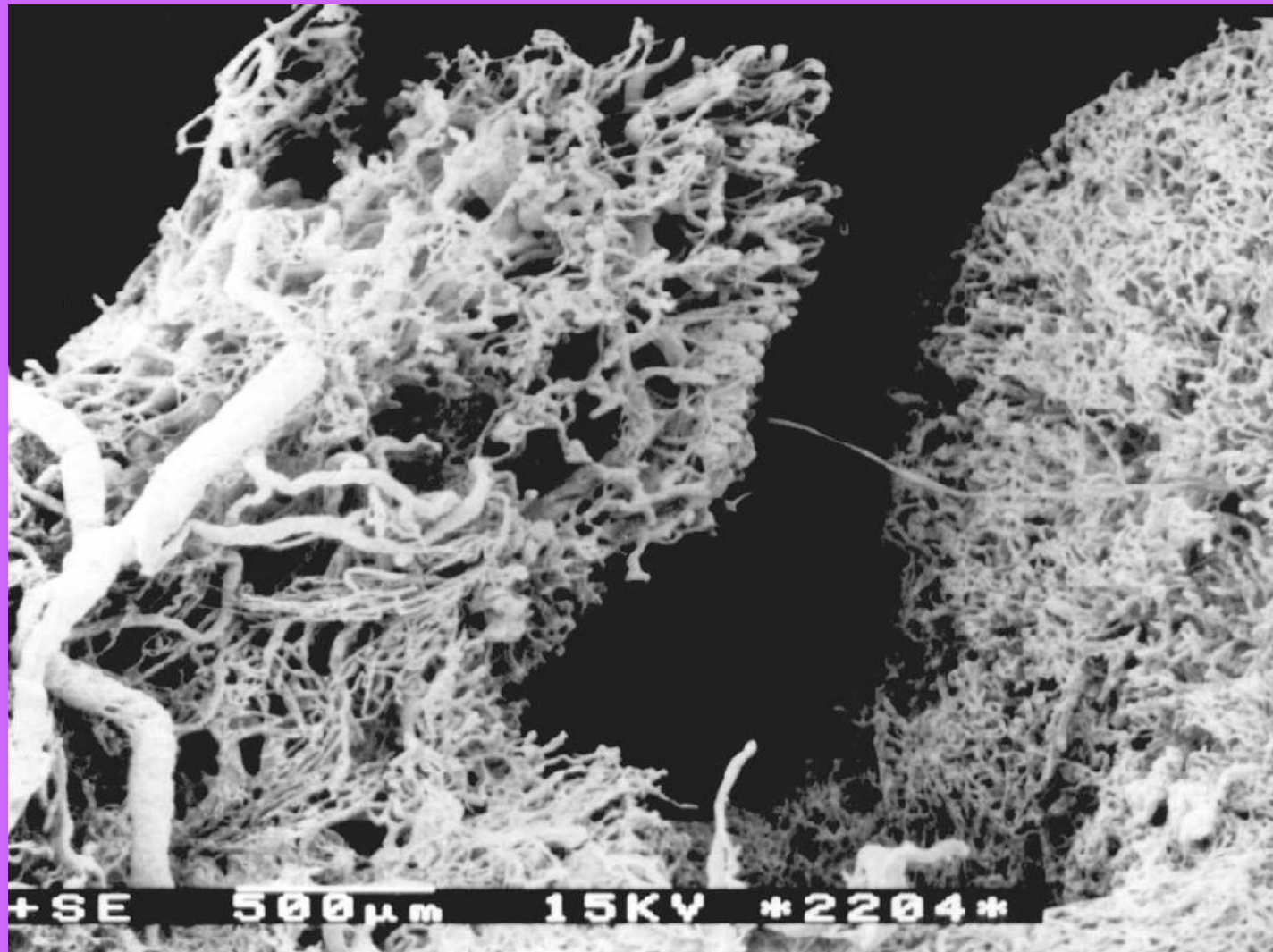
Příklad vzorku s pevnou křemičitou schránkou



Schránka **rozsivky** *Stephanodiscus hantzschii*

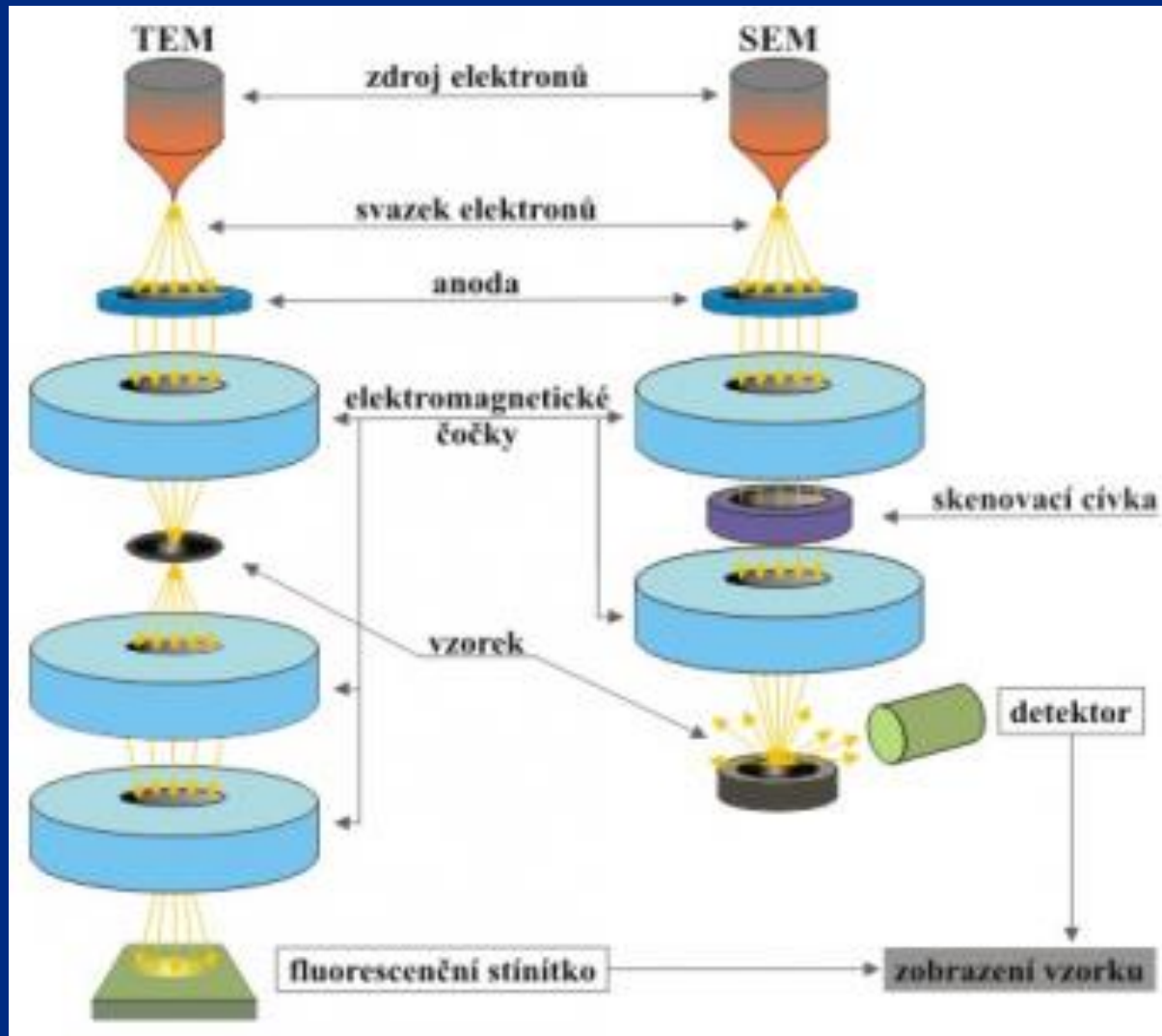
(foto Radko Novotný)

Příklad složitěji připravované tkáně



Korozivní preparát tonsilla palatina ukazuje výlitek krevního řečiště.
Celkový pohled. (foto Radko Novotný)

Srovnání TEM a SEM



Enviromentální mikroskop

Skenovací EM (ESEM) s volitelným vakuem

- prohlížení vzorků bez pokovení připouštěním inertního plynu nebo vody
(přirozené prostředí v preparátové komoře)

→ zmenšení množství artefaktů vznikajících vysušováním



Výhody elektronové mikroskopie

- Pozorování velmi malých částic (zvětšení až 1 000 000x)
- Velké rozlišení a velká hloubka ostrosti
- Informace o morfologii, topografii i materiálovém složení vzorku

Nevýhody elektronové mikroskopie

- Drahý a prostorově náročný přístroj
- Pozorování jen ultratenkých řezů (náročné na přípravu preparátů)
- Umístění preparátu ve vakuu znemožňující pozorování živých organismů

Využití EM

- Věda (biologie, chemie – např. ke kvantitativní prvkové analýze, geologie ...)
- Lékařství (studium bakterií a virů ...)
- Soudní lékařství (forensní EM)
- Metalurgie (studium vlastností materiálů)
- V mikroelektronice (studium čipů, mikroprocesory)

Literatura

- <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/3.0.html>
- <http://biologie.upol.cz/mikroskopie>
- <http://www.fzu.cz/texty/brana/prozmikroskop/prozmikroskop.php>
- <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/elektronova.htm>
- **Vše, co chcete vědět o elektronové mikroskopii...**
...ale neodvážili jste se zeptat. Příručka FEI Company, 2002.
(v anglické verzi -
http://www.fei.com/uploadedfiles/documents/content/2006_06_allyouwanted_pb.pdf)
- **Bielniková, H.: Elektronová mikroskopie ve virologii - DP**
<http://www.paru.cas.cz/lem/cs/elektonova%20mikroskopie%20ve%20virologii.pdf>