

Inovace předmětu KBB/MIK

SVĚTELNÁ A ELEKTRONOVÁ

MIKROSKOPIE

Rozvoj a internacionalizace chemických
a biologických studijních programů na
Univerzitě Palackého v Olomouci



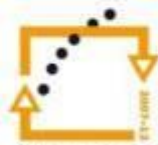
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

CZ.1.07/2.2.00/28.0066

Přednáška 6

Princip a metody elektronové mikroskopie

RNDr. Radko Novotný, CSc.

RNDr. Pavla Válová

2014

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)
Rastrovací neboli skenovací (REM, SEM)
Skenovací-transmisní (STEM)
- **Mikroskopie atomárních sil**

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 fokuzace elektronů cylindrickou magnetickou čočkou

Objev elektronového mikroskopu

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



Ernst Ruska
(1906 – 1988)

TEM – Transmission Electron Microscope

1937 – Ernst Ruska - první obrázek viru

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

TEM
z roku 1938



Historie objevu elektronového mikroskopu

V Československé republice

1949 první český EM v Tesle Brno

prof. Arming Delong se spolupracovníky

Historie SEM

1935 – Max Knoll – první publikace o SEM

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

1942 – první skutečný **rastrovací EM**

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

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

1969 - první komerční SEM Philips EM200

SEM – Scanning Electron Microscope

- postupné bombardování vzorku elektrony

- současné SEM - Z: až 400 000x (užitečné 10 000x); RS: 1 nm

Druhy informací z EM

- **Morfologie vzorku:**
tvar a velikost částic 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)

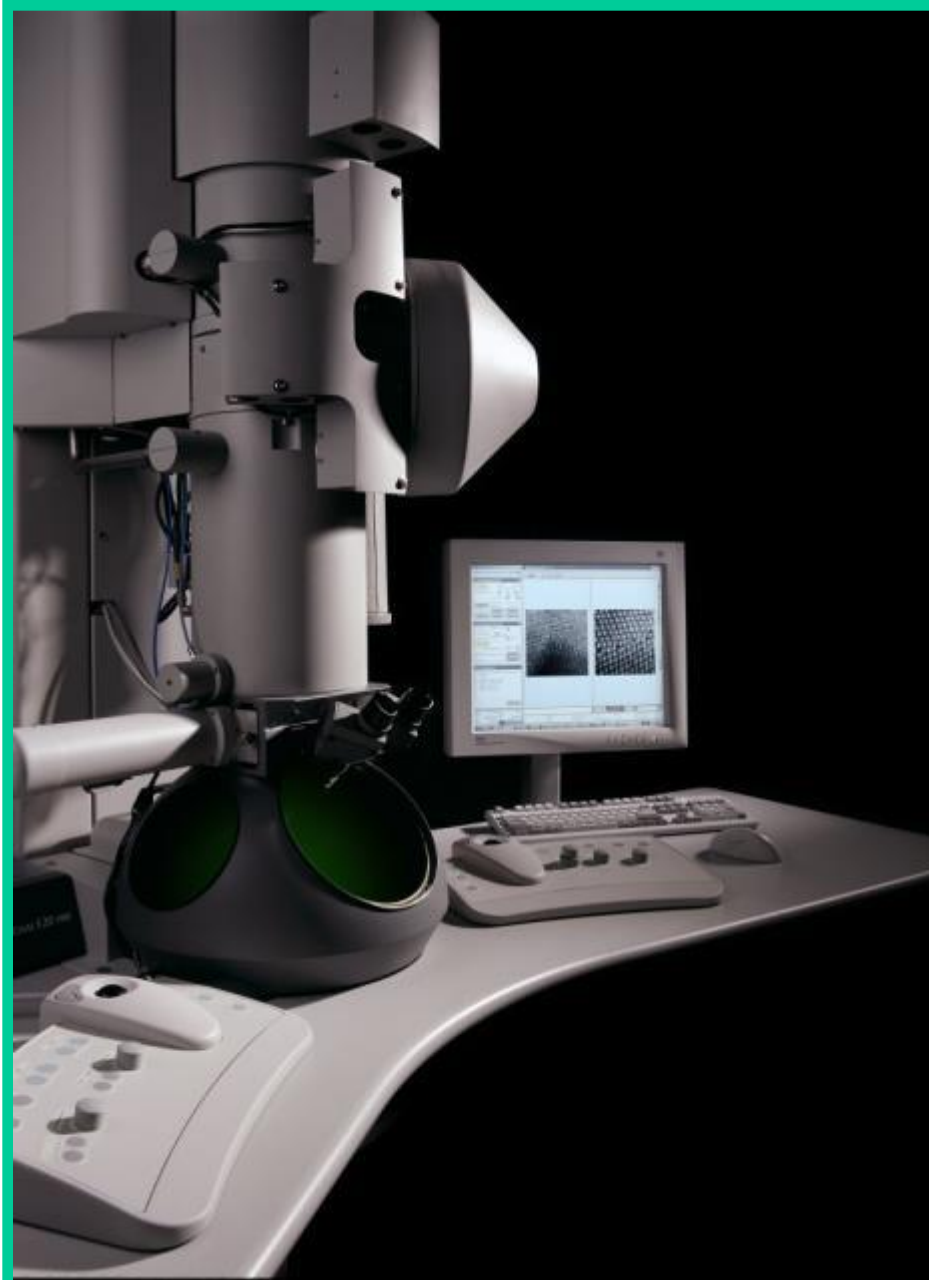
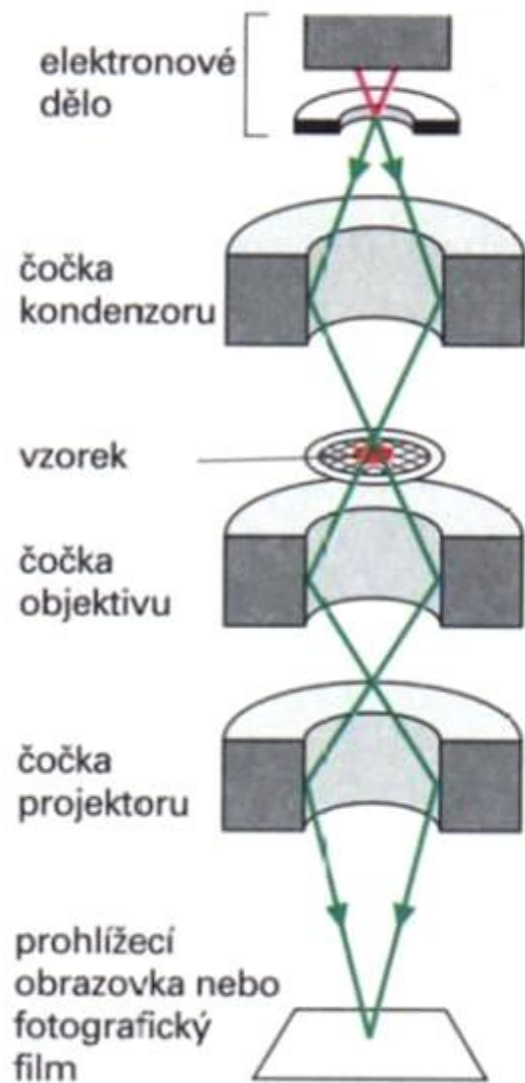
Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

- 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 mikr.
(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: kontrastované ultratenké řezy (tloušťka 20 – 100 nm)
negativně barvené preparáty
repliky apod.

Základní části TEM

- Tubus
- Vakuový systém
- Elektronika
- Software

TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE





Klára Šafářová+EM FEI Company

Centrum pro výzkum nanomateriálů, Olomouc

Konstrukce transmisního elektronového mikroskopu



<http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>

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

Základní části TEM

- **Elektronová tryska (elektronové dělo):**

- **Katoda - zdroj elektronů:**

- žhavené vlákno tvaru V (wolfram, t. 2 700 °C)
- krystal hexaboridu lanthanu - LaB_6 , t. 2 100 °C
- studená emise - FEG (studené wolframové vlákno)

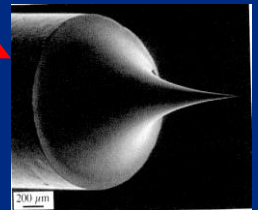
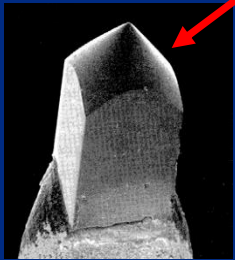
- **Wehneltův válec (fokuzáční elektroda)**

- **anoda**

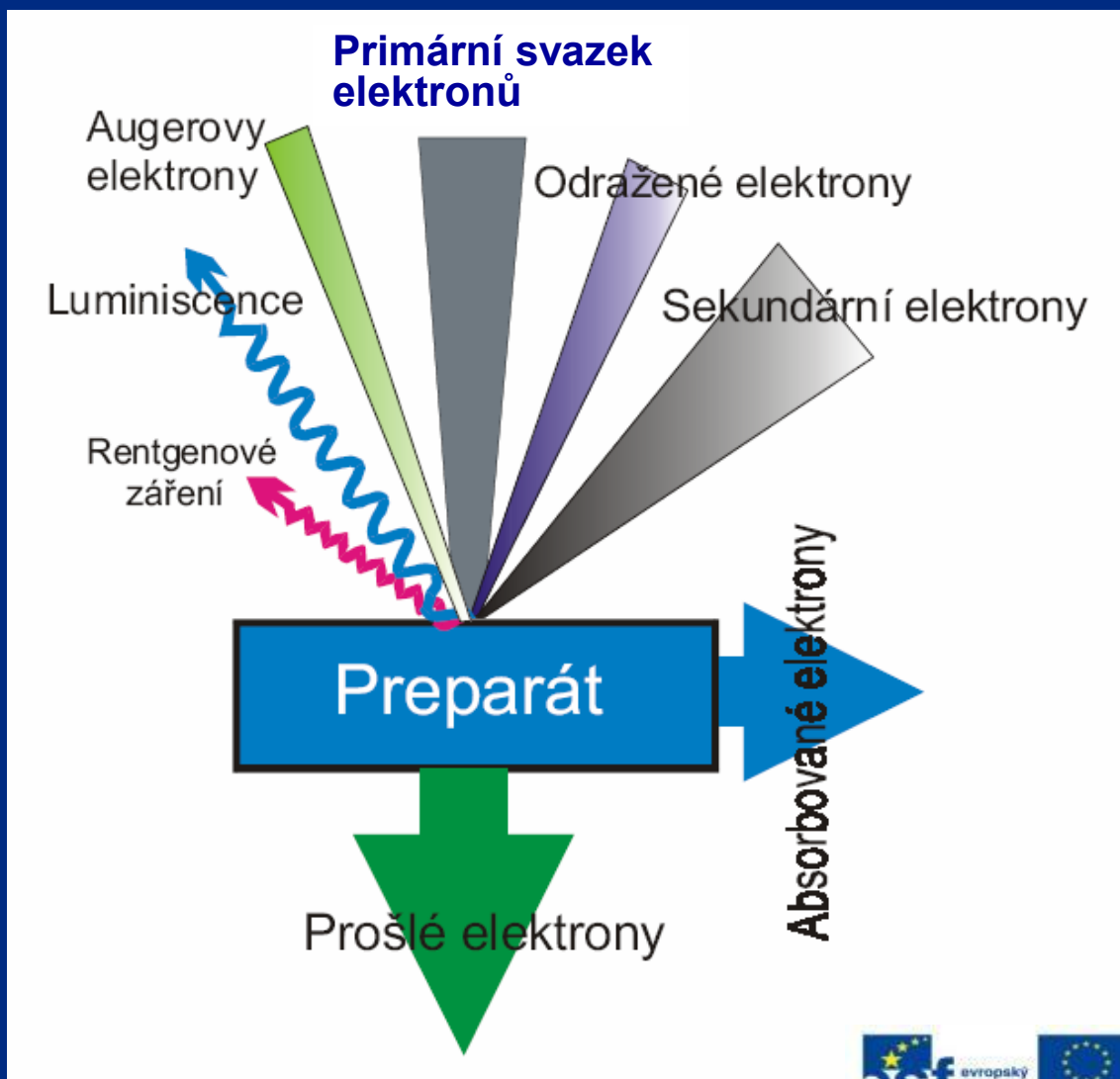
(potencionální rozdíl mezi katodou a anodou
60 – 200 kV; u biol. 80 kV; vysokovoltová EM –
200 - 1 000 kV – silné objekty)

Hustota elektronů dopadající na preparát:

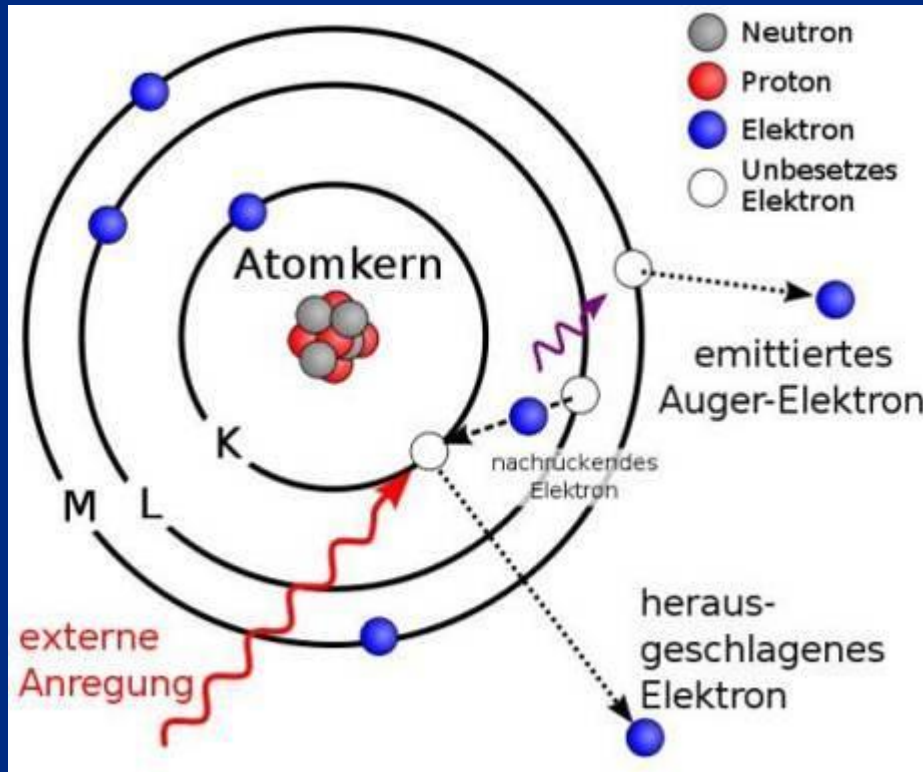
cca 6 mil. elektronů/s



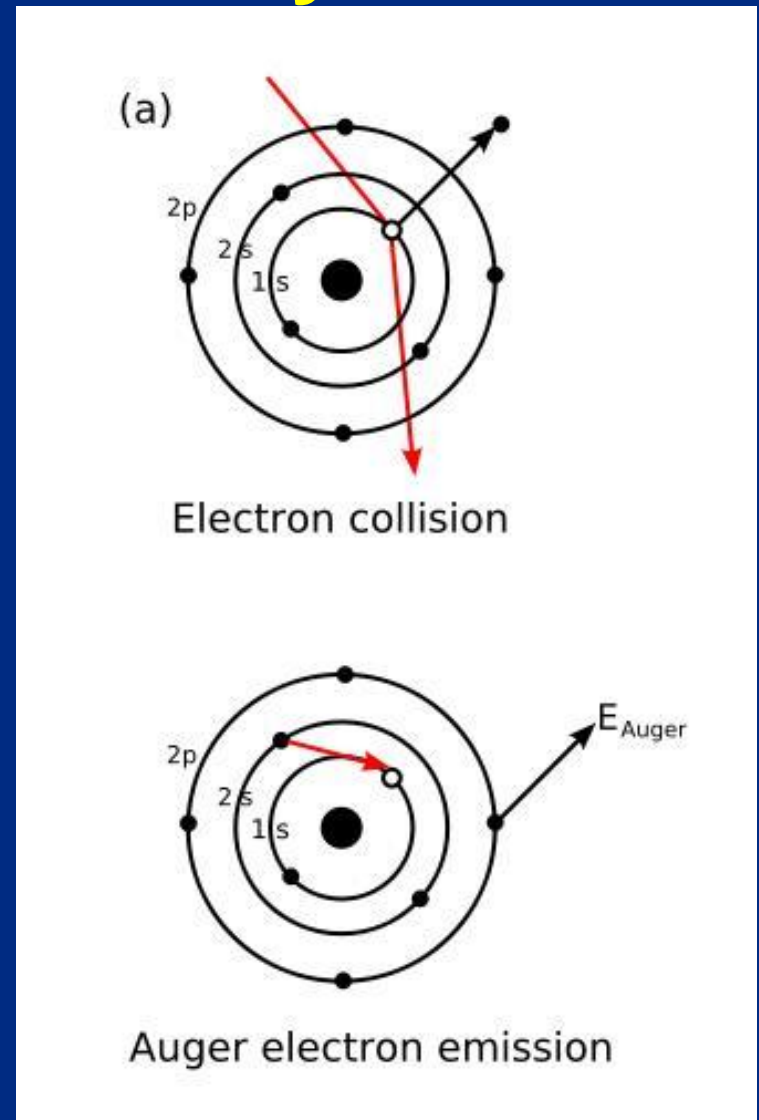
Interakce elektronů s preparátem



Augerovy elektrony

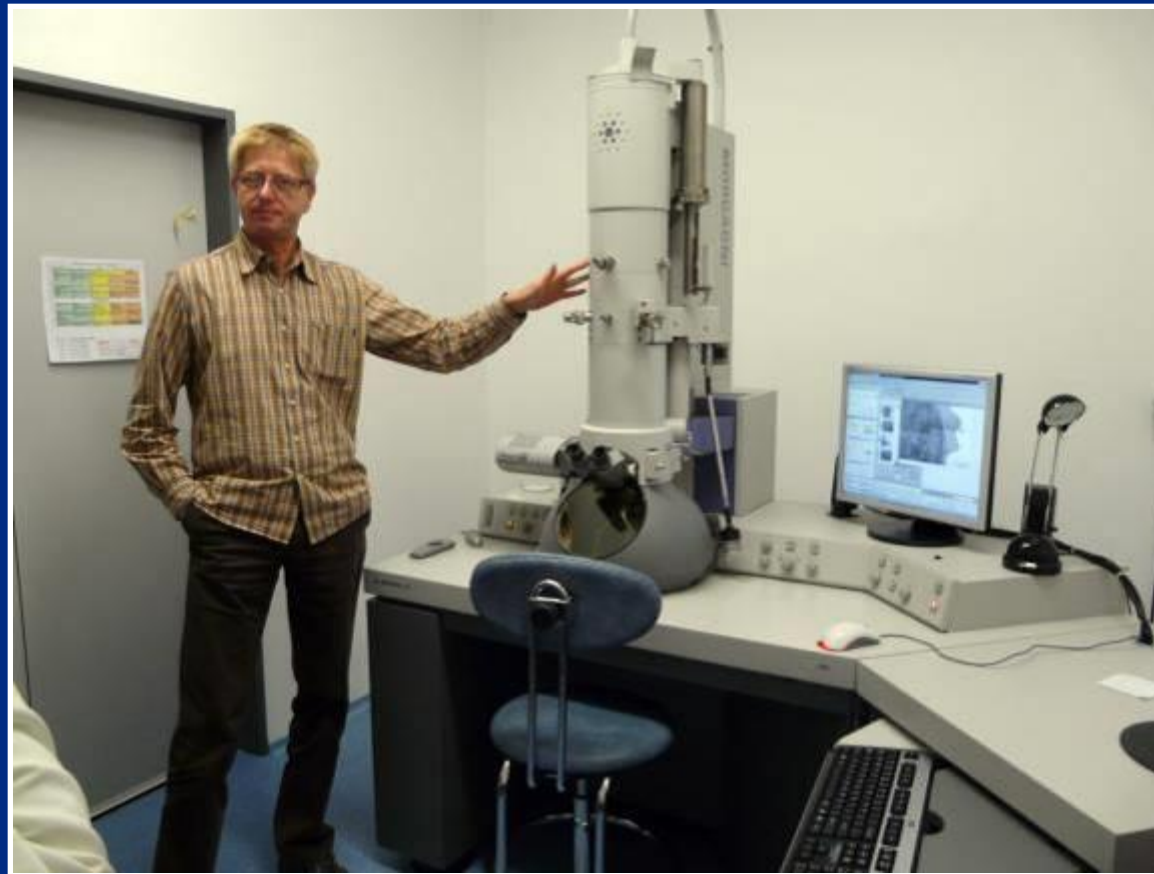


Využití ???



EM ÚMG AV ČR Praha-Krč

doc. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

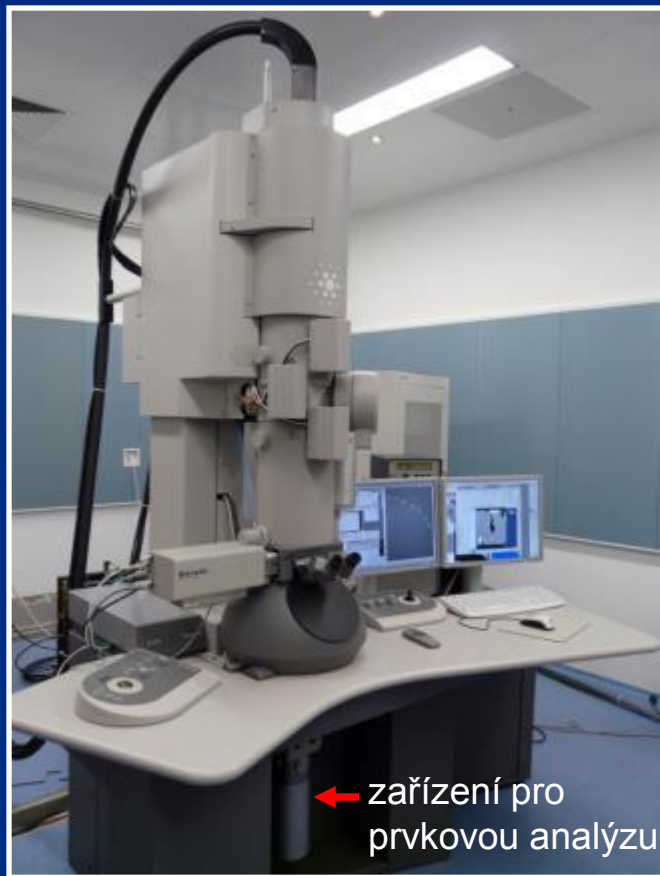


80 kV

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

TEM – FEI - Morgan

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

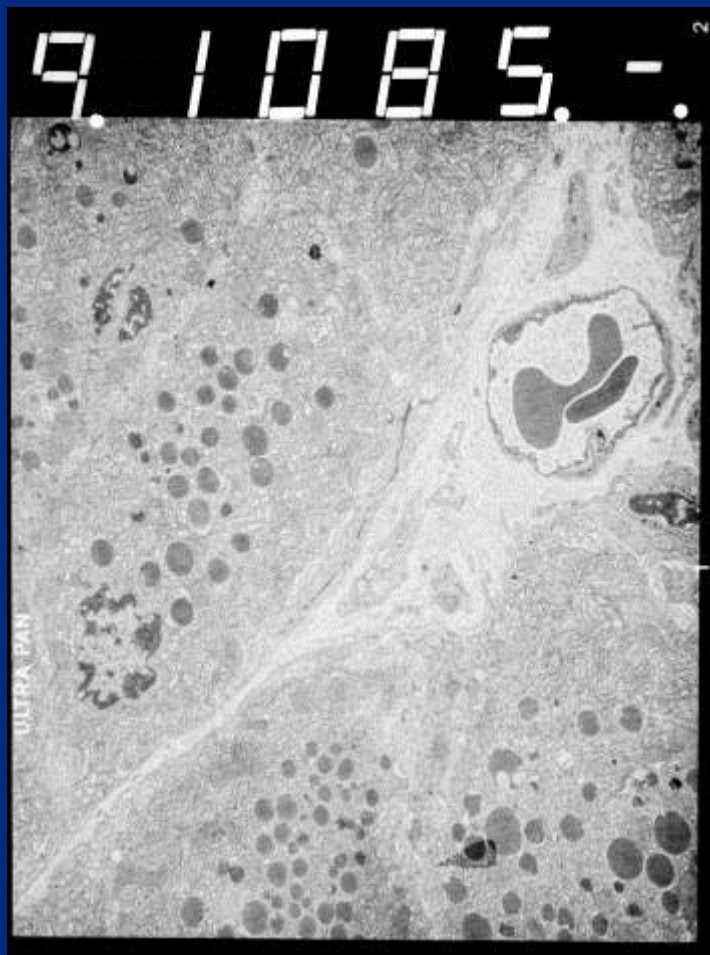
většinou 65 x 90 mm/ 50 snímků v 1 kazetě

- 35 mm film bez perforace

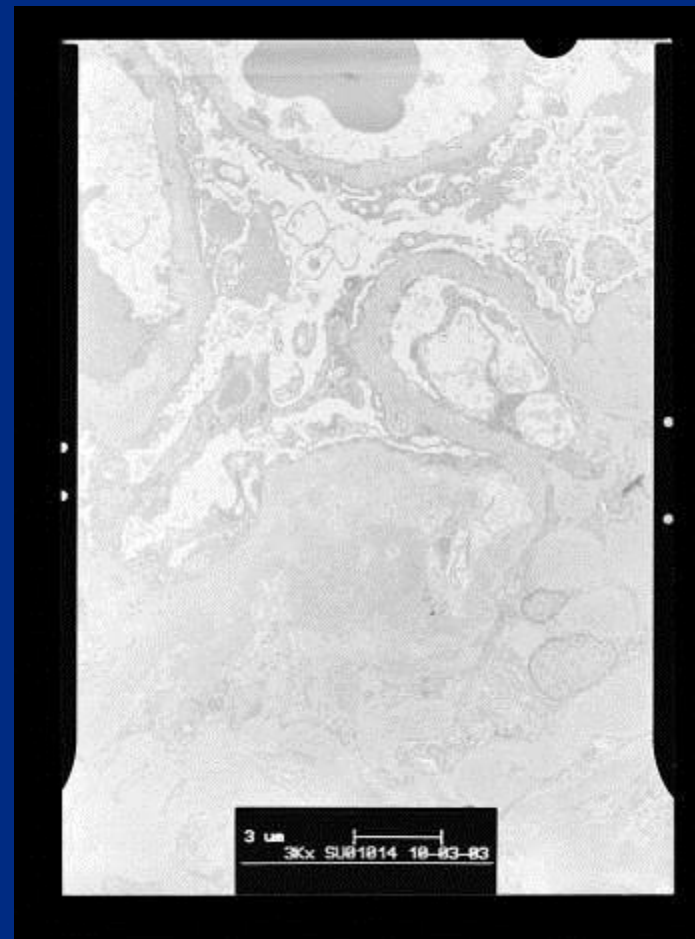
Nyní:

- **Digitální kamera (CCD)**

Záznam negativ - pozitiv

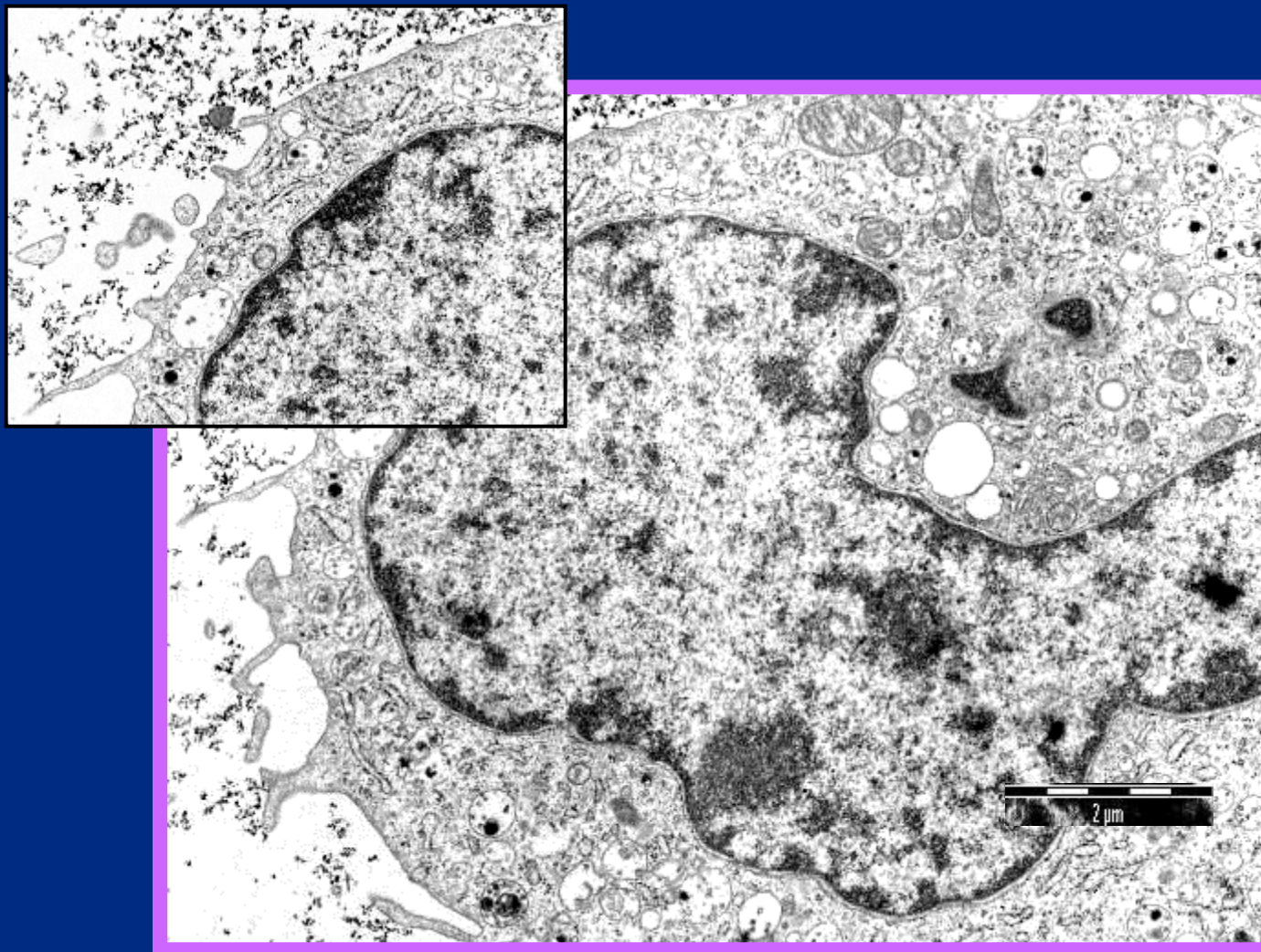


**Svitkový film BII
(formát 60x85 mm)**



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.

Metody viz i <http://web.natur.cuni.cz/~lem/index.php?p=metody>

Příprava preparátů pro TEM metodou ultratenkých řezů

- **Fixace**
- **Postfixace**
- **Odvodnění** (postupné a šetrné zbavení tkáně vody)
- **Prosycení a zalití do pryskyřice** (opora při řezání)
- **Polymerace**
- **Řezání pro svět. mikroskop – kontrola a výběr oblasti** (tloušťka řezu 0,5 – 1 μm)
- **Krájení na ultratenké řezy a zachycení na EM síťku** (většinou z Cu, Ni)
- **Kontrastování** (barvení; zvýšení kontrastu)
- **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**

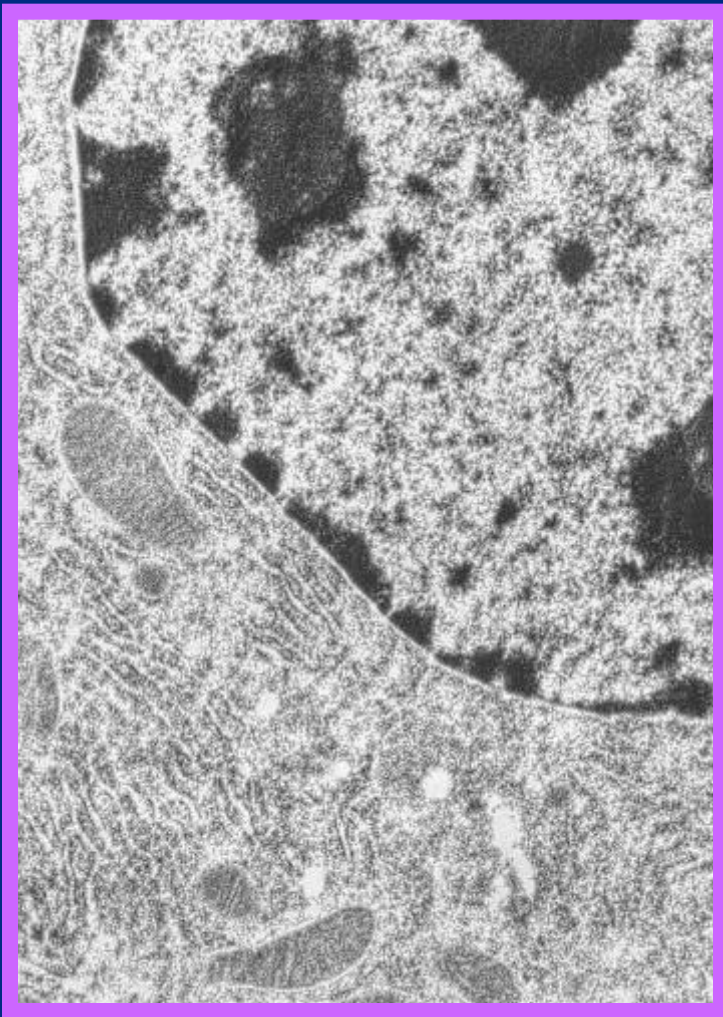
a **jejich směsi** (slučují jejich dobré vlastnosti)

Postfixace

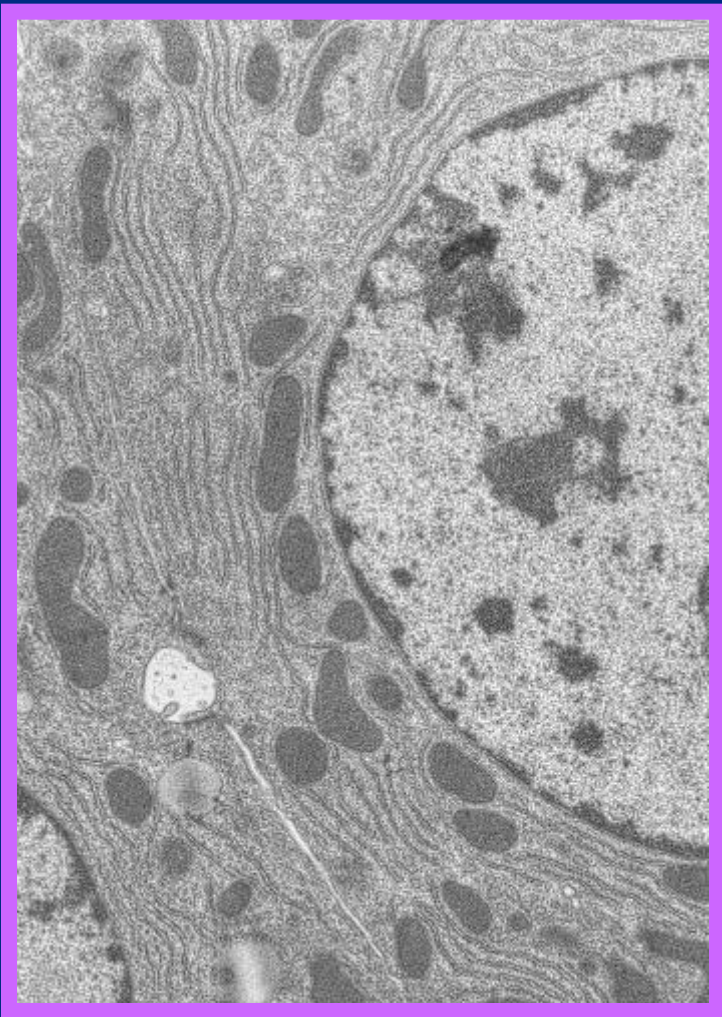
- Zvyšuje celkovou kvalitu uchování odebrané tkáně
- Zvyšuje kontrast cytoplazmatických membrán
- Nejčastěji se používá
0,5 - 2% pufrovaný roztok **oxidu osmičelého**

OsO_4 - zvlášť nebezpečný jed !!!

Vliv postfixace na výsledný obrázek



bez OsO_4



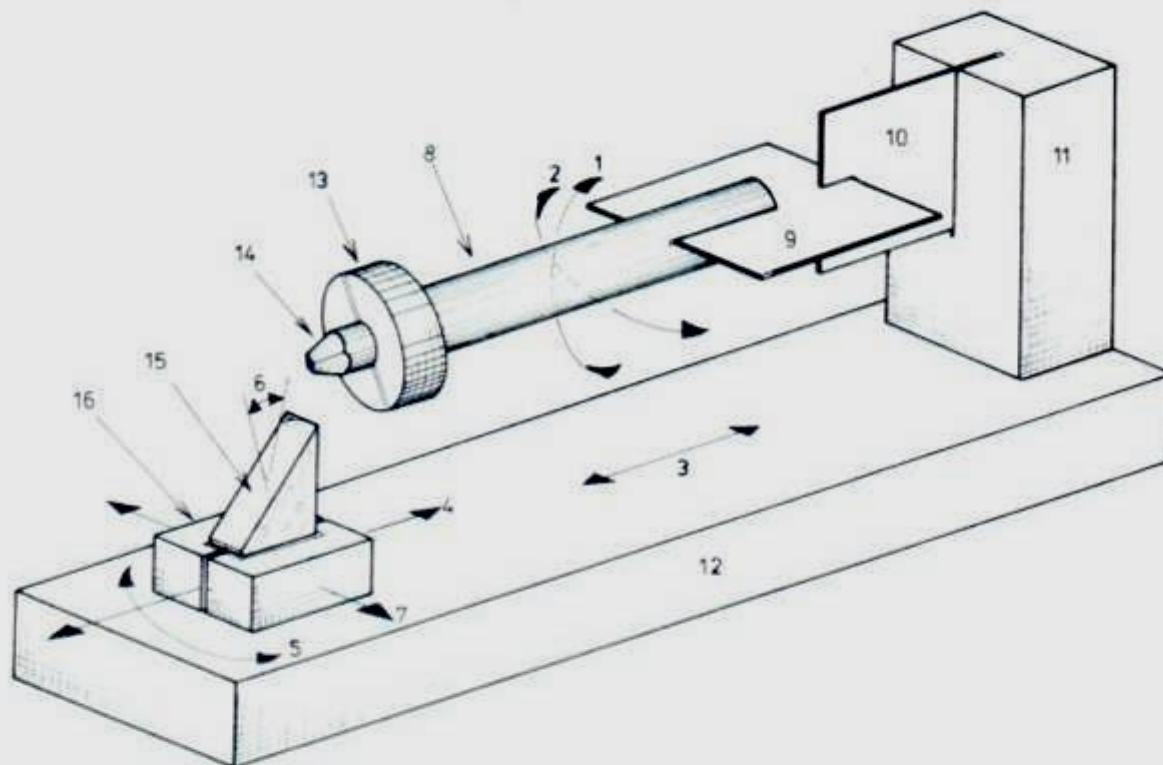
viditelné membrány s OsO_4

Ing. Jana Nebesářová (vpravo) a Ing. Václava Nováková



Foto P. Válová

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 ultramikrotomu s výkyvným zariadením, 12 – telo podstavca, 13 – držiak objektu, 14 – objekt, 15 – nôž, 16 – držiak noža.

Skleněné nože ultramikrotomu

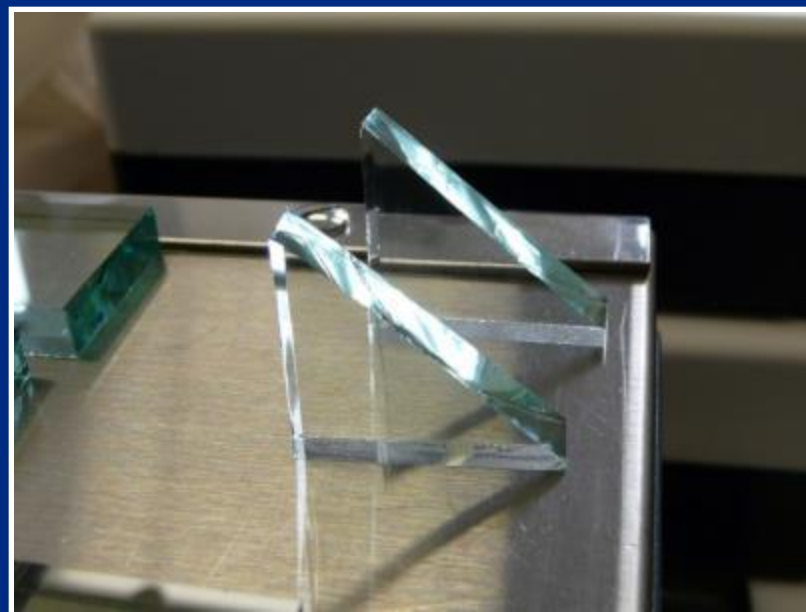
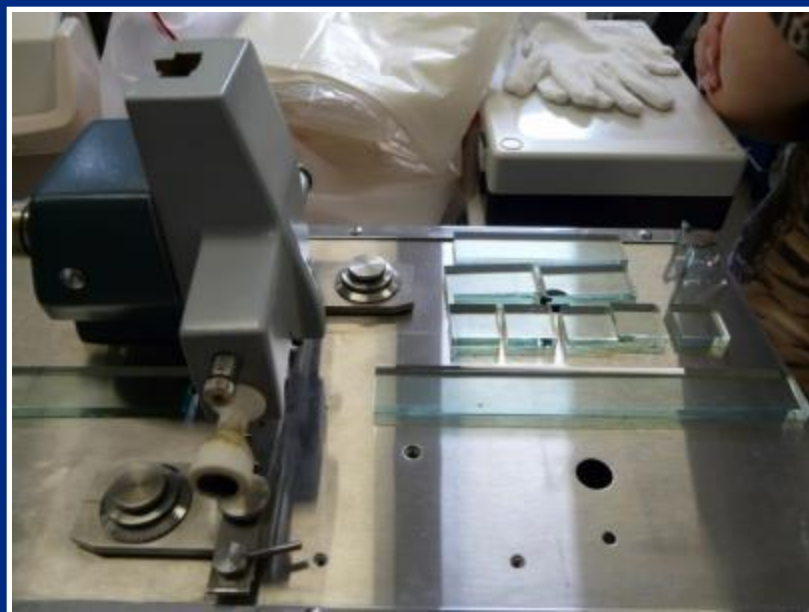


Foto P. Válová

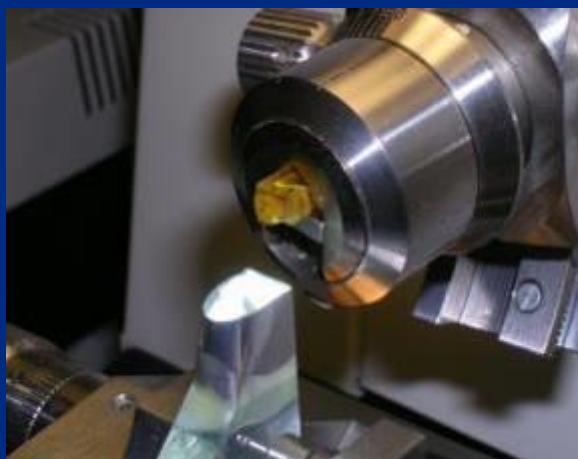
Ultramikrotom



Foto P. Válová



Foto P. Válová



<http://blog.eyewire.org/wp-content/uploads/2012/11/ultramicrotome.jpg>

Pomůcky k ultramikrotomu



Foto P. Válová

Sít'ky na preparáty pro EM

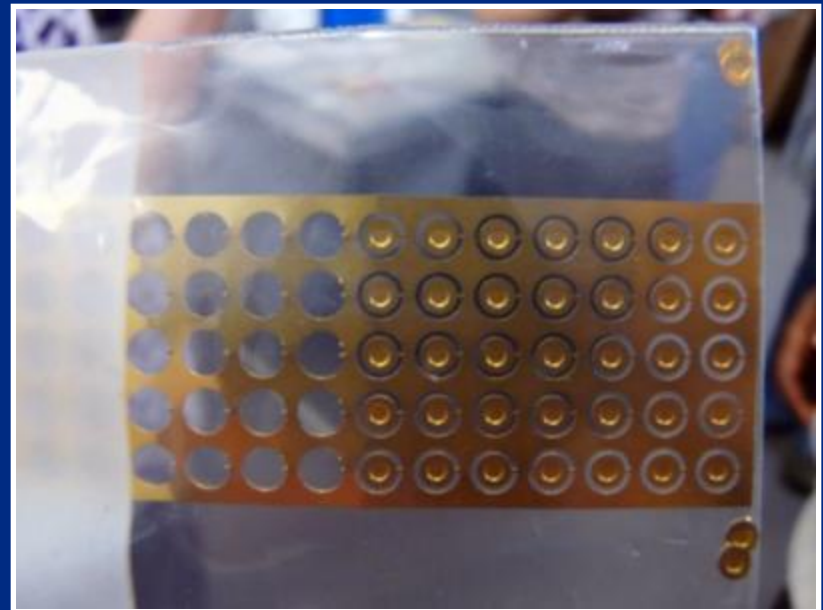
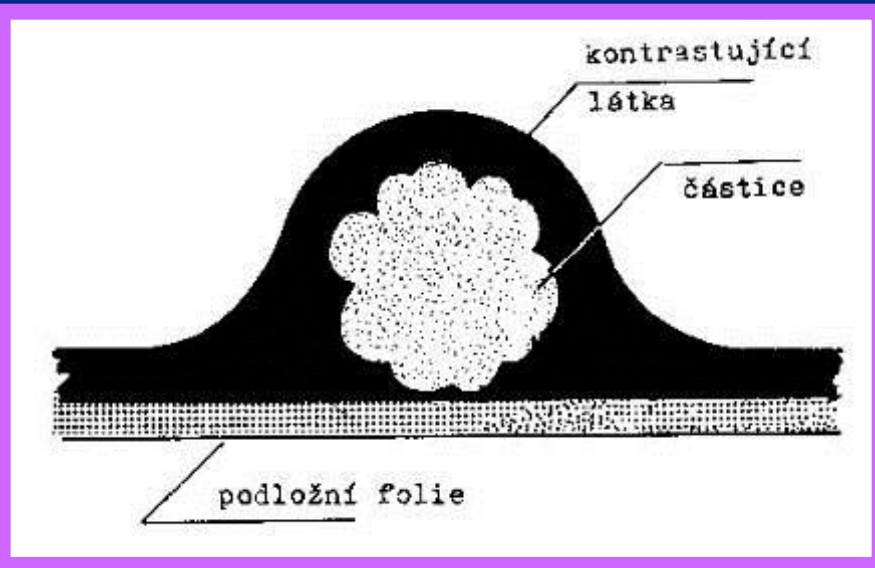


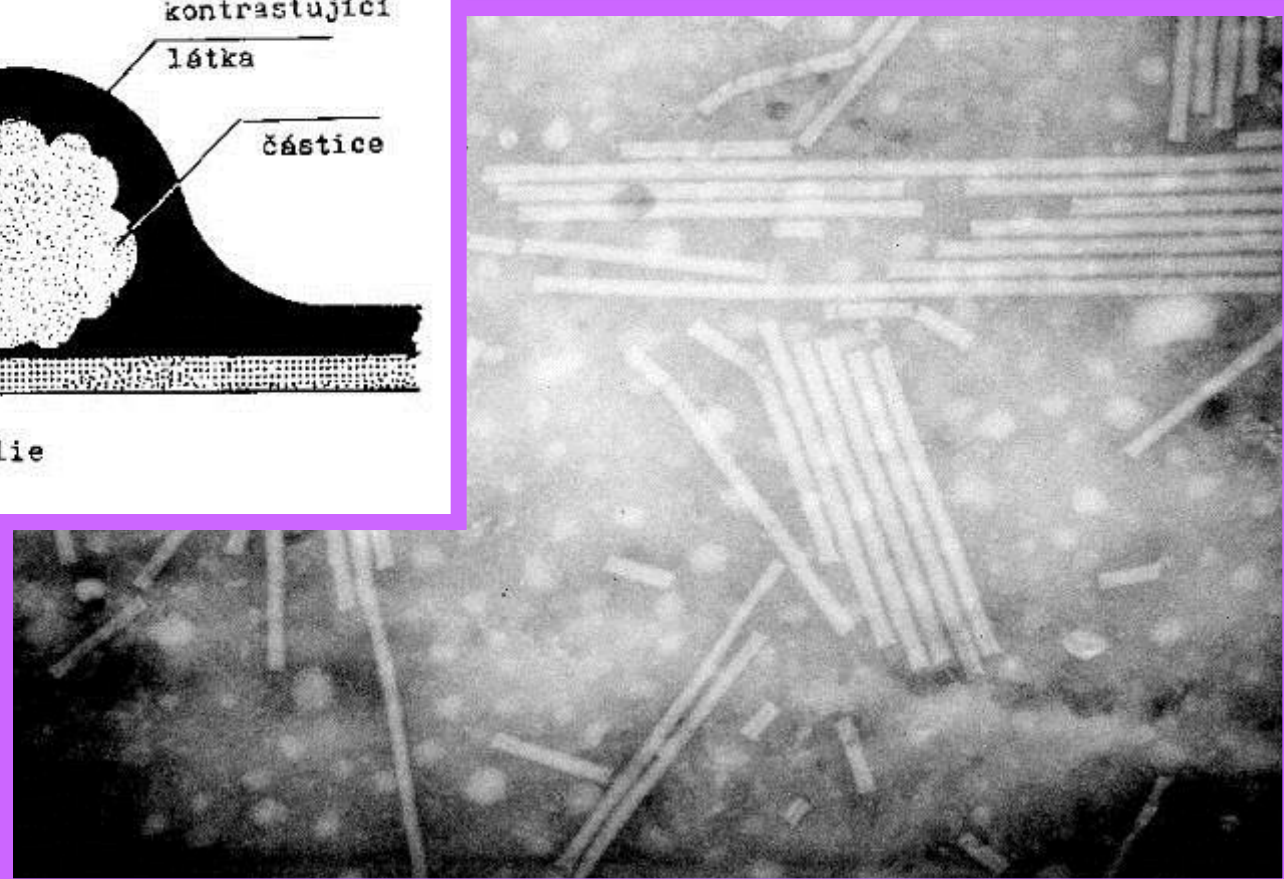
Foto P. Válová

Negativní kontrastování (barvení)

příklad

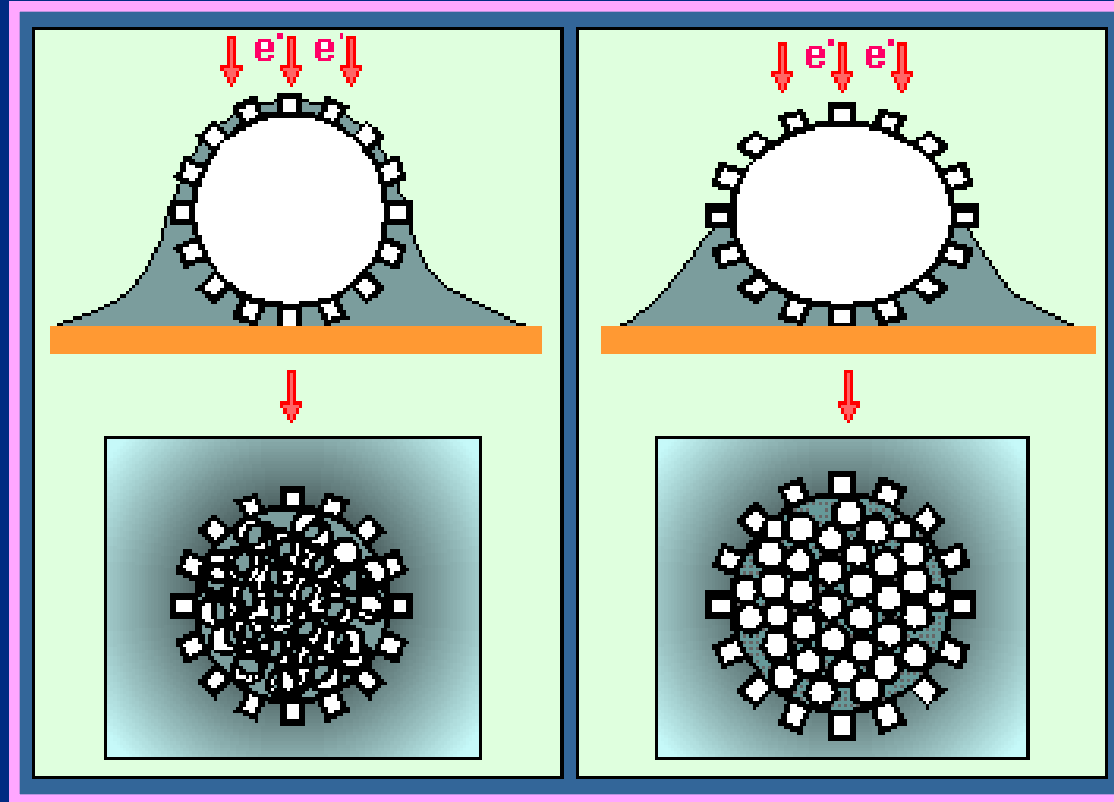


schéma



Virus tabákové mozaiky (TMV) – rostlinný virus s délkou 300 nm,
používaný jako vnitřní standard

Negativní kontrastování (barvení)



- Část elektronů preparátem neprojde a odrazí se, na stínítku se jeví tmavě

- Procházející elektrony se jeví světlé

Negativní kontrastování (barvení)

- Nejčastěji používaná negativní barviva:
 - kyselina fosfowolframová (PTA)
 - molybdenan amonný
 - uranyl acetát

Příprava preparátů pro TEM – imunogold značení

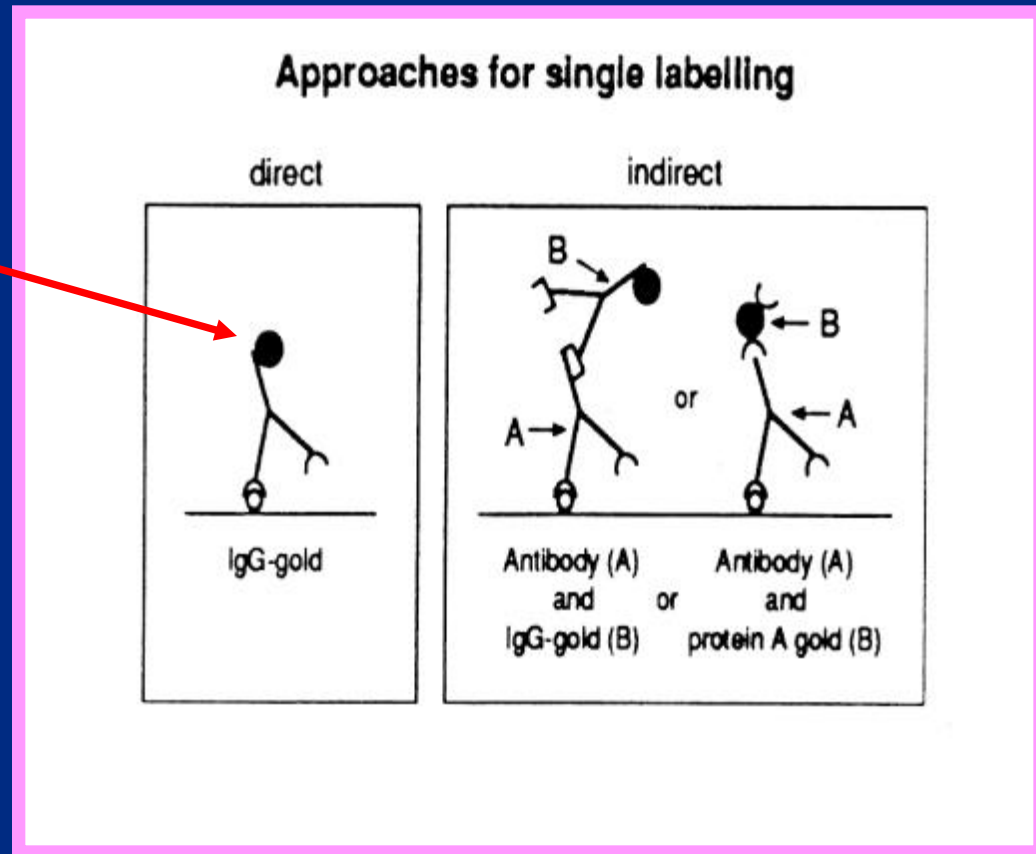
- Značení nejčastěji na ultratenkých řezech
- Fixace vhodným fixativem aby zůstala zachována vazebná schopnost **Ag (antigen) – protilátka**
- Prosycení a zalití do akrylátové pryskyřice při snižující se teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Polymerace UV světlem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

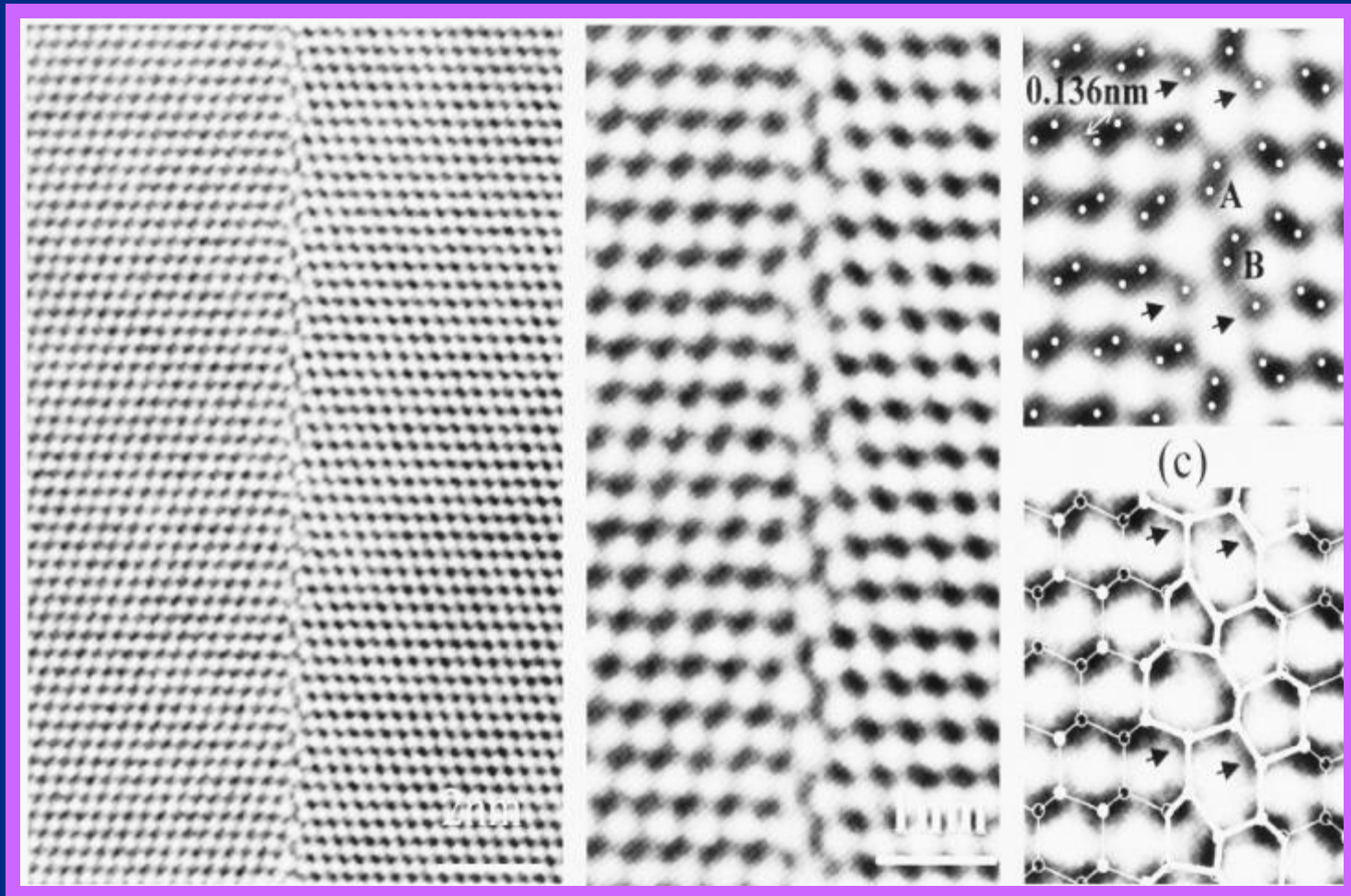
Candida albicans
v SEM



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.

High Resolution TEM (HR TEM)



Vysokorozlišovací TEM

– zkoumání křemíkového filmu na 1 200 kV mikroskopu umožňuje rozeznání jednotlivých atomů

Rastrovací elektronová mikroskopie

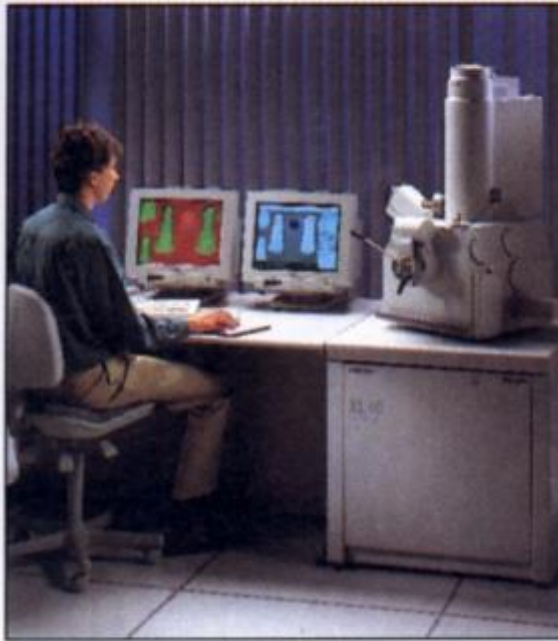
S E M

Pozorování povrchu preparátu (odvodněných a většinou pokovených)

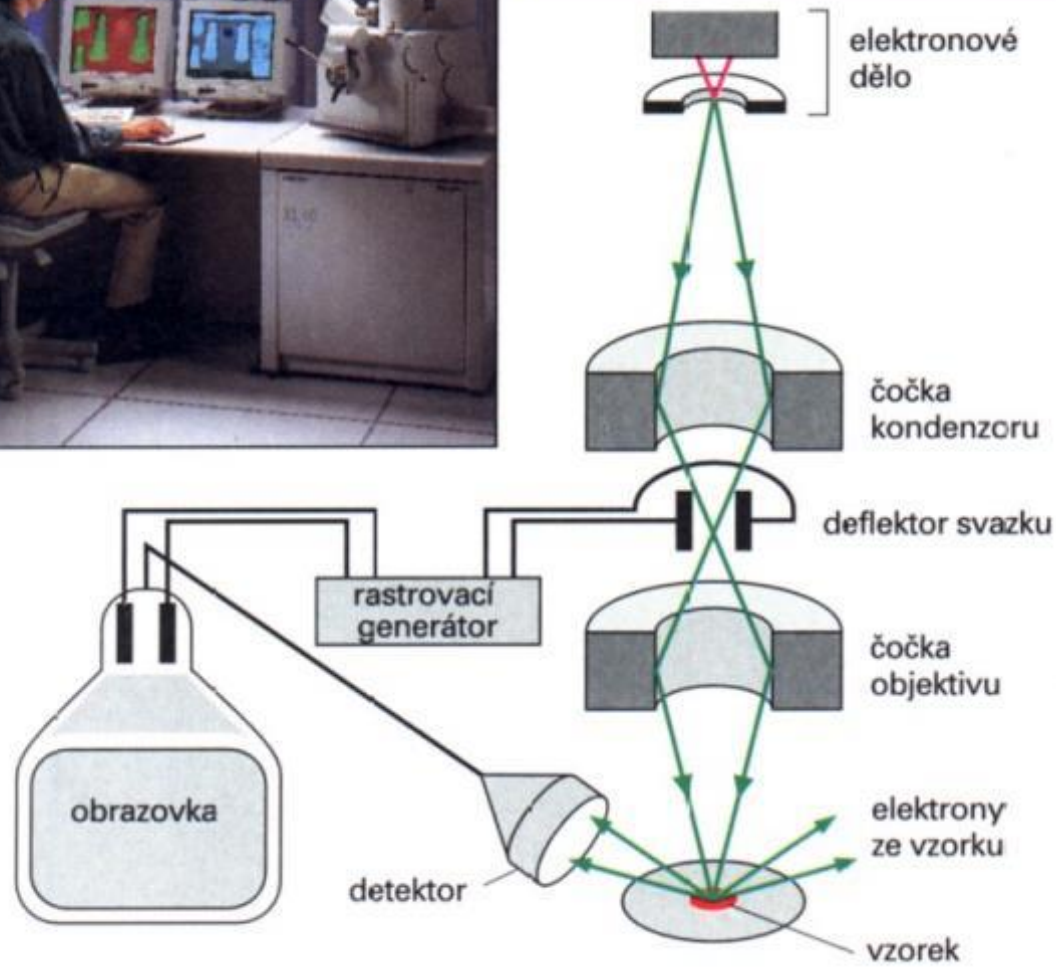
- Ke zobrazení používá **rastrovací paprsek elektronů** (cca 1 nm silný), který postupně bod po bodu dopadá na povrch preparátu
- Vznikající signál ze **sekundárních elektronů** slouží ke složení výsledného obrázku
- Max. zvětšení asi **200 000x (400 000x)**
(užitečné zvětšení 15 – 50 000x, nejčastěji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

Složení SEM

- **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>



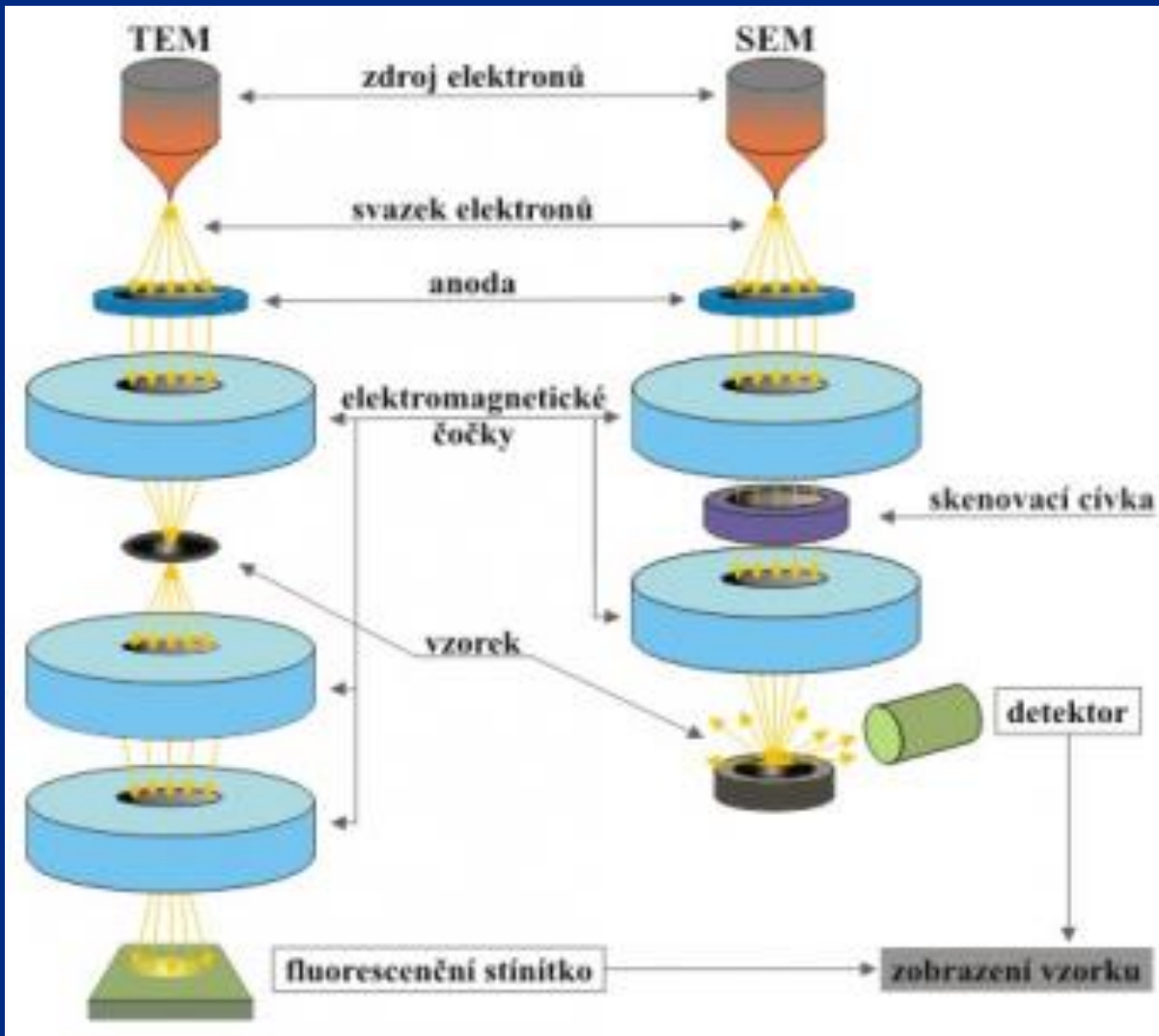
Nový autoemisní **rastrovací mikroskop Hitachi SU6600**

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

Rychlá a přesná analýza chemického složení

<http://www.specion.biz/Pristroje.php?menu=PristX&sort=Elektronov%C3%A9%20mikroskopy>

Srovnání TEM a SEM

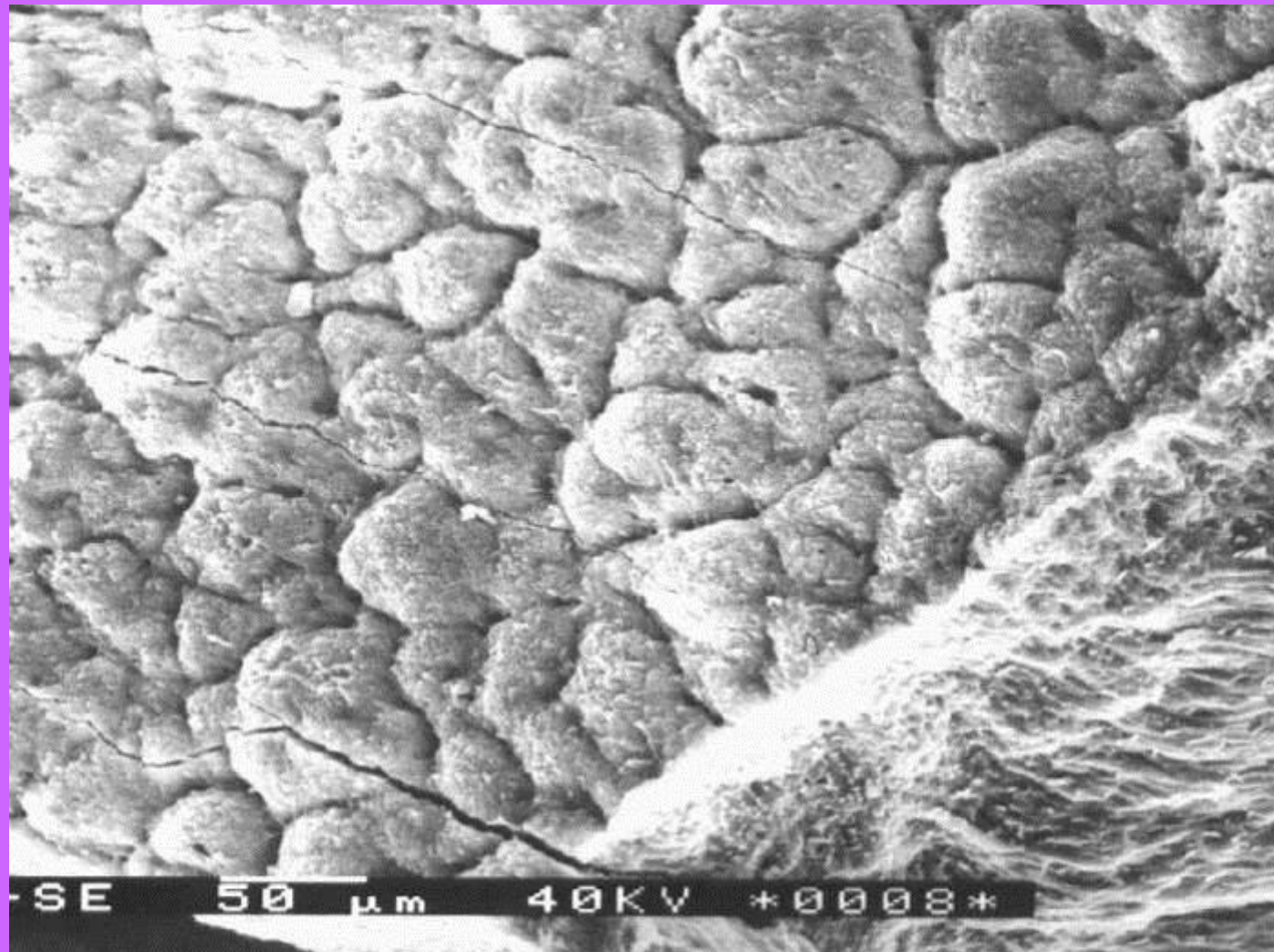


Candida albicans v SEM



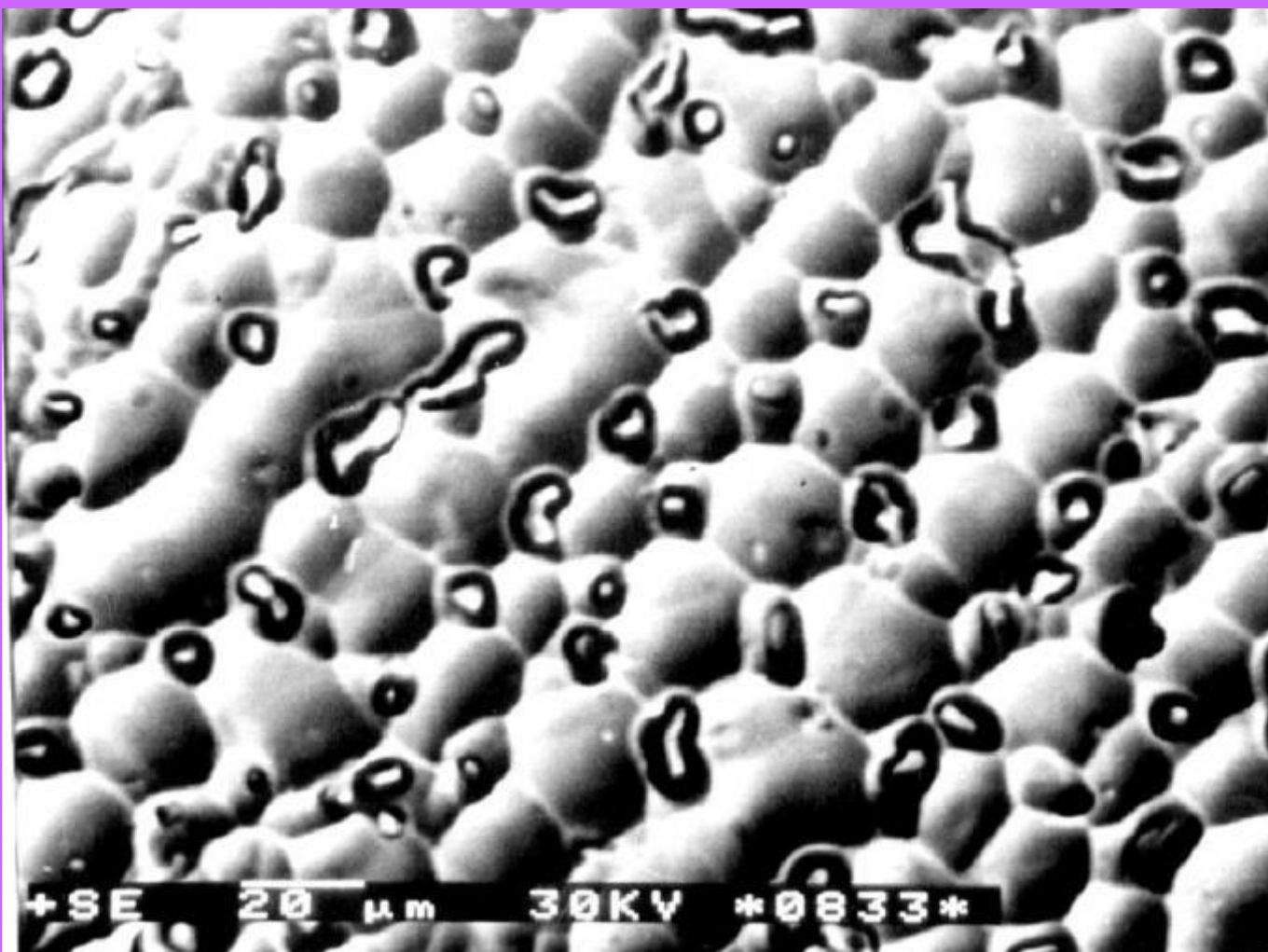
Candida albicans, kvasinka, často používaná jako modelový organismus v biologii (foto Radko Novotný)

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.

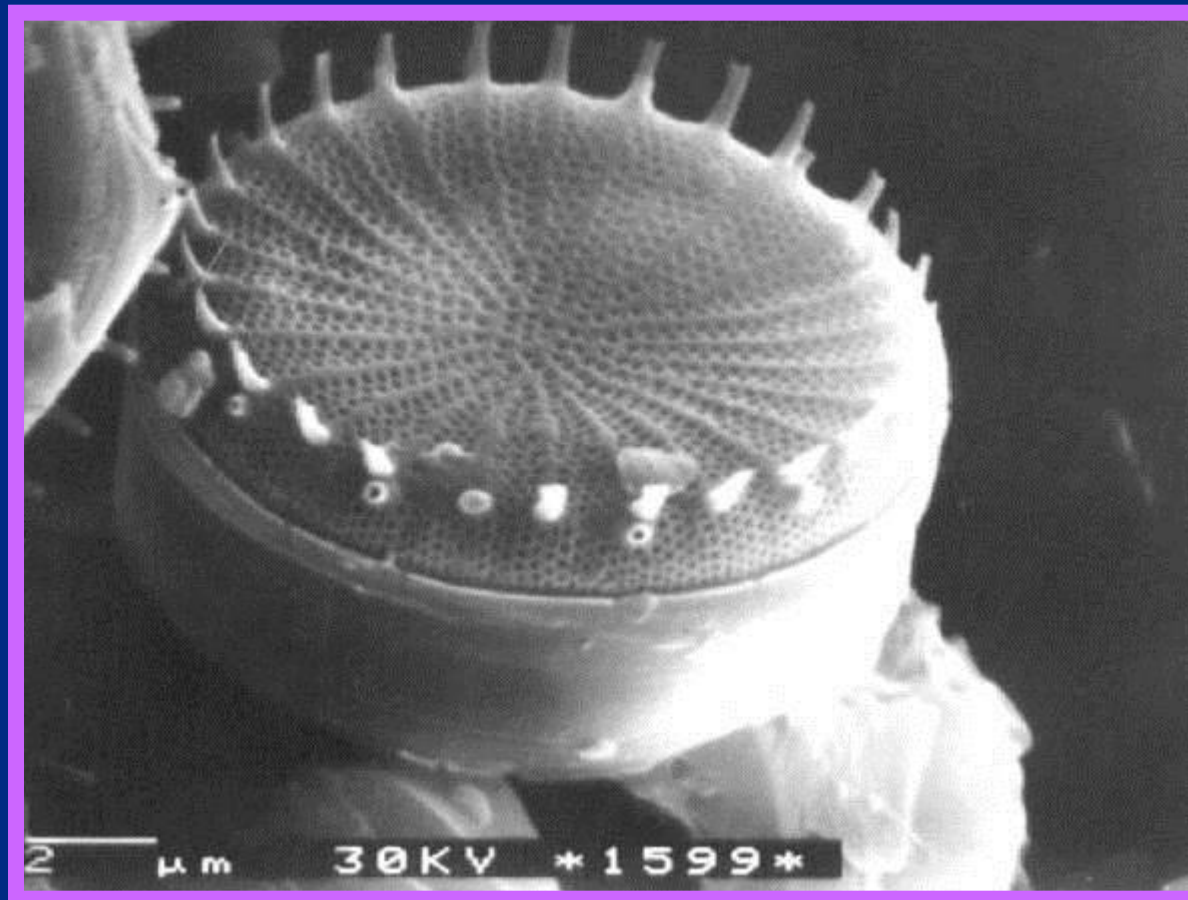
(foto Radko Novotný)



Pavouk pokrytý zlatem v SEM mikroskopu.

(obr. <http> – wikipedia)

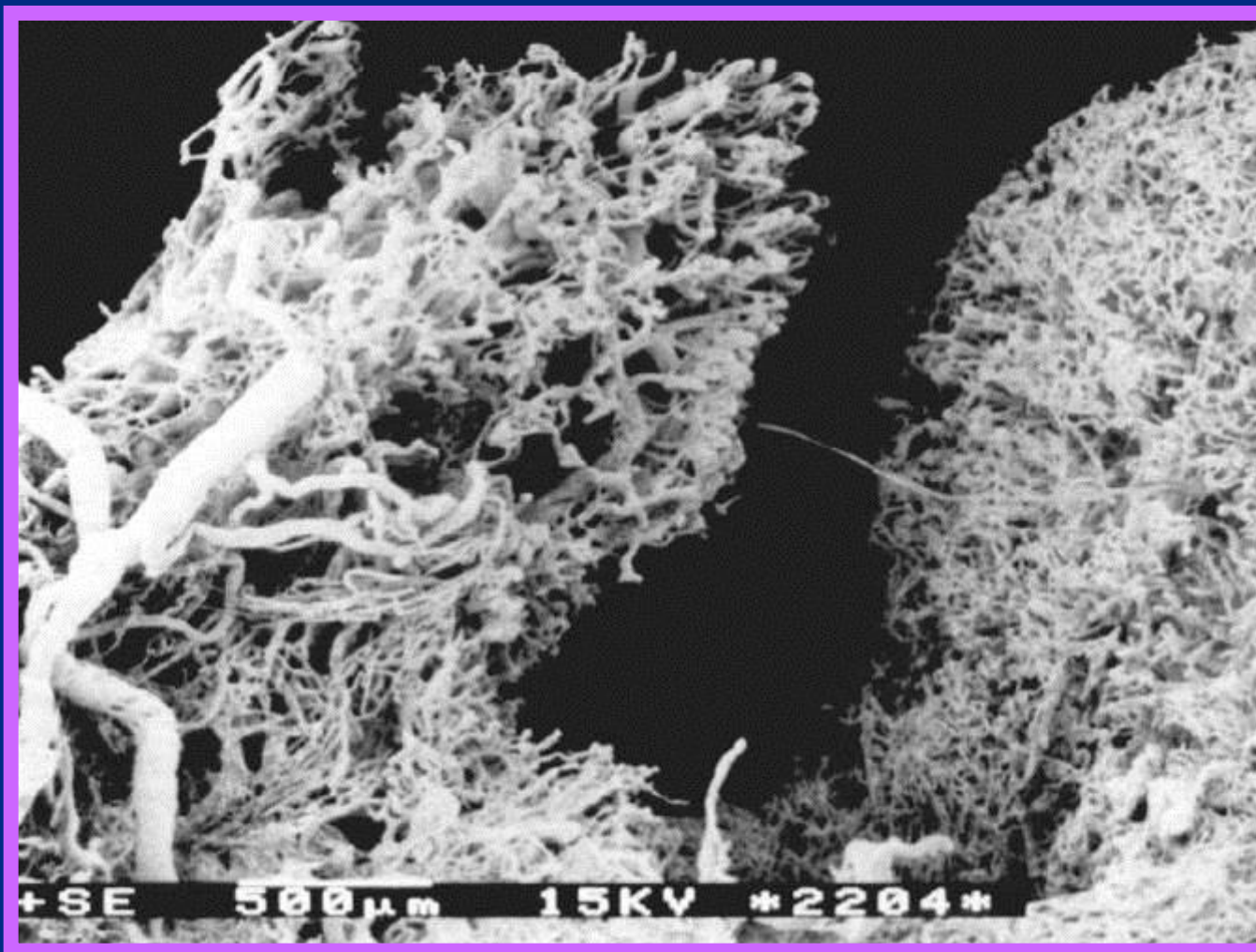
Příklad vzorku s pevnou křemičitou schránkou



Schránka **rozsivky** *Stephanodiscus hantzschii*

(foto Radko Novotný)

Příklad složitěji připravované tkáně



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

Enviromentální mikroskop

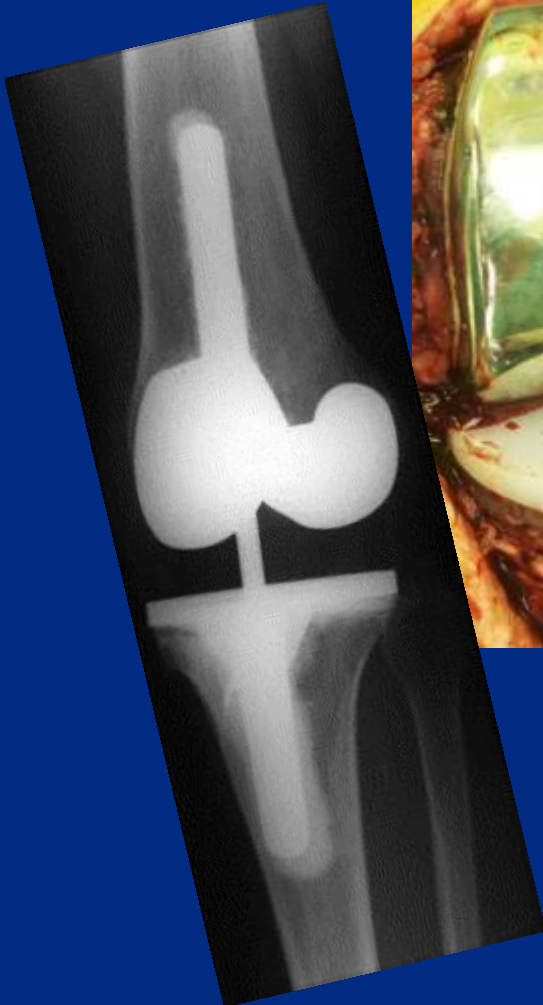
Rastrovací EM (ESEM) s volitelným vakuem

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

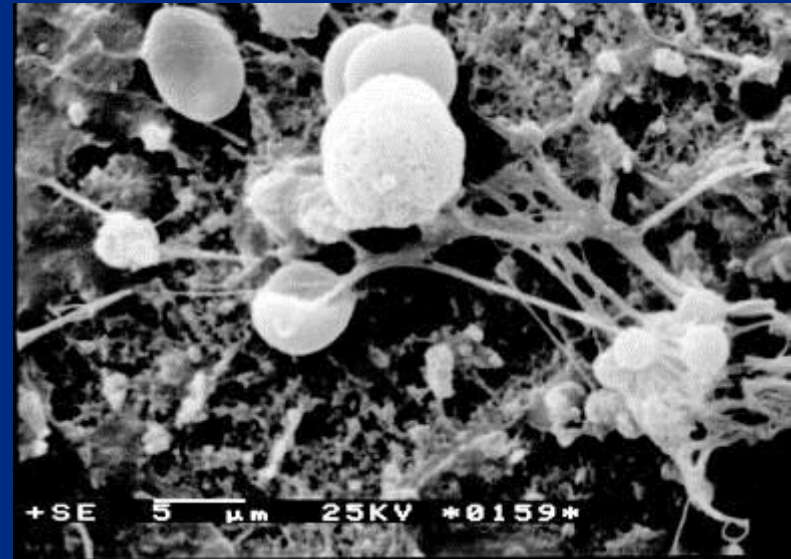
→ zmenšení množství artefaktů vznikajících vysušováním



EM v praxi – ortopedie



(foto Radko Novotný)

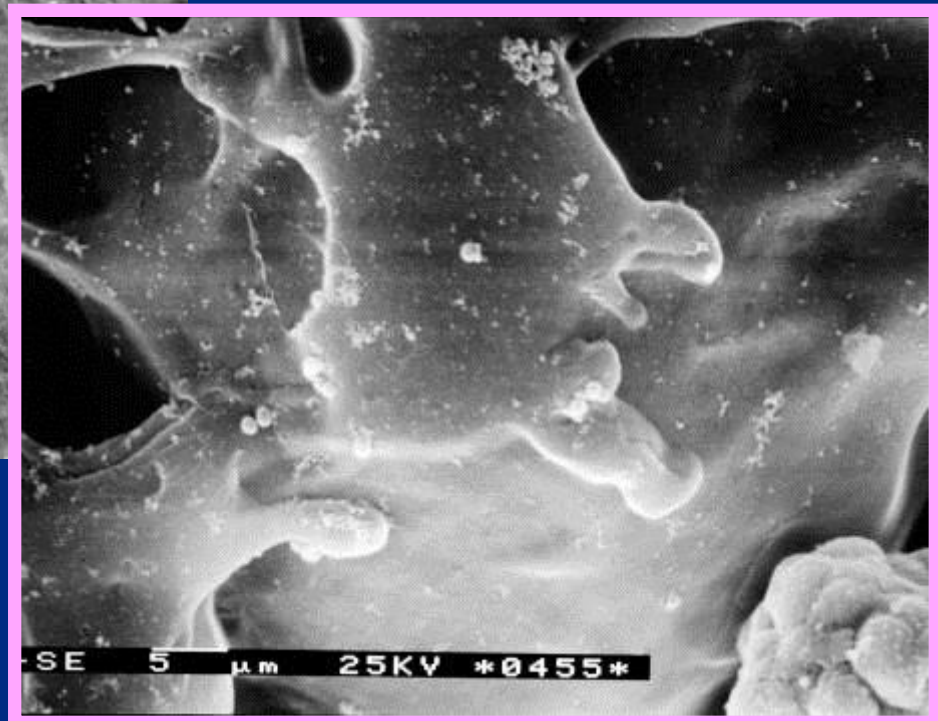


Staphylococcus epidermidis

Kultivace *Staphylococcus aureus* s materiály kloubních náhrad



Palamed (akrylát)
s příměsí antibiotik



PE

(foto Radko Novotný)

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_allyouwantd_pb.pdf)
- **Bielniková, H.: Elektronová mikroskopie ve virologii - DP**
<http://www.paru.cas.cz/lem/cs/elektonova%20mikroskopie%20ve%20virologii.pdf>