

Reforma a rozvoj výuky Biofyziky pro potřeby 21. století

Číslo výzvy: **IPo - Oblast 2.2 (výzva 15)**

Reg. č. projektu: **CZ.1.07/2.2.00/15.0215**



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Biologická elektronová mikroskopie

Jana Nebesářová
Laboratoř elektronové mikroskopie
PřF UK Praha, BC AV ČR České Budějovice
E-mail: nebe@paru.cas.cz
<http://www.paru.cas.cz/lem/book/index.html>

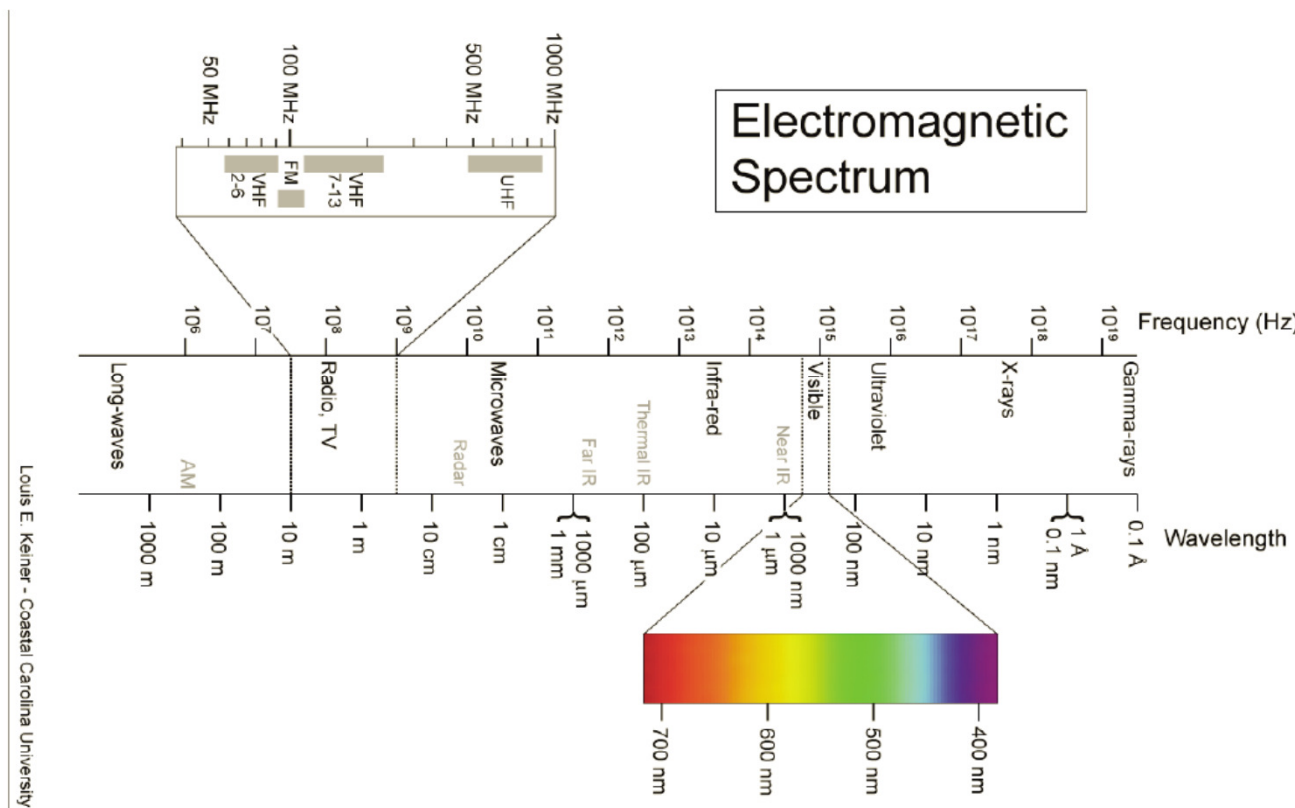


Co je to elektronová mikroskopie?

- Metoda, kdy se ke zkoumání vzorku používá svazku urychlených elektronů
- Získané informace – morfologie (TEM), topologie (SEM), kvalitativní a kvantitativní analýzy (rtg.mikroanalýza), krystalografické vl. (elektronová difrakce)
- Základní rozdělení – transmisní a skenovací elektronové mikroskopy

Rozlišovací schopnost mikroskopu

The electromagnetic spectrum



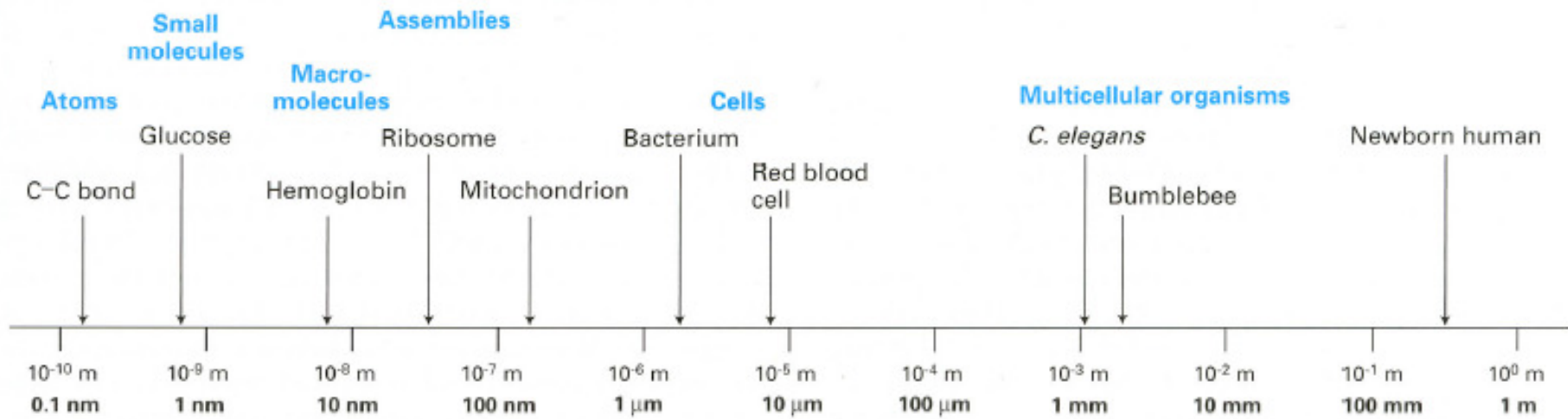
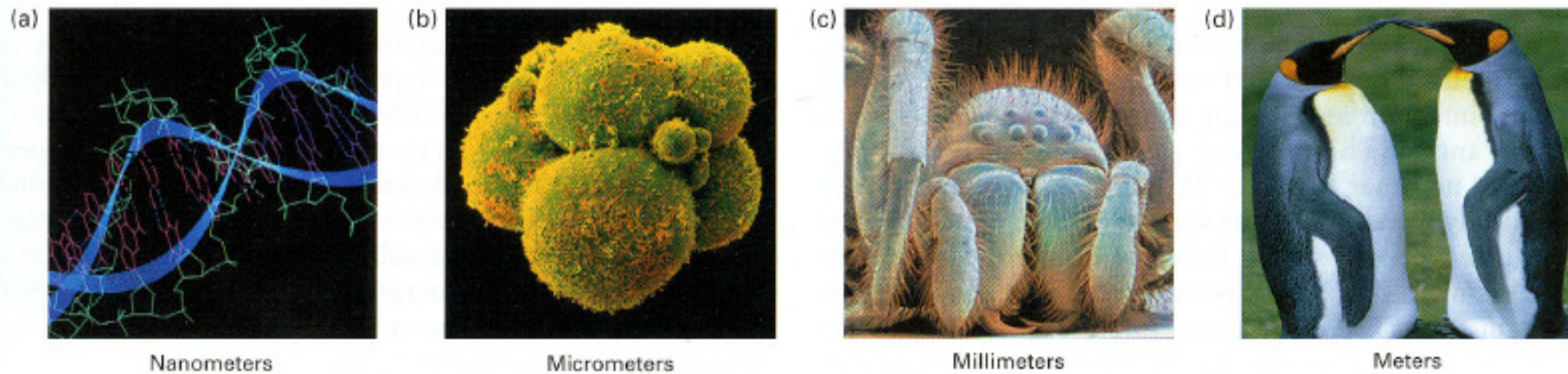
Rozlišení optického mikroskopu:

bílé světlo – 280 nm

UV světlo – 160 nm

Rozlišení TEM:

100 kV – 0,5 nm



Molecular Cell Biology, Harvey Lodish, 2007



Rozlišovací schopnost

- Nejmenší vzdálenost dvou bodů (bodová) nebo čar (čarová), které je možné v obraze vhodného objektu danou optickou soustavou rozeznat jako oddělené
- Subjektivní – optické vlastnosti oka
- Objektivní - matematicky



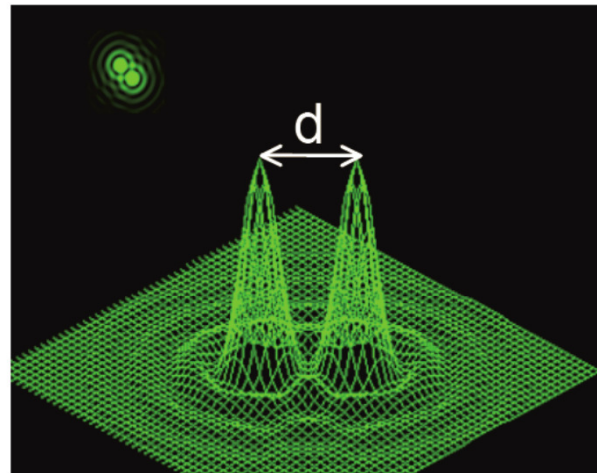
Rozlišení a zvětšení

- Lidské oko – mm
- Optický mikroskop – μm
- Elektronový mikroskop -nm

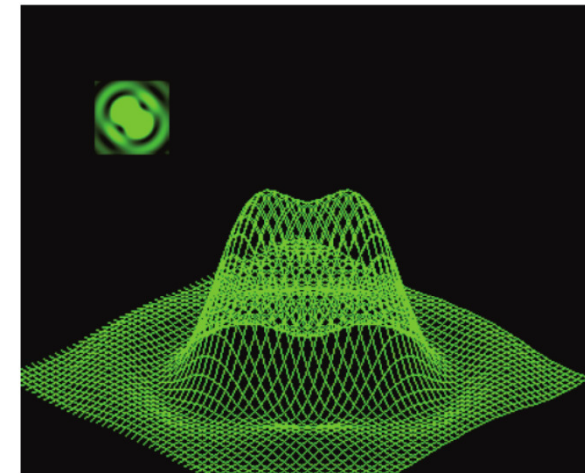
Zvětšení = poměr mezi velikostí
virtuálního zobrazení objektu a
skutečnou velikostí objektu

Rozlišovací schopnost mikroskopu

- Odpovídá zhruba polovině vlnové délky záření použitého k zobrazení objektu
- Abbého vztah: $d = \lambda / (2n \sin \theta)$



1 MV
 $\lambda \approx 1.2 \text{ pm}$



100 kV
 $\lambda \approx 3.8 \text{ pm}$




Proč elektrony

- Jednoduše získatelné
- Lehké
- Duální charakter:
$$\left. \begin{array}{l} eU = \frac{1}{2} mv^2 \\ \lambda = h/mv \end{array} \right\} \lambda = \frac{h}{(2meU)^{\frac{1}{2}}}$$
- Náboj – možnost ovlivňovat je elektrostatickým nebo elektromagnetickým polem
- Nevýhoda – volně pohybovat se mohou ve vakuu lepším než 10^{-4} torru

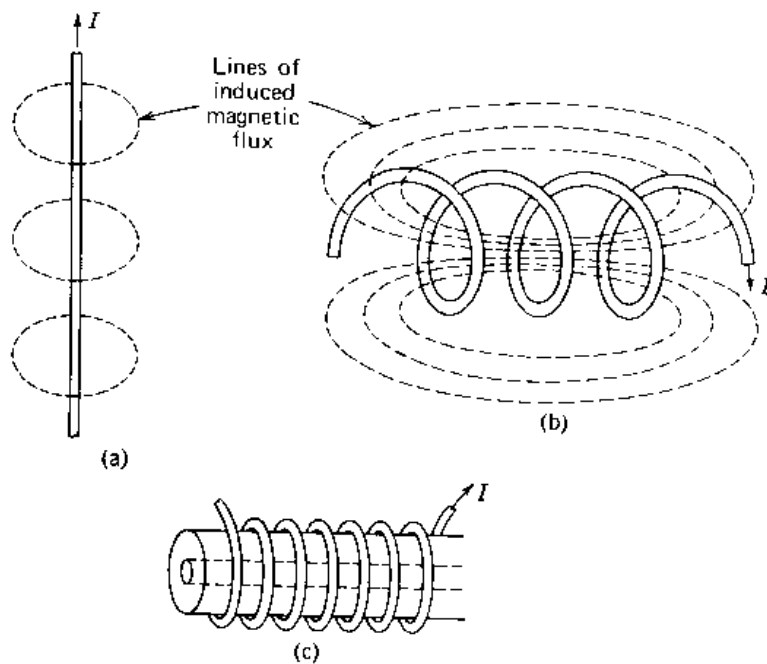


Rychlost elektronů

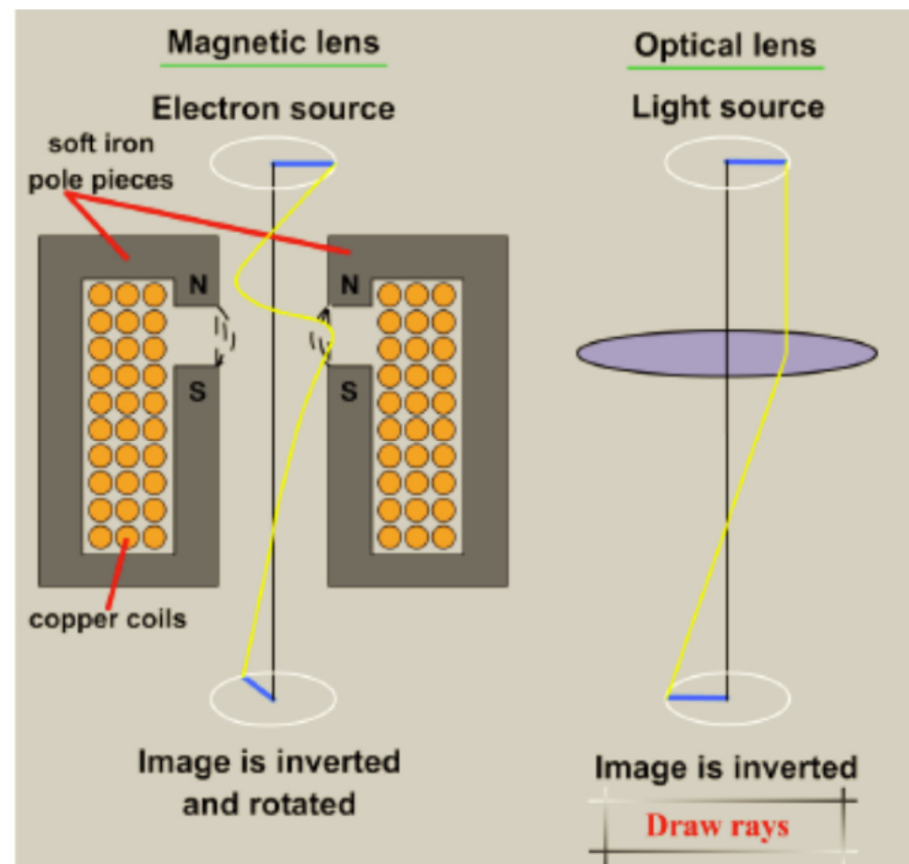


E [keV]	λ [Å]	v [km/sec]
20	0.086	76 000
40	0.060	107 000
60	0.059	131 000
80	0.042	152 000
100	0.037	170 000
300	0.019	233 000
1000	0.009	282 000

Elektromagnetické čočky



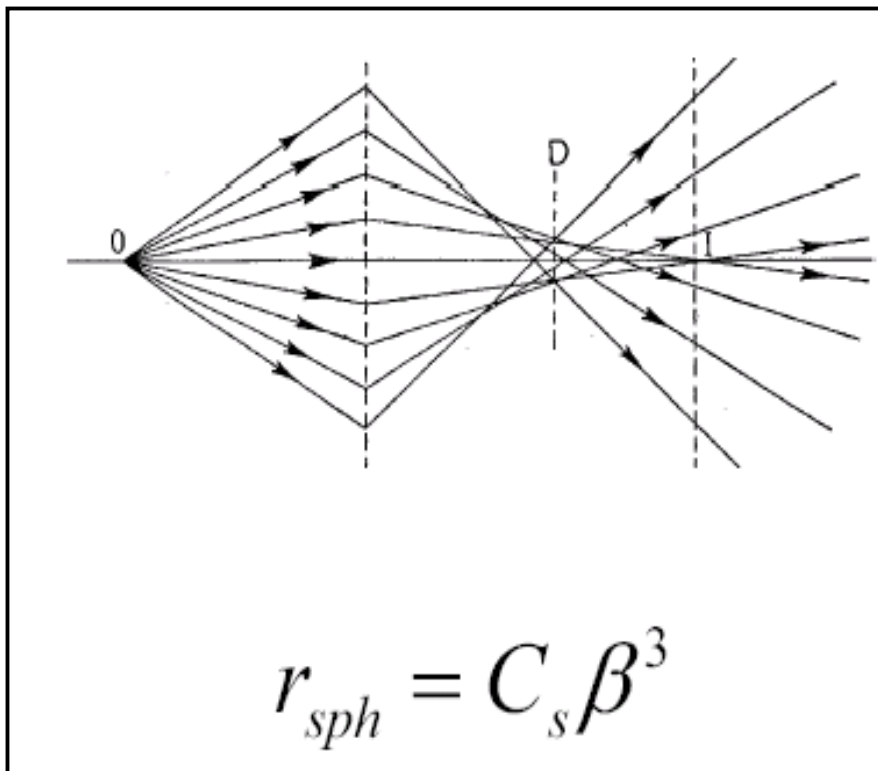
solenoid



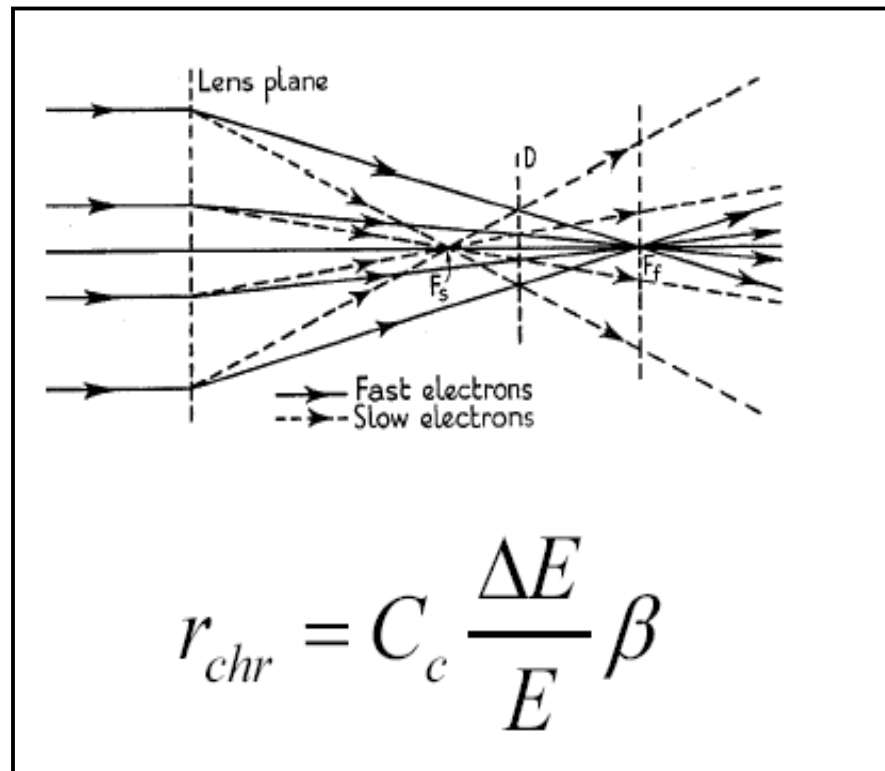
Elektromagnetická
čočka

Vady čoček

Sférická vada

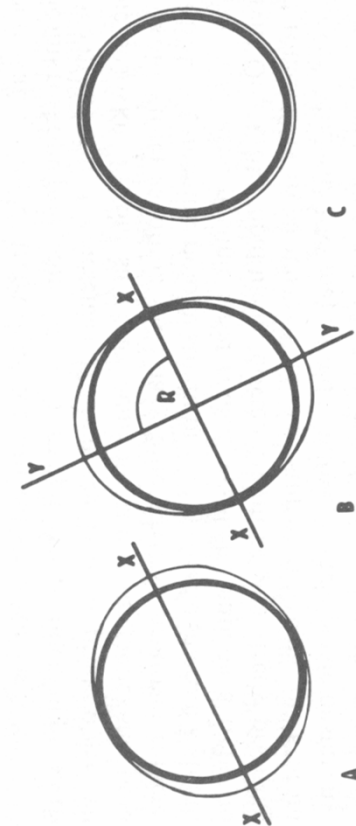
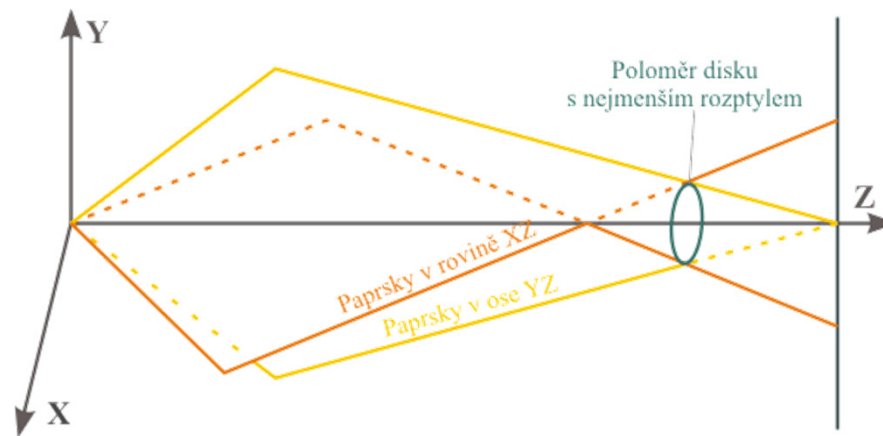


Chromatická vada

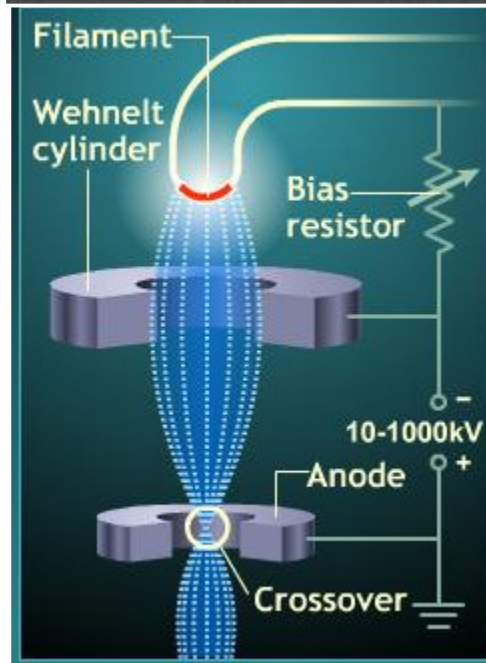
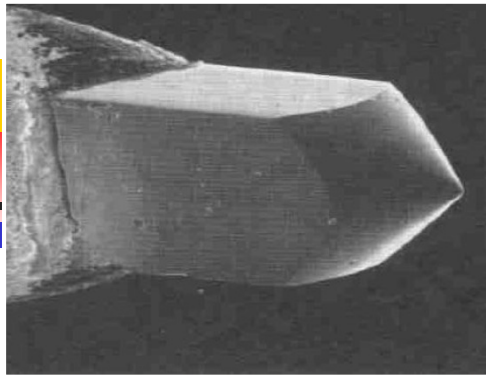


Vady čoček

- Osový astigmatismus – jediná korigovatelná vada – stigmátor
- Nečistoty a nehomogenita materiálů pólových nástavců, clon – mění se v průběhu prohlížení



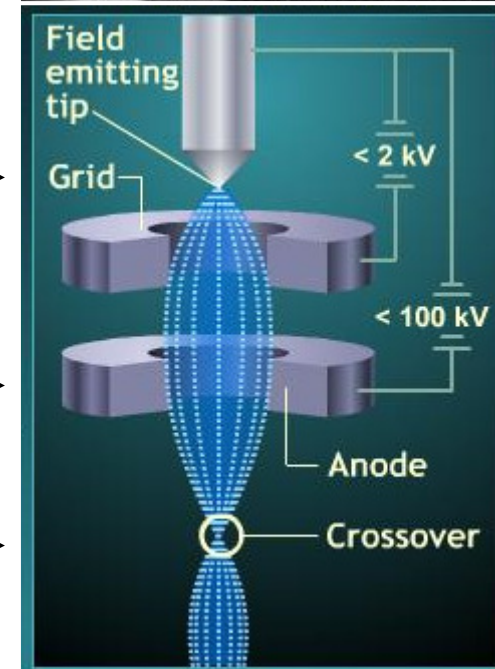
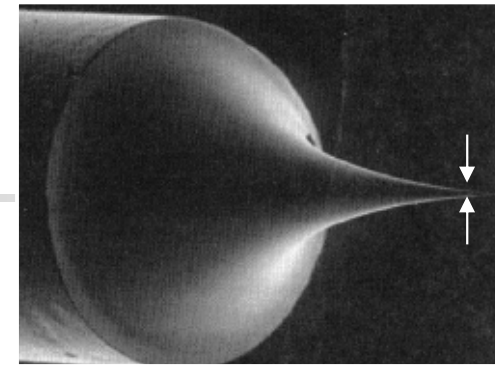
Thermionic



LaB₆ crystal or Tungsten

Gun

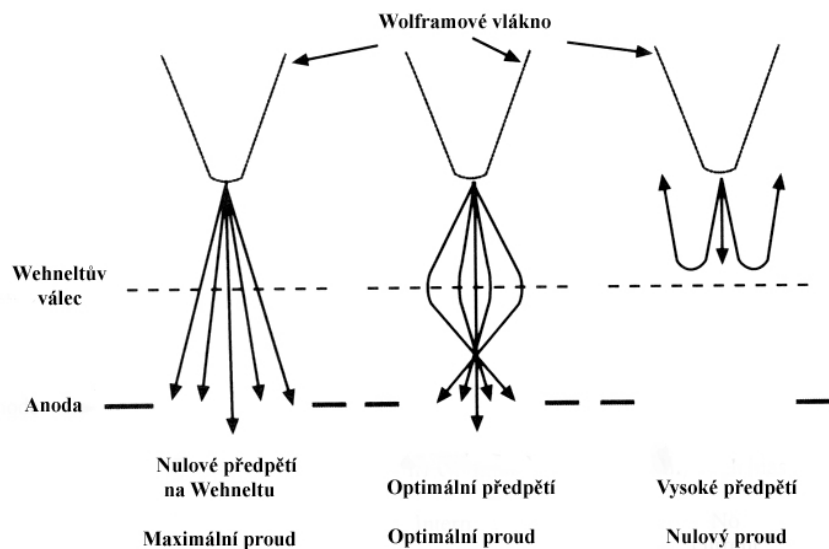
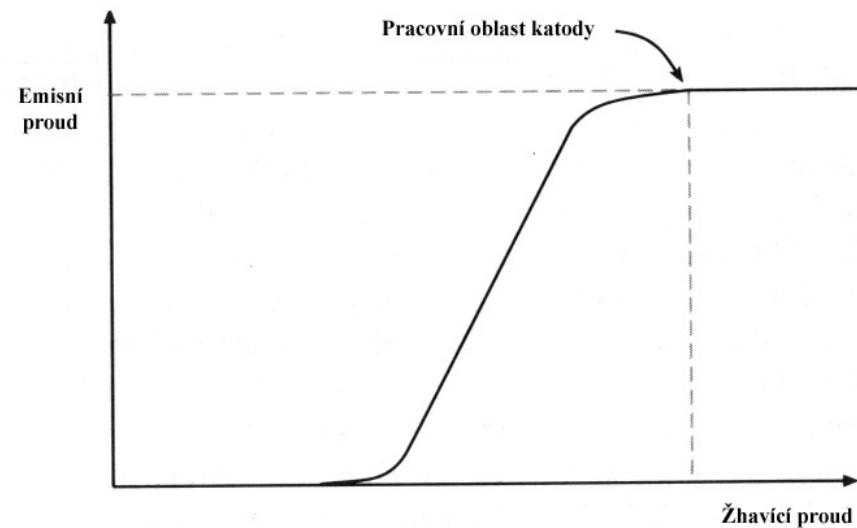
Field emission (FEG)



Tungsten tip coated with ZrO

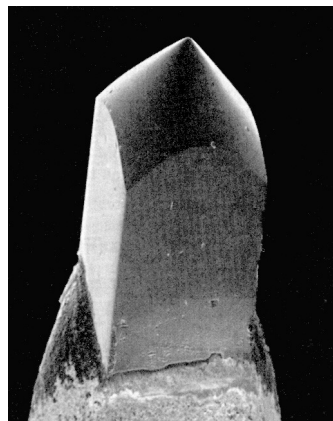
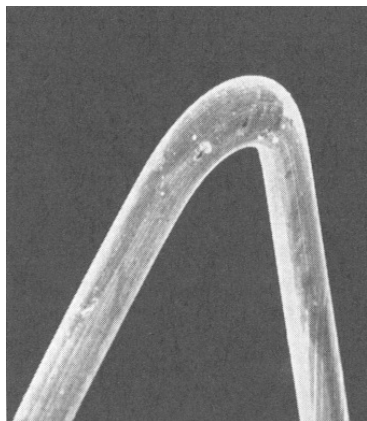
Termoemisní zdroj elektronů

Vliv nastavení žhavicího proudu
na emisní proud katody



Funkce Wehneltova válce

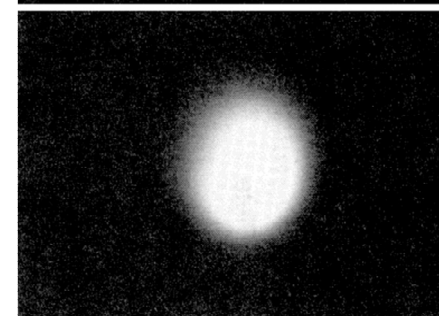
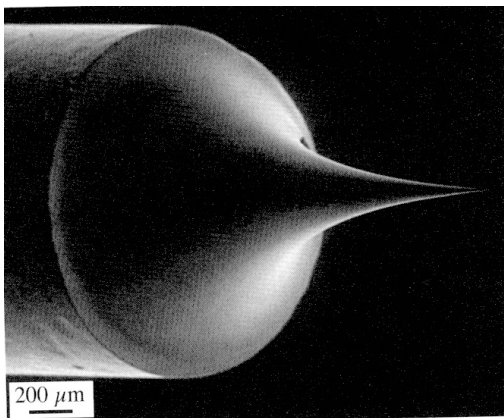
Zdroje elektronů



W katody, LaB₆, auto-emisní katoda



Obraz dutého paprsku



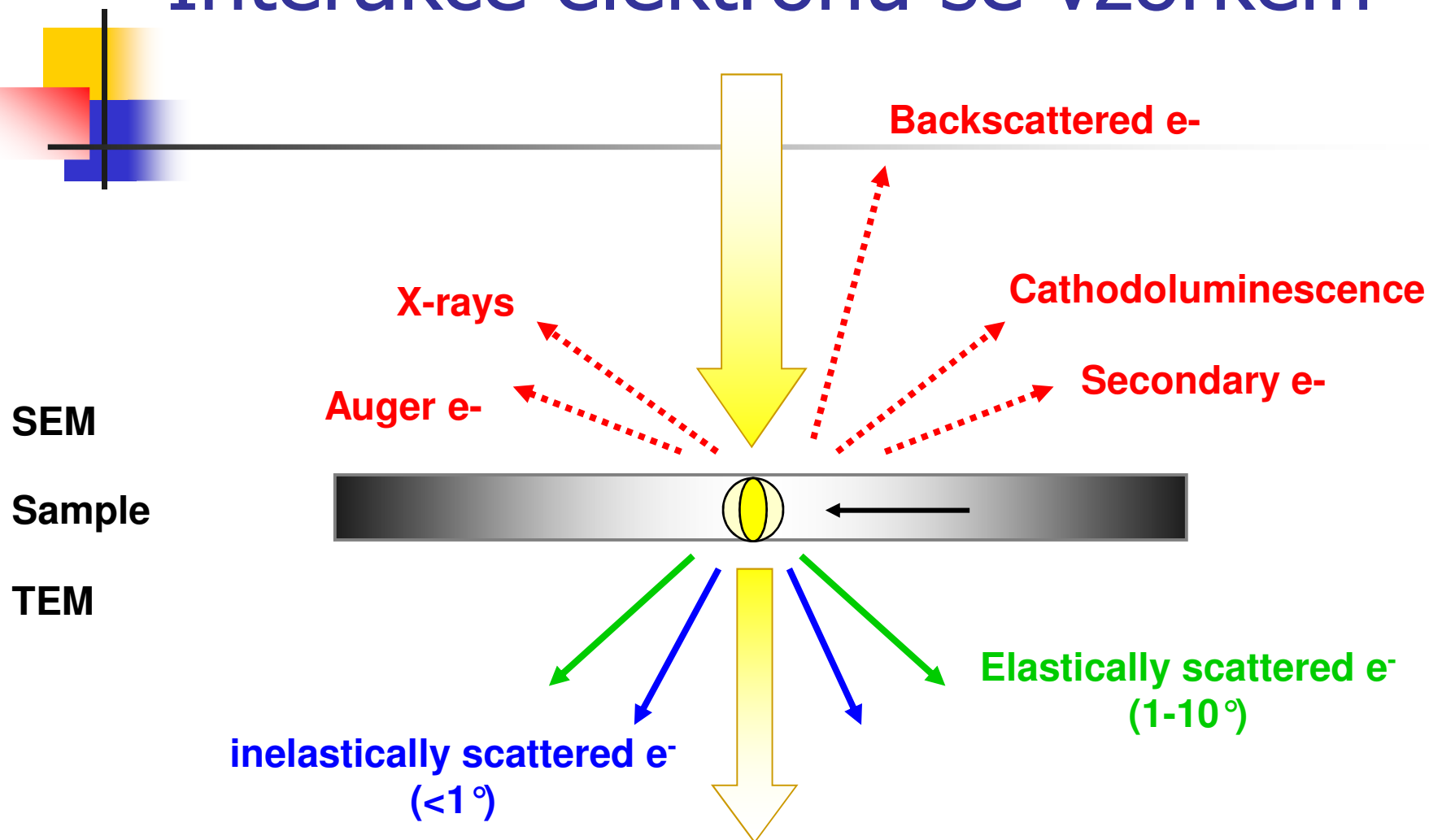


Zdroje elektronů

Parametry jednotlivých elektronových zdrojů

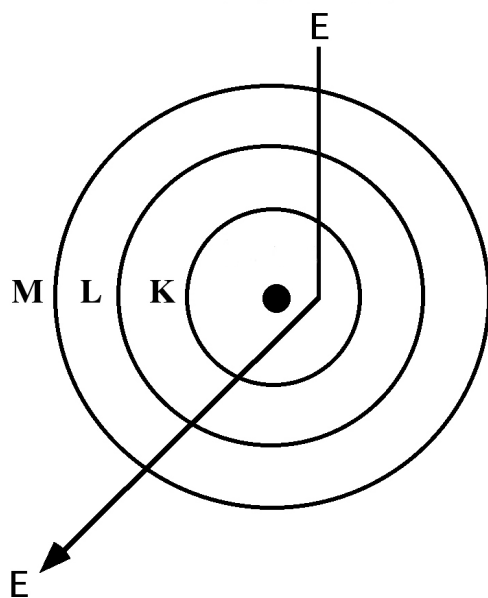
Vlastnosti	W katoda	LaB6	autoemisní tryska
průměr hrotu	200 μm	20 μm	0,1 μm
provozní teplota	2859 K	1850 K	okolí
proud svazku	5×10^{-12} A	8×10^{-11} A	10^{-8} A
průměr svazku	9 μm	5 μm	1-2 nm
požadované vakuum	10^{-5} mm Hg	10^{-7} mm Hg	10^{-10} mm Hg
životnost	35 h	250 h	neomezená

Interakce elektronů se vzorkem



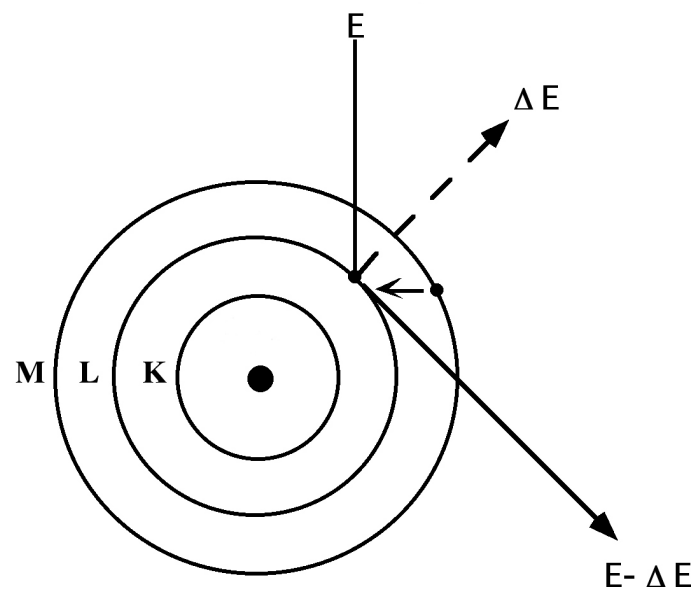
Rozptylový kontrast

Elastický rozptyl

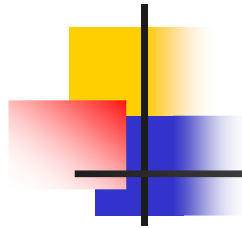


- Bez ztráty energie
- Velká změna směru

Neelastický rozptyl

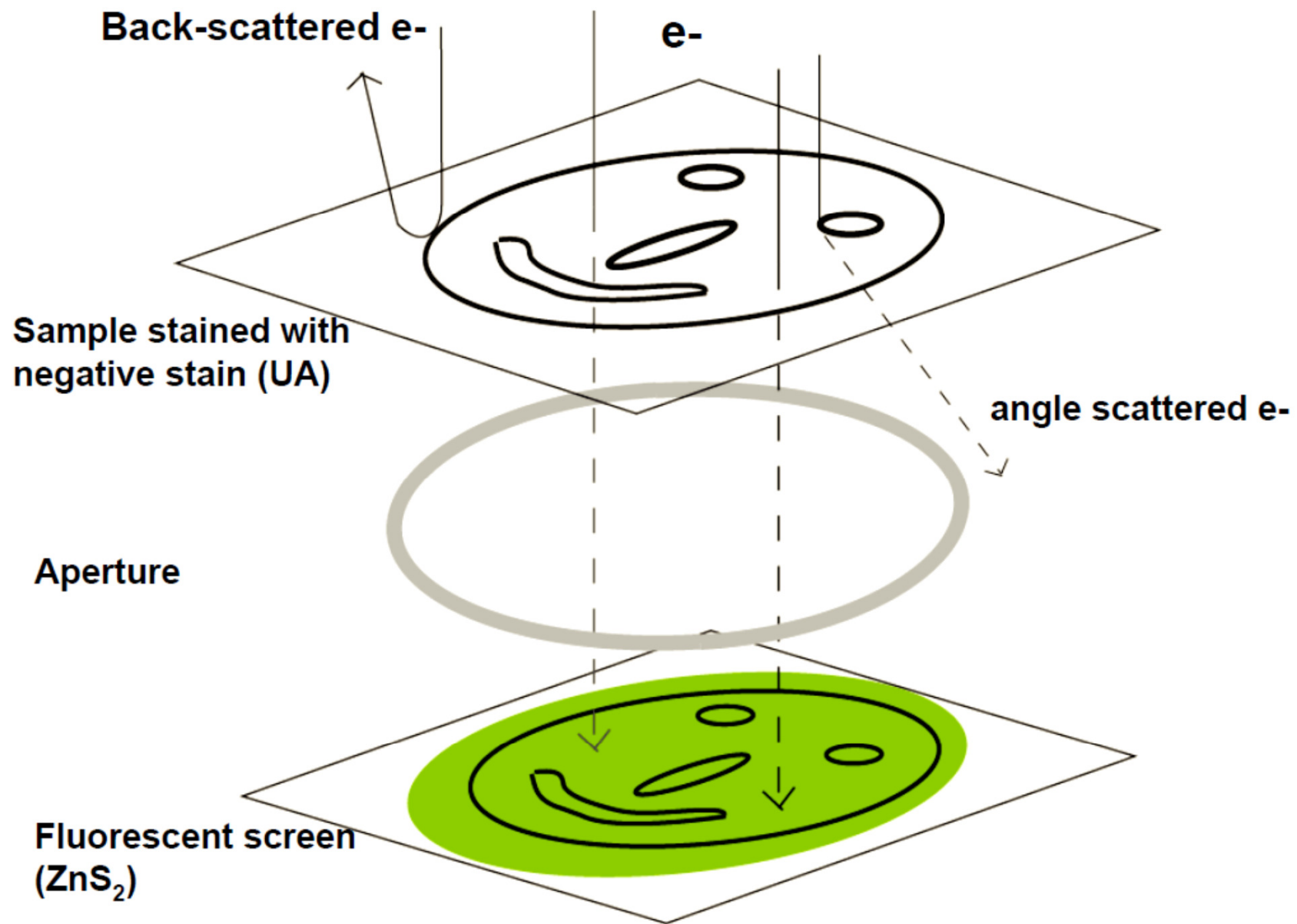


- Malá ztráta energie
- Malá změna směru



Tvorba obrazu

- Amplitudový kontrast – pružný a nepružný rozptyl
- Fázový kontrast – interference
- Biologické preparáty jsou tvořeny lehkými prvky – nízký kontrast
- Zvýšení kontrastu – změnou urychlovacího napětí, objektivovou clonou, tloušťkou preparátu, přidavkem těžkých kovů





Trocha historie nikoho nezabije....

- 1887: objev elektronu - J.J. Thompson
- 1924: De Broglieho zákon – vlnová délka elektronu $\lambda = h/mv$
- 1926: H.Busch – vliv elektrického a magnetického pole na elektron
- 1931: E.Ruska, M.Knoll a další staví první elektronový mikroskop
- 1939: první komerční přístroj (firma Siemens und Halske) 10 nm
- 1938: první prototyp SEMu - M. von Ardenne
- 1942: Zworykin k detekci SE fotonásobič
- 1965: Cambridge Instruments představují první SEM - 50 nm
- 1986: Nobelova cena za konstrukci TEM – E.Ruska

- Česká republika – Ústav přístrojové techniky (Drahoš, Delong), Tesla Brno

Historie

TEM

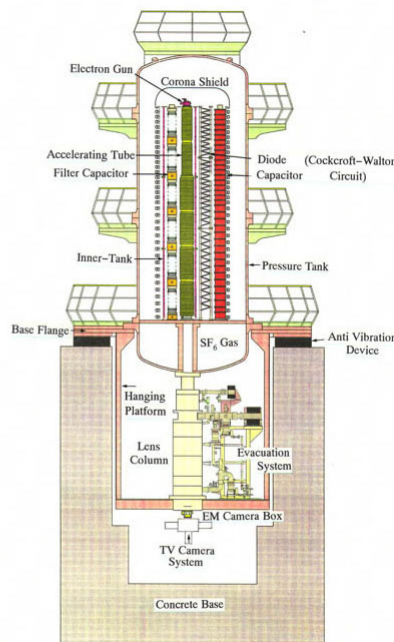
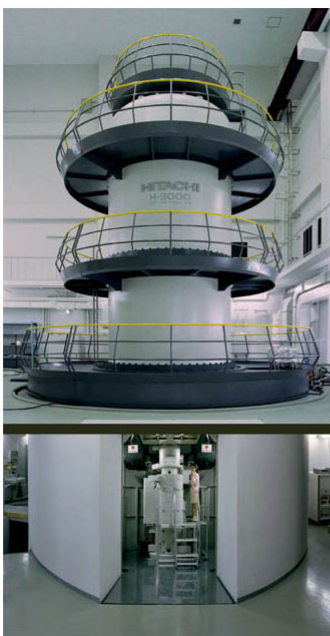


1931 by the German engineers [Ernst Ruska](#) and [Max Knoll](#)



Williams B D, Carter C B, Transmission Electron Microscopy

Současnost

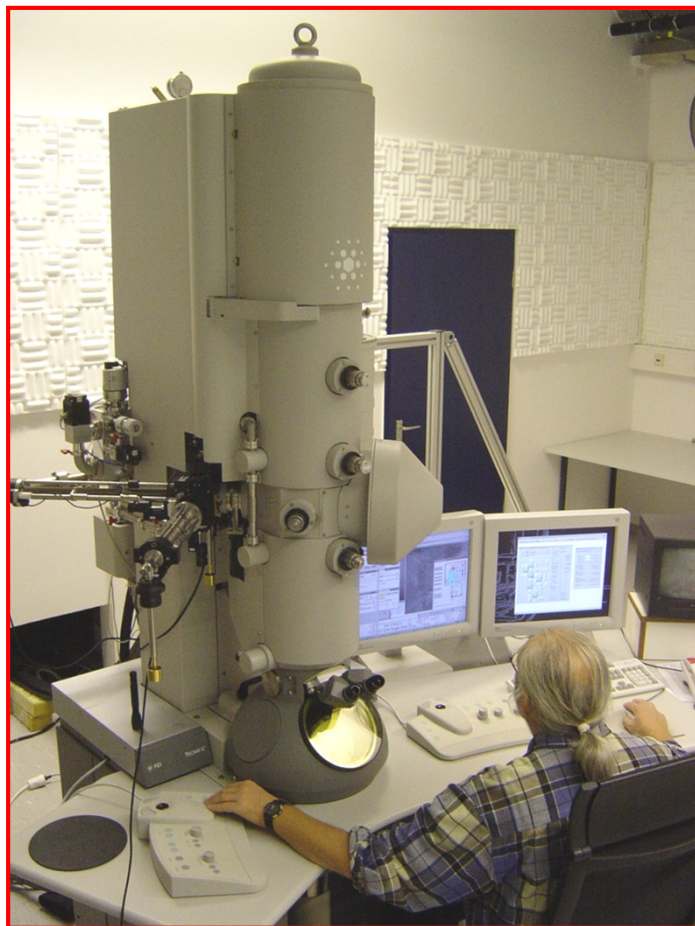


Největší elektronový mikroskop



Nejmenší elektronový mikroskop

Současnost



FEI Tecnai - Polara



TEM JEOL 1010

TEM – analogie světelného mikroskopu v procházejícím světle

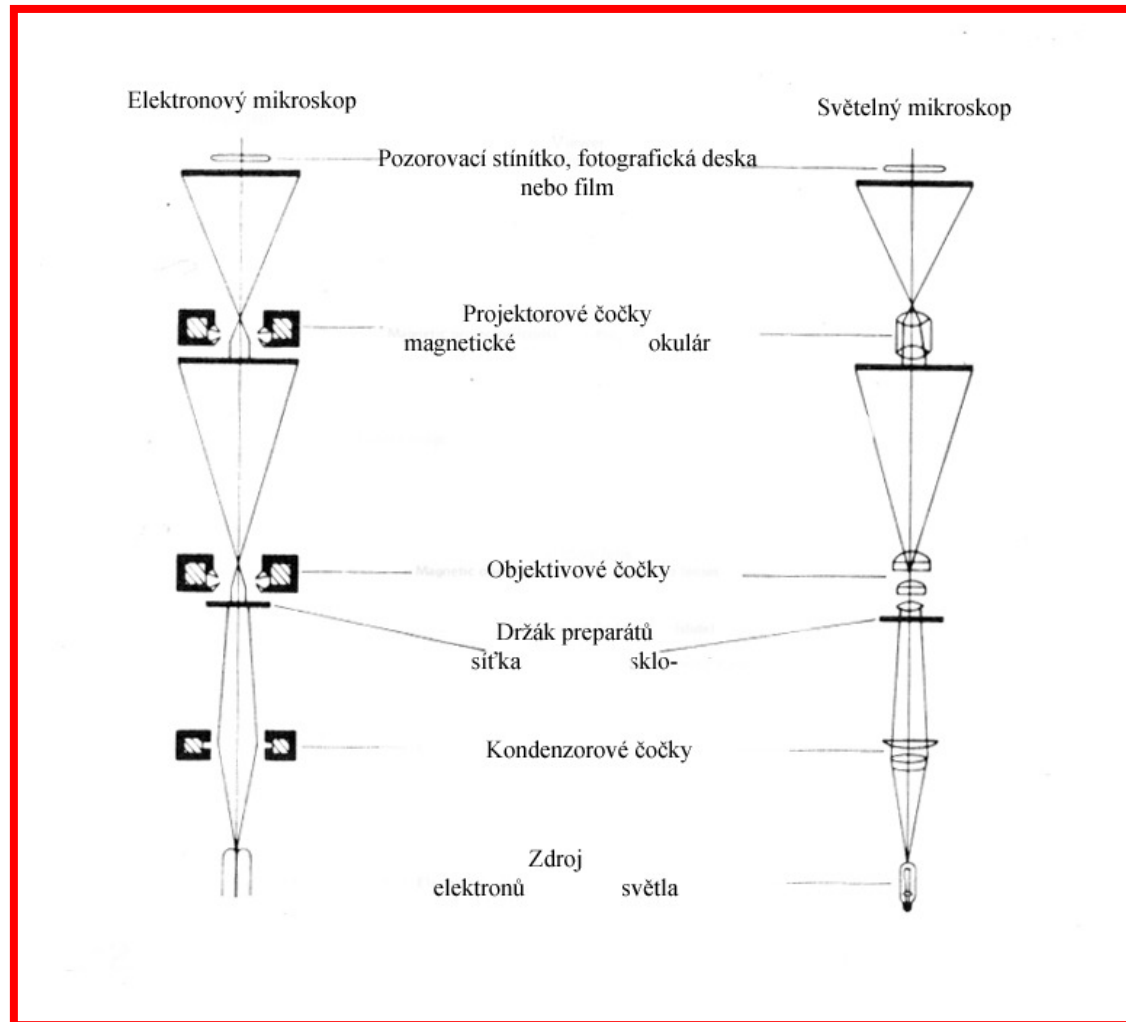
Části TEM:

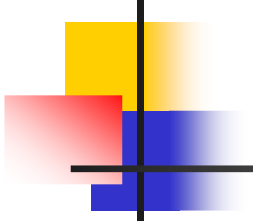
Elektron-optická (zdroj a úprava elektronového paprsku)

Elektronika (zdroje vysokého napětí, zdroje napětí pro elektromagnetické čočky, regulační obvody, PC)

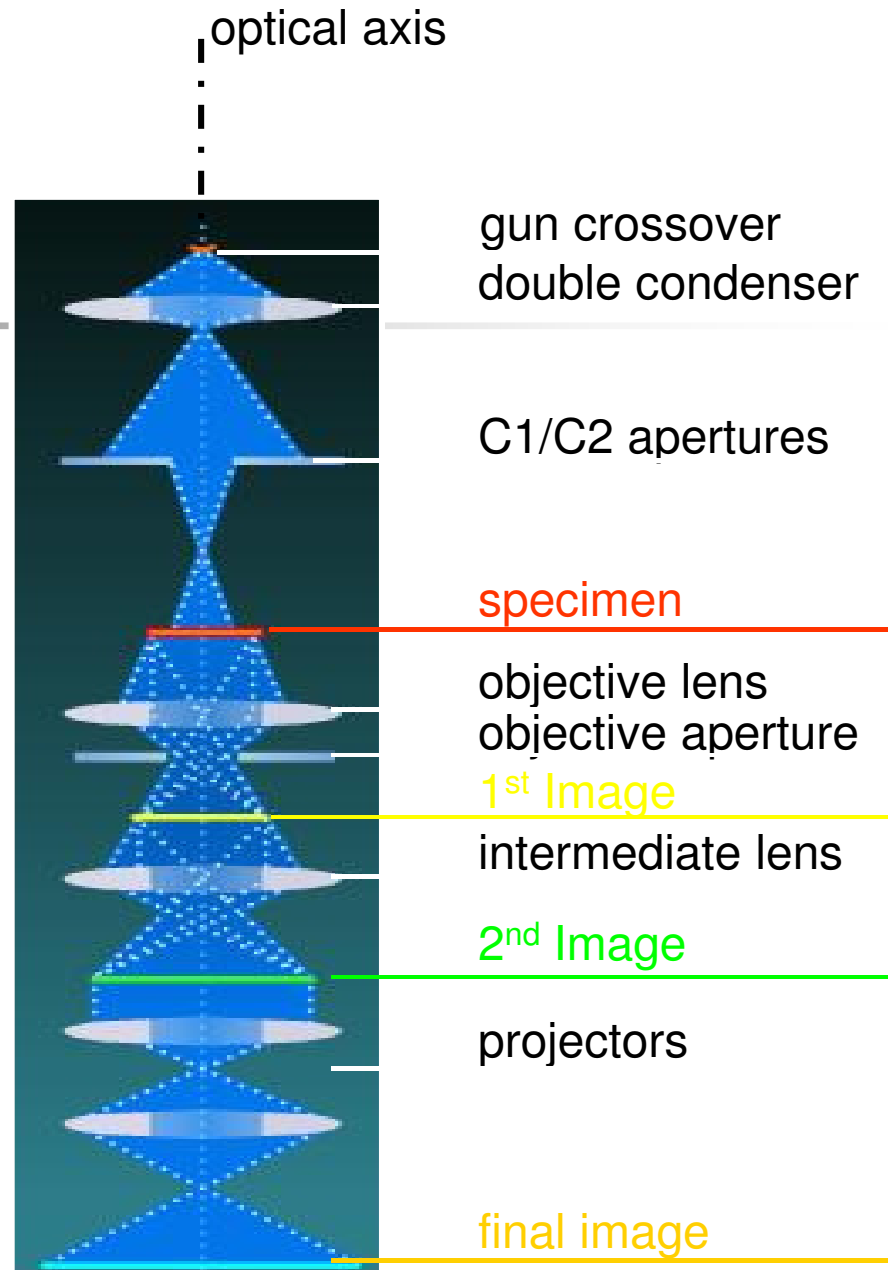
Vakuová (dvou či třístupňový systém s IGP nebo turbomolekulární pumpou)

Záznamová (fotografický nebo digitální záznam)



- 
- **Gun**
 - **Condenser system**
 - **Objective system**
 - **Stage**

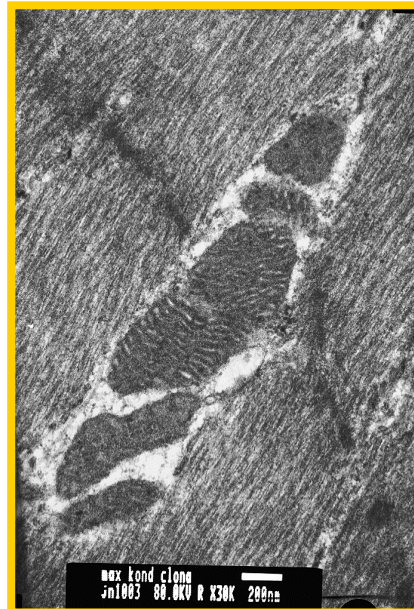
 - **Energy filter**
 - **CCD**



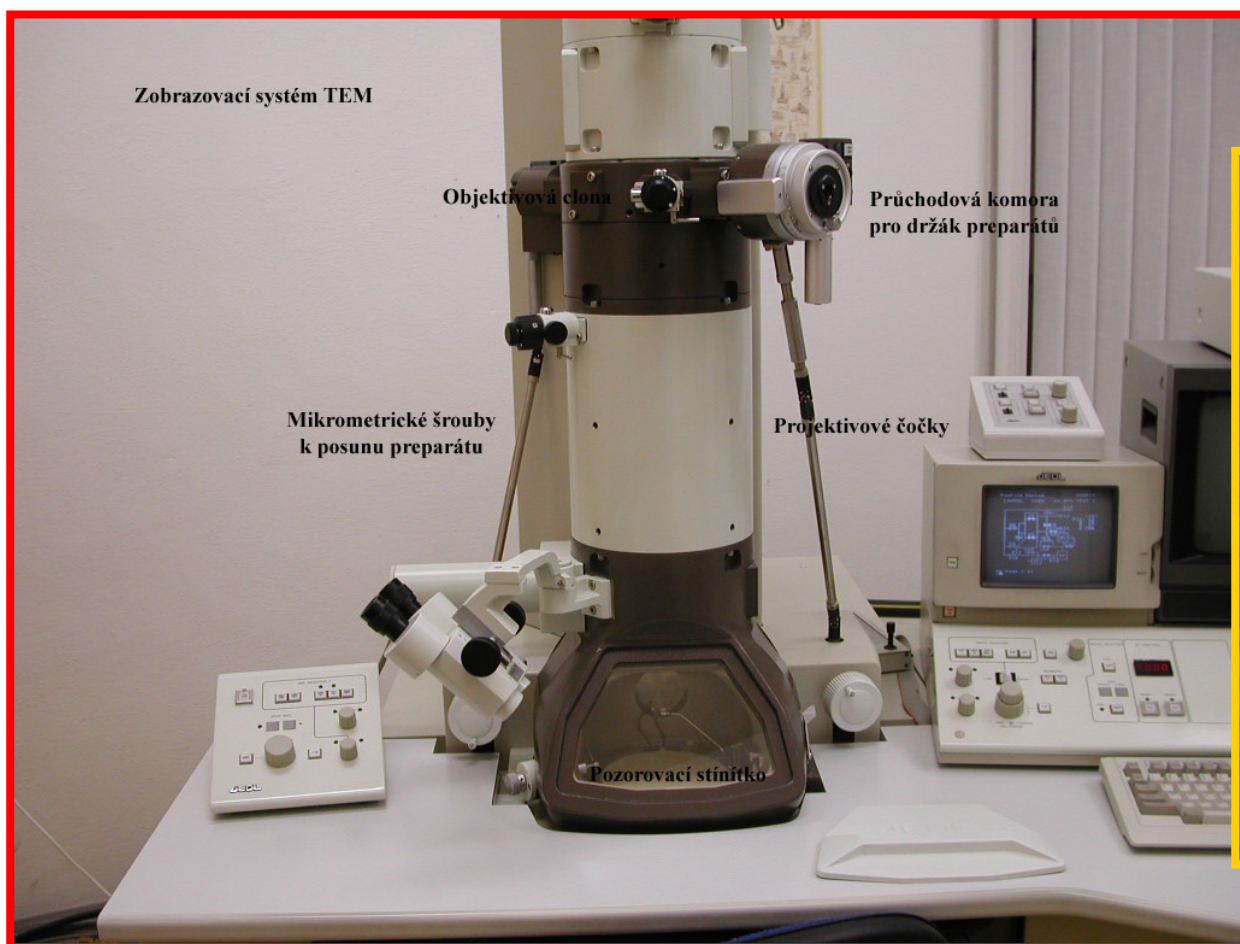
Osvětlovací soustava

Zdroj elektronů
Kondenzorové čočky
Kondenzorová clona

Kondenzorová soustava
přenáší obraz křižště
do roviny preparátu
První kondenzor –
ohnisková vzdálenost
(spot size)
Druhý kondenzor –
fokus
Ovládání – levou rukou



Zobrazovací soustava



Držák preparátů





Zobrazovací soustava

Držák preparátů

Objektiv – nejvýkonnější elektromagnetická čočka systému –
nejkratší ohnisková vzdálenost – ovládání ostřením na pravé straně
ovládacího panelu mikroskopu

Projektivy – celkové zvětšení je násobkem zvětšení všech čoček,
které se podílí na zvětšování, pomocný projektiv s proměnným zvětšením
-ovládání přepínačem zvětšení

Rozsah zvětšení – 300 - 800000 krát

Stigmátor – korekce astigmatismu zobrazovací soustavy

Stínítko – konverze neviditelného elektronového obrazu do oblasti viditelné
malé – ke kontrole ostrosti obrazu

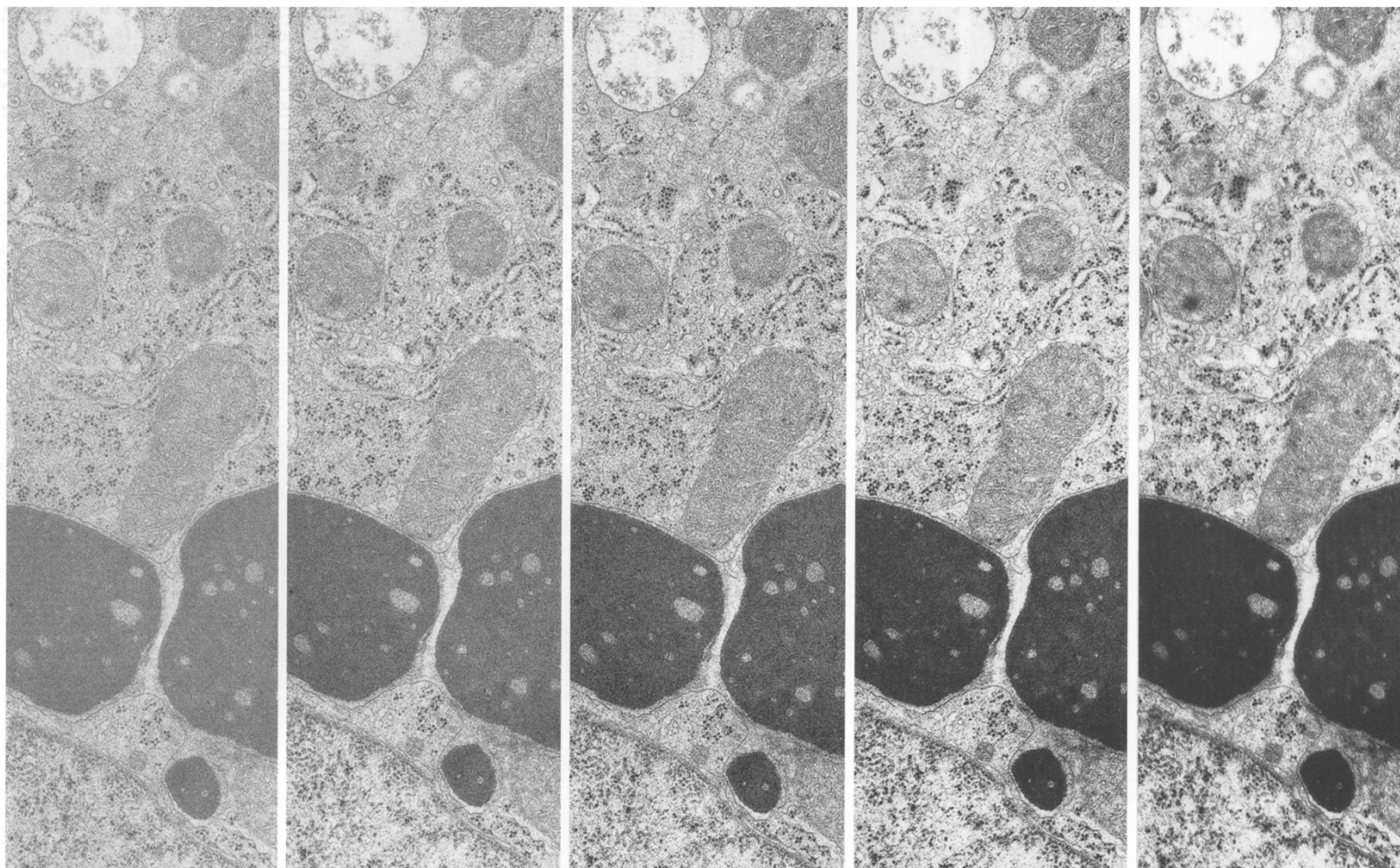
Hloubka ostrosti v obrazové rovině – $H = Z^2 R / A$ 100 m

Hloubka ostrosti v předmětové rovině - 4 μm

Antikontaminační zařízení

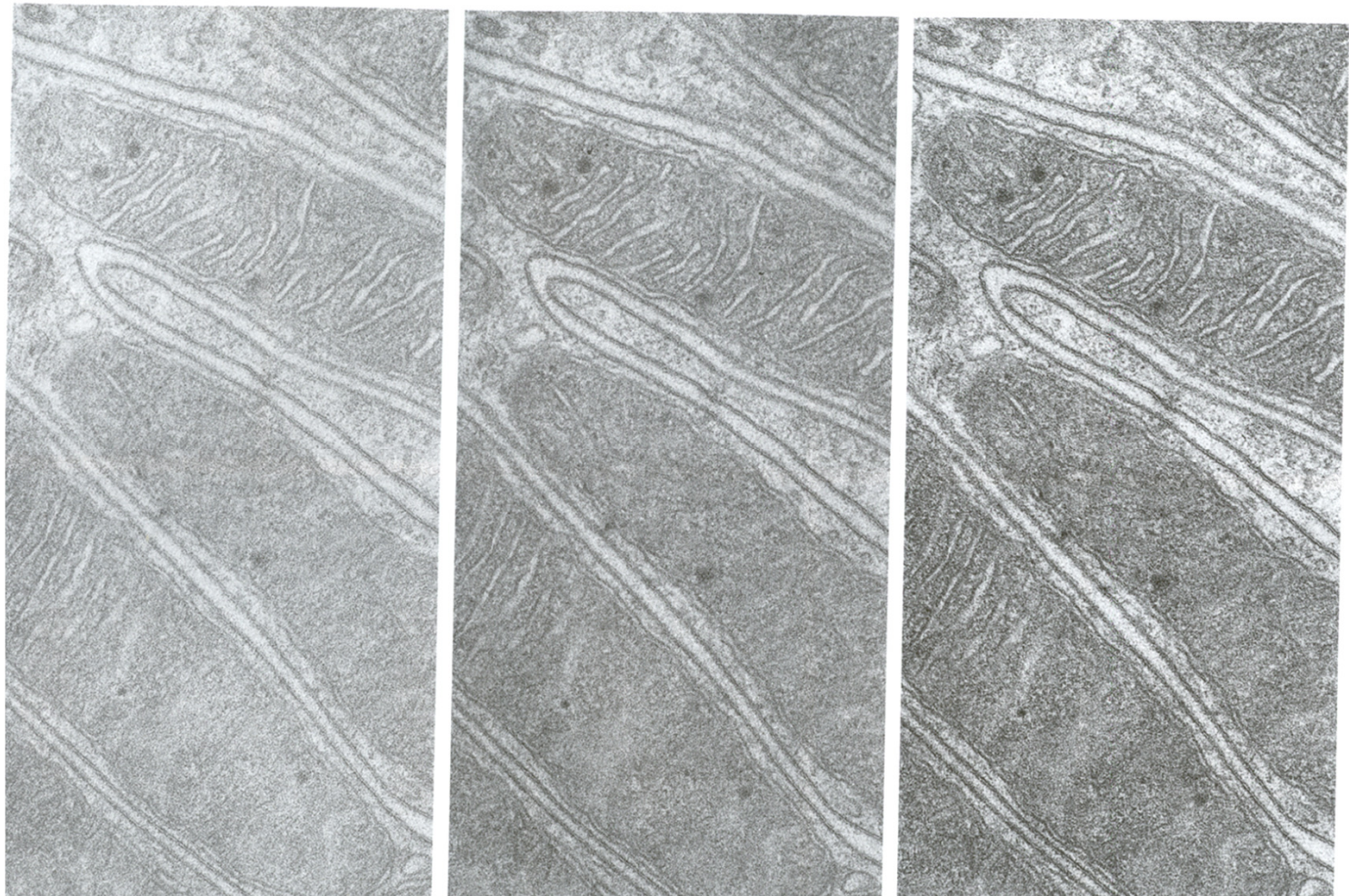
Wobbler – ostření při nízkých zvětšení do 50000 x

Urychlovací napětí

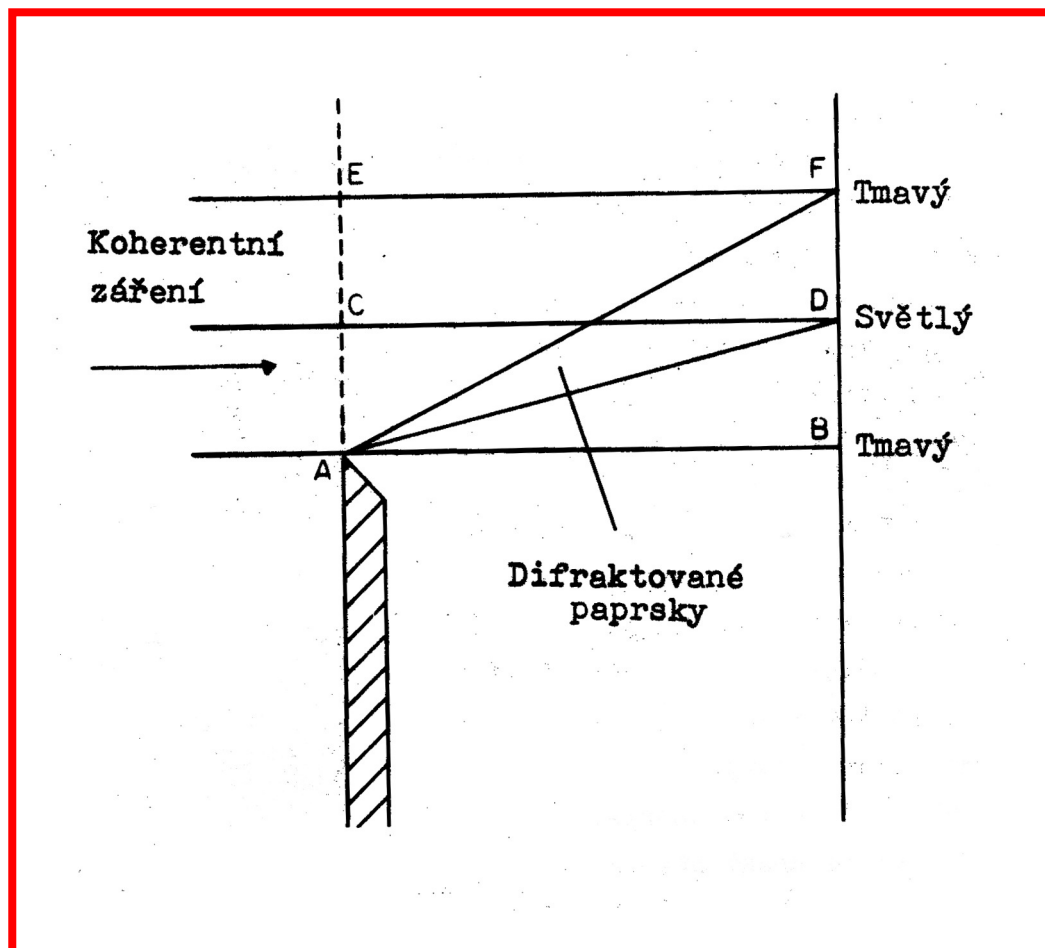




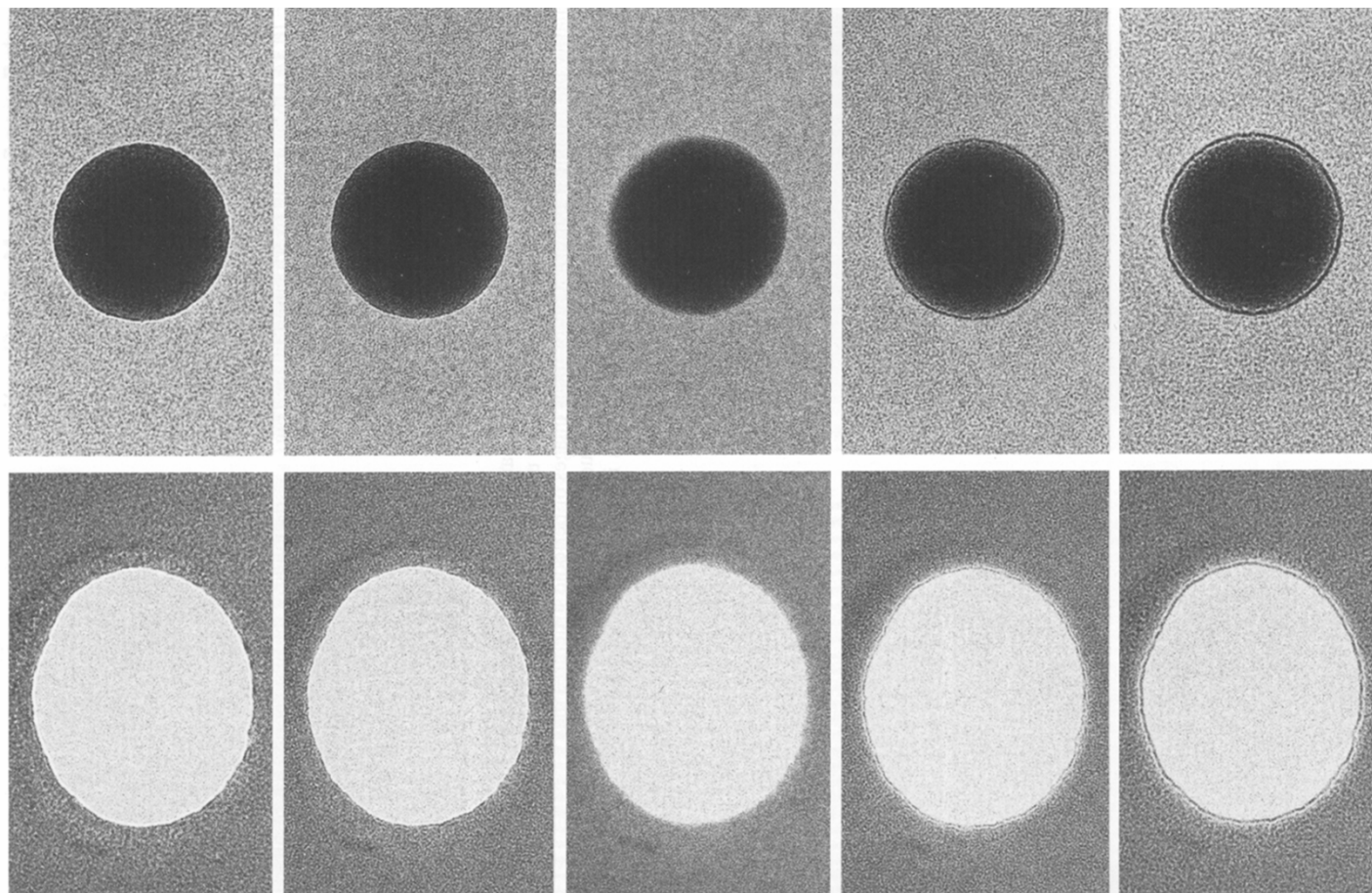
Objektivová clona



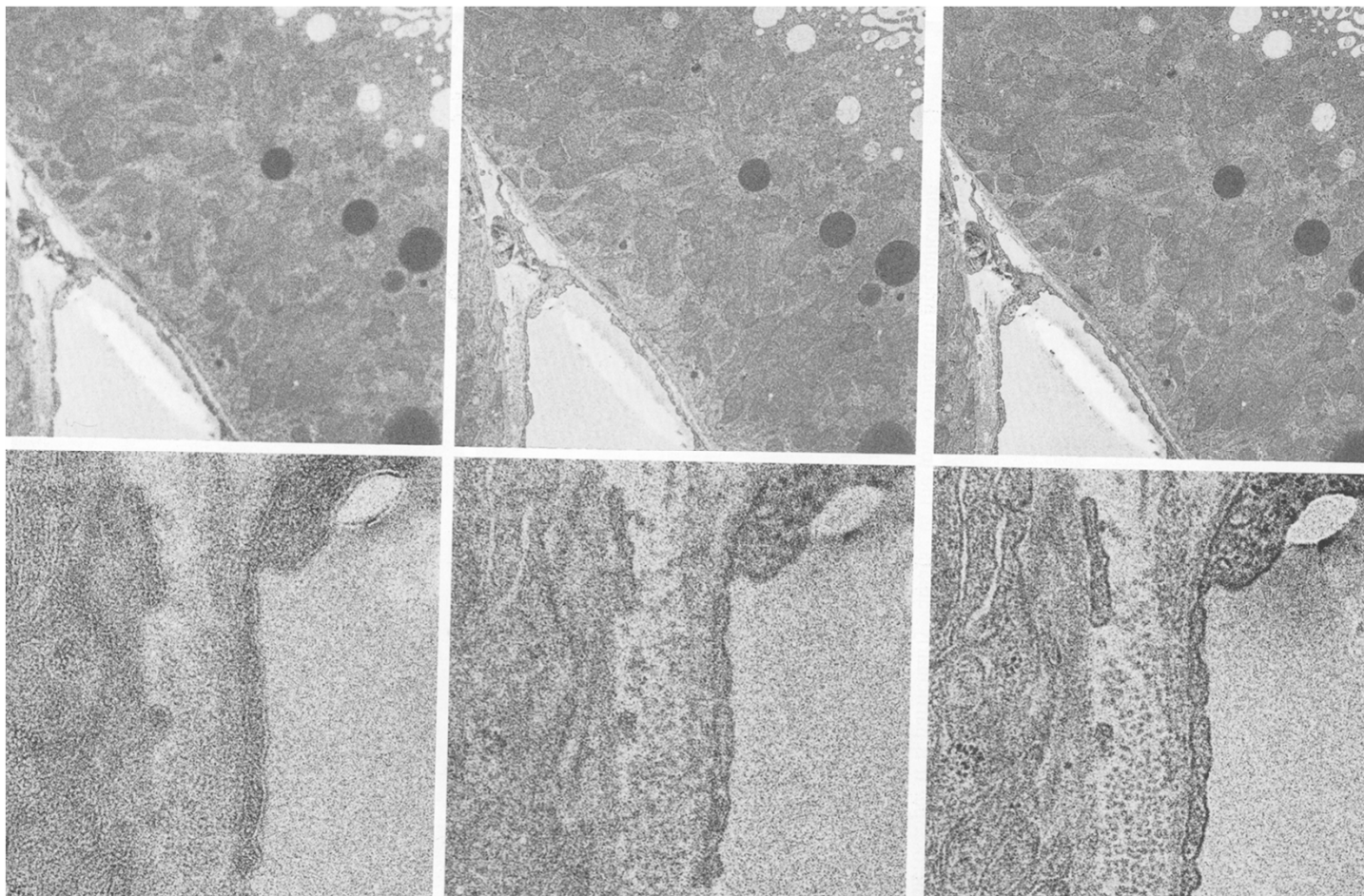
Ohybové jevy v TEM



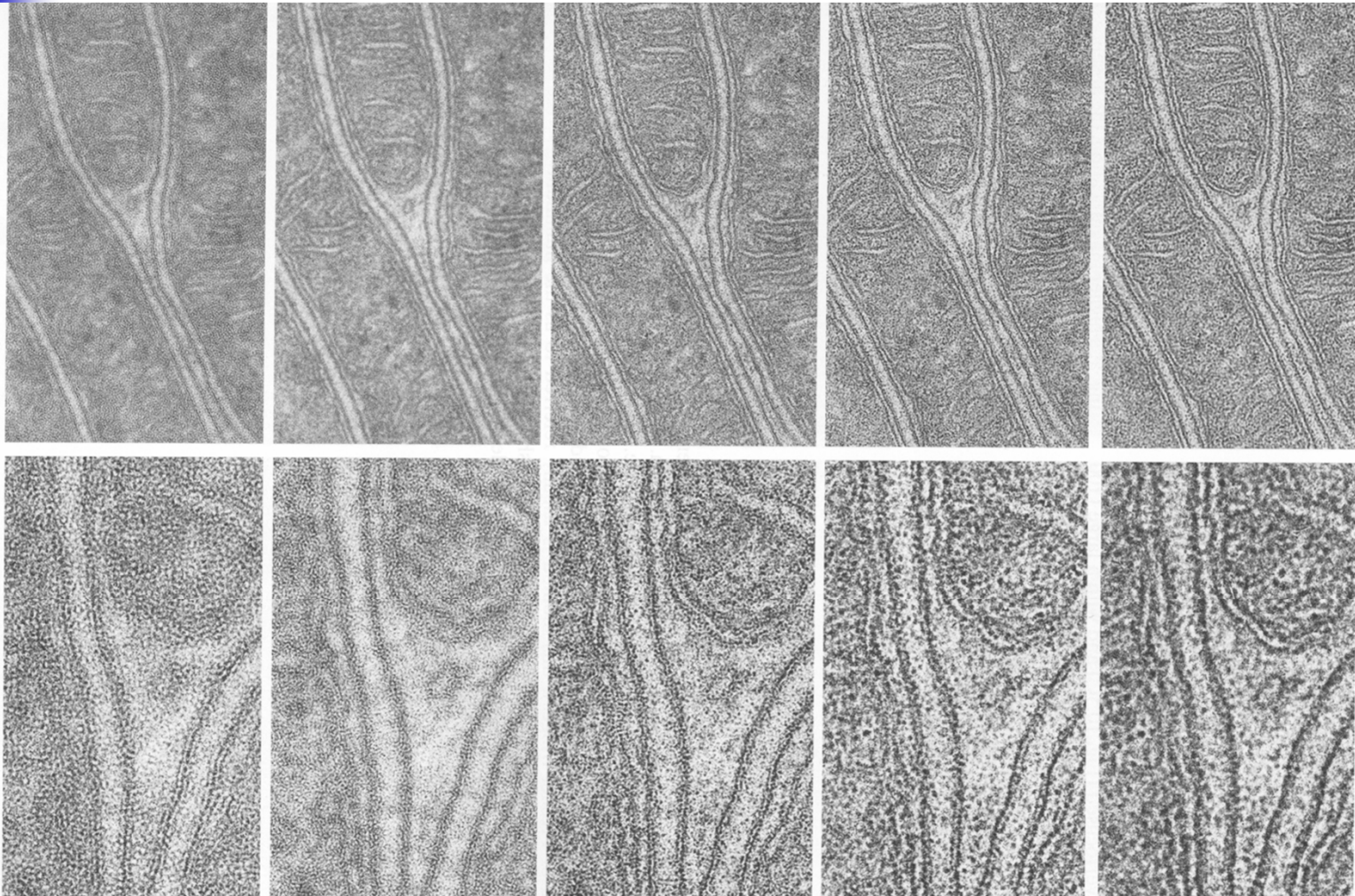
Fresnelův proužek



Kontrast a zaostření

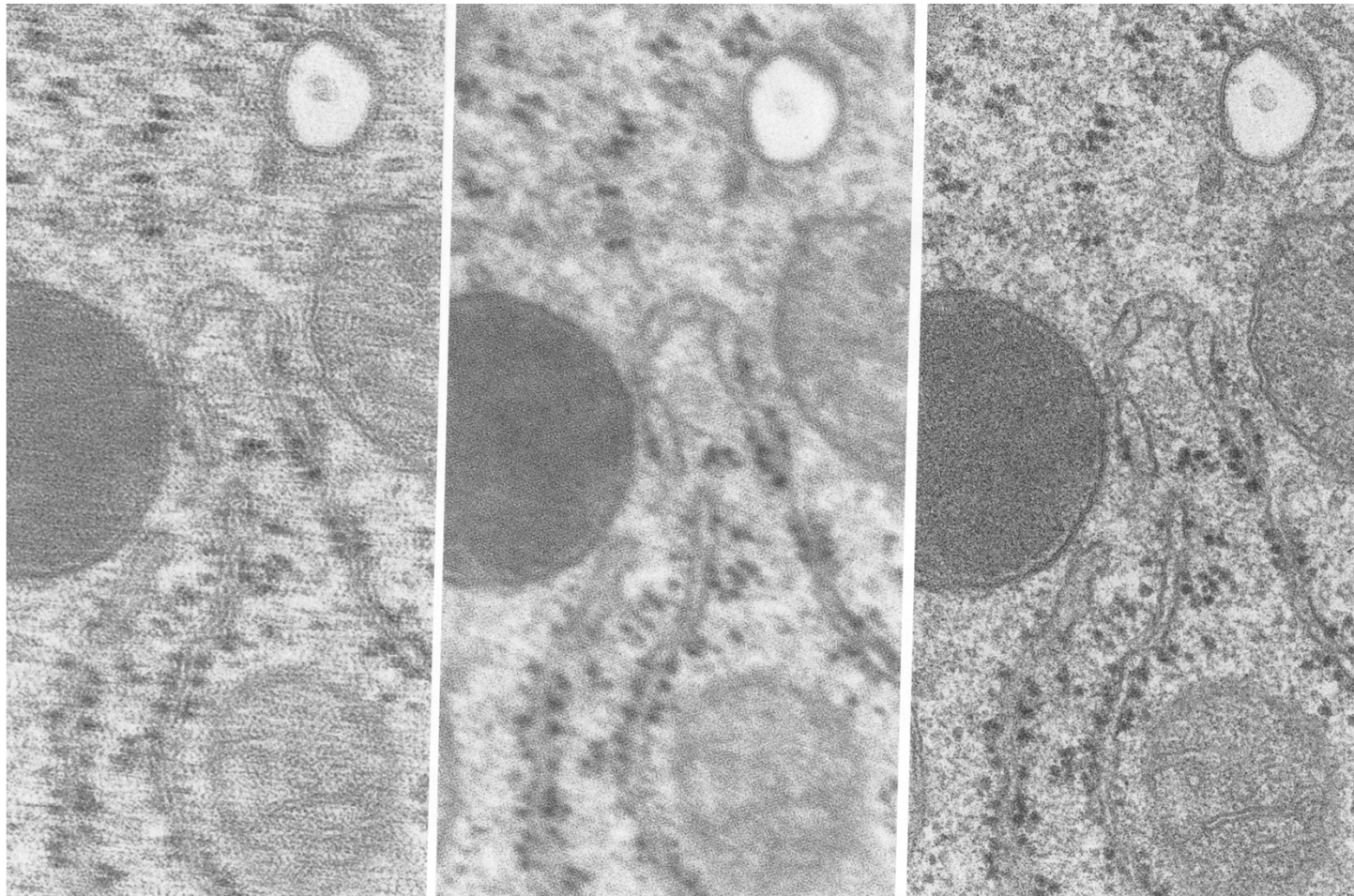


Through focus



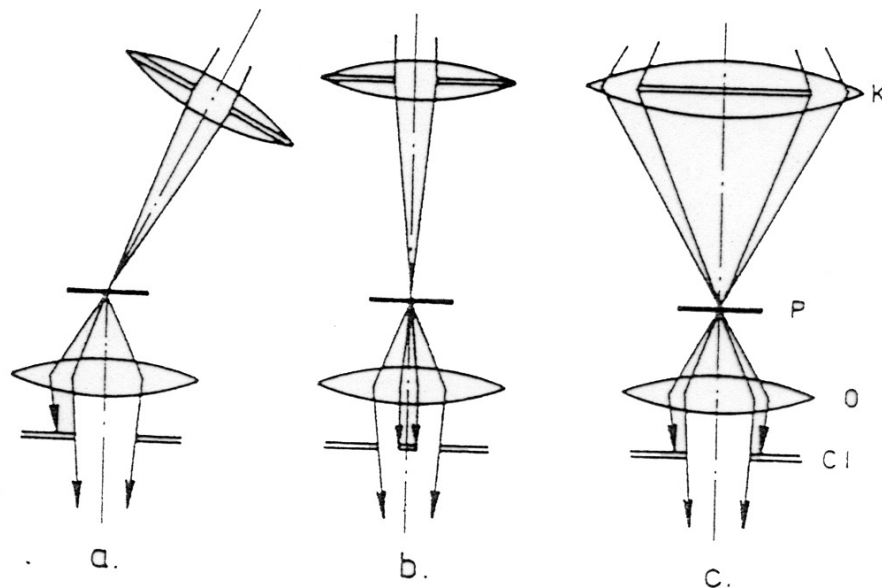
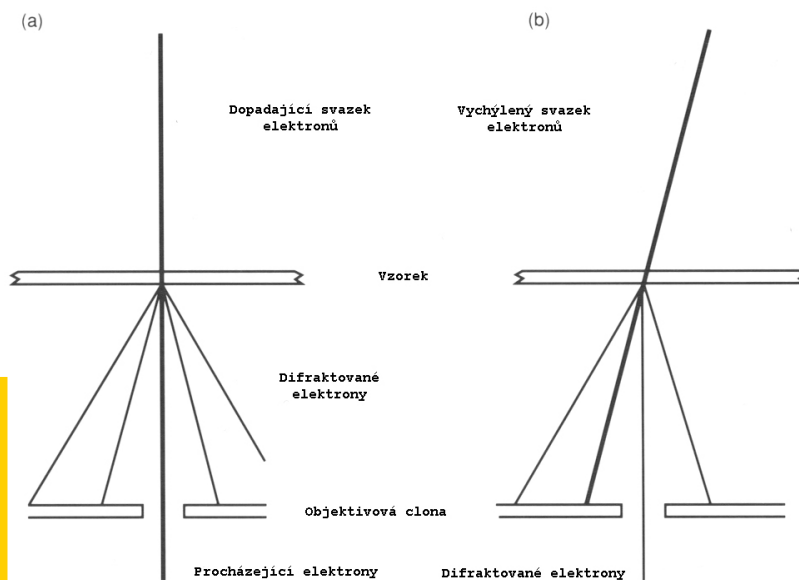


Wobbler



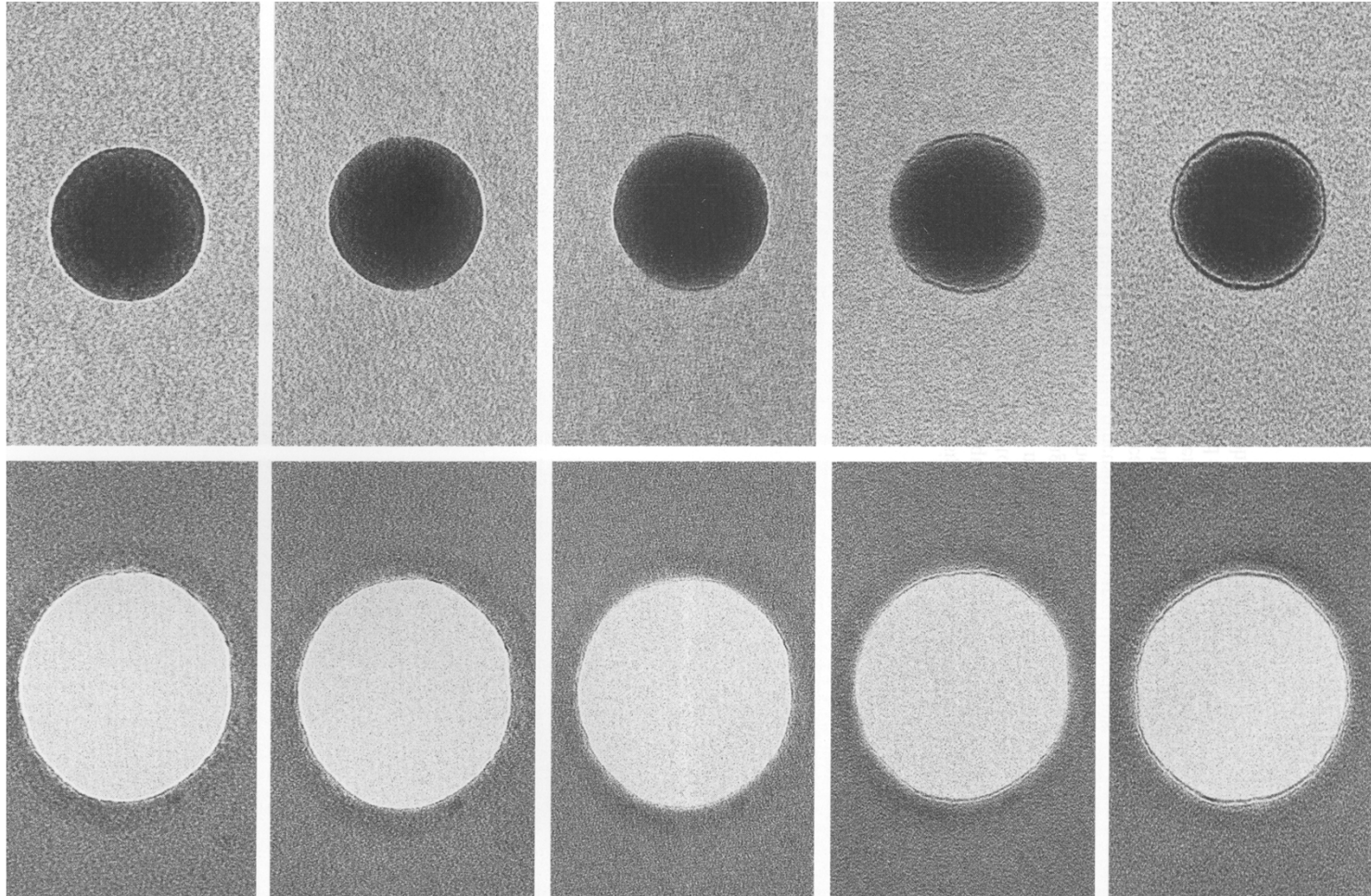
Zobrazení v temném poli

Pro preparáty s mizivým kontrastem
Využití elasticky rozptýlených elektronů
k tvorbě obrazu



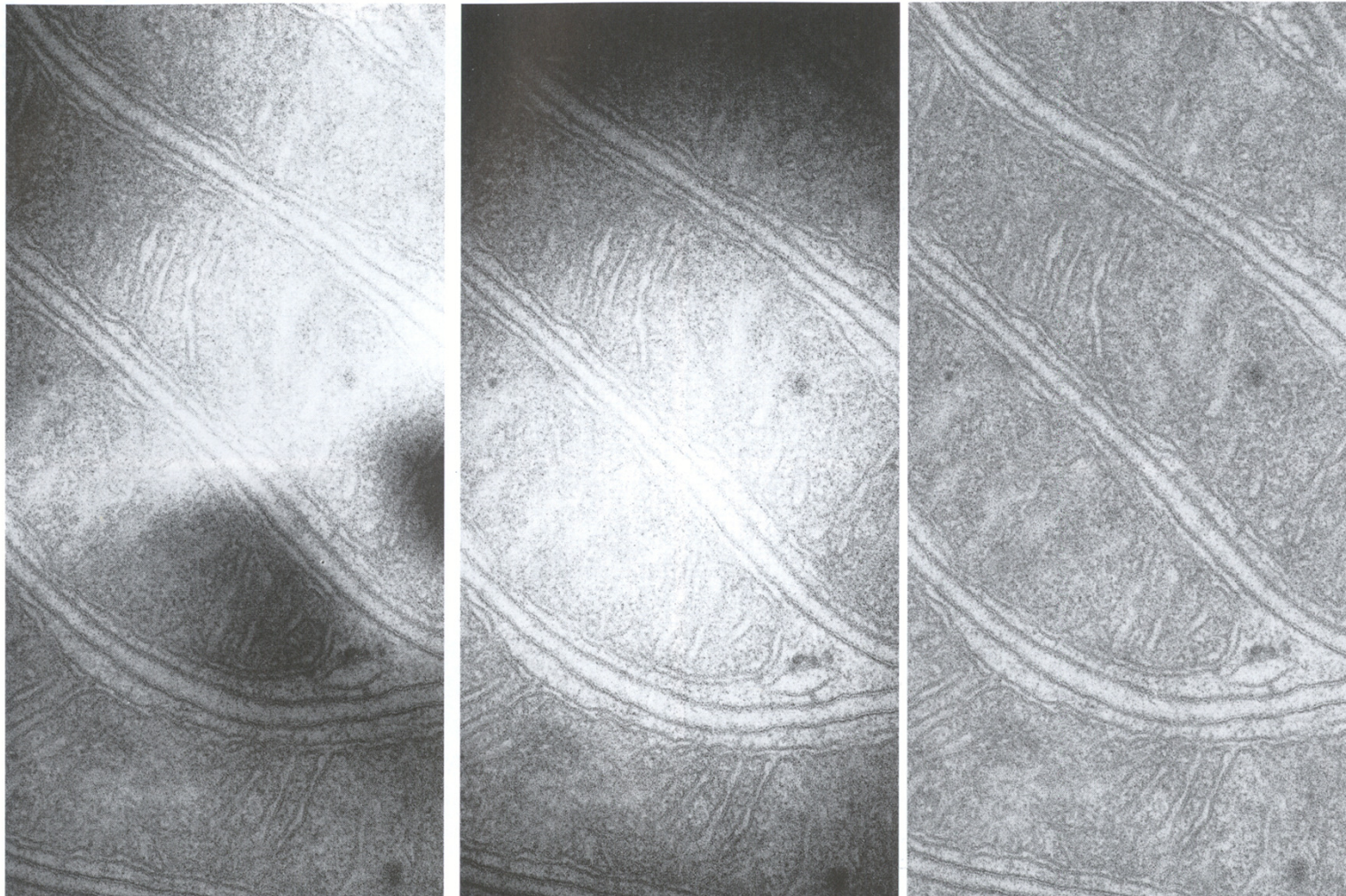


Astigmatismus

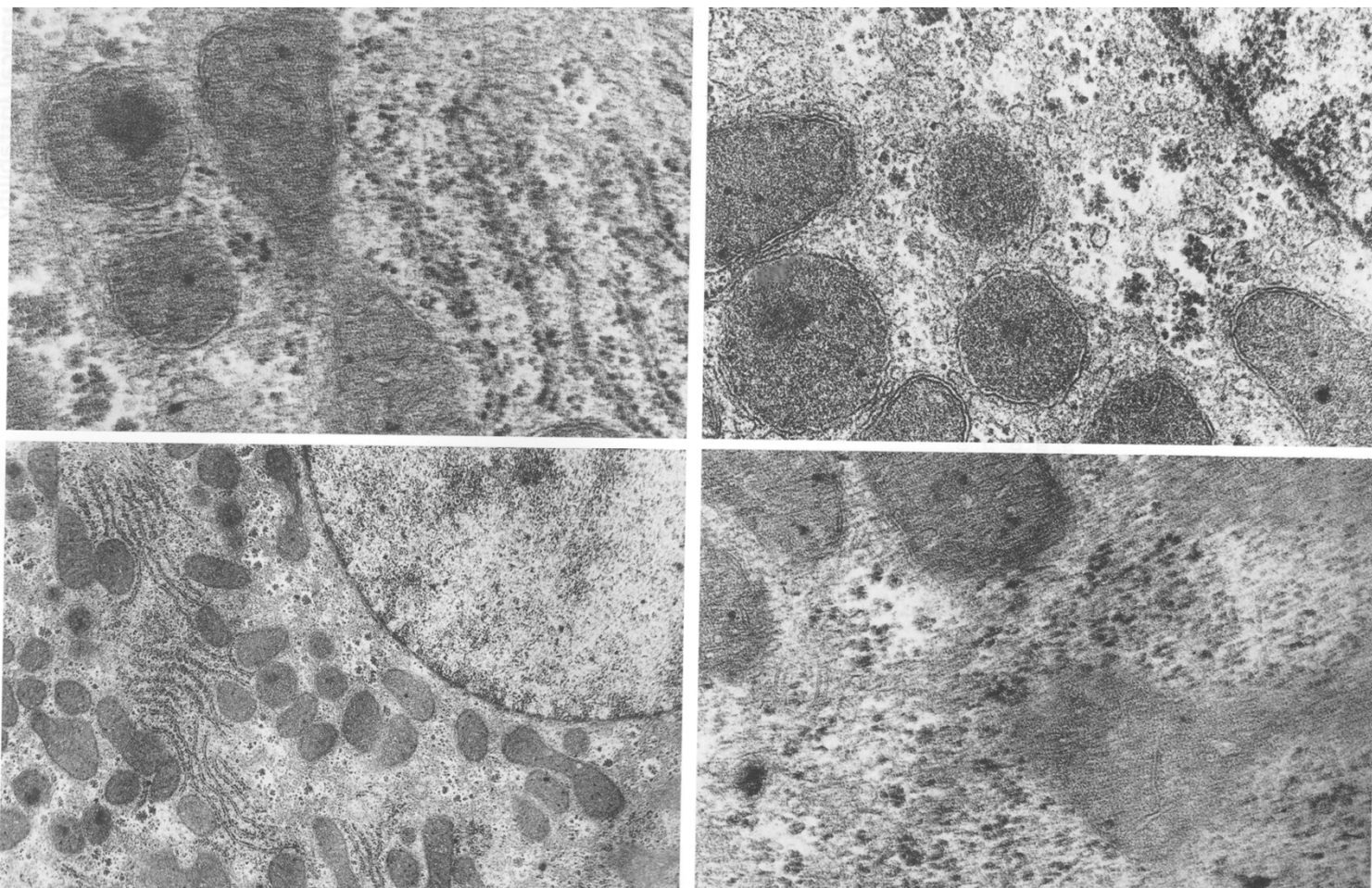




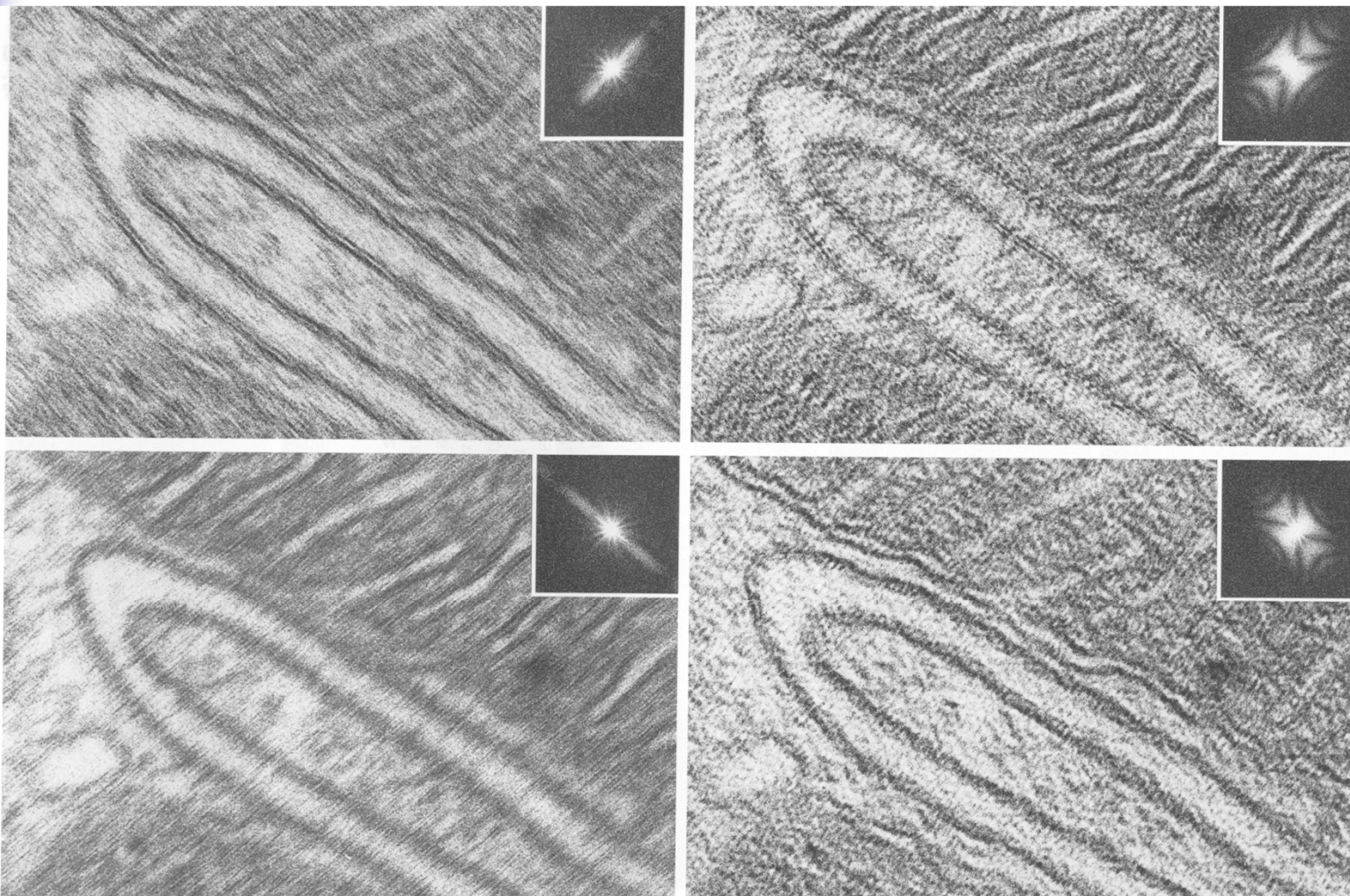
Nenasycený svazek



Chromatická vada

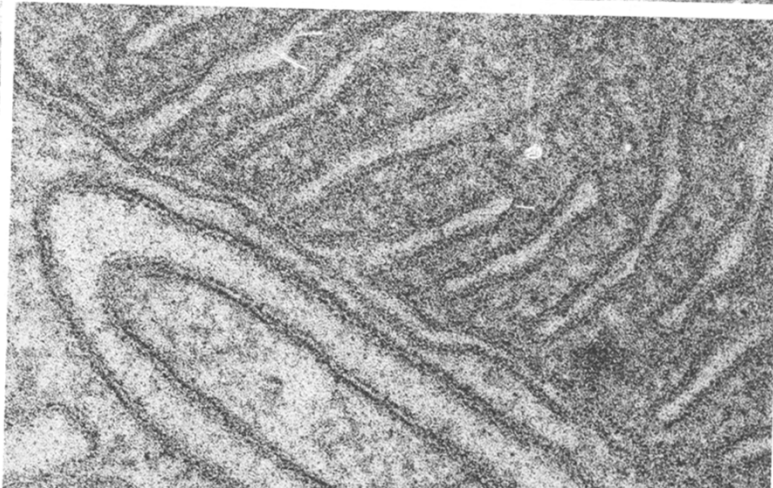
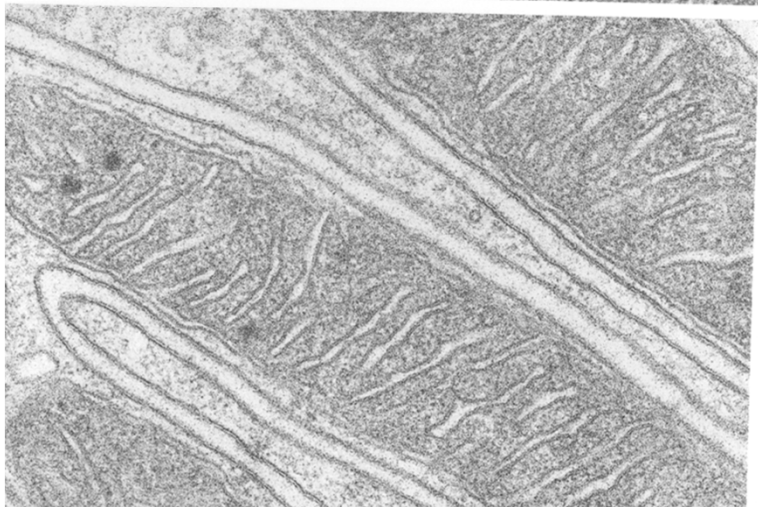
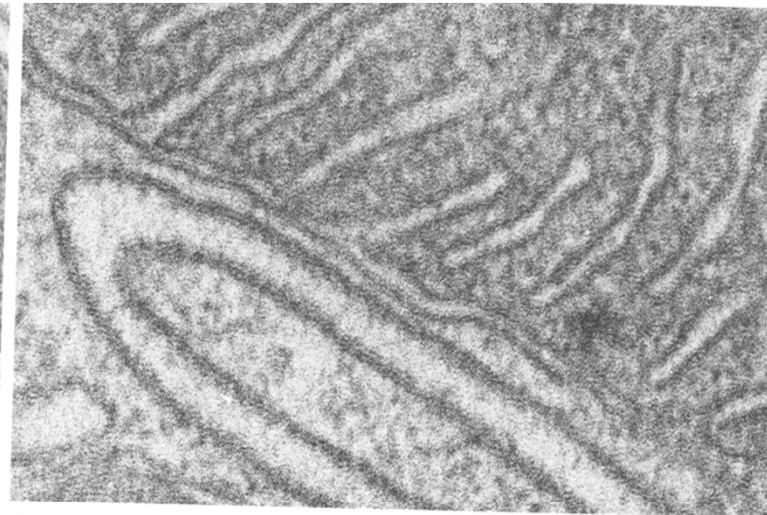
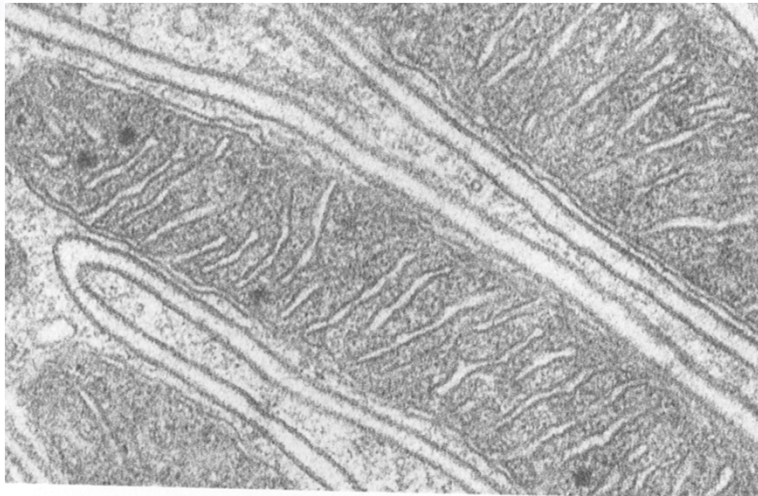


Drift obrazu

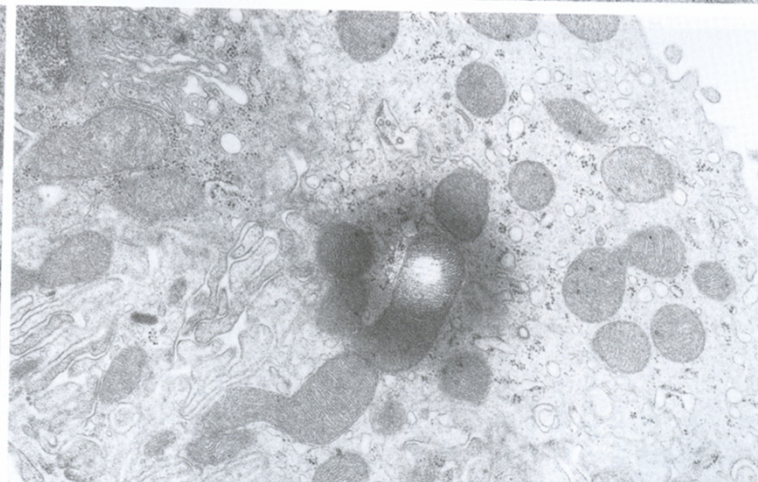
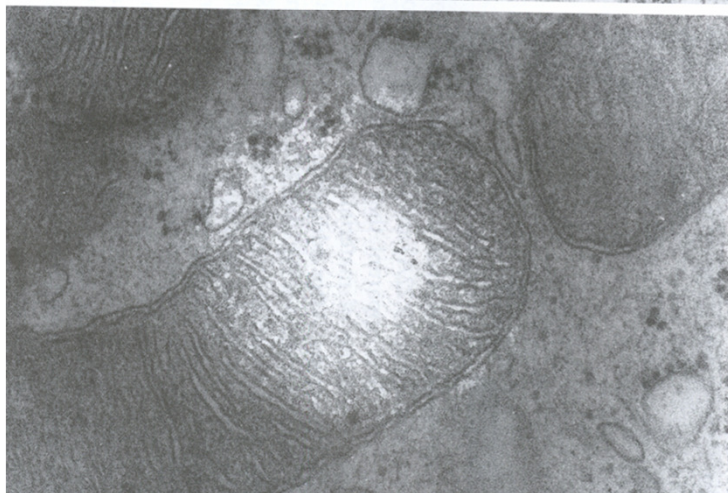
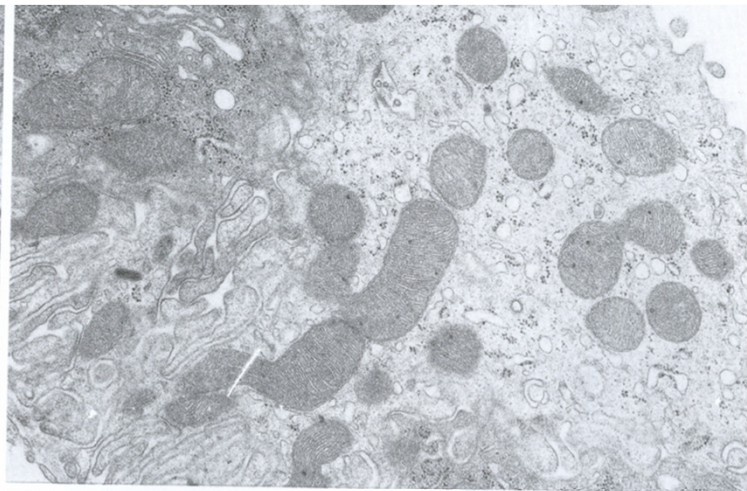
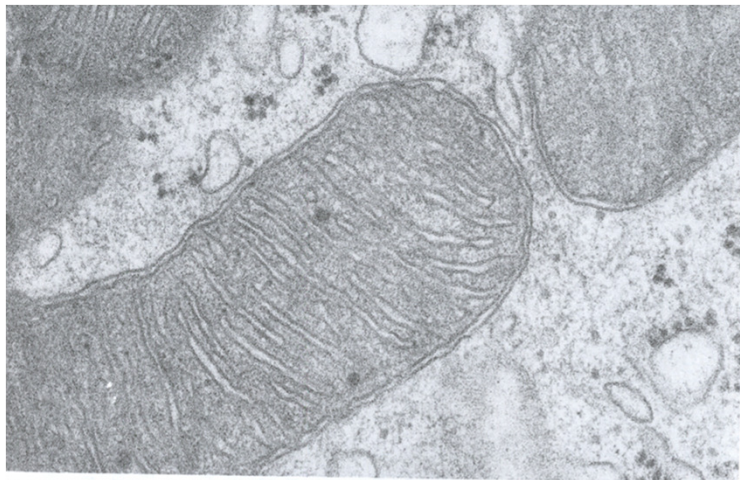




Nestabilita

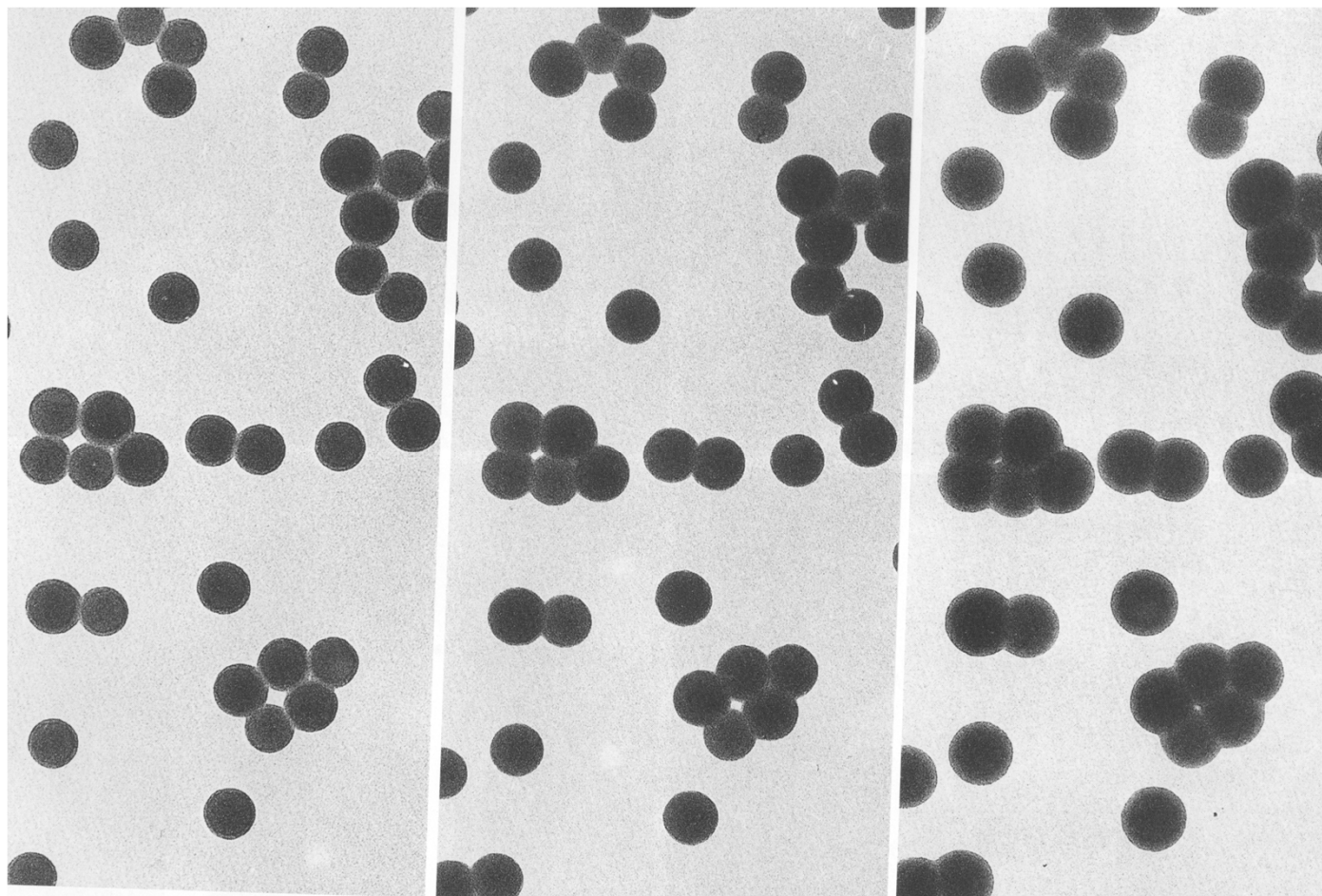


Radiační poškození

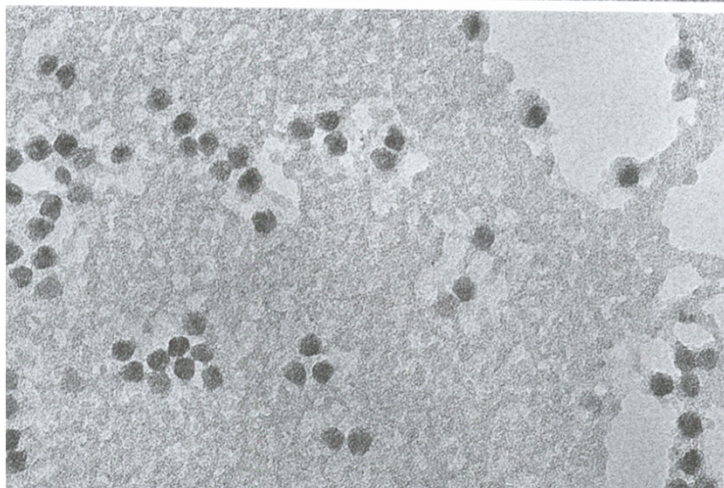
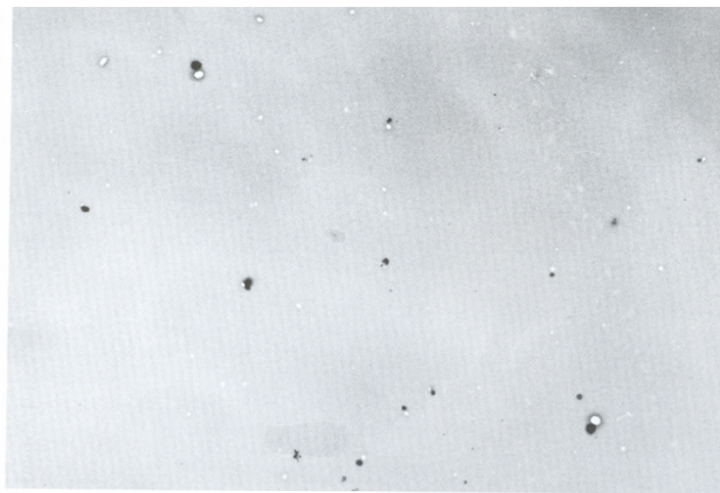
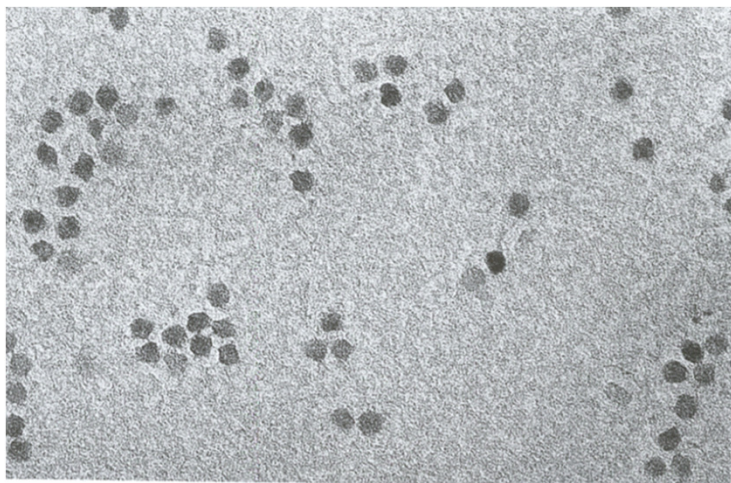




Radiační poškození



Radiační poškození





Vakuový systém

Elektrony jsou rozptylovány atomy plynů, proto musí být jejich pracovní prostor (vnitřek elektron-optické části TEM) vyčerpán

Atmosferický tlak : 105 Pa (750 Torr)

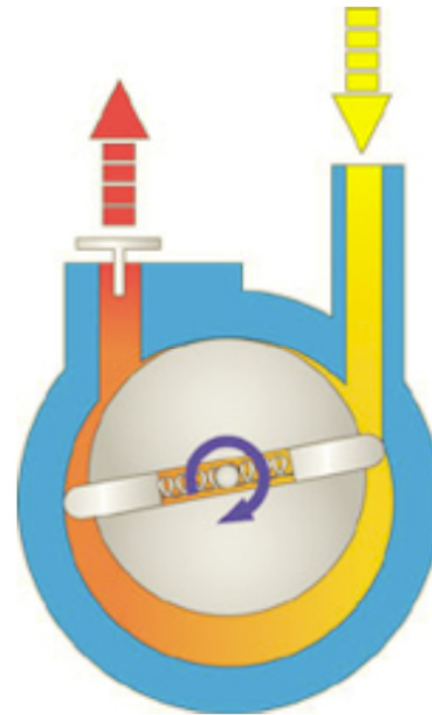
Vakuum:	hrubé	100-0.1 Pa ($1-10^{-3}$ Torr)
	nízké	$0.1-10^{-4}$ Pa ($10^{-3}-10^{-6}$ Torr)
	vysoké	$10^{-4}-10^{-7}$ Pa ($10^{-6}-10^{-9}$ Torr)
	ultravysoké	$<10^{-7}$ (10^{-9} Torr)

Vacuum in TEM: 10^{-7} Pa

FEG: 10^{-9} Pa

Vakuové pumpy

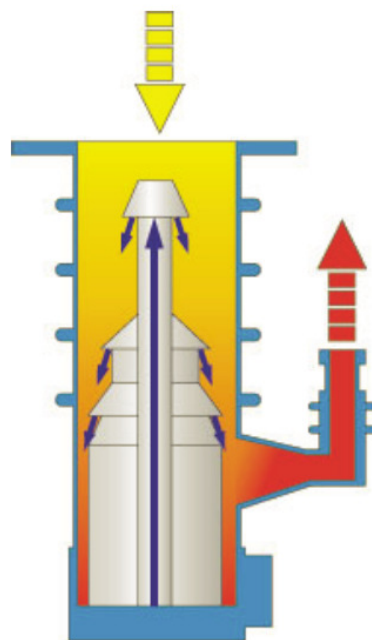
- Roughing pump- rotary pump



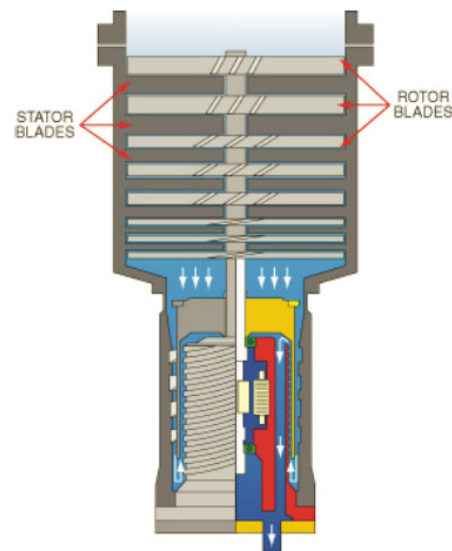
10^{-1} Pa

Vakuové pumpy

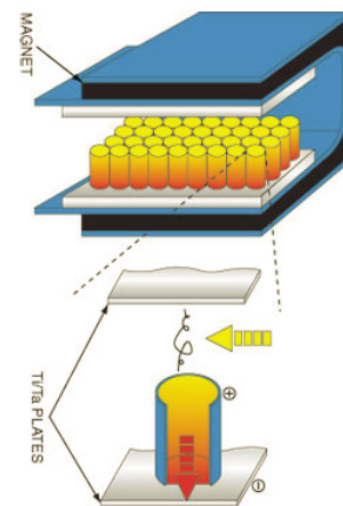
High/ Ultrahigh vacuum pumps



Oil-diffusion pump



Turbo pump



Ion gather pump
(IGP)

Záznam obrazu

Cameras/Films

- CCD chips (1k x 1k – 8k x 8k)
- Films – convenient for high resolution EM
 - time-consuming

