
Nowe możliwości obrazowania mikroskopowego w Centrum Dobrostanu i Zdrowia Zwierząt

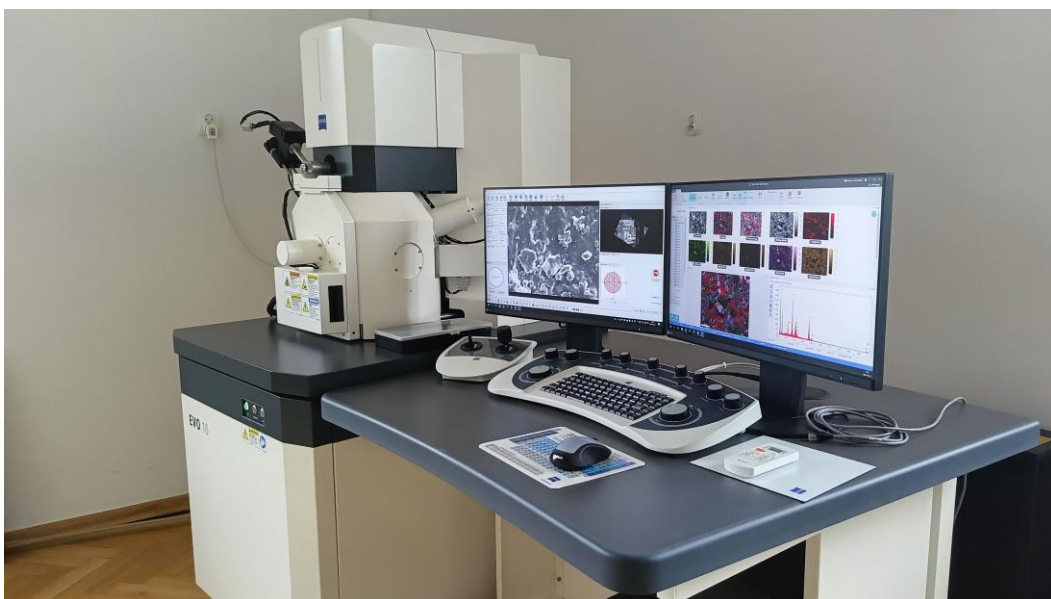


mgr inż. Marcin Kujawa

*Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*



MIKROSKOP ELEKTRONOWY SKANINGOWY SEM (*Scanning Electron Microscope*)



ZEISS EVO 10 (*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*)

OBRAZOWANIE

- analiza powierzchni próbki
- informacje o topografii powierzchni i składzie próbki

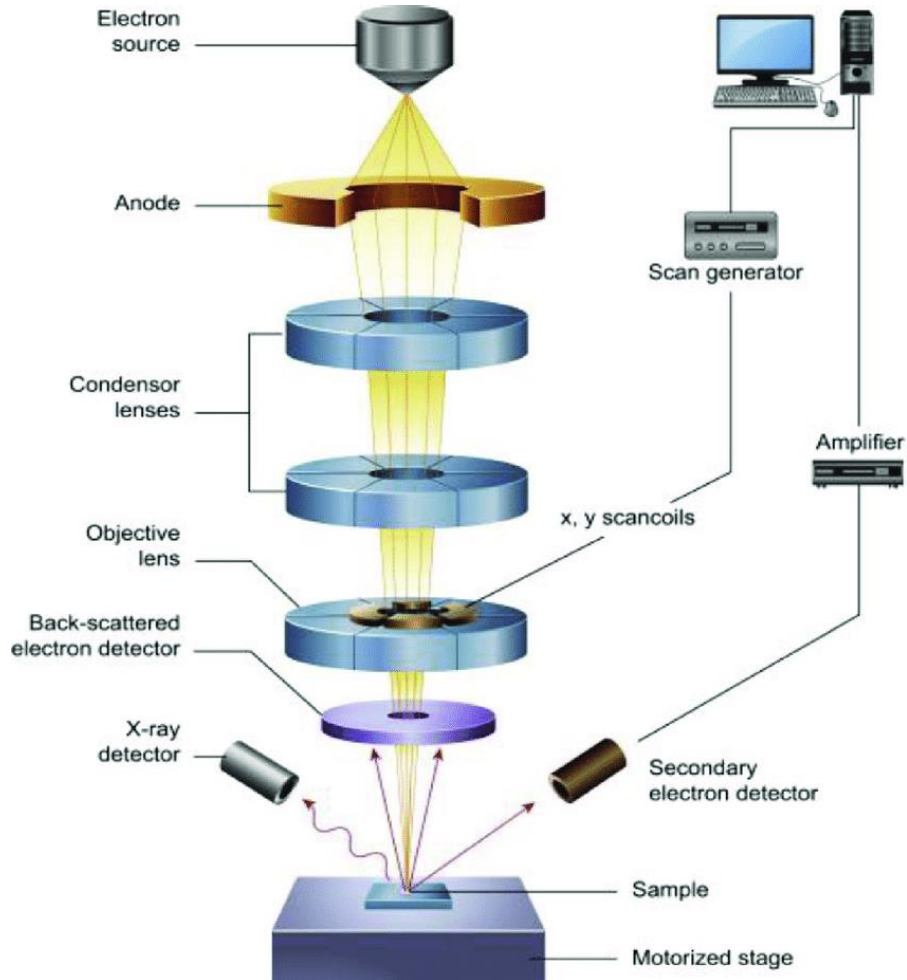
ZASTOSOWANIE

- inżynieria materiałowa
- biologia i medycyna
- technika śledcza

MOŻLIWOŚCI

- powiększenie od 50x do 500000x
- rozdzielczość do 3nm

SCHEMAT SEM



ŹRÓDŁO ELEKTRONÓW

- działo wolframowe
- działo LaB_6 (*heksaborek lantanu*)
- emisja polowa (*Field Emission Gun*)

TRYB PRACY

- wysoka próżnia HV (*High Vacuum*)
- zmienna próżnia VP (*Various Pressure*)

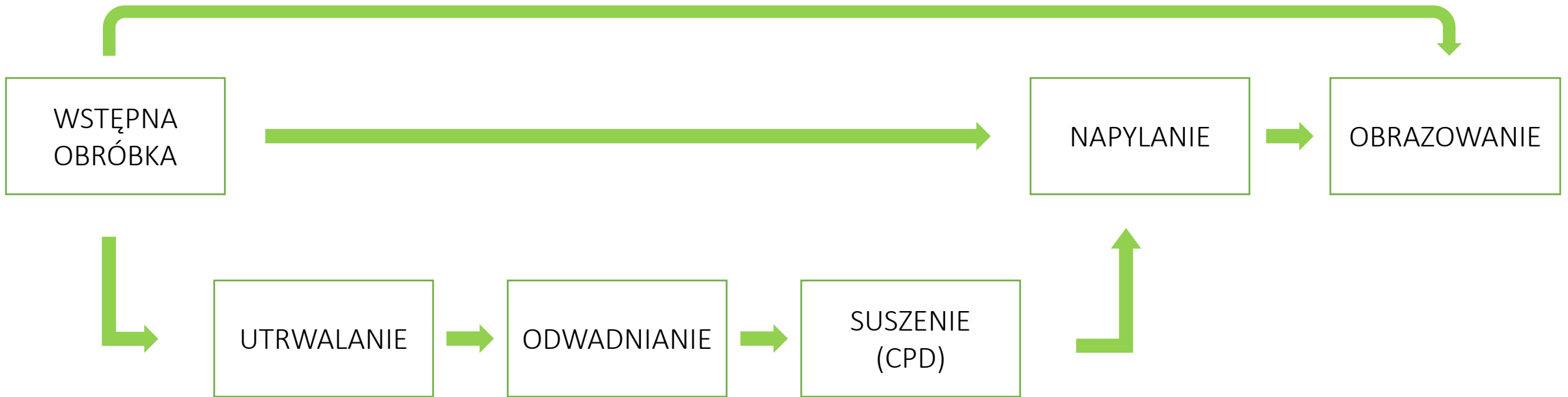
CO MOŻEMY OGLĄDAĆ/OBRAZOWAĆ W SEM ?

- **wszystko**, ale...pod pewnymi warunkami

~~WODA~~

PRZEWODNICTWO
ELEKTRYCZNE ✓

DROGA PRÓBKII DO MIKROSKOPU



WSTĘPNA OBRÓBKA / FORMOWANIE

Standardowy stolik (szer. 12 mm)



- nałożenie na stolik możliwie jak najmniejszej ilości materiału
- możliwe dopasowanie próbki do szerokości stolika
- możliwie jak najmniejsza wysokość próbki
- możliwie jak największa powierzchnia styku materiału ze stolikiem (naklejką węglową)

Stoliki specjalne



Potrzebna ilość materiału

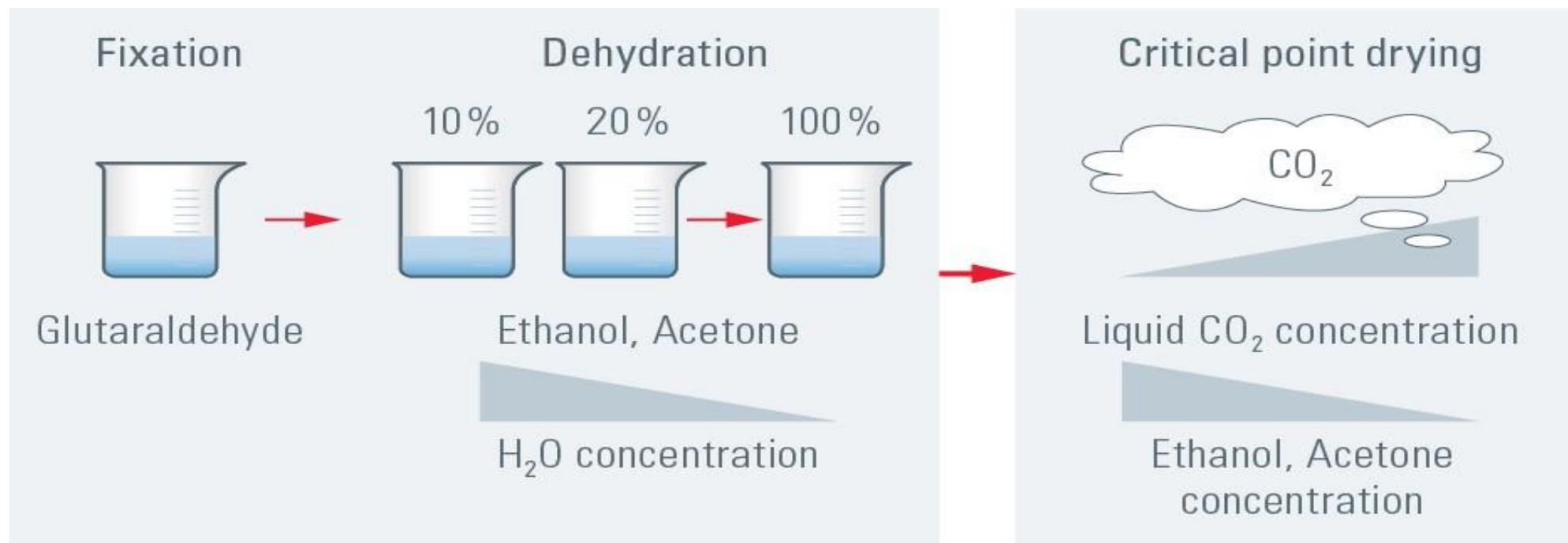
Materiał sypki



Zawiesiny



UTRWALANIE – ODWADNIANIE – SUSZENIE (CPD)



Wzmocnienie struktury materiału

Konieczne ze względu na warunki panujące w komorze mikroskopu

Punkt krytyczny – w odpowiednich warunkach ciśnienia i temperatury medium znajduje się w stanie ciekłym i gazowym.

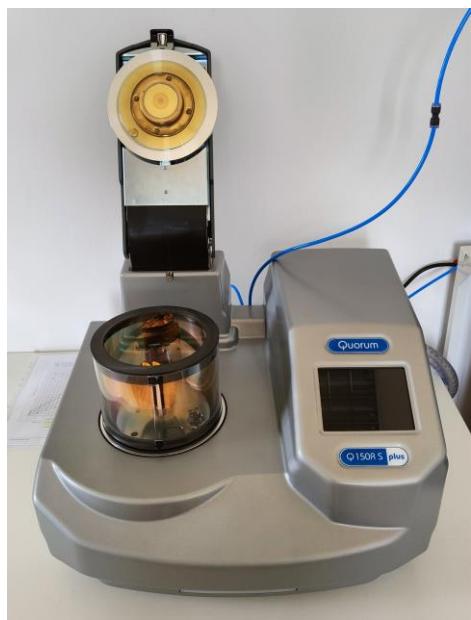
Brak napięcia powierzchniowego - zachowanie struktury.

Punkt krytyczny dla H₂O: 374°C | 22,2 MPa;
CO₂: 35°C | 8,2 MPa

NAPYLANIE PREPARATÓW

- konieczne dla materiałów nie będących przewodnikami. Zapobiega efektowi ładowania (odprowadzenie ładunku – uziemienie)
- ochrona preparatów czułych na działanie strumienia elektronów
- zapewnia wzrost stosunku sygnału do szumu (obrazy lepszej jakości)

NAPYLARKA



Napylarka Quorum Q150R Plus (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu)

NAPYLONE PREPARATY



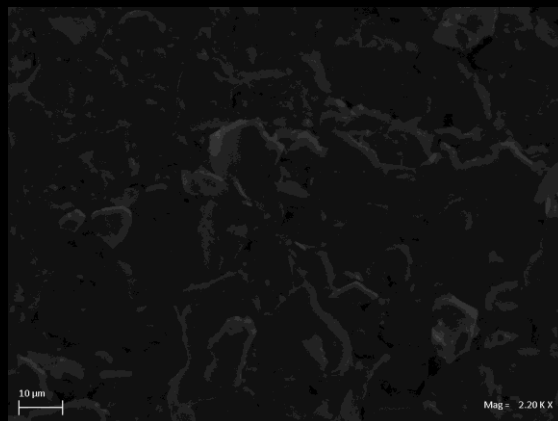
NAPYLANIE W PRAKTYCE

próbka gumy

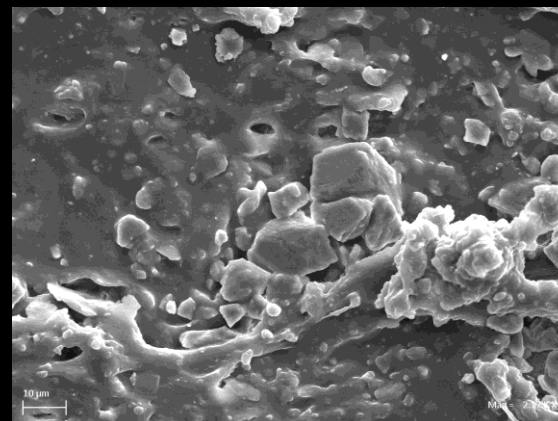
Brak napylenia



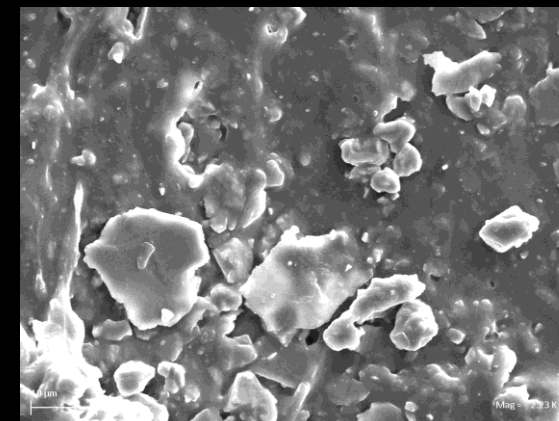
60 sek., 20 mA



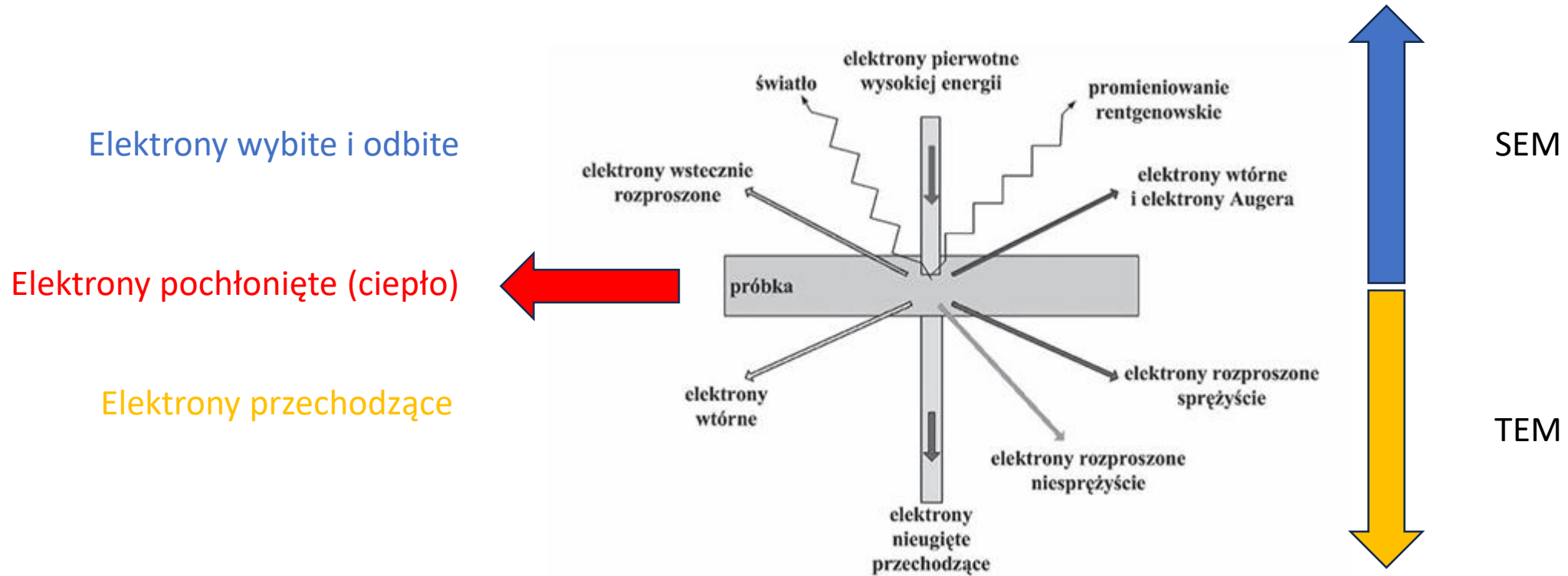
120 sek., 20 mA



60 sek., 25 mA

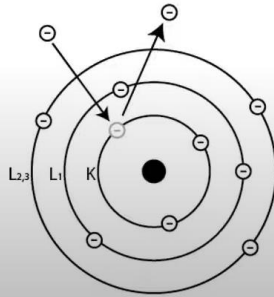


ODDZIAŁYWANIE ELEKTRONU Z MATERIAŁĄ (na przykładzie cienkiej próbki folii)



RODZAJE ELEKTRONÓW TWORZĄCYCH OBRAZ W SEM

TOPOGRAFIA



1 nm

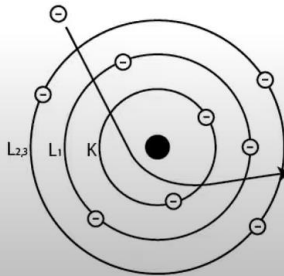
SE (*Secondary electrons*)

Elektrony wtórne o niskiej energii (<50 eV) wybite z atomów znajdujących się na powierzchni próbki. Duża ilość. Większości to one formują obraz SEM.

30 nm

TOPOGRAFIA

KONTRAST
MATERIAŁOWY

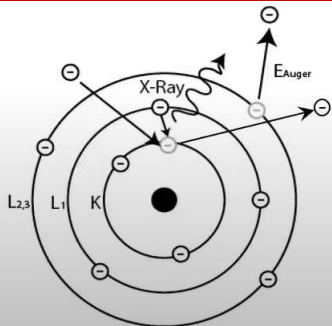


100 nm

BSE (*Backscattered electrons*)

Wysokoenergetyczne (>50 eV) elektrony pierwotne ulegające odbiciu sprężystemu od jąder atomowych próbki. Mniejsza ilość. Zdolność odbijania elektronów przez atomy pierwiastków w znacznym stopniu uzależniona jest od liczby atomowej (Z) i wraz z jej wzrostem rośnie.

ANALIZA
PIERWIASTKOWA

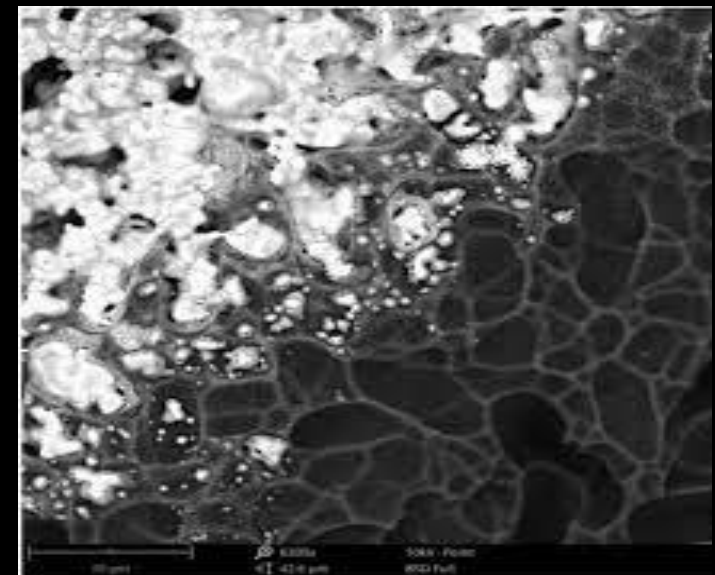
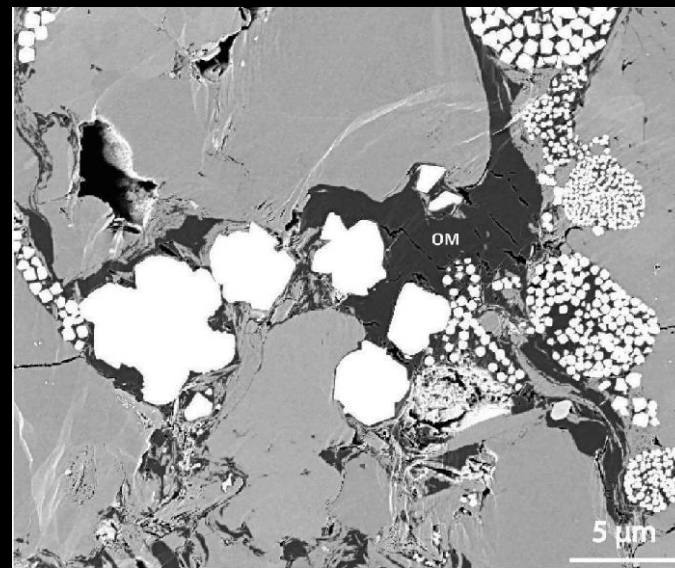
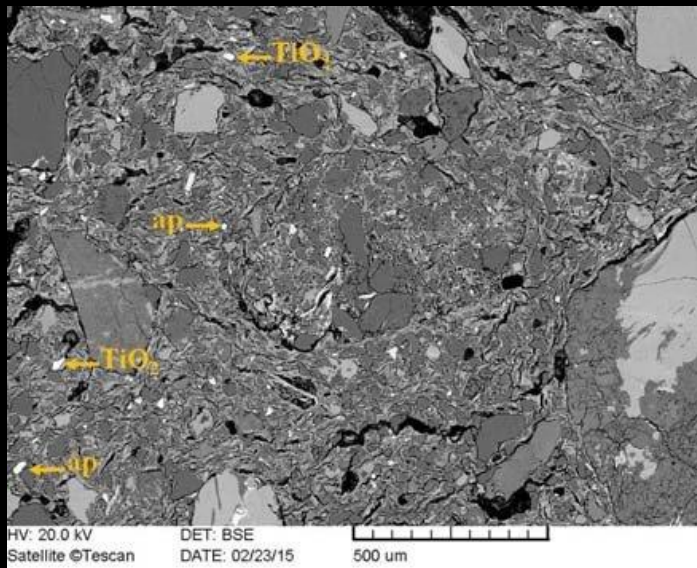
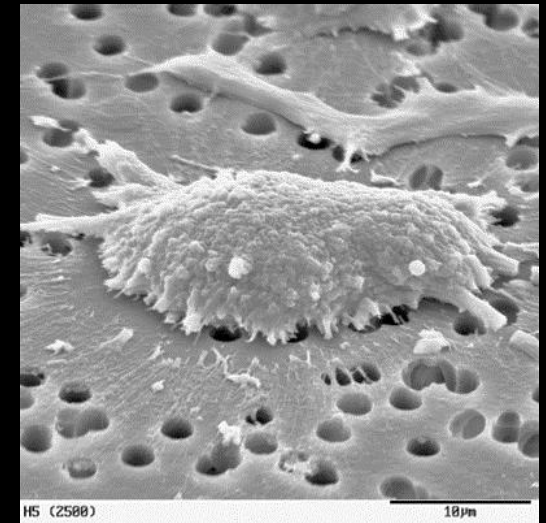
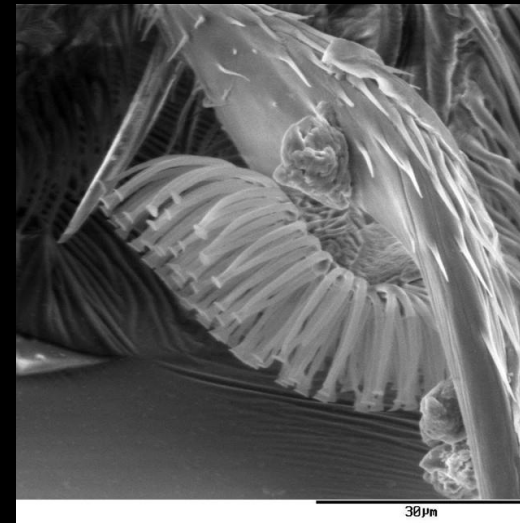
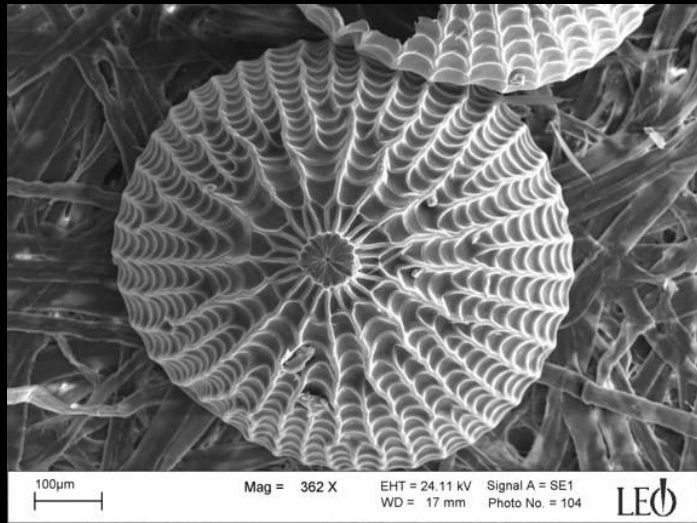


1000 nm

Promieniowanie X (*EDS*)

Pierwotna wiązka elektronów wybija elektrony z wewnętrznej powłoki (K, L, M) atomu próbki. Powstałe wolne miejsca po wybitym elektronie zajmowane jest przez elektron z powłoki o wyższej energii. Różnica energii elektronów powoduje powstanie charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego

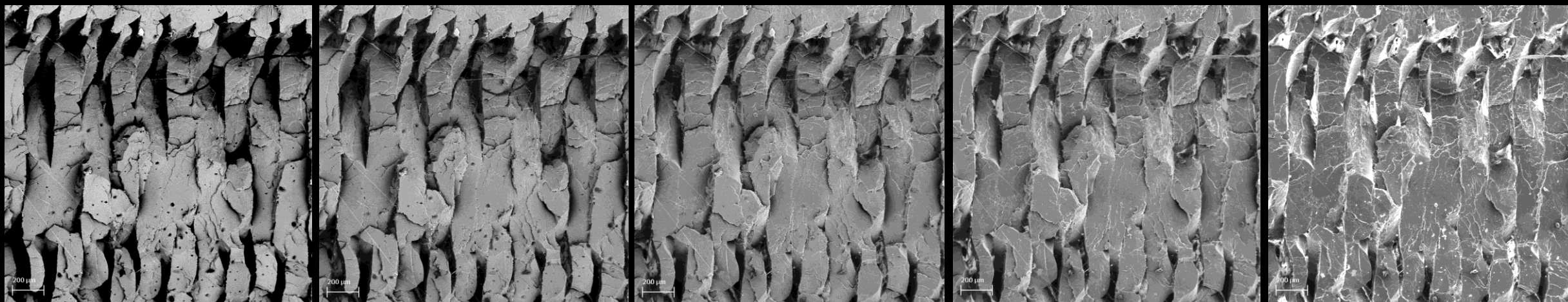
PRZYKŁADOWE ZDJĘCIA SE I BSE



MIX z detektorów BSE I SE
(przełom tworzywa sztucznego)

100 % BSE

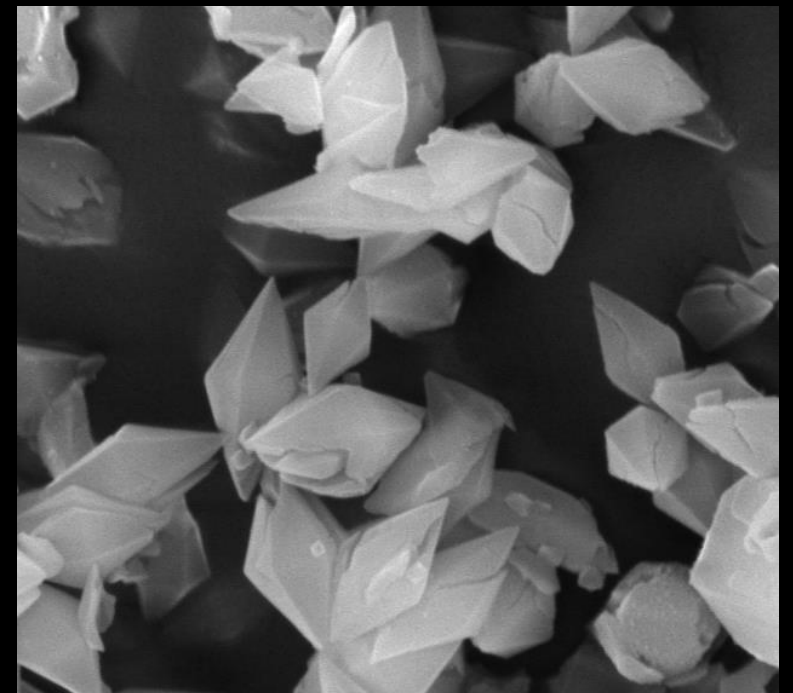
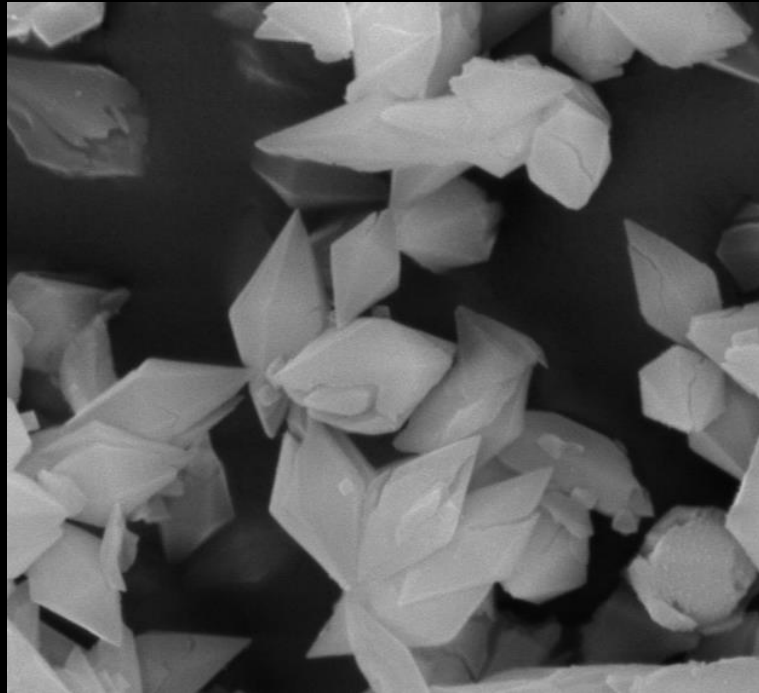
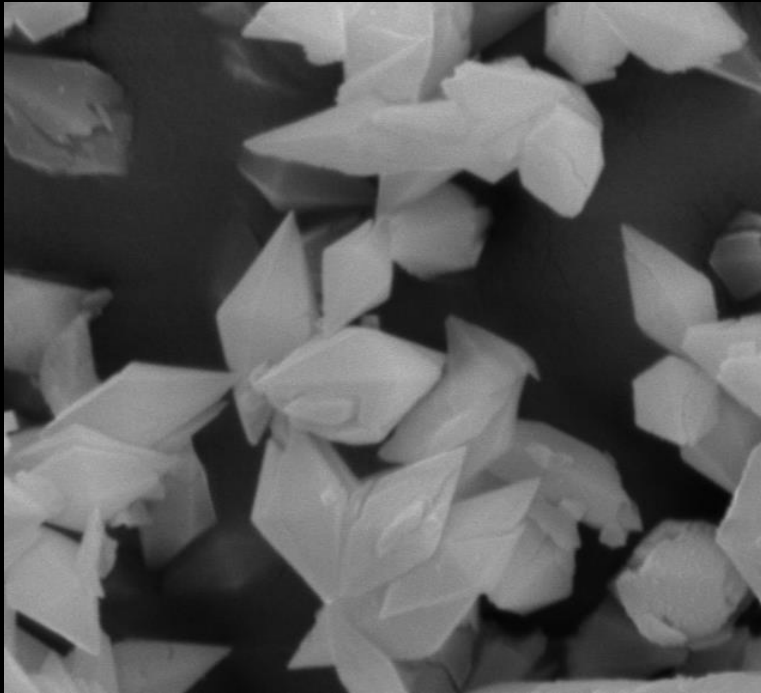
100% SE



ROZDZIELCZOŚĆ A NAPIĘCIE PRZYSPIESZAJACE (EHT)
(powiększenie 20000 x)

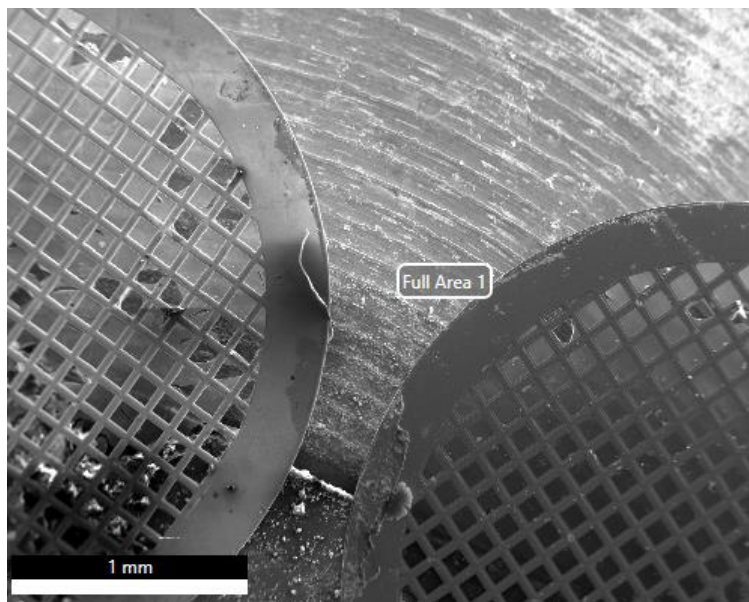
EHT 10 kV

EHT 20 kV

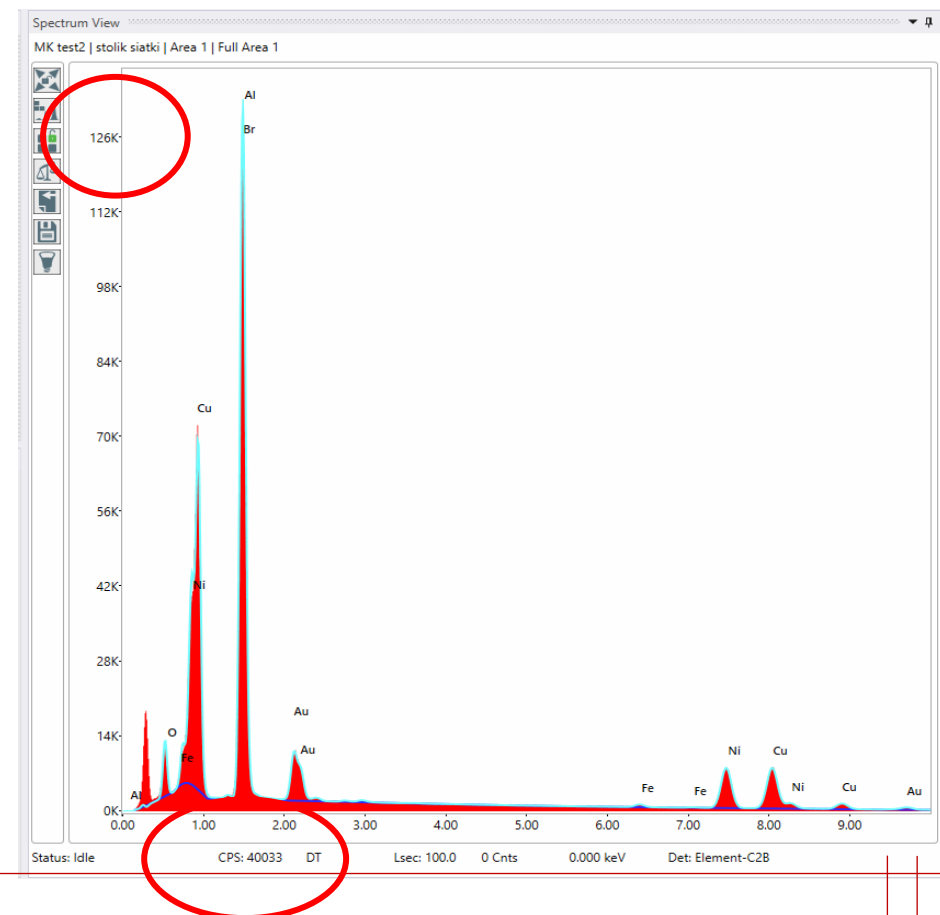


EDS (electron dispersive spectroscopy) Analiza jakościowa składu

- każdy pierwiastek emituje charakterystyczne promieniowanie X wyrażone w keV dla każdej z powłok elektronowych (K, L, M)
- aby wzbudzić promieniowanie X o określonej wartości należy dostarczyć 2,5x wyższą energię wiązki elektronów pierwotnych (np. EHT 10kV wzbudzi pierwiastki do max. wartości 4 keV)
- rozdzielczość analizy w zakresie od 0,125 – 0,132 keV
- konieczność zebrania jak największej ilości zliczeń CPS (możliwie ok. 1 mln)

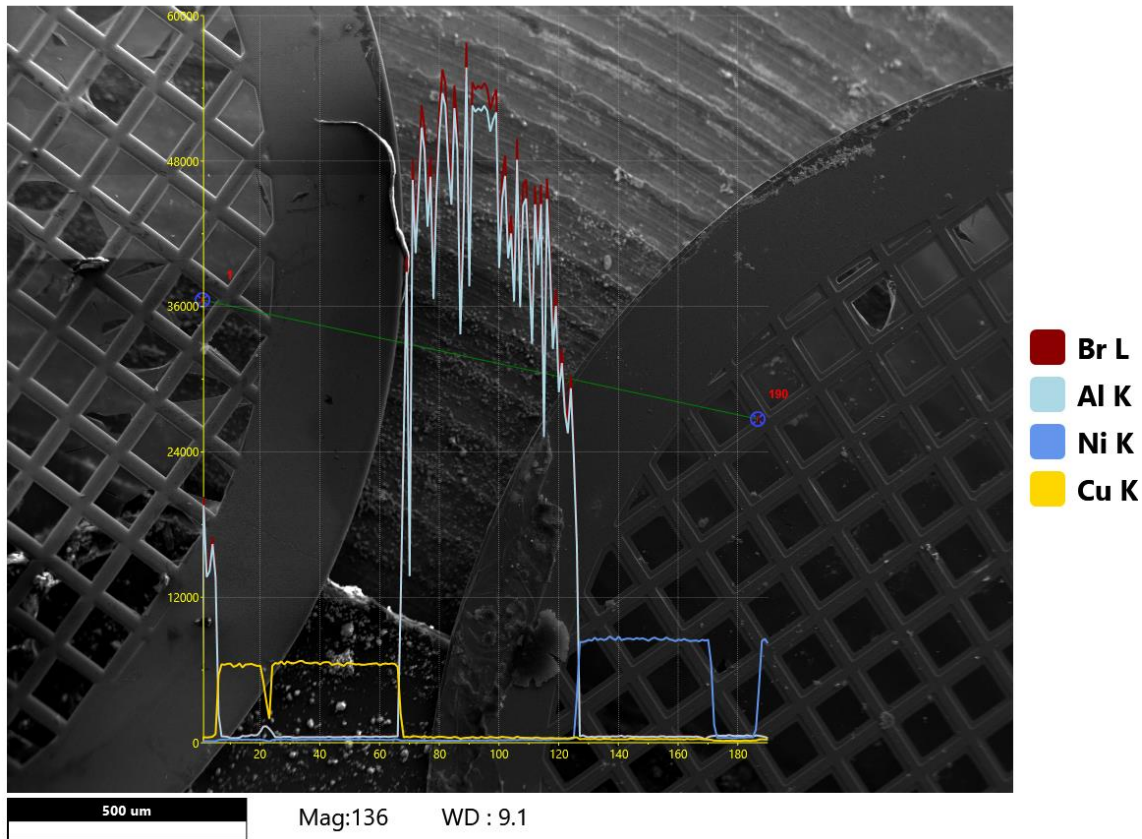


28	58.70	29	63.546	13	26.982	35	79.904
Ni		Cu		Al		Br	
Nickel		Copper		Aluminum		Bromine	
7.477		8.040		1.486		11.922	
0.851		0.930		0.073		1.480	

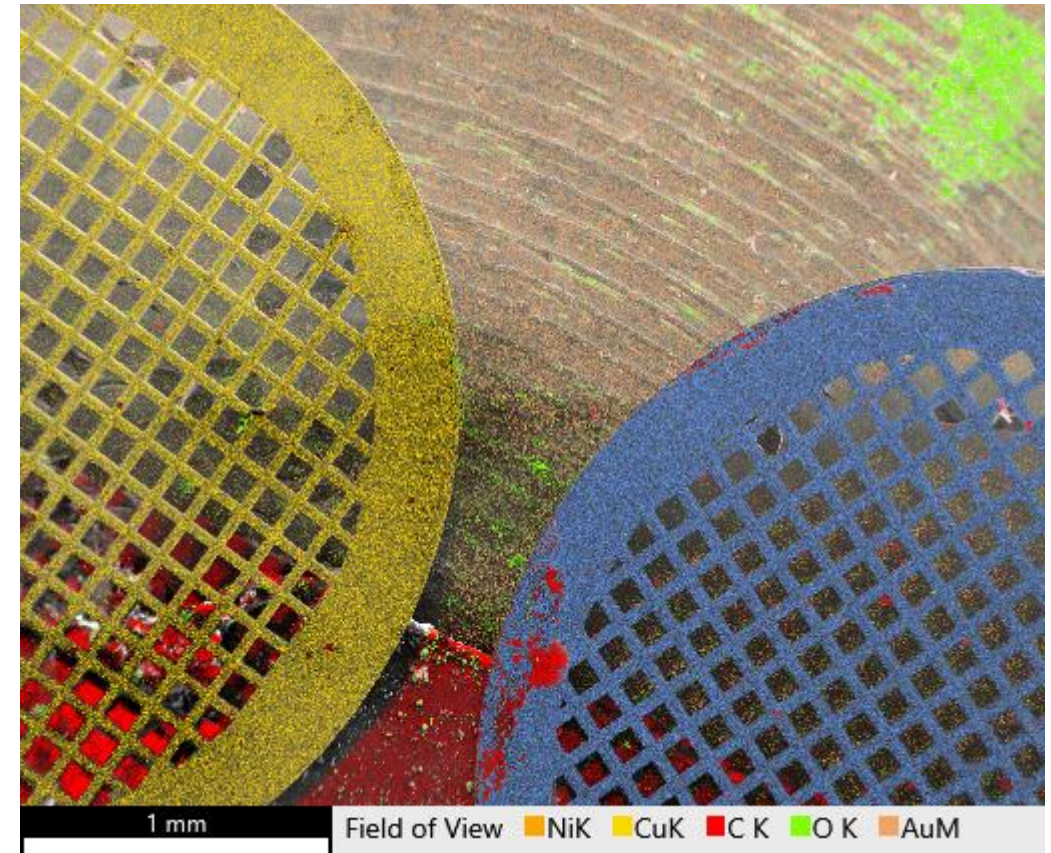


DODATKOWE TRYBY ANALIZY EDS

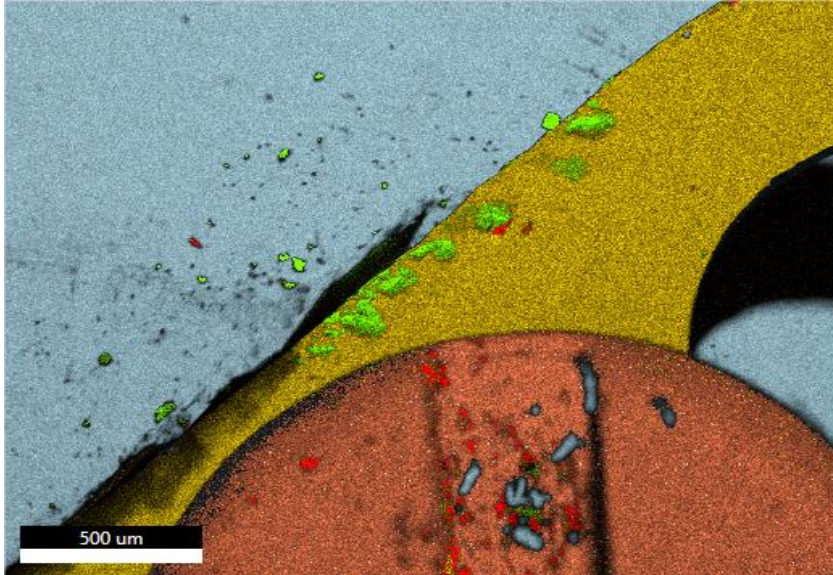
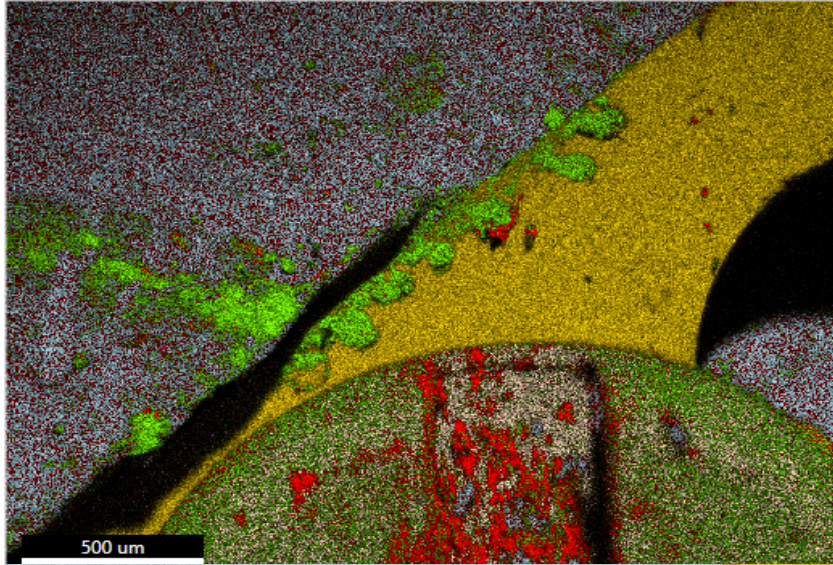
ANALIZA LINIOWA



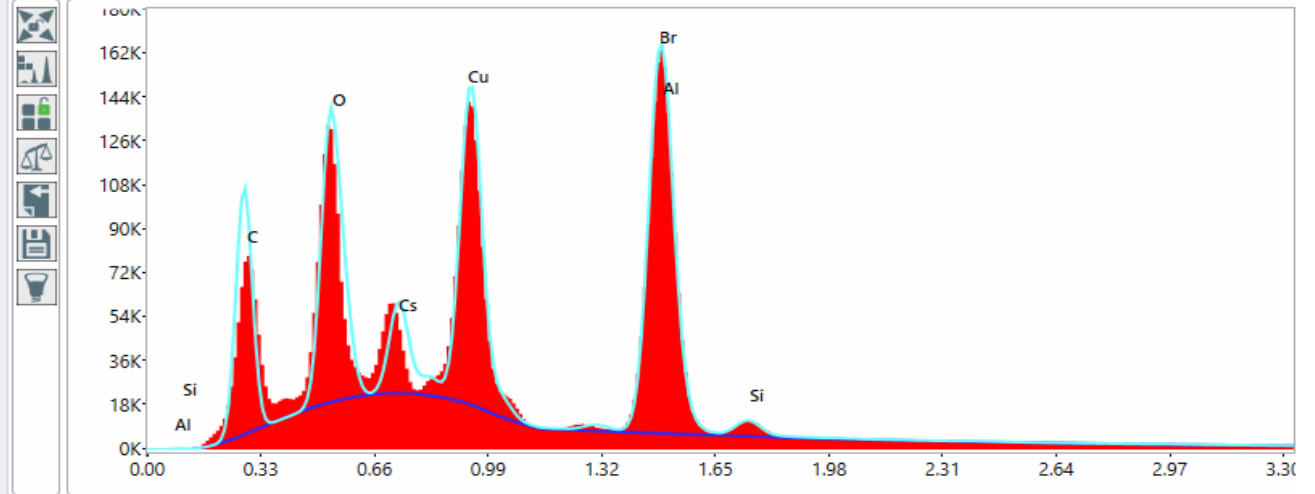
MAPOWANIE



ANALIZA PRZY RÓŻNYCH NAPIĘCIACH PRZESPIESZAJĄCYCH

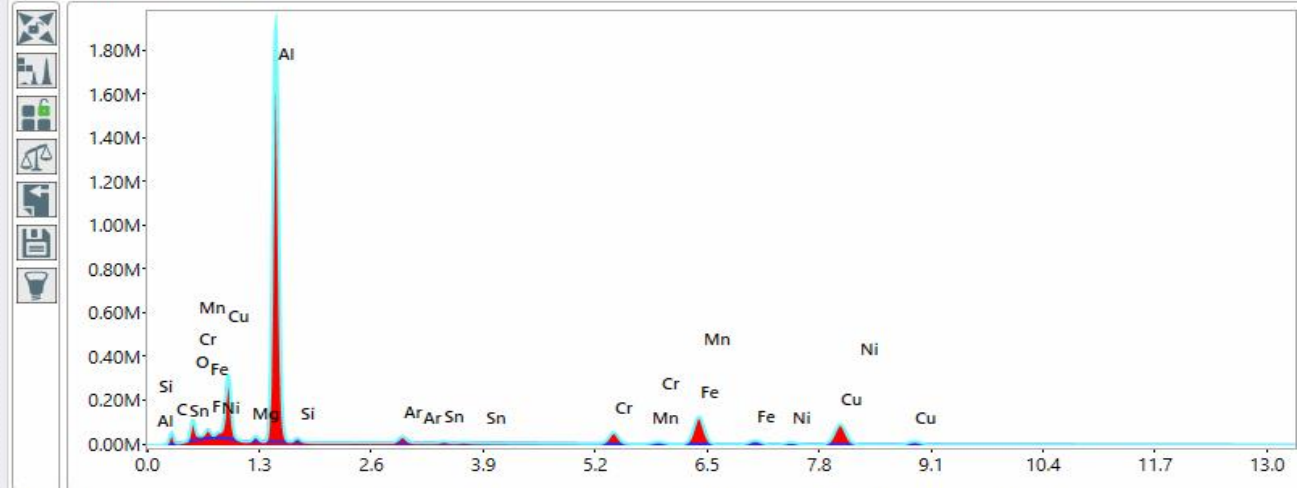


MK test2 | przelom | Test kv | 5kv



Status: Idle CPS: 21404 DT Lsec: 327.7 0 Cnts 0.000 keV Det: Element-C2B

MK test2 | przelom | Test kv | 20kv



Status: Idle CPS: 109394 DT Lsec: 327.7 0 Cnts 0.000 keV Det: Element-C2B

MIKROSKOP ELEKTRONOWY SKANINGOWO - TRANSMISYJNY STEM (*Scanning - Transmission Electron Microscope*)



OBRAZOWANIE

- detektor elektronów przechodzących oraz odbitych i wtórnych
- obrazowanie w jasnym i ciemnym polu
- możliwość analizy znacznie grubszych skrawków niż w TEM

ZASTOSOWANIE

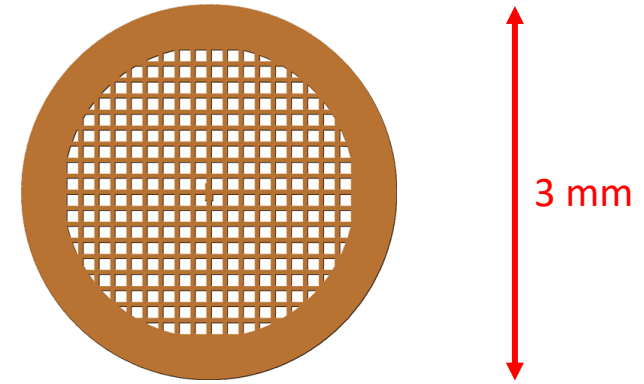
- inżynieria materiałowa (folie, materiały sypkie)
- biologia i medycyna

MOŻLIWOŚCI

- powiększenie od 50x do 500000x (niższa od TEM)
- rozdzielczość do 3nm (rozdzielczość TEM 0,1 – 0,2nm)

CO MOŻEMY OGLĄDAĆ/OBRAZOWAĆ W STEM ?

- prawie wszystko, ale jest pewien problem...



DROGA PRÓBKII DO MIKROSKOPU

MATERIAŁ
SYPKI

DYSPERSJA NA
SIATKĘ TEM



OBRAZOWANIE

MATERIAŁ
BIOLOGICZNY

UTRWALANIE



ZATOPIENIE W
ŻYWICY



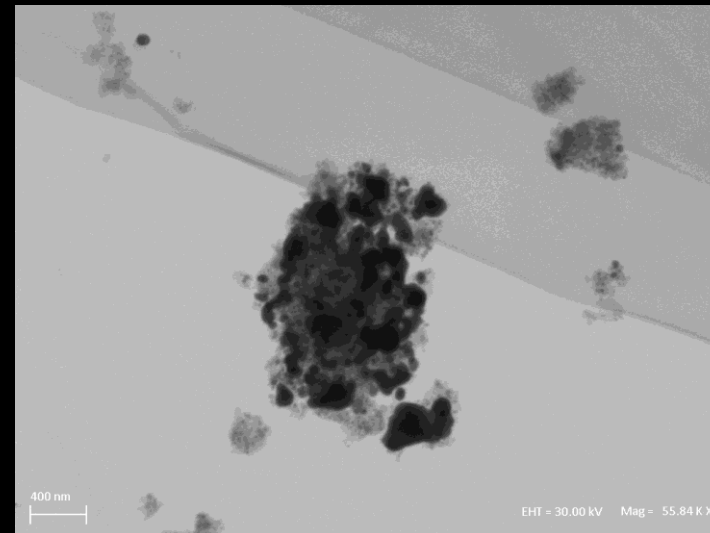
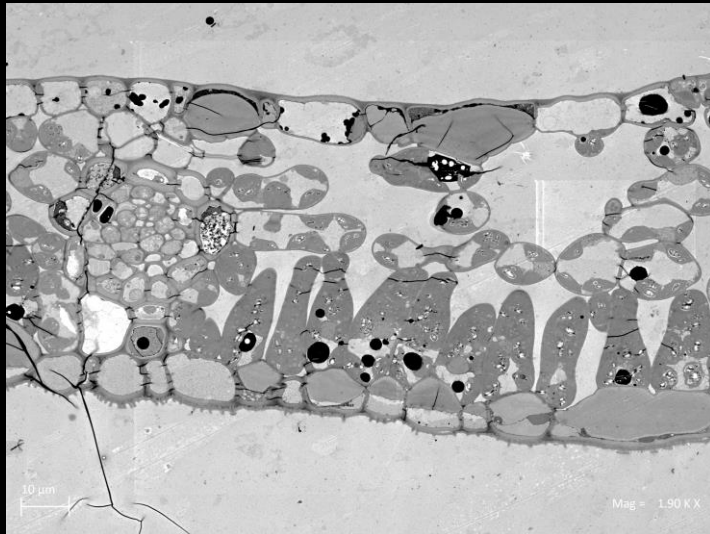
KROJENIE NA
SKRAWKI
(ULTRAMIKROTOM)



KONTRASTOWANIE
(OPCJONALNIE)



ZDJĘCIA STEM



MIKROSKOP KONFOKALNY LSM (*Laser Scanning Microscope*)



ZEISS LSM 880 with Airyscan (*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*)

OBRAZOWANIE

- analiza próbek zdolnych do fluorescencji
- tworzenie modeli 3D
- możliwość analizy żywych komórek

ZASTOSOWANIE

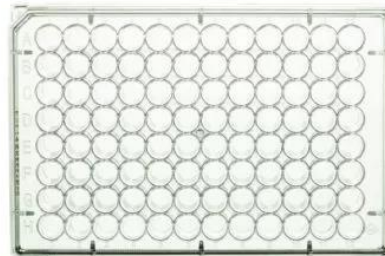
- biologia, medycyna, farmacja
- branża przemysłowa (topografia)

MOŻLIWOŚCI

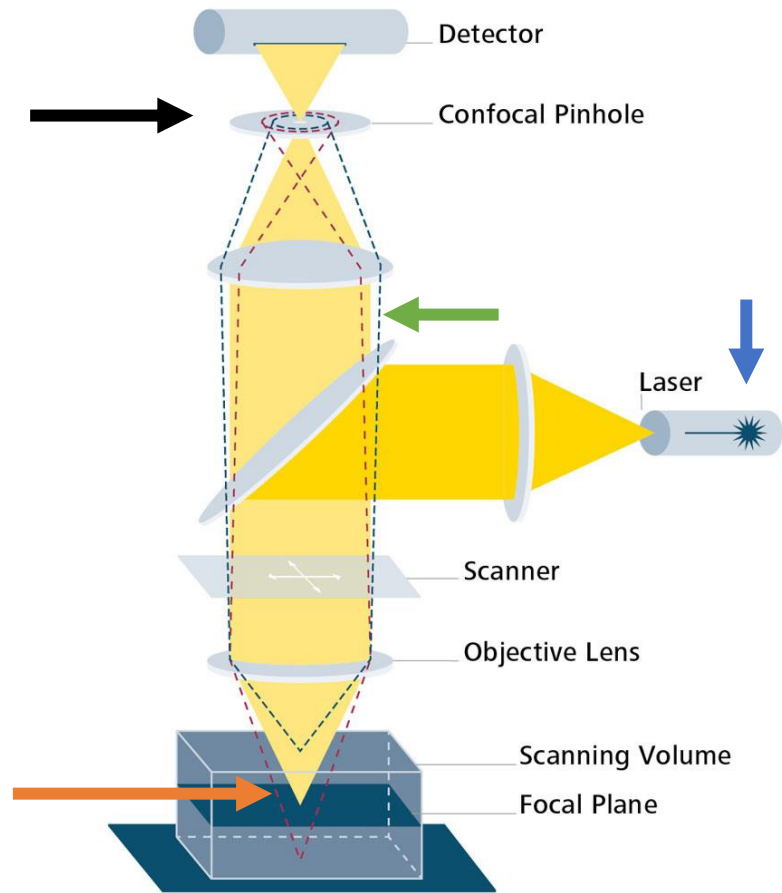
- powiększenie od 50x do 1000x plus zoom cyfrowy
- rozdzielczość do 200 nm w osi X, do 500 nm w osi Z;
Airyscan 140 nm w osi X, 400 nm w osi Z

PRZYGOTOWANIE PRÓBKKI DO MIKROSKOPU KONFOKALNEGO

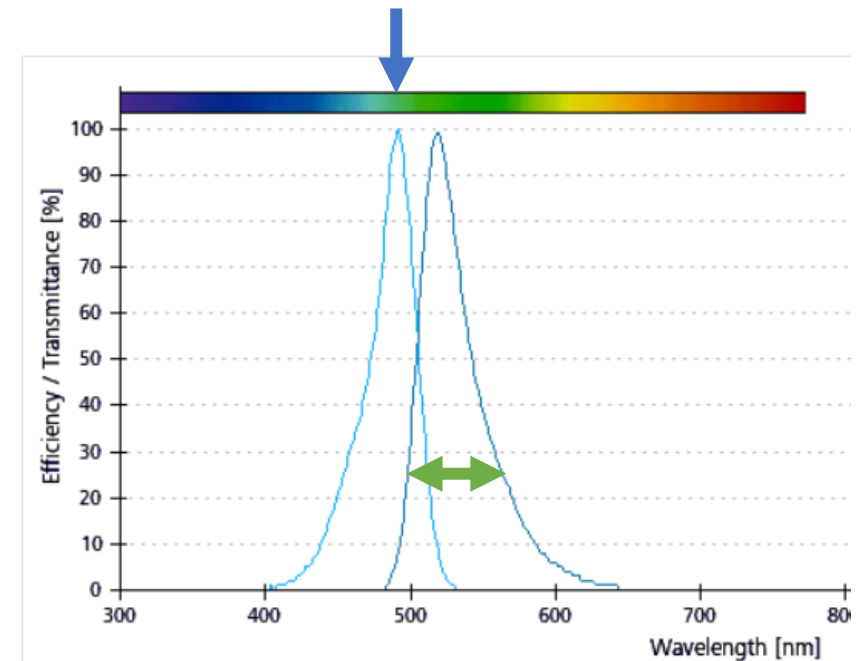
- krojenie na skrawki (ręcznie, wibratom, mikrotom, kriostat)
- utrwalanie, procedura „barwienia”
- umieszczenie preparatu na szkiełku, hodowla komórkowa na płytkach lub szalkach



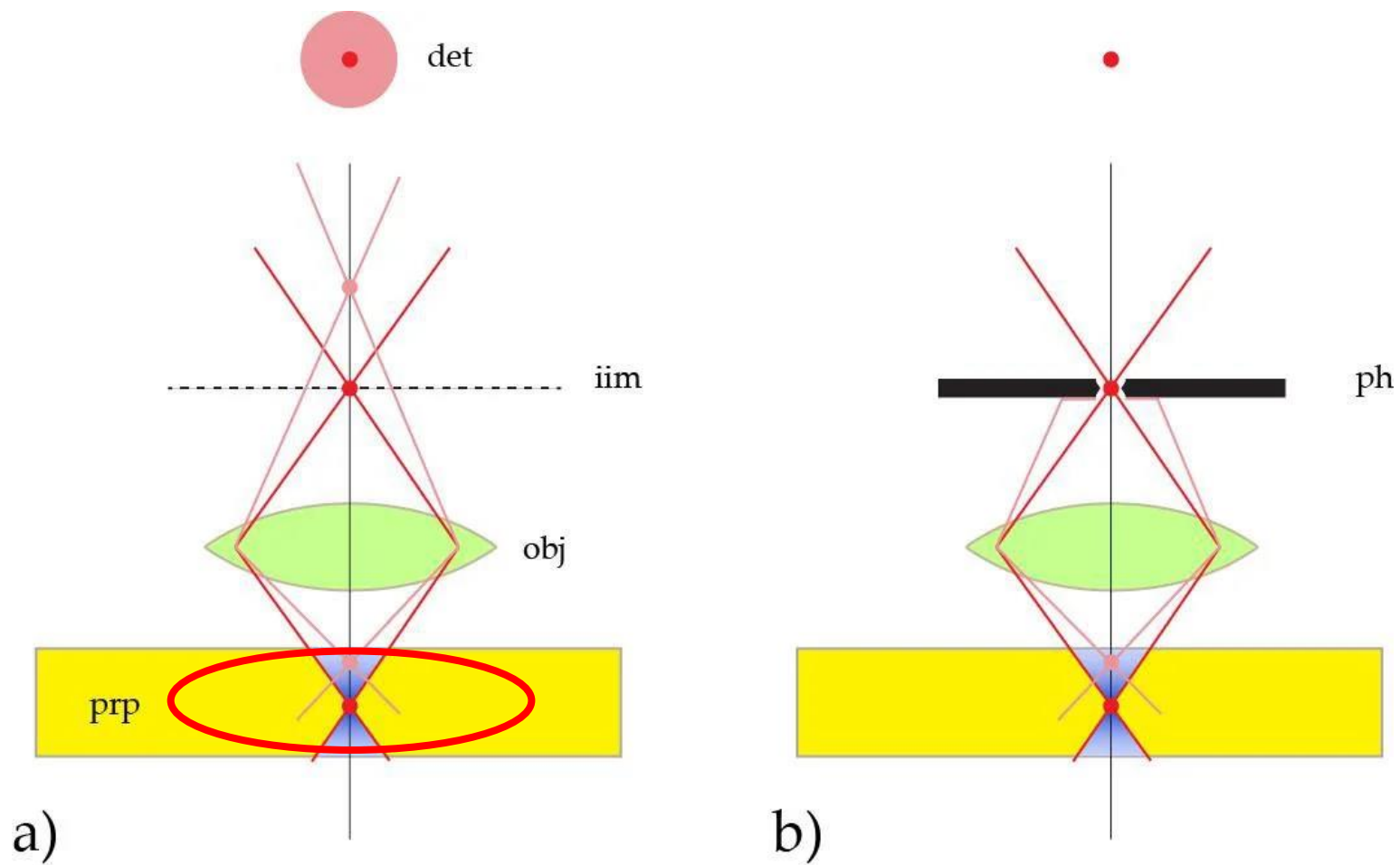
SCHEMAT MIKROSKOPU KONFOKALNEGO



- punktowe wzbudzenie sygnału na płaszczyźnie fokalnej/ogniskowej (skanowanie)
- przysłona pinholowa w płaszczyźnie obrazu
- odpowiednia długość fali wzbudzenia
- odpowiedni zakres długości fal emisji (filtry emisyjne)

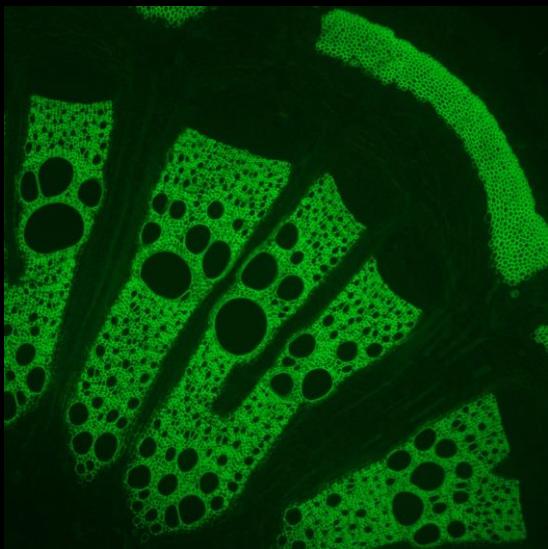


PINHOLE (przysłona pinholowa)

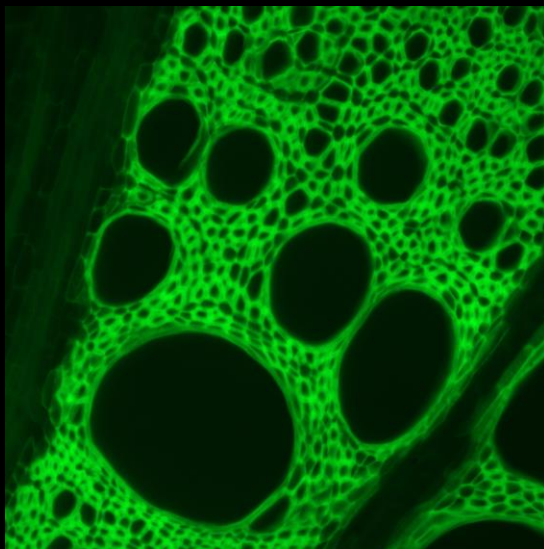


OBRAZ FLUORESCENCYJNY vs OBRAZ KONFOKALNY
(przekrój łodygi kokornaku)

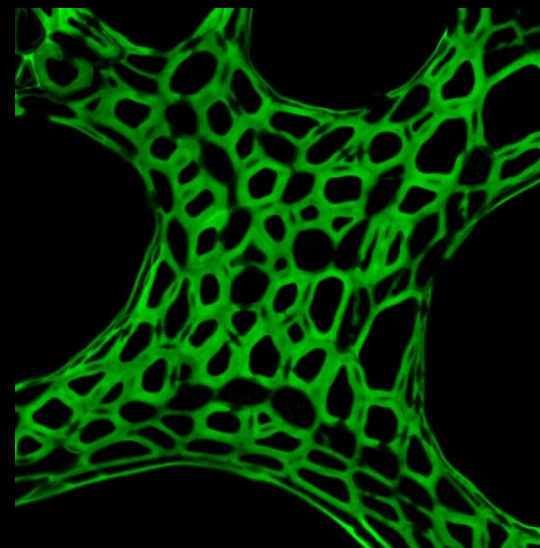
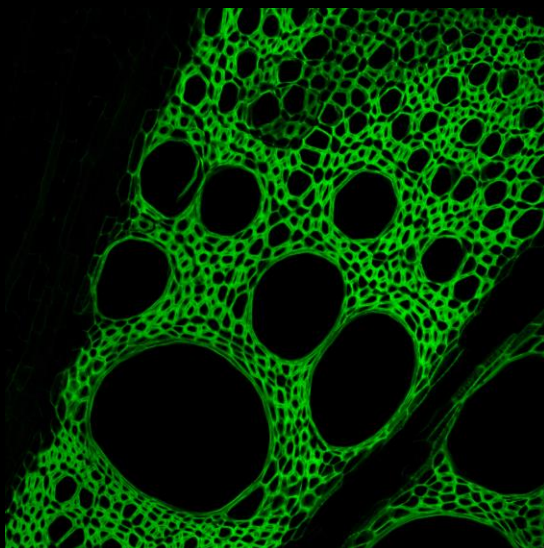
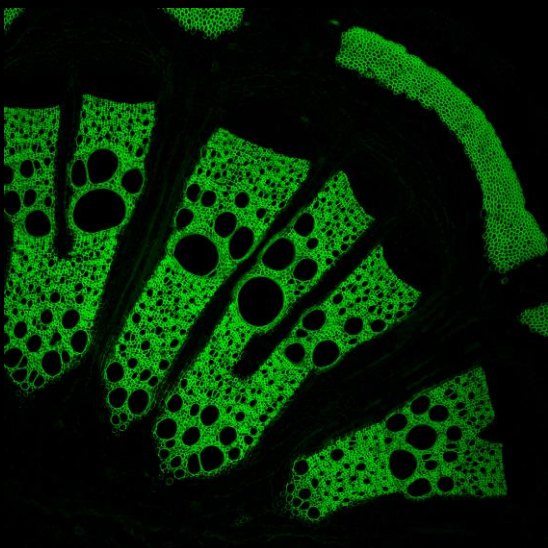
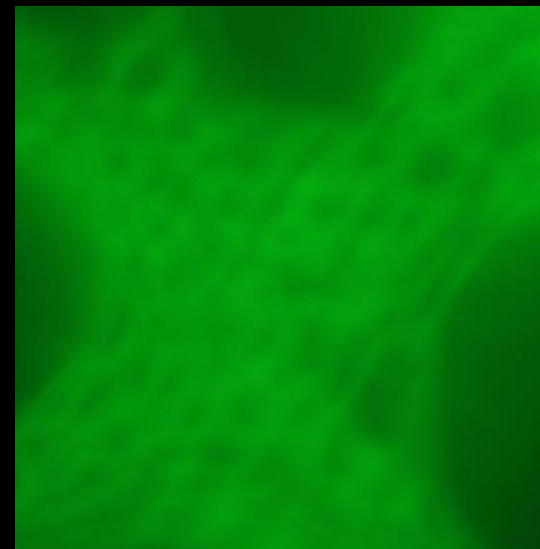
5x



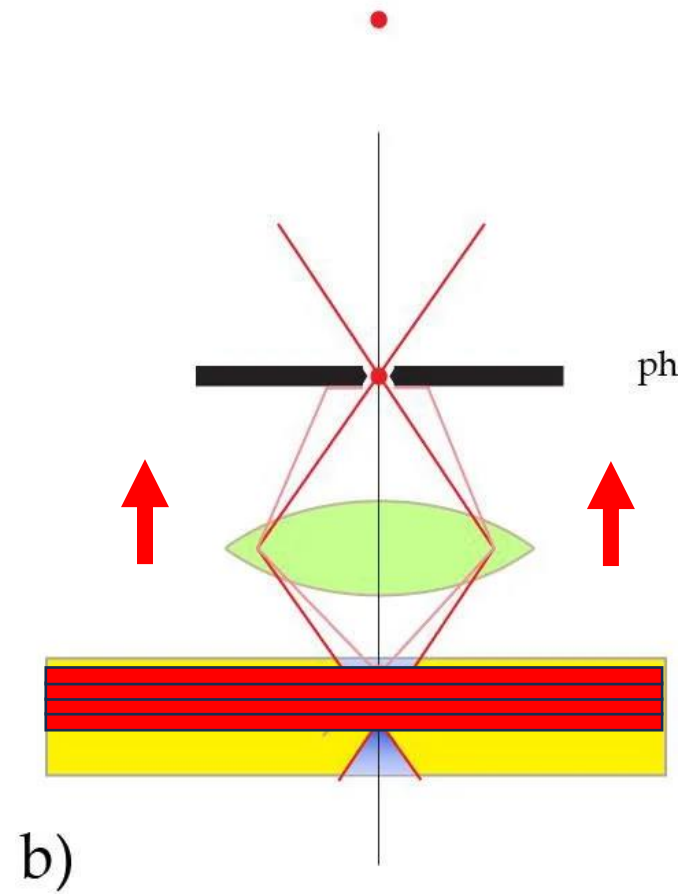
20x



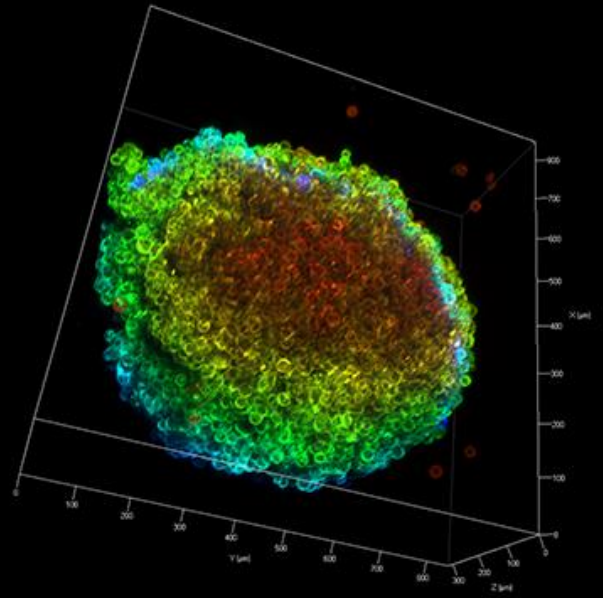
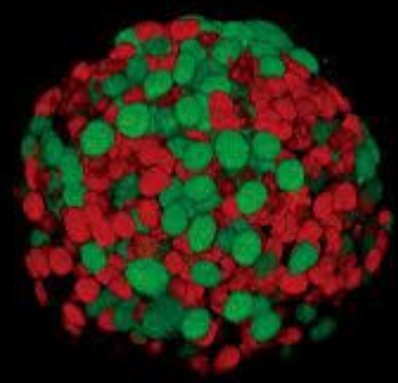
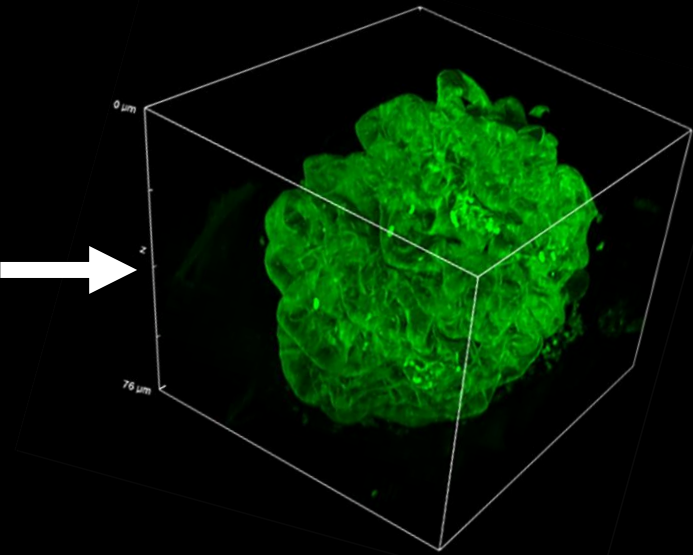
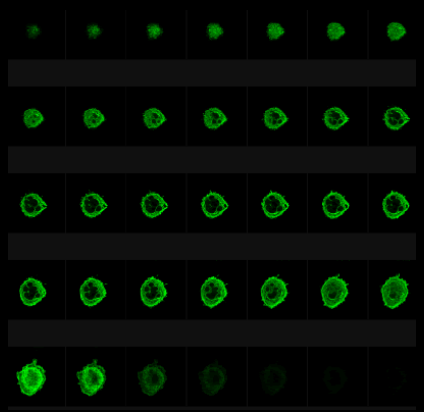
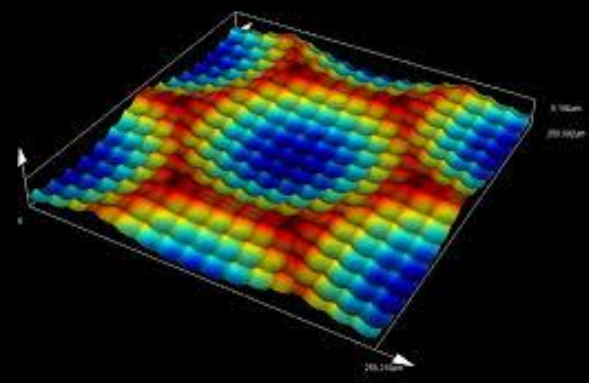
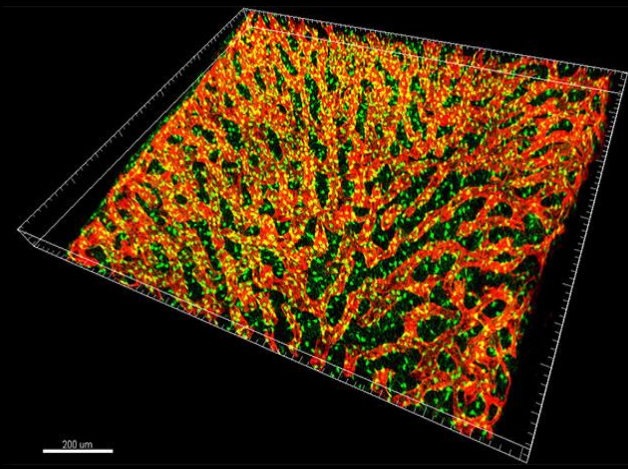
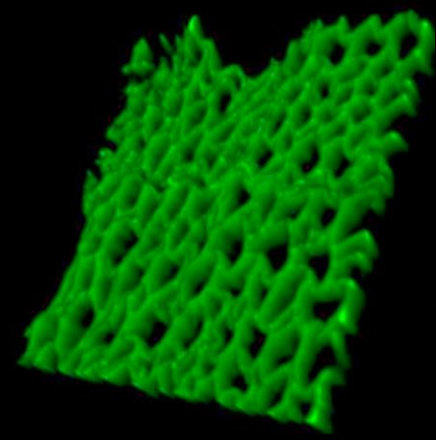
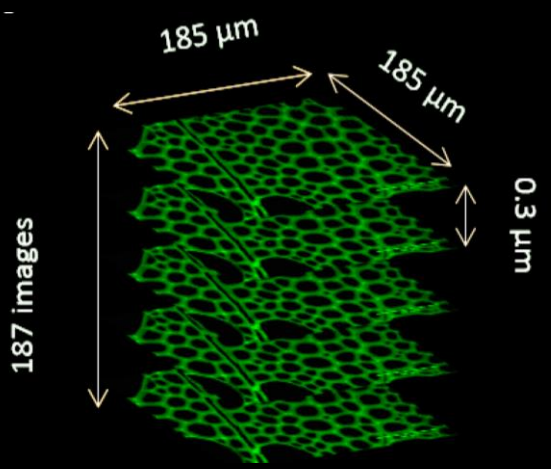
60x



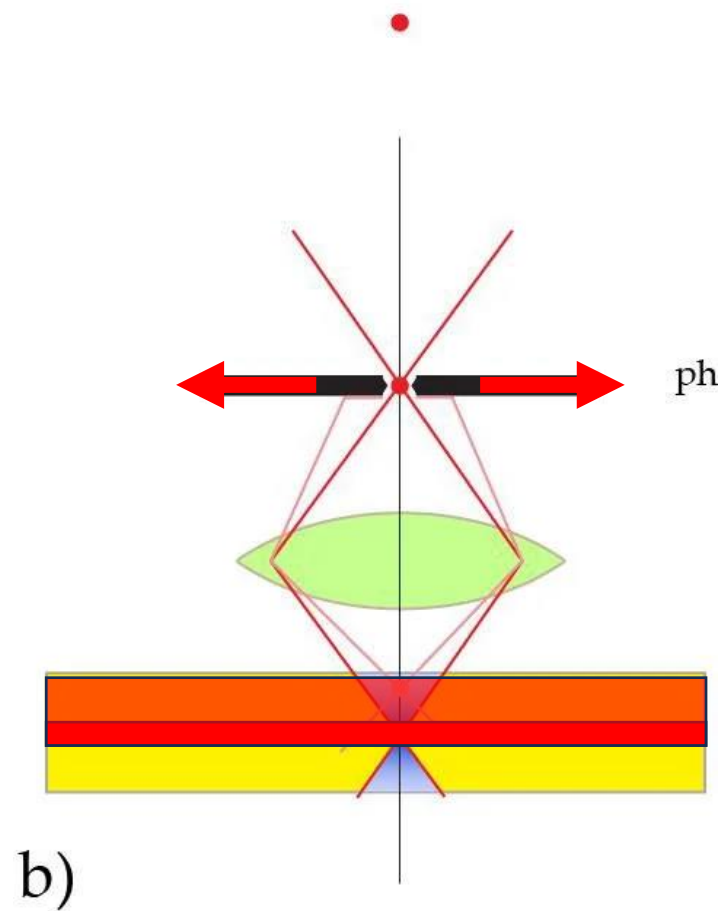
ZBIERANIE SKRAWKÓW OPTYCZNYCH (Z – stack)



OBRAZY 3D



PINHOLE (przystaona pinholowa) i SKRAWEK OPTYCZNY (grubość skrawka)



TEST OTWARCIA PRZYSŁONY PINHOLOWEJ

(przekrój łodygi kokornaku)

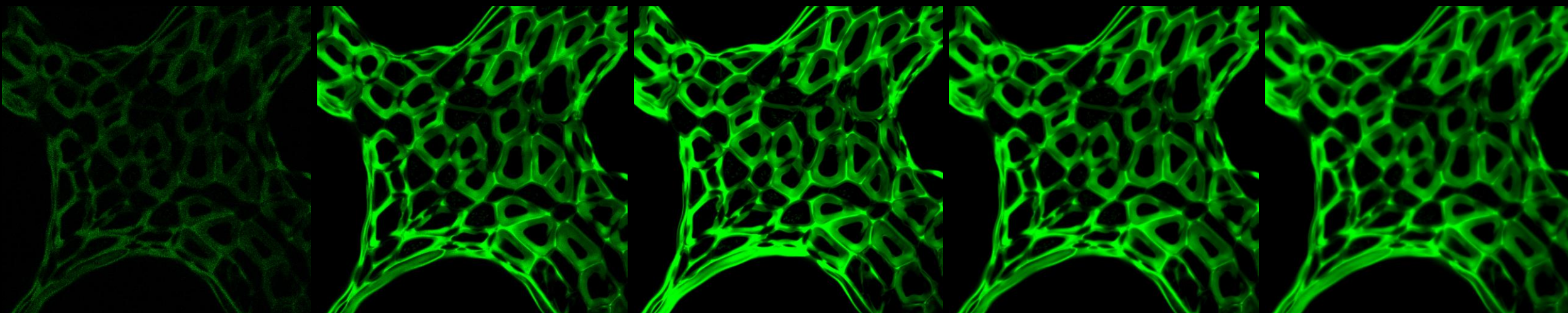
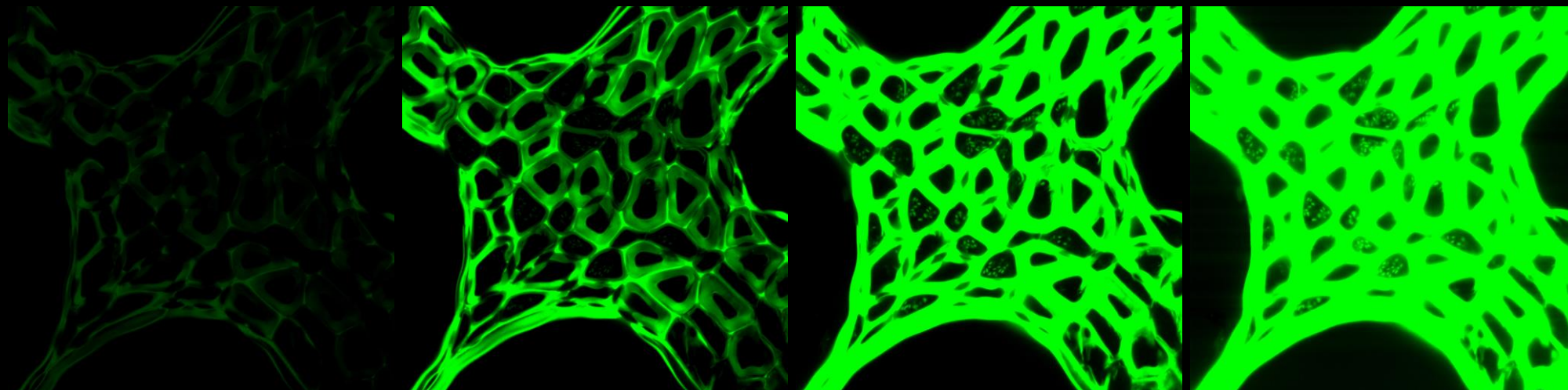
0,2 AU

0,6 AU

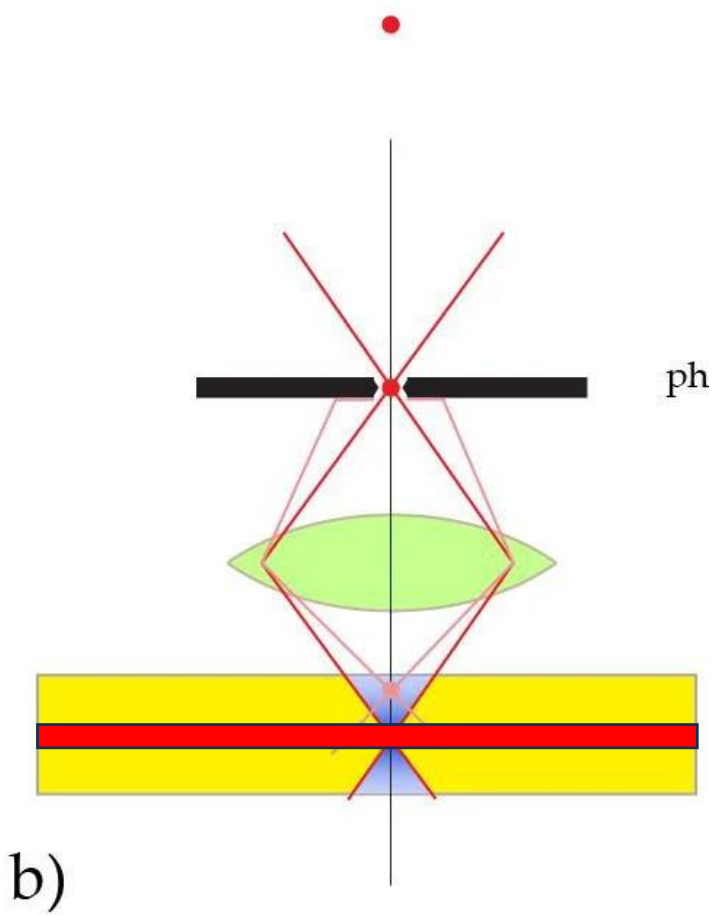
1 AU

2 AU

4 AU



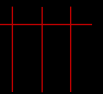
PINHOLE (przystaona pinholowa) - optymalna wartość



Dysk Airy'ego (*Airy Disc*)



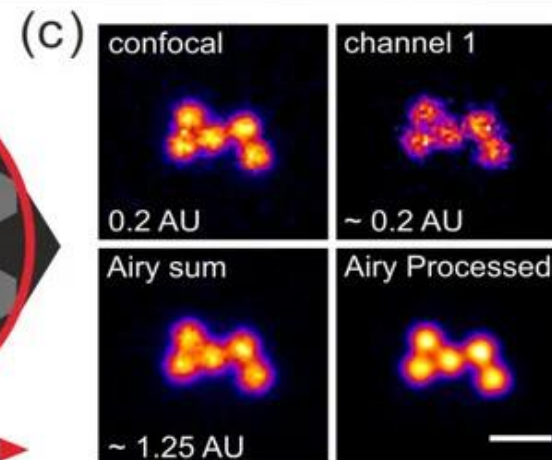
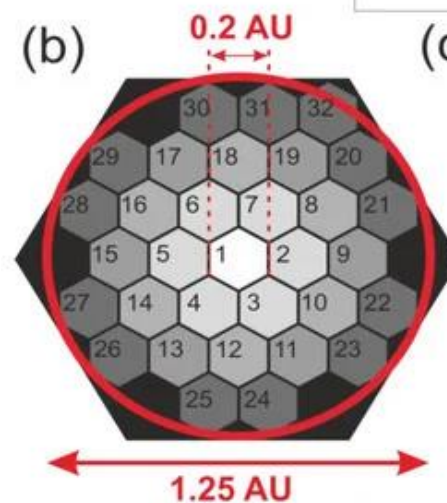
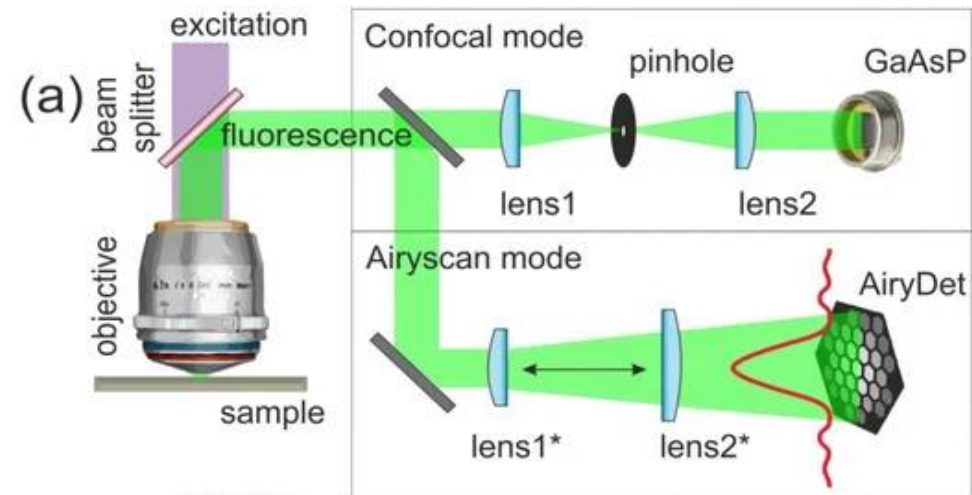
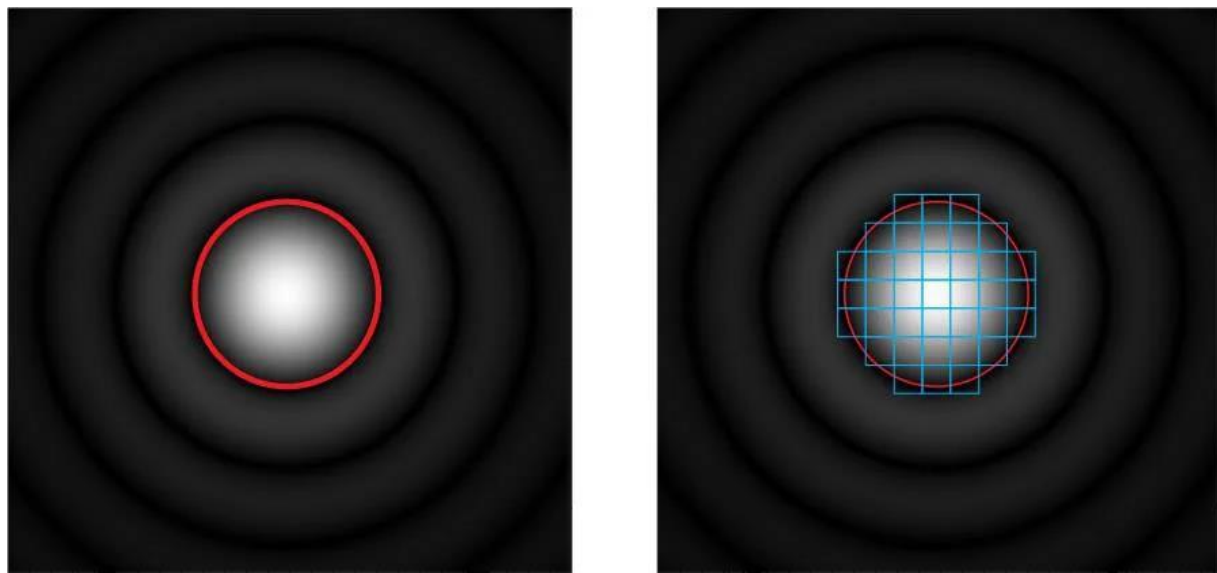
PSF
(*Point Spread Function*)



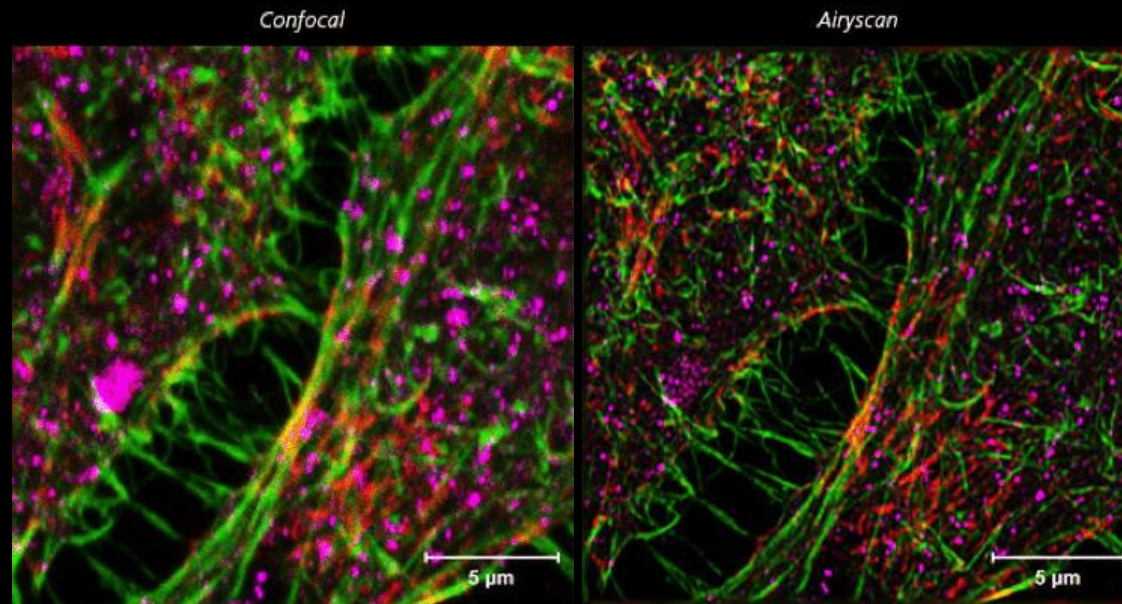
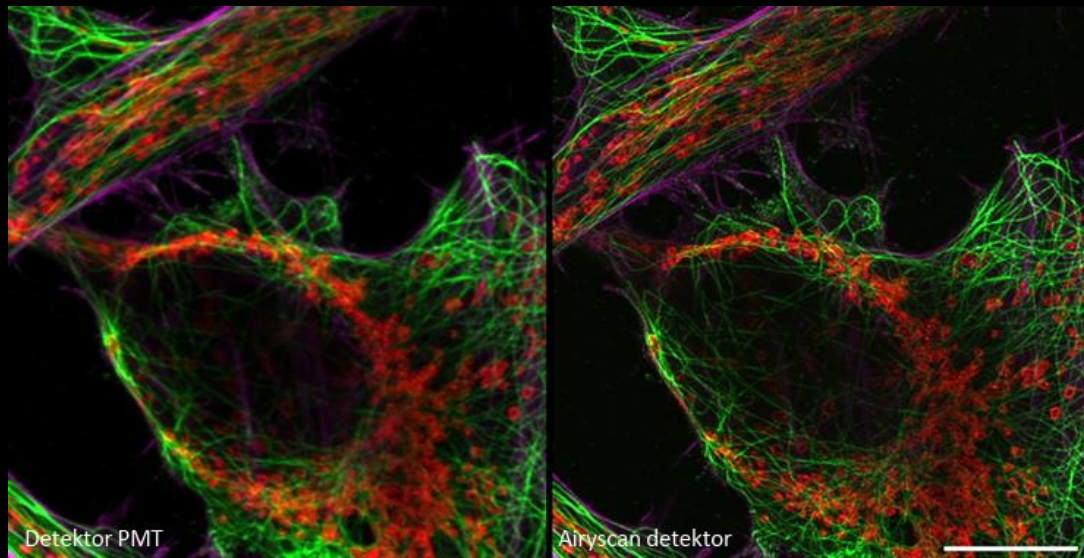
AIRYSCAN

1 Airy Unit (1AU)

- otwarcie przysłony pinholowej zapewniające optymalny stosunek sygnału do szumu oraz optymalną rozdzielczość
- zawiera 85 % sygnału z punktu



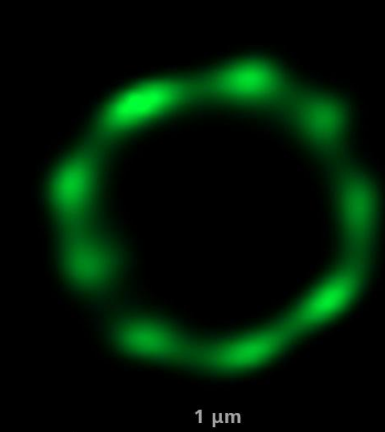
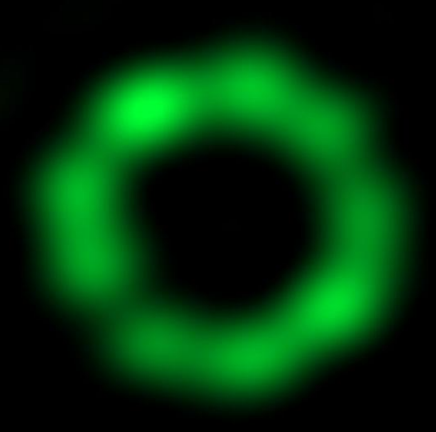
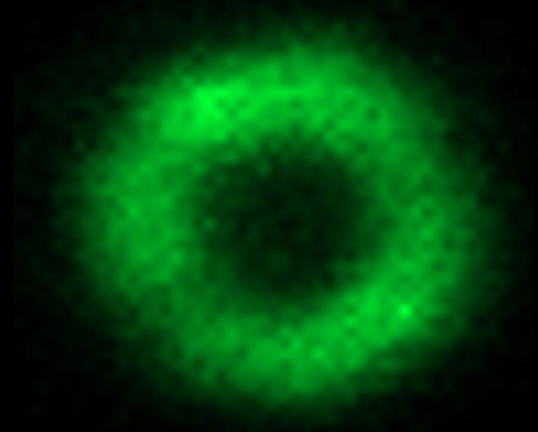
KONFOKAL vs AIRYSCAN



Confocal

Airyscan SR

Airyscan jDCV





FORMULARZ ZLECENIA



Pieczęć zleceniodawcy

Miejscowość, data.

Do Centrum Dobrostanu i Zdrowia Zwierząt

Proszę o przeprowadzenie badań zleconych prób na Mikroskopie Elektronowym Skaningowym.

1. Liczba zleconych prób:

2. Dokładne oznakowanie prób:

3. Stosowana metoda obróbki prób:

- brak (własne stoliki do SEM lub siatki do STEM z nałożonym materiałem)
- nałożenie na stolik SEM dyspersja na siatce TEM napylenie
- inne

4. Dane kontaktowe:

4.1. Nazwa i adres jednostki zlecającej

4.2. Dane osoby zlecającej (imię, nazwisko, email, telefon)

5. Płatność (zlecający z Uniwersytetu Przyrodniczego):

- subwencja dział. badawcza subwencja dydaktyczna granty

Dokładne dane subwencji, grantu itp.

6. Cennik (ceny brutto)

Praca na mikroskopie	50 PLN / 1h
Analiza EDS	50 PLN / usługa
Przygotowanie preparatu na siatce (STEM)	16 PLN / 1 siatka
Napylenie	20 PLN / 1 wsad (1 - 6 stolików)

7. Wyrażam zgodę na pokrycie opłat za badania zgodnie z obowiązującym cennikiem (pkt.6)

8. Oświadczam, iż zapoznałem/am się i akceptuję regulamin świadczenia usług (załącznik nr.1)

9. Administratorem Państwa danych osobowych jest Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań. Przetwarzamy Państwa dane osobowe w celu realizacji zadań Uczelni wynikających z ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, wypełnienia przepisów innych ustaw, zawarcia umowy oraz rozpatrzenia spraw kierowanych do Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Przysługuje Państwu prawo do: żądania od Administratora dostępu do swoich danych osobowych, ich sprostowania, usunięcia lub ograniczenia przetwarzania, wniesienia sprzeciwu wobec takiego przetwarzania, przenoszenia danych. Pełna treść klauzuli informacyjnej: <https://puls.edu.pl/contact-us/polityka-cookies>

10. Dane do płatności: **Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań**
NIP: 777 00 04 960
SANTANDER BANK POLSKA S.A.
29 1090 1362 0000 0000 3601 7894
Subkonto Uniwersyteckiego Centrum Dobrostanu i Zdrowia Zwierząt: 510.508

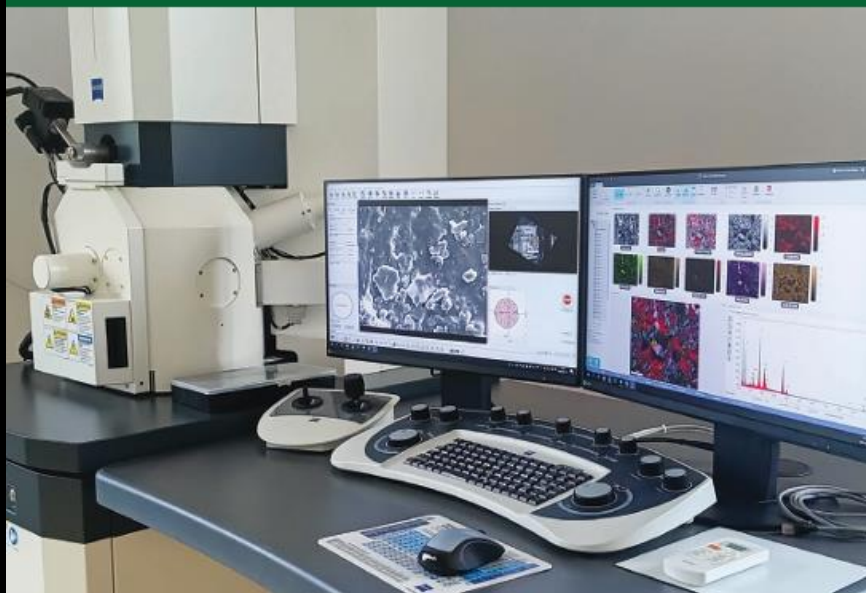
.....
(pieczęć i podpis dysponenta środków finansowych)

11. Podsumowanie zlecenia (wypełnia zleceniobiorca)

Data realizacji zlecenia.....

Czynność	Jednostka	Ilość	Suma (PLN)
Praca na mikroskopie	1 h		
Analiza EDS	usługa		
Przygotowanie preparatu na siatce (STEM)	1 siatka		
Napylenie	1 wsad		
			RAZEM





CENTRUM DOBROSTANU I ZDROWIA ZWIERZĄT

WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ
I NAUK O ZWIERZĘTACH

**SKANINGOWY MIKROSKOP ELEKTRONOWY
(SEM) ZEISS EVO 10**

OFERTA USŁUG

DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ!

marcin.kujawa@up.poznan.pl
513 704 861

SKANINGOWY MIKROSKOP ELEKTRONOWY (SEM) ZEISS EVO 10



- obrazowanie powierzchni preparatu w wysokiej próżni (HV) z wykorzystaniem detektora SE oraz BSE (obrazowanie różnic w składzie pierwiastkowym powierzchni) z rozdzielczością do 3 nm*
- obrazowanie powierzchni preparatu w zmiennej próżni (VP) z wykorzystaniem detektora VPSE z rozdzielczością do 20 nm*. Tryb pracy przeznaczony dla miękkich i delikatnych preparatów, które nie mogą być poddane standardowej procedurze przygotowania oraz obserwacji w warunkach wysokiej próżni
- obrazowanie cienkich, półcienkich i ultracienkich skrawków oraz sypkich preparatów zdyspergowanych na siatce do mikroskopii transmisyjnej z wykorzystaniem detektora elektronów przechodzących w trybie STEM z rozdzielczością do 3 nm*
- analiza składu pierwiastkowego (EDX), mapowanie
- przygotowanie próbek - suszenie w punkcie krytycznym (CPD), nałożenie na stoliki SEM, dyspersja na siatce TEM, napylenie złotem

* wartość zależna od warunków pracy mikroskopu oraz rodzaju preparatu

Kontakt:

Marcin Kujawa
Marcin.kujawa@up.poznan.pl
513 704 861