

## Il microscopio elettronico:

**oltre la lunghezza d'onda della luce visibile**

### **Perché utilizzare gli elettroni come radiazione:**

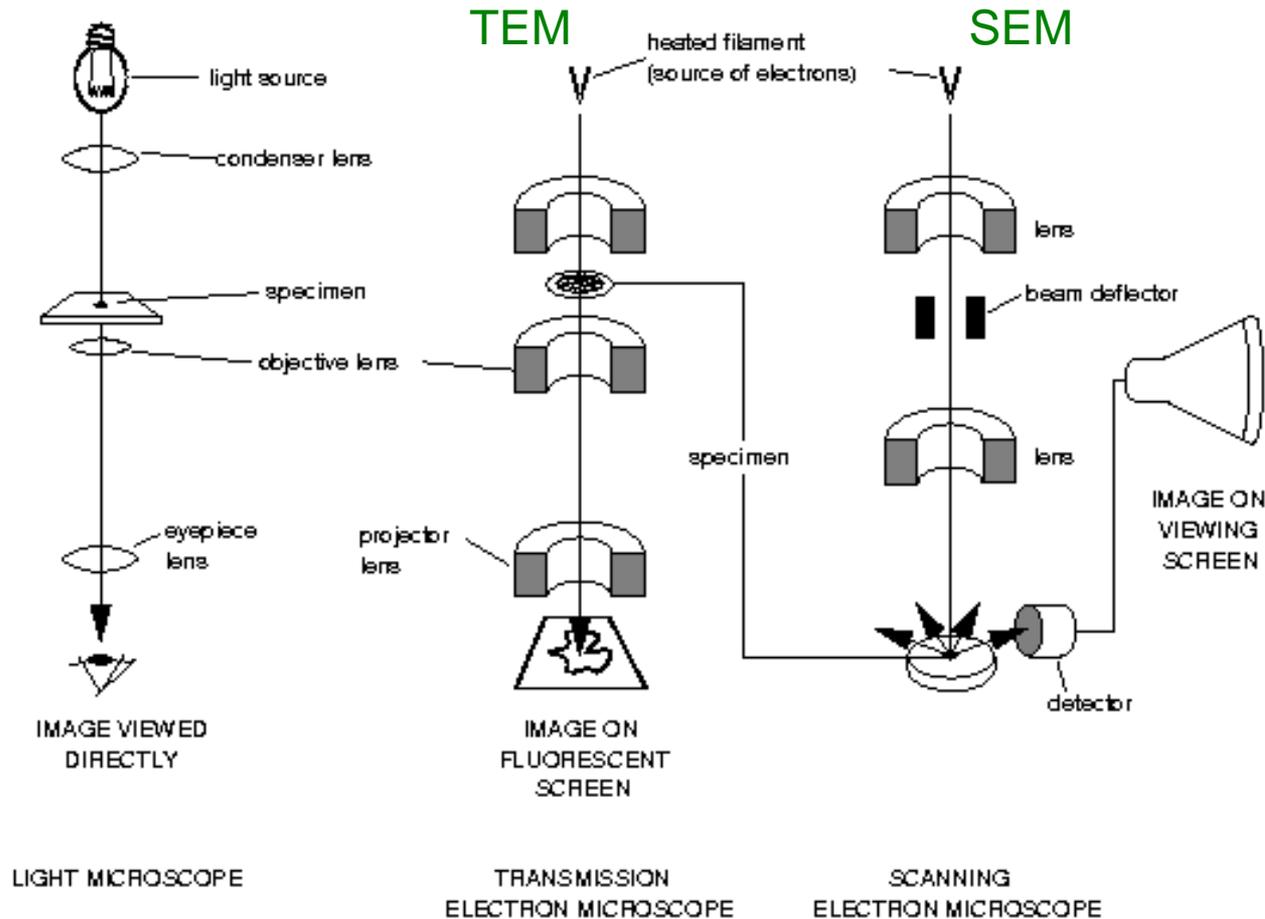
- si possono produrre facilmente (fotoemissione, emissione termoionica, elettroni secondari, emissione di campo)
- hanno lunghezze d'onda molto corte (e modulabili)
- gli elettroni interagiscono con la materia e possono essere rivelati facilmente

la lunghezza d'onda degli elettroni è modulabile mediante il potenziale di accelerazione che serve a creare un fascio. Un potenziale di accelerazione più alto permette:

- lunghezze d'onda minori
- penetrazione maggiore
- **minore contrasto**

# Il microscopio elettronico:

## I tipi diversi di microscopi

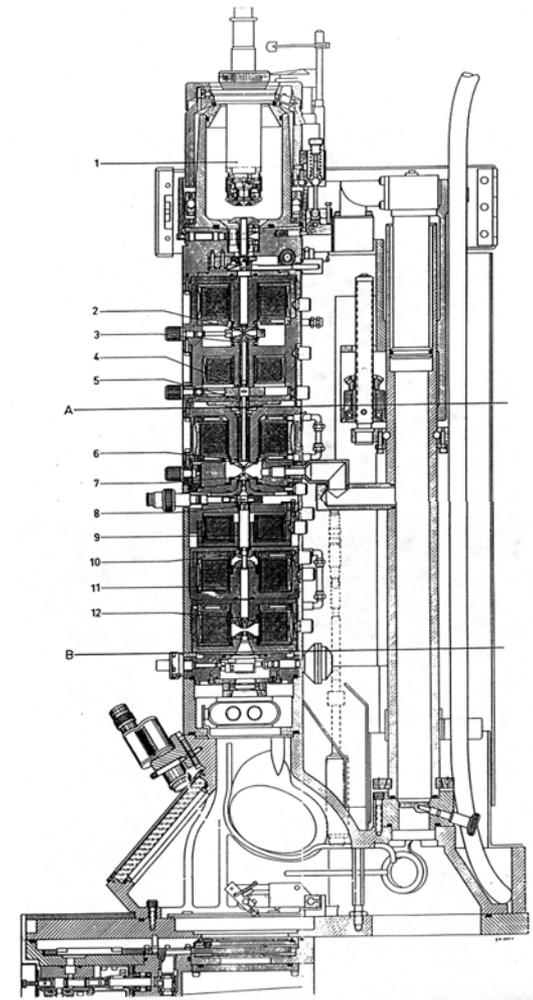


Il microscopio elettronico lavora **sotto vuoto**

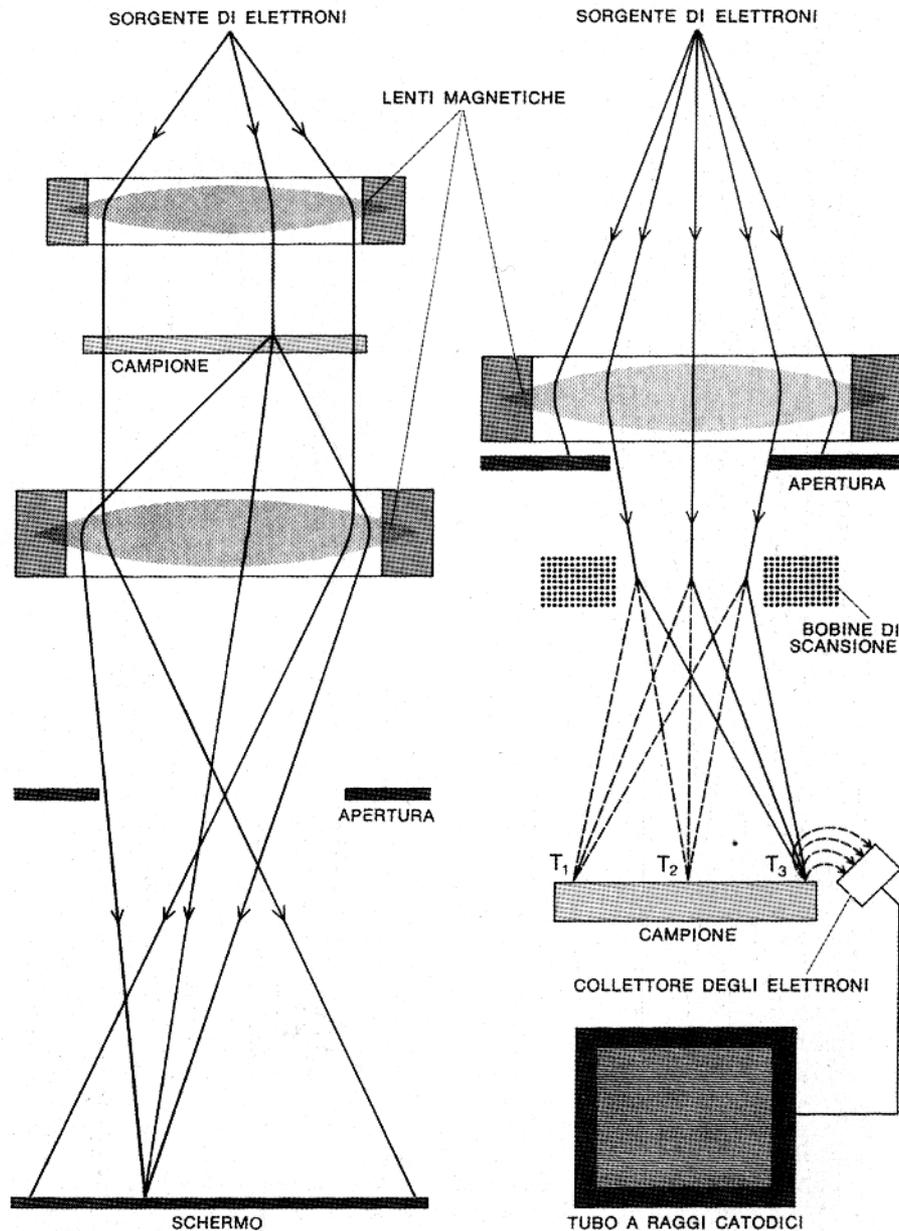
# Alcune date importanti per la microscopia elettronica

*Year Application/development/instrumentation*

- 1934 first operational TEM (Ruska, Knoll)
- 1934 resolution exceeds that of LM (Driest, Muller)
- 1934 first images of biological material (Marton)
- 1938 first commercial EM (Siemens)
- 1940-1950 replicas in material science 50KV, one condenser ~10nm resolution
- 1946 shadowing (Williams & Wyckoff)
- 1947 OsO<sub>4</sub>, slow speed ultramicrotome, floating sections for biology
- 1949 first publication on TEM of thin foils (Heidenreich)
- 1950 glass knives
- 1950-1960 materials scientists work on thin foils from bulk and deposited samples, see defects and phase transitions at ~0.5-2nm resolution
- 1952 first good fixation in biology (Palade)
- 1953 diamond knives, first good commercial ultramicrotome
- 1955 negative staining (Hall)
- 1957 freeze fracture replication (Steere)
- 1959 protein monolayer technique for nucleic acids (Kleinschmidt & Zahn)
- 1960-1970 first HVEMs (Toulouse 1.2 & 3MeV)
- 1963 glutaraldehyde fixation
- 1964 first good SEMs, resolving ~ 10nm
- 1970-1980 high resolution imaging theory developed, wide use of lattice imaging, analytical TEM/STEM, EDX, EELS
- 1981 STM
- 1980- present- various scanned probe microscopies, PEELS, UHV, cryo, atomic resolution almost routine in some systems
- 1986 Ruska, Binnig, Rohrer get Nobel prize



# Schema di funzionamento dei microscopi elettronici a trasmissione (TEM) ed a scansione (SEM)



# Come si presentano i microscopi elettronici

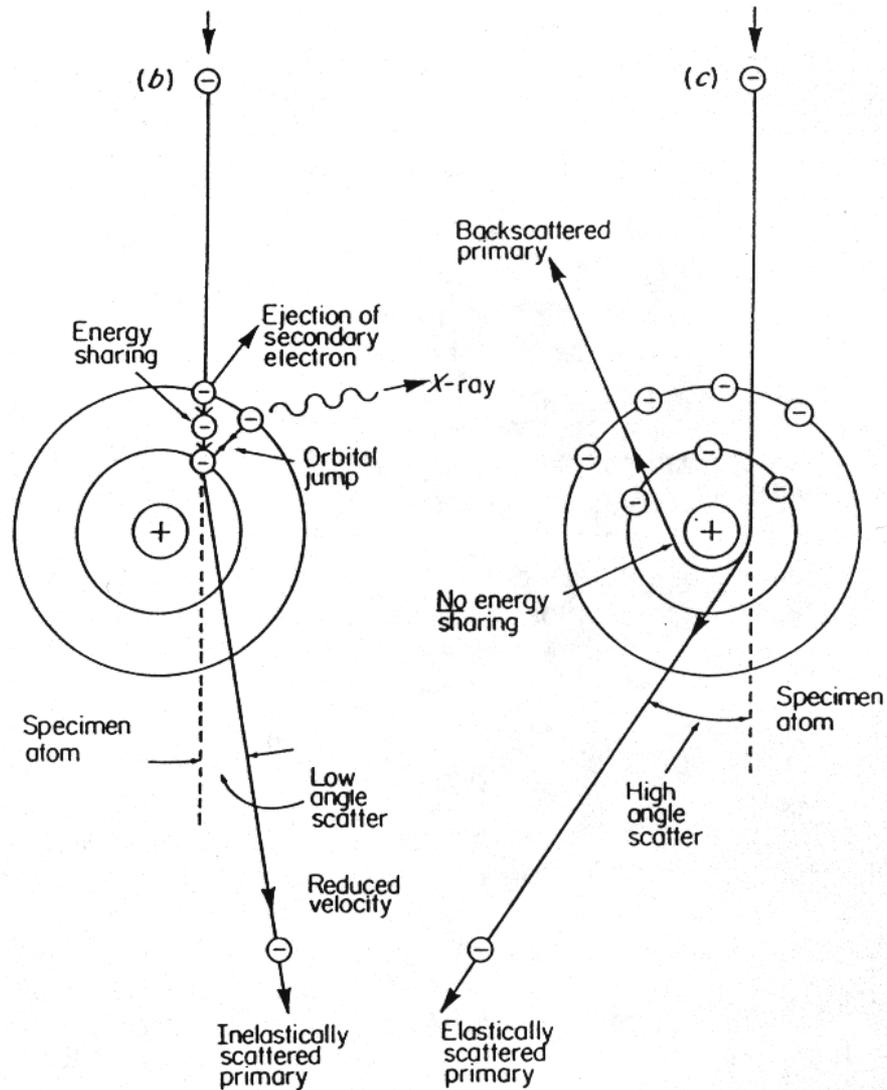
TEM



SEM



# L'interazione degli elettroni con la materia



Nella microscopia elettronica dei campioni biologici, uno dei problemi maggiori è il **contrasto**

in TEM l'immagine osservata sullo schermo o registrata sulla pellicola fotografica dipende dalla differenza nel numero di elettroni per unità di area superficiale e tempo che colpiscono il piano dell'immagine: è il campione che modula l'intensità elettronica sull'immagine. Il numero di elettroni che colpisce lo schermo dipende da:

- **Scattering elastico**
- **Scattering anelastico**
- **Diffrazione**
- **Assorbimento**
- **Rumore elettronico**

diverse cose possono succedere agli elettroni che attraversano un campione sottile. Possono interagire con i nuclei atomici o con gli elettroni che li circondano o possono attraversarli senza interagire con niente (come capita alla maggior parte degli elettroni per i campioni sottili). Per un dato materiale, la probabilità che un elettrone sia disperso (scattering) dipende dallo spessore, poiché più è spesso e maggiore è la probabilità di urti. Per diversi materiali, la probabilità dipende anche dal numero atomico del materiale, poiché materiali con numero atomico più alto avranno nuclei più grossi ed un numero maggiore di elettroni che li circondano. Un elettrone che incontra un nucleo viene deflesso con un grosso angolo, ma non perderà energia (**scattering elastico**): viene rimosso dal fascio elettronico grazie ad un diaframma. Questa è l'origine del contrasto di ampiezza delle micrografie TEM, quello comunemente utilizzato.

# L'interazione degli elettroni con la materia

Gli elettroni hanno **lunghezza d'onda variabile**, dipendente dal modo in cui sono prodotti: il microscopio elettronico può utilizzare radiazioni di lunghezza d'onda tale da poter osservare gli atomi. Sfortunatamente una radiazione elettronica a bassa lunghezza d'onda ha alta energia e distrugge i campioni fragili (tutti i campioni biologici).

La lunghezza d'onda degli elettroni dipende dalla loro velocità, e quindi dal potenziale di accelerazione impiegato

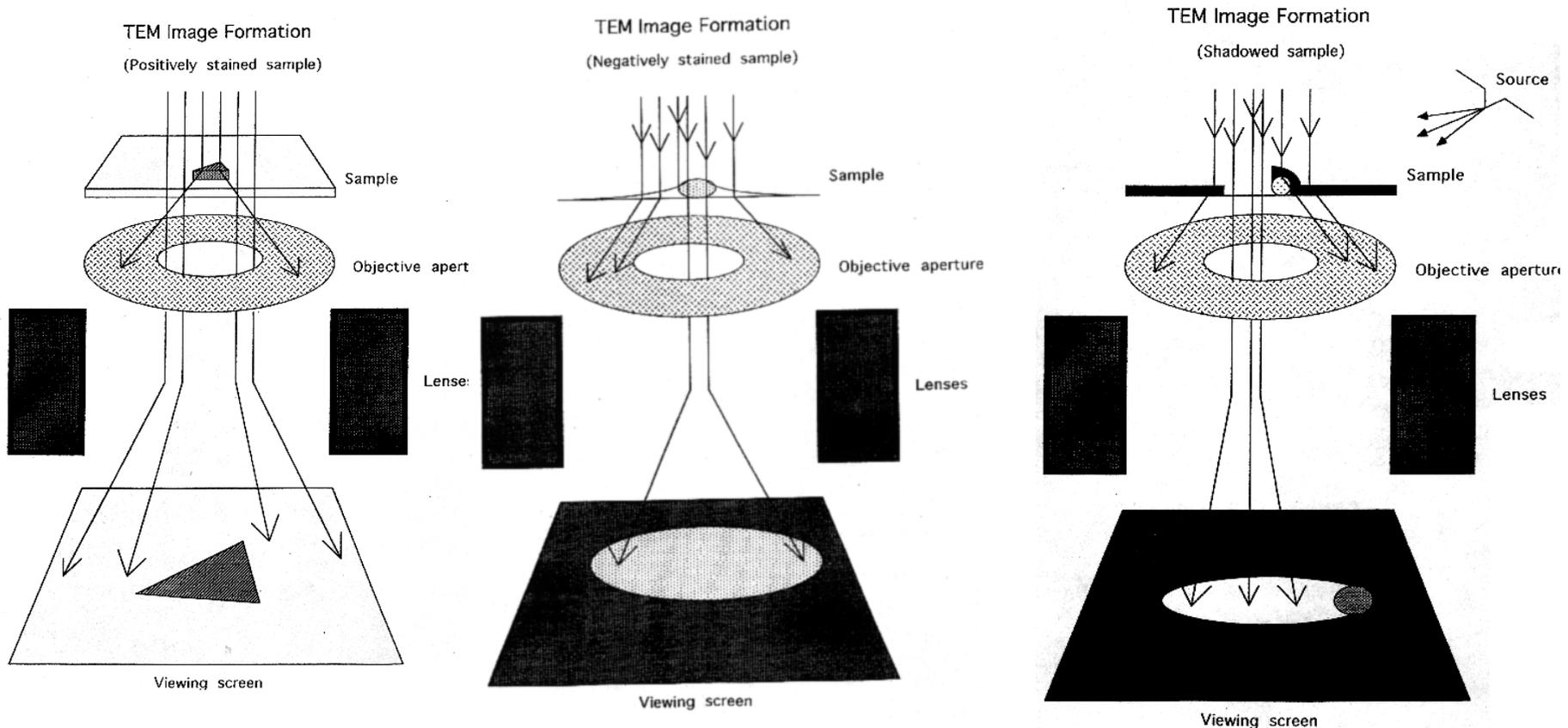
$$\lambda = \frac{h}{p} = h(2meE)^{1/2} \cong \left( \frac{150}{E} \right)^{1/2}$$

se E è in elettronvolt. Ad esempio, E=100 keV,  $\lambda=0.037 \text{ \AA}$ .

Ma la risoluzione è, in realtà, fortemente limitata da fenomeni di diffrazione e di aberrazione (sferica) delle lenti (le lenti magnetiche sono molto meno efficienti delle lenti ottiche) e il limite corrente di risoluzione per un'accelerazione di 100 kV è intorno ai 3  $\text{\AA}$ .

# Tre tipologie di contrasto in TEM: positive staining, negative staining e shadowing

Tecniche differenti sfruttano diversi aspetti dell'interazione degli elettroni con la materia, permettendo di avere informazioni (e contrasto) dipendente dallo spessore del campione, dalla sua conformazione superficiale, dalla sua composizione o struttura. La dispersione degli elettroni è alta se questi incontrano elementi atomici pesanti: la EM sfrutta **coloranti** opportuni per visualizzare elementi specifici



## La colonna del microscopio deve essere sotto vuoto

- per evitare lo scattering degli elettroni
- per mantenere un'alta tensione stabile
- per prolungare la vita della sorgente di elettroni (il filamento)
- per ridurre le contaminazioni

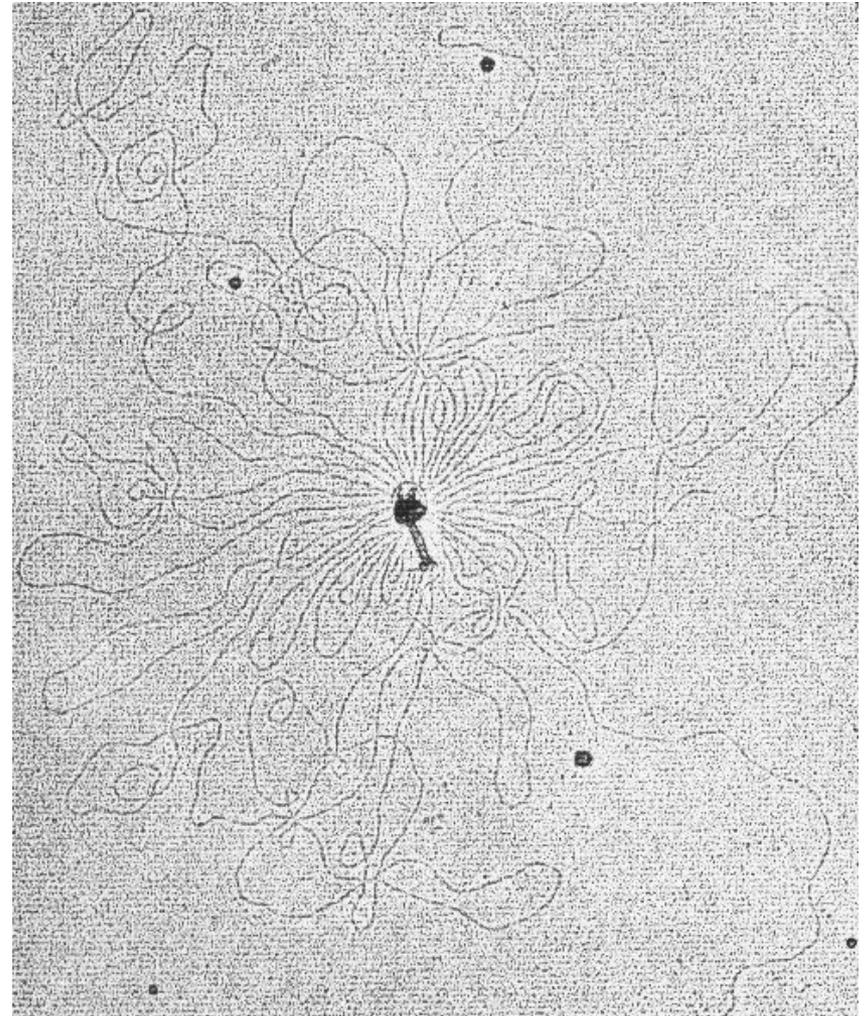
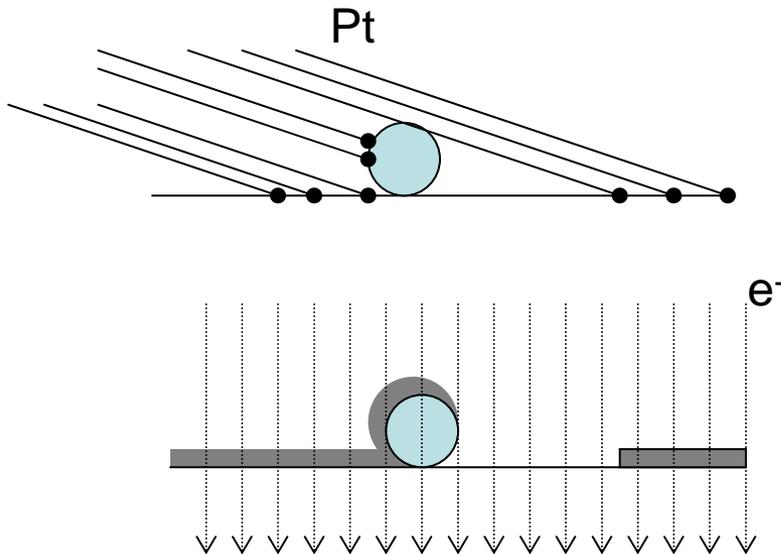
il cammino libero medio (MFP) degli elettroni deve essere almeno lungo come la colonna dell'EM

<u>P</u>	<u>MFP</u>
$10^5$ Pa	660 Å.
$10^{-3}$ Pa	6.6 m
$10^{-7}$ Pa	6600 m

(1 Torr=1.32 mbar=1 mmHg=132 Pa; 1 atm=760 Torr=101000 Pa)

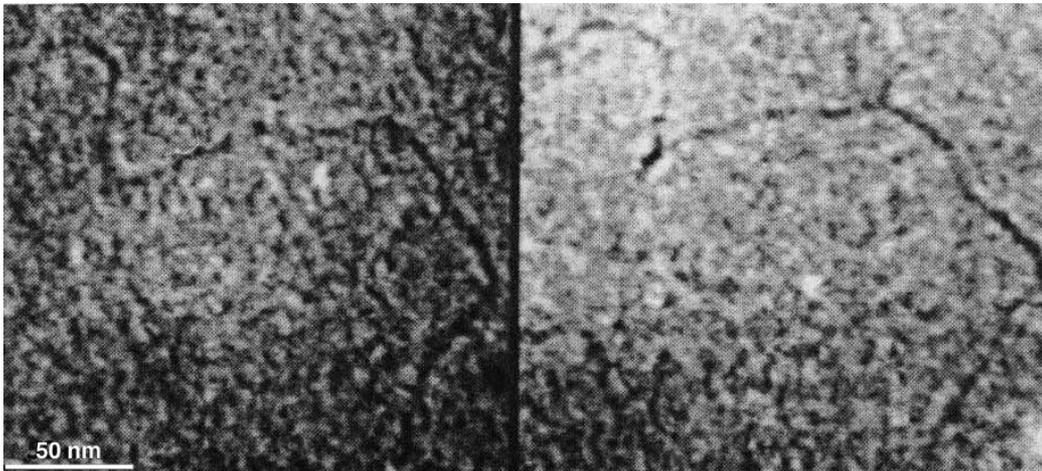
# Il DNA osservato al microscopio elettronico

Varie tecniche sono state sviluppate per l'osservazione del DNA con il TEM: tecniche di contrasto (positive staining, shadowing) e di deposizione (su citocromo, con detergenti, su mica). Sotto, shadowing con Pt su DNA ricoperto di citocromo C (immagine di Kleinshmidt e collaboratori)



In **CRIMICROSCOPIA ELETTRONICA** il campione (un volume molto piccolo di soluzione acquosa) è congelato molto velocemente mediante immersione in etano liquido. L'acqua vetrifica (non cristallizza) e blocca ogni movimento del campione. Durante tutta la misura il campione deve essere mantenuto a temperatura bassa ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ed osservato per poco tempo per non danneggiarlo.

In genere il campione non è colorato con alcun metallo pesante, per cui il **contrasto delle immagini è molto basso** (le immagini sono brutte a vedersi). Spesso si sfrutta il “contrasto di fase” che si ottiene guardando le immagini sfocate. **La risoluzione delle immagini è però molto alta** e ricostruendo matematicamente l'immagine a fuoco si ottengono micrografie con dettaglio molto fine. Registrando coppie di immagini a due diversi angoli di visione si ottiene una immagine tridimensionale del campione.



Coppia di immagini di DNA al criomicroscopio elettronico (immagini di I. Dustin e collaboratori)

# La preparazione dei campioni per criomicroscopia elettronica

