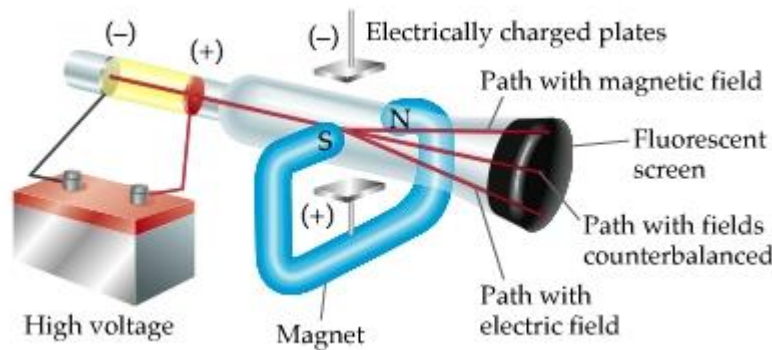


Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

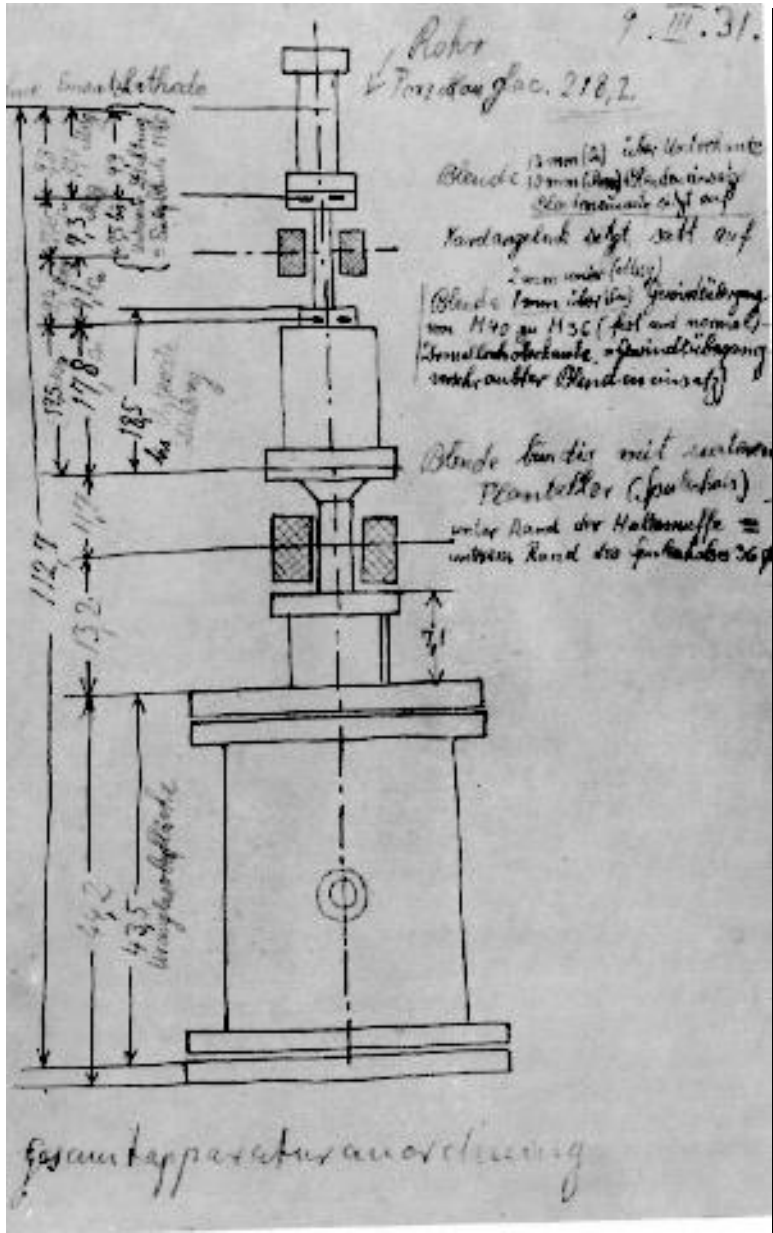
Historie vývoje elektronové mikroskopie

- 1897 J.J. Thomson objevil a popsal částici – elektron při studiu vlastností katodového záření. Nobelova cena za fyziku v r. 1906.
- 1924 Louis de Broglie navrhl princip duality částic a vlnění
Vlnové vlastnos
 λ - vlnová délka
Nobelova cena
- 1926 Hans Busch ukázal elektrony
funguje jako čočka pro
- 1931 Ernst Ruska a M. S. Klenk vyvinuli první elektronový mikroskop se
zvětšením 150 – 400x.
Ernst Ruska získal Nobelovu cenu za fyziku v roce 1986 za vývoj elektronového mikroskopu
- 1934 Elektronový mikroskop s rozlišením 100 Å sestaven dvojicí Ernst Ruska a Bodo van Borries
- 2017 Nobelova cena za chemii za vývoj metody kryogenní elektronové mikroskopie
Jacques Dubochet, Joachim Frank a Richard Henderson



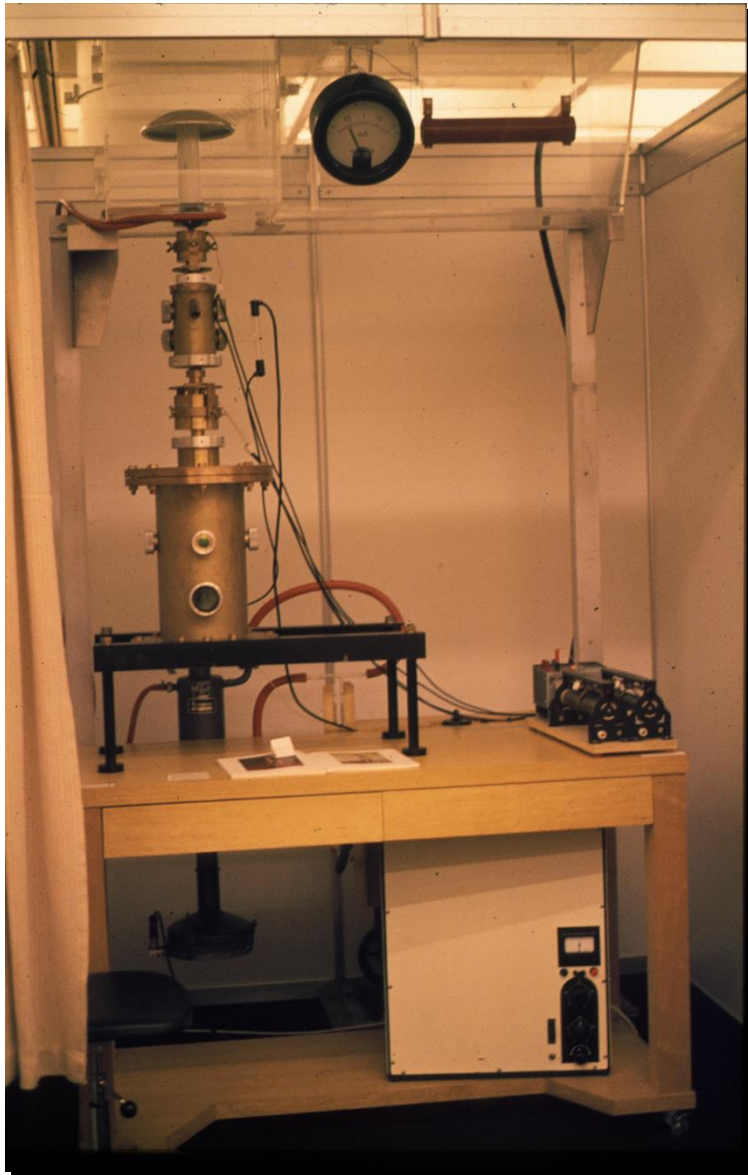
wps.prenhall.com

Ernst Ruska and Max Knoll



Design of first electron microscope by Ernst Ruska (9 March 1931)

Replika prvního elektronového mikroskopu



Elektronové mikroskopy současnosti
Tecnai (FEI)



Titan Krios (FEI)



Konstrukce každé součástky TEM výsledkem
dlouhodobého vývoje

Elektron jako vlna ve vakuu

- pohybující se elektron o energii E a hybnosti p má podle Louis de Broglieho teorie vlnovou povahu
- chová se jako vlna o frekvenci: $f = \frac{E}{h}$ a vlnové délce $\lambda = \frac{h}{mv}$

$$E_k = \frac{1}{2} mv^2 = eU \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2eU}{m}}$$

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{h}{m\sqrt{\frac{2eU}{m}}} = \frac{h}{\sqrt{2meU}}$$

- pro urychlovací napětí $> 100\text{kV}$ se rychlost elektronu postupně blíží rychlosti světla – platí relativistické vztahy
- pro kinetickou energii urychleného elektronu ve vakuu el. polem o napětí U platí
 $E_k = m \cdot c^2 - m_0 \cdot c^2 = eU$, m_0 – klidová hmotnost elektronu
relativistická hmotnost $m = \frac{eU}{c^2} + m_0$

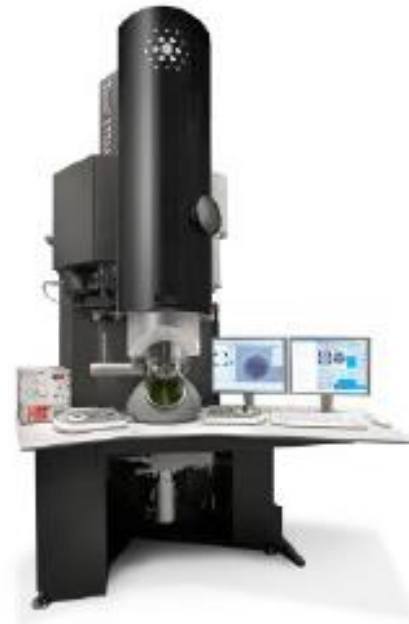
$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meU}} = \frac{h}{\sqrt{2\left(\frac{eU}{c^2} + m_0\right)eU}} = \frac{h}{\sqrt{2m_0eU\left(1 + \frac{eU}{m_0c^2}\right)}} \cong \frac{h}{\sqrt{2meU}}$$

- v praxi pro výpočet λ při známé hodnotě U [V] $\lambda = \frac{1.226}{\sqrt{U}} \text{ [nm]}$
- Př. $U = 10 \text{ kV} \rightarrow \lambda = 0.01226 \text{ nm}$; $U = 100 \text{ kV} \rightarrow \lambda = 0.0037 \text{ nm}$.

Rozlišení TEM

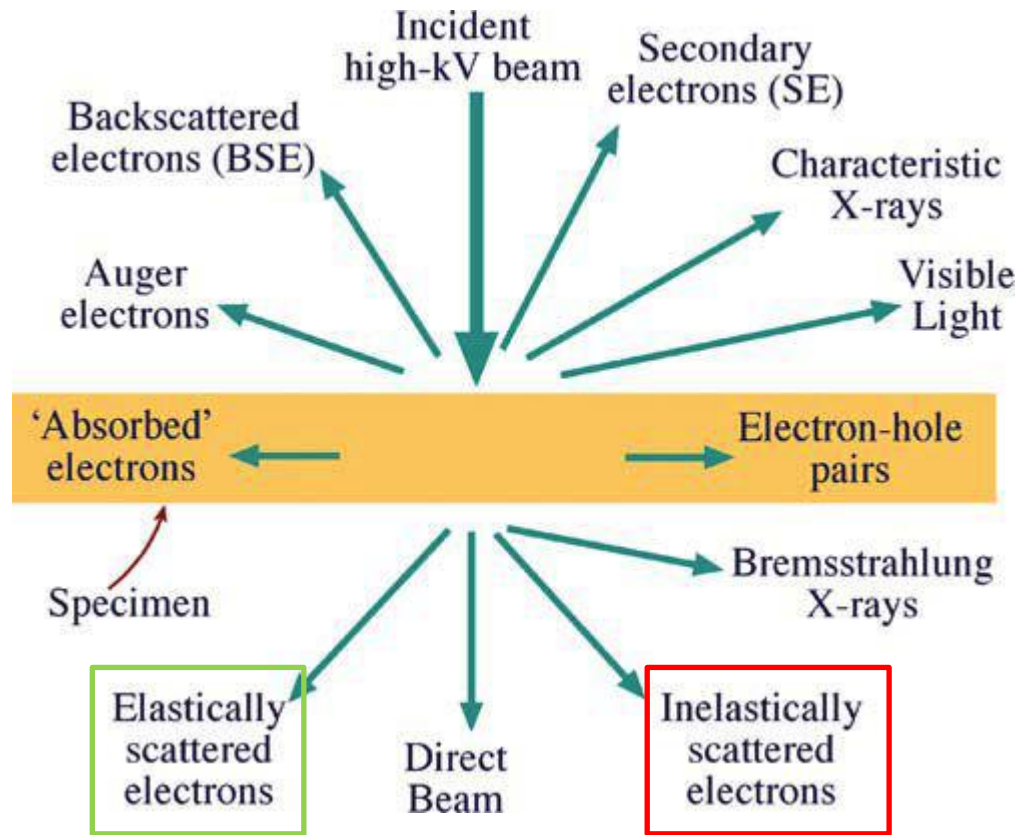
- TEM s urychlovacím napětím 100 kV: $\lambda = 0.0037 \text{ nm}$
 - běžný SM: $\lambda = 500 \text{ nm}$
- $$d = \frac{0.61 \lambda}{\sin \alpha}$$
- dle teorie by měl mít TEM o 5 řádů vyšší rozlišení
 - ve skutečnosti díky zobrazovacím vadám čoček a technických limitů mikroskopu (stabilní držák vzorku, rozlišení detekce – digitální kamery) je rozlišení zobrazení jen o 2 – 3 řády vyšší oproti SM
 - pro dosažení vyššího rozlišení je vhodnější korigovat zobrazovací vady než konstruovat TEM pracující na vysokém urychlovacím napětí

Dřívější a dnešní konstrukce TEM s vysokým rozlišením



Závěr: v elektronové mikroskopii již není vlnová délka limitujícím faktorem!

Interakce elektronů se vzorkem



- TEM pracuje s elektrony, které prošly preparátem
- kontrast v obraze vzniká díky rozptýlu elektronů vzorkem
- „nosiči“ strukturní informace v TEM jsou **elasticky (pružně) rozptýlené elektrony**
- **neelastický (nepružný) rozptyl** - část energie elektronů je absorbována vzorkem, nejsou nositeli strukturních informací a způsobují radiační poškození vzorku

Kontrast v TEM

- způsoben rozptylem elektronového svazku (elektron má částicový charakter)
- způsoben interferencí svazku elektronů (elektron má vlnový charakter)
- kontrast není způsoben absorpcí jako ve světelném mikroskopu

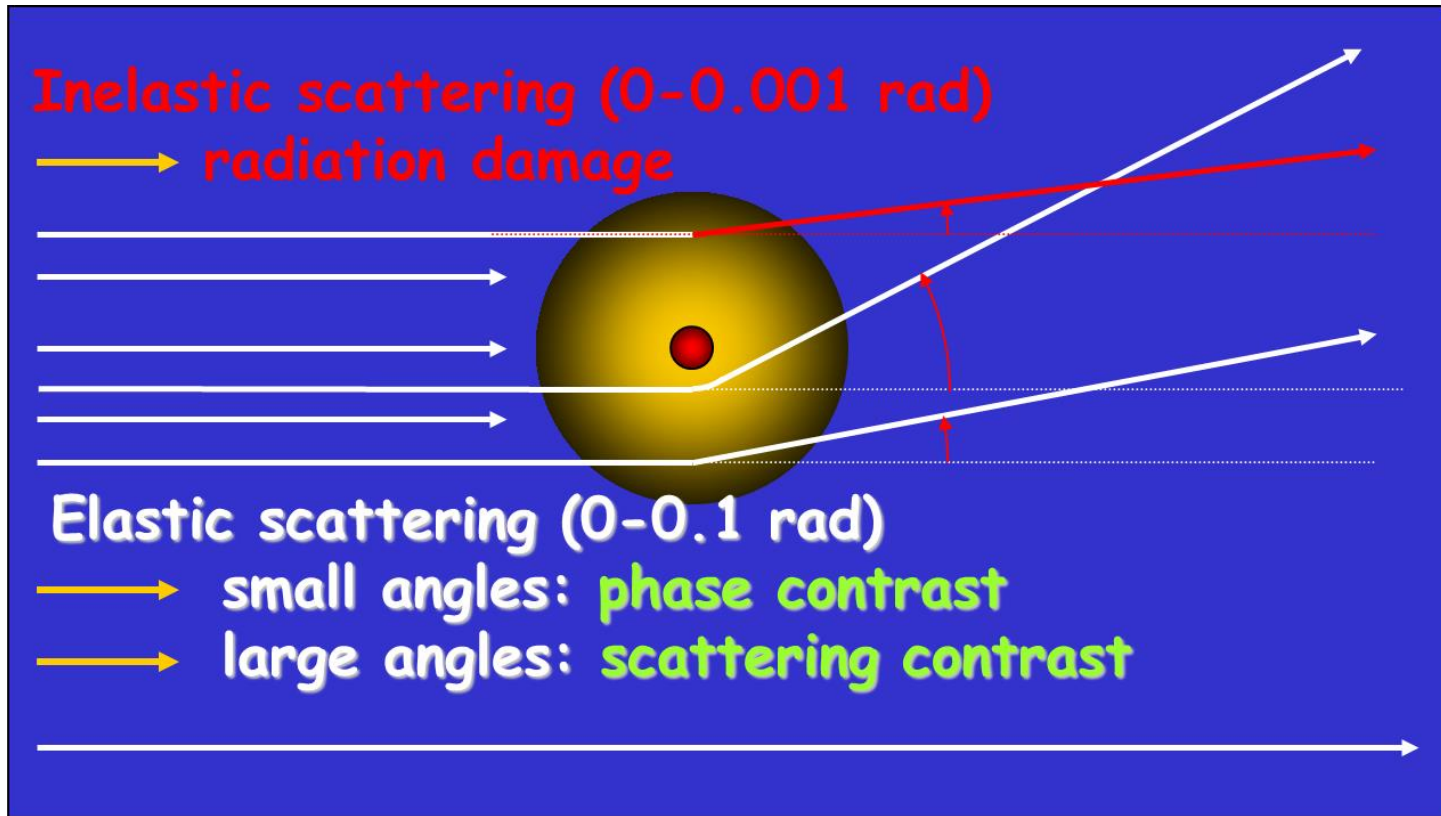
Elastický rozptyl

- kinetická energie a hybnost elektronu je po interakci s atomem vzorku ***zachována***
- platí předpoklad, že každý elektron elektronového svazku je při průchodu vzorkem ***rozptýlen pouze jednou*** – jednoznačná interpretace
 - u silnějších vzorků (stovky nm) může dojít k nežádoucímu násobnému rozptylu
 - násobně rozptýlené elektrony již nenesou jednoznačnou informaci o struktuře ⇒ komplikovaná interpretace
- elastický rozptyl vytváří dva druhy kontrastu
 - ***rozptylový kontrast*** (scattering contrast)
 - ***fázový kontrast*** (phase contrast)

Neelastický rozptyl

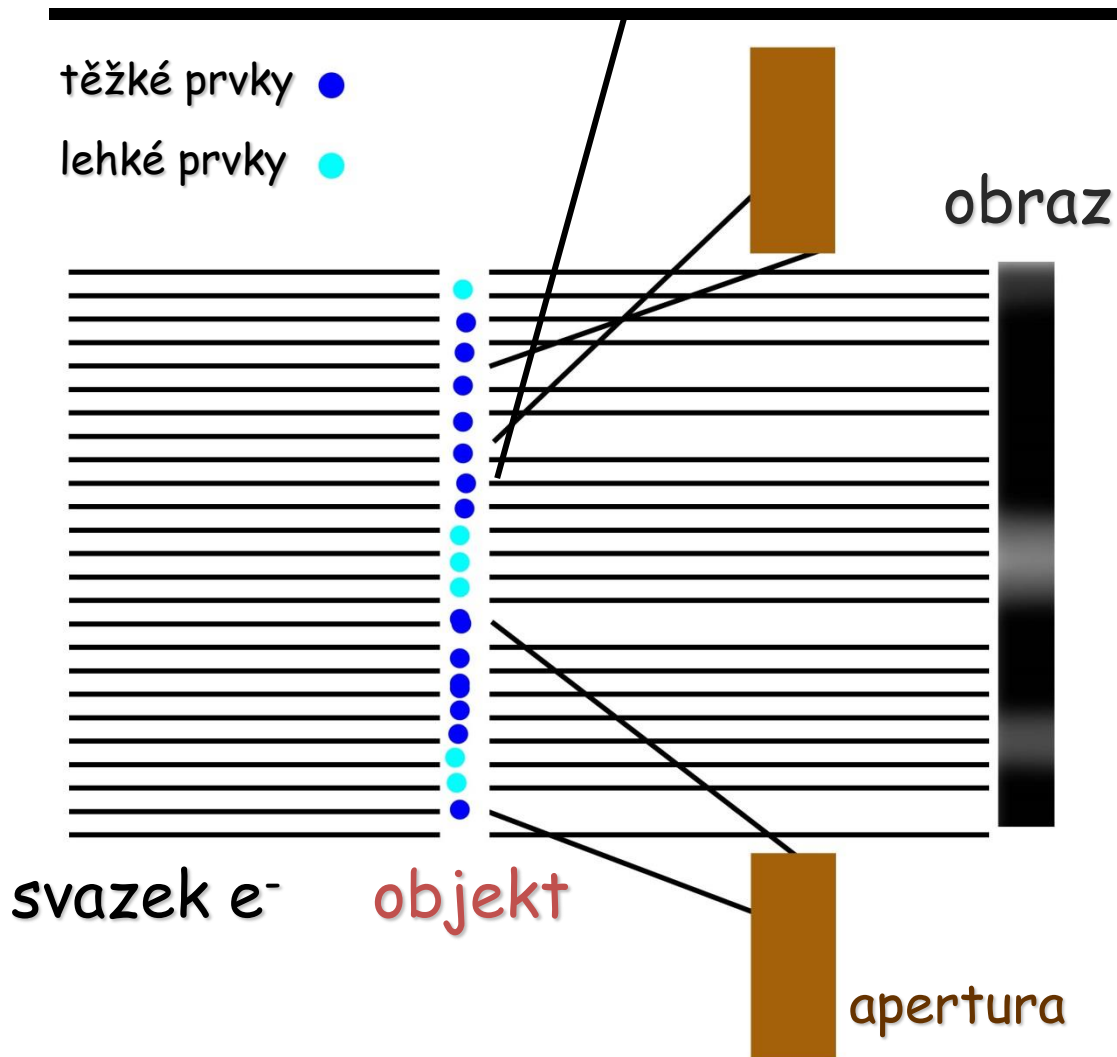
- část kinetické energie je předána vzorku jako vnitřní energie
 - díky ztrátě energie elektron „zpomalí“ a změní se jeho vlnová délka
- elektrony způsobují rozmazání obrazu díky chromatické aberaci
- neelastický rozptyl způsobuje radiační poškození
- vznik sekundárních elektronů, RTG, fluorescence, zahřívání vzorku, ionizace, poškození chemických vazeb, ...

Elastický a neelastický rozptyl elektronů atomem vzorku



- rozptyl závisí na protonovém čísle $\Rightarrow$ těžké prvky rozptylují elektrony více než lehké prvky
 - Elastický rozptyl $\sim Z^{4/3}$
 - Neelastický rozptyl $\sim Z^{1/3}$
- poměr elastický /neelastický rozptyl = $Z/19$
- pro lehké prvky (C, N, O) převažuje neelastický rozptyl
- pro těžké prvky (U, W, Pt, Os) převažuje elastický rozptyl

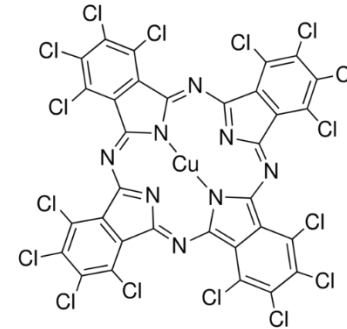
Rozptylový kontrast v TEM



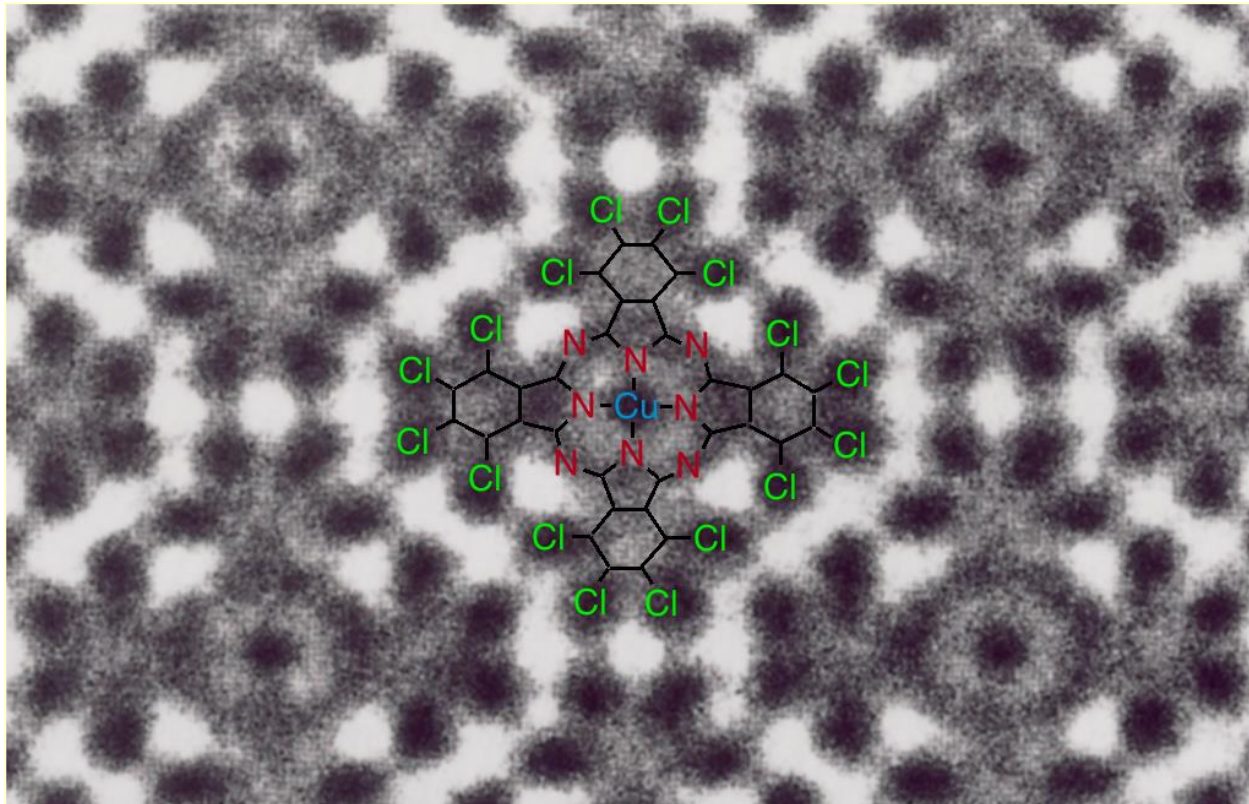
- elektrony rozptýlené pod velkými úhly jsou zachyceny clonou nebo tělem mikroskopu
- zachycené elektrony nedorazí k detektoru $\Rightarrow$ temné místo v obraze
- nerozptýlené a slabě rozptýlené elektrony vytváří v obraze světlá místa

Rozptylový kontrast v TEM

- krystal látky - copper (II) phthalocyanine, chlorinated



- TEM snímek tenkého krystalu dokumentuje vyšší rozptyl elektronového svazku těžkými prvky $\Rightarrow$ vyšší kontrast



Protonové číslo:

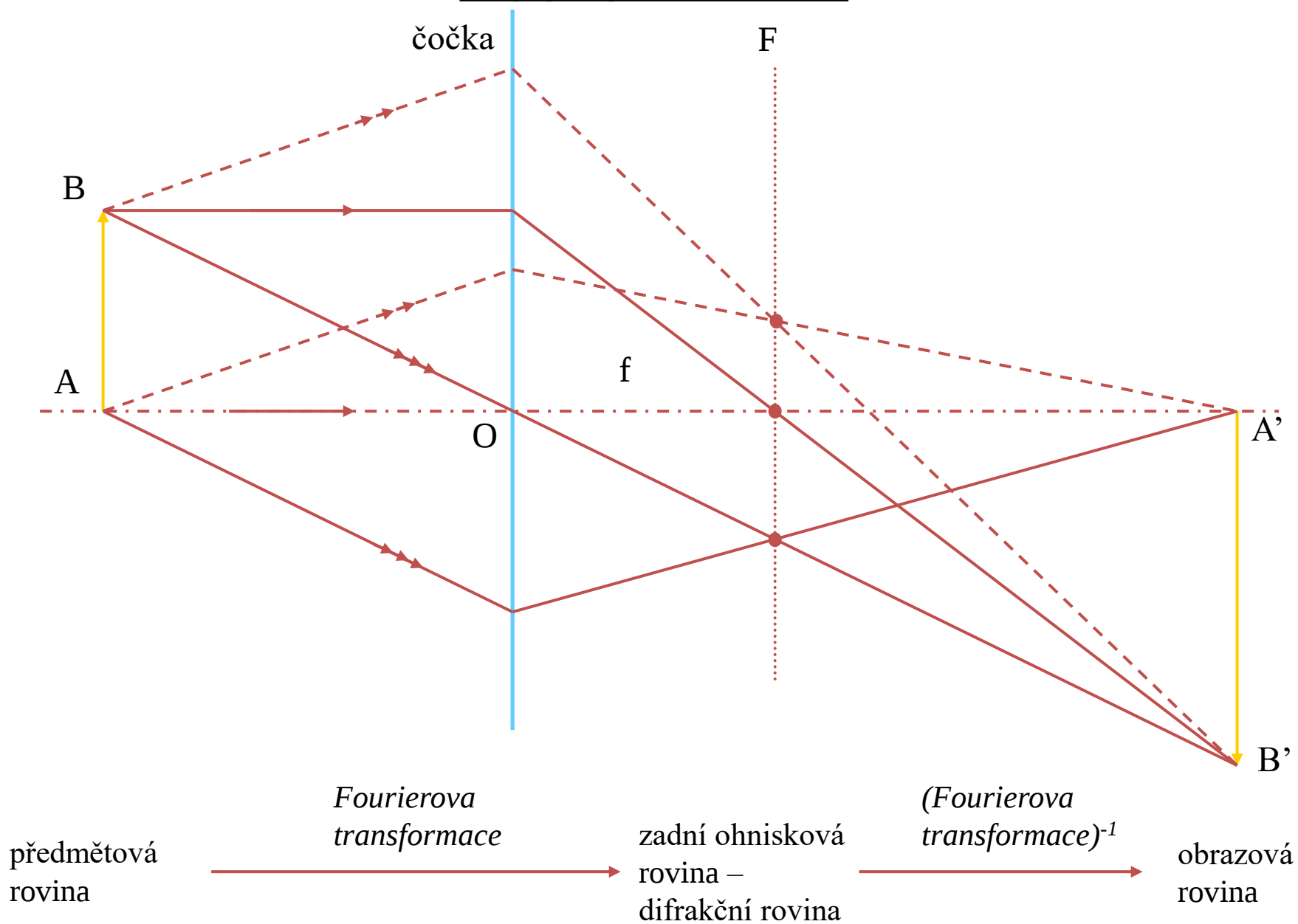
Cu – 29

Cl – 17

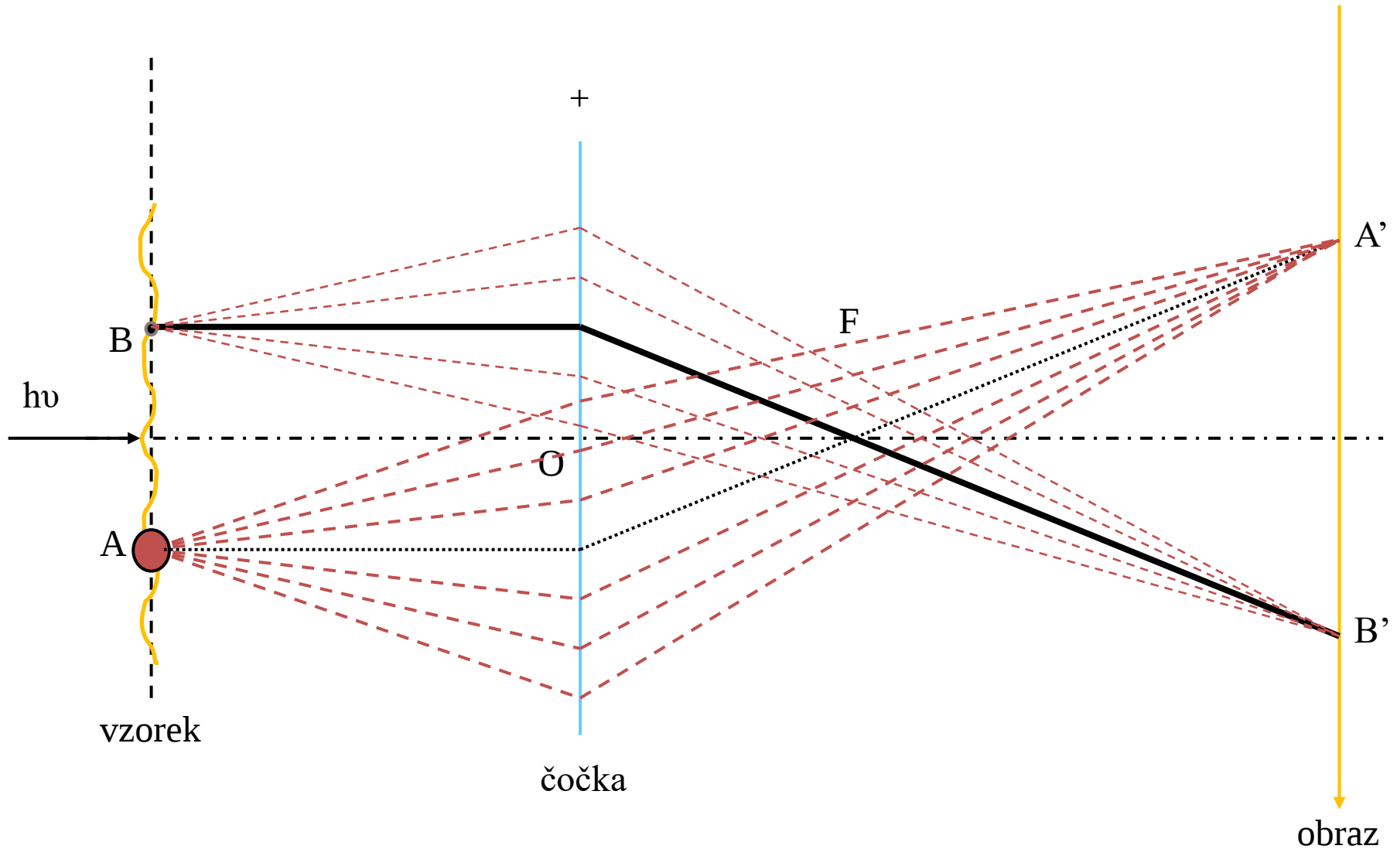
N – 7

C – 6

Rozptylový kontrast v TEM

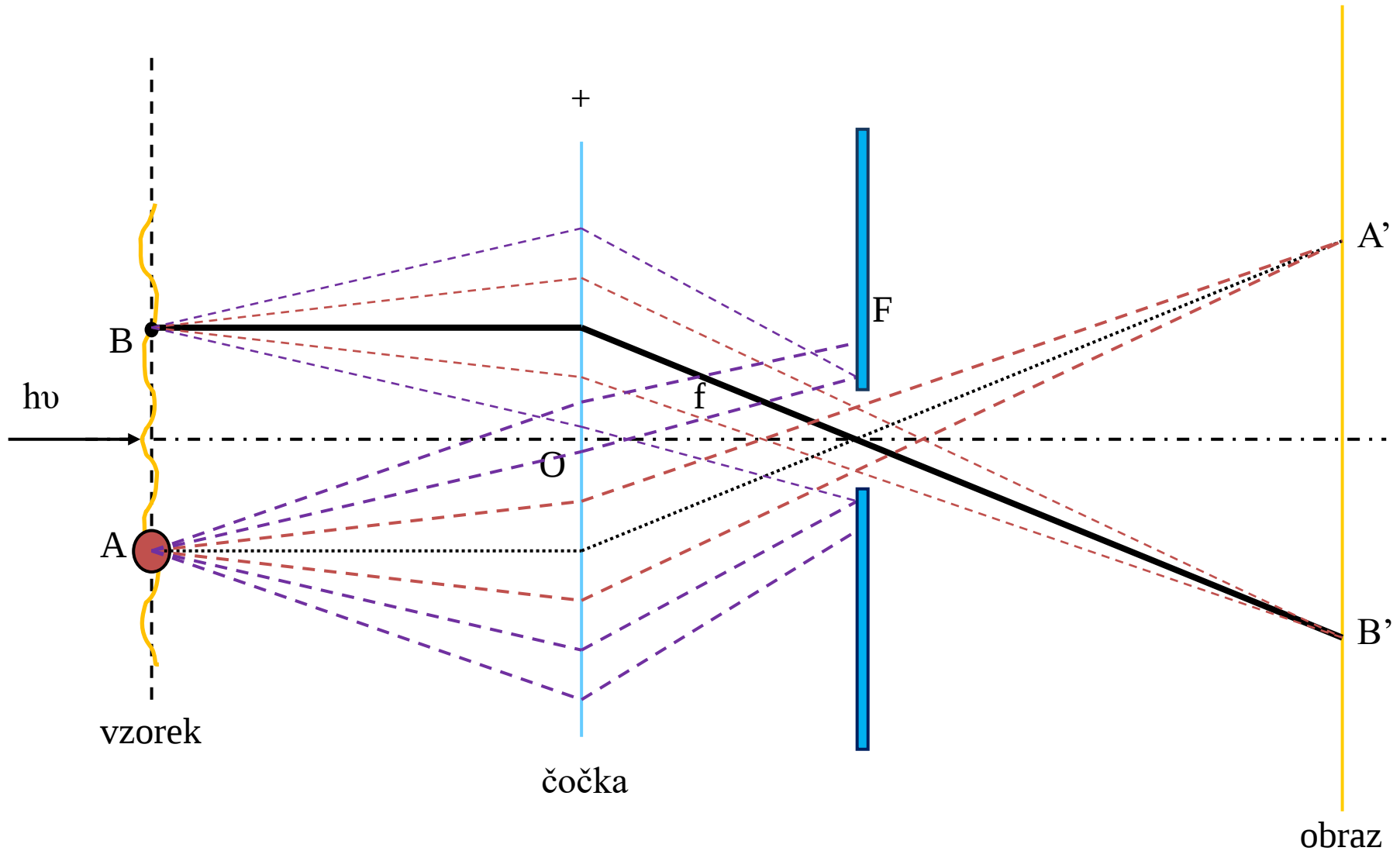


Rozptylový kontrast v TEM



- vzorek : A – silně rozptylující bod, B – slabě rozptylující bod
- při ideálním zobrazení je intenzita v obrazech bodů A' a B' stejná $\Rightarrow$ nulový kontrast

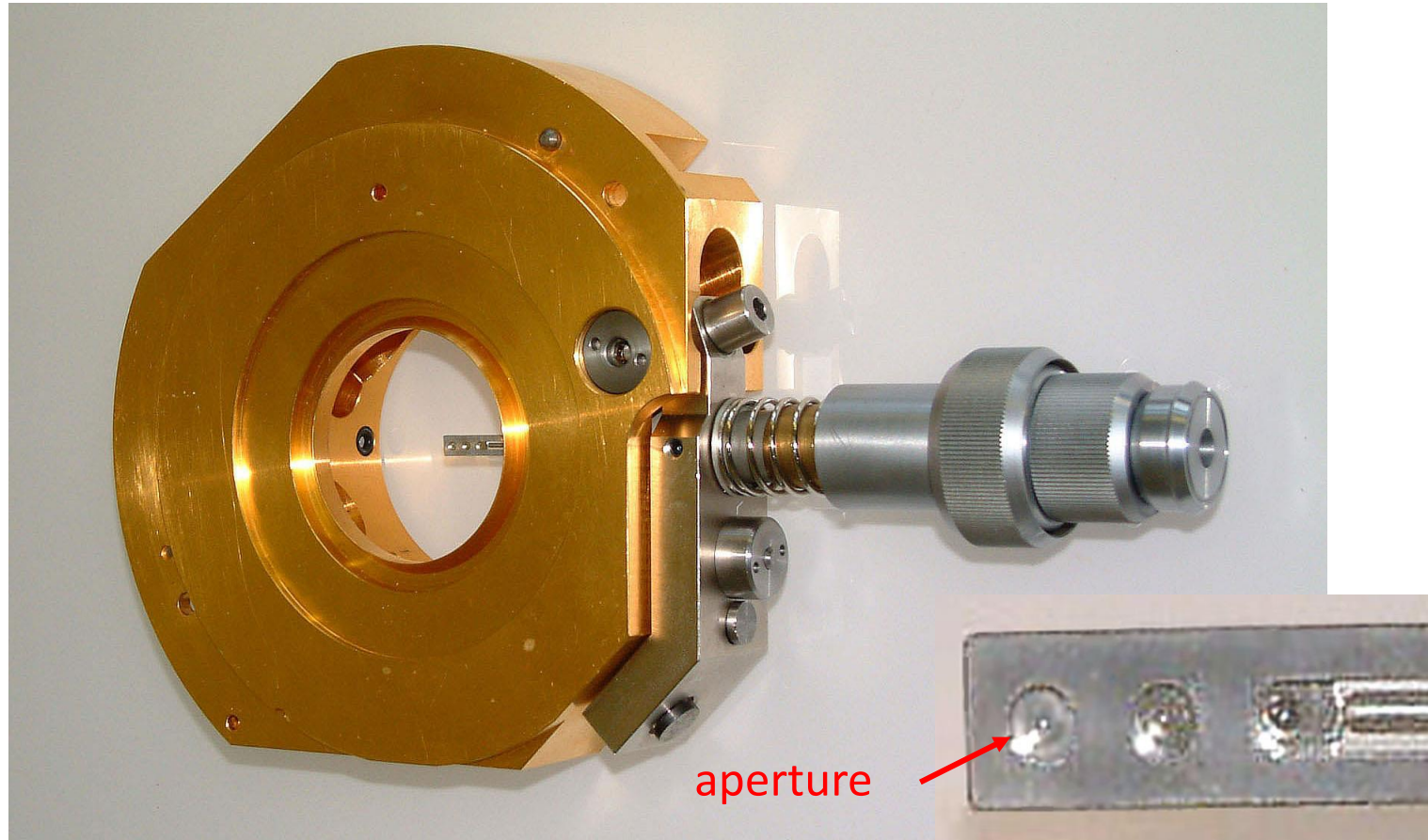
Rozptylový kontrast v TEM



- elektrony rozptýlené pod velkým úhlem jsou v zadní ohniskové rovině objektivové čočky zachyceny aperturou $\Rightarrow$ **rozptylový kontrast** $\Rightarrow$ nenulový kontrast bodů A' a B', silně rozptylující bod je v obraze tmavší

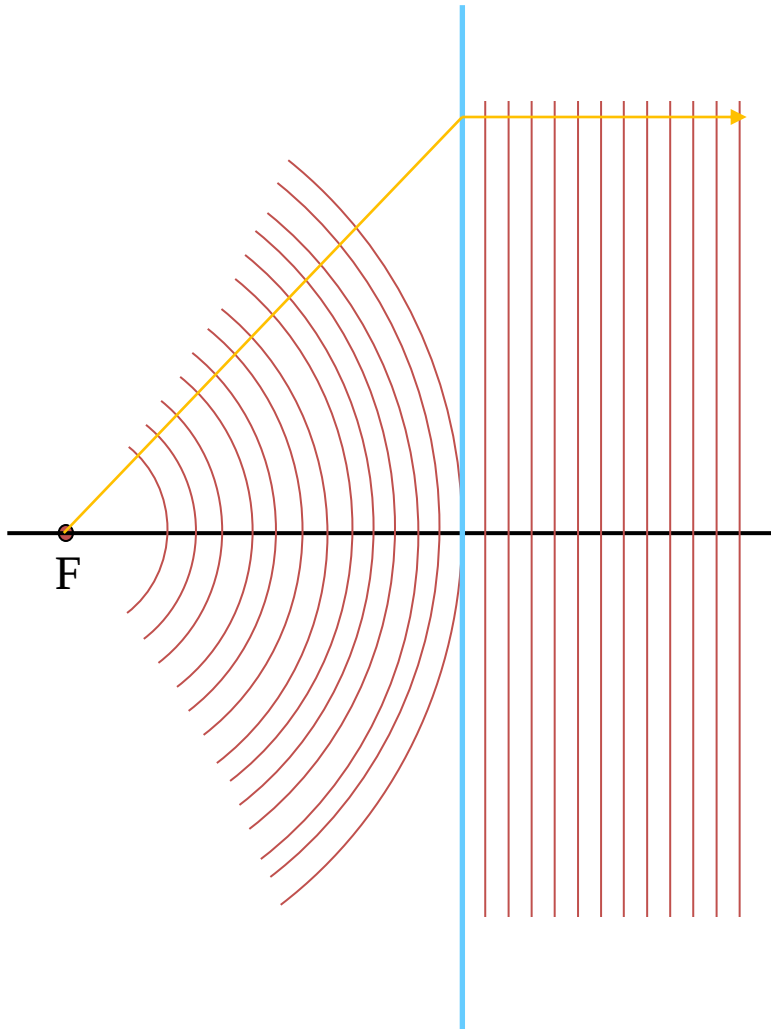
Rozptylový kontrast v TEM – role apertury

- rozptylový kontrast je zesílen objektivovou clonkou (aperturou) umístěnou v zadní ohniskové rovině objektivové čočky
- poloměr clonky je obvykle v rozmezí 50 – 100 μm



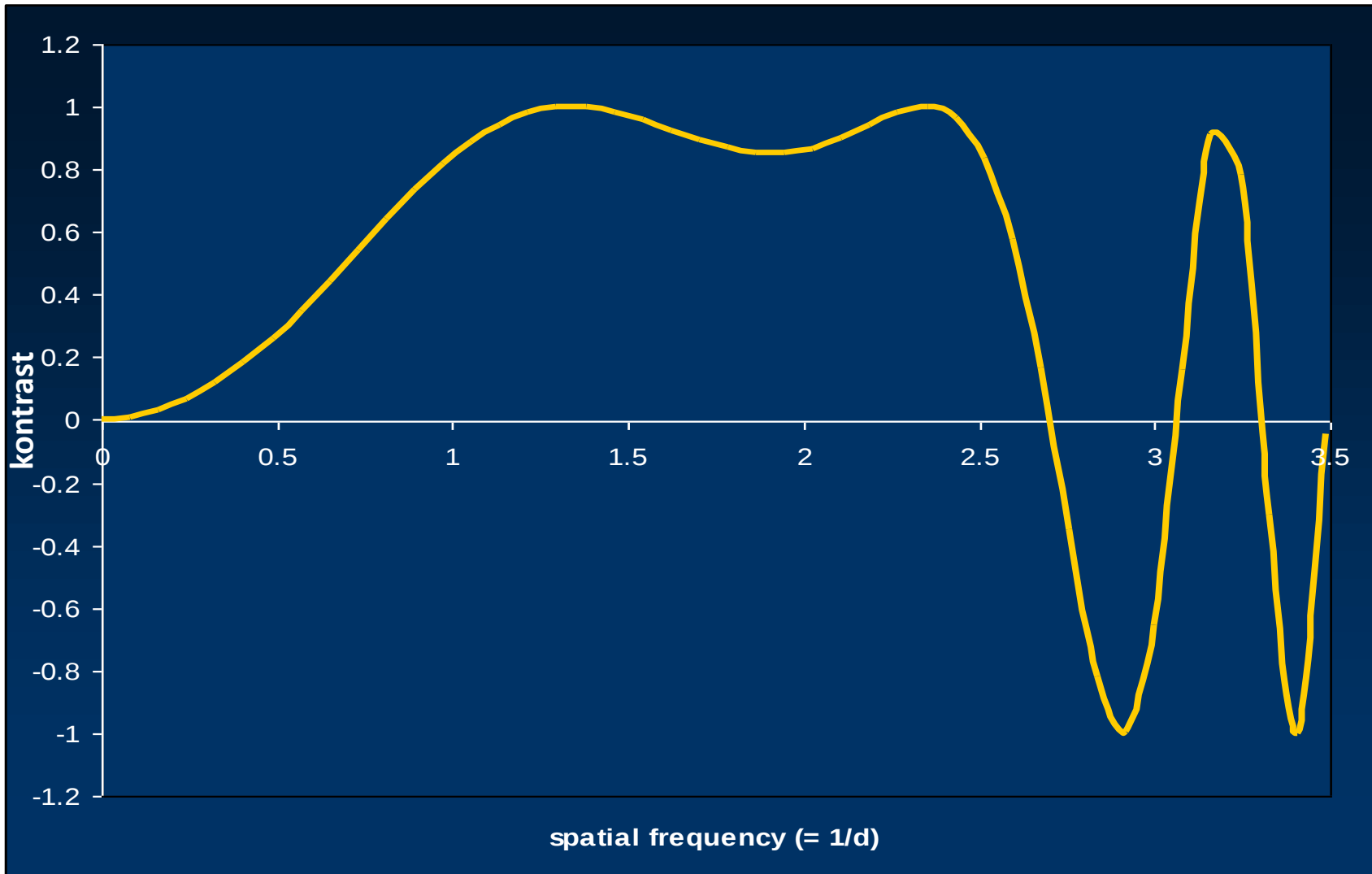
Fázový kontrast v TEM

- důsledek interference ***elasticky rozptýlených elektronů s nerozptýleným svazkem elektronů***
- při nastavení TEMu mimo fokus (underfocus/overfocus) mají rozptýlené vlny v zadní ohniskové rovině ***různý fázový rozdíl*** – nutná podmínka pro vznik ***fázového kontrastu***
- velikost defokusu určuje velikost fázového rozdílu



Fázový kontrast v TEM

- fázový kontrast je popsán tzv. *přenosovou funkcí fázového kontrastu* (Phase Contrast Transfer Function (CTF)) – **průběh CTF určuje s jakým kontrastem TEM zobrazí určité detaily ($1/d$)**
- průběh **CTF** se mění s **velikostí defocusu** $\Rightarrow$ hodnota defocusu určuje, které detaily ($1/d$) se v obraze zobrazí s kladným nebo inverzním kontrastem, příp. s nulovým kontrastem (neviditelné)



Vliv CTF na výsledný obraz v TEM

- průběh CTF a tudíž i kontrast různých detailů v obraze závisí na hodnotě defocusu TEMu

Original



With Transfer Function



Albert Einstein in his study. Haberlandstraße, Berlin

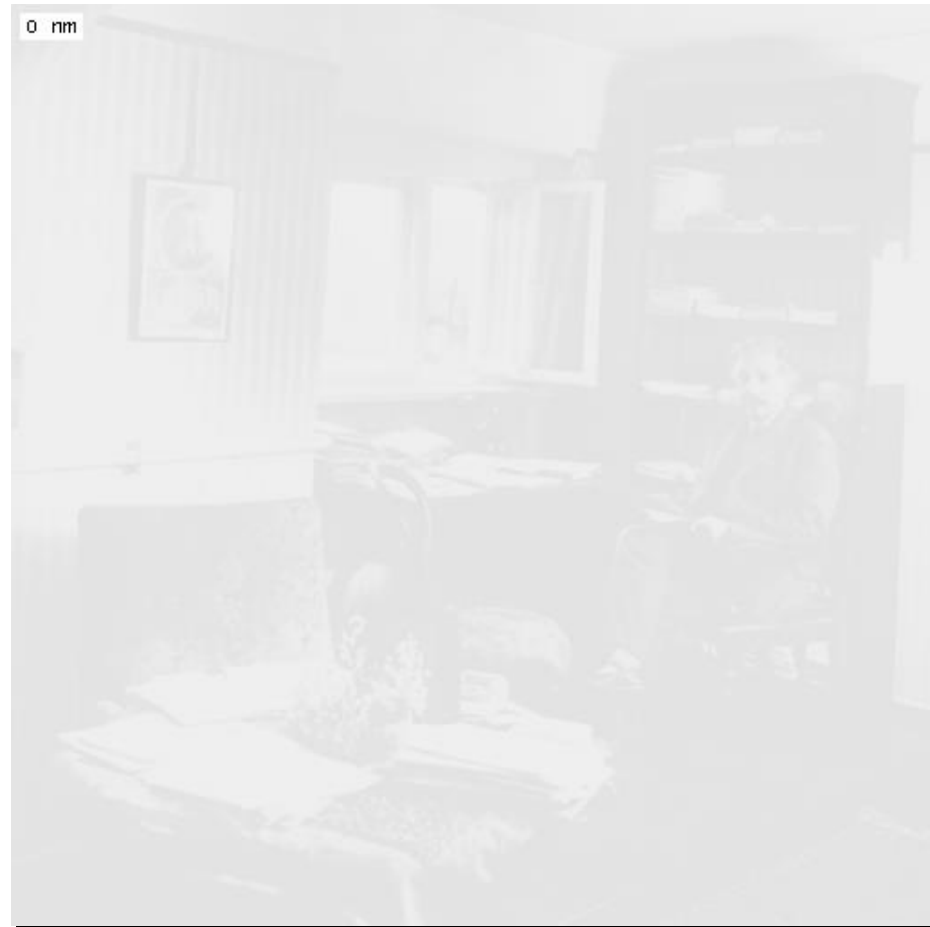
Vliv CTF na výsledný obraz v TEM

- pro defocus = 0 (TEM je ve fokusu) je fázový kontrast rovný nule, kontrast ve snímku závisí pouze na rozptylovém kontrastu

Original



With Transfer Function



Shrnutí: kontrast v TEM

- kontrast v obraze (rozptylový a fázový) závisí na složení vzorku

rozptylový kontrast

- dominantní u těžkých prvků

fázový kontrast

- v závislosti na nastavení defokusu může zviditelnit nebo naopak „schovat“ určité detaily struktury vzorku
- může vést k zobrazení určitých detailů s inverzním kontrastem
 - Interpretace snímků není přímočará, je nutné počítačová úprava snímků
- fázový kontrast je dominantní forma kontrastu u *kryogenní mikroskopie*
 - metoda kryogenní mikroskopie – studium vzorků ve zmraženém stavu (Nobelova cena za chemii v r. 2017)

Detekce obrazu vytvořeného elektrony v TEM

- přeměnou kinetické energie elektronů na světlo – přímé pozorování
 - dopadem elektronů na fotografickou emulzi – záznam obrazu
1. *stínítko mikroskopu* – elektrony dopadají na stínítko s luminoforem (jako dřívější TV)
 - nejčastěji se používá fosfor (zelená fosforescence), ZnS, atd.
 2. *TV kamera* – poskytuje živý obraz, lepší kontrast v porovnání se stínítkem
 - postupně je vytlačována na digitálními detektory
 3. *fotografický film* – fotografická emulze je citlivá jak na světlo tak na elektrony
 - film ve formátu fotografických desek (100 x 80 mm)
 - vrstva fotografické emulze obsahující světlocitlivé krystalky (např. AgJ, AgBr, AgCl)
 - dopadem elektronů na emulzi dojde k fotochemické reakci a vytvoří se latentní obraz
 - vyvolávacím procesem se latentní obraz přemění na viditelný
 - krystalky AgJ (AgBr, AgCl) se rozdělí na stříbro a jód (bróm, chlór)
 - místa více osvětlená (ozářená elektrony) se na negativu jeví tmavší (více Ag), tedy na pozitivu světlejší

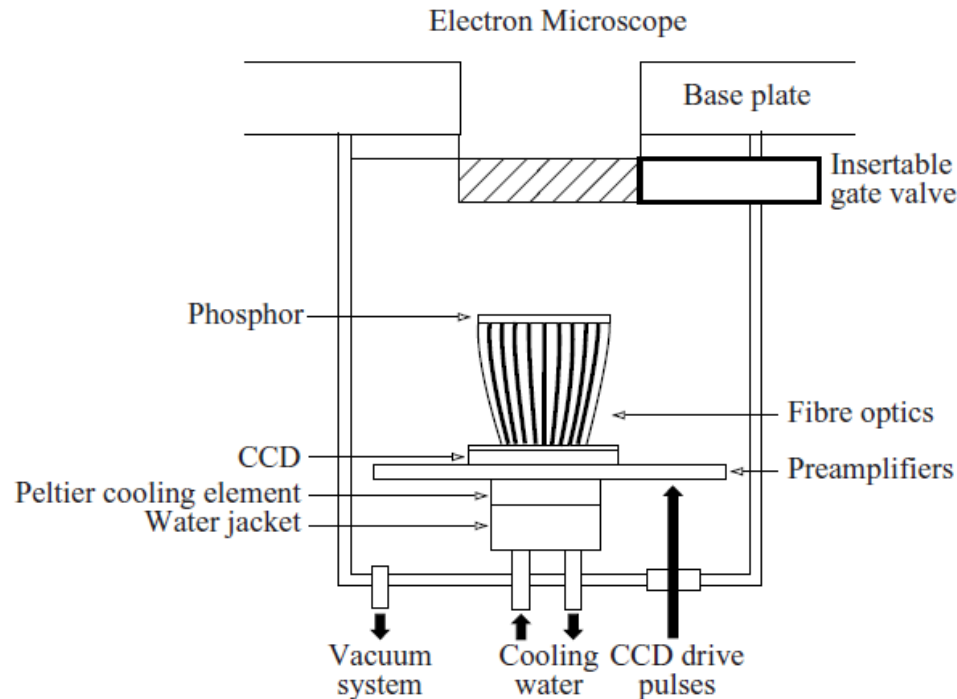
Nevýhody - omezený počet snímků v jedné kazetě (nutná výměna)

- zdlouhavý proces vyvolání filmů
- nutná digitalizace snímků – nákladné skenery
- postupně nahrazován digitálními detektory

Detekce obrazu vytvořeného elektrony v TEM

4. CCD kamery (Charge-Coupled Device)

- převod elektronů na foton a pak na elektrický signál
- umožňují online snímání obrazu – vhodné pro seřízení mikroskopu
- digitální záznam snímků vzorku s velikostí čipu od 1k x 1k do 4k x 4k
- relativně rychlý záznam, jednoduché ukládání, zpracování, atd.

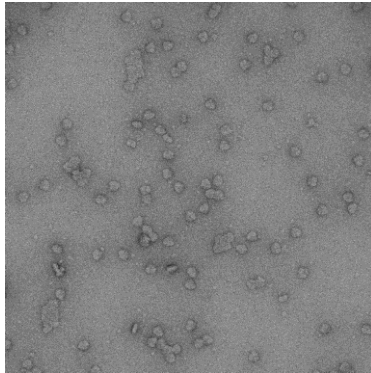


- CCD čip je spojen skleněnými vlákny (vysoká odrazivost) s luminiscenční vrstvou
- chlazení CCD čipu pro eliminaci temného proudu
- fyzická velikost pixelu CCD čipu: např. $9\text{ }\mu\text{m} \times 9\text{ }\mu\text{m}$, efektivní velikost: $18\text{ }\mu\text{m} \times 18\text{ }\mu\text{m} \Rightarrow$ závisí na „point spread function“ – foton do/z optického vlákna není zaznamenán pouze jedním pixelem CCD čipu, ale i sousedními pixely

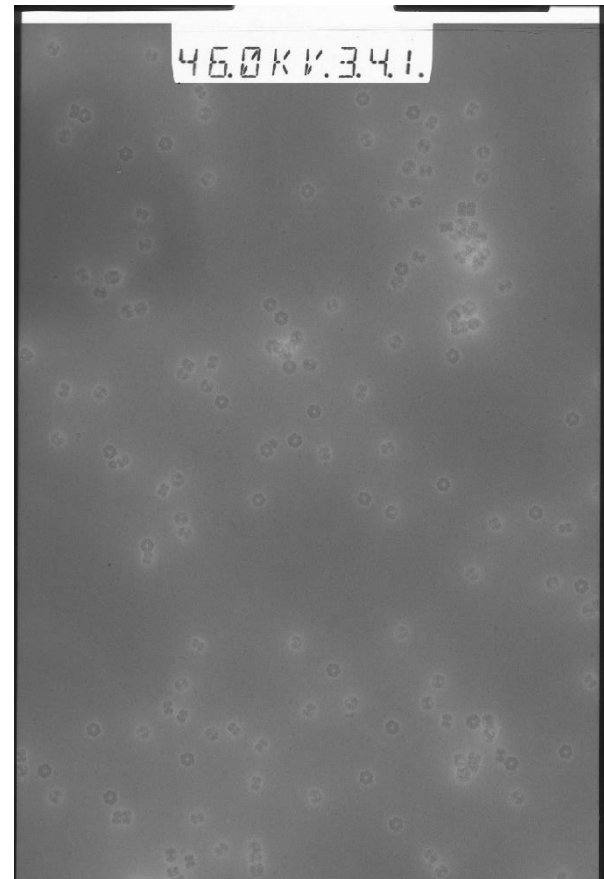
Detekce obrazu vytvořeného elektrony v TEM

Srovnání fotografického film a CCD kamery

CCD kamera



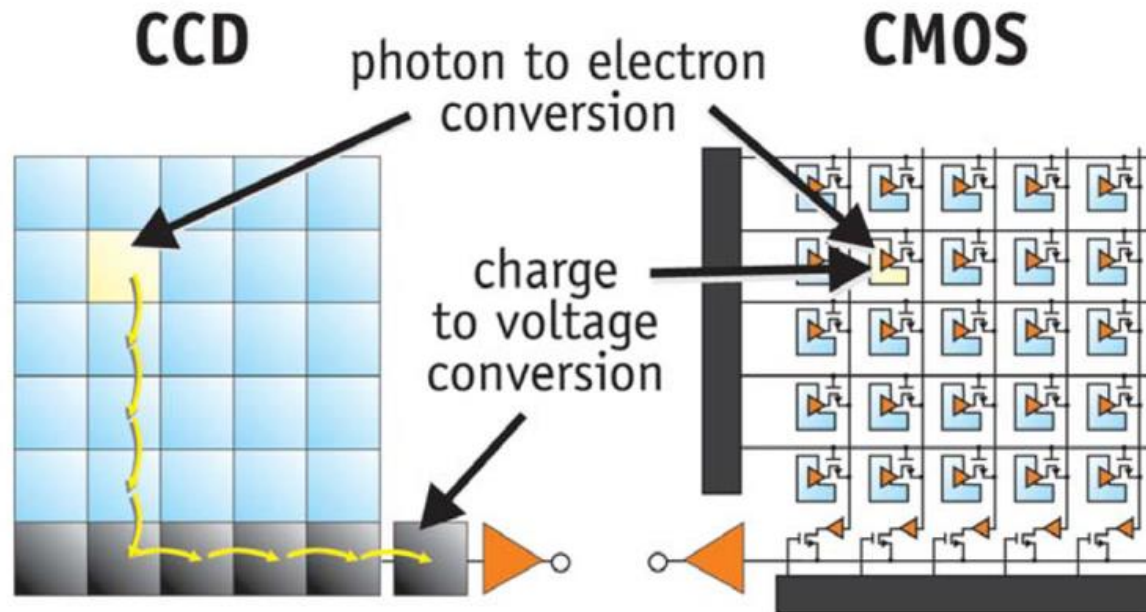
Fotografický film



Detekce obrazu vytvořeného elektrony v TEM

5. CMOS kamery (Complementary Metal-Oxide-semiconductor)

- detektor typu CMOS je spojen optickými vlákny s luminiscenční vrstvou
- od CCD detektoru se liší způsobem zpracování signálu



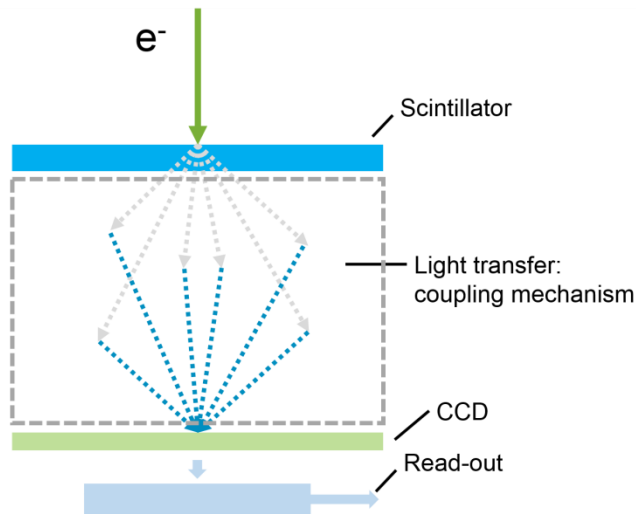
CCDs move photogenerated charge from pixel to pixel and convert it to voltage at an output node. CMOS imagers convert charge to voltage inside each pixel.

Detekce obrazu vytvořeného elektrony v TEM

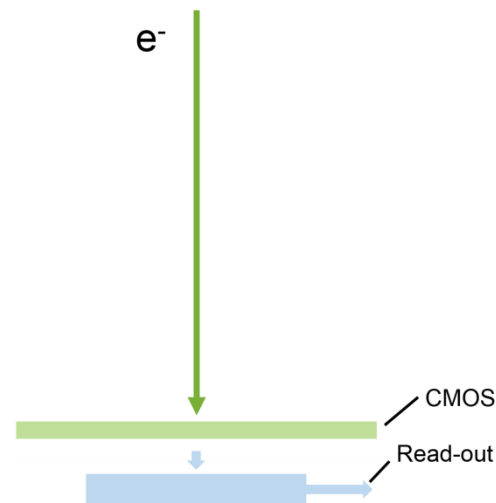
6. *Přímé detektory elektronů (Direct Detection camera)*

- detektor jednotlivých elektronů
- nevyužívají scintilační vrstvu ani vláknovou optiku
- konstrukce detektoru typu CMOS umožňuje přímou detekci elektronů

CCD/CMOS s vláknovou optikou



Přímý detektor



- nejnovější přímý detektor s rozlišením 24 megapixelů umožňuje záznam až 1500 snímků/sec - eliminace „driftu“ vzorku $\Rightarrow$ umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení
- ***zavedení přímých detektorů představuje revoluci v elektronové mikroskopii*** (kryogenní elektronové mikroskopii) – umožňuje získání ***struktury proteinů se stejným rozlišením jako metoda RTG krystalografie***, ale ***bez nutnosti krystalizace proteinu***

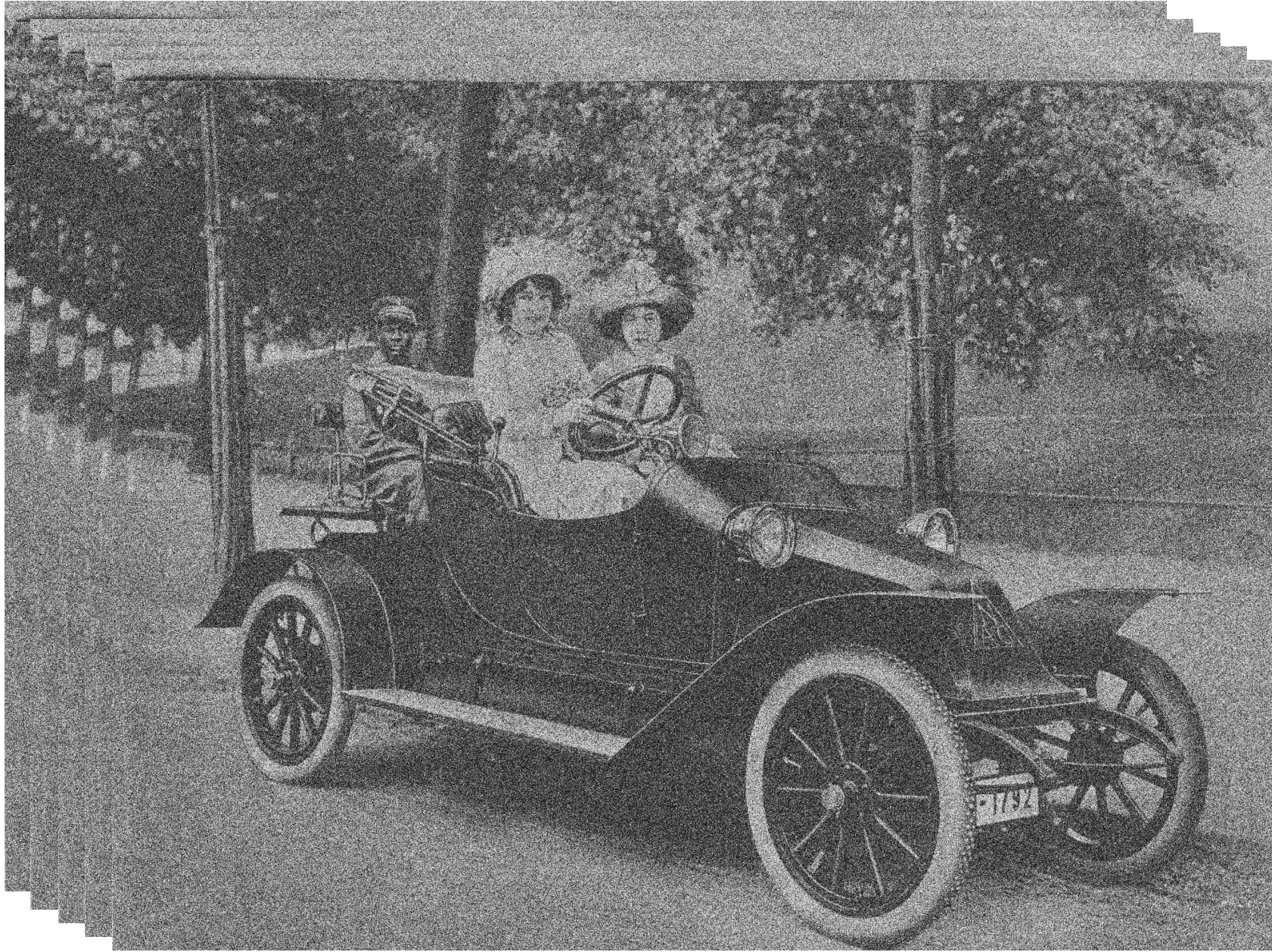
Eliminace driftu díky přímému detektoru elektronů

Klasická CCD kamera s 1 sec expozicí – drift vzorku způsobí rozmazání obrazu



Eliminace driftu díky přímému detektoru elektronů

„movie-mode“ přímého detektoru – rozdělení 1 sec expozice do kratších expozic



Eliminace driftu díky přímému detektoru elektronů

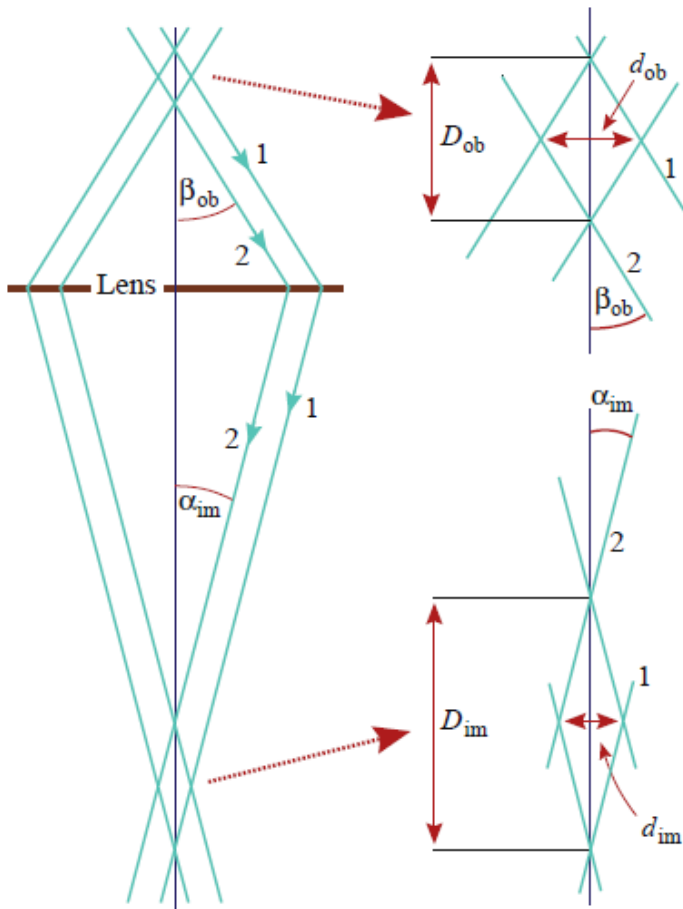
srovnání a zprůměrování jednotlivých snímků z „movie“ – **eliminace driftu**, tj. **vyšší rozlišení**



Zvětšení a hloubka ostrosti v TEM

- paprsek 1 a 2 vychází nad a pod *bodem* vzorku, který je zaostřen, a vytváří obraz v obrazové rovině
 - d_{ob} a d_{im} představují minimální velikost danou rozlišovací mezí
 - D_{im} má význam hloubky ostrosti
- příčné zvětšení (M_T) a úhlové zvětšení (M_A) je dáno:

$$M_A = \frac{\alpha_{im}}{\beta_{ob}}, MT = \frac{d_{im}}{d_{ob}}, MT = \frac{1}{M_A}$$



- pro aperturní úhel platí: $\beta_{ob} \cong \tan \beta_{ob} = \frac{d_{ob}/2}{D_{ob}/2}$

$$\alpha_{im} \cong \tan \alpha_{im} = \frac{d_{im}/2}{D_{im}/2}$$

- hloubka ostrosti:

$$D_{im} = \frac{d_{im}}{\alpha_{im}} = \frac{d_{im}}{\beta_{ob}} \cdot MT = \frac{d_{ob}}{\beta_{ob}} \cdot MT^2$$

- pro objekt $d_{ob} = 0.2 \text{ nm}$, $\beta_{ob} = 10 \text{ mrad}$, $M = 50\,000\times$
- $D_{im} = 50\text{m!}$
- umístění kamery pod stínítko mikroskopu nevyžaduje změnu fokusu (defokusu)
- Pozn. zvětšení na úrovni kamery je větší než na stínítku!

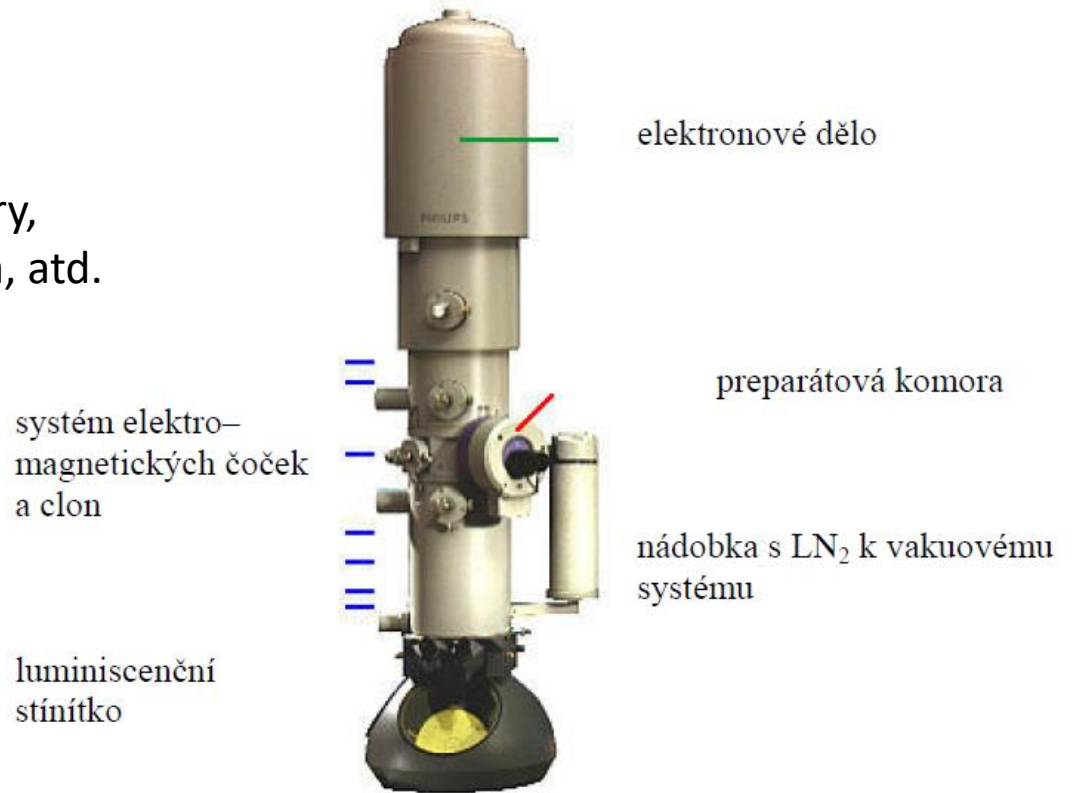
Konstrukce TEM

Čtyři základní stavební a funkční prvky elektronového mikroskopu:

- zdroj elektronů
- elektromagnetické čočky – kondenzorové čočky, objektivová čočka, projektivní čočky
- preparátový stolek (držák, goniometr)
- vakuový systém

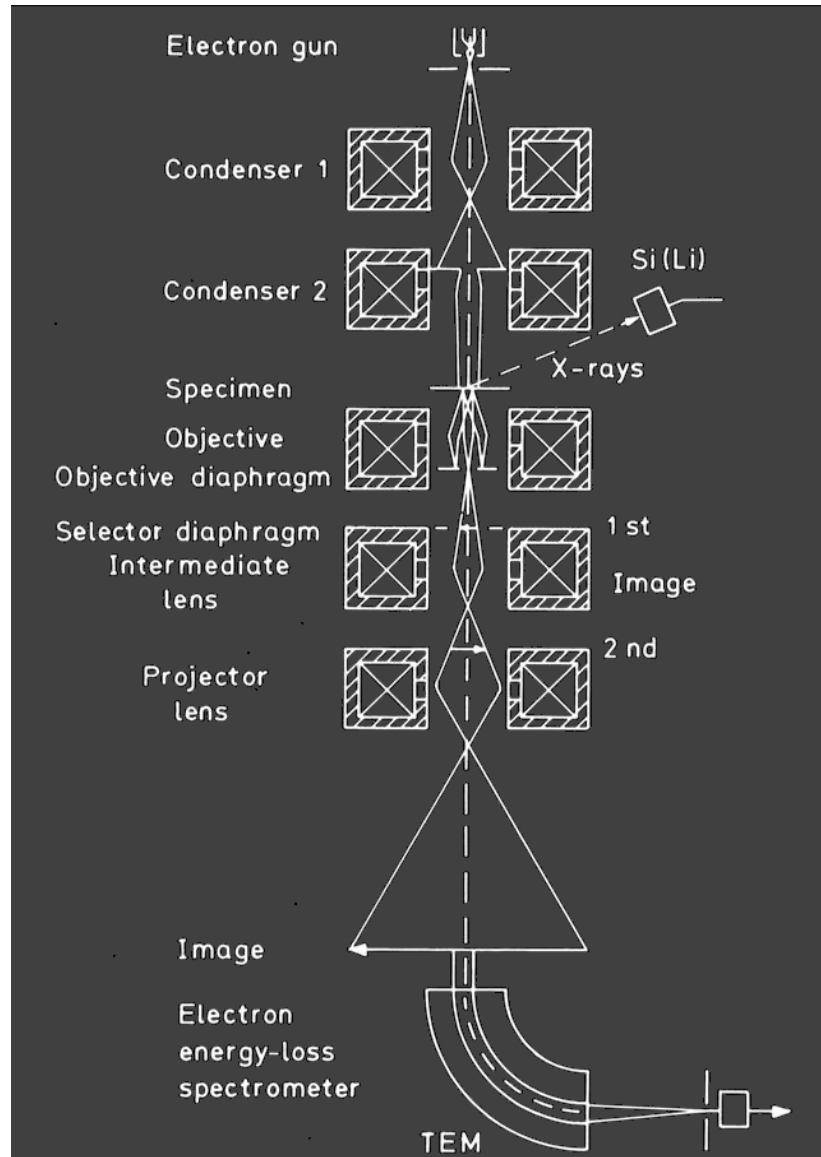
Dále obsahuje:

- antikontaminátor (nádobka LN_2)
- kamera
- energetický filtr, přídavné detektory, aberační korektory, fázová destička, atd.



obrázek tubusu TEM

Základní konstrukce TEM



- kondenzorové čočky osvětlují vzorek

- objektiv vytváří primární obraz

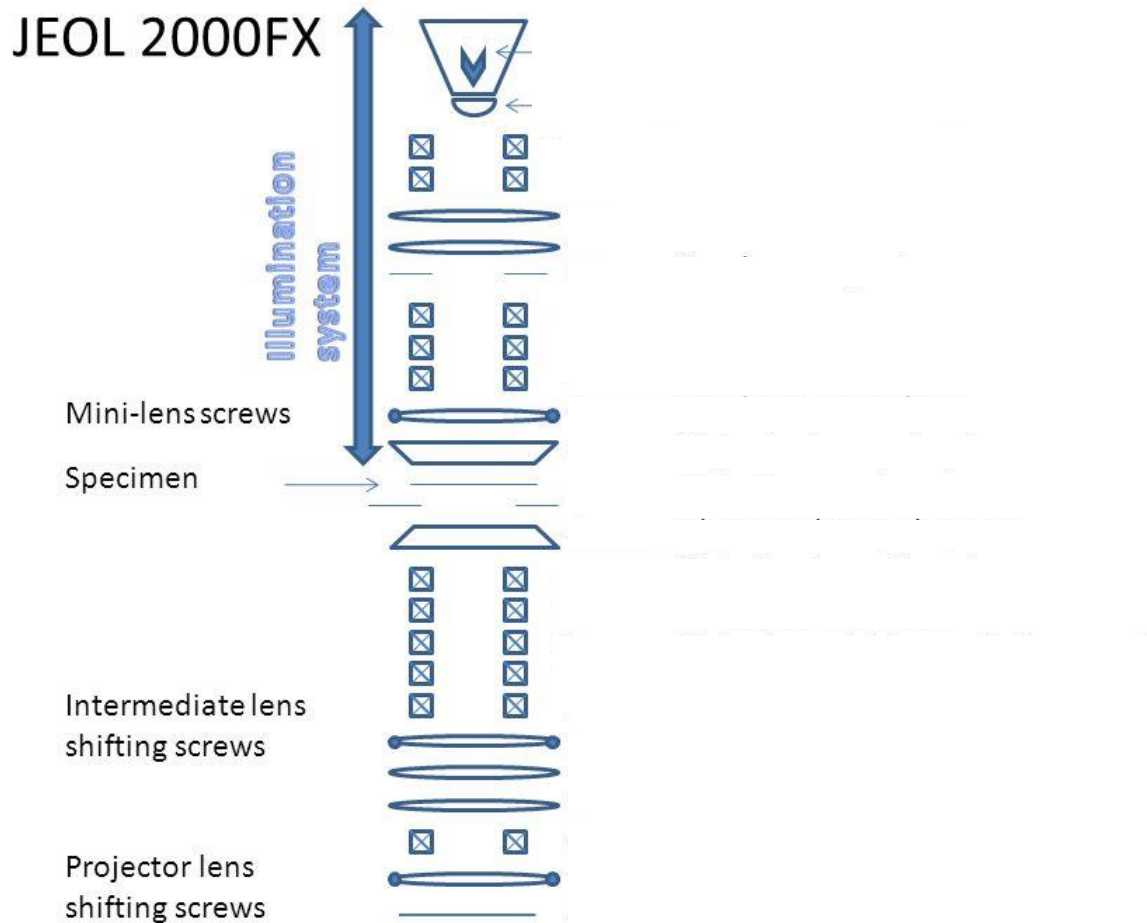
- projekční čočky dále zvětšují primární obraz

- luminiscenční stínítko

- energetický filtr a detekční kamera

- množství čoček se může lišit dle modelu (kondenzor, projektor)
- schéma nezobrazuje přídatné čočky (korekční, deflektory – vychylují paprsek)

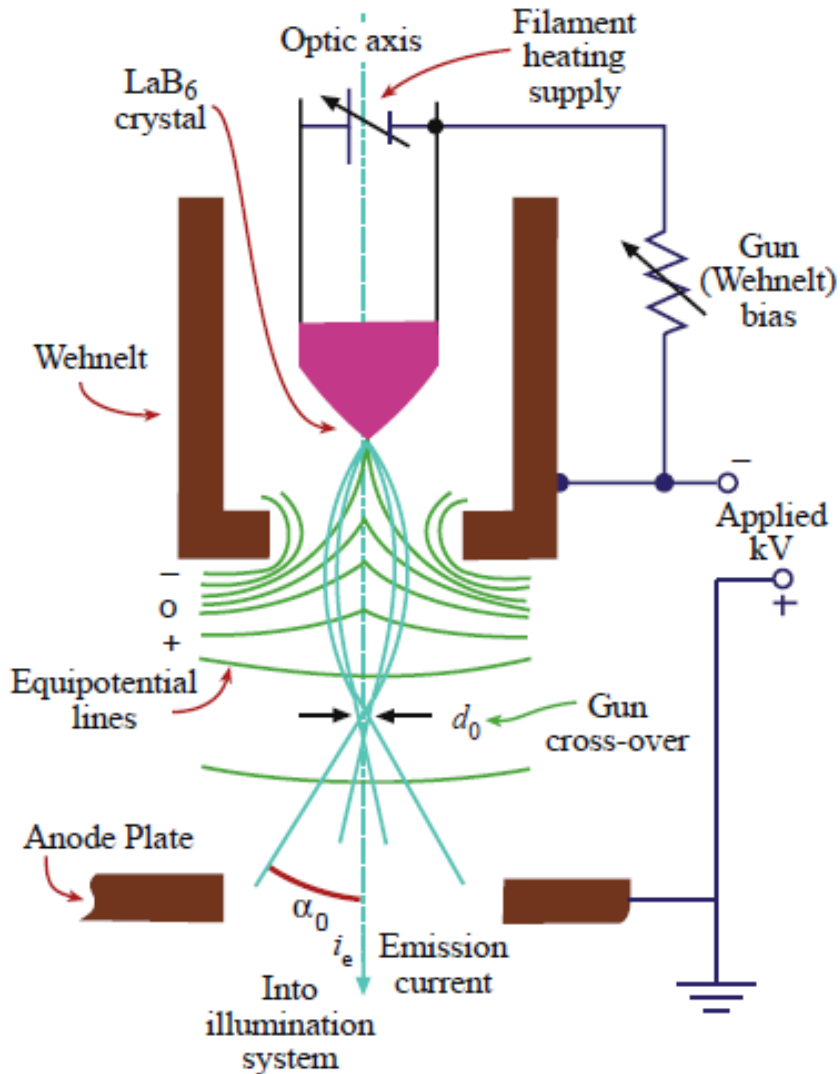
Tubus TEM – detailnější schéma



- malé čočky mají za úkol paprsek vycentrovat s optickou osou (posun, náklon) a korigovat aberace
- kondenzor i objektivová čočka jsou doplněny o clony (apertury)
 - clona kondenzoru – odcloní mimoosové el. svazky, velikost clony ovlivňuje intenzitu el. Svazku
 - clona objektivu – zvyšuje kontrast (odcloní rozptýlené paprsky pod velkým úhlem)
 - je umístěna v zadní ohniskové rovině $\Rightarrow$ limituje rozlišení

Elektronové dělo

Termoemisní zdroj a urychlovač elektronů



- žhavení vlákna vede k emisi elektronů z katody, které jsou přitahovány anodou
- Wehneltův válec (potenciál cca -100V) obklopuje katodu a fokusuje emitované elektrony $\Rightarrow$ vytváří křížiště („gun cross-over“)
- velikost křížiště d_0 odráží kvalitu zdroje
- urychlovací napětí 100 až 300 kV (obvyklá hodnota TEM)

Elektronové dělo

Zdroj elektronů:

termoemisní zdroj

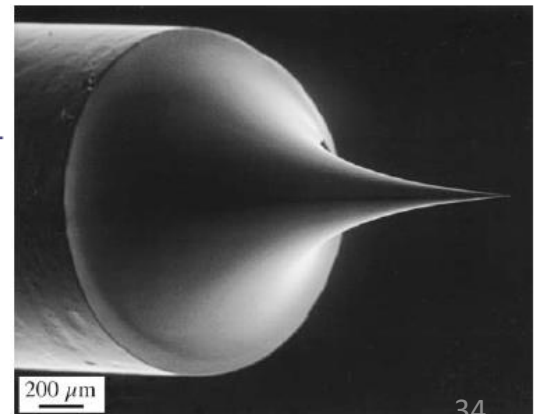
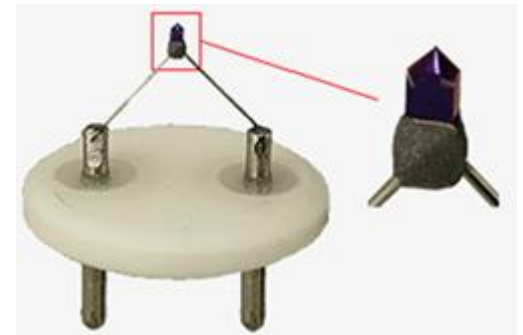
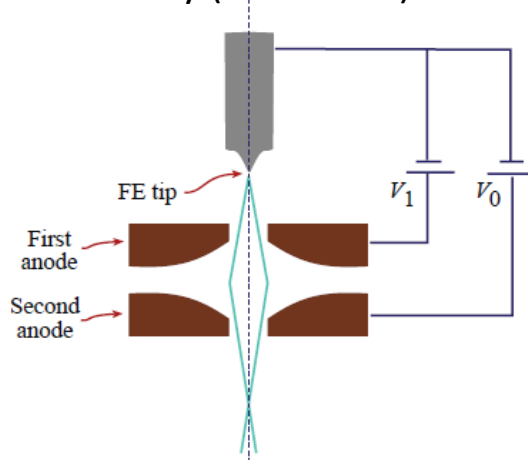
- přímo žhavené wolframové vlákno (2700 °C)
- elektrony jsou emitovány přímo z hrotu wolframového vlákna
- vydrží několik měsíců

katoda LaB_6

- termo emise elektronů z krystalu hexaboridu lanthanu
- emitované elektrony mají užší „energy spread“
- delší životnost (1-2 roky)

autoemisní

- zdroj FEG (field emission gun)
- studený nebo Schottky typ (částečně se zahřívá)
- vysoké napětí mezi první anodou a hrotem katody (několik kV) způsobí extrakci elektronů z hrotu
- druhá anoda urychluje elektrony



Srovnání parametrů různých typů elektronového děla

	Units	Tungsten	LaB ₆	Schottky FEG	Cold FEG
Operating temperature	K	2700	1700	1700	300
Current density (at 100 kV)	A/m ²	5	10 ²	10 ⁵	10 ⁶
Crossover size	nm	> 10 ⁵	10 ⁴	15	3
Brightness (at 100 kV)	A/m ² sr	10 ¹⁰	5 × 10 ¹¹	5 × 10 ¹²	10 ¹³
Energy spread (at 100 kV)	eV	3	1.5	0.7	0.3
Emission current stability	%/hr	<1	<1	<1	5
Vacuum	Pa	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹
Lifetime	hr	100	1000	>5000	>5000

Elektromagnetické čočky

- v elektromagnetické čočce indukuje procházející elektrický proud magnetické pole
- v homogenním magnetickém poli se **elektron pohybuje po šroubovici**

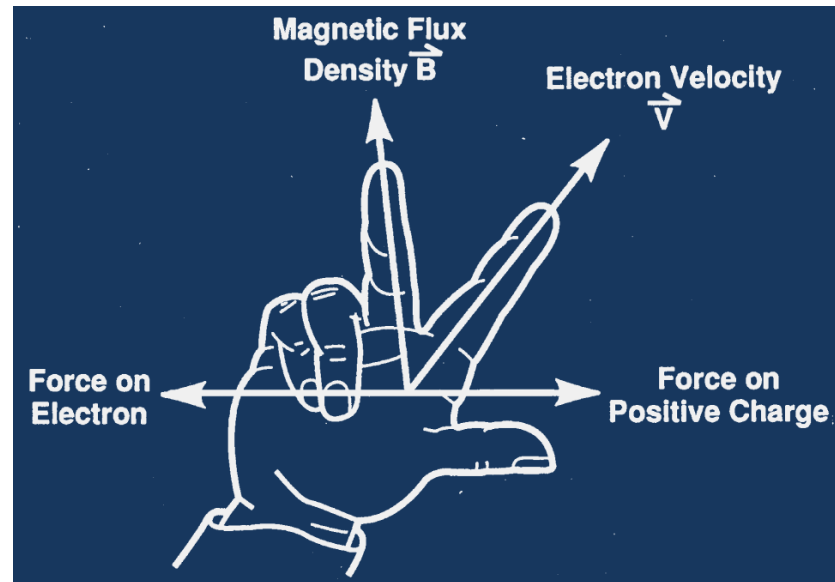
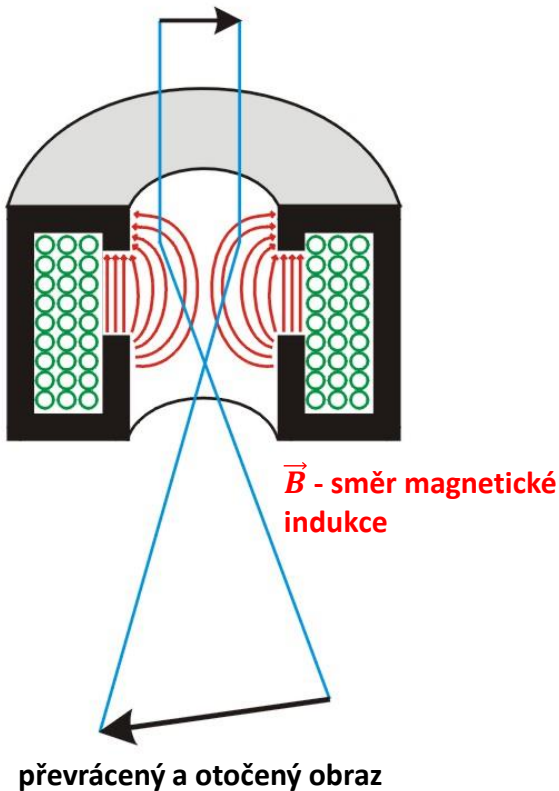
- v elmag. poli působí na náboj Lorentzova síla

$$\vec{F} = q \cdot (\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B})$$

- magnetické pole působí na elektron Lorentzovou silou:

$$\vec{F}_{mag} = q(\vec{v} \times \vec{B})$$
$$F_{mag} = eBv \sin \alpha = \frac{mv^2}{r}$$

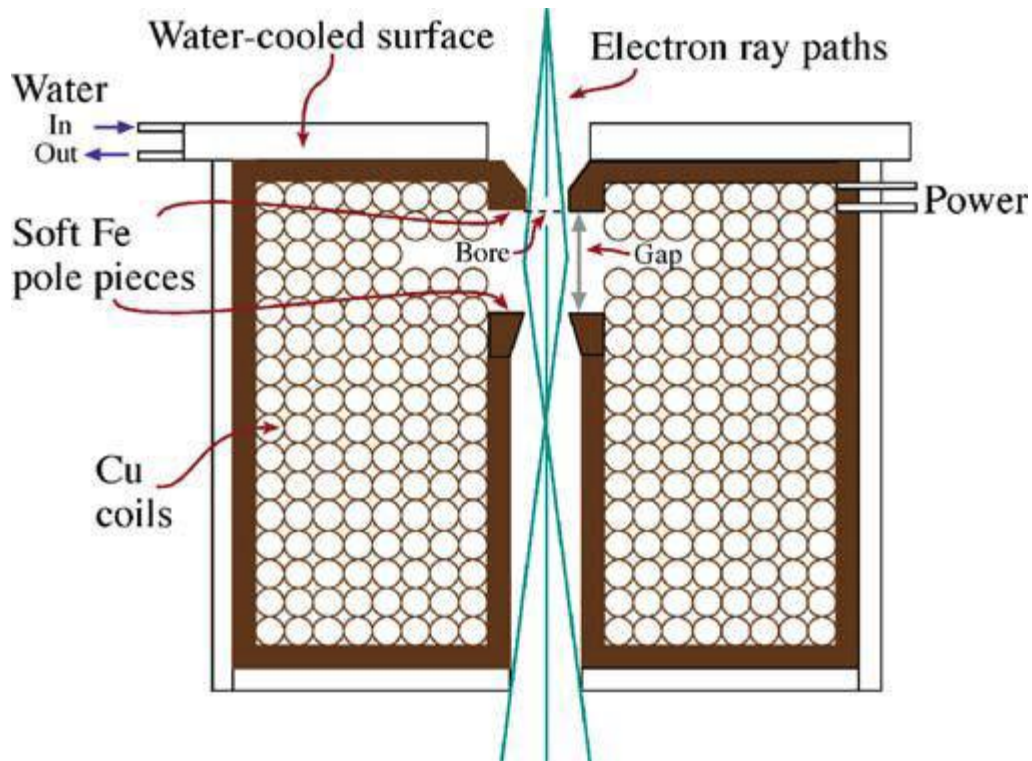
- složka $v_{//}$ - přispívá k rovnoměrnému pohybu
- složka $v_{\perp}$ - nutí elektron pohybovat se po kružnici



elektron pohybující se po šroubovici je čočkou díky F_{mag} fokusován do ohniska

Elektromagnetické čočky

Schematický řez elmag. čočkou

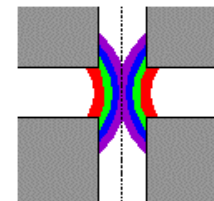


Pro ohniskovou vzdálenost čočky přibližně platí:

- možnost měnit ohniskovou vzdálenost změnou proudu ve vinutí cívky (solenoidu)
- magnetické pole v dutině cívky (čočky) se mění $\Rightarrow$ **aberace**

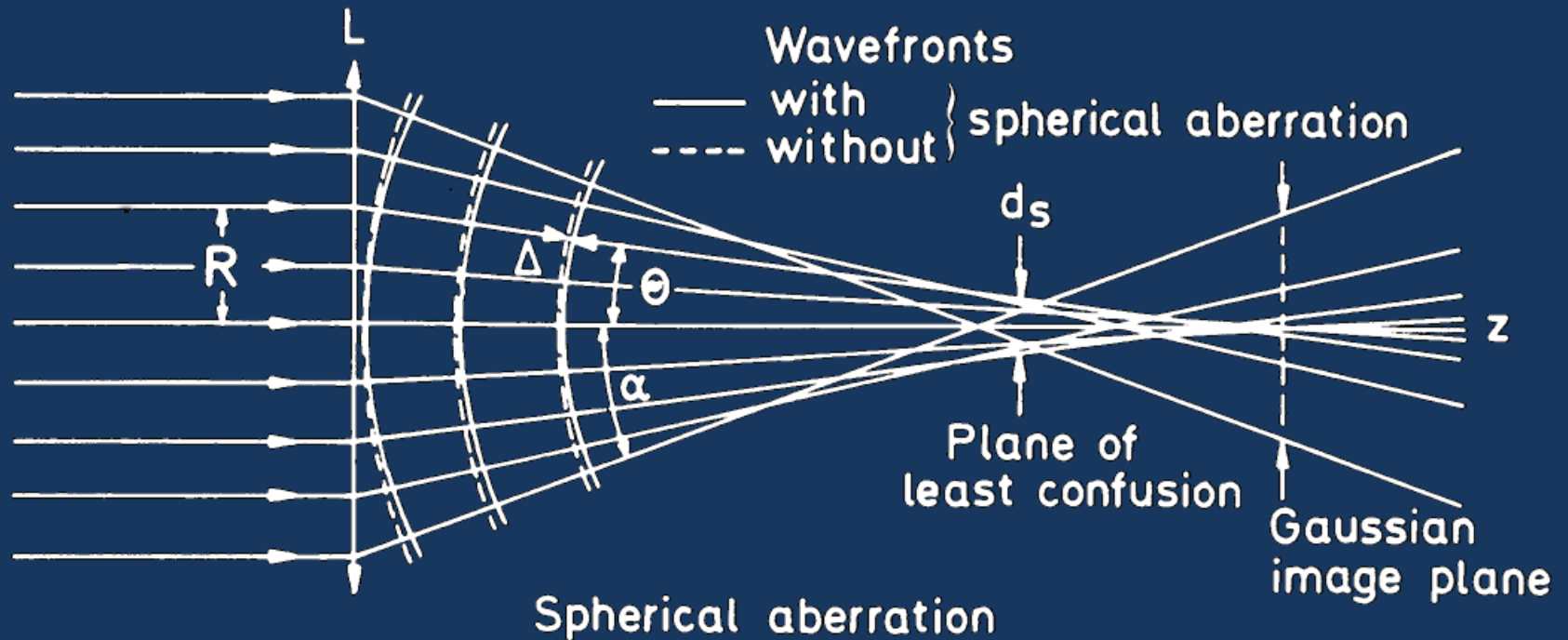
$$f = \frac{K \cdot U}{(N \cdot I)^2}, \quad K - \text{konst.}, \quad U - \text{urychl. napětí}$$

N – vlnutí, I – el. proud



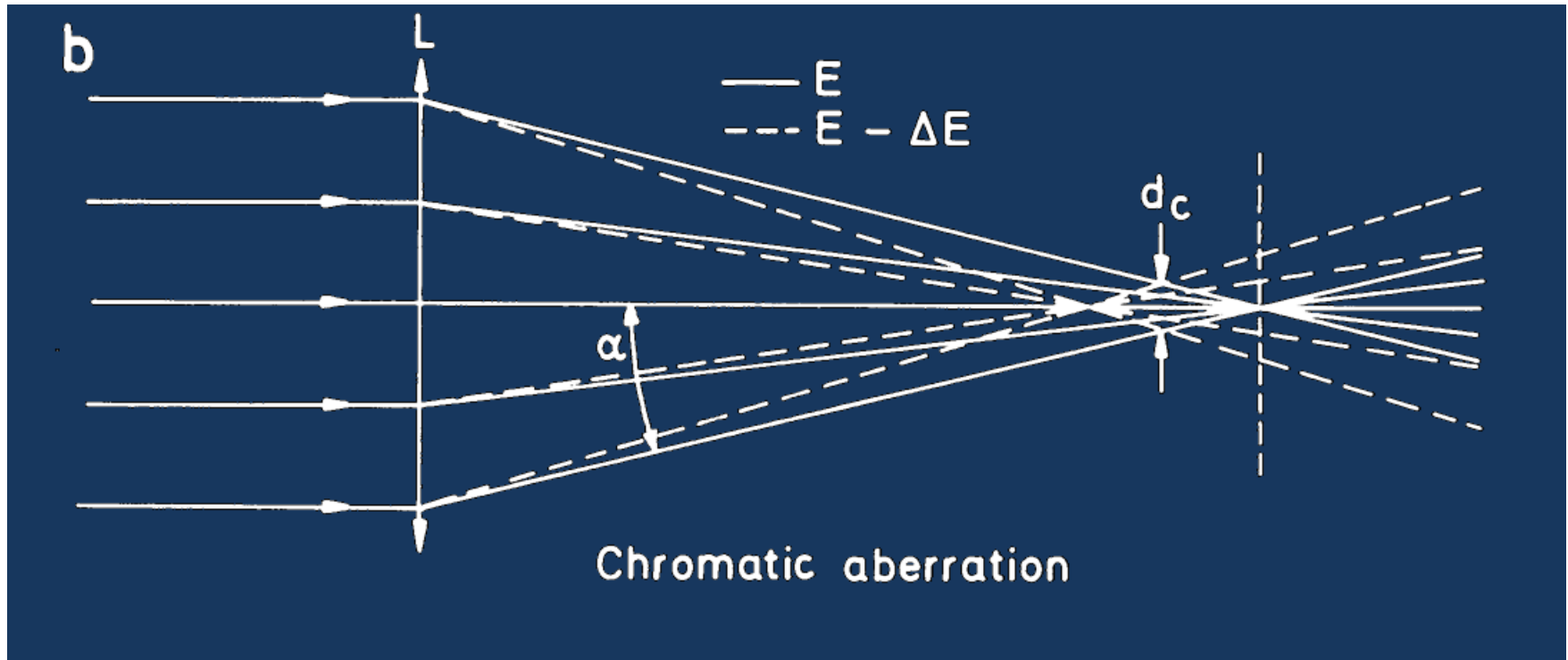
Sférická aberace

- paprsky procházející čočkou dále od středu čočky jsou více fokusované v porovnání s paprsky procházejícími blíže středu čočky
- bod se nezobrazí jako bod ale ploška o průměru $d = C_s \alpha^3 \Rightarrow$ limitace rozlišení
- korekce pomocí stigmátoru (C_s corrected TEM) – soustava korekčních cívek



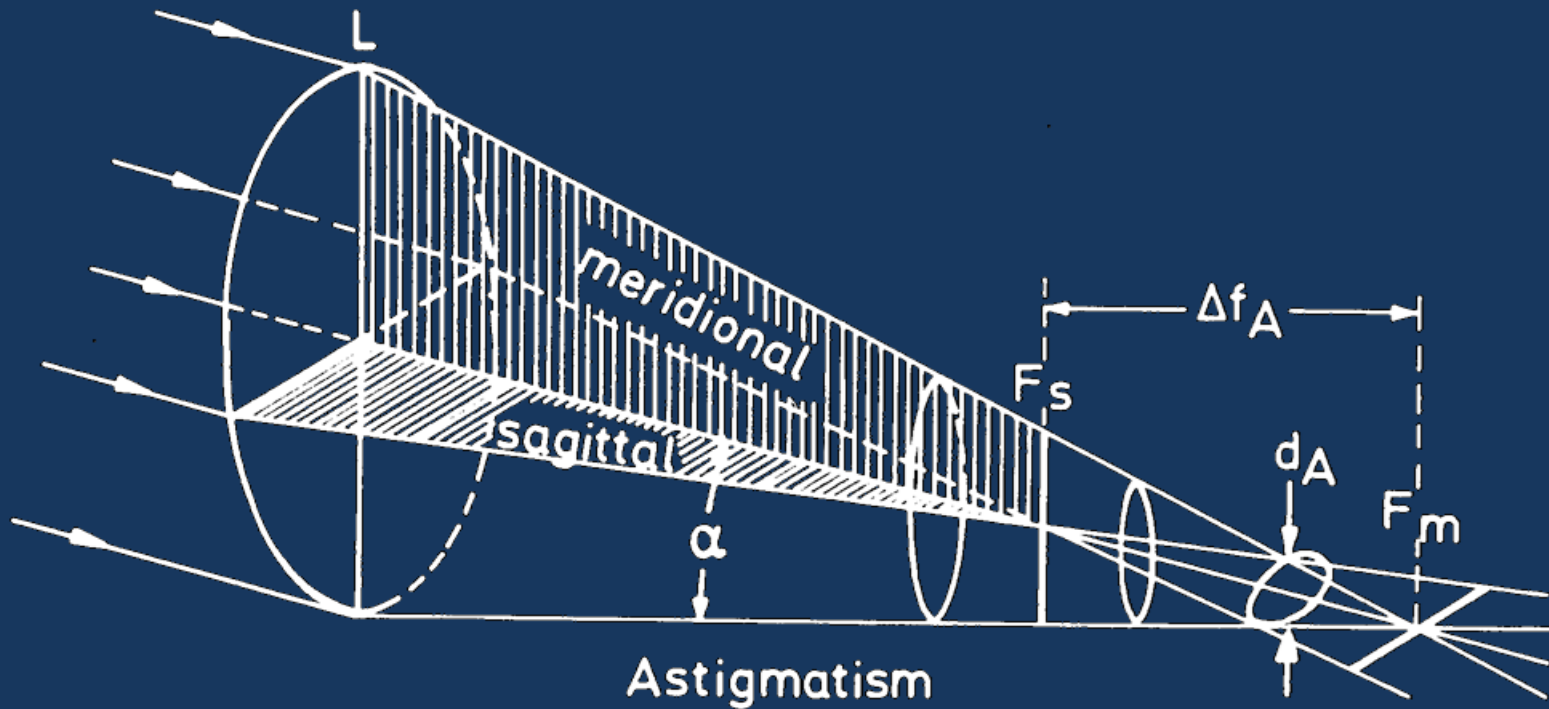
Chromatická aberace

- elektrony o různé energii jsou různě fokusovány (pomalejší jsou fokusovány výrazněji)
- ztráta energie díky neelastickému rozptylu
- roli hraje i kvalita zdroje elektronového svazku („energy spread“)
- chromatická aberace způsobí rozmazání obrazu



Astigmatismus

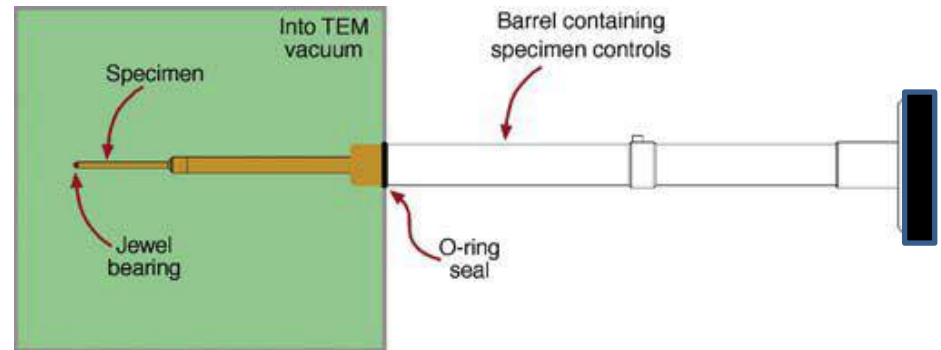
- nesymetrická fokusace čočkou
- bod se zobrazí jako protáhlá úsečka (elipsa)
- nutná korekce – korekční cívkky (standardní výbava TEM)
- astigmatické snímky jsou obvykle nepoužitelné



Držák vzorku a preparátová komora



Držák vzorku s těsnícím kroužkem



Goniometr

- přesný posuv držáku v osách x, y, z
- umožňuje náklon vzorku

- výměna vzorků – dvoufázový proces: (1) vyčerpat vzduch z preparátové komory, (2) transfer do tubusu
- držáky vzorků mají různou konstrukci a mechanismus vkládání do TEM

držák pro TEM při pokojové teplotě



držák pro TEM při kryogenní teplotě (77K)

