

С.В. Немова

ООО «ИНТЕРО», Киев

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ И СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ: НОВЫЕ УСТАНОВКИ ОТ LEICA MICROSYSTEMS ДЛЯ НАНЕСЕНИЯ ПОКРЫТИЙ



Представлена информация о новых настольных установках от Leica Microsystems для нанесения токопроводящих покрытий в вакууме. Представлена информация о технических характеристиках и области использования данных установок.

Ключевые слова: нанотехнологии, электронная микроскопия, анализ микроструктур, реплика, автоматическое управление, уровень вакуума.

Электронная микроскопия — это метод исследования структур, находящихся вне пределов видимости светового микроскопа и имеющих размеры менее одного микрона (от 1 мк до 1–5 Å). Различают два главных направления электронной микроскопии: *трансмиссионную* (просвечивающую — ПЭМ) и *растровую* (сканирующую — СЭМ), основанных на использовании соответствующих типов электронных микроскопов и дающих качественно различную информацию об объекте исследования. Часто оба типа электронных микроскопов применяются совместно.

Наиболее трудным этапом электронно-микроскопических исследований является пробоподготовка образца, так как электронный микроскоп — это прецизионный прибор, который требует особых методов приготовления препаратов. Специальная подготовка образцов необходима для выявления отдельных компонентов изучаемых объектов (клетки, бактерии, ви-

русы и т. д.), а также для сохранения их структуры в условиях высокого вакуума под пучком электронов. При подготовке образцов используют *прямой* и *косвенный* методы.

Прямой метод — это метод тонкопленочных образцов. Тонкопленочные образцы готовят различными способами: резкой на ультрамикротоме; травлением или электрополировкой; плавлением с отливкой тонкой пленки.

Косвенные методы исследований предполагают приготовление специальных тонких слепков (реplik) с поверхности шлифа или излома исследуемого образца. Материал реплики должен обладать способностью точно воспроизводить особенности микрорельефа, быть бесструктурным, химически устойчивым, достаточно прозрачным, в малой степени рассеивать электроны и отделяться от поверхности образца без разрушения.

Метод реплик применяют:

- ✦ для изучения рельефа массивных объектов, непрозрачных для формирующих изображение электронов;



Рис. 1. Leica EM ACE 200. Общий вид

- ✦ для непроводящих образцов (исследование таких материалов в электронных микроскопах затруднено из-за накопления поверхностного заряда);
- ✦ для исследования структуры выделений, фиксируемых на реплике.

Реплики получают с поверхности образцов с хорошим поверхностным рельефом, характеризующим микроструктуру образца. Самым распространенным методом приготовления реплик является метод напыления тонкой (чаще всего углеродной) пленки.

В этом году компания Leica Microsystems представила на рынок новое поколение установок для нанесения покрытий при изготовлении реплик. Это два прибора из серии Leica EM ACE (Advanced Coating Experience for Electron Microscope): модели EM ACE 200 и EM ACE 600.

В производстве данных установок учтены все требования, необходимые для подготовки образцов от напыления покрытий до криоскальвания. Задача производителя очень ясна — сделать процесс напыления простым, быстрым и надежным для достижения наилучшего изображения образца в электронном микроскопе.

Нанесение проводящего слоя на образец пре-

пятствует накоплению заряда, снижает термальные повреждения и улучшает вторичный электронный сигнал, требуемый для топографических исследований в СЭМ. Тонкие слои углерода, прозрачные, но проводящие для электронов, необходимы для рентгеновского микроанализа, для поддержки пленок на сетках и резервных реплик для отображения методом ПЭМ. Техника нанесения покрытий зависит в основном от разрешения и области применения. Семейство приборов Leica EM ACE обеспечит прекрасный результат в любой области применений.

Устройства Leica EM ACE выполнены в двух вариантах: Leica EM ACE 200 — для напыления в низком вакууме (до 7×10^{-3} mbar) для обычного СЭМ- и ТЭМ-анализа и Leica EM ACE 600 — прибор для напыления в высоком вакууме (до 2×10^{-7} mbar) для анализа с высоким разрешением в ПЭМ и ПЭ-СЭМ и возможностью доукомплектации криовакуумной системой переноса образца. Оба устройства эргономичны, компактны, с автоматическим управлением. Настройки программ могут быть заданы с помощью мультипользовательского сенсорного меню, можно запрограммировать прибор под индивидуальные задачи лаборатории.

Leica EM ACE 200 (рис. 1) — высококачественный настольный прибор предназначен для нанесения напыления проводящего слоя металлов или углерода для требований электронной микроскопии. Эта полностью автоматическая модель может быть сконфигурирована либо для разбрызгивания металла, либо для испарения углеродной нити. Прибор может при необходимости комбинировать оба метода с заменой головок инструмента перед каждым методом. Дополнительные опции включают:

- ✦ планетарное вращение столика — для равномерного распределения материала покрытия на трещиноватые образцы;
- ✦ функцию «глеющий разряд» — для изготовления гидрофильных сеток для ПЭМ;
- ✦ функцию «сменное экранирование» — для удобства чистки камеры.

Прибор позволяет наносить высоковоспроизводимые и ровные слои углерода толщиной до 40 нм с установленными границами и аккуратно осажденные благодаря уникальному управлению процессом с помощью программного обеспечения. Испарение углеродной нити проходит по импульсной процедуре в сочетании с постоянным отслеживанием толщины (кварцевое измерение).

Leica EM ACE 600 (рис. 2) — система для осаждения пленок в высоком вакууме, предназначенная для нанесения очень тонкого, мелкозернистого, проводящего металлического или углеродного покрытия с целью проведения анализа с высоким разрешением для применения в полевой эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (ПЭ-СЭМ) и ПЭМ. Этот полностью автоматический настольный прибор включает встроенную безмасляную насосную систему, кварцевый кристалл для измерения толщины пленки, трехосевой моторизованный столик с функциями поворота, дополнительного наклона и изменения по высоте.

Прибор может применяться для:

- ✦ напыление металлов;
- ✦ испарения углеродной нити;
- ✦ испарения углеродного стержня (с опцией для термального испарения);
- ✦ электронно-лучевого испарения;
- ✦ тлеющего разряда;
- ✦ адаптации криовакуумной системы переноса образцов Leica EM VCT 100 для методов криопокрытия, криоскальвания, двойной реплики, криосушки и транспортировки без воздействия окружающих факторов с помощью VCT-шатла.

Прибор **Leica EM ACE 600**, снабженный системой криопереноса Leica EM VCT 100 (рис. 3), является идеальным решением для подготовки образцов в крио-СЭМ в условиях полного контроля над окружающими факторами. В случае, когда система сконфигурирована для использования криометодик, столики для работы при комнатной температуре меняются на крио столики. Светодиодный ис-



Рис. 2. Leica EM ACE 600. Общий вид



Рис. 3. Leica EM ACE 600 с криопроставкой

точник освещения позволяет осветить камеру, и можно наблюдать весь процесс напыления. В функции Leica EM ACE 600 с криосистемой Leica EM VCT 100 включены:

- ✦ достижение высокого вакуума до 2×10^{-7} mbar с помощью крионасоса;
- ✦ управление температурой для криоскальвания, и криосушки;
- ✦ регулировка высоты ножа для скальвания с помощью моторизованного привода;
- ✦ снятие двойной реплики;
- ✦ настройка вспомогательных параметров и автоматический запуск всех циклов напыления;

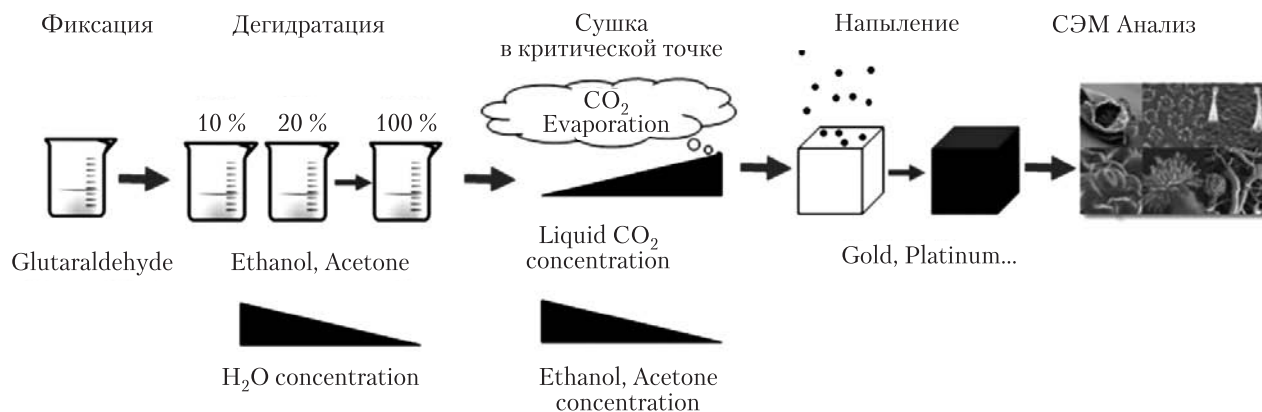


Рис. 4. Этапы подготовки образца для СЭМ-анализа



Рис. 5. Автоматическая линия подготовки образцов

✦ обеспечение постоянного нахождения образца в криоусловиях благодаря вакуумному криопереносу.

Одной из проблем изучения морфологии биологических образцов является сохранение структуры для исследования методом СЭМ. Образцы должны быть сухими, чтобы быть совместимыми в вакууме микроскопа. Присутствие молекул воды будет нарушать вакуум и, соответственно, изображение. Это также вызовет обширную деформацию или разрушение структур при исследовании непосредственно под электронным микроскопом. Вода имеет высокое поверхностное натяжение по сравнению с воздухом. Пересекая границу между жидкой и газообразной фазой во время испарения (воздушная сушка), тангенциальные силы, вызываемые поверхностным натяжением, могут повлиять на нано- и микроструктуры образца.

Сушка в критической точке является самым современным методом для сохранения морфологии

образца. В критической точке физические характеристики жидкости и газа неразличимы. Если изучаемый объект может быть преобразован в критической точке в жидкость или газ без перехода между жидкой и газообразной средой, то возможность его повреждения исключается. Дегидратация образцов в критической точке невыполнима до условий 374 °С и 229 бар, когда любой биологический образец будет разрушен. Для преодоления этой проблемы воду можно заменить жидким диоксидом углерода (CO_2), чья критическая точка находится при 31 °С и 74 бар. Эта процедура более подходит для всех биологических применений и технически легко выполнима.

Однако CO_2 имеет серьезный недостаток как переходная жидкость, потому что он нерастворим в воде и не смешивается с ней. Поэтому воду нужно сначала заменить метанолом или ацетоном, т. е. веществом, которое может смешиваться как с водой, так и с диоксидом угле-

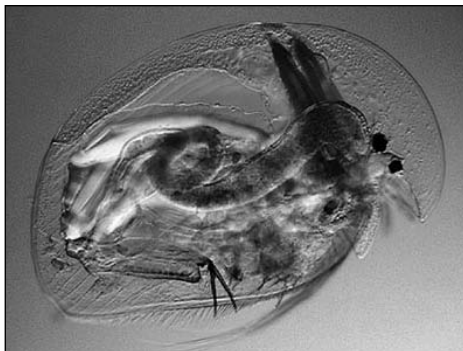


Рис. 6. Дафния (водяная блоха *Daphnia sp.*) — общий вид

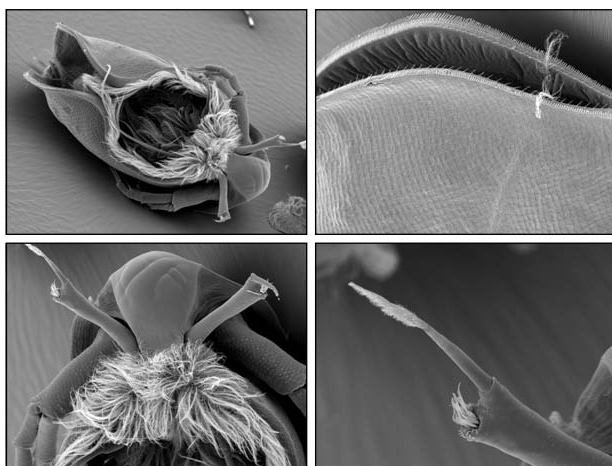


Рис. 7. Дафния (водяная блоха *Daphnia sp.*) — изображение под СЭМ

рода CO_2 . Обе эти жидкости не могут быть использованы для сушки в критической точке, потому что у них высокие температуры критической точки (Ethanol: P_c 60 bar / T_c 241 °C; Acetone: P_c 46 bar / T_c 235 °C). После замены воды промежуточной жидкостью последняя заменяется жидким диоксидом углерода, который приводится к критической точке перехода в газообразную фазу в процессе снижения давления при постоянной температуре критической точки.

Таким образом, для подготовки биологического образца, содержащего воду, с целью сохранения его структуры в условиях вакуума под сканирующим электронным микроскопом необходимо пройти следующие этапы подготовки (рис. 4, 5):

1) фиксация: перекрестное связывание протеинов для того, чтобы увеличить механическую и термальную стабильность;

2) дегидратация: повышение концентрации замещающей жидкости заменяет воду в образце (автоматизация процесса двух первых этапов осуществима с помощью автоматического процессора для фиксации и дегидратации Leica EM TP);

3) замена замещающей жидкости на жидкий диоксид углерода CO_2 (чистка) в образце, затем сушка в критической точке (для автоматизации процесса третьего этапа подготовки может быть использован Leica EM CPD300 — автомат для сушки в критической точке);

4) напыление проводящего покрытия для анализа методом СЭМ.

Фирма Leica Microsystems предлагает полный модельный ряд приборов для подготовки образцов в электронной микроскопии и новые установки для нанесения покрытий. Приборы Leica EM ACE отлично «вписываются» в производственный процесс. Только при выполнении каждого шага подготовки образцов с наивысшим качеством можно достичь оптимальных результатов в электронной микроскопии высокого разрешения.

Наведем пример успешного применения приборов фирмы Leica Microsystems.

На рис. 6 и 7 наведены результаты, любезно представленные *Д. Грубером* (D. Gruber), Венский Университет (University of Vienna, Austria), — дафния (водяная блоха): общий вид и изображение под сканирующим электронным микроскопом с различным увеличением.

С.В. Нємова

ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ ДЛЯ ПРОСВІЧУЮЧОЇ
ТА СКАНУЮЧОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ:
НОВІ УСТАНОВКИ ВІД LEICA MICROSYSTEMS
ДЛЯ НАНЕСЕННЯ ПОКРИТТІВ

Надана інформація про нові настільні установки від Leica Microsystems для нанесення струмопровідних покриттів в вакуумі. Представлена інформація про технічні характеристики та область застосування таких установок.

Ключові слова: нанотехнології, електронна мікроскопія, аналіз мікроструктур, репліка, автоматичне управління, рівень вакууму.

S.V. Niemova

SAMPLE PREPARATION FOR TEM AND FE-SEM:
NEW GENERATION COATERS FROM LEICA
MICROSYSTEMS

The article informs about new desktop coaters for application of conductive layers in vacuum from Leica Microsystems. There are information about technical data and field of application of the coaters.

Key words: nanotechnology, electron microscopy, microstructure analysis, replica, automatic control, vacuum level.

Стаття надійшла до редакції 16.12.13