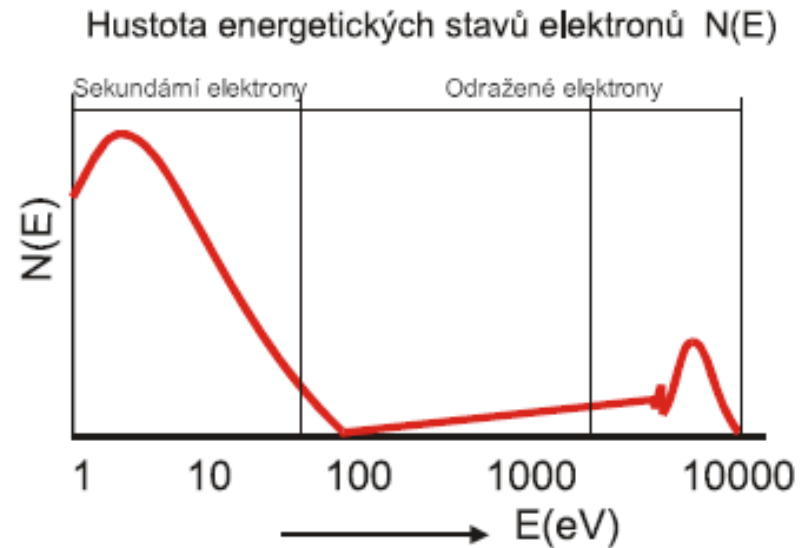
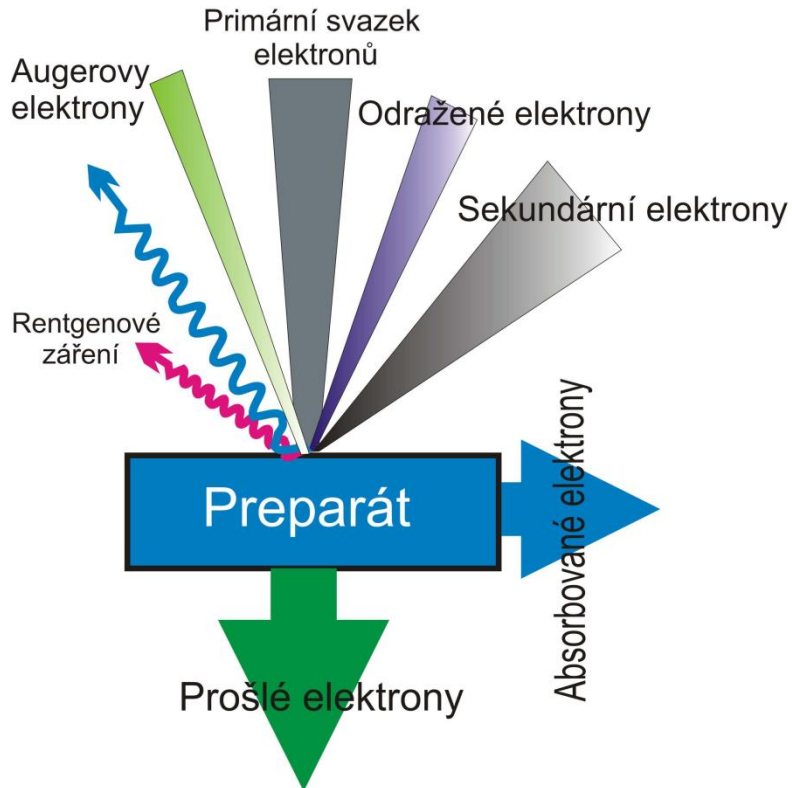


Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronová mikroskopie (REM) (Scanning Electron Microscopy – SEM)

- skenuje fokusovaný svazek elektronů o energii 10^3 až 10^5 eV po povrchu vzorků
- interakce *elektronový svazek – povrch vzorku* $\Rightarrow$ detekce odezvy – informace o fyzikálních a chemických vlastnostech zkoumaného vzorku



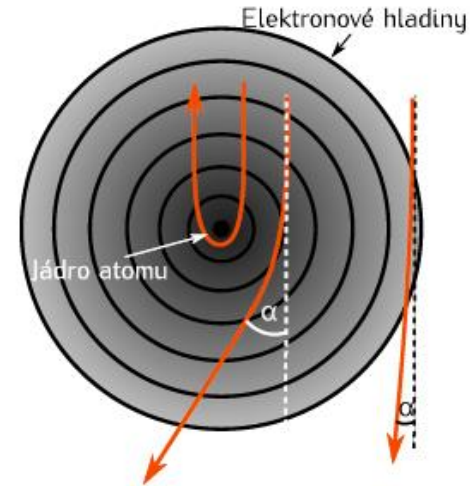
SEM - interakce elektronového svazku se vzorkem

Pružný (elastický) rozptyl

- zahrnuje coulombovskou interakci elektronu s jádrem
- elektrony rozptýleny pod velkým úhlem, odražené elektrony (BSE)

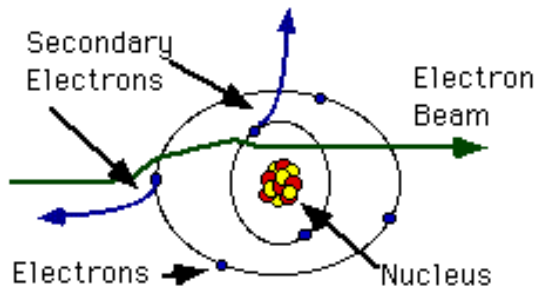
Nepružný (neelastický) rozptyl

- procesy generující RTG, sekundární a Augerovy elektrony



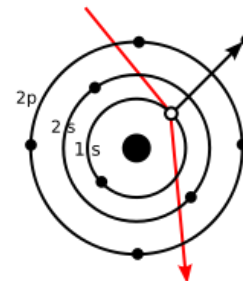
Sekundární elektrony (SE)

- primárním svazkem excitovaná molekula emituje elektrony z vnějších slupek – **valenční elektrony**
- uvolněné elektrony mají energii do 50 eV

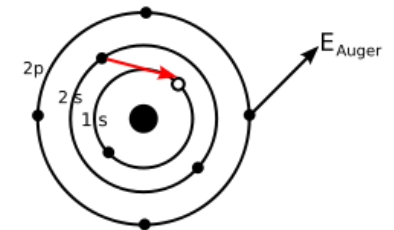


Augerovy elektrony

- elektron je vyražen z atomu v důsledku emise sekundárního elektronu (z vnitřní slupky) a následném předání energie při zaplnění vzniklé díry



Electron collision

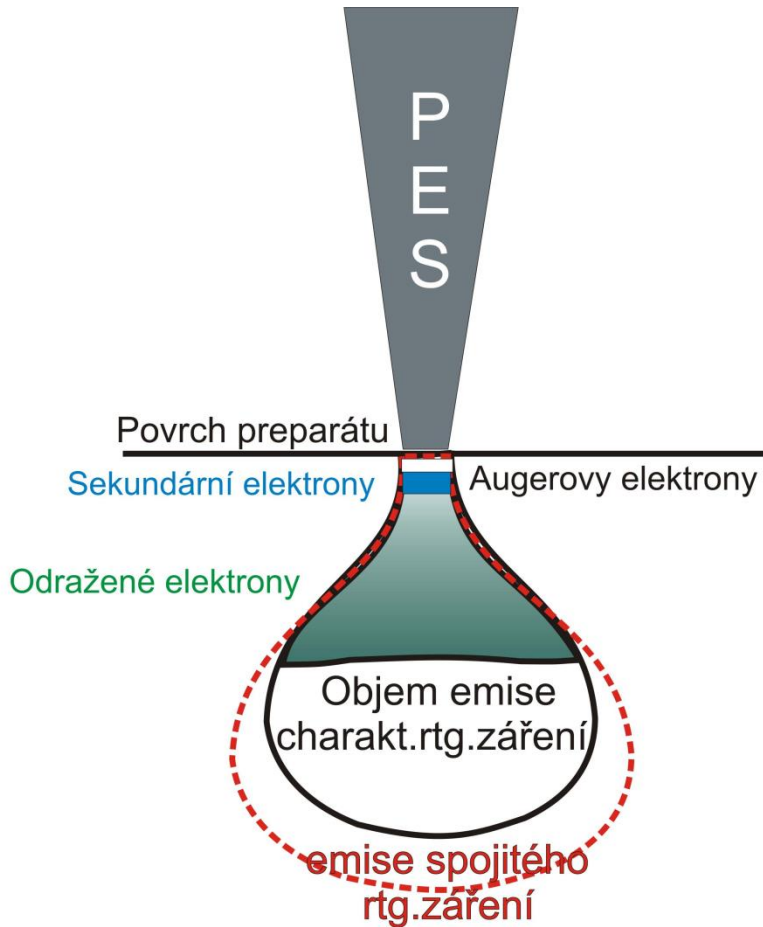


Auger electron emission

Každý druh signálu odráží **specifické vlastnosti vzorku** – SEM využívá různé typy detektorů

SEM - interakce elektronového svazku se vzorkem

Excitační objem po dopadu
primárního elektronového svazku



Energie primárního svazku elektronů (PES)

- energie PES ovlivňuje tvar oblasti pod povrchem preparátu – nižší energie $\Rightarrow$ mělčí, ale širší oblast
- při nízké energii PES klesá rozlišovací schopnost REM

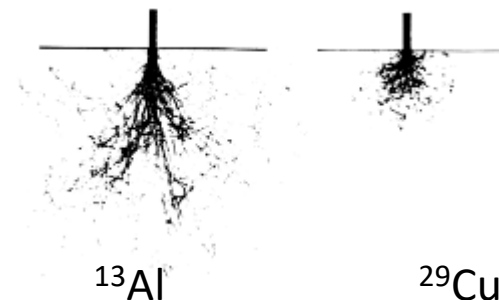
Složení vzorku:

- lehčí prvky – roste hloubka průniku PES
- těžké prvky – roste podíl odražených elektronů

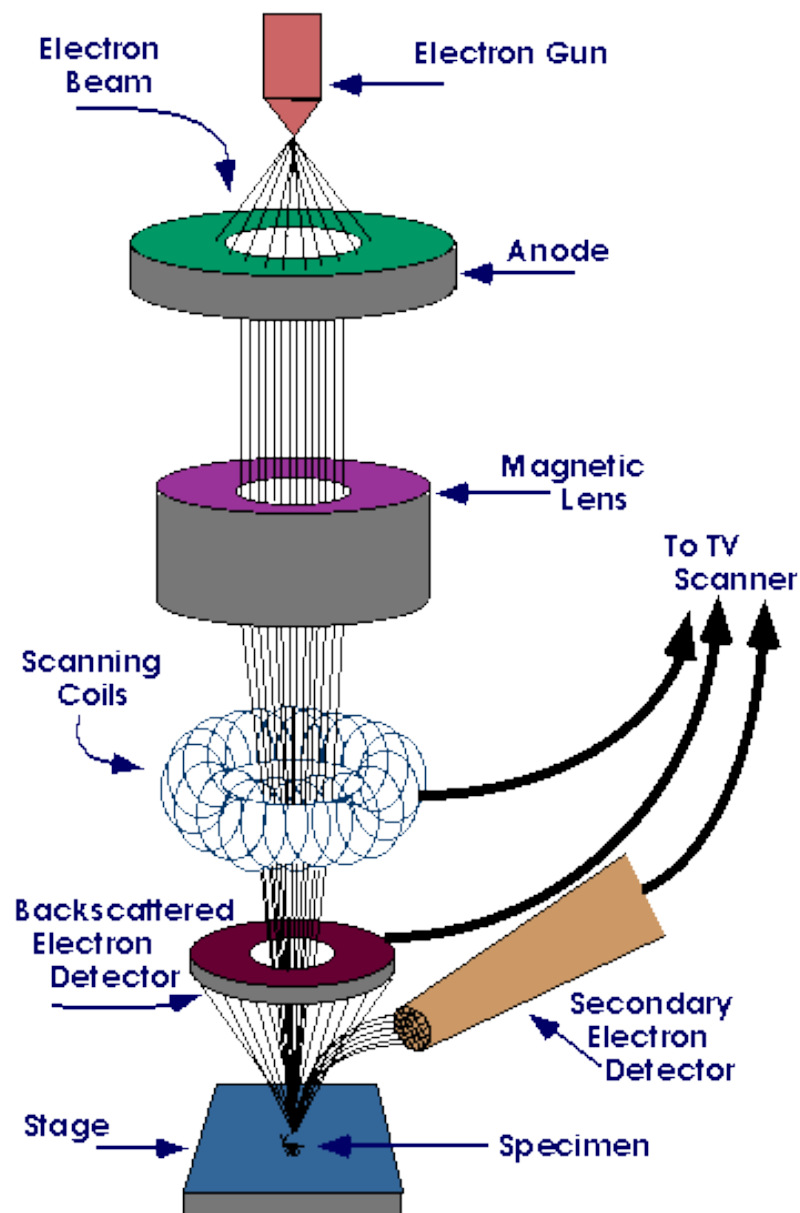
Interakce PES se vzorkem

- elektrony PES se ve vzorku pohybují náhodně (elastické/neelastické interakce)
- PES generuje další signály (sekundární, Augerovy elektrony, RTG)

Monte-Carlo simulace interakce PES se vzorkem



SEM - konstrukce a funkční prvky



- kondenzorový systém doplněn o vychylující cívky $\Rightarrow$ zajistí skenování vzorku elektronovým svazkem
- detektory pro sekundární odražené elektrony

SEM - konstrukce a funkční prvky

Electron gun

- přímo žhavená katoda (W)
- urychl. napětí: 1 – 50 kV

Elektron-optický systém

- 2 kondenzory
- objektivová čočka + stigmátor
- vychylovací rastrovací systém

Detektory

- detekce SE a BSE

Vakuový systém

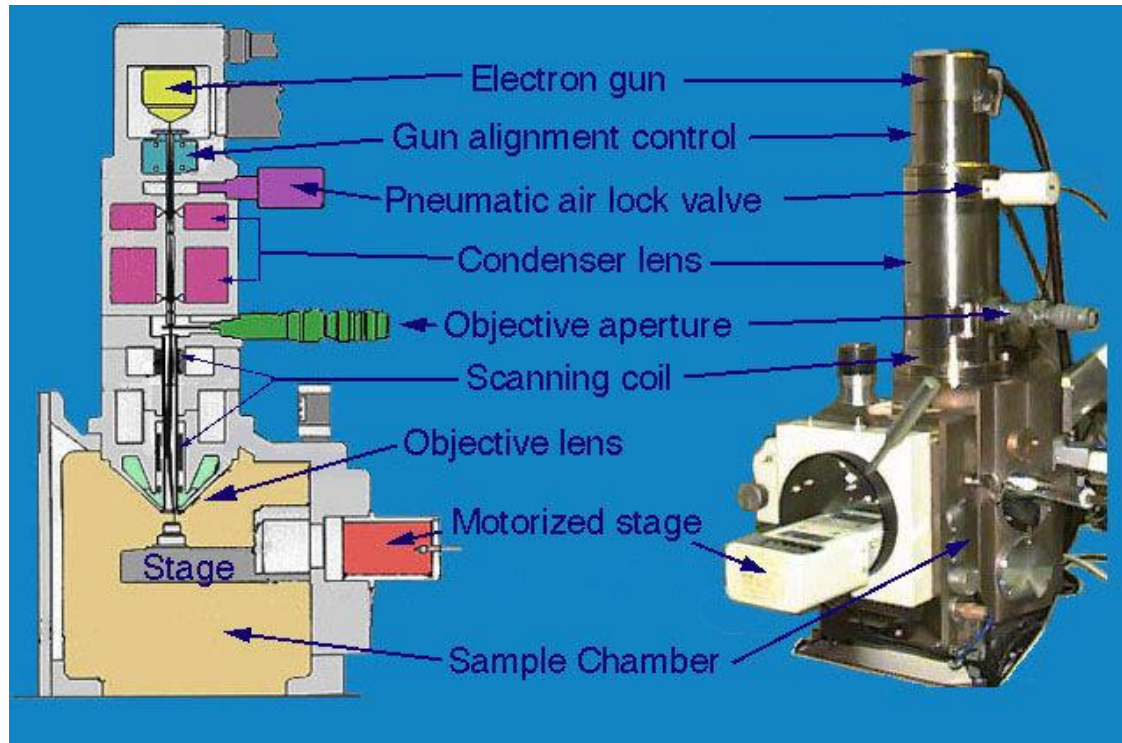
- provozní tlak 10^{-5} Pa

Zvětšení

- 5 až 500 000x
- nezávisí na zvětšení objektivové čočky, ale na velikosti skenované oblasti

Rozlišení

- není omezeno difrakčním limitem $\Rightarrow$ obraz nevytváří čočka
- závisí na velikosti průměru PES (objektiv se stigmátorem) $\Rightarrow$ čím menší průměr, tím vyšší rozlišení
- závisí na velikosti excitačního objemu (optimalizace energie PES)



SEM - zobrazení povrchu - topografický kontrast

Zobrazení povrchu vzorku

- detekují se sekundární (SE) nebo odražené (BSE)

Sekundární elektrony

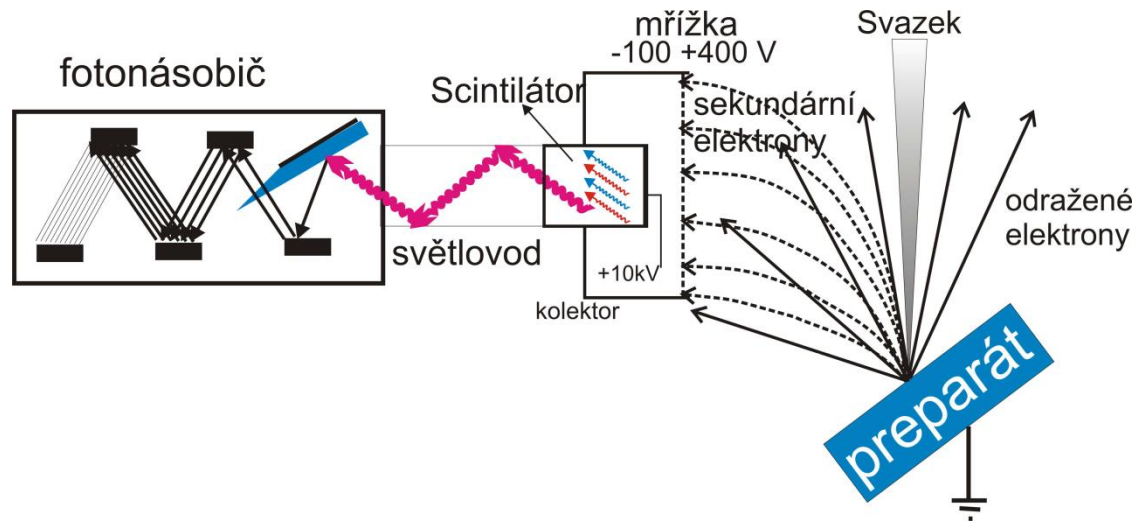
- energie SE je cca 50 eV a vystupují ze vzorku z hloubky několik desítek nm $\Rightarrow$ topografie vzorku
- *pomalé SE* – elektrony pochází z vodivostního nebo valenčního pásu – malá energie na jejich vyražení
- *rychlé SE* – elektrony z vnitřních hladin atomů, nutná větší energie na jejich vyražení

Odražené elektrony

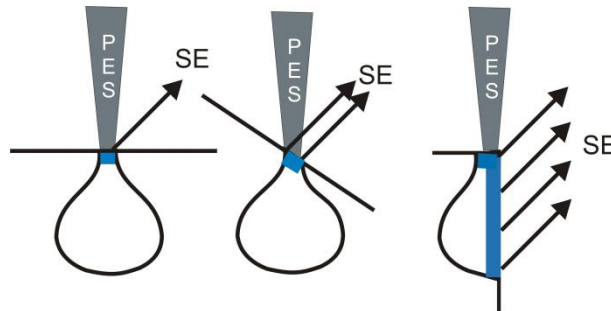
- nesou informaci z hloubky vzorku – citlivé na změnu prvkového složení – Z (protonové číslo)
- místa tvořené těžšími prvky $\Rightarrow$ silnější signál v režimu detekce BSE

SEM - režim detekce sekundárních elektronů

- detekční systém složený ze scintilátoru a fotonásobiče (Everhat-Thornleyho detektor)



- SE jsou elektrickým polem (do + 400 V) mřížky kolektoru „odsáty“ z povrchu → scintilátor → fotonásobič
- SE jsou před dopadem na scintilátor urychleny napětím (SE mají nízkou energii oproti BSE)
- emise SE závisí na orientaci vzorku a PES $\Rightarrow$ z nakloněných ploch preparátu je vyšší emise SE

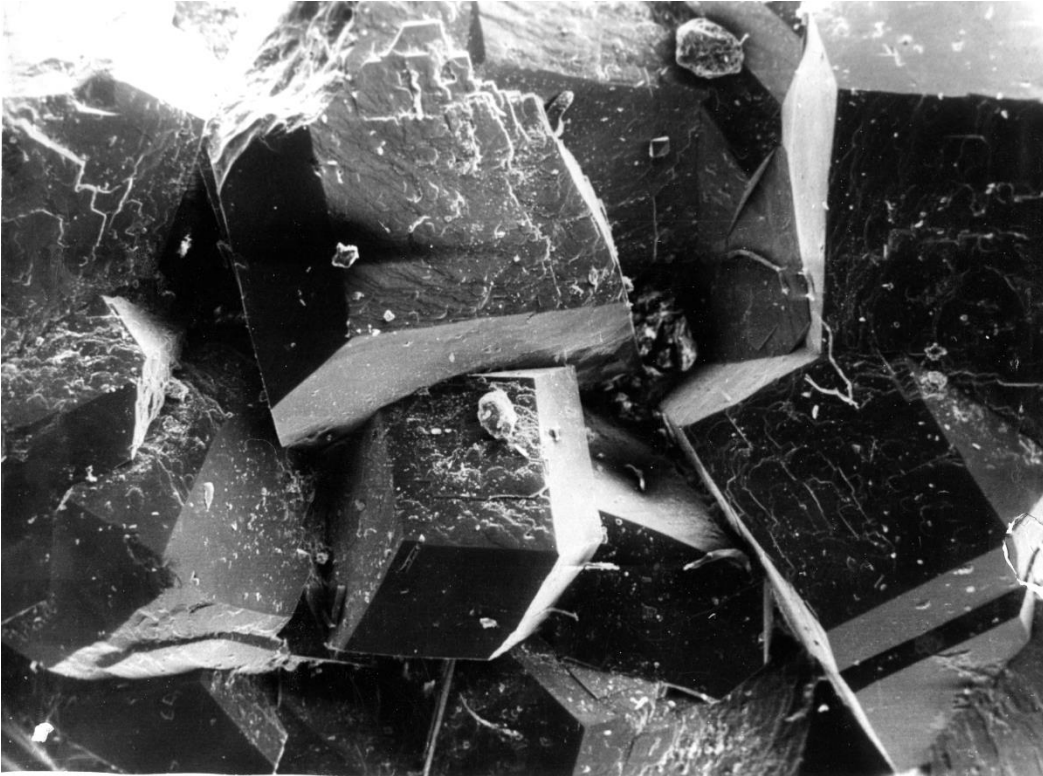


$$\text{Výtěžek emise: } \delta = \frac{\text{konst.}}{\cos \beta}$$

β - úhel mezi PES a normálou plochy

SEM - režim detekce sekundárních elektronů

Krystaly vínanu draselného v režimu sekundárních elektronů



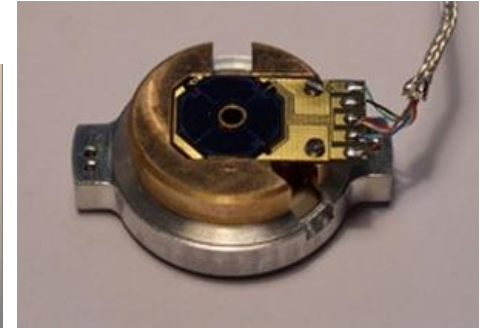
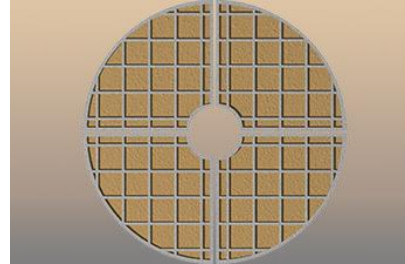
Zrnko pylu



- nakloněné plochy mají světlejší odstín díky zvýšené emisi SE

SEM - režim detekce odražených elektronů (BSE) – materiálový kontrast

- detekční systém složený ze scintilátoru a fotonásobiče (Everhart-Thornleyho detektor)
- BSE jsou před dopadem na scintilátor napětím brzděny (do -100 V) $\Rightarrow$ lze jejich detekci odlišit od SE
- lze využít samostatný detektor umístěný nad vzorkem



- BSE nesou informaci o průměrném protonovém čísle Z vzorku – *materiálový kontrast*

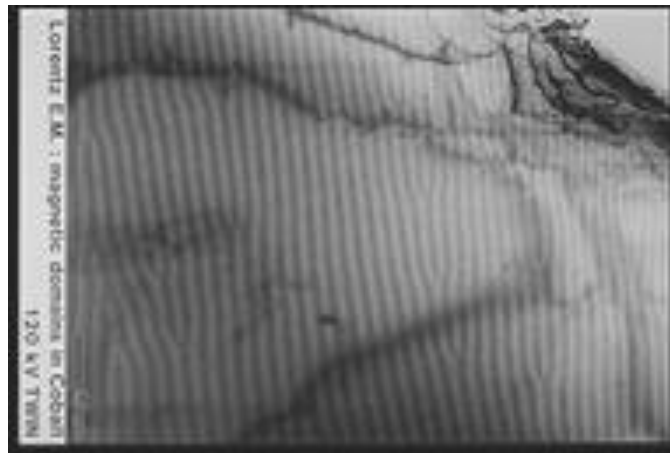


Odlišení oblasti materiálu na řezu slitiny Al-Cu v režimu zpětně odražených elektronů (BSE).
Al ($Z = 13$) – tmavší oblasti, Cu ($Z = 29$) – světlejší oblasti

SEM - magnetický a napěťový kontrast

Magnetický kontrast

- možnost pozorovat kontrast na doménových stěnách kubických a jednoosých feromagnetik
- na uvolněné elektrony působí Lorentzova síla vyvolaná magnetickým polem uvnitř domén
- Lorentzova síla způsobí stočení elektronů dovnitř vzorku (tmavá oblast v obraze) nebo naopak k povrchu (světlá oblast)

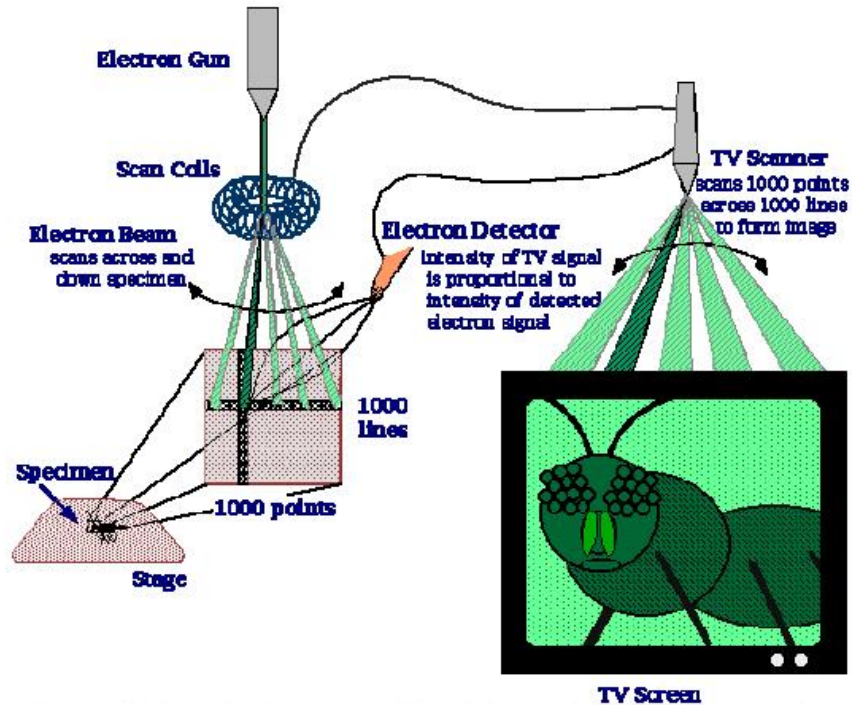


Magnetické domény v kobaltu

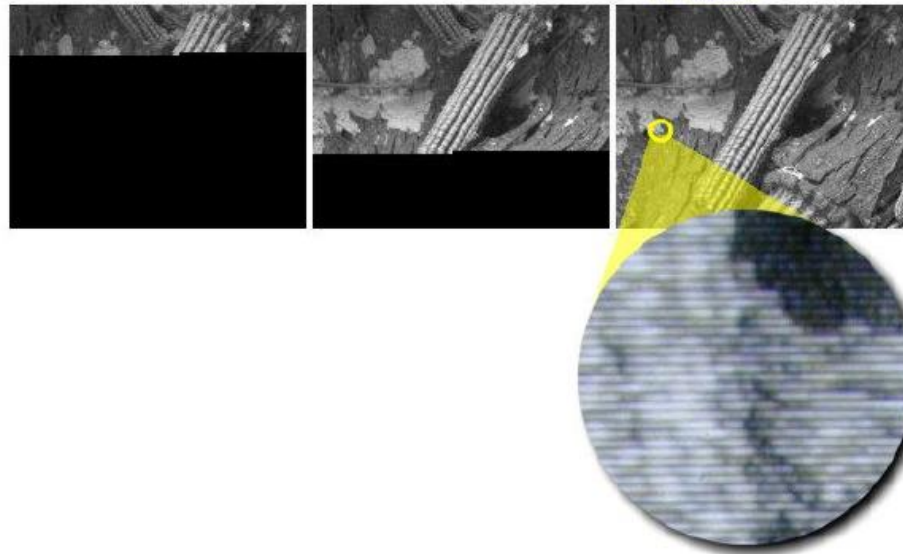
Napěťový kontrast

- vzniká vlivem elektrostatických sil mezi dopadajícími elektrony a nabitými místy na povrchu
- zobrazuje potenciálové rozdíly např. na povrchu polovodičů po přívodu napětí $\Rightarrow$ sledování defektních spojů (bariéra pro procházející proud)

SEM - tvorba obrazu a parametry zobrazení



- obraz vzniká bod po bodu během skenování povrchu



Zvětšení obrazu: $Z = \frac{L}{L'}$

- L – délka hrany obrazovky (konst.)
- L' - rozměr skenovaného povrchu
- čím menší je skenovaná oblast (L'), tím větší je výsledné zvětšení

SEM - hloubka ostrosti a rozlišovací schopnost

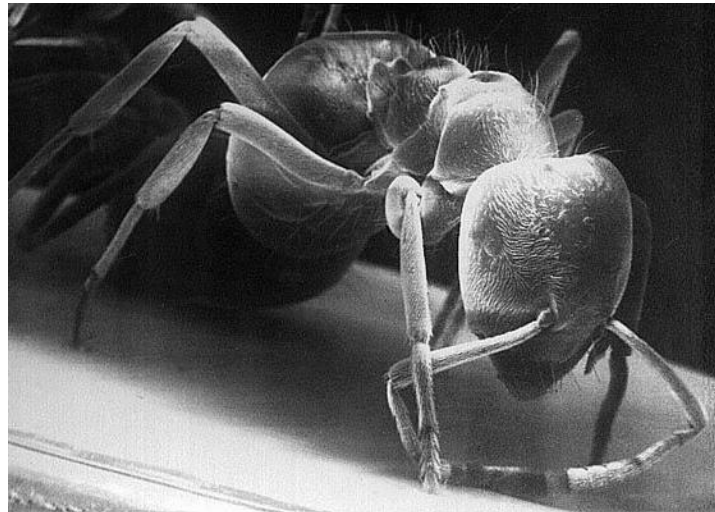
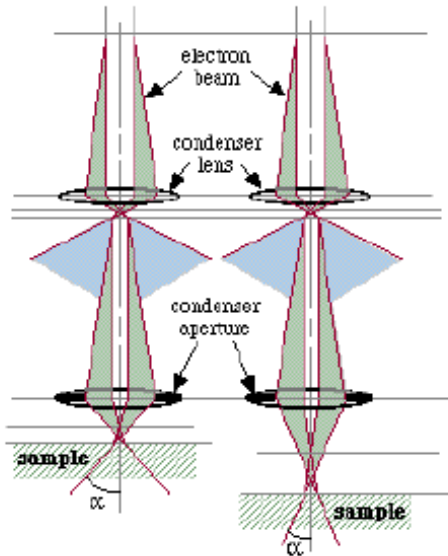
- rozlišení SEM souvisí s nejmenším dosažitelným průměrem fokusovaného svazku elektronů
- fokusaci zajišťuje kondenzorový systém s objektivem $\Rightarrow$ rozlišení je dáno jejich kvalitou a schopností zobrazit zdroj elektronů jako bod
- pro přibližné určení platí:

$$d_{min} = 0.61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

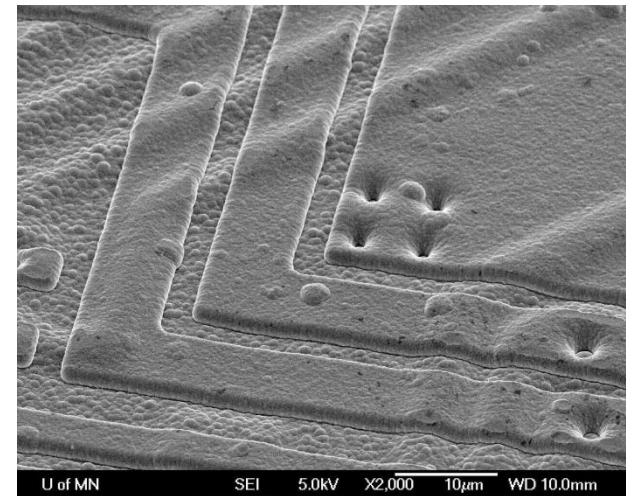
- teoretická hodnota $d_{min} \approx 0.1$ až 1 nm
- realita: zobrazení omezeno vadami (aberrace čoček, vnější elektromagnetické pole, vibrace)
- rozlišovací mez vs hloubka ostrosti L :

$$L = \frac{d_0}{Z \cdot \alpha}, \quad d_0 - \text{rozlišení oka}, Z - \text{zvětšení SEM}$$

Závěr: Operátor musí volit kompromis mezi zvětšením a hloubkou ostrosti pro optimální vykreslení detailů povrchu preparátu.



mravenec (velká hloubka ostrosti)



integrovaný obvod (velké zvětšení)

SEM - úprava obrazu

Přehled chyb a poruch snižující kvalitu výsledného obrazu

Neostrosta

- souvisí s kvalitou zobrazení zdroje PES na vzorek
- špatná volba urychlovacího napětí
- nestabilita zdroje elektronového svazku, způsobená nedostatečným žhavením katody
- chybné seřízení primárního elektronového svazku
- nedokonalé vycentrování aparatury objektivu
- nedostatečná korekce astigmatismu
- příliš velké zvětšení
- špatně fokusovaný svazek elektronů (nezaostřeno)
- značná plošná hustota náboje na povrchu vzorku

Celkově nízká kvalita obrazu

- špatná volba urychlovacího napětí
- chybné nastavení velikosti proudu primárního svazku elektronů
- zřetelný šum vyvolaný nadměrným zesílením fotonásobiče
- chybně nastavený jas a kontrast pro fotografování
- nevhodná vzájemná poloha vzorku a detektoru
- nedokonale připravený vzorek

SEM - úprava obrazu

Přehled chyb a poruch snižující kvalitu výsledného obrazu

Faktory způsobující lokální poruchy obrazu

- nestabilita emise elektronového děla
- značná plošná hustota náboje na povrchu vzorku
- mechanické vibrace
- vnější elektromagnetické pole
- nečistoty na vzorku

Deformace vzorku

- termické poškození primárním elektronovým svazkem
- změna teplotního gradientu vzorku
- zkreslení způsobené náklonem preparátu
- velký plošný náboj na povrchu vzorku
- poškození vzniklé při přípravě vzorku

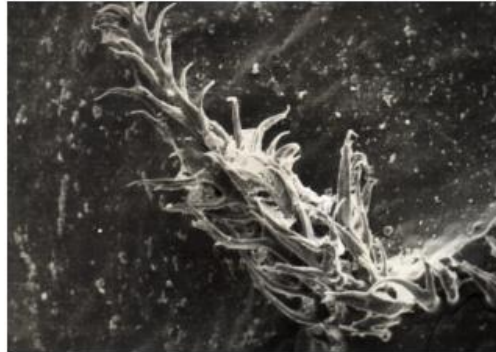
SEM - úprava obrazu

Možnosti korekce ovládacími prvky SEM

Správné nastavení urychlovacího napětí svazku elektronů

- musíme mít minimální hodnotu proudu ve svazku, abychom nezvyšovali šum detektoru
- vysoké urychlovací napětí u nevodivých vzorků vede k nabíjení a deformaci preparátu a ztrátě ostrosti $\Rightarrow$ nabíjením vznikají světlé plochy (artefakty)

Prokreslení detailů biologického vzorku při různých hodnotách UN



a) struktura zřetelná UN 5 kV



a) malý povrchový náboj UN 15 kV



a) nevýrazná struktura UN 30 kV



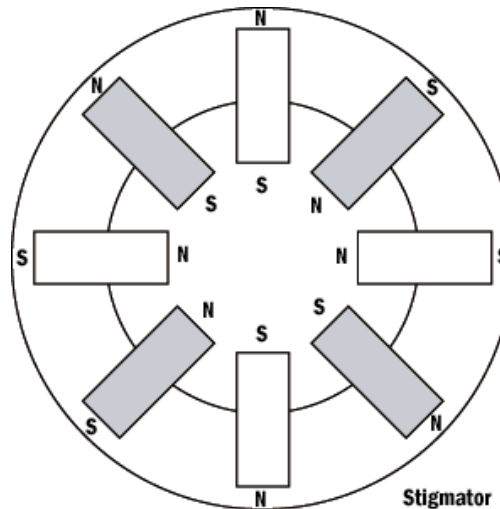
a) velký povrchový náboj UN 45 kV

SEM - úprava obrazu

Možnosti korekce ovládacími prvky SEM

Korekce astigmatismu

- reálná čočka nemá dokonale symetrické elektromagnetické pole (např. nehomogenita feromagnetického materiálu pólových nástavců)
- korekce pomocí stigmátoru – soustava cívek umístěná v objektivu
 - slabé magnetické pole koriguje vady objektivu



Gamma korekce

- nelineární zesílení *obrazového signálu* (potlačuje silnější signály a zesiluje slabší) = elektronické vyrovnávání velkých rozdílů v kontrastu (zvláště u biologických preparátů).

SEM s volitelným vakuem – environmentální SEM

- jeden z vývojových trendů klasické SEM
- umožňuje studovat vzorky při vyšším tlaku ve vzorkové komoře (až 3kPa)

Princip:

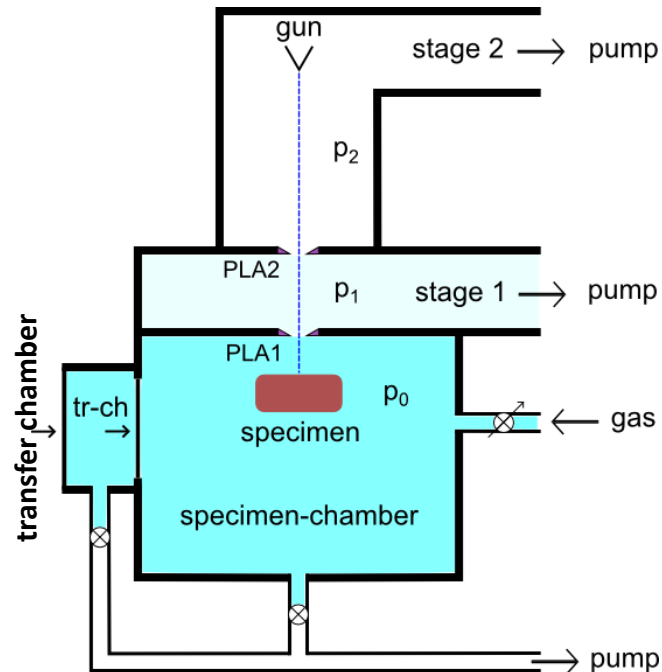
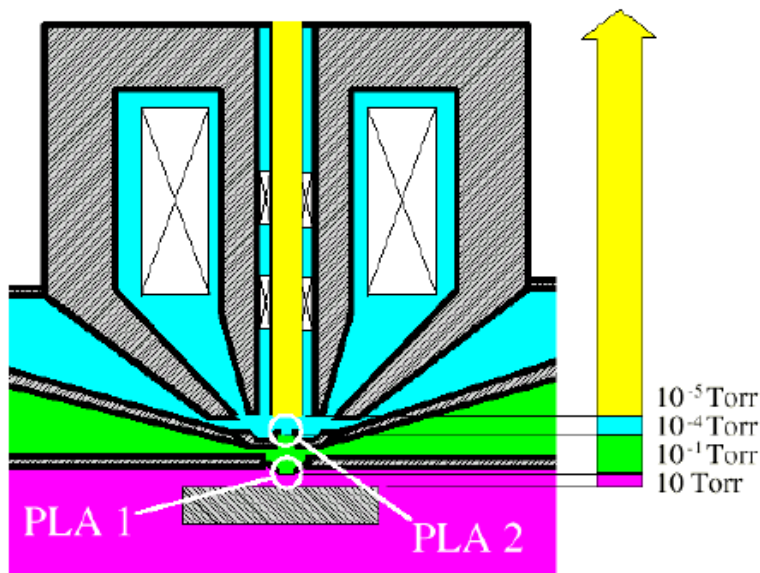
- tubus mikroskopu a vzorková komora jsou odděleny dvěma **tlakovými clonkami (PLA** - pressure-limiting apertures) $\Rightarrow$ oddělení vysokého (tubus) a nízkého (komoře) vakua
- při vyšším tlaku ve vzorkové komoře dochází ke srážkám elektronů primárního svazku s molekulami plynů $\Rightarrow$ dochází k ionizaci
- ionty v okolí vzorku kompenzují nabíjení povrchu vzorku
- nutné použít detektory tolerující přirozené prostředí preparátu

Výhody zvýšeného tlaku:

- pozorování nevodivých preparátů – není nutné naprašovat vodivou vrstvu
- povrch nevodivého vzorku se nenabíjí
- umožňuje studovat vlhké vzorky – zvýšený tlak chrání vzorek před vyschnutím
- studium různých druhů vzorků v podmínkách blížících se atmosférickému tlaku
- studium vlhkých vzorků a vzorků na fázovém rozhraní skupenství (procesy kondenzace, vypařování, tání, tuhnutí, atd.)

SEM s volitelným vakuem – environmentální SEM

- umístění dvou tlakových clonek (velmi malé otvory) PLA1 a PLA2 mezi tubusem mikroskopu a vzorkovou komorou
- tlakové clonky oddělují prostory s různým tlakem
- rozdílný tlak je udržován díky vývěvám
- obvykle wolframová katoda, pro LaB_6 nutné udržovat vyšší vakuum v tubusu



Basic ESEM gas pressure stages

$$p_0 \gg p_1 \gg p_2$$

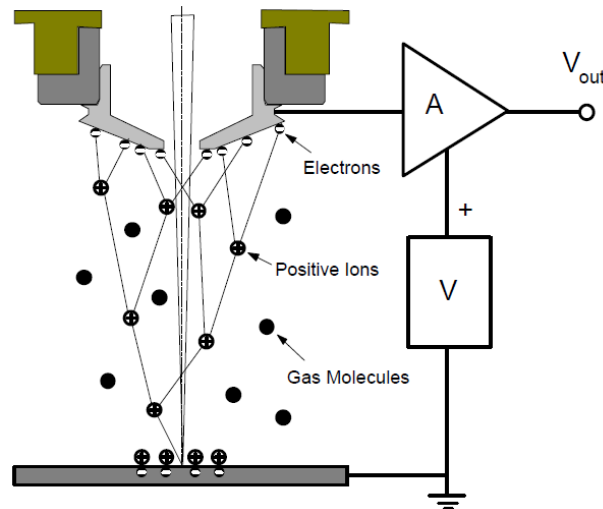
SEM s volitelným vakuem – environmentální SEM

Detektory v eSEM

- nutné použít **environmentální detektory** sekundárních elektronů (SE) tolerující vyšší tlak prostředí (ESD – Environmental Secondary Detector), nelze použít klasický Everhart-Thornleyho detektor určený pro SEM

Princip:

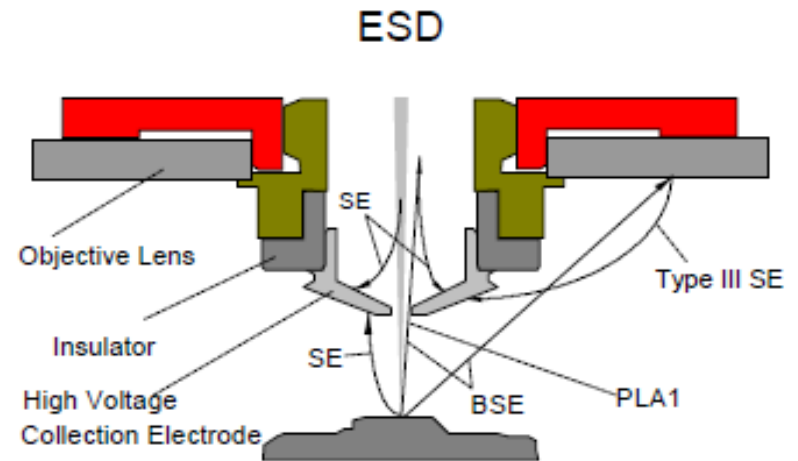
- ESD využívá ionizace plynu ve vzorkové komoře (obvykle vodní páry, příp. speciální plyn)
- primární svazek elektronů generuje SE ze vzorku
- kladné napětí konické elektrody detektoru přitahuje SE, které mohou dále ionizovat molekuly vzduchu $\Rightarrow$ vznik *kladných iontů a volných environmentálních elektronů*
- *kladné ionty* – eliminují artefakty způsobené nabíjením povrchu preparátu
- *volné env. elektrony* – zvyšují účinnost detekce
- ESD necitlivý na světlo - nepoužívá fotonásobič



SEM s volitelným vakuem – environmentální SEM

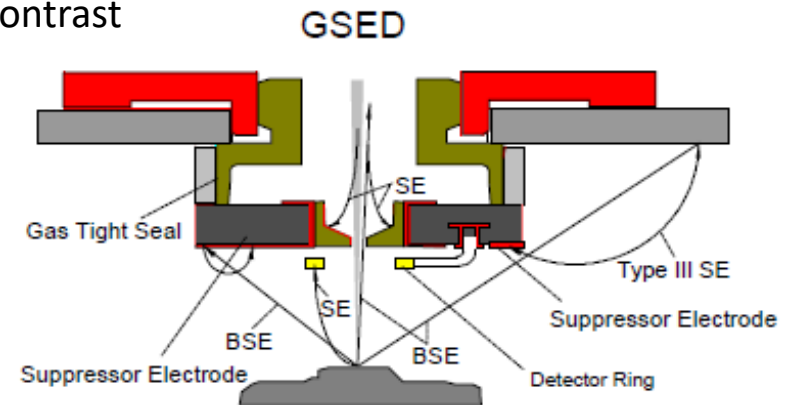
ESD detektor

- detekuje primárně SE
- díky konstrukci detekuje ale i odražené elektrony (BSE)
- BSE pochází ze vzorku, příp. z interakcí s okolními částmi komory a objektivové čočky
- BSE snižují rozlišení a kontrast snímku



GSED (Gaseous Secondary Electron Detector)

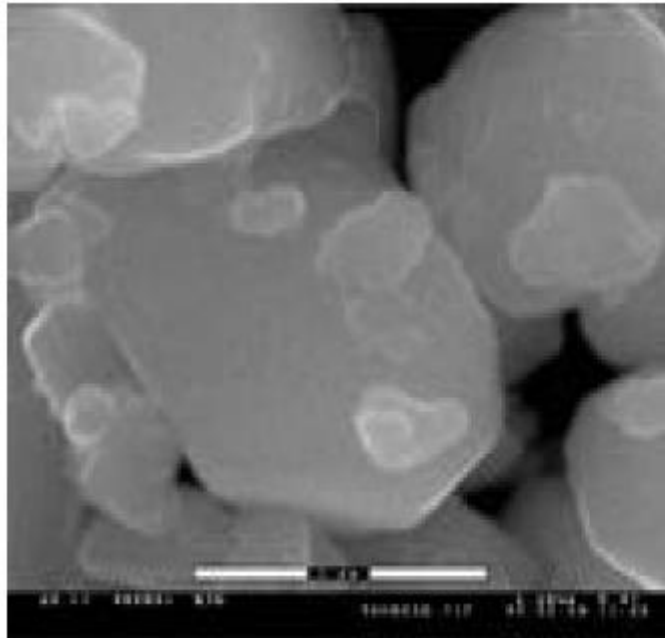
- vylepšená verze ESD detektoru
- eliminuje příspěvek BSE a Type III SE $\Rightarrow$ lepší rozlišení a kontrast



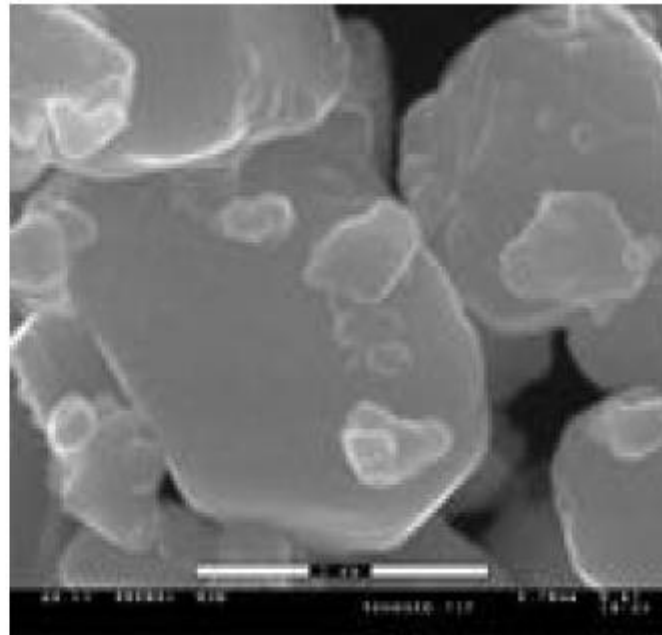
SEM s volitelným vakuem – environmentální SEM

Náplň toneru

ESD detektor



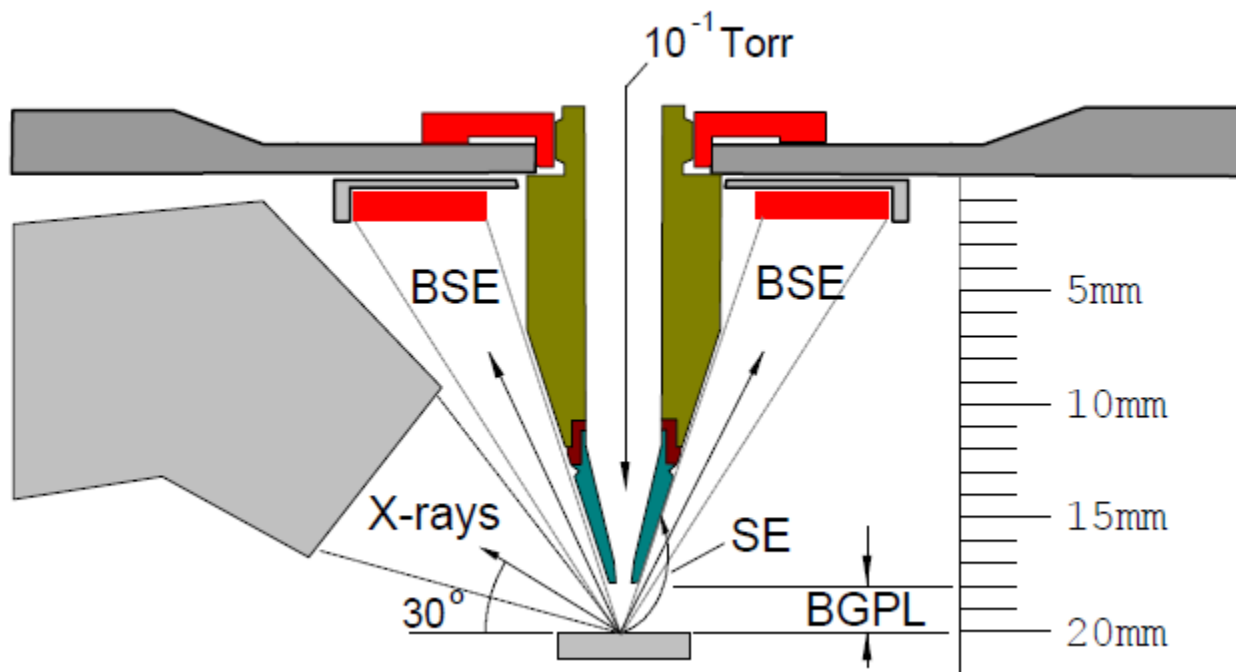
GSED detektor



SEM s volitelným vakuem – environmentální SEM

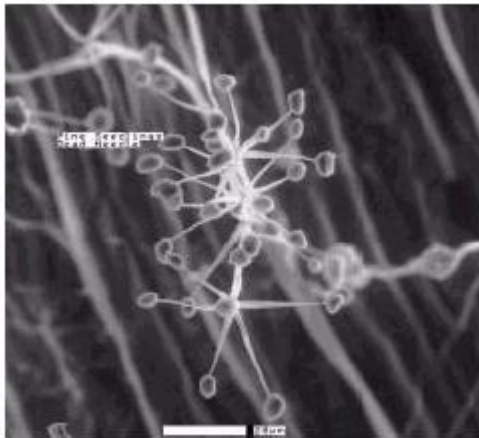
Detekce rentgenového záření pomocí eSEM

- u eSEM není X-ray signál zkreslen přítomností naprášené vrstvy
- díky speciální konstrukci ESD detektoru se eliminuje interakce mezi primárním svazkem elektronů a molekulami plynu ve vzorkové komoře $\Rightarrow$ krátká BGPL (Beam Gas Path Length)
- je zde prostor pro umístění detektoru X-ray

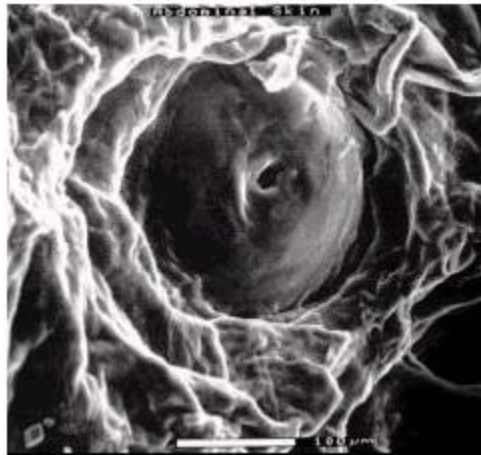


environmentální SEM – příklady použití

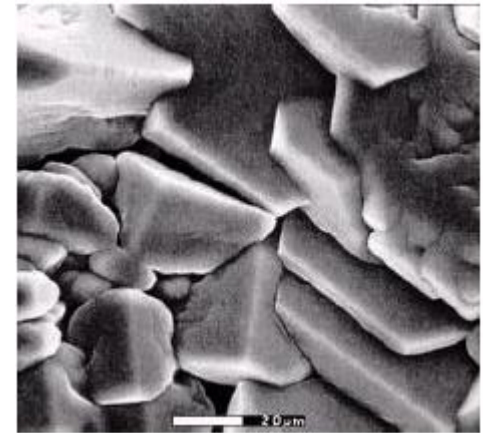
plíseň na jehličí



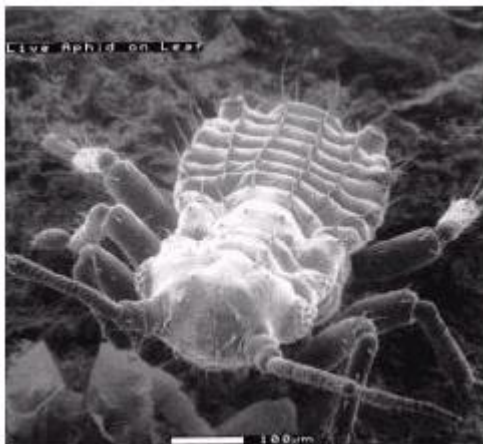
kožní pór



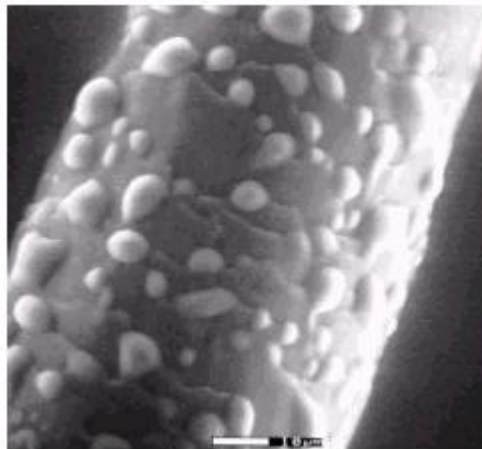
krystalky ledu



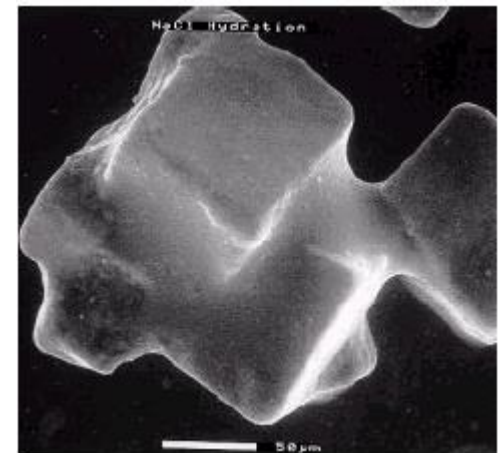
živá mšice



vlas s kapkami vody



solvatace NaCl

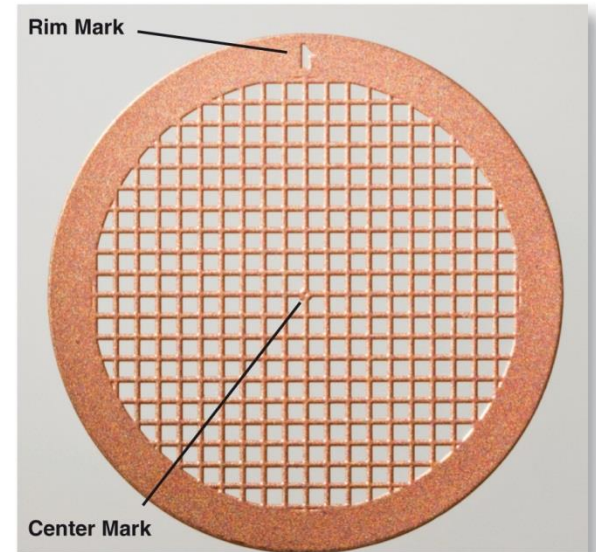
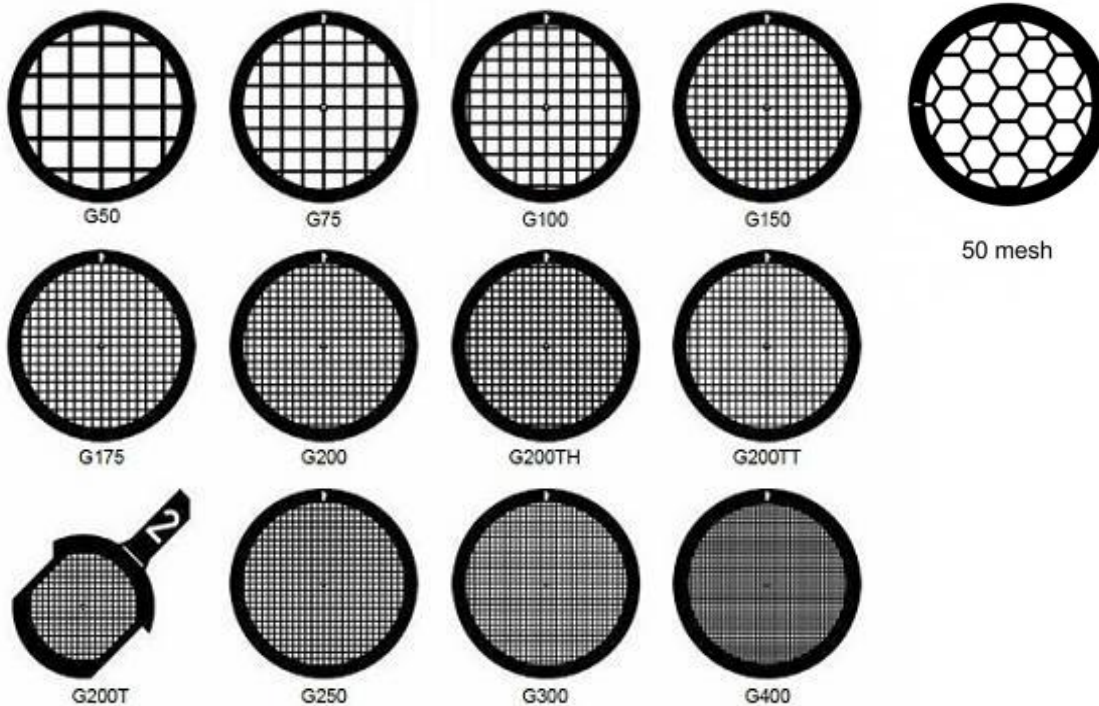


Příprava vzorků pro TEM

Příprava vzorků pro TEM

Sítky

- nejčastěji měděné, niklové, zlaté, ...
- různá velikost a tvar otvorů
- speciální značky – slouží pro orientaci při prohlížení v TEM
- Počet otvorů je dán číslem: např. mesh 400, Cu400



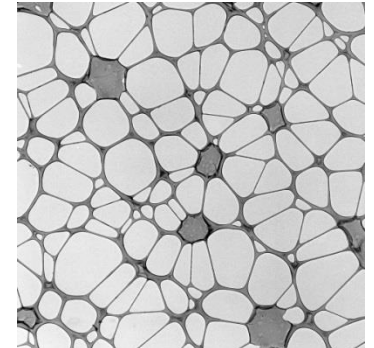
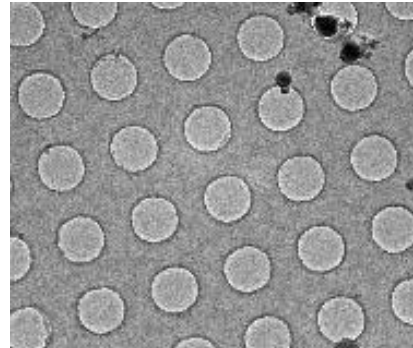
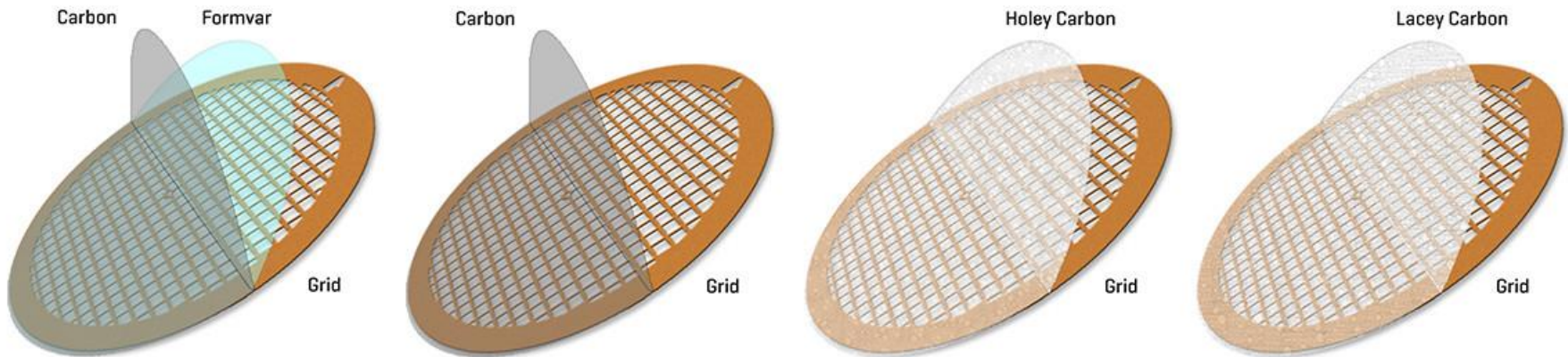
Příprava vzorků pro TEM

Nosné sítky s podpůrným filmem

- vzorky (kapalné, pevné, řezy) se nanesou na sítku s filmem
- film je podpůrná a transparentní vrstva, stabilní při ozařování elektrony, nízká zrnitost a kontrast
- film slouží k zachycení částic v suspenzi

Podpůrný film

- uhlíkový film – tl. cca 20 až 50 nm
- Formvar – plastická fólie, tl. cca 20 nm
- uhlíkový film s otvory



Příprava vzorků pro TEM – napařování tenkého uhlíkového filmu

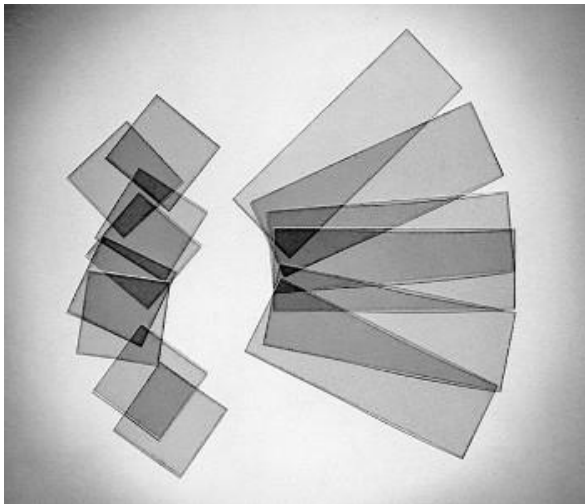
uhlíkové tyčinky



úprava konců tyčinek



slídové tabulky



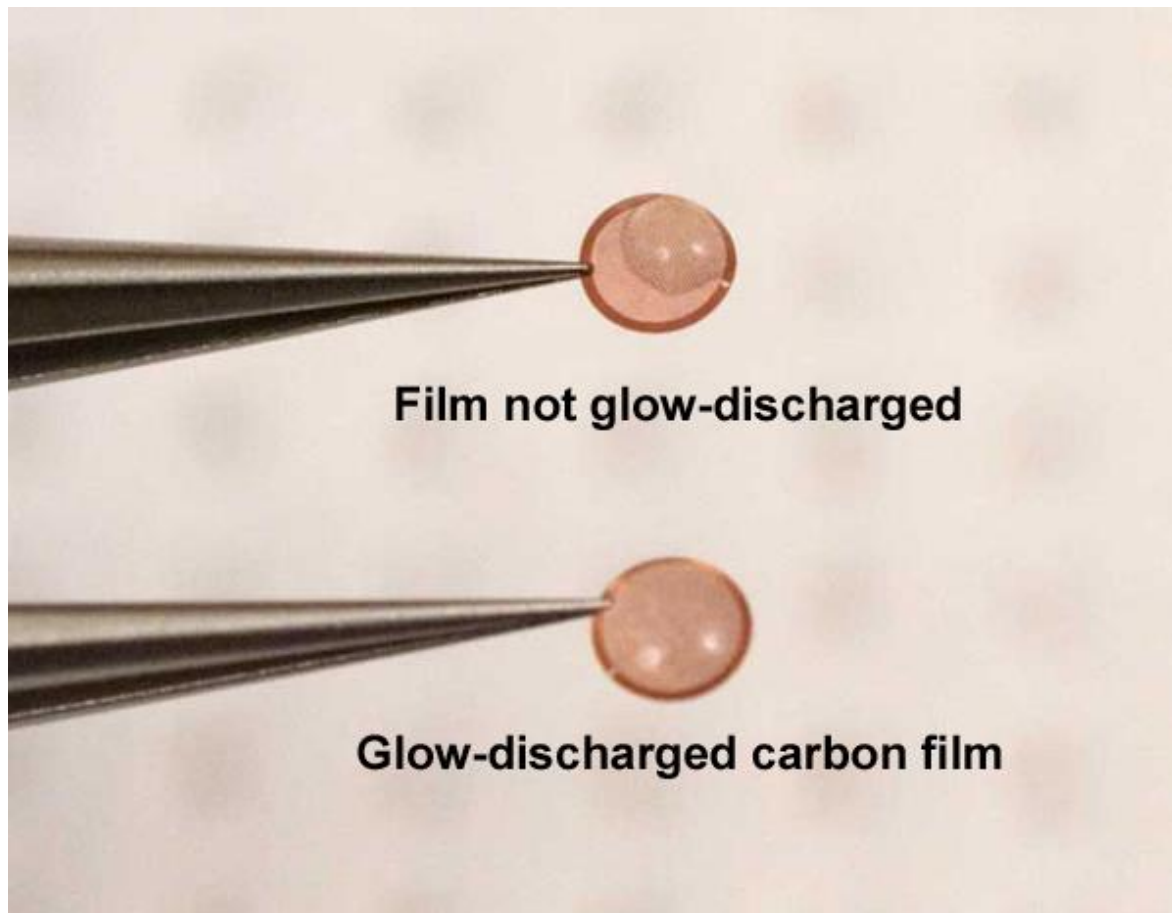
napařování uhlíku ve vakuované komoře



- elektrický proud žhaví zúžené konce uhlíkových tyčinek $\Rightarrow$ dochází k odparu uhlíku a jeho nasedání na slídovou tabulku
- uhlíkový film se od slídy oddělí ve vodní lázni a nanese se na sítky

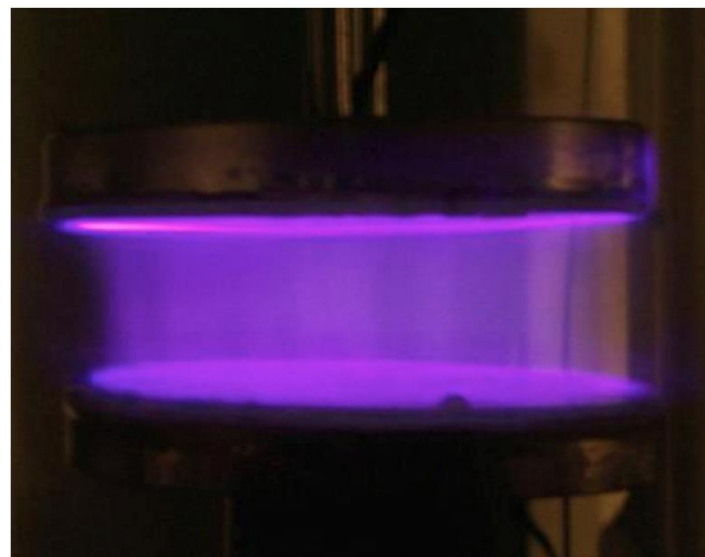
Příprava vzorků pro TEM – úprava uhlíkového filmu

- uhlíkový film se postupně stává hydrofobní $\Rightarrow$ špatná adsorpce vzorku
- úprava doutnavým výbojem způsobí nabití uhlíkového filmu $\Rightarrow$ stává se hydrofilní



Příprava vzorků pro TEM – úprava uhlíkového filmu

Doutnavý výboj

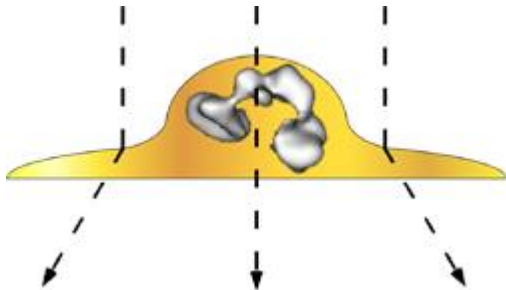


- sítky s uhlíkovým filmem jsou umístěny v částečně vakuované komoře
- elektrické napětí mezi elektrodami způsobí ionizaci vzduchu – doutnavý výboj
- záporně nabití ionty nasedají na uhlíkový film – stává se hydrofilní

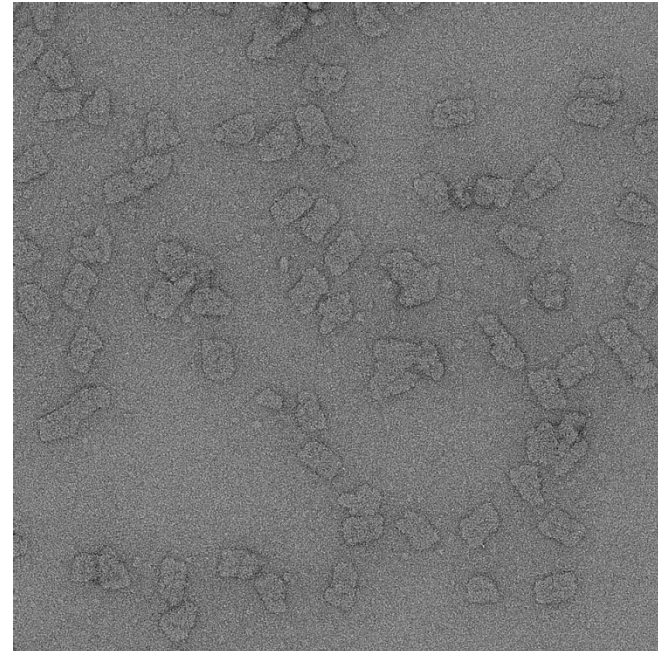
Příprava vzorků pro TEM – metoda negativního kontrastování

Princip metody

1. kapka vzorku (např. izolované proteiny, částice) je pipetou nanesena na sítku s podpůrným filmem
 - část molekul se přichytí na podpůrný film
 - nadbytek vzorku je po cca 1 min odsán filtračním papírem
2. na vzorek se nanese kapka roztoku soli těžkého kovu (např. 2 % uranyl acetát)
3. kontrastní látka nasedá a obklopuje molekuly vzorku $\Rightarrow$ v TEM rozptyluje elektrony a vytváří kontrast



izolované komplexy fotosystému II



Příprava vzorků pro TEM – ultratenké řezy

- vzorky nesmí obsahovat vodu – v TEM je vysoké vakuum
- s rostoucí tloušťkou vzorku klesá množství prošlých elektronů (od proteinů po organely)

Řešení: (1) TEM s vyšším urychlovacím napětím (300kV a více) a energetickým filtrem
(2) ultratenké řezy vzorku – optimální tloušťka 50 až 80 nm
(3) odstraněním části vzorku fokusovaným svazkem - ion beam milling

Příprava tkáně pro získání řezů:

- **odběr** tkáně nebo buněk (přímo do fixativa)
- **fixace**
- **odvodnění**
- **zalití do bločku**
- **kontrastování**

Fixace (chemická)

- chemická fixace založena na *reakci fixačních činidel se složkami biologického preparátu*
- nutnost zachování původního stavu vzorku až na molekulární úroveň
- stabilizace proteinů, uchování prostorového rozložení buněčných organel
- doba fixace závisí na velikosti fixovaného vzorku ($\approx 1 \text{ mm}^3$)

Příprava vzorků pro TEM – ultratenké řezy

Fixace vzorku pomocí fixačních roztoků

- dochází k přeměně cytoplasmy v gel transparentní pro elektrony – zachování ultrastruktury
- kvalita fixace – výběr činidla a koncentrace, velikosti vzorku, podmínek (teplota, pH, čas)

Osmium tetraoxid (OsO_4)

Dobře reaguje s lipidy a fosfolipidy, stabilizuje buněčné proteiny formující cytoplazmu

Špatně fixuje karbohydráty (glykogen) a nukleové kyseliny

- **doba fixace** od 30 do 90 minut – nutné optimalizovat (krátký čas vede k nedostatečné fixaci, dlouhý čas může vést až k rozpadnutí tkáně)
- **pH**: pufrý udržují roztoky při pH blízkém 7
- **teplota**: vyšší teplota obvykle urychluje fixaci

Aldehydy

- nejpoužívanější jsou *formaldehyd (FA)* a *glutaraldehyd (GA)*

Dobře fixují bílkoviny, cytoplazmu a lysosomy

Špatně stabilizují v buňkách lipidy (nutná osmiová post-fixace)

- v koncentracích 1 – 6% se mísí s kakodylátovým pufrem o pH 7.2
- rychle penetruje do tkání a buněk. Mírná deformace buněk se dá odstranit manganistanovou fixací

Manganistanové fixace

- používají se zejména pro fixaci rostlinných pletiv a buněk

Dobře fixují chlorofyl, cytoplasmatické membrány a struktury obsahující lipidy a lipoproteiny

Špatně po manganistanové fixaci mizí ribozomy, rušivě působí granulace (zrnitost se odstraňuje před-fixací GA, případně použitím acetonu místo etanolu při odvodnění)

- **doby fixace** 15 až 50 minut
- **teplota** ani **pufr** nejsou rozhodující

Příprava vzorků pro TEM – ultratenké řezy

Odvodnění

- úkolem je nahrazení volné vody ve vzorku odvodňujícím činidlem (etanol, metanol, isopropylalkohol, aceton)
- odvodňovací činidlo je mísitelné se zalévací hmotou (případně se používá jako mezistupeň např. propylenoxid)
- etanol – je nejrozšířenější
- aceton – také hojně používaný, má ale nežádoucí extrakční účinky na lipidy
- odvodňovací řada: 10% až 70% (někdy i vyšší 95%) (alespoň 20 min, 6 a více kroků)
- nežádoucí projevy odvodňování: extrakce proteinů, lipidů, sacharidů; objemová změna preparátu, vznik precipitátů
- po odvodnění jsou vzorky stabilní
- následuje přesun do roztoku odvodňujícího činidla a zalévací hmoty (např. pryskyřice)

Zalítí do bločků

- cílem zalévání je fyzická stabilizace preparátu, která umožní krájení na tenké řezy
- používá se pryskyřice, parafín je příliš měkký

Vlastnosti ideální zalévací hmoty:

- rozpustnost v etanolu nebo acetonu před polymerizací
- neovlivňuje chemicky vzorek
- nezpůsobuje pnutí ve vzorku
- homogenně tuhá, ale dostatečně plastická
- stabilní při ozařování elektronovým svazkem

Příprava vzorků pro TEM – ultratenké řezy

Zalévací hmoty:

Epoxidové pryskyřice

- vytvrzují se teplem – Termoset (60 °C, 48 hod)
- odolné proti teple a rozpouštědlům
- nejsou patrné žádné artefakty po polymerizaci
- řezací vlastnosti jsou závislé na poměru složek směsi pryskyřicového monomeru (epoxidová pryskyřice, tužidlo, katalyzátor, změkčovaadlo)
- nejpoužívanější: Epon 812, Araldit, DER-334

Polyesterové pryskyřice

Vestopal W – dobrá stabilita v elektronovém svazku, nevýhoda je vysoká viskozita

Metakryláty

- rychlá penetrace do tkáně a snadné pořízování řezů 50–100 nm
- nevýhody: až o 20% se sníží objem při polymerizaci - vznik artefaktů; nestabilita řezů po ozáření elektrony

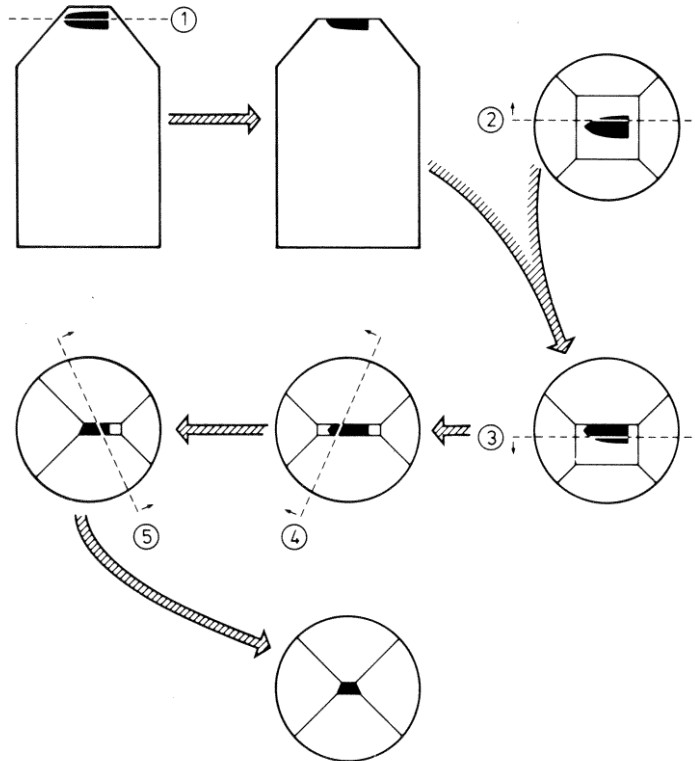
Hmoty rozpustné ve vodě

- používají se bezprostředně po fixaci – např. glykol metakrylát, Durcupan

Příprava vzorků pro TEM – ultratenké řezy

Zalévání do bločků

- dehydratační činidlo z posledním kroku odvodnění je nahrazeno směsí (50:50) dehydratačního činidla a epoxidové pryskyřice
- infiltrace ve 100 % roztoku pryskyřice
- bloček tkáně je párátkem přenesen na dno želatinové kapsle a zalit zalévací hmotou
- ořezání bločku do tvaru komolého jehlanu



Příprava vzorků pro TEM – ultratenké řezy

Ultramikrotomie

- používají se ultramikrotomy (manuální, poloautomatické) pro řezy při pokojové/kryogenní teplotě

Pro reprodukovatelnost řezů je nutné splnit podmínky:

- všechny pohyby musí být bez vibrací
- mechanické části musí mít minimální tření
- schopnost posuvu tyče s držákem vzorku k hodnotě 10 nm (tl. řezu dána teplotní dilatací tyče)
- po provedení řezu musí blok utlumit rázy způsobené řezáním

Vlastnosti kvalitních nožů

- tvrdost a tuhost nože musí odolávat nárazům bločku se vzorkem
- odolnost vůči chemickému rozkladu
- homogenita materiálu nože podél jeho hrany
- fyzikální stabilita při pokojové teplotě

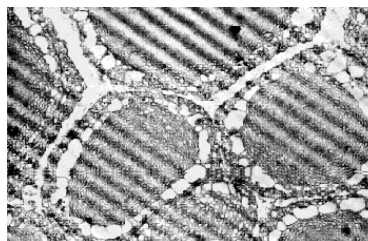
Materiál nožů

- *Diamantové nože* jsou odolné, ale drahé (cca 120 tis. Kč)
- *Skleněné nože* jsou křehké, ale levné (nevhodné pro tvrdé tkáně – např. kosti)

Kvalita řezu

- závisí na kvalitě nože (ostrosti), dobře připraveném bločku (sklon ořezání), na kvalitě ultramikrotomu

Vliv vibrací na tloušťku ultratenkého řezu



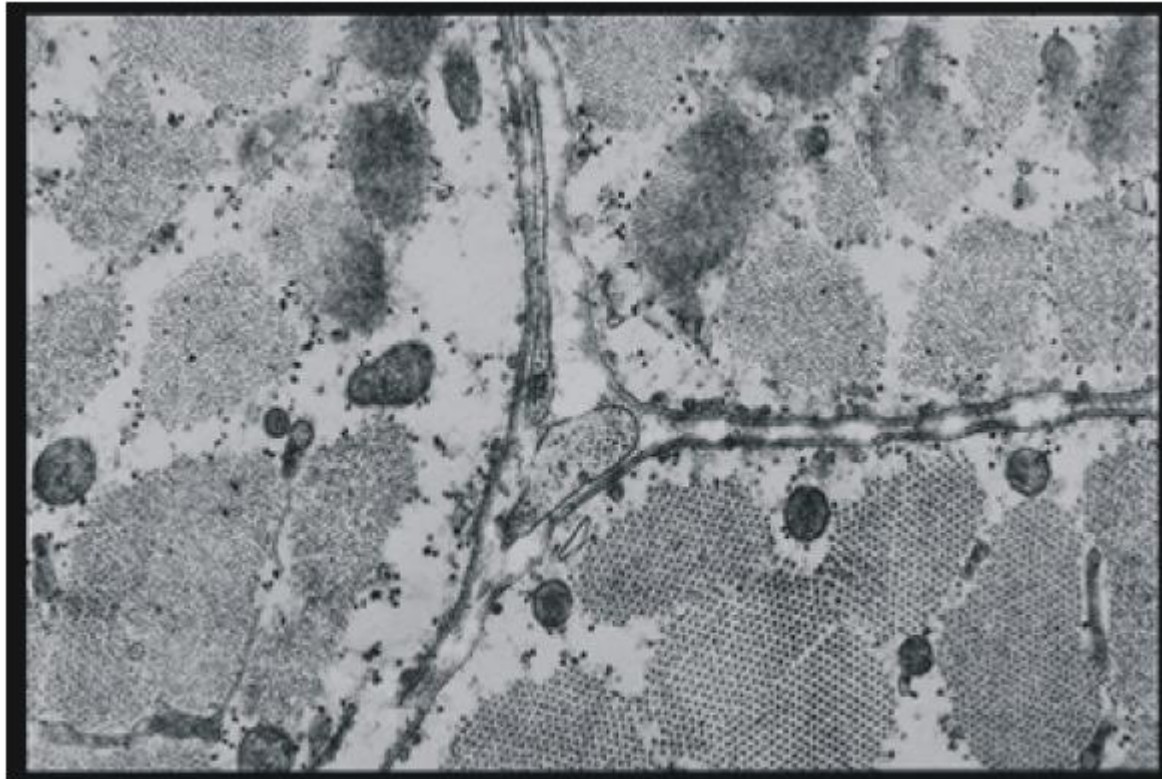
Příprava vzorků pro TEM – ultratenké řezy

Kontrastování

- roztoky těžkých kovů – zvyšují rozptylový kontrast
- uranylacetát, kyselina fosfowolframová

Imunohistochemické metody

- imunologická reakce koloidního zlata se specifickými proteiny

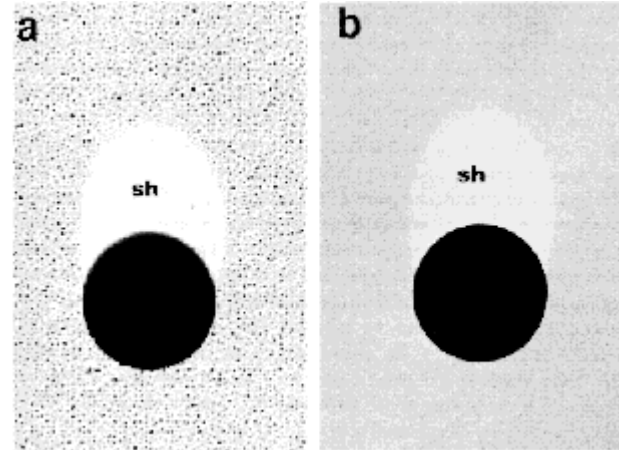
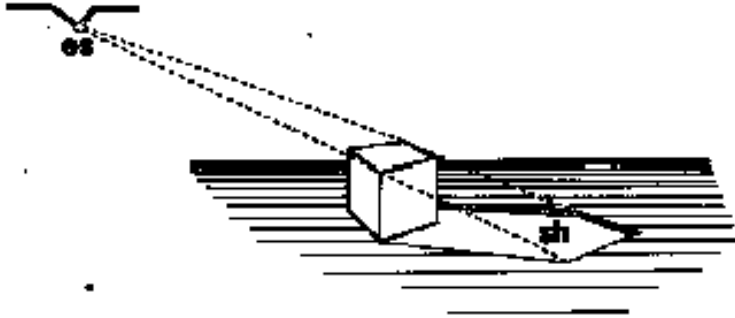


Značení koloidním zlatem

Příprava vzorků pro TEM – stínování preparátu

Stínování těžkými kovy

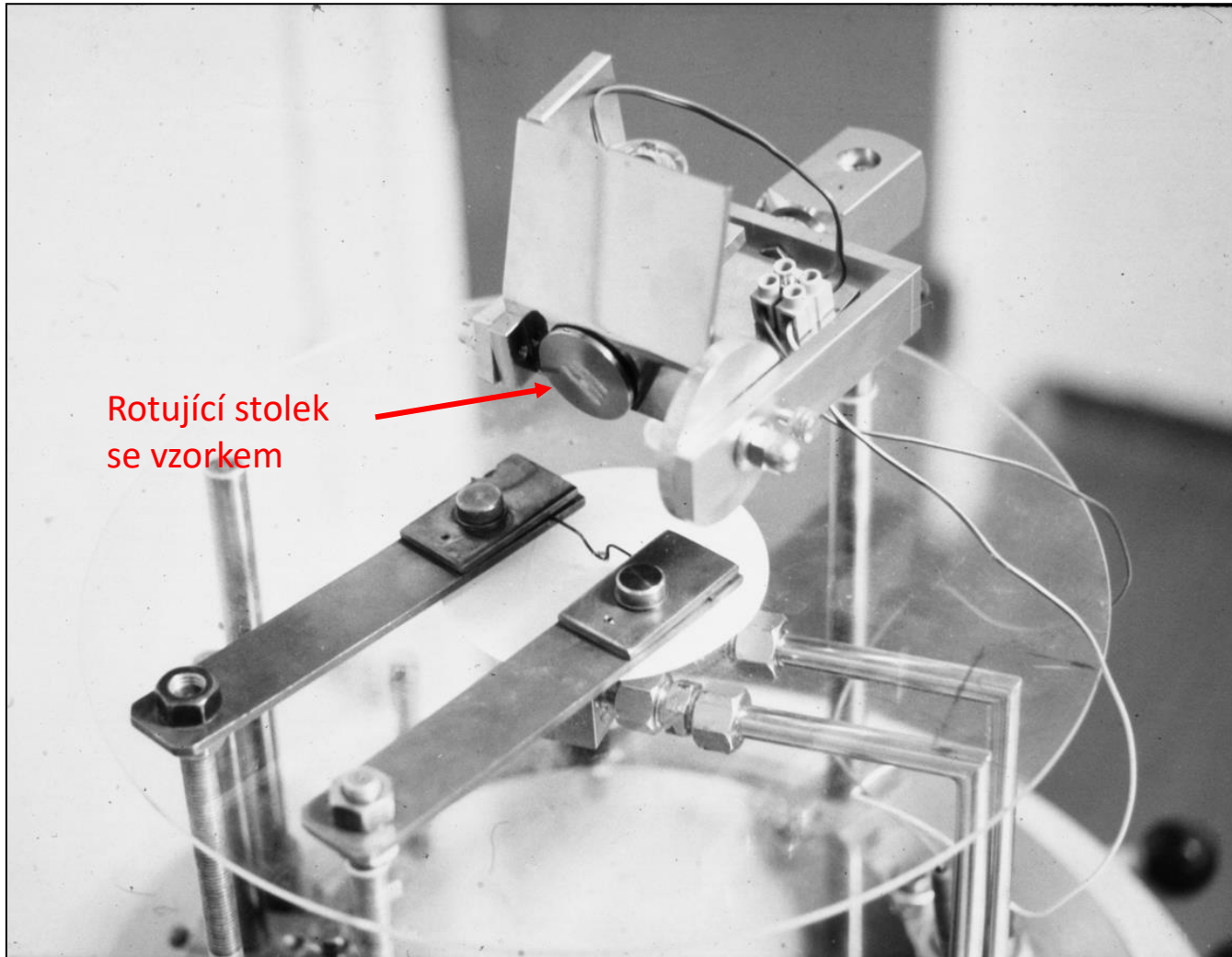
- zvýraznění povrchové topografie odpařováním kovu ze strany



latexové kuličky (0,3 μm) stínované
a) Au b) Au-Pd

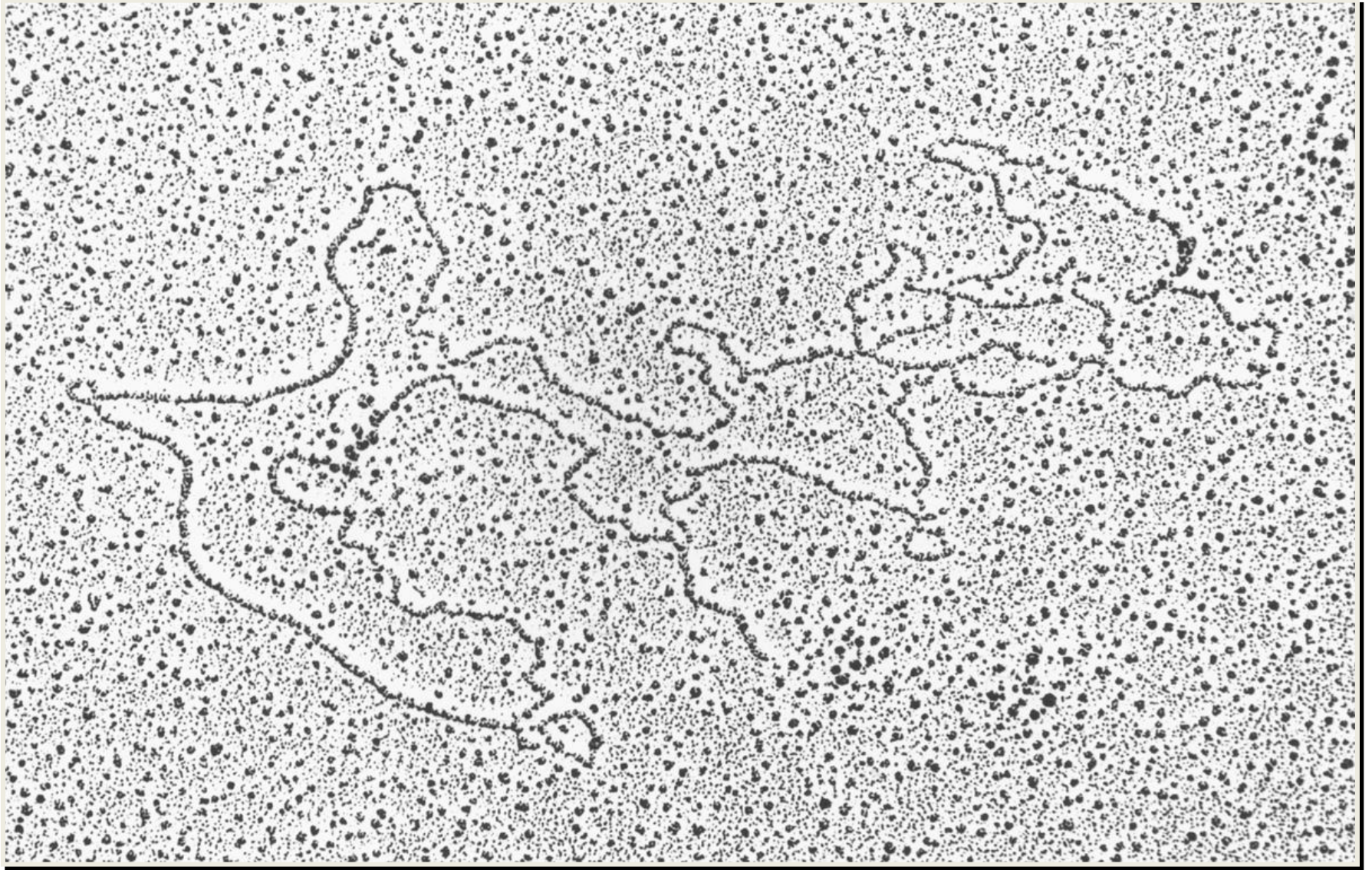
- používají se inertní kovy – Au, Pd, Ni, Pt, Cr, případně jejich slitiny

Příprava vzorků pro TEM – napařování kovu



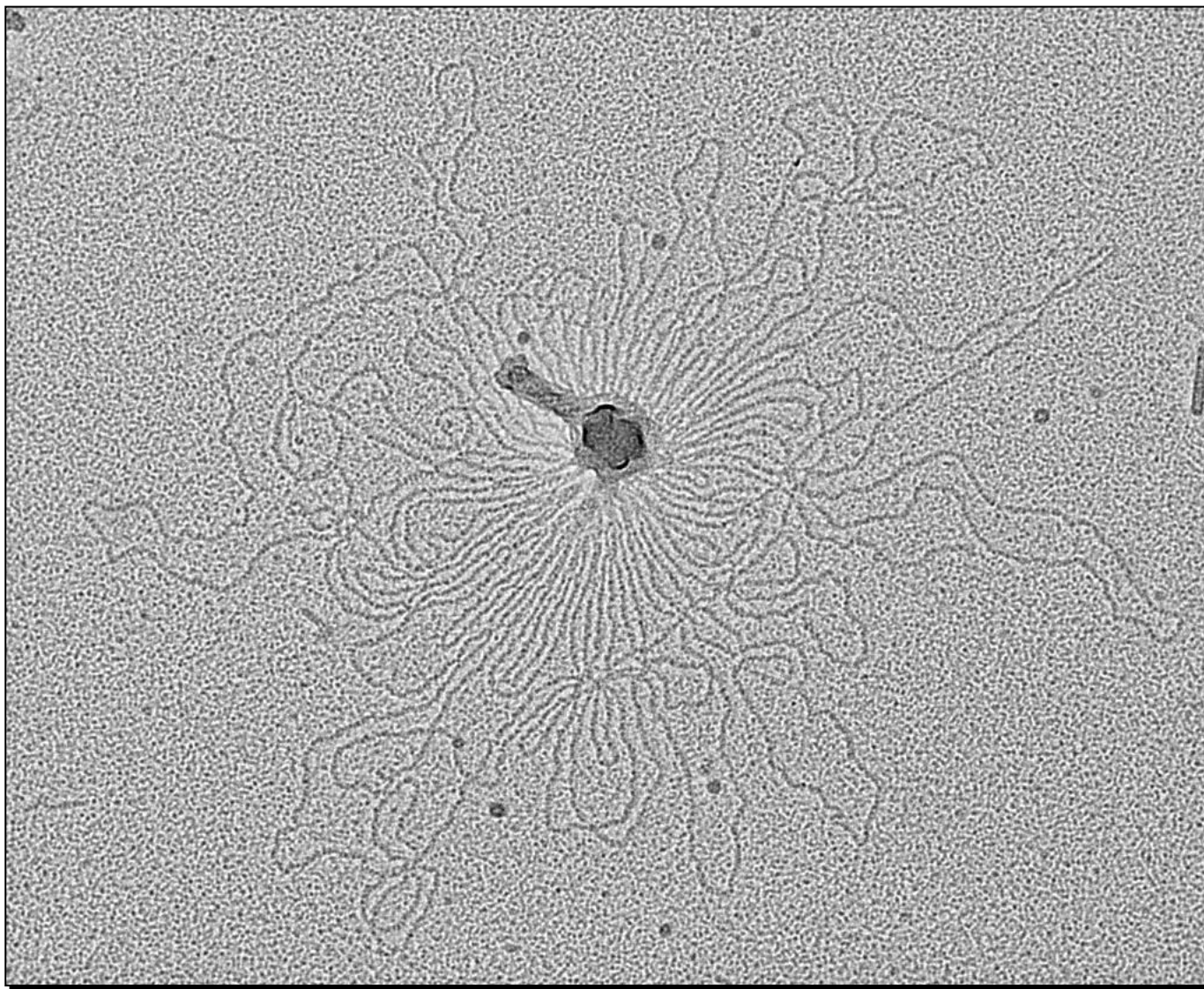
- wolframový drátek s namotanou platinou je umístěn mezi elektrody
- procházející proud žhaví wolfram i platinu $\Rightarrow$ ve vakuu dochází k odparu kovu
- kov je pod specifickým úhlem napařován na vzorek
- stolek může rotovat – kov je napařován ze všech stran – lepší kontrast

Příprava vzorků pro TEM – napařování kovu na DNA



napaření kovu na mitochondriální DNA – důkaz cirkulární DNA

Příprava vzorků pro TEM – napařování kovu na DNA z bakteriofágu



cirkulární napařování Pt na osmoticky prasklý bakteriofág – DNA uvolněno do okolí

Příprava vzorků pro TEM – repliky povrchu

Replika povrchu

- silnější vzorky nemohou být studovány v TEM (rozptyl, absorpce) $\Rightarrow$ používají se repliky
- metoda povrchových replik spočívá v otisku povrchu do tenkého filmu transparentního pro elektrony (C, Formvar atd.)
- tloušťka repliky je cca 20 nm a z důvodu malého kontrastu je dodatečně stínována

Způsob vytváření replik

uhlíkové repliky

- napaření vrstvy uhlíku na reliéfní povrch vzorku
- materiál vzorku se poté odleptá (rozpustí) a zbyde jen tenká uhlíková vrstva

plastické repliky

- nanesení roztoku polymeru na reliéfní povrch vzorku
- materiál vzorku se rozpustí rozpouštědlem a odpaří $\Rightarrow$ získáme tenkou repliku

