

# STEM

## Sveptransmissionselektronmikroskopi

### Inledning

När man ska betrakta små beståndsdelar i vår omvärld räcker vårt öga oftast inte till och vi får ta hjälp av olika optiska instrument. Om det vi vill betrakta är tillräckligt litet räcker inte synligt ljus, eller vanliga ljusmikroskop till. Man kan då utnyttja elektroners vågegenskaper och använda ett elektronmikroskop istället.

Det finns flera olika sorters elektronmikroskop som använder sig av lite olika metoder och tekniker för att studera ett föremål beroende på ändamål. Det mikroskop som ska omnämnas här är ett så kallat STEM, sveptransmissionselektronmikroskop. Mikroskopet använder sig fördelaktigt av mörkfältsmikroskopi, varför biologiskt material inte behöver färgas. Tekniken för också med sig den fördelen att den kan användas samtidigt med röntgenspektroskopi om man vill analysera vilka atomslag som förekommer.

### Funktion

Hur fungerar då ett elektronmikroskop i allmänhet och ett STEM i synnerhet? Först och främst måste alla elektronmikroskop ha någon slags elektronkälla, kallad elektronkanon. En elektronkanon är helt enkelt en apparatur som frigör elektronen från en yta och sedan accelererar dessa rätlinjigt med hjälp av ett elektriskt fält. Elektronkanonen består av en V-formad glödtråd av metall, där elektroner frigörs från spetsen genom att ett elektriskt fält läggs på mellan katoden och anoden. Värms tråden samtidigt upp kan man få elektronerna att lämna tråden mindre motvilligt, men generellt ger termisk emission inte en särskilt koherent elektronstråle, då elektronernas hastighet, och därmed deras energi, följer en normalfördelningskurva med kromatiskt aberration som följd. Fältemissionen å andra sidan ger en väldigt koherent stråle då denna teknik endast använder ett mycket kraftigt elektriskt fält. Nackdelen är att elektronkanonen då kräver ett extremt lågt tryck inom kammaren där den är verksam. Följaktligen blir denna elektronkanon, FEG (Field Emission Gun), tämligen dyr. Det är även denna teknik som används för ett dedikerat STEM, då detta kräver en så smal och koherent stråle som möjligt.

Under elektronkanonen läggs preparatet i samma kammare som kanonen. Med hjälp av magnetiska linser fokuseras strålen i en så liten punkt som möjligt på preparatet. När elektronstrålen träffar preparatet sänder detta ut olika typer av signaler som kan fångas upp med detektorer. De olika signalerna ger olika information om preparatets egenskaper. Ett STEM fokuserar strålen i en punkt på preparatet, låter de olika detektorerna samla information och går senare vidare till en annan punkt i närheten. Hela preparatet täcks in i ett punktmönster, där bildens upplösning begränsas av punkten, alltså elektronstrålens bredd. Ju mindre desto bättre.

### Interaktion med partiklar i preparat

Elektronstrålen interagerar med atomerna i preparatet på många olika sätt. Vid de flesta typer av interaktioner förlorar elektronerna i elektronstrålen en del av sin energi och bromsas in. Därför kan stålen endast tränga in på ett begränsat djup i provet innan den har hejdat helt. I såväl STEM som TEM tittar man i huvudsak på elektroner som transmitteras, varför preparatet måste göras mycket tunt.

STEM skapar bilder genom att analysera de transmitterade elektronerna. Bilden kan skapas på flera sätt, till exempel med ljusfälts- och mörkfältsmikroskopi. Under preparatet finns ett antal elektrondetektorer. De som används för ljusfältsmikroskopi kallas Bright Field Detector (BF). BF-detektorn är placerad så att den bara träffas av elektroner som transmitterats utan att spridas. Om denna detekterar en stark signal så betyder det att elektronerna inte spritt sig särskilt mycket genom preparatet. Liten spridning resulterar i en ljus punkt på bilden.

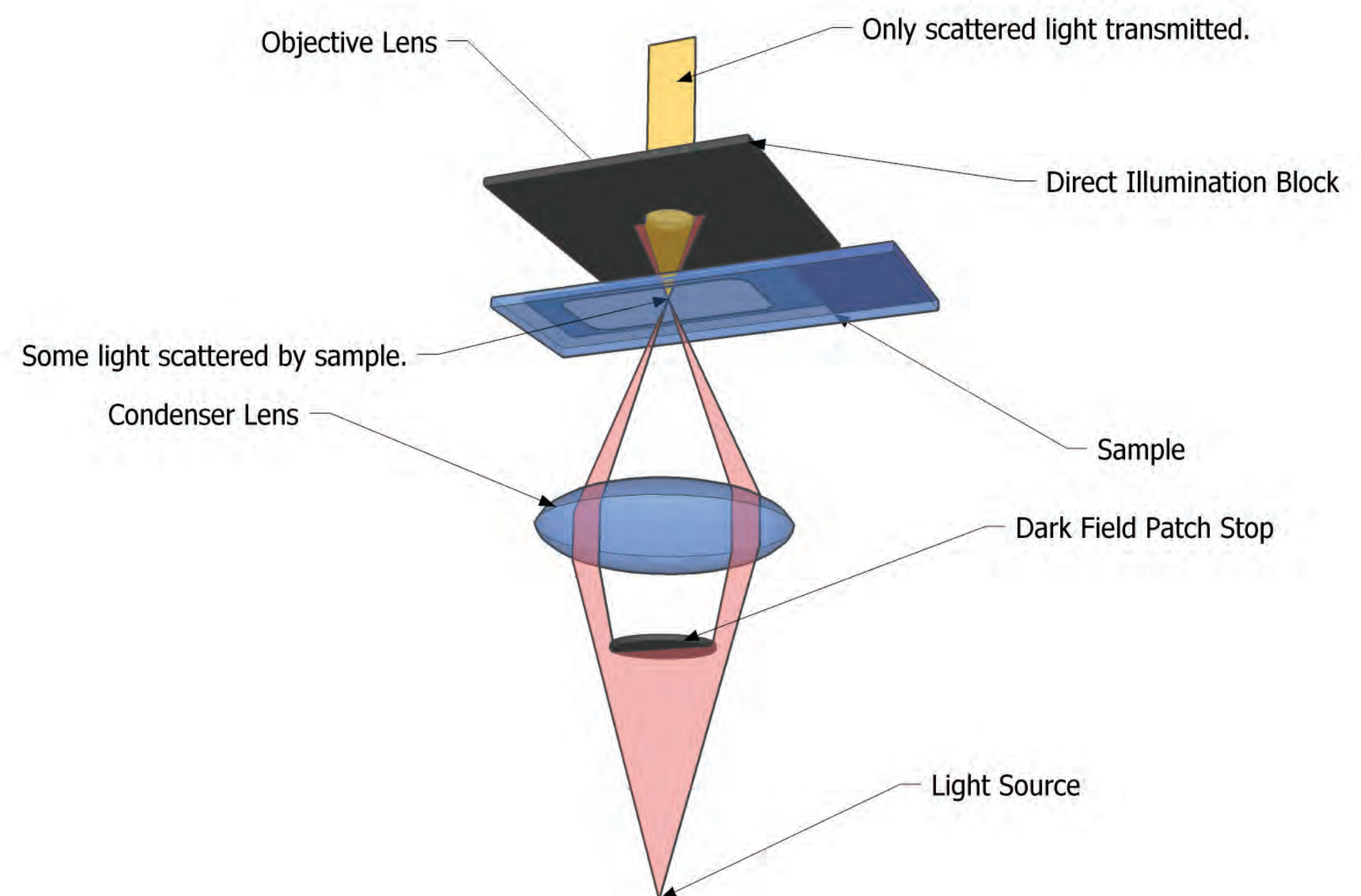
Mörkfältsmikroskopi fungerar analogt, med skillnaden att man registrerar de elektroner som spritt sig genom preparatet. Detektorerna kallas Annular Dark Field Detectors (ADF) och är placerade utanför BF-detektorerna, dit endast spridda elektroner når. Områden på preparatet där elektronerna sprider sig mycket avbildas ljusa när man använder mörkfältsmikroskopi. Alltså blir ljusfältsbilder och mörkfältsbilder varandras negativ. Mörkfältsmikroskopi används fördelaktigt i ett STEM.

Spridningen beror både på hur tjockt preparatet är och atomernas atomnummer. Spridningen i biologiska material är dock inte särskilt stor eftersom de nästan bara består av lätta atomer och ljusfältsmetoden ger således dålig kontrast. Genom tillsättning av tunga färgämnen kan kontrasten förstärkas. Om man använder ett STEM och mörkfältsmikroskopi behövs inte detta. ADF-detektorerna registrerar endast svaga intensiteter eller ingen signal alls och kontrasten kan förstärkas digitalt. Med ett STEM slipper man alltså färga preparatet för att få kontrast.

Man kan få annan information om preparatet än struktur genom att titta på spridda elektroner. Om elektroner i elektronstrålen kommer in nära en atomkärna kommer deras riktning att böjas av i det elektriska fältet. Detta sker utan att elektronen förlorar någon energi. En sådan typ av spridning kallas elastisk. Om elektronerna passerar strax utanför kärnan avviker de en del från deras tidigare bana. Signalens intensitet beror på det genomsnittliga atomnumret i interaktionsvolymen. Genom att detektera dessa signaler kan man alltså skapa sig en bild av hur tunga element preparatet består av. Detta kallas med ett annat ord för Z-kontrast. Elektronerna detekteras med så kallade High Angle Annular Dark Field-detektorer eller HAADF-detektorer som sitter utanför ADF-detektorerna.

Under interaktion med elektronstrålen sänder preparatet ut egna signaler. Elektroner från atomer i preparatet kan slås ut. Om dessa detekteras kan man få viktig information om preparatets yta. Detta är dock inte så vanligt i ett STEM utan används mest i svepelektronmikroskopi.

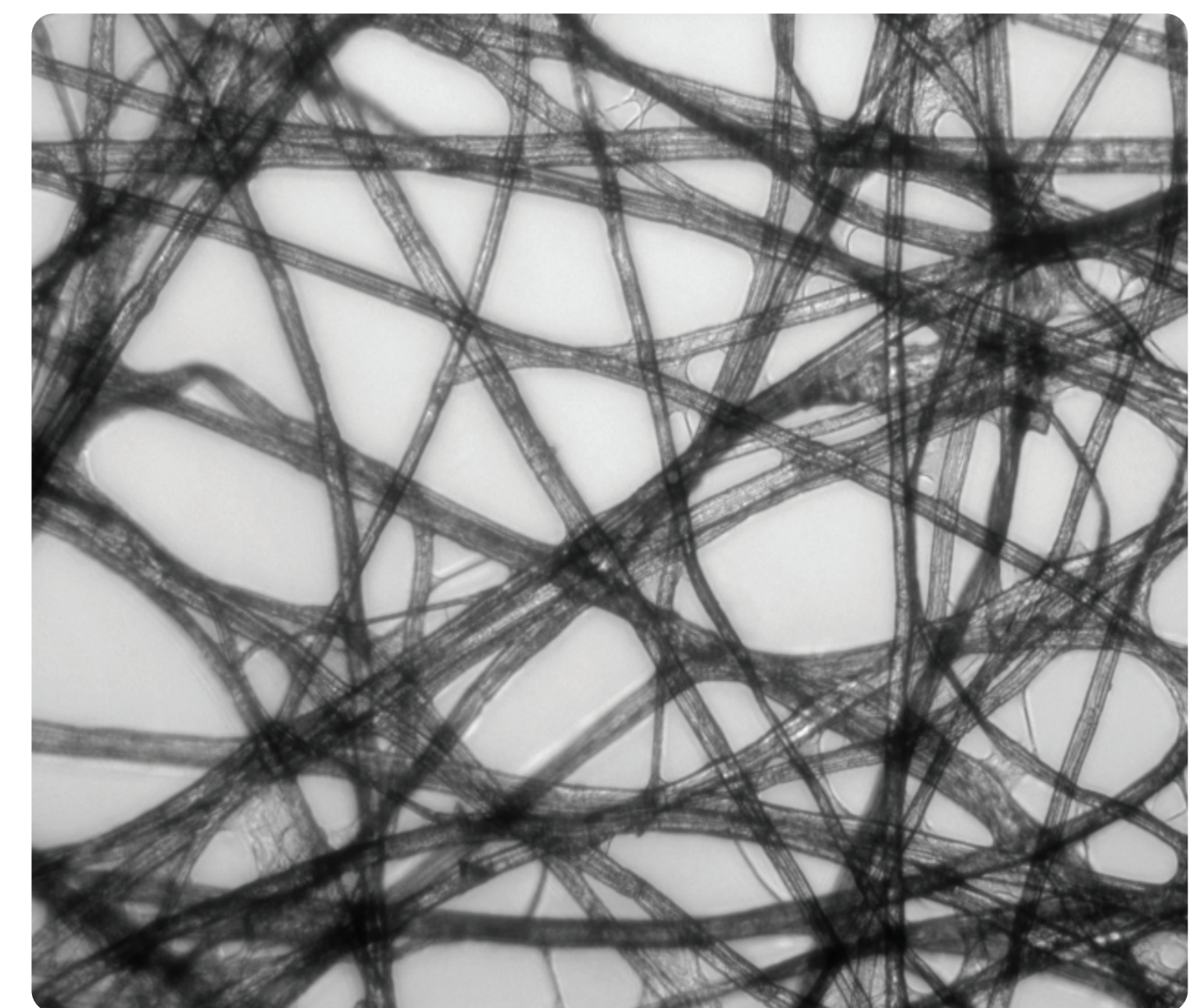
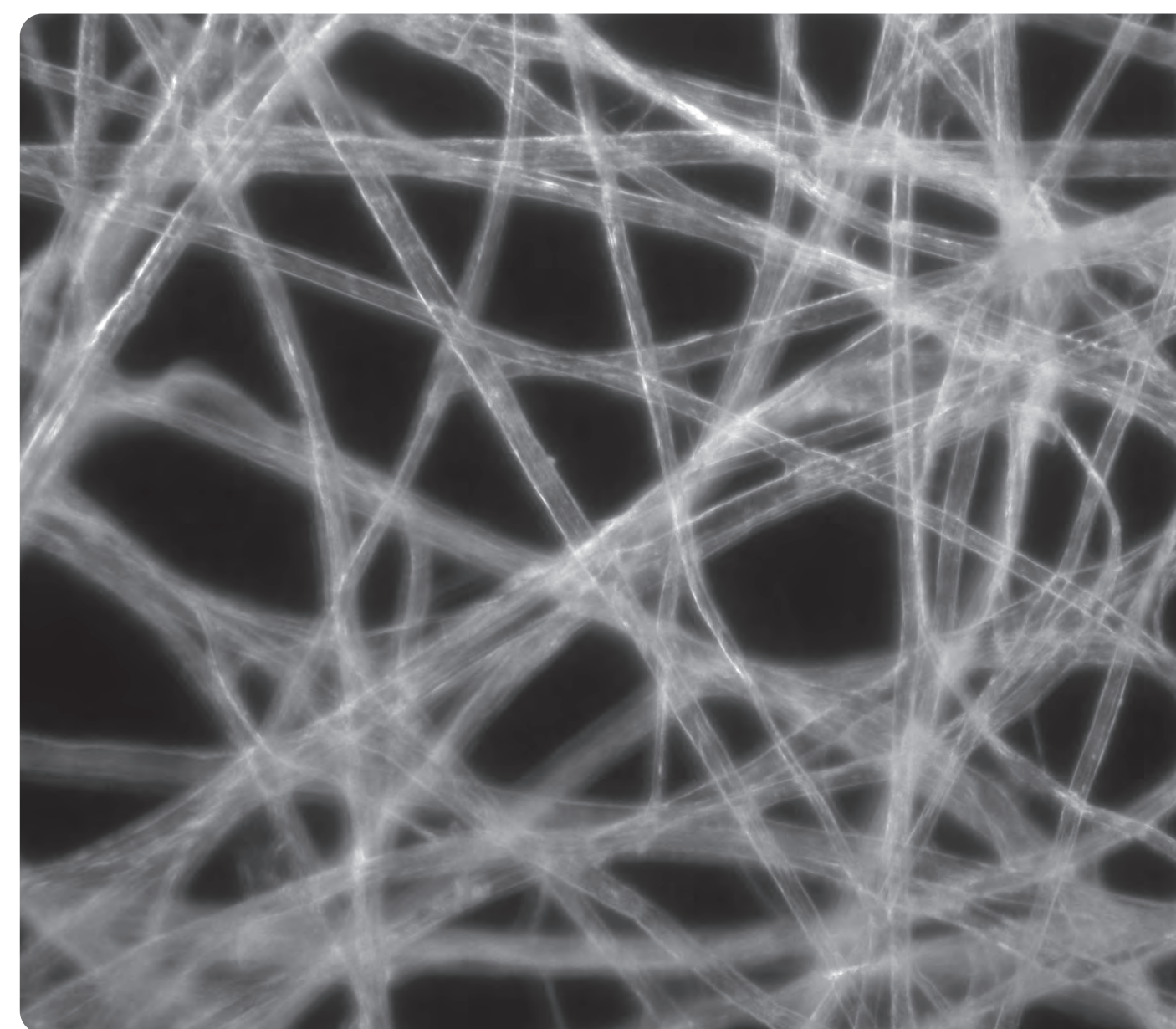
Interaktion med elektronmoln kan även resultera i emission av fotoner. Fotonerna som bär med sig den viktigaste informationen är röntgenfotoner. Om en elektron med hög hastighet tränger in i en atom kan denna slå ut en elektron i något av de inre elektronskalen. Vakansen som uppstår fylls genom att en elektron faller in från ett övre skal. När detta sker emitteras energi i form av fotoner. Fotonenergin är unik för varje element och röntgenstrålningen kan på så vis tala om exakt vilka atomer som finns i preparatet samt deras koncentration.



Det är fördelaktigt att använda sig av ett STEM för röntgenspektroskopi av biologiskt material. Biologiska preparat behöver inte färgas för att skapa kontrast i bilderna på samma sätt som i ett TEM, eftersom det i huvudsak använder sig av mörkfältsmikroskopi. "Elektronfärgerna" stör analysen eftersom även de sänder ut röntgenstrålning.

Ett annat sätt att analysera kemisk sammansättning är att mäta energin hos elektroner som spritt sig inelastiskt genom preparatet med en elektronspektrometer. Spektrometern består av ett magnetfält, som elektronerna träder in i efter att de lämnat preparatet. När elektronerna påverkas av det magnetiska fältet kommer de att separeras beroende på deras hastighet. Med hjälp av detta kan antalet elektroner med en speciell hastighet analyseras en hastighet i taget.

Vad används detta spektrum till? Jo, det är nämligen så att för att excitera en elektron i det innersta skalet hos en godtycklig atom krävs en energi som är specifik för dess atomnummer. Skulle ett mycket högre antal elektroner än väntat ha 285 eV mindre energi än vad de hade innan de innan de träffade preparatet kan man dra den säkra slutsatsen att det består till stora delar av kol, då detta är precis den energin som krävs för att excitera en elektron i innersta skalet hos en kolatom.



Mörkfält- respektive ljusfältsmikroskopi som talande visar på hur de båda metoderna ser sig i förhållande till varandra.

### Tillämpning

Ett STEMs främsta användningsområde är att studera ytterst små saker. STEM har en förstoring på upp till två miljoner gånger. Ett vanligt ljusmikroskop har en förstoring på enbart 2000 gånger. Detta har forskare på Oxford University, University of Bristol och Brookhaven Lab använt sig av när de studerade ett proteinkomplex på ytan av tarmbakterien Shigella i hopp om att få bättre förståelse för sjukdomen samt framtagningen av ett botemedel.

Det är dessa bakterier som orsakar tarminflammationen Dysenter. Det är på ytan av bakterien som proteinkomplexet sitter och där fungerar det som en biologisk spruta som injicerar dödliga proteiner i tarmens olika celler. Liknande proteinkomplex finns i en rad olika bakterier, bland annat de som orsakar tyoidfeber och pest.

För att bekämpa bakterieinfektionen är det viktigt att förstå dess struktur och det är här STEM kommer in i bilden. Tidigare studier visar att proteinkomplex består av 25 olika typer av protein i tre större delar. Men för att kunna få en djupare insikt om sjukdomen krävs det mer förståelse hur de olika proteindelarna samverkar och påverkar varandra. För detta krävs det en högre upplösning strukturell information och mer kunskap om den kemiska sammansättningen, och det är tack vare kombinationen av STEM och TEM som forskare nu har kunnat avslöja nya detaljer om dess komplicerade struktur.

Den nya studien visade detaljer om enskilda subenheter och hur allt är orienterat. Detta har gett en noggrannare modell och därmed utvecklad förståelse hur injektionen fungerar. Vilket i sin tur har gjort att de är ett steg närmare att utveckla inhibitorer som ska kunna förebygga bakterieinfektioner. Så en dag är det kanske STEM som hjälper till att vi undviker att få bakterieinfektioner.

### Referenser

- Jeanne Ayache, Luc Beauvier, Jacqueline Boumendil, Gabrielle Ehret and Danièle Laub. (2010). *Sample preparation handbook for Transmission electron microscopy*. New York. Springer Science+Business Media.
- N. D. Browning, E. M. James, K. Kishida, I. Arslan, J. P. Buba, J. A. Zaborac, S. J. Pennycook, Y. Xin1 and G. Duscher. (2000). Scanning Transmission Electron Microscopy: An experimental tool for atomic scale interface science. *Rev. Adv. Met. Sci.* 1, 1-26.
- A. R. Lupini, M. F. Chisholm, M. Varela, K. Van Benthem, A. Y. Borisevich, Y. Peng, W. H. Sides, J. T. Luck and S. J. Pennycook. (2005). Sub-Ångström and 3-dimensional STEM for semiconductor research. A. G. Cullis, J. L. Hutchison. *Microscopy of Semiconducting Materials*. New York. Springer Science+Business Media.
- <http://www.vardguiden.se/Sjukdomar-och-rad/Omraden/Sjukdomar-och-besvar/Dysenteri/>
- <http://www.azonano.com/news.aspx?newsID=11114&lang=sv>
- Richard Wheeler (Zephyris). Diagram showing the light path in a dark field microscope. 6 August 2006 (original upload date)
- Richard Wheeler (Zephyris). Micrograph of Whatman lens tissue paper. Bright field illumination. 10x magnification, 1.559 µm/px. 29 June 2010
- Richard Wheeler (Zephyris). Micrograph of Whatman lens tissue paper. Dark field illumination. 10x magnification, 1.559 µm/px. 29 June 2010
- Alla använda bilder är upplagda på internet under Creative Commons GNU Free Documentation License och är alltså våra att använda samt till och med ändra på i denna poster så länge vi refererar till upphovsmannen.