

Roman Kubínek, Klára Šafářová, Milan Vůjtek

# Elektronová mikroskopie

*Skriptum podává přehled o základech elektronových mikroskopických technik a jejich aplikacích v oblasti biologického výzkumu.*

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY A CENTRUM VÝZKUMU NANOMATERIÁLŮ

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

## Obsah

1. Úvod	3
2. Elektron jako vlna ve vakuu	4
3. Tubus elektronového mikroskopu	5
3.1. Vakuový systém	5
3.2. Elektronová tryska – zdroj elektronů	6
3.3. Pohyb elektronů v magnetickém poli	8
3.4. Elektromagnetická čočka	8
4. Zobrazení elektronovým mikroskopem	9
4.1. Pozorování a záznam obrazu vytvořeného elektronovým mikroskopem	10
4.2. Interakce elektronů s preparátem	11
5. Základní pracovní režimy transmisního elektronového mikroskopu	11
5.1. TEM jako difraktograf	12
5.2. Vznik kontrastu v TEM	13
5.3. Elektronová holografie	13
5.4. Atomární rozlišení	14
5.5. Elektronová tomografie	14
6. Tvorba obrazu ve skenovacím elektronovém mikroskopu	15
7. Detekce rentgenového záření	20
7.1. EDS detektor rentgenového záření	21
7.2. WDS detektor rentgenového záření	22
7.3. Závislost velikosti excitačního objemu na urychlovacím napětí	23
7.4. Příprava vzorků pro elektronovou mikroanalýzu	23
8. Parametry zobrazení a úprava obrazu v SEM	23
9. Environmentální skenovací elektronová mikroskopie	26
9.1. Možnosti eSEM	26

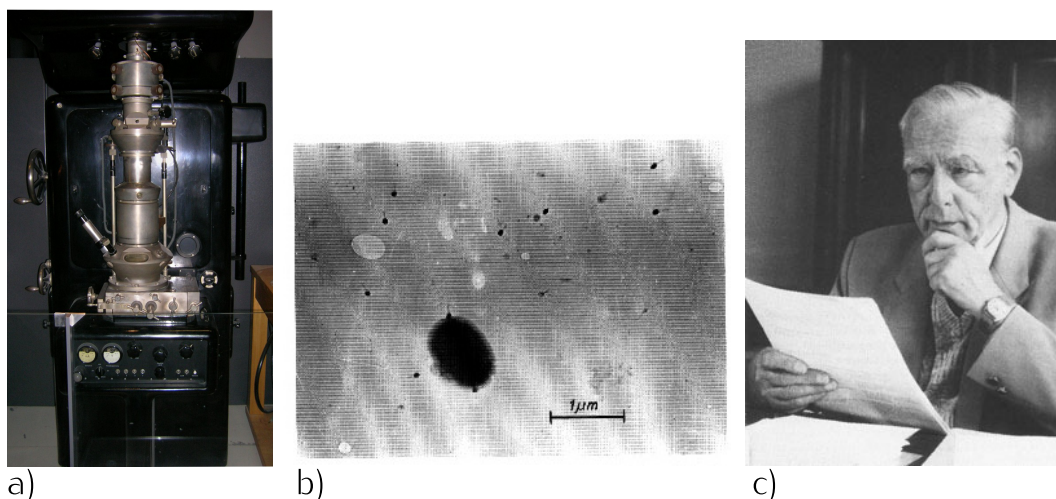


<b>10. Příprava vzorků pro TEM</b>	<b>27</b>
10.1. Ultratenké řezy	28
10.2. Fixace	29
10.3. Podmínky fixace	30
10.4. Odvodnění	31
10.5. Zalévání	32
10.6. Ultramikrotomie	33
10.7. Nože	33
10.8. Kvalita řezu	34
10.9. Kontrastování	35
10.10. Značení koloidním zlatem (imunohistochemické metody)	35
10.11. Repliky	35
10.12. Stínování těžkými kovy	36
10.13. Metody mrazového sušení, lomu a odpařování	36
10.14. Chladicí média	37
10.15. Zpracování zmraženého preparátu	38
<b>11. Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii</b>	<b>39</b>
11.1. Zvláštnosti pozorování biologických preparátů v SEM	39
11.2. Chemické metody	40
11.3. Mrazové metody	42
<b>12. Příklady aplikací TEM a SEM</b>	<b>43</b>
12.1. Využití TEM při charakterizaci magnetosomů	43
12.2. Studium sluchových kůstek z archeologických nálezů	44
12.3. Včelí pyl jako monitor znečištění životního prostředí	45
12.4. Studium cévního zásobení jater krysy	45
12.5. Studium kavitačního opotřebení materiálu	46
12.6. Studium chloroplastů	46
12.7. Využití SEM při studiu dendritické krystalizace	47
<b>13. Literatura</b>	<b>49</b>

## 1. Úvod

Světelné mikroskopy využívají ke zobrazení elektromagnetické vlnění ve viditelné oblasti, případně jí blízké. Rozlišovací mez je omezena *difrakčním limitem*, který tvoří přibližně polovina vlnové délky použitého světla. Elektronové mikroskopy, jak už název napovídá, využívají ke zobrazení elektronů. Elektron popsal J. J. THOMPSON v roce 1897, ale cesta do mikrosvěta i nanosvěta se otevřela až klíčovým objevem, se kterým přišel LUIS DE BROGLIE. Ten v roce 1925 navrhl, že rychle letící částice mají nejen korpuskulární, ale i *vlnový* charakter jako světlo, dosud využívané pro zobrazení ve světelném mikroskopu. Objev to byl tak významný, že Lui de Broglie za něj získal v roce 1929 Nobelovu cenu za fyziku. Vlnová povaha elektronů byla vzápětí potvrzena elektronovou difrakcí. Analogií k fokusaci světla skleněnými čočkami, které by jinak byly pro rychle letící elektrony nepřekonatelnou bariérou, se staly dlouhé elektromagnetické cívky (solenoidy), které ovlivňují dráhu letícího elektronu magnetickým polem, které vytváří proud tekoucí v jejich vinutích.

První konstrukci *transmisního* elektronového mikroskopu (obr. 1a) představil tým na Vysoké škole technické v Berlíně, vedený MAXEM KNOLLEM a ERNSTEM RUSKOU v roce 1932 a prezentovali i první elektronmikroskopický snímek bakterie (obr. 1b). Ernst Ruska (obr. 1c) se dočkal „poloviny“ Nobelovy ceny až v roce 1986 za zásadní objev v oblasti elektronové optiky a konstrukci elektronového mikroskopu. Druhou půlku získali GERD BINNIG a HEINRICH RÖHRER za objev skenovacího tunelového mikroskopu z roku 1981.



Obrázek 1: a) První transmisní elektronový mikroskop, b) první snímek bakterie pořízený v TEM a c) Ernst Ruska.

První komerční *skenovací* (rastrovací) elektronový mikroskop představila firma Cambridge Scientific Instruments v roce 1965 na základě práce výzkumného týmu, vedeného C. W. OATLEYEM. Teoreticky i prakticky byl však princip představen již v roce 1938 německým fyzikem MAXEM VON ARDENNEM.

Výrobou a vývojem elektronových mikroskopů nejrůznější konstrukce se v současnosti zabývají firmy JEOL, FEI, LEO, Hitachi, Tescan. Československo dokázalo držet krok se světem v oblasti vývoje a výroby elektronových mikroskopů. V *Ústavu přístrojové techniky* v Brně se konstrukcí elektronových mikroskopů zabývala od šedesátých let skupina vedená V. DRAHOŠEM a A. DELONGEM. Brno si tuto tradici drží dále, i když pod hlavičkou nově vzniklých firem (DeLong Instruments, Tescan).

Prvními preparáty, které byly v transmisním elektronovém mikroskopu pozorovány, byly biologické materiály. Jednalo se o krevní buňky, rostlinné tkáně, ale také chitinové schránky hmyzu nebo rozsivky. Pozorování těchto preparátů bylo limitováno prostupností urychlených elektronů. Proto preparáty musí být dostatečně tenké a zbavené veškeré volné vody. U prvních preparátů byl pozorován především obrys, nikoli vnitřní struktura. Vedle fixace a odvodnění bylo třeba najít rovněž způsob, jak vytvořit kvalitní ultratenký řez. K tomu bylo třeba rozpracovat zkušenosti z mikrotomie preparátů ve světelné mikroskopii, které vedly k dnešním ultramikrotomům a diamantovým nožům.

Pozdější uvedení skenovacího elektronového mikroskopu přineslo trojrozměrný pohled do mikrosvěta. Přestože preparáty pro SEM nevyžadují ultratenké řezy, příprava biologických preparátů je rovněž časově náročná.

## 2. Elektron jako vlna ve vakuu

Pohybující se elektron o energii  $E$  a hybnosti  $p = mv$  má podle de Broglieho teorie vlnovou povahu. Chová se tedy jako vlna o frekvenci  $f = \frac{E}{h}$  a vlnové délce  $\lambda = \frac{h}{mv}$ , kde  $h$  je Planckova konstanta.

Rychlost elektronů v EM se blíží rychlosti světla a je třeba při jejím výpočtu zahrnout relativistické vztahy. Pro kinetickou energii elektronu urychleného ve vakuu elektrickým polem, daným urychlovacím napětím  $U$ , platí  $E_k = mc^2 - m_0c^2 = eU$ , kde  $m_0$  je klidová hmotnost a  $c$  je rychlost světla ve vakuu. Relativistická hmotnost je  $m = \frac{eU}{c^2} + m_0$  a rychlost

$$v = c \frac{\sqrt{\frac{eU}{m_0c^2} \left( 2 + \frac{eU}{m_0c^2} \right)}}{\frac{eU}{m_0c^2} + 1}.$$

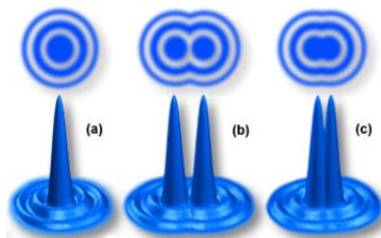
Pro vlnovou délku elektronu, po dosazení do de Broglieho vztahu, dostaneme

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0eU \left( 1 + \frac{eU}{m_0c^2} \right)}} \approx \frac{h}{\sqrt{2m_0eU}}.$$

V praxi pro výpočet  $\lambda$  při známé hodnotě urychlovacího napětí  $U$  [V], po dosazení známých konstant, použijeme vztah  $\lambda = \frac{1,226}{\sqrt{U}}$  [nm].

Dosadíme-li do vztahu běžnou hodnotu urychlovacího napětí pro skenovací elektronovou mikroskopii  $U = 10$  kV, dostaneme vlnovou délku  $\lambda = 0,01226$  nm. Pro hodnotu  $U = 100$  kV, běžnou pro transmisní elektronové mikroskopy, potom  $\lambda = 0,0037$  nm. Srovnáme-li tyto hodnoty ( $\lambda \sim 0,01$  nm) s vlnovou délkou viditelného světla (cca 500 nm), lze očekávat, že elektronový svazek přinese mnohem podrobnější informace o struktuře vzorku.

U světelné mikroskopie nelze dosáhnout lepší hodnoty rozlišení, než je polovina vlnové délky použitého světla z důvodu jeho difrakce na kruhových otvorech (apertuře objektivu). ERNEST ABBÉ vyšel z Airyho disků, které pozorujeme při zobrazení bodového zdroje světla. V případě dvou bodových zdrojů světla, které navzájem přibližujeme, jsme schopni je rozeznat jako oddělené právě tehdy, když ohybové maximum jednoho obrazu bodu se kryje s prvním ohybovým minimem druhého obrazu, což odpovídá přibližně 20% poklesu intenzity světla mezi maximy (obr. 2). Vzdálenost mezi středy maxim obrazů světelných bodů v tomto případě odpovídá rozlišovací mezi světelného mikroskopu.



Obrázek 2: Airyho disky a podmínka rozlišení dvou bodů v obraze.

Tuto hodnotu určíme podle vztahu, který odvodil Abbé

$$d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha}.$$

Použijeme-li tento vztah pro stanovení rozlišovací meze elektronového mikroskopu, dostaneme, po dosazení za vypočtenou vlnovou délku elektronového svazku, rozlišení teoreticky o 5 řádů lepší než v případě optického mikroskopu. Ve skutečnosti v důsledku vad zobrazení je lepší jen o 2 až 3 řády oproti světelné mikroskopii. I to však stačí na zobrazení jednotlivých atomů a k rutinnímu pozorování organel buněk v transmisním elektronovém mikroskopu. Běžné laboratorní transmisní elektronové mikroskopy mají v současné době rozlišovací schopnost v řádu desetin nm, která postačuje k pozorování např. bílkovinných makromolekul.

Z matematických vztahů vyplývá, že volbou vyšších urychlovacích napětí dosáhneme i kratší vlnové délky a tím i menší hodnoty rozlišovací meze. Tento způsob vedl dříve ke konstrukci mikroskopů enormě velkých, pro něž musely být stavěny speciální budovy (délka tubusu byla přes dvě patra budovy) – viz

obr. 3a). V dnešní době přichází vědci se stále dokonaleji korigovanými vadami elektromagnetických čoček (tzv. Cs korekce), které potom umožní dosáhnout lepších rozlišení při zachování běžné velikosti elektronového mikroskopu (obr. 3b).



Obrázek 3: Dřívější a dnešní konstrukce TEM s vysokým rozlišením.

### 3. Tubus elektronového mikroskopu

**Tubus** elektronového mikroskopu, podobně jako u světelného mikroskopu, obsahuje zobrazovací systém s čočkami, které vytváří zvětšený obraz detailů pozorovaných preparátů a s clonami, které mají funkci omezení zorného pole nebo apertury objektivu. Přesto oproti světelnému mikroskopu musíme mít na paměti, že zobrazujeme prostřednictvím elektronů, které musíme nějak vytvořit a elektronoptickým systémem přenést.

#### 3.1. Vakuový systém

Vnitřní prostor mikroskopu, ve kterém se pohybují elektrony, musí být vakuovaný. Základní důvody tohoto požadavku jsou tyto:

1. Elektronová tryska musí být izolována vakuem, protože vzduch není dostatečně dobrým izolantem. Vzniká nebezpečí ionizace vzduchu a následného elektrického výboje mezi katodou a anodou trysky.
2. Vzduch obsahuje molekuly  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$  a uhlovodíky, které způsobují kontaminaci tubusu i pozorovaného předmětu (vzorku).

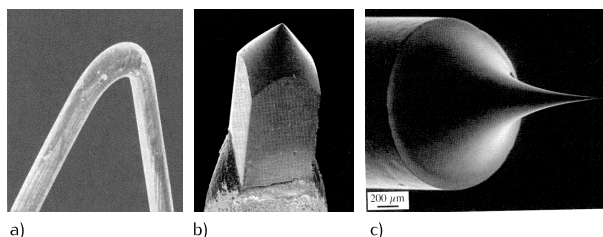
Důvodem vyčerpání prostoru tubusu je snaha zabránit náhodným srážkám urychlených primárních elektronů s molekulami vzduchu, které by vedly ke změnám jejich energie a směru pohybu. Na dosažení pracovního vakua (minimálně  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  Pa) musí být mikroskop vybaven dostatečně výkonnými vývěvami mnoha různých typů. Používají se především rotační, difúzní, iontové a turbomolekulární vývěvy. Kvalitu vakua kontrolují měrky vakua a celý proces čerpání vzduchu je řízen automaticky. Rotační olejová vývěva se používá pro předčerpání zavzdušněného vnitřku mikroskopu, případně pro odvzdušnění komůrky při výměně preparátů. Tato vývěva je schopna snížit tlak zhruba na  $10^{-1}$  Pa. Po dosažení tohoto stupně vakua se zapíná difúzní vývěva, která odpařováním a zpětnou kondenzací speciálního oleje s nízkou tenzí par snižuje tlak na  $10^{-3}$  Pa. Prostor elektronové trysky vyžaduje nejvyšší stupeň vakua až  $10^{-7}$  Pa (přibližně stejný tlak je v kosmickém prostoru) a je ho dosahováno iontovými vývěvami. Nutné je zmínit ještě turbomolekulární vývěvu a kryogenní pumpu. I přes vysoký stupeň vakua dochází ke kontaminaci vnitřku tubusu zbytky vodních par a molekulami uhlovodíků, které se tam mohou dostat z odparů oleje vývěv nebo těsnících tuků. To vše ovlivňuje kvalitu obrazu. Proto se používá speciální antikontaminační komůrka, která je chlazená kapalným dusíkem z Dewarovy nádoby umístěné vně tubusu. Tím se snižuje tenze vodních a uhlovodíkových par, které potom kondenzují na komůrce.

### 3.2. Elektronová tryska – zdroj elektronů

Každý elektron je v atomu vázán jistou výstupní energií  $E_v$ . Abychom tento elektron z vazby uvolnili, musíme mu dodat energii, která je větší než  $E_v$ . To lze zajistit mnoha různými způsoby. V elektronové mikroskopii našly své uplatnění především tyto:

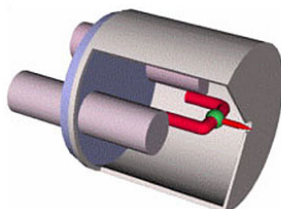
1. *sekundární emise* – studené kovové vlákno (katodu) bombardujeme urychlenými ionty, které nárázem uvolňují elektrony z povrchu katody. Tento postup se aplikoval u prvních typů TEM, ale dnes se již prakticky nevyužívá.
2. *termoemise* – zahříváme-li katodu, zvyšujeme její vnitřní energii. Překročí-li teplota katody jistou mezní teplotu, dochází k uvolňování elektronů z jejího povrchu. Tento postup je nejužívanější.
3. *autoemise* – proti studenému kovovému vláknku, odleptanému do tvaru hrotu, umístíme elektrodu s vysokým kladným napětím. V okolí hrotu vzniká silné elektrické pole, které je schopno vytrhávat velké množství elektronů z povrchu hrotu. Nevýhodou tohoto postupu je potřeba velmi vysokého vakua ( $10^{-6}$  až  $10^{-7}$  Pa).

Zdroj elektronů v elektronovém mikroskopu nazýváme **elektronová tryska** (popř. elektronové dělo). Účinnost emise elektronů emitovaných z katody (některým z uvedených způsobů) můžeme ještě zvýšit vytvarováním katody do tvaru písmene V, což usnadní uvolnění elektronů v místě ohybu (obr. 4a). Katoda bývá vyrobena z wolframu, protože ten má nízkou výstupní energii valenčních elektronů ( $E_v = 4,5$  eV) a vysoký bod tání ( $T_t = 3653$  K) a protože pro svůj provoz nevyžaduje vysokou hodnotu vakua. Životnost vláknka katody je nepřímo úměrná teplotě, na kterou bývá vlákno obvykle žhveno. Vlákno wolframové katody má provozní teplotu přibližně 2800 K. Jeho životnost je pak asi 40 hodin. V dnešní době je již běžná katoda z  $\text{LaB}_6$  (hexaborid lanthanu – obr. 4b). Tento typ katody má asi 10× větší emisi elektronů než wolframová katoda, vyžaduje ovšem mnohem vyšší hodnotu vakua (minimálně  $10^{-4}$  Pa). Tato katoda má provozní teplotu cca 1800 K a vydrží asi rok běžného pracovního provozu mikroskopu. V nejvýkonnějších elektronových mikroskopech bývá zdrojem elektronů autoemisní katoda (Field Emission Gun – FEG, obr. 4c), která vydrží až několik let.



Obrázek 4: Katody elektronových mikroskopů: a) wolframová, b)  $\text{LaB}_6$ , c) autoemisní.

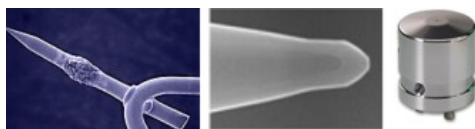
Na zdroje elektronů jsou kladeny požadavky, jako je malá velikost zdroje, nízké rozpětí emisní energie elektronů, vysoká intenzita elektronového paprsku v malém prostorovém úhlu, nízký šum a dlouhodobá stabilita, jednoduché ovládání a nízké náklady na provoz. Tyto podmínky splňují Schottkyho (obr. 5) a studené emisní zdroje. Ve srovnání s termoemisními zdroji vynikají malou velikostí, velkou intenzitou (100krát vyšší) a životností.



Obrázek 5: Ukázka řezu Schottkyho emisním zdrojem.

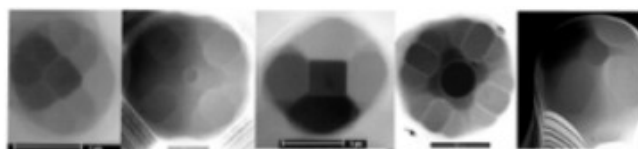
Tento zdroj elektronů je preferován z důvodu vyšší stability proudu svazku. Vyžaduje nižší elektrické pole k získání stejné emise elektronů, než ostatní emitory. Elektrické pole na emitoru je nastavitelné napětím, rozměrem, tvarem či ostroty emitoru. Pro dané elektrické napětí je elektrické pole tím silnější, čím ostřejší a menší je emitor (hrot). Šum Schottkyho zdroje je velice malý, nepřímo úměrný velikosti emisní plochy, a proto se zvyšuje se zmenšující se emisní plochou. Proto má Schottkyho emitore větší poloměr (asi 0,4–1  $\mu\text{m}$ ), než studené emisní zdroje.

**Schottkyho zdroj elektronů** je aktuálně nejpokročilejší komerčně dostupný zdroj, zpravidla používaný ve skenovací elektronové mikroskopii. Tento zdroj využívá *Schottkyho jevu*, který můžeme popsat jako zvýšení průtoku elektronů z povrchu zahřátého materiálu působením elektrického pole. Minimální energie požadovaná k tomu, aby elektron opustil povrch určitého materiálu (výstupní práce), je zajištěna zvýšenou teplotou. Současně aplikované slabé elektrické pole odnáší emitované elektrony z povrchu materiálu. Při zvyšování elektrického pole se výstupní práce stále snižuje a tím se zvyšuje emisní proud elektronů. Kvantově mechanicky můžeme mechanismus emise Schottkyho zdroje vysvětlit snížením potenciálové bariéry elektrickým polem, což usnadní únik elektronů ve vyšších energetických hladinách. Pro vysoké hodnoty intenzity elektrického pole se potenciálová bariéra stává tenší a tím zajišťuje značný příspěvek emise prostřednictvím tunelového jevu.



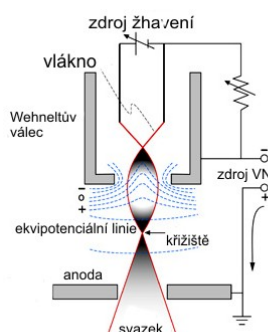
**Obrázek 6:** Schottkyho emisní zdroje, zleva: hrot a  $ZrO_x$  rezervoár redukující výstupní práci plošek, detail hrotu s ploškami a celkový pohled na Schottkyho zdroj.

Schottkyho zdroj se tedy skládá z monokrystalického wolframového drátu na jednom konci vyleptaného do tvaru hrotu, zakončeného ploškami krystalových rovin. Na druhém konci monokrystalického drátu je svár k polykrystalickému wolframovému drátu přibližně stejného průměru. Tato polykrystalická smyčka wolframu je upevněna ke dvěma pólům, které jsou vloženy do válcovitého keramického základu. Asi v polovině monokrystalického drátu je nanesený zásobník (rezervoár) ze  $ZrO_x$  (obr. 6) Ten zajišťuje ploškám v krystalografickém směru (100) mnohem nižší výstupní práci, než jiné krystalografické orientace (obr. 7). Emise ze zdroje je řízena zvýšenou teplotou (1 800 K) ve vakuu.



**Obrázek 7:** SEM obrázky špičky hrotů ukazující různé geometrie centrálních plošek emitující elektrony.

Elektronovou trysku tvoří ve všech případech katoda, která je obklopena *Wehneltovým válcem*, který má proti špičce vlákna katody otvor (obr. 8). Za válcem je umístěna anoda s otvorem uprostřed, která je uzemněna. Wehneltův válec vytváří v okolí vlákna katody elektrické pole, které způsobuje, že se svazek elektronů emitovaných z katody zužuje tak, že těsně před otvorem v anodě vytváří **křížičstě**, tj. nejužší místo svazku. Toto místo lze pak považovat za bodový zdroj urychlených elektronů. Elektrostatická optika, která promítá obraz emisního hrotu – křížičstě do otvoru v anodě, musí zajistit co nejdokonalejší kruhovitost průmětu vlákna v křížičsti, abychom mohli považovat zdroj elektronů za bodový a koherentní.



**Obrázek 8:** Schematický náčrt elektronového děla.

Dráha, rychlost a šířka svazku elektronů je poté ještě upravena systémem clonek a čoček, které společně s elektronovou tryskou vytvářejí ozařovací soustavu elektronového mikroskopu.

### 3.3. Pohyb elektronů v magnetickém poli

Na náboj elektronu  $e$ , který se pohybuje v magnetickém poli o indukci  $\vec{B}$ , působí síla  $\vec{F}$ , jejíž velikost a směr lze určit ze vztahu

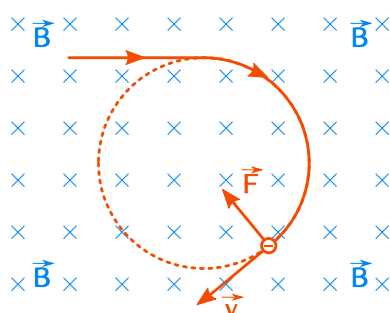
$$\vec{F} = e (\vec{v} \times \vec{B}),$$

kde  $\vec{v}$  je rychlost elektronu. Pro velikost síly  $F$  pak platí vztah  $F = evB\sin\theta$ , kde  $\theta$  je úhel, který mezi sebou svírají vektory  $\vec{v}$  a  $\vec{B}$ .

Jestliže elektron vletne do homogenního magnetického pole ve směru kolmém k vektoru magnetické indukce, pak magnetická síla, působící na elektron, zakřivuje jeho trajektorii a ten se začne pohybovat po kružnici (obr. 9). Z rovnosti odstředivé a magnetické síly můžeme vyjádřit poloměr zakřivení kruhové trajektorie pohybu elektronu. Vletne-li elektron do magnetického pole pod určitým úhlem, rozloží se vektor rychlosti pohybu elektronu na složku normálovou a tečnou. Výslednou trajektorii pak bude šroubovice, která má v průmětu tvar kružnice o poloměru

$$r = \frac{m_e v}{Be},$$

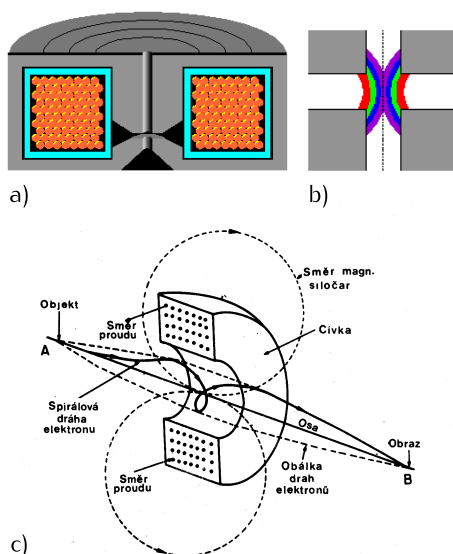
kde  $m_e$  je hmotnost elektronu.



Obrázek 9: Trajektorie elektronu v příčném homogenním magnetickém poli.

### 3.4. Elektromagnetická čočka

Ovlivnění trajektorie elektronu magnetickým polem lze využít k sestavení *elektromagnetické čočky*, která má podobnou funkci jako skleněná čočka v případě světla. Nejjednodušší elektromagnetická čočka je podobná solenoidu. **Solenoid** je cívka s velkým počtem závitů, jejichž průměr je mnohem menší než délka cívky (obr. 10a). Uvnitř solenoidu vzniká téměř homogenní magnetické pole. To, že není dokonale homogenní, je jedna z příčin vzniku **aberací**.



Obrázek 10: Schematické znázornění a) elektromagnetické čočky, b) jejího magnetického pole s vyznačením „chromatické aberace“ a c) trajektorie elektronů uvnitř čočky.



Trajektorie elektronu, který vletne do magnetického pole elektromagnetické čočky, má tvar prostorové spirály (obr. 10c). Trajektorie všech elektronů, které procházejí stejným bodem na ose čočky, jsou magnetickým polem čočky ovlivněny tak, že se za čočkou opět protínají ve stejném bodě na ose čočky. Čím větší je proud procházející čočkou, tím větší je magnetická indukce pole v dutině čočky, a tím kratší je ohnisková vzdálenost čočky. Pro vyjádření ohniskové vzdálenosti platí vztah

$$\frac{1}{f} = \frac{e}{8m_e U} \int_{z_1}^{z_2} B_{z0}^2 dz,$$

kde  $B_{z0}$  je magnetická indukce v místě  $z$  na ose čočky.

Průchodem vysokého proudu vinutím elektromagnetické čočky vzniká teplo, které zvyšuje její teplotu. Proto musí být elektromagnetické čočky chlazeny. Magnetické pole uvnitř reálné elektromagnetické čočky není přesně homogenní (obr. 10b). To vede k mnoha vadám, které jsou svou podstatou totožné s vadami optických čoček. Tyto vady negativně ovlivňují obraz vytvořený čočkou, především jeho kontrast, hloubku ostrosti a rozlišovací mez. Uvedme příčiny nejběžnějších vad zobrazení.

**Sférická (otvorová) vada** znamená, že elektromagnetická čočka nefokusuje všechny elektronové paprsky, vycházející z bodového zdroje na ose, opět do jednoho bodu na této ose. Elektrony, procházející dále od osy čočky, jsou zaostřovány do bodu, který leží blíže k čočce, než elektrony, které procházejí čočkou v těsné blízkosti elektronoptické osy. Částečně lze tuto vadu kompenzovat zmenšením průměru clony.

**Chromatická vada** je ve světelném mikroskopu způsobena disperzí světla ve skle čoček a projeví se rozkladem světla na spektrální barevné složky. V elektronovém mikroskopu chromatická vada vzniká v důsledku rozdílných energií elektronů ve svazku. Pomalejší elektrony s větší vlnovou délkou jsou v magnetickém poli cívek vychylovány jinak a potom protínají osu cívkou v jiném bodě, než elektrony s vyšší rychlostí. Chromatickou vadu můžeme eliminovat stabilizací urychlovacího napětí mikroskopu, čímž se stane elektronový svazek monochromatictější a koherentnější. Jelikož se rychlost elektronů mění průchodem přes preparát, bude docházet ke chromatické vadě v každém případě. Tloušťka preparátu musí být tedy co nejmenší.

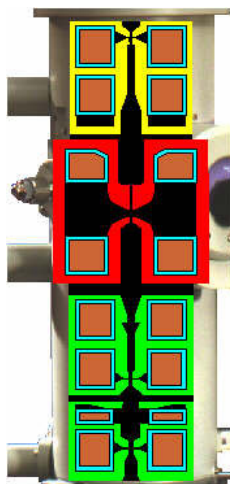
**Osový astigmatismus** je způsobený nesymetrií elektronového svazku, tedy i magnetického pole, které ho deformuje. V důsledku toho mají elektronové svazky různé ohnisko. Astigmatismus se koriguje přidáním magnetickým polem *stigmátoru* prakticky při každém zaostřování obrazu, zejména při větších zvětšeních. Zdrojem astigmatismu mohou být i nečistoty na clonách a pólových nástavcích. Proto je třeba věnovat udržování čistoty uvnitř tubusu mimořádnou pozornost a clony je třeba čas od času vyžíhat.

## 4. Zobrazení elektronovým mikroskopem

Již bylo zmíněno, že stavba transmisního elektronového mikroskopu je podobná stavbě světelného mikroskopu. Tedy i zobrazení předmětu pomocí transmisního elektronového mikroskopu bude mít jistou analogii.

Základními stavebními prvky zobrazovací soustavy TEM jsou *kondenzor* (analogie s kondenzorem v osvětlovací soustavě SM), *objektiv* a *projektív* (odpovídá okuláru SM). **Kondenzor** bývá obvykle dvou-*stupňový* a fokusuje elektronové paprsky na preparát. Promítá křižičku elektronové trysky na preparát a zajišťuje jeho homogenní a intenzivní ozáření. Důležitým parametrem je *úhlová apertura*, při níž se v rovině preparátu zobrazuje křižička. Ta se mění v závislosti na zaostření, přičemž největší je v ohnisku kondenzoru. Jak bylo uvedeno v předchozím textu, při malých úhlových aperturách se snižuje chromatická vada čoček, což však znamená, že pro snímání obrazu se rozostřuje kondenzor a snižuje intenzita svazku, neboť v oblastech nad a pod ohniskem se zmenšuje úhlová apertura. Naopak, pro vyhledávání obrazu je možné použít maximální intenzitu svazku a zaostřovat kondenzor. Maximální úhlová apertura je omezena clonami kondenzoru. V první čočce je vestavěná clona s velkým průměrem, v druhé je výměnná clona s velikostí otvoru v intervalu 100–500  $\mu\text{m}$ . Kondenzor společně s elektronovou tryskou tvoří ozařovací část transmisního elektronového mikroskopu (analogie k osvětlovací soustavě SM).

Do zobrazovací části TEM patří prostor preparátu s držákem vzorku, objektiv, projektív a luminiscenční stínítko, případně CCD kamera pro záznam obrazu (obr. 13). **Objektiv** je určen k tvorbě obrazu a má faktor zvětšení zhruba 100. Zpravidla je tvořen jednou elektromagnetickou čočkou, zatímco **projektív** tvoří až čtyři elektromagnetické čočky. Úkolem projektivu je „promítnout“ obraz na stínítko. Součástí zobrazovací soustavy TEM je i systém clonek, které omezují průměr zobrazujícího svazku elektronů. Zobrazovaný

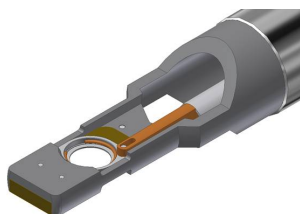


**Obrázek 11:** Tubus transmisního elektronového mikroskopu s kondenzorem, objektivem a projekтивem.

předmět je v TEM umístěn v těsné blízkosti objektivu. Objektiv tedy stejně jako ve SM vytváří základní obraz předmětu. Objektiv má také nejkratší ohniskovou vzdálenost a je rovněž „nejvýkonnější“ čočkou mikroskopu. Aby se dosáhlo požadované magnetické indukce, má cívka objektivu velký počet závitů, kterými protéká poměrně značný proud.

Obraz vytvořený objektivem je dále zobrazen čočkami, které tvoří projekтив. Proud procházející čočkami projekтиву lze regulovat, a tím i měnit výsledné zvětšení elektronového mikroskopu. Maximální užitečné zvětšení užívané v elektronovém mikroskopu je  $10^6$ .

Do držáku (obr. 12) se vkládají sítky, na kterých jsou umístěny vlastní preparáty. Držák vzorku je umístěn na *goniometrickém stolku*, který umožňuje jemné a přesné posuny ve směrech  $x$ ,  $y$ ,  $z$  a často je vyžadován i náklon vzorku, zejména při pořizování tomografického obrazu. Náklon je v tomto případě  $\pm 70^\circ$ . V dnešních mikroskopech, ovládaných elektronikou řízenou počítačem, umožňují motorky nastavit reprodukovatelnou pozici, kterou si uživatel mikroskopu uložil do paměti PC při vyhledávání zajímavých detailů.



**Obrázek 12:** Držák sítěk preparátů v TEM.

*Preparátová komůrka* bývá umístěna mezi pólovými nastavci objektivu. Do tohoto prostoru zasahují různé detektory a jsou zde i aperturní clony určující dosažitelnou rozlišovací mez.

Hloubka ostrosti obrazu je dostatečně velká, aby pokryla tloušťku ultratenkého řezu (cca 50 nm). Tím se některé detaily ve dvourozměrném obrazu rozostřují, protože se jejich obrazy vzájemně překrývají.

#### 4.1. Pozorování a záznam obrazu vytvořeného elektronovým mikroskopem

Svazek urychlených elektronů, který nese informaci o zobrazovaném předmětu, nelze přímo vidět okem, jako je to možné ve světelném mikroskopu. Abychom viděli obraz vytvořený elektronovým mikroskopem, je nutné převést tyto informace do viditelné podoby. K pozorování obrazu se používá stínítko pokryté luminoforem (nejčastěji ZnS), které bývá umístěno na dně tubusu TEM. **Luminofor** je látka, která je schopna, v závislosti na energii a množství dopadajících elektronů, emitovat světlo různé intenzity o přibližně stejné vlnové délce. V případě ZnS má vlnová délka vznikajícího světla velikost okolo 550 nm. Na stínítku potom vzniká obraz z odstínů zelené barvy, který je již možné pozorovat okem. Rozlišení stínítka je omezeno velikostí zrn ZnS, která se pohybuje okolo 50 nm. Kromě velkého stínítka je většina elektronových mikroskopů vybavena ještě malým stínítkem, na kterém je možno detail obrazu ještě zvětšit pomocí binokulárního mikroskopu. Velikost zrn ZnS na malém stínítku se pohybuje kolem 10 nm.

V praxi se pořízuje záznam obrazu pozorovaného předmětu na fotografický film nebo v současnosti se obraz zaznamenává v digitální podobě pomocí speciálních kamer. Fotografický materiál vhodný pro EM

musí být stabilní i při vysoké hodnotě vakua, které je uvnitř EM. Nejpoužívanějším typem fotografického materiálu je polyesterová podložka, na které je nanášena želatinová vrstvička s drobnými krystalky chloridu stříbrného (AgCl).

**Slow-scan CCD kamery (SSC)**, používané v TEM, pracují obdobně jako klasické CCD kamery používané ve světelné mikroskopii. Rozdílem je pouze to, že detektor SSC kamery je schopen zaznamenávat změny intenzity zobrazujícího svazku elektronů (obr. 13). V současné době se ve SSC kamerách používá nejčastěji YAG krystal (*scintilátor*), na který dopadají primární elektrony. Vzniklý obraz se přenáší na CCD senzor pomocí optických vláken. CCD senzor má přes 10 milionů obrazových bodů (pixelů), což zajišťuje vysoké rozlišení obrazu. Čipy těchto prvků bývají chlazeny Peltiérovými články, aby se zamezilo temnému proudu v detektoru. Přestože fotografický materiál umožňuje pořízení perfektního snímku, je zřejmé, že digitální kamery jsou praktičtější. Hlavním důvodem rozšíření CCD kamer je rychlost záznamu bez nutnosti vyvolávat film. Je možné je využít k efektivnímu záznamu elektronových difraktogramů. V režimu nízkých dávek elektronů, při pozorování velmi citlivých preparátů (kryořezy) či v elektronové spektroskopii, poskytují vysokou citlivost, která je předností těchto kamer.



**Obrázek 13:** Kamera pro digitální záznam elektronového obrazu, určená pro instalaci do bočního portu tubusu TEM.

## 4.2. Interakce elektronů s preparátem

V obou systémech – transmisního i skenovacího elektronového mikroskopu, je pro tvorbu obrazu zásadní interakce urychlených elektronů s preparátem. Je důležité si však uvědomit, že u TEM elektrony vzorkem prochází a u SEM na něj dopadají. V obou případech dochází v atomech preparátu k pružnému a nepružnému rozptylu elektronů. Při *pružném rozptylu* nedochází k výraznějšímu snížení energie rozptýlených elektronů oproti energii elektronů primárních (dopadajících na vzorek). Primární elektrony prolétají elektronovým obalem atomu preparátu, vychylují se tím více, čím blíže mají elektron jádro a čím vyšší je hodnota elektrického náboje jádra. Tento úhel může dosáhnout takové hodnoty, že elektron se jeví jako zpětně odražený. Část elektronů, rozptýlených s dostatečně velkým úhlem, je zachycena clonou objektivu a tím jsou vyřazeny z tvorby obrazu na stínítku TEM. V důsledku toho se mění intenzita elektronového svazku a vzniká kontrast obrazu. Kromě toho se na tvorbě obrazu projevuje ještě fázový kontrast, tvořící různé stupně šedi. Fázový rozdíl je způsoben rozdílem drah elektronů, odchýlených pod různým úhlem.

Při *nepružném rozptylu* dochází ke srážkám primárních elektronů s elektrony ve slupkách atomů preparátu. Srážkami se sníží výrazně jejich energie a změna jejich vlnové délky se podílí na zhoršení chromatické aberace. Tento nepříznivý vliv roste s tloušťkou preparátu a s klesajícím urychlovacím napětím.

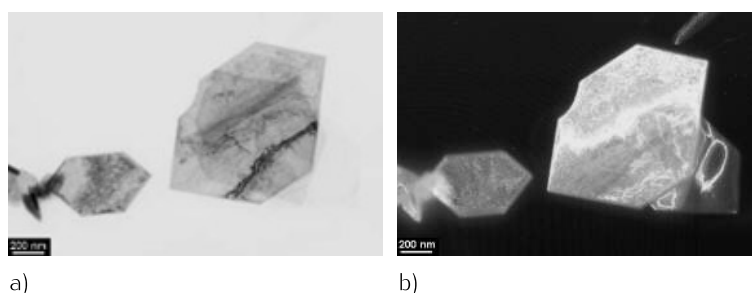
Při srážkách urychlených elektronů s elektrony v orbitalech atomů dochází k excitaci atomů a následně emisi charakteristického rentgenového záření. Tyto signály, společně s dalšími, si představíme následně při popisu interakce primárních elektronů s povrchem vzorku u skenovacího elektronového mikroskopu.

## 5. Základní pracovní režimy transmisního elektronového mikroskopu

Biologické preparáty jsou tvořeny lehkými prvky, které nezpůsobují dostatečný rozptyl primárních elektronů, procházejících preparátem. Preparáty bývají umístěny v zalévacích hmotách, které mají podobné rozptylové vlastnosti a tím nelze očekávat větší rozdíl v kontrastu mezi vzorkem a zalévacím médiem. Z toho důvodu je třeba v průběhu přípravy preparátů dostat do vzorku těžké kovy, např. Os, Pb, U, jež bývají zpravidla součástí fixačních činidel a výrazně se podílí na zvýšení kontrastu. Kontrast lze zvýšit i volbou menšího průměru clony objektivu, snížením urychlovacího napětí nebo volbou větší tloušťky řezu. Bohužel tyto úpravy snižují rozlišovací schopnost a přináší zhoršení vad zobrazení mikroskopu.

U transmisních elektronových mikroskopů, speciálně pro biologické účely, se ke zvýšení kontrastu také využívá ohybových jevů, které vznikají při průchodu elektronů preparátem. Nejlépe jsou demonstrovatelné na drobném otvoru v ultratenkém řezu. Na jeho hraně dojde po dopadu elektronového vlnění ke vzniku nové vlnoplochy, která se šíří všemi směry a interferuje s původní vlnou rovinného charakteru. Na stínítku vznikne světlá ploška, která je způsobená konstruktivní interferencí vln elektronového svazku. Naopak při destruktivní interferenci vzniká interferenční minimum a v příslušném místě vznikne tmavý prostor. K interferenci dochází při dostatečné koherenci elektronových vln. Ta však v reálné mikroskopii není dostatečná a vznikne zpravidla jen jedno maximum a minimum, označované jako *Fresnelův proužek*. Ten se potom dá využít ke korekci astigmatismu nebo k dokonalému zaostření obrazu.

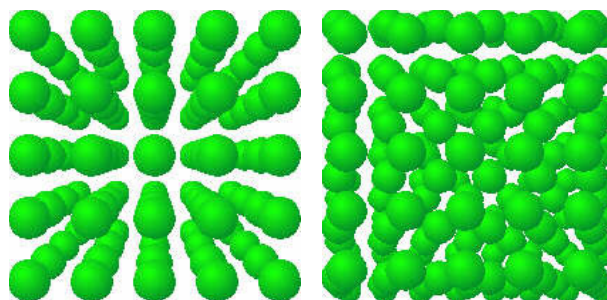
Jako analogii ke *zobrazení v tmavém poli* ve světelné mikroskopii bychom mohli vysvětlit zobrazení ve tmavém poli u transmisního elektronového mikroskopu. Princip metody spočívá v naklonění osvětlovací soustavy tak, aby ze svazku elektronů po průchodu preparátem byly využity ty, které jsou více odkláňeny. Při zobrazení ve světlém poli jsou normálně zachyceny clonou objektivu. Pokud do zobrazovací soustavy mikroskopu vniknou tyto rozptýlené elektrony, zobrazí nám světlé detaily vzorku na tmavém pozadí. Velké odchylky v rychlostech rozptýlených elektronů však přispívají ke snížení rozlišení a velké chromatické aberaci. Použití metody tmavého pole není tak časté a operátoři EM ho používají ve speciálních případech, kdy chtějí získat specifickou informaci ze vzorku (obr. 14). Porovnáním obou obrázků je vidět, že v různých režimech vynikají na krystalech jiné detaily.



Obrázek 14: Krystaly MnO zobrazené a) v režimu světlého a b) temného pole.

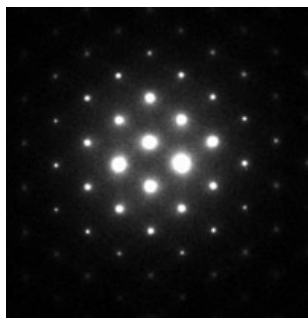
## 5.1. TEM jako difraktograf

Je-li zkoumaný materiál krystalický, dochází na vhodně orientovaných krystalových rovinách (obr. 15) k difrakci elektronů. Jestliže dopadají elektronové paprsky na vzorek rovnoběžně se zónami krystalových rovin, svazky elektronů difraktovaných na různých systémech krystalových rovin jsou objektivovou čočkou fokusovány do bodů v obrazové ohniskové rovině.



Obrázek 15: Vhodná orientace krystalické mřížky pro procházející elektrony (snímek vlevo).

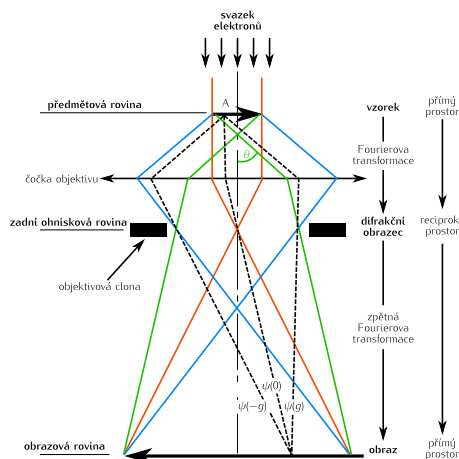
V obrazové ohniskové rovině se vytváří *Fraunhoferův difrakční obraz*, který reprezentuje Fourierovu transformaci vlny vystupující ze vzorku (obr. 16). Mohli bychom ho, stejně jako ve světelné mikroskopii, nazvat primárním obrazem, který je zdrojem vlnění, jenž v obrazové rovině vytvoří obraz předmětu prostřednictvím inverzní Fourierovy transformace. V obrazové ohniskové rovině objektivu je umístěna objektivová clona, která slouží k vytvoření žádaného typu kontrastu. Abychom mohli pozorovat difrakční obraz, je třeba zaostřit mezičočku na obrazovou rovinu objektivu. V tomto režimu vidíme difrakční obrazec i na stínítku mikroskopu a můžeme ho registrovat na film nebo digitální kamerou, umístěnou zpravidla pod stínítkem.



Obrázek 16: Difrakce elektronů na křemíku.

## 5.2. Vznik kontrastu v TEM

V klasickém zobrazení pomocí difrakčního kontrastu používáme malou objektivovou clonu, která vymezuje pouze jeden svazek elektronů – prošlý (T) či difraktovaný (D), k získání známých obrazů ve světlém, resp. tmavém poli. Použijeme-li velkou objektivovou clonu, dostáváme (pokud je dopadající svazek elektronů dostatečně koherentní) fázový interferenční kontrast. Obraz  $A'$  libovolného bodu  $A$  vzorku je výsledkem interference vln (svazků)  $\psi(-g)$ ,  $\psi(0)$ ,  $\psi(g)$  a dalších, které procházejí otvorem clony objektivu (obr. 17). Tímto způsobem je možné dosáhnout zobrazení krystalové mřížky vzorku až v atomárním rozlišení. Přenos kontrastu mikroskopem však v případě interferenčního kontrastu není lineární a je většinou nutné experimentální snímky interpretovat pomocí počítačových simulací, abychom ověřili, zda obraz odpovídá zkoumané struktuře a nejde o interferenční artefakt [6].

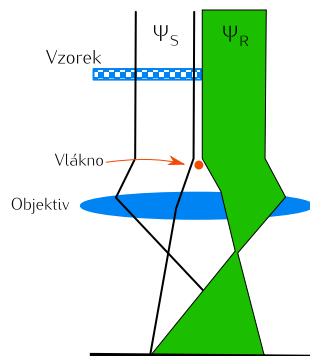


Obrázek 17: Princip zobrazení předmětu objektivem TEM.

## 5.3. Elektronová holografie

DENIS GÁBOR navrhl princip holografického zobrazení již v roce 1948, dokonce původně pro dosažení lepšího rozlišení v TEM. Nebyly však známy dostatečně koherentní zdroje elektronů a proto s objevem prvních laserů (zdrojů vysoce koherentního světelného vlnění) byla rozvíjena nejprve optická holografie. Elektronová holografie byla vyvinuta až po roce 1990, jakmile byly do elektronových mikroskopů zavedeny kvalitní autoemisní katody (FEG), poskytující koherentní elektronové svazky.

Elektronová holografie vychází z principů vlnové optiky. Obraz registrovaný ve fotografické desce nebo na čipu CCD kamery je daný intenzitou (druhou mocninou amplitudy) dopadající vlny. Fáze elektronové vlny, která je důležitou součástí, je přitom ztracena. Fázi lze počítačově rekonstruovat holografickými metodami. Jedna z nejrozšířenějších metod v elektronové holografii je použití **referenční vlny**. Do mikroskopu s autoemisní katodou je mezi objektivovou čočkou a vzorek nainstalován dělič elektronového svazku v podobě pokoveného skleněného vlákna tloušťky menší než  $0,5\ \mu\text{m}$ . Vlákno, na kterém je udržován kladný potenciál 10 až 150 V, působí jako *Fresnelův dvojhranol* (obr. 18). Vzorek natočíme tak, aby byl rovnoběžný s vláknem. Část elektronového svazku tak prochází vzorkem (obrazová vlna  $\Psi_S$ ), zatímco druhá část svazku  $\Psi_R$  působí jako vlna referenční. Informace o amplitudě a fázi je zakódována v modulaci kontrastu a zakřivení interferenčních proužků obrazové a referenční vlny [6].



Obrázek 18: Princip záznamu elektronového hologramu.

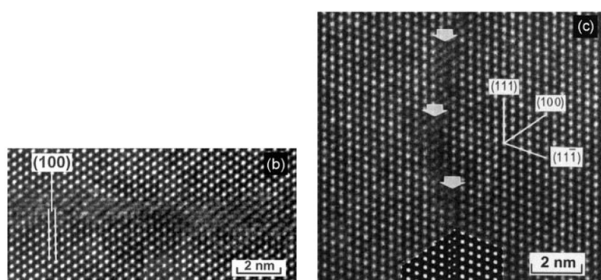
Interpretace elektronového hologramu spočívá v jeho počítačovém zpracování, které umožňuje korigovat vady přenosu kontrastu mikroskopem a získat tak obraz nedeformované elektronové vlny na výstupu ze vzorku. Počítačové simulace kontrastu potom stačí provést pouze pro interakci elektronové vlny se vzorkem, čímž se výrazně snižuje počet parametrů výpočtů.

Elektronová holografie se používá při studiu struktury krystalů v atomovém rozlišení, řada aplikací je i při nižším rozlišení, jako například při studiu profilů p-n přechodu, zobrazení elektrických či magnetických polí s laterálním rozlišením několika nanometrů apod.

#### 5.4. Atomární rozlišení

Z fyzikálního principu zobrazení pomocí elektronů vyplývá, že čím je vyšší urychlovací napětí, tím je kratší vlnová délka elektronového svazku. Tím se rovněž snižuje rozlišovací mez, která při napětích 200 kV a více přináší možnost zobrazit jednotlivé atomy. Je však třeba brát v úvahu také *Cs korigované* elektronové mikroskopy, které dosahují atomárního rozlišení při nižších urychlovacích napětích (80 kV). K tomu je nutné mít kvalitní autoemisní zdroj elektronů poskytující vysoký proud ve svazku. Při správné orientaci krystalu do osy zóny rovnoběžné se svazkem jsme schopni získat atomy v podobě světlých bodů, představujících sloupec atomů v příslušné krystalové mřížce.

Jedna z efektivních metod k dosažení atomárního rozlišení je metoda Z-kontrastu. Ta využívá nekoherentního zobrazení v důsledku difrakce pod úhly většími než  $3^\circ$ . Její výhodou je, že poskytuje přímo interpretovatelné obrazy mikrostruktury – mapy rozptylových center krystalu, ve kterých je intenzita úměrná protonovému číslu  $Z$  (odtud Z-kontrast). Nekoherentní přenos obrazu je lineární, a proto počítačové simulace nejsou potřeba. Abychom mohli metodu Z-kontrastu použít, musí být mikroskop vybaven autoemisní katodou, řádkováním elektronového svazku a prstencovým detektorem elektronů difraktovaných pod velkými úhly (High-Angle Angular Dark Field Detector – HAADF). S použitím autoemisní trysky je v současné době možné dosáhnout velikosti svazku 0,15 nm a proudu kolem 1 nA, což je dostatečné pro rozlišení atomových sloupců u kovů. Použijeme-li při naklopení krystalu hliníku do osy zóny  $\langle 110 \rangle$  velkou objektivovou clonu, získáme obraz v atomárním rozlišení. Každý světlý bod na snímku představuje atomový sloupec minoritní podmřížky hliníku (obr. 19) [6].

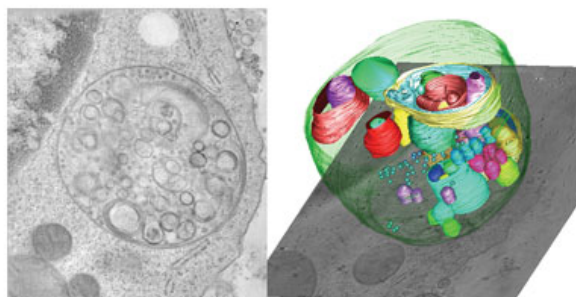


Obrázek 19: Antifázová rozhraní v uspořádané slitině na bázi  $\text{Fe}_3\text{Al}$  – atomové rozlišení podmřížky hliníku v orientaci  $\langle 110 \rangle$  [6].

#### 5.5. Elektronová tomografie

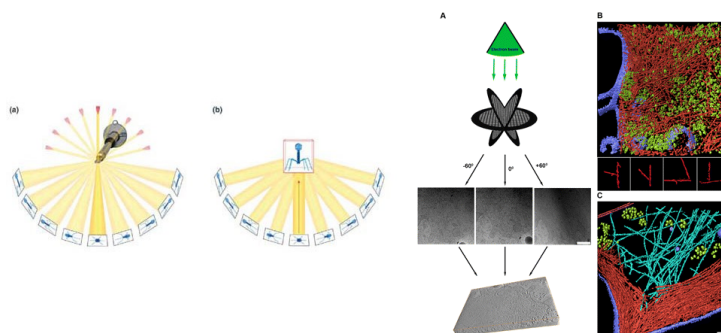
Narozdíl od běžné transmisní elektronové mikroskopie, která pracuje s ultratenkými řezy, elektronová mikroskopická tomografie umožňuje prostorové zobrazení útvarů v buňkách s velmi vysokým rozlišením

a často – při použití rychle zmrazených, chemicky nefixovaných biologických materiálů – ve stavu velmi blízkém stavu za živa. Její princip je podobný jako u počítačové tomografie používané v medicíně, ovšem v ultramikroskopickém měřítku. Elektronové prozařují objekt (tlustší řez než při běžné transmisní elektronové mikroskopii) pod různými úhly a z tomografických „řezů“ počítač vytváří „trojrozměrné“ modely objektů (obr. 20).



**Obrázek 20:** Klasický obraz TEM (vlevo) a tomografická rekonstrukce (vpravo) multilyosomálního objektu (počítačově modelováno) (A. J. Koster and W. J. C. Geerts, Utrecht University, Utrecht).

Kryoelektronová tomografie a elektronová tomografie obecně spočívá v záznamu dvourozměrných projekcí (2D) trojrozměrného objektu (3D) pod různými úhly, při náklonu preparátu (od  $+70^\circ$  do  $-70^\circ$ ). Následuje seřazení projekcí a tomografická rekonstrukce 2D projekcí do objemu 3D vzorku. Elektronmikroskopická tomografie tak může poskytnout neocenitelné a originální informace o prostorovém uspořádání ultrastruktury ve tkáních, buňkách a makromolekulách. V případě kryoaplikací se těží z prostorového obrazu chemickou fixací neovlivněných struktur objektu (obr. 21). Je však vyžadováno rychlé zamražení biologických objektů. Oproti laserové konfokální mikroskopii je možné dosáhnout rozlišení lepší než 5 nm. Rozlišení je závislé na jemnosti krokování náklonu a na celkovém počtu projekcí zkoumaného vzorku. Obvykle se jedná o stovky expozičních (je třeba brát ohled na radiační poškození preparátu urychlenými elektrony) řízených elektronikou elektronového mikroskopu, ovládající režim náklonu preparátorového držáku. Často poskytují tyto techniky doplňkovou informaci, protože navíc dávají možnost fluorescenčního značení organel. Nejčastěji se metody kryoelektronové tomografie používají pro zobrazení cytoskeletu buněk, pozice jader buněk, prostorové zobrazení bakterií a virů.



**Obrázek 21:** Princip elektronové tomografie.

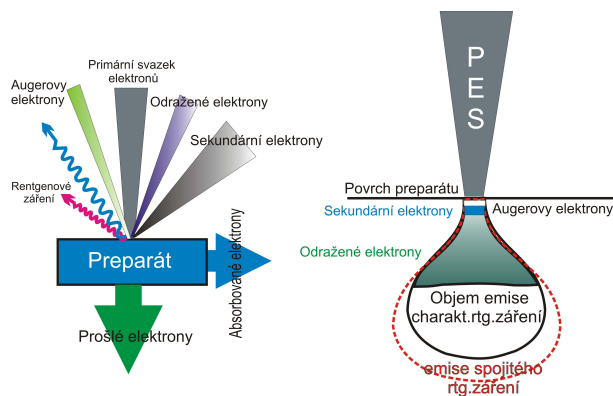
## 6. Tvorba obrazu ve skenovacím elektronovém mikroskopu

Interakce primárních elektronů se vzorkem přináší informace o fyzikálních a chemických vlastnostech zkoumaného objektu. Energie primárních elektronů, daná použitým urychlovacím napětím, ovlivňuje tvar oblasti pod povrchem preparátu, ve které se uvolňují jednotlivé signály (tzv. excitační objem, obr. 22). Tato oblast se s klesající hodnotou urychlovacího napětí stává mělkší (menší co do hloubky a větší co do šířky). Zvětšení šířky této oblasti je pak příčinou snížení rozlišovací schopnosti mikroskopu. Na hloubku průniku primárních elektronů do objemu vzorku má dále samozřejmě vliv i složení vzorku. Je-li vzorek tvořený těžšími prvky (např. kovy), bude produkovat více odražených elektronů než preparát tvořený lehkými prvky a hloubka průniku primárních elektronů bude menší.

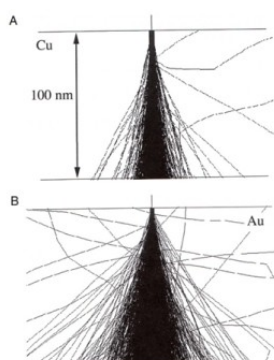
Při dopadu urychleného primárního elektronového svazku na preparát dochází k tomu, že pod povrchem preparátů se začnou primární elektrony pohybovat náhodným a velmi chaotickým způsobem. Je to

dáno pružnými i nepružnými srážkami s atomy vzorku. Na své chaotické dráze mohou generovat další signály (sekundární elektrony – SE, Augerovy elektrony – AE, rentgenové záření – RTG).

I přes chaotický pohyb elektronů lze přibližně určit, v jaké hloubce pod povrchem vznikají a jakého prostoru či objemu konkrétní druhy signálů dosahují. Existují speciální statistické metody simulace drah elektronu. Nejznámější se nazývá *metoda Monte-Carlo*. Pomocí této numerické metody, využívající náhodných čísel, lze chaotický pohyb elektronů a jejich objem přibližně popsat. Obr. 23 zobrazuje simulace pohybu elektronů ve 100 nm měděné (Cu) a Au fólii. Lze si všimnout, že rozptyl elektronu se zvyšuje se zvyšujícím se protonovým číslem vzorku.

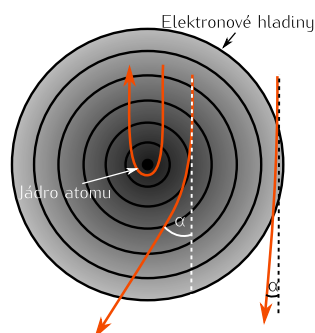


**Obrázek 22:** Excitační objem a signály uvolněné z preparátu po dopadu primárních elektronů.



**Obrázek 23:** Simulace drah elektronu ve 100 nm tenké fólii metodou Monte-Carlo. A – fólie Cu a B – fólie Au.

Pružný rozptyl se projevuje způsobem, který zahrnuje coulombovskou interakci atomového jádra (obr. 24). Jestliže elektron proniká elektronovým oblakem a blíží se jádru, je jádrem silně přitahován a může být rozptýlen pod většími úhly. Pružným rozptylem také vznikají zpětně odražené elektrony (Back Scattered Electrons – BSE).



**Obrázek 24:** Ukázka pružně rozptýlených elektronů.

Nepružné (neelastické) procesy dělíme do tří částí:

- procesy generující RTG záření,
- procesy generující sekundární elektrony (SE) a

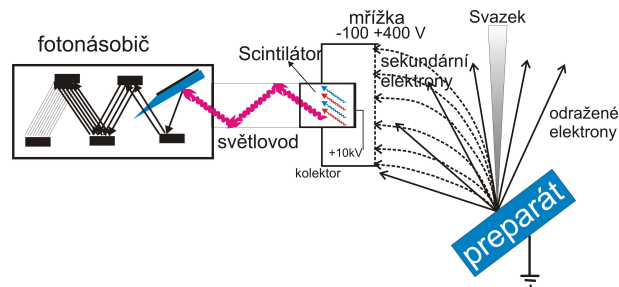


- procesy vyplývající z kolektivních interakcí s mnoha atomy.

Každý druh signálu má své využití při studiu a měření specifických vlastností vzorku, případně ho lze využít i v kombinaci více signálů. Z toho důvodu se v SEM využívá celá řada detektorů a je dobré vědět, který signál a který detektor použít v určité oblasti zkoumání vzorku.

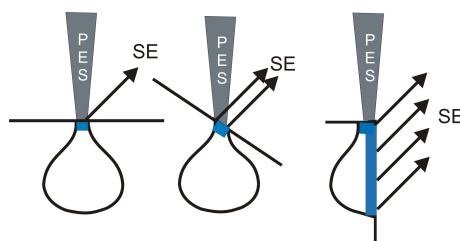
K zobrazení povrchu preparátu se v SEM využívají sekundární nebo odražené elektrony. *Sekundární elektrony* mají energii přibližně 50 eV a vystupují z hloubky řádově desítek nm. Kopírují tedy povrch a přináší informace o jeho topografii. Odražené elektrony, na rozdíl od nich, vystupují z větší hloubky a reagují citlivě na změnu složení (průměrné protonové číslo v daném místě). Jak již bylo uvedeno, zpětně odražené elektrony (BSE) jsou v podstatě primárními elektrony, vracejícími se po coulombovské interakci s jádrem atomu s malou ztrátou energie. Sekundární elektrony mohou být „pomalé SE“, jestliže jsou elektrony uvolněny z vodivostního či valenčního pásu a není potřeba velká energie k tomu, aby byly elektrony vyraženy primárním elektronovým paprskem. Jejich energie se pohybuje pod 50 eV. Jestliže jsou elektrony silně vázané ve vnitřních hladinách atomu, tak po vyražení mimo jejich hladinu mohou mít významnou část (až do asi 50%) energie primárního paprsku. Tyto elektrony označujeme jako „rychlé SE“.

Produkce *odražených elektronů* závisí především na středním protonovém čísle vzorku. Z toho plyne, že v režimu odražených elektronů se na obrazovce SEM budou jevit místa tvořená těžšími prvky jako světlé oblasti. Naopak oblasti tvořené lehkými prvky se budou jevit jako tmavá místa. Obraz v odražených elektronech je tedy schopen odlišit oblasti s různým prvkovým složením (obr. 28). Detekce těchto elektronů probíhá různými způsoby. V elektronových mikroskopech je stále používán detekční systém podle konstruktérů Everharta a Thornleyho, složený ze scintilátoru a fotonásobiče (obr. 25).



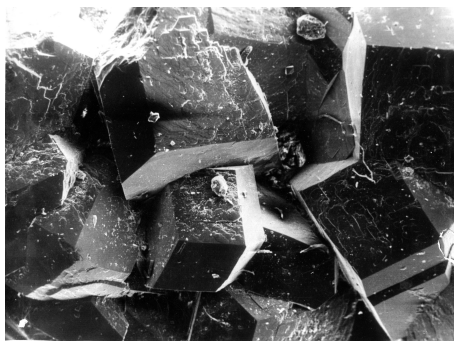
Obrázek 25: Everhart-Thornleyho detektor (scintilátor-fotonásobič).

Sekundární elektrony jsou nejdříve elektrickým polem mřížky kolektoru „odsátý“ z povrchu vzorku. Poté dopadají na scintilátor, v němž vyvolávají luminiscenci (emisi fotonů). Slabý signál fotonů je převeden na elektrický impuls ve fotonásobiči. Ten se dále zesiluje v elektronickém obvodu detektoru. Protože sekundární elektrony mají oproti odraženým elektronům mnohem menší energii i rychlost, musejí být ještě před dopadem na scintilátor urychleny napětím přivedeným na scintilátor. Odražené elektrony musejí být tímto napětím naopak bržděny. Detekce obou druhů elektronů probíhá odděleně. Proto si můžeme vybrat, zda chceme měřit v režimu odražených elektronů či v režimu sekundárních elektronů.



Obrázek 26: Vliv náklonu povrchu vůči dopadajícímu svazku na emisi SE.

Díky nízké energii sekundárních elektronů se z nakloněných ploch na povrchu preparátu dostane do detektoru více sekundárních elektronů než z těch, které jsou položeny kolmo k dopadajícímu svazku elektronů. Výsledkem je proto vyšší intenzita signálu přicházejícího z detektoru. Proto je možno v režimu sekundárních elektronů lépe rozpoznat topografii povrchu vzorku. Světlá místa na snímku odpovídají větším sklonům či zakřivením (obr. 26). Výtěžek emise  $\delta = \frac{\text{konst.}}{\cos \beta}$ , kde  $\beta$  je úhel mezi normálou povrchu a dopadajícím svazkem paprsků. Následující obr. 27 přináší typický 3D obraz členitého preparátu v režimu sekundárních elektronů. Na obrázku jsou krystaly vínanu draselného, jehož plochy, které jsou více skloněné mají světlejší odstín, způsobený vyšší emisí sekundárních elektronů.



Obrázek 27: Krystaly vínanu draselného v režimu sekundárních elektronů.

Odražené elektrony, které vystupují z větší hloubky pod povrchem preparátu, přináší sice zkreslenou informaci o topografii povrchu, ale přináší informaci o průměrném protonovém čísle  $Z$ . Hovoříme o *materiálovém kontrastu*, který bývá používán k mapování prvků ve spojení s elektronovou mikroanalýzou (obr. 28).



Obrázek 28: Odlišení oblastí materiálu na řezu slitiny Al-Cu v režimu zpětně odražených elektronů (BSE) Al ( $Z = 13$ ) – tmavší oblasti, Cu ( $Z = 29$ ) – světlejší oblasti.

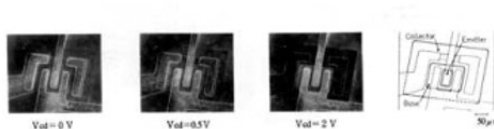
„Magnetický kontrast“ umožňuje pozorovat kontrast na doménových stěnách kubických a jednoosých feromagnetik. Na elektronech uvolněných po interakci s magnetickým vzorkem se projeví účinek *Lorentzovy síly* vyvolané magnetickým polem uvnitř domén. Některé elektrony jsou stočené dovnitř vzorku, jiné jsou usměrněné k povrchu. Na obr. 29 jsou v režimu magnetického kontrastu patrné magnetické oblasti – domény.



Obrázek 29: Magnetické domény v materiálu NdFeB.

„Napěťový kontrast“, realizovaný vlivem přitažlivých či odpudivých sil mezi dopadajícími elektrony a nabitými místy na povrchu, zobrazuje např. potenciálové rozdíly na povrchu polovodičových součástek, na které je přivedeno napětí. Je tak možné sledovat místa, která jsou defektní a představují bariéru pro proud procházející obvodem (obr. 30).

*Augerovy elektrony* (AE) vznikají, když jsou elektrony vyraženy z vnitřních vrstev elektronového obalu atomu. V této vrstvě vznikne nezaplňená slupka, která je obratem zaplněna elektronem z vnějších vrstev



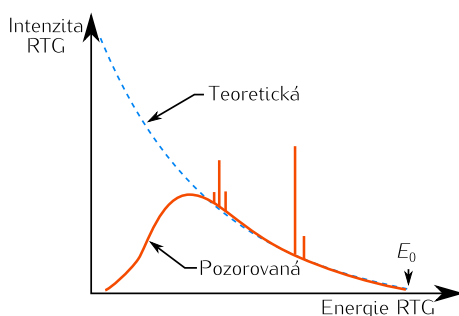
Obrázek 30: Napěťový kontrast na povrchu tranzistoru při různých hodnotách napětí.

atomu. Takto uvolněná energie může být vyžářena ve formě fotonu rentgenového záření, ale v některých případech je předána energie některému z elektronů ve vnější slupce, který ji tak může opustit. Dostane-li se nad povrch látky jako Augerův elektron, jeho energie je velmi nízká a je registrován z nanometrových hloubek od povrchu. Tento typ elektronů je ideální při popisu povrchových jevů pevných látek (fyzika povrchů).

**Katodoluminiscence** vzniká, pokud elektron z valenčního pásu přechází přes zakázaný do vodivostního pásu, čímž vznikne ve valenčním pásu vakance. Rekombinací elektronu dochází k vyžáření energie ve formě fotonu ve viditelné oblasti.

Zajímavá je problematika emitovaného rentgenového záření, které vystupuje ze vzorku po dopadu elektronů s vysokou energií. Analýza charakteristického rentgenového záření umožní jak v TEM, tak i v SEM provést prvkovou analýzu preparátu. Tím se významně rozšiřují analytické možnosti těchto přístrojů.

**Spojité rentgenové záření** Rtg záření patří do širokého spektra elektromagnetického záření. Jeho vlnová délka, se pohybuje v rozmezí  $10^{-12}$  m až  $10^{-8}$  m. Jedná se o záření se silnými ionizačními účinky. Spojité rtg záření bývá též nazýváno jako *brzdné záření* a vzniká zpomalením urychleného primárního elektronu ve zkoumaném vzorku. Elektron nepružně interaguje s jádrem atomů. Energetické ztráty jsou spojité a závislé na příslušném urychlovacím napětí a na úhlu dopadu mezi primárním svazkem a vzorkem. Spojitá složka rtg záření, emitovaná ze vzorku, zhoršuje výsledky analýzy charakteristického rtg záření. Spojité rtg záření je polychromatické, má spojité energetické spektrum a jsou v něm obsaženy fotony různých vlnových délek. Intenzita brzdného záření je funkcí energie (obr. 31). Intenzita se rychle zvyšuje v oblasti nízkých energií, ale velké množství energie brzdného záření je absorbováno ve vzorku a v detektoru, čímž intenzita postupně klesá k nule.  $E_0$  je energie elektronů způsobujících emisi rentgenového záření. Ve spektru na obr. 32 je patrná spojitá složka rtg záření mezi píky Au a Cu charakteristického rtg záření.

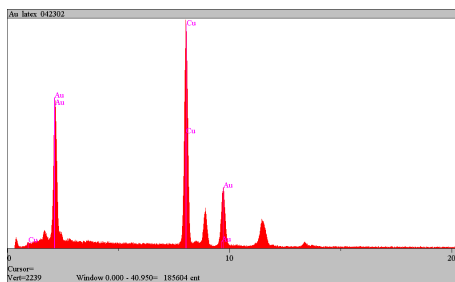


Obrázek 31: Intenzita brzdného rtg záření jako funkce energie.

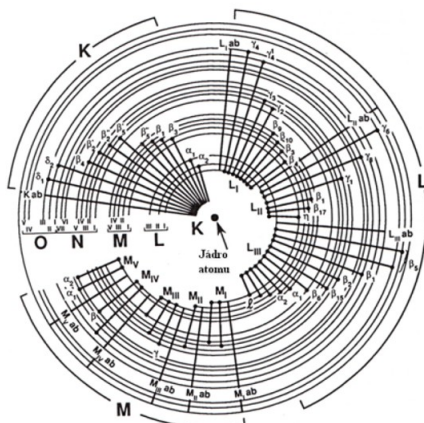
**Charakteristické rentgenové záření** Při popisu charakteristického rtg záření můžeme vyjít z teorie, že jednotlivé elektrony se pohybují kolem jádra atomu v určitých orbitalech. Při aproximaci hovoříme o kruhových drahách neboli elektronových hladinách, nacházejících se v různé vzdálenosti od atomového jádra. Kvantová fyzika jednotlivým orbitalům (hladinám) přiřadila určité označení. Hladině, nacházející se nejbližší jádru, náleží označení K. Hladiny více vzdálené atomovému jádru se dále označují písmeny L, M, N. Počet hladin závisí na druhu atomu, přesněji na jeho protonovém čísle, které udává zároveň počet elektronů v obalu. Každé hladině náleží energie udávaná v elektronvoltech (eV).

Z důvodu rozštěpení energie jednotlivých hladin na více podhladin může mít například orbital L další tři podhladiny označené jako  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  (obr. 33). Tyto indexy se zvyšují s tím, jak se podhladiny vzdalují od jádra. Podobně je to u ostatních hladin.

Elektron patří mezi částice (fermiony) s poločíselným spinem a podléhající určitému pravidlu při obsazování jednotlivých hladin. Podle tohoto pravidla nemohou být žádné dva nerozlišitelné fermiony ve



**Obrázek 32:** EDX spektrum zlatem pokovených latexových kuliček na povrchu měděné podložky. Mezi charakteristickými vrcholy je možné pozorovat spojitou složku spektra rtg záření.



**Obrázek 33:** Přechody mezi hladinami vedoucí k emisi charakteristického rtg záření.

stejném kvantovém stavu. Tzn., že je povoleno, aby v každé energetické hladině byly pouze dva elektrony, a to s opačně orientovanými spiny. Tímto pravidlem je umožněn výskyt pouze jednoho elektronu v každém rozlišeném kvantovém stavu. Počet elektronů, které mohou obsadit  $n$ -tou hladinu atomu je  $2n^2$ , kde  $n$  je hlavní kvantové číslo. „K hladina“ atomu se tedy skládá ze dvou elektronů pro  $n = 1$ , která je následována „L hladinou“ s  $n = 2$  a „M hladinou“ s  $n = 3$ . Tyto uzavřené hladiny K, L, M pak dohromady obsahují  $2 + 8 + 18$  elektronů.

Přechody elektronů mezi těmito jednotlivými hladinami vedou k uvolnění energie, která v určitých případech odpovídá energii rtg záření. Vznik charakteristického rtg záření nastane, pokud primární urychlený elektron vyrazí některý elektron z atomu vzorku na některé vnitřní hladině (blízké jádru), např. z hladiny K. K vyrazení dojde pouze za předpokladu, že je předána energie větší, než je energie kritická ( $E_c$ ) pro danou vrstvu (K, L, M, N).

Po vyraženém elektronu vznikne prázdné místo a nepřítomností elektronu je narušen rovnovážný stav atomu jako celku. Takhle ionizovaný atom spěje opět do stavu s minimální energií (do základního stavu) tím způsobem, že prázdné místo např. v hladině K je obsazeno elektronem z některé vyšší energetické hladiny, např. hladiny  $L_3$ . Rozdíl energií těchto dvou hladin  $L_3$  a K, mezi kterými se přeskok elektronu odehrál, je vyzářen ve formě kvanta rtg záření nebo je energie předána Augerovu elektronu. Tyto přechody mají své konkrétní označení, tento konkrétně  $K_{\alpha 1}$ . Další přechody jsou znázorněny na obr. 33. Potom, co elektron z hladiny  $L_3$  přeskočí na prázdné místo po vyraženém elektronu na hladině K, vzniká na hladině  $L_3$  opět další prázdné místo, které je obsazeno elektronem z některé následující vyšší hladiny, např. M. Emitované záření má opět svou charakteristickou energii a také své konkrétní označení. Energie jsou tabelovány a využívají se při *identifikaci složení vzorku*. Každý prvek periodické tabulky má své jedinečné rozložení energetických hladin a také jedinečné hodnoty energií při všech možných povolených přechodech mezi dvěma hladinami.

V přeneseném významu tyto energie slouží jako „otisky prstu“ každého chemického prvku a tímto způsobem je tedy možné zjistit chemické složení zkoumaného vzorku.

## 7. Detekce rentgenového záření

Pro získání charakteristického spektra a následné vyhodnocení charakteristického rtg záření, je důležitá rychlá a přesná detekce rtg záření vystupujícího ze vzorku. Elektronový mikroskop (SEM nebo

TEM) může být vybaven analyzátozem, který provádí rozklad rtg záření podle energie (Energy Dispersive Spectrometer - EDS) nebo podle vlnové délky (Wavelength Dispersive Spectrometer - WDS). Protože systém EDS je běžnější, především z důvodu nižších pořizovacích nákladů a rychlejšího získání spektra, bude popsán především jeho princip; o WDS se zmíníme okrajově.

## 7.1. EDS detektor rentgenového záření

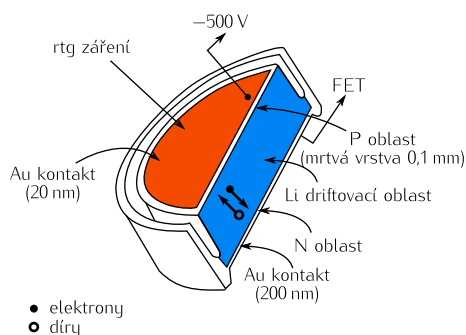
Dnešní EDS detektory jsou schopny registrovat více než  $10^6$  rtg pulzů za sekundu a rozřadit je v mnohokanálovém analyzátoru do podoby charakteristického spektra.

Zpravidla EDS rtg detektory (obr. 34) mají Si(Li) detektor chlazený kapalným dusíkem ( $\text{LN}_2$ ). Ten je schopen poskytnout mikroanalýzu s vysokým rozlišením čar charakteristických energií ve spektru.



Obrázek 34: Thermo Scientific NanoTrace detektor rtg záření.

Tyto typy detektorů využívají aktivní oblasti od 10 do 50  $\text{mm}^2$ . Energetická citlivost a vysoké rozlišení dovolují přesnou kvalitativní a kvantitativní analýzu. Schéma polovodičového Si(Li) detektoru ilustruje obr. 35.



Obrázek 35: Schéma Si (Li) polovodičového detektoru.

Detektor pracuje na principu obráceně polarizované PIN diody. Když rtg záření interaguje s polovodičem, dochází k přechodu elektronů z valenčního pásu do pásu vodivostního a vytvoření páru elektron-díra. Vysokoenergetické elektrony ztratí energii v křemíku (Si). Charakteristické rtg záření s typickou energií více než 1 keV může vygenerovat tisíce párů elektron-díra. Počet vytvořených párů elektron-díra je přímo úměrný energii přicházejícího rtg záření  $n = \frac{E_x}{\omega}$ , kde  $E_x$  je energie fotonů rtg. záření a  $\omega$  průměrná energie potřebná na vytvoření 1 páru (pro Si  $\omega_{\text{Si}} = 3,6$  eV). Amplituda napětového impulsu je vyjádřena vztahem

$$U = \frac{en}{C} = \frac{eE_x}{\omega C},$$

kde  $e$  je elementární náboj a  $C$  celková kapacita systému.

Jelikož rtg záření proniká hmotou mnohem snadněji než elektrony, potřebujeme pro rtg záření vnitřní oblast mezi P a N polovodičem o tloušťce asi 3 mm k tomu, aby vytvořila páry elektron-díra. Používaný křemík obvykle obsahuje nečistoty akceptorového druhu (P polovodič), proto je dopován lithiem (Li). Lithium nasytí akceptorovou příměs a polovodič má jen vlastní vodivost. Elektrony a díry vygenerované rtg zářením představují velmi malý náboj (asi  $10^{-16}$  C). Sběr většiny signálů zajišťuje záporné předpětí mezi čelní a zadní stěnou, které jsou pokryty tenkou kovovou vrstvou z Au či Ni (10 až 20 nm na čelní

stěně a 200 nm na zadní stěně). Aplikujeme-li závěrné napětí, záporný náboj je disklokován na P oblasti v přední části detektoru a kladný náboj na zadní části. Elektronů a díry jsou oddělené a může tak být měřen puls elektronů v zadním ohmickém kontaktu. Následně je signál zesílen tranzistorem řízeným polem (FET). Velikost tohoto pulsu je úměrná energii rtg záření, které vygenerovalo páry elektron-díra.

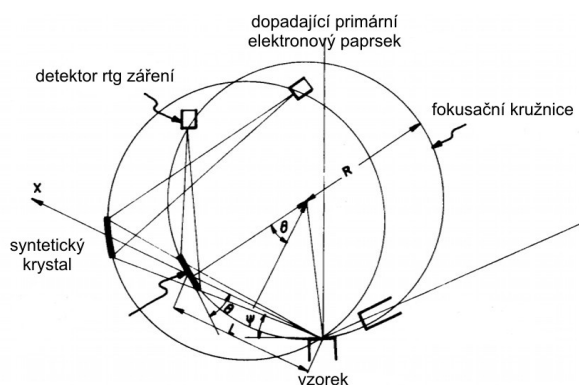
Chlazení detektoru je nutné z důvodu omezení tepelné energie, která by aktivovala páry elektron-díra a zvyšovala tak úroveň šumu. Dále by hladina šumu ve FET maskovala signály z nízkoenergetického rtg záření. Z těchto důvodů chladiíme detektor i FET kapalným dusíkem ze zásobníku – Dewarovy nádoby.

Rozlišovací schopnost detektoru je běžně dosahována v hodnotách 140 eV na  $Mn_{K\alpha}$  a 80 eV na  $C_{K\alpha}$ . Mezi detektorem a komorou je beriliové okénko, které zabraňuje kondenzaci nečistot na detektoru. Odsunutím okénka je možno měřit na nižších energiích.

Vedle pojmu EDS „Energy Dispersive Spectrometer“ se můžeme setkat také s EDX, což je označení pro „Energy Dispersive X-Ray Analysis“. Existují dva přístupy jak provést EDX mikroanalýzu. *Kvalitativní EDX mikroanalýza*, kterou můžeme detekovat prvky v určité oblasti vzorku. Rozsah detekce prvků záleží na citlivosti konkrétního detektoru, na protonovém čísle studovaného vzorku a na délce expozičního času při načítání EDX spektra. *Kvantitativní EDX mikroanalýza* vychází z porovnání spekter. Srovnávají se intenzity čar rtg záření měřených prvků ve studovaném vzorku s intenzitami odpovídajících čar produkovaných z určitého standardu.

## 7.2. WDS detektor rentgenového záření

Tento způsob detekce charakteristického rentgenového záření vede k získání mnohem přesnějšího spektra energií a tím k přesnějšímu stanovení chemického složení analyzovaných mikroobjemů. Princip detekce je naznačen na obr. 36.



Obrázek 36: Princip detekce charakteristického rtg záření u WDS.

Při WDS se využívá Braggova vztahu  $2d \sin \theta = n \cdot \lambda$  pro difrakční maxima, z něhož lze při známém  $d$  určit  $\lambda$  a tím i energii rtg záření. Základem detekce je krystalový detektor se syntetickým krystalem, případně systémem krystalů s velkou vzdáleností krystalových rovin  $d$ , aby byla umožněna i analýza lehkých prvků (Be, B, C, O, N). Energie dopadajícího svazku elektronů musí být 2 až 2,5krát vyšší než je excitační energie (energie absorpční hrany) pro daný prvek. Touto metodou však můžeme dosáhnout mnohem vyššího rozlišení energií až 5 eV (oproti 150 eV u EDS).

WDS	EDS
Vysoké spektrální rozlišení (2–6 eV)	Nízké spektrální rozlišení (130–155 eV)
Nižší účinnost při nabírání spektra (pomalejší)	Vysoká účinnost při nabírání spektra (rychlejší)
Vyšší citlivost na změnu geometrie vzorku	Nižší citlivost na změnu geometrie vzorku
Řídké artefakty ve spektru	Časté artefakty ve spektru
Nevyžaduje LN <sub>2</sub>	Vyžaduje LN <sub>2</sub>
Dochází k pohybu mechanických částí	Nedochází k pohybu mechanických částí
Je nutná relativně vysoká energie svazku	Nízká energie svazku není problémem
Nákladné zařízení	Méně nákladné zařízení

Tabulka 1: Porovnání WDS a EDS mikroanalytických metod.

### 7.3. Závislost velikosti excitačního objemu na urychlovacím napětí

Excitační objem je nejvíce ovlivněn urychlovacím napětím primárního svazku elektronů. Ve snaze dosáhnout většího excitačního objemu lze zvýšit energii dopadajících elektronů na desítky keV. Primární paprsek s vyšší energií dokáže proniknout hlouběji do vzorku. Elektronový svazek paprsků musí mít energii větší než je kritická hodnota energie ( $E_c$ ), potřebná k ionizaci atomu uvolněním elektronu z vnitřní hladiny elektronového obalu atomu. Hodnota  $E_c$  se zvyšuje pro elektrony v hladině nejbližší jádru. Pro K slupku je  $E_c$  vyšší než pro hladinu L. Atomy s vyšším protonovým číslem mají více elektronů v obalu a proto je i  $E_c$  vyšší. Jak velké hloubky excitační objem dosáhne, lze přibližně vypočítat pomocí střední hloubky penetrace ve vzorku podle vzorce

$$R = 0,33(E_0^2 - E_c^2)/\rho,$$

kde  $R$  je střední hloubka penetrace,  $E_0$  energie primárního elektronu (v keV),  $E_c$  kritická ionizační energie (keV) (pro  $Au_{M_{at}} = 2,123$  keV) a  $\rho$  hustota vzorku (v  $g/cm^3$ ) ( $\rho_{Au} = 19,32$   $g/cm^3$ ). Následující tabulka 2 obsahuje vypočtené hodnoty hloubky penetrace ve zlatě pro hodnoty urychlovacího napětí 5 kV, 10 kV a 15 kV.

$E_0$ [keV]	5	10	15
$R$ [nm]	35	163	376

Tabulka 2: Střední hloubky penetrace pro jednotlivá urychlovací napětí.

Volba optimálního urychlovacího napětí je důležitá pro optimalizaci podmínek EDX mikroanalýzy. Souvisí s účinným ionizačním průřezem a obecně se dá konstatovat, že větší urychlovací napětí usnadňuje excitaci, zvyšuje penetraci elektronů do hloubky, ale tím zvyšuje i absorpci rtg kvant vygenerovaných ve vzorku. Kvůli účinkům absorpce, která může zhoršit vyhodnocení EDX spekter, by volba primární energie elektronu neměla být příliš vysoká. Použité urychlovací napětí se zpravidla pohybuje kolem 15 kV.

### 7.4. Příprava vzorků pro elektronovou mikroanalýzu

Naprášená vrstva pro eliminaci povrchového náboje u nevodivých preparátů (biologické preparáty, ...) způsobuje problémy při analýze překryvem píků naprášeného kovu (čím těžší prvek, tím více čar). Preparáty musí být čisté a nekontaminované (hydrokarbonáty, prach, ...)

## 8. Parametry zobrazení a úprava obrazu v SEM

Zatímco v TEM můžeme dosáhnout jen pseudo-3D efektu při pozorování tenkých řezů, charakteristickým obrazem v SEM je 3D obraz s vysokou hloubkou ostrosti. Obraz v SEM vzniká bod po bodu, řádek po řádku skenováním povrchu vzorku. Zvětšení obrazu je proto rovno podílu velikosti  $L$  hrany obrazu na monitoru a velikosti intervalu  $L'$  zobrazovaného povrchu vzorku

$$Z = \frac{L}{L'}.$$

Rozsah zvětšení používaných v SEM se pohybuje v rozmezí od 5 až po 600 000. Maximální hodnota zvětšení SEM je současně rovna velikosti jeho užitečného zvětšení.

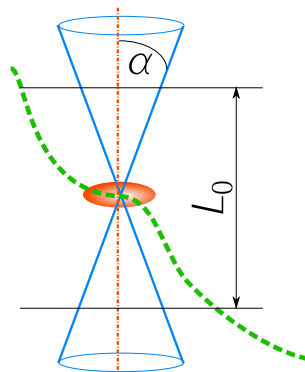
Rozlišovací mez SEM závisí především na průměru stopy fokusovaného elektronového svazku na povrchu preparátu. U nejběžnějších přístrojů s wolframovou přímo žhavenou katodou se rozlišovací mez pohybuje v rozmezí 10 až 15 nm. V novějších typech výkonných SEM se používají autoemisní elektronové trysky, které mají mnohem menší průměr katody. Tyto typy SEM pak umožňují dosáhnout rozlišovací meze až 1 nm. Rozlišovací mez SEM je (stejně jako v TEM) dále ovlivněna mnoha vadami zobrazení (chromatická vada, otvorová vada, astigmatismus, aj.). Tyto vady lze minimalizovat clonkami a speciálními druhy elektromagnetických čoček, které jsou umístěny v elektronoptické soustavě SEM.

Pro hloubkou ostrosti  $L_0$  obrazu vytvořeného pomocí SEM (obr. 37) platí vztah:

$$L_0 = \frac{d_0}{Z\alpha},$$

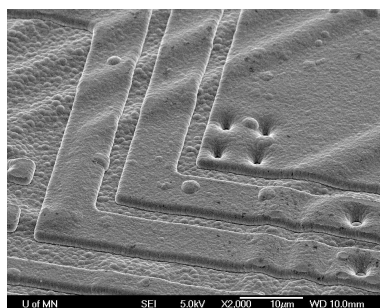
kde  $d_0$  je rozlišovací mez oka (0,2 mm),  $\alpha$  aperturní úhel (v rad) a  $Z$  zvětšení SEM.

Z uvedeného vztahu je zřejmé, že s rostoucím zvětšením SEM klesá hloubka ostrosti vzniklého obrazu. Proto musíme při zobrazování pomocí SEM volit kompromis mezi zvětšením a hloubkou ostrosti obrazu

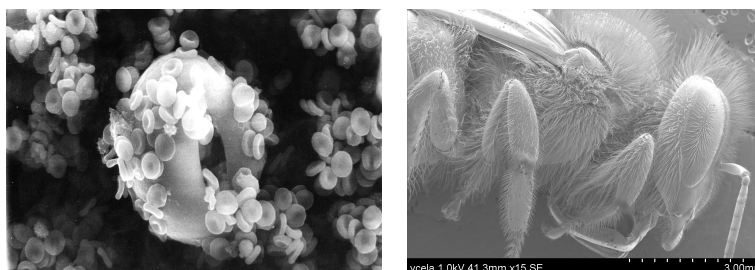


Obrázek 37: Znárodnění intervalu  $L_0$  (hloubka ostroiti).

tak, abychom dosáhli optimální hloubky ostroiti v zobrazených detailech povrchu preparátu [14]. Pro případ plochého zobrazení povrchu integrovaného obvodu (obr. 38) není nutná vysoká hloubka ostroiti a převažuje potřeba dosáhnout vyšší rozlišovací schopnosti, zatímco u preparátu na obr. 39 je tomu naopak. Může jím být hmyz, členité krystaly nebo jiné objekty. Ve všech případech je pro nás rozhodující dostatečná hloubka ostroiti, zajišťující přijatelně ostré zobrazení v celém objemu vzorku.



Obrázek 38: Povrch integrovaného obvodu.



Obrázek 39: Krevní buňky a snímek hmyzu.

Uvedme ve stručném přehledu nejčastější příčiny vedoucí ke snížení kvality výsledného obrazu.

#### 1. Neostroiti způsobená:

- špatnou volbou urychlovacího napětí,
- nestabilitou zdroje elektronového svazku, např. způsobená nedostatečným žhavením katody,
- chybným seřizením primárního elektronového svazku,
- nedokonalým vycentrováním aparatury objektivu,
- nedostatečnou korekcí astigmatismu,
- příliš velkým zvětšením,
- špatně fokusovaným svazkem elektronů (nezaostroiti),
- značnou plošnou hustotou náboje na povrchu vzorku,
- nezaostroiti fotoaparátem nebo CCD kamerou.



## 2. Celkově nízká kvalita obrazu může být zapříčiněna:

- špatnou volbou urychlovacího napětí,
- chybným nastavením velikosti proudu primárního svazku elektronů,
- zřetelným šumem vyvolaným nadměrným zesílením fotonásobiče,
- chybně nastaveným jasnem a kontrastem pro snímání obrazu,
- nevhodnou vzájemnou polohou vzorku a detektoru,
- nedokonale připraveným vzorkem,

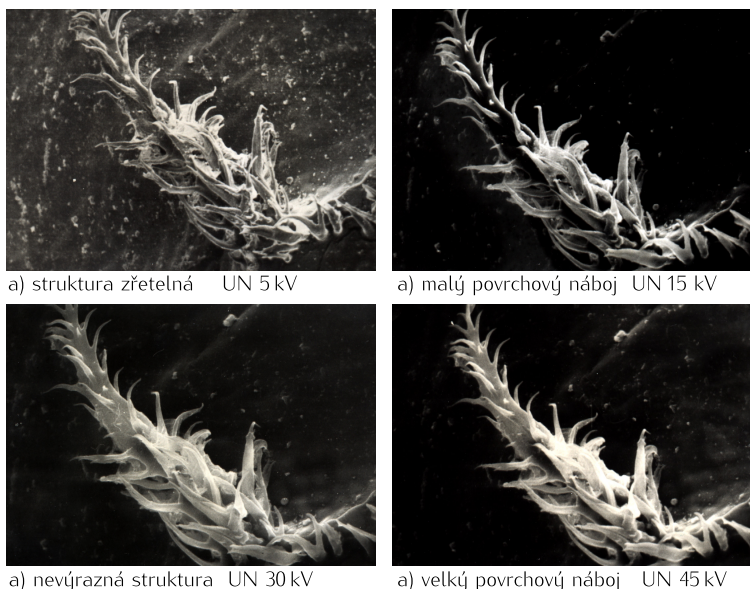
## 3. Faktory způsobující lokální poruchy obrazu z důvodu:

- nestability emise elektronového děla,
- značné plošné hustoty náboje na povrchu vzorku,
- mechanických vibrací,
- vnějšího elektromagnetického pole,
- nečistot na vzorku.

## 4. Deformace vzorku může být způsobena:

- termickým poškozením primárním elektronovým svazkem,
- změnou teplotního gradientu vzorku,
- zkreslením způsobeným náklonem preparátu,
- velkým plošným nábojem na povrchu vzorku,
- poškozením vzniklým při přípravě vzorku.

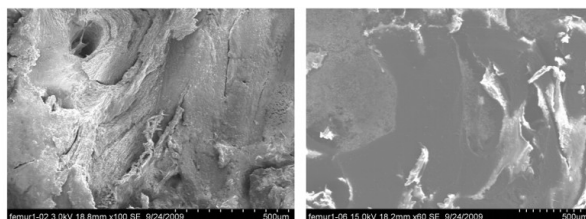
Existuje celá řada způsobů, jak se výše uvedeným problémům vyhnout. Dnešní přístroje dokážou i samy optimalizovat parametry pro dosažení dokonalého snímku. Musíme však mít minimální hodnotu proudu ve svazku, abychom nezvyšovali šum detektoru. Následující obrázky 40a) až 40d) porovnávají různé hodnoty urychlovacího napětí v závislosti na prokreslení detailů vzorku.



**Obrázek 40:** Prokreslení detailů biologického vzorku při různých hodnotách urychlovacího napětí.

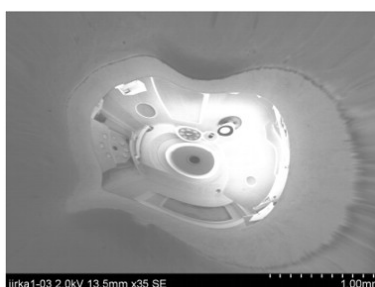
### *Nesprávná volba urychlovacího napětí u skenovacího elektronového mikroskopu*

Při charakterizaci vzorků pomocí skenovací elektronové mikroskopie je špatná volba urychlovacího napětí jedním z nejčastějších problémů. V případě nevodivých vzorků (pokud nejsou pokoveny) je třeba volit nízká napětí (0,5–1,5 kV). Pokud by bylo nastaveno vyšší napětí, docházelo by ke značnému hromadění elektronů v preparátu a jeho nabíjení (viz kap. 11.1). To se projevuje deformacemi měřeného vzorku a ztrátou ostrosti obrazu. Na snímcích se nabíjení preparátu projevuje světlými plochami (obr. 41), které zcela znehodnocují snímek.



**Obrázek 41:** Zobrazení chrupavky v SEM s efektem nabíjení.

Při pozorování některých nevodivých vzorků v režimu sekundárních elektronů při urychlovacích napětích do 3 kV je možné pozorovat zajímavý jev. Místo obrazu pozorovaného preparátu bylo sekundárními elektrony vytvořeno tzv. „zrcadlení detektorů“ (obr. 42). Je zrcadlení lze vysvětlit následujícím způsobem. V analyzovaném preparátu se hromadí elektrony, které díky špatné vodivosti vzorku nejsou z preparátu odváděny. Ty poté vytvoří natolik silnou bariéru, že další dopadající primární elektrony se pouze odpudí od preparátu a dopadají na vnitřní stěny mikroskopu, kde vybudí sekundární emisi. Vzorek se tedy stává v podstatě zrcadlem.



**Obrázek 42:** Zrcadlení preparátové komory SEM.

## 9. Environmentální skenovací elektronová mikroskopie

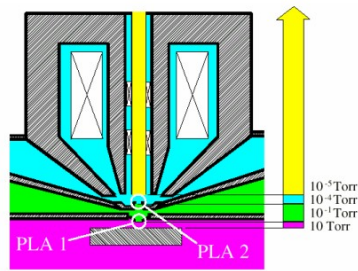
Environmentální skenovací elektronová mikroskopie (eSEM) představuje jeden z vývojových trendů v elektronmikroskopických metodách. Umožňuje zkoumání vzorků živé i neživé přírody v podmínkách vysokého tlaku plynů až 3 kPa, ve kterých se nejen povrch nevodivého preparátu nenabíjí, ale dokonce lze uchránit vlhký vzorek před vyschnutím. Přístroje eSEM přitom umožňují pracovat i ve vakuu pod  $10^{-3}$  Pa, odpovídajícímu podmínkám pozorování v klasickém skenovacím elektronovém mikroskopu.

Je-li tlak plynů v komoře vzorku eSEM vyšší než přibližně 200 Pa, dochází k ionizačním srážkám primárních i signálních elektronů s atomy a molekulami plynů v okolí preparátu a vzniklé ionty kompenzují nabíjení vzorku dopadajícími elektrony. Tento proces umožňuje pozorování elektricky nevodivých vzorků bez nutnosti pokrytí jejich povrchu elektricky vodivou vrstvou. Je-li v komoře vzorku tlak plynů, nejlépe vodních par, vyšší než 611 Pa (při teplotě 0 °C), lze pozorovat objekty obsahující menší či větší množství vody bez vyschnutí a zborcení jejich struktury.

### 9.1. Možnosti eSEM

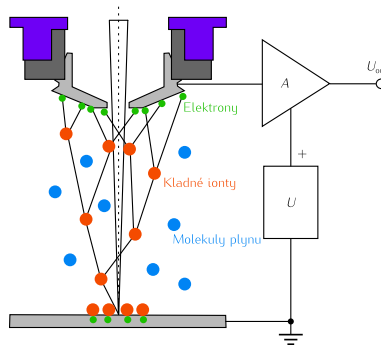
- Studium detailů struktury povrchů vodivých i nevodivých vzorků pocházejících z živé i neživé přírody o rozměrech nanometrů až milimetrů.
- Studium vlhkých vzorků a vzorků na fázovém rozhraní skupenství (procesy kondenzace, vypařování, tání, tuhnutí, atd.)
- Studium vzorků v podmínkách mechanického i tepelného namáhání v prostředí vakua, nebo různých druhů plynů s volitelnou vlhkostí.
- Studium materiálového, topografického, popř. napětového kontrastu (umožňujícího zobrazit nahromadění a rozložení elektrického náboje, například na hradlech tranzistorů).
- Studium reakcí různých chemických látek v komoře vzorku mikroskopu.

- Studium chemicky agresivních látek, například bateriových hmot.
- Studium různých druhů vzorků v podmínkách blízcích se atmosférickému tlaku.

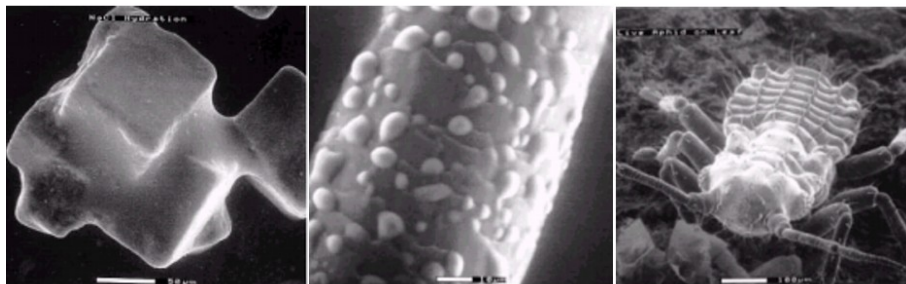


**Obrázek 43:** Speciální tlakové clonky oddělující prostor tubusu s vysokým vakuem a prostor preparátové komory s nízkým vakuem (až s atmosférickým tlakem).

eSEM mikroskop musí mít v tubusu stejně vysoké vakuem, jako ostatní elektronové mikroskopy. Prostor preparátové komory, kde je vakuem nízké, je odděleno speciální tlakovou clonkou (obr. 43). Detektory, které jsou v eSEM využívány, tolerují přirozené prostředí preparátu (proto také environmentální mikroskopy). Nejsou citlivé na světlo a teplo a umožňují zvýšení účinnosti detekce. Z obr. 44 vyplývá, že dochází k ionizaci plynu uvolněnými elektrony ze vzorku. Ionizovaný plyn nejenže kladnými ionty potlačuje nabíjení preparátu, ale při ionizaci dochází k vyšší tvorbě elektronů, které zvyšují účinek detekce. Následující snímky na obr. 45 ukazují některé z mnoha aplikací, které by nebylo možné realizovat v klasickém SEM.



**Obrázek 44:** Schematické znázornění ionizačních procesů v eSEM po dopadu primárních elektronů na vzorek.

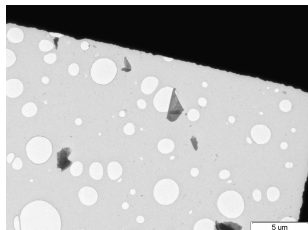


**Obrázek 45:** Příklady aplikací eSEM: zleva rozpouštění krystalů NaCl, kapky vody na lidském vlase a živá mšice.

## 10. Příprava vzorků pro TEM

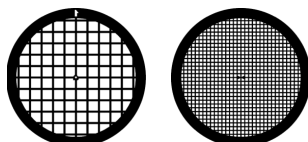
Hlavním cílem přípravy vzorku jak pro TEM, tak i pro SEM, je získat reprodukovatelným způsobem přesnou morfologickou informaci o preparátu a maximálním způsobem potlačit jakékoli artefakty v jeho objemu.

Pro zachycení ultratenkých řezů, replik povrchu nebo suspenze buněk nebo částic se používá tenká fólie, transparentní pro elektrony. Podmínkou je, aby byla stabilní vůči urychleným elektronům a měla nízkou zrnitost. Z důvodu eliminace absorpce elektronů ve fólii musí mít tloušťku kolem 20 nm. Nejvíce se používají uhlíkové a plastové fólie. Uhlíkové mají často otvory, aby pozorované struktury nebyly ovlivněny uhlíkovou vrstvou (holey carbon – obr. 46). Jako plastová fólie se používá Formvar ředěný v etylendichloridu o koncentraci menší než 0,5%. Příprava plastové fólie je snadná, uhlíkové vrstvy je možné připravovat napařováním. V dnešní době je možné zakoupit uhlíkové fólie, nanesené přímo na podložní sítku.



Obrázek 46: Holey carbon fólie.

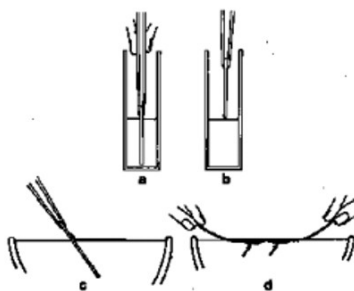
Sítka pro TEM představuje pevnou podporu pro fólie a ultratenké řezy nebo suspenze částic. Bývá vyrobena z mědi, která je diamagnetickým materiálem, neovlivňujícím procházející elektrony. Sítky se liší procentem otevřené plochy a perioda síťování se označuje v čarách na palec (obr. 47).



Obrázek 47: Podložní sítky s označením Mesh 100 a Mesh 300 (čar/palec).

Postup nanesení fólie na sítku je znázorněn na obr. 48:

- a – sklíčko ponořit do roztoku s Formvarem,
- b – vysušit v bezprašném prostředí,
- c – fólii splavit na hladinu vody,
- d – podložní sítku dát na proužek papíru, ponořit pod fólii a vytáhnout.



Obrázek 48: Postup nanesení formvarové fólie na sítku.

## 10.1. Ultratenké řezy

Vrstvou biologického preparátu o tloušťce 100 nm, který má měrnou hmotnost  $\rho = 1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , prochází při urychlovacím napětí 50 kV přibližně 50 % elektronů. Z toho vyplývá, že není možné pozorovat celé buňky. Obvyklá tloušťka tenkého řezu je kolem 50 nm. Silnější preparáty by snižovaly penetrační schopnosti elektronů. V případě, že projdou, ztratí rychlost, a to zvýší chromatickou aberaci a ztíží

zaostření pozorovaného preparátu. Vzorky pro transmisní i skenovací elektronovou mikroskopii nesmí obsahovat vodu, protože v mikroskopu jsou vystaveny vysokému vakuu a v něm by mokré vzorky okamžitě zmrzly a při sublimaci ledu by se deformovaly. Předtím však musí být biologický preparát fixován, aby byla věrně reprodukována jeho ultrastruktura. Z toho je patrné, že pro samotné vytváření ultratenkých řezů musí být tkáň speciálně připravena. Kompletní příprava zahrnuje odběr tkáně nebo buněk, fixaci preparátu, odvodnění, kontrastování, zalití do bločku a teprve potom následuje krájení na ultramikrotomu.

Obecně existují dva způsoby jak připravit vzorky pro TEM:

1. Do mikroskopu přímo vkládáme celý studovaný objekt, připravený podle obvyklých pravidel. Jedná se buď o suspenze virů, bakterií nebo izolovaných buněčných organel, které můžeme v mikroskopu pozorovat celé, nebo z větších vzorků jsou připraveny ultratenké řezy.
2. Druhý způsob představuje nepřímé pozorování ultrastruktury, kdy v mikroskopu pozorujeme repliku (otisk) studovaného objektu, nikoliv samotný objekt.

## 10.2. Fixace

Prvním krokem přípravy preparátů pro TEM je **fixace**. Jejím cílem je zachovat buněčnou ultrastrukturu s minimem změn oproti nativnímu stavu, zabránit degradačním procesům a stabilizovat vzorek pro další kroky přípravy. K fixaci biologických objektů se používají chemické nebo fyzikální metody. Je důležité si uvědomit, že zatím neexistuje univerzální fixační postup, který by byl vhodný pro všechny typy tkání a buněk. Stanovení vhodného postupu je třeba pro každý vzorek hledat experimentálně, přičemž na začátku je možné vycházet ze všeobecně platných zásad.

*Chemická fixace* je založena na reakci některých chemických činidel se složkami biologických objektů, které vedou k jejich stabilizaci a imobilizaci bez větších ultrastrukturálních změn. Chemická fixační činidla se dělí do skupin koagulátorů a nekoagulátorů. **Koagulátory** denaturují proteiny a způsobují jejich precipitaci. Jelikož při tomto typu fixace nevznikají žádné vazby mezi různými molekulami, označuje se také jako neaditivní. Mezi tato fixační činidla patří např. *metanol*, *etanol* nebo *kyselina chlorovodíková*. **Nekoagulátory** fixují tak, že dochází k přeměně cytoplasmy v gel transparentní pro elektrony. Často se označuje také jako aditivní fixace a z hlediska elektronové mikroskopie nejlépe zachovává buněčnou ultrastrukturu. Příkladem tohoto typu fixačních činidel jsou *glutaraldehyd*, *oxid osmičelý*, nebo *manganistan draselný*.

Kvalitu fixace však ovlivňuje celá řada faktorů, z nichž uvedme ty nejdůležitější: výběr fixačního činidla, velikost vzorku, způsob fixace, koncentrace a rychlost penetrace fixačního činidla, teplota, osmolalita a pH fixačního roztoku, délka fixace, přídavky dalších látek ovlivňujících průběh fixace.

Tyto faktory se ovlivňují navzájem a v mnoha případech je třeba volit určité kompromisy. Např. teplota ovlivňuje rychlost difúze fixačního činidla a tím i dobu fixace. Penetrační rychlost je ovlivněna velikostí preparátu apod. V následujícím textu zmíníme jen některé typické příklady fixačních roztoků a uvedeme, pro které typy preparátů jsou vhodné.

**Osmium tetroxid ( $OsO_4$ )** Dobře reaguje s lipidy a fosfolipidy, stabilizuje buněčné proteiny formující cytoplasmu, naopak špatně fixuje karbohydráty (glykogen) a nukleové kyseliny.

Doba fixace se pohybuje od 30 do 90 minut. Krátký čas vede k nedostatečné fixaci, dlouhý čas může zase vést až k rozpadnutí tkáně.  $OsO_4$  penetruje do tkáně pomaleji z důvodu pomalé difúze velkých molekul. V případě  $OsO_4$  obvykle urychluje fixaci vyšší teplota a pomocí pufrů se udržují roztoky při pH blízce 7.

**Aldehydy** Pro přípravu preparátů v elektronové mikroskopii jsou z této skupiny nejpoužívanější *formaldehyd* a *glutaraldehyd*. Dobře fixují bílkoviny, cytoplasmu a lysosomy. Špatně stabilizují v buňkách lipidy, což se dá napravit osmiovou postfixací. Glutaraldehyd má relativně malou viskozitu ( $M_m = 100,12 \text{ g/mol}$ ). V koncentracích 1–6% se většinou mísí s kakodylanovým pufrům 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, výborně fixují cytoplasmatické membrány a struktury obsahující lipidy a lipoproteiny. Nevýhodou manganistanové fixace je, že po ní mizí ribozomy a rušivě působí také granulace, která se však dá odstranit předfixací glutaraldehydem, případně použitím acetonu místo etanolu při odvodnění. Doba fixace se pohybuje od 15 do 50 minut, teplota ani pufr nejsou rozhodující. Podle některých autorů pufrované i nepufrované roztoky dávají stejné výsledky.

### 10.3. Podmínky fixace

Jak již bylo uvedeno, výsledek fixace je závislý na celé řadě faktorů. Pokusme se shrnout nejdůležitější z nich. S výjimkou manganistanu draselného, který se užívá rozpuštěný v redestilované vodě, všechny ostatní fixační činidla se aplikují rozpuštěné v pufovacích roztocích. Důvodem je, aby se fixační roztok co nejvíce blížil svými vlastnostmi (pH, teplota, osmolalita apod.), prostředí, ve kterém se vzorek nacházel do chvíle odebrání a nedošlo k reakci fixovaného objektu na změnu vnějšího prostředí, která by mohla vést k jeho poškození, např. smrštění fixovaných buněk.

*Koncentrace fixačního činidla* závisí na druhu fixovaných objektů a způsobu fixace. Pro glutaraldehyd se doporučují koncentrace v intervalu 1–3 % v případě izolovaných buněk a perfúzní fixace, 3–6 % pro tkáňe a imerzní fixaci. Podobná doporučení platí i pro formaldehyd. U  $\text{OsO}_4$  se doporučuje koncentrace 1–2 % a to jak pro primární fixaci, tak pro postfixaci.

*pH fixačního roztoku* závisí na typu fixovaného vzorku. Průměrné pH extracelulární kapaliny člověka je blízké hodnotě 7,4, oproti tomu pH intracelulární kapaliny kolísá v rozmezí 6,0–7,5. Doporučovaná hodnota pH fixačního roztoku se pohybuje v intervalu 6,7–7,1. V této oblasti se dá očekávat dobrá reaktivita glutaraldehydu a rovněž i stabilita roztoku  $\text{OsO}_4$ . K udržení pH ve zvoleném intervalu se používají tlumící roztoky. Nepufrované aldehydické roztoky způsobují pouze malou změnu intracelulárního pH, naproti tomu v případě roztoků  $\text{OsO}_4$  může pH klesnout na hodnotu mezi 2 a 3 a použití nepufrovaných roztoků nepřipadá v úvahu.

*Vlastnosti pufrů* – na pufrů používané v elektronové mikroskopii jsou kladeny vysoké nároky. Kromě dostatečné tlumící kapacity by měly být chemicky stabilní a odolné proti degradaci enzymy a jinými biologicky aktivními látkami, neměly by být cytotoxické, neměly by disociovat a uvolňovat fyziologicky účinné ionty vápníku, draslíku, sodíku apod., neměly by tvořit precipitáty, interferovat s fixačním činidlem, inhibovat nebo naopak stimulovat buněčné funkce atd. Z celé velké škály tlumících roztoků nenajdeme ani jeden, který by beze zbytku splňoval uvedená kritéria. Mezi nejpoužívanější v současné době patří fosfátový a kakodylanový pufr a pufrů označované zkratkami TRIS, PIPES, HEPES apod., které jsou většinou organickými deriváty aminokyselin. Mezi přednosti uvedeného seznamu pufrů patří především nízký stupeň toxicity, kompatibilita s fyziologickými funkcemi buněk, snížení extrakce lipidů, proteinů a dalších buněčných komponent v průběhu zpracování materiálu.

*Přidávky jiných látek* – některé látky svojí přítomností ve fixačním roztoku selektivně fixují určité organely, některé ovlivňují reaktivitu fixačního činidla, rychlost jeho pronikání do tkáňe apod., čímž ovlivňují výsledky fixace (peroxid vodíku, Saponín, dimetylsulfoxid, Tanín, ferokyanid draselný).

*Osmotické vlastnosti fixačního roztoku* – buňky obsahují velké množství intracelulárních roztoků, které jsou uzavřeny a navzájem od sebe odděleny semipermeabilními membránami. Vně buněk jsou extracelulární kapaliny a v živém organismu membrány fungují jako selektivní bariéry a propouštějí do tohoto vyrovnaného systému jen některé látky a vodu. Pohyb vody přes semipermeabilní membrány je dán rozdílem koncentrací roztoků, které odděluje, a sice ze strany nižší koncentrace roztoku směrem k vyšší, který zřeďuje. Čím je rozdíl koncentrací vyšší, tím větší je tlak vody na membránu. Tento tlak se označuje jako osmotický a udává hydrostatický tlak, který by bylo třeba vyvinout na straně koncentrovanějšího roztoku, aby se zabránilo proudění vody do něj. Při fixaci je důležité, aby vzorky po ponoření do fixačního roztoku nebyly vystaveny velké změně osmotického tlaku, aby nepřijímaly vodu ani ji neuvolňovaly, což by mělo za následek velkou objemovou změnu buněk. Roztoky, ve kterých dochází ke zvětšení objemu buněk se označují jako **hypotonické**, opačně působí **hypertonické** roztoky. Ideální jsou **izotonické** roztoky, které nevyvolávají objemové změny. Právě takovými by měly být fixační roztoky. Tlak elektrolytů je vždy vyšší než neelektrolytů, protože jejich molekuly disociují na více částí. Proto 0,16M roztok NaCl má např. stejnou osmolalitu jako 0,3M roztok glukózy. Při stanovení optimálních osmotických vlastností se většinou vychází z osmotické koncentrace lidského séra, která je asi 300 mOsm/kg. Při fixaci je výhodné fixovat mírně hypotonickým roztokem, aby obsah fixační látky proudil dovnitř buněk. Membrány si však při fixaci glutaraldehydem dlouho zachovávají své semipermeabilní vlastnosti a glutaraldehyd nepatří k látkám, které by ochotně pouštěly dovnitř buněk. Často zůstávají buňky osmoticky aktivní i po fixaci GA a při použití vypíracího roztoku s nevhodnými osmotickými vlastnostmi může stále dojít k jejich poškození.

Při určování osmotické koncentrace fixačního roztoku je třeba stanovit tzv. *účinnou osmolalitu*, která se může lišit od celkové, např. GA v koncentraci 2–6 % není osmoticky aktivní.  $\text{OsO}_4$  naproti tomu okamžitě ničí semipermeabilní vlastnosti membrán a v tomto případě se účinná osmotická koncentrace rovná celkové, včetně podílu  $\text{OsO}_4$ .

Snížení osmolality roztoku lze docílit přidáním vody, zvýšení přidávkem glukózy a sacharózy nebo kationtů ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Výsledný vzhled ultrastruktury vypoví, zda měl fixační roztok správnou osmolalitu. Scvrknuté buňky a buněčné organely byly fixovány hypertonickým roztokem, zvětšené

buňky a orgány, kulatá jádra hypotonickým roztokem. Nejcitlivěji reagují na nevhodnou osmotickou koncentraci mitochondrie.

*Teplota fixačního roztoku* – na jedné straně do značné míry ovlivňuje penetrační rychlost fixačního činidla a na druhé straně rychlost autodegradačních a autolytických procesů ve fixovaném materiálu. Zatímco pro pronikání fixačního roztoku do buněk je vhodnější vyšší teplota, pro zbrzdění autodegradačních procesů teplota nižší. Na určení vhodné teploty má vliv celá řada faktorů, především způsob fixace, např. při perfúzní fixaci je vhodné upravit teplotu na hodnotu živého organismu. Určení konkrétní teploty fixačního roztoku je vždycky kompromisem mezi několika faktory.

*Doba fixace* – závisí na velikosti fixovaného materiálu, teplotě fixačního roztoku, jeho složení, způsobu fixace atd. Obecně neplatí, že čím déle fixujeme, tím lepší výsledky, neboť proteiny změněné na gel reakcí s glutaraldehydem po čase kapalní a potom jsou odplaveny během dalších kroků přípravy. Bylo změřeno, že průměrná rychlost penetrace fixačních roztoků při pokojové teplotě je 0,2 až 0,34 mm/hod. Při imerzní fixaci vzorku o velikosti 1 mm<sup>3</sup> pronikne fixační roztok do jeho středu za 1,5 až 2,5 hod. Při celkové délce fixace 3 hod jsou však buňky ve středu vzorku fixované pouze za 30 min, zatímco na povrchu 3 hod. Při pokusech stanovit optimální délku fixace se ukázalo, že na imobilizaci pohybu v rostlinné cytoplazmě potřeboval glutaraldehyd 15–20 min, formaldehyd 30 min a akrolein 6 min.

*Množství fixačního roztoku a promíchávání* – závisí především na způsobu fixace. Při imerzní fixaci se doporučuje, aby objem roztoku byl asi 1000krát vyšší než objem fixovaného vzorku, aby byl zajištěn dostatek fixačního činidla. Tedy na fixaci 5 kusů vzorku o objemu 1 mm<sup>3</sup> by se mělo použít asi 5 ml roztoku. Při perfúzní fixaci bývá objem spotřebovaného fixačního roztoku ještě vyšší. Stejně důležité je i jemné promíchávání při fixaci, aby se podpořila penetrace fixačního roztoku do vzorku.

*Způsob fixace* – je většinou nejvíce ovlivněn účelem pokusu. Nejběžnějším, nejjednodušším a nejčastěji používaným způsobem je **imerzní fixace** spočívající v ponoření získaného materiálu do fixačního roztoku. V případě citlivých tkání, např. jaterní, je však tento způsob pomalý a v ultrastruktuře je již možno pozorovat poškození způsobené degradačními procesy. **Perfúzní způsob fixace** je možné použít při experimentu na pokusném zvířeti, kterému se v celkové anestézii vstříkne fixační roztok přímo do krevního řečiště. Dalším způsobem je možnost předfixovat tkáň určenou k odebrání pomocí injekce s fixačním roztokem, nebo opět při celkové anestézii obnažit hledaný orgán a nakapat na něj fixační roztok a teprve poté odebrat kousky tkáně. V případě vzorků tkání ze živého člověka získaných biopsií připadá v úvahu pouze imerzní fixace, tedy co nejrychlejší ponoření získaných vzorků do fixačního roztoku. Pro vzorky určené pro transmisní elektronovou mikroskopii platí, že by neměly přesahovat velikost 1 mm<sup>3</sup>. Často bývá problém s fixací izolovaných buněk v suspenzi, které je nutno pro jednodušší manipulaci zalít do agaru. Pokud je počet buněk v suspenzi nízký, je třeba je zkoncentrovat filtrací přes membránový filtr, filtr rozstříhat na malé kousky a pracovat s nimi jako s kousky excize. Pouze při odvodňování a zalévání je třeba zajistit, aby se v některém kroku filtr nerozpustil.

Z uvedeného stručného přehledu vyplývá rozmanitost postupů používaných k fixaci, které odráží variabilitu připravovaných preparátů.

## 10.4. Odvodnění

Úkolem je nahrazení volné vody ve vzorku odvodňujícím činidlem (etylalkohol, metylalkohol, isopropylalkohol, aceton). Nejčastěji se jako dehydratační činidla používají etanol a aceton.

*Etanol* je nejběžnější dehydratační činidlo, jehož nevýhodou je možnost reakce se zbytky OsO<sub>4</sub> za vzniku drobných hustších precipitátů. Udává se, že způsobuje menší extrakci buněčného materiálu než aceton. Není přímo mísitelný s epoxidovými a polyesterovými pryskyřicemi, kde se z tohoto důvodu musí použít jako mezistupně např. propylenoxid.

*Aceton* je druhé nejčastěji používané dehydratační činidlo. Přičítá se mu větší extrakce buněčného materiálu, hlavně lipidů, na druhé straně je přímo mísitelný se všemi používanými pryskyřicemi. Způsobuje menší scvrkávání vzorku než etanol.

Obvykle se acetonem nebo etanolem odvodňuje tak, že vzorek prochází řadou roztoků o stoupající koncentraci – 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 %, ve kterých je podle typu a velikosti ponecháván 5 až 10 min. Protože komerčně dodávaný čistý etanol i aceton obsahují vodu, je třeba je vysušit přidáním bezvodého síranu měďnatého nebo chloridu vápenatého.

Dehydratace bývá považována za zdroj řady artefaktů. Po nekvalitní fixaci dochází k extrakci proteinů, lipidů, sacharidů atd. Objemové změny mohou dosáhnout až 40 %. Kromě toho vzniká řada precipitátů.

**Infiltrace** je postupné prosycení preparátu pryskyřicí. V praxi se provádí tak, že vzorek projde řadou roztoků pryskyřice v dehydratačním médiu s rostoucí koncentrací pryskyřice. V případě zalévacích médií s vyšší viskozitou nebo málo prostupného vzorku je možné zvýšit účinnost prosycení mikrovlnami nebo změnou tlaku.

## 10.5. Zalévání

Existují obecně dva způsoby zalévání preparátů. **Plošné zalévání** se používá v případě, kdy je vzorek třeba orientovat, aby oblast, kterou chceme připravit pro prohlížení, ležela co nejbližně řezné roviny bločku. **Zalévání do kapslí** je vhodné v případě suspenzí nebo jiného materiálu, kdy nezáleží na jeho orientaci. Ideální zalévací hmota by měla mít následující vlastnosti:

- rozpustnost v etanolu nebo acetonu před polymerizací,
- neměla by chemicky ovlivňovat vzorek,
- nezpůsobovat pnutí ve vzorku.
- Měla by být homogenně tuhá, ale dostatečně plastická a
- stabilní při ozařování elektronovým paprskem.

Při zalévání preparátů pro imunoznačení, z důvodu minimalizace extrakce, agregace a přemístění buněčných komponent se používá nízkoteplotní zalévání.

**Zalévací hmoty** Zalévání do parafínu např. neumožňuje pořídit řezy pod 1  $\mu\text{m}$ , protože je příliš měkký. Z běžnějších zalévacích hmot, používaných pro elektronovou mikroskopii, se používají následující hmoty. Uvedme rovněž jejich přednosti i nevýhody.

**Metakryláty** Poskytují rychlou penetraci do tkáně a snadné pořizování řezů o tloušťce 50 až 100 nm. Správná tuhost je dosažena vhodnou směsí metylmetakrylátu a *n*-butyl metakrylátového monomeru. Jejich nevýhodou je, že až o 20 % se sníží objem při polymerizaci, což vede ke vzniku artefaktů a nestabilitě řezů po prozáření elektrony.

**Hmoty rozpustné ve vodě** se používají bezprostředně po fixaci. Glykol metakrylát (2-hydroxyetyl metakrylát) má tendenci se rozpínat pod vlivem elektronů. V této skupině je patrně nejpoužívanější hmota s komerčním označením Durcupan.

**Polyesterové pryskyřice** – Vestopal W poskytuje dobrou stabilitu v elektronovém svazku, nevýhoda je vysoká viskozita a mísitelnost s etanolem.

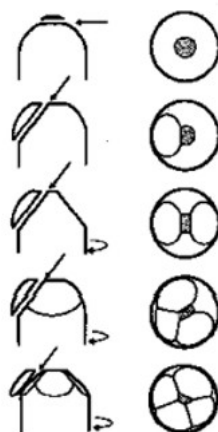
**Epoxidové pryskyřice** – vytvrzují se teplem 60 °C (termoset) po dobu 48 hod. Jsou odolné proti teplu a rozpouštědlům a po polymerizaci nejsou patrná žádná poškození. Řezací vlastnosti jsou závislé na poměru složek směsi pryskyřicového monomeru (epoxidová pryskyřice, tužidlo, katalyzátor, změkčovač). Mezi tyto látky patří Araldit, Epon 812 (velmi často užívaný), DER-334.

**Polymerizace** Existuje několik způsobů, jak nastartovat polymerizaci zalévacího média:

1. Teplem při teplotách do 60 °C. Tento způsob je obvyklý především u epoxidových pryskyřic. Dochází při něm však k značnému snížení imunoreaktivity vzorku.
2. Ozářením UV zářením lze nastartovat polymerizaci především u akrylátových pryskyřic v teplotním intervalu od pokojové teploty dolů.
3. Přidáním chemického katalyzátoru nebo iniciátoru polymerizace. Ten bývá kombinován s dodáním energie UV zářením nebo tepla.

**Postup při zalévání do bločku** Dehydratační činidlo v posledním kroku odvodnění je nahrazeno směsí (50 : 50) dehydratačního činidla a epoxidové pryskyřice. Následuje infiltrace ve 100% roztoku pryskyřice. Bloček tkáně je přenesen na dno želatinové kapsle a zalit zalévací hmotou. Nakonec se provede ořezání bločku do tvaru komolého jehlanu, přičemž ploška ploška by měla mít velikost 0,5 mm. Postup při ořezání bločku je naznačen na obr. 49.





Obrázek 49: Postup při ořezání bločku.

## 10.6. Ultramikrotomie

Pro reprodukovatelnost ultratenkých řezů je nutné splnit některé podmínky. Všechny pohyby musí být bez vibrací, příslušné mechanismy musí mít minimální tření, tyč s držákem vzorku musí zajistit tloušťku řezu k hodnotě 10 nm a po provedení řezu musí utlumit rázy způsobené řezáním. Ultramikrotomy většinou k posuvu bločku k hraně nože využívají tepelné dilatace měděné tyče. Jiné ultramikrotomy jsou konstruovány s mechanickým posunem. Předností termodilatačního ultramikrotomu je schopnost krájet i velmi tvrdé materiály, mechanický ultramikrotom je naopak velmi stabilní v tloušťce ultratenkých řezů. Výhody obou výrobci spojili u kombinovaných typů. Schéma ultramikrotomu, ze kterého je zřejmé, že v jeho pohyblivém vahadlu je umístěn bloček, který je přibližován k řezné hraně nože, upevněného ve stolku proti němu, je na obr. 50.



Obrázek 50: Pozice nože proti bločku ve výkyném držáku.

## 10.7. Nože

Nutné vlastnosti nožů pro dosažení kvalitních řezů:

1. poloměr křivosti hrany nože musí být menší než je nejmenší požadovaná tloušťka řezu,
2. tvrdost a tuhost nože musí odolávat nárazům bločku se vzorkem,
3. odolnost vůči chemickému rozkladu,
4. homogenita materiálu nože podél jeho hrany,
5. fyzikální stabilita při pokojové teplotě.

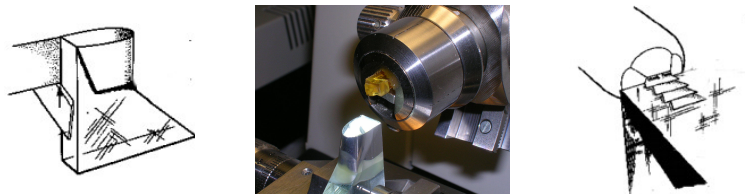
Diamantové nože jsou odolné, ale poměrně drahé, skleněné nože jsou křehké pro tvrdé tkáň (kosti), ale levné. Skleněné nože se připravují lomem ze čtvercové destičky speciálními zařízeními (*knife maker*, obr. 51), která dávají reprodukovatelné výsledky (délka, pozice hrany, působiště ohybové síly a její velikost).

Před krájením je třeba u řezné hrany vytvořit vaničku (obr. 52), do které se napustí voda, na jejíž hladinu se splavují po skrojení ultratenké řezy. Vanička vznikne nalepením stříbrné pásky nebo plastového přípravku a utěsní se (např. lakem na nehty). Kvalitu nožů hned po lámání určíme podle velikosti



**Obrázek 51:** Knife maker – přípravek pro lámání skleněných desek pro výrobu skleněných nožů.

protiplošky, která by u nožů pro ultratenké krájení měla být menší než 0,2mm. Další chyby lze odhalit ve stereomikroskopu ultramikrotomu při vhodném osvětlení suchého nože. Připravené skleněné nože skladujeme na suchém a bezprašném místě.



**Obrázek 52:** Vanička na skleněném noži (postup přípravy, reálný pohled, splavování řezů na vodní hladinu).

Diamantový nůž poskytuje výrazně kvalitnější ultratenké řezy (obr. 53). Z důvodu vysoké ceny diamantových nožů se většinou bločky předřezají na skleněném noži a diamantový nůž se použije až na ultratenké řezání. Hlavním problémem při použití diamantového nože je jeho čištění a hydrofobnost, takže občas je problematické dostat hladinu ve vaničce k řezné hraně. Pokud na hraně nezůstaly zbytky pryskyřice, stačí nůž opláchnout proudem čisté vody nebo s přidávkem saponátu. Zbytky pryskyřice je možné odstranit přejetím hrany polystyrenovou tyčinkou namočenou v etanolu nebo ve speciálních přístrojích určených pro mytí diamantového nože. Na diamantové nože pro kryoaplikace se kladou ještě vyšší nároky.



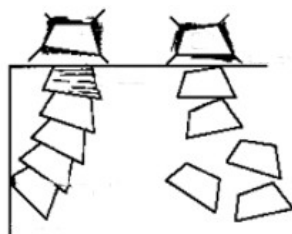
**Obrázek 53:** Diamantové nože pro klasické preparáty a pro kryořezy.

## 10.8. Kvalita řezu

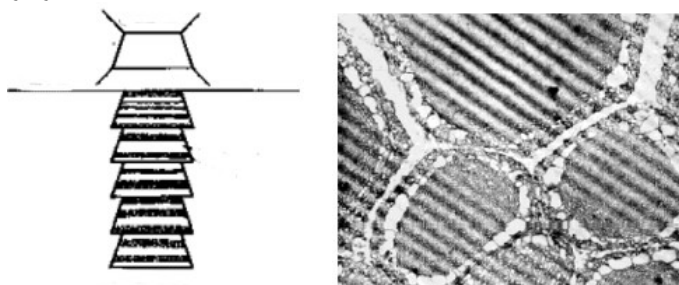
Kvalita ultratenkého řezu závisí na kvalitě nože, především jeho ostrosti, dobře připraveném bločku, který umožňuje pravidelné řezání a na kvalitě ultramikrotomu, zejména s ohledem na tlumení vibrací atd. Při řezání je řezaná tkáň stlačována a není-li dostatečně homogenní zalévací médium, není rovná řezná hrana nože, či vznikají-li vibrace tyče ultramikrotomu, není možné získat kvalitní ultratenký řez. Na obr. 54 je patrné, k jakým změnám dochází ve tkáni při řezání, na obr. 55 je znázorněn vliv špatného ořezání bločku a na obr. 56 je vidět projev špatného tlumení vibrací a vznik odpovídajícího artefaktu.



Obrázek 54: Působení sil při řezání tkáně.



Obrázek 55: Chybný sklon ořezaného bločku.



Obrázek 56: Vibrace při řezání na ultramikrotomu a jejich projev při zobrazení tkáně.

## 10.9. Kontrastování

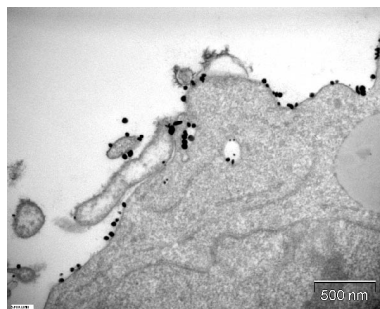
Kontrastování se provádí proto, aby těžké kovy zvýšily kontrast vzorku při prozařování elektronovými svazky. Používá se uranylacetát, kyselina fosfowolframová, citrát olova,  $\text{KMnO}_4$ . Způsob, který se používá nejvíce, je selektivní adsorpce těžkých kovů na buněčné organely. Těžké kovy více rozptylují primární elektrony a zvyšují tak kontrast struktur, na které se adsorbovaly. K prvnímu kontrastování dochází již při fixaci  $\text{OsO}_4$ . V ostatních případech se řezy kontrastují buď před zalitím, nebo po nakrájení na ultratenké řezy přímo na sítkách. Kontrastování vzorku v bloku se provádí buď okamžitě po fixaci, nebo při odvodňování. Ve srovnání s kontrastováním ultratenkých řezů nemají vzorky kontrastované v bloku takový kontrast a ostrost. Při kontrastování ultratenkých řezů se nejčastěji používá octan uranylu a citrát olova. Octan uranylu reaguje především s nukleovými kyselinami, ale také s proteiny. Citrát olova zvyšuje obecně kontrast membrán, proteinů, nukleových kyselin a glykogenu. Pokud se ke kontrastování použijí postupně obě látky, vzorek získá rovnoměrný kontrast všech buněčných struktur.

## 10.10. Značení koloidním zlatem (imunohistochemické metody)

Pro pozorování specifických struktur buněk a tkání lze použít úpravu preparátu, založenou na značení pomocí protilátek. V tomto případě jsou na sekundární protilátky navázány velmi malé (obvykle 5 až 15 nm) koloidní zlaté částice. Protože jsou tyto částice elektrodensní, jeví se v elektronovém mikroskopu jako tmavé tečky (obr. 57).

## 10.11. Repliky

Jak již bylo uvedeno, vzorky silnější než  $0,1 \mu\text{m}$  nemohou být v TEM studovány z důvodu absorpce a rozptylu elektronů v látce. Zejména u kovů, které není možné připravit v podobě tenkého řezu, bylo nutné najít způsob, jak zajistit *otisk povrchu*. Metody vytváření replik se dnes používá zejména v kombinaci s metodami mrazového leptání.

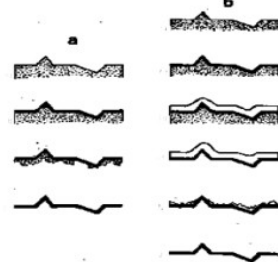


**Obrázek 57:** Buňky K562 fixované aldehydem a před zalitím (Epon) značené koloidním zlatem (velikost částic 15 nm).

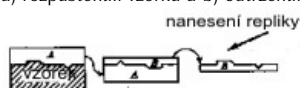
Repliky se dělí na jednostupňové a dvoustupňové, pozitivní a negativní. *Jednostupňový pozitivní otisk* se utvoří tak, že objekt se ve vakuu nejprve šikmo nastínuje kovem a pak se na něj kolmo napaří silnější krycí vrstva uhlíku. Replika se potom splaví nebo sejme pomocí plastické hmoty. *Jednostupňový negativní otisk* se připraví tak, že se na objekt kolmo napaří ve vakuu vrstva uhlíku a stínuje se až sejmutá replika (obr. 58). Není-li možné repliku jednoduše sejmut, musí se snímat jednostupňový otisk pomocí podpůrné vrstvy plastické hmoty, která se nechá zaschnout, potom se plastická hmota strhne pomocí samolepicí pásky, a ta se rozpustí v acetonu (obr. 59). *Dvoustupňový negativní otisk* vznikne, pokud se na objekt nanese dostatečné množství výše zmíněných roztoků kolodia nebo formvaru a po zaschnutí se první stupeň repliky sejme pomocí samolepicí pásky. Na otiskovou stranu se napaří ve vakuu vrstva uhlíku a tato uhlíková vrstva se šikmo nastínuje kovem. V závěru se rozpustí samolepicí páska i plastická hmota. U pozitivního dvoustupňového otisku se po sejmutí repliky nejprve otisková strana postínuje kovem a pak se na ni napaří vrstva uhlíku (obr. 60). Ve všech případech tloušťka repliky nesmí přesáhnout 20 nm.



**Obrázek 58:** Tvorba negativní repliky: nanesení plastického (nebo C) filmu, sloupnutí a stínování.



**Obrázek 59:** Způsob vytváření replik: a) rozpuštěním vzorku a b) odtržením z povrchu a odstraněním pásky.



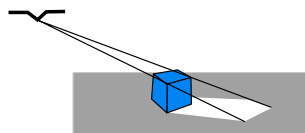
**Obrázek 60:** Příprava pozitivní repliky.

## 10.12. Stínování těžkými kovy

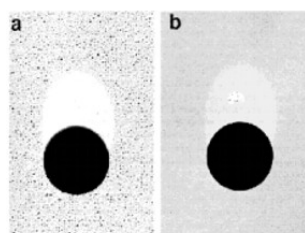
Ke zvýraznění povrchové topografie ultratenkého řezu nebo repliky se používají „těžké“ kovy, které se napařují na povrch kovu ze strany (obr. 61). Kovy musí mít vysokou hustotu a musí být inertní vzhledem k chemickým vlivům a teplotě. Používají se Au, Pd, Cr, Ni, Ge, Pt, U. Nevýhodou Cr je, že pod 5 nm vykazuje granularitu. Slitina Pt a Pd (v poměru 3:1) je vhodnější než čistá platina. Tloušťka stínované vrstvy je 0,3–1,5 nm. Na obr. 62 jsou latexové kuličky stínované zlatem a slitinou zlata a paladia.

## 10.13. Metody mrazového sušení, lomu a odpařování

Kromě chemické fixace lze pro TEM připravit vhodné preparáty z biologických objektů i za použití fyzikálních postupů, tedy nejčastěji prudkým snížením teploty. Jejich předností je, že zachovávají preparát



Obrázek 61: Princip stínování.



Obrázek 62: Latexové kuličky (0,3 μm) stínované a) Au, b) Au-Pd.

co nejlíže nativnímu stavu. Pro tyto metody existuje řada přístrojů, které umožňují biologické objekty zmrazovat, krájet, sušit atd.

*Mrazová fixace* využívá toho, že většina živých organismů obsahuje více než 70 % vody nerovnoměrně rozdělené do membránami ohraničených oblastí. Při zmrazování však musíme respektovat fyzikální jevy. Objem vody ve zmrazeném stavu je zhruba o 9 % větší než v kapalném stavu. Hustota vody není nejvyšší v bodě tuhnutí, ale v kapalném stavu při teplotě 277 K (anomálie vody). Voda má vysoký bod tání (273 K), bod varu (373 K) a ve fázovém diagramu odpovídá kritickému bodu teplota 647 K. Voda má vysoké vypařovací teplo a relativní permitivitu, což napomáhá rozpouštění látek ve vodě. Navíc je známa řada krystalických forem ledu, což v praxi znamená, že hrozí poškození ultrastruktury v důsledku potrhání buněk zvětšujícím se objemem nebo tvořícími se krystaly. Bylo by možné popsat mechanismy zamrznutí vody, ale již z naznačeného výčtu vyplývá, že základní podmínkou pro minimalizaci škod při zmrazení preparátu je dosažení vysoké chladicí rychlosti. V literatuře se uvádí [20], že pro kvalitní kryofixaci je nutná chladicí rychlost minimálně  $10^4$  K/s<sup>-1</sup>. Pokud není této rychlosti dosaženo, je vzorek vystaven nebezpečí poškození.

Kryofixace má oproti chemické fixaci řadu výhod. Buňky mohou být pozorovány v mikroskopu v jejich přirozeném extra a intracelulárním prostředí, a to i v případě ultratenkých řezů. Při kryofixaci nedochází k denaturaci enzymů a antigenů. Buňky jsou při kryofixaci imobilizovány ve zlomku vteřiny, ale pouze pokud máme vhodná chladicí média.

## 10.14. Chladicí média

Chladicí médium musí mít velmi dobrou tepelnou vodivost, tekutost při nízkých teplotách a relativně vysokou hustotu. Navíc by byla ideální nízká cena a možnost bezpečné manipulace s ním. Všechny tyto podmínky nesplňuje žádné chladivo. Nejběžnějším laboratorním chladivem je kapalný dusík, který má tu nevýhodu, že má velmi blízko bod tání a bod varu. Důsledkem toho je, že vhození i rozměrově nepatrného vzorku vede k varu kapalného dusíku na jeho povrchu, spojenému s uvolňováním plynu, který vzorek obalí a izoluje. Sníží se tak rychlost odvodu tepla. Při použití kapalného dusíku je nezbytné vzorek ošetřit kryoprotektantem.

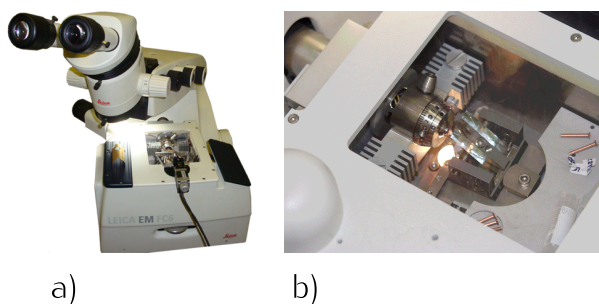
O kvalitě mrazové fixace do značné míry rozhoduje způsob jejího provedení. Z podmínek, které musí být splněny, jsou nejdůležitější jednoduchost, reprodukovatelnost a rychlost. Při *imerzní kryofixaci* je kousek tkáně připevněný na kovovém nosiči nebo koncentrovaná suspenze na síťce ponořena do kapalného chladiva. *Sprejová metoda* je použitelná pouze pro suspenze buněčných frakcí, izolované buňky, víry apod., kdy malé kapičky suspenze jsou vstříkovány do chladicího média. Při metodě *jet freezing* se vzorek stále pohybuje v chladicím médiu s konstantní teplotou. Při *mražení pomocí kovového bloku* je vzorek naražen na povrch vychlazeného a vyleštěného kovového bloku. Vrstva vzorku, která byla v těsném kontaktu s kovem, obsahuje amorfní led, který ve větší vzdálenosti přechází v klasické hexagonální uspořádání. *Mražení při vysokém tlaku* vyžaduje speciální aparaturu (obr. 63), ve které dochází ke zmrazení vzorku za sníženého tlaku, takže k mražení lze použít i kapalný dusík. Podle dostupné literatury poskytuje skvělé a reprodukovatelné výsledky.



**Obrázek 63:** Přístroj pro dosažení hlubokého a rychlého zamražení ve vakuu (RMC RFD-9010 Freeze Fracture System).

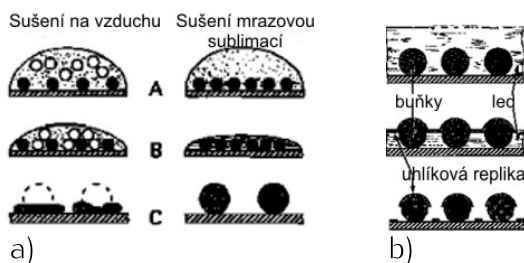
## 10.15. Zpracování zmraženého preparátu

Po kvalitní kryofixaci je třeba vzorek dále zpracovat pro prohlížení v TEM. K moderním ultramikrotomům (obr. 64a) je možné zakoupit kryokomoru, ve které se dají připravovat ultratenké řezy při teplotách okolo  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (obr. 64b). Podle možností laboratoře a vybavení přístroje je možné přímo pozorovat kryorezy, za předpokladu, že je TEM vybaven kryodržákem, umožňujícím pozorovat vzorky ve zmrazeném stavu. V souvislosti s tím je nutné mít možnost prohlížet preparáty v režimu minimálního ozáření urychlenými elektrony (low dose), aby nedocházelo k jejich zahřívání a k odpařování ledu z jejich povrchu. Další možností je po nakrájení kryorezy vysušit řízenou sublimací ledu a vysušeným vzorkům dodat kontrast stínováním. Existují však další postupy (imunozařování, kryosubstituce, atd.), které vyžadují další pomůcky pro přípravu preparátů. Nevýhodou kryometod je potřeba náročného technického vybavení.



**Obrázek 64:** a) Kryoultramikrotom Leica, b) detailní pohled na kryokomoru.

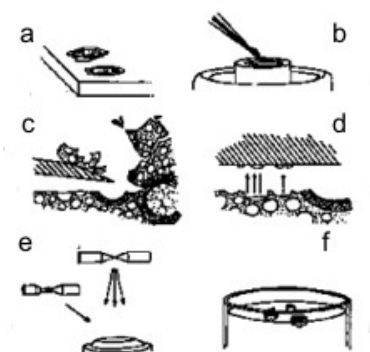
Na obr. 65a) je na příkladu suspenze ultramalých částic schematicky naznačen rozdíl mezi sušením na vzduchu a mrazovým sušením (freeze drying). Zatímco při vysoušení na vzduchu dochází k agregaci částic, případně u buněk k jejich deformaci, u mrazového sušení je po sublimaci ledu zachováno rozdělení částic (buněk) a je zachován i jejich tvar bez deformace. Při mrazovém sušení buněk může být jako mezistupeň zařazeno nanesení uhlíkového filmu pro dosažení lepšího kontrastu (obr. 65b).



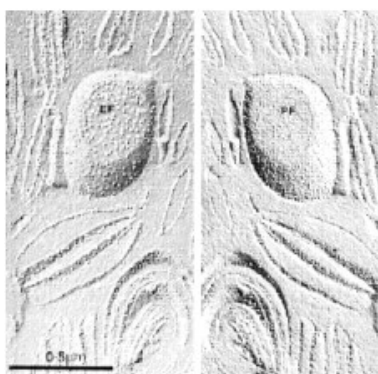
**Obrázek 65:** a) Rozdíl mezi sušením na vzduchu a mrazovým sušením, b) kontrastování odsublímaného povrchu.

Postup metody „mrazového lámání“ (freeze fracturing) je znázorněn na obr. 66. Při mrazovém lomu je obnažena ultrastruktura, která je po rychlém zamražení (a, b) ve vakuovaném prostoru řezána nožem nebo kontrolovaně zlomena (c). Absence chemické fixace poskytuje zachování ultrastruktury. Po odsublímaní povrchové vrstvy cca 10–30 nm (d) můžeme vytvořit repliku povrchu (e), která je následně čištěna ve vhodném roztoku od tkáně (f). Rozlišení je dáno zrnitostí nanášeného materiálu, z něhož je

replika vyrobena. Vytvoří se reliéf povrchu. Povrchová topografie kopíruje buněčné membrány a organely (obr. 67). Povrch se bezprostředně stínuje kovem a nanáší se uhlíkový film pro vytvoření repliky.



Obrázek 66: Postup při metodě „Freeze fracturing“ a „Freeze etching“.



Obrázek 67: Repliky izolovaných thylakoidních membrán chloroplastů.

## 11. Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) má díky svému analytickému potenciálu široké uplatnění v řadě vědních a průmyslových oborů. V biologii je důležitý pro lékařské vědy (anatomie, histologie, patologie, ...), botaniku a zoologii. Uplatňuje se v geologii, metalografii, mikroelektronice, strojírenství, gumárenském průmyslu apod.

V SEM je možné pozorovat objemné preparáty, jejichž velikost je limitována velikostí preparátové komory. Vodivé materiály (kovy, polovodiče) není třeba zvlášť připravovat. Biologické preparáty zpravidla vyžadují speciální přípravu, neuvažujeme-li mikroskop s volitelným vakuem (environmentální SEM) nebo nepracujeme-li v režimu nízkého napětí (low voltage SEM).

U biologických preparátů je třeba posoudit, zda se jedná o tkáň tvrdé či měkké. Tvrdé tkáně, jako jsou např. kosti, vlasy, zuby, kutikulární vrstvy u hmyzu, schránky rozsivek, dřevo aj., vyžadují pouze zajištění vodivosti povrchu. Měkké tkáně vyžadují složitější postup zahrnující fixaci, odvodnění, vysušení, pokovení, tedy zhruba stejný postup jako u TEM.

### 11.1. Zvláštnosti pozorování biologických preparátů v SEM

Biologický materiál je materiál dielektrický (nevodivý), náchylný k poškození elektronovým paprskem. Při dopadu elektronů na povrch nevodivého vzorku, jsou elektrony špatně odváděny z povrchu a vznikají na něm oblasti s velkou hustotou plošného náboje. Hovoříme o tzv. „nabíjení“ povrchu (obr. 41). Pokud k němu dochází, sekundární elektrony jsou ovlivňovány povrchovým nábojem, který zároveň působí svou negativní povahou na dopadající primární elektrony a povrch není věrně zobrazen.

Pro dosažení kvalitního snímku je možné provést snížení urychlovacího napětí k hodnotám jednotek kV, případně použít mikroskop v režimu nízkého vakua. Vrstva těžkého kovu, nanosená na povrch, po-

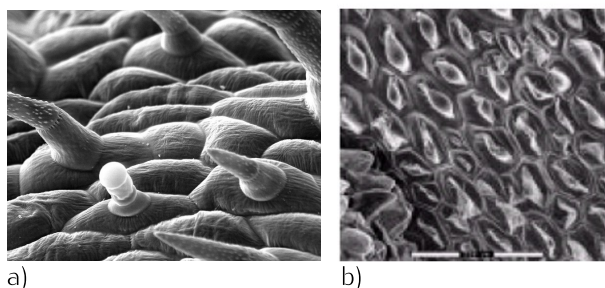
skytne větší emisi sekundárních elektronů i tepelnou ochranu biologického vzorku. Z tohoto důvodu se používají metody katodového naprašování, při němž se na povrch nanese nejčastěji vrstvička Au nebo slitiny Au-Pd o tloušťce, která nenaruší ultrastrukturu povrchu (10 nm).

*Katodové naprašování* je založeno na vzniku doutnavého výboje v prostředí nízkotlaké argonové atmosféry účinkem elektrického napětí mezi katodou a anodou. Při výboji dochází k ionizaci plynu a vzniklé ionty jsou přitahovány ke katodě, která je tvořena naprašovaným kovem. Urychlené ionty z něj vyrážejí částice kovu, které nesou záporný náboj a směřují k anodě, tvořené stolem, na kterém jsou umístěny vzorky. V prostoru komory naprašovačky se rozptylují srážkami s dalšími molekulami a ionty plynu, takže vznikne prostorový mrak plazmy, který dokonale obalí povrch preparátu tenkou vrstvičkou kovu. Magnetické pole hlavy (katody) soustřeďuje ionty směrem na stolek. Tloušťka naprášené vrstvy by měla být dostatečná, aby odvedla náboj, ale neměla by zakrývat povrchové detaily. Napětí a doba naprašování určuje tloušťku naprašované vrstvy, čímž je možné tuto tloušťku empiricky stanovit nebo lze použít krystalové detektory, které měří tloušťku naprášené vrstvy. Detail naprašovacího zařízení je na obr. 68.



Obrázek 68: Naprašovací zařízení (SCD – Sputtering coater device).

**Měkké tkáně** – rostlinná pletiva a buňky, živočišné tkáně a buňky vyžadují větší pozornost. Ve vakuu dochází k jejich rychlému vysušování a deformaci. Pro srovnání uvádíme obr. 69a), na němž jsou věrně zobrazené pokožkové buňky listu, a obr. 69b), kde jsou deformované nešetrným vysušením. Příprava měkkých tkání je obdobná jako příprava tkání pro TEM.



Obrázek 69: a) Pokožkové buňky na listu s trichomy, b) vysušení rostlinného pletiva ve vakuu.

## 11.2. Chemické metody

Obvykle příprava biologického objektu pro SEM zahrnuje následující kroky:

1. odběr vzorku, (v případě potřeby očištění),
2. fixace preparátu (nejčastěji ponořením do fixačního činidla),
3. vymytí fixačních roztoků a odvodnění vzorku,
4. vysušení preparátu a jeho nalepení na podložný terčík,
5. zvýšení povrchové vodivosti preparátu.



Tento postup je časově náročný a zabere zhruba dva až tři dny. Protože u SEM může být preparát objemnější, musíme si uvědomit, co nás na něm zajímá. Zda chceme pozorovat jen vnější povrch nebo budeme pozorovat i detaily uvnitř preparátu. Tomu musíme podřídit režim fixace. U velkých vzorků je problém s dokonalým vysušením.

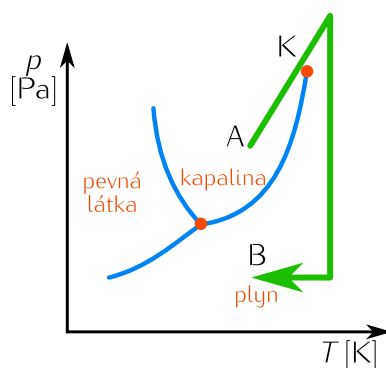
**Chemická fixace** Hlavním úkolem fixace je, stejně jako v TEM, stabilizovat preparát co nejbližší přirozenému stavu. Navíc má fixace zpevnit struktury preparátu, které chceme pozorovat. K fixaci se nejvíce používají aldehydy a oxid osmičelý ve stejných koncentracích jako v TEM. Glutaraldehyd je účinnou fixací, ale jen velmi pomalu proniká do větších vzorků, které se pro SEM fixují velmi často. *Formaldehyd* vyniká rychlejší penetrací do vzorku a proto je vhodnější k fixaci větších objektů, kde nezáleží na zachování buněčné ultrastruktury. *Oxid osmičelý* má velkou reaktivitu a z ní vyplývající rychlost fixace, dále nízký osmotický účinek a zvyšuje permeabilitu membrán. Při fixaci neproniká příliš rychle dovnitř preparátu, zůstává na povrchu a díky tomu jej zpevňuje a přispívá také ke snížení povrchového náboje.

Cílem *odvodnění* je postupné nahrazení vody ve vzorku organickým rozpouštědlem. K odvodnění se používají rozpouštědla dobře mísitelná s vodou, nejčastěji etanol, aceton. Při odvodnění vzorek projde řadou roztoků se zvyšující se koncentrací organického rozpouštědla, např. 30, 50, 70, 80, 90, 95 a 100%. Důležitou podmínkou je, aby preparát během odvodňování byl stále pod hladinou roztoků a nevyschnul. Čas jednotlivých kroků při odvodňování závisí na velikosti preparátu a pohybuje se od 10 do 30 min.

Pokud k sušení vzorku bude použita metoda obejití kritického bodu, je třeba vzorky v etanolu v závěru převést do acetonu z důvodu omezené mísitelnosti etanolu s kapalným oxidem uhličitým, který se při metodě kritického bodu používá.

Po úplném nahrazení vody je vzorek třeba zbavit dehydratačního činidla. K sušení preparátu se využívá téměř výhradně metody obejití kritického bodu (CPD – Critical Point Drying). Při sušení na vzduchu by došlo ke tvarovým deformacím v důsledku existence povrchového napětí, navíc zintenzivněného rychlým odpařením dehydratačního činidla.

*Metoda kritického bodu* je založena na skutečnosti, že při zahřívání kapaliny v omezeném prostoru se docílí stavu, který se označuje jako kritický a je charakterizován kritickou teplotou a tlakem (viz fázový diagram na obr. 70). V tomto stavu mizí veškeré rozdíly mezi oběma fázemi dané látky – fáze mají stejnou hustotu a měrný objem, nejsou odděleny rozhraním a povrchové napětí klesá na nulu. Právě v tomto bodě je kapalina převedena na plyn, který se vypustí z uzavřené komory, a tímto způsobem je připravovaný vzorek vysušen bez poškození povrchovým napětím kapaliny, ve které se nachází.



Obrázek 70: Fázový diagram s vyznačením kritického bodu.

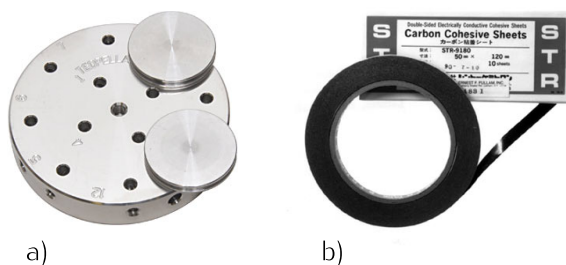
Dosáhnout kritické teploty a tlaku u vody je v laboratorních podmínkách prakticky nemožné ( $p_K = 21,8 \text{ MPa}$ ,  $T_K = 647 \text{ K}$ , tj.  $374 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Nejvíce se k těmto účelům využívá kapalným oxid uhličitý, který je běžně dostupný a levný a parametry kritické teploty a tlaku jsou snadno dostupné –  $p_K = 7,3 \text{ MPa}$ ,  $T_K = 304 \text{ K}$  ( $31 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Metoda se provádí ve speciálních aparaturách. Pro tento proces se využívají zařízení CPD (Critical point dryer), která řídí celý proces automaticky (obr. 71). Komora, ve které jsou uloženy vzorky ve speciálních pouzdrech, se pomalu, aby nevznikly turbulence, které by mohly poškodit preparát, napustí kapalným oxidem uhličitým. Ten se několikrát vymění, aby došlo k úplnému nahrazení organického rozpouštědla. Proces obejití kritického bodu je automatický. S rostoucí teplotou roste i tlak v komoře, až dosáhne kritického bodu. Potom otevřeme vypouštěcí ventil a pomalu, aby rychlá dekomprese nepoškodila vzorky, vypustíme plynný oxid uhličitý. Po dosažení atmosférického tlaku komoru otevřeme a vyjmeme vysušené preparáty.

Abyste nedošlo k opětovnému zvlhnutí preparátu, je třeba jej co nejdříve nalepit na vhodný nosič a pokovit. Nosičem jsou nejčastěji hliníkové kruhové podložky lišící se průměrem u různých typů SEM. Často jsou přizpůsobeny tak, aby bylo možné použít držák pro několik podložek (obr. 72a). Použité



Obrázek 71: Zařízení pro sušení preparátů metodou obejití kritického bodu.

lepidlo musí splňovat řadu podmínek. Nesmí obsahovat vodu, nemělo by být hydroskopické, mělo by být nevzlínavé, aby nezakrývalo povrchové detaily vzorku, mělo by být stabilní ve vakuu a neměnit zde své vlastnosti, tzn. udržet vzorek na nosiči při náklonu, mělo by být elektricky vodivé a nemělo by emitovat stejně jako nosič zpětně odražené elektrony. Velké objekty se zpravidla lepí přímo na hliníkový terč pomocí koloidního stříbra, malé objekty pomocí oboustranně lepicí uhlíkové nebo adhesivní pásky (obr. 72b). Je důležité zajistit vodivost preparátu a v případě potřeby pomocí koloidního stříbra vytvořit vodivé spojení na hranicích mezi povrchem nosiče a lepicí páskou.

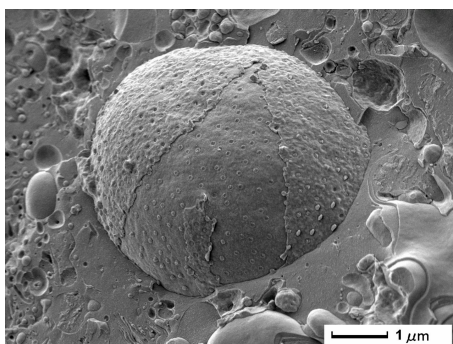


Obrázek 72: a) Hliníkové podložky na preparáty (umístěné na karuselovém držáku podložek), b) oboustranná uhlíková lepicí páska.

### 11.3. Mrazové metody

Mrazové metody se vyznačují rychlostí přípravy při zachování povrchové struktury a v případě SEM dávají možnost nahlédnout do struktury vnitřních tkání nebo buněk prostřednictvím mrazového lámání. *Mrazové lámání* odhaluje vnitřní povrchy buněčných organel, protože lom se ve zmrazeném materiálu šíří cestou nejmenšího odporu, nejčastěji podél membrán. Na obr. 73 je např. snímek mrazového lomu jdoucího zmraženou ledvinovou tkání. Z obrázku firmy Gatan jsou patrné zachovalé póry v tubulech tkáně. *Mrazové leptání* s částečnou sublimací ledu z obnaženého povrchu lomem zvýrazní prohlubně a vakuoly. Po nastínování se preparát prohlíží ve zmrazeném stavu v mikroskopu vybaveném kryodržákem.

*Mrazové sušení* spočívá v tom, že zmrazený preparát se přemístí do vakua a nechá se z něj vysublimovat led. Mrazové sušení se provádí ve specializovaných aparaturách, kde je možné řídit rychlost sublimace.



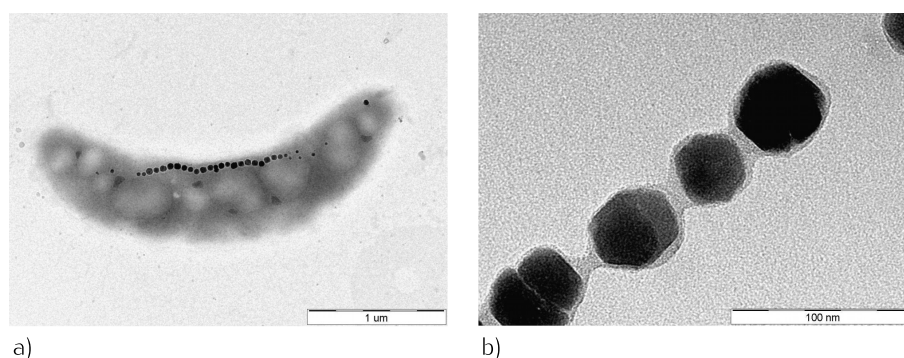
Obrázek 73: Metoda mrazového lomu použitá k zobrazení ledvinové tkáně (použito z materiálu firmy Gatan).

## 12. Příklady aplikací TEM a SEM

### 12.1. Využití TEM při charakterizaci magnetosomů

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa s vhodnou povrchovou modifikací mohou být využívány v řadě biochemických a biomedicínských aplikací, jako například v zobrazení pomocí magnetické rezonance (MRI), k léčbě nádorů apod. Všechny tyto aplikace vyžadují nanočástice vykazující vysokou hodnotu magnetizace, minimální distribuci velikostí, netoxicitu a biokompatibilitu. Jedním z nejvhodnějších materiálů, splňující tyto podmínky, je biogenní magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), vyskytující se v tzv. magnetotaktických bakteriích.

*Magnetotaktické bakterie* (obr. 74a) jsou mikroorganismy, objevené roku 1975, které uvnitř svého těla syntetizují magnetické částice. Vyskytují se běžně ve sladkovodních i mořských prostředích, prokázána byla jejich přítomnost v lokalitách v USA, Německu, Číně, Japonsku a Brazílii. Existuje několik druhů těchto bakterií, lišících se tvarem, velikostí či počtem magnetických částic, tzv. magnetosomů. Magnetosomy pak v bakteriích vytváří řetězky, které se orientují jako střelky kompasu, které jsou vyrovnány souběžně se zemským magnetickým polem a umožňují tak, aby bakterie snáze našla její nejpřirozenější prostředí – mikroaerofilní zónu rozhraní kal/voda.



Obrázek 74: a) Magnetotaktická bakterie, b) magnetosomy společně se svou biologickou membránou.

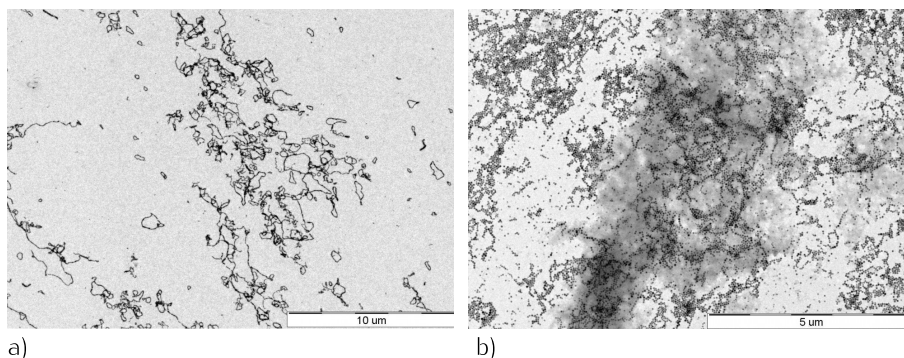
Předností magnetotaktických bakterií je produkce biokompatibilního magnetitu. Magnetotaktické bakterie byly testovány pro použití v řadě aplikací, například identifikaci severního a jižního pólu silně magnetických granulí v meteoritech nebo k rozpoznání jemných magnetických materiálů. Byly také testovány v případech adsorpce iontů těžkých kovů v odpadních vodách. Z hlediska nanomateriálového výzkumu jsou zajímavé především kmeny magnetotaktických bakterií, které jsou kultivovatelné a dostupné v čisté kultuře.

Výhodou bakteriálních magnetosomů je jejich shodný tvar a fosfolipidová membrána (obr. 74b), která umožňuje navázání bioaktivních látek. Magnetosomy tedy mohou sloužit jako nosiče léků, enzymů nebo protilátek v biologických oborech.

Kultivace magnetotaktických bakterií je jedním z nejdůležitějších procesů při získávání magnetosomů. Magnetotaktické bakterie a jejich magnetosomy, zmiňované v této aplikační části, byly získány z kultivace bakterií *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Z jednoho litru kultivace lze po rozbití bakterií získat magnetickou separací až 0,35 g magnetosomů v suchém stavu.

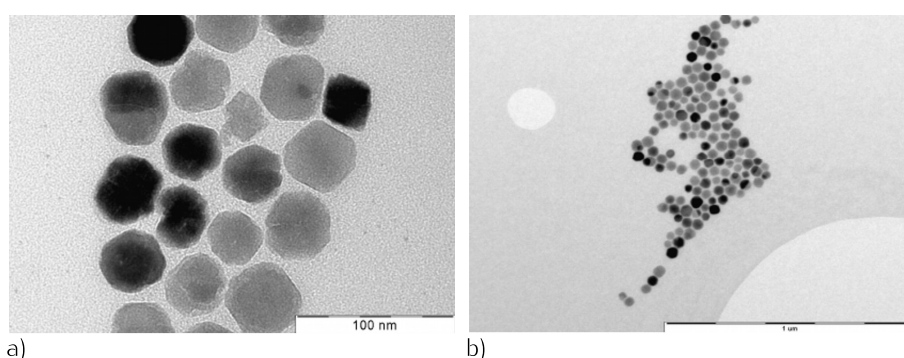
**Úprava povrchu magnetosomů a funkcionalizace** Hlavním cílem skupiny, zabývající se v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů PŘF UP v Olomouci magnetotaktickými bakteriemi, je získat čisté magnetosomy bez zbytků bakterií, obalit je a navázat na ně další látky vhodné pro využití v bioaplikacích. Proto bylo nejprve třeba ověřit, zda jsou izolované magnetosomy čisté, tzn. bez zbytků rozbitých bakterií. Na obr. 75a) je zřejmé, že suspenze s magnetosomy neobsahuje žádné zbytky rozbitých bakterií, avšak na obr. 75b), na kterém jsou magnetosomy získané z jiné kultivace, jsou patrné zbytky rozbitých bakterií.

**Povrchová modifikace magnetosomů** Z obr. 75b) je zřejmé, že magnetosomy se nevyskytují samostatně, ale vytváří aglomeráty. Pro řadu aplikací je velice důležité magnetosomy chemicky stabilizovat a zabránit tak jejich aglomeraci a degradaci. Toho je možné dosáhnout obalením magnetosomů organickými látkami včetně surfaktantů a polymerů, nebo obalením organickou vrstvou, jako např. polysacharidy. V mnoha případech pak obalové slupky magnetosomy nejen stabilizují, ale mohou sloužit i pro jejich další funkcionalizace, v závislosti na dalším využití. Prvním krokem povrchové modifikace magnetosomů



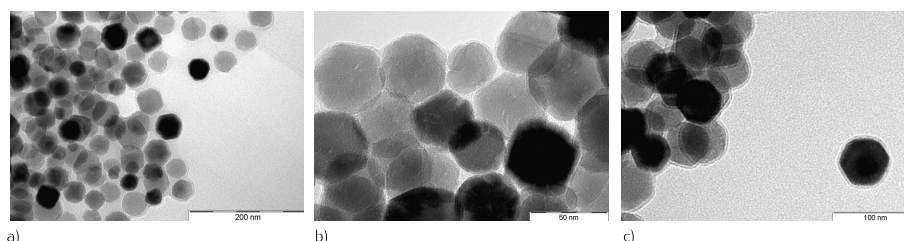
**Obrázek 75:** Magnetosomy a) bez zbytku rozbitých bakterií, b) se zbytky rozbitých bakterií.

bylo odstranění jejich membrány pomocí cetyl trimethylammonium chloride (CTAC) nebo dodecylsulfátu sodného (SDS). Z TEM snímků (obr. 76) je zřejmé, že v případě použití SDS–negativního surfaktantu i CTAC–pozitivního surfaktantu, dojde k rozbití řetězků a zamezení aglomerace po odstranění biologické membrány.



**Obrázek 76:** Magnetosomy bez membrány, která byla odstraněna a) CTAC, b) SDS.

Dalším krokem je samotné obalení magnetosomů biokompatibilními materiály, jako je chitosan, dextran a Tween 20 (obr. 77a–c).

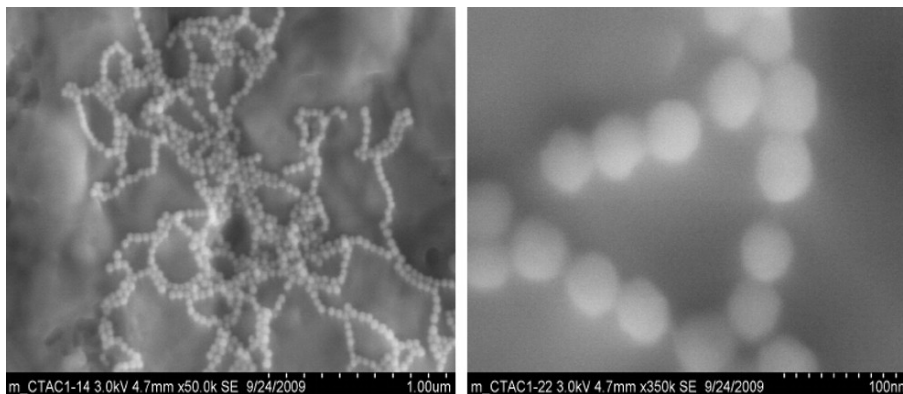


**Obrázek 77:** Magnetosomy obalené a) dextranem, b) chitosanem, c) Tweenem 20.

Z hlediska TEM bylo v některých případech obtížné identifikovat obalení různými činidly. Pro vytvoření kvalitních snímků bylo nutné nalézt magnetosomy uchycené na vnitřní straně otvorů v uhlíkové fólii (holey carbon). Tak bylo možné získat na snímcích magnetosomy bez podložního uhlíku a přesně tak identifikovat obalení. Pro získání přehledu o uspořádání magnetosomů ve vzorcích byl využit také SEM. Vzorek byl nakápnut na oboustrannou uhlíkovou pásku, uchycenou na kovovou podložku. Poté byl sušen 20 minut na vzduchu. Urychlovací napětí bylo nastaveno na 3 kV. Při vyšších napětích docházelo ke značnému nabíjení vzorků. Ze snímků na obr. 78 však není možné rozlišit, zda jsou magnetosomy obalené či nikoliv, protože v režimu sekundárních elektronů je zobrazován jen povrch magnetosomů.

## 12.2. Studium sluchových kůstek z archeologických nálezů

Sluchové kůstky jsou příkladem preparátu, který je příliš velký jako histologický objekt a naopak malý pro anatomy, protože představují nejmenší kůstky v těle. Pomineme-li sníženou tvrdost kostní tkáně v případě kůstek z archeologických nálezů, stačí pro jejich analýzu ve skenovacím elektronovém mikroskopu kůstky přilepit na držák a naprášit na ně vrstvičku vodivého materiálu (10 nm slitiny Au-Pd).



Obrázek 78: SEM snímky řetízků magnetosomů.

V této studii [17] byly sluchové kůstky, získané při archeologických vykopávkách z doby kultury únětické (Nové Dvory), z doby laténské (Ruzyně – Jiviny) a ze středověku (Beroun), po příslušné přípravě pro studium v SEM (Tesla BS 300) použity pro osteometrické vyšetření. Skenovací mikroskop ukázal řadu zajímavých nálezů: neobvyklý hrbol na anterolaterální ploše hlavičky kladívka (Beroun), vedoucí v jednom případě až k primární kostní fixaci kladívka ke stěně středoušní dutiny; kovadlinky s neobvykle krátkým dlouhým raménkem, s různými formami utváření processus lenticularis a s jeho zánětlivými apozicemi ve formě kostěných perel na povrchu těla kovadlinky; na třmínkách (obr. 79) bylo možno pozorovat skořepinovou konstrukci hlavičky.



Obrázek 79: Sluchová kůstka v SEM – třmínek.

Mezi laténskou skupinou ruzyňskou a středověkou skupinou berounskou se projevila při studiu v SEM řada diferenciací, které byly důležitým poznatkem při srovnávací anatomii tohoto materiálu s osteometrickými hodnotami ostatních kostí skeletu příslušných jedinců.

### 12.3. Včelí pyl jako monitor znečištění životního prostředí

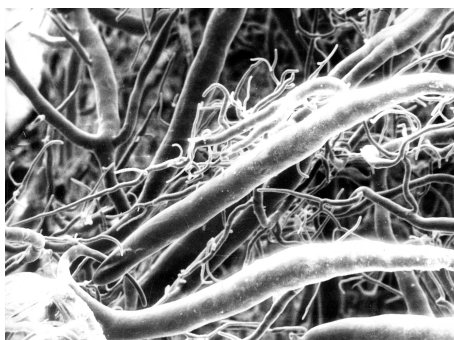
Život včelstva může být negativně ovlivněn neuváženým použitím pesticidů, nevhodně aplikovanými postřiky, ale také celkovým znečištěním prostředí. Jde zejména o emise chemického průmyslu, tepelných elektráren, cementáren, dopravy aj. Tyto emise obsahují také těžké a toxické kovy, které se dostávají z prostředí i k nadzemním částem rostlin a více či méně rozevřenými květy se dostávají k reprodukčním orgánům rostlin, které včely v době květu navštěvují.

Analytický potenciál elektronové mikroskopie byl v tomto případě [28] využit k nasnímání povrchu filtru, na který byl usazen depozit pylového materiálu. Zvětšení se pohybovalo do 200. Další rozbor ve vodě nerozpustných imisních částic na filtrech byl proveden pomocí energiově disperzní elektronové mikroanalýzy (EDX, Link Systém 860). Výhodou použité EDX analýzy spadu byla možnost získat přehled o zastoupení prvků na povrchu imisních částic. Výsledky metody upozornily na kovy přítomné v nerozpustných sloučeninách (např.  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Rentgenová difrakce potom ve shodě s výsledky EDX upozornila na lokality s vysokým výskytem ekotoxikologického spadu.

### 12.4. Studium cévního zásobení jater krysy

Na korozivních preparátech, zhotovených nástřikem portálního a arteriálního řečiště krysy monomermem meatakrylátu, byl ve skenovacím elektronovém mikroskopu studován preterminální a terminální úsek tohoto řečiště [16]. Naše pozorování podpořily existenci sfinkterů na jaterních sinusoidách i na

kapilárách arteriálního stromu v místě vyústění do sinusoid. Obdobným způsobem je možné připravovat otisky kapilárního řečiště i jiných orgánů. Příklad typického korozivního preparátu kapilárního řečiště mozku křesy je na obr. 80.

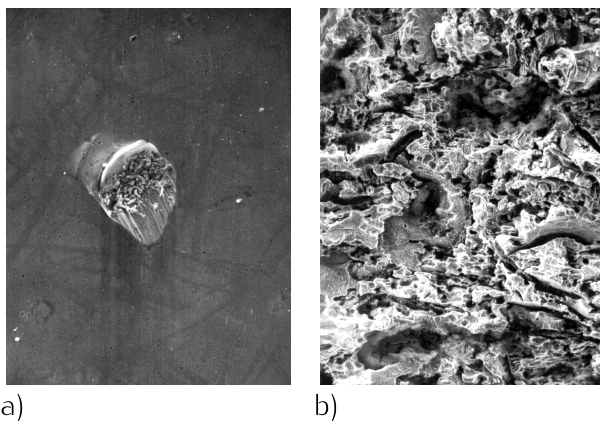


Obrázek 80: Korozivní otisk kapilárního řečiště mozku křesy v SEM.

## 12.5. Studium kavitačního opotřebení materiálu

Ideálním pomocníkem je skenovací elektronový mikroskop při analýzách povrchů kovů. Velmi často se jedná o faktografické analýzy. Při provozu čerpadel, případně armatur, je stále aktuální pochopení mechanismu kavitace. Ze studia kavitačního opotřebení exponovaných částí je třeba optimalizovat volbu kovových materiálů pro provozní podmínky čerpadel s cílem zvýšení jejich životnosti a spolehlivosti.

Ze získaných poznatků vyplývá [8], že k opotřebení materiálu při kavitaci může docházet jen následkem dynamického kontaktu kapaliny s funkčním povrchem součásti. Kavitační působení je tak intenzivní, že mu žádný dosud známý materiál nemůže trvale odolávat. Studium povrchu vzorků exponovaných v podmínkách kavitace blízkých reálným ukázalo, že povrch materiálu při kontaktu s kavitujiící kapalinou je vystaven jak mnohonásobnému zatížení, vedoucímu ke kumulaci plastické deformace a únavovému porušení, tak i k lokálnímu působení, vedoucímu u plastického materiálu ke vzniku kráteru následkem ojedinělého zatížení. Na vzorcích z hliníku, který je měkkým a tvárným materiálem, lze již v prvních minutách pozorovat lokální poškození ve tvaru kráterů různých rozměrů (obr. 81a). Na obr. 81b) je deformovaný povrch vzorku etalonu hliníku ČSN 42 4005 (99,5% Al) při pokročilém působení kavitace.

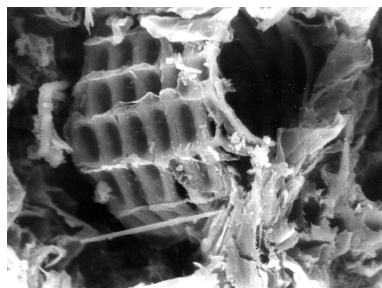


Obrázek 81: a) Účinek kavitační bubliny, b) pokročilý účinek kavitačního působení.

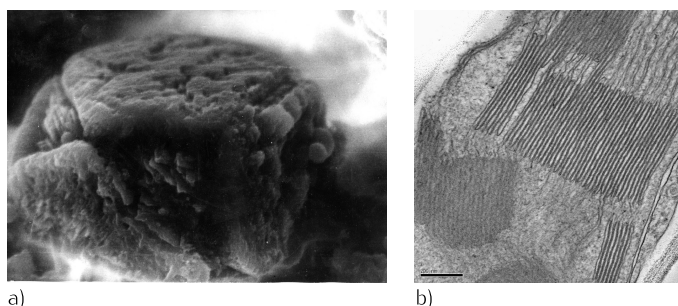
## 12.6. Studium chloroplastů

Rostlinná pletiva patří mezi biologické materiály, které obsahují velké procento vody. Z tohoto důvodu je třeba provádět pro analýzu v elektronovém mikroskopu pečlivou přípravu těchto preparátů. Jedna z aplikací, která vyžadovala vytipování vhodného fixačního a dehydratačního činidla při přípravě vzorků rostlinných pletiv, byla zaměřena na pozorování intaktních chloroplastů a chloroplastů 2. třídy s různým stupněm odvodnění. Práce [10] přinesla nové pohledy na vnitřní stavbu chloroplastů a zjištění odolnosti jejich stavebních prvků proti odvodňujícímu činidlu (acetonu). Obr. 82 ukazuje odolnou stěnu cévy ve stonku listu špenátu. Na obr. 83a) je vidět izolovaný chloroplast z listu špenátu, s viditelnou strukturou

gran ve vnitřním prostoru, zobrazený v SEM. Pro srovnání je na obr. 83b) uveden obrázek vnitřní stavby chloroplastu s grany a tylakoidními membránami, zobrazený v TEM (University of Sussex).



Obrázek 82: Stěna cévy ve stonku listu.

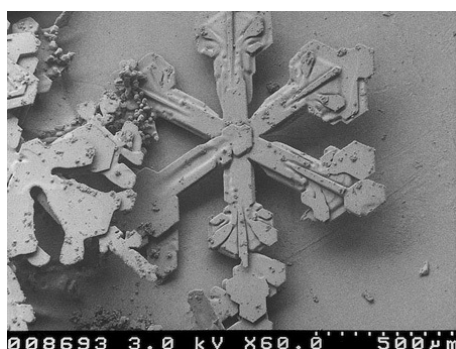


Obrázek 83: Chloroplast v a) SEM, b) TEM.

## 12.7. Využití SEM při studiu dendritické krystalizace

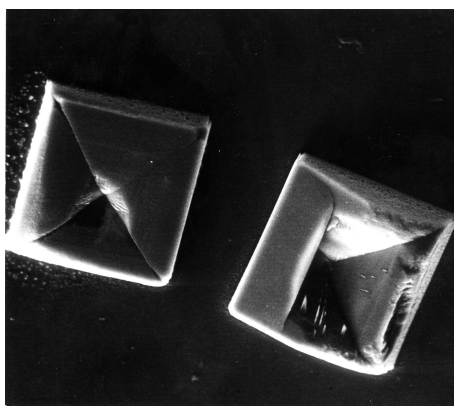
Krystalografické analýzy s využitím skenovacího elektronového mikroskopu je možné provádět bez speciální úpravy preparátu. Krystaly jsou dostatečně odolné proti působení urychlených elektronů a je třeba brát v úvahu pouze jejich nízkou vodivost. V případě krystalů chloridu sodného se jedná o izolant a pro potřeby pozorování a kvalitního záznamu je třeba jejich povrch pokovit.

Atraktivním příkladem krystalizačních procesů jsou dvojrozměrné krystaly dendritického typu. Typickým dendritickým krystalem je sněhová vločka, jejíž tvar vychází z hexagonální symetrie ledu (obr. 84).

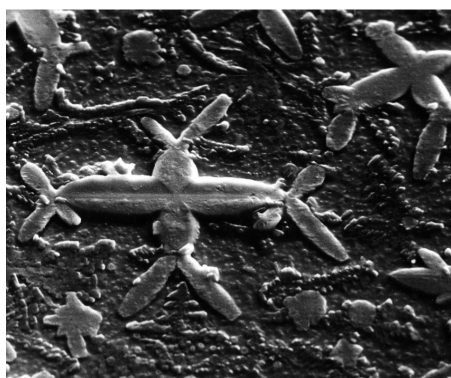


Obrázek 84: Sněhová vločka v SEM (Nízkoteplotní SEM Beltsville Agricultural Research Center in Maryland).

Dendritickou krystalizaci je možné pozorovat i u krystalů různých solí v roztocích, které obsahují organické molekuly, tedy jsou charakterizované určitou viskozitou [9]. Použijeme-li fyziologický roztok (0,9% NaCl v destilované vodě) a necháme ho vyschnout na podložním sklíčku, dostaneme typické kubické krystaly (obr. 85). Pokud však s tímto roztokem postupně smícháme moč (obr. 86a), mozkomíšní mok (obr. 86b), sliny (obr. 86c) a krevní sérum (obr. 86d), dostaneme pokaždé jiný výsledný tvar dendritického krystalu, což odpovídá různým hodnotám viskozity a jinému složení příslušné organické tekutiny.



Obrázek 85: Kubické krystaly NaCl.



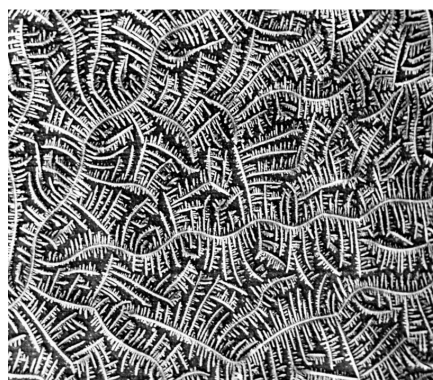
a)



b)



c)



d)

Obrázek 86: Krystalogram a) moči, b) mozkomíšního moku, c) slin a d) krevního séra.



## Poděkování

Autoři děkují za podporu Evropskému sociálnímu fondu v ČR a projektu *Vzdělávání výzkumných pracovníků v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů*, r. č. CZ.1.07/2.3.00/09.0042, s jehož podporou vznikl tento text určený ke vzdělávacím účelům v oblasti skenovací a transmisní elektronové mikroskopie.

## 13. Literatura

- [1] Aimar P., Lossi L., Merighi A.: *Immunogold Labelling for Transmission Electron Microscopy: Exploring New Frontiers*. Cell Vision 4: 394–407, 1997.
- [2] Carlemalm E., Colliex C., Kellenberger E.: *Contrast Formation in Electron Microscopy of Biological Material*. Adv. Imaging Electron Phys. 63: 269–334, 1985.
- [3] Dawes C. J.: *Introduction to Biological Electron Microscopy: Theory and Techniques*. Ladd Research Industries, Inc. Publisher Burlington, Vermont, 1988.
- [4] Hulínský V., Jurek K.: *Zkoumání látek elektronovým paprskem*. SNTL Praha, 1982.
- [5] Kalina T., Pokorný V.: *Základy elektronové mikroskopie pro biology*. Univerzita Karlova, Praha, 1981.
- [6] Karlík M.: *Transmisní elektronová mikroskopie. Pohled do nitra materiálů*. Čs. čas. fyz. 55: 457–464, 2005.
- [7] Karnovsky M. J.: *A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy*. J. Cell Biol. 27: 137A–138A, 1965.
- [8] Koutný A., Kubínek R.: *Studium kavitačního opotřebení materiálu pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu*. Jemná mechanika a optika 6: 198–203, 2001.
- [9] Kubínek R., Hozman J., Vařenka J.: *Dendritic Growth from Viscous Solution Containing Organic Molecules*. J. Crystal Growth 193: 174–181, 1998.
- [10] Kubínek R., Nauš J.: *Investigation of Chloroplasts by Means of Scanning Electron Microscope*. Acta UPO. Fac. rer. nat. 91, Phys. 27: 29–39, 1988.
- [11] Kubínek R., Rusek J., Filip P.: *Microstructural Investigation of the High-T Superconductors*. Acta UPO, Fac. rer. nat. 99, Phys. 30: 105–121, 1991.
- [12] Kubínek R., Rusek J.: *A View on X-ray Microanalysis*. Acta UPO. Fac. rer. nat. 97, Phys. 29: 137–160, 1990.
- [13] Kubínek R., Sobotka J.: *Metody zpracování obrazové informace v rastrovacím elektronovém mikroskopu*. Jemná mechanika a optika 11: 239–246, 1993.
- [14] Kubínek R.: *Využití hloubky ostrosti rastrovacího elektronového mikroskopu ve fraktografii*. Jemná mechanika a optika 10: 269–273, 1984.
- [15] Kubínek R.: *Metodika přípravy a studium některých rostlinných pletiv v REM*. Acta UPO Fac. rer. nat. 88, Phys. 26: 309–323, 1987.
- [16] Kutal M., Kubínek R., Holibka R., Holibka V.: *Blood Supply of Rat Liver in Scanning Electron Microscopy*. Acta UPO. Fac. med. 119: 149–159, 1988.
- [17] Lisoněk P., Kutal M., Peške L., Kubínek R.: *Human Auditory Ossicles from Archaeological Findings (The Latene and Medieval periods)*. Acta UPO, Fac. med. 113: 61–69, 1986.
- [18] Mráz P., Polónyi J.: *Metody elektronovej mikroskopie živočišných tkanív*. Veda, Bratislava, 1988.
- [19] Reid N., Beesley J. E.: *Sectioning and Cryosectioning for Electron Microscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1991.
- [20] Nebesářová J.: *Elektronová mikroskopie pro biology*. 2001 (<http://www.paru.cas.cz/lem/book/>)
- [21] Robards A. W., Wilson A. J.: *Procedures in Electron Microscopy*, Willey and Sons, 1993.

- [22] Robinson D. G., Ehlers U., Herken R., Herrmann B., Mayer F., Schurmann F.-W.: *Methods of Preparation for Electron Microscopy*. Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- [23] Roos N., Morgan A. J.: *Cryopreparation of Thin Biological Specimens for Electron Microscopy: Methods and Applications*. Oxford University Press. Royal Microscopical Society, 1990.
- [24] Rumph J. A., Turner W. J.: *Alternative to Critical Point Drying for Soft-Bodied Insect Larvae*. Ann. Entomol. Soc. Am. 91: 693–699, 1998.
- [25] Ryan K. P.: *Cryofixation of Tissues for Electron Microscopy: A Review of Plunge Cooling Methods*. Scanning Microsc. 6: 715–743, 1992.
- [26] Sitte H.: *Ultramicrotomy—Common Problems and Mistakes*. Elektronenmikroskopie: 1–36, 1981.
- [27] Šafářová K.: *Transmisní elektronová mikroskopie nanopráškových materiálů*. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, 2010.
- [28] Tureček R., Bičík V., Kubínek R.: *Včelí pyl jako monitoring znečištění životního prostředí*. Acta UPO, Fac. rer. nat. 104, Biologica XXXI, 1990.
- [29] Villiger W. and Bremer A.: *Ultramicrotomy of Biological Objects: From the Beginning to the Present*. J. Struct. Biol. 104: 178–188, 1990.
- [30] Wang W., Cai Z., Du K.: *Improved Methods for Making and Using Glass Knives*. Biotech. Histochem. 72: 129–134, 1997.
- [31] Weibull C., Christiansson A., Carlemalm E.: *Extraction of Membrane Lipids during Fixation, Dehydration and Embedding of Acholeplasma laidlawii-cells for Electron Microscopy*. J. Microsc. 129: 201–207, 1983.
- [32] Williams D. B., Carter C. B.: *Transmission Electron Microscopy*, Plenum Press, New York, 1996.

---

#### Autoři textu

doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.

[roman.kubinek@upol.cz](mailto:roman.kubinek@upol.cz)

tel.: 58 563 4286

Mgr. Klára Šafářová, Ph.D.

[klara.safarova@upol.cz](mailto:klara.safarova@upol.cz)

tel.: 58 563 1429

Mgr. Milan Vůjtek, Ph.D.

[milan.vujtek@upol.cz](mailto:milan.vujtek@upol.cz)

tel.: 58 563 1430

---

#### Pracoviště

Katedra experimentální fyziky

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc

<http://www.upol.cz/fakulty/prf/struktura/katedry-a-pracoviste/katedra-experimentalni-fyziky>

Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

<http://rcptm.cz>

Doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.  
Mgr. Klára Šafářová, Ph.D.  
Mgr. Milan Vůjtek, Ph.D.

### Elektronová mikroskopie

Výkonný redaktor: *Prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.*  
Odborný redaktor: *Doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.*  
Odpovědná redaktorka: *Mgr. Jana Kreiselová*  
Technický redaktor: *Mgr. Milan Vůjtek, Ph.D.*

Určeno pro studenty, odbornou veřejnost a další zájemce.

---

Vydala Univerzita Palackého v Olomouci  
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc  
[www.upol.cz/vup](http://www.upol.cz/vup)  
e-mail: [vup@upol.cz](mailto:vup@upol.cz)

---

Olomouc 2011  
1. vydání

Tato publikace neprošla redakční jazykovou úpravou.

© Roman Kubínek, Klára Šafářová, Milan Vůjtek, 2011

Ediční řada — Ostatní publikace  
Online publikace  
ISBN 978-80-244-2739-3

[fyzika.upol.cz/cs/pro-studenty/elektronova-mikroskopie](http://fyzika.upol.cz/cs/pro-studenty/elektronova-mikroskopie)