

Elektronová mikroskopie

transmisní elektronový mikroskop

skenovací elektronový mikroskop

mikroskopie atomárních sil

historie:

komplexní vynález 20. století – kombinace mnoha výsledku bádání v různých oblastech

pol. 19 století – studium elektrických výbojů

1897 – objev elektronu

1925 – rychle letící částice mají vlnový charakter – vlnová povaha elektronů

1927 – práce studující vychylování elektronů pomocí magnetických polí solenoidů

1932 – Knol a Ruska (Berlín) – první TEM

1939 – komerční výroba TEM (fa Siemens) – rozlišovací schopnost 10 nm

1986 – Ruska dostává Nobelovu cenu

SEM:

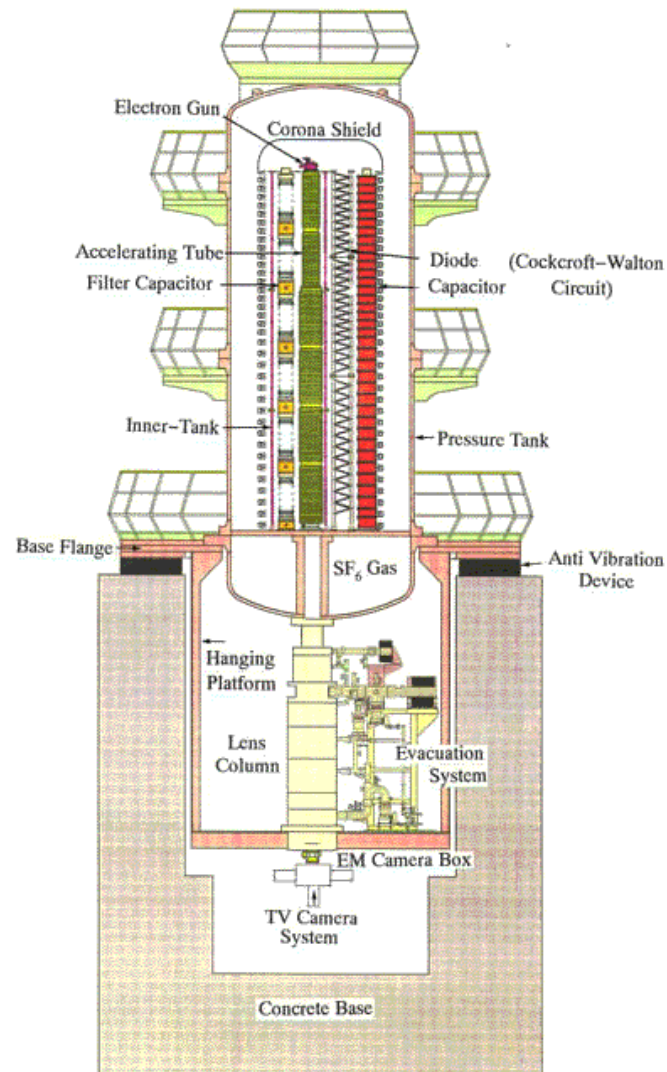
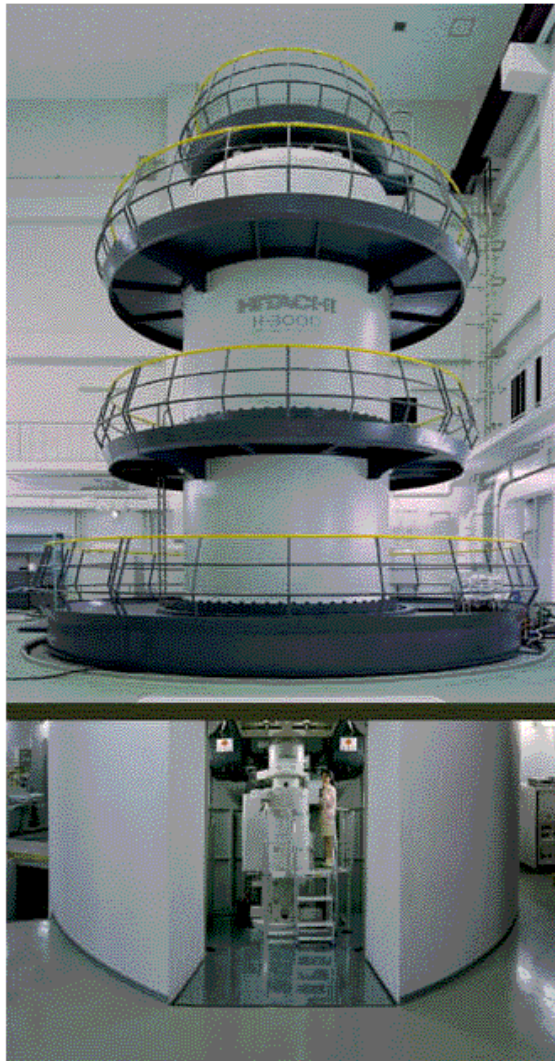
1938 – popis rastrování u TEM

vynález fotonásobiče

1965 – SEM – Cambridge Scientific – C.W.Oatley

současnost:

3 MV transmisní elektronový mikroskop – poprvé spatřen atom !



z důvodu **malé penetrační schopnosti elektronů** a nutnosti malého množství vody ve vzorku (kvůli vysokému vakuu v přístroji)

pro biologické vědy nutný vývoj **ultramikrotomů** – spec. nožů na přípravu ultratenkých vzorků

nutné nalezení vhodných metodických přístupů k přípravě preparátu – zalévání, fixace, barvení apod.

elektrony – malé částice, nepatrná hmotnost, lze je urychlit el. napětím U , získá kinetickou E

$$eU = \frac{1}{2}mv^2$$

m - hmotnost elektronu ($9,109 \times 10^{-31} \text{ kg}$)

e - náboj elektronu ($1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$)

U - urychlovací napětí (V)

v - rychlost elektronu

Do vztahu lze za rychlost dosadit z rovnice de Broglieho, která popisuje vztah mezi vlnovou a korpuskulární povahou hmotných částic:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

λ - vlnová délka

h - Planckova konstanta ($6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$)

$$v = h / m\lambda$$

$$eU = \frac{h^2}{2m\lambda^2}$$

$$\lambda = \frac{h}{(2meU)^{1/2}}$$

Z výsledného vztahu vyplývá, že vlnová délka urychleného elektronu je nepřímo závislá na použitém urychlovacím napětí. Pokud dosadíme za konstanty, vztah se zjednoduší do podoby

$$\lambda = 1,226 / U^{1/2}$$

pro $U=100$ kV dosahuje jejich rychlost již 1/2 rychlosti světla ve vakuu ($2,998 \times 10^8$ m/s)

Vlnová délka elektronu v závislosti na urychlovacím napětí

U [V]	λ [nm]	$\lambda_{\text{relativistická}}$ [nm]	v[m/s]
10^2	0.123	-	5.95×10^6
10^3	0.040	-	1.87×10^7
10^4	0.0123	-	5.85×10^7
10^5	0.00386	0.00370	1.65×10^8
10^6	0.00122	0.00087	2.83×10^8

Rozlišovací schopnost a vlnová délka

Základní vlastností každého zařízení, které pomáhá našemu zraku uvidět, zvětšit pro něj příliš malé objekty, **je rozlišovací schopnost**. Je to vzdálenost dvou bodů ležících vedle sebe, které lze daným zařízením rozeznat jako oddělené.

zdravé lidské oko při dostatečném osvětlení je schopno ve vzdálenosti 25 cm rozlišit dva body vzdálené od sebe 0,2 mm

Optický mikroskop - jeho rozlišovací schopnost se během jeho vývoje posunula až na hodnotu menší než 0,2 μm

$$R.S. = \frac{0,61\lambda}{n \sin \alpha}$$

λ je vlnová délka použitého záření

n je index lomu

α je poloviční úhlová apertura čočky

Ize dosadit za součin $n \cdot \sin \alpha = 1$ (numerická apertura) - je optickou konstantou daného objektivu

z toho vyplývá že mezní rozlišovací schopnost je zhruba polovinou vlnové délky použitého záření

pro zelené světlo, které je zhruba uprostřed viditelného spektra, je λ okolo 550 nm a tedy rozlišovací schopnost mikroskopu pracujícího s tímto světlem je okolo 300 nm

hlubší proniknutí do mikrosvěta vyžaduje použít záření s mnohem kratší vlnovou délkou než má viditelné světlo

viz tab. výše - vlnová délka elektronu urychleného napětím 100 kV už teoreticky stačí na zobrazení atomu

prakticky je to ale mnohem méně – díky konstrukci mikroskopu

běžné laboratorní transmisní elektronové mikroskopy v současné době mají rozlišovací schopnost v řádu desetin nm, která postačuje k pozorování např. větších bílkovinných makromolekul

Proč používat elektrony?- rozlišení

$$r = 0.61\lambda / n \sin \alpha$$

λ – vln. délka

α – apertura čočky

V – urychlovací napětí

n – index lomu

$$\lambda = [1.5 / V + 10^{-6} V^2]^{1/2} \text{ nm}$$

zelené světlo

$\lambda \sim 400 \text{ nm}$

$n \sim 1.7$ olej imerse

$r \sim 150 \text{ nm}$ (0.15 μm)

elektrony

200 kV $\sim 0.0025 \text{ nm}$

$n \sim 1$ (vacuum)

$r \sim 0.02 \text{ nm}$ (0.2 Å)

nereálné, ale proč?

účelem každého zvětšování v mikroskopii je zvýšit počet informací o pozorovaném objektu, které jsou jinak lidskému oku nedostupné

pokud počet informací roste, je zvětšení užitečné, pokud ne, jde o prázdné zvětšení

k tomu dochází, když zvětšení překročí rozlišovací schopnost mikroskopu

$$M_u = R_{S \text{ oko}} / R_{S \text{ mik}}$$

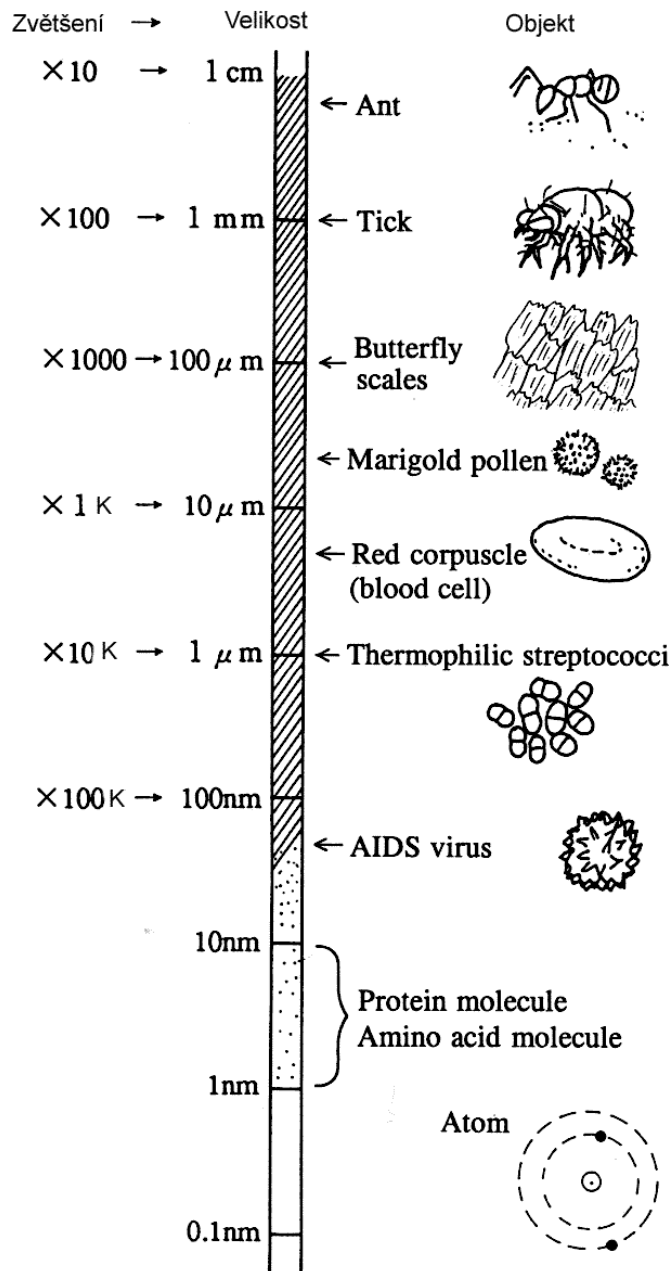
M_u je užitečné zvětšení

R_S oko je rozlišovací schopnost lidského oka (cca 0,1 mm)

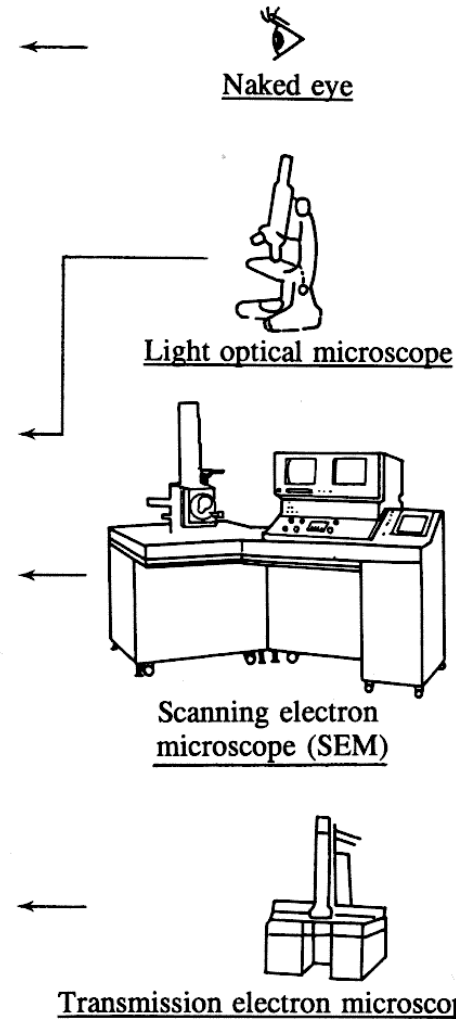
R_S mik - elektronový mikroskop 10 nm, transmisní elektronový mikroskop 0,1 nm

užitečné zvětšení například pro světelný mikroskop je tedy okolo 550 x, pro SEM 10000 x a pro TEM 1000000 x

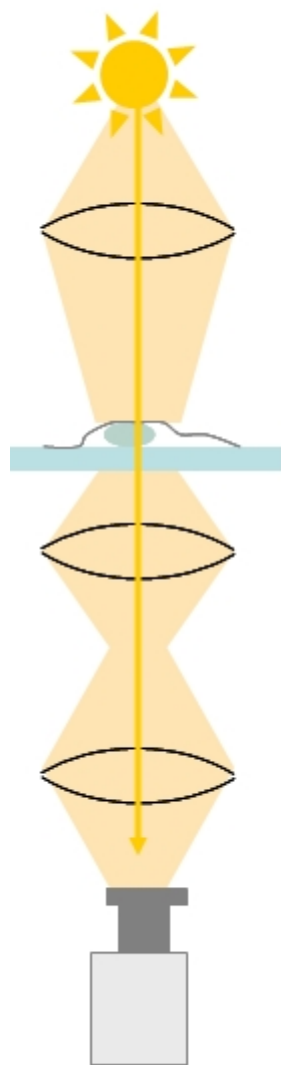
jaký mikroskop pro co vybrat? záleží i na povaze preparátu



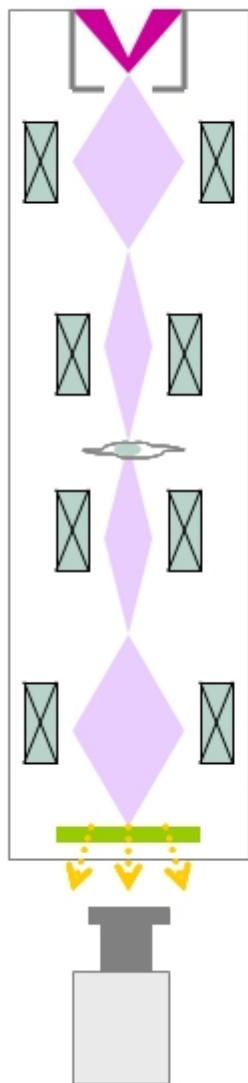
Rozlišení



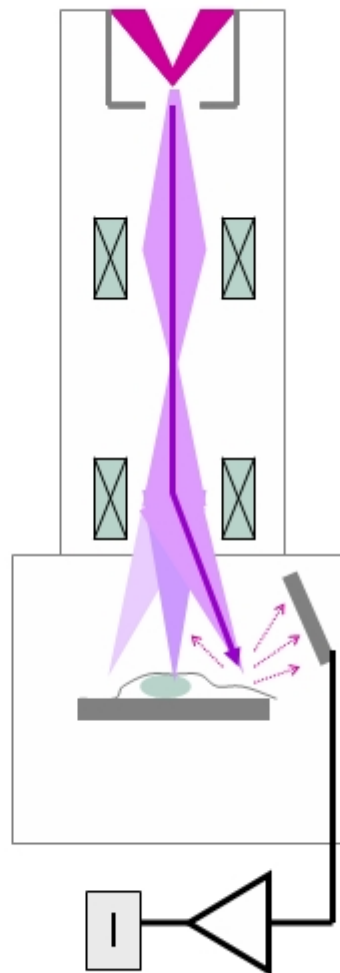
Optical



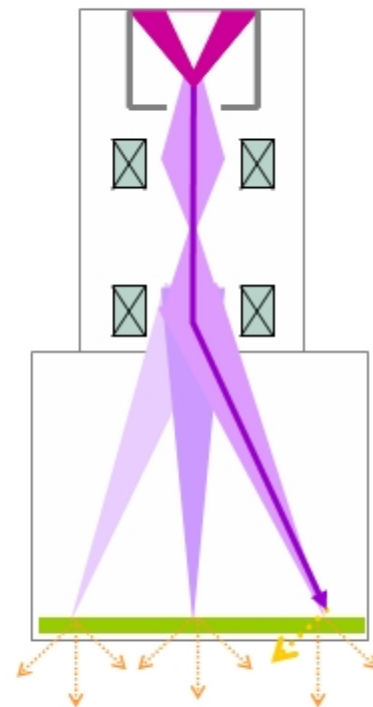
TEM



SEM



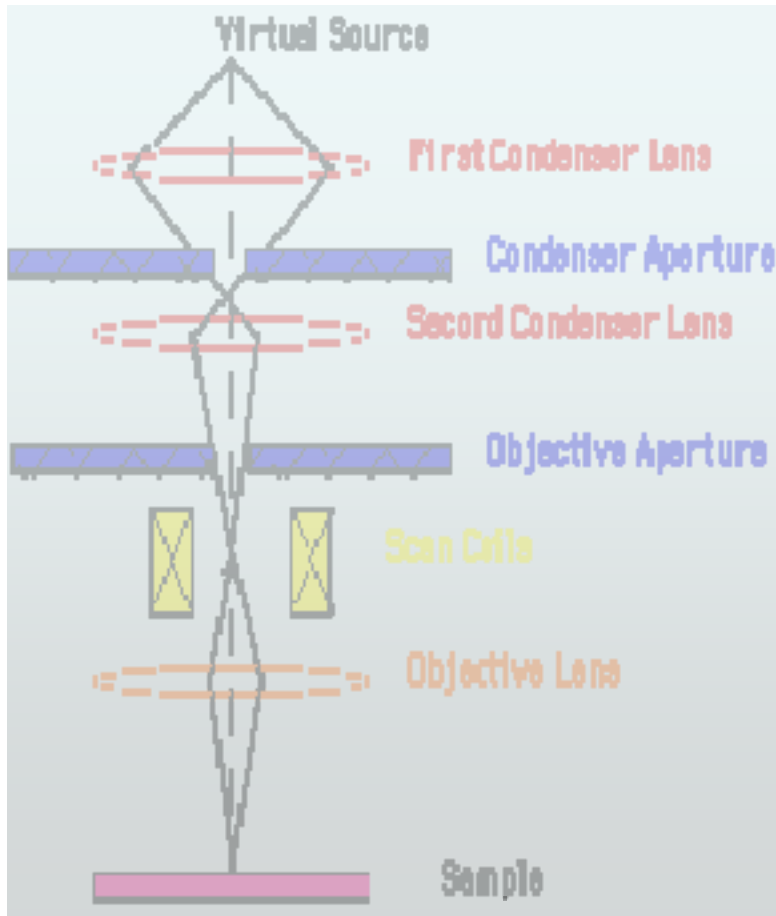
CRT



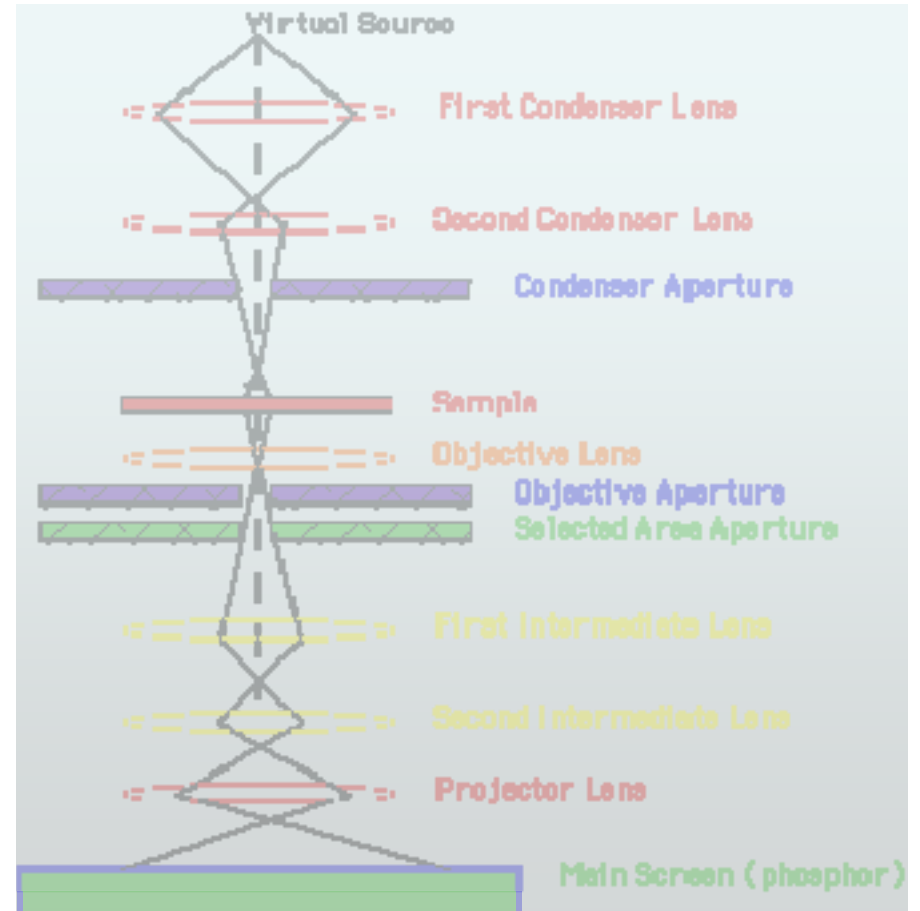
cathode ray tube
(princip staré
obrazovky)

Electron beam path

SEM

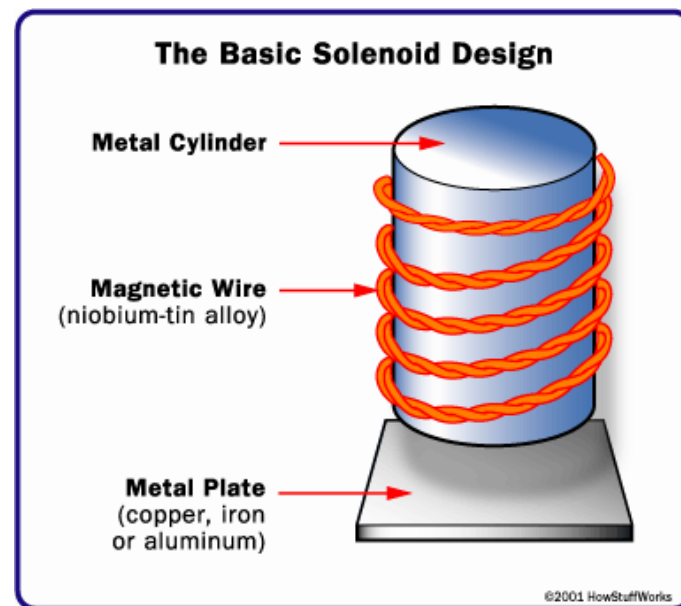
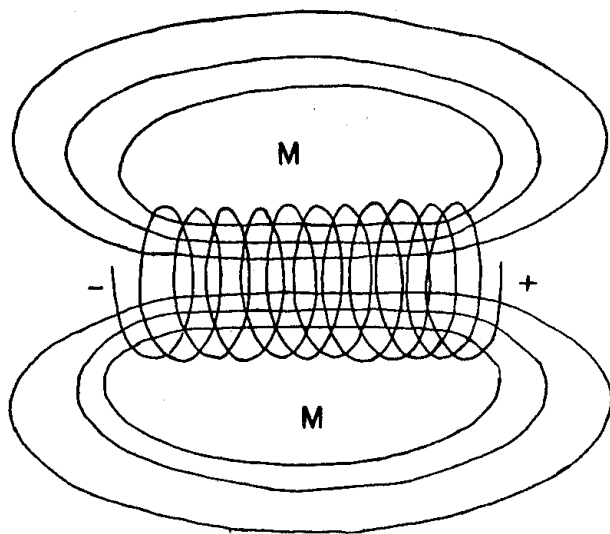


TEM



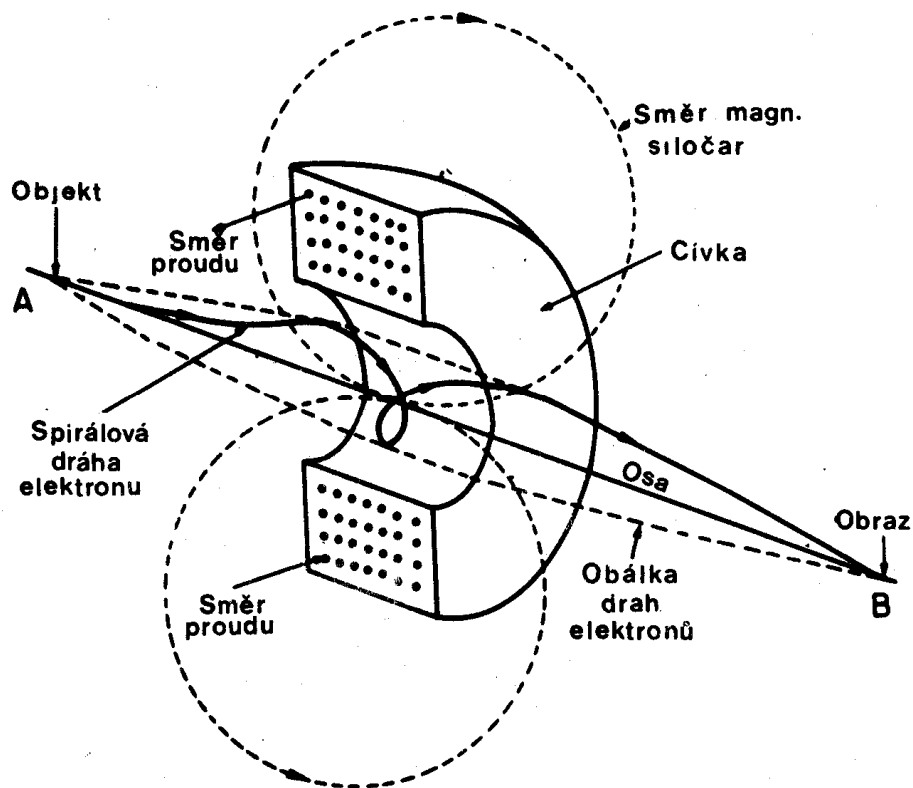
magnetické pole: působení magnetického pole na dráhu letícího elektronu lze využít k sestrojení elektromagnetické čočky
funguje přibližně stejně jako skleněná čočka v případě světla

nejjednodušší elektromagnetickou čočkou je solenoid - kruhová cívka



ve které a okolo které při průchodu elektrického proudu vzniká magnetické pole

magnetické pole solenoidu ovlivňuje dráhy elektronů, které vycházejí z bodového zdroje A a které po zakřivení jejich drah v magnetickém poli cívky, opět protínají její osu v bodě B

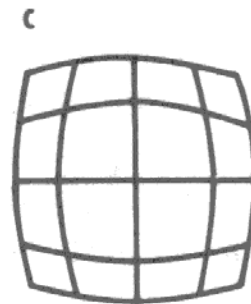
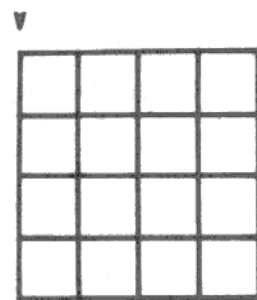
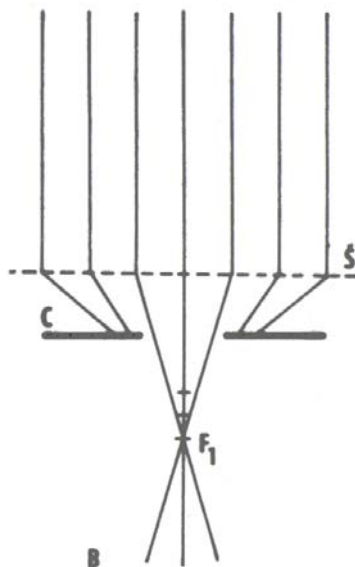
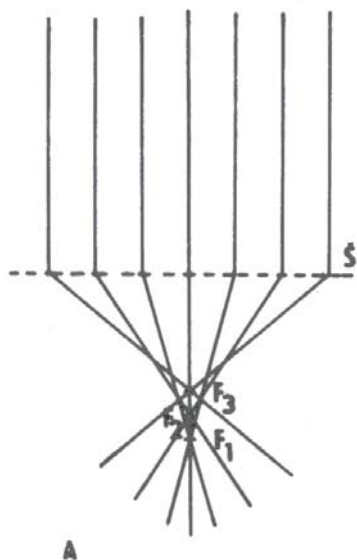


vady elektromagnetických čoček

stejně jako skleněné čočky, i elektromagnetické čočky vykazují stejné vady

důvod, proč se v praxi nedosahuje teoretické rozlišovací schopnosti

sférická vada - je neschopnost čočky zaostřovat všechny paprsky vycházející z bodového zdroje opět do jednoho bodu - důsledkem této vady je, že zvětšení v krajích obrazu je jiné než v jeho středu



reálný předmět, poduškovitost,
soudkovitost

omezení vady clonkou

chromatická vada - vzniká v důsledku rozdílných energií elektronů ve svazku

pomalejší elektrony s větší vlnovou délkou jsou v magnetickém poli cívek vychylovány jinak a protínají osu cívky v jiném bodě, než elektrony s vyšší rychlostí

snížení chromatické vady je možné docílit maximální stabilizací urychlovacího napětí mikroskopu

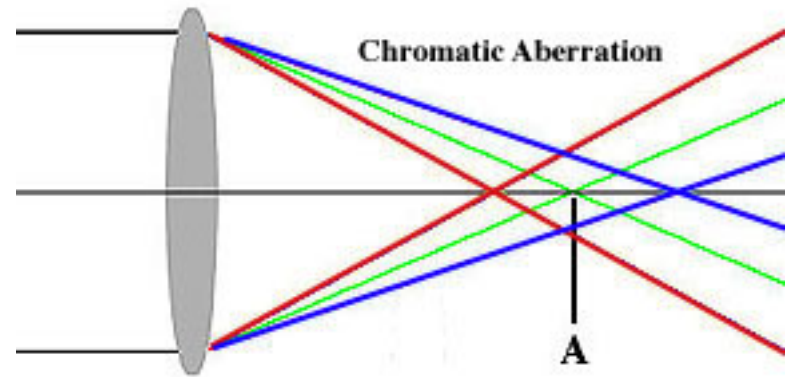
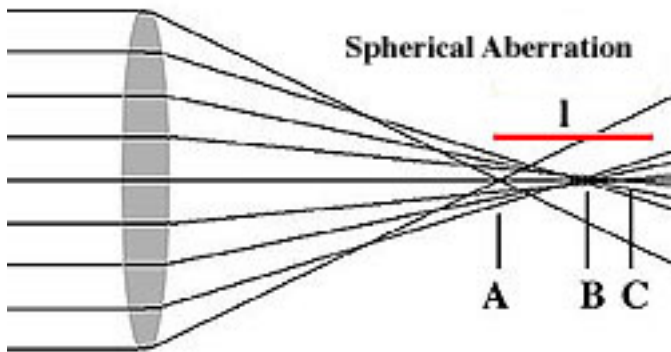
osový astigmatismus - způsobený nesymetrií magnetického pole

většinou díky nečistotám, lze uměle korigovat

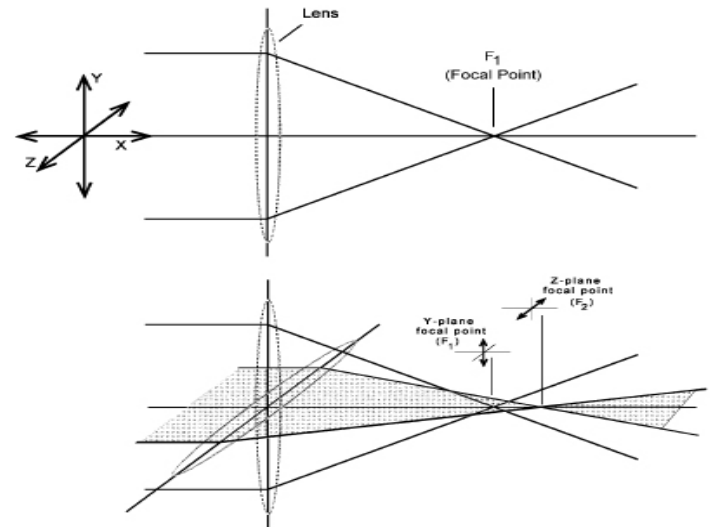


aberrace

- tři typy aberací:
 - sférická (velikost clonky)
 - chromatická (různé energie elektronu)
 - astigmatická (defekt čoček, špína)



Astigmatism aberration



aberrace jsou důvodem proč
není rozlišení 0.2 Å.

transmisní elektronový mikroskop

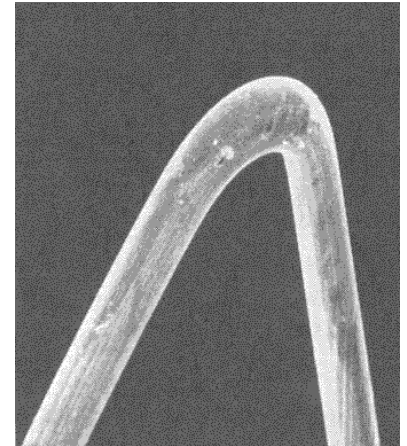
transmisní elektronový mikroskop (TEM)

umožňuje pozorování preparátů do tloušťky 100 nm při vysokém zvětšení a s velkou rozlišovací schopností

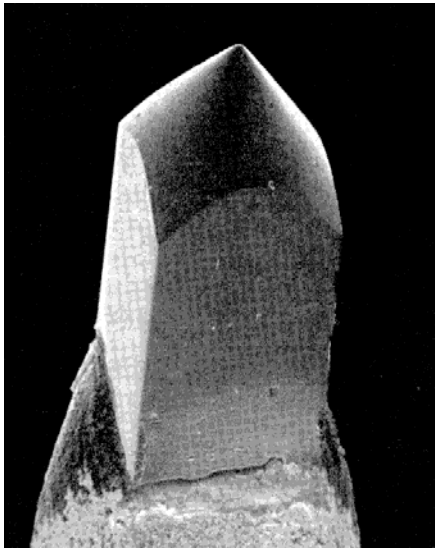
jestliže zahřejeme jakýkoliv materiál na vysokou teplotu, dodáme elektronům dostatečnou energii, aby překonaly přirozenou energetickou bariéru, která jim brání v úniku

výstupní energie je specifická pro daný kov (pro wolfram je rovna 4,52 V), pro wolfram je úniková rychlost $1,26 \times 10^6$ m/s

k zahřátí a následné termoemisi může dojít při průchodu elektrického proudu vláknem a pravděpodobnost úniku elektronů může být ještě zvýšena jeho vytvarováním do tvaru písmene V



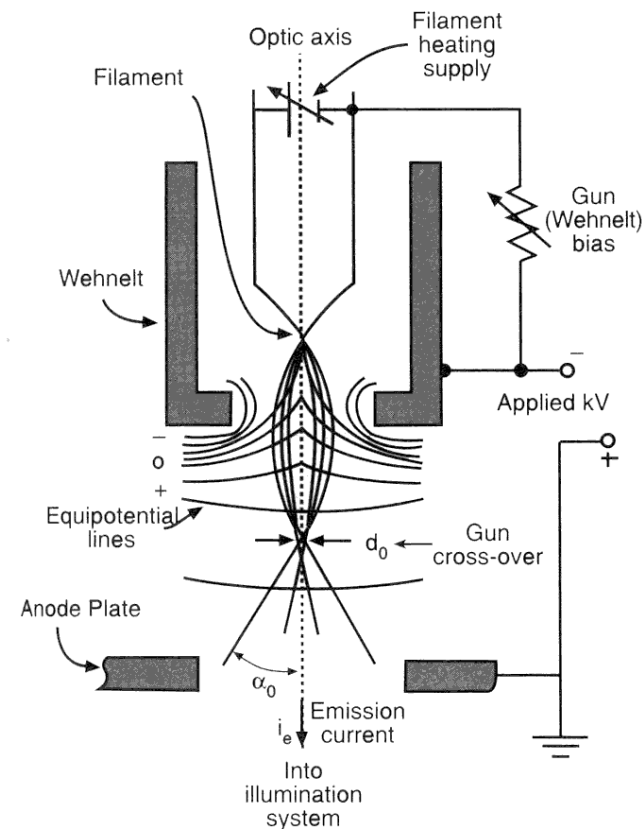
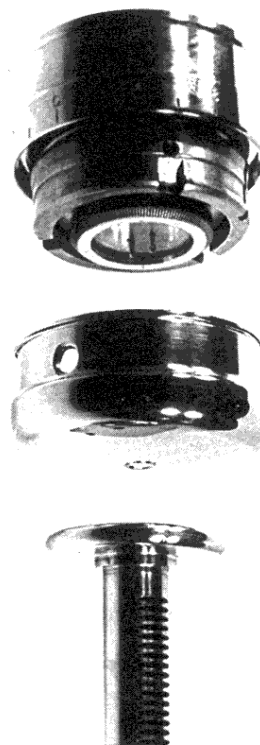
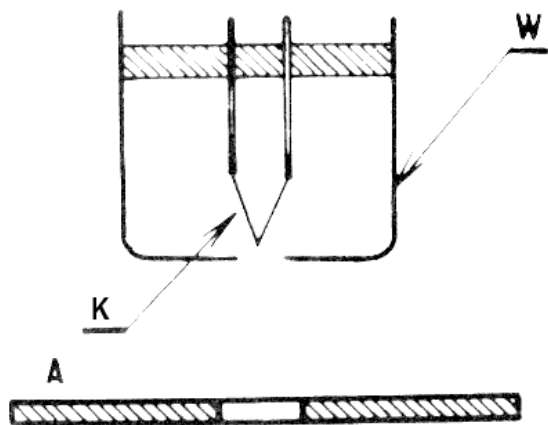
nejčastěji se v termoemisních tryskách používá **wolframové vlákno** díky nízké výstupní energii ($W = 4,5 \text{ V}$, $Ni = 2,6 \text{ V}$, $LaB6 = 1,0 \text{ V}$), vysokému bodu tání ($W = 3653 \text{ K}$, $Ni = 1000 \text{ K}$, $LaB6 = 2000 \text{ K}$) a nízké hodnotě vakua, kterou vyžaduje pro svůj provoz



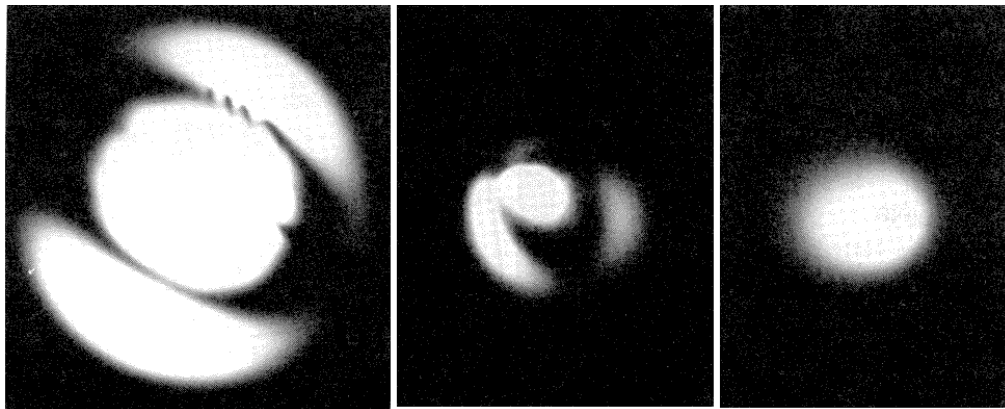
LaB6

od elektronového zdroje vyžadujeme, aby poskytoval koherentní svazek elektronů, elektrony by měly vycházet z bodového zdroje, měly by mít stejnou energii

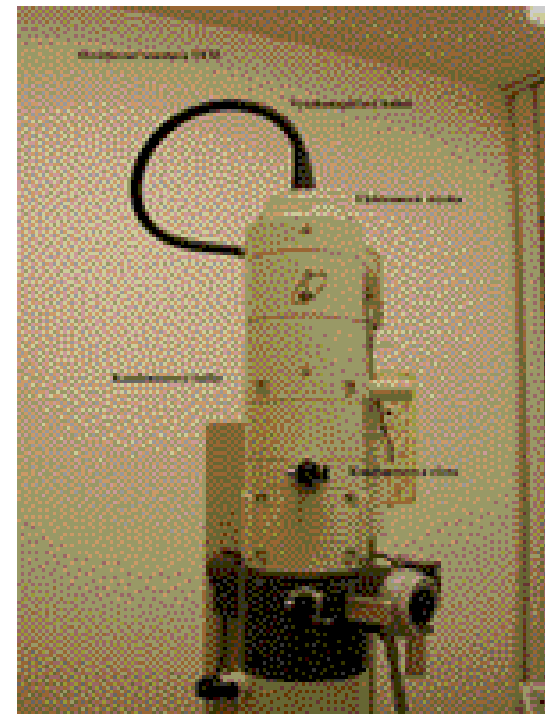
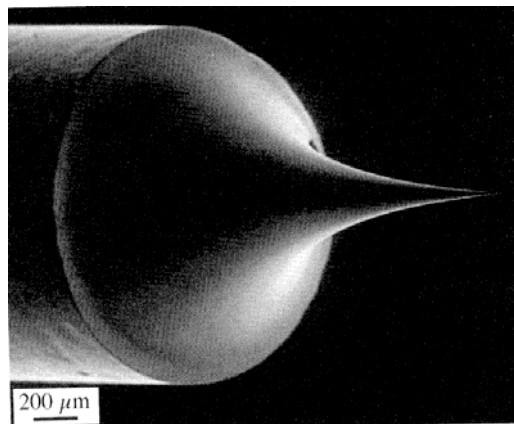
elektronová tryska - katoda emitující elektrony a anoda s kruhovým otvorem ve svém středu, která je přitahuje a dává jim dostatečné zrychlení na průlet tubusem mikroskopu



katoda v podžhaveném stavu, tzv. **dutý paprsek**, který je používán k vycentrování elektronové trysky a k nastavení stigmátoru osvětlovací soustavy čoček



autoemisní tryska -
elektrony emituje
studené wolframové
vlákno odleptané do
hrotu



srovnání typů elektron emitujících zdrojů

parametry jednotlivých elektronových zdrojů

vlastnosti	žhavená wolframová katoda	žhavená LaB ₆ katoda	autoemisní tryska
průměr hrotu	200 μm	20 μm	0,1 μm
provozní teplota	2859 K	1850 K	okolí
proud svazku	5×10^{-12} A	8×10^{-11} A	10^{-8} A
průměr svazku	9 mm	5 mm	<1-2 nm/td>
požadované vakuum	10^{-5} mm Hg	10^{-7} mm Hg	10^{-10} mm Hg
životnost	35 h	250 h	neomezená

urychlené elektrony, produkované elektronovou tryskou, vstupují do magnetického pole kondenzorových čoček

elektronová tryska spolu s kondenzorovými čočkami tvoří osvětlovací část transmisního elektronového mikroskopu

zobrazovací soustava TEM

držák preparátu, objektiv, mezičočky, projektivy a pozorovací stínítko

**preparát je v mikroskopu umístěn
blízko **objektivu** - nejvýkonnější
čočka mikroskopu
je schopen největšího zvětšení a má
také nejkratší ohniskovou
vzdálenost, cívka objektivu má velký
počet závitů, kterými protéká značný
proud, nutné chladit vodou**

obraz vyprodukovaný objektivovou čočkou se dále zvětšuje na požadovanou velikost pomocí projektivů a intermediálních čoček

v rovině objektivu je **preparát se zvětšením okolo 100 x**

další čočkou, která se zapojuje do zvětšování obrazu, je **hlavní projektiv** obvykle s konstantním zvětšením **100 x**

dále **pomocný projektiv** tak, aby výsledné maximální zvětšení celého zobrazovacího systému, které se rovná součinu zvětšení všech čoček, dosáhlo hodnoty **1 000 000 x**

abychom mohli vidět elektrony, které prošly preparátem a zobrazovacím systémem, je třeba převést informace, do oblasti viditelného světla - **stínítko pokryté nejčastěji ZnS**, který je schopen v závislosti na energii a množství dopadajících elektronů emitovat světlo s vlnovou délkou 450 nm

dopad elektronů na pozorovaný vzorek

biologické preparáty jsou tvořeny lehkými prvky, které nedostatečně rozptylují primární elektrony, a navíc jsou občas zality do pryskyřic, které mají přibližně stejné prvkové složení jako vlastní preparáty a tedy i podobné rozptylové vlastnosti

není tedy velký rozdíl v kontrastu mezi vzorkem a zalévacím médiem

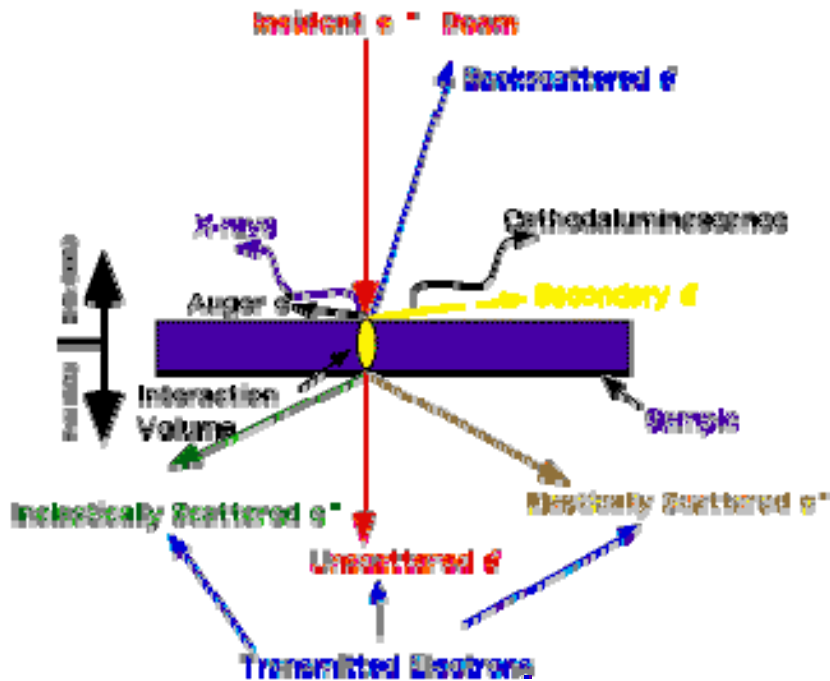
nutné vzorek barvit – soli těžkých kovů - Os, Pb, U, W

kontrast se zvyšuje dále objektivovou clonou malého průměru, snížením urychlovacího napětí či zvětšením tloušťky řezů

tyto úpravy ovšem způsobují snížení rozlišovací schopnosti

interakce vzorku a elektronů

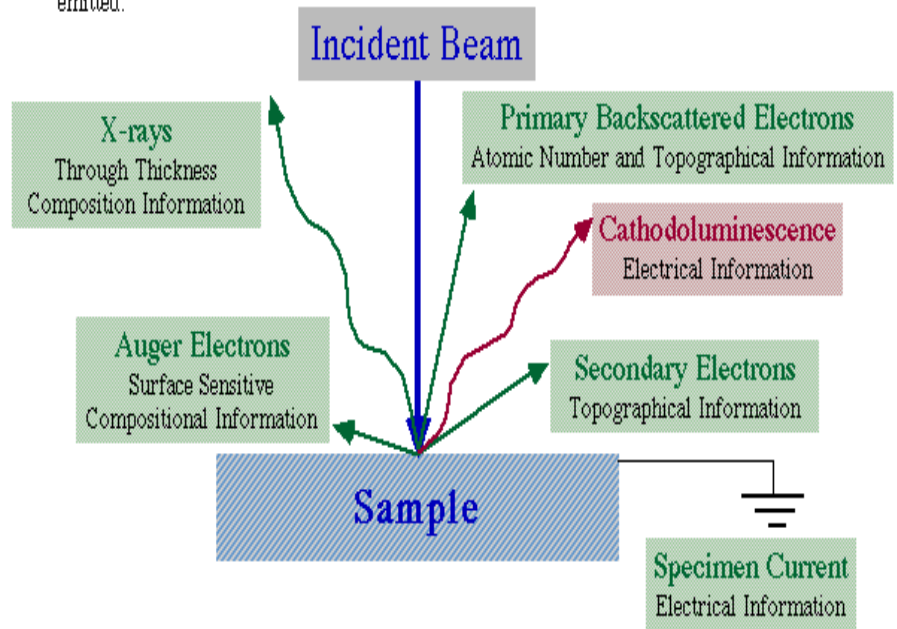
TEM



For TEM elastically scattered electrons are important.

SEM

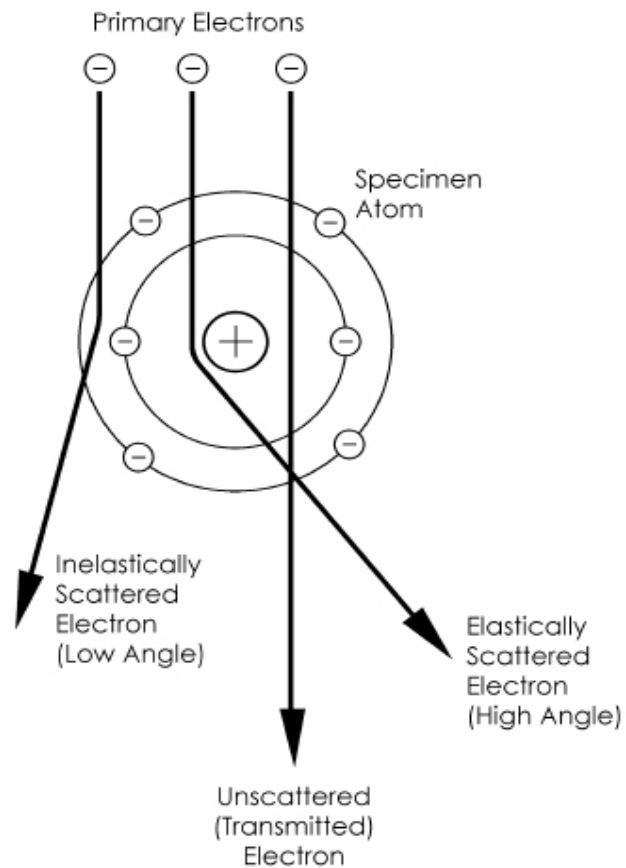
When the electron beam strikes the sample, both **photon** and **electron** signals are emitted.



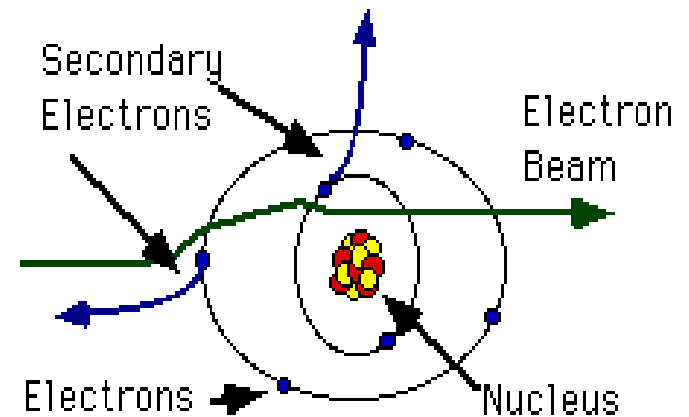
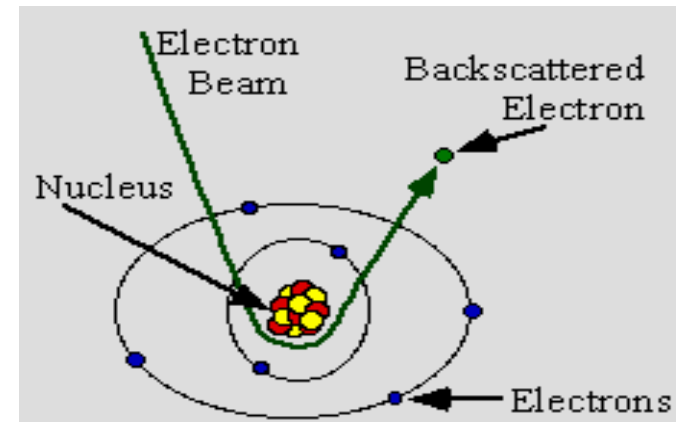
For SEM backscattered and secondary electrons are important.

interakce vzorku a elektronů

TEM



SEM



pozorování a záznam obrazu

praktickým výstupem z transmisního elektronového mikroskopu je trvalý záznam pozorovaného obrazu

speciální fotografický materiál nebo v digitální podobě pomocí CCD kamer

CCD kamera – přeměna elektronového signálu na světelný, má mnoho výhod, ale nižší rozlišení než fotografický záznam

příprava preparátů pro TEM chemickou cestou

vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii **nesmí obsahovat vodu** – v mikroskopu vakuum

díky nízké penetrační schopnosti elektronů **tloušťka preparátu nesmí překročit 100 nm**

jak připravit vzorky pro TEM:

A/ přímá metoda, kdy do mikroskopu vkládáme celý studovaný objekt zbavený vody – suspenze virů či malých částíček, které můžeme v mikroskopu pozorovat celé
z větších vzorků je třeba připravit řezy tloušťky cca do 100 nm, aby jimi mohly projít urychlené primární elektrony

B/ metoda nepřímá, kdy v mikroskopu pozorujeme repliku studovaného objektu, ne samotný objekt

Fixace

prvním krokem přípravy preparátů pro TEM je v naprosté většině případů **fixace**

jejím cílem je zachovat buněčnou ultrastrukturu s minimem změn oproti nativnímu stavu, zabránit degradačním procesům a stabilizovat vzorek do dalších kroků přípravy

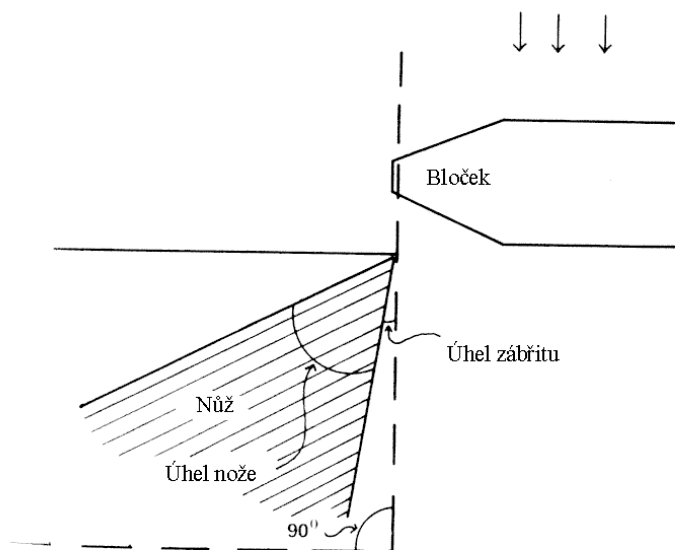
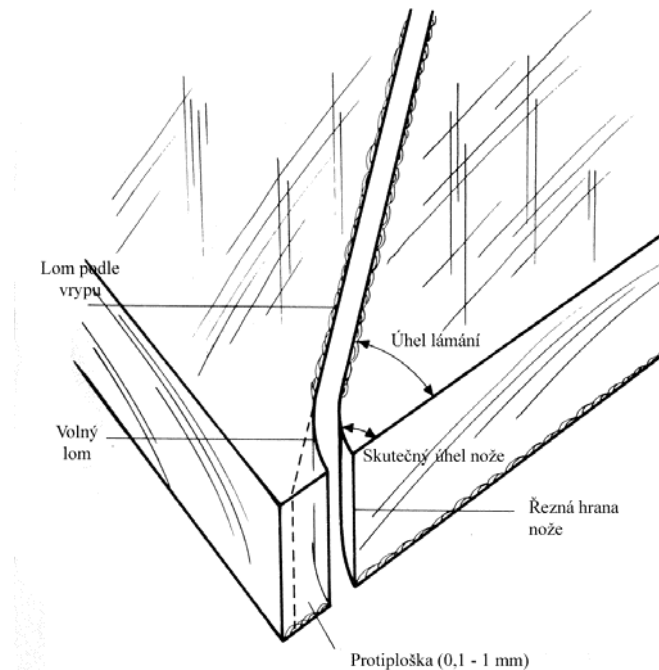
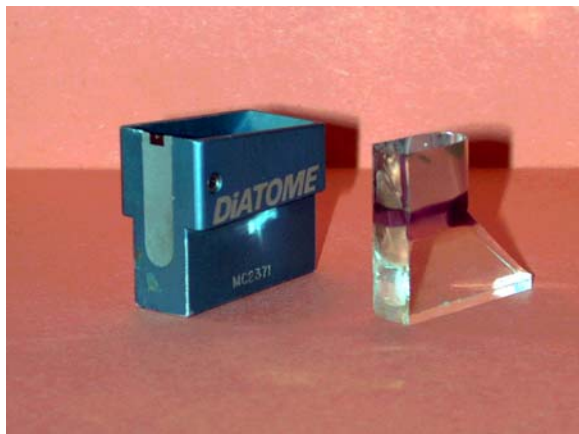
k fixaci biologických objektů se používají **chemické nebo fyzikální metody**

chemická fixace - reakce některých chemických činidel se složkami biologických objektů, které vedou k jejich stabilizaci a imobilizaci bez větších ultrastrukturálních změn - metanol, etanol, kyselina chlorovodíková, glutaraldehyd, oxid osmičelý, manganistan draselný

fyzikální fixace – dehydratace, zalévání do pryskyřic

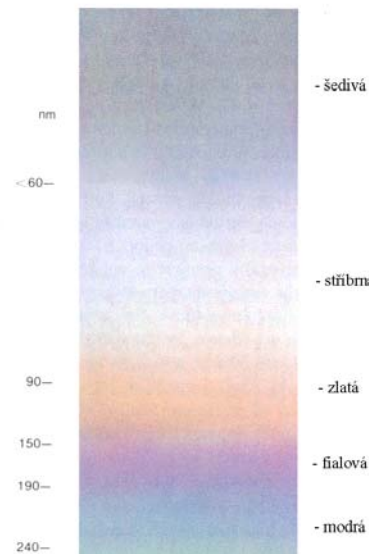
příprava ultratenkých řezů – ultramikrotom

skleněné či diamantové nože



Tloušťka řezů

Barva řezů



mrazící metody – mrazová fixace vzorku

naprašování

metoda negativního barvení vzorku – PTA, STA

vzorek nanesen na tenkou membránku – formvar nebo uhlík
poté barven

repliky – dříve více používané

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

tato přednáška byla vytvořeny dle výukových materiálů na

<http://www.paru.cas.cz/lem/book/>

TEM JEOL JEM-1010

metody negativního barvení:

obvykle **4% STA** (sodium silicotungstate), pH 7.2-7.8

methyamin tungstate

uranyl sulphate, uranyl acetate, 1 – 3% ve vodě nebo ethanolu

příprava sítěk – 400 mesh copper grids, carbon coated

tato přednáška byla vytvořena dle výukových materiálů na

<http://www.paru.cas.cz/lem/book/>

skenovací elektronový mikroskop

skenovací (raastrovací) elektronový mikroskop (SEM)

je přístroj určený **k pozorování povrchů nejrůznějších objektů**

je ho možné do jisté míry považovat za analogii světelného mikroskopu v dopadajícím světle

na rozdíl od něho je výsledný obraz tvořen pomocí sekundárního signálu - odražených nebo sekundárních elektronů

velkou předností SEM v porovnání se světelným mikroskopem je jeho **velká hloubka ostrosti**

další předností těchto mikroskopů je, že v komoře preparátů vzniká při interakci urychlených elektronů s hmotou vzorku kromě výše zmíněných signálů ještě řada dalších, např. rtg. záření, Augerovy elektrony, katodoluminiscence, které nesou mnoho dalších informací o vzorku – např. **prvkové složení preparátu**, a při porovnání s vhodným standardem **lze určit i kvantitativní zastoupení jednotlivých prvků**

konstrukce SEM mikroskopu

**zásadní rozdíly oproti TEM už na první pohled
rozdílná délka tubusu, který je poloviční**

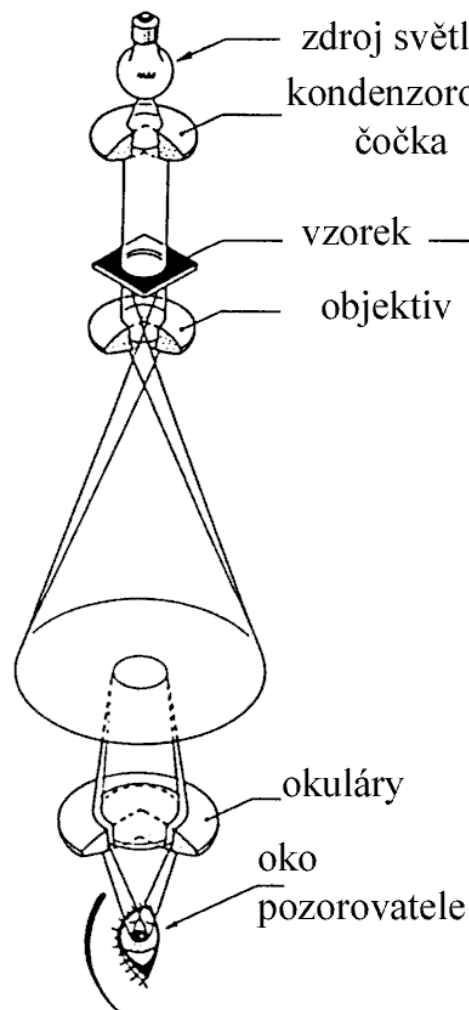
**u skanovacího elektronového mikroskopu se detekují signály, které
primární svazek elektronů uvolnil nad povrch preparátu, a není třeba
soustavy čoček, které u TEM tvoří zobrazovací systém ve spodní
části tubusu**

**místo toho je SEM vybaven detektory sekundárních a odražených
elektronů a elektronikou na zesílení a zpracování signálu a tvorbu
obrazu**

**zdrojem elektronů je ve špičce tubusu stejně jako u TEM nejčastěji
přímo žhavené wolframové vlákno**

**rozlišovací schopnost přístrojů s wolframovou přímo žhavenou
katodou se pohybuje mezi 10 až 15 nm**

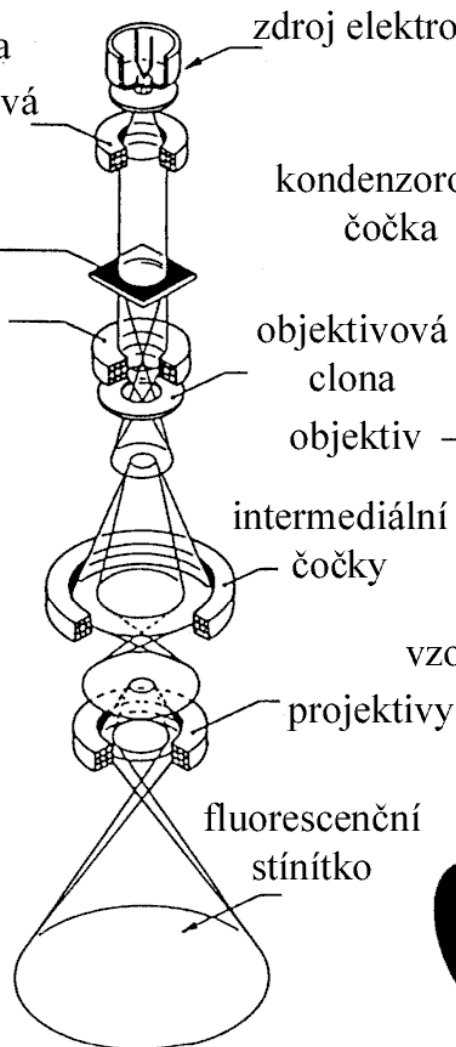
Světelný mikroskop



Rozlišení 200 nm

Zvětšení $\sim \times 2000$

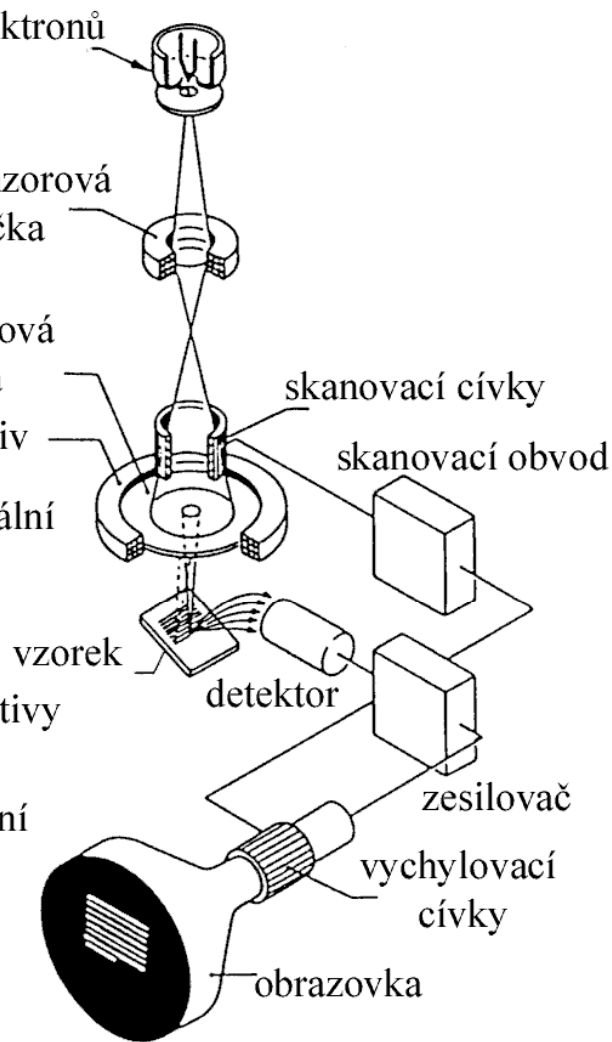
TEM



0.1 nm

$\times 50 \sim \times 1,500,000$

SEM



0.5 nm

$\times 10 \sim \times 1,000,000$

stejně jako v TEM primární elektrony jsou urychleny potenciálem mezi katodou a anodou, která má ve svém středu kruhový otvor, kudy prolétají primární elektrony do soustavy elektromagnetických čoček

u SEM při prohlížení biologických preparátů se používá urychlovací napětí do 25 kV

hlavním úkolem soustavy elektromagnetických čoček v SEM je co nejvíce **zmenšit průměr svazku elektronů**, které dopadají na povrch preparátu

důležitou součástí elektron optického systému je **stigmátor**, pomocí kterého se koriguje astigmatismus elektromagnetických čoček

elektromagnetickými čočkami zkoncentrovaný **paprsek primárních elektronů je před dopadem na povrch preparátů rozpořbován vychylovacími cívkami tak, že pokryje řádky - rastruje - malou plošku**

počet řádků je možné měnit od desítek do několika tisíc a zároveň lze měnit i rychlost přeběhu paprsku v jednom řádku

pro fotografický záznam se vybírá co nejpomalejší rychlost přeběhu, kdy získání jednoho celého obrazu může trvat 30, 60 i 120 s

v dolní části tubusu se nachází komora preparátů, která je ve srovnání s TEM velmi rozměrná, i několik cm

**v blízkosti preparátu jsou umístěny detektory jednotlivých signálů :
např. sekundárních a odražených elektronů, rt. záření**

tvorba obrazu

získání obrazu ve skanovacím elektronovém mikroskopu je založeno na interakci primárního svazku s povrchem prohlíženého objektu

každý produkt této interakce přináší informaci o fyzikálních a chemických vlastnostech zkoumaného objektu, které lze využít, pokud je mikroskop vybaven detekčním čidlem, které dokáže účinně a selektivně tento signál zachytit

interakce mezi primárními elektrony a atomy preparátu můžeme stejně jako u TEM rozdělit do dvou skupin: elastické kolize, které mají na svědomí vznik zpětně odražených elektronů a neelastické, při kterých dochází k předávání energie primárních elektronů atomům vzorku a následně k uvolnění sekundárních a Augerových elektronů, rtg. záření a katodoluminiscenci

k zobrazení povrchu preparátu se v SEM využívají **sekundární elektrony**

vzhledem k nízké energii sekundárních elektronů se z vyvýšenin na povrchu preparátu dostane do detektoru více sekundárních elektronů a výsledkem je vyšší intenzita signálu z detektoru a tedy světlé místo na obrazovce, z prohlubenin je tomu naopak - **tím je získán topografický kontrast**, který umožňuje zobrazit v mnohonásobném zvětšení povrch vzorku

produkce odražených elektronů, jak bylo zmíněno výše, závisí na **středním atomovém čísle vzorku** - jako světlé oblasti se budou na obrazovce jevit místa s vyšším středním atomovým číslem, tedy tvořená těžšími prvky naopak, oblasti tvořené lehkými prvky se budou jevit jako tmavá místa – **možnost prvkové analýzy**

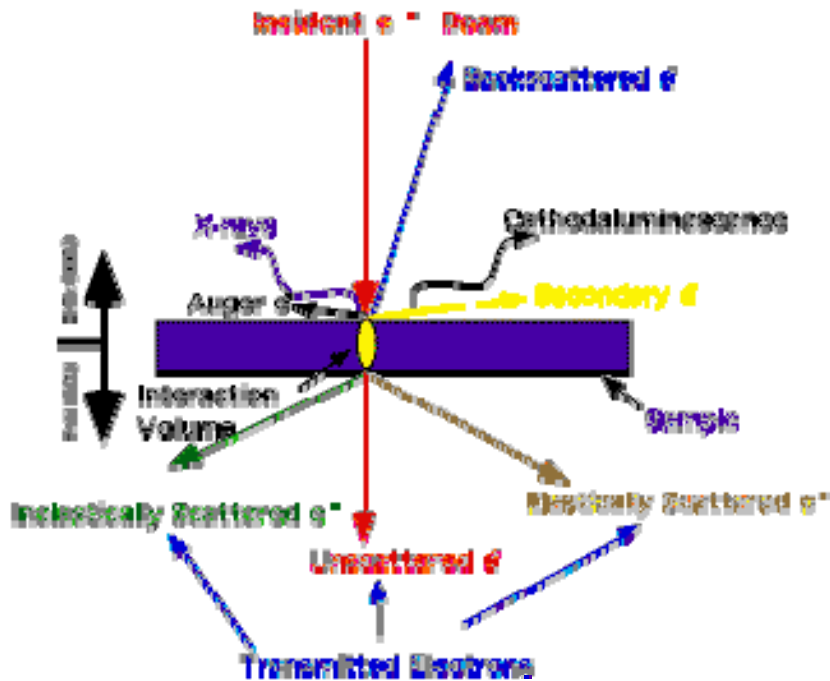
rušivé jevy - k nim patří především nabíjení povrchu preparátu, na který dopadají záporně nabitě primární elektrony, v případě, kdy není dostatečně elektricky vodivý

biologické objekty ve vysokovakuovém SEM musíme stejně jako v případě TEM pozorovat vysušené, kdy nejsou elektricky vodivé

před vlastním pozorováním se musí potáhnout tenkou vrstvičkou kovu s dobrou elektrickou a tepelnou vodivostí

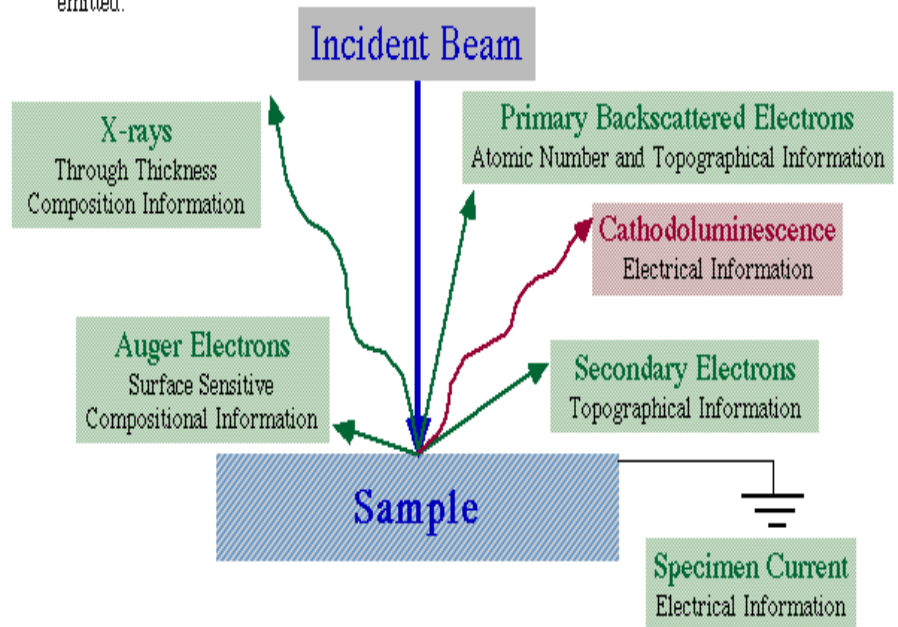
interakce vzorku a elektronů

TEM



SEM

When the electron beam strikes the sample, both **photon** and **electron** signals are emitted.

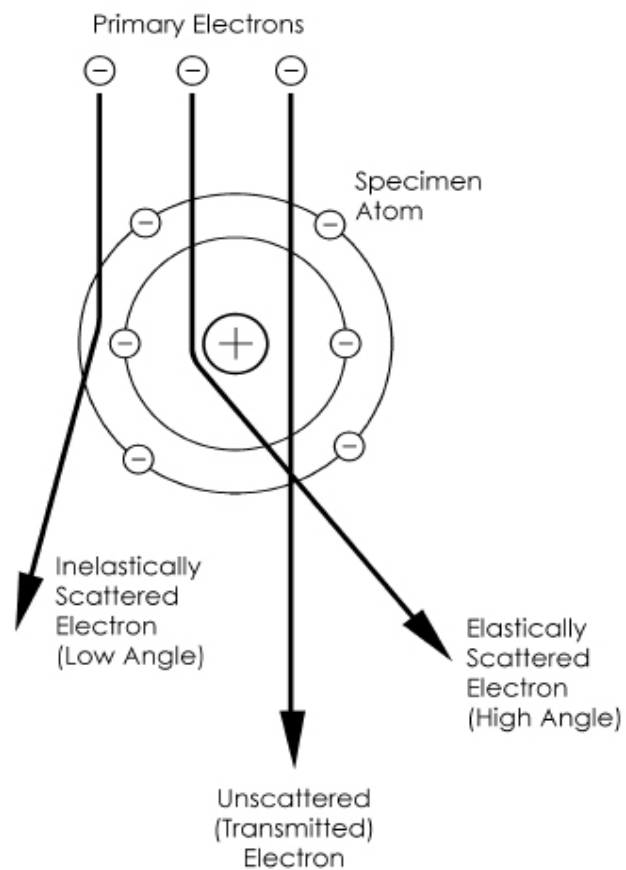


TEM - důležité jsou elasticky rozptýlené elektrony

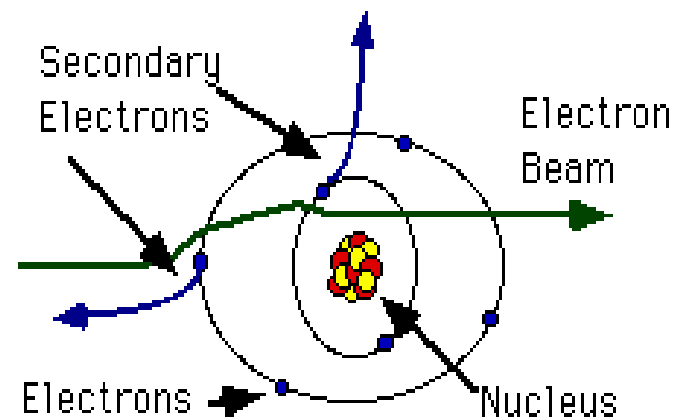
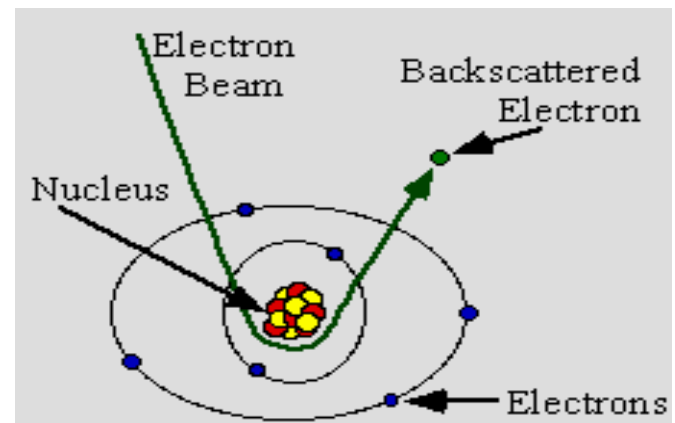
SEM – důležité jsou odražené a sekundární elektrony

interakce elektron - atom

TEM



SEM



detekce sekundárních a odražených elektronů

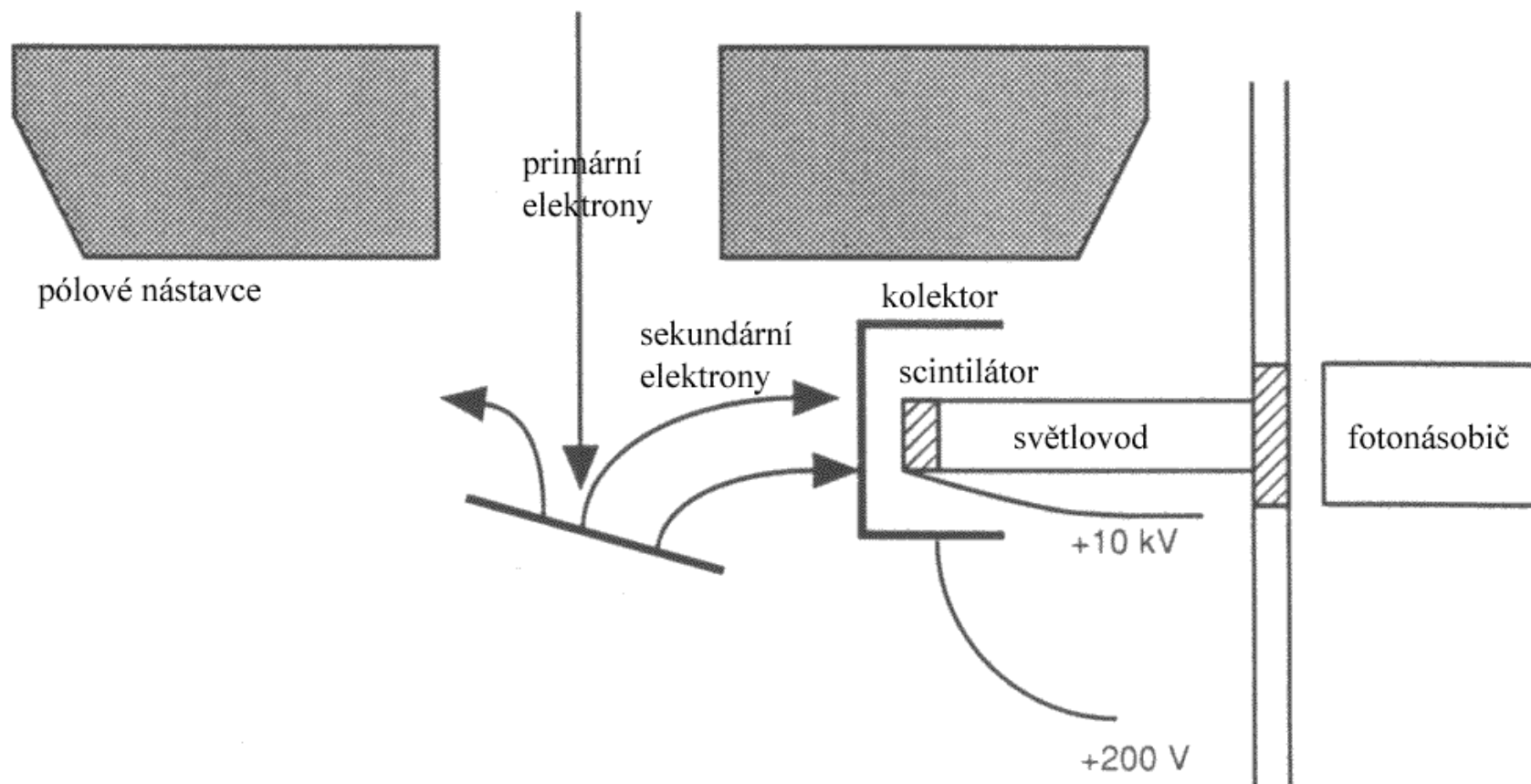
detektor sekundárních elektronů je prostředníkem mezi dějem, odehrávajícím se při interakci primárních elektronů s povrchem preparátu, při kterém dochází k uvolnění sekundárních elektronů, a obrazovkou mikroskopu, na kterou přenáší informace získané zachycením sekundárních elektronů o topografickém kontrastu preparátu

detektor sekundárních elektronů podle Everhart -Thornley

tvořen scintilátorem, který po dopadu elektronů uvolní záblesk světla ze středu viditelné oblasti (550-650 nm), jehož intenzita je přímo úměrná energii elektronů, které ho vyvolaly

světlo je dále vedeno světlovodem a komoru SEM opustí průchodem křemenným okénkem

mimo vakuum je umístěn fotonásobič, který zachytí světelný signál a převede je na elektrický, přičemž dojde k zesílení signálu zhruba 1000 až 1 000 000 krát



záznam obrazu

fotografie nebo digitální obraz

barvení digitálního obrazu, další úpravy, jednodušší než u TEM

příprava preparátů pro SEM

preparát vhodný pro prohlížení v mikroskopu musí splňovat

následující kritéria:

- na jeho povrchu by se neměly vyskytovat cizorodé částice, např. prach**
- měl by být stabilní ve vakuu**
- stabilitu by měl vykazovat i při ozáření elektronovým paprskem**
- měl by produkovat dostatečné množství požadovaného signálu, např. sekundárních elektronů**
- při expozici primárními elektronům by nemělo docházet k jeho nabíjení**

nutno vždy odstranit z biologických vzorků vodu

**očištění, případně i oplach, sušení, odvodnění, fixace, přichycení na
podložku,
pokovení**

Signály využívané v SEM

Informace

Použitý signál

morfologie

všechny signály s výjimkou rtg. záření a Augerových el.

**prvková
analýza**

**odražené el., Augerovy el., rtg.záření,
katodoluminiscence**

**chemická
vazba**

Augerovy el., rtg. záření

krystalografie

**odražené el., sekundární el, transmitované el.,
rtg záření**

tato přednáška byla vytvořeny dle výukových materiálů na

<http://www.paru.cas.cz/lem/book/>

pokovení vzorku: zlato, palladium, uhlík, platina

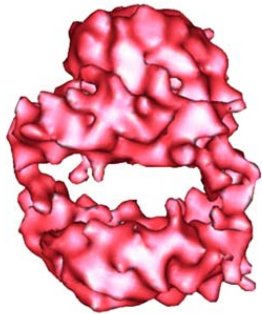
cryo-SEM : lze pozorovat vzorky i uvnitř, po jejich prasknutí

mikroskopy vybavené **EDS** (Energy Dispersed Spectroscopy) nebo **EDAX** (Energy-Dispersed Analysis of X-rays) detektory pro snímání přímo odražených elektronů (**back scattered electrons**) a **X-ray**, je možné detekovat které prvky jsou přítomné na povrchu (prvková analýza)

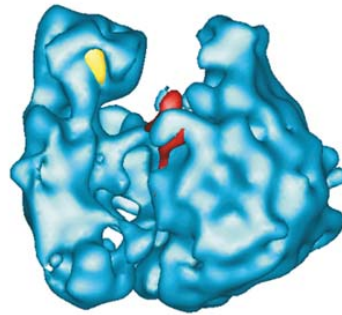
kryoelektronová mikroskopie

kryoelektronová tomografie

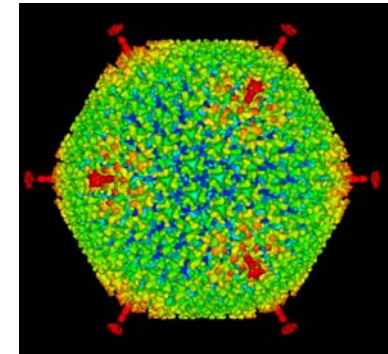
vhodné vzorky – jednotlivé částice (200 kDa – 400 MDa)



Asymmetric monomeric proteins
e.g. DNA-PKcs, 470 kDa



Protein/RNA or DNA complexes
e.g. Ribosome, ~2 MDa

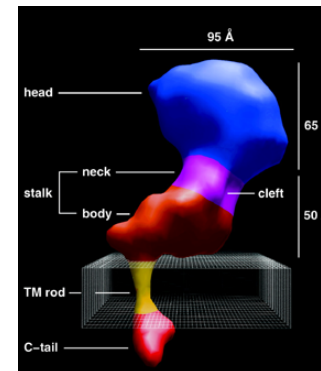


Icosahedral viruses
60-fold symmetry
e.g. Adenovirus, ~150 MDa



Detergent solubilized membrane proteins

e.g. Voltage-sensitive sodium channel
~300 kDa, Sato *et al.*, Nature 2001



e.g. Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$
~230 kDa, Adair & Yeager, PNAS 2002

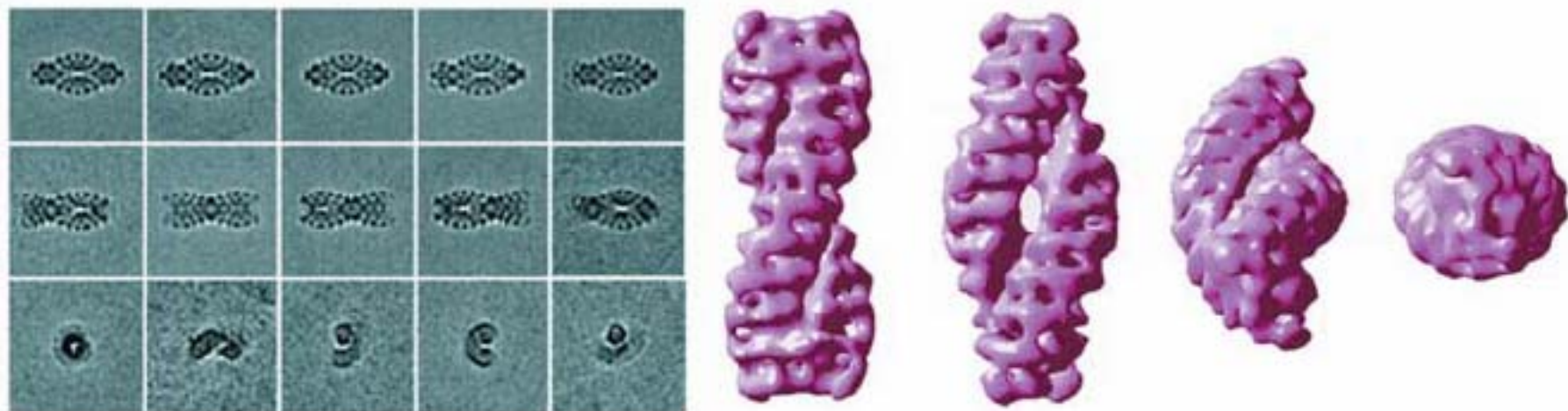


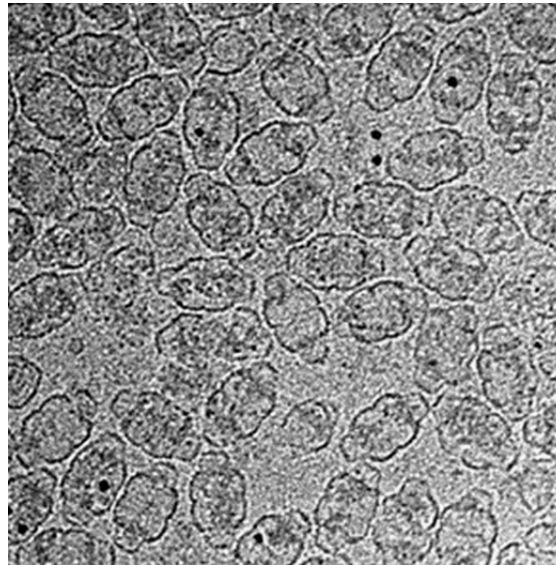
Figure 1. (a) High-resolution TEM (FEI Tecnai) images of *Drosophila melanogaster* tripeptidyl peptidase II acquired as part of a CryoEM single particle analysis. (b) The resulting 3D reconstruction with 3.3-nm resolution. Courtesy of Sali et al *Nature* 422: 216-225; ©2003 Nature Publishing Group.

Single Particle Method - Overview

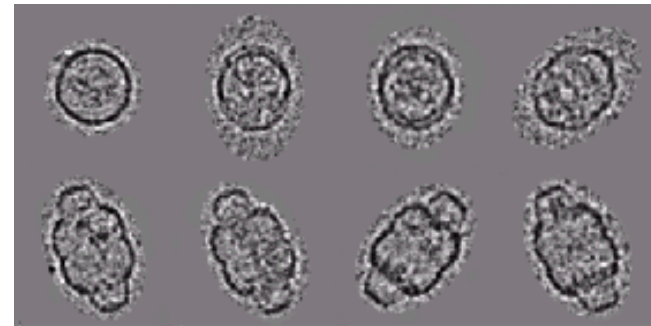
1. Cryo-Plunge Samples



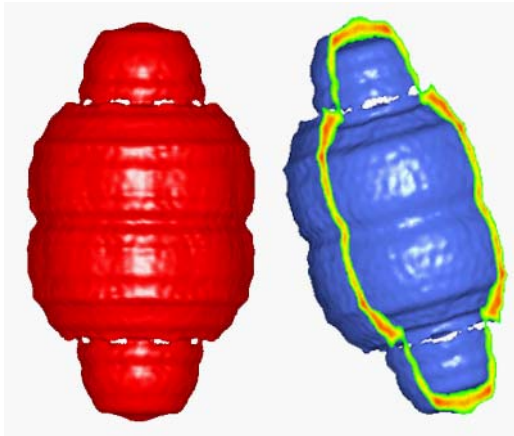
2. Collect Micrographs



3. Digitally Select Particle Images



4. 3D Image Processing



Average 100's or 1000's
of particle images

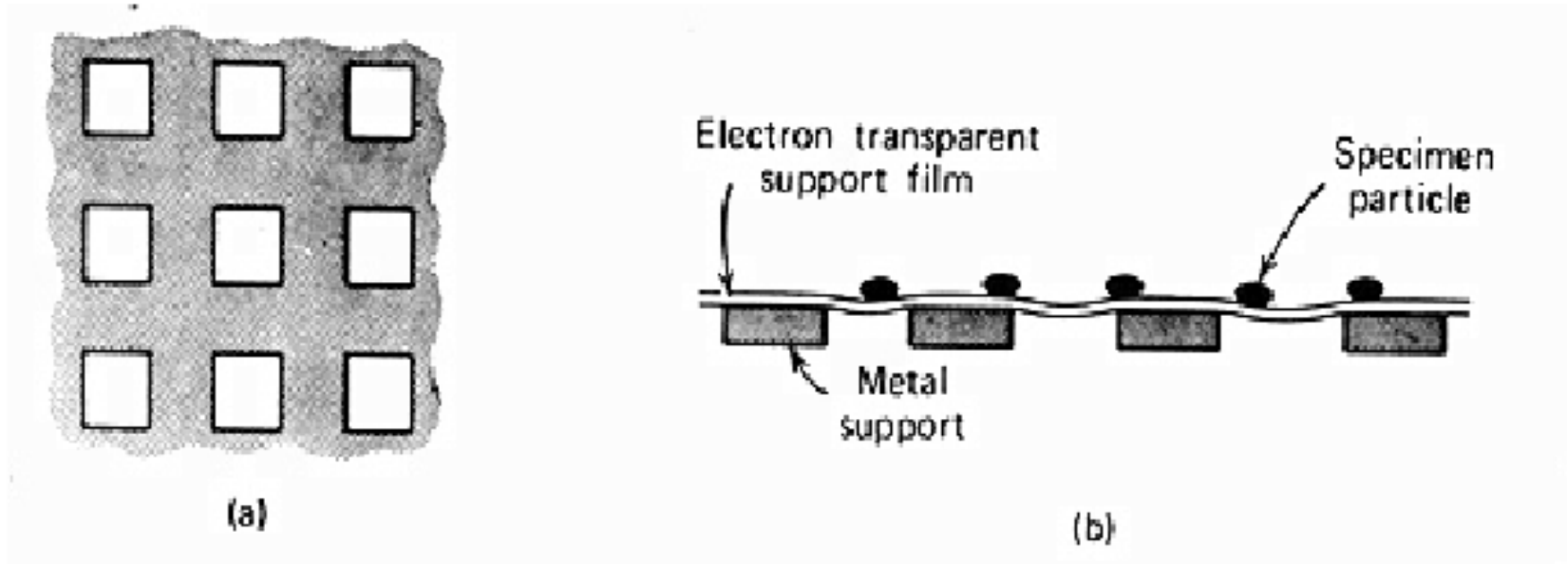
5. Structural Analysis & Modeling

GOAL

- ◆ Use structural information to understand biological function

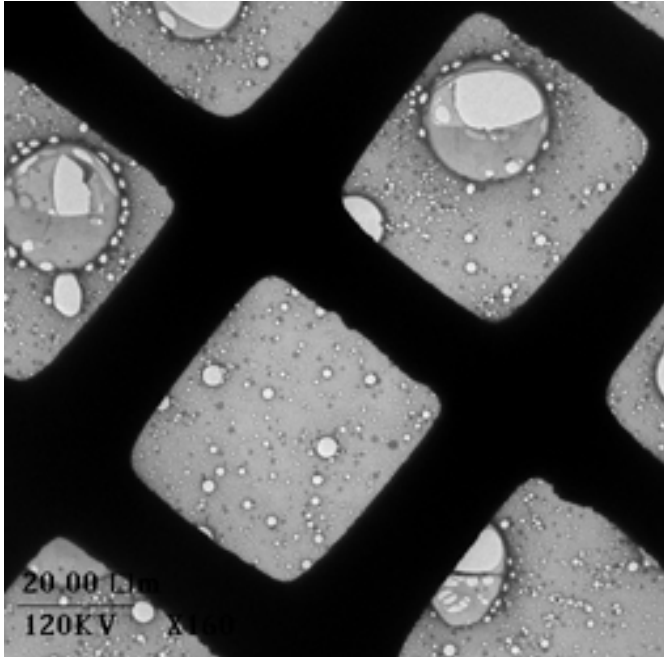
Cryo-Plunge Samples

EM Sample Grids

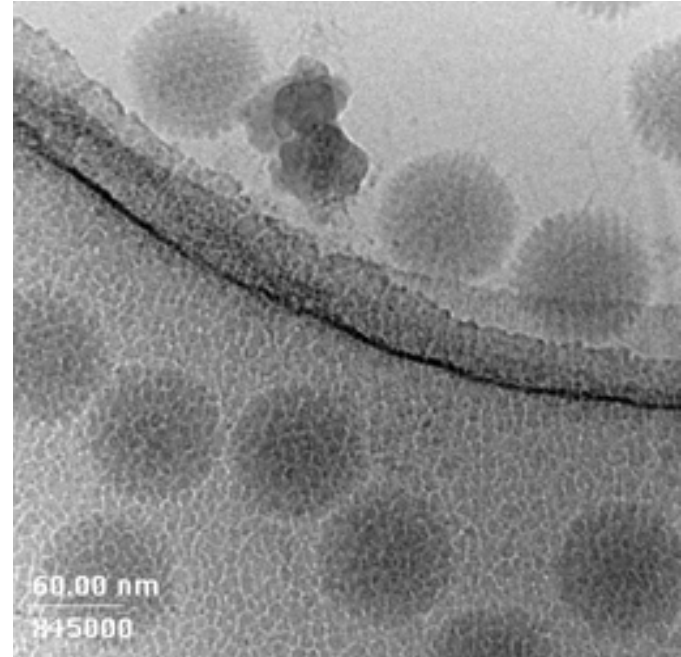


- For traditional electron microscopy, a copper mesh grid is covered with a thin carbon film.

A



B



- For cryo-EM, a copper mesh grid is covered with a holey carbon film (A). Images are collected of the frozen sample suspended in holes of the carbon film (B). Any particles that are on the carbon support are not used in the image processing because they have a higher background signal.

Cryo-Plunging Device



- The biological sample is applied to the grid, blotted to leave a thin film of water, and then plunge-frozen in ethane slush chilled by liquid nitrogen.
- Cryo sample preparation methods were developed in the mid 1980s

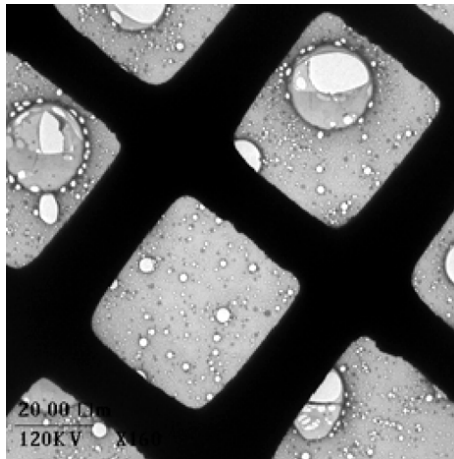
Cryo Plunging and Grids



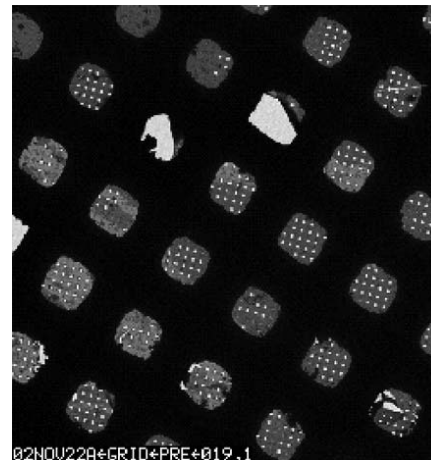
Home built
Plunger



Vitrobot
Reproducibility



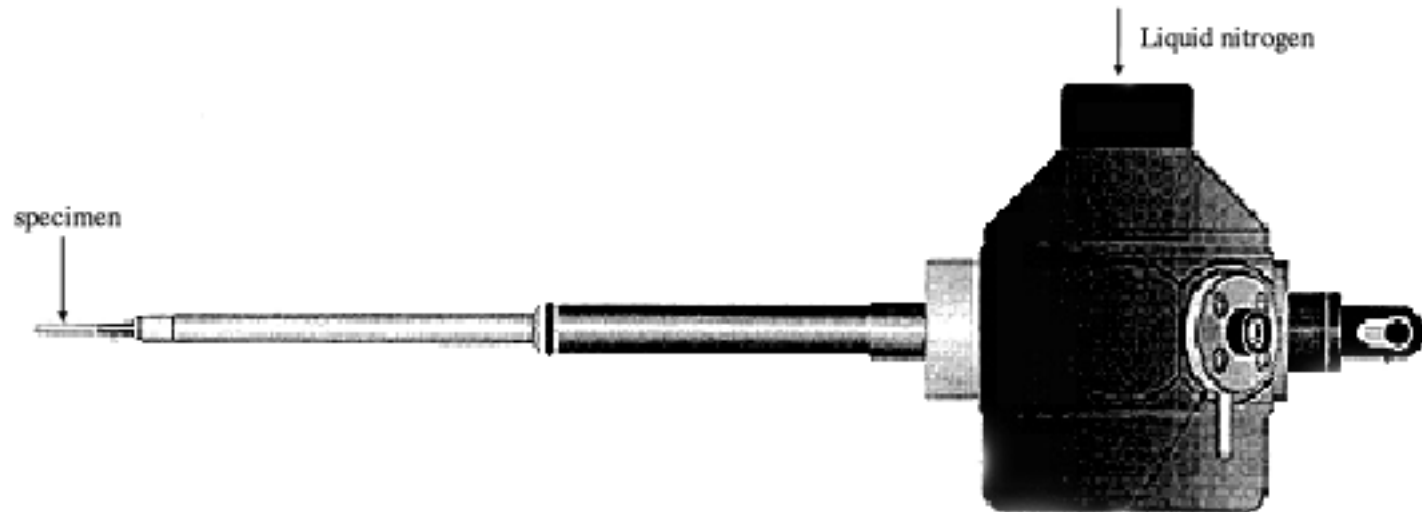
Homemade
Holey film



Quantifoil Grids
*Automation of Data
Acquisition
LEGION System
Scripps*

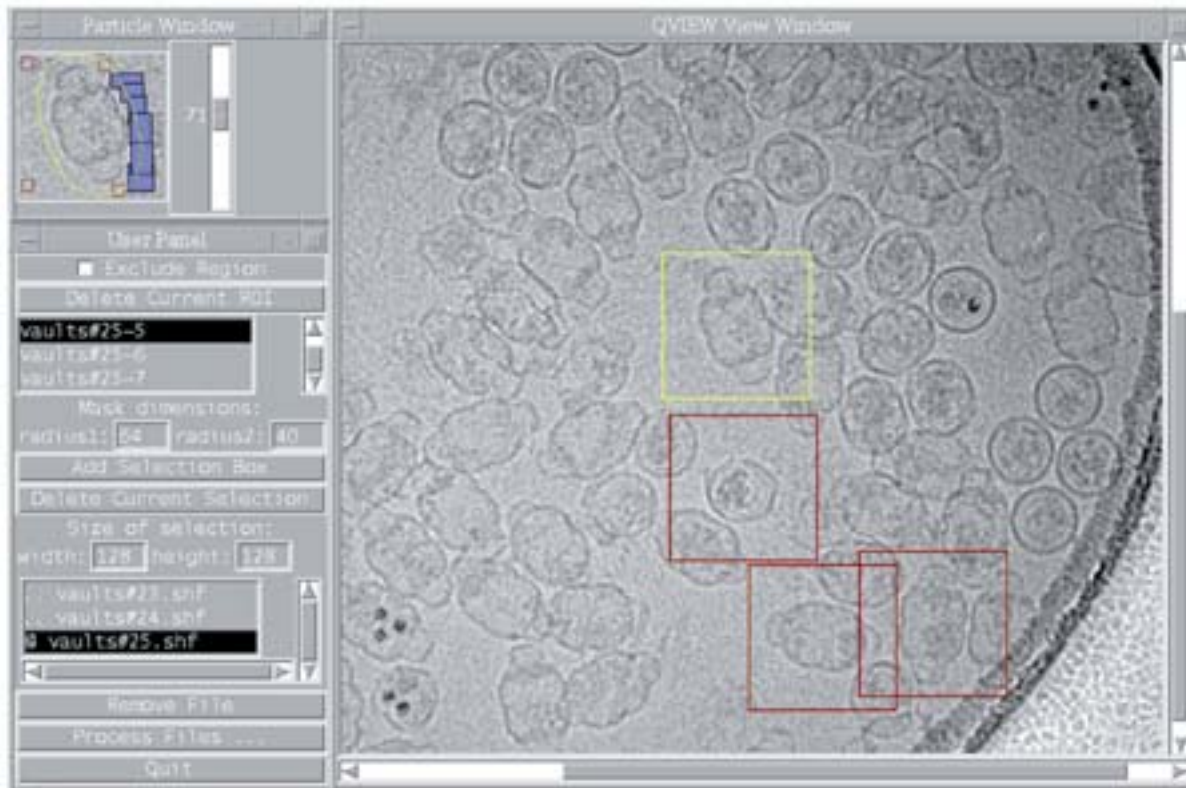
Collect Cryo-Micrographs

Cryo Sample Holder



- The frozen sample grid is normally kept at liquid nitrogen temperature (approximately -185°C) while in the vacuum of the microscope by a cryo-holder.
- Liquid helium microscopes allow the sample grid to be kept even colder ($\sim 12\text{ K}$, -261°C) in the microscope.

Digitally Select Particle Images



- Individual particle images must be selected from digital cryo-electron micrographs. This has been done interactively (non-automatically) in the past. Software is being developed for automatic particle selection.

Three-Dimensional Image Processing

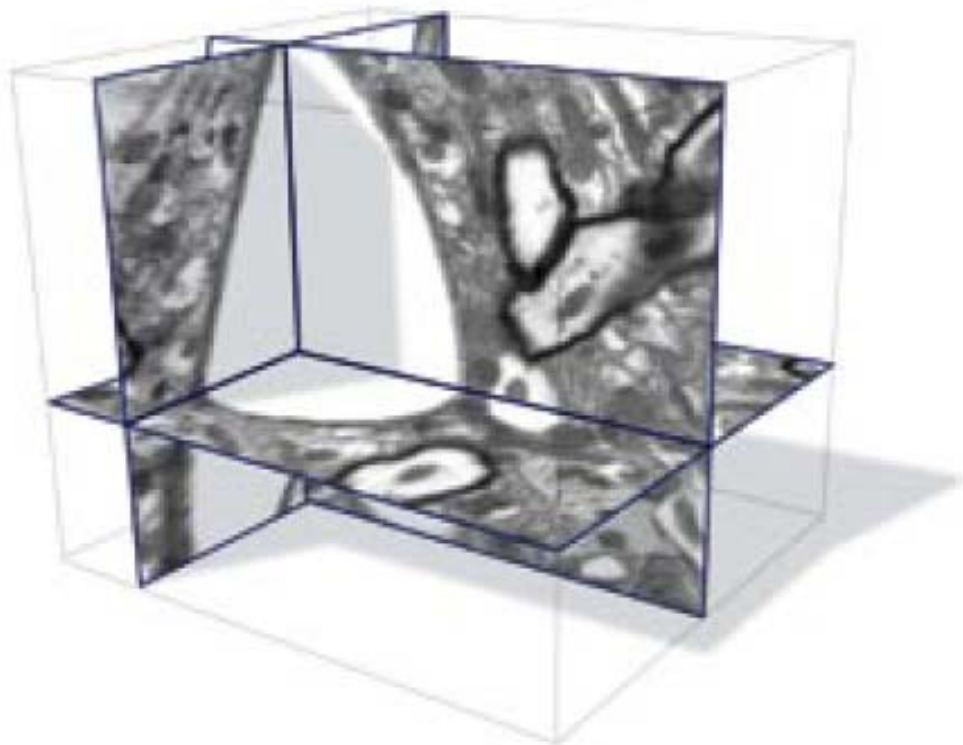
- Each particle image represents a 2D projection of the 3D object



3D object (a
duck)

2D projections
in different
views

- The difficult step in 3D image processing is to determine the orientational angles (Euler angles) for each projection image



This image shows a 3D representation of more than 200 recorded slices using the fully automated *Slice and View* process of an embedded and stained section of mouse brain. The sectioned area of the sample is $13 \times 13 \times 8 \mu\text{m}$ and is courtesy of Dr. Graham Knott, Département de Biologie, Cellulaire et de Morphologie, Faculté de Biologie et Médecine, Université de Lausanne, Switzerland.

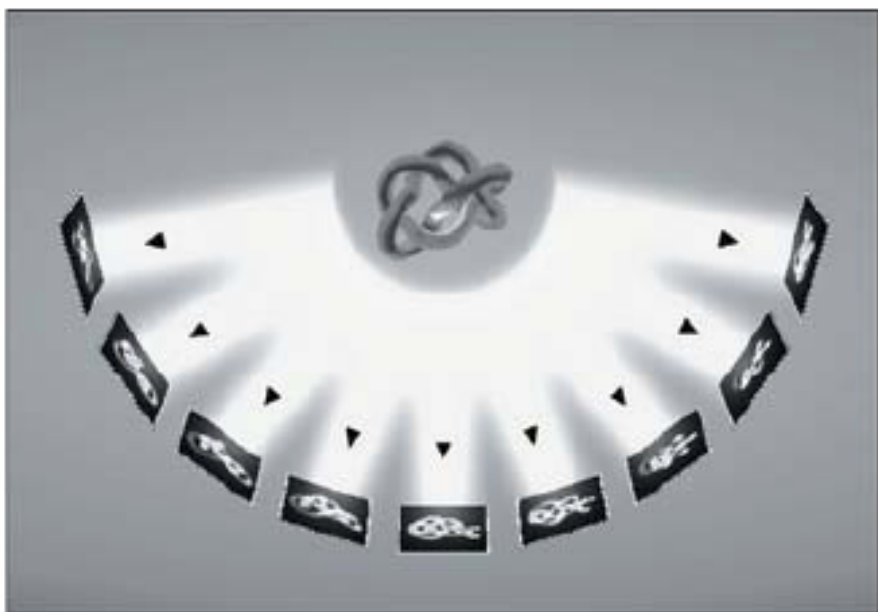
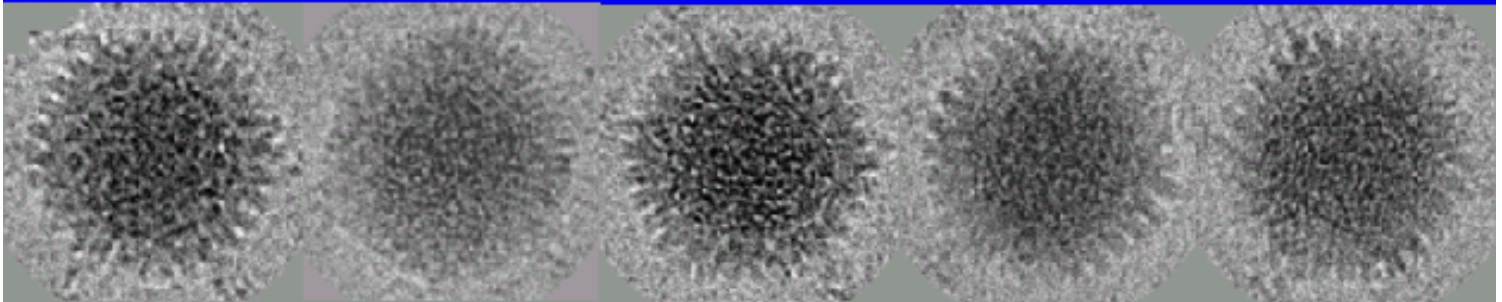


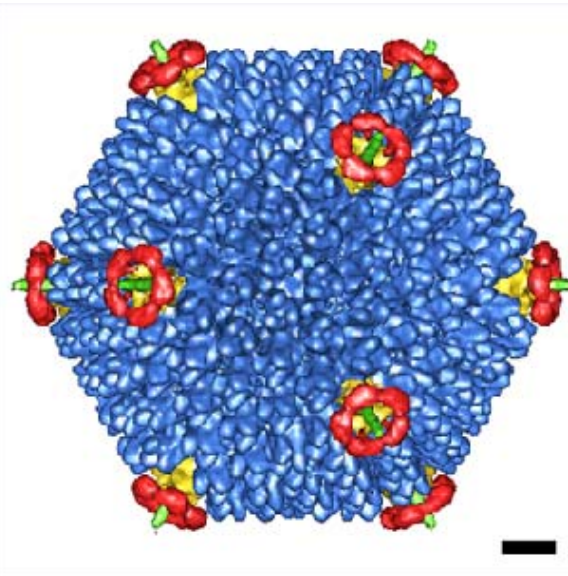
Figure 3. Electron tomography acquires multiple 2D projections of the molecule as it is tilted through a sequences of precise angular increments. The projections are then 'back-projected' to calculate the 3D model. Sidec COMET analysis acts as a mathematical filter to improve the signal to noise ratio and resolution of the model. Courtesy of Sali et al *Nature* 422:216-225; ©2003 Nature Publishing Group.

3D Image Processing

Particle images (with determined Euler angles)



3D Reconstruction



Reprojections
(should match particle images)

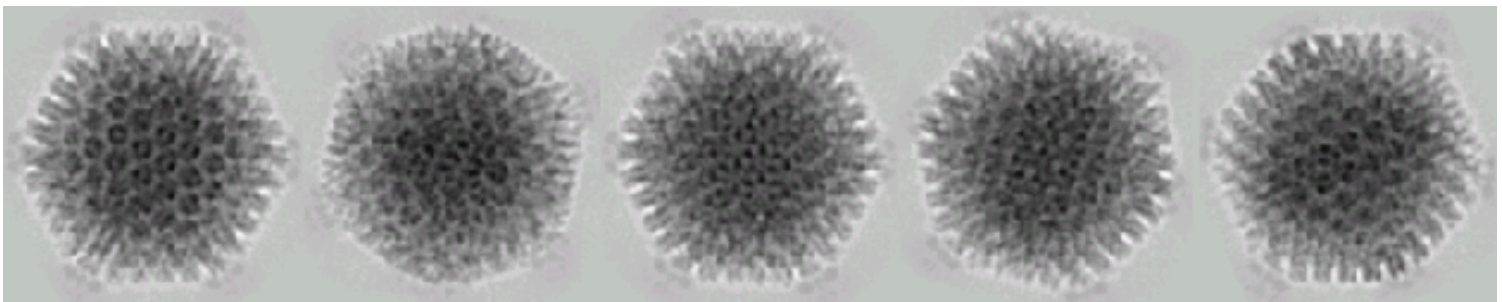
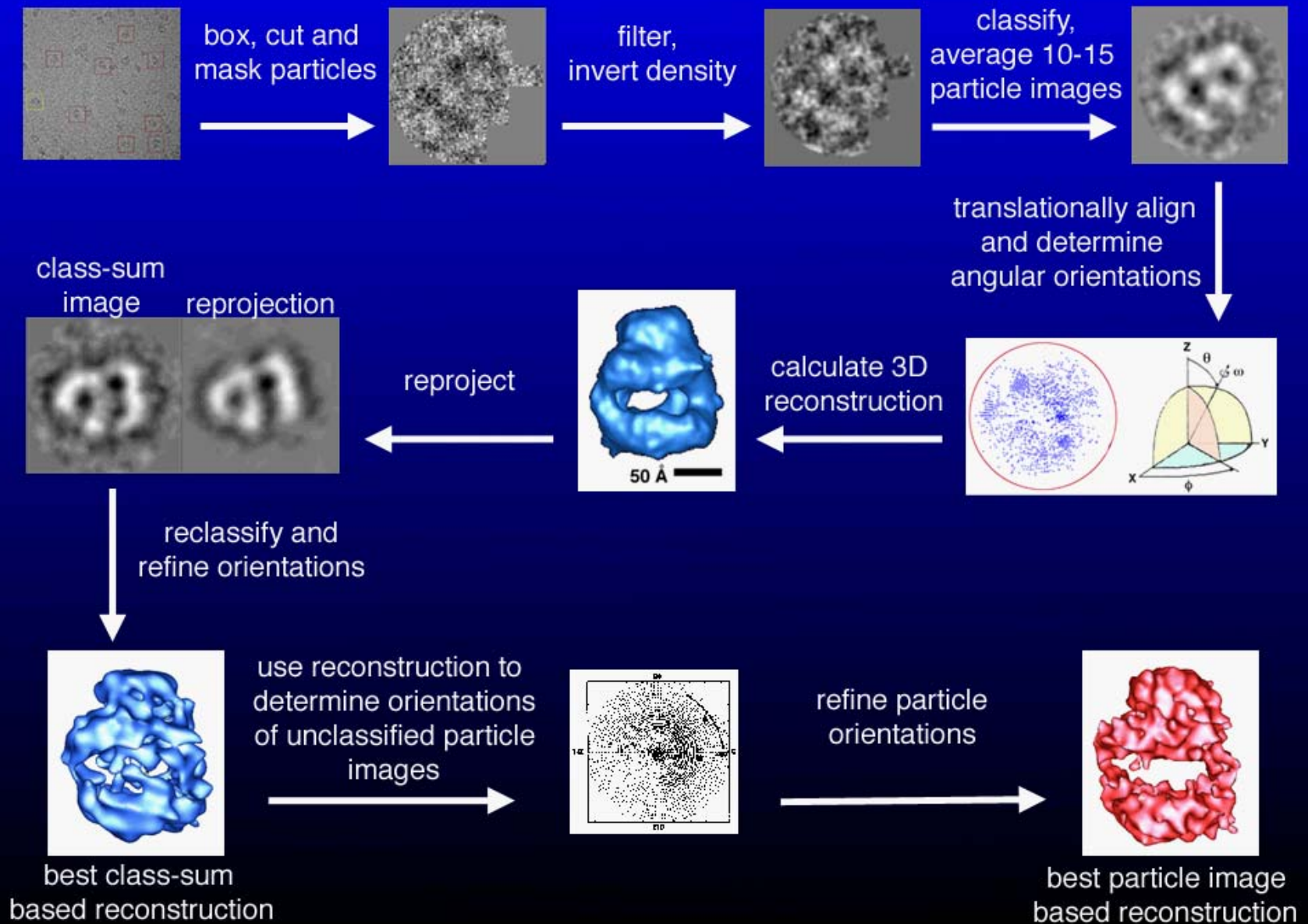


Image Processing of an Asymmetric Particle



mikroskopie skenující sondou

mikroskopie atomárních sil

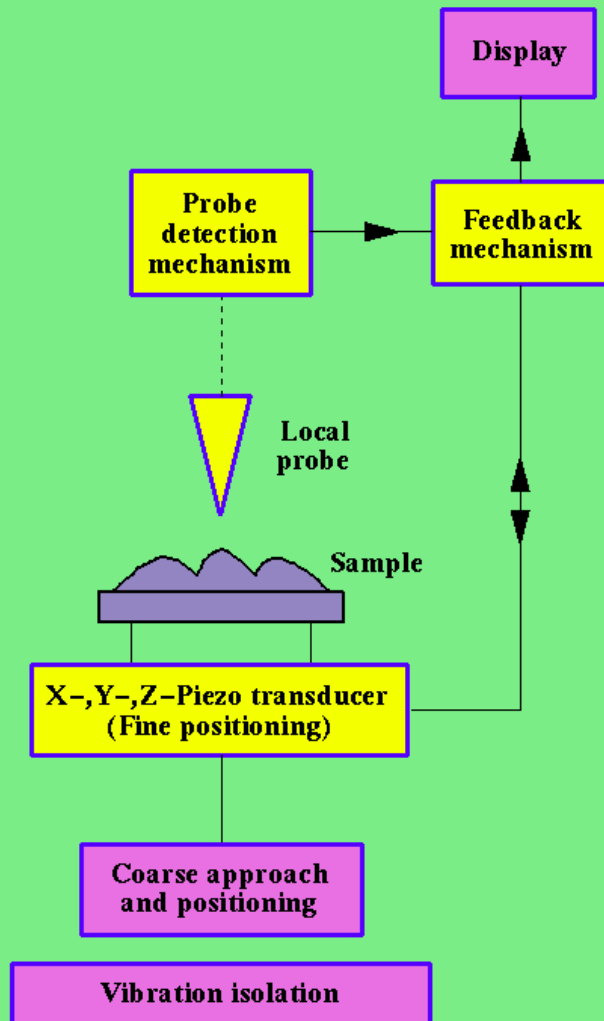
Characteristics of Common Microscopic Techniques for Imaging and Measuring Surface Morphology

	Optical Microscope	SEM	SPM
Sample operating environment	ambient air, liquid, or vacuum	vacuum*	ambient air, liquid, or vacuum
Depth of field	small	large	medium
Depth of focus	medium	large	small
Resolution: x,y	1.0 μ m	5nm	2-10nm for AFM 0.1nm for STM
Resolution: z	N/A	N/A	0.1nm for AFM 0.01nm for STM
Effective magnification	1X - 2x10 ³ X	10X - 10 ⁶ X	5x10 ² X - 10 ⁸ X
Sample preparation requirement	little	little to substantial	little or none
Characteristics required of sample	sample must not be completely transparent to light wavelength used	surface must not build up charge and must be vacuum compatible*	sample must not have local variations in surface height > 10 μ m

*Environmental SEMs can be operated at higher pressures and low eV but resolution is sacrificed.

mikroskopie skenující sondou (SPM)

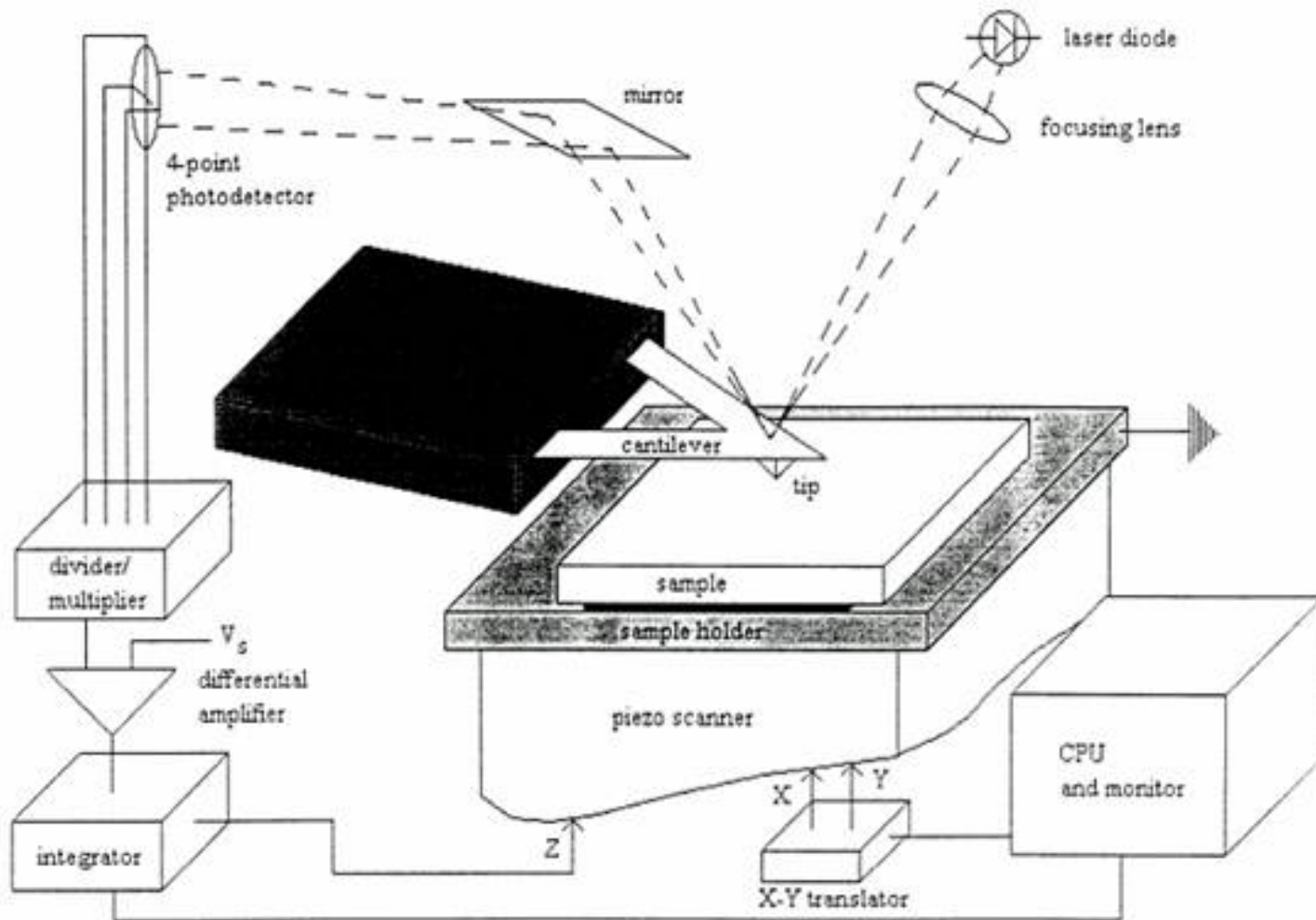
Generalized Schematic of a Scanning Probe Microscope



typy interakcí mezi jehlou a vzorkem:

- **tunelovací proud**
 - Scanning tunneling microscopy (STM)
- **silové interakce**
 - Scanning force microscopy (and variants) (AFM)
- **elektromagnetické síly**
 - Scanning near-field optical microscopy (SNOM)

mikroskopie skenovací sondou



-Piezo scanner is a device containing a piezoelectric crystal

-Piezoelectric crystal is able to produce electric potential in response to applied stress

-this induces a voltage across the sample and tunneling is able to occur

skenovací tunelovací mikroskopie (STM)

první pokusy zobrazit povrch vodivých a nevodivých materiálů

první biologická molekula zobrazená pomocí STM byla dsDNA v r. 1989

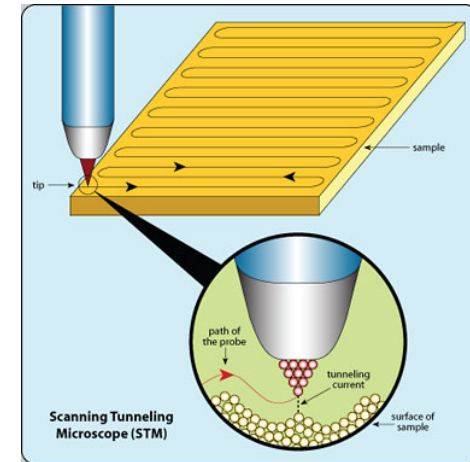
tunelovací efekt: kvantový fenomén, pro velmi malé objekty, např. elektrony, jim jejich vlnové vlastnosti dovolují projít skrz pevnou bariéru (zde vzduch)

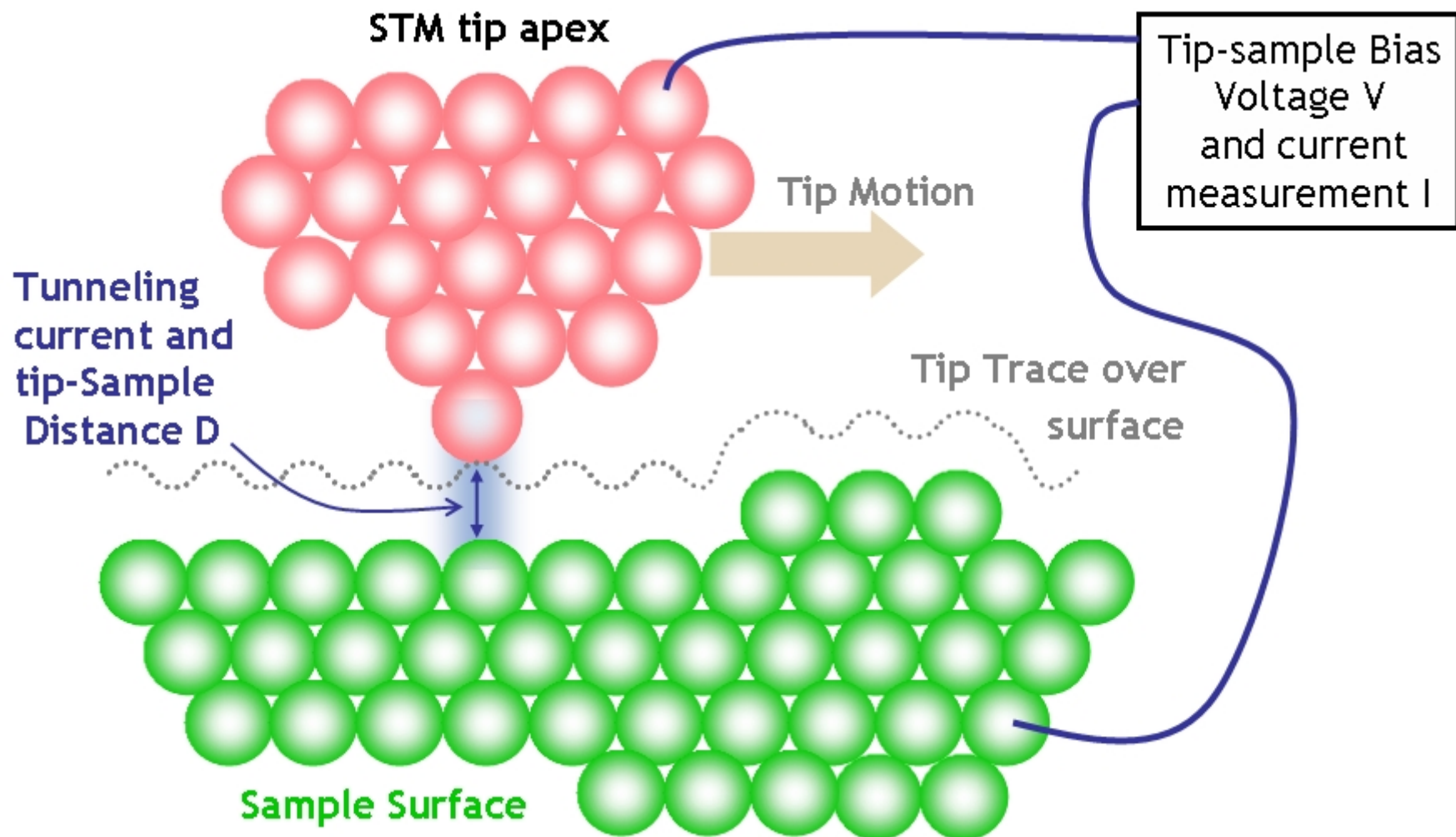
princip: elektronový mrak je těsně nad povrchem vzorku

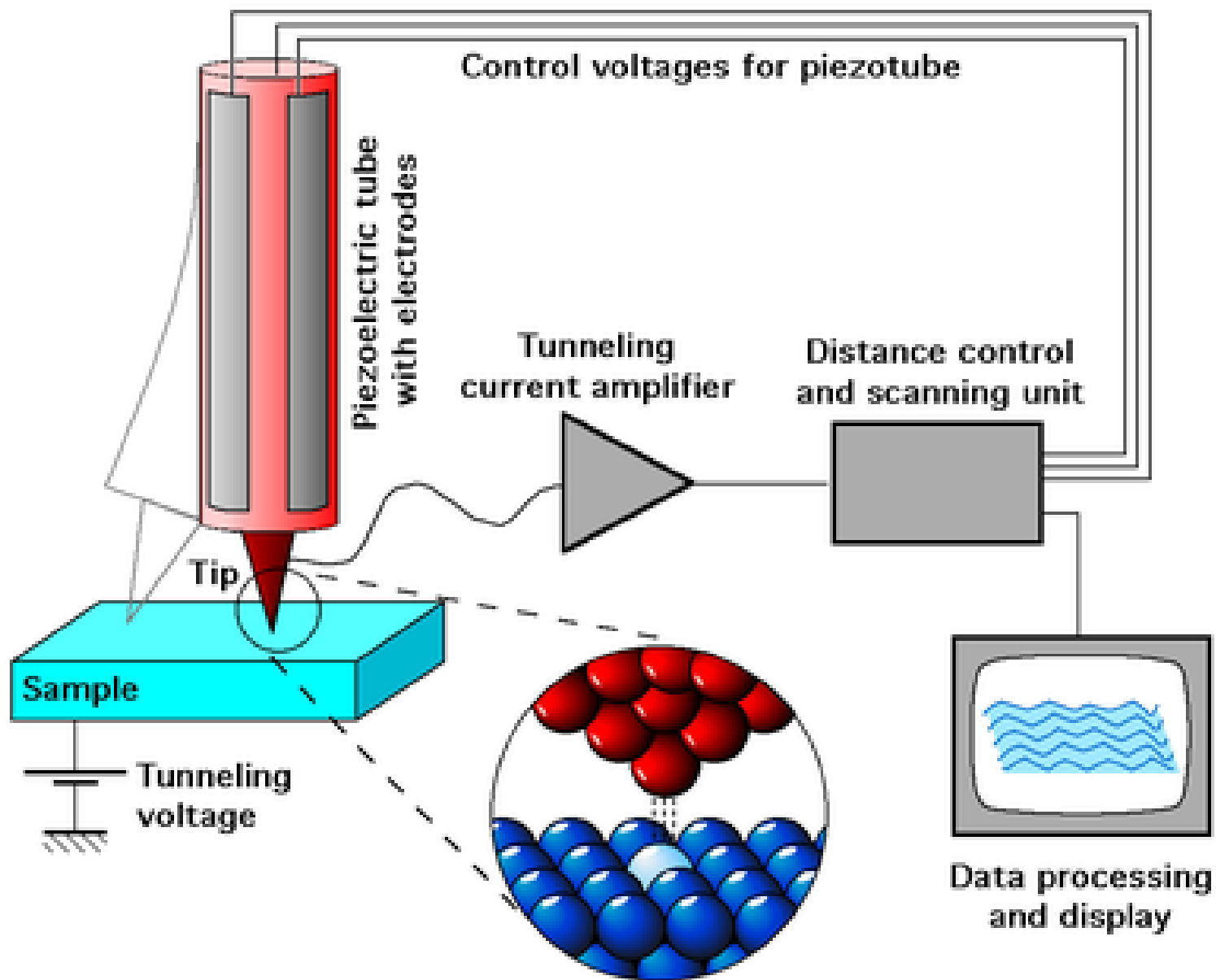
jehla je upravená tak, aby na jejím konci byl jeden atom

když se tento atom přiblíží povrchu, tedy el. mraku, interagují a produkují elektrický tunelovací proud

čím je jehla blíže k povrchu tím je vyšší tento proud







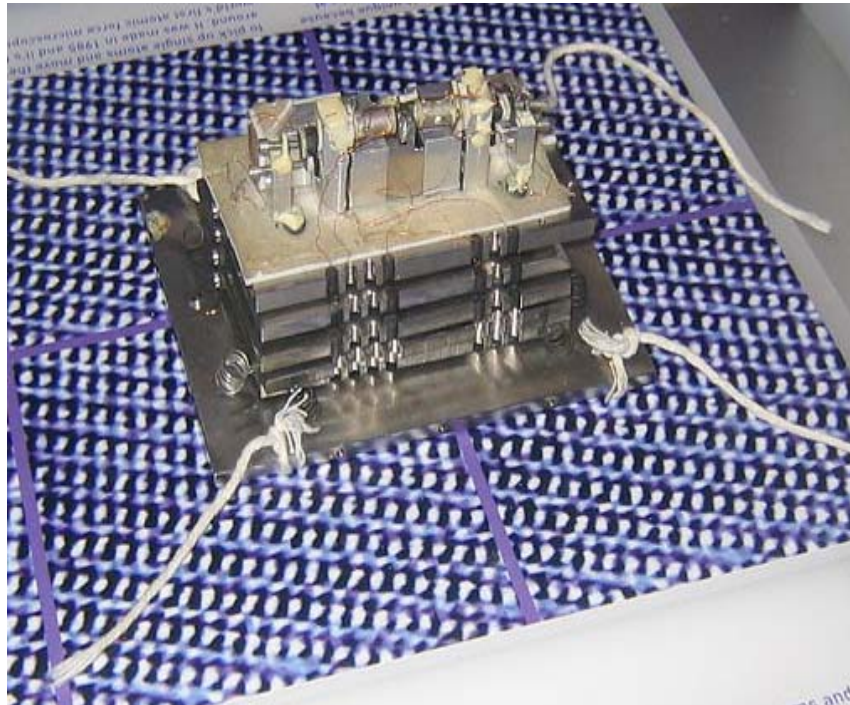
mikroskopie atomárních sil

historie AFM

1981 - STM - Binnig a Rohrer (NC 1986)

1986 - AFM - Binnig, Quate a Gerber

1987 – pokleповý (tapping) mode



1989 – více publikací využití AFM v biologických vědách

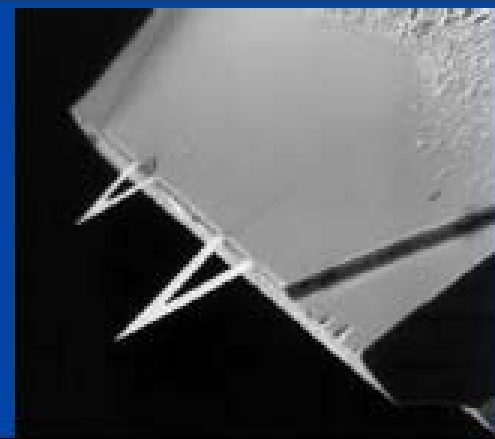
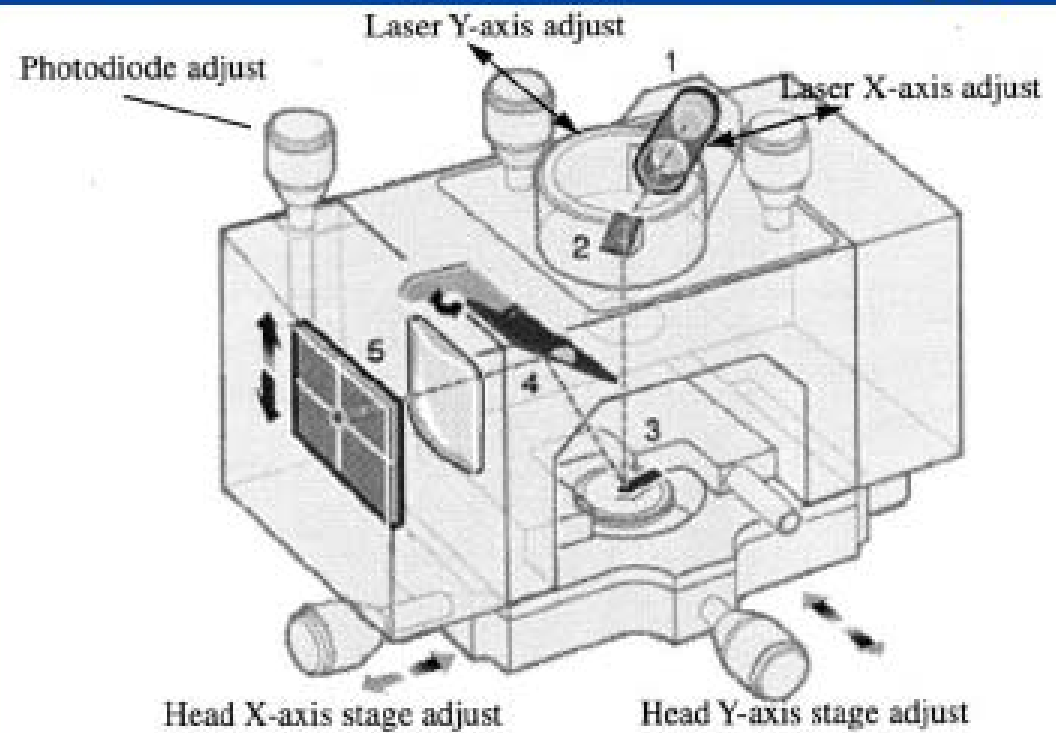
1992 – první článek o zobrazení DNA

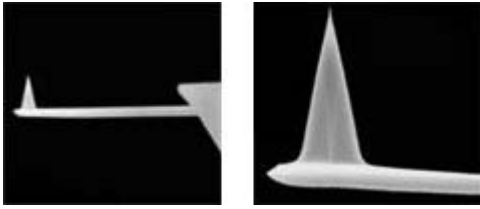
1994 – Tapping mode v kapalině

Atomic Force Microscopy

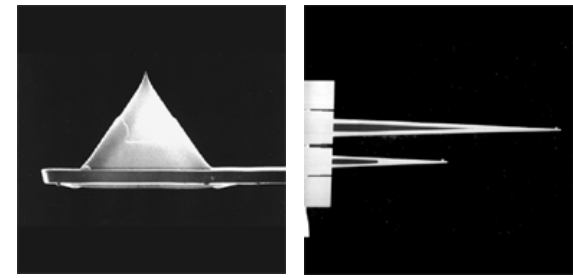


Atomic Force Microscopy





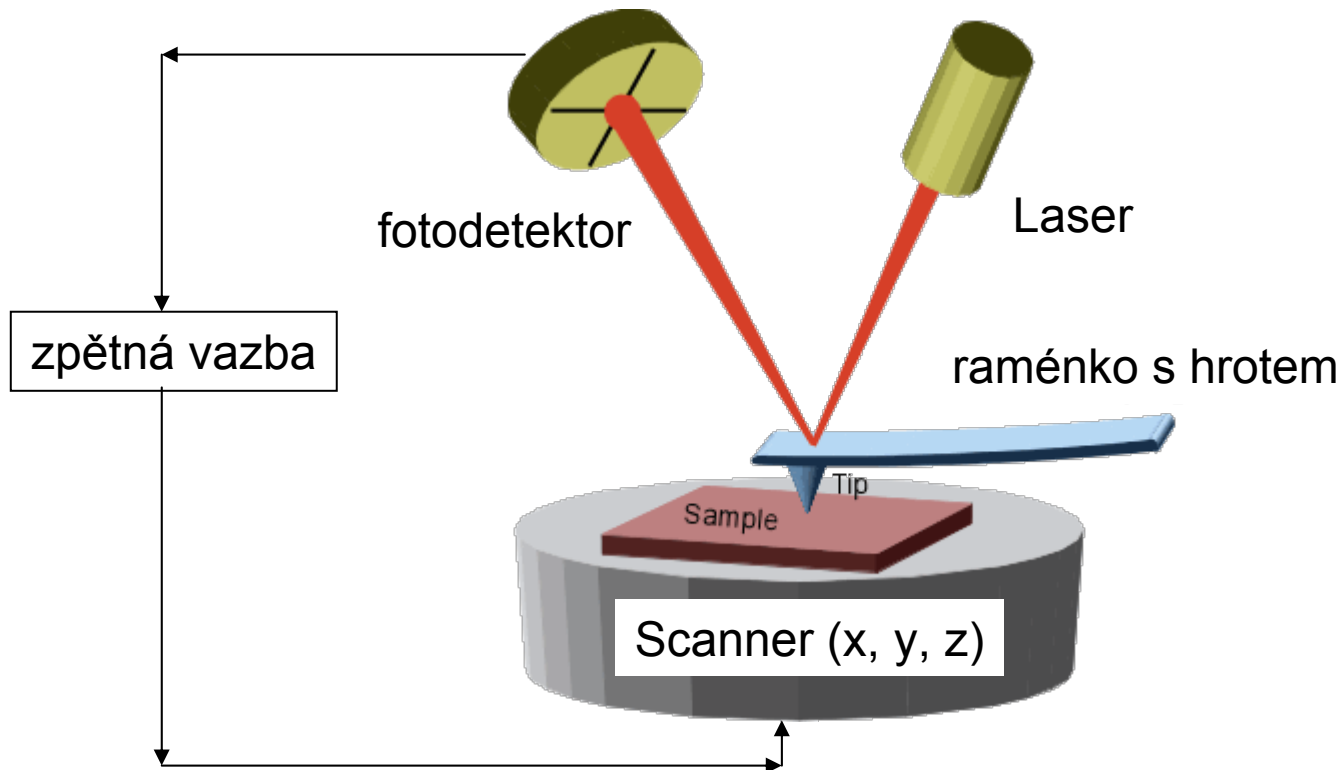
princip AFM

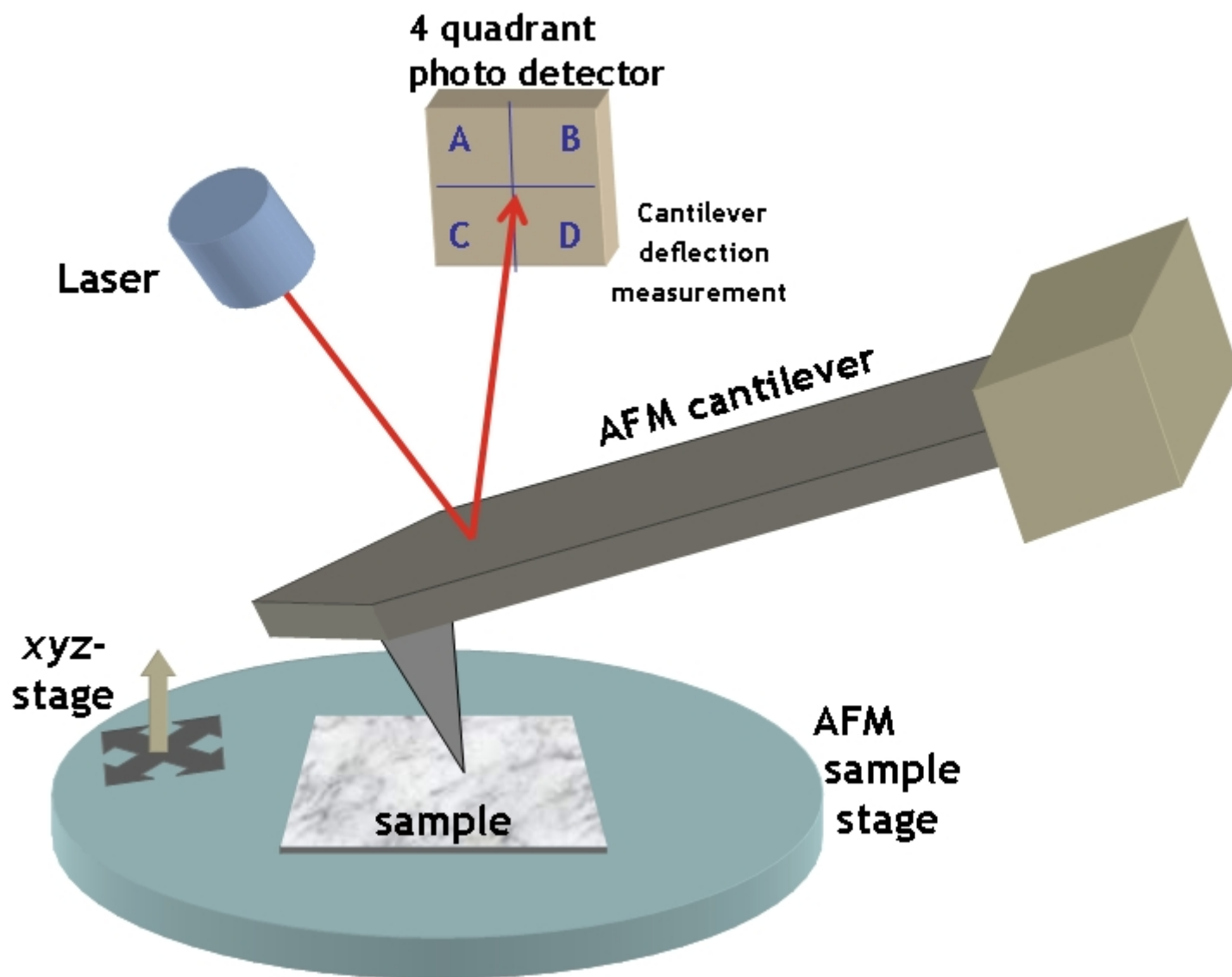


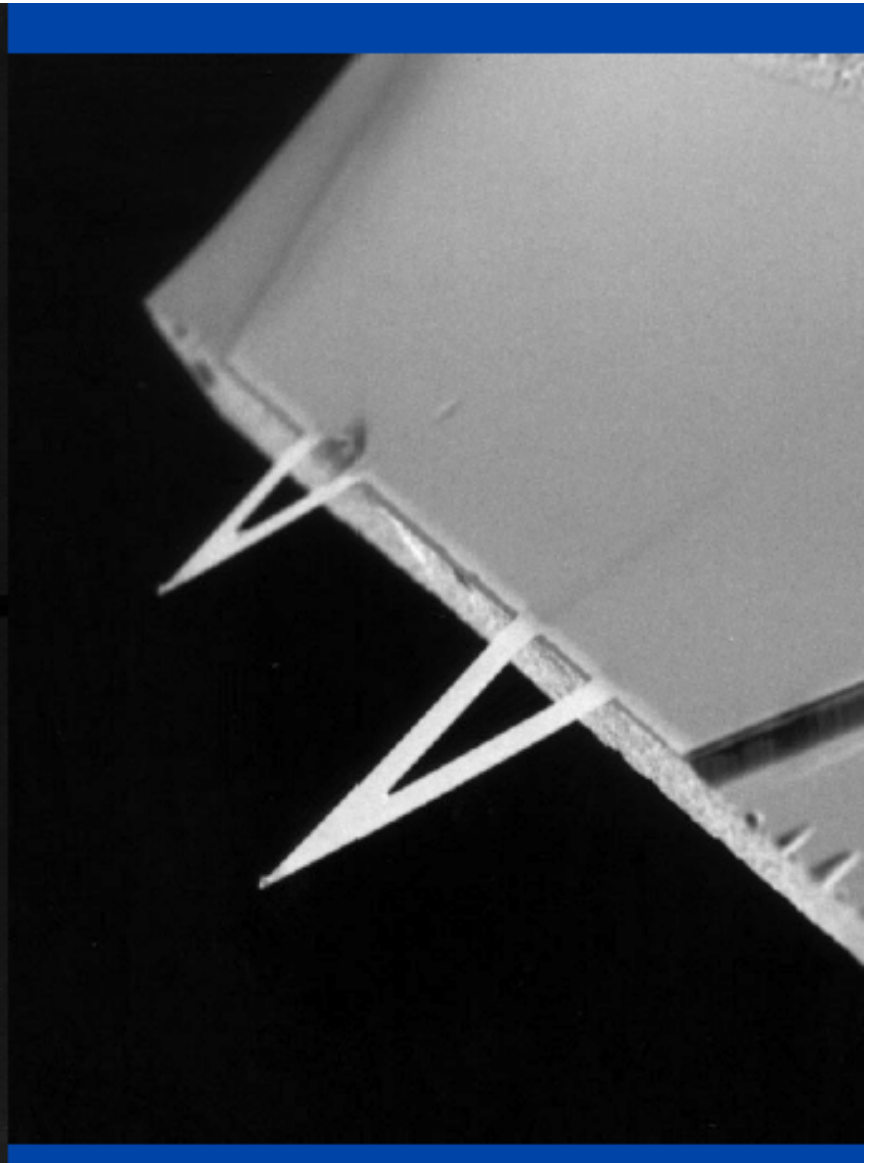
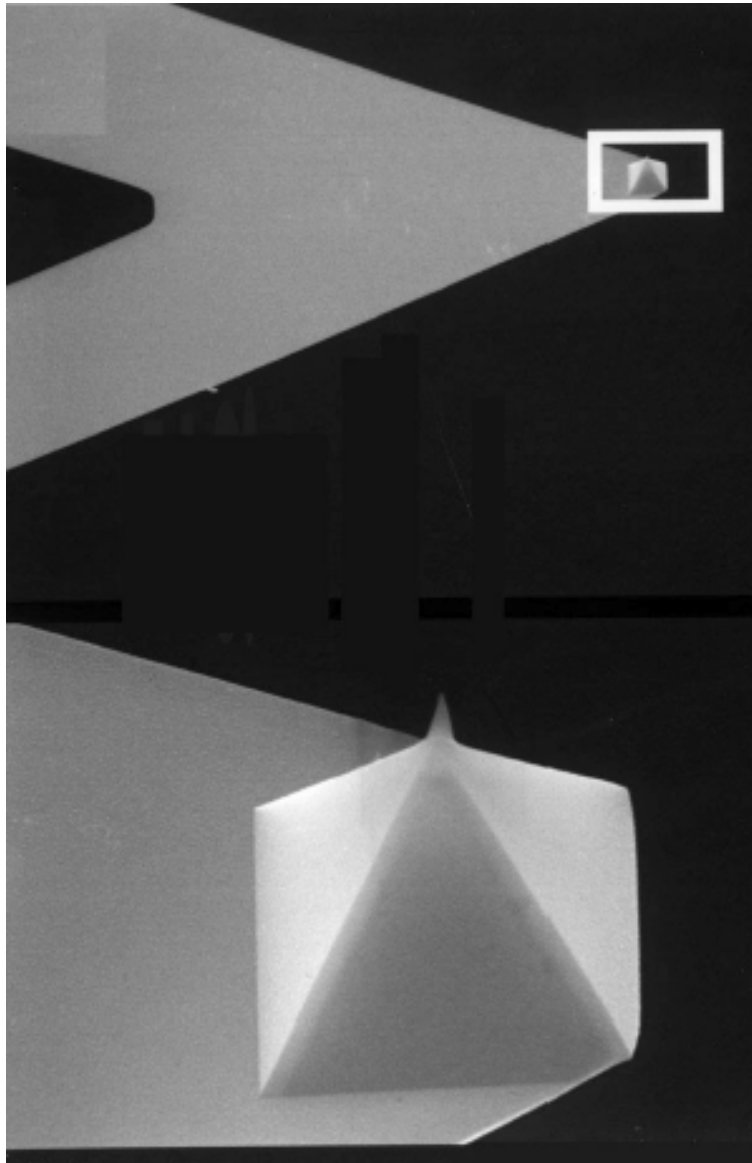
velmi tenký hrot umístěný na pružném raménku

detekce ohybu, detekce vibrace raménka díky odrazu laseru

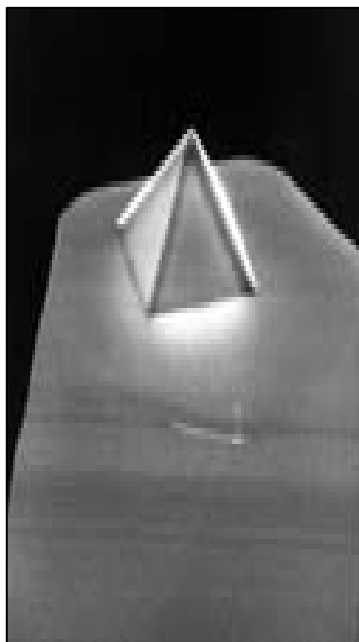
skenování - načítání výškového profilu řádek po řádku



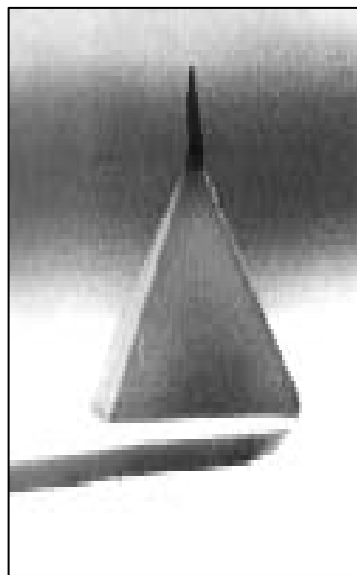




Normal tip



Supertip



Ultralever



Tall (μm)	3
End Radius (nm)	~ 30

Tall (μm)	3
End Radius (nm)	10

Tall (μm)	3-5
End Radius (nm)	$\sim 3-5$

Si, Si_3N_4

Contact mode



Non-contact



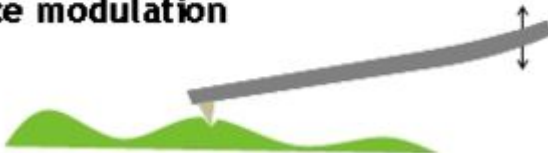
**Tapping mode
/intermittent contact**



Lateral force



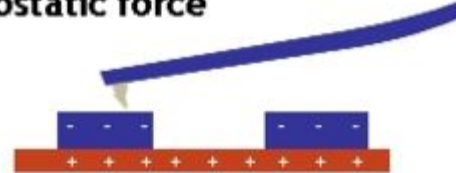
Force modulation



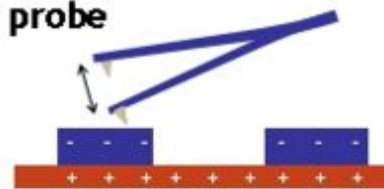
Force distance



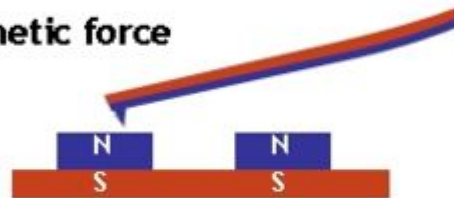
Electrostatic force



Kelvin probe



Magnetic force



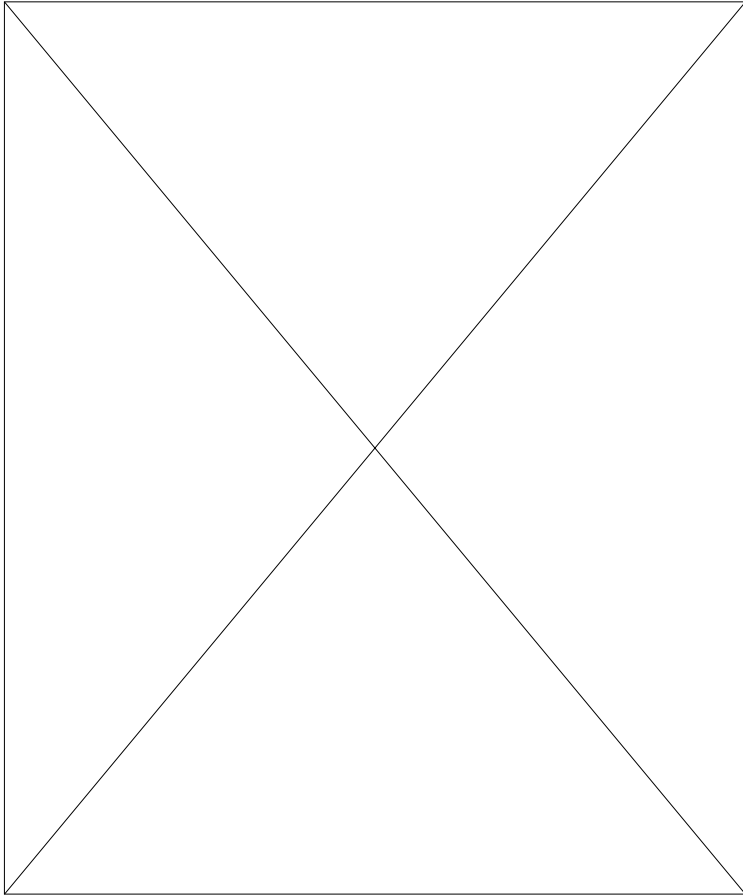
Liquid AFM



Electrochemical AFM

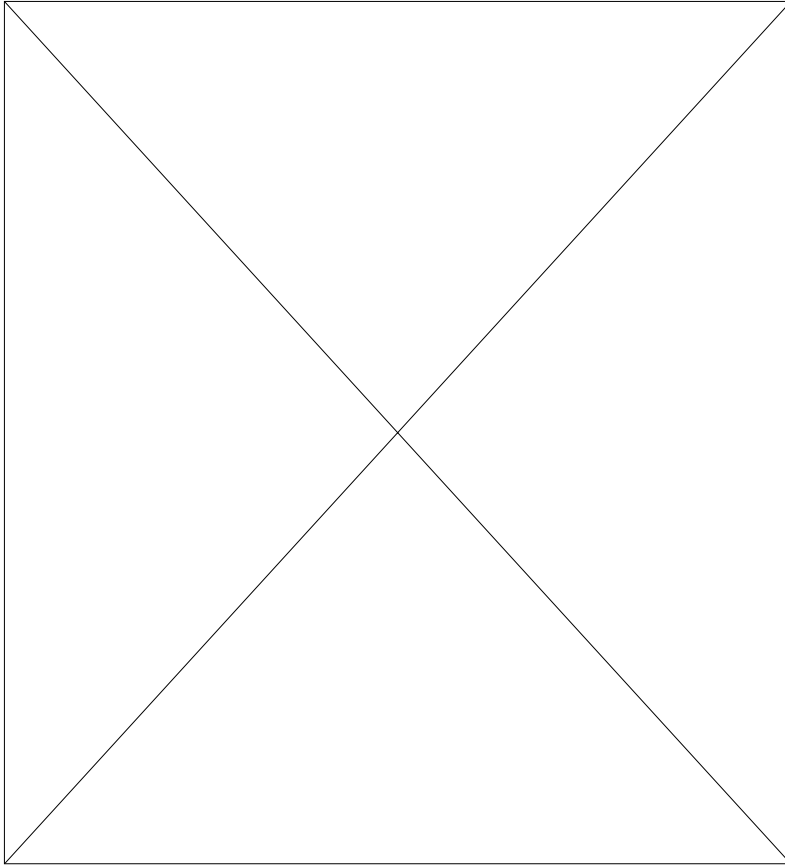


kontaktní mód



- konstantní ohyb
- konstantní výška
- vysoké střižné síly
- vhodné na skenování pevnějších materiálů
- nutnost velmi pevné immobilizace
- až atomární rozlišení

pokleповý mód



- tappingTM, semicontact...
- hrot rozechvívaný piezorezonátorem
- definovaná redukce (A_{sp}) volné amplitudy (A_0)
- regulované zpětnou vazbou pohybem skeneru
- eliminace střižných sil
- nižší rozlišení

**povrchy na uchycení studovaného předmětu na AFM – často slída
nebo sklo**

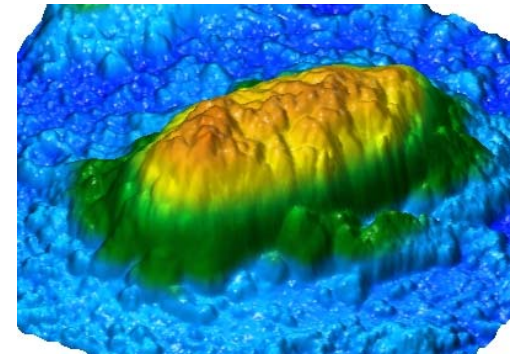
**povrch musí být atomárně hladký, čistý, chemicky ekvivalentní ve
všech směrech**

měly by se na něj dobře adsorbovat proteiny či nukleové kyseliny

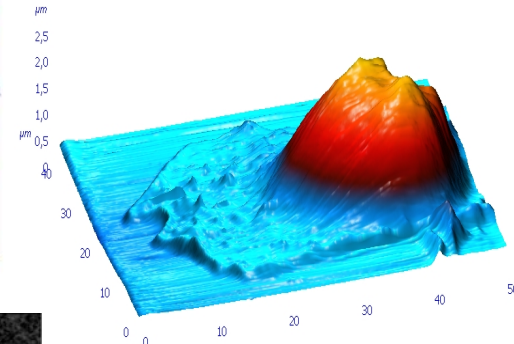
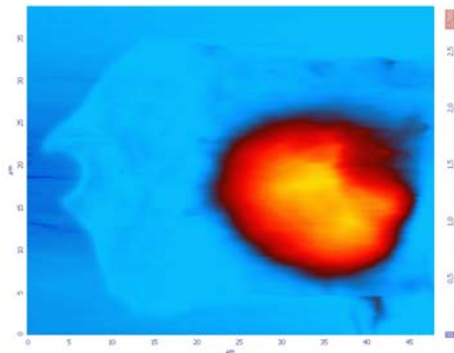
- modifikace povrchu, polylysin,**
- fixace vzorku**

výhody použití AFM v biol. vědách

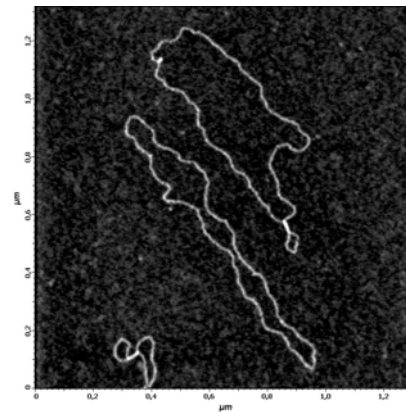
- skutečný 3D obraz povrchu
- nativní prostředí
- nanometrové rozlišení
- možnost skenovat živý systém, bez fixování
- velký dynamický rozsah (nm po μm)
- změna prostředí *in-situ*



E. coli



buňky Cos1



plasmidy na slídě

Použití AFM:

zobrazení živých buněk

zobrazení nukleových kyselin a jejich komplexů s proteiny

zobrazení komplexů proteinů

membrány a membránově vázané proteiny

měření interakcí – modifikace povrchu jehly

požadavky na vzorek