

Лабораторно упражнение към Магистърски курс по “Патология на биомембрани”

Сканираща електронна микроскопия (SEM) на биомембрани

Цели на упражнението: Запознаване с устройството и начините за използване на сканиращ електронен микроскоп. Подготовка на образци от модели на биологични мембрани (порести филтри) и наблюдаване на образи. Извършване на компютърна обработка на цифровите изображения.

В настоящето упражнение ще се запознаете с възможностите, устройството, и използването на сканиращ електронен микроскоп. В точка II. е описан принципът и устройството на SEM, а в точка III. е описан начинът на използване на уреда в упражнението, SEM Hitachi S570 в Лабораторията по Елипсометрия (A204). Преди започване на упражнението е необходимо да се запознаете с този материал и да можете да отговорите на контролните въпроси в точка I.1.

I. Провеждане на лабораторното упражнение

1. Контролни въпроси
 - a. Какъв е диапазонът от размери на обекти които могат да се изследват със SEM? От какво зависи увеличението?
 - b. Коя характеристика на SEM дава значително предимство пред оптичния микроскоп при разглеждането на релефни обекти?
 - c. Какво е необходимо да се направи при приготвянето на образца за предотвратяване на натрупването на заряд?
 - d. Регистрирането на кои електрони дава информация за топографията на повърхността? Защо?
 - e. Каква информация за образца може да се получи от излъчените рентгенови фотони? Какъв детектор трябва да се постави в камерата за това?
 - f. От кои фактори зависи контрастът на изображението, съответно детайла който може да се наблюдава?
 - g. Кой параметър на SEM апарата се регулира само и единствено от ръководителя на упражнението?

2. Заснемане на червени кръвни клетки (готов образец, запознаване с уреда)
 - a. Поставете образца в камерата на сканиращия микроскоп, както е описано в точка II.2.
 - b. При малко увеличение на микроскопа (около 100x) и голямо работно разстояние (около 10 мм) подберете подходяща за наблюдаване област и запишете снимката (точка II.4)
 - c. Върху по-тъсна област от образца (например единична клетка) направете снимка с увеличение 4-5K и 10-20 K. Повторете за няколко области.
 - d. Променете работното разстояние последователно на 5 мм и 1 мм. Необходимо ли е да промените фокусировката при промяна на работното разстояние? За всяко работно разстояние повторете точки b. и c. Зависи ли образа от работното разстояние?

- e. Оценете размера на клетките.
 - f. Започнете процедурата по смяна на образеца (т. II.2)
3. Приготвяне на образец от биомембрани и заснемане
- a. Вземете малко парче от филтъра-образец и го поставете върху алуминиевия държател. Изчакайте 5-10 минути ако е необходимо остатъчната вода да се изпари. Закрепете и заземете образеца със сребърна паста.
 - b. Държателя се поставя в магнетронния разпрашител за покриване с тънък слой злато (изпълнява се от ръководителя на упражнението). Камерата на разпрашителя се поставя под вакуум и се натича с инертен газ. Избира се големина на тока и време на отлагане и апарата се задейства. Металния слой се отлага за осигуряване на проводимост и предотвратяване на натрупване на заряд при наблюдението.
 - c. Пригответия образец се поставя в камерата на сканиращия микроскоп, както е описано в точка II.2.
 - d. при малко увеличение на микроскопа (около 100x) подберете подходяща за наблюдаване област и запишете снимката (точка II.4)
 - e. върху по-тъсна област от образеца (например единични пори) направете снимка с увеличение 4-5K. Повторете за няколко области.
 - f. Оценете размера на порите.
 - g. За една от областите направете снимки при 2 до 3 наклона на образеца спрямо електронния лъч (tilt), през 20 градуса. Сравнете образите получени при различни наклони.
 - h. Направете няколко снимки при промяна на ъгъла (tilt) и въртене на образеца около оста му (rotation), така че да подберете положение при което можете да оцените размера на порите и да видите как наблюдаемия размер зависи от ъгъла.
 - i. Започнете процедурата по смяна на образеца (т. II.2)
4. Обработка на изображенията
- a. Използвайте безплатната програма ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) за цифрова обработка на изображенията
 - b. От меню Image изберете Adjust Brightness and Contrast. Променете съответните параметри до получаване на по-добро изображение
 - c. Снемане на размери от снимката: отидете с мишката до началото на скалата на снимката (долу вдясно), задръжте левия бутон, и отидете до края на скалата. Запишете числото след "length=" което се появява в прозореца с текущото положение на курсора. Отидете в меню Analyse-> Set scale и въведете това число в прозорец "Distance in pixels". Въведете размера на скалата даден на снимката в прозорец "Known distance". Натиснете ОК. След тази процедура програмата е калибрирана за съответната снимка и можете чрез положението на курсора да определяте директно размери и ъгли.

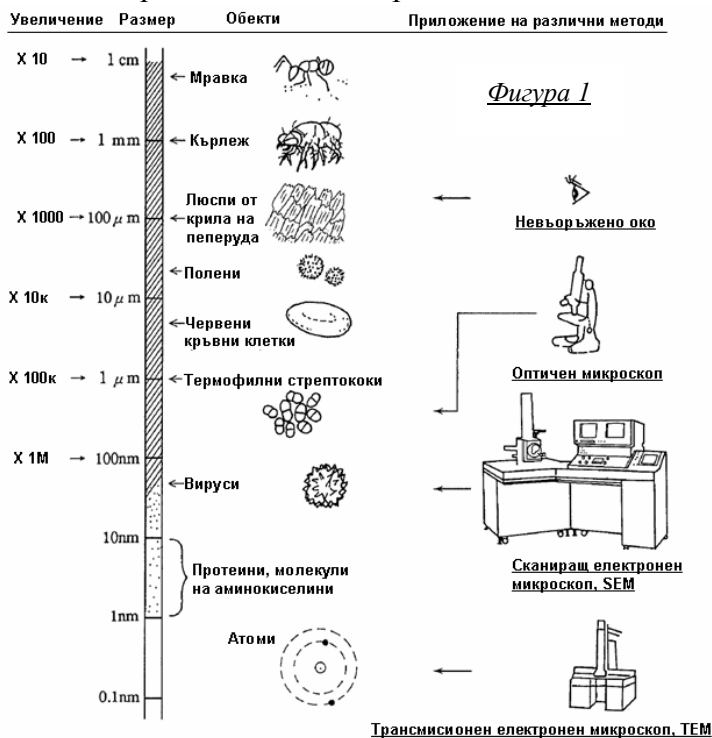
II. Сканиращ електронен микроскоп (SEM) – устройство и принцип на работа.

1. Кратка история и развитие.

Принципите на сканиращата електронна микроскопия (SEM) са известни още от 1930 г. Изследванията започват в Германия, но едва след Втората световна война, през 1965 г., е произведен първият комерсиален микроскоп от Cambridge Scientific Instruments. Възможностите които предоставя SEM през последните години и увеличаването на достъпността на апаратурата правят метода широко използван в разнородни области като физика, химия, екология, медицина, материалознание, дефектология, и др.

2. Област на приложение и принципи на SEM.

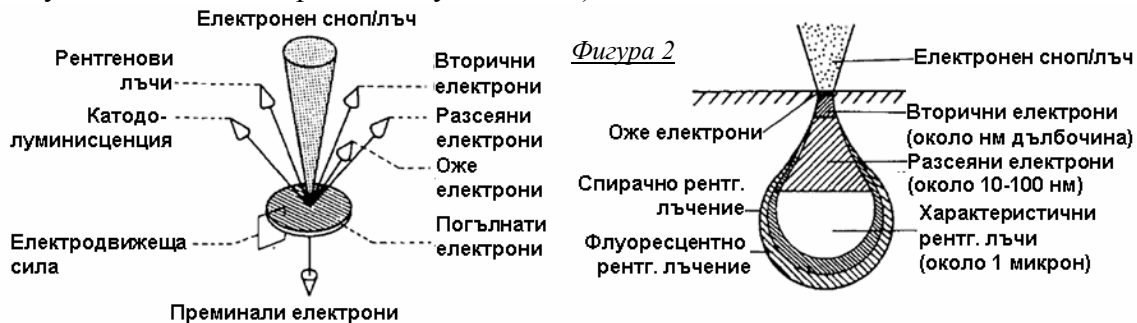
Фигура 1 показва скала с размерите на различни обекти в природата, различни методи за тяхната визуализация, и границите на възможностите на отделните методи. SEM се отличава с широк диапазон от изследвани размери, от 1 сантиметър до ~10 нанометра. Увеличението е значително по-голямо от това на



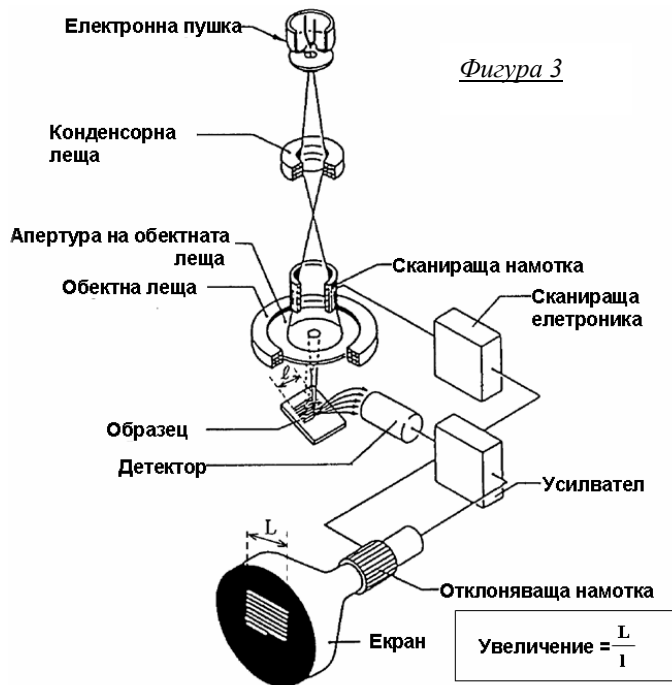
оптичния микроскоп, но дори и в областта на припокриване на двата метода SEM предлага по-добра разделителна способност. Значително предимство на SEM пред оптичния микроскоп е по-голямата работна дължина и дълбочина на фокуса, което позволява изследването на релефни обекти, като различните им части са на фокус на една и съща снимка. Възможно е изследването на широк кръг от обекти, като биологични клетки, бактерии, изолиращи или неизолиращи материали, сечения на многослойни структури. Приготвянето на

образците е сравнително просто (за разлика от това за трансмисионен електронен микроскоп) и в общия случай не променя изследвания обект. Възможно е и изследване на хидратирани обекти със SEM.

Методът SEM се основава на взаимодействието на електронен сноп (лъч) с атомите в съответния материал. Електронният сноп се фокусира до нанометрови размери чрез магнитни елементи и при попадането му върху образеца се наблюдават различни ефекти даващи информация за образеца. Лявата част на фиг. 2 обобщава тези ефекти, като излъчване на други електрони, излъчване на светлина или рентгенови лъчи, създаване на електродвижещо напрежение. Дясната част на фиг. 2 показва дълбочината от която произлизат електроните или фотоните свързани с дадения ефект. Изследвайки съответния ефект получаваме осреднена информация за образеца до съответната дълбочина. Анализирвайки енергията на характеристичните рентгенови фотони излъчени от образеца може да се получи и информация за химическите елементи в областта на попадане на лъча. Сканирайки лъча по образеца и регистрирайки съответния ефект може да се изготвят карти за свойствата на образеца с нанометрова разделителна способност (напр. химическия му състав или електронната му плътност).



3. Устройство на SEM и видове детекция.



На фиг. 3 е показано принципното устройство на апарат за SEM. Източник на електрони (т.нар електронна пушка, най-често представляваща нагреваема жичка) създава облак от електрони до повърхността си, които се ускоряват към образеца от ускоряващо напрежение. При движението си електроните взаимодействат с няколко магнитни „лещи“ (намотки) и малки отвори (апертури), които фокусират електроните в точка върху равнината на образеца. Вследствие на изброените по-горе взаимодействия с атомите в образеца възникват електрони или фотони, които се регистрират със съответен детектор. На

информацията получена от детектора за дадената точка (например броя вторични или разсеяни електрони, или интензитета на рентгеновото лъчение) се съпоставя

цвет и точката се проектира на компютърен екран. Сканирайки лъча по повърхността на образца се изготвя двумерен образ върху екрана. Отношението на размера на образа върху екрана (L) спрямо размера на областта в която се движи елетронния лъч по образца (l) дава увеличението на микроскопа.

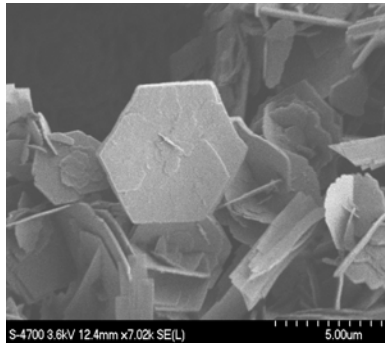
В зависимост от използвания детектор и геометрията на експеримента има различни режими за работа на SEM. По-долу са изброени някои от тях заедно със съответната информация която носят за образец.

Регистриране на	Наименование	Информация за образца
вторични електрони	SEI	топография на повърхността
разсеяни електрони	BEI	структура на образца
рентгенови лъчи	EDX	химически състав
преминали електрони	TEI	вътрешна структура
катодолуминисценция	CL	вътрешни характеристики
електродвижеща сила	EBIC	вътрешни характеристики
вторични електрони	ECP	кристалитна структура
разсеяни електрони	MDI	магнитни домени

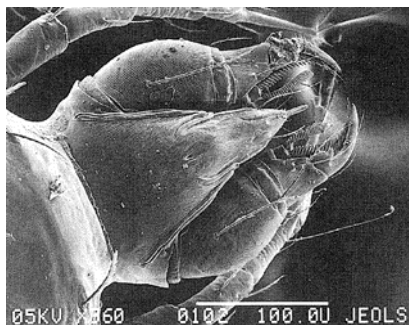
4. Примери за изследвания със SEM.

4.1. Топография на повърхността (използват се вторичните електрони)

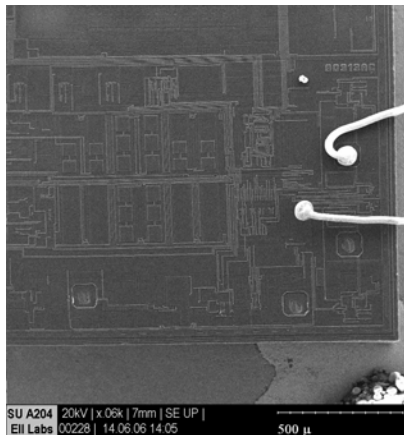
Това е най-използвания режим на работа при SEM. Използват се вторичните електрони излъчвани от тънък слой до повърхността. Броят вторични електрони силно зависи от ъгъла между първичния електронен сноп и повърхността, следователно образа дава информация за релефа на образца. По-долу са дадени примери на обекти подходящи за изследване в този режим.



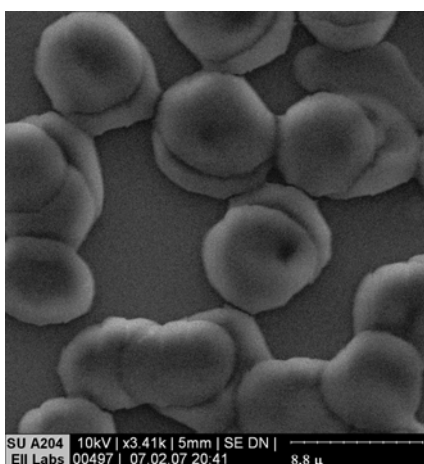
Морфология на биогенни железни окиси със смесена валентност (т.нар. „зелени ръжди”), получени при редукцията на фери-хидроокиси от почвени бактерии (увеличение $\times 7000$). Наблюдава се кристализация в тънки хексагонални кристали, свързано с кристалната структура на материала.



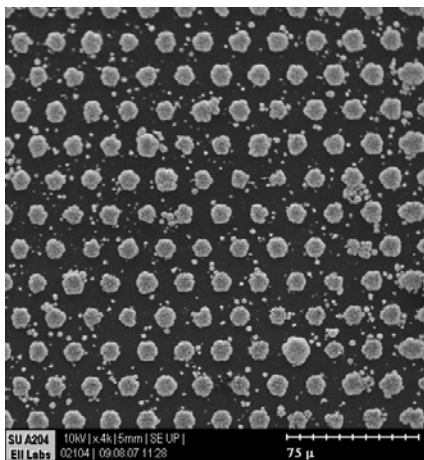
Глава на кърлеж, увеличение $\times 360$. Дори при увеличаване сравнимо с това на оптичен микроскоп със SEM се получава по-детайлна информация за образца, поради това че всички области от обекта са на едновременно на фокус.



Дефекти при свързване в интегрална схема.
Увеличение x60.



Червени кръвни клетки, увеличение x3400.



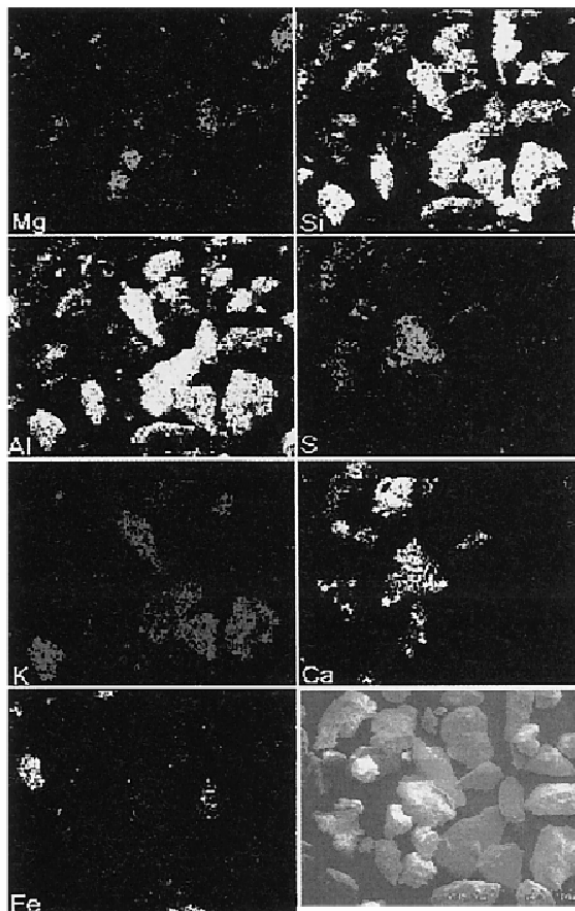
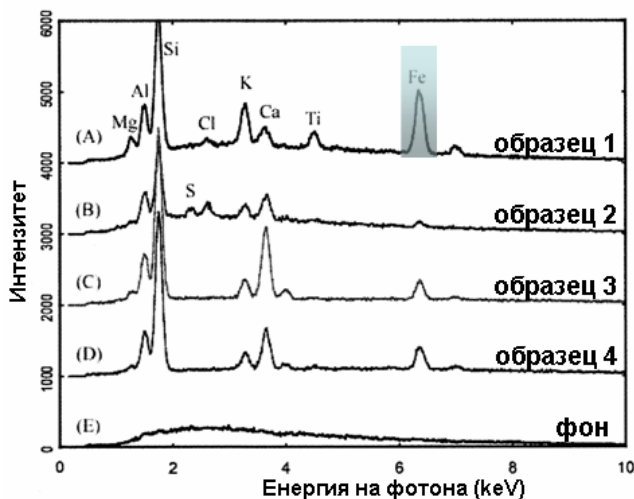
Подредени сребърни nano-структури върху
подложка. Увеличение x4000.

4.2.

4.3. Елементен анализ (използват се характеристичните рентгенови фотони).

След получаване на топографско изображение от вторичните електрони, е възможно да се изследва химичния състав на избрани области от изследвания обект ако апарата разполага с анализатор по енергии за рентгенови фотони. В дадена точка от образца се записва спектъра на

излъчените фотони и се анализира интензитета на характеристичните линии за даден елемент.



Отгоре е показан измерен спектър на излъчени фотони за образци от аерозолни частици. Дефинирайки енергетични области за всеки елемент (като пример е показан Fe), и интегрирайки интензитета под съответния пик във всяка точка на образеца могат да се получат карти на елементното разпределение. Вдясно (долу) е показан SEM образ на аерозолни частици, а над него интензитетът за няколко елемента (Mg, Si, Al, S, K, Ca, и Fe) в съответните точки.

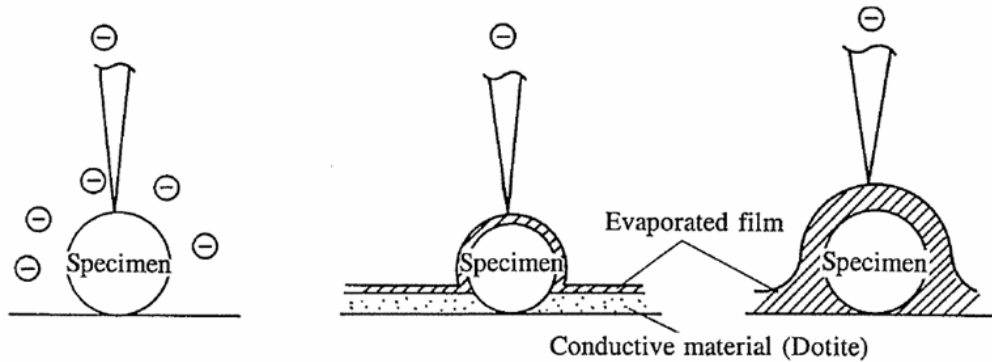
5. Подготовка на образците.

Разнообразието от обекти изследвани чрез SEM е довело до разнообразни методи на приготвяне на образците. За произволен образец обаче е необходимо да бъдат изпълнени следните условия:

- повърхността на образеца трябва да е чиста от замърсявания
- морфологията му трябва да не се променя от поставяне на образеца във вакуум
- образеца не трябва да натрупва електростатичен заряд

Тези изисквания следват от това, че SEM е повърхностно изследване извършвано във вакуум, за което се използват заредени частици. Чиста повърхност може да се получи чрез счупване на образеца в инертна среда или чрез вграждане на образеца в полимер и рязане с микротом. Запазването на морфологията е особено важно при биологични образци, тъй като те съдържат вода която се изпарява при поставяне във вакуум и е възможно образеца да се свие в камерата на апарата. Морфологията се запазва чрез „фиксиране” на протеините и липидите посредством физични методи (дълбоко замразяване) или химични методи (напр. полимеризация и

дехидратация). Ако образеца е непроводящ е необходимо да се покрие с проводящ слой и да се заземи. Това се налага поради факта, че част от електроните на микроскопа се поглъщат и натрупват в образеца, и ако не бъдат отведени създават поле което отклонява другите електрони и водят до погрешни образи. Най-често се отлага тънък (няколко nm) слой от платинено-златна сплав или от въглерод, като е необходимо да се постигне компромис между дебелина на покритието и ускоряващото напрежение. При по-високо ускоряващо напрежение се постига подобър контраст, но се увеличава зареждането на образеца. Поради това е необходимо да се отложи по-дебел слой, което маскира детайлите в образеца. Обратно, при по-ниско напрежение се намалява проблема със зареждането, запазва се детайла в изображението, но се намалява контраста.



a) **Образец без покритие:**
Използва се ниско ускоряващо напрежение за да се избегне зареждане на образеца.

b) **Тънко покритие на образеца:**
Запазва детайлите по повърхността на образеца и позволява използването на по-високи напрежения

c) **Дебело покритие:**
Намалява наблюдавания детайл в образеца

III. Инструкции за експлоатация на сканиращ електронен микроскоп Hitachi S570 в Лаборатория по Елипсометрия (A204)

Внимание: Всички действия, свързани с управлението на електронния микроскоп, смяна на образците и на режима на работа правете **само** в присъствието и с разрешението на преподавателя, водещ упражнението.

1. Подготовка на микроскопа за работа.

- 1.1. Пуснете водата за охлаждане на дифузионната помпа.
- 1.2. Включете компресора за поддържане на нужното налягане за пневматичните клапани.
- 1.3. Уверете се, че микроскопа е включен към мрежовото напрежение.
- 1.4. Включете микроскопа (“Evac. Power”- ON).
- 1.5. След около 20-25 мин светва зелената лампа (Vacuum – High) , което е индикация че микроскопа е готов за работа.

2. Зареждане на образца.

- 2.1. Уверете се, че работното разстояние е в позиция за смяна на образца(зелената лампа “SC. Air possible” свети) и наклона е нула.
- 2.2. Натиснете бутона “AIR” от дясната страна на колоната на микроскопа.
- 2.3. Когато налягането в камерата се изравни с атмосферното издърпайте я внимателно и сменете образца. **НЕ ЗАБРАВЯЙТЕ ДА НОСИТЕ ПРЕДПАЗНИ РЪКАВИЦИ.**
- 2.4. Затворете работната камера и натиснете бутона “EVAC”.

3. Включване и работа с микроскопа.

- 3.1. Уверете се, че зелената лампа (High Vac.) за високо налягане свети.
- 3.2. Включете високоволтовия блок на микроскопа (“DISPLAY PPOWER”- ON).
- 3.3. От менюто на екрана изберете работното ускоряващо напрежение (фиг.1 левия панел). Натиснете последователно “Call” и “0” за възможност за промяна на напрежението. Наберете съответното напрежение и натиснете бутона “Enter” два пъти.
- 3.4. Уверете се, че копчето за контрол на тока през нишката (**Filament knob**) е завъртяна напълно по посока, обратна на часовниковата стрелка.
- 3.5. Натиснете бутона (“ACC. VOLTAGE” - ON), за да включите високото напрежение.
- 3.6. Преминете в режим на сканиране по линия (чрез натискане на бутона Scanning Mode - W. Form – фиг. 1)
- 3.7. **МНОГО БАВНО** завъртете копчето **Filament knob** (фиг. 1) докато сигнала достигне насищане. Върнете копчето на положение точно преди насищане.

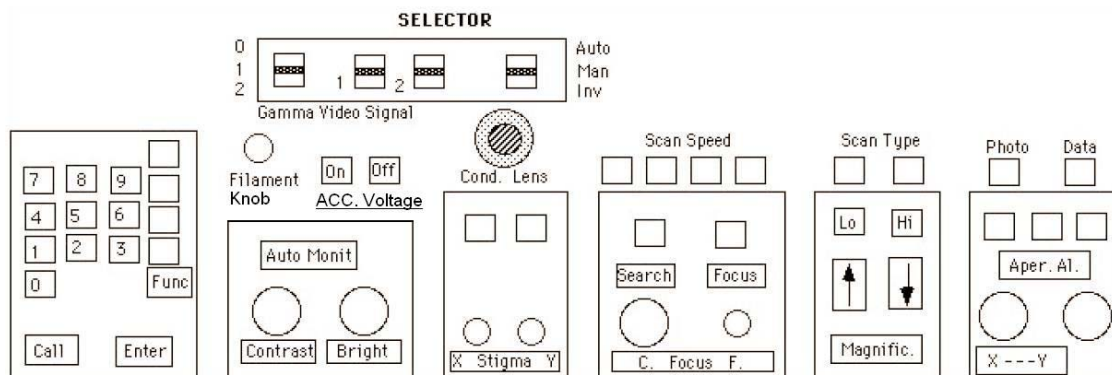
- 3.8. Натиснете бутона за нормално сканиране (Normal Scanning Mode) за да получите изображението на екрана.
- 3.9. Подберете подходящи работно разстояние и наклон на образеца (Z-Axis и Tilt – фиг. 2) и застопорете масичката (Stage “LOCK” – фиг. 2).
- 3.10. Изберете бърз режим (Rapid Mode) и фокусирайте изображението.

4. Работа с програмата SEM570.exe.

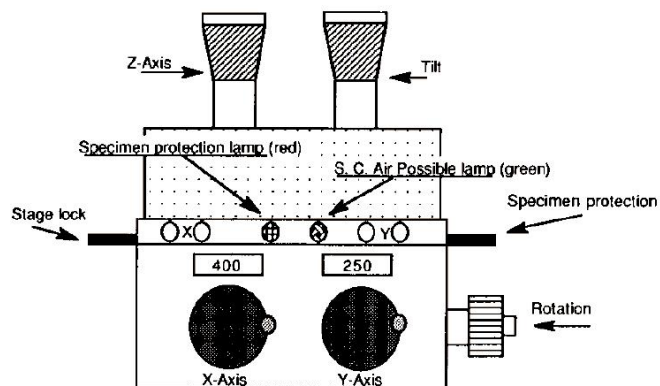
- 4.1. Уверете се, че модула за синхронизация е захранен и включете блока за цифрово заснемане на изображението.
- 4.2. Пуснете програмата (SEM570.exe) от десктоп-а на монитора.
- 4.3. Преминете в режим на синхронизация с честотата на мрежовото напрежение (■).
- 4.4. Изберете областта, от образеца, която ще се снима (X и Y фиг.2).
- 4.5. Подберете подходящо увеличение (Magnification: High, Low, фиг. 1).
- 4.6. Нагласете яркостта и контраста на изображението (Contrast и Bright на фиг.1).
- 4.7. Прехвърлете изображението към екрана на компютъра – два пъти натиснете бутона за скорост на сканиране $\frac{3}{4}$ и след това бутона за точков режим (на панела до монитора е отбелязан с квадрат с точка в средата).
- 4.8. Изберете размер на изображението от 256x256 p до 4096x4096 p. - ■■■■■, фиг. 3.
- 4.9. Въведете данните за увеличението, размер на скалата, ускоряващо напрежение, детектор и работно разстояние (в лявата част на екрана – фиг. 3).
- 4.10. Изберете еднократно сканиране на изображението (■) и го стартирайте (бутон ■ фиг. 3).
- 4.11. Запишете снимката във файл с разширение “JPG” (■).
- 4.12. Прехвърлете изображението към екрана на микроскопа за избор на нова област (става чрез последователно натискане на бутона за растерно сканиране и за бързо сканиране – Rapid Scanning Speed).

5. Изключване на микроскопа.

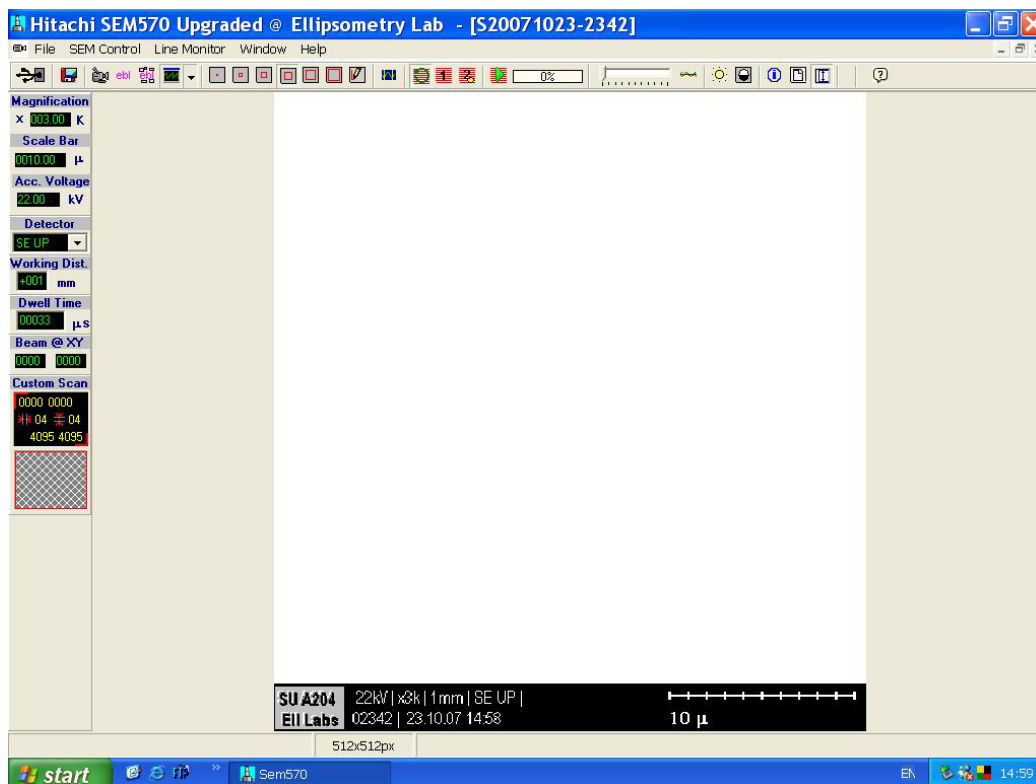
- 5.1. МНОГО БАВНО намалете тока през нишката до нула (обратно на часовниковата стрелка изцяло).
- 5.2. Изключете високото напрежение (“ACC. VOLTAGE” - OFF).
- 5.3. Нагласете работното разстояние в позиция за смяна на образеца (лампата S. C. Air possible свети) и наклона на нула.
- 5.4. Преместете ключа за застопоряване на масичката в позиция “FREE”.
- 5.5. Изключете високоволтовия блок (“DISPLAY POWER- OFF”).
- 5.6. Изчакайте около 10 s преди да изключите захранването на микроскопа (“EVAC POWER- OFF”).
- 5.7. Оставете водата да тече поне 20 мин след приключване на работата с микроскопа.



Фигура 1. Работен панел.



Фигура 2. Гониометър на предметната масичка.



Фигура 3. Главният прозорец на SEM570.