

RAFAŁ BUTOWT

*Zakład Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Biologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Gagarina 9, 87-100 Toruń*

FILTROWANIE ENERGII ELEKTRONÓW — NOWA TECHNIKA
TWORZENIA OBRAZU W TRANSMISYJNYM MIKROSKOPIE
ELEKTRONOWYM

WPROWADZENIE

Mikroskop elektronowy jest jednym z podstawowych narzędzi stosowanych do badań strukturalnych, zarówno w odniesieniu do materii żywej, jak i nieżywej. Postępujące udoskonalanie współczesnych transmisyjnych mikroskopów elektronowych (ang. TEM — transmission electron microscope) w znacznym stopniu przyczyniło się do postępu badań biologicznych, zwłaszcza na poziomie komórkowym i tkankowym.

Pierwszy mikroskop elektronowy został zbudowany w 1931 roku przez E. Ruska i M. Knolla. Ten przyrząd jest dziś uważany za pierwszy mikroskop elektronowy, nawet jeśli wspomnieć o jego nadzwyczaj skromnym, całkowitym powiększeniu ($3,6 \times 17,4$).

Przez punktową zdolność rozdzielczą rozumie się na ogół najmniejszą odległość między dwoma punktami, w jakiej są one jeszcze rozróżnialne jako oddzielne obiekty. Już w 1873 roku Ernst Abbe wykazał, że zdolność rozdzielcza mikroskopu świetlnego nie może być lepsza niż około 200 nm. Wartość ta jest bowiem w przybliżeniu równa wartości połowy długości fali elektromagnetycznej stosowanej do obserwacji. W przybliżeniu określa to następujące znane wyrażenie:

$$d = L/A \quad (1)$$

gdzie: d — zdolność rozdzielcza fali elektronowej [nm]

L — długość fali świetlnej [nm]

A — apertura obiektywu (czyli sinus połowy maksymalnego kąta rozwarcia przesłony obrazowej obiektywu).

Mikroskop elektronowy podlega tym samym prawom optyki co mikroskop świetlny. Tak więc wyrażenie (1) obowiązuje jednakowo w mikroskopii świetlnej i mikroskopii elektronowej. Jednak różnego rodzaju błędy formowania odwzorowania obrazu są w mikroskopie elektronowym znacznie trudniejsze do usunięcia aniżeli w mikroskopie świetlnym. Stąd też ogólne wyrażenie określające punkto-

wą zdolność rozdzielczą współczesnych TEM przedstawia się najczęściej w postaci (HUTCHISON 1990):

$$d = 0,66 \times c_s^{1/4} \times L^{3/4} \quad (2)$$

gdzie: d — zdolność rozdzielcza [nm]

c_s — współczynnik aberracji sferycznej

L — długość fali elektronowej [nm]

Rozpędzony w polu elektrycznym między katodą i anodą strumień elektronów tworzy w kolumnie mikroskopu wiązkę elektronów o fali bardzo małej długości (MEEK 1976). Wartość długości tej fali zależy od masy elektronu (masa ta nie jest stała, lecz rośnie wraz ze wzrostem prędkości — tak zwany efekt relatywistyczny) oraz od jego prędkości. Iloczyn tych dwu wielkości określa pęd elektronu. Związek pędu i długości fali elektronu jest opisywany znanym równaniem de Broglie'a:

$$L = h/m \times v \quad (3)$$

gdzie: L — długość fali pędzących elektronów [nm]

h — stała Plancka [$6,62 \times 10^{-34} \text{ J} \times \text{s}$]

m — masa elektronu [$9,11 \times 10^{-31} \text{ kg}$]

v — prędkość elektronu [m/s]

Prędkość elektronu zależy natomiast od wartości przyłożonego między katodą i anodą napięcia przyspieszającego E_0 (MEEK 1976). Na przykład, dla $E_0 = 100 \text{ keV}$ prędkość elektronów wynosi około 164000 km/s. Poruszające się z tą prędkością elektrony są opisywane falą o długości równej w przybliżeniu 0,0037 nm. Po wstawieniu tej liczby do równania (1) (oraz założeniu że $A = 2 \times 10^{-2} \text{ Rad}$) otrzymalibyśmy zdolność rozdzielczą d rzędu $0,2 \text{ nm} = 2 \times 10^{-10} \text{ m}$. Wartość ta jest zbliżona do teoretycznej zdolności rozdzielczej mikroskopu elektronowego, działającego pod napięciem przyspieszającym 100 keV. Ażeby osiągnąć taką wartość d , soczewki powinny być idealne, zasilanie mikroskopu nieskończenie stabilne, natomiast bardzo cienka próbka nie powinna zmieniać struktury pod wpływem bombardowania wiązką elektronów (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993).

Spełnienie tych warunków nie jest jednak proste. W chwili obecnej najlepsze uzyskiwane rozdzielczości w wysokorozdzielczych transmisyjnych mikroskopach elektronowych są rzędu 0,12–0,16 nm (HUTCHISON 1990). Z taką zdolnością rozdzielczą osiąga się odwzorowanie obrazów dla specjalnie przygotowywanych próbek nieorganicznych, a nie dla preparatów biologicznych. W praktyce, rozdzielczości obrazów uzyskiwane we współczesnych TEM w skrawkach biologicznych o grubości poniżej 100 nm osiągają wartości rzędu 0,25–0,50 nm (EGLE i współaut. 1984). W przypadku skrawków grubszych od 200–300 nm rozdzielczość obrazu jest co najmniej o rząd wielkości gorsza. Wynika stąd, że w konwencjonalnym TEM rozdzielczość obrazów zależy w dużej mierze od grubości stosowanych preparatów.

W przypadku preparatów biologicznych dodatkowe kłopoty z otrzymanymi obrazami sprawia niewielki ich kontrast (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Oznacza to, że obraz składa się z sąsiadujących ze sobą obszarów o niewielkiej różnicy

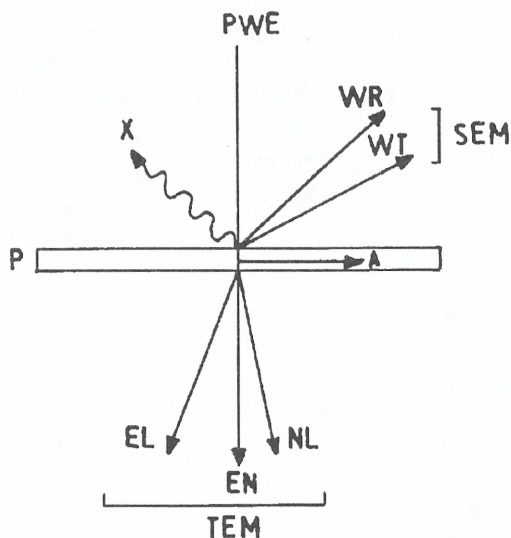
w skali szarości¹. Przy czym może on być zbyt jasny lub zbyt ciemny. Ten drugi przypadek zdarza się, gdy nadmierna grubość skrawka utrudnia jego penetrację przez wiązkę elektronową.

Powyższe problemy wynikają ze sposobu oddziaływania pierwotnej wiązki elektronów z materiałem próbki (rys. 1). Spośród wielu efektów tego oddziaływania za powstanie prawidłowego obrazu w TEM są odpowiedzialne elektrony rozproszone na badanym preparacie w sposób elastyczny (ang. elastic scattering). Rozproszenie elastyczne dokonuje się na skutek oddziaływań elektrostatycznych (Coulomba) pędzących elektronów z jądrami atomów próbki, zachodzi bez strat energii tych elektronów ($dE = 0$) oraz generalnie pod dużym kątem w stosunku do osi optycznej mikroskopu (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993).

Elektrony rozproszone przez próbkę nieelastycznie tracą część swojej energii głównie w wyniku oddziaływań z elektronami wewnątrz różnych atomów próbki (ang. inelastic scattering). W wyniku oddziaływań nieelastycznych większość elektronów jest rozpraszana pod małymi kątami w stosunku do osi mikroskopu (rys. 1, SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Elektrony te stanowią „tło” powstającego obrazu, obniżając tym jego zdolność rozdzielczą i kontrast.

Jakość obrazu w TEM pogarsza się drastycznie ze wzrostem grubości badanej próbki, ponieważ w tych warunkach spada stosunek elektronów rozproszonych elastycznie do elektronów rozproszonych nieelastycznie (tab. 1, ANDREWS i LEAPMAN 1993).

Intensywność rozpraszania elektronów zależy również od masy atomowej pierwiastka rozpraszającego. Wraz ze wzrostem masy rośnie ogólna wydajność rozpraszania oraz stosunek rozproszeń elastycznych do nieelastycznych (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Stąd też materiały biologiczne, złożone głównie z pierwiastków lekkich, bez odpowiednich modyfikacji, są mało kontrastowe.



Rys. 1. Niektóre efekty oddziaływania wiązki elektronowej (PWE) z próbką (P) badanego materiału (MEEK 1976).

WR — elektrony rozproszone wstecznie; WT — elektrony wtórne; EL — elektrony rozproszone elastycznie; NL — elektrony rozproszone nieelastycznie; EN — elektrony nierozproszone; X — promieniowanie rentgenowskie; SEM — skaniningowy mikroskop elektronowy; TEM — transmisyjny mikroskop elektronowy; A — elektrony zaabsorbowane.

¹Miarą kontrastu obrazu jest wartość wyrażenia:

$$\%C = I_t - I_o \times 100\%$$

gdzie: %C — miara kontrastu

I_t — intensywność promieniowania w punkcie obrazu należącym do tła

I_o — intensywność promieniowania w punkcie należącym do obiektu.

Idealna krzywa rozkładu energii elektronów rozproszonych na preparacie biologicznym posiada charakterystyczny, hiperboliczny przebieg (rys. 2). Opisuje ją funkcja typu:

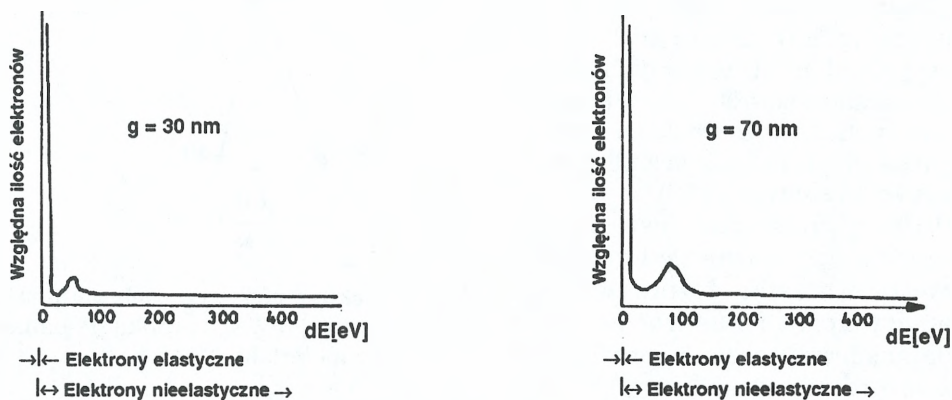
$$Y = ax^{-b} \quad (4)$$

Wysokość i położenie jej maksimum zależą od grubości preparatu i wartości napięcia przyspieszającego wiązkę elektronową w mikroskopie. Miarą wartości liczbowej elektronów rozproszonych elastycznie i nieelastycznie jest powierzchnia pod krzywą.

Tabela 1

Względny udział elektronów rozproszonych elastycznie i nieelastycznie w zależności od grubości próbki biologicznej (dla napięcia przyspieszającego $E_0 = 80$ kV).

Grubość preparatu	Rodzaj rozpraszania	
	Elastyczne	Nieelastyczne
30 nm	> 90%	< 10%
70 nm	70%	30%
500 nm	3%	97%
1000 nm	< 1%	> 99%



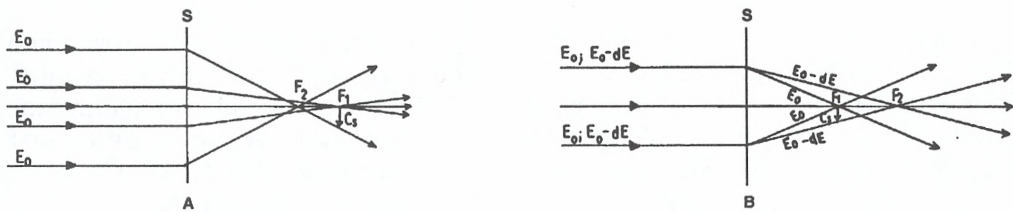
Rys. 2. Schemat rozkładu strat energii elektronów (dE) rozproszonych na preparacie biologicznym o różnej grubości (g).

PRZYCZYNY „KŁOPOTÓW” Z OBRAZEM

Sama obecność elektronów rozproszonych elastycznie, nieelastycznie oraz elektronów nierozproszonych jest naturalną konsekwencją budowy materii i sposobu jej oddziaływania z wiązką pędzących elektronów i bezpośrednią przyczyną powstawania obrazu i powstających zaburzeń obrazu. Przyczyn pośrednich zaburzeń obrazu mikroskopowego należy szukać we właściwościach

soczwek elektromagnetycznych, stosowanych do budowy mikroskopów elektronowych.

Termin „soczewka” odzwierciedla analogię funkcjonalną z soczewkami szklanymi wchodzącymi w skład mikroskopu świetlnego. Soczewki elektromagnetyczne wykazują, bowiem, zdolności skupiania i rozpraszania elektronów bez zmiany ich energii i prędkości (MEEK 1976). Obydwa rodzaje soczewek podlegają zatem tym samym prawom optycznym. Odnosi się to również do występowania w nich zniekształcających obraz aberracji, zwłaszcza aberracji sferycznej i aberracji chromatycznej (rys. 3), astygmatyzmu i podobne.



Rys. 3. Schemat aberracji sferycznej (a) oraz aberracji chromatycznej (b).

S — soczewka; F1, F2 — ogniskowe; Cc — promień dysku chromatycznego; Cs — promień dysku sferycznego; E0, E0 - dE — energie wiązki elektronów.

W efekcie wystąpienia zjawiska aberracji sferycznej i aberracji chromatycznej soczewka ogniskuje wiązkę elektronową w różnych punktach osi optycznej mikroskopu (rys. 3). Dlatego też obrazem punktu jest dysk, którego promień jest miarą wielkości danej aberracji. Promień ten jest jednocześnie zbliżony do osiąganego w danym mikroskopie zdolności rozdzielczej (HEZEL i BAUER 1985).

Podkreślić należy, że aberracja sferyczna jest zasadniczym zjawiskiem ograniczającym zdolność rozdzielczą współczesnych mikroskopów elektronowych (HUTCHISON 1994).

Dodatkowym źródłem problemów związanych z jakością obrazu w mikroskopach pracujących pod napięciami 20–100 keV, które są najczęściej używane w badaniach biologicznych, jest aberracja chromatyczna układów soczewek znajdujących się w mikroskopie poniżej preparatu (SOKOŁOWSKI i współaut. 1980). Emitowane przez katodę elektrony tworzą wiązkę elektronów przestrzennie spójną o energii $E_0 \pm 1-2$ eV. Jednak w procesach oddziaływań wiązki elektronów z atomami preparatu, zwłaszcza jeśli jest to gruby preparat biologiczny, znaczna ich część ulega rozproszeniu nieelastycznym. Elektrony rozproszone nieelastycznie o niższej energii (E_0-dE) i dłuższej fali są ogniskowane w dalszych punktach osi optycznej mikroskopu, aniżeli elektrony rozproszone elastycznie o energii E_0 .

Wielkość promienia dysku chromatycznego można oszacować na podstawie wyrażenia (HEZEL i BAUER 1985):

$$C = e \times a \times dE/E_0 \quad (5)$$

gdzie: C — długość promienia dysku chromatycznego [mm]

e — stała aberracji chromatycznej [mm]

a — apertura obiektywu

dE — wartość strat energii elektronów rozproszonych nieelastycznie [eV]

E_0 — napięcie przyspieszające wiązkę elektronową [eV].

Zakres strat energii elektronów rozproszonych nieelastycznie posiada istotny wpływ na wartość C . Mieści się on w bardzo szerokich granicach i, jak zauważono wcześniej, wykazuje rozkład hiperboliczny (rys. 2).

MOŻLIWOŚCI POPRAWIANIA JAKOŚCI OBRAZU MIKROSKOPOWEGO

Istnieją oczywiście określone sposoby podnoszące jakość rejestrowanego obrazu. Zgodnie z równaniem (5) zmniejszenie wartości e , a i dE spowoduje obniżenie promienia dysku chromatycznego C . Wartość stałej aberracji chromatycznej e zależy od konstrukcji soczewek elektromagnetycznych, natomiast wartość apertury a od średnicy przesłony obrazu obiektywu (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Średnicy apertury nie można jednak dowolnie zmniejszać.

Odwrotna zależność istnieje natomiast między wielkościami C i E_0 . Zastosowanie zatem bardzo wysokich napięć przyspieszających wiązkę elektronową również umożliwia obniżenie wartości promienia dysku chromatycznego C . Napięcia stosowane w mikroskopach wysokonapięciowych sięgają milionów elektronowoltów (HERMAN 1983). W tego rodzaju TEM możliwe jest oglądanie z dobrą rozdzielczością także grubych preparatów (rzędu mikrometrów), jednakże kontrast uzyskiwanego obrazu jest niewielki i maleje wraz ze wzrostem napięcia przyspieszającego elektrony (MANNELLA i RATKOWSKI 1983, DELONG i współaut. 1994). Mikroskopy wysokonapięciowe konstruuje się już od wielu lat. Nie są one zbyt rozpowszechnione w laboratoriach biologicznych z uwagi na ich wysoki koszt.

Dotychczas polepszenie jakości obrazu skrawków biologicznych dokonywano w praktyce krojąc odpowiednio cienkie preparaty, najlepiej poniżej 100 nm. Jak zauważono bowiem, dla cieńszych skrawków preparatu wzrasta stosunek rozprzeń elastycznych do nieelastycznych.

Najnowszym i niestety bardzo drogim sposobem poprawienia jakości obrazu mikroskopowego jest metoda polegająca na filtrowaniu energii elektronów, to znaczy przepuszczaniu na ekran lub kliszę fotograficzną elektronów o ściśle określonej energii (HEZEL i BAUER 1985, BAUER 1988, KOPF-MAIER 1991). Metodę tę określa się terminem elektronowej spektroskopii obrazu, lub w skrócie ESI (ang. electron spectroscopic imaging). Możliwości zastosowania techniki ESI przewidziano już na początku lat sześćdziesiątych, w praktyce jednak do szerokiego użytku weszła ona kilkanaście lat później (CASTAING i HENRY 1962, OTTENSMEYER i ANDREW 1980).

ZASADA FUNKCJONOWANIA TRANSMISYJNEGO MIKROSKOPU ESI/TEM

Do zalet metody ESI w odniesieniu do materiału biologicznego należy (EGLE i współaut. 1984):

— Znaczne poprawienie jakości uzyskiwanych, mikroskopowych obrazów skrawków o grubości powyżej 200 nm. Rozdzielczość mikroskopowych obrazów w mikroskopie ESI/TEM jest zbliżona i wynosi około 0,2–0,5 nm (dla E_0 rzędu 100 keV).

— Wzmocnienie kontrastu obrazu zarówno ultracienkich, jak i grubych skrawków.

— Wykrywanie i lokalizacja pierwiastków w wydzielonych mikroobszarach próbki z rozdzielczością rzędu 5–10 nm.

Użyteczność metody ESI objawia się szczególnie w przypadku badania skrawków biologicznych o grubości 0,2–1 μm (tab. 2). Jak zauważono powyżej, oglądanie tak grubych skrawków w konwencjonalnym TEM jest niezwykle utrudnione i wiąże się ze znacznym spadkiem rozdzielczości i zaciemnieniem obrazu (HEZEL i BAUER 1985).

Tabela 2

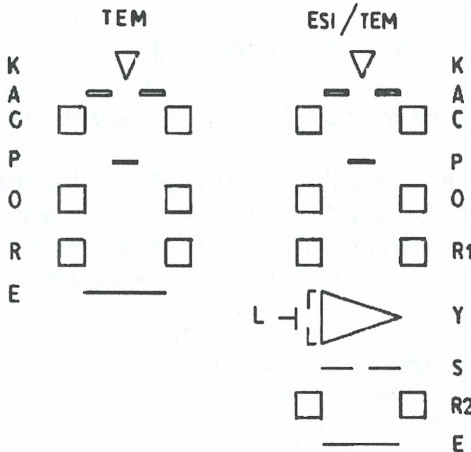
Wpływ napięcia przyspieszającego wiązkę elektronową na długość promienia dysku chromatycznego w skrawku biologicznym o grubości 0,75 μm . Przybliżenie dla strat energii elektronów, $dE = 250 \text{ eV}$ (HEZEL i BAUER 1985).

Rodzaj mikroskopu	Napięcie przyspieszające	Promień dysku chromatycznego
Konwencjonalny TEM	80–120 kV	25–30 nm
Wysokonapięciowy TEM	1000 kV	2 nm
ESI/TEM	80–120 kV	2–3 nm

W konwencjonalnym TEM efekt wzmocnienia kontrastu dla skrawków biologicznych uzyskuje się traktując je solami niektórych metali ciężkich. Wykorzystuje się w tym celu głównie sole ołowiu i uranu (REYNOLDS 1963). Metale ciężkie silnie rozpraszają elektrony i dlatego są doskonale widoczne w otoczeniu pierwiastków lekkich, stanowiących podstawową część materiału biologicznego. Posiadając względnie duże jądra atomowe, zwiększają prawdopodobieństwo rozproszeń elastycznych (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Wykazują one ponadto selektywne powinowactwo do niektórych składników komórki. Na przykład, czterotlenek osmu (OsO_4) wiąże się głównie z lipidami i ułatwia w ten sposób lokalizację struktur błoniastych w komórce. Metale ciężkie mają jednak tendencję do tworzenia agregatów, co ogranicza zdolność rozdzielczą w ujawnianiu struktur w ultracienkich skrawkach do około 1–2 nm (OTTENSMEYER i PEAR 1975). W mikroskopie ESI/TEM (mikroskop ten określa się również jako EF/TEM — energy filtering TEM) wzmocnienie kontrastu uzyskuje się bez traktowania materiału dodatkowymi związkami chemicznymi. Dzięki temu struktura badanego obiektu jest z pewnością bardziej wierna rzeczywistości.

Mikroskop ESI/TEM posiada identyczny plan budowy jak konwencjonalny TEM (rys. 4, HEZEL i BAUER 1985, DE BBRUIJN i współaut. 1993). Podstawowa różnica polega na tym, że ESI/TEM jest wyposażony w spektrometr do pomiaru strat energii elektronów. Jego głównymi elementami są: zwierciadło elektrostatyczne będące odmianą działa elektronowego i pryzmaty magnetyczne (OTTENSMEYER 1984). Najnowsze spektrometry strat energii elektronów, stosowane w TEM, nie posiadają zwierciadła elektrostatycznego, lecz są zbudowane z czterech

symetrycznie ułożonych pryzmatów magnetycznych (MAYER 1993). W tego typu spektrometr jest wyposażony między innymi mikroskop ZEISS 912 Omega.



Rys. 4. Porównanie budowy konwencjonalnego TEM oraz mikroskopu ESI/TEM. Schemat ESI/TEM odpowiada budowie mikroskopu ZEISS 902A.

K — katoda; A — anoda; C — soczewki kondensatora; P — preparat; O — soczewki obiektywu; R, R1, R2 — soczewki projektora; L — lustro elektrostatyczne; Y — pryzmat magnetyczny; S — energo-dyspersyjna szczelina; E — ekran.

riału ograniczającego szczelinę (JOY 1979). Elektronów, które przeszły przez szczelinę trafiają do drugiego układu soczewek projektora. Elektronów, docierających do drugiego układu soczewek projektora mają bardzo zbliżoną energię. W przypadku stosowania napięcia przyspieszającego $E_0 = 100$ keV, układ przepuszcza elektrony o energii $E_0 \pm 10$ eV (KOPF-MAIER 1991). Ostatecznie elektrony tworzą obraz padając na ekran, kliszę fotograficzną lub elektroniczny detektor (EGLE i współaut. 1984).

Mikroskop ESI/TEM może pracować w trzech podstawowych trybach (rys. 5, EGLE i współaut. 1984). W przypadku, gdy nie ma energo-selektywnej szczeliny uzyskuje się tak zwany obraz całkowity (ang. global image). Jest on odpowiednikiem obrazu uzyskiwanego w konwencjonalnym TEM (HEZEL i BAUER 1985).

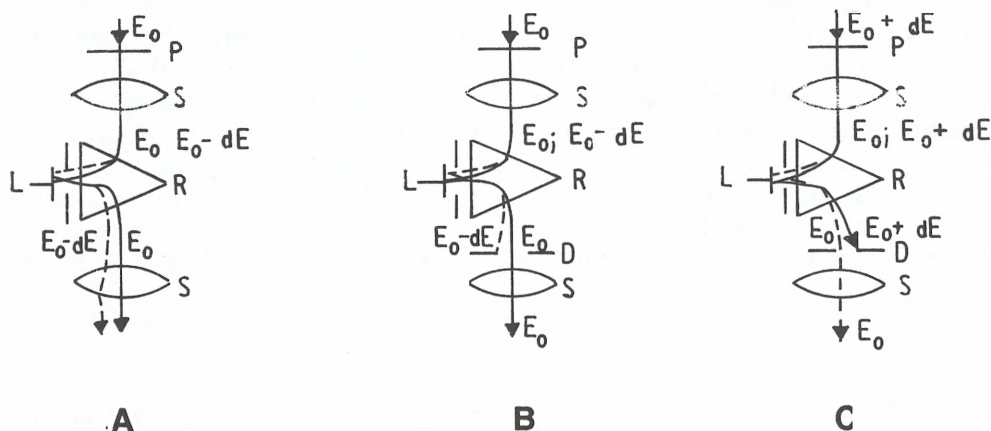
W przypadku, gdy przez szczelinę przechodzą elektrony o energii zgodnej z energią wiązki pierwotnej E_0 , uzyskuje się obraz dzięki elektronom rozproszonym elastycznie (ang. elastic image). Z uwagi na to, że wielkość strat energii elektronów dE jest zbliżona do zera, ten tryb pracy ESI/TEM określa się jako ESI w $dE = 0$ (EGLE i współaut. 1984).

Trzecim możliwym trybem pracy ESI/TEM jest realizacja ESI dla elektronów charakteryzujących się stratami energii $dE > 0$. W tym przypadku przez energo-selektywne szczelinę przechodzą elektrony rozproszone nieelastycznie (EGLE i współaut. 1984). Nie są to jednak wszystkie elektrony rozpraszane nieelasty-

W pryzmatach jest wytwarzane pole magnetyczne odchylające strumień elektronów pod kątem zależnym od ich energii. Elektrony rozproszone elastycznie są odchylane dokładnie pod kątem 90 stopni, natomiast nieelastyczne pod kątem większym (JOY 1979). Spektrometr jest umieszczony w mikroskopie pomiędzy dwoma układami soczewek projektora (rys. 4b).

Bieg elektronów w ESI/TEM jest analogiczny do ich biegu w konwencjonalnym TEM aż do poziomu pierwszego układu soczewek projektora. Następnie jednak elektrony wchodzą w obszar pierwszego pryzmatu magnetycznego. Po odbiciu od zwierciadła elektrostatycznego i wyjściu z obszaru drugiego pryzmatu tworzą wiązkę rozbieżną. Z tego właśnie powodu przez energo-selektywną szczelinę przechodzi tylko pewien fragment tej wiązki, zawierający elektrony o określonej energii. Pozostała część elektronów jest absorbowana i odbijana od materiału

cznie, lecz o ściśle wybranej wartości strat energii (np. elektrony o $dE = 280 \pm 10$ eV). Mikroskop ESI/TEM jest tak zbudowany, że dzięki nim (tzn. elektrony ze stratą energii, $E_0 - 280$ eV) jest formowany obraz mikroskopowy (ang. inelastic image). Jest to zawsze obraz w ciemnym polu (JOY 1979). Oznacza to, że struktury będące jasne w konwencjonalnym TEM i w ESI/TEM dla $dE = 0$ tutaj są ciemne i *vice versa*.



Rys. 5. Możliwe tryby pracy mikroskopu ESI/TEM (EGLE i współaut. 1984).

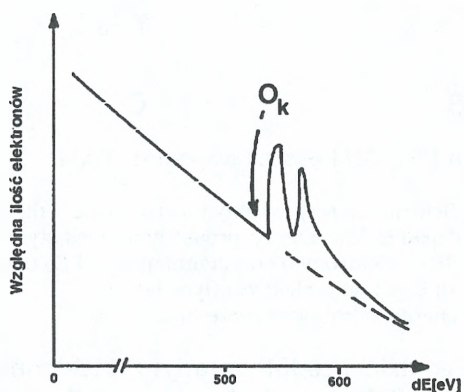
A — obraz całkowity; B — obraz powstający dzięki elektronom rozproszonym elastycznie i nierozproszonym (ESI dla $dE = 0$) C — obraz powstający dzięki elektronom rozproszonym nieelastycznie (ESI dla $dE > 0$). E_0 — elektrony o energii E_0 ; $E_0 - dE$ — elektrony o energii mniejszej od E_0 o wartość dE ; P — preparat; S — soczewki; L — lustro elektrostatyczne; R — pryzmat magnetyczny; D — energo-selektywna szczelina.

Bardzo ważną cechą obrazu tworzonego dzięki „odfiltrowanym” elektronom nieelastycznym rozproszonym w wyniku oddziaływań nieelastycznych jest jego specyficzność względem niektórych pierwiastków (OTTENSMEYER i ANDREW 1980, SHUMAN i SOMLYO 1987, BAUER 1988). Jak zaznaczono wcześniej rozproszenia nieelastyczne dokonują się w wyniku oddziaływań elektrostatycznych elektronów wiązki pierwotnej z elektronami wewnątrz atomów próbki. Niektóre z tych oddziaływań prowadzą do wzbudzenia elektronów z powłok wewnętrznych (K, L, względnie M) i jonizacji tych atomów. Poszczególne powłoki różnych pierwiastków posiadają charakterystyczne dla siebie energie jonizacji (BIELAŃSKI 1987). Przez energię jonizacji rozumie się minimalną energię, jaką należy dostarczyć elektronowi, ażeby wyrwać go z danej powłoki na powłokę o wyższej energii. Na przykład energie jonizacji powłoki K (dla orbitalu $1s$) węgla, azotu i tlenu wynoszą odpowiednio: C — 280 eV; N — 400 eV i O — 530 eV.

Zatem przykładowo w wyniku oddziaływania elektronu wiązki pierwotnej o energii $E_0 = 100$ keV z elektronem powłoki $1s$ atomu tlenu dochodzi do przekazania energii i jonizacji tego atomu. Wzbudzony z powłoki $1s$ elektron posiada energię równą 530 eV, która odpowiada energii jonizacji tej powłoki atomu tlenu. Natomiast zgodnie z zasadą zachowania energii, energia elektronu wiązki pierwotnej w wyniku oddziaływania i przekazania energii na wzbudzenie atomu tlenu maleje i po zderzeniu jest równa $E_0 - dE$ (czyli 100 keV $- 530$ eV).

Jeżeli spektrometr mikroskopowy ESI/TEM będzie „nastawiony” na przepuszczanie elektronów o energii $E_0 - 530$ eV (straty energii elektronów dE), uzyskamy obraz rozmieszczenia tlenu w oglądanym fragmencie próbki. W celu wyeliminowania tła obrazu od uzyskanego kontrastu obrazu odejmuje się zwykle kontrast obrazu uzyskany dla elektronów o nieco mniejszych stratach energii (w tym przypadku np. dla $dE = 500$ eV). Jest to możliwe dzięki zastosowaniu we współczesnych TEM numerycznych obliczeń z wykorzystaniem komputerów klasy PC, wykorzystywanych do obróbki i przechowywania uzyskiwanych obliczeń i obrazów (DRECHSLER i CANTOW 1991, BOWLING i współaut. 1992).

Gdy zatem elektrony wiązki pierwotnej przechodzą przez obszary o dużym stężeniu atomów tlenu, widmo rozkładu strat energii elektronów przybierze postać pokazaną na rysunku 6 z charakterystycznym dla powłoki K tlenu progiem jonizacji (tzw. pik O_K). Subtelna struktura widma progu jonizacji wynika z faktu, że elektrony w obrębie powłoki K znajdują się zarówno na orbitalu $1s$, jak i $1p$, które różnią się minimalnie energią jonizacji (BIELAŃSKI 1987).



Rys. 6. Rozkład strat energii elektronów wiązki mikroskopowej w obszarze o dużej zawartości atomów tlenu. Strzałka wskazuje próg jonizacji powłoki K atomu tlenu, korelujący z jej energią jonizacji. Linia przerywaną zaznaczono teoretyczny przebieg krzywej przy braku atomów tlenu. Powyższy schemat jest uproszczeniem. Oryginalne widma posiadają charakterystyczną strukturę subtelną.

Wielkość analizowanego obszaru jest uwarunkowana średnicą stosowanej wiązki elektronowej (ISAACSON 1977).

ESI/EELS jest metodą o bardzo wysokiej czułości. Umożliwia ona wykrycie w objętości kilkuset nm^3 próbki, kilkuset, a nawet kilkudziesięciu atomów analizowanego pierwiastka (KRIVANEK 1991). Na przykład dla fosforu szacuje się, że minimalna ilość wykrywanych atomów wynosi 25 (LEAPMAN i ANDREWS 1992). Bezwzględna czułość metody sięga do 10^{-21} g masy analizowanego obszaru.

Powierzchnia pod progiem jonizacji (tak zwany pik O_K) świadczy natomiast o liczbie atomów tlenu w badanym obszarze i stanowi podstawę pomiarów ilościowych (SORBER i współaut. 1991, DE BRUIJN i współaut. 1993). W celu wykonania takich pomiarów należy porównać otrzymane widmo z widmem standardu o znanej zawartości badanego pierwiastka. Wiarygodna analiza ilościowa skrawków biologicznych wymaga jednak zastosowania mroźniowych technik ich preparowania, w celu zmniejszenia dyfuzji oznaczanych pierwiastków w czasie przygotowywania preparatów (KRIVANEK 1991).

Technika ESI/TEM dla elektronów o $dE > 0$ jest zatem analityczną metodą określania jakościowego i ilościowego składu pierwiastkowego próbki. Ogólna analiza strat energii elektronów określa się terminem spektroskopii strat energii elektronów (ang. EELS — electron energy loss spectroscopy).

Warunkiem koniecznym dla analizy pierwiastków jest jednakże stosowanie skrawków o grubości nie przekraczającej 50 nm. W skrawkach grubszych efekt wielokrotnego rozpraszania elektronów wiązki pierwotnej powoduje zniekształcenie otrzymywanych wyników pomiaru (ANDREWS i LEAPMAN 1993).

Generalnie mikroskopy ESI/TEM wykorzystuje się nie tylko do badania preparatów biologicznych, lecz także wszelkich innych próbek ciała stałego, takich jak kryształy, polimery czy próbki geologiczne (MAYER 1993). Metoda ESI/EELS jest przydatna natomiast w szczególności do badań materiałów biologicznych, ponieważ pozwala na wykrywanie z bardzo wysoką czułością pierwiastki lekkie (EGLE i współaut. 1984, SHUMAN i SOMLYO 1987). Metodą tą można wykrywać również metale ciężkie, ale wówczas podstawą analizy są wartości energii progów jonizacji powłok dalej położonych od jądra, na przykład powłoki L lub M. Inne metody analityczne na poziomie mikroskopu elektronowego, takie jak, na przykład, mikroanaliza rentgenowska, charakteryzują się mniejszą czułością i znacznie mniejszą rozdzielczością energetyczną w zakresie analizy pierwiastków lekkich (BUTOWT i BEDNARSKA 1993).

Metodą ESI/EELS są wykrywane pierwiastki, których energie jonizacji elektronów z powłok wewnętrznych nie przekraczają 2000 eV (DE BRUIJN i współaut. 1993). Uzyskuje się widma strat energii analogiczne do widm pokazanych na rysunku 6, otrzymanych z rozdzielczością energetyczną rzędu 1–2 eV. Inną formą informacji otrzymywanych z wykorzystaniem ESI/TEM jest otrzymanie obrazu mikroskopowego, powstającego dzięki elektronom o określonej wartości strat energii. Obrazy takie są mapami rozkładu określonego pierwiastka w objętości badanej próbki (KOPF-MAIER 1991).

PODSUMOWANIE

Obrazy mikroskopowe powstają w wyniku oddziaływania elektronów wiązki pierwotnej z badanym materiałem i z soczewkami mikroskopu. Od momentu powstania pierwszego mikroskopu elektronowego wprowadza się rozmaite rozwiązania techniczne, mające na celu zmniejszenie wpływu aberracji soczewek elektromagnetycznych na jakość powstającego obrazu. Za jakość obrazu są odpowiedzialne przede wszystkim dwa jego parametry: zdolność rozdzielcza i kontrast obrazu w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Szczególne problemy w tym zakresie stwarzają preparaty biologiczne, ponieważ w większości wypadków są amorficzne i składają się głównie z lekkich, słabo rozpraszających elektrony pierwiastków. Ponadto jakość obrazu próbek biologicznych pogarsza się z biegiem czasu, gdyż są one niezwykle wrażliwe na bombardowanie wiązką elektronową.

W konwencjonalnym TEM, stosuje się bardzo małe średnice przysłon obrazowych obiektywu. Wtedy są przepuszczane tylko przyosiowe składowe wiązki. Dzięki temu uzyskuje się obrazy mikroskopowe z lepszą zdolnością rozdzielczą.

Najnowszym rozwiązaniem w dziedzinie badań materiałów biologicznych było wprowadzenie systemu filtrowania energii elektronów ESI. W systemie tym spektrometr ESI działa analogicznie jak filtr w mikroskopie świetlnym, rozdzielając elektrony o różnej energii i przepuszczając na ekran lub do detektora

elektrony o określonej wybranej energii. Dzięki temu mikroskopowe obrazy preparatów biologicznych są otrzymywane z lepszą rozdzielczością, lepszy jest również kontrast otrzymywanych obrazów rozkładu chemicznego pierwiastków w badanej próbce. Jest to istotne dla skrawków biologicznych, gdyż stwarza możliwość wyeliminowania z procedury ich przygotowywania etapu wysycania solami metali ciężkich i umożliwia oglądanie skrawków grubszych od 100 nm.

Zastosowanie techniki ESI/TEM ($dE > 0$) do badań materiałów biologicznych umożliwia wykonanie ilościowej analizy składu pierwiastkowego wybranych mikroobszarów próbki i jej struktury. Bezwzględna czułość pomiarów jest bardzo wysoka i sięga 10^{-19} – 10^{-21} g analizowanego pierwiastka. Metoda ta jest przystosowana przede wszystkim do analizy pierwiastków o małej i średniej masie atomowej i z tego względu jest szczególnie przydatna dla materiału biologicznego.

Współczesne mikroskopy ESI/TEM są urządzeniami w pełni skomputeryzowanymi. Umożliwia to między innymi zatrzymywanie otrzymywanych obrazów w pamięci komputera i późniejszą ich dodatkową obróbkę.

Autor pragnie wyrazić szczerze podziękowanie Pani Doktor Elżbiecie Mizerze z Instytutu Fizyki PAN w Warszawie za pomoc okazaną w trakcie pisania niniejszej pracy.

ELECTRON ENERGY FILTRATION — A NEW TECHNIQUE FOR IMPROVING THE IMAGE IN TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE (TEM)

Summary

The paper describes the basis of the Electron Spectroscopic Imaging (ESI) technique, which is a relatively new method of improving the resolution and contrast of the biological image in TEM. In addition, the ESI is a highly sensitive method for the elemental analysis of samples in TEM. The usefulness of the method for studying biological samples is discussed.

LITERATURA

- ANDREWS S. B., LEAPMAN R. D., 1993. *Biological scanning transmission electron microscopy*. Eur. Micr. Anal. 24, 21–24.
- BAUER R., 1988. *Electron spectroscopic imaging: an advanced technique for imaging and analysis in transmission electron microscopy*. [W:] F. MEYER (red.), Academic Press, 20, 133–146.
- BIELAŃSKI A., 1987. *Podstawy chemii nieorganicznej*. PWN Warszawa, 275–276.
- BOWLING C. D., TRYKA A. F., CASBY A. P., COX W. E., VAN DEVANTER S. H., 1992. *A computer aided approach to electron energy loss spectroscopy and imaging*. Comput. Methods. Programs. Biomed. 38(1), 1–10.
- BUTOWT R., BEDNARSKA E., 1993. *Metoda mikroanalizy rentgenowskiej w badaniach biologicznych*. Post. Biol. Kom. 4, 403–420.
- CASTAING R., HENRY L., 1962. *C. R. Sci. Paris B*, 255, 76–86.
- DE BRUIJN W. C., SORBER C. W. J., GELSEMA E. S., BECKERS A. L. D., JONGKIND J. F., 1993. *Energy-filtering transmission electron microscopy of biological specimens*. Scann. Microsc. 7(2), 693–709.
- DELONG A., HLADIL K., KOLARIK V., 1994. *A low voltage transmission electron microscope*. Eur. Microsc. Anal. 27, 13–16.
- DRECHSLER M., CANTOW H. J., 1991. *EELS data acquisition, processing and display for the Zeiss CEM 902 based on Lotus 1-2-3: Application examples from a biological system and inorganic transition metal compounds*. J. Microsc. 162(1), 61–76.

- EGLER W., KURZ D., DILK A., 1984. *The TEM 902, a new analytical TEM for ESI and EELS*. Mag. for Electron Microsc. Opton Information, 3-7.
- HERMAN K. -H., 1983. *Instrumental requirements for high resolution imaging*. J. Microsc. 131(1), 67-79.
- HEZEL U. B., BAUER R., 1985. *Opton EM 902, the new TEM with Integrated Imaging Electron Energy Spectrometer*. Opton Product Information, 1-12.
- HUTCHISON J. L., 1990. *400 kilovolt high resolution electron microscopy of semiconductors: the current state of the art*. Jeol News, 28(1), 4-7.
- HUTCHISON J. L., 1994. *Seeing atoms in and around crystals*. Eur. Microsc. Anal. 28, 9-12.
- ISAACSON M. S., 1977. *Specimen damage in the electron microscope*. [W:] *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. M. A. HAYAT (red.). Van Nostrand-Reinhold New York, 1-78.
- JOY D. C., 1979. *The basic principles of electron energy loss spectroscopy*. [W:] *Introduction to Analytical Electron Microscopy*. J. J. HREN, J. I. GOLDSTEIN, D. C. JOY (red.). Plenum Press, New York.
- KOPF-MAIER P., 1991. *Electron spectroscopic imaging — a new method for analysing the distribution of light element in mammalian cells and tissues*. Acta Histochem. 91(1), 25-37.
- KRIVANEK O. L., 1991. *EELS quantification near the single atom level*. Microsc. Microanal. Microstruct. 2, 257-267.
- LEAPMAN R. D., ANDREWS S. B. 1992. *Characterization of biological macromolecules by combined mass mapping and electron-energy loss spectroscopy*. J. Microsc. 165(Pt2), 225-238.
- MANNELLA C. A., RATKOWSKI A. J., 1983. *Adaptation of high-voltage electron microscope for routine biological dark-field imaging*. Ultramicrosc. 11, 21-35.
- MAYER J., 1993. *Applications of energy-filtering TEM in material science*. Eur. Microsc. Anal. 25, 21-23.
- MEEK G. A., 1976. *Practical Electron Microscopy For Biologists*. John Wiley & Sons Inc.
- OTTENMEYER F. P., PEAR M., 1975. *Contrast in unstained sections: a comparison of bright and dark field electron microscopy*. J. Ultrastruct. Res. 51, 253-260.
- OTTENMEYER F. P., ANDREW J. W., 1980. *High resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopy imaging*. J. Ultrastruct. Res. 72, 336-348.
- OTTENMEYER F. P., 1984. *Electron spectroscopic imaging: parallel energy filtering and microanalysis*. J. Ultrastruct. Res. 88, 121-134.
- REYNOLDS E. S., 1963. *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy*. J. Cell Biol. 17, 208-212.
- SHUMAN H., SOMLYO A. P., 1987. *Electron energy loss analysis of near-trace elemental concentrations of calcium*. Ultramicrosc. 21, 23-32.
- SLAYTER E. M., SLAYTER H. S., 1993. *Light and Electron Microscopy*. Cambridge University Press.
- Sokołowski J., PLUTA B., NOSIŁA M., 1980. *Elektronowy mikroskop skaningowy*. Dział Wydawnictw Pol. Śląskiej, 8-17.
- SORBER C. W. J., KETELAARS G. A. M., GELSEMA E. S., JONGKIND J. F., DE BRUIJN W. C., 1991. *Quantitative analysis of electron energy loss spectra from ultrathin-sectioned biological material*. J. Microsc. 162(Pt1), 61-76.
- TREBBIA P., MORY C., 1990. *EELS elemental mapping with unconventional methods. II Applications to biological specimens*. Ultramicrosc. 34, 179-203.