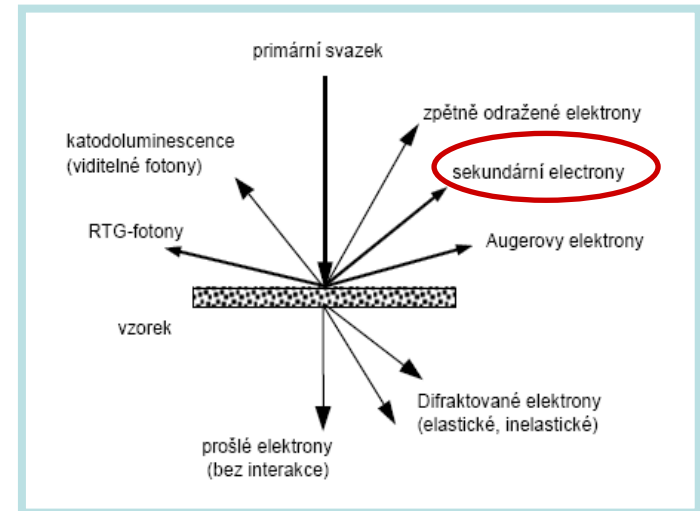
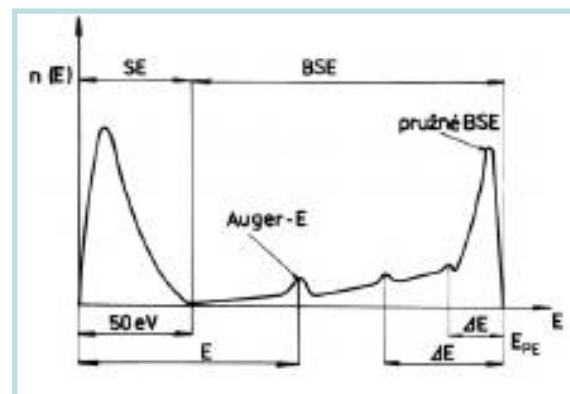
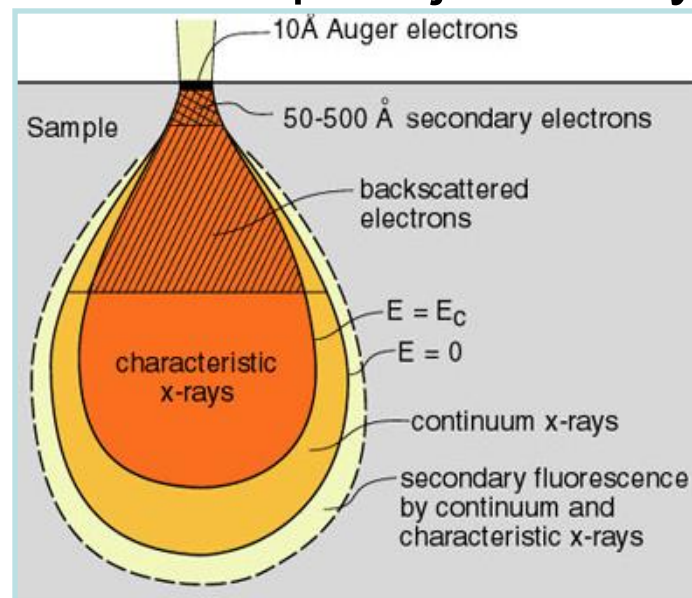
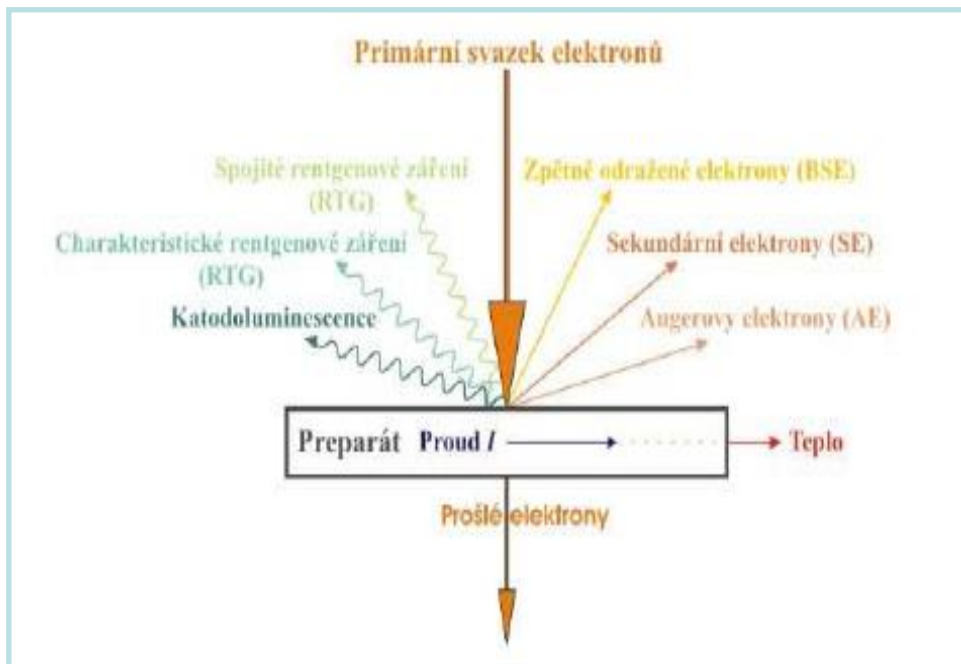


SKANOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP

- SEM – pozorování povrchů různých objektů
- Systém nepřímého pozorování a snímání obrazu
- Ke tvorbě obrazu se využívají sekundární nebo odražené elektrony (uvolněné z povrchu preparátu po dopadu primárních elektronů).
- Výhoda: velká hloubka ostrosti, lze zobrazit členitý povrch libovolně tlustého preparátu i s velkými výškovými rozdíly.



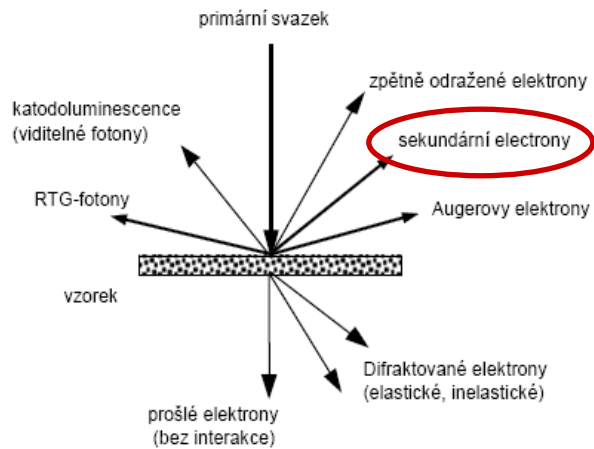
Další využití: v preparátové komoře vzniká při interakci urychlených elektronů s hmotou vzorku řada dalších signálů – rtg. záření, Augerovy elektrony, katodoluminiscence – ty nesou další informace o vzorku (lze určit prvkové složení preparátu v dané oblasti, kvantitativní zastoupení jednotlivých prvků).



Signály využívané v SEM

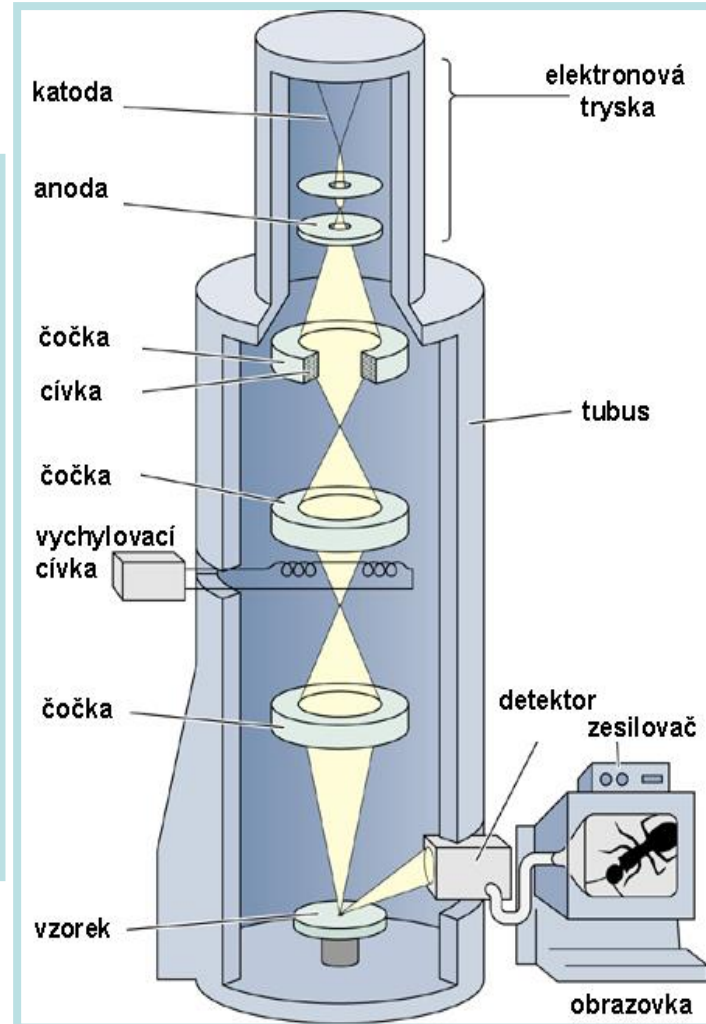
Informace	Použitý signál
Morfologie	všechny signály s výjimkou rtg. záření a Augerových el.
Prvková analýza	odražené el., Augerovy el., rtg.záření, katodoluminiscence
Chemická vazba	Augerovy el., rtg. záření
Krystalografie	odražené el., sekundární el, transmitované el., rtg. záření

SKANOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP



KONSTRUKCE SEM

- Elektronová tryska
- Dvojitý kondenzor
- Objektiv s vychylovacími cívkami
- Generátor
- Detektor
- Scintilátor
- Fotonásobič
- Zesilovač
- Obrazovka



Konstrukce SEM

- **TRYSKA:** emituje paprsek urychlených elektronů
- **DVOJITÝ KONDENZOR:** kondenzorové čočky mají za úkol zfokusovat paprsek elektronů (aby nedocházelo k překryvu řádků).

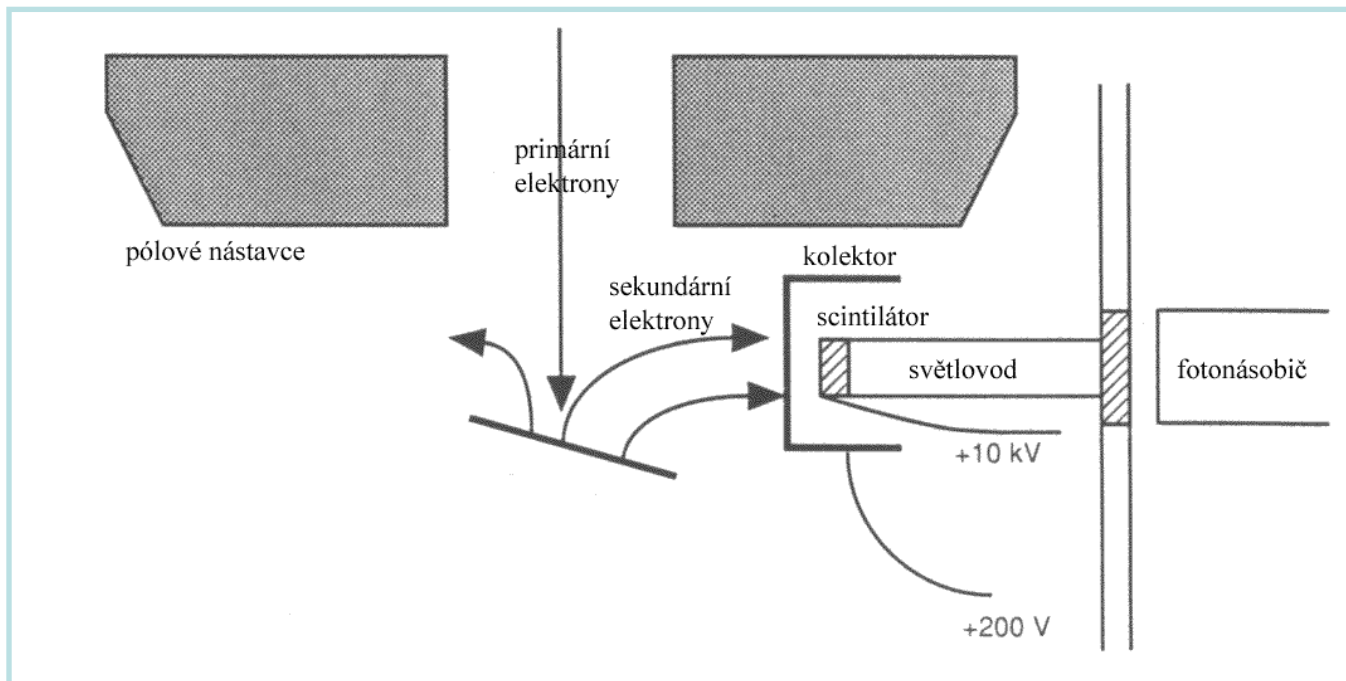
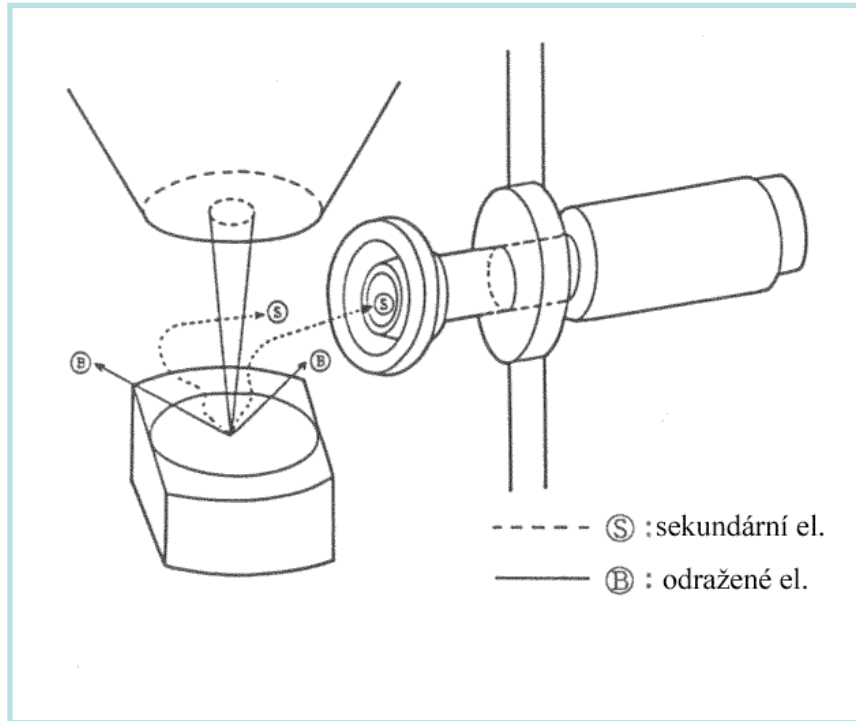
Na zfokusování závisí rozlišovací schopnost (u TEM na objektivové čočce).

- **OBJEKTIV:** dále zmenšuje průměr paprsku a zaostřuje ho na povrch preparátu na plochu o průměru 5-10 nm.

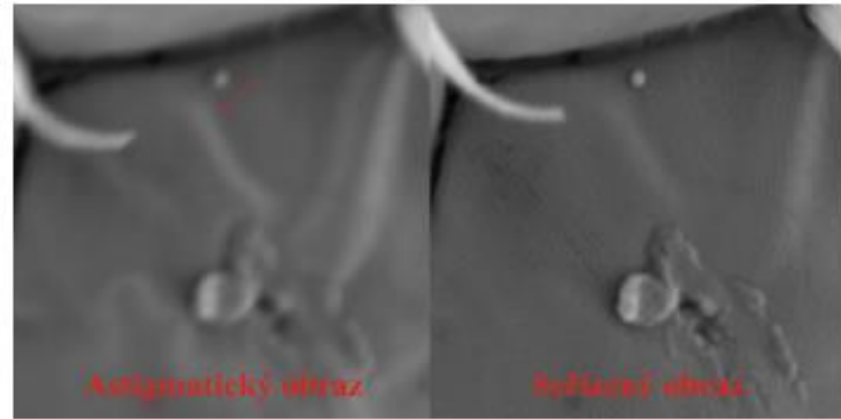
V objektivu jsou 2 páry vychylovacích cívek, které vychylují paprsek ve 2 na sebe kolmých směrech (tj. paprsek rastruje na povrchu preparátu malou plošku – po řádcích podobně jako paprsek TV obrazovky).

Pomocí změn malých proudů v objektivu se **zaostřuje obraz.**

- **GENERÁTOR:** napájí vychylovací cívky a současně vychyluje i paprsek obrazovky.
Synchronně s primárním svazkem elektronů tedy rastruje i paprsek, který tvoří obraz na obrazovce.
- Po dopadu primárního paprsku elektronů jsou z povrchu preparátu vyráženy sekundární elektrony.
- Sekundární elektrony jsou přitahovány **DETEKTOREM**, pak jsou urychlovány k **SCINTILÁTORU**.
- Po dopadu na scintilátor z něho vyrazí fotony, které potom světlovodem vstupují do **FOTONÁSOCIČE**.
- Elektrický signál z fotonásobiče je zesílen **ZESILOVAČEM** a určuje intenzitu paprsku na obrazovce.

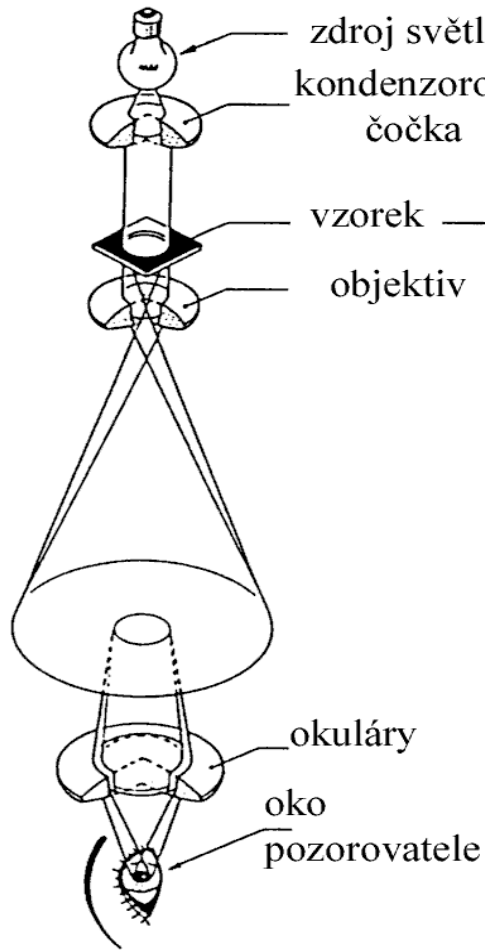


- **STIGMÁTOR:** ke korekci astigmatismu elektromagnetických čoček (velký vliv na výslednou kvalitu obrazu). Nutno korigovat často.



- **ŘÁDKOVÁNÍ:** lze měnit počet řádků i rychlost přeběhu paprsku v jednom řádku.
Při hledání, zaostřování a korekci obrazu - rychlejší přeběh- lze plynule sledovat změny v zobrazení, ale klesá poměr signálu k šumu.
Při záznamu obrazu – pomalá rychlost přeběhu.
- **ZVĚTŠENÍ:** je dáno poměrem plochy, kterou rastrujeme, ku velikosti obrazovky, na které pozorujeme.
Tedy: velká rastrovaná plocha – **malé zvětšení**
malá rastrovaná plocha – **velké zvětšení**

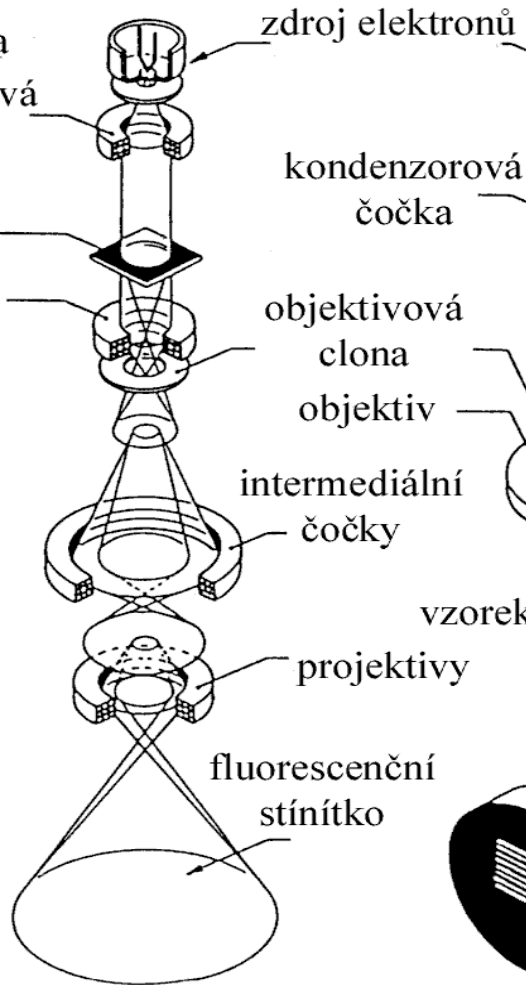
Světelný mikroskop



Rozlišení 200 nm

Zvětšení ~ ×2000

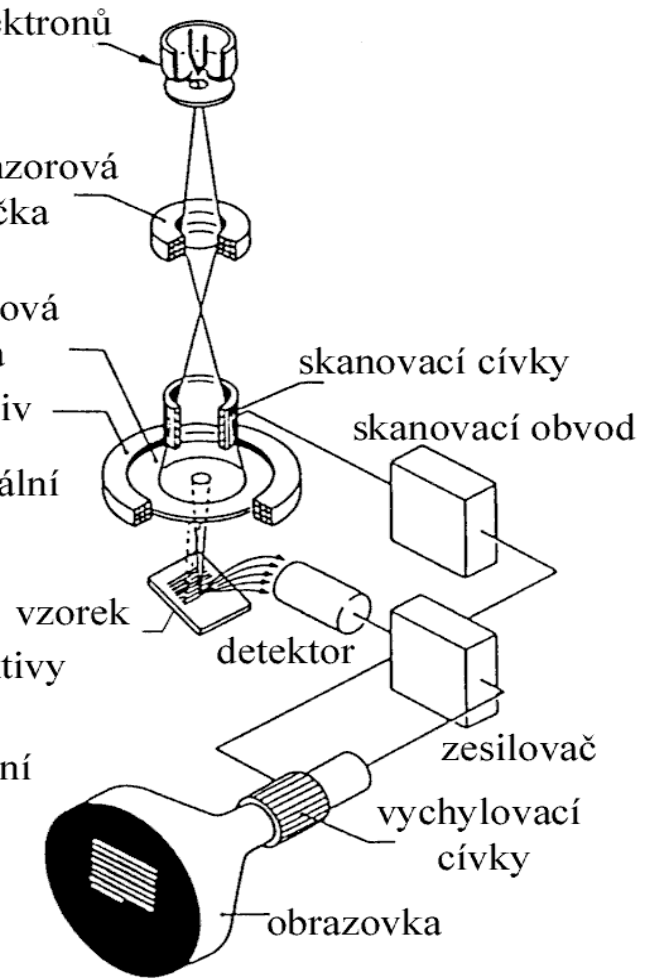
TEM



0.1 nm

×50 ~ ×1,500,000

SEM



0.5 nm

×10 ~ ×1,000,000

Tvorba obrazu

- **KONTRAST:**

v SEM se na jeho tvorbě podílejí

3 jevy:

- topografický (reliéfový) kontrast
- hranový jev
- materiálový kontrast

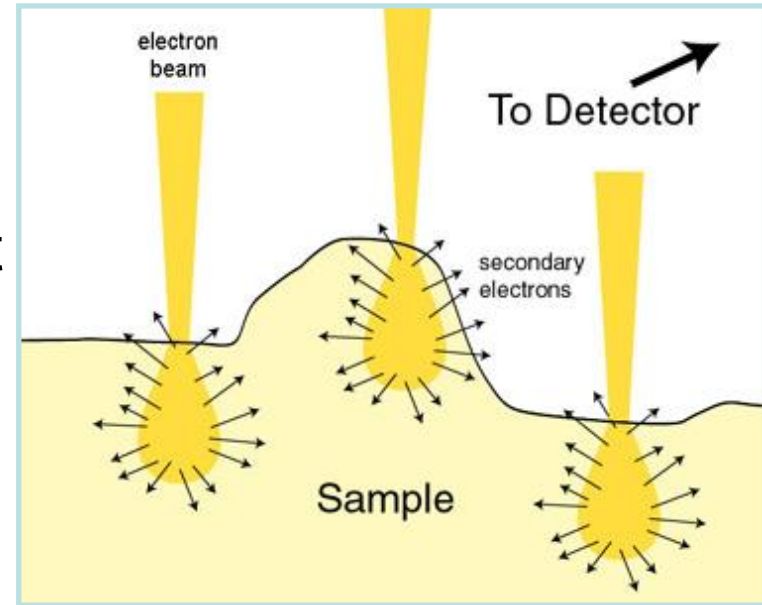
Topografický kontrast:

preparát mohou opustit jen

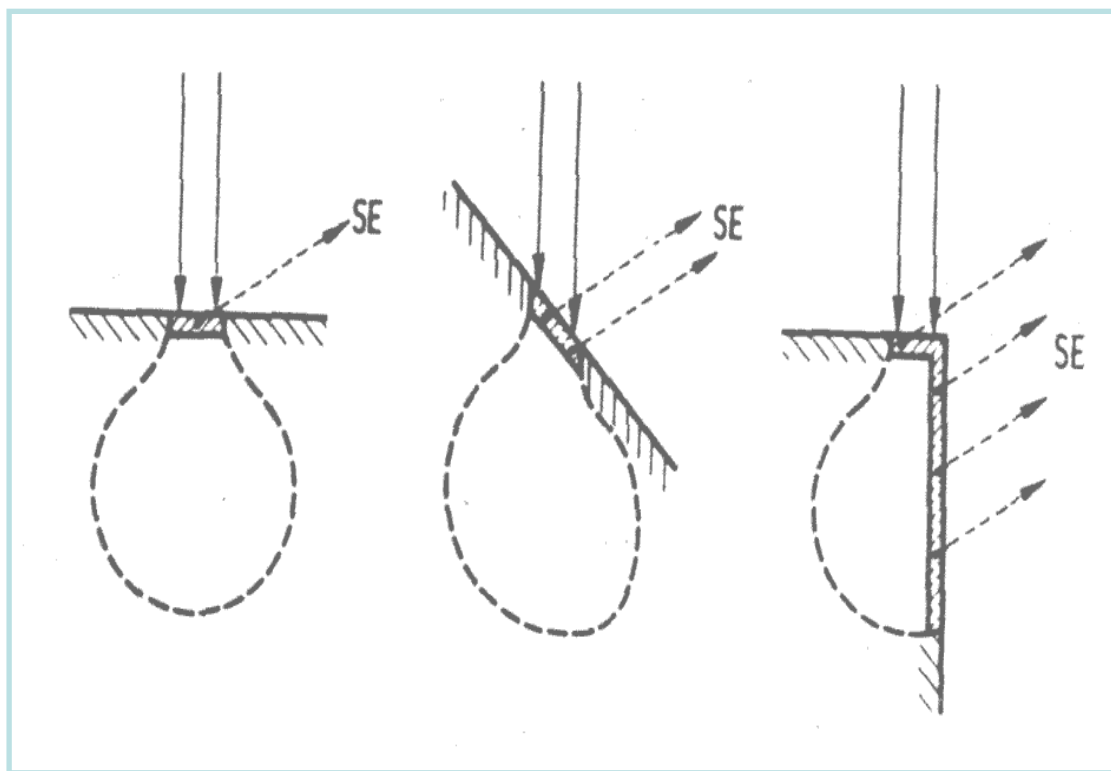
sekundární elektrony uvolněné

v tenké vrstvě pod povrchem, sekund. elektrony uvolněné hlouběji, zůstanou uvnitř preparátu.

Sekundární elektrony mají nízkou energii a rychlost, proto se z vyvýšenin na povrchu preparátu dostane do detektoru více sekundárních elektronů ...intenzita signálu z detektoru je vyšší ...světlé místo na obrazovce. Prohlubeniny – naopak.



Hranový jev: dopad primárního svazku elektronů zvětšuje oblast, ze které se mohou uvolnit sekundární elektrony, zvyšuje se tedy i signál z detektoru. Ve výsledném obraze se hrany zobrazují jako přesvícené oblasti – to ale neznamená, že jsou vyvýšené.



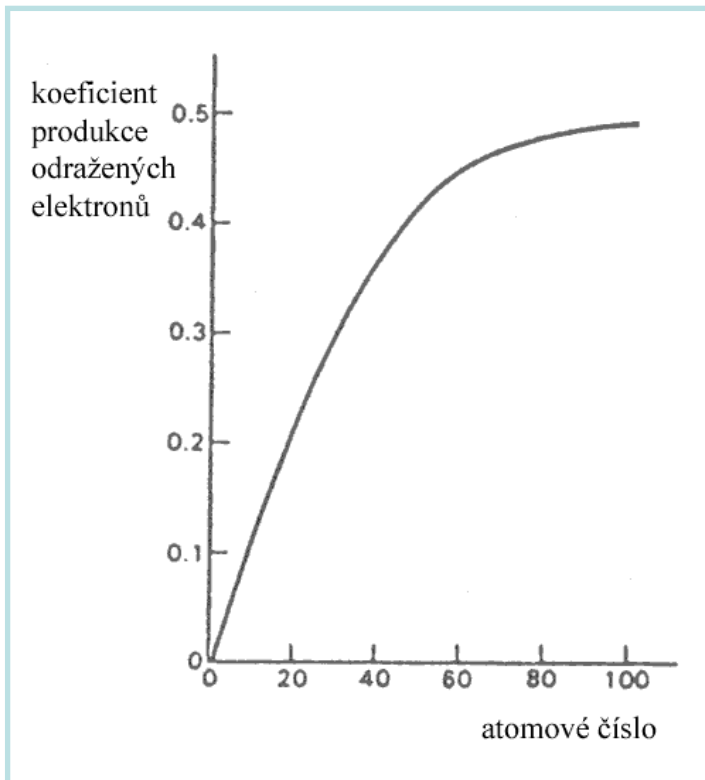
Tvorba kontrastu v SEM

- Uvolňování sekund. el. v tenké vrstvě pod povrchem
- Zmenšený úhel dopadu – primár el. déle u povrchu – větší emise sekund. el.
- Okrajové plochy objektů budou světlé, plochy kolmé na paprsek tmavé

Materiálový kontrast: závisí na schopnosti jednotlivých materiálů uvolňovat odražené nebo sekundární elektrony.

Čím vyšší atomové číslo, tím větší emise.

Biologické objekty: malá emise sekund. elektronů, nutno povrch **pokovit**.

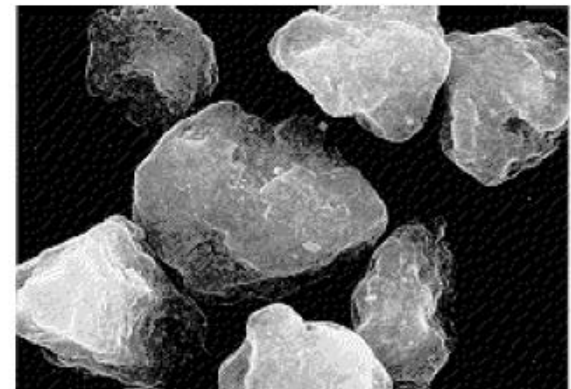
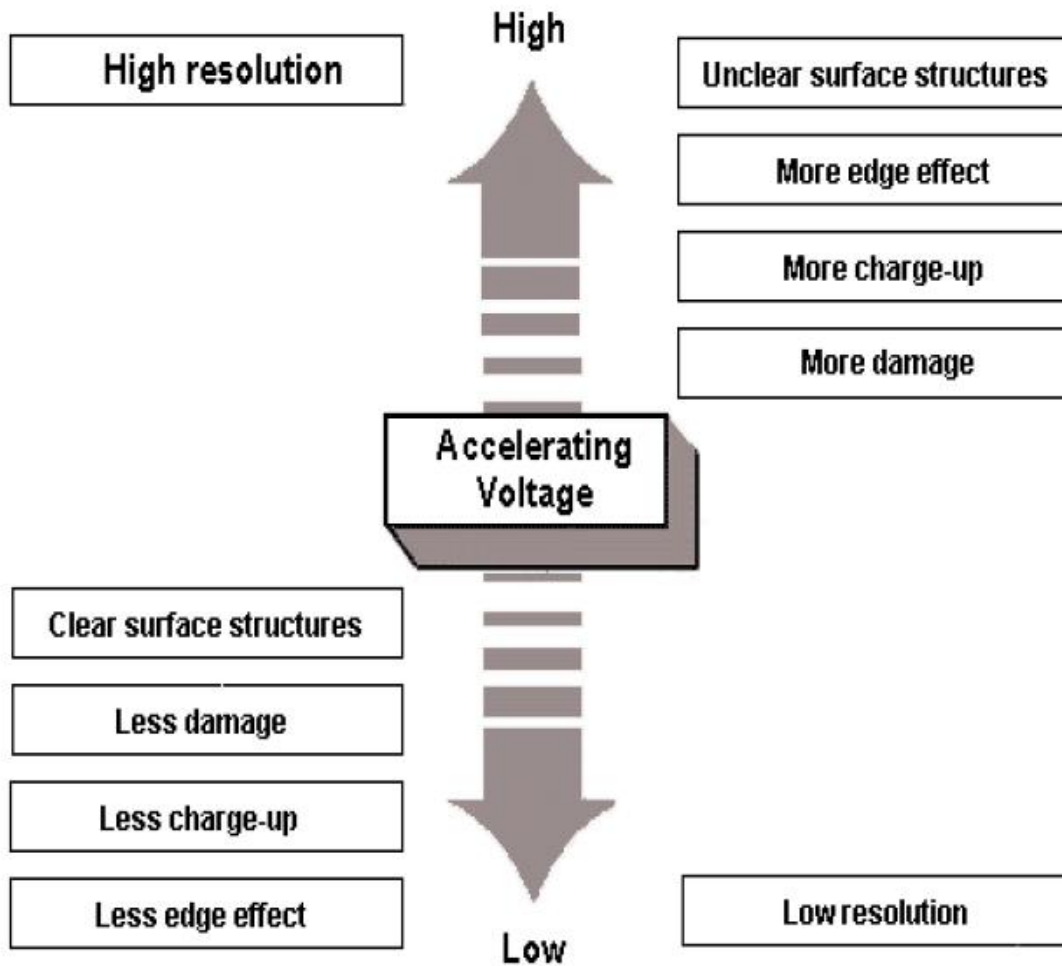


Závislost koeficientu produkce odražených elektronů na atomovém čísle

Faktory ovlivňující kvalitu výsledného obrazu v SEM

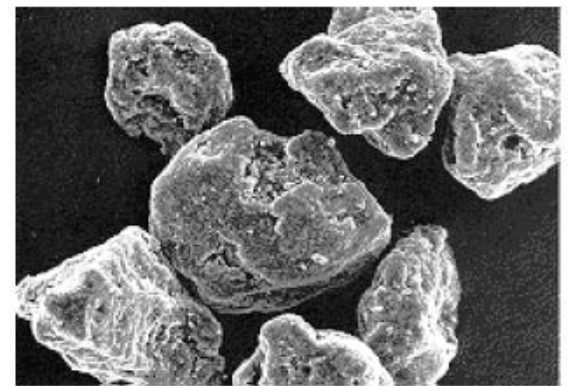
- Volba urychlovacího napětí
- Náklon vzorku
- Nabíjení vzorku
- Pracovní vzdálenost
- Kvalita pokovení

Volba urychlovacího napětí



(a) 30 kV

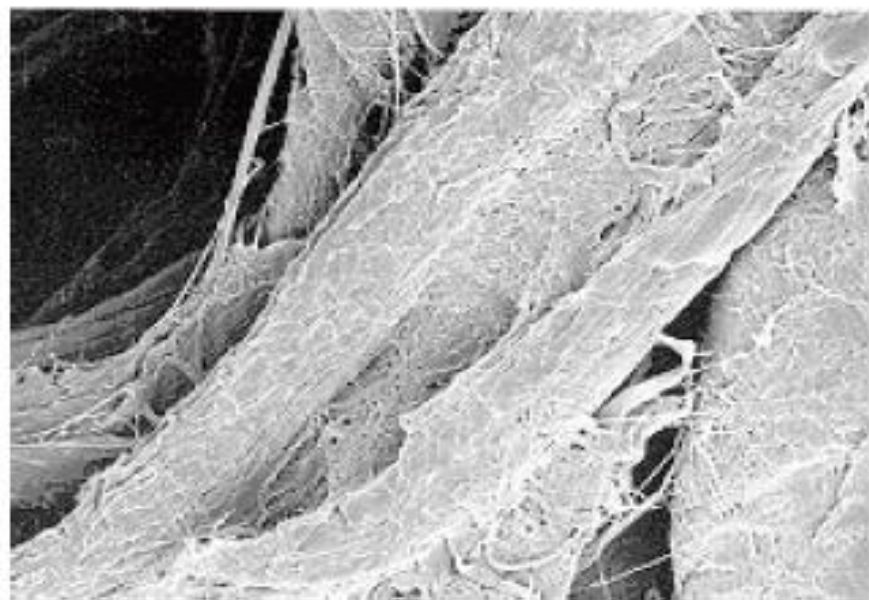
x 2,500



(b) 5 kV

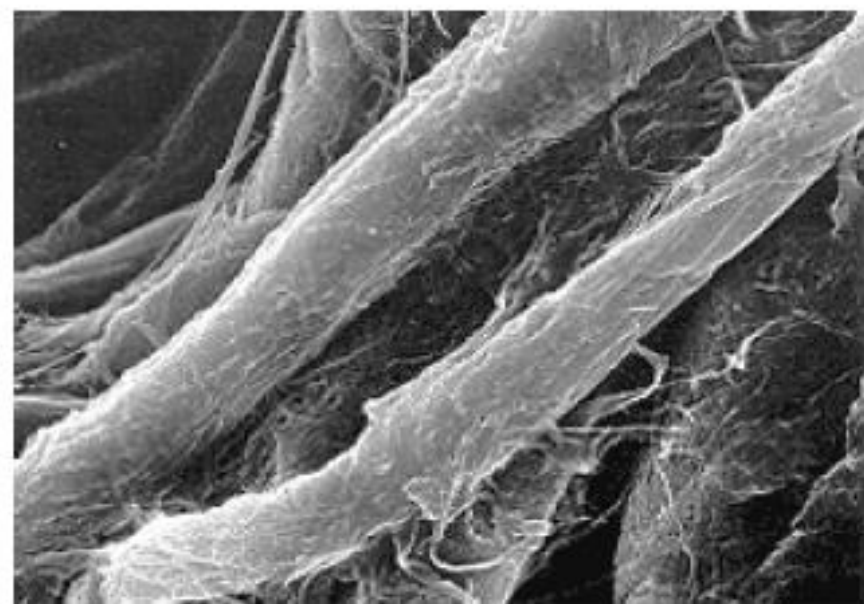
x 2,500

Ovlivnění hloubky penetrace svazku urychlovacím napětím



(a) 5 kV

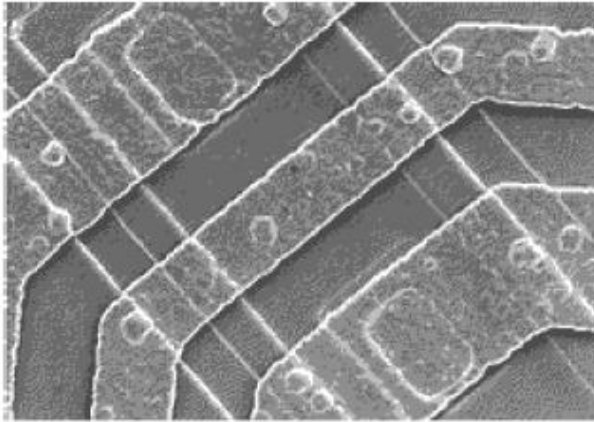
x 1,400



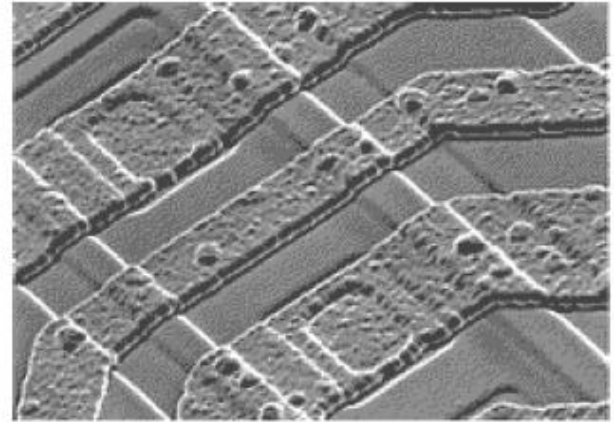
(b) 25 kV

x 1,400

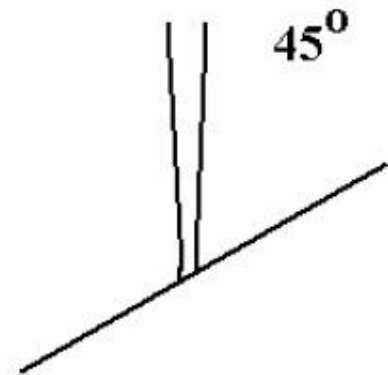
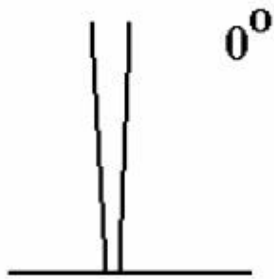
Vliv náklonu vzorku



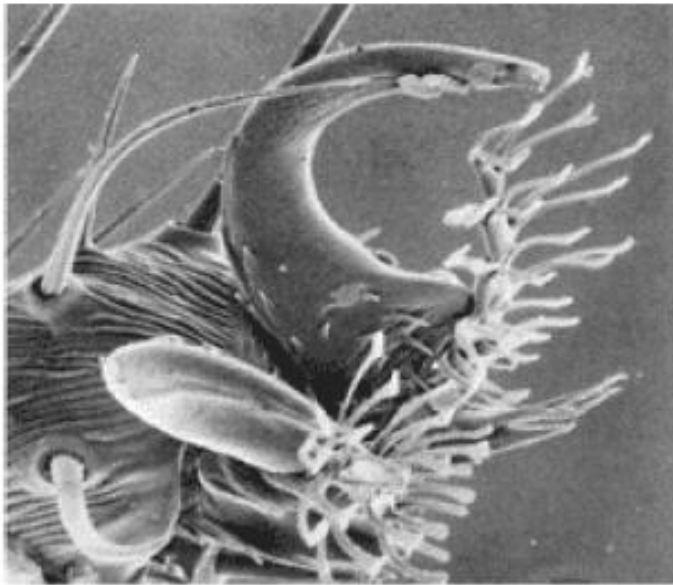
(a) Tilt angle: 0°



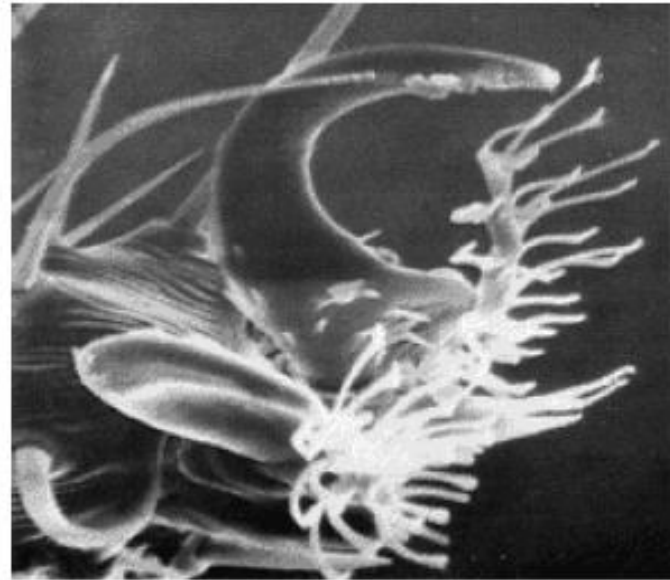
(b) Tilt angle: 45°



Ovlivnění nabíjení vzorku - změnou urychlovacího napětí



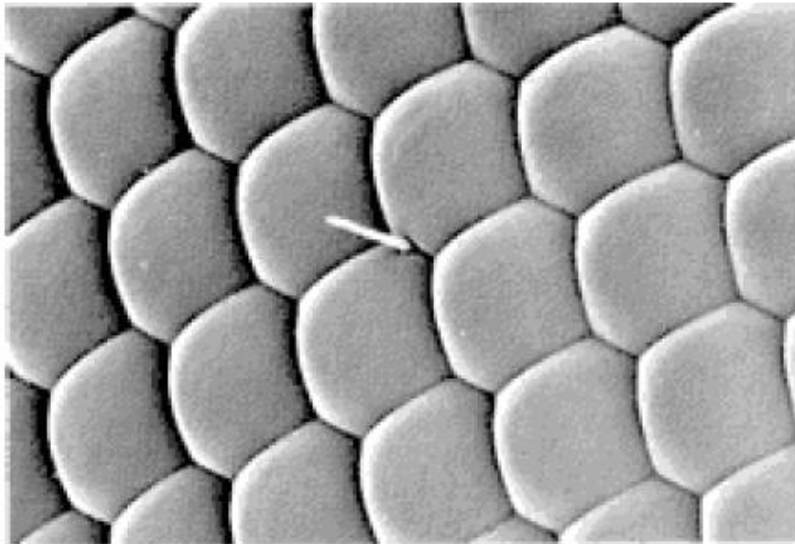
(a) 4 kV



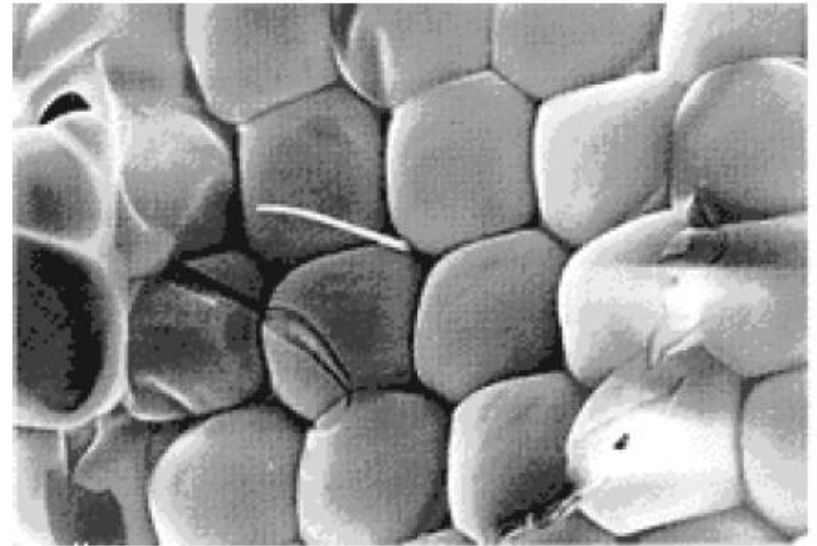
(b) 10 kV



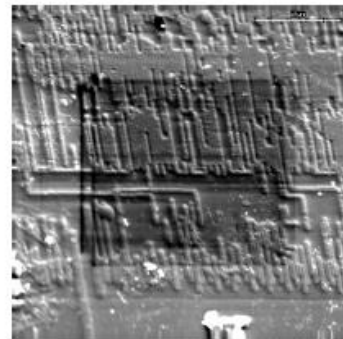
Poškozování vzorku elektronovým svazkem



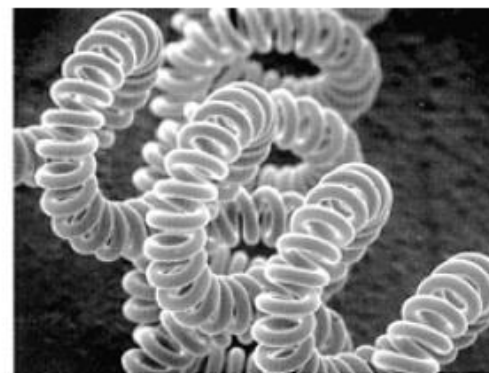
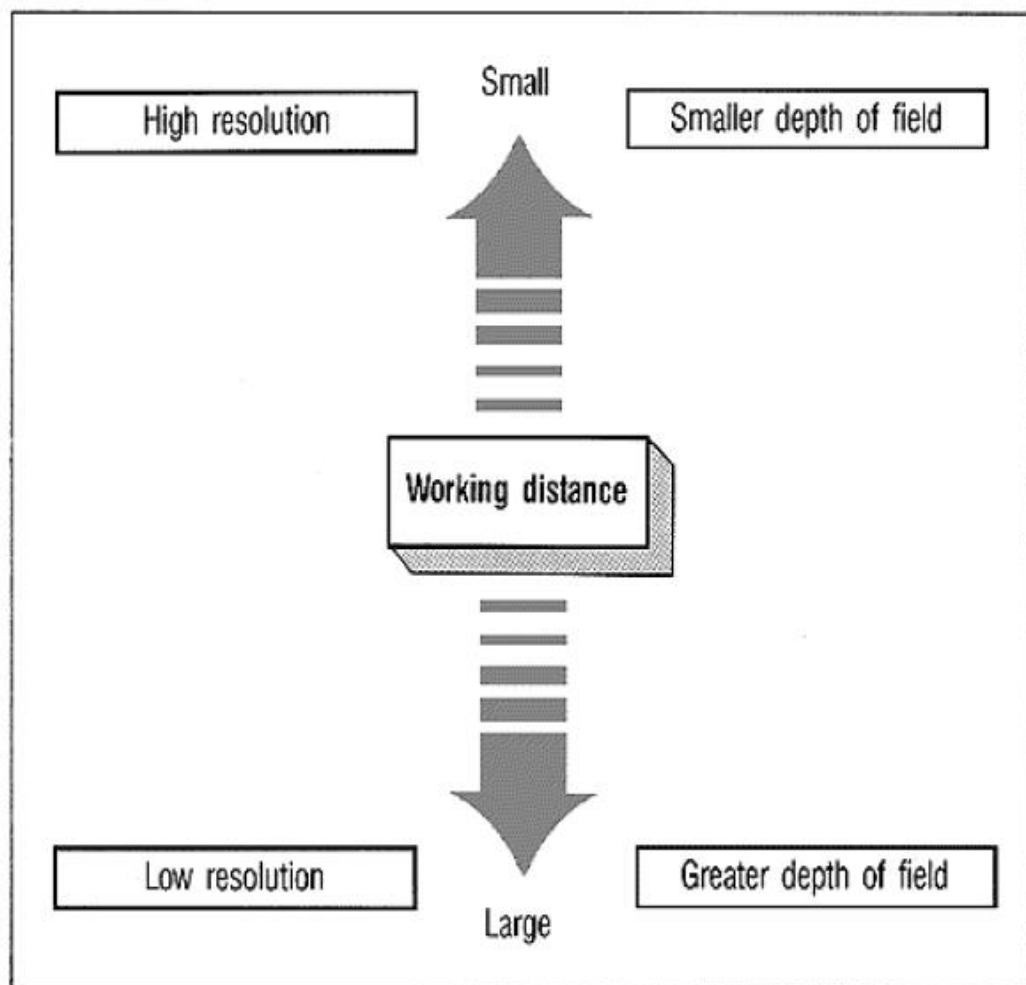
(a) Undamaged specimen



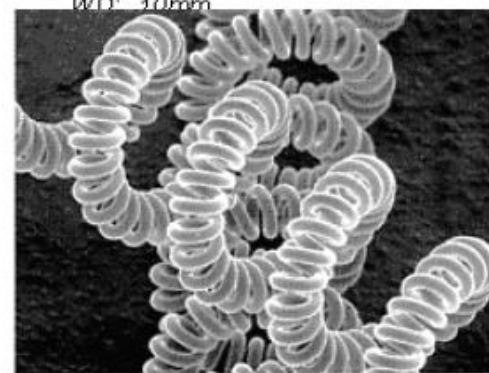
(b) Damaged specimen



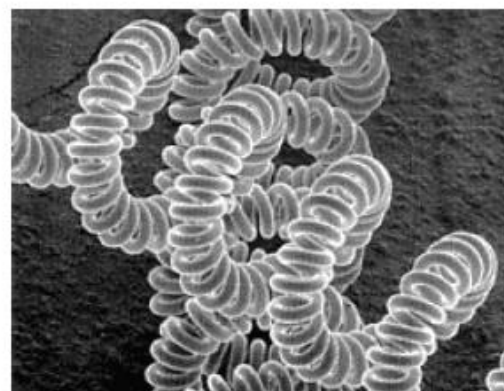
Vliv pracovní vzdálenosti



(b) OL aperture diameter: 200 μm
WD: 10mm

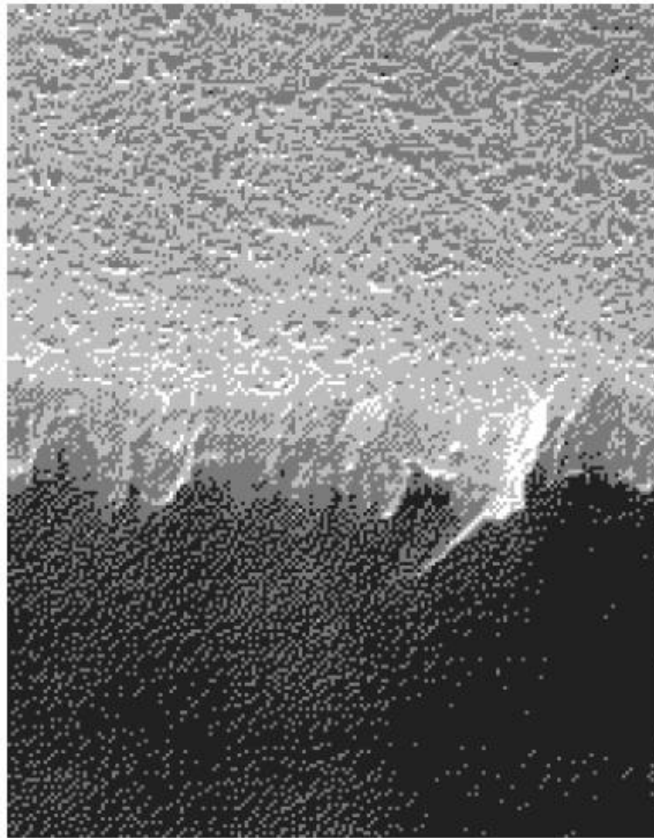


(c) OL aperture diameter: 200 μm
WD: 20mm

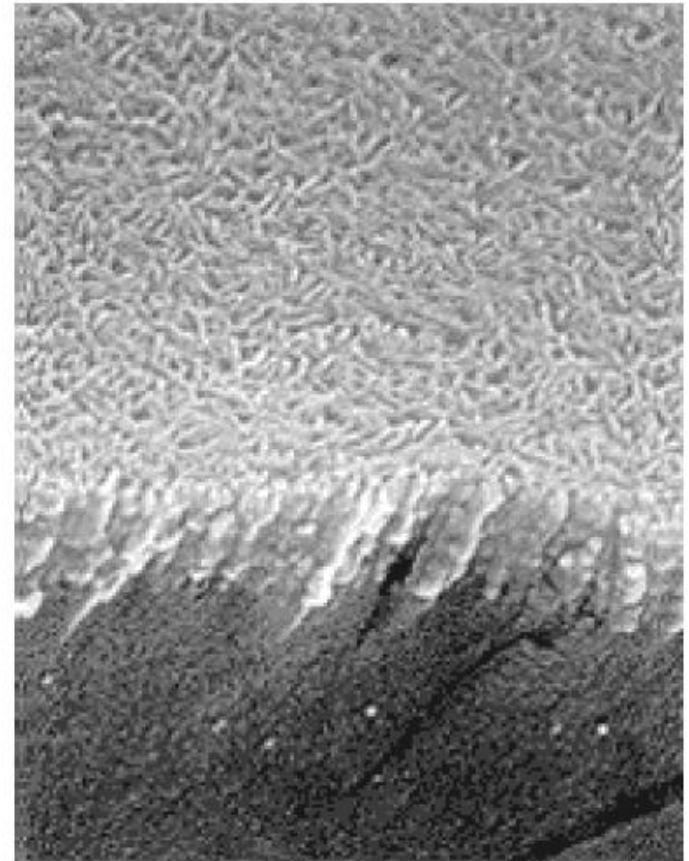


(e) OL aperture diameter: 100 μm
WD: 38mm

Kvalita pokovení



(a) Optimum coating



(b) Too thick coating

Přehled chyb a poruch snižujících kvalitu výsledného obrazu:

NEOSTROST

- 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
- nezaostřený fotoaparát nebo CCD kamera

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
- chybná expozice nebo špatně zpracovaný snímek

FAKTORY ZPŮSOBUJÍCÍ LOKÁLNÍ PORUCHY OBRAZU

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

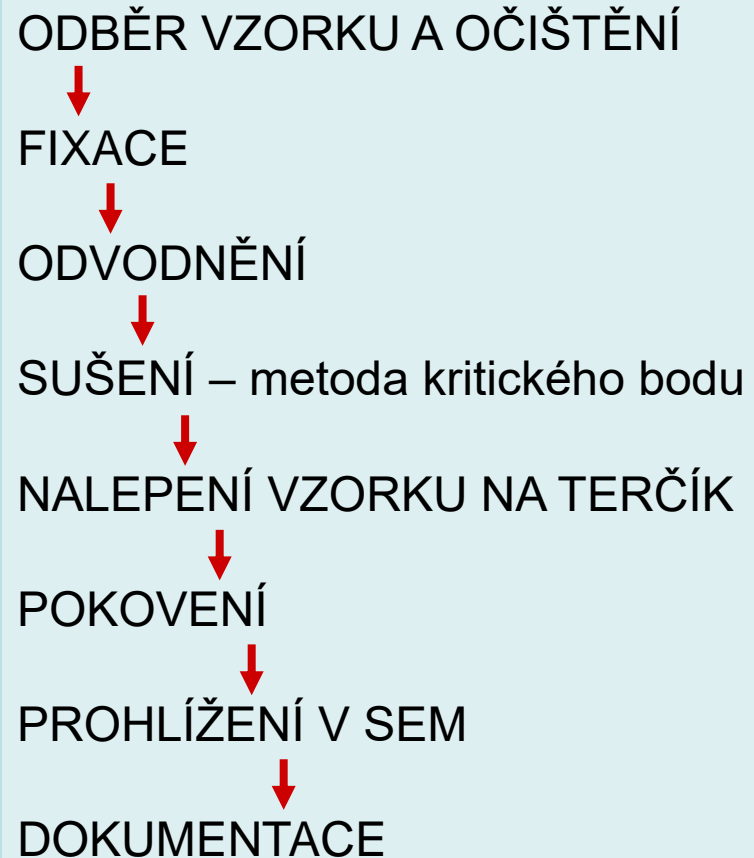
DEFORMACE VZORKU

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

PŘÍPRAVA VZORKU PRO SEM

Vlastnosti vzorku pro SEM

- nesmí obsahovat vodu
- bez nečistot, nepoškozený
- mechanicky pevný a stabilní
- vodivý
- nejsme limitováni tloušťkou a velikostí vzorku
- výškově členitý vzorek -
výhoda



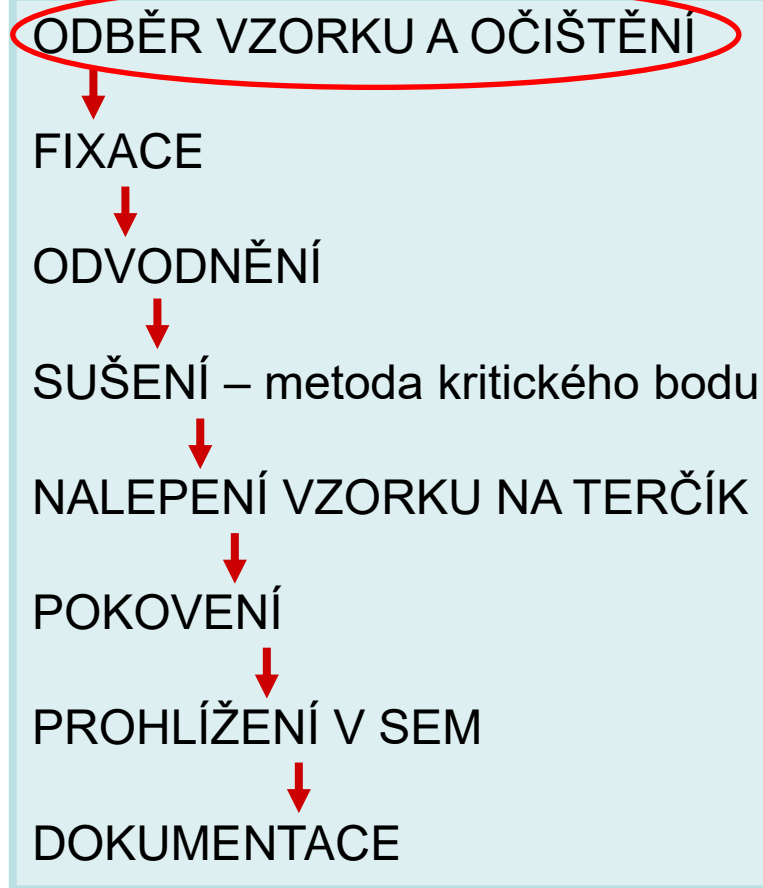
PŘÍPRAVA VZORKU PRO SEM

ODBĚR MATERIÁLU A OČIŠTĚNÍ

Tvrdé tkáně – kosti, vlasy, zuby, nehty, kutikulární vrstvy u hmyzu, pylová zrna, semena, rozsivky, dřevo...- není nutno upravovat, pouze zajistíme vodivost povrchu

Měkké tkáně – nutno fixovat, odvodnit, vysušit a pokovit. Nutno odstranit hleny, zbytky krevních sraženin apod., které by bránily pozorování.

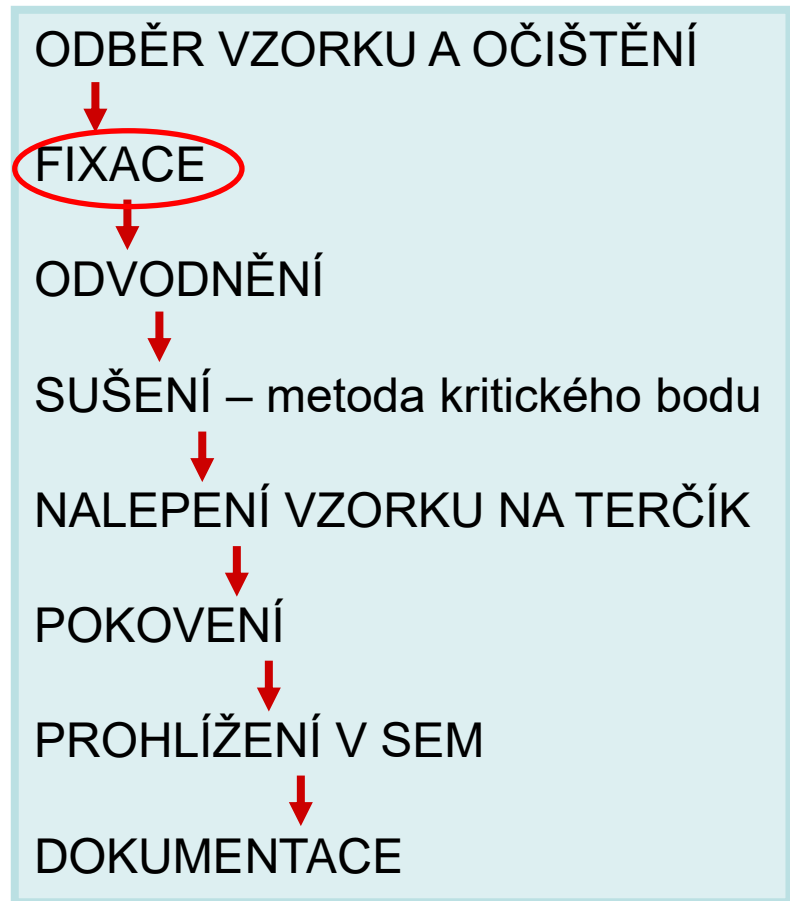
Čištění: jehlou pod stereomikroskopem, oplachem, sonifikací, ofukem tlakovým vzduchem, suspenze opakovanou centrifugací



PŘÍPRAVA VZORKU PRO SEM

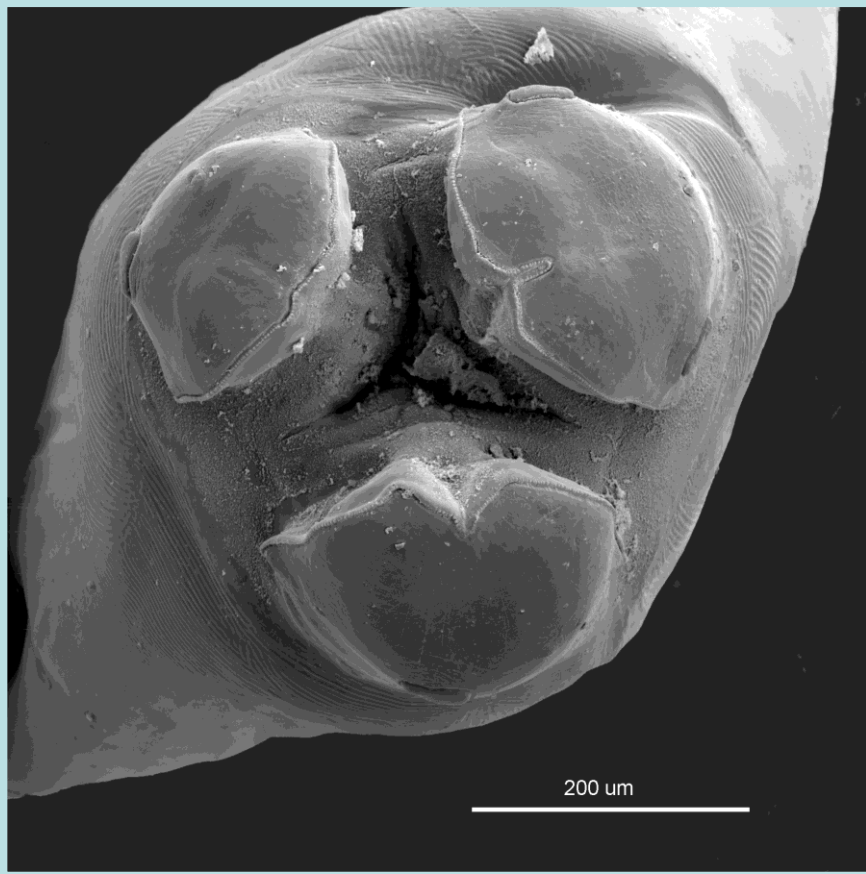
FIXACE - chemická

- stabilizace a mechanické zpevnění vzorku, zachování vnějšího tvaru jako v nativních podmínkách
- podobně jako u TEM – glutaraldehyd, formaldehyd, oxid osmičelý
- větší vzorky – nutná fixace delší dobu
- vypírání - pufry

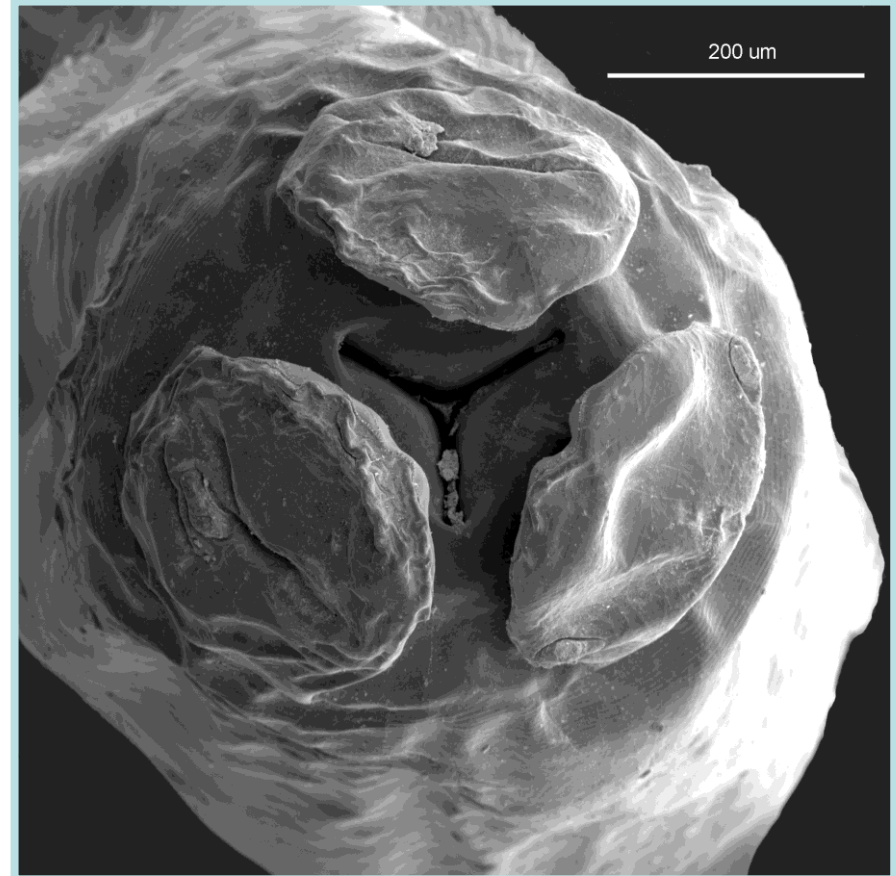


FIXACE

Správně x špatně



Ascaris sp.
Fixace 4% formaldehydem

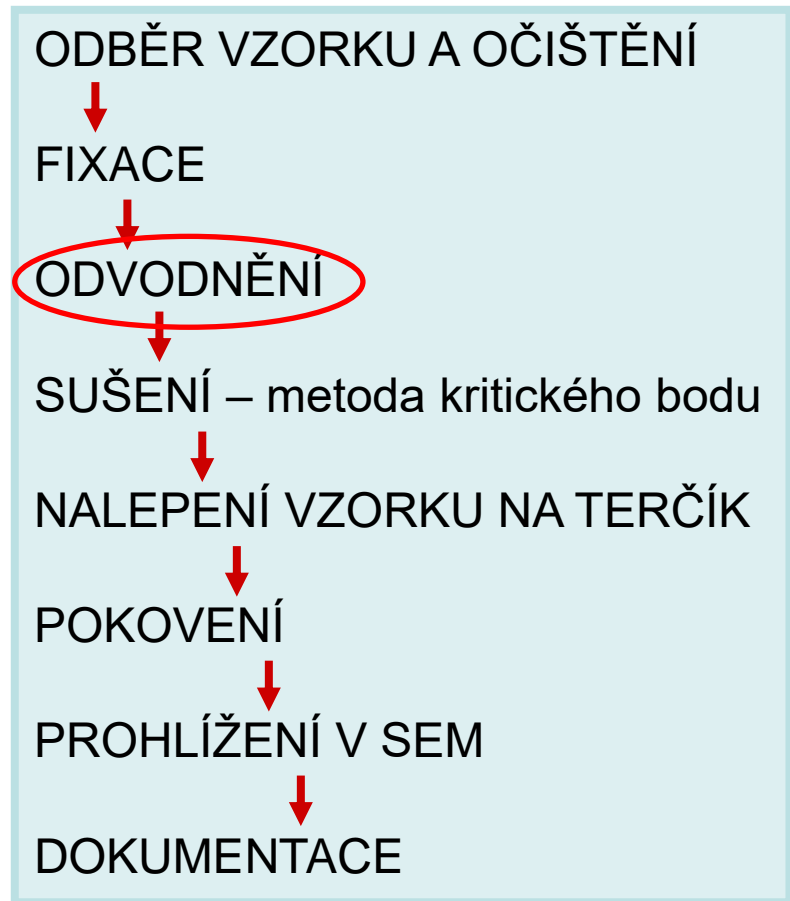


Ascaris sp.
Fixace 96% ethanolem

PŘÍPRAVA VZORKU PRO SEM

ODVODNĚNÍ

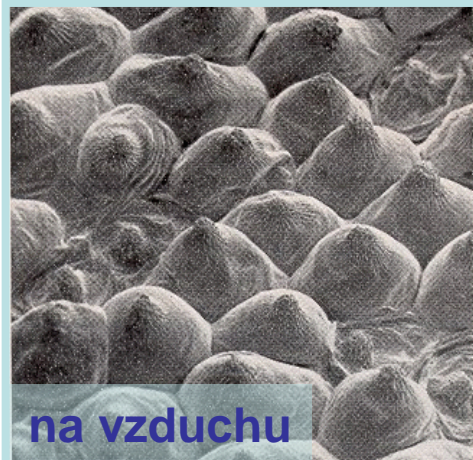
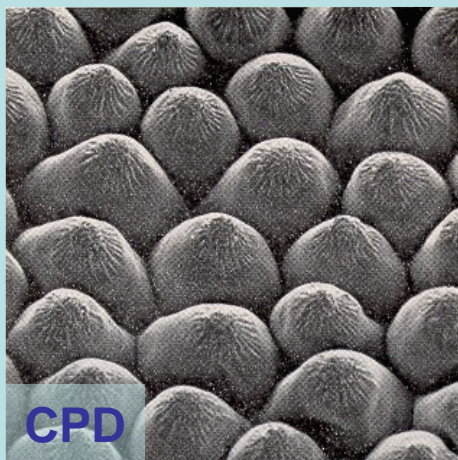
- vzestupná alkoholová, acetonová řada (chemikálie pro EM)
- objekty můžeme vkládat do mikroporezních košíčků
- **Příklad postupu:** vzorek po fixaci uchován v 70% ethanolu, odvodnění po 15 min v 80%, 90%, 95%, 100% ethanolu, 100% ethanol : 100% aceton – 2:1, 2:2, 1:2, 100% acetonu



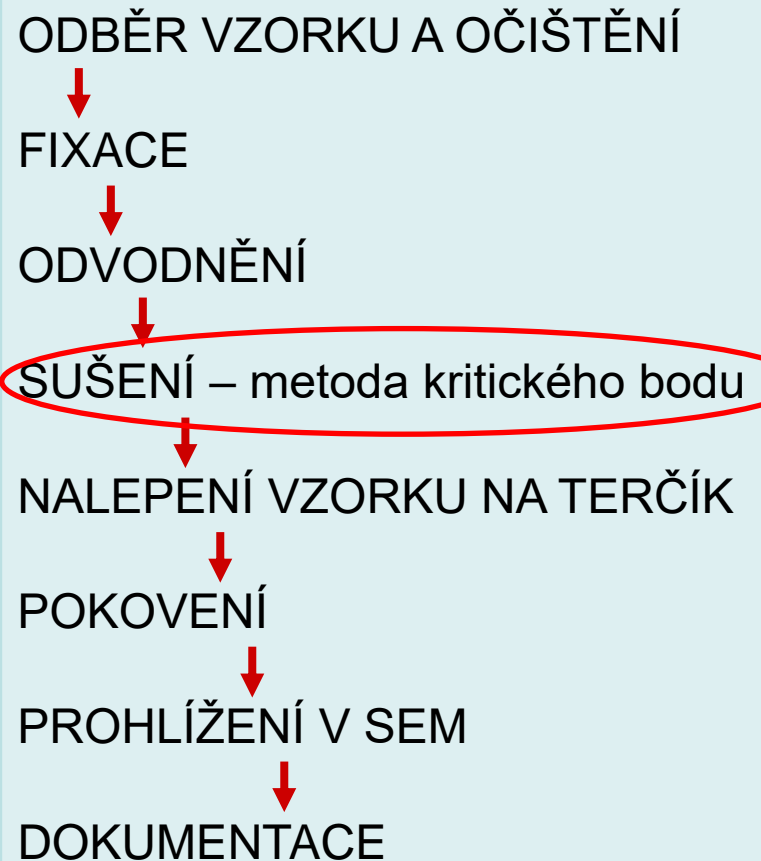
PŘÍPRAVA VZORKU PRO SEM

SUŠENÍ

- **metoda kritického bodu**
- po nahrazení vody ve vzorku je nutno se zbavit dehydratačního činidla
- sušení na vzduchu – tvarové deformace – proto metoda kritického bodu



povrch okvětního lístku růže



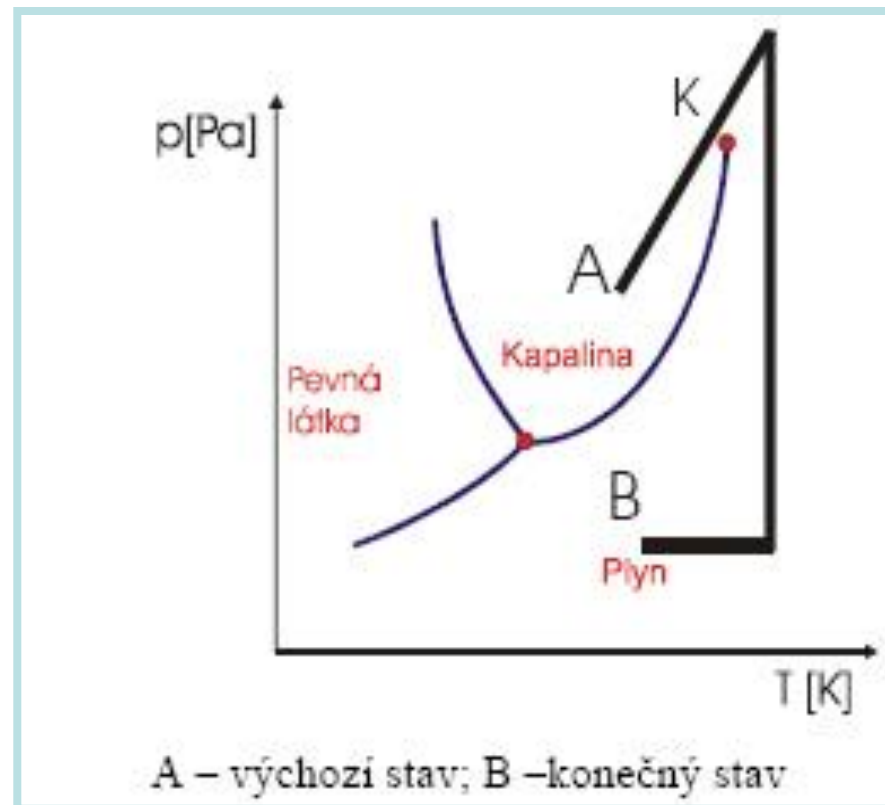
- Critical Point Dryer (CPD) – speciální aparatura
- Vysoušecí činidlo - CO₂



• metoda vychází z fyzikálních vlastností kapalin, u nichž nad **kritickým bodem K** daným kritickým tlakem p_k a kritickou teplotou T_k mizí rozhraní mezi kapalnou a plynnou fází.

pro vodu: T_k 374 °C, p_k 21,8 MPa

pro CO₂: 31 °C, 7,3 Mpa



- V uzavřeném prostoru se při zvyšování teploty kapalina a nad ní se nacházející pára chovají rozdílně.
- Kapalina se teplem roztahuje, tím zmenšuje prostor pro páru. Pára s rostoucí teplotou zvyšuje svůj tlak.
- Hustota kapaliny klesá, hustota páry stoupá. Při určité teplotě se hustota páry a kapaliny vyrovnají.
- V tom momentě se na hladině kapaliny ztrácí povrchové napětí. Povrchové napětí mizí i na povrchu preparátu, který je v kapalině ponořen.
- Po zvýšení teploty nad kritický bod je možno snížit tlak, aniž by došlo ke kondenzaci páry.

Postup:

- Tlaková komůrka se vychladí, vloží se vzorky.
- Komůrka se napustí kapalným CO₂, ten se několikrát vymění, aby se úplně nahradilo organické rozpouštědlo.
- Část komory se odpustí a pak se začne zahřívat. Roste teplota i tlak až po dosažení kritického bodu.
- Potom se vypouští plynný CO₂.
- Po dosažení atmosférického tlaku se komora otevře a vyjmou se vysušené vzorky.

PŘÍPRAVA VZORKU PRO SEM

NALEPENÍ VZORKU NA TERČÍK

- objekty se lepí na hliníkové kruhové terčičky
- pomocí oboustrannné pásky uhlíkové nebo adhesivní
- vodivý stříbrný lak
- orientace vzorku pod preparačním mikroskopem



ODBĚR VZORKU A OČIŠTĚNÍ

↓
FIXACE

↓
ODVODNĚNÍ

↓
SUŠENÍ – metoda kritického bodu

↓
NALEPENÍ VZORKU NA TERČÍK

↓
POKOVENÍ

↓
PROHLÍŽENÍ V SEM

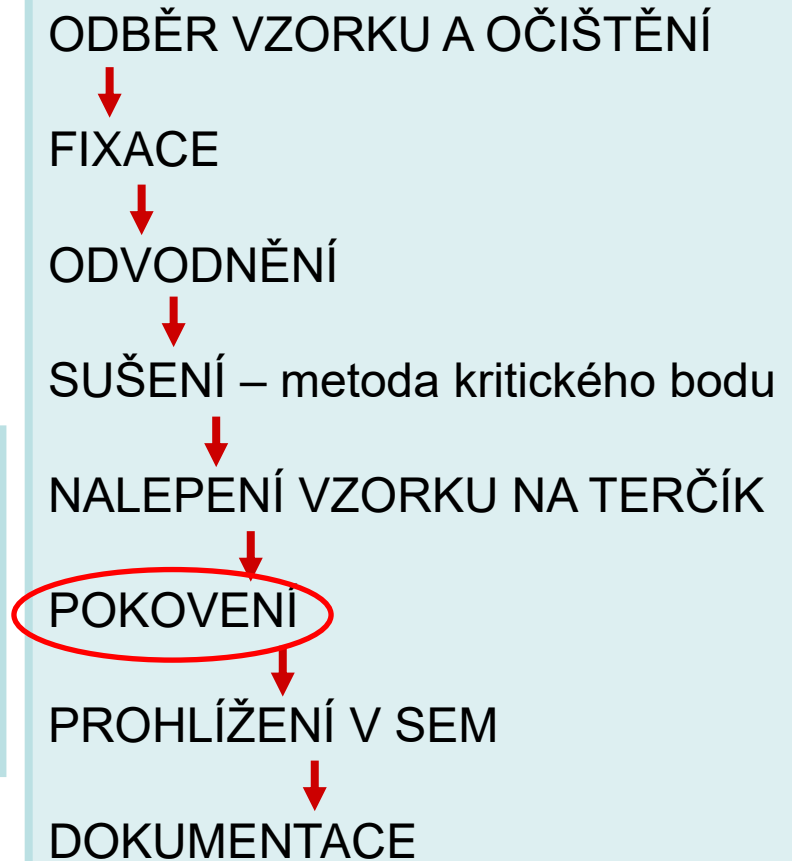
↓
DOKUMENTACE



PŘÍPRAVA VZORKU PRO SEM

POKOVENÍ

- Vysušené biologické objekty jsou téměř nevodivé.
- V SEM by se proto na nich hromadil elektrický náboj a to by znemožňovalo pozorování.
- Povrch preparátu se proto pokryje vrstvou kovu cca 10-20 nm.
- Používané kovy: zlato, platina, slitina platiny a paládia



Vakuové napařování:

v napařovací aparatuře za vysokého vakua, kov se zahřívá, z povrchu se začnou odpařovat jednotlivé molekuly, šíří se všemi směry, po dopadu na chladnější předměty na nich kondenzují.

Iontové naprašování:

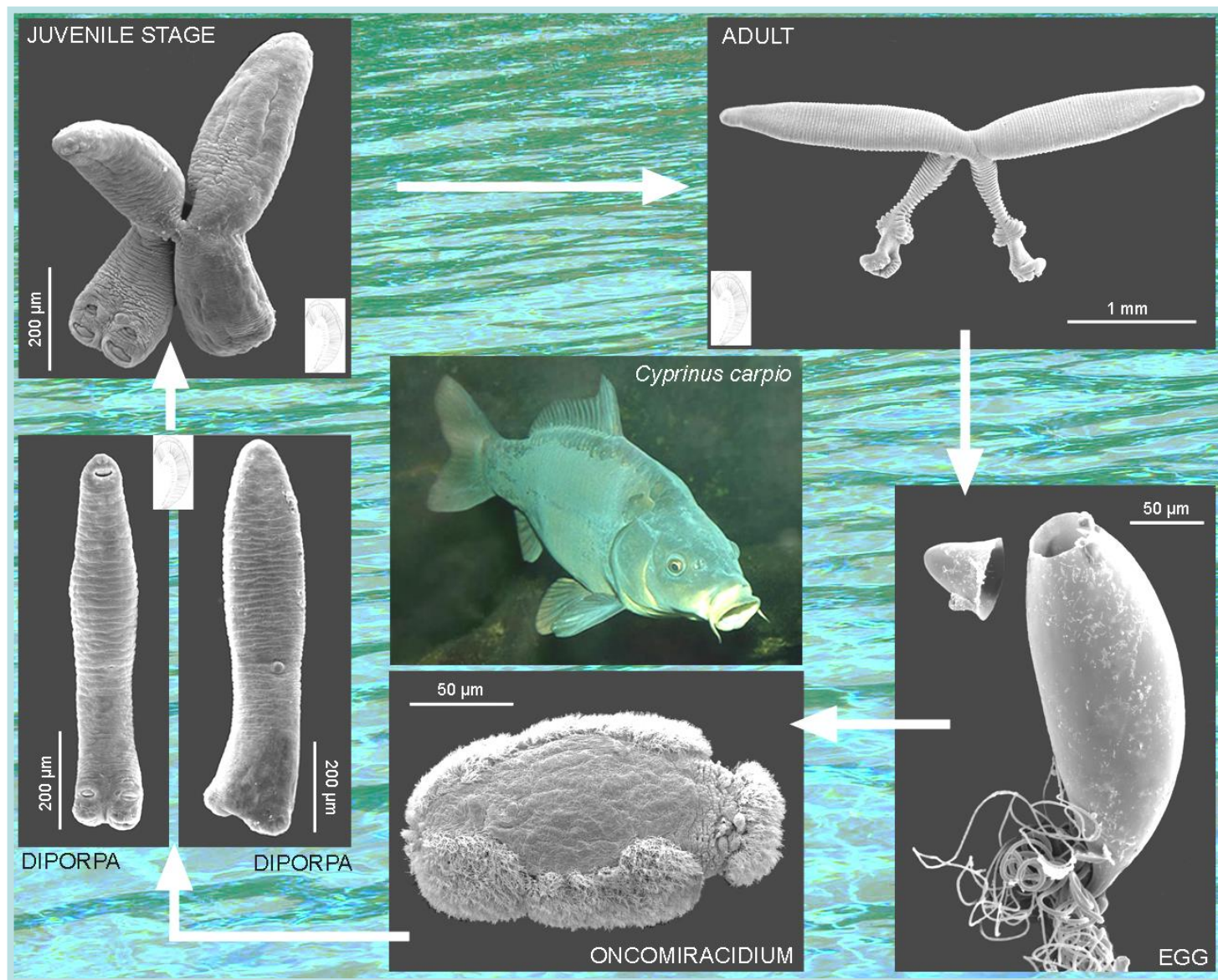
- za nízkého vakua, v argonové atmosféře (lze použít i zředěný vzduch)
- Účinkem elektrického napětí v ní vzniká magnetickým polem usměrněný výboj.
- Urychlené ionty plynu narážejí na zlatou elektrodu takovou energií, že z elektrody vyrážejí atomy kovu, ty se potom v prostoru výboje srážejí s dalšími ionty plynu. Kov se přitom rozptyluje všemi směry.
- Částičky kovu kondenzují na preparátě ze všech směrů.
- Tloušťka nánosu je úměrná proudu mezi anodou a katodou a dobře pokovování.
- Tloušťka naprašované vrstvy by měla být dostatečná, aby odvedla náboj, ale neměla by zakrývat povrchové detaily.



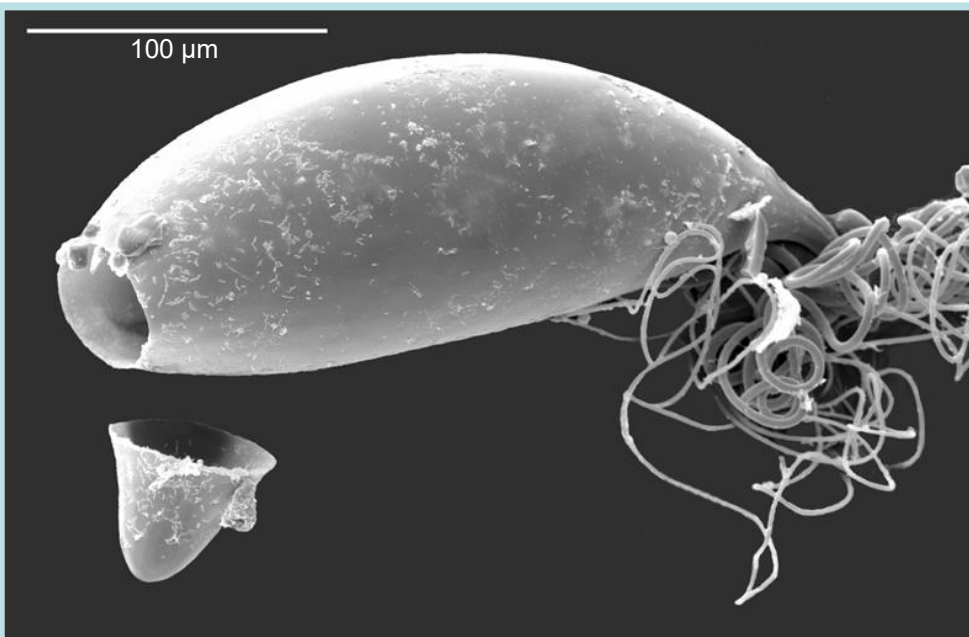
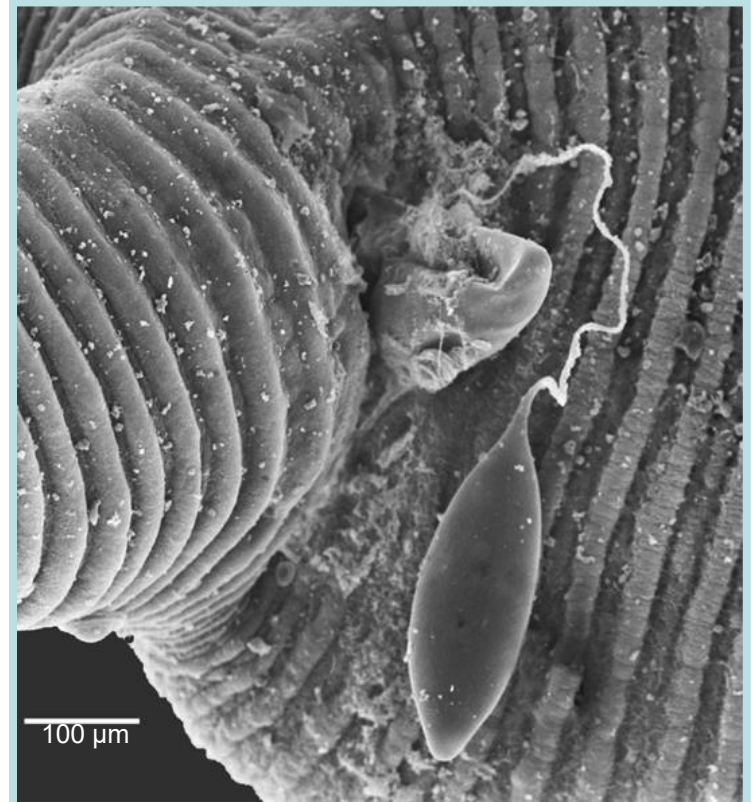
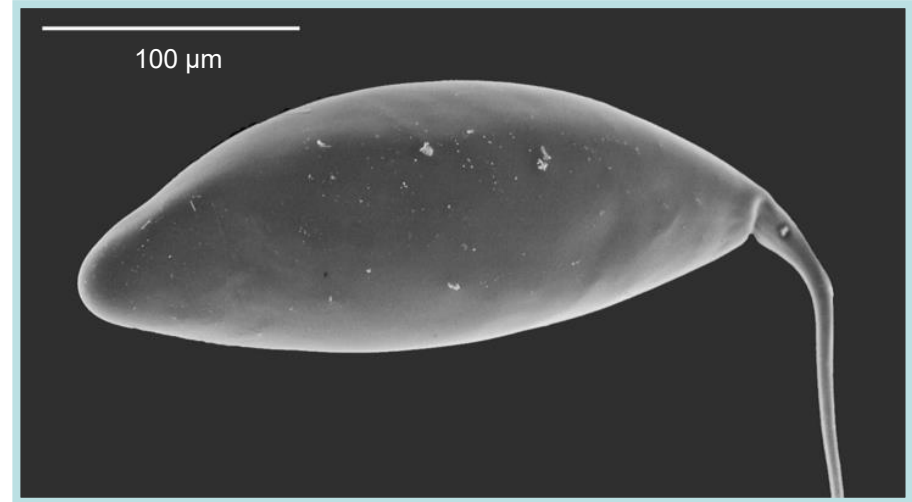
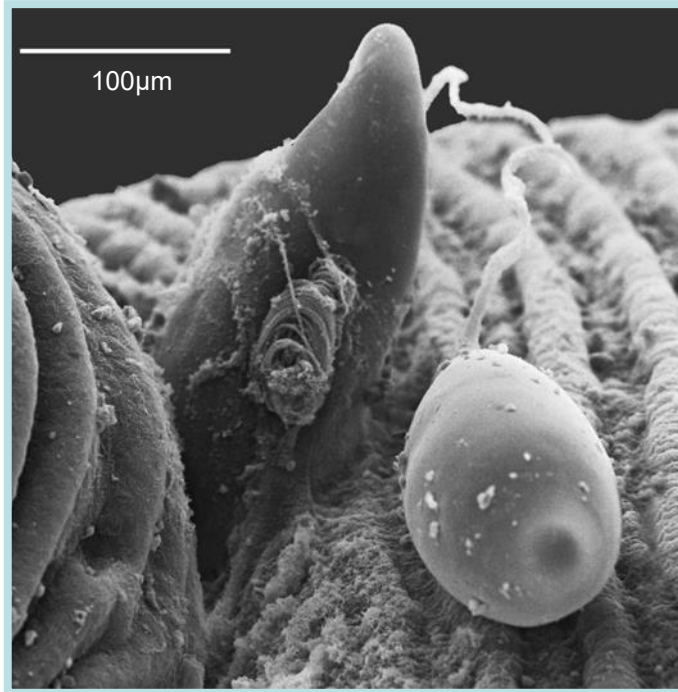
Eudiplozoon nipponicum – Platyhelminthes – Monogenea - Diplozoidae

Parazit - žábry kapra - živí se krví

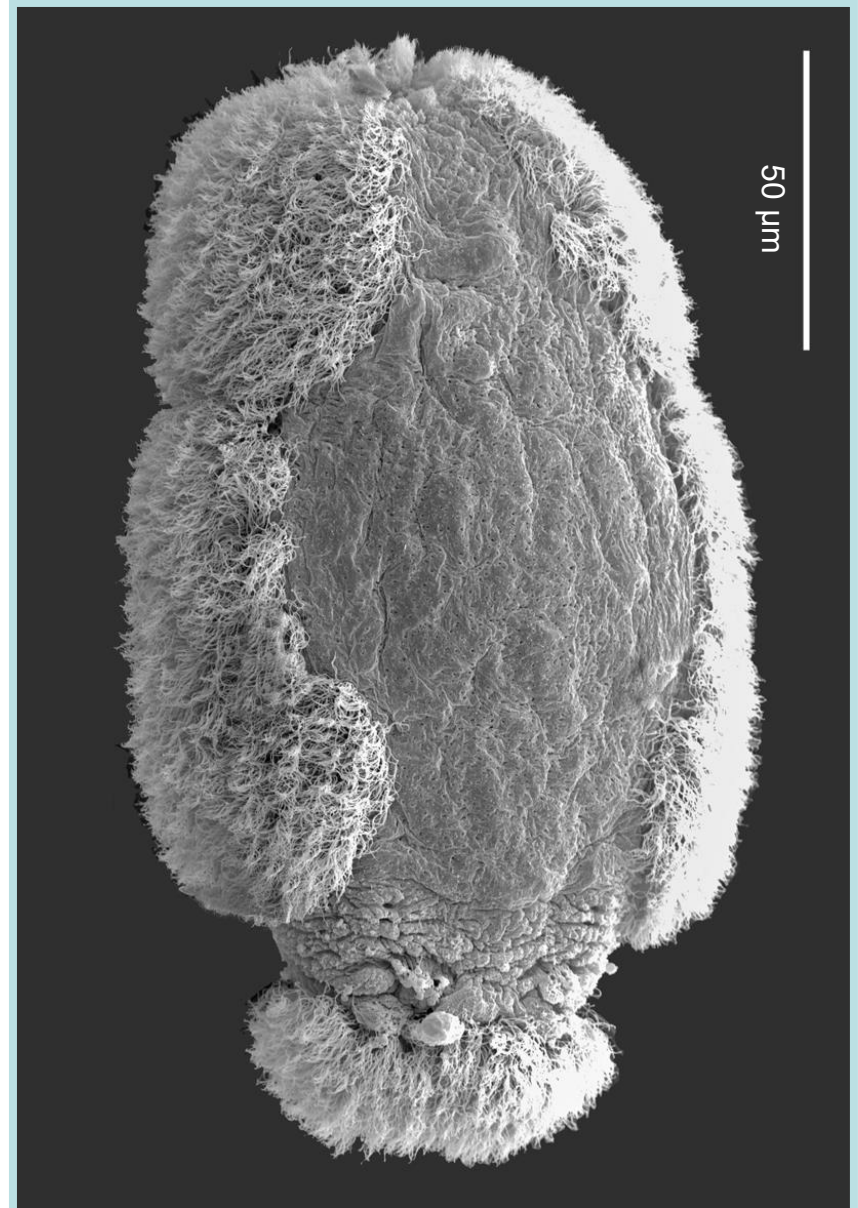
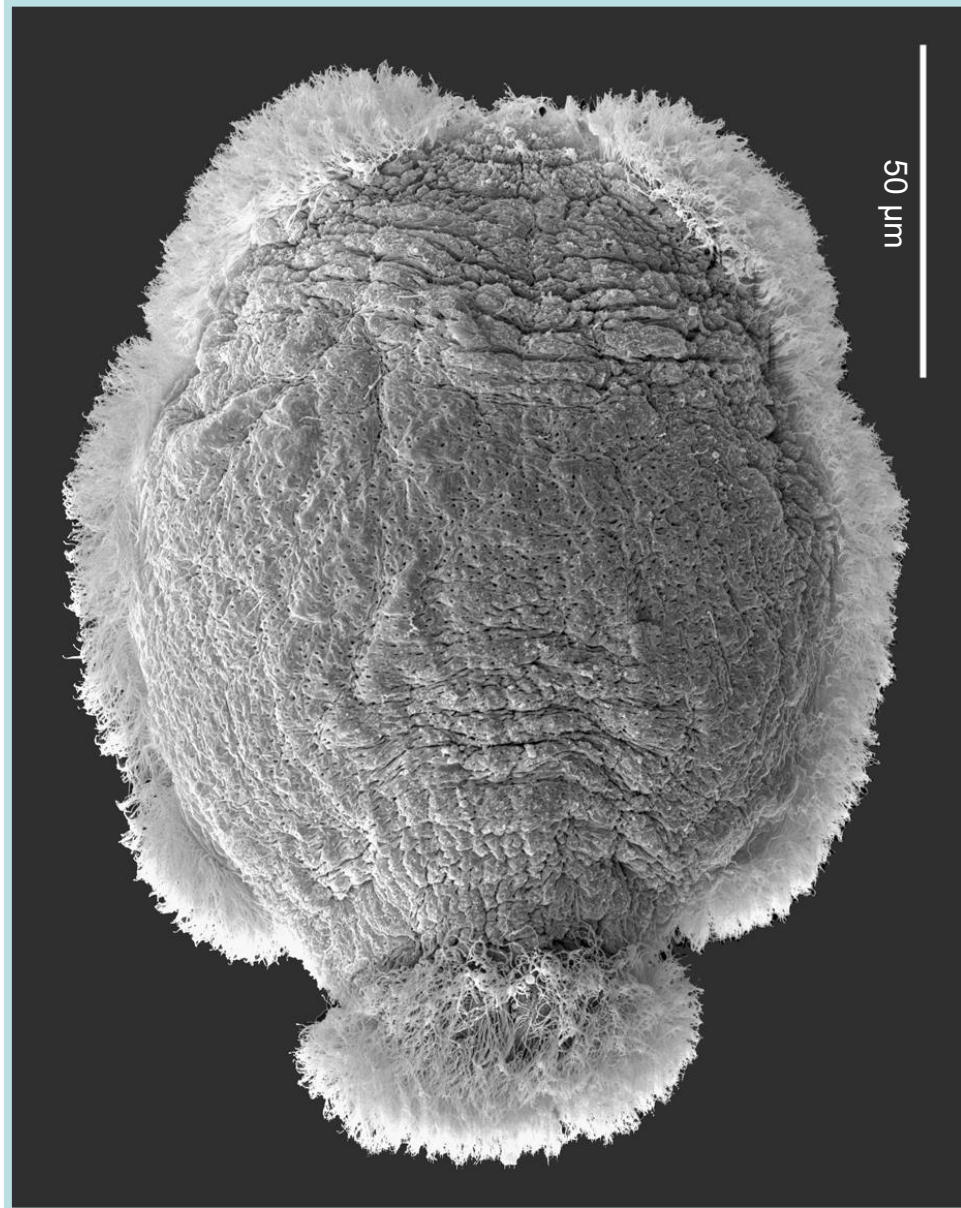
Zajímavý vývojový cyklus



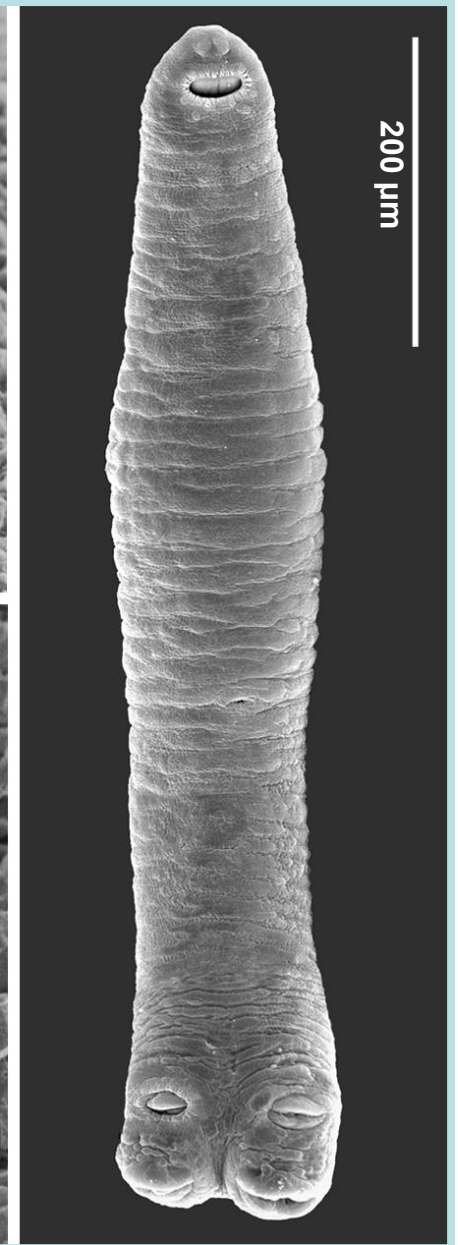
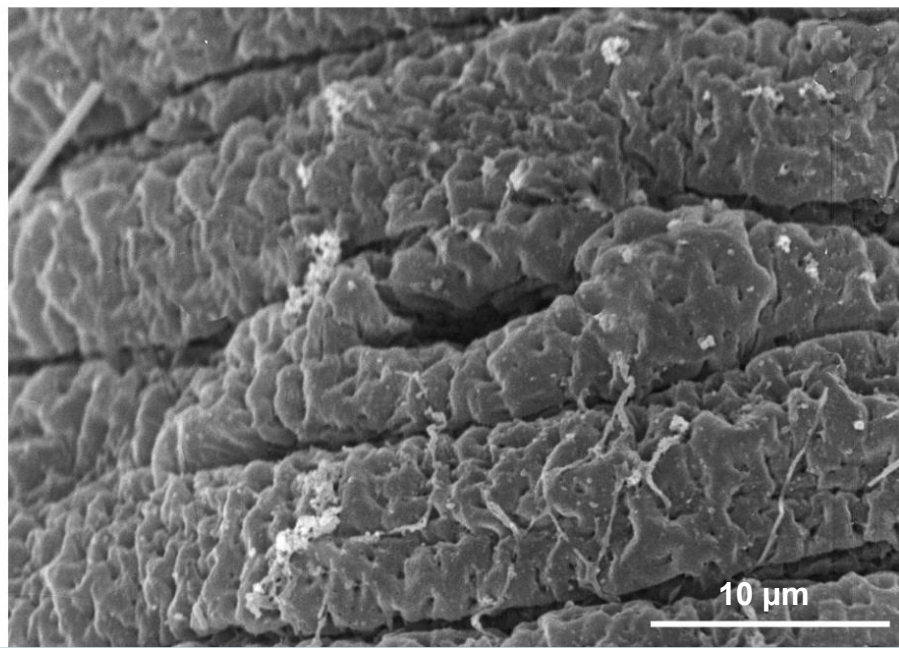
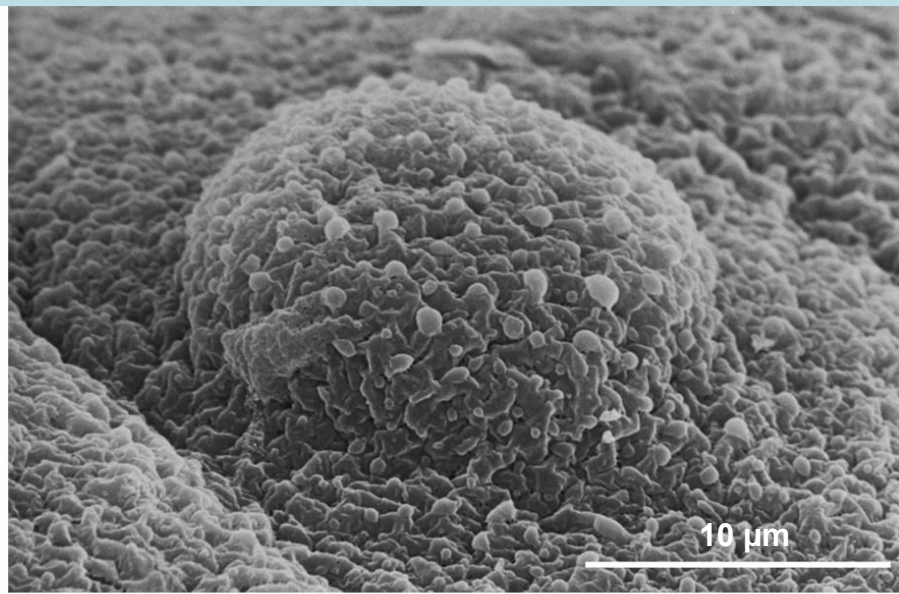
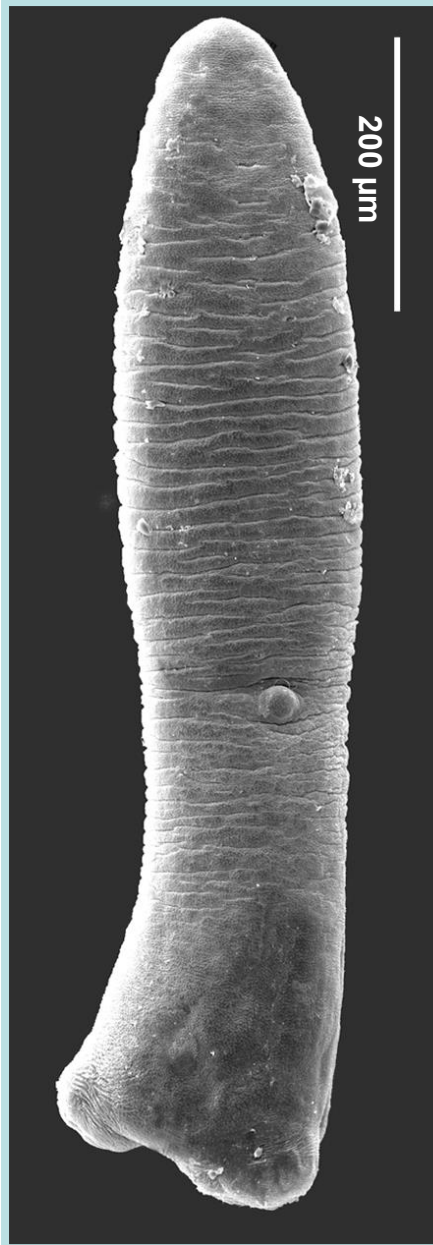
Eudiplozoon nipponicum - vajíčko



Eudiplozoon nipponicum – onkomiracidium



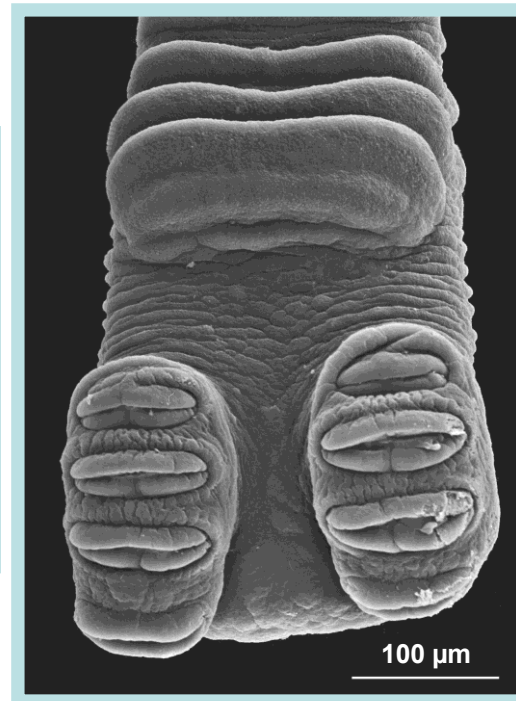
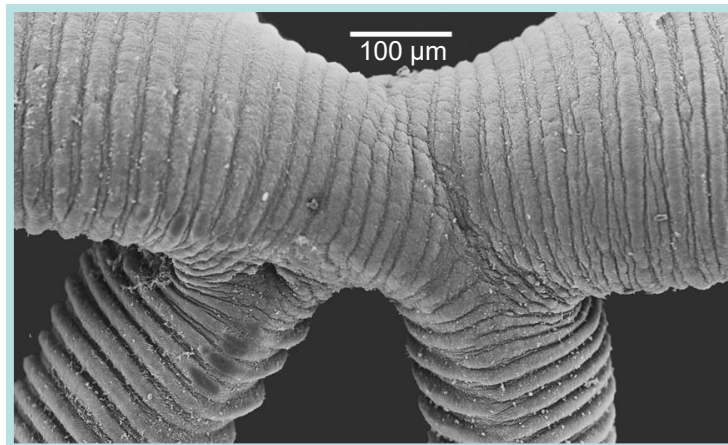
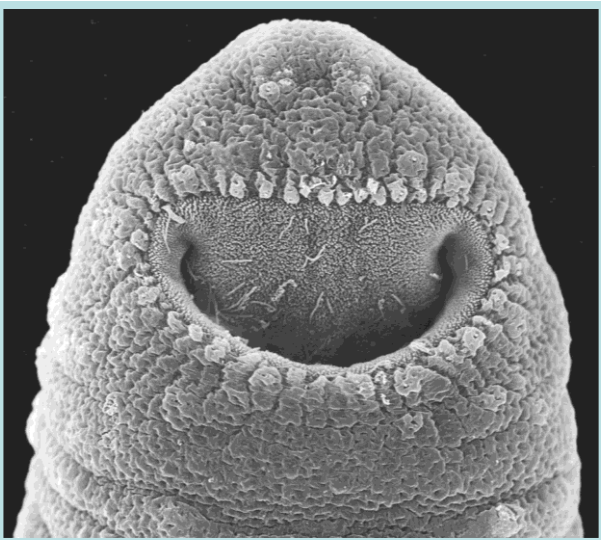
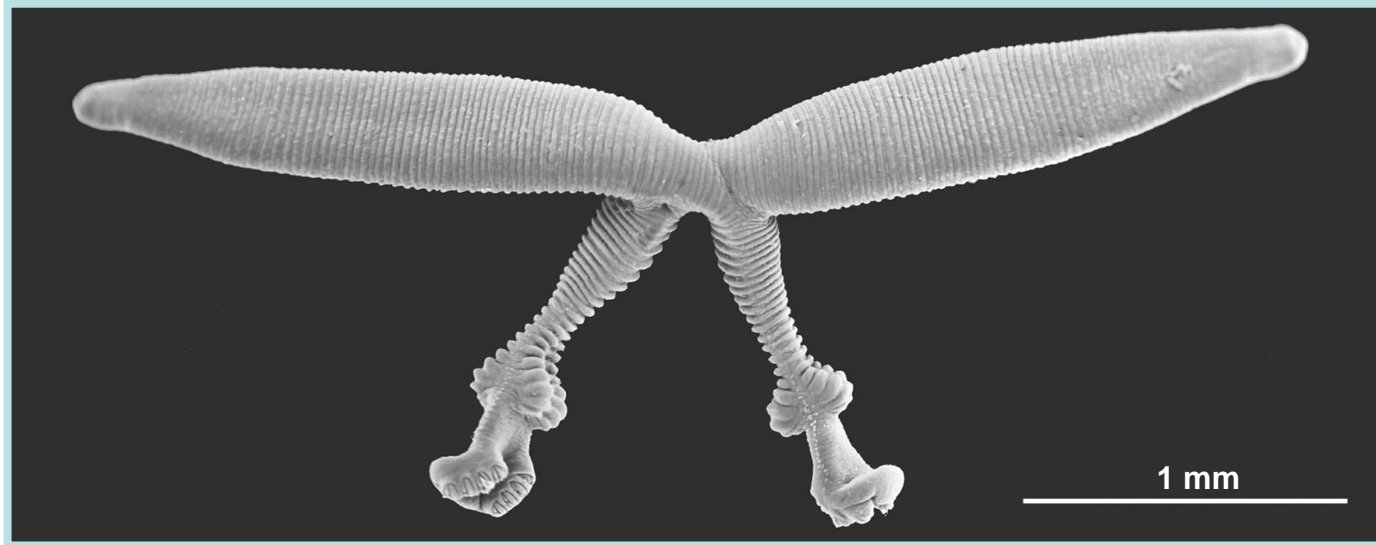
Eudiplozoon nipponicum – diporpa



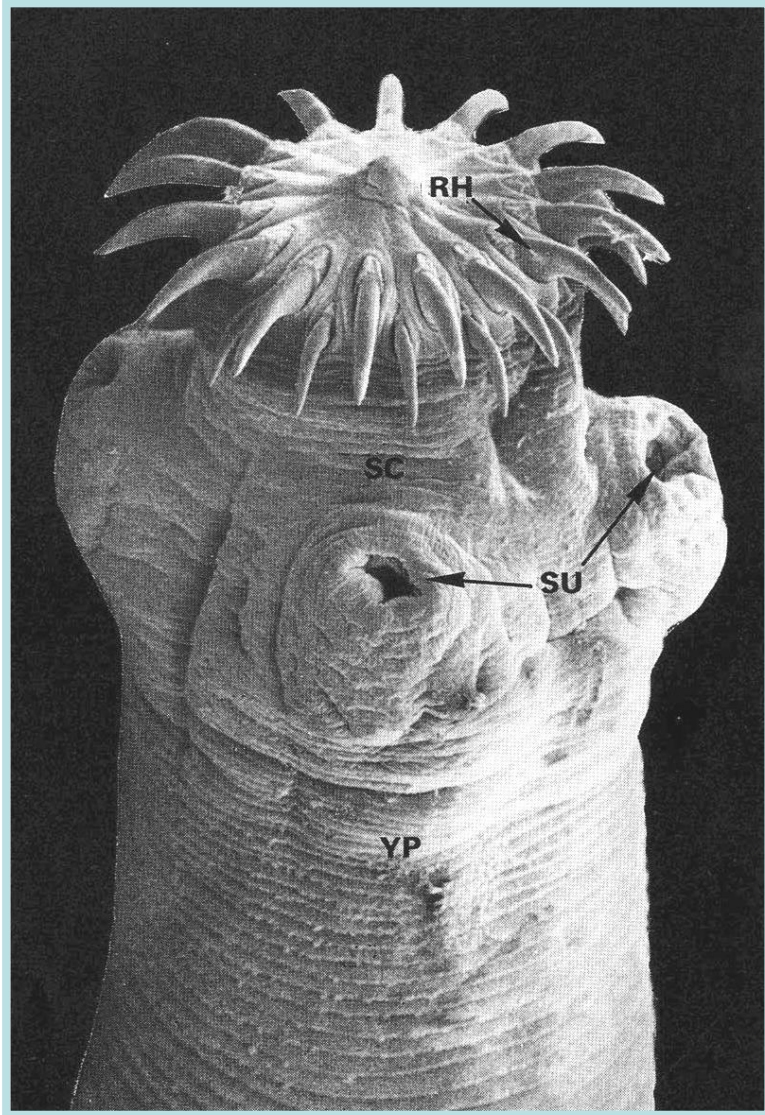
Eudiplozoon nipponicum – juvenilní jedinec



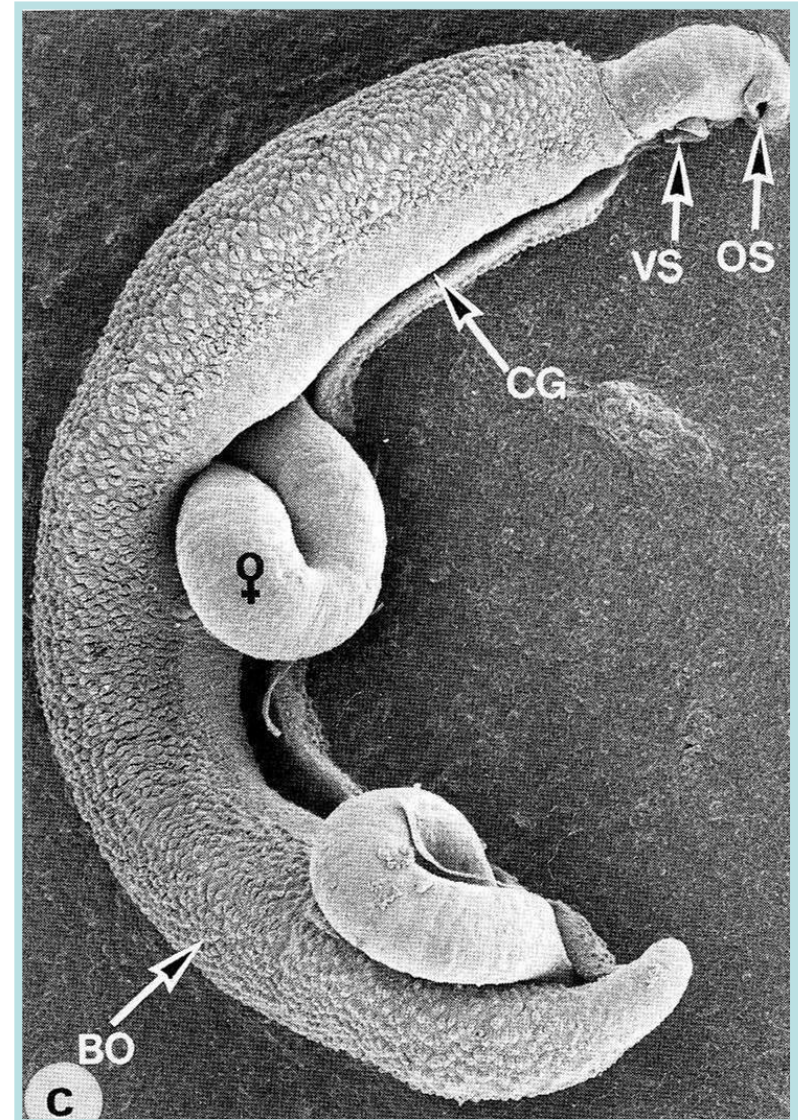
Eudiplozoon nipponicum – adultní jedinec



Kmen: Platyhelminthes (ploštěnci)

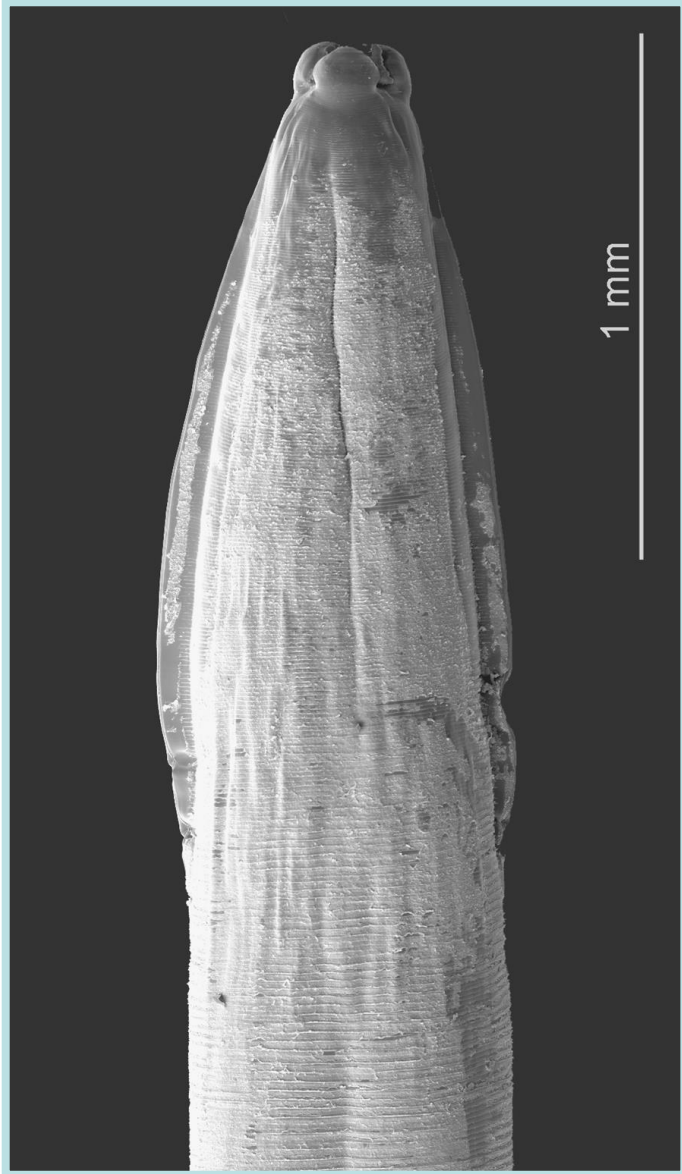


Cestoda (tasemnice)
Taenia taeniaeformis (tasemnice kočičí)



Digenea (motolice)
Schistosoma mansoni (krevnička)

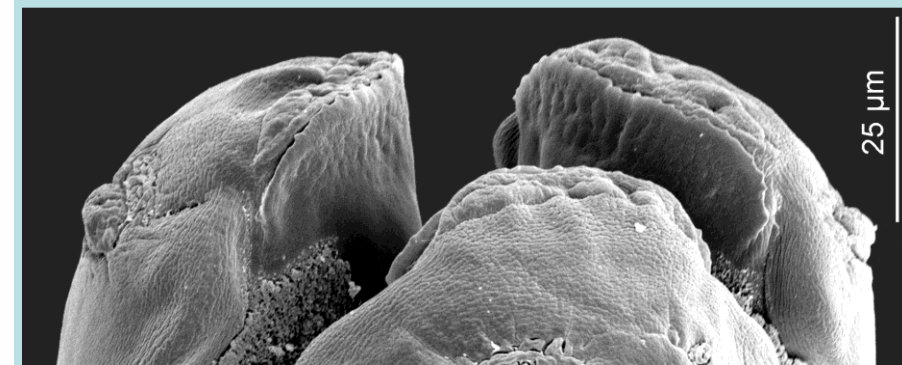
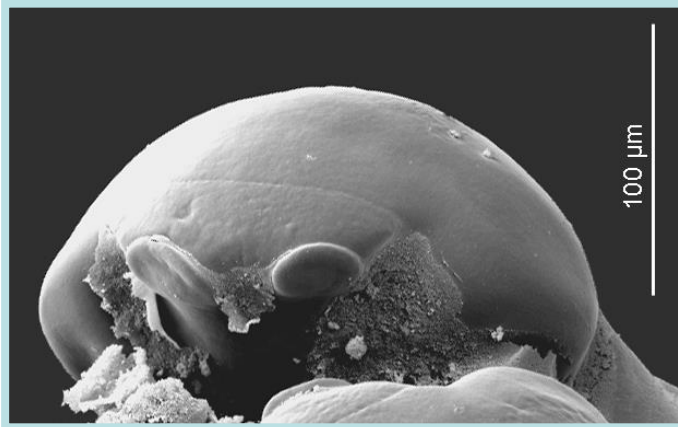
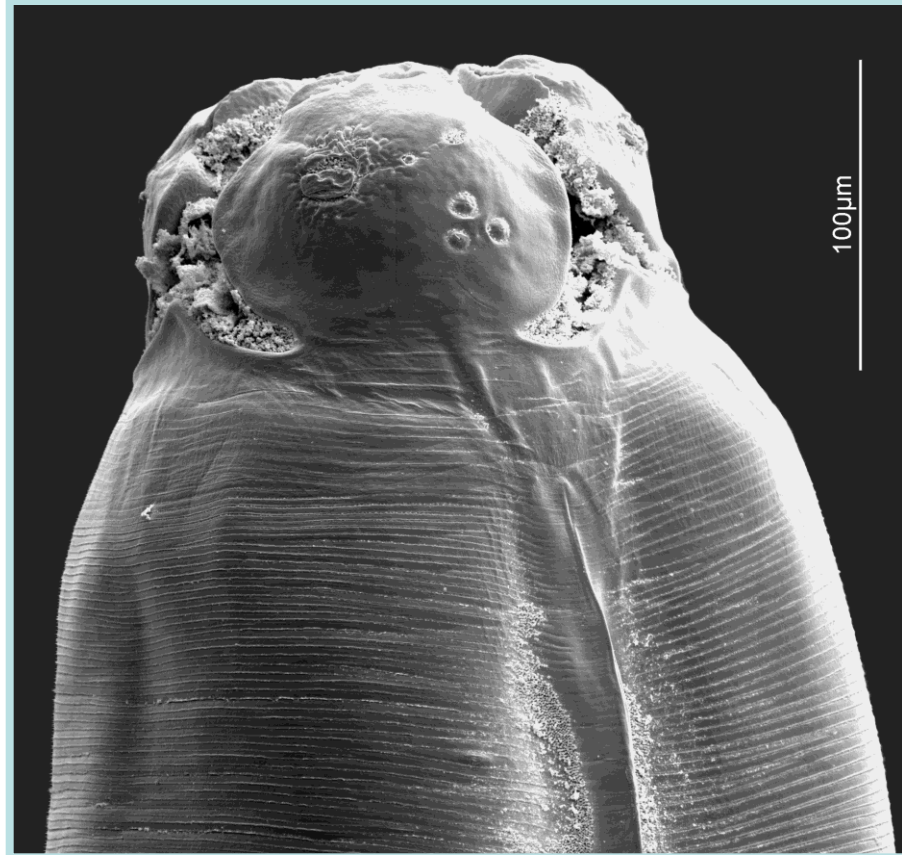
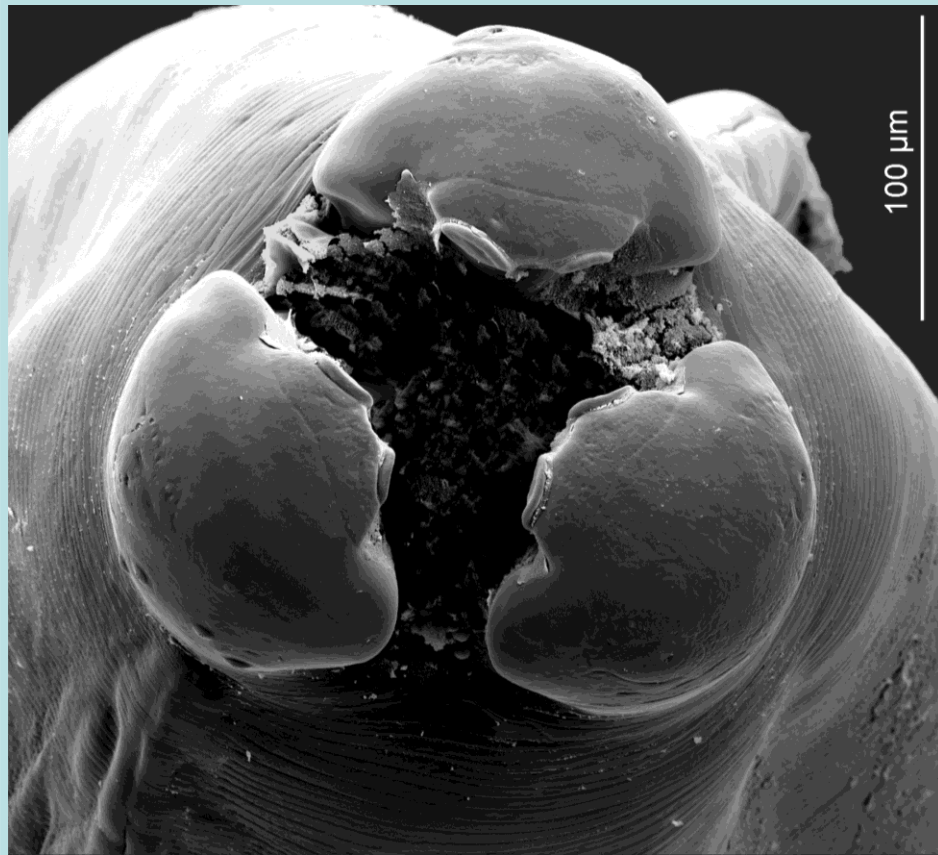
Nematoda (hlístice)



Ascaridia hermaphrodita

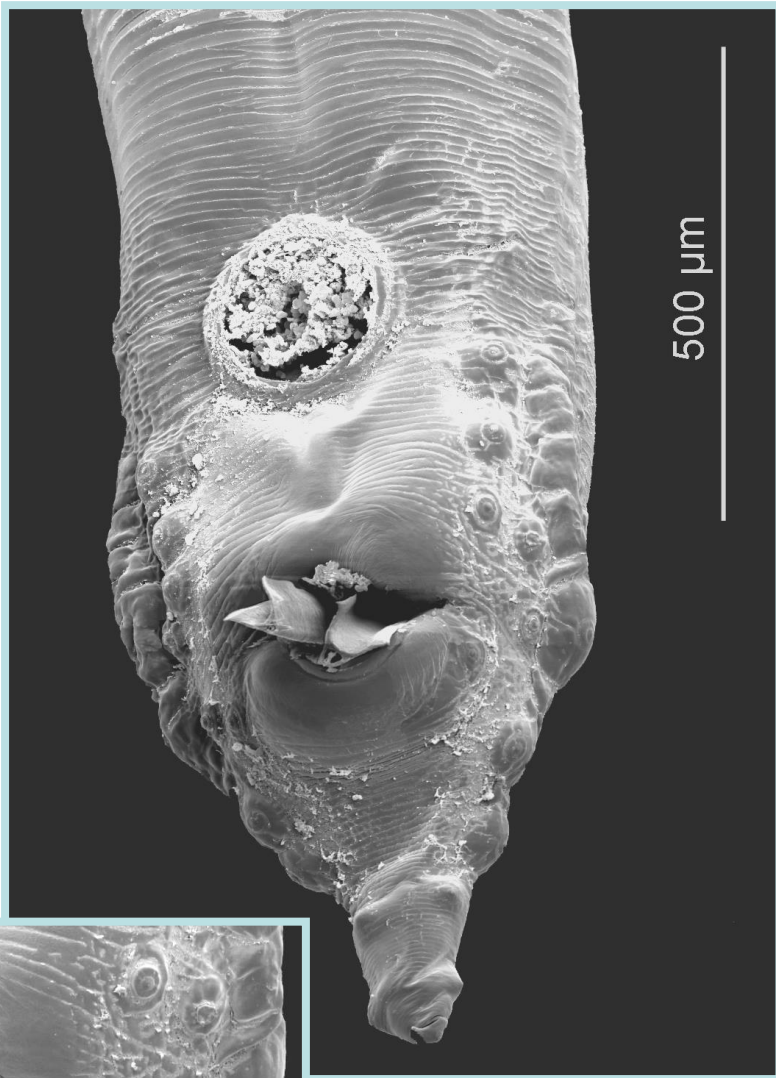


Ascaridia platyceri

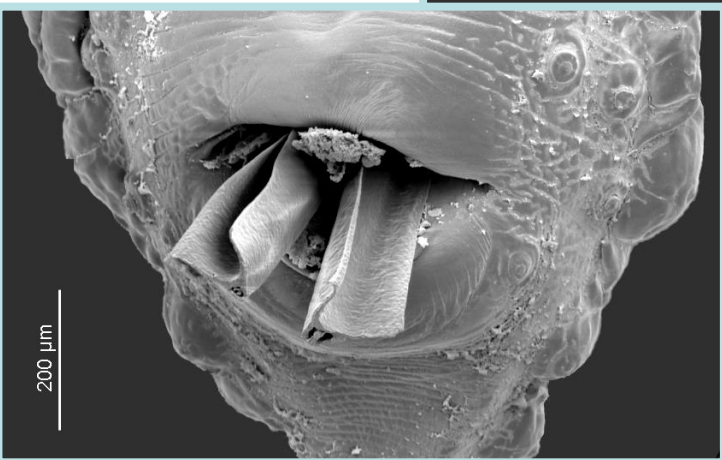


Ascaridia hermaphrodita

Ascaridia platyceri



Ascaridia platyceri



Ascaridia hermaphrodita

Pongobius hugoti

Nematoda, řád: Oxyurida, čeleď:
Oxyuridae, podčeleď: Enterobiinae

Hostitel:

Pongo abelii - orangutan

Lokalizace: Paraziti byli nalezeni
v čerstvém trusu hostitele a ihned fixováni.

Lokalita: Bukit Lawang, národní park
Gunung Louser, severní Sumatra,
Indonésie

Pongobius hugoti

Samice:

A – hlavový konec, apikálně

B – hlavový konec, lateroventrálně

C – lateroventrální pysk

D – anus

E – zadní část těla

F – vajíčko

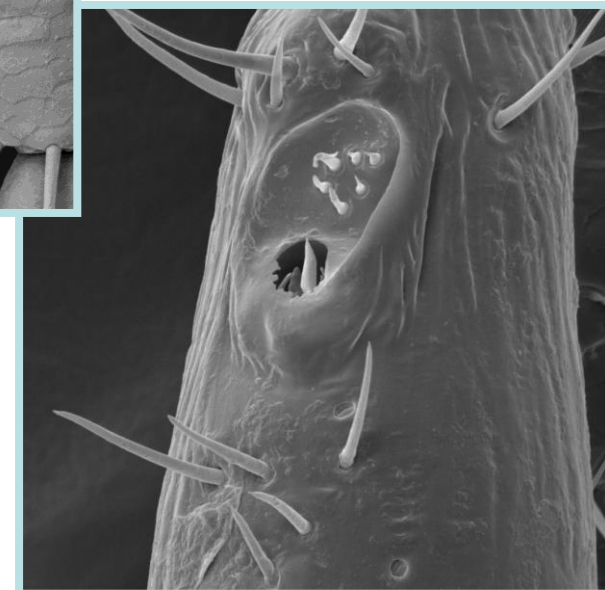
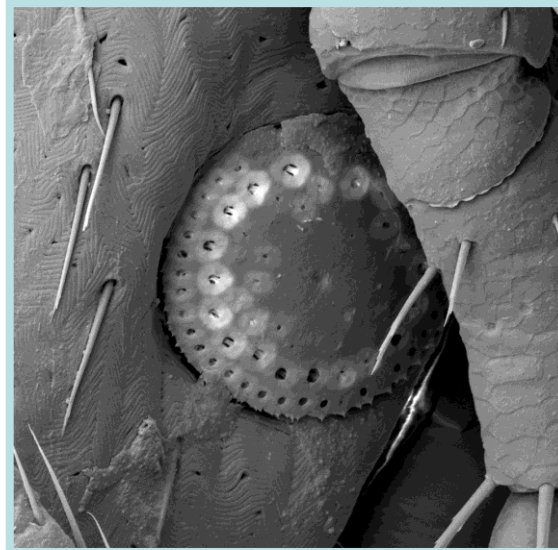
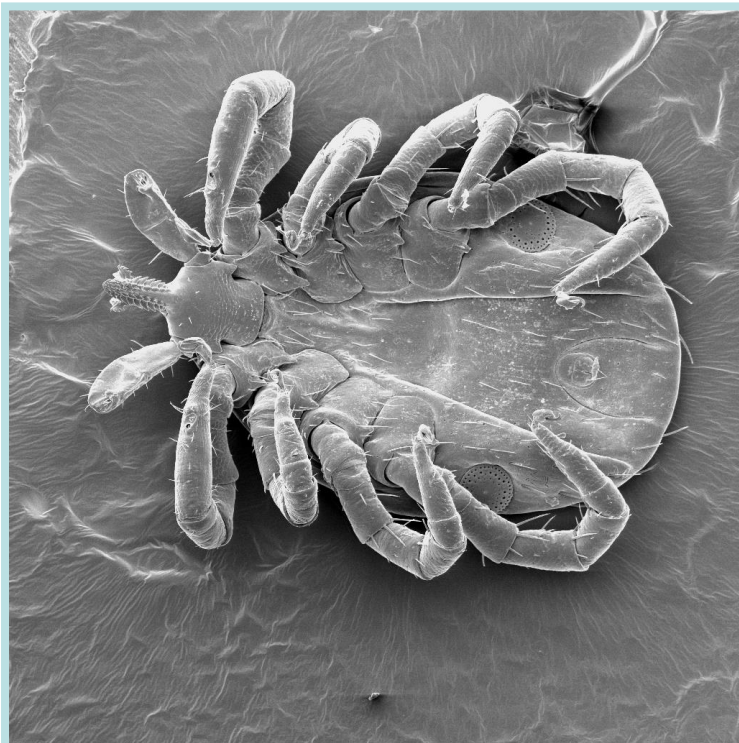
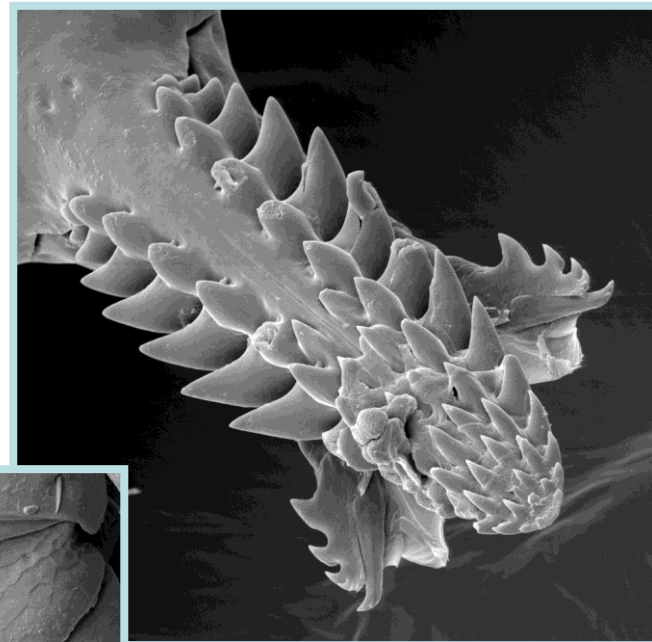
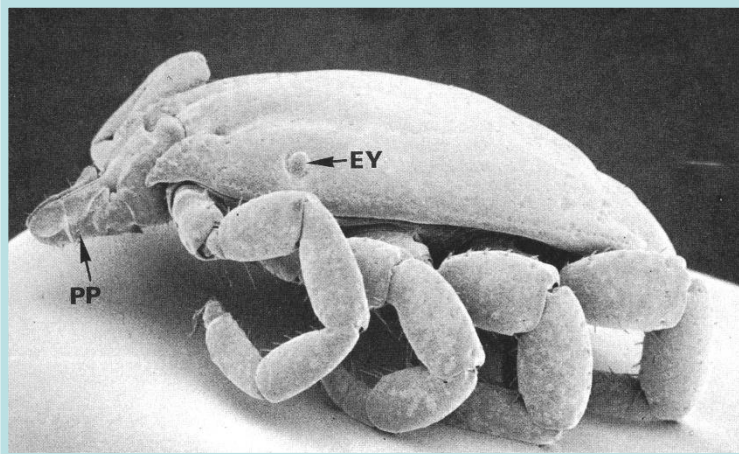
G – detail subpolárního víčka

Samec:

H – celkový pohled

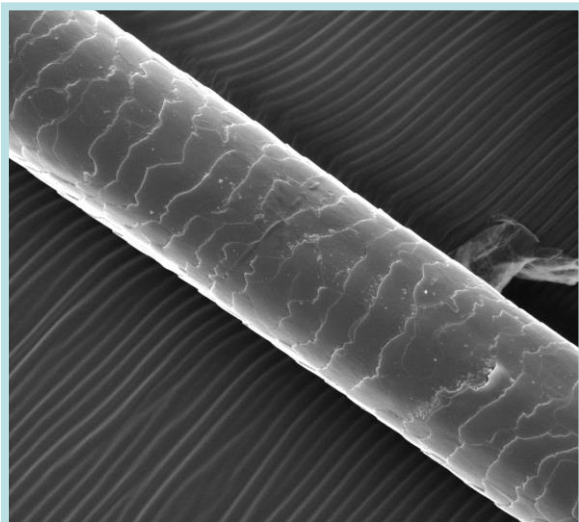
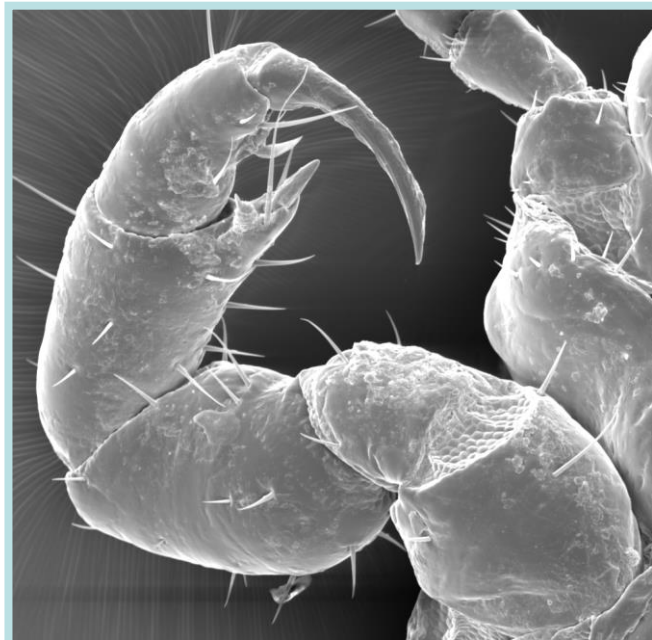
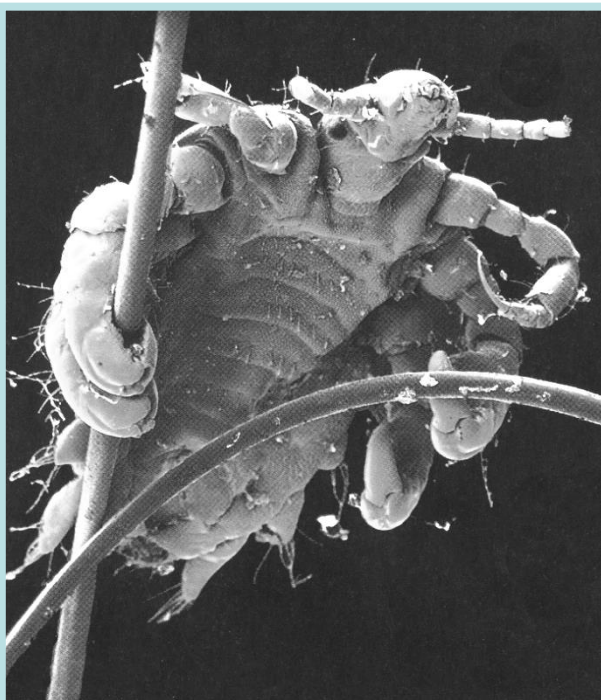
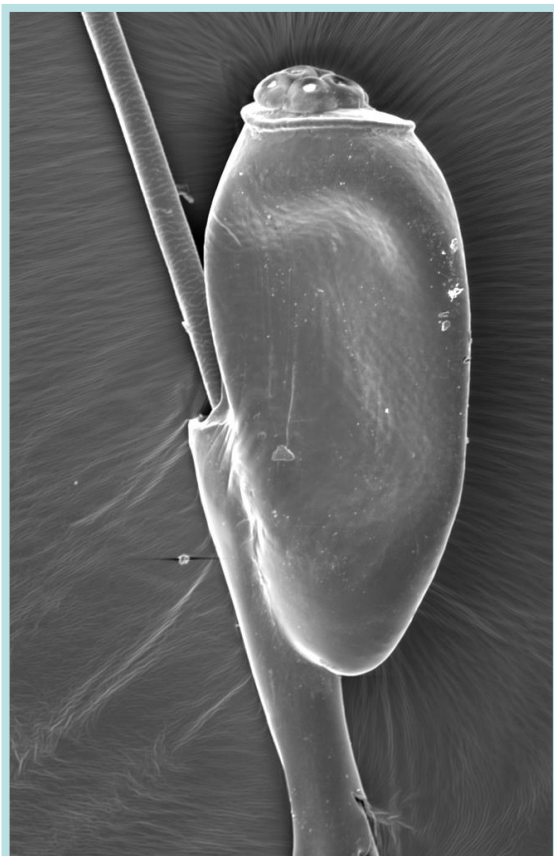
I – detail ocásku



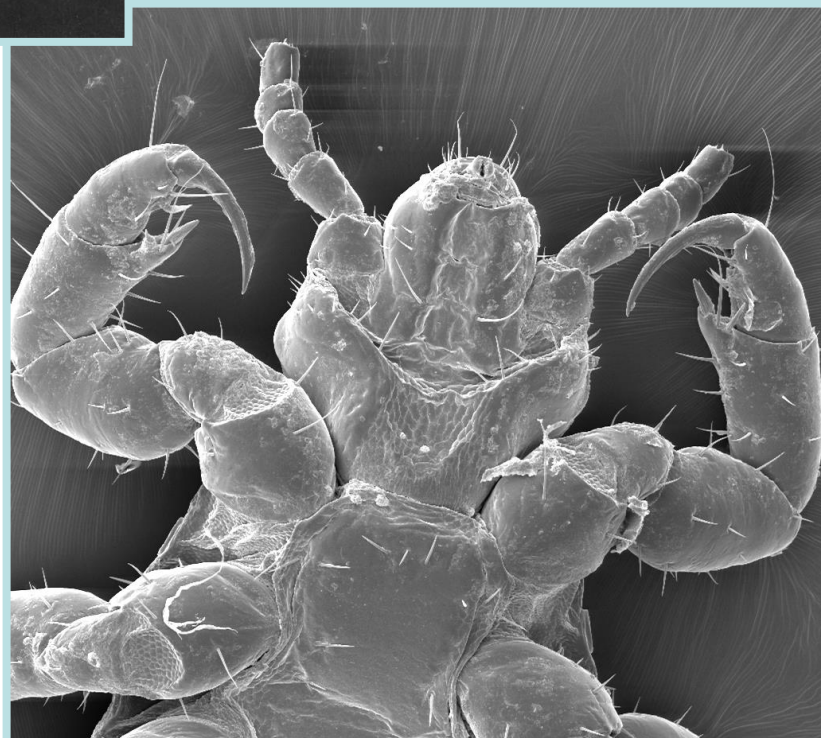


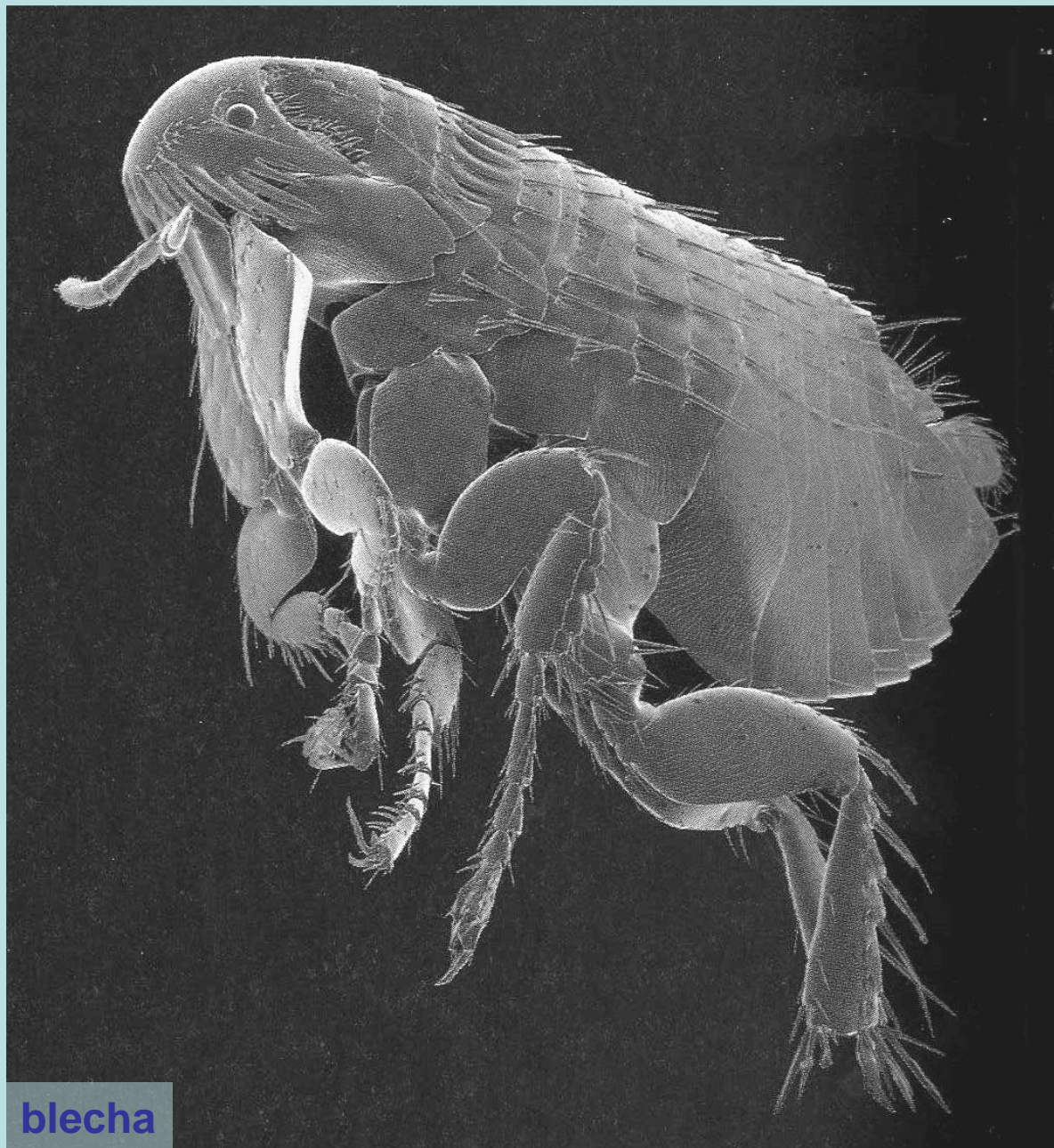
SEM MAG: 159 x DET: SE Detector
HV: 15.0 kV DATE: 04/28/09 500 um Vega ©Tescan
VAC: HiVac Device: TS5136XM Digital Microscopy Imaging

Ixodes ricinus
(klíště obecné)



Pediculus humanus capitis (veš dětská)



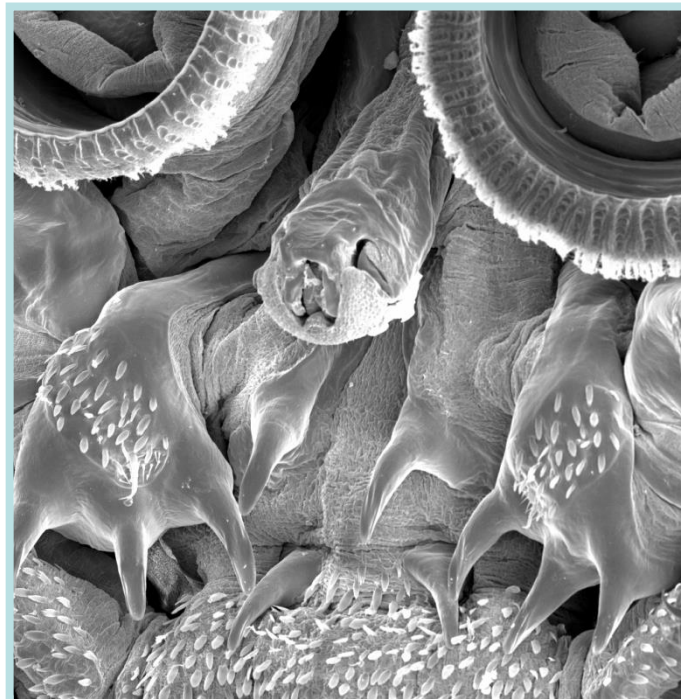
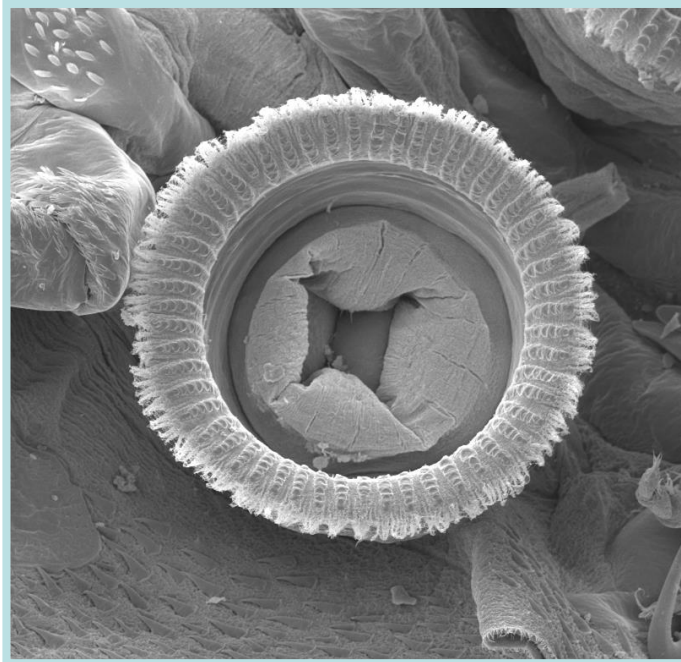


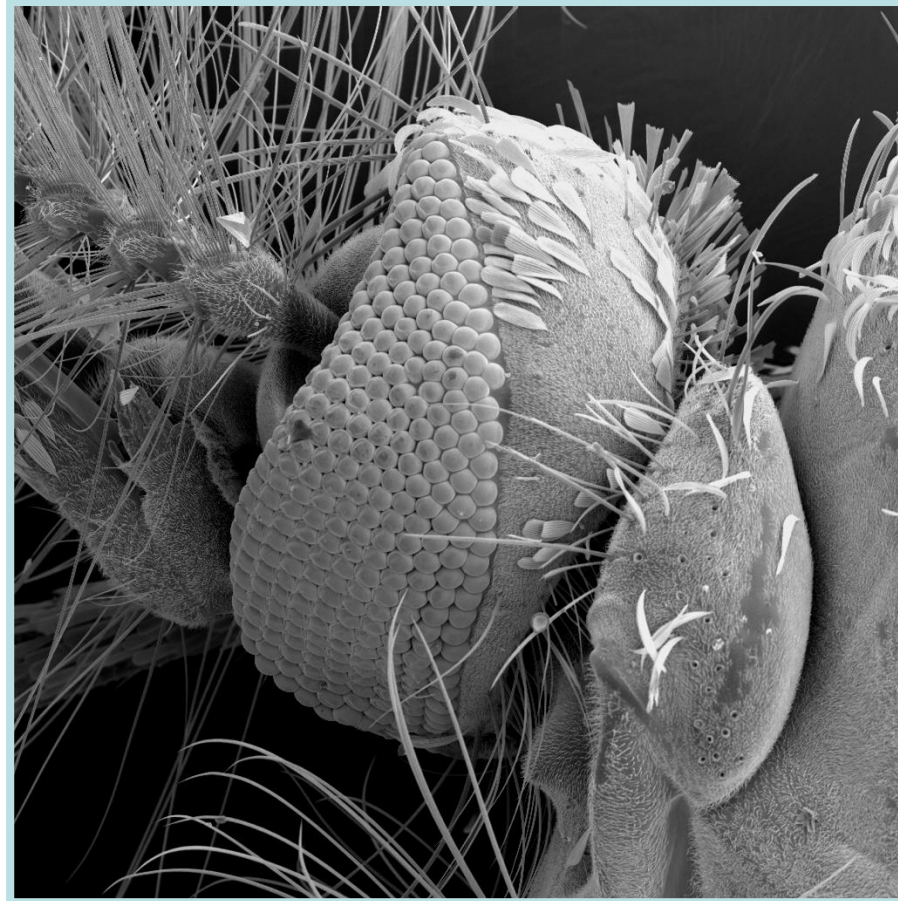
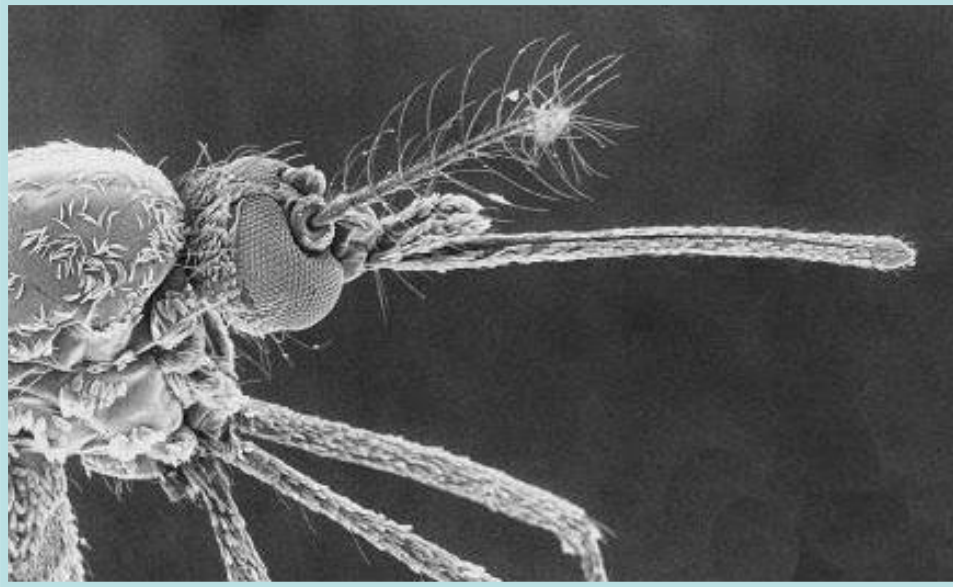
blecha



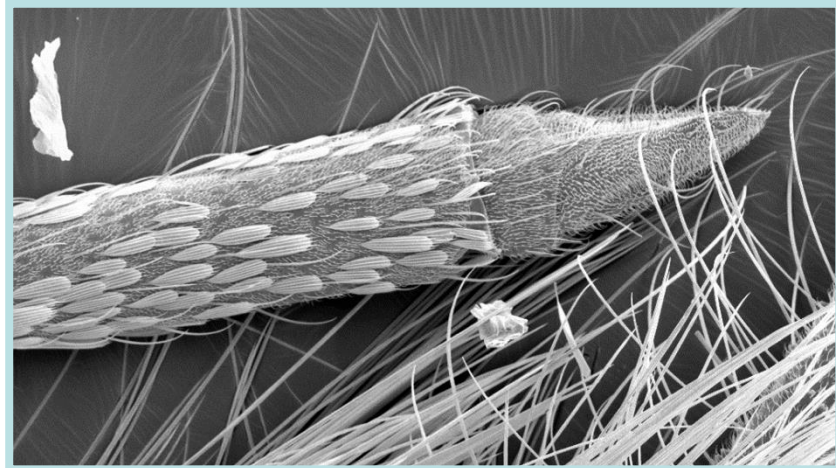


Argulus foliaceus (kapřivec)

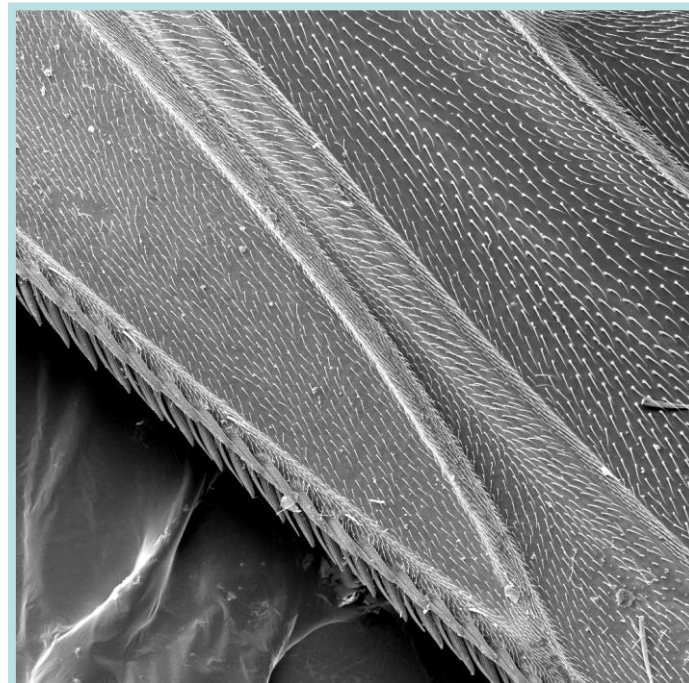
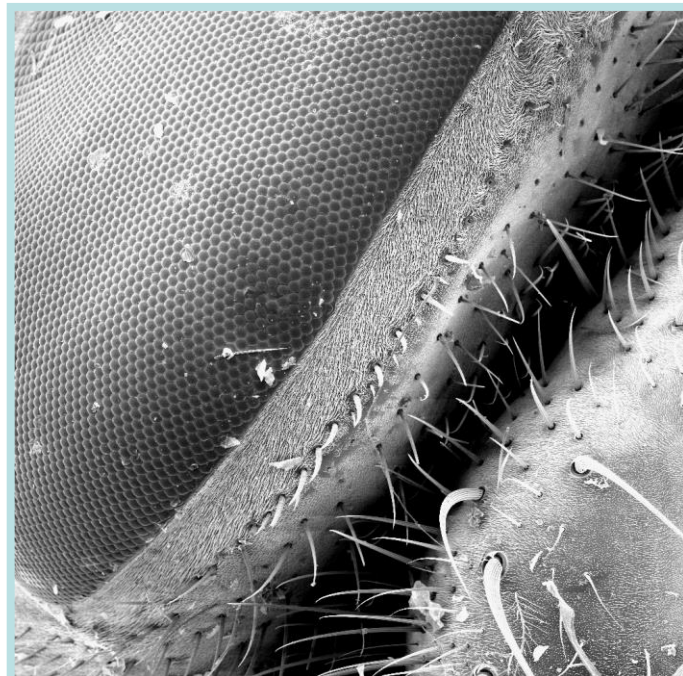
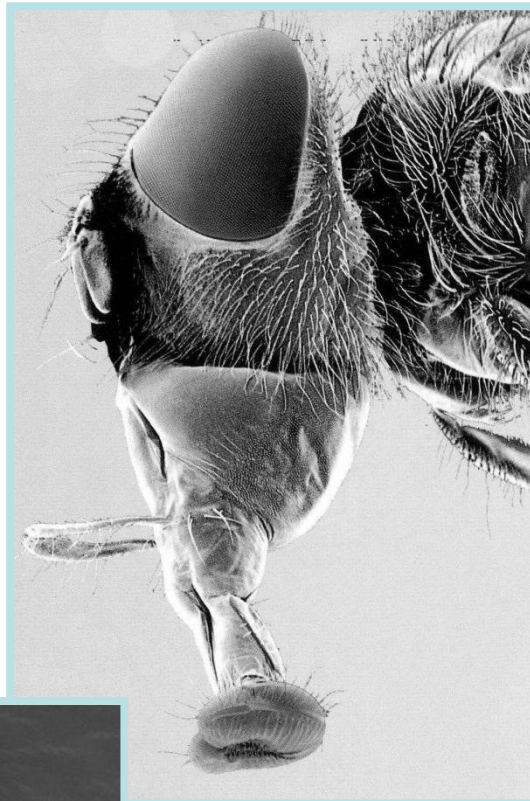


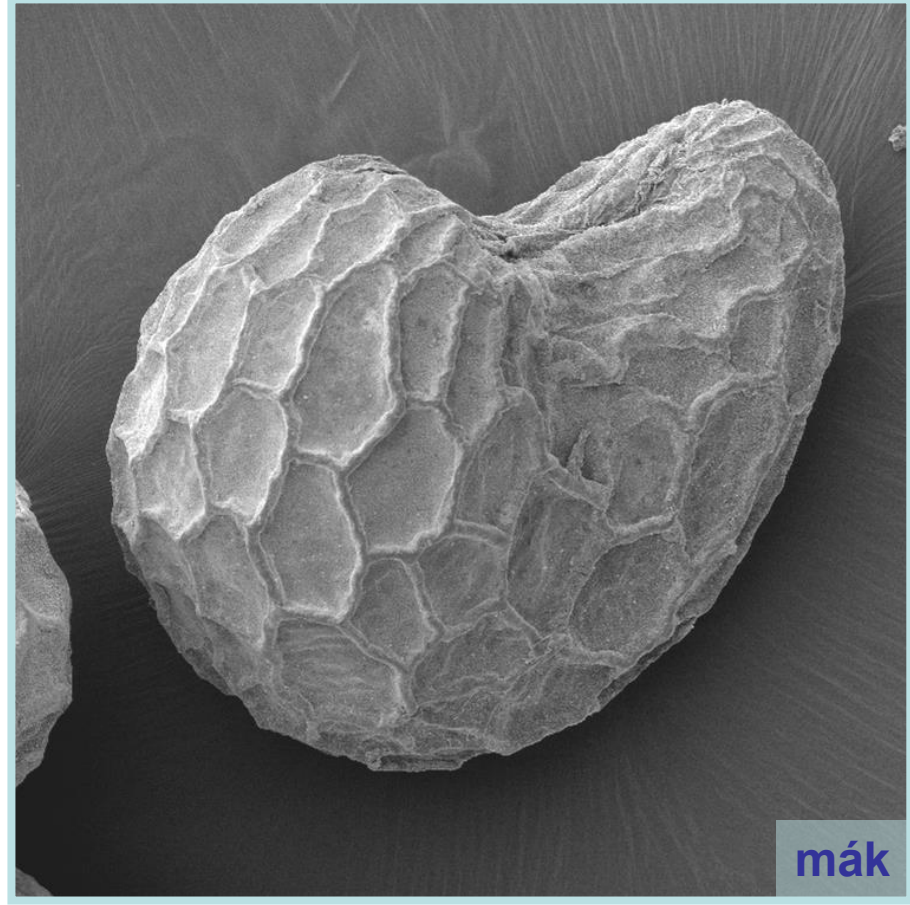
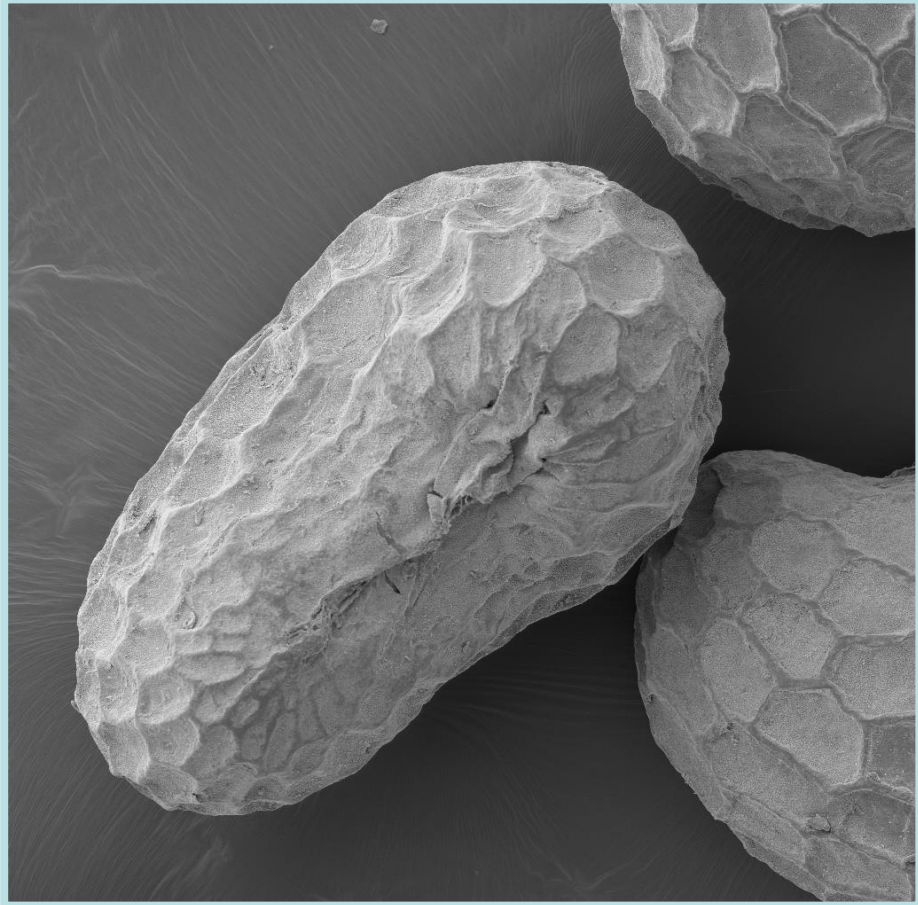


komár



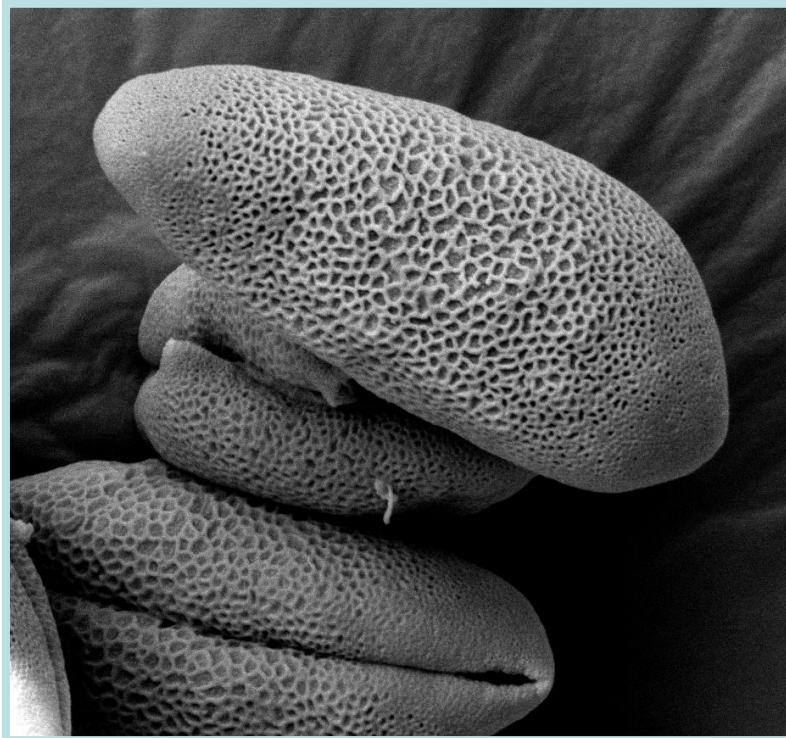
Musca domestica
(moucha domácí)





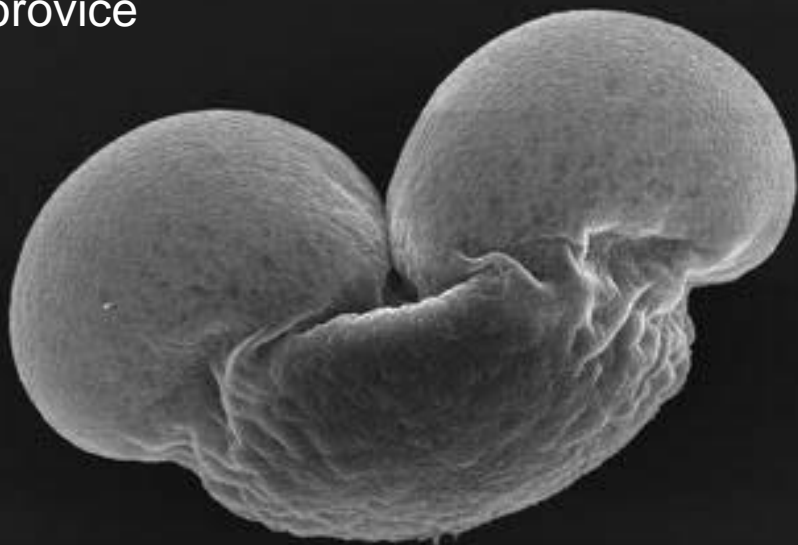
mák

PYLOVÁ ZRNA

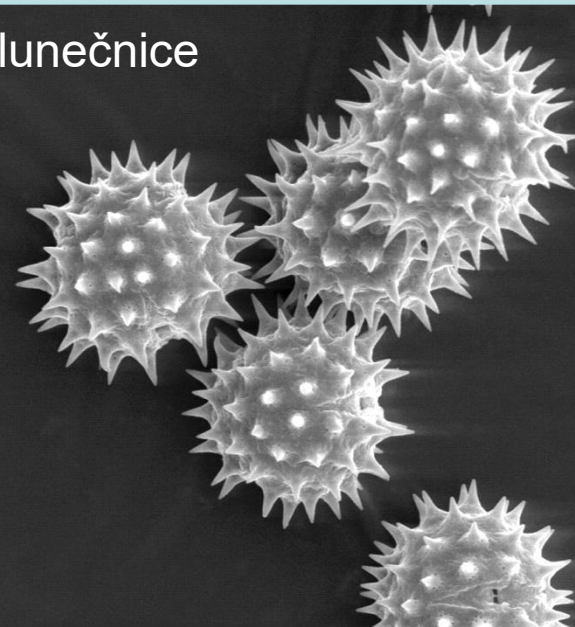


hvězdník – „Amaryllis“

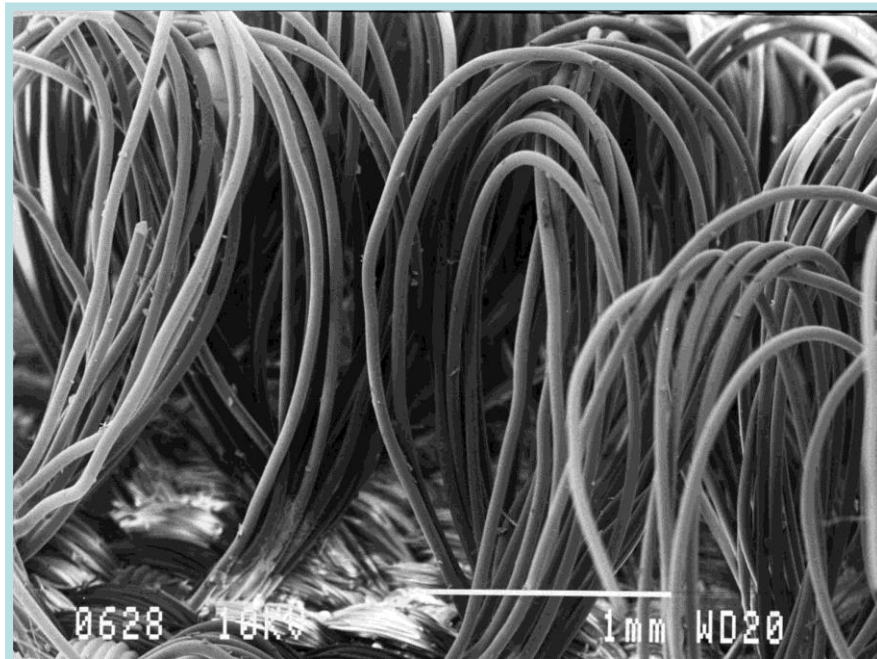
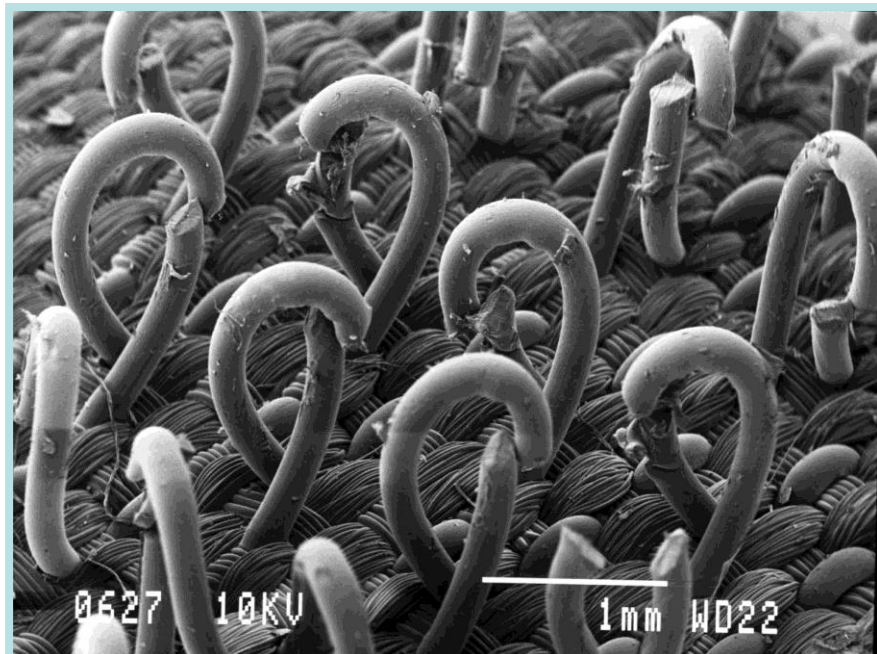
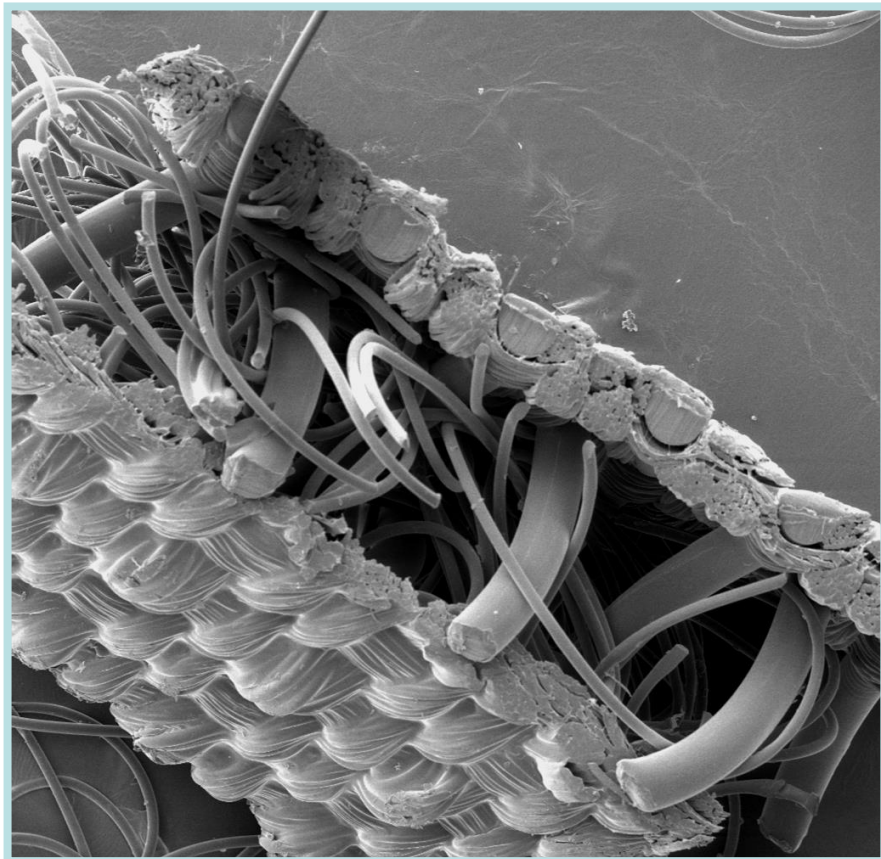
borovice



slunečnice



suchý zip



FYZIKÁLNÍ METODY

Mikrovlny – pro urychlení chemické fixace atd.

Kryofixace – rychlá příprava, zachování povrchové struktury, popř. studium vnitřní struktury (mraz. lámání)

- co nejrychleji, aby nevznikaly krystalky ledu
- viz TEM

Mrazové sušení (Freeze - drying)

- není-li kryodržák
- zmrazený preparát do vakua, nechá se vysublimovat led, pokovení Au

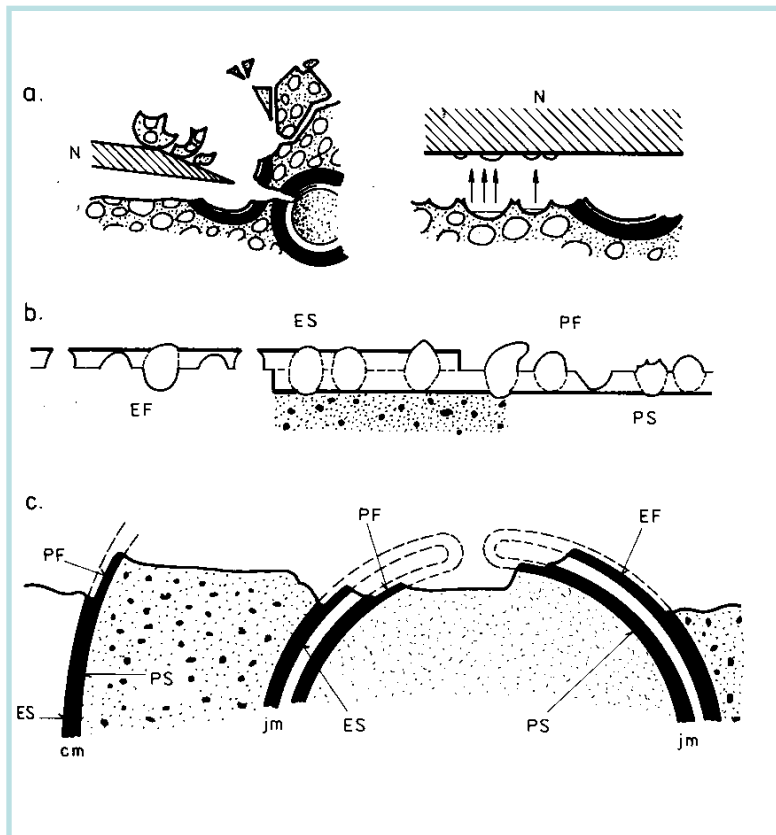
Mrazové lámání (Freeze – fracturing)

- lom ve zmrazeném biologickém materiálu cestou nejmenšího odporu, nejčastěji podél membrán
- odhalení vnitřních povrchů buněčných struktur
- vizualizace těchto struktur depozicí platiny a uhlíku ve vakuu
- sejmutí repliky
- pozorování možné v TEM i SEM
- studium funkční morfologie buněk

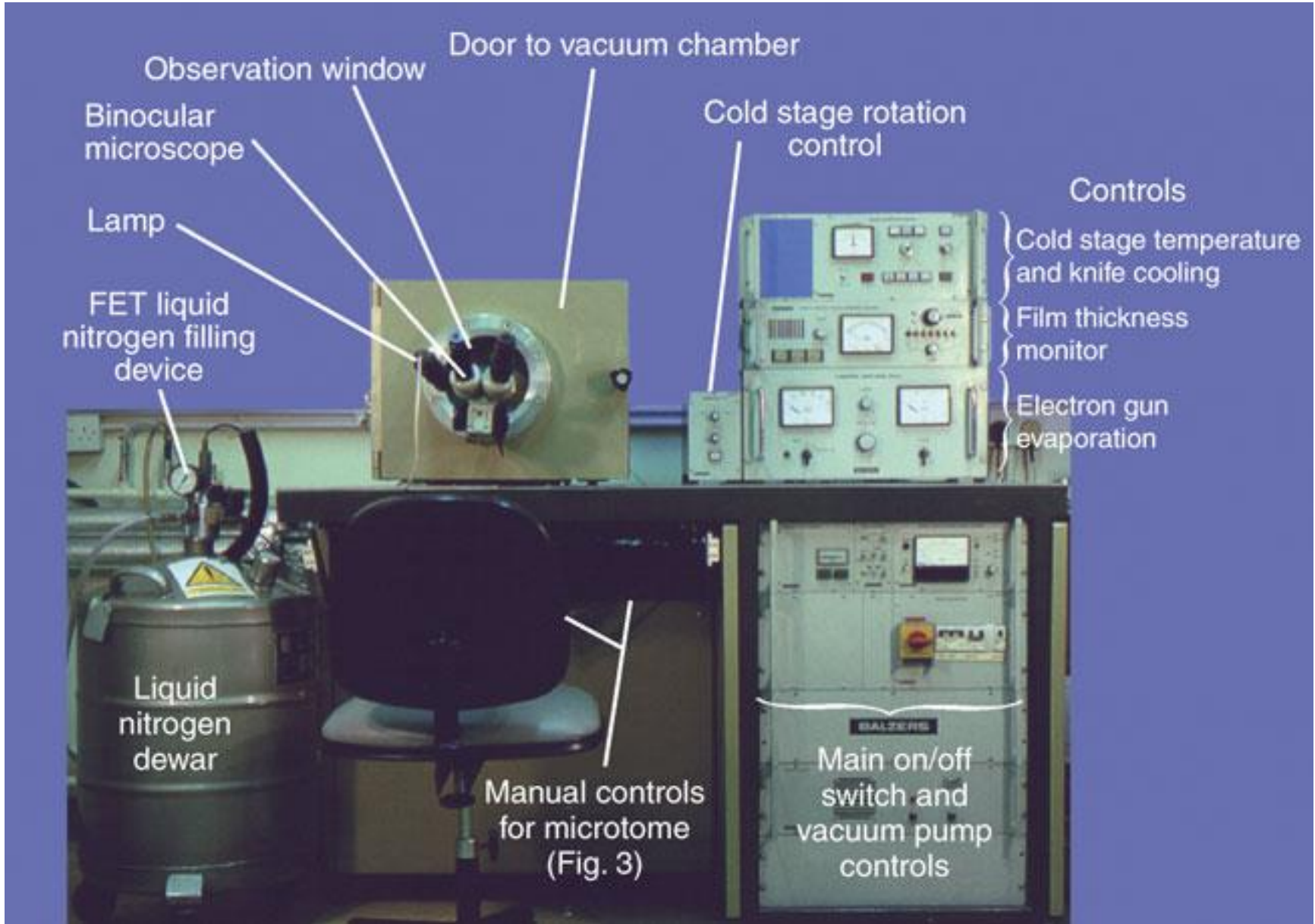
- pozn. před zmrazením možná fixace glutaraldehydem, ošetření kryoprotektantem (glycerol); popř. krok „leptání“ = etching – zahrnující sublimaci ledu ve vakuu – může proběhnout po lámání (fracturing).

• Mrazové leptání (Freeze – etching)

- studium povrchu odhaleného po odkrojení zmrazeného preparátu
- částečná sublimace ledu z obnaženého povrchu za sníženého tlaku
- nastínování (Pt, C)
- prohlížení v mikroskopu s kryodržákem



Schematické znázornění metody mrazového leptání: a) řez zmrazeným objektem a sublimace ledu z jeho povrchu, b) schéma membrány: ES - vnější exoplasmatický povrch, PS - vnitřní protoplasmatický povrch, EF - zlomová plocha na exoplasmatické části membrány, PF - zlomová plocha na protoplasmatické části, c) interpretace lomem odkrytých ploch jaderné membrány (jm) a cytoplasmatické membrány (cm)



Door to vacuum chamber

Observation window

Binocular microscope

Cold stage rotation control

Lamp

Controls

FET liquid nitrogen filling device

Cold stage temperature and knife cooling

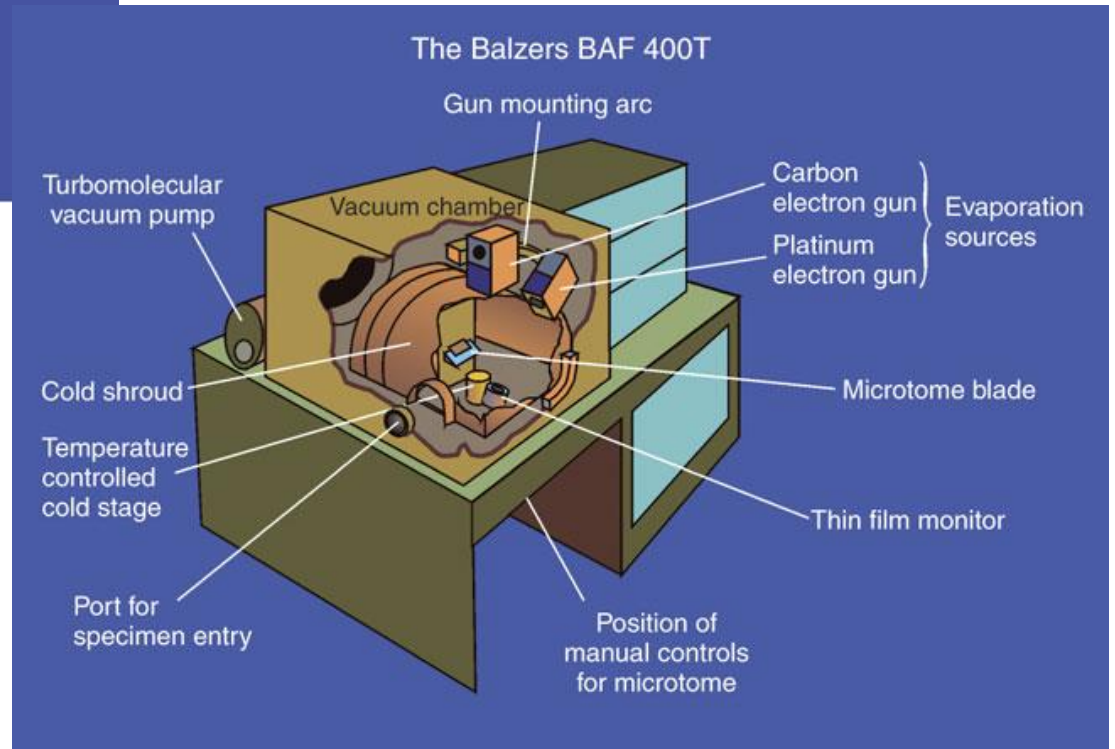
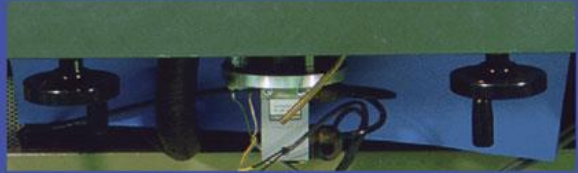
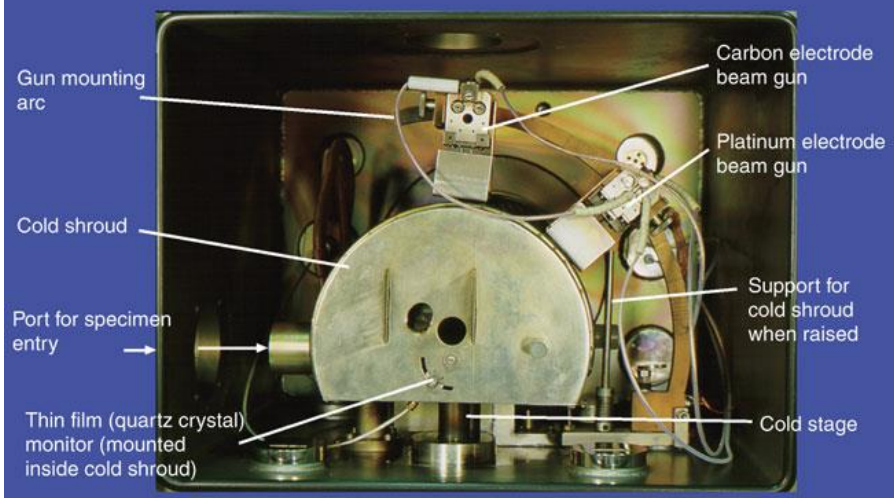
Film thickness monitor

Electron gun evaporation

Liquid nitrogen dewar

Manual controls for microtome (Fig. 3)

Main on/off switch and vacuum pump controls



Freeze Fracture Scheme

1
Preparation



2
Freezing



3
Fracturing



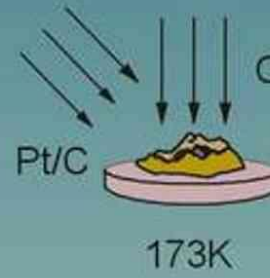
$p < 10^{-4}$ Pa

4
Etching
77K



$p < 10^{-4}$ Pa

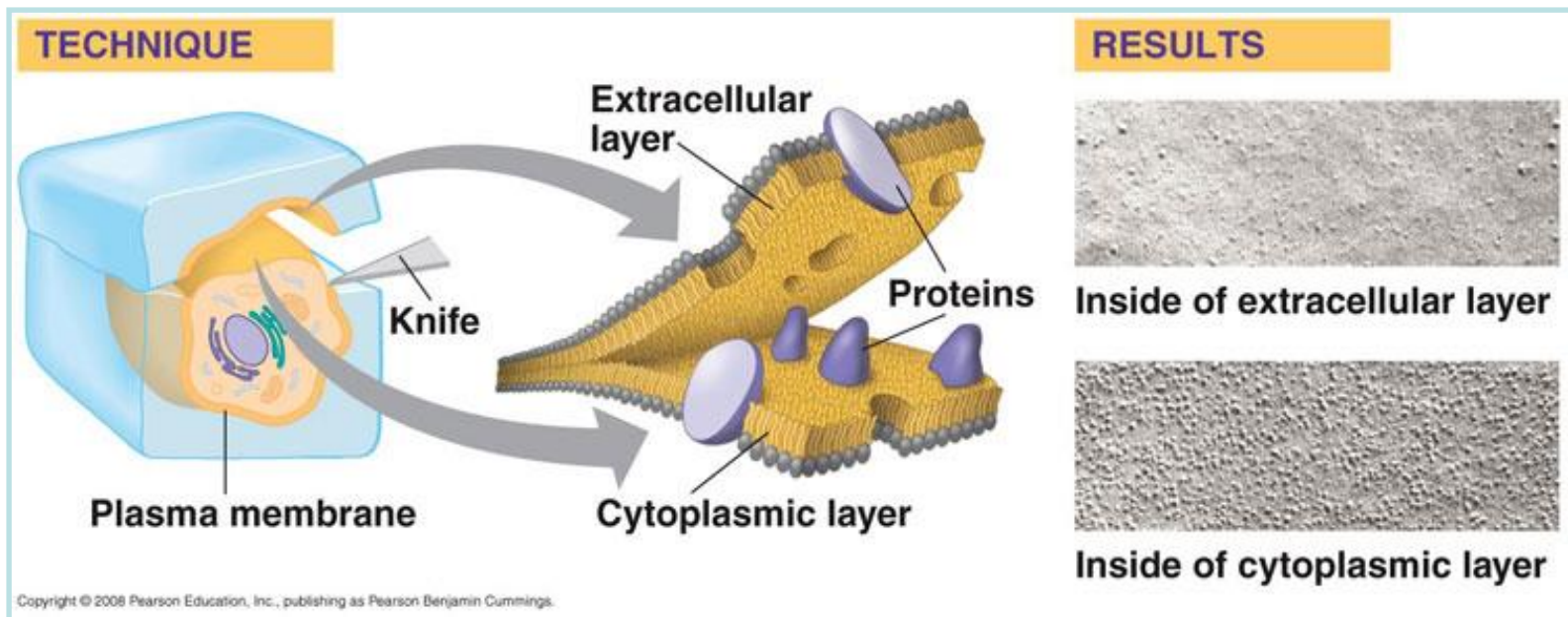
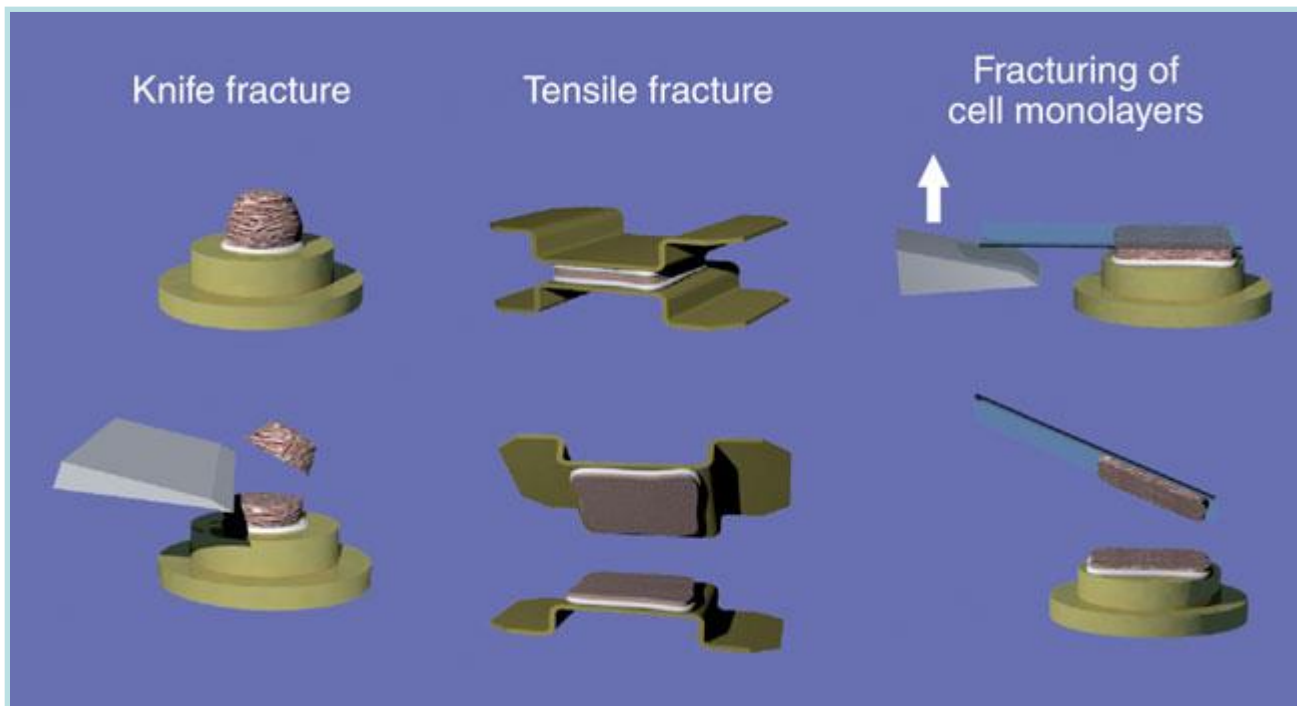
5
Evaporation

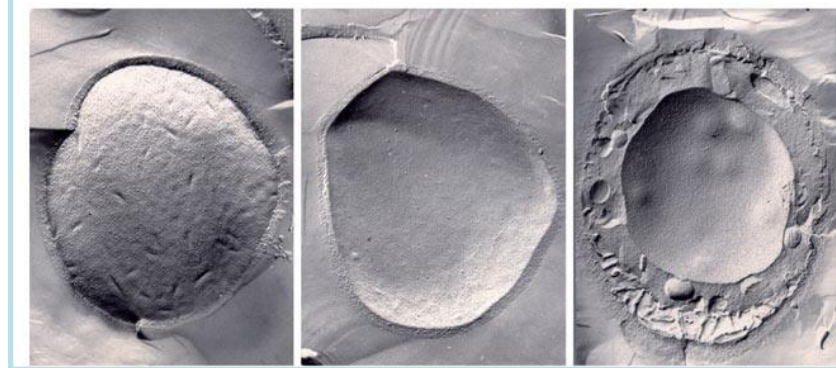
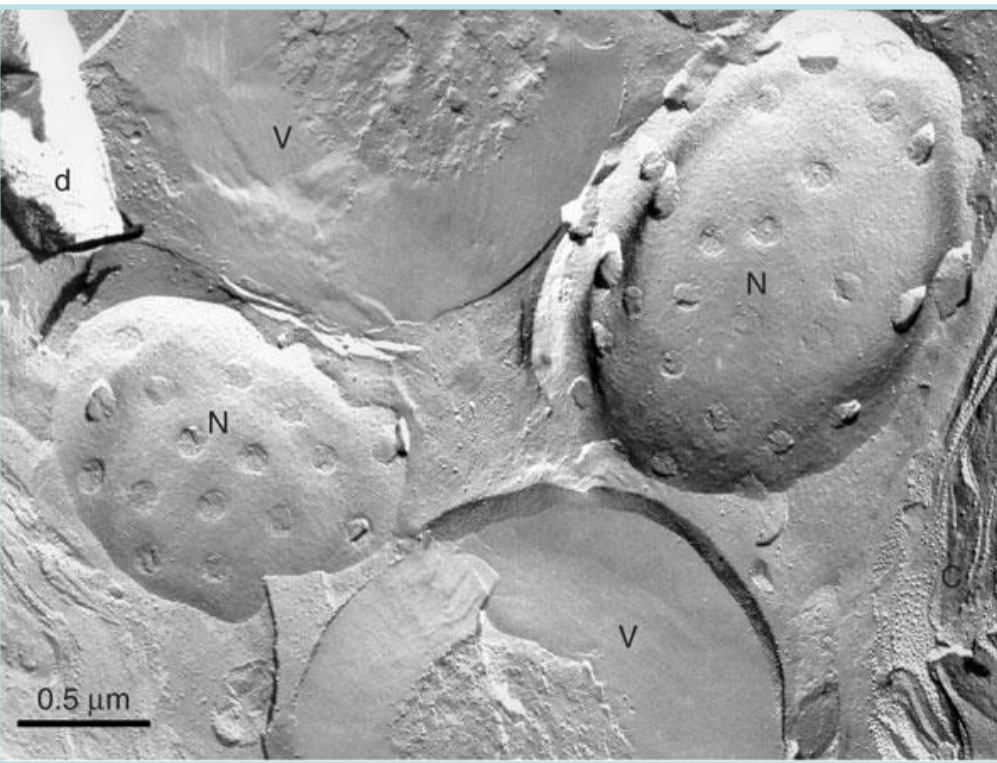
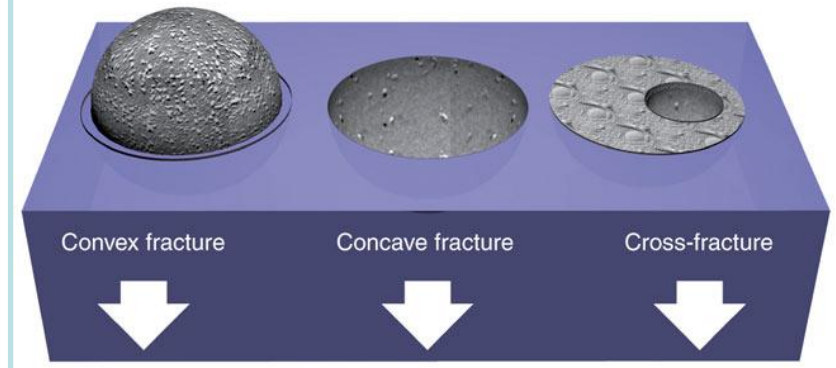
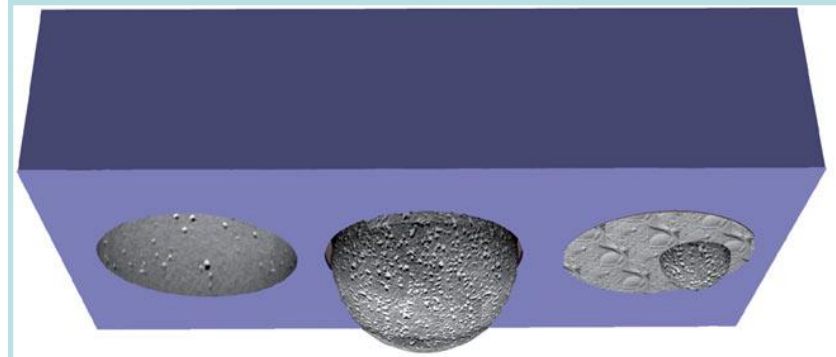
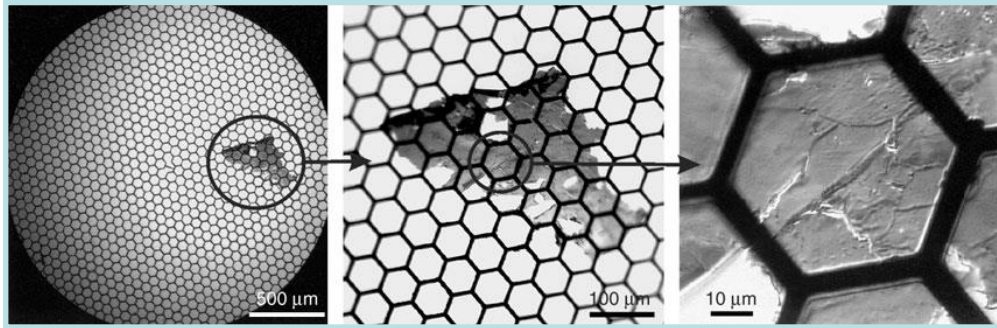


$p < 10^{-4}$ Pa

6
Cleaning



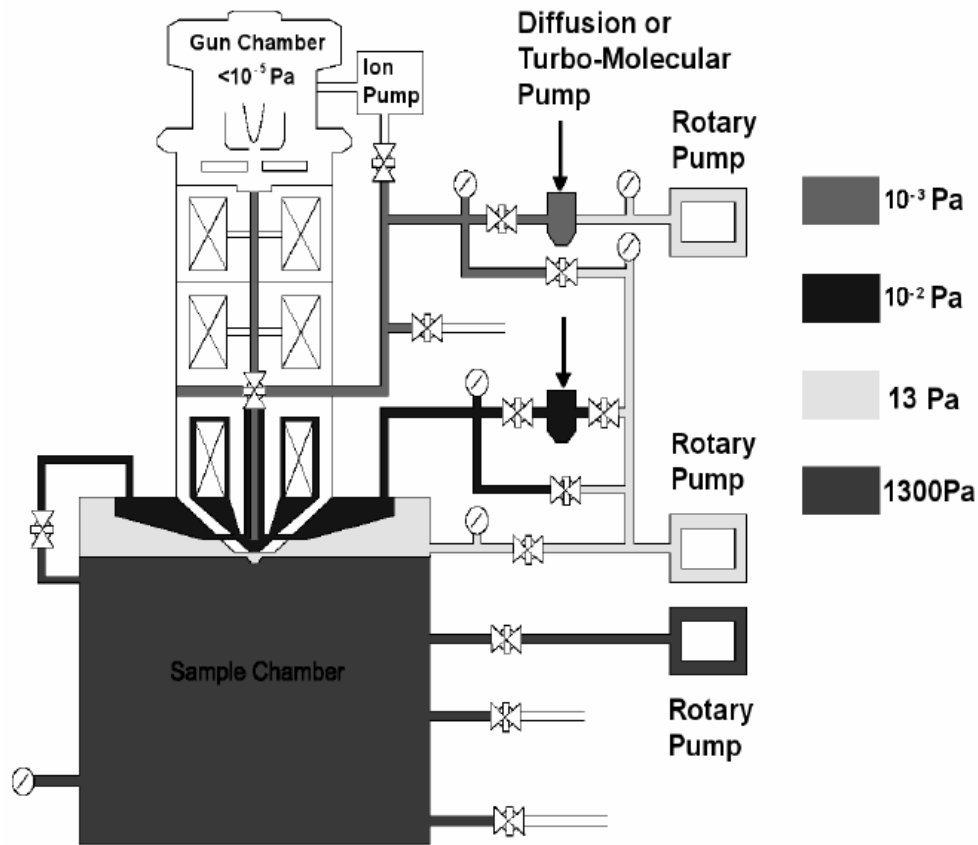




ENVIRONMENTÁLNÍ SEM

- Pozorování **nevodivých preparátů**
- Možnost pozorování **zavodněných preparátů** (bez úpravy, která může vést ke vzniku artefaktů) s obsahem vody 70-90%
- Pracovní podmínky: **nízké vakuum** (cca 3000 Pa, normální SEM 0,001 Pa)
- Vnitřní prostor těchto mikroskopů je rozdělen do několika navzájem oddělených komor, které jsou čerpány na různé hodnoty tlaku. Tlak klesá směrem od elektronového děla ke komoře preparátů.

Moderní EREM může být provozován ve třech základních operačních módech :



Vacuum diagram of ESEM (LaB₆-filament)

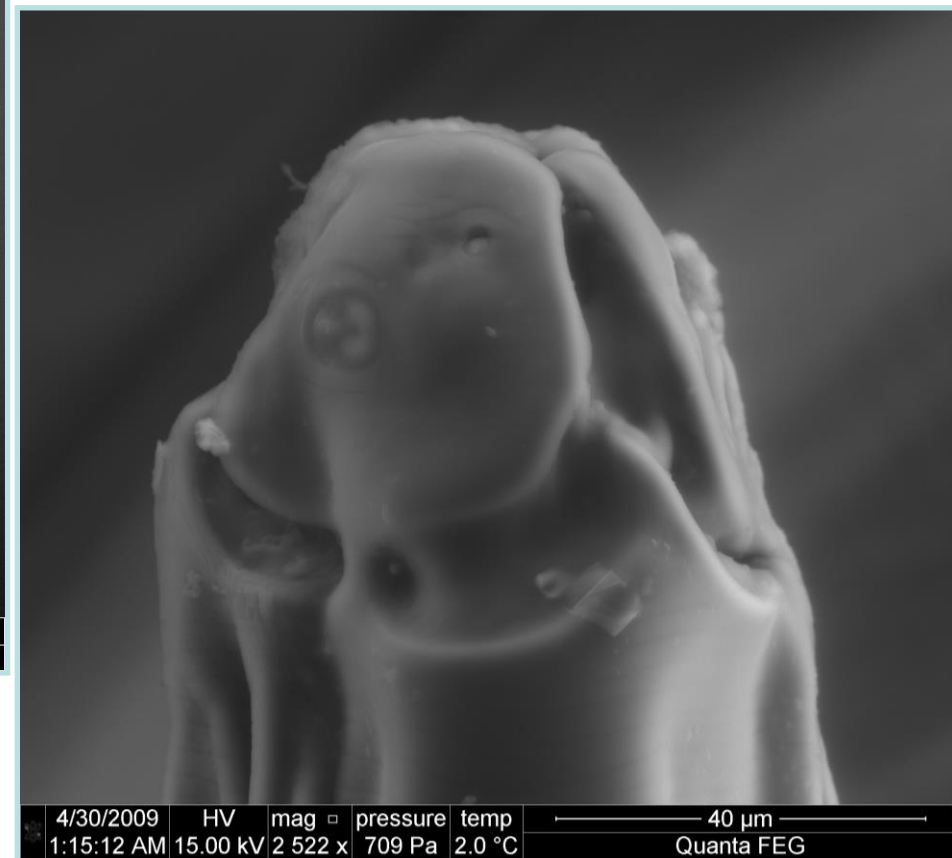
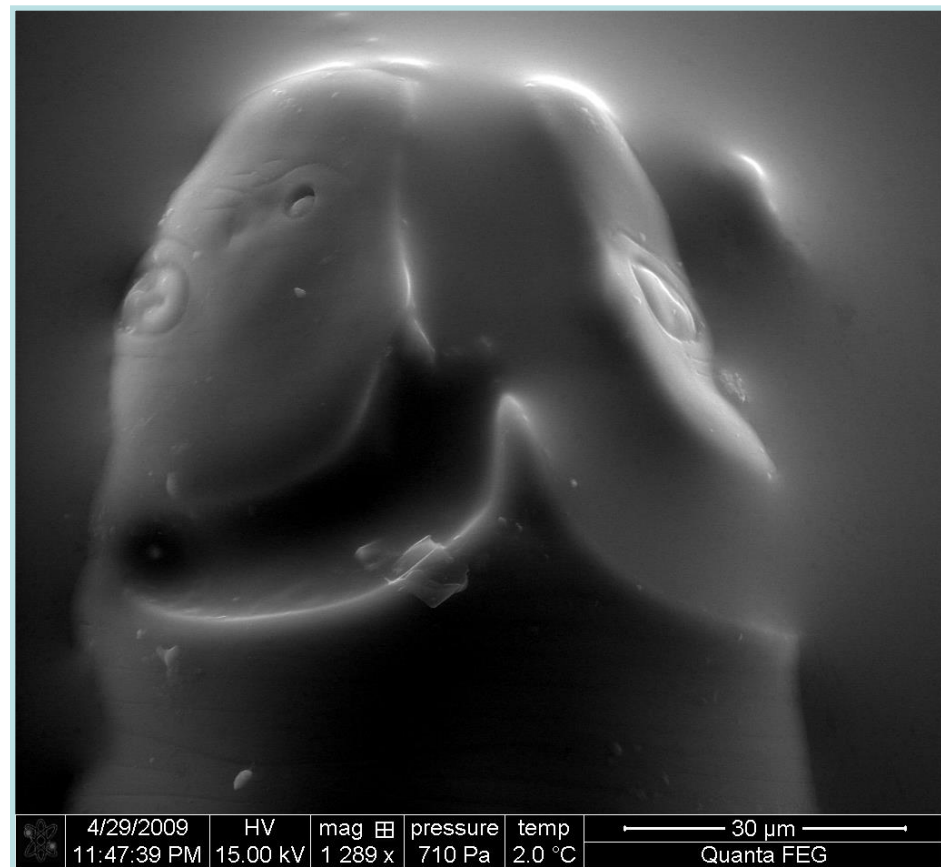
<http://www.poco.phy.cam.ac.uk/research/esem/index.html>

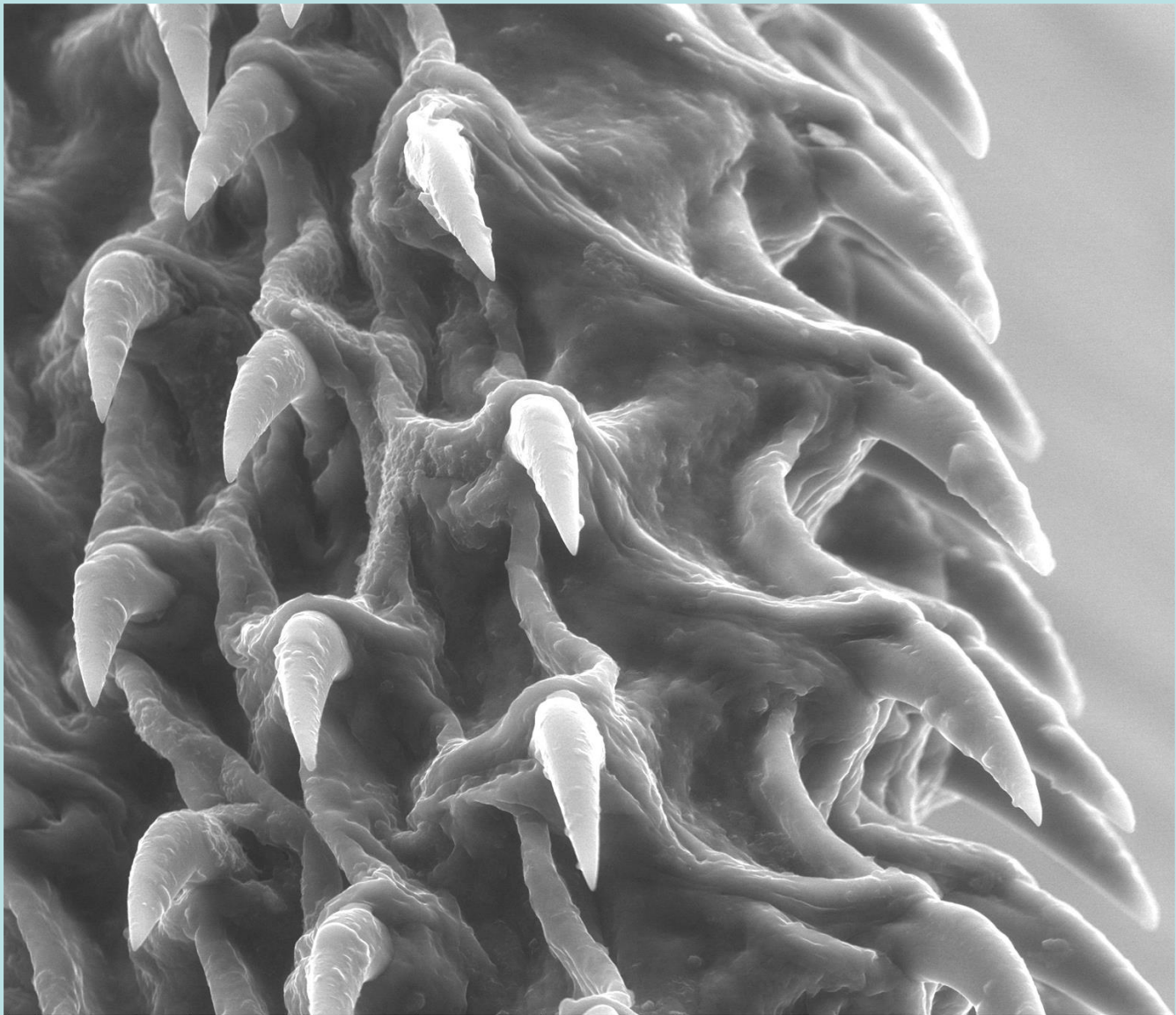
- ✓ High vacuum – vhodný pro vysušené, elektricky vodivé vzorky.
- ✓ Low vacuum – (asi do 330Pa) vhodný pro elektricky nevodivé vzorky bez nutnosti zvodivění jejich povrchu.
- ✓ ESEM – (asi do 2500Pa), vhodný pro vysoce vlhké nevodivé vzorky bez nutnosti zvodivění jejich povrchu a dynamické „in situ“ experimenty jako je např. tání, tuhnutí, kondenzace aj. (často s využitím chlazeného či vyhřívaného držáku vzorku).

- K tvorbě obrazu se využívají sekundární i odražené elektrony, které ionizují molekuly plynu v prostoru mezi vzorkem a detektorem a elektrony uvolněné při ionizaci přenáší signál dál do detektoru sekundárních elektronů.
- **Cenou za možnost prohlížet zavodněné preparáty je snížená rozlišovací schopnost.**

Zvýšený počet interakcí elektronů s molekulami a atomy plynu způsobuje rozptyl primárního elektronového svazku, průměr stopy primárního elektronového svazku se zvětší a tím se zhoršuje rozlišovací schopnost.

- Na povrchu nevznikají nabíjecí artefakty.





4/30/2009	HV	mag □	pressure	temp	50 μm
2:39:46 AM	15.00 kV	2 224 x	719 Pa	2.0 °C	Quanta FEG



**DĚKUJI
VÁM ZA
POZORNOST!**