

TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

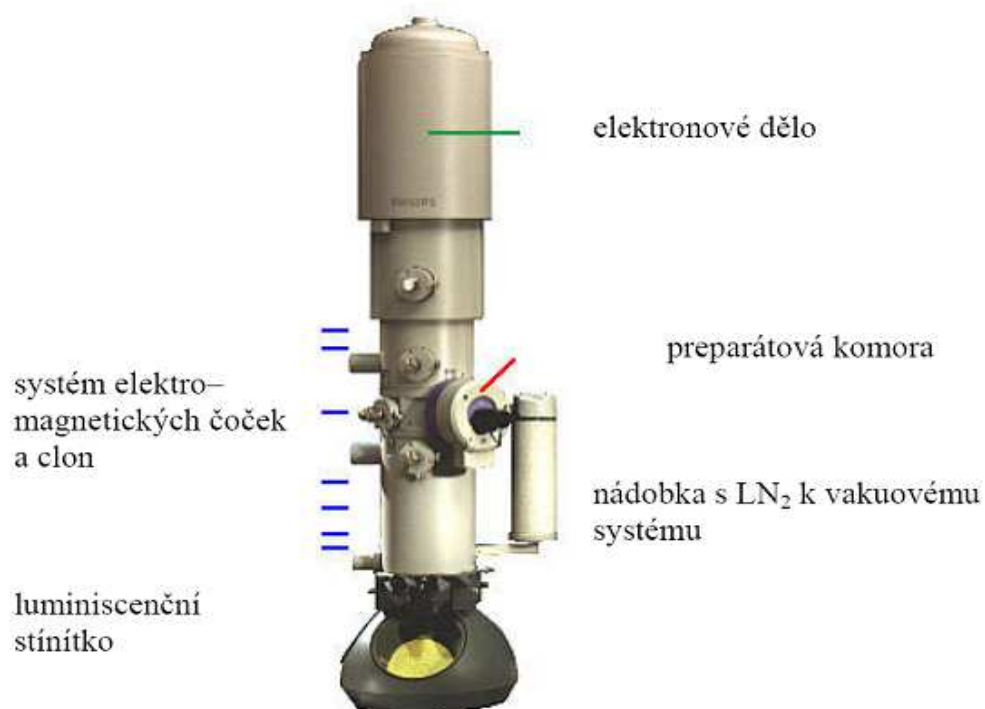
Transmisní elektronová mikroskopie je jednou z experimentálních metod, bez kterých se v současné době věda neobejde. Umožňuje zobrazit mikrostrukturu uvnitř materiálu řádově od několika mikrometrů až po atomové rozlišení.

První transmisní elektronový mikroskop byl sestaven roku 1930 E. Ruskou a M. Knollem. Vývoj elektronového mikroskopu byl značně motivován omezenou rozlišovací schopností světelného mikroskopu. Původně byl TEM konstruován pro výzkum virů (v biologii a lékařství se používá dodnes). První aplikací elektronové mikroskopie v oblasti materiálového výzkumu bylo studium uhlíkových replik lomových ploch.

TEM je obdobou světelného mikroskopu. Světelný zdroj optického mikroskopu je zde nahrazen zdrojem elektronů (elektronovým dělem), skleněné čočky jsou nahrazeny čočkami elektromagnetickými a místo okuláru je zde fluorescenční stínítka. Celá dráha elektronů od elektronového děla až po stínítka musí být ve vakuu. Vakuum je zde nutné hned z několika důvodů. Prvním z nich je, že ve vzduchu by elektron byl absorbován. Druhým, neméně důležitým důvodem, jsou molekuly obsažené ve vzduchu. Ty by způsobily kontaminaci tubusu a vzorku. Výsledný obraz je pak pozorován přes okno v projekční komoře (na fluorescenčním stínítku). Dalším důležitým rozdílem mezi světelným a elektronovým mikroskopem je, že elektromagnetické čočky jsou oproti skleněným nastavitelné (změnou proudu, procházejícího cívkou, lze měnit ohniskovou vzdálenost čočky)

Základní konstrukce transmisního elektronového mikroskopu

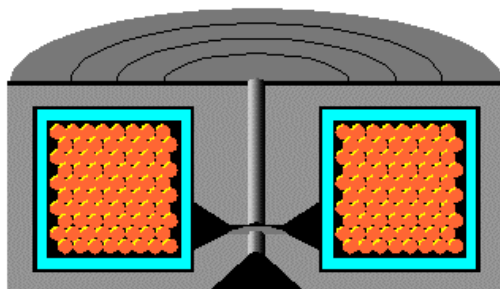
Transmisní elektronový mikroskop se skládá ze čtyř hlavních částí: **tubusu s elektronovou optikou, vakuového systému, nezbytné elektroniky** (napájení čoček pro zaostřování a vychylování elektronového paprsku a zdroj vysokého napětí pro zdroj elektronů) a **softwaru**.



Obr.1 Konstrukce transmisního elektronového mikroskopu

Elektromagnetické čočky

Jsou tvořeny prstenci z velmi čistého železa, které jsou zasazené v cívkách napájených stejnosměrným proudem. Elektromagnetické čočky pracují pouze ve vakuu (celý tubus musí být pod vakuem), slouží pouze jako spojky a jsou lehce fokusovatelné. Jestliže cívkami prochází elektrický proud, vznikne mezi pólovými nástavci elektromagnetické pole, které tvoří mezeru v magnetickém obvodu.



Obr.2 Průřez elektromagnetickou čočkou

Zvětšení čoček lze měnit změnou proudu, který cívkami teče. To je základní rozdíl mezi magnetickými a skleněnými čočkami. Jinak se chovají stejně a mají stejné druhy optických vad:

a) sférickou (kulovou) vadu

Tato vada je velmi důležitá. Z velké části závisí na tvaru a zpracování čočky. Projeví se tím, že zvětšení ve středu čočky je jiné než na okrajích.

b) chromatickou (barevnou) vadu

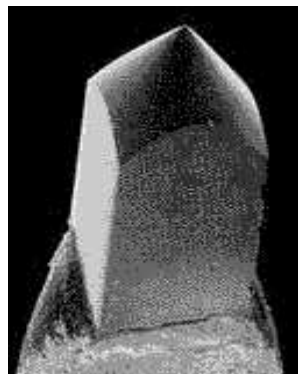
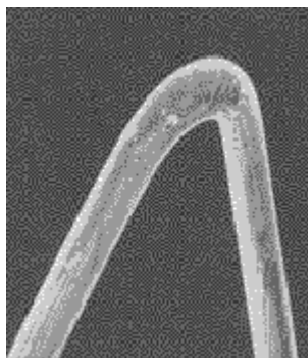
Zvětšení čoček je závislé na vlnové délce elektronů v paprsku. Tuto vadu lze zmenšit co možná největší stabilizací urychlovacího napětí a použitím velmi tenkých preparátů.

c) astigmatismus

Je vadou čoček, která se projevuje tím, že se kruh na preparátu zobrazí jako elipsa.

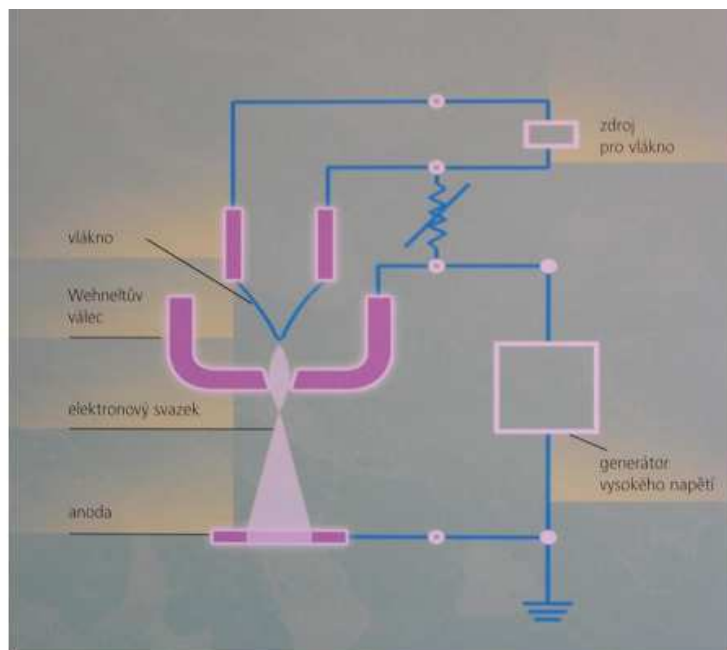
Elektronové dělo

Elektronové dělo se skládá z **katody**, tzv. **Wehneltova válce** a **anody**. Jako katoda se používá wolframové vlákno, které je přímo žhavené na teplotu 2800°C. V posledních letech se staly oblíbenými dva jasnější zdroje elektronů, a to elektronová tryska na bázi hexaboridu lanthanu (LaB_6), která emituje 10x více elektronů než wolfram zahřátý na stejnou teplotu, a tryska emitující elektrony vlivem elektrického pole (field emission gun - FEG). V tomto případě jsou elektrony "vysávány" z velmi ostrého hrotu silným elektrickým polem. S FEG se tak dá docílit až tisícinásobné elektronové hustoty.



Obr.3 Wolframové vlákno (vlevo) a krystal LaB_6 (vpravo)

V praxi od elektronového zdroje vyžadujeme, aby poskytoval koherentní svazek elektronů, což znamená, že by elektrony měly vycházet z bodového zdroje, měly by mít stejnou energii a dokonce by se měla jejich průvodní vlna nacházet ve stejné fázi. Trysku tvoří katoda emitující elektrony a anoda s kruhovým otvorem ve svém středu, která je přitahuje a dává jim dostatečné zrychlení na průlet tubusem mikroskopu. Vláknko katody je vystředěno do otvoru tzv. Wehneltova válce (obr. 4), který má záporné předpětí a díky jehož působení se okolo emitujícího hrotu katody vytvoří mrak elektronů. Ty jsou potom postupně odsávány z otvoru Wehneltova válce k anodě a ty které mají správný směr získají dostatečnou rychlost, aby jí prolétly dále do tubusu. Tímto jednoduchým způsobem je zajištěna dostatečná zásoba elektronů s přibližně stejnou počáteční energií tak, aby elektronový paprsek měl výše zmíněné vlastnosti.

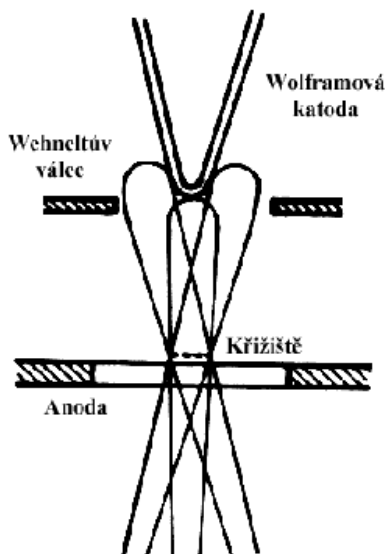


Obr.4 Schéma elektronové trysky TEM

Osvětlovací soustava [1]

Osvětlovací soustavu transmisního elektronového mikroskopu tvoří **elektronová tryska** společně s **kondenzorovými čočkami**.

Elektrostatická optika elektronové trysky promítá obraz emisního hrotu vlákna do prostoru blízko kruhového otvoru v anodě, který se nazývá **křížiště** (obr. 5).



Obr.5 Křížiště v TEM[1]

Křížiště slouží jako technický zdroj elektronů a jeho poloha se mění centrováním katody. Vzhledem k tvaru katody v případě wolframového vlákna, které se do křížiště promítá, má křížiště elipsovitý tvar. Čím je tvar kruhovější, tím je zdroj elektronů kruhovější a koherentnější.

Urychlené elektrony, které produkuje elektronová tryska, vstupují do magnetického pole kondenzorových čoček. Ty slouží k přenosu elektronového paprsku z křížiště na preparát.

Používají se většinou dvě kondenzorové čočky, z nichž první vytváří obraz křížiště a změnou její ohniskové vzdálenosti je možné měnit velikost obrazu. Druhým kondenzorem se tento obraz zaostřuje do roviny preparátu. V první čočce je vestavěná clona s velkým průměrem, v druhé je výměnná clona s velikostí otvoru v intervalu 100 - 500 μm . Obě clony jsou vystavené silnému

elektronovému bombardování a často dochází k jejich znečištění, které vede k zhoršení astigmatismu kondenzorové soustavy.

Zobrazovací soustava [1]

Tuto soustavu tvoří **držák preparátu, objektiv, mezičochy, projektivy a fluorescenční stínítko**. Do držáku (obr. 6) se vkládají síťky, na kterých jsou umístěny vzorky. Díky držáku, který zapadá do goniometrického stolku, je možné s preparátem pomocí motorků velmi jemně posouvat ve všech směrech a dokonce ho i naklánět. Tento posun řídí uživatel pomocí "trackballu". Preparát je v mikroskopu umístěn do těsné blízkosti pólových nástavců objektivu.



Obr. 6 Držák preparátu pro TEM

Objektiv je nejvýkonnější čočkou mikroskopu a často bývá označován za srdce celého elektron-optického systému. Je schopen největšího zvětšení a má také nejkratší ohniskovou vzdálenost. Aby se dosáhlo požadovaného výkonu, má cívka objektivu velký počet závitů, kterými protéká značný proud. Aby nedošlo k jeho přehřátí, bývá chlazený vodou.

Prostor v okolí ohniska objektivu bývá často kritickou oblastí mikroskopu, protože je zde umístěno mnoho součástí. Ve většině mikroskopů je zde také umístěno antikontaminační zařízení, které umožňuje zmrazit prostor v okolí preparátu a tím snížit jeho kontaminaci. Těsně

pod preparát je třeba ještě umístit objektivovou clonu, která snižuje sférickou vadu objektivu a výrazně zvyšuje kontrast výsledného obrazu.

Obraz vyprodukovaný objektivovou čočkou se dále zvětšuje na požadovanou velikost pomocí projektivů a intermediálních čoček. V obrazové rovině objektivu je možné pozorovat preparát se zvětšením okolo 100x. Část tohoto obrazu se promítá do pomocného projektivu, který je schopen v závislosti na změně proudu měnit ohniskovou vzdálenost a tím zvětšení, např. v rozsahu od 0,45x do 24,5x. Další čočkou, která se zapojuje do zvětšování obrazu, je hlavní projektiv obvykle s konstantním zvětšením 100x. V současnosti je běžné zařadit do tohoto systému ještě druhý pomocný projektiv tak, aby výsledné maximální zvětšení celého zobrazovacího systému, které se rovná součinu zvětšení všech čoček, dosáhlo hodnoty 1000000x.

Abychom mohli vidět elektrony, které prošly preparátem a zobrazovacím systémem, je třeba převést informace, které nesou, do oblasti viditelného světla. K tomuto účelu se na dno tubusu umísťuje stínítko pokryté nejčastěji ZnS, který je schopen v závislosti na energii a množství dopadajících elektronů emitovat světlo s vlnovou délkou 450 nm. Díky nečistotám je emise posunuta blíže 550 nm, tedy zelenému světlu.

Dopad elektronů na preparát

Při dopadu elektronů na vzorek může nastat několik případů:

- a) Některé elektrony jsou absorbovány v závislosti na tloušťce a složení vzorku. To způsobuje tzv. amplitudový kontrast obrazu.
- b) Další elektrony jsou rozptýleny pod malými úhly, jejichž velikost závisí na složení vzorku, to způsobuje tzv. fázový kontrast v obraze.
- c) V krystalických preparátech jsou elektrony rozptýleny do velmi odlišných směrů, které jsou v závislosti na krystalické struktuře. To způsobuje tzv. difrakční kontrast obrazu.

d) Některé z dopadajících elektronů mohou být odraženy (nazývají se zpětně rozptýlené elektrony).

e) Dopadající elektrony mohou také způsobit to, že vzorek sám emituje elektrony. Takto emitované elektrony se nazývají sekundární elektrony.

f) Elektrony, které dopadají na preparát mohou způsobit také to, že vzorek emituje rentgenové paprsky, jejichž energie a vlnová délka závisí na chemických prvcích obsažených v preparátu.

g) V některých případech mohou elektrony způsobit u preparátu emisi fotonů (nebo světla). Tento jev se nazývá katodoluminiscence.

Ve standardním transmisním elektronovém mikroskopu první dva jevy připívají ke vzniku běžného obrazu u biologických preparátů, zatímco u krystalických (materiály jiného než biologického původu) preparátů jsou nejdůležitějšími faktory tvořícími obraz fázový a difrakční kontrast.

Záznam obrazu

Celkovým výstupem z transmisního elektronového mikroskopu je trvalý záznam snímku. V současné době lze zaznamenávat buď na speciální fotografický materiál nebo digitálně pomocí CCD kamer. Fotografický záznam obrazu v současné době ustupuje do pozadí, do popředí se dostávají CCD kamery.

Záznam na fotografický materiál

Pod stínítkem TEM je uložena fotografická komora, ve které jsou uloženy fotografické filmy. Ty musí být vyrobeny z materiálu, který má citlivost posunutou do oblasti velmi krátkých vln a vydrží vysoké vakuum v mikroskopu. Při pořizování fotografického záznamu se odkloní stínítka, najede pouzdro s filmem a na něj mohou přímo dopadat elektrony. Po expozici zářením dojde k vytvoření latentního obrazu. Po vyvolání exponovaná místa zčernají, přičemž míra zčernání závisí na intenzitě osvětlení.

Digitální záznam

V tomto případě jde o přímý přenos obrazu v digitální podobě na obrazovku monitoru počítače a dále jeho uložení do paměti. Pro uskutečnění tohoto přenosu je do dráhy elektronového svazku v oblasti pozorování obrazu vložen detektor, který zaznamená množství primárních elektronů a jejich energii v závislosti na místě dopadu. Ideální detektor elektronů by měl být schopen detekovat elektronový obraz bez degradace jeho rozlišení a přidání šumu, měl by mít velký počet pixelů, široký dynamický rozsah a výbornou linearitu. Detektor by měl zaznamenat obraz během několika vteřin a tento obraz by měl být okamžitě k dispozici v počítači k dalšímu zpracování a analýze.

V praktických úlohách je možno použít dva typy CCD kamer, a to Moradu a KeenView.

Morada je vysokorozlišovací CCD kamera, která nabízí až 11 megapixelů s dynamickým rozsahem 14 bitů. Tato kamera se instaluje po straně na širokoúhlý port mikroskopu. Kamerový systém se skládá z vysoce ziskového fosforového stínítka spřaženého s optickými čočkami, z hranolu speciálně navrženém pro odrážení obrazu na CCD senzor a z příruby, která je specifická pro každý mikroskop. Vnitřní přenosový čip s elektronickým přerušovačem umožňuje extrémně krátké i extrémně dlouhé expoziční časy - 1 ms až 60 s. Akvizice je tudíž možná nejen při intenzivním osvětlení, ale i při extrémně nízké intenzitě. Morada dosahuje až 10 snímků za sekundu a frekvenci pixelu 24 MHz.

CCD čip je chlazený Peltierovým způsobem a vzduchem a je stabilizovaný při 15°C, poskytuje velmi vysoký poměr signál/šum. Šum je rovněž potlačen aplikováním vysoce účinné digitální techniky načítání.



Obr. 7 CCD kamera Morada

Druhou kamerou, která je instalována na mikroskopu, na němž budou probíhat praktické úlohy je CCD kamera **KeenView**. V praktických úlohách bude užívána především tato kamera, která je pro nanomateriálové vzorky vhodnější.

Je to černobílá CCD kamera, která je instalována přímo vespodu projekční komory v ose elektronového svazku. Uspořádání CCD čipu a účinného fosforového scintilátoru je na principu optického vlákna. Kamera poskytuje rozlišení 1280×1024 , rychlost záznamu je max. 10 obrázků/s při rozlišení 1280×1024 nebo 20 obrázků/s při rozlišení 640×512 . Expoziční čas se pohybuje v rozmezí $100 \mu\text{s}$ - 160 s.



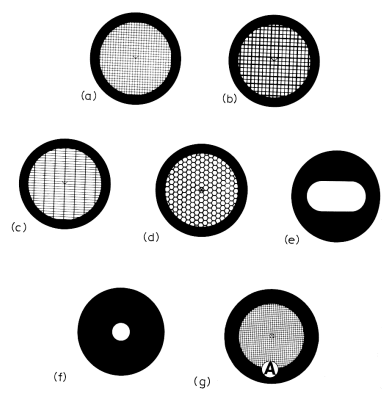
Obr.8 CCD kamera KeenView

Příprava vzorků pro transmisní elektronový mikroskop

TEM může být používán v řadě vědních oborů a to ke studiu vnitřní struktury materiálů na úrovni atomárních rovin. Vzorky pro TEM musí být dostatečně malé (3mm v průměru) a dostatečně tenké (méně než $0,5\mu\text{m}$), aby nimi mohli projít elektrony.

Každé odvětví výzkumu používá při přípravě vzorků své specifické metody.

Všechna odvětví však používají k pohodlné manipulaci se vzorkem **podložní síťky** (obr. 9).



Obr.9 Podložní síťky pro přípravu vzorků

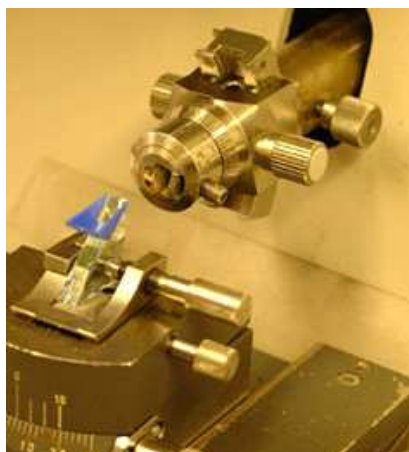
Jejich průměr musí být 3mm, aby se vešly do držáku vzorku. Vyrábějí se z různých materiálů, např. nikl, zlato, měď, elektrogalvanickým leptáním. Na trhu se vyskytuje řada typů sítěk, lišících se tvarem, počtem a uspořádáním otvorů. Nejběžněji používanými sítěkami v nanomateriálovém výzkumu jsou sítěky měděné.

Aby vzorek přes otvory sítěky nepropadl, je třeba síťku "potáhnout" fólií. Při měření biologických preparátů, při nichž se používá urychlovací napětí 100kV, se síťka potáhne formvarovou fólií (viz praktické úlohy). Při měření materiálových vzorků, kdy je urychlovací napětí nastaveno na 200kV, se používají sítěky s již napařenou uhlíkovou fólií. Formvarovou fólii není při vysokých urychlovacích napětích vhodné používat, protože po dopadu elektronů se začne tavit.

Příprava vzorků biologického původu

Jako první krok je třeba provést **odběr tkáně**. Druhým krokem přípravy vzorku je **fixace**, jejíž cílem je zabránit degradačním procesům a zachovat buněčnou ultrastrukturu. Po fixaci následuje **dehydratace**, neboli odvodnění. Ta spočívá v tom, že je vzorek postupně vkládán do roztoků s rostoucím podílem dehydratačního činidla do té doby, než je jím všechna voda v systému nahrazena. Nyní již přichází na řadu **zalévání do bloků**. Jeho účelem je dát zpracovávanému vzorku takové vlastnosti, aby ho bylo možno krájet na ultratenké řezy tloušťky do 100nm. K zalévání se používají pryskyřice, na které je kladeno velké množství požadavků (např. měly by být stabilní ve vakuu a při ozáření primárními elektrony, vzniklé bločky by měly mít přiměřenou tvrdost, aby se daly dobře krájet atd.).

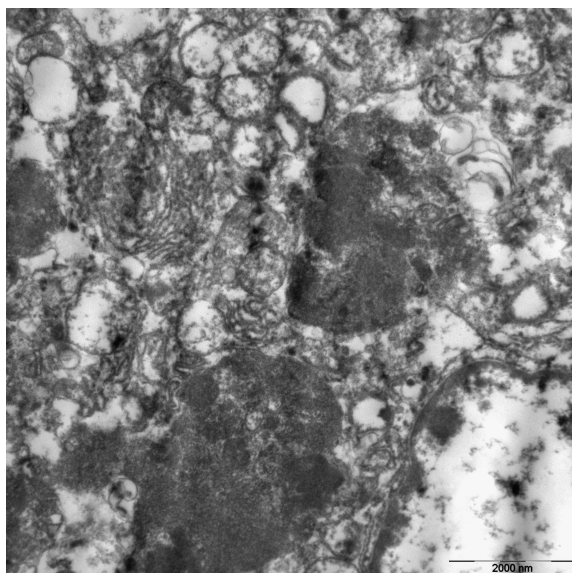
Závěrečnou fází přípravy biologických vzorků je **krájení ultratenkých řezů**. K tomuto účelu se používá zařízení zvané **ultramikrotom** (obr. 10). V současné době jsou na trhu dva typy těchto zařízení, a to ty, které k posuvu bločku k hraně nože využívají tepelné dilatace měděné tyče a ultramikrotomy s mechanickým posunem. Předností prvního typu je schopnost krájet i velmi tvrdé materiály, mechanický ultramikrotom je naopak velmi stabilní v tloušťce ultratenkých řezů. K řezání ultratenkých řezů se používají dva typy nožů, a to skleněné a diamantové. Zatímco skleněné nože jsou levné, je možné je po použití vyhodit, diamantové nože jsou drahé, jejich cena závisí na délce řezné hrany a při jejich poškození je nutné je znovu za poměrně vysokou cenu přebrousit. Skleněný nůž je schopen ukrojit z jednoho místa na řezné hraně asi 30 ultratenkých řezů a pak je nutné se na hraně posunout dále nebo nůž vyměnit, diamantový nůž po opatrném přiblížení čela bločku nakrájí tolik řezů, kolik potřebujeme. Diamantový nůž také poskytuje výrazně kvalitnější ultratenké řezy. Jeho cena odráží skutečnost, že diamant je nejtvrdší přírodní materiál, jehož opracování není snadné. Proto se většinou bločky "předřezají" na skleněném noži a diamantový nůž se použije až na ultratenké řezání.



Obr. 10 Ultramikrotom

Pořízený ultratenký řez se následně přenese na podložní síťku a vzorek pro TEM je připraven k analýze (viz obr. 11).

S podrobnostmi, souvisejícími s přípravou biologických preparátů bude seznámeni během praktické úlohy přímo na pracovišti, kde příprava ultratenkých řezů probíhá.

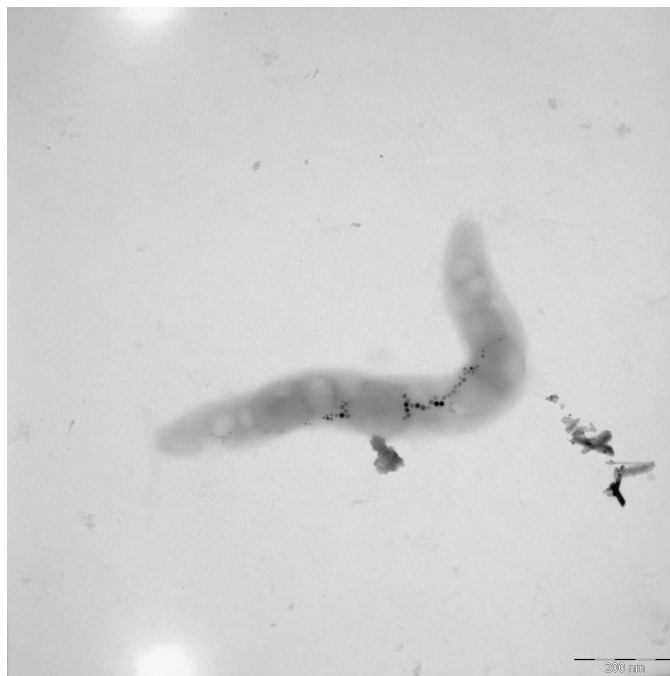


Obr.11 TEM snímek ledvin pořízený kamerou Morada ,urychlovací napětí-100kV

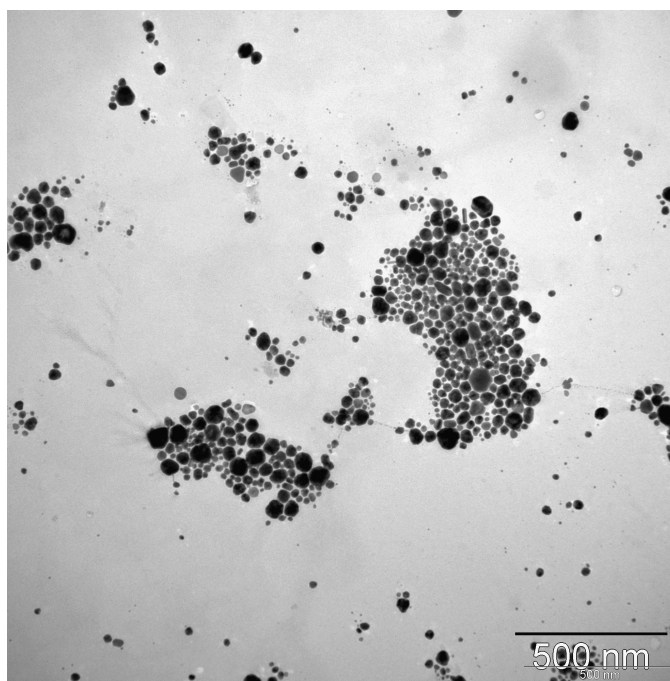
Příprava nanopráškových materiálů

Příprava tohoto typu vzorků je méně náročná než příprava biologických preparátů (viz praktická úloha).

Spočívá pouze ve třech krocích. Nejprve je třeba nanopráškový materiál rozdispergovat v ethanolu. Do ependorfký se dá materiál a zakápně ethanolem. K tomu, aby byl nanoprášek dostatečně rozdispergován se používá ultrazvukové vany. Po přibližně 30 minutách ultrasonifikace se vzniklý roztok po kapkách nakápně na podložní síťku, která je již potažena napařenou uhlíkovou fólií. Vzorek se pak nechá vyschnout při pokojové teplotě. Nyní je již připraven pro analýzu pomocí transmisního elektronového mikroskopu.



Obr.12 Snímek magnetotaktické bakterie pořízený pomocí TEM, urychlovací napětí-160kV



Obr. 13 Částice koloidního stříbra-TEM obraz, urychlovací napětí: 120kV

Příprava vzorků pro TEM v metalurgii

V metalurgii se TEM užívá ke zkoumání vnitřní struktury různých materiálů a především k nalezení poruch.

Nabízí se spousta možností, jak vytvořit vzorek. My se touto problematikou však zabývat nebudeme. Uveďme si pouze pro představu alespoň jeden z těchto způsobů: Ze vzorku materiálu ve tvaru disku o průměru 3mm (tloušťka asi 0,3mm) je chemicky odleptána jeho střední část. Kolem otvoru jsou obvykle oblasti s vhodnou tloušťkou (asi 0,1mm) umožňující pronikání elektronů. U polovodičů je někdy nutné vyříznout vrstvu materiálu kolmo k povrchu, aby bylo možné zkoumat poruchu materiálu.

Použitou literaturu a další podrobnější informace o transmisní elektronové mikroskopii a přípravě vzorků lze najít na:

[1] <http://www.paru.cas.cz>

[2] <http://www.natur.cuni.cz>

[3] <http://apfyz.upol.cz>

[4] <http://www.matter.org.uk/tem/>

[5] <http://www.unl.edu/CMRAcfem/em.htm>

[6] http://rumcajs.fjfi.cvut.cz/fyzport/FT/2004/Difrakce/05_Karlik_CsCAsFyz_manu.pdf

[7] <http://www.cscasfyz.fzu.cz/2005/03/237.html>