

## SCANNING ELEKTRONENMICROSCOPISCHE (SEM) OBSERVATIE VAN BIOLOGISCHE EN NIET-BIOLOGISCHE PREPARATEN IN HOOG- EN LAAG-VACUÛM

W. Van den Broeck, B. De Pauw

Vakgroep Morfologie, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,  
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke  
wim.vandenbroeck@rug.ac.be

### SAMENVATTING

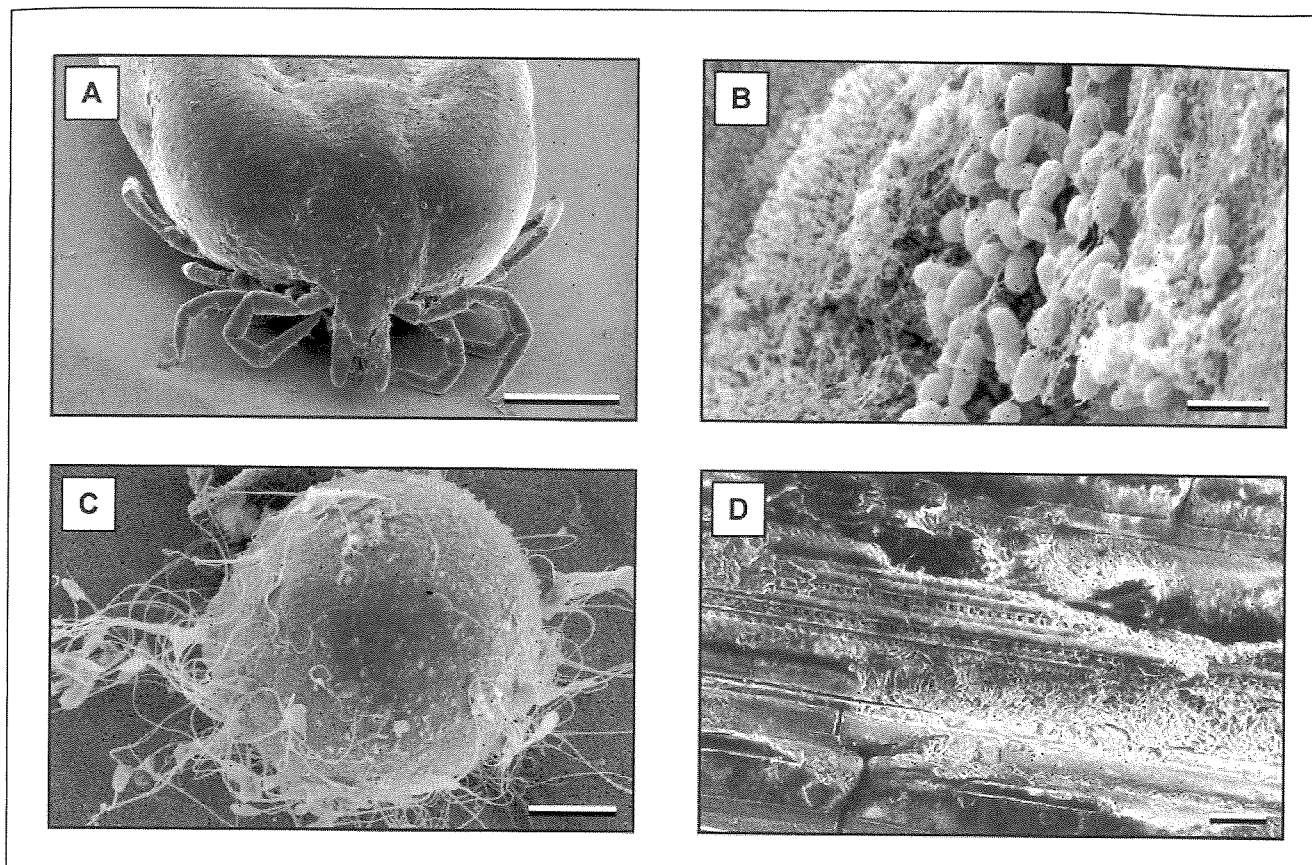
Bij conventionele scanning elektronenmicroscopie (SEM) wordt het oppervlak van onderzoekspreparaten in beeld gebracht door emissie van secundaire elektronen in hoog-vacuüm. Door de technische evolutie bestaat thans de mogelijkheid om backscattered elektronen te detecteren in laag-vacuüm. Deze techniek laat de analyse van de samenstelling en de densiteit van diepere lagen toe, evenals het gebruik van specifieke immunogoud kleuringen. In deze studie werden de oppervlakteobservaties van niet-biologische geleidende en niet-geleidende preparaten bij hoog- en laag-vacuüm vergeleken. Bovendien werd onderzocht of deze methodiek ook kan aangewend worden voor de observatie van niet-gefixeerde en niet-ontwaterde biologische specimens. De conclusie is dat niet-biologische preparaten kunnen bekeken worden in laag-vacuüm, waarbij de beelden gelijkaardig zijn en in sommige gevallen zelfs meer informatie verschaffen dan de beelden bij hoog-vacuüm analyse. Biologische preparaten daarentegen worden het best geobserveerd volgens de conventionele hoog-vacuüm methode waarbij de specimens voldoende gefixeerd, gedehydrateerd en gecoat worden. Wanneer de stalen weinig vocht bevatten kan de laag-vacuüm techniek aangewend worden, maar deze beelden zijn minderwaardig aan de conventionele SEM-beelden.

### INLEIDING

De vakgroep Morfologie van de faculteit Diergeneeskunde beschikt over een scanning elektronenmicroscopie (SEM) die reeds voor verschillende diergeneeskundige toepassingen werd gebruikt, zowel op het gebied van onderzoek als voor diagnostiek (Figuur 1). De beelden 1 A tot en met 1 D tonen respectievelijk een teek aangetroffen op een geschoten ree-geit, enterotoxigene *Escherichia coli* bacteriën die het darmslijmvlies van een varken koloniseren, spermatozoa op een eikel van het rund, en een stukje plantaardig materiaal aangetroffen in een abces in de neus van een paard. Bij al deze toepassingen werd de conventionele SEM-technologie aangewend. Deze technologie is gebaseerd op de detectie van *secundaire elektronen* in een hoog-vacuüm milieu (high vacuum SEM, HV-SEM) en vereist in de meeste toepassingen een geleidend preparaat (Murphy, 1980; Nowell en Pawley, 1980). Deze secundaire elektronen ontstaan vanuit de oppervlakkige lagen van het preparaat en bezitten een lage energie. Door deze lage energetische waarde worden de secundaire elektronen in een laag-vacuüm milieu verstrooid na contact met aanwe-

zige luchtmoleculen, waardoor het verkregen beeld aan scherpte verliest. Dit maakt dat secundaire elektronen enkel in een hoog-vacuüm omgeving in voldoende mate zonder verstrooiing gedetecteerd kunnen worden.

De SEM wordt echter niet alleen gebruikt in de medische en biologische wetenschappen, maar ook in diverse andere domeinen, zoals forensisch onderzoek, kwaliteitscontrole en/of defectanalyse bij de ontwikkeling van metalen en keramische materialen, halfgeleiders en dergelijke (Basu en Ferriss, 1980; Yuhas en Kessler, 1980). De wisselwerking tussen de snelle toename van het aantal SEM-toepassingen enerzijds en de continue ontwikkeling en verfijning van de SEM-technologie anderzijds, heeft tot gevolg dat de voorbereiding van biologische stalen voor SEM-analyse sterk varieert. Daar waar de conventionele SEM-methodiek gebaseerd is op detectie van secundaire elektronen in een hoog-vacuüm omgeving, wordt bij de recent ontwikkelde SEM-technologie gebruik gemaakt van *backscattered elektronen* in laag-vacuüm (low vacuum SEM, LV-SEM) waarbij niet-geleidende preparaten kunnen geobserveerd



**Figuur 1.** Conventionele HV-SEM-beelden van A: een teek aangetroffen op een reegit (maatstrep = 1 mm); B: enterotoxigene *Escherichia coli* bacteriën die het darmslijmvlies van een big koloniseren (maatstrep = 20 µm); C: spermatozoa op een eicel van het rund (maatstrep = 20 µm, met dank aan Prof. A. Van Soom); D: een stukje plantaardig materiaal aangetroffen in een abces in de neus van een paard (maatstrep = 20 µm, met dank aan Prof. A. De Moor).

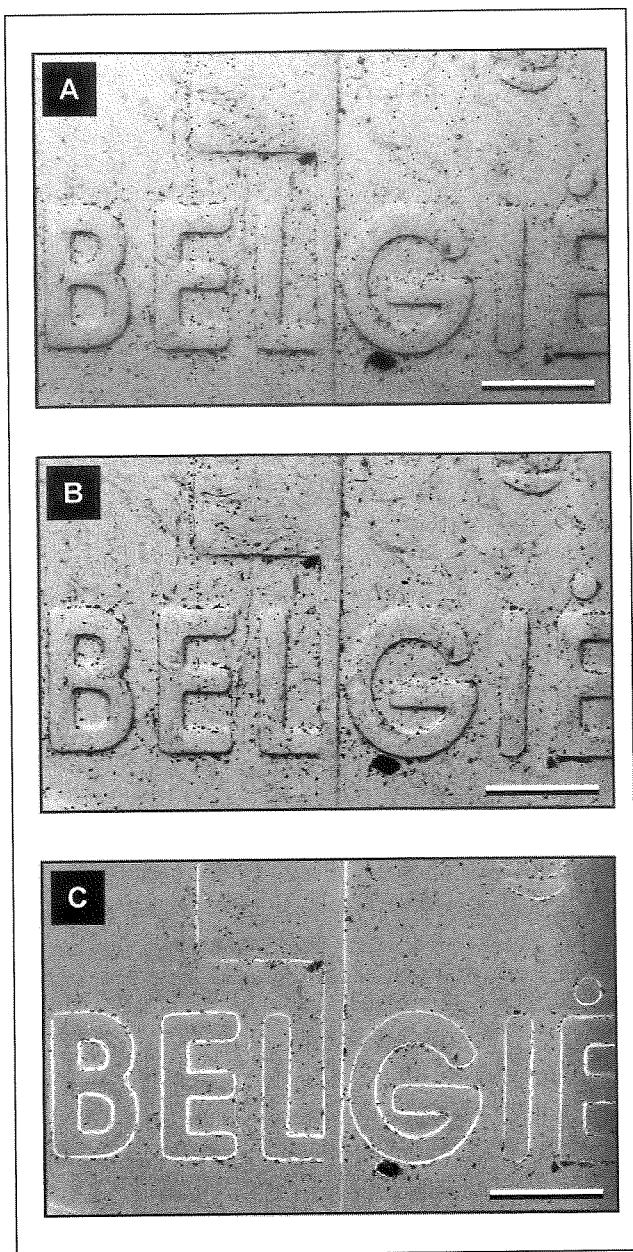
worden (Ushiki *et al.*, 1998). Deze backscattered elektronen zijn afkomstig van de primaire elektronenbundel, worden teruggezonden vanuit de diepere lagen van het preparaat en behouden hun relatief hoge energetische inhoud. Daardoor kunnen zij ook gedetecteerd worden in laag-vacuüm. De LV-SEM-techniek kan mits enige aanpassingen ook angewend worden voor densiteitsmetingen (Roschger *et al.*, 1998) en immunogoud gemerkte SEM-analysen (Hodges, 1992; Goto *et al.*, 1999). Aangezien backscattered elektronen gedetecteerd kunnen worden in een laag-vacuüm omgeving bestaat de mogelijkheid om onder de LV-SEM niet-ontwaterde en zelfs niet-gefixeerde biologische preparaten te observeren zonder dat te veel deformaties optreden tengevolge van de uitdroging. Er zijn echter weinig gegevens beschikbaar over deze methodiek.

De SEM van de vakgroep Morfologie is geschikt zowel voor microscopische analyse onder hoog-vacuüm (detectie van secundaire of backscattered elektronen) als onder laag-vacuüm (detectie van backscattered elektronen) waarbij de resolutie respectievelijk 3,5 nm en 5,0 nm bedraagt. Daardoor kan dit toestel gebruikt worden volgens de conventionele

methodiek voor allerhande diergeneeskundige toepassingen (Figuur 1), maar ook volgens de meer recent ontwikkelde laag-vacuüm technologie. In dit artikel worden daarom kort de mogelijkheden van deze laag-vacuüm technologie onderzocht en besproken. Daartoe worden verscheidene niet-biologische en biologische preparaten onderzocht, waarbij telkens een vergelijking wordt gemaakt tussen hoog-vacuüm analyse ( $10^{-4}$  Pa) en laag-vacuüm analyse (30 Pa).

#### METHODIEK EN VOORBEELDEN

Er werd gebruik gemaakt van de facultaire SEM-apparatuur, bestaande uit een scanning elektronenmicroscop van het merk JEOL, type JSM 5600 LV (Tokyo, Japan), een kritisch punt droger van het type Balzers CPD 030 (Balzers, Liechtenstein) en de platina coater Auto Fine Coater JFC-1300 van JEOL (Tokyo, Japan). Alle preparaten werden digitaal gefotografeerd aan een hoge resolutie en de foto's werden verwerkt met het programma Ulead Photoimpact (Taipei, Taiwan).



**Figuur 2.** SEM-beelden van een muntstuk (maatstreep = 1 mm); A: laag-vacuüm; B: hoog-vacuüm, backscattered elektronen; C: hoog-vacuüm, secundaire elektronen.

### Niet-biologische preparaten

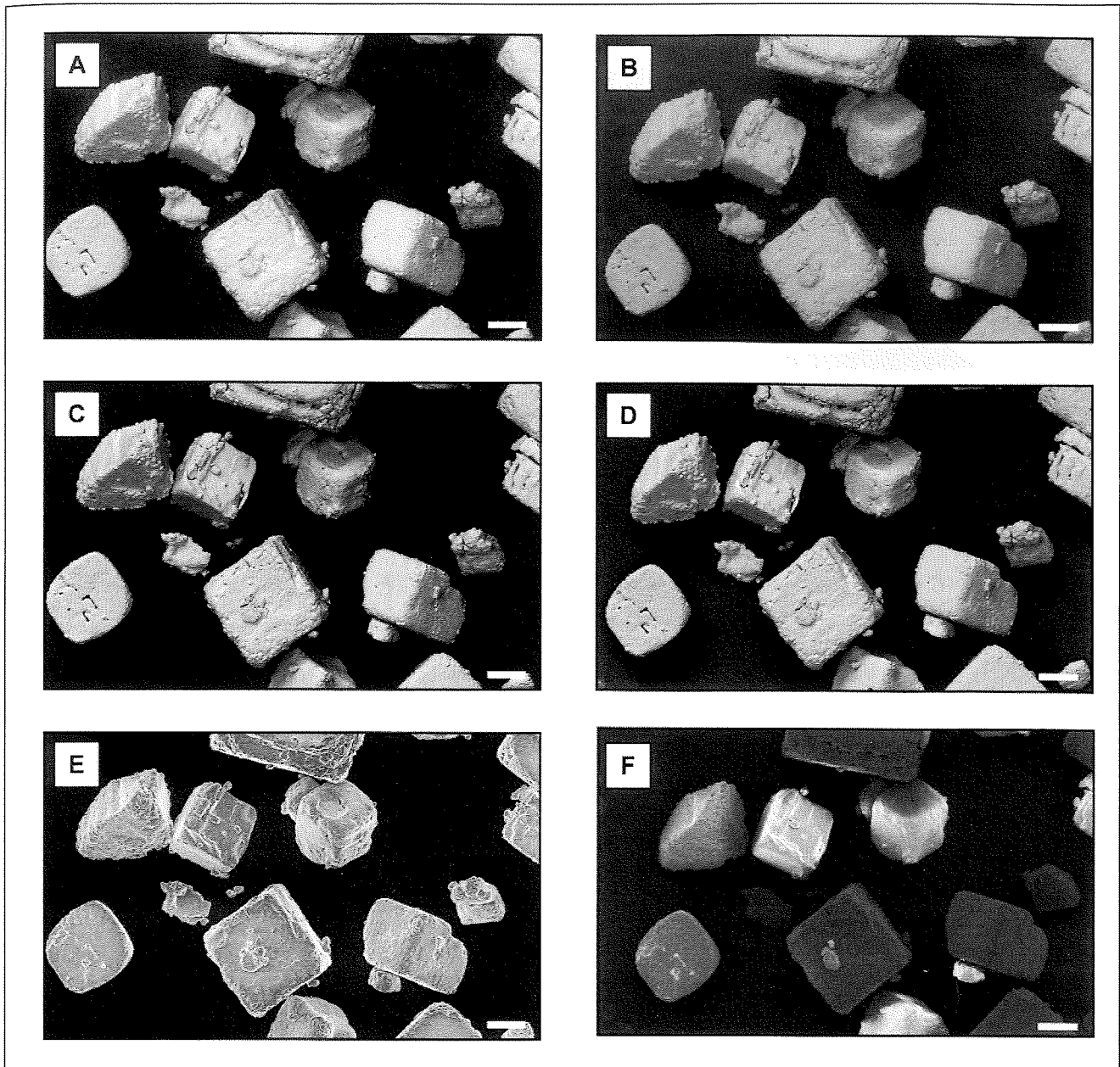
Een muntstuk werd genomen als niet-biologisch, droog en geleidend preparaat. Dit muntstuk werd onder laag-vacuüm bekeken met behulp van backscattered elektronen, en onder hoog-vacuüm met behulp van backscattered en secundaire elektronen. Hieruit blijkt dat het gebruik van backscattered elektronen de beste resultaten geeft (Figuur 2 A en B). Deze techniek laat toe om een duidelijk reliëf waar te nemen, zowel onder laag-vacuüm (Figuur 2 A) als onder hoog-vacuüm (Figuur 2 B), waarbij het laag-vacuüm beeld een beetje inboet aan scherpheid en contrast. Wanneer onder

hoog-vacuüm secundaire elektronen worden waargenomen, verkrijgt men een beeld waarbij enkel de contouren ter hoogte van de reliëfverschillen worden weergegeven (Figuur 2 C). Daardoor lijkt het beeld vrij vlak en verliest het enige informatie.

Als voorbeeld van een niet-biologisch, droog en niet-geleidend preparaat werd keukenzout (NaCl) gebruikt. De zoutkristallen werden zowel door middel van backscattered elektronen onder laag-vacuüm als onder hoog-vacuüm door middel van backscattered en secundaire elektronen, bekeken. Hierbij werd telkens een onderscheid gemaakt tussen de natieve niet-geleidende NaCl kristallen en kristallen die geleidend werden gemaakt door middel van platina coating. De analyse van deze kristallen leert dat het gebruik van backscattered elektronen onder laag- en hoog-vacuüm gelijkaardige beelden oplevert. Zoals bij het muntstuk blijken ook hier de laag-vacuüm beelden (Figuur 3 A en B) minder scherp en minder contrastrijk dan de hoog-vacuüm beelden (Figuur 3 C en D). Binnen één aangewende methode (laag-vacuüm of hoog-vacuüm) is er echter geen verschil in beeldkwaliteit tussen niet-gecoate en gecoate kristallen. Wanneer daarentegen in hoog-vacuüm secundaire elektronen worden waargenomen, is er wel een duidelijk verschil merkbaar. Bij de niet-gecoate kristallen zijn de overgangen ter hoogte van de reliëfverschillen duidelijk te zien (Figuur 3 E). Dit geeft een zeer informatief beeld, maar wanneer de kristallen op dergelijke manier te lang bekeken worden, leidt dit, door gebrek aan geleidbaarheid, tot een opstapeling van elektronen in de kristallen. Deze opladingen worden waargenomen als opklaringen (i.e. zeer witte beelden) en kunnen na enige tijd leiden tot beschadiging van het preparaat. Dit probleem treedt niet op wanneer de preparaten gecoat zijn met een geleidend laagje, zoals platina, maar deze techniek brengt enig verlies aan beeldinformatie met zich mee (Figuur 3 F). Deze beelden zijn minder contrastrijk en de fijnere oppervlakkige structuren zijn minder goed te differentiëren.

### Biologische preparaten

Een dekhaar van een konijn (kruising tussen een Witte Nieuwzeelander en Vlaamse Reus) deed dienst als voorbeeld van een relatief droog en niet-geleidend biologisch preparaat. Dit dekhaar werd zonder voorafgaande fixatie onder identieke omstandigheden bekeken als bij de NaCl kristallen. Wanneer het dekhaar wordt bekeken onder laag-vacuüm, blijkt dat het gecoate preparaat een scherper beeld oplevert (Figuur 4 B)

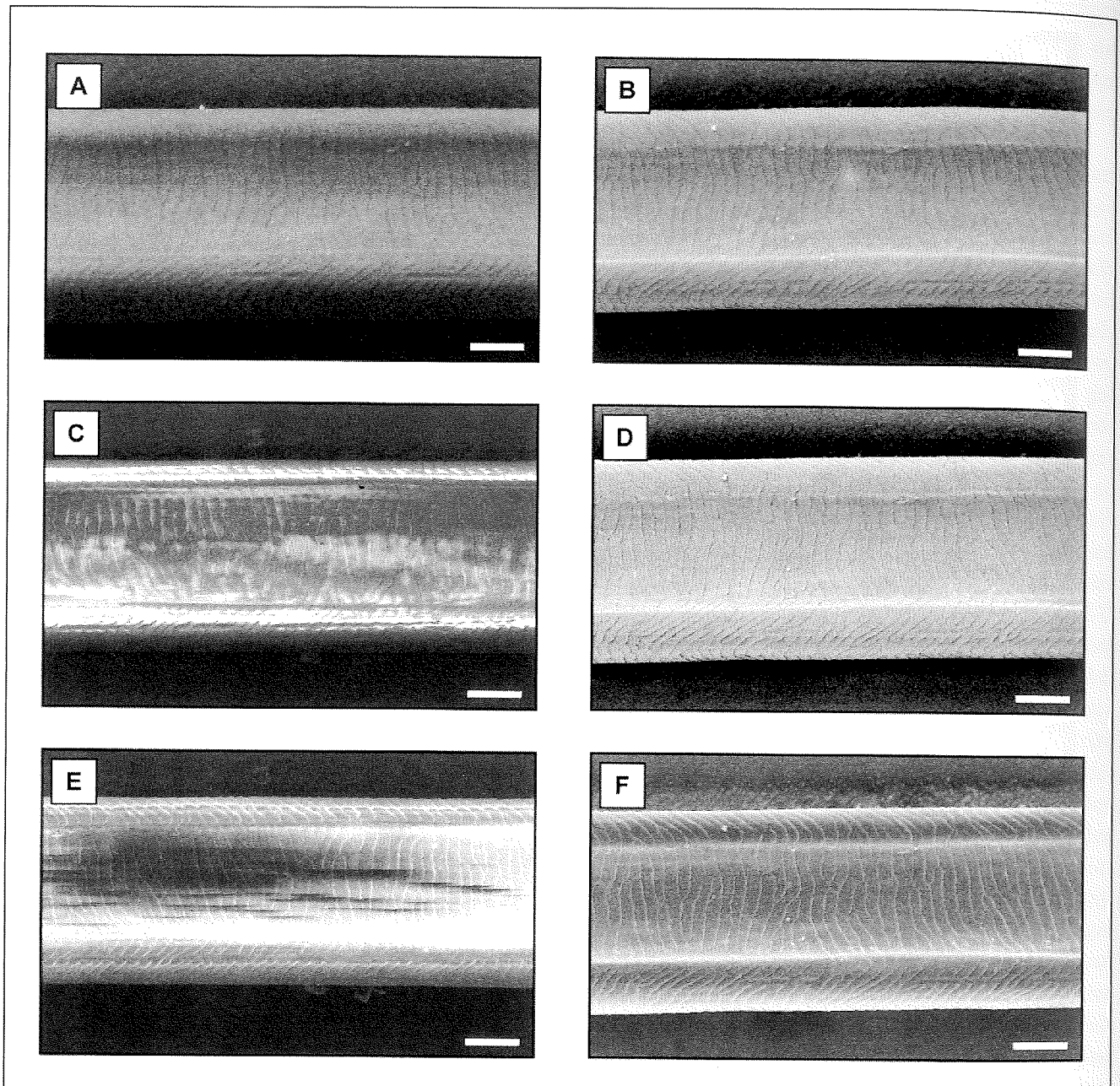


**Figuur 3.** SEM-beelden van NaCl kristallen (maatstrep = 100  $\mu$ m); A: laag-vacuüm, niet gecoat; B: laag-vacuüm, gecoat; C: hoog-vacuüm, niet-gecoat, backscattered elektronen; D: hoog-vacuüm, gecoat, backscattered elektronen; E: hoog-vacuüm, niet gecoat, secundaire elektronen; F: hoog-vacuüm, gecoat, secundaire elektronen.

dan het niet-gecoate preparaat (Figuur 4 A). Wanneer daarentegen backscattered elektronen gedetecteerd worden in hoog-vacuüm is het ongecoate preparaat onbruikbaar wegens het optreden van opladingseffecten (Figuur 4 C). Het gecoate haar geeft hier een veel beter resultaat wat scherpte en contrast betreft (Figuur 4 D). Bij de detectie van secundaire elektronen is het niet-gecoate preparaat niet bruikbaar wegens uitgesproken oplading (Figuur 4 E). Dit kan voorkomen worden door coating van het haar, waardoor finaal het beste beeld verkregen wordt (Figuur 4 F).

Als voorbeeld van een biologisch niet-geleidend en vochtrijk preparaat werd een stukje jejunum van een cavia gebruikt. Een deel van dit preparaat werd

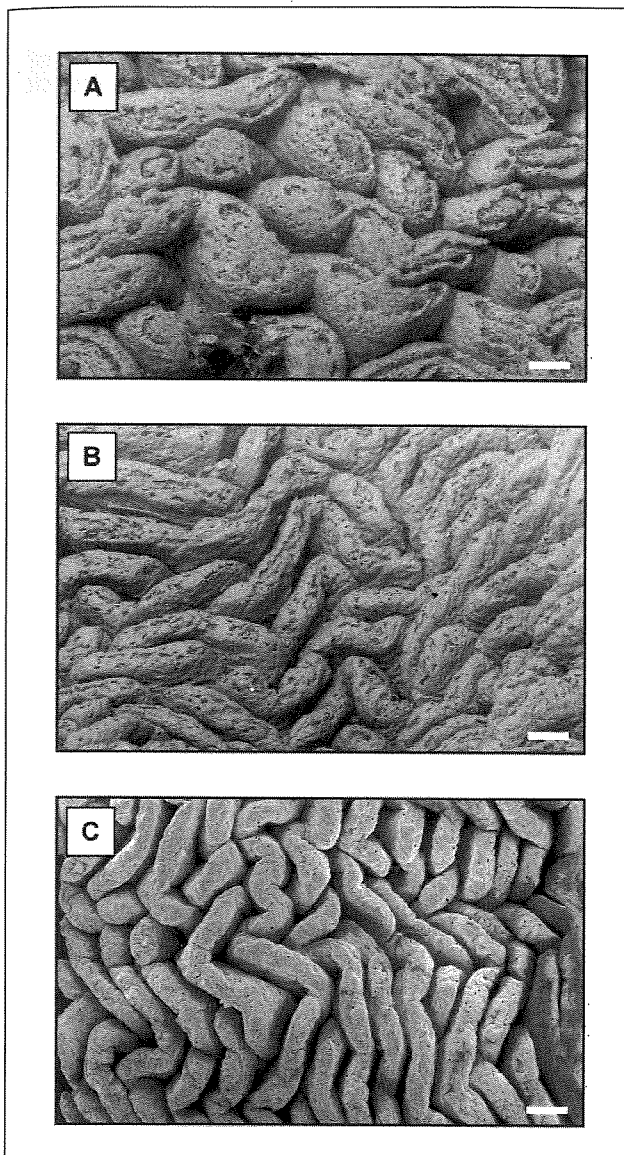
enkele malen gewassen in fosfaat-gebufferde zoutoplossing en werd vervolgens zonder fixatie, dehydratie en platinacoating onmiddellijk bekeken onder laag-vacuüm met behulp van backscattered elektronen. Een tweede stukje jejunum werd gedurende één uur gefixeerd in SEM-fixatief, namelijk een natriumcacodylaat-gebufferde oplossing van 2% paraformaldehyde en 2,5% glutaraldehyde en vervolgens bekeken onder laag-vacuüm. Een derde stukje jejunum werd voorbereid volgens de conventionele manier (Simoens *et al.*, 1985). Hierbij werd het specimen overnacht gefixeerd in SEM-fixatief. Na deze fixatie werd het preparaat gedurende 30 minuten gewassen in gedestilleerd water waarna een twee uur du-



**Figuur 4.** SEM-beelden van een dekhaar van een konijn (maatstreep = 20  $\mu\text{m}$ ); A: laag-vacuüm, niet gecoat; B: laag-vacuüm, gecoat; C: hoog-vacuüm, niet gecoat, backscattered elektronen; D: hoog-vacuüm, gecoat, backscattered elektronen; E: hoog-vacuüm, niet gecoat, secundaire elektronen; F: hoog-vacuüm, gecoat, secundaire elektronen.

rende postfixatie werd uitgevoerd in 1% osmiumtetroxide. Vervolgens werd het preparaat ontwaterd in een stijgende alcoholreeks (50 – 90%), gedroogd in een kritisch punt droger en met platina gecoat. Finaal werd dit preparaat bekeken onder hoog-vacuüm. De observatie van het jejunum toont enkele opmerkelijke verschillen aan tussen laag-vacuüm (Figuur 5 A en B) en hoog-vacuüm analyse (Figuur 5 C). Wanneer het volledig ontwaterd en gecoat preparaat wordt bekeken onder hoog-vacuüm kunnen duidelijk de plooi-vormige darmvlokken herkend worden (figuur 5 C). Op deze vergroting is het zelfs mogelijk om een idee

te krijgen van de fijnere oppervlaktestructuren van de darmvlokken. Wanneer daarentegen een niet-ontwaterd en niet-gecoat darmstukje wordt geobserveerd onder laag-vacuüm zijn enkel de plooiën te herkennen, maar de kleinere oppervlaktestructuren zijn beschadigd (figuur 5 A en B). Bovendien blijkt dat laag-vacuüm observatie van een niet-gefixeerd preparaat (Figuur 5 A) slechtere resultaten geeft dan laag-vacuüm observatie van een gefixeerd preparaat (Figuur 5 B). Op het gefixeerde preparaat hebben de darmvlokken ongeveer dezelfde afmetingen als op het gefixeerde en volledig ontwaterde preparaat,



**Figuur 5.** SEM-beelden van het jejunumslijmvlies van een cavia (maatstreep = 100  $\mu\text{m}$ ); **A:** laag-vacuüm, niet-gefixeerd, niet-ontwaterd, backscattered elektronen; **B:** laag-vacuüm, gefixeerd, niet-ontwaterd, backscattered elektronen; **C:** hoog-vacuüm, gefixeerd, ontwaterd, gecoat, secundaire elektronen.

maar ze vertonen wel verlies van de fijnere oppervlaktestructuren. Bij het niet-gefixeerde darmstukje daarentegen lijken de plooien sterk gezwollen en vertonen ze beschadiging.

## DISCUSSIE

De conventionele methode voor het bekijken van biologische preparaten met behulp van de SEM vereist een fixatie, eventueel gecombineerd met een postfixatie, gevolgd door een volledige dehydratie

en finaal een coating met een geleidend materiaal, zoals goud of platina. Op die manier worden biologische preparaten geschikt gemaakt voor de detectie van secundaire elektronen in een hoog-vacuüm milieu. Deze omslachtige procedure is echter tijdrovend en bovendien houdt het gebruik van osmiumtetroxide enige gezondheidsrisico's in. Het onderzoek van backscattered elektronen in een laag-vacuüm milieu kan een alternatief bieden, omdat bij deze detectiemethode het preparaat niet geleidend hoeft te zijn. Een bijkomend voordeel is dat deze detectie in een laag-vacuüm milieu plaats vindt, zodat in principe niet-ontwaterde preparaten geobserveerd kunnen worden zonder dat al te veel deformaties optreden. Deze procedure kan een aanzienlijke verkorting van de voorbereidingstijd betekenen.

De hier beschreven voorbeelden tonen aan dat het gebruik van backscattered elektronen in een laag-vacuüm omgeving uitermate geschikt is voor de oppervlakteanalyse van zowel geleidende als niet-geleidende, niet-biologische preparaten. Wanneer backscattered elektronen gedetecteerd worden onder hoog-vacuüm wordt een gelijkaardig beeld verkregen dat een beetje scherper en contrastrijker is. Dit is te verklaren door het feit dat er minder verstrooiing optreedt van de backscattered elektronen in een hoog-vacuüm omgeving. Het al dan niet coaten van de niet-geleidende preparaten maakt hier geen verschil uit. Dit is wel het geval bij de detectie van secundaire elektronen, waarbij niet-gecoate preparaten een scherper beeld opleveren dan gecoate preparaten. Het belangrijkste nadeel bij de observatie van niet-gecoate preparaten met behulp van secundaire elektronen is de stapeling van elektronen in het preparaat met opklaringseffecten en eventuele preparaatbeschadiging tot gevolg.

Biologische vochtarme specimina, zoals haren, kunnen geobserveerd worden onder laag-vacuüm zonder dat vormveranderingen optreden. Wanneer bovendien de preparaten gecoat worden met een geleidend materiaal resulteert dat in een scherper beeld. Het beste resultaat met backscattered elektronen wordt verkregen wanneer gecoate haren worden bekeken onder hoog-vacuüm. Dit is te wijten aan de verminderde verstrooiing van de elektronen in een hoog-vacuüm omgeving. Dit beeld wordt echter opgebouwd uit elektronen die afkomstig zijn vanuit de diepere lagen van het specimen, zodat de eigenlijke oppervlaktestructuren minder duidelijk zijn dan bij het gebruik van secundaire elektronen. Bij detectie

van backscattered en secundaire elektronen in hoog-vacuüm is coating van de haren noodzakelijk gezien de verhoogde kans op opladingseffecten.

Biologische vochtrijke preparaten kunnen bijna niet bekeken worden onder laag-vacuüm zonder voorafgaande fixatie, dehydratatie en coating. Dit blijkt overduidelijk uit de beelden die bekomen worden wanneer een niet-gefixeerd en niet-ontwaterd stukje jejunum geobserveerd wordt. De darmvlokken zijn dan groter en vertonen talrijke beschadigingen ter hoogte van de toppen in vergelijking met de conventionele HV-SEM-beelden. Wanneer de preparaten een lichte fixatie ondergaan, kan de deformatie voorkomen worden. Dit kan afgeleid worden uit het feit dat darmpluoiën van het gefixeerde maar niet-ontwaterde jejunumpreparaat gelijkaardige afmetingen hebben als deze van het volledig gefixeerde en ontwaterde specimen. De beschadigingen blijven echter bestaan en zijn waarschijnlijk het gevolg van de dehydratatie die optreedt in het laag-vacuüm milieu. Bovendien vertonen de bekomen beelden zeer weinig details, zelfs bij kleinere vergrotingen.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat niet-biologische specimens, zowel geleidend als niet-geleidend, kunnen bekeken worden in een laag-vacuüm omgeving waarbij de verkregen beelden gelijkaardig zijn en in sommige gevallen zelfs meer informatie verschaffen dan de beelden verkregen bij hoog-vacuüm analyse. Biologische preparaten daarentegen worden het best geobserveerd volgens de conventionele HV-SEM-methode waarbij de specimens voldoende gefixeerd, gedehydrateerd en gecoat worden. Wanneer de stalen weinig vocht bevatten kan de snelle laag-vacuüm techniek aangewend worden, maar deze beelden zijn minderwaardig aan de conventionele HV-SEM-beelden.

## DANKBETUIGING

De auteurs danken het Bijzonder Onderzoeksfonds van de Universiteit Gent voor de financiële steun, en Prof. Dr. H. Lauwers en Prof. Dr. P. Simoens voor hun constructieve opmerkingen.

## REFERENTIES

- Basu S., Ferriss S. (1980). A refined collection technique for rapid search of gunshot residue particles in the SEM. *Scanning Electron Microscopy I*, 375-384.
- Goto T., Wong K.S., Brunette D.M. (1999). Observation of fibronectin distribution on the cell undersurface using immunogold scanning electron microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47, 1487-1494.
- Hodges G.M. (1992). On the molecular profiling of cell surfaces by SEM. *Archives of Histology and Cytology* 55 (Supplement), 27-38.
- Murphy J.A. (1980). Non-coating techniques to render biological specimens conductive. *Scanning Electron Microscopy I*, 209-220.
- Nowell J.A., Pawley J.B. (1980). Preparation of experimental animal tissue for SEM. *Scanning Electron Microscopy II*, 1-20.
- Roschger P., Fratzl P., Eschberger J., Klaushofer K. (1998). Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* 23, 319-326.
- Simoens P., Lauwers H., Bohyn W., De Geest J.P. (1985). Scanning electronmicroscopische studie van jonge kippenembryo's. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 54, 317-330.
- Ushiki T., Hashizume H., Itoh S., Kubodi K., Saito S., Tanaka K. (1998). Low-voltage backscattered electron imaging of non-coated biological samples in a low-vacuum environment using a variable-pressure scanning electron microscope with a YAG-detector. *Journal of Electron Microscopy (Tokyo)* 47, 351-354.
- Yuhas D.E., Kessler L.W. (1980). Defect characterization by means of the scanning laser acoustic microscope (SLAM). *Scanning Electron Microscopy I*, 385-392.