

UVOD U NANOZNANOST

MIKROSKOPIJA 1 - TEM i primjeri

SEMINAR

Studenti: Ena Džanko (0036509339), Kristijan Čepić (0036508742)

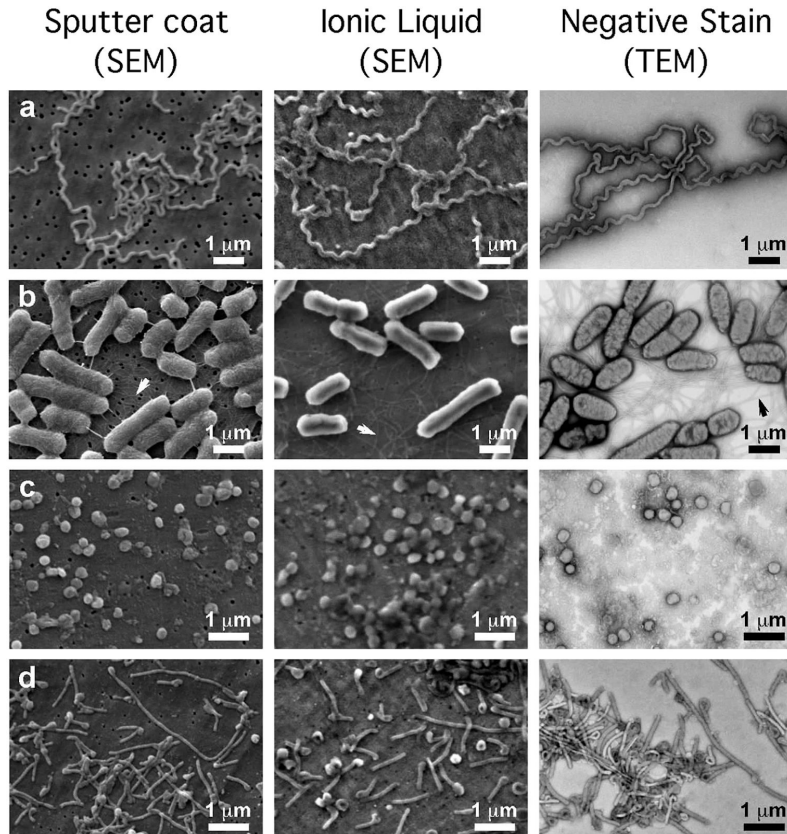
SADRŽAJ:

1. Mikroskopija - Uvod	3
2. Transmisijaska elektronska mikroskopija	4
2.1. Povijest	4
2.2. Komponente i građa	6
2.3. Princip rada	8
3. Metode oslikavanja	10
4. Priprema uzoraka	11
5. Važnosti i koristi	12
6. Literatura	12

1. Mikroskopija - Uvod

Mikroskopija kao tehnika promatranja sitnih objekata, omogućava nam uvid u oblik, strukturu, broj, veličinu ili ponašanje čestica. Elektronska mikroskopija je vrsta mikroskopije koja za stvaranje slike koristi snop elektrona, dok specifično, u transmisivskoj elektronskoj mikroskopiji taj snop prolazi kroz uzorak obojen teškim metalima. U ovom seminaru će biti riječ upravo o TEM-u, odnosno transmisivskoj elektronskoj mikroskopiji.

Transmisivski elektronski mikroskop (u nastavku TEM) promatrani uzorak "obasjava" snopom elektrona koji vrše interakciju sa uzorkom. Uzorak se pri tom postupku prilagođava debljini manjoj od 100nm te slika nastaje interakcijom elektrona dok prolaze kroz uzorak. Ta slika se potom povećava, fokusira i projicira na određeni uređaj. U nastavku ćemo navesti povijesni razvoj elektronske mikroskopije, komponente elektronskog mikroskopa, princip njegovog rada te neke metode oslikavanja i metode pripreme uzorka kojeg promatramo.





Slike 1.1 i 1.2: Razne mikroskopske slike.

Slika 1.1 dolazi iz artikla koji razmatra primjenu mikroskopa u mikrobiologiji i dijagnozi zaraznih bolesti

Slika 1.2 je snimljena pomoću SEM-a, a prikazuje alge i bakterije

2. Transmisijaska elektronska mikroskopija

2.1. Povijest

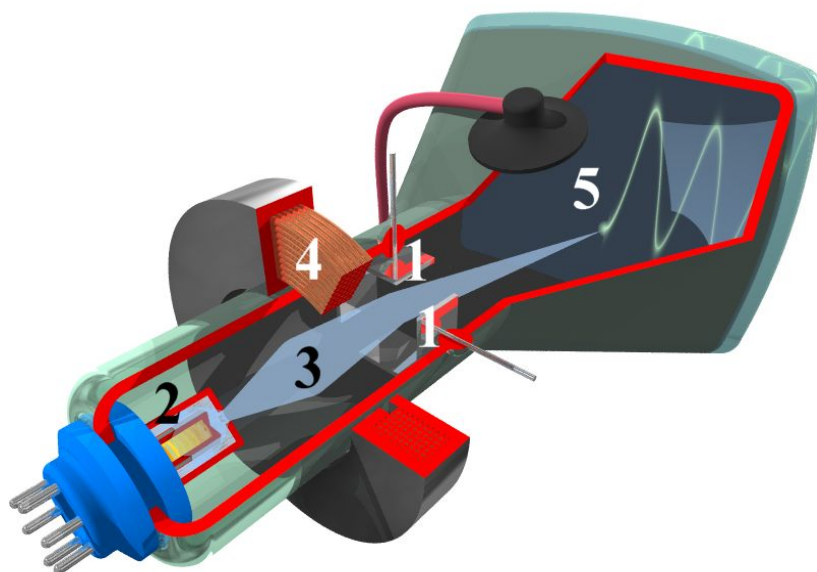
Kratko ćemo se osvrnuti na inicijalni razvoj elektronskih mikroskopa koji je prethodio današnjim postignućima sa istim. Elektronski mikroskopi imaju mogućnost dati sliku puno većih detalja i rezolucije nego li svjetlosni mikroskopi, međutim nemaju mogućnost davanja slike u boji. Razlog zašto elektronski mikroskopi upravo mogu davati tako detaljne slike je upravo zbog njihove valne duljine koja je mnogo manja od valne duljine svjetla. 1873. Godine je Ernst Abbe

predložio da je valna duljina zapravo ograničavajući faktor te da upravo zbog toga sub-mikrometarske slike nije moguće dobiti.

U 1858. godini Plücker je uvidio deflekciju “katodnih zraka”, tj. elektronskih zraka na magnetskim poljima. Ovo otkriće je iskoristio Ferdinand Braun te sagradio jednostavan osciloskop baziran na elektronskim zrakama 1897. godine. Iznimno važan razvoj je bilo otkriće da je ove zrake elektrona moguće fokusirati pomoću elektromagnetskih leća, te da su one primjenjive i na optičke formule za leće. Za otkriće da elektromagnetska polja omogućuju fokusiranje elektronskih zraka je zaslužan Riecke 1891. Godine time što je omogućilo izgradnju elektromagnetskih leća. Mogućnost primjene optičkih formula za leće na elektromagnetske je otkrio Hans Busch 1926.

Prvi prototip TEM mikroskopa je napravljen 1931. na Tehničkom sveučilištu u Berlinu, a iste te godine je Reinhold Rudenberg patentirao elektronski mikroskop temeljen na elektrostatskim lećama.

Što se tiče prvoga prototipa, on je iniciran od strane Adolfa Matthiasa koji je u to doba bio profesor visoko-voltažne tehnologije i električkih instalacija, a htio je unaprijediti tadašnje osciloskope - takozvane CRO-e, “Cathode Ray Oscilloscope”. Ti osciloskopi su se temeljili na katodnoj zruci, tj. elektronskoj zruci te njihovom deflekcijom o magnetska polja. Max Knoll je bio zadužen za vođenje tima istraživača.



Slika 1.3: Interijer cijevi katodne zrake u osciloskopima(CRO)



Slika 1.4: Cijev katodne zrake osciloskopa izvana(eksterijer) - CRO

Njihov rad se je fokusirao na dizajnu leća, pozicioniranju stupca CRO-a, a s ciljem optimiziranja parametara CRO-a te izrade elektronskih optičkih komponenti za generaciju slika omjera uvećanja 1:1(niska magnifikacija). Upravo 1931. grupa istraživača je uspjela dobiti povećane slike mrežastih objekata stavljenih na otvor anode. Povećane slike tj. povećanje je postignuto primjenom 2 magnetske leće. Princip rada TEM-a je zapravo je primjena katodne zrake, tj. zrake elektrona i elektromagnetskih leća koje fokusiraju ovaj snop elektrona kroz objekt i izlazni snop se dalje pomoću leća projicira na određeni ekran (npr. fluorescentni ekran). Zato se kaže da je ova grupa istraživača napravila prvi elektronski mikroskop.

Knollova grupa istraživača je shvatila 1932. godine da elektroni prema De Broglievoj valnoj teoriji imaju puno manju valnu duljinu od svjetlosti - npr. elektroni s energijom od samo 1 volta imaju valnu duljinu samo 1.23 nm. Svjetlosnim mikroskopima nije moguće promatranje objekata u toliko visokoj rezoluciji kao elektronskim mikroskopima zato što su bazirani na svjetlosti čija valna duljina vidljivog spektra je između 400-700 nanometara, tj. 0.4-0.7 μm . Moguće je vidjeti objekte koji nisu manji od polovine valne duljine svjetlosti vidljivog spektra. Dakle, na primjer ako gledamo zelene objekte maksimalna

rezolucija će biti oko 0.2 μm pošto je valna duljina zelene boje 0.5 μm . Elektroni nasuprot 400-700 nm valne duljine svjetlosti vidljivog spektra imaju valnu duljinu od 1.23 nm, što omogućava puno bolju rezoluciju, te su oni izbor ukoliko trebamo slike vrlo visokih rezolucija.

U travnju 1932. je stoga Ruska (originalno jedan od članova istraživačkog tima) predložio konstrukciju novog elektronskog mikroskopa koji bi se koristio za proučavanje pravih bioloških uzoraka te njihov direktan prikaz, a ne samo prikaz mrežica ili otvora kao što je do sada bio slučaj. Ovi mikroskopi su još uvijek bili eksperimentalne prirode i u razvitku. Iako je grupa uspjela dobiti prikaz aluminijskog listića, no rezolucija je bila manja nego kod svjetlosnih mikroskopa. Veće rezolucije su postignute u rujnu 1933. na pamučnim vlaknima (iako na kraju postupka su bili oštećeni od elektronske zrake, no slika je dobivena prije oštećenja).

Interes u TEM mikroskopiji je rastao te su konstruirani i prvi TEM mikroskopi u Sjevernoj Americi:

- Paul Anderson i Kenneth Fitzsimmons na Washington State University u SAD 1935. godine
- Albert Prebus i James Hillier na University of Toronto 1938. godine

Tih godina (prije Drugog Svjetskog rata) Siemens je dalje nastavio rad na TEM mikroskopima te ih usavšavao, nastojeći povećati rezoluciju i kvalitetu slike, a s ciljem promatranja bioloških uzoraka. Prvi komercijalni elektronski mikroskop je instaliran 1939. godine u zavodu za fiziku IG Farben-Werke. Tijekom Drugog svjetskog rata je rad na TEM-ovima usporio zbog uništenja laboratorija i smrti dvojice istraživača.

Poslije Drugog svjetskog rata Ruska, koji je nastavio rad u Siemensu, je uspio proizvesti prvi mikroskop sa povećanjem od 100k puta. Njegov dizajn i struktura se i dalje koristi u modernim mikroskopima. Sa razvojem TEM-a rastao je interes i razvoj i jedne druge vrste mikroskopa: STEM mikroskopi - skenirajući transmisijski elektronski mikroskopi.



Quelle: Deutsche Fotothek

Slika 1.5: TEM iz 1976.

Jannick Meyer et al. su 2008. uspjeli dobiti direktnu vizualizaciju laganih atoma poput ugljika ili čak i vodika, a za to su koristili TEM mikroskope i čisti jednoslojni grafenski substrat.



Slika 1.6: Prvi praktični TEM koji se originalno nalazio u IG Farben-Werke, a danas se nalazi u Deutsches Museum u Münchenu

2.2. Komponente i građa

TEM ili Transmisijski elektronski mikroskop se sastoji od 3 ključne komponente koje su opisane u nastavku:

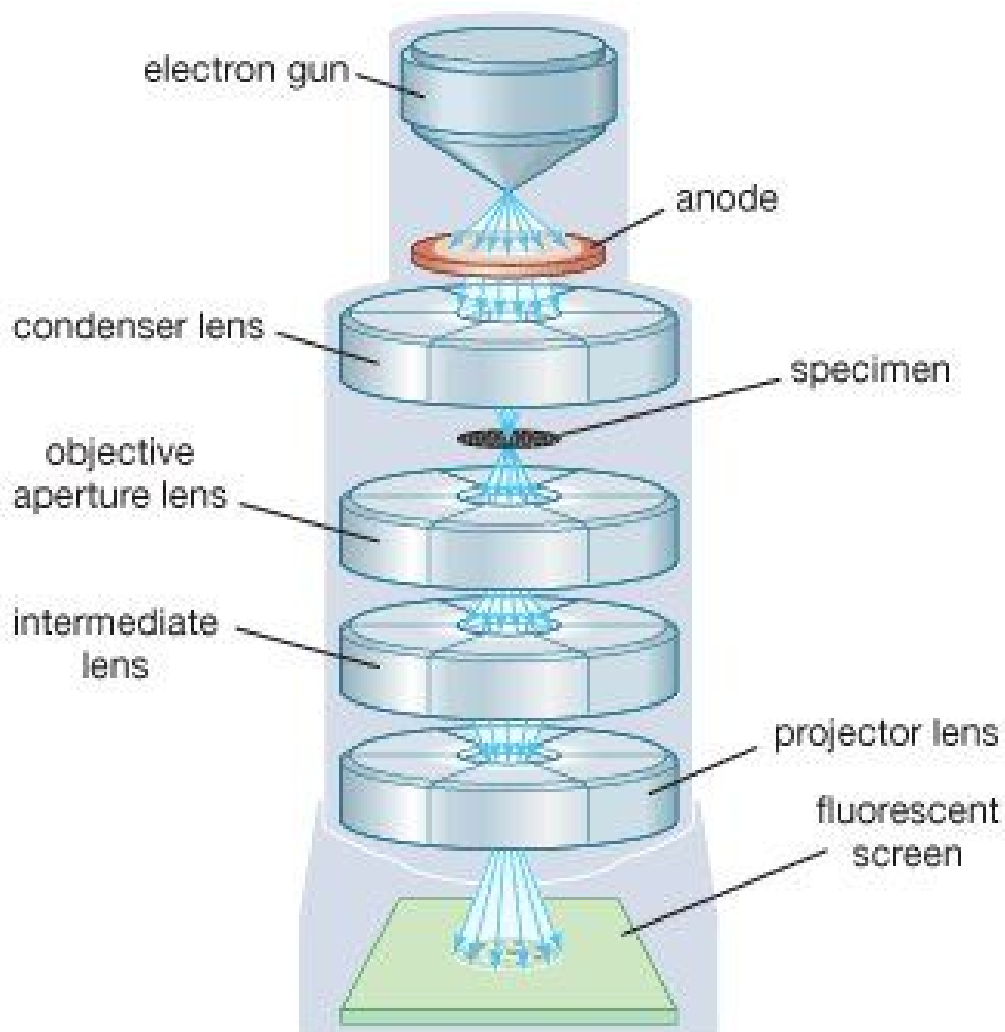
- 1) Elektronski top i kondenzatorski sustav
- 2) Dio zaslužan za proizvodnju slike
- 3) Dio zaslužan za prikaz ljudski-razumljive slike i njeno snimanje/bilježenje
- 4) Vakuumski sustav

Slijede detaljniji opisi po pojedinim komponentama:

- 1) Ova komponenta zaslužna je za proizvodnju elektronske zrake te njeno zgušnjavanje (kondenziranje) tj. fokusiranje u objekt (uzorak) koji se promatra.
- 2) Ovo je zapravo mjesto gdje se dešava proizvodnja slike. Elektronska zraka dolazi do objekta (koji mora biti izrezan izuzetno tanko, npr. dijamantnim nožem) te prolazi 'kroz' uzorak. Pritom laki atomi propuštaju puno više elektrona (veća transmisija), a teški propuštaju puno manje elektrona (manja transmisija, tj. veća apsorpcija elektrona). Tako će na mjestima gdje se nalaze laki atomi slika biti sivkaste boje, a na mjestima gdje se nalaze teški atomi slika biti tamne/crne boje. Pošto TEM radi sa elektronima, a ne sa svjetlošću, slike će biti crno-bijele, a ne u boji. One će se temeljiti upravo na apsorpciji, odnosno transmisiji elektrona.
Kroz vakuumsku cijev se nalazi niz elektromagnetskih leća. Ove leće nisu od stakla niti su to tradicionalne optičke leće. Naime, kada su nabijene tj. kada ih nabijemo sa strujom one proizvode magnetsko polje koje pomaže ohladiti i održati jedinstvenu elektronsku zraku kroz vakuumsku cijev.

Razlog zašto se koristi vakuumska cijev je taj što zrak interferira sa elektronskom zrakom te ju uništava. Ova elektronska zraka ulazi u iduću komponentu.

- 3) Ova komponenta služi za hvatanje elektronske zrake, te produkciju crno-bijele slike iz nje koja je nama vidljiva i razumljiva. Za to se najčešće koristi fluorescentni zaslon za proučavanje rezultata rada mikroskopa. Također ovaj sustav često ima i mogućnost snimanja/pohrane slike, npr. pomoću digitalne kamere.
- 4) Zadnja komponenta je vakuumski sustav koji služi za sprječavanje interferiranja zraka sa elektronskim snopom. On se sastoji od raznih pumpi, mjerila, i ventila. Ovaj podsustav zahtijeva i svoje napajanje.



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

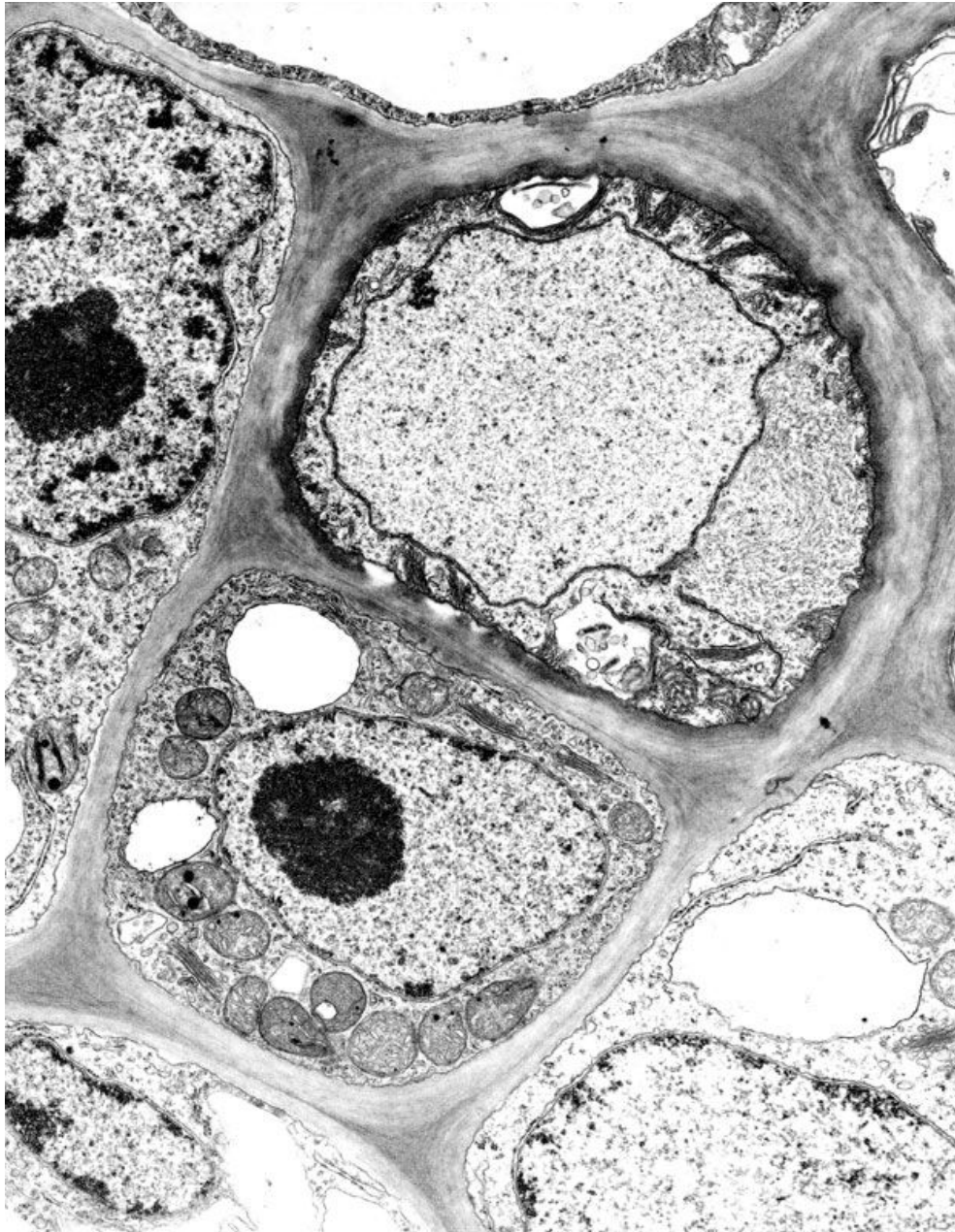
Slika 1.7: Šematik građe i strukture TEM-a

2.3. Princip rada

Kao što je već prije navedeno, TEM se temelji na apsorpciji i transmisiji elektrona prilikom prolaska jedinstvenog elektronskog snopa kroz uzorak. Upravo niska valna duljina elektronskog mikroskopa mu omogućuje puno bolje performanse naspram svjetlosnog mikroskopa, iako zbog toga on ne može prikazivati boju.

Izvor elektrona, katoda, je ugrijan tungstenski filament u V-obliku. U sustavima sa visokim zahtjevima koriste se alternativne, kvalitetnije komponente - oštri štapić od primjerice lantanovog heksaborida. Filament je okružen kontrolnom mrežom,

koja se ponekad zove i Wehneltov cilindar. Elektronska zraka ispućana iz katode putuje prema anodi.

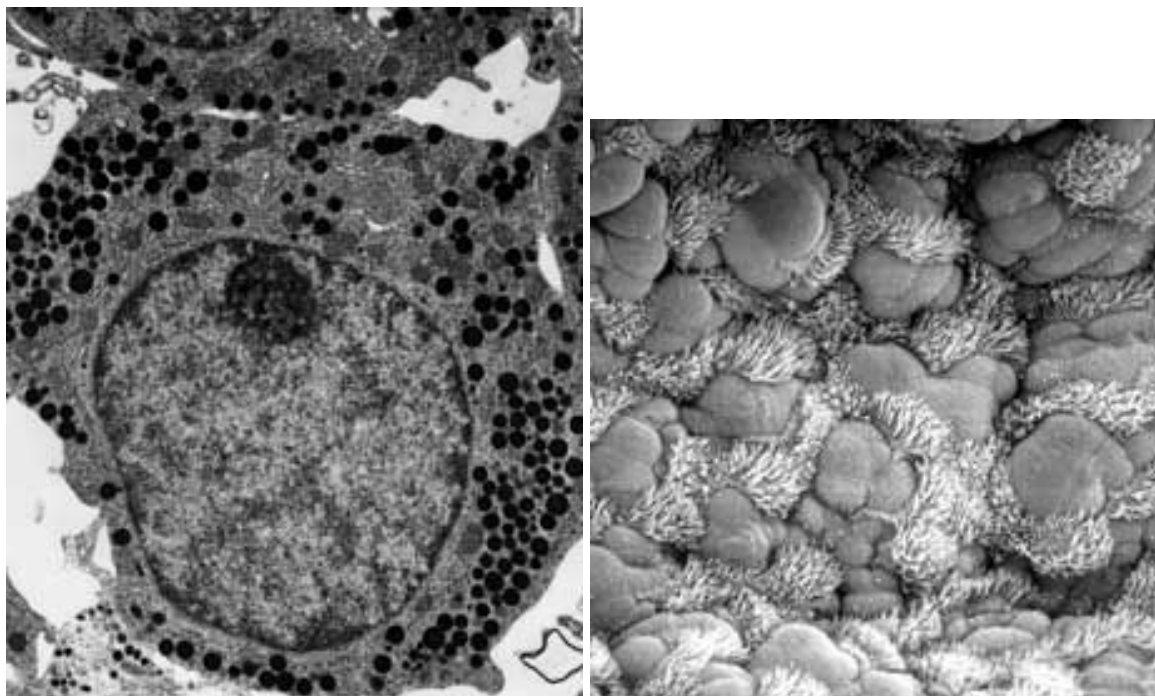


Slika 1.8: Uvećana slika pamučnog floem tkiva koja prikazuje 2 stanice(sieve element i ispod nje companion cell). Slika je dobivena pomoću TEM x8,000.

Kritičan dio je kondenzacijski sustav leća, koji ispućane elektrone kondenzira u tanki i koherentni snop elektrona. Otvor kondenzatora blokira elektrone s visokim kutovima upada, te ovakva uniformna zraka/snop dalje ide do uzorka.

Kondenzacijski sustav se može sastojati od jedne leće, ali češće se koristi dupli kondenzacijski sustav, koji je fleksibilniji i prostorno efikasniji.

U uzorku se odvija već opisan proces transmisije - teški atomi apsorbiraju više, a transmitiraju manje elektrona. Nasuprot njima, lagani atomi apsorbiraju manje te transmitiraju više elektrona. Po tome će i tamniji dijelovi slike biti oni sa većom apsorpcijom (manjom transmisijom), a svetliji dijelovi slike će biti oni sa manjom apsorpcijom (većom transmisijom) elektrona.



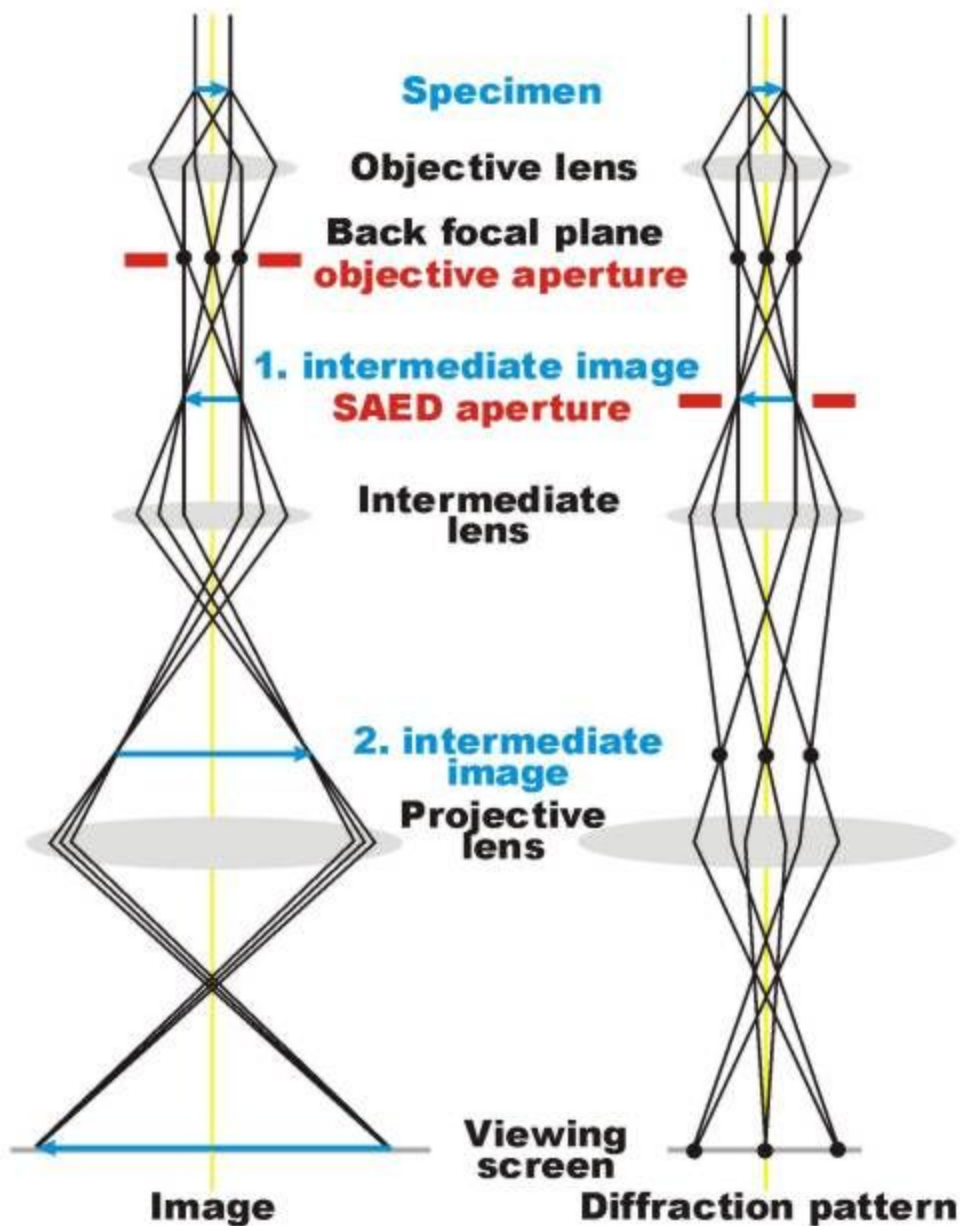
Slike 1.9 i 1.10:

Slika 1.9: Slika i prikaz pomoću TEM mikroskopa. TEM omogućuje gledanje unutarnje strukture i izuzetnu preciznost i rezoluciju

Slika 1.10: Slika i prikaz pomoću SEM mikroskopa. SEM omogućuje promatranje eksterijera Tijekom prolaska elektronskog snopa kroz uzorak on se raspršuje, pa poslije prolaska se nalazi objektivna leća koja raspršene elektrone fokusira nazad (elektroni raspršeni iz jedne točke uzorka su fokusirani nazad u jednu točku u slici). TEM se može podesiti da umjesto prikaza slike (stvarni prostor), pokaže uzorak difrakcije (recipročni prostor) tako što se mijenja jačina srednje leće.

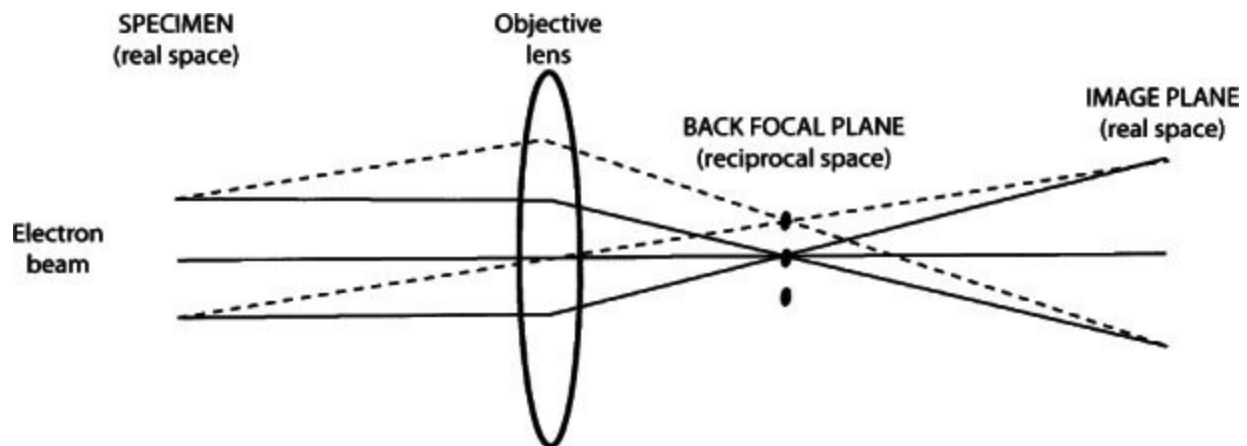
Selektiranje područja koje želimo dobiti koriste se objektivni otvor ili SAED otvor. Objektivni otvor se koristi pri generiranju slike te selekciji zraka koje želimo da doprinesu konačnoj slici, a SAED otvor pri selekciji regije čiji difrakcijski uzorak želimo vidjeti. Difrakcija elektrona se dešava zbog dualne prirode čestica (de Broglie), a u ovom slučaju elektroni se ponašaju kao val.

SAED = "Selected Area Electron Diffraction", što u bi prijevodu značilo "Elektronska Difrakcija Izabranoga Područja". Navedeno se vidi na slici ispod:



Slika 1.11: Put elektronske zrake i EM leće

Na slici dolje vidimo sličan prikaz, ali na drugačiji način. U ovoj slici izcrtana linija pokazuje elektrone koji su raspršeni u istom smjeru, kako su fokusirani u jednu točku. To je mjesto stražnje fokalne ravnine objektivne leće, i upravo tu se formira uzorak difrakcije.



Slika 1.12: Još jedan prikaz rada EM leća. Prikaz stvaranja stvarne slike(real space) i difrakcijskog uzorka(reciprocal space)
 Na slici gore vidimo još jedan prikazije ranije izloženih informacija o građi TEM-a i njegovoj elektronskoj difrakciji. Kao detalj za kraj opisa građe i rada, ranije je spomenut bio fluorescentni zaslon, no može npr. koristiti se i fosforni zaslon ili CCD(charge coupled device) kamera.

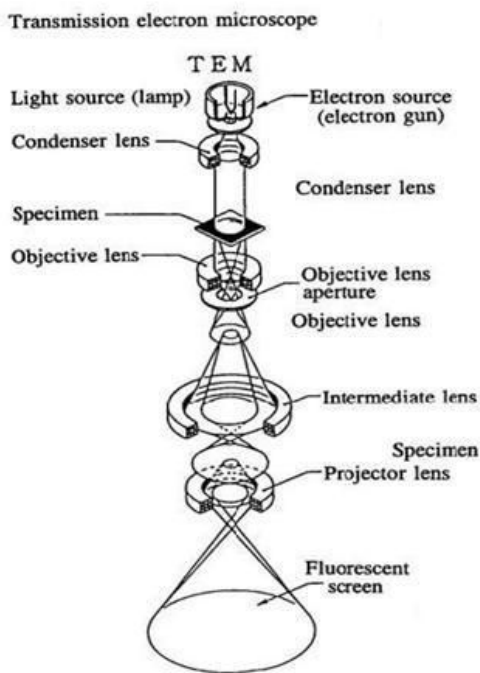


Fig 1

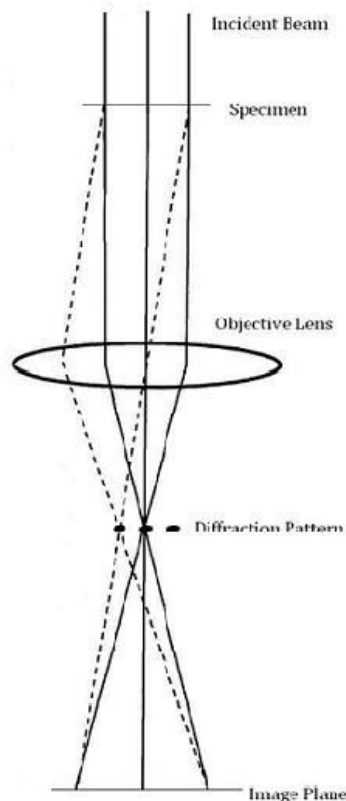
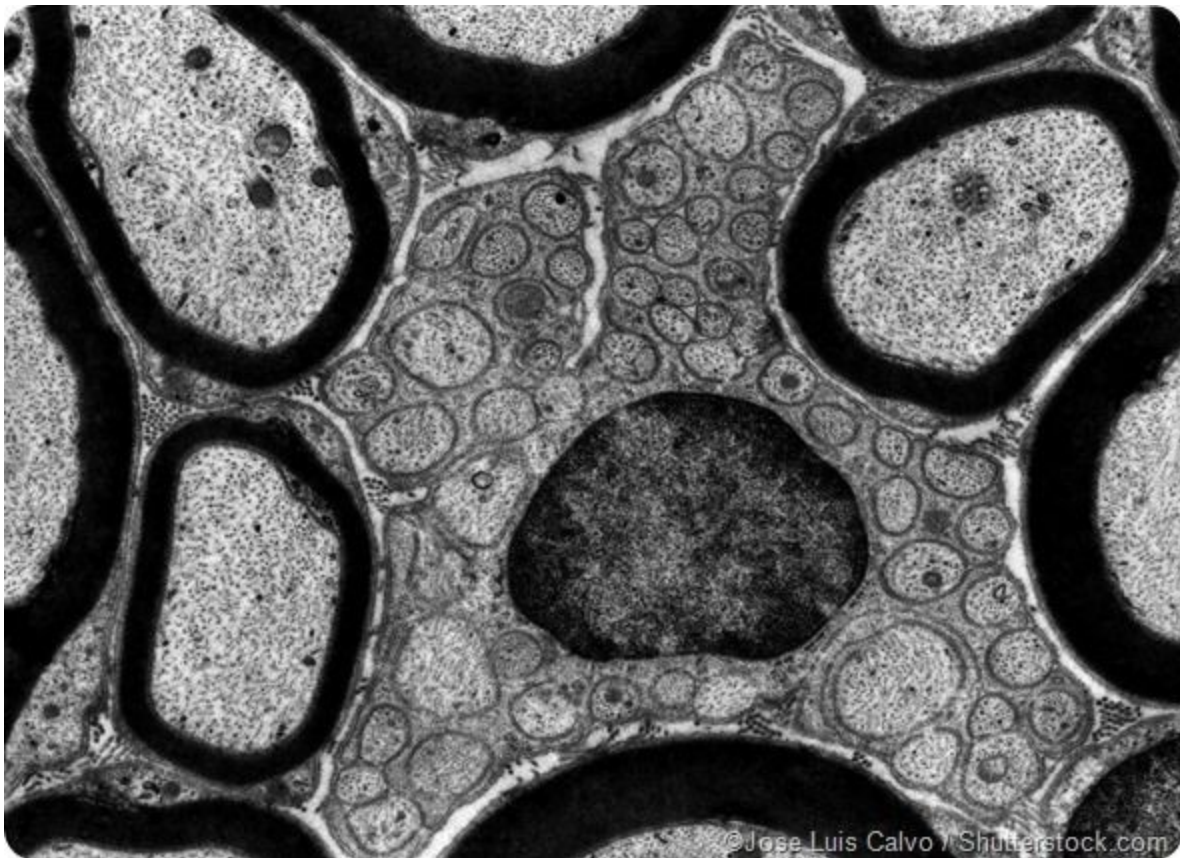


Fig 2

Slika 1.13: Još prikaza građe i strukture mikroskopa na Fig1, te puta zrake i EM leća na Fig2

3. Metode oslikavanja

Metode oslikavanja u TEM-u rabe informacije sadržane u valovima elektrona iz uzorka te time formiraju sliku. Leće projektora omogućavaju pravilno pozicioniranje i distribuciju elektrona na vizualni sustav. Različite metode oslikavanja nastoje modificirati izlazni uzorak na način da što bolje pruži informaciju o samom uzorku. Slika ovisi o amplitudi snopa i fazi elektrona. Slike više rezolucije primjerice zahtijevaju tanje uzorke i elektrone više energije, odnosno, podrazumijeva se da promatrani uzorak ne apsorbira elektrone. Upravo zbog toga, uzorak se modelira tako da ne mijenja amplitudu ulaznog vala elektrona, već modificira njegovu fazu.



Slika 1.14: Slika dobivena pomoću TEM-a, a prikazuje nekoliko perifernih mijeliniziranih vlakana i Schwannovu stanicu

Dvije osnovne operacije TEM-a su oslikavanje i difrakcija. U oba slučaja je uzorak obasjan sa paralelnim snopom formiranim u sustavu te nakon interakcije sa uzorkom, na izlazu se javljaju dva tipa elektrona - neraspršeni i raspršeni. Oni neraspršeni odgovaraju svijetlom snopu, dok su raspršeni oni koji zbog te interakcije mijenjaju svoju putanju.

Pri operaciji oslikavanja otvor objektiva se postavlja u stražnju žarišnu ravninu leće (gdje se stvaraju difrakcijske mrlje). Odabirom samo središnje zrake, propušteni elektroni prolaze kroz otvor a svi ostali se blokiraju te se tako dobiva slika svijetlog polja. Ukoliko odaberemo (propustimo) signal iz difraktirane zrake, dobit će se slika tamnog polja. Konačno, slika uzorka se dobiva uvećavanjem i projiciranjem tog odabranog signala na zaslon.

Pri operaciji difrakcije se može preciznije odrediti uzorak s kojeg će se prikazivati signal. Promjenom jačine struje na središnju leću se projicira difrakcijski uzorak. Tako primjerice možemo rekonstruirati stanicu ili odrediti orijentaciju kristala.



Slika 1.15: TEM elektronska difrakcija

Kontrast u slici između dva područja postiže se razlikom u gustoći elektrona. Zbog raspršenja upadne zrake, mijenjaju se amplituda i faza elektronskog vala te to rezultira amplitudnim i faznim kontrastima. Većina slika ima te obje komponente. Amplitudni kontrast se dobiva uklanjanjem elektrona time što se tijekom njihove interakcije s uzorkom dio gubi zbog apsorpcije ili raspršenja pod kutovima koji prelaze ograničenja mikroskopa, dok se fazni kontrast postiže zbog razlika u fazi između elektronskih valova.

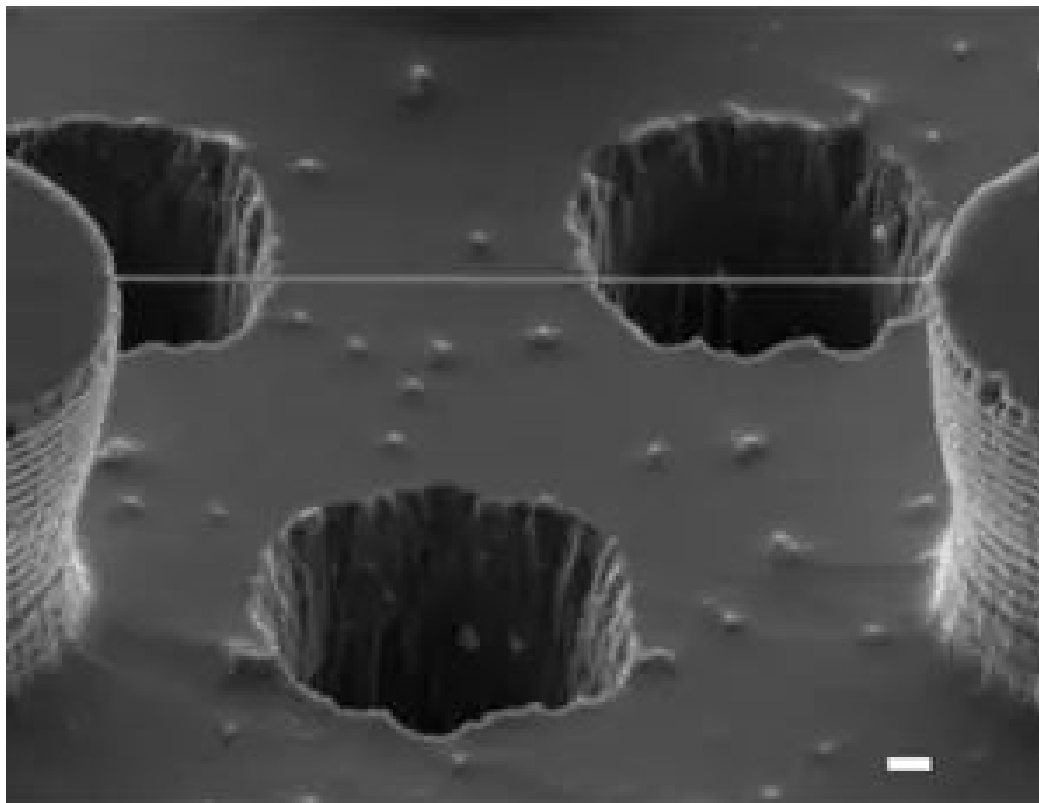
4. Priprema uzoraka

Priprema uzorka u TEMu je dosta složen postupak. Prije svega bi uzorci trebali biti manji od 100nm. Sama priprema uzorka je specifična za materijal koji se analizira te za vrstu informacija koje se trebaju dobiti iz uzorka. Materijali relativno malih dimenzija se mogu pripremiti taloženjem razrijeđenog uzorka, dok primjerice biološki uzorci mogu biti ugrađeni u smolu kako bi omogućili rezanje tkiva u elektronski prozirne tanke dijelove. Oni se također mogu i obojati. U nastavku ćemo navesti nekolicinu tehnika pripreme uzoraka.

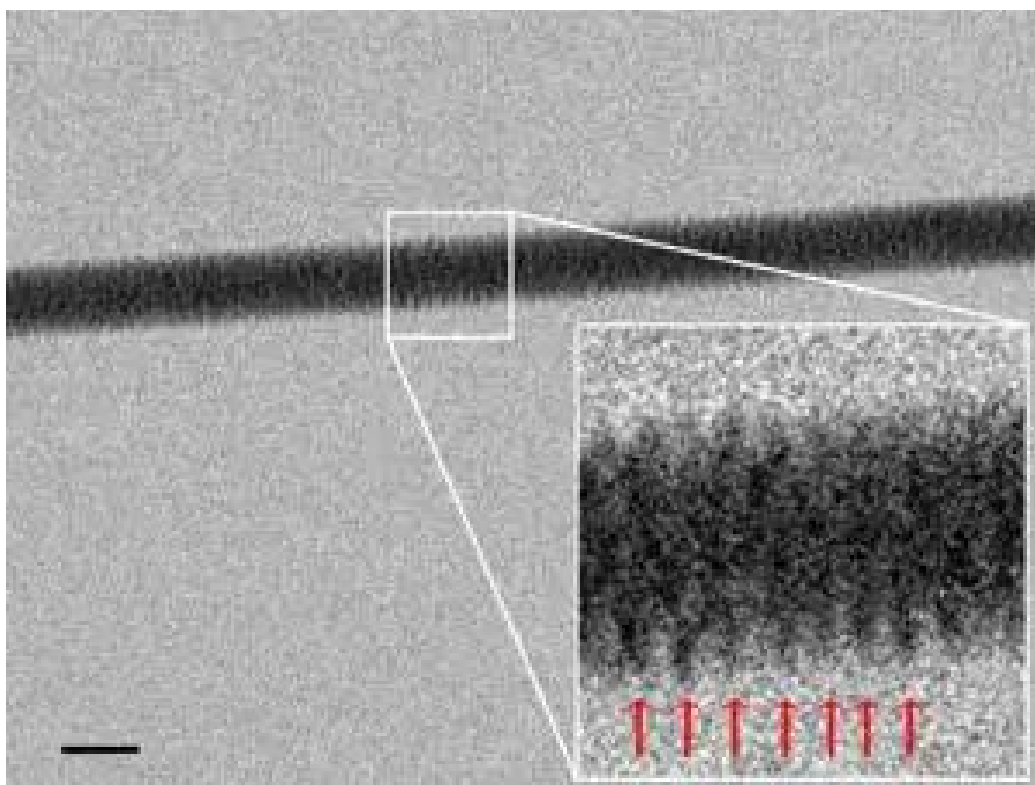
Seciranje tkiva se koristi najviše kod bioloških materijala. Nakon što se biološko tkivo ugradi u blok smole, stanjuje se na komade manje od 100nm. Neki anorganski uzorci, poput aluminija, se također mogu ugraditi u smolu. Još jedna navedena metoda je bojanje uzorka, npr. potrebnim biološkim uzorcima radi postizanja većeg kontrasta. Mrlje dobivene bojanjem upijaju ili raspršuju dio snopa elektrona. Mehaničko mljevenje, odnosno poliranje je zahtjevnija metoda koja se obavlja u grubljoj tehnici, te najčešće prethodi nekoj finijoj metodi, poput ionskog nagrizanja. Ostale metode uključuju kemijsko jetkanje, ionsko jetkanje (nagrizanje) ili čak ionsko mljevenje. Uzorci se također mogu replicirati uz pomoć celuloznog acetatnog filma.

5. Važnosti i koristi

Elektronski mikroskop se služi snopom elektrona za dobivanje uvida u uzorak i njegovu mikrostrukuru, s tim da mu je glavna prednost dosta velika rezolucija. U okviru toga, transmisijski elektronski mikroskop (TEM) koristi snop elektrona koji prolazi kroz tanki uzorak i skup elektromagnetskih leća te se slika promatra na fluorescentnom ekranu ili digitalnoj kameri. Osim generalne važnosti same mikroskopije za analizu mikrostrukture, posebno elektronske mikroskopije visoke rezolucije i oštine, zaključujemo da je upravo elektronska mikroskopija najviše utjecala na naše razumijevanje građe stanice, jer je u odnosu na svjetlosnu mikroskopiju elektronska mnogo detaljnija, do te mjere da je otkrila neke stanične strukture koje su bile premale da se zamijete svjetlosnim mikroskopom.



Slika 1.16: DNA 'uže' između 2 silikonska nanostupa



Slika 1.17: Akompanirajuća slika s DNA užem između nanostupova. Pogađam da je to uvećani prikaz DNA uža.

6.Literatura

- [1] https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy#History
- [2] https://en.wikipedia.org/wiki/Oscilloscope#Cathode-ray_oscilloscope_.28CRO.29
- [3] <https://warwick.ac.uk/fac/sci/physics/current/postgraduate/regs/mpagswarwick/ex5/techniques/structural/tem>
- [4] <https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=qsrxpx3K8AI>
- [5] <https://courses.lumenlearning.com/introchem/chapter/cathode-rays/>
- [6] <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/cation-vs-anion-definition-chart-and-the-periodic-table-322863>
- [7] <https://en.wikipedia.org/wiki/Anode>
- [8] https://www.wikilectures.eu/w/Limit_of_resolution_of_optical_microscope
- [9] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4865294/>
- [10] <https://www.microscopy.ethz.ch/TEMED.htm>
- [11] <https://www.getkisi.com/guides/ccd-camera>
- [12] <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>
- [13] <https://www.umassmed.edu/cemf/whatisem/>
- [14] <https://www.ccber.ucsb.edu/ucsb-natural-history-collections-botanical-plant-anatomy/transmission-electron-microscope>
- [15] <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Transmission-Electron-Microscopy.aspx>
- [16] <https://www.nature.com/articles/srep26516/figures/1>
- [18] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4d/Algae_and_bacteria_in_Scanning_Electron_Microscope%2C_magnification_5000x.JPG
- [19] <https://www.newscientist.com/article/dn22545-dna-imaged-with-electron-microscope-for-the-first-time/>
- [20] <https://www.slideshare.net/johader/tem-workshop-2013-electron-diffraction-hadermannfinal>