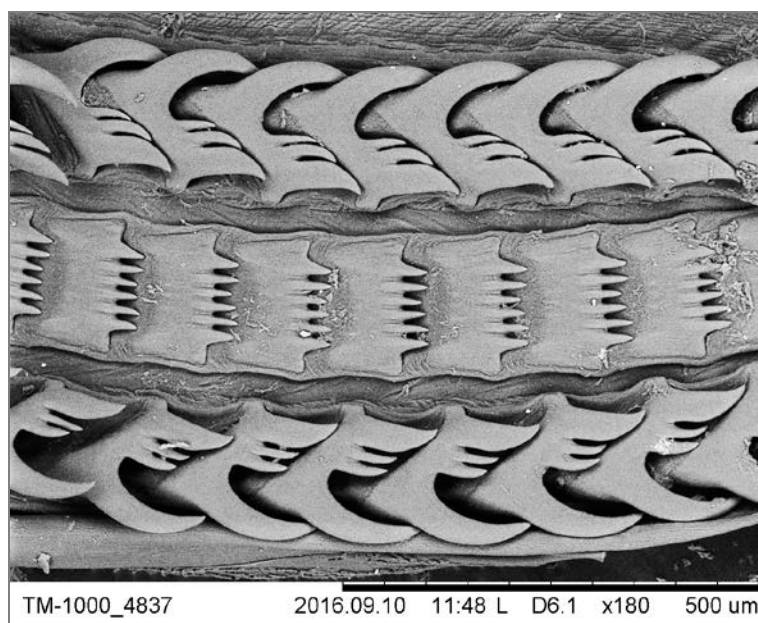


А. В. Голиков, А. В. Беспятых, Р. М. Сабиров

**РАСТРОВЫЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП
НІТАСНІ ТМ - 1000**

Использование в биологических исследованиях

Учебно-методическое пособие



**КАЗАНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
2018**

УДК 57.086.3: 591

ББК 28с

С 59

Печатается по рекомендации Учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии КФУ,
протокол № 2 от 27 марта 2018 г.

Рецензент -

В. н. с. Междисциплинарного центра аналитической микроскопии КФУ,
д. б. н., профессор **Сальников В. В.**

Голиков А. В.

С 59 Растровый электронный микроскоп Hitachi TM - 1000: использование в биологических исследованиях. Учебно-методическое пособие / Голиков А.В., Беспятых А.В., Сабиров Р.М. / – Казань: Казан. ун-т, 2018. – Учебно-методическое пособие. – 24 с.

В учебно-методическом пособии рассмотрены поэтапные действия при подготовке и исследовании биологического материала на настольном растровом электронном микроскопе Hitachi TM – 1000. Предназначено для студентов биологического направления подготовки, изучающих курсы «Современные методы в зоологических исследованиях», «Электронная микроскопия», «Большой практикум по зоологии», «Физико-химические методы биологических исследований» и др., а также для студентов медицинских, сельскохозяйственных, ветеринарных и педагогических направлений подготовки.

Фотографии объектов, полученные на растровом электронном микроскопе Hitachi TM – 1000 без напыления: на 1-й стр. обложки – аберрантное образование в мадрепоровой пластинке морской звезды *Asterias rubens* при разных увеличениях; на 4-й стр. обложки – чешуйки на крыле тропического парусника *Papilio blumei*, элемент скелета морской звезды *A. rubens*, тарзальный членик ходильной конечности паука *Araneus sp.*, хелицеры паука *Neoscona adianta*, стаболит золотой каракатицы *Sepia esculenta*; на 1-й стр. – фрагмент радулы брюхоногого моллюска трубача *Vuccinum sp.*

УДК 57.086.3: 591

ББК 28с

© Голиков А.В., Беспятых А.В.,
Сабиров Р.М., 2018

© Казанский университет, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С РЭМ	5
2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОДГОТОВКЕ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НА РЭМ	6
3. УСТАНОВКА ОБРАЗЦА НА СМОТРОВУЮ ПЛОЩАДКУ И В РАБОЧУЮ КАМЕРУ РЭМ	7
4. ВКЛЮЧЕНИЕ МИКРОСКОПА	11
5. ПРОСМОТР ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЯ И ЗАПИСЬ ДАННЫХ	14
6. ВЫКЛЮЧЕНИЕ МИКРОСКОПА	23
ЛИТЕРАТУРА	24

ВВЕДЕНИЕ

Микроскопы очень широко применяются в научных лабораториях по всему миру. Световые микроскопы были изобретены еще в конце XVI века, электронная микроскопия началась с теоретических работ немецкого физика Ганса Буша (H. Busch, 1926) о влиянии электромагнитного поля на траекторию заряженных частиц. Первый растровый электронный микроскоп (РЭМ) был сконструирован в Германии в 1938 г. Манфредом фон Арденне (M. von Ardenne). Но наиболее близкий к современной конструкции РЭМ появился в 1942 г. в США - его автором был русский эмигрант Владимир Зворыкин.

Принципиальная схема работы современных РЭМ следующая: 1) электронный пучок направляется на анализируемый образец; 2) в результате взаимодействия генерируются низкоэнергетичные вторичные электроны, которые собираются детектором вторичных электронов. Интенсивность электрического сигнала детектора зависит как от природы образца (в меньшей степени), так и от топографии (в большей степени) образца в области взаимодействия. Таким образом, становится возможным получить карту рельефа проанализированной зоны. РЭМ является вакуумным прибором, так как при нормальном атмосферном давлении электронный пучок сильно рассеивается и поглощается, что делает невозможным его фокусировку. Поэтому рабочий вакуум в камере микроскопа должен быть 10^{-5} Па или более высокий. В вакууме электронный зонд генерируется электронной пушкой (играет роль источника электронов), и фокусируется электронными линзами. Современный растровый электронный микроскоп позволяет работать в широком и плавно перестраиваемом диапазоне увеличений от 10 х до 1'000'000 х, что почти в 500 раз превышает предел увеличения лучших оптических микроскопов.

РЭМ Hitachi TM-1000 - это компактный настольный микроскоп, не требующий трудоемкой подготовки образцов для изучения и сложной настройки прибора для процесса микроскопирования. На 2 и 3 с. обложки данного пособия показан внешний вид РЭМ Hitachi TM-1000 и основные управляющие элементы. Главное достоинство данного РЭМ – простота в эксплуатации и возможность получения качественного изображения морфологии и структуры поверхности исследуемого образца с увеличением до 10'000 раз.

1. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С РЭМ

Электронный микроскоп Hitachi TM-1000 в сборе весит около 70 кг. Поэтому его нельзя передвигать, поднимать и переносить одному человеку. При перемещении РЭМ следует соблюдать осторожность, чтобы не травмироваться или не повредить прибор.

Нельзя открывать крышки основного и управляющего блоков микроскопов, внутри них высокое напряжение (100 Вт, 15 кВт). Прикосновение к внутренним деталям и узлам прибора может привести к серьезному поражению электрическим током и даже к летальному исходу.

Наиболее оптимальные условия помещения для расположения и работы РЭМ: комнатная температура 15 - 30°C, относительная влажность менее 70%, не допускается конденсации влаги по поверхностям в помещении!

Избегайте установки РЭМ рядом с оборудованием, являющегося источником электромагнитного излучения, это может привести к некачественной работе микроскопа. Во время сеанса работы РЭМ в помещении должны быть отключены мобильные телефоны, передатчики, беспроводные телефонные трубки и прочие подобные устройства.

РЭМ Hitachi TM-1000, как и все электроприборы, является источником рентгеновского излучения. Но его уровень не превышает такового у обычных бытовых электроприборов. Рекомендуемая продолжительность эксплуатации РЭМ Hitachi TM-1000 - 48 часов в неделю.

Микроскоп следует оставлять в нерабочем состоянии с созданным в нем разрежением, даже если не предполагается использовать прибор в течение продолжительного периода времени.

РЭМ Hitachi TM-1000 допускается использовать только по назначению, для научно-исследовательской работы в соответствии с порядком, описанными в данном учебно-методическом пособии и технической документации данного типа микроскопа.

В случае ухудшения качества работы РЭМ или полного его выхода из строя не пытайтесь самостоятельно устранить причины поломки. Необходимо обратиться к специалисту.

2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОДГОТОВКЕ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НА РЭМ

Главное требование к образцам для изучения на РЭМ Hitachi TM-1000 – их максимальная дегидратация (высушивание) и размеры не более 10 мм, предпочтительно 1-2 мм и менее. Наилучшее изображение можно получить для объектов, имеющих хитиновую кутикулу, известковую раковину либо целиком состоящие из твердого материала.

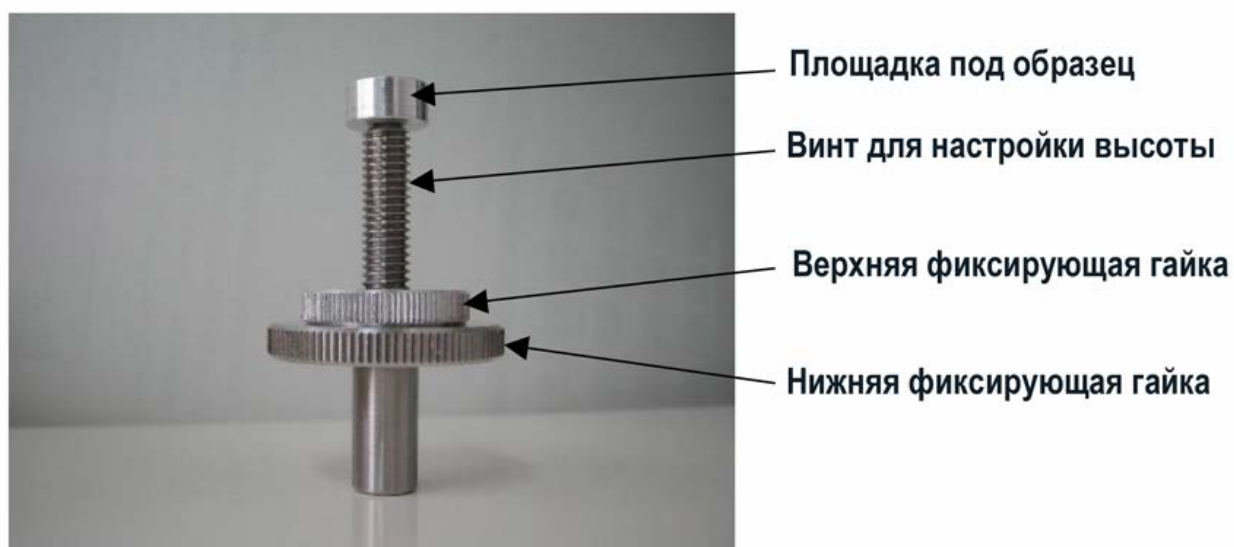
Мягкотканые объекты, предварительно фиксированные в различных фиксаторах (4-7% раствор формальдегида, 70% раствор этанола и др.) при дегидратации деформируются и получаемые изображения передают искаженный внешний вид. В определенной степени деформацию объектов можно преодолеть, если высушивание объекта проводить в сушильном шкафу. Для каждого объекта в зависимости от плотности тканей подбирается специальный режим дегидратации. Путем подбора оптимальной температуры и длительности процесса дегидратации можно получить наилучший эффект с минимальной деформацией объекта.

Объекты на РЭМ Hitachi TM-1000 исследуются, как правило, без напыления. Однако если подвергнуть объекты напылению (углеродом, золотом, сплавом золота с палладием), то это позволит получить микрофотографии с наибольшим возможным увеличением (до 10'000 х) и наилучшим контрастом.

Для исследования объекты помещаются на специальную смотровую площадку, имеющую вид металлической таблетки (см. рис. на следующей стр.). Для этого на «таблетку» наклеивается двусторонняя липкая лента-держатель, на которой закрепляется исследуемый объект. Если объект очень маленьких размеров и его нельзя захватить пинцетом, можно объекты перенести пипеткой в капле воды. На ленте-держателе после испарения воды объекты зафиксируются на липкой поверхности ленты. Пока капля воды не испарилась, можно под биноклем препаровальными иглами придать объектам нужное положение. Тщательная и кропотливая подготовка объектов к исследованию на РЭМ вознаграждается тем, что на ленте-держателе после высыхания капли воды обязательно некоторые объекты окажутся лежащими в самом выгодном для исследования ракурсе.

3. УСТАНОВКА ОБРАЗЦА НА СМОТРОВУЮ ПЛОЩАДКУ И В РАБОЧУЮ КАМЕРУ РЭМ

Смотровая площадка исследуемого образца имеет вид металлической «таблетки». На ней образец помещается в рабочую вакуумную камеру микроскопа.



Перед началом установки объекта на смотровую площадку вымойте руки во избежание попадания жирового загрязнения.

Наклейте проводящую ток 2-стороннюю липкую ленту-держатель на смотровую площадку.



Перенесите исследуемый объект на липкую поверхность ленты-держателя. Как можно перенести очень мелкие объекты, описано в предыдущей главе.



Установите смотровую площадку с объектами исследования на устройство с винтом для настройки высоты.



Установите устройство с винтом и смотровой площадкой на приспособление для измерения высоты образца.

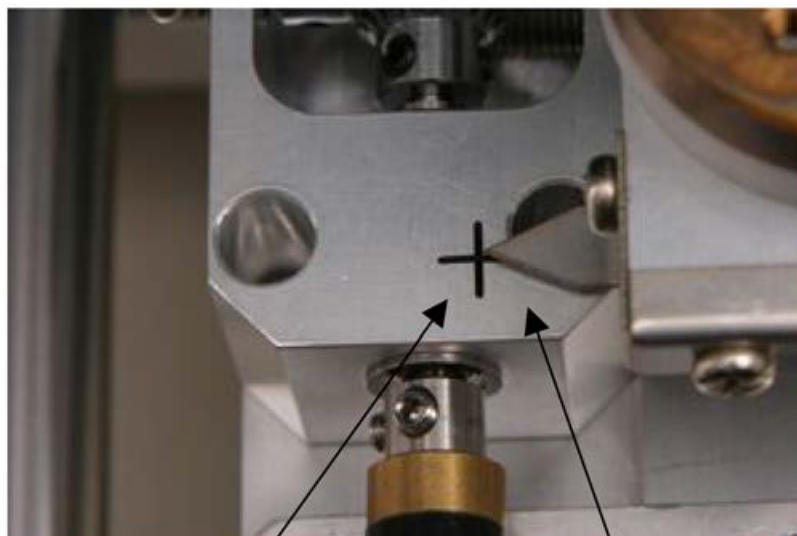
Вращением фиксирующей гайки установите высоту держателя таким образом, чтобы зазор между самой верхней частью исследуемого объекта и нижней поверхностью приспособления для измерения высоты стал равным 1 мм (попал в диапазон от 0,5 до 1,5 мм), как показано на рисунке.



Установите устройство со смотровой площадкой с объектом исследования в рабочую камеру микроскопа.



Пользуясь рукоятками X и Y, добейтесь положения, при котором наконечник указателя положения попадает в центр перекрестия (как показано ниже).



Перекрестие

Указатель положения

Задвиньте устройство с держателем объекта исследования в рабочую камеру микроскома. Задвигать следует медленно, чтобы образец или держатель образца не коснулись верхней части шахты рабочей камеры.



4. ВКЛЮЧЕНИЕ МИКРОСКОПА

Выключатель питания, имеющийся на управляющем блоке, установите в положение «включено». Световой индикатор EXCHANGE (замена) загорится зеленым светом, включится вакуумный насос, начнется создание разрежения.

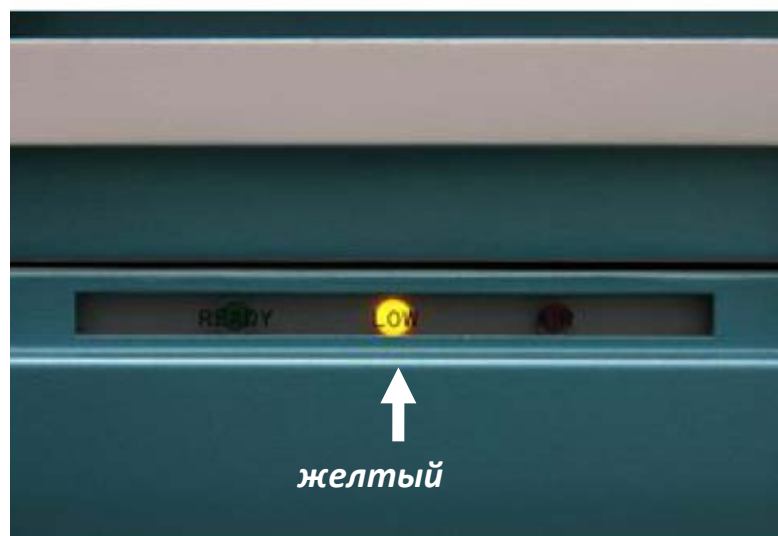


Загорится один из световых индикаторов, указывающих состояние вакуума в рабочей камере микроскопа.

Горит красный световой индикатор AIR – вакуума в рабочей камере микроскопа нет. В таком состоянии происходит замена смотровых площадок с объектами исследования.



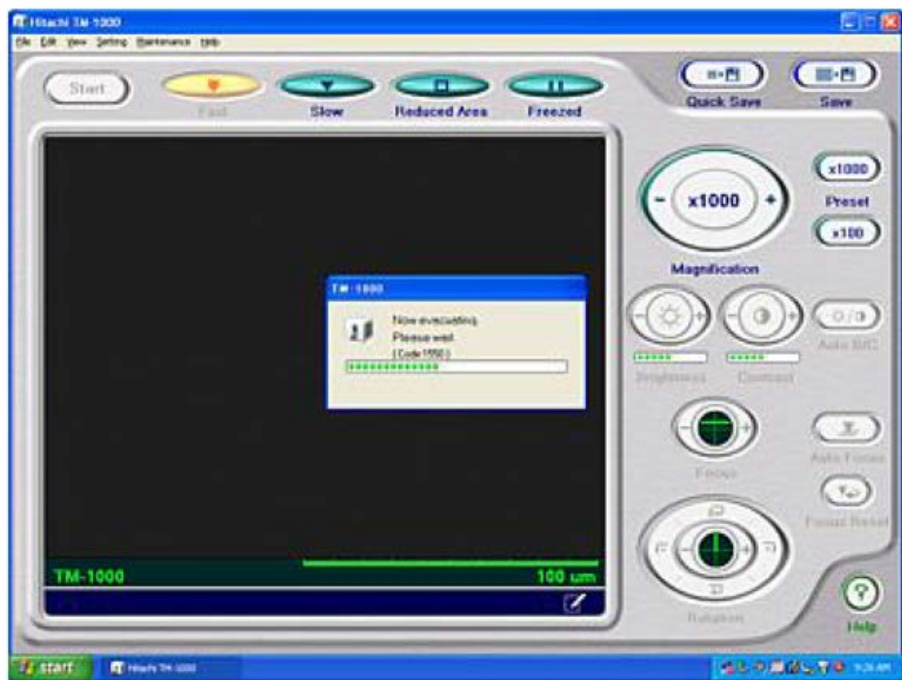
Горит желтый световой индикатор LOW - малая степень разрежения, идет создание вакуума. Начиная с момента включения вакуумного насоса рекомендуется давить на внешнюю крышку рабочей камеры микроскопа, чтобы в неё не попадал воздух.



Горит зеленый световой индикатор READY – вакуум создан, микроскоп готов к работе. Можно приступить к просмотру образца.

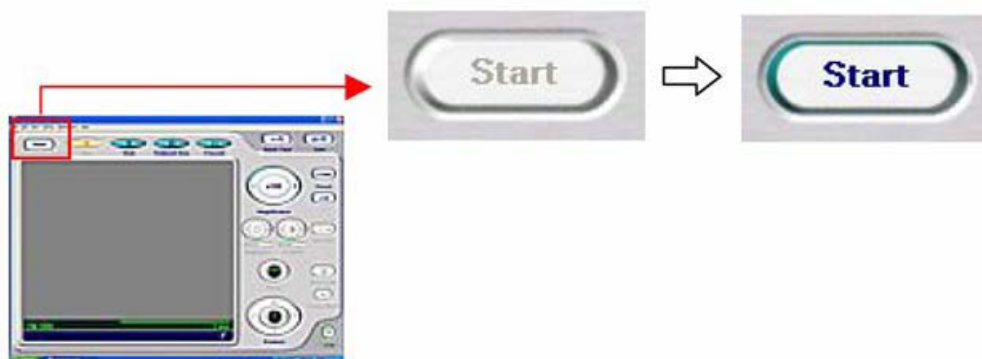


За процессом создания разрежения можно следить и по изображению на мониторе компьютера. После завершения откачки воздуха из рабочей камеры микроскопа и создания вакуума, соответствующий сектор в середине экрана исчезает.



5. ПРОСМОТР ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЯ И ЗАПИСЬ ДАННЫХ

После того, как загорелся зеленый световой индикатор на основном блоке микроскопа, активизируется клавиша Start (начало).



Нажмите показанную на экране клавишу Start (начало). Режим автоматического начала просмотра предусматривает последовательную автоматическую реализацию следующих функций: автоматическое фокусирование, автоматическую настройку яркости и контраста. Изображение появляется в поле экрана, отведенном под просмотр.

Выберите режим Fast (быстрый) и найдите интересующую зону образца. Затем, перейдите к режиму Reduced Area (просмотр ограниченного участка), чтобы подстроить яркость и сфокусировать изображение. При просмотре изображения образца приходится повторять эти процессы.

Яркость и контраст изображения можно подстраивать вручную или автоматически.

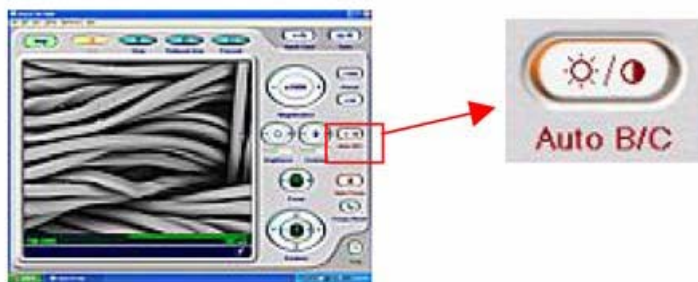
Подстройка вручную:



Для повышения яркости изображения, установите (мышью) указатель на сторону + клавиши Brightness (яркость); для снижения яркости изображения: на сторону – этой клавиши. Нажатие показанной на экране клавиши

обеспечивается последующим нажатием левой клавиши мыши. Аналогичным образом подстраивается и контраст. Для повышения контраста, установите указатель на сторону + клавиши Contrast (контраст); для снижения контраста изображения: на сторону – этой клавиши (нажатие показанной на экране клавиши обеспечивается последующим нажатием левой клавиши мыши). Когда каждую из этих клавиш продолжают нажимать, яркость или контраст регулируются плавно и быстро.

Подстройка автоматически:

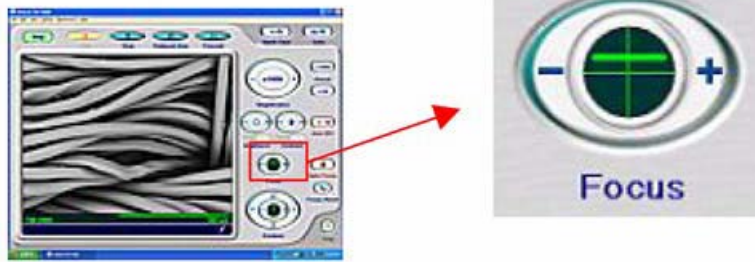


Нажмите клавишу Auto В/С (автоматическая подстройка яркости и контраста) или же выберите функцию Auto В/С из перечня, раскрываемого через слово View (вид). Яркость и контраст будут настроены автоматически.

В процессе поиска интересующей зоны образца, приходится часто менять степень увеличения и выбранный участок поверхности. Такие изменения обычно сопровождаются изменениями яркости и контраста изображения. Чтобы облегчить процесс, вы можете нажать клавишу Auto В/С (автоматическая подстройка яркости и контраста) чтобы баланс этих параметров сохранялся в грубом приближении. После уточнения интересующей зоны и настройки нужной степени увеличения, вы можете точно подстроить яркость и контраст вручную (с помощью соответствующих клавиш).

Предварительное фокусирование изображения можно выполнять ручную или автоматически.

Фокусирование вручную:



Для изменения глубины резкости, установите (мышью) указатель на сторону «+» клавиши Brightness (яркость); для снижения яркости изображения: на сторону «-» этой клавиши. Нажатие показанной на экране клавиши обеспечивается последующим нажатием левой клавиши мыши. Аналогичным образом подстраивается и контраст. Для повышения контраста, установите указатель на сторону «+» клавиши Contrast (контраст); для снижения контраста: на сторону «-». Нажатие показанной на экране клавиши обеспечивается последующим нажатием левой клавиши мыши. Когда клавишу продолжают нажимать, глубина резкости регулируется плавно и быстро.

Фокусирование автоматически:



Нажмите клавишу Auto Focus (фокусирование автоматически) или выберите функцию Auto Focus из перечня, раскрываемого через слово View (вид). Настройка глубины резкости обеспечится автоматически.

На точность автоматического фокусирования влияет структура поверхности исследуемого образца. Если контраст низок из-за отсутствия структурных характеристик на поверхности образца или образец склонен к накоплению заряда, автоматическая настройка контраста может не давать правильного результата. В этом случае, фокусирование следует производить вручную.

Для возврат на контрольный уровень глубины резкости нажмите клавишу Focus Reset (возврат на контрольный уровень глубины резкости).



Это обеспечит возврат на тот контрольный уровень фокусирования, который был задан на заводе-изготовителе.

Выбор поля изображения производится поворотом рукояток X и Y столика. Перед самым началом работы микроскопа установите их значения на 0°.

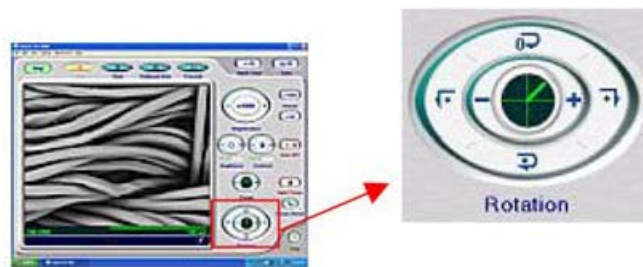



Наблюдаемое изображение смещается вправо поворотом рукоятки X (левой) по часовой стрелке. Если эта рукоятка поворачивается против часовой стрелки, изображение смещается влево.




Наблюдаемое изображение смещается вниз поворотом рукоятки Y (правой) по часовой стрелке. Если эта рукоятка поворачивается против часовой стрелки, изображение смещается вверх.

Поворот изображения. Просматриваемое изображение поворачивается за счет поворота направления сканирования (сканирования электронным лучом). Если угол поворота изображения настроен соответственно, можно получить очень четкое изображение.

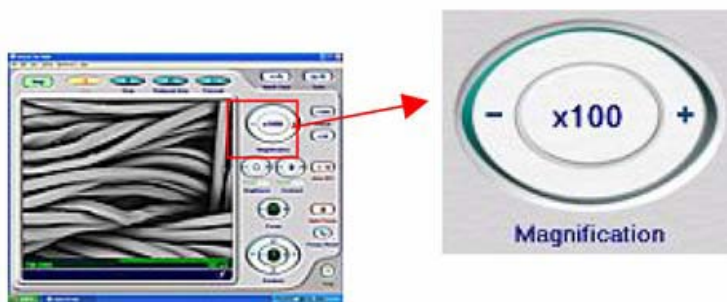


Для поворота из текущего положения по часовой стрелке на 180° нажмите (мышью) зону с меткой  на клавише Rotation (поворот), на экране появится изображение, повернутое по часовой стрелке на 180° .

Для поворот из текущего положения по часовой стрелке на 90° нажмите (мышью) зону с меткой  на клавише Rotation (поворот). На экране появится изображение, повернутое по часовой стрелке на 90° .

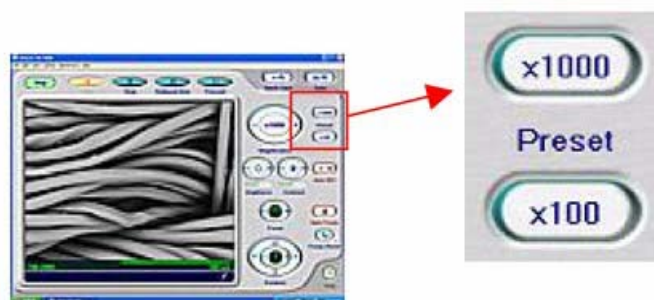
Настройка увеличения. Предусмотрены три способа настройки степени увеличения.

- 4) Нажатие клавиши Magnification (степень увеличения) зоны с меткой «+» приводит к дискретному увеличению степени увеличения; нажатие зоны с меткой «-» к дискретному уменьшению степени увеличения.



Если клавишу удерживать нажатой, степень увеличения будет изменяться плавно и быстро.

- 2) С помощью клавиши Preset (предварительно заданная).



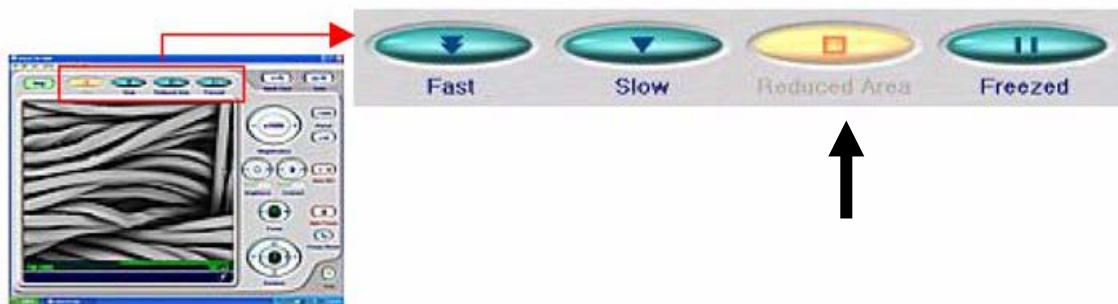
После того, как степени увеличения, выгодные для поиска интересующего поля поверхности образца и для получения сохраняемого изображения, приписаны двум клавишам Preset (предварительно заданная), для такой настройки достаточно лишь нажать (мышью) соответствующие клавиши.

3) Выбор степени увеличения из перечня, раскрываемого через слово View (вид). Из этого перечня можно выбрать предварительно заданные степени увеличения (через функцию Preset Magnification). Установленная (на этот момент времени) степень увеличения подменится заведомо заданной.

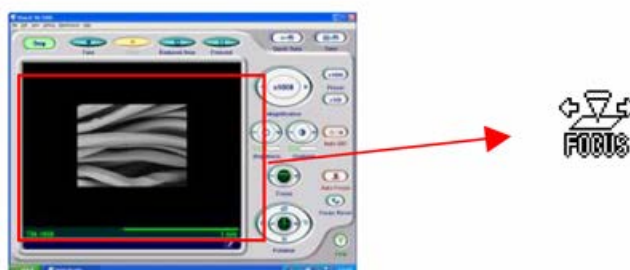
Или же можно выбрать разные степени увеличения (из широкого набора значений) с помощью того же самого перечня View (вид), но через функцию Magnification (степень увеличения).

Точное фокусирование. При просмотре изображения с высокой степенью увеличения, требуется более точная настройка глубины резкости.

Сместите изображение зоны образца, подлежащей фокусированию, в центр просматриваемой площади изображения, после чего нажмите клавишу Reduced Area (просмотр ограниченного участка). Просматриваемая зона изображения окажется ограниченной той, которая находится ближе к центру.



С помощью мыши, сместите указатель в подлежащую просмотру область. Вид указателя подменится тем, который соответствует подстройке фокуса:



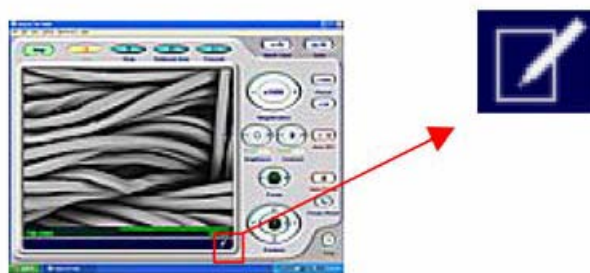
Ради обеспечения точной настройки глубин резкости (точного фокусирования), перемещайте мышью с нажатой левой клавишей влево «-» или вправо «+». Просматривая изображение, подстройте фокус до того уровня, который сочтете оптимальным.

Запись данных об изображении в память.

После завершения фокусирования (настройки глубины резкости), нажмите клавишу Slow (медленный) [в ряду клавиш, расположенных непосредственно над полем экрана, отведенном для просмотра изображения образца] и убедитесь, что все изображение оказалось записанным в память.

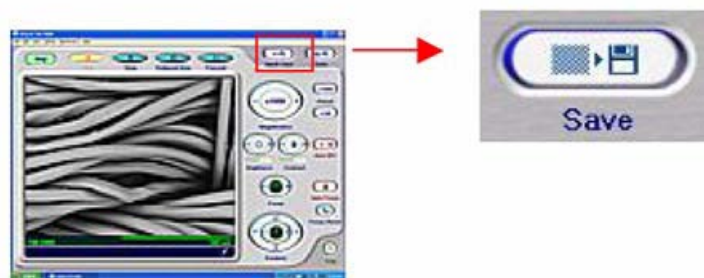
Чтобы изменить подлежащую сохранению информацию, выполните следующие указания:

- нажмите клавишу Edit (редактирование) в той части экрана, которая отведена под строки с информацией и комментариями. Или выберите функцию Setting for save (настройка для записи в память) из перечня, раскрываемого через слово File (файл).



- на экране появится окно Setting for save (настройка для записи в память). Проверьте показываемые на экране сведения; выберите тип изображения (Image Type) и название подлежащего сохранению файла (File Name).

- нажмите клавишу Save (запись в память) или выберите функцию Save image (запись изображения в память) из перечня, раскрываемого через слово File (файл), и, затем, выберите вариант Save.



- после того, как начнется процесс записи в память, показываемое на экране изображение темнеет, после чего изображение начинает снова постепенно проявляться сверху вниз (этот процесс называют «захватом изображения»). Захват изображения производится за 30 – 40 секунд.

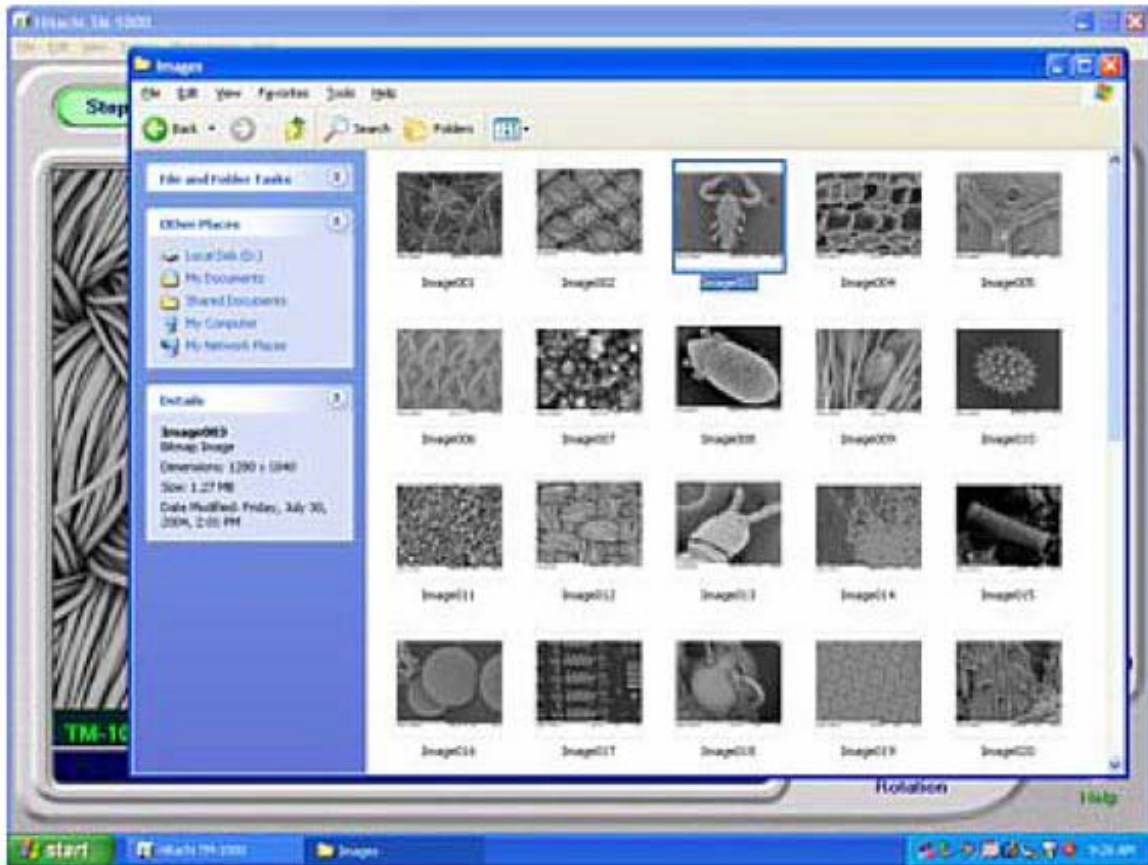


Во время процесса захвата изображения в центре экрана появляется сектор, указывающий прогресс выполнения операции. После завершения процесса, этот сектор исчезает.

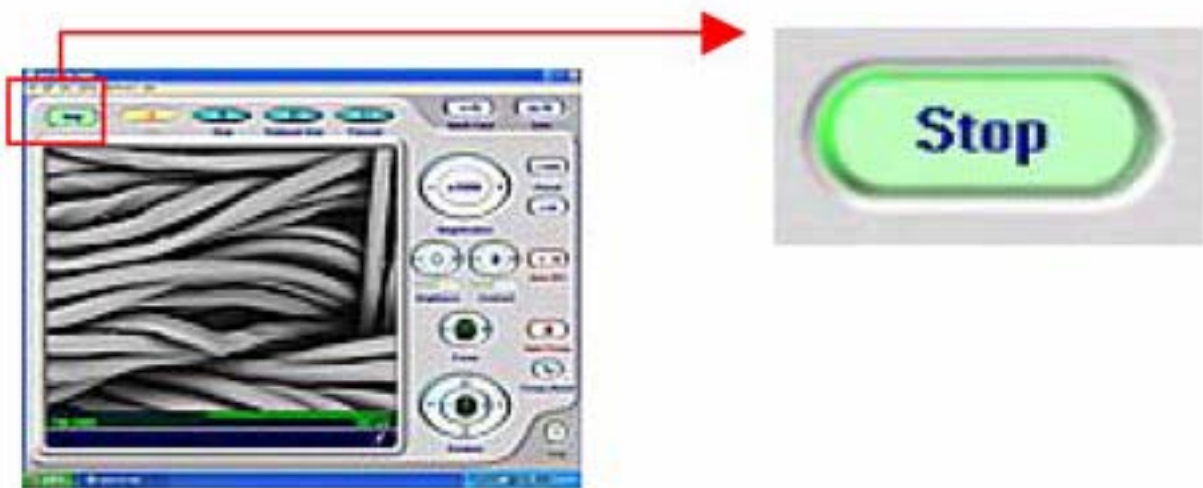
После записи в память, выбранный режим просмотра подменяется режимом Freezed (стоп-кадр).

Просмотрите перечень записных в память изображений с помощью обслуживающей программы Windows Explorer:

- нажмите клавишу F9 на клавишном пульте компьютера;
- на экране будет раскрыта та папка, в которую записывались изображения во время выполнения последней операции по сохранению изображений.



Для прекращения просмотра изображения, нажмите клавишу Stop (остановка).



6. ВЫКЛЮЧЕНИЕ МИКРОСКОПА

1. Выньте просматриваемый образец, если после включения микроскопа не собираетесь просматривать этот образец снова.

2. Перед выключением микроскопа убедитесь, что в рабочей камере микроскопа создано разрежение (это состояние подтверждается показываемым на экране изображением).



3. Перед выключением микроскопа необходимо завершить сеанс связи с программой, управляющей микроскопом.

4. Установите выключатель питания на управляющем блоке в выключенном положение.



Даже в том случае, если Вы не будете пользоваться микроскопом в течение длительного периода времени, следует поддерживать разрежение в рабочей камере микроскопа.

ЛИТЕРАТУРА

- Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П., Джой Д., Фиори Ч., Лифшин Ф.* Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ: в двух книгах. Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 303 с.
- Иванов А. В., Мончадский А. С., Полянский Ю. И., Стрелков А. А.* Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Типы: Кольчатые черви, Членистоногие: Учеб. пособие для студентов биолог. спец. ун-тов. Ч. 2. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1983. – 543 с.
- Иванов А. В., Полянский Ю. И., Стрелков А. А.* Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Простейшие, губки, кишечнополостные, гребневики, плоские черви, немертины, круглые черви: Учеб. пособие для студентов биолог. спец. ун-тов. Ч. 1. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1981. – 504 с.
- Иванов А. В., Полянский Ю. И., Стрелков А. А.* Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Типы: сипункулиды, моллюски, щупальцевые, иглокожие: Учеб. пособие для студентов биолог. спец. ун-тов. Ч. 3. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1985. – 390 с.
- Микроанализ и растровая электронная микроскопия. Пер. с франц. *Под ред. Морис Ф., Мени Л., Тиксье Р.* - М.: Металлургия, 1985. – 392 с.
- Практическая растровая электронная микроскопия. *Под ред. Дж. Гоулдстейна и Х. Яковица.* – М.: Мир, 1978. – 656 с.
- Практические методы в электронной микроскопии. Пер. с англ. Под ред. Глоэр О. М. – Л.: Машиностроение. Ленинградское отделение, 1980. – 375с.
- Синдо Д., Оикава Т.* Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия. Пер. с англ. – М.: Техносфера, 2006. – 255 с.

Отпечатано в полном соответствии с предоставленным оригинал-макетом

Подписано в печать 27.03.2018.

Форм. 60 x 84 1/16. Гарнитура "Таймс". Печать ризографическая.

Печ. Л. 1,5. Тираж 100. Заказ 169/4.

Лаборатория оперативной полиграфии Издательство КФУ

420012, Казань, ул. Бутлерова, 4

Тел. 291-13-88