

Pyyhkäisyelektronimikroskopia biokuvantamisessa

LuK-tutkielma
Turun yliopisto
Fysiikka
2025
Viola Leoni
Tarkastaja:
FT Ermei Mäkilä

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO
Fysiikan ja tähtitieteen laitos

Leoni, Viola Pyyhkäisyelektronimikroskopia biokuvantamisessa

LuK-tutkielma, 25 s.
Fysiikka
Toukokuu 2025

Biologisten näytteiden kuvantaminen on keskeinen osa monia tieteellisiä tutkimuksia. Yksi tärkeimmistä kuvantamismenetelmistä on pyyhkäisyelektronimikroskopia (*engl. Scanning Electron Microscopy, SEM*), joka tarjoaa korkean resoluution ja kolmiulotteisen näkymän näytteiden pintarakenteesta.

SEM:iä käytetään laajasti biologisessa kuvantamisessa, sillä se mahdollistaa solujen ja kudosten yksityiskohtaisen tarkastelun. Biologisten näytteiden kuvantaminen tuottaa omia haasteitaan, koska näytteet vaativat tietyt olosuhteet mikroskoopissa. Kehittyneet valmistelutekniikat ja mikroskoopit ovat kuitenkin parantaneet biologisten näytteiden kuvantamismahdollisuuksia.

Työssä käydään läpi SEM:in toimintaperiaate, sekä biologisten näytteiden käsittely ja kuvantamisen erityispiirteet. Lisäksi esitellään muun muassa tapa yhdistää fluoresenssimikroskopia ja elektronimikroskopia (CLEM), syväoppiminen kuvantamisen työkaluna ja erityisesti biologisille näytteille sopiva ESEM.

Asiasanat: SEM, ESEM, CLEM, elektronimikroskopia, pyyhkäisyelektronimikroskopia, syväoppiminen

Sisällys

Johdanto	1
1 Pyyhkäiselektronimikroskopian perusteet	1
1.1 Toimintaperiaate	1
1.2 Elektronilähteet	2
1.3 Linssit	4
1.4 Poikkeutuskelat ja ilmaisimet	5
1.5 Bionäytteiden SEM-kuvantamisen erityispiirteet	9
1.6 ESEM	12
2 Näytteenkäsittely	13
2.1 Näytteiden kiinnitys ja merkitys solurakenteelle	14
2.2 Kuivausmenetelmiä	15
2.3 Pinnoitusmenetelmiä	16
3 Kuvien analyysi ja prosessointi	17
3.1 Kuvien tulkinta - resoluutio, kontrasti ja topografia	17
3.2 Kuvien tulkinta - rakenteiden havainnointi	18
3.3 Kuvien artefaktit	20
4 Sovelluksia	21
5 Yhteenveto	23

Johdanto

Elektronimikroskopia on mullistanut bionäytteiden tutkimuksen tarjoamalla huomattavasti suuremman resoluution kuin perinteinen valomikroskopia. Yksi keskeisimmistä elektronimikroskopian muodoista on pyyhkäisyelektronimikroskopia (*scanning electron microscopy, SEM*). SEM on osoittautunut erityisen hyödylliseksi biologisten näytteiden tutkimuksessa, sillä sen avulla voidaan tarkastella solujen morfologiaa, kudusrakenteita ja mikro-organismeja jopa nanometrin tarkkuudella.

Biologiset näytteet asettavat kuitenkin erityisiä vaatimuksia SEM-kuvantamiselle, johtuen niiden herkkydestä, pehmeystä ja korkeasta vesipitoisuudesta. Näiden ominaisuuksien vuoksi näytteiden esikäsittely on keskeisessä roolissa onnistuneen SEM-analyysin kannalta.

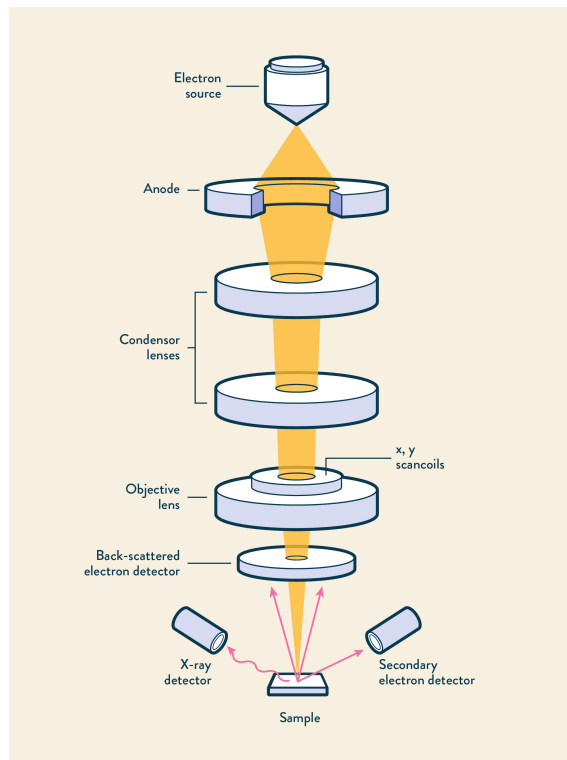
Tässä tutkielmassa tarkastellaan pyyhkäisyelektronimikroskopian periaatteita ja soveltuvuutta biologisten näytteiden tutkimukseen. Työssä käsitellään SEM-tekniikkaa, biologisten näytteiden valmistelua sekä esitetään esimerkkejä pyyhkäisyelektronimikroskopian sovelluksista.

1 Pyyhkäisyelektronimikroskopian perusteet

1.1 Toimintaperiaate

Työlästä näytteenkäsittelyä vaativan ja vain ohuille sekä kuiville näytteille soveltuvan läpäisyelektronimikroskoopin (*engl. transmission electron microscopy, TEM*) rinnalle kehitettiin Max Knoll'in 1935 esittelemä ja Von Ardenne myöhemmin viimeistelemä pyyhkäisyelektronimikroskooppi eli SEM. TEM vaati toimiakseen ohuita näytteitä, kun taas SEM mahdollistaa myös huomattavasti suurempien näytteiden kuvantamisen. SEMin hyötyjä olivat lisäksi optiseen mikroskooppiin verrattuna korkea syväterävyys ja parempi resoluutio [1]. Tyypillisen SEM:in pääkomponentit ovat elektronitykki, tyhjiökammio, kondensaattori- ja objektiivilinsit, poikkeu-

tuskela, detektorit ja kuvantamisjärjestelmä. Kuvassa 1 on havainnollistava kuva SEM:in yhdestä mahdollisesta rakenteesta. Elektronisuihku tarkennetaan pistemäiseksi, jota pyyhkäistään halutulta alueelta, joka muodostaa tietokoneohjelmistolla kuvan. Elektronisuihkun elektronit törmäävät näytteen atomeihin joko elastisesti tai epäelastisesti siroamalla. Elastisissa törmäyksissä elektronit kimpoavat menettämättä energiaa, kun taas epäelastisissa törmäyksissä elektronit luovuttavat energiaa näytteen atomeille ionisoimalla ne. Näiden törmäyksiä todennäköisyys riippuu elektronien kineettisestä energiasta sekä näytteen atomeista. Näitä vuorovaikutuksia voidaan havainnoida ja näin piirtää kuva havaittujen signaalien funktiona. [2]



Kuva 1. Havainnekuva SEM-tornista

1.2 Elektronilähteet

Yleisiä elektronilähdetyyppejä ovat termiset lähteet (*engl. hot beam*), kenttäemissioelektronilähteet (*engl. field emission gun*), ja edellisten toimintatapoja yhdistelevät

Schottky-lähteet. Jokaisella on omat hyvät ja huonot puolensa, mutta yksi vaikuttava tekijä on usein hinta, jolloin valinta osuu mitä todennäköisimmin termisiin lähteisiin edullisuutensa takia. Termisiä lähteitä on lisäksi muihin lähteisiin verrattuna helpompi ylläpitää [2]. Perinteisissä termisissä lähteissä elektronisuihku syntyy kuumentamalla taivutettua volframifilamenttia n. 2700 K lämpötilaan, joka on n. 1–30 keV:in negatiivisessa jännitteessä. [2]

Vain 1500 K:n lämpötilassa toimiva lantaaniheksaboraatti (LaB_6) on volframilankaa tehokkaampi lähde, ja se tuottaa kirkkaampia kuvia. Lisäksi taivutetun LaB_6 -kärjen geometria mahdollistaa volframia pienemmän lähteen joka parantaa resoluutiota. Rajoittava tekijä LaB_6 -lähteen käyttöön on sen korkea reaktiivisuus, jonka vuoksi sitä ei saa päästä jäähtymään eikä altistaa ilmakehälle. Parannus operointilämpötilassa menetetään laitteen vaativampaan ylläpitoon. [2]

Rajoittavia tekijöitä termisillä emittereillä ovat lähteen alhaisesta kirkkaudesta johtuva huono resoluutio, sekä säteilevän kärjen korkean lämpötilan aiheuttama laaja elektronisuihkun energiajakauma. Lähteen kärjen terävöitys on yksi tapa korjata ongelmia, koska se kasvattaa elektronisuihkua parantavaa kärjen kenttää, ja toki pienentää lähdeä. Viime vuosina on kehitetty nanometrisiä kenttäemittereitä, kuten (LaB_6)-nanoneuloja, joiden valmistuksessa hyödynnetään FIB-teknologiaa (*engl. Focused ion beam*). Näillä voidaan saavuttaa erittäin terävä kärkigeometria, tyypillisesti alle 30 nm säteellä, mikä mahdollistaa huomattavasti voimakkaamman sähkökentän lähteen kärjessä. Tämä ei ainoastaan paranna elektronisuihkun kohdistuvuutta ja koherenssia, vaan myös pienentää työfunktion vaikutusta energiakais-tan leveyteen. Näin ollen voidaan saavuttaa pienempi energiajakauma ja parempi kuvanlaatu ilman korkeita käyttölämpötiloja. [2, 3]

Kun halutaan tutkia muutamien nanometrien yksityiskohtia sisältäviä näytteitä, eivät termiset lähteet yksinkertaisesti pysty tuottamaan tarvittavan pientä pistekokoa. Lisäksi korkea toimintalämpötila luo kromaattista aberratiota, eli elektroni-

säteet leviävät linssin polttotasossa tuottaen kuvaan virheitä. [4]

Kenttäemissiolähteet (*engl. field emission gun, FEG*) käyttävät voimakasta sähkökenttää, joka saa elektronit irti materiaalin pinnasta, vaikka niiden energia ei normaalisti riittäisikään. Näin lähteet tuottavat erittäin korkean kirkkauden ja mahdollistavat nanometriluokan tarkkuuden. Kenttäemissiolähteet toimivat myös suhteellisen alhaisilla lämpötiloilla, joka rasittaa lähdettä vähemmän. Lisäksi FEG-lähteen elektronivirran elektronijakauma on pieni ja säde tarkka, jolloin herkät biologiset näytteet saavat vähemmän säteilyvaurioita ja sädettä on helpompi kontrolloida. Suuri määrä elektroneja voisi rikkoa näytteen kemiallisia sidoksia tai aiheuttaa lämpövaurioita. FEG-lähteet ovat kuitenkin herkkiä saastumiselle ja vaativat korkean tyhjiön. Niiden huolto on kuitenkin vaativaa, korkean tyhjiövaatimuksen ja kärjen terävyyden ylläpidon takia. [5]

Schottky-lähteet (*engl. Schottky emission gun, SEG*) käyttävät termisesti avustettua kenttäemissiota, eli ovat ikäänkuin edeltävien yhdistelmiä. Lähteessä luodaan voimakas sähkökenttä, joka saa elektronit tehokkaasti emittoitumaan materiaalin pinnasta. Lisäksi lähteen anodia kuumennetaan hieman, jotta elektronit saavat lisää energiaa, mikä helpottaa niiden irtoamista materiaalista. Tämä terminen lämmitys alentaa elektronien irtoamiskynnystä, eli työfunktia. Schottky-lähteet eivät ole yhtä tarkkoja kuin kenttäemissiolähteet, mutta paljon kirkkaampia ja tarkempia kuin termiset lähteet [5]. Taulukossa I on vertailtu termisen volframi-, kenttäemissio- sekä Schottky- lähteiden ominaisuuksia.

1.3 Linssit

Elektronisäteen hallintaan käytetään sähkömagneettisia linsejä. Linssi koostuu kuparilangasta tehdystä solenoidista, jonka läpi kulkee virta joka indusoi magneettikentän. Virtaa säätämällä hallitaan linssin läpi kulkevaa elektronisuihkua. Elektronit jotka eivät kulje keskiakselia pitkin taipuvat kohti akselia, mikä aiheuttaa sä-

Taulukko I. Termisen volframi-, kenttäemissio- (FEG), ja Schottky-lähteen (SEG) ominaisuuksien vertailu. [5–7]

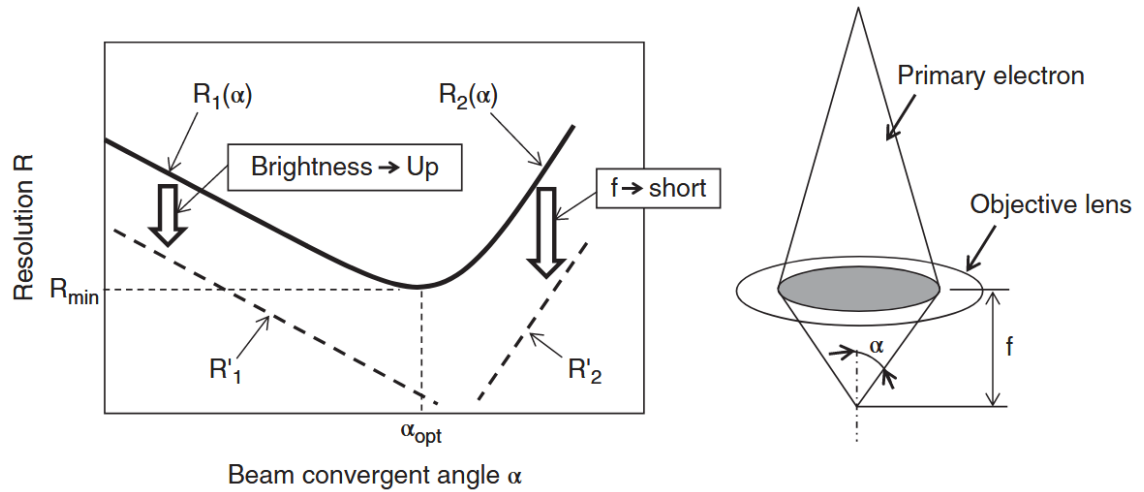
	W-filamentti	FEG	SEG
Kirkkaus	10^5 A/cm ² sr	10^8 A/cm ² sr	10^8 A/cm ² sr
Energiajakauma	10-20 eV (laaja)	2-5 eV (kapea)	4–8 eV (kapea)
Työfunktio	4,5–5,5 eV	4,5–5,0 eV	4,5–5,2 eV
Käyttölämpötila	2000-3000K	293 K	1500–2000 K
Tyhjiövaatimus	10^{-3} bar	10^{-9} mbar	10^{-6} mbar
Resoluutio	~3,0–5,0 nm	~1,0–2,0 nm	~1,5–2,5 nm

teen risteymän tietyllä etäisyydellä linssistä. Linssityyppinä on kaksi: kondensaattorilinssi ja objektiivilinssi. Kuvassa 1 on merkitty kaksi kondensaattorilinssiä, ja yksi objektiivilinssi. Kondensaattorilinssin ensisijainen tarkoitus on pienentää elektronisäteen halkaisijaa. Sillä voidaan haluttaessa myös poistaa elektronit, jotka eivät kulje keskiakselia pitkin jolloin säteen halkaisija pienenee entisestään, jolloin saadaan entistä pienempi pistekoko (*engl. spot size*) ja pienempi virta. Objektiivilinssi on aina linssisarjan viimeisenä, ja se keskittää säteen näytteen pinnalle. Objektiivilinssiä hienosäätämällä vaikutetaan resoluutioon ja konvergenssikulmaan. Säteen suuri konvergenssikulma parantaa syväterävyyttä, mutta resoluutio kärsii [8]. Säteen konvergenssikulman ja resoluution suhde on esitetty kuvassa 2.

1.4 Poikkeutuskelat ja ilmaisimet

Kun säde on kohdistettu, sädettä voidaan kääntää poikkeutuskeloilla skannaamaan näyte rasterimaisesti. Kelat synkronoidaan detektoreita ja lopullista kuvaa ohjauvan ohjelmiston kanssa, jolloin kerätyt signaalit muutetaan kuvaksi. Kuvaa voidaan katsella reaaliaikaisesti.

Tärkeitä signaaleja ovat vähäenergiset sekundäärielektronit (SE), joita näytteen atomien ionisointi tuottaa. Nämä elektronit irtoavat näytteen uloimmista kerroksista, mistä saadaan tietoa näytteen topografisista ominaisuuksista.



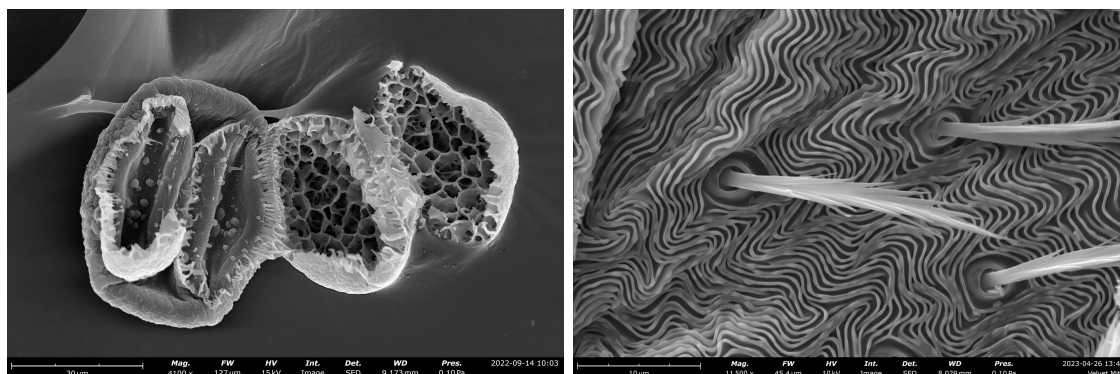
Kuva 2. Säteen konvergenssikulman ja resoluution suhde [2].

Yleisin käytetty ilmaisimien on Everhart-Thornley-ilmaisimien (ETD), joka koostuu Faradayn häkin sisällä olevasta tuikeaineesta, joka vetää puoleensa matalaenergisiiä elektroneja muuntaen ne fotoneiksi. Tämä vahvistetaan valomonistinputkella (PMT) lopulliseksi havaittavaksi jännitepulsiksi.

TTL-ilmaisimet (*engl. Through-the-lens*) ovat lähelle objektiivilinssiä integroituja ilmaisimia. Ne keräävät sekundäärielektroneja objektiivilinssin sähkö- ja magneettikenttien avulla, ja soveltuvat nanomittakaavan kuvantamiseen. Linssiin integroidut ilmaisimet (*engl. In-lens*) ovat erityisen herkkiä alhaisilla jännitteillä, koska ne keräävät tehokkaasti heikkoenergisii sekundäärielektronit suoraan näytteen pinnalta linssin ohjaavien sähkökenttien avulla ja tarjoavat korkean resoluution. In-lens-ilmaisimet ovat yleisiä kenttäemissio-SEM (FE-SEM) laitteissa.

Lisäksi erityisesti biologisten näytteiden tutkimiseen tarkoitettu ESEM (*engl. Environmental scanning electron microscope*) käyttää kaasuvahvistettua ilmaisinta (*engl. Gaseous Secondary Electron Detector, GSED*), jonka rakenne kestää painetta. Ilmaisimien on sijoitettu tyhjiökammioon tai sen läheisyyteen. ESEM:istä kerrotaan lisää luvussa 1.6. Kuvassa 3 on SE-kuvat siitepölystä ja samettipunkista. [8]

Myös takaisinsironneet elektronit (*engl. Back-scattered electrons, BSE*) voidaan havainnoida. Näiden elektronien määrä riippuu näytteen atomien atomiluvusta, jo-

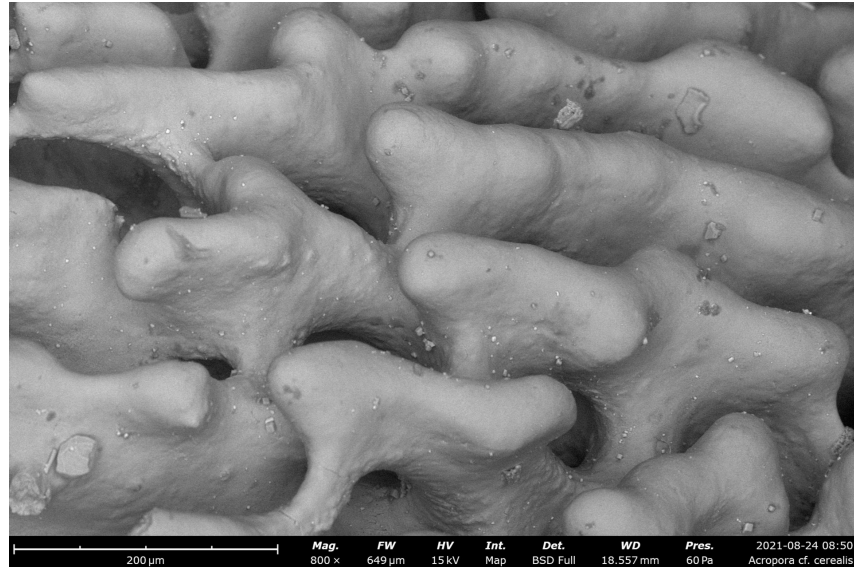


Kuva 3. Kaksi eri SE-kuvaa. Ensimmäinen kuva on 4100-kertainen kuva siitepölystä 15 kV jännitteellä. Toisessa kuvassa on samettipunkin karvoitusta 11500-kertaisesti suurennettuna 10 kV jännitteellä. Molemmat kuvat on otettu 0.1 Pa paineessa. [8]

ten BSE-signaalit antavat tietoa näytteen rakenteesta. Suuremmat atomiluvut tarkoittavat enemmän positiivisesti varattuja protoneja ytimen sisällä, mikä lisää sähköstaattista vuorovaikutusta elektronisuihkun ja atomin välillä. Tämä johtaa suurempaan elektronien elastiseen sirontaan, jolloin enemmän elektroneja heijastuu takaisin. Raskaammat alkuaineet (korkea atomiluku) sirontavat enemmän elektroneja takaisin, mikä tarkoittaa, että ne näkyvät kuvissa kirkkaampina, kun taas kevyet alkuaineet (matala atomiluku) sirontavat vähemmän elektroneja, joten ne näkyvät tummempina. Näin erilaiset alkuaineet ja yhdisteet erottuvat toisistaan kontrastin perusteella.

Yksi yleisimmistä BSE-ilmaisimista on YAG (yttrium-alumiini-garnetti) -pohjainen. Ne hyödyntävät tuiketekniikkaa, jossa BSE-elektronit osuvat YAG-kiteeseen synnyttäen valoa, joka muunnetaan sähköiseksi signaaliksi. Uudemmat BSE-ilmaisimet koostuvat puolijohde-antureista, joissa elektronit muodostavat elektroni-aukko-pareja, jolloin syntyy takaisinsironneisiin elektroneihin verrannollinen virta. Puolijohdeilmaisimet ovat YAG-ilmaisimia herkempiä, ja toimivat alhaisilla jännitteillä paremmin. YAG-ilmaisimet ovat kuitenkin kestävämpiä, sillä puolijohdeilmaisimet ovat herkkiä säteilyvaurioille [5, 8]. Kuvassa 4 on BSE-kuva *Acropora cerealis*-korallista.

Alkuainekartoitusta varten usein myös virittyneiden atomien purkautumisesta

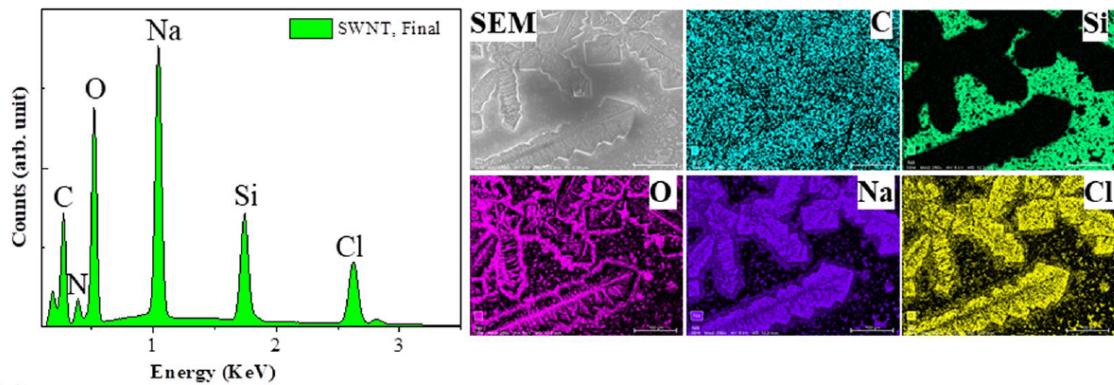


Kuva 4. BSE-kuva *Acropora cerealis* korallista. Kuva on 800-kertainen, ja otettu 15 kV jännitteellä, 60 Pa paineessa. [8]

syntyneet röntgensäteet voidaan havainnoida, mitä kutsutaan energiadisersiiviseksi röntgenspektroskopiaksi (*engl. energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS*), sillä emittoidun röntgenfotonin energia on jokaiselle alkuaineelle ominainen. Röntgensäteilyä syntyy, kun elektronisuihku irrottaa näytteen atomin sisäkuoren elektronin ja atomi virittyy, ja viritystilan purkautuessa syntynyt aukko täyttyy ulomman kuoren elektronilla. Alkuaineilla on kvanttiutunut energiaero kuorien välillä, jolloin havaitut röntgensäteet ovat tunnistettavissa. Yleisin EDS-ilmaisimien on SDD-ilmaisimien (*engl. silicon drift detector*), johon muodostuu elektroni-aukkopareja röntgensäteilyn absorboitumisen seurauksena. Röntgenfotonin energia muunnetaan ilmaisimissa sähkövaraukseksi, kun syntyneet elektronit johdetaan kenttägradientin avulla anodille ja kerätään. Tämän jälkeen varaus muutetaan jännitteeksi FET-esivahvistimella (*engl. field effect transistor*) ja edelleen digitaalisesti prosessoiduksi signaaliksi. Jokainen röntgenfotonin aiheuttama jännitesignaali vastaa tiettyä energiatasoa, mikä mahdollistaa spektrin muodostamisen, jossa signaalin voimakkuus ja energia kertovat näytteen alkuainekoostumuksen. Kuvassa 5 on EDS-kuvia näytteestä, jonka eri alkuaineet on eroteltu väreillä. Jokaisen alkuaineen energia ja määrä

näkyvä spektrillä. [8, 9]

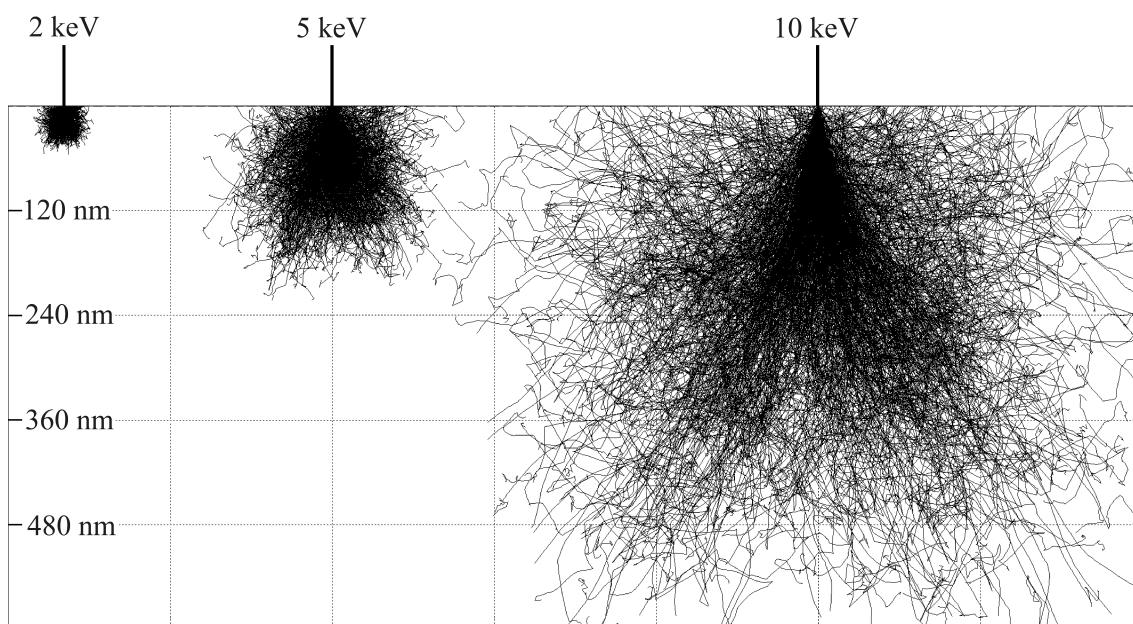
EDS:n rinnalla voidaan käyttää myös aallonpituusdispersiivistä röntgenspektroskopiaa (*engl. wavelength-dispersive X-ray spectroscopy, WDS*), jossa röntgensäteet erotellaan niiden aallonpituuden perusteella käyttämällä näille soveltuvia diffraktiokiteitä. WDS tarjoaa huomattavasti paremman energian erotuskyvyn kuin EDS, minkä ansiosta se pystyy erottamaan lähekkäin olevia spektriviivoja ja tunnistamaan erityisesti kevyitä ja vähän esiintyviä alkuaineita tarkemmin. WDS vaatii kuitenkin pidemmän mittausajan ja kalliimman laitteiston, ja siksi sitä käytetään usein täydentävänä menetelmänä kun tarvitaan kvantitatiivisempaa tai yksityiskohtaisempaa analyysiä. Näin WDS soveltuu erityisesti tilanteisiin, joissa EDS:n erotuskyky ei riitä luotettavaan alkuaineiden erottamiseen tai määrittämiseen. [5, 10]



Kuva 5. EDS-spektri hiilinanoputkista natriumhypokloriittikäsittelyn jälkeen, sekä vastaavat elektronikuva ja alkuainekartat havaituista komponenteista. [11]

1.5 Bionäytteiden SEM-kuvantamisen erityispiirteet

Elektronisuihkun ja näytteen välinen vuorovaikutus riippuu merkittävästi kiihdytysjännitteestä. Elektronien tunkeutuminen näytteeseen muodostaa niin kutsutun vuorovaikutustilavuuden (*engl. interaction volume*), joka kuvaa tilaa näytteen sisällä, jossa elektronit hajottavat energiaansa ja vuorovaikuttavat (sekundäärielektronien, takaisinsironneiden elektronien ja röntgensäteilyn synty). Korkeammilla kiih-



Kuva 6. YAG:Ce-kiteen vuorovaikutustilavuus kuvattu Monte Carlo-menetelmällä simuloituna. Simuloitu ilman johtavaa pintakerrosta. [12]

dytysjännitteillä tämä tilavuus kasvaa, mikä voi johtaa pienentyneeseen pintaresoluutioon sekä siihen, että signaali muodostuu suuremmasta, ei-paikallisesta näytealueesta. Erityisesti ohuiden tai pinnaltaan herkempien materiaalien kuvantamisessa tämä voi vääristää tai peittää yksityiskohtia. Kuvassa 6 on havainnollistettu vuorovaikutustilavuutta eri jännitteillä. [5]

Bionäytteiden herkkyden vuoksi matalajännitteinen elektronimikroskopia on bio-kuvantamisessa kasvattanut huomiotaan. Matala jännite pienentää vuorovaikutustilavuutta, jolloin saadaan terävämpiä pintakuvia ja voidaan vähentää näytevaurioita. Biologiset näytteet ovat haastavia kuvattavia niiden herkkyden vuoksi. Ne kestävät heikosti kuivausta ja säteilyä. Tämän vuoksi matalan jännitteen kuvantaminen sopii bionäytteille hyvin. Matalat energiat myös vähentävät varautumista, mikä mahdollistaa eristävien näytteiden havainnoinnin ilman häiritseviä sähköstaattisia ilmiöitä. [5]

Kuitenkin, kun elektronien energiaa madalletaan, kuvausresoluutioon vaikuttava kromaattinen aberraatio lisääntyy. Tämä johtuu siitä, että erienergiset elektronit

eivät tarkennu samaan pisteeseen objektiivilinssissä, vaan poikkeavat polttotasosta. Aberraation vaikutusta voidaan arvioida seuraavalla kaavalla:

$$d_c = C_c \cdot \alpha \cdot \frac{\delta E}{E}$$

missä d_c on säteen leviämisen halkaisija, C_c on kromaattisen aberraation kerroin (näytteen ja linssin välinen etäisyys), α elektronisuihkun konvergenssin puolikulma, δE elektronien energiaero ja E elektronien keskiarvoenergia. Kromaattinen aberraatio korostuu erityisesti matalilla säteen energioilla, koska energian pienentyessä d_c kasvaa, jolloin tarkkuus heikkenee. [13]

Aiemmin näytteen pintaan kohdistettiin negatiivinen jännite säteen hidastamiseksi juuri ennen sen osumista näytteeseen. Tämä loi paikallisen sähköstaattisen kentän, joka hidasti korkeaenergiset primäärielektronit juuri ennen kontaktia. Yksistään tämä menetelmä kuitenkin tekee kentästä näytekohtaisen, eli syntyvä sähköstaattinen kenttä riippui näytteen ominaisuuksista – esimerkiksi pinnan muodoista, koostumuksesta tai johtavuudesta. [5, 14]

Nykyisissä korkean resoluution SEM-laitteissa käytetään lisäksi laiteperäistä hidastuskenttää: elektronisuihku kiihdytetään ensin suurella jännitteellä, jolloin se kulkee objektiivilinssien läpi optimaalisesti. Hidastus tapahtuu vasta linssien jälkeen, juuri ennen kuin elektronit osuvat näytteeseen. Tämä saavutetaan asettamalla koko näyte negatiiviseen potentiaaliin suhteessa maadoitettuun elektronitykkiin ja linssistöön. Näin sähköstaattinen kenttä muodostuu laitteessa hallitusti, eikä se ole riippuvainen yksittäisen näytteen ominaisuuksista. Tämä parantaa kuvanlaatua ja tekee menetelmästä toistettavamman. Äärimmäinen resoluutio saavutetaan yhdistämällä näytekohtainen ja laiteperäinen tekniikka. [5]

Jos elektronisäde olisi täysin monokromaattinen, eli kaikki elektronit olisivat täsmälleen samanenergisiä, kromaattista aberraatiota ei esiintyisi lainkaan. Käytännössä näin ei kuitenkaan ole. Elektronilähteen tyyppi vaikuttaa oleellisesti säteen energiajakaumaan: Kylmäkenttäemissiolähteet tuottavat hyvin kapean energiaja-

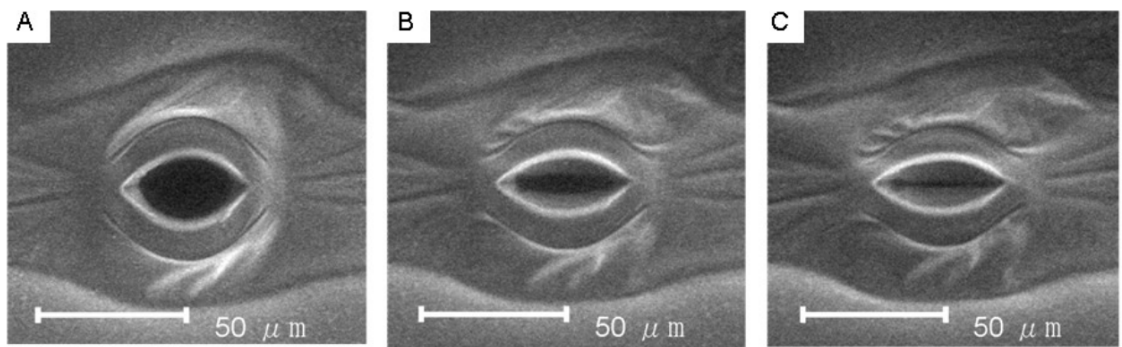
kauman, joten ne kärsivät vähemmän kromaattisista aberratioista. Termiset lähteet sen sijaan tuottavat huomattavasti leveämmän energiajakauman, mikä lisää aberratiota etenkin matalilla jännitteillä. Tästä syystä matalan jännitteen kuvaustilaa (*engl. Low voltage mode*) käytetään usein vain pienillä suurennoksilla, missä resoluutio ei ole kriittisin tekijä. Poikkeuksena ovat huippuluokan kenttäemissiomikroskoopit, jotka käyttävät mainittuja hidastustekniikoita. Näissä laitteissa käytetään usein myös lisävarusteita, kuten sädemonokromaattoreita, jotka kaventavat säteen energiajakaumaa keinotekoisesti. Näin kromaattista aberratiota voidaan vähentää merkittävästi myös suurilla suurennoksilla. [5, 13]

Jos monokromaattorin käyttö ei ole mahdollista, aberratioon voidaan vaikuttaa apertuurin kokoa säätämällä. Apertuuri rajoittaa elektronisäteen halkaisijaa linssistössä. Pienempi apertuuri johtaa kapeampaan säteeseen, joka tuottaa pienemmän konvergenssikulman. Konvergenssikulman suuruus vaikuttaa suoraan kromaattiseen aberratioon. Tämän menetelmän etuna on sen helppous ja laajamittainen käytettävyys useimmissa pyyhkäisyelektronimikroskoopeissa ilman lisälaitteita. Haittapuolena on se, että pienempi konvergenssikulma samalla vähentää säteen virtaa ja voi siten heikentää kuvan signaali–kohinasuhdetta. Siksi sopiva kulma valitaan aina kompromissina resoluution ja kuvanlaadun välillä. [5, 13]

1.6 ESEM

Yksi SEM:in johdannaisista on ESEM (*engl. Environmental Scanning Electron Microscope*), joka eroaa perinteisestä pitämällä elektronitykin ja näytteen eri paineessa. Differentiaalipumppausjärjestelmä ylläpitää kaasun, usein vesihöyryn, paineen näytekammiossa, kun taas tykki on tyhjiössä. Törmätessään elektronit ionisoivat kaasumolekyylejä, josta syntyneet positiiviset ionit neutralisoivat näytteen. Näin eristäviä näytteitä voidaan kuvata ilman johtavan pinnoituksen tarvetta. Näytekammiossa oleva vesihöyry myös ylläpitää optimaalisen ilmankosteuden esimerkiksi

solunäytteille, jolloin myöskään näytteiden kuivaus ja kiinnitys eivät ole pakollisia. Tällä menetelmällä voidaan kuvata biologisia prosesseja, kuten lehden ilmarakojen sulkeutumista. Kuvassa 7 on kolme ESEM-kuvaa, jotka ilmentävät ilmaraon sulkeutumisprosessia, kun näyttekammion suhteellinen ilmankosteus laskettiin 97 %:sta 91 %:iin. Kuvat ovat otettu 10 kV jännitteessä, 90 pA virralla noin 10 minuutin välein. Kun kosteutta vähennettiin 18 %, sulkeutumisaika puoliintui, josta päätellen kyseessä oli elävä prosessi eikä apoptoosi. [15]



Kuva 7. Kolmen ESEM-kuvan sarja ilmaraon sulkeutumisesta vastauksena näyttekammion suhteellisen kosteuden muutokseen 97 %:sta 91 %:iin. Kuvat ovat otettu (A) 12, (B) 25, ja (C) 32 minuuttia leikkaamisesta. Jännite 10 kV ja virta 90 pA. Vesihöyryn paine ja lämpötilat: (A) 973.25 Pa , 7 °C , (B) ja (C) 959.92 Pa, 8 °C. [15]

2 Näytteenkäsittely

Biologisten näytteiden valmisteleminen pyyhkäisyelektronimikroskopiaa varten on haastavaa niiden herkkyyden ja fysikaalisten ominaisuuksien vuoksi. Valtaosa biologisista näytteistä sisältää olennaisena osana vettä. Elektronimikroskopiassa käytettävä tyhjiöympäristö saa veden kuitenkin haihtumaan näytteestä nopeasti. Tämä voi johtaa näytteen rakenteen romahtamiseen - esimerkiksi solukalvo voi luhistua, solurakenteet voivat menettää muotonsa, ja pinnan topografia vääristyä. Biologiset näytteet ovat lisäksi usein myös huonosti sähköä johtavia ja säteilyherkkiä. Kuvantamista edeltävä näytteenkäsittely on siksi erityisen tärkeää.

2.1 Näytteiden kiinnitys ja merkitys solurakenteelle

Aluksi näytteen rakenne ja biologiset prosessit tulee stabiloida yleensä joko jäädyttämällä tai kemiallisesti kiinnittämällä. Kemiallisesti kiinnitys tapahtuu käsittelemällä näyte formaldehydillä tai glutaraldehydillä, jonka johdosta proteiinit ja peptidit ristisilloittuvat ja näin rakenne vakiintuu. Haluttaessa prosessia voidaan jatkaa käsittelemällä näyte osmiumtetroksidilla ja/tai uranyyliasetaatilla, jotka voivat parantaa kontrastia ja vähentää varauksen kertymistä. [2, 4]

Yksi kiinnitystavoista on kryo-kiinnitys, joka voidaan tehdä hitaasti (*engl. slow-equilibrium freezing*) tai erittäin nopeasti menetelmällä, jota kutsutaan vitrifikaatioksi (*engl. vitrification*). Hitaassa jäädytyksessä soluja jäähdytetään hitaasti, yleensä alle 3 °C/min nopeudella esimerkiksi 0 °C:sta -40 °C:seen, minkä jälkeen ne upotetaan nestetyyppeen (-196 °C). Haittana on, että jotkin solutyypit ovat herkkiä solunulkoiselle jääkiteiden muodostumiselle (*engl. extracellular ice formation, EIF*) ja kylmävaurioille, mikä voi johtaa solukuolemaan. Vitrifikaatiossa solut jäädytetään erittäin nopeasti, jotta vältetään jääkiteiden muodostuminen ja kylmävauriot. Tavoitteena on saavuttaa amorfinen eli lasimainen tila, jossa solun vesi ei kiteydy. Ongelmana on ns. Leidenfrostin ilmiö, jossa nestetyypen ja näytteen väliin muodostuu eristävä kaasukerros, joka hidastaa jäätymistä. Tätä voi ehkäistä käyttämällä typpisohjoa (*engl. slush nitrogen*), joka on kiinteän ja nestemäisen tyypen seos ja jäädyttää näytteen tehokkaammin. [2, 4]

Näytteen kiinnitys alustaan riippuu näytteen tyypistä. Ohuita näytteitä, kuten ihokerrosta, varten alustaan voidaan lisätä selluloosa-asetaatti-kolloidigrafiittiseosta, joka toimii kiinnityksineena. Nestemäiset näytteet voidaan suodattaa kalvolle, joka on kiinnitetty esimerkiksi filtereillä päällystettyyn alustaan. [2]

Näytteiden tulee olla johtavia, joten esimerkiksi eristävän aluslasin käyttö on ongelmallista. Eräs tapa on kasvattaa näytteet johtaville hiilikuituteipeille. Hiiliteipit steriloidaan UV-valossa ja asetetaan soluviljelylevyihin. Solut inkuboidaan

kasvatusolosuhteissa (37 °C, 5 % CO₂) 24–48 tunnin ajan niiden kasvuvauhdista riippuen. Kun solut ovat saavuttaneet halutun kasvun, ne pestään fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS) ja kiinnitetään 2 % glutaraldehydiliuoksella noin 20 minuutin ajan 4 °C:ssa. Hiiliteipeille viljely tarjoaa helpon ja kustannustehokkaan vaihtoehdon SEM-näytteiden valmistukseen. Menetelmä soveltuu biologiseen perustutkimukseen ja voi nopeuttaa laboratoriotyöskentelyä ilman merkittävää laadun heikkenemistä verrattuna perinteisiin kuivatusmenetelmiin. [16]

Aluslasit voidaan myös käsitellä johtaviksi. Usein käytetään ITO-lasia (*engl. indium tin oxide*), eli läpinäkyvällä ja johtavalla oksidikerroksella ohutkalvomenetelmin päällystetty tavallinen lasi. ITO-kalvo on lisäksi jo hapettunut yhdiste, joten se on kemiallisesti vakaa eikä menetä johtavuuttaan. ITO-pinnalle voidaan suorittaa soluviljely: pinnoitetut lasilevyt steriloidaan UV-valossa ja asetetaan viljelylevyihin, minkä jälkeen solut inkuboidaan ja fiksataan kuten muillakin pinnoilla. [4]

2.2 Kuivausmenetelmiä

Stabiloinnin jälkeen näyte tulee kuivata niin, että näytteen koko muuttuisi mahdollisimman vähän ja artefaktit olisivat minimaalisia. Kuivausprosessi aloitetaan lähes aina poistamalla vesi etanolisarjan avulla: näytteet kuivataan asteittain etanolisarjan avulla (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % ja kahdesti 100 %) kolme minuuttia kerrallaan. Tämä vaihe on yhteinen kaikille seuraaville kuivausmenetelmille, joiden tarkoituksena on poistaa jäljellä oleva liuotin näytteestä hallitusti ja minimoiden artefaktit.

Yksi yksinkertaisimmista ja nopeimmista tavoista on ilmakeivaus: alkoholikäsitelyn jälkeen näytteet jätetään kuivumaan ilmavirtaukseen noin 15–20 minuutiksi. Menetelmä on helppo, edullinen ja laajalti käytetty, mutta se altistaa näytteet kuitistumiselle ja pintajännityksestä johtuville artefakteille. Tarkan ajastuksen ja käsittelevän avulla näitä vaikutuksia voidaan kuitenkin lieventää. [2, 16, 17]

Artefaktien määrää voidaan vähentää käyttämällä heksametyylidisilatsaania (HMDS), joka on orgaaninen liuotin ja tehokas kuivausaine. Etanoli korvataan HMDS:llä ennen sen haihduttamista. Menetelmä aiheuttaa vähemmän pintajännitystä ja minimoi rakenteelliset vauriot. HMDS on kuitenkin myrkyllistä ja helposti syttyvää. [2, 16]

Perinteisin ja edelleen erittäin luotettava menetelmä on kriittisen pisteen kuivaus (CPD). Tässä etanolilla korvattu vesi vaihdetaan ensin nestemäiseen hiilidioksidiin, joka sitten haihdutetaan ylittämällä sen kriittinen piste. Näin vältetään pinta–nestejännitys kokonaan, mikä tekee menetelmästä erityisen soveltuvan herkille biologisille rakenteille. [17]

Solujen vesi voidaan myös korvata ionisilla nesteillä. Ioniset nesteet ovat huomosti haihtuvia, sähköä johtavia ja lämpötilaltaan vakaita nesteitä, jotka koostuvat kokonaan ioneista. Ne eivät aiheuta jääkiteiden muodostumista, toisin kuin vesipohjaiset liuokset. Tämä veden korvaaminen tehdään usein joko diffuusiolla tai osana näytteen käsittelyprosessia, kuten kryofiksaatiossa, jossa vesi korvataan asteittain ioninesteellä alhaisissa lämpötiloissa. Ionisia nesteitä voidaan myös yhdistää muihin korvaaviin aineisiin, kuten metanoliin, etanoliin tai asetoniin. [18, 19]

2.3 Pinnoitusmenetelmiä

Parhaan tuloksen saamiseksi biologiset näytteet tulisi pitää mahdollisimman lähellä alkuperäisiä tilojaan, joten pinnoituskin tulee tehdä harkiten. Näytteet pinnoitetaan ohuesti johteella varautumisen estämiseksi. Sputterointi on prosessi, jossa näyte päällystetään ohuesti, n. 1–2 nm, johtavalla metallilla, kuten kullalla tai platinalla. Sekundäärielektronit lisääntyvät eli signaali kasvaa, ja varauksen kertymisestä ja heikosta elektronisignaalista johtuva kohina pienenee, jolloin signaali-kohinasuhde kasvaa ja kuva on tarkempi. Samalla pinnoitus antaa näytteelle hieman paremman lämmönjohtavuuden, jolloin varmistetaan, ettei näyte lämpene liikaa ja siten vau-

rioidu. Metallipinnoitus voi kuitenkin peittää herkkiä pintarakenteita. [2, 17]

Pinnoitus voidaan suorittaa myös hiilellä, mistä käytetään nimeä tyhjiöhöyrystys. Prosessissa hiilitankoon tai -lankaan johdetaan korkea sähkövirta, mikä aiheuttaa sen kuumentumisen ja hiilimateriaalin höyrystymisen. Höyrystynyt hiili tiivistyy näytteen pinnalle muodostaen ohuen, johtavan kerroksen. Näyte altistuu prosessissa kuitenkin merkittävälle lämpösäteilylle, joka voi vaurioittaa sitä. Lisäksi hiilipinnoite on herkkä mekaanisille vaurioille, ja saattaa lohkeilla ja kulua. [2, 4]

3 Kuvien analyysi ja prosessointi

3.1 Kuvien tulkinta - resoluutio, kontrasti ja topografia

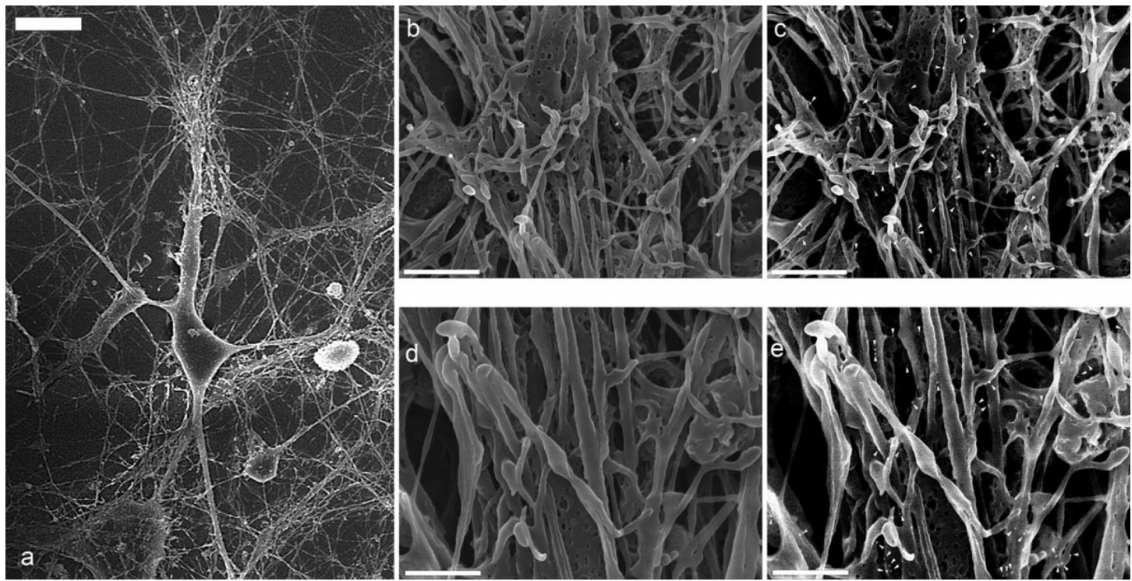
SEM-kuvan resoluutio määräytyy useista tekijöistä, kuten käytetystä jännitteestä ja työskentelyetäisyydestä. Resoluutio on suoraan verrannollinen elektronisäteen aallonpituuteen, joka puolestaan pienenee suuremmilla kiihdytysjännitteillä. Korkeat jännitteet parantavat tarkkuutta, mutta voivat lisätä elektronisäteen tunkeutumista näytteeseen ja siten heikentää pinnan yksityiskohtien erottumista, ja vaurioittaa herkkiä bionäytteitä. Sopivan jännitteen valitsemisessa täytyy miettiä signaalikohinasuhdetta, tunkeutumissyvyyttä ja haluttua resoluutiota. Työskentelyetäisyyttä säätämällä etsitään tasapainoa haluttujen tulosten saamiseksi.

Kontrasti muodostuu takaisinsironneiden elektronien (BSE) ja sekundäärielektronien (SE) avulla. BSE-kontrasti riippuu näytteen keskimääräisestä atomipainosta, jolloin raskaammat alkuaineet näkyvät kirkkaampina, joka todettiin luvussa 1.4. Sekundäärielektronit sen sijaan korostavat näytteen pintarakennetta, sillä ne syntyvät matalalla energialla hyvin läheltä pintaa.

SEM:n etuna on laaja syväterävyys, joka mahdollistaa kolmiulotteisen rakenteen hahmottamisen. Työskentelyetäisyyden säätely vaikuttaa syväterävyyteen: suurempi etäisyys parantaa syväterävyyttä, mutta voi heikentää erotuskykyä. SEM:n avulla

voidaan tarkastella näytteen pinnan muotoja, kuten soluja ja kuituja, josta saadaan tietoa näytteen topografiasta.

SEM-kuvien tulkinta perustuu resoluution, kontrastin ja topografisten ominaisuuksien analyysiin. Mikroskoopin asetuksia säätämällä voidaan optimoida näytteen yksityiskohtien erottaminen ja välttää artefakteja, kuten varautumista ja säteen tunkeutumista syvemmälle rakenteeseen. [1]



Kuva 8. SEM-kuva aivokuoren primääri-neuroneista. Neuronit ovat päällystetty 20 nm ITO-kalvolla. a) SE-yleiskuva; korreloivat korkean resoluution b), d) SE-kuvat ja c), e) BSE-kuvat. Mittapalkkien pituudet a) 10 μm , b), c) 1 μm , d), e) 500 nm. [20]

3.2 Kuvien tulkinta - rakenteiden havainnointi

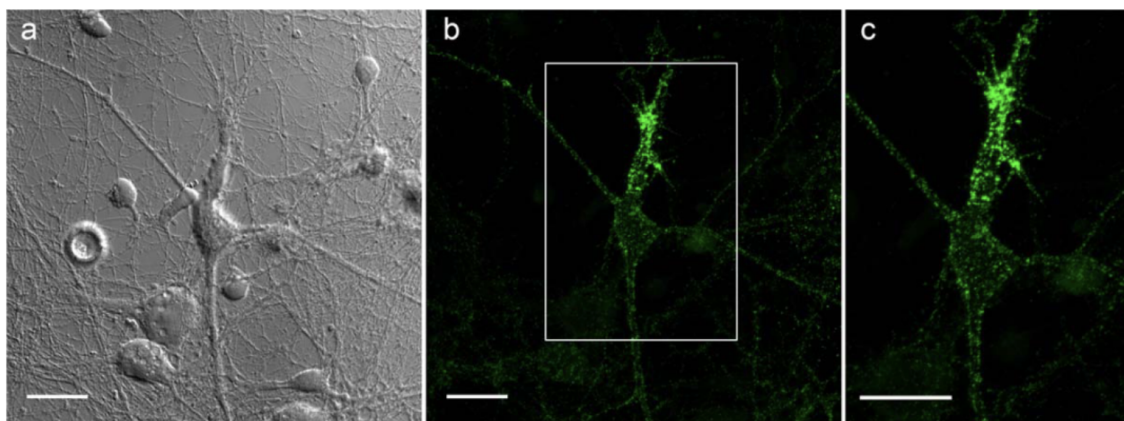
Fluoresoivia tunnisteita käyttämällä voidaan visualisoida solun spesifejä antigeenejä optisella mikroskoopilla. Konfokaalimikroskopiassa fluoresenssikuvantamisella osoitetaan, missä tietyt antigeenit sijaitsevat käyttämällä antigeeneihin hakeutuvia fluoroforeja, jotka emittoivat fotoneja. Elektronimikroskopiassa tämä on hankalaa orgaanisten molekyylien antaessa vain vähän kontrastia, jolloin voidaan käyttää kultananopartikkeleja, jotka korkean järjestyslukunsa (79) takia näkyvät kuvassa

kirkkaimpana. Partikkelit voidaan peittää vasta-aineilla eli spesifeihin antigeeneihin hakeutuvilla proteiineilla. Kun kultapartikkelit lisätään soluun ne hakeutuvat antigeeneihin, ja BSE-signaaleja mitattaessa korkean järjestysluvun kulta tuottaa voimakkaan BSE-signaalin ja näkyy kuvissa kirkkaana pisteinä. Perinteiset metallipinnoitteet, kuten kulta tai platina, peittävät helposti kultananopartikkeleiden tuottamaa BSE-signaalia. SEM-kuvauksen haasteena on solujen sähköisen johtavuuden varmistaminen niin, että kullan signaali näkyy yhä. [20]

Yksi ratkaisu on käyttää ITO-kalvoa, joka parantaa johtavuutta mutta säilyttää kullan BSE-signaalin. Sen keskimääräinen järjestysluku (49) on selvästi alempi kuin kullan (79), joten kullan BSE-signaali säilyy kirkkaimpana. ITO-kalvo voidaan levittää ionisputteroinnilla, jolloin se leviää näytteen pinnalle tasaisesti peittämättä solun pintarakenteita, joten SE-kuvantaminen on edelleen mahdollista. [20]

Kuvassa 8 nähdään SEM-kuva aivokuoren primäärineuroneista, jotka on päällystetty ITO-kalvolla. Neuroneihin on lisätty kultananopartikkeleita, jotka on päällystetty vasta-aineella. Vasta-aine hakeutuu GABA-A-reseptoreihin. BSE-kuvissa nähdään kultananopartikkeleita kirkkaina pisteinä, jotka on korostettu valkoisilla nuolilla. [20]

Vertailun vuoksi kuvassa 9 on konfokaalimikroskoopilla otettu kuva samoista neuroneista, joissa GABA-A-reseptorien $\alpha 1$ -alalyksiköt on merkitty ATTO488-fluoroforilla. Fluoresenssikuva näyttää signaalin niistä kohdista, joissa kyseisiä reseptoreita esiintyy – samoista kohdista, joissa kultananopartikkelit havaittiin SEM-kuvissa. Näin yhdistämällä fluoresenssi- ja elektronimikroskopiaa, eli käyttämällä korrelatiivista elektronimikroskopiaa (*correlative electron microscopy, CLEM*), voidaan tarkasti paikantaa antigeenit sekä valomikroskooppisesti että elektronimikroskooppisesti ilman ristihäiriöitä. ITO-pinnoitus osoittautui tässä ratkaisuksi, joka mahdollistaa monimenetelmällisen kuvantamisen laadun heikkenemättä. [20]



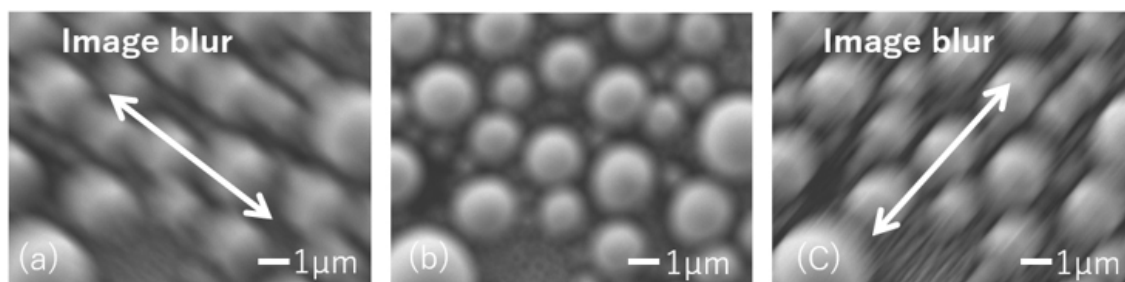
Kuva 9. Konfokaalimikroskooppikuvat aivokuoren primäärineuroneista. GABA-A-reseptoreiden $\alpha 1$ -alaysiköt ovat merkattu ATTO488-fluoroforilla. a) valo-DIC-kuva neuronien rakenteesta ilman fluoresenssia. b) Maksimiprojektio 25 optisella sektioilla. c) Suurennos kuvan (b) rajatusta alueesta. Mittapalkkien pituudet ovat $20 \mu\text{m}$. [20]

3.3 Kuvien artefaktit

Jokainen vaihe näytteenkäsittelystä valmiiseen kuvaan sisältää mahdollisuuden virheille, jotka vaikuttavat lopputulokseen. Kuvissa voi siis esiintyä häiriöitä, joiden syytä on monia.

Astigmatismi, eli hajataitto, on eräs häiriö, jossa kuva venyy ja sumenee. Kun hajataitto on isotrooppista eli kohdistuu jokaiseen suuntaan, kuva on kohdistettu oikein eikä venymistä esiinny. Kun astigmatismia kohdistuu enemmän tiettyyn suuntaan, kuva venyy, kuten kuvassa 10 nähdään. Ilmiö johtuu elektronisuihkun ellipsinmuotoisesta radasta. Tarkan kuvantamisen mahdollistamiseksi elektronisuihkun tulisi kulkea mahdollisimman pyöreää rataa. Hajataittoa korjataan stigmaattoreilla, jotka koostuvat sähkömagneettisista keloista. Keloilla voidaan muokata säteen muotoa ja korjata vääristymää.

Kun elektronien emissio lisääntyy näytteen sisältä reunoilta ja huipuista, syntyy reunavaikutus (*engl. edge-effect*). Elektronit virtaavat mieluiten reunoihin ja teräviin kohtiin joissa matka ulos näytteestä on lyhin. Elektronit emittoituvat näistä kohdista, ja antavat muodon ja ääriviivat sekundaarisen elektroninilmaisimen tuottamille kuville. Heikko signaalin voimakkuus ilmenee painaumuksissa. Elektronisuihkun



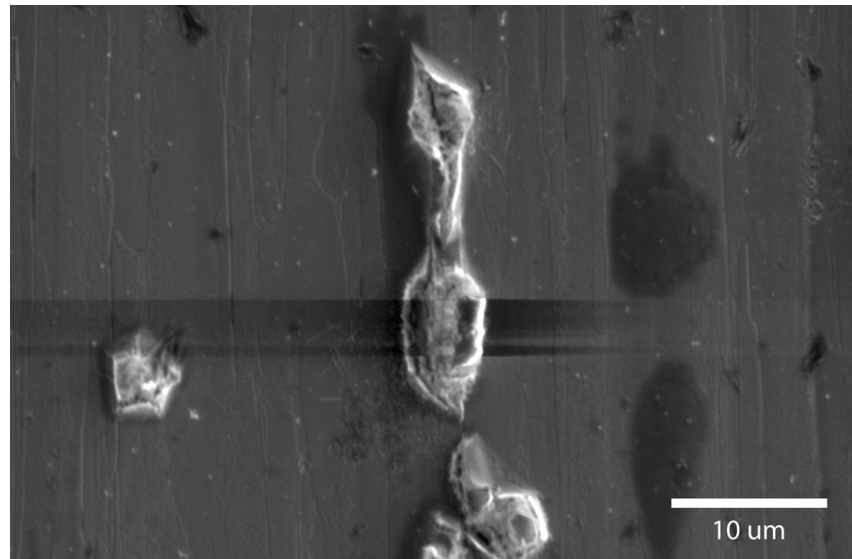
Kuva 10. Hajataiton vaikutus kuvaan eri polttopisteissä säteen ollessa a) ylitarkennettu, b) isotrooppisesti epätarkka tai c) alitarkennettu. Kuvan näytteenä tinapallot, joita kuvattu 5 kV kiihdytysjännitteellä ja 4 mm työskentelyetäisyydellä käyttäen 176 pA koetinvirtaa. [21]

jännitteen alentaminen voi vähentää reunavaikutusta.

Kun elektronisäde osuu näytteeseen, näyte saattaa varautua ja syntyy sekä positiivisen että negatiivisen varauksen alueita. Jos alue muuttuu positiiviseksi, se vetää puoleensa sekundäärielektroneja ja näkyy kuvassa tummana kohtana. Mitä negatiivisempi alue on, sitä enemmän se emittoi hitaita elektroneja ja näkyy kuvassa kirkkaana. Joissain tapauksissa negatiiviset alueet levittävät elektroneja aiheuttaen kuvaan kirkkaita juovia ja häiriöitä. Kuvassa 11 on kuva pesäkuoriaisesta, jossa näkyy varauksen aiheuttamaa häiriötä tummana ja kirkkaana nauhana. Apuna ongelmaan näytteen johtavuutta voidaan parantaa, lisäksi näytteeseen osuneiden elektronien määrään tulisi olla sama kuin poistuvien elektronien, jotta näyte pysyisi neutraalina. [5]

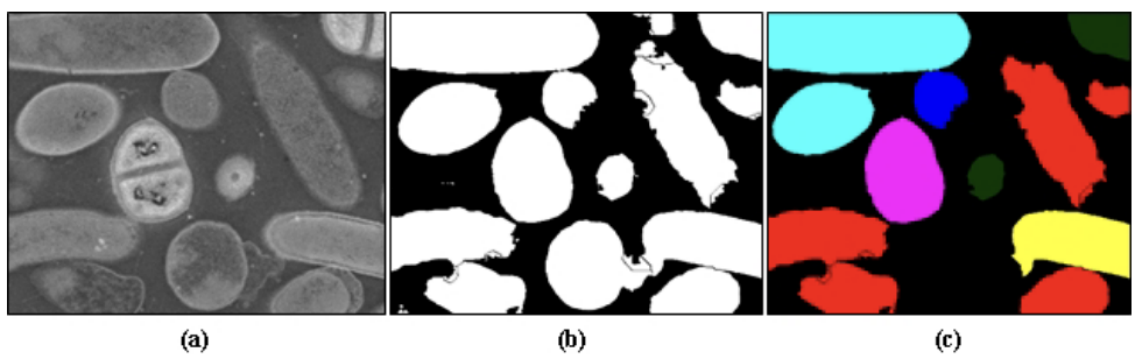
4 Sovelluksia

SEM-laitteita ja niiden sovelluskohteita kehitetään jatkuvasti. Yksi viimeaikaisista innovaatioista on ajatus ihmisen suolistobakteerinäytteestä otettujen SEM-kuvien analysoimisesta syväoppimista hyödyntäen. SEM-kuvilla ja syväoppimisen avulla saadaan tarkempaa tietoa, kuin perinteistä optista mikroskooppia käyttämällä. Kuvien korkea resoluutio mahdollistaa bakteerien pinnan yksityiskohtaisen tarkastelun ja antaa informaatiota myös bakteerien sisäpuolen tekstuurista. Kagishita *et al.* [22]



Kuva 11. BSE-kuva pesäkuoriaisesta, jossa näkyy varauksen aiheuttamaa häiriötä tummana ja kirkkaana nauhana.

ehdottivat menetelmää, joka sisältää segmentointi-, erottelu- ja luokittelumoduulit bakteerien kvantitatiiviseen analysointiin. Prosessin tuloksena SEM-kuvan bakteerit on erotettu toisistaan, luokiteltu lajeihinsa ja laskettu. Kuvassa 12 näkyy prosessikuvia, joista ensimmäisenä on saatu SEM-kuva, ja toisena syväoppimisjärjestelmän erottelamat bakteerit. Viimeisessä kuvassa nähdään, miten bakteerit on luokiteltu väreihin lajinsa perusteella.



Kuva 12. Prosessikuvat SEM-kuvan bakteerien analysoinnista. (a) Järjestelmälle syötetty SEM-kuva. (b) Etu- ja taka-alan segmentoidut ja erotetut alueet. (c) Lopputulos, jossa nähdään eri väreihin lajinsa perusteella luokitellut bakteerit. [22]

5 Yhteenveto

Pyyhkäiselektronimikroskopia on merkittävä kuvantamistekniikka biologisten näytteen morfologian ja pintarakenteiden analysoinnissa. Sen korkea erotuskyky, laaja syväterävyys ja kyky tuottaa kolmiulotteisia kuvia tekevät siitä erityisen hyödyllisen monille aloille, kuten solubiologialle, mikrobiologialle ja materiaalitutkimukselle. SEM:n onnistunut käyttö biologisille näytteille vaatii huolellista näytteenkäsittelyä tavoitteena säilyttää näytteen rakenteet ja estää artefakteja. Kuvan laatuun vaikuttavat monet tekijät, kuten elektronisäteen energia, detektorivalinnat ja pinnoitusmateriaalit, joiden optimointi on olennaista tarkkojen tulosten saavuttamiseksi. SEM:n avulla voidaan tehokkaasti tutkia biologisten näytteen topografiaa ja yksityiskohtia, mutta menetelmän haasteisiin kuuluvat muun muassa bionäytteen haasteellinen preparointi ja heikko muuttuvien olosuhteiden sieto. Tästä huolimatta SEM on edelleen yksi tärkeimmistä työkaluista biologisten näytteen yksityiskohtaiseen analyysiin.

Viitteet

- [1] E. R. Fischer, B. T. Hansen, V. Nair, F. H. Hoyt, C. L. Schwartz ja D. W. Dorward, *Current Protocols* **4**, e1034 (2024).
- [2] R. A. Fleck ja B. M. Humbel, *Biological Field Emission Scanning Electron Microscopy*, 1st ed. (Wiley, 2019).
- [3] S. Tang, J. Tang, E. Okunishi, Y. Ninota, A. Yasuhara, J. Uzuhashi, T. Ohkubo, M. Takeguchi, J. Yuan ja L.-C. Qin, *Materials Today* **57**, 35 (2022).
- [4] P. Echlin, *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (Springer US, Boston, MA, 2009).
- [5] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. Ritchie, J. H. J. Scott ja D. C. Joy, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (Springer New York, New York, NY, 2018).
- [6] R. F. Egerton, *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM* (Springer, New York, NY, 2005), oCLC: ocm61714990.
- [7] P. W. Hawkes, *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*, No. v.45 in *Springer Series in Optical Sciences Ser*, 2nd ed. (Springer Berlin, Berlin, Heidelberg, 1998).
- [8] Scanning Electron Microscopy | Nanoscience Instruments.
- [9] Oxford Instruments, *Silicon Drift Detectors Explained*, Oxford Instruments NanoAnalysis, 2012.
- [10] D. B. Williams ja C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy* (Springer US, Boston, MA, 1996).
- [11] M. Zhang, Y. Deng, M. Yang, H. Nakajima, M. Yudasaka, S. Iijima ja T. Okazaki, *Scientific Reports* **9**, 1284 (2019).
- [12] O. Lalinský, J. Bok, P. Schauer ja L. Frank, kirjassa *Proceedings of the 18th International Microscopy Congress* (Czechoslovak Microscopy Society, Prague, Czech Republic, 2014), pp. Abstract IT-4-P-3232.
- [13] JEOL Ltd., Chromatic Aberration, <https://www.jeol.com/words/semterms/20121024.011200.php>, 2012.
- [14] D. C. Joy ja C. S. Joy, *Micron* **27**, 247 (1996).
- [15] J. E. McGregor ja A. M. Donald, *Journal of Physics: Conference Series* **241**, 012021 (2010).
- [16] R. Ali, K. El-Boubbou ja M. Boudjelal, *MethodsX* **8**, 101521 (2021).

- [17] W. Zhou ja Z. L. Wang, *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications* (Springer Science+Business Media, New York, NY, 2007).
- [18] L.-A. DiCecco, A. D'Elia, C. Quenneville, L. Soleymani ja K. Grandfield, *Micron* **153**, 103192 (2022).
- [19] O. E. Zhuravlev, A. I. Ivanova ja R. M. Grechishkin, *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques* **9**, 904 (2015).
- [20] S. Rodighiero, B. Torre, E. Sogne, R. Ruffilli, C. Cagnoli, M. Francolini, E. Di Fabrizio ja A. Falqui, *Microscopy Research and Technique* **78**, 433 (2015).
- [21] JEOL Ltd., *Glossary of SEM Terms*, 2020.
- [22] Y. Kakishita, A. Ray, H. Hattori, A. Hisada, Y. Ominami, J.-P. Baudoin, J. Y. B. Khalil ja D. Raoult, kirjassa *2021 55th Annual Conference on Information Sciences and Systems (CISS)* (IEEE Baltimore, MD, USA, 2021), pp. 01–06.