

# Transmisijski elektronski mikroskop

---

**Račić, Paola**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:669265>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-24**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za Biologiju

Paola Račić

**TRANSMISIJSKI ELEKTRONSKI  
MIKROSKOP**

Završni rad

Split, 2022.

Ovaj rad, izrađen u sklopu studijskog programa Biologija, pod vodstvom prof.dr.sc. Ivane Bočine predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice (*baccalaurea*) Biologije.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

## TRANSMISIJSKI ELEKTRONSKI MIKROSKOP

Paola Račić

### SAŽETAK

Razvojem elektronske mikroskopije znanost je napravila golem korak prema brojnim novim, do sada nezamislivim, otkrićima. Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) uporabom elektrona umjesto svjetlosnih zraka nudi veću razlučivost i povećanje, no slika koja njome nastaje može biti samo crno-bijela. Najbitniji korak u razvoju TEM-a bio je napredak rezolucije putem pojačanja napona i razvojem naprednijih leća. Sama priprema uzroka za ovu vrstu mikroskopije može biti vrlo zahtjevan i iscrpan proces koji zahtijeva izrazitu vještinu i preciznost. Dok se kod optičkog mikroskopa može proizvesti samo jedna vrsta slike, TEM specifičnim pozicioniranjem leća, nagiba snopa elektrona i promjera otvora leće ima sposobnost stvaranja nekoliko vrsta slike od kojih svaka može prikazati različite strukture.

**Ključne riječi:** mikroskop, elektroni, leće, slika, rezolucija, strukture

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

**Rad sadrži:** 21 stranicu, 11 slika, 0 tablica, 37 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Bočina

**Ocjenjivači:** prof. dr. sc. Ivana Bočina

doc. dr. sc. Željana Fredotović

izv. prof. dr. sc. Elma Vuko

**Rad prihvaćen:** rujan 2022.

## Basic documentation card

Thesis

University of Split

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

### TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE

Paola Račić

#### ABSTRACT

Through the development of electron microscopy, the field of science made a huge step towards new, until then unimaginable, discoveries. Transmission electron microscope (TEM) provides a better display of magnification and resolution by using electrons instead of light rays, but it can only produce a black and white image. The most important step during TEM's development was obtaining higher resolution by increasing the voltage and advancing the lenses. Preparing a sample for this type of microscope alone can be a challenging and draining process that requires extreme skill and precision. While the optical microscope can produce only one type of image, TEM is capable of displaying many different structures due to its ability to adjust specific lens positioning, electron beam tilt and lens aperture diameter.

**Key words:** microscope, electrons, lenses, image, resolution, structures

Thesis deposited in library of Faculty of Science, University of Split

**Thesis consists of:** 21 pages, 11 pictures, 0 tables, 37 references. Original language: Croatian

**Supervisor:** Ivana Bočina, Ph.D. *Full Professor of Faculty of Science, University of Split*

**Reviewers:** Ivana Bočina, Ph.D. *Full Professor of Faculty of Science, University of Split*

Željana Fredotović, Ph.D. *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*

Elma Vuko, Ph.D. *Associate Professor of Faculty of Science, University of Split*

**Thesis accepted:** September 2022.

## **IZJAVA**

*kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom TRANSMISIJSKI ELEKTRONSKI MIKROSKOP izradila samostalno pod vodstvom prof. dr. sc. Ivane Bočine. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti, koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu, na uobičajen i standardan način citirala sam te povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.*

*Studentica*

*Paola Račić*

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	1
<b>2</b>	<b>RAZRADA TEME</b> .....	2
2.1	POVIJEST .....	2
2.1.1	ERNST RUSKA .....	2
2.1.2	NAPREDAK REZOLUCIJE .....	2
2.1.3	RAZVOJ OD 1940-IH DO 1960-IH GODINA .....	3
2.1.4	RAZVOJ OD 1960-IH DO 1990-IH GODINA .....	3
2.2	DIJELOVI TRANSMISIJSKOG ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA .....	4
2.2.1	ELEKTRONSKI TOP .....	4
2.2.2	VAKUUMSKI SUSTAV .....	5
2.2.3	POSTOLJE ZA UZORAK .....	5
2.2.4	ELEKTRONSKE LEĆE .....	6
2.2.5	OTVORI LEĆA .....	8
2.2.6	FLUORESCENTNI ZASLON .....	8
2.3	PRIPREMA UZORAKA .....	9
2.3.1	FIKSACIJA UZORKA .....	9
2.3.2	DEHIDRACIJA UZORKA .....	11
2.3.3	UKLAPANJE UZORKA .....	11
2.3.4	REZANJE UZORKA .....	11
2.3.5	KONTRASTIRANJE (BOJANJE) UZORAKA .....	12
2.4	STVARANJE SLIKE .....	14
2.4.1	SLIKA U SVIJETLOM POLJU (eng. <i>bright-field imaging</i> ) .....	14
2.4.2	SLIKA U TAMNOM POLJU (eng. <i>dark-field imaging</i> ) .....	15
2.4.3	DIFRAKCIJSKA SLIKA .....	15
2.4.4	DIFRAKCIJA ELEKTRONA KONVERGENTNOG SNOPA (eng. <i>Convergent Beam Electron Diffraction, CBED</i> ) .....	16
2.4.5	3D-TEM .....	16
<b>3</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	18
<b>4</b>	<b>LITERATURA</b> .....	19

# 1 UVOD

Dvadesetih godina dvadesetog stoljeća njemački fizičar Ernst Ruska otkriva valna svojstva elektrona, njihovo ubrzano kretanje u vakuumu i karakteristike zajedničke s valovima svjetlosti. Kreću se linearno, a njihova valna duljina je otprilike 1.000 puta manja od valne duljine svjetlosti (Shampo i Kyle, 1997). Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) uvodi novu perspektivu u svijet znanosti zamjenjujući svjetlosne zrake elektronskima. Izrazito uvećanu i detaljnu sliku stvara snop elektrona koji prolazi kroz uzorak. Za uspješno stvaranje slike takav uzorak trebao bi biti vrlo tanak, debljine manje od 100 nm. Zbog kraće valne duljine elektrona u usporedbi s fotonima, transmisijski elektronski mikroskop može stvoriti detaljniju sliku mnogo veće rezolucije. U TEM-u slika nastaje interakcijom propuštene elektronske zrake i uzorka. Formirana slika se zatim povećava i vizualizira na fluorescentnom ekranu (sloju fotografskog filma). Elektronska mikroskopija je relativno mlada metoda čijim su se izumom otvorila mnoga vrata za napredak u budućnosti, a njen razvoj doveo je do otkrića novih znanstvenih grana omogućujući promatranje prije neistraženih uzoraka (Šimeg, 2014).



## 2 RAZRADA TEME

### 2.1 POVIJEST

#### 2.1.1 ERNST RUSKA

Ernst August Friedrich Ruska njemački je fizičar i dobitnik Nobelove nagrade 1986. godine za svoj izum prvog elektronskog mikroskopa pod mentorstvom profesora Maxa Knolla. Rođen je u Heidelbergu, školovao se na Tehničkom sveučilištu u Münchenu od 1925. do 1927., a zatim je upisao Tehničko sveučilište u Berlinu (Hausmann, 1988). Ondje je pretpostavio da mikroskopi koji koriste elektrone, s valnim duljinama 1.000 puta kraćim od svjetlosnih, u teoriji mogu dati detaljniju sliku predmeta od svjetlosnih s povećanjem većim i do 100.000 puta (Shampo i Kyle, 1997). 1931. godine dokazao je da se za izradu elektronske leće može iskoristiti magnetska zavojnica te je istu iskoristio 1933. godine za izradu prvog elektronskog mikroskopa (Shampo i Kyle, 1997). Sa samo 24 godine izradio je prvu preteču elektronskog mikroskopa. Ona se sastojala od elektronske leće koja je služila za stvaranje slike i otvora leće u metalnom disku, no tim uređajem nije se moglo postići povećanje slike. Tek dodatkom druge leće u kolonu došlo je do povećanja slike i to do sedamnaest puta (Bradbury, 1968).

#### 2.1.2 NAPREDAK REZOLUCIJE

Rezolucija (razlučivost) je tada počela predstavljati ključnu ulogu u napretku tehnologije. Do kasnih 1930-ih maksimalna dostupna razlučivost bila je 200 nm na svjetlosnom mikroskopu, no tada su dizajnirani i proizvedeni elektronski mikroskopi s maksimalnom rezolucijom od 10 nm, a do 1944. ona je smanjena na 2 nm. Poboľšanju razlučivosti najviše je pridonijelo povećanje napona ubrzanja elektronske zrake, no veliku ulogu su imali i napreci u tehnologiji elektronskih leća. Unaprjeđenja leća smanjila su deformacije slike što je također utjecalo na kvalitetu razlučivosti, kao i bolji vakuumski sustavi i svjetliji elektronski topovi. Nakon što je elektronski mikroskop postao dostupniji javnosti u daljnji razvoj uključili su se i razni ekonomski faktori što uočavamo kod varijacija dostupnih mikroskopa u ponudi (Palucka, 2002). Uz najskuplji instrument s najvećom kvalitetom slike, također bi u ponudi bio mikroskop niže razlučivosti za projekte s manjim budžetom ili one kojima nisu potrebne detaljne slike u istraživanjima. U razvoju su najviše napredovali Knoll i Ruska, no drugi su im se istraživači brzo pridružili, a 1938. godine Ruska je u Siemensu u Njemačkoj proizveo prvi komercijalni elektronski mikroskop (Slika 1) u svijetu (Hausmann, 1988).



Slika 1 Prototip elektronskog mikroskopa 1933. godine (Lalchandama, 2020)

### 2.1.3 RAZVOJ OD 1940-IH DO 1960-IH GODINA

Rani napredak u znanosti o materijalima 1940-ih uglavnom je bio ograničen na proučavanje malih čestica, poput čađe i raznih pigmenata. Njihova mala veličina omogućila je analizu obrisa čestica u transmisijskom elektronskom mikroskopu; određivanje veličine, oblika i broja, ali ne i otkrivanje unutarnje strukture. U 40-im i 50-im godinama prošlog stoljeća dogodila su se naglih poboljšanja u razvoju mikroskopije. Došlo je do povećanja razlučivosti jer su napajanja i leće postali stabilniji, a svjetliji elektronski topovi proizvodili su elektrone s više energije za ispitivanje uzoraka. Istraživači su naučili kako pripremiti uzorke raznih vrsta i interpretirati dobivene mikrofotografije. U biologiji, poboljšani mikrotomi proizvode sve tanje kriške uzorka koje elektronska zraka neće oštetiti (Palucka, 2002).

### 2.1.4 RAZVOJ OD 1960-IH DO 1990-IH GODINA

U ovom razdoblju dolazi do proizvodnje sve naprednijih uređaja (Slika 2). Ultravisokonaponski TEM instrumenti u 1960-im i 1970-im davali su elektronima veću energiju kako bi prodrli dublje u deblje uzorke. Razvoj svjetlijih izvora elektrona te njihova komercijalizacija u 1970-ima omogućili su istraživačima još svjetliji izvor, a time i bolju sliku i rezoluciju. Nagibni stupnjevi uzorka koji omogućuju ispitivanja iz različitih kutova značajno

su pomogli u određivanju kristalne strukture. Tijekom 1980-ih i 1990-ih, elektronski mikroskopi su omogućili znanstvenicima ispitivanje uzoraka pod prirodnijim uvjetima temperature i tlaka što proširuje broj vrsta uzoraka koji se mogu ispitivati. Računalna tehnologija za automatsko upravljanje elektronskim mikroskopima i za analizu dobivenih mikrografija također je pridonijela mogućnostima tehnologije, posebno smanjenjem veličine računala 1980-ih (Palucka, 2002).

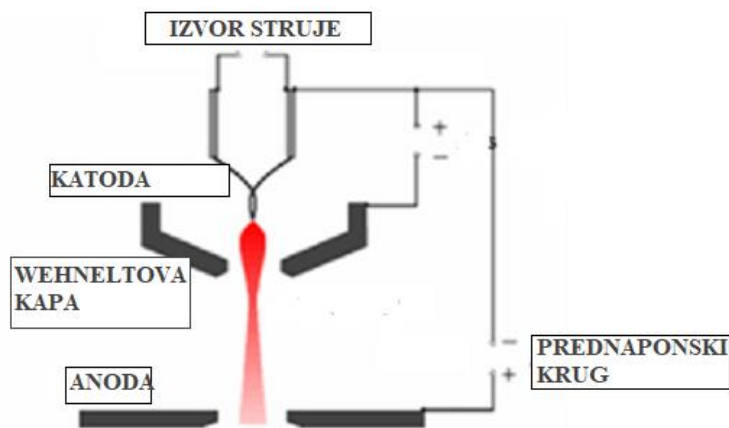
## 2.2 DIJELOVI TRANSMISIJSKOG ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA



Slika 2 Transmisijski elektronski mikroskop novije građe (Tang i Yang, 2017)

### 2.2.1 ELEKTRONSKI TOP

Uloga elektronskog topa (Slika 3) je generiranje elektronskih zraka, a sastoji se od četiri važna dijela: žarne niti, prednaponskog kruga, Wehneltove kape i anode. Volframove niti u obliku ukosnice najčešći su oblik žarnih niti kod ove vrste mikroskopije, a još se nazivaju katodama, emiterima ili izvorima elektrona. Žarna nit zagrijavanjem emitira elektrone. Wehneltova kapa, također poznata kao Wehneltov cilindar, je elektroda koja se koristi za fokusiranje i kontrolu elektronskog snopa. Anoda ima veliku razliku potencijala prema katodi i radi toga prima elektronsku zraku emitiranu iz katode i usmjerava ju na uzorak (Marassi i Nobili, 2009). Nakon spajanja na izvor struje, elektronski top počinje generirati elektronske zrake koje putuju prema anodi, a potom prema koloni transmisijskog elektronskog mikroskopa.



Slika 3 Shematski prikaz elektronskog topa (JEOL, 2022)

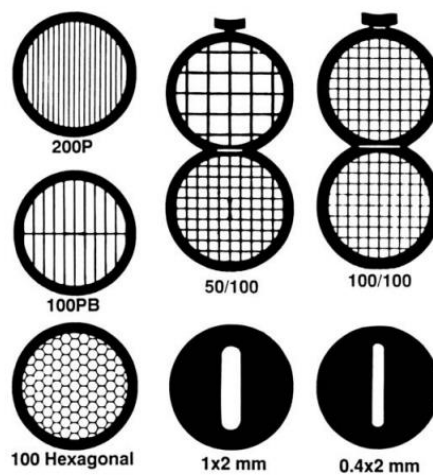
### 2.2.2 VAKUUMSKI SUSTAV

Uloga vakuumnog sustava je sprečavanje interakcije čestica zraka s elektronima što bi dovelo do njihovog raspršenja. Kod tipičnog elektronskog mikroskopa najčešće nalazimo sustav od tri vrste pumpi: rotacijske, difuzijske i ionske. Rotacijska pumpa je velika mehanička naprava koja služi za spuštanje tlaka komore od atmosferskog do oko  $1,33 \times 10^{-1}$  Pa u kojem rad može nastaviti pumpa visokog vakuuma koja se dodaje odmah nakon isključenja rotacijske pumpe (Dykstra i Reuss, 2003). Pumpe visokog vakuuma moraju postići dovoljno velik vakuum koji je potreban za optimalan rad mikroskopa. Neke pumpe te vrste zahtijevaju dodatnu potporu, dakle potrebna im je dodatna pumpa (najčešće rotacijska) koja će raditi na 'stražnjem dijelu' sustava i preuzimati ispumpani zrak prve pumpe. Te čestice zraka zatim se mogu nakupljati u mikroskopskim kapljicama ulja difuzijske pumpe te naposljetku ukloniti rotacijskom pumpom (Dykstra i Reuss, 2003). Neke pumpe, poput ionskih, ne trebaju podršku dodatnih pumpi: stvaraju niži tlak od difuzijskih pumpi (do  $1,33 \times 10^{-7}$  Pa) što im omogućuje jednostavnije odstranjivanje preostalih čestica plina. Takav proces se odvija tako da crpka atome ubrzava i usmjerava u čvrste stijenke komore za ispumpavanje, a kod difuzijske pumpe čestice plina se mogu kondenzirati na hladnu podlogu i na taj način ukloniti iz komore (Dykstra i Reuss, 2003).

### 2.2.3 POSTOLJE ZA UZORAK

Ključni dio postolja predstavljaju zračne komore koje omogućuju umetanje držača uzorka u vakuum uz minimalno povećanje tlaka u drugim područjima mikroskopa. Uzorci se mogu staviti u kolonu odozgo ili sa strane, ovisno o vrsti držača. Držač koji se umeće odozgo omogućava veću stabilnost uzorka i bolju rezoluciju slike, dok onaj koji se umeće sa strane dopušta bolju rukovanje uzorkom u koloni (Dykstra i Reuss, 2003). Držači su prilagođeni za

držanje mrežice na koju se postavlja uzorak. Mrežice za TEM najčešće su u obliku plosnatog diska koji na sebi ima rupice raznih veličina i oblika koje služe za propuštanje elektrona (Slika 4). Standardni oblik mrežice je prsten promjera 3,05 mm, no postoje posebni instrumenti koji koriste i manje promjere (Williams i Carter, 2009). Mrežica se obično izrađuje od bakra, molibdena, zlata ili platine i postavlja se u držač uzorka koji je povezan sa kolonom mikroskopa. Izbor dizajna je velik te ovisi o vrsti eksperimenta koji se izvodi. Mrežice manjih promjera, primjerice 2,3mm, koriste se kod istraživanja uzoraka koji za proučavanje zahtijevaju veliki stupanj nagiba (Williams i Carter, 2009). Nakon umetanja u mikroskop, uzorak se pretražuje kako bi se lociralo područja od interesa. Postolje mora biti pomično kako bi se područje od interesa moglo promatrati, a radi toga mora biti otporno na često i brzo mehaničko pomicanje.



Slika 4 Vrste mrežica različitih veličina i oblika (Williams i Carter, 2009)

#### 2.2.4 ELEKTRONSKE LEĆE

Izlaskom iz elektronskog topa, snop elektrona nailazi na niz elektromagnetskih leća; sabirnu leću, leću objektiva, srednju leću (međuleća) i projektorsku leću (Slika 5). Konačna slika nastaje na fluorescentnom zaslonu (Šimeg, 2014) gdje crno-bijela slika prikazuje prisustvo, odnosno odsustvo, atoma u uzorku. U mikroskopiji se leće najčešće koriste za smanjenje promjera snopa elektrona. Elektronske leće su magnetski ekvivalent staklenih leća u optičkom mikroskopu. Generira se jako magnetsko polje propuštanjem struje kroz žarnu nit koje se ponaša kao konveksna leća i služi za vraćanje zraka koje nisu na osi u fokus. Slika se rotira do određenog stupnja koji ovisi jačini leće. Udaljenost između središta leće i točke fokusa elektrona (žarišne točke, točke na preparatu) naziva se žarišna udaljenost elektromagnetske leće. Žarišna udaljenost ovisi o naponu i snazi magnetskog polja leće (Dykstra i Reuss, 2003).

Kod optičke leće slika je obrnuta, a kod elektronske je i obrnuta i rotirana. Rezolucija slike razmjerna je veličini elektronskog snopa koji pogodi uzorak. Uobičajena rezolucija TEM-a je oko 1 nm s povećanjem do  $10^6$  puta. Dio primarnog snopa elektrona raspršuje se kada pogodi uzorak zbog međudjelovanja s jezgrama atoma preparata, a dio prolazi kroz njega (Matekalo, 2020).

#### 2.2.4.1 SABIRNA LEĆA

Ova se leća koristi za formiranje snopa elektrona i ograničavanje količine struje u njemu, a također ima i ulogu kontrole njegovog promjera. Snop elektrona je kondenziran sabirnom lećom, a ako se jačina struje pojača snop se fokusira iznad otvora leće i veliki dio ne upada u sam otvor čime se struja smanjuje. Na taj način sabirna leća i njezin otvor rade zajedno i tako eliminiraju sve elektrone koji upadaju pod visokim kutom. Postoje sustavi koji se sastoje od dvije ili više leća i jednog otvora. Funkcija takvog sustava je kontrola veličine žarišne točke i konvergencija snopa elektrona (Williams i Carter, 2009). Najveća prednost sustava dvostrukih sabirnih leća je dodatna konvergencija elektronskih zraka čime se smanjuje zračenje područja uzorka izvan vidnog polja. Time se umanjuje pozadinsko raspršivanje iz takvih područja i ukupna količina kontaminacije na uzorku. Prednost sustava dvostrukih leća je da se svjetlina elektronskog topa može smanjiti što rezultira povećanjem vijeka trajanja žarne niti. Kontrast slike je poboljšán kao rezultat povećane koherencije manjeg izvora elektrona. Uloga prve sabirne leće je kontrola veličine snopa u ostatku kondenzatorskog sustava, a druga sabirna leća utječe na konvergenciju snopa i promjer osvijetljenog područja uzorka (Dykstra i Reuss, 2003).

#### 2.2.4.2 LEĆA OBJEKTIVA

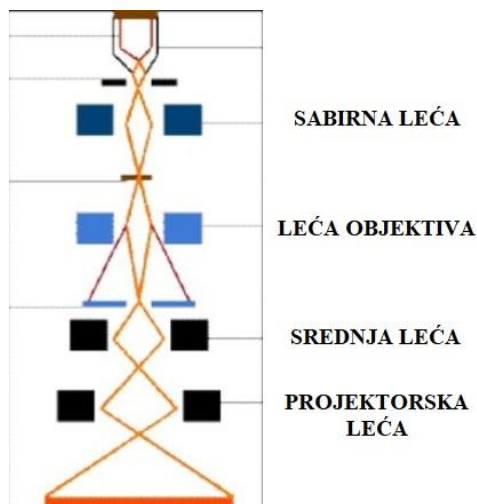
Ovo je prva leća u mikroskopu i najbliža je preparatu kojeg promatramo. Također je i najvažnija leća u mikroskopu jer stvara prvu međusliku čija kvaliteta određuje rezoluciju konačne slike. Leća objektivna fokusira i povećava sliku uzorka (Dykstra i Reuss, 2003). Dizajnirana je asimetrično te se time razlikuje od radijalno simetrične građe sabirne leće. Stvara obrnutu početnu sliku koja se naknadno povećava, a u stražnjoj žarišnoj ravnini leće formira se difrakcijski uzorak. U elektronskoj mikroskopiji nije moguće pomicati položaj leća pa je za fokusiranje uzorka potrebno mijenjati položaj žarišne duljine što se postiže prilagodbom struje kroz elektromagnet koji čini leću objektivna (Williams i Carter, 2009).

#### 2.2.4.3 SREDNJA LEĆA

Ova leća povećava početnu sliku koju stvara leća objektivna. Može se fokusirati na spomenutu početnu sliku ili na difrakcijski uzorak u stražnjoj žarišnoj ravnini iste leće. Ovo određuje prikazuje li zaslon mikroskopa difrakcijski uzorak ili sliku (Williams i Carter, 2009).

#### 2.2.4.4 PROJEKTORSKA LEĆA

Ova leća ima najveću ulogu kod povećanja slike. Povećanje na elektronskom mikroskopu može varirati od stotinu do nekoliko stotina tisuća puta a postiže se mijenjanjem jačine srednje i projektorske leće (Williams i Carter, 2009).



Slika 5 Shematski prikaz elektronskih leća (Neumeier, 2015)

#### 2.2.5 OTVORI LEĆA

Otvori leća su prstenaste metalne ploče koje se sastoje od malog metalnog diska. Ovaj disk je najčešće napravljen od molibdena ili platine te kroz sebe propušta samo centralne elektrone, dok ostale eliminira. Propuštajući centralne elektrone, otvori smanjuju intenzitet elektronskih zraka u mikroskopu, što je pogodno za uzorke osjetljive na prekomjerno zračenje (Williams i Carter, 2009).

##### 2.2.5.1 OTVOR SABIRNE LEĆE

Otvor sabirne leće (kondenzora) kontrolira udio snopa koji može pogoditi uzorak te tako pomaže u kontroli intenziteta snopa elektrona (Williams i Carter, 2009). Što je veći kut otvora leće, veći je maksimalni intenzitet osvetljenja, ali općenito lošija kvaliteta slike.

##### 2.2.5.2 OTVOR LEĆE OBJEKTIVA

Funkcija otvora leće objektiva je odabrati one elektrone koji će pridonijeti završnoj slici, utjecati na njezin izgled i poboljšati konačni kontrast. Umetanjem otvora leće ili naginjanjem snopa elektrona mogu se formirati različite vrste slika (Williams i Carter, 2009).

#### 2.2.6 FLUORESCENTNI ZASLON

Klasični uređaj za prikaz slike u TEM-u je fluorescentni zaslon. On služi za pretvorbu kinetičke energiju elektrona u vidljivu svjetlost. U većini slučajeva izrađen je od praha kadmijevog i cinkovog sulfida, obično je zelene fluorescentne boje, no to se može mijenjati dodatkom drugih



metala. Fluorescentni zaslon neizostavan je dio TEM-a jer ima bitnu ulogu u podešavanju, odabiru i fokusiranju željenog područja na uzorku (Stegmann i sur., 1999).

### 2.3 PRIPREMA UZORAKA

Kod modernih tehnika mikroskopije priprema uzorka za analizu gotovo je uvijek vrlo zahtjevna, posebice kod preparata za TEM. To je izrazito složen proces, a ključni problem predstavlja sama veličina uzorka. Kako bi se preparat mogao uspješno unijeti u kolonu mikroskopa, on mora biti stabiliziran i obrađen do dovoljno malih i tankih prereza kroz koje će propuštanje elektrona biti moguće. Točna debljina prereza ovisi o vrsti preparata i cilju samog istraživanja (Tizro i sur., 2019).

Idealan uzorak mora biti dovoljno tanak da:

- se može tretirati kao objekt slabe faze (uzorak koji je toliko tanak da snop elektrona koji prolazi kroz njega doživljava samo minimalni fazni pomak, a amplituda se ne mijenja)
- širenje elektronskog snopa unutar uzorka bude zanemarivo.

Uzorak također mora biti dovoljno debeo da:

- njegove dvije površine budu dovoljno udaljene kako bi materijal iznutra ostao karakterističan i reprezentativan (osim u slučajevima gdje su površine predmet interesa)
- površinska kontaminacija ne dominira slikom (Shouqing i sur., 2020).

Kod pripreme preparata, uzorak bi u idealnim uvjetima bio savršeno ravan, sastavljen od paralelnih stanica bez kontaminacije, otporan na oštećenja ionizacijom i intenzitetom snopa elektrona. Iako, naravno, gotovo niti jedan realni preparat ne zadovoljava sve navedene kriterije, popis idealnih svojstava treba u svakom trenutku imati na umu kako bi ih uzorak koji se priprema sadržavao što više.

#### 2.3.1 FIKSACIJA UZORKA

Fiksacija preparata stabilizira stanicu kako ne bi došlo do daljnjih promjena ili oštećenja, a može se izvesti na dva načina; kemijskom fiksacijom i fizikalnom fiksacijom (kriofiksacijom) (Dykstra & Reuss, 2003).

##### 2.3.1.1 KEMIJSKA FIKSACIJA

Kemijska fiksacija najpopularnija je i najpristupačnija metoda fiksacije za biološke preparate u TEM-u. Postoji nekoliko vrsta kemikalija koje će, nakon nanošenja na biološki uzorak, stvoriti poprečne veze između aminokiselina, proteina i lipida, obično u obliku kovalentnih veza. Od kemikalija u širokoj upotrebi za primarnu fiksaciju od kojih su najpopularnije glutaraldehyd, formaldehyd i akrolein. Fiksacija glutaraldehydom daje najbolje rezultate kod



očuvanja strukture stanice. Taj se rezultat postiže uvođenjem unutar- i vanmolekulskih veza u stanične proteine. Učinkovitost glutaraldehida može se povećati dodavanjem odgovarajućih reagensa za bolje povezivanje i brzo prodiranje, kao i reagensa za poboljšanje kontrasta. Glutaraldehyd i akrolein uzrokuju brzo i trajno povezivanje proteina. Moguće je koristiti glutaraldehyd kao jedino sredstvo fiksacije no njegovo prodiranje u uzorak je sporo, a to može dovesti do degradacije tkiva tijekom tog vremenskog razdoblja. Kako bi se takav ishod spriječio, on se najčešće kombinira s formaldehydom koji brzo prodire u uzorak i omogućuje privremeno umrežavanje proteina koje se potom zamjenjuje glutaraldehydom. Tvari za kemijsku fiksaciju se moraju nanijeti na preparat u puferskoj otopini, izotoničnom nosaču fiksatora koji sprječava bubrenje i nagomilavanje stanica. Time se uzorak očuva u stanju koje je najbliže onom žive stanice (Hayat, 1986).

Sekundarna kemijska fiksacija (postfiksacija) provodi se uz pomoć osmij tetroksida ( $\text{OsO}_4$ ) te pomaže pri stvaranju veće stabilnosti i povećanju kontrasta sitnih struktura unutar uzorka. Osmij tetroksid snažno reagira s membranskim lipidima i proteinima, a kontrast se povećava pretvorbom proteina u gelove i povezivanjem regija fosfolipidnih glava. Nezasićene veze u masnim kiselinama njime se oksidiraju, a time se osmij tetroksid reducira na crni metalni osmij koji ima veliku elektronsku gustoću i pridonosi stvaranju boljeg kontrasta u biološkim preparatima (Porter i Kallman, 1952). Osmij je dovoljno težak metal da pruža određenu elektronsku gustoću membranama i drugim staničnim strukturama na koje se veže (Winey i sur., 2014).

#### 2.3.1.2 FIZIKALNA FIKSACIJA (KRIOFIKSACIJA)

Značajan napredak u pripremi uzoraka postignut je brzim zamrzavanjem malih organizama, uzoraka tkiva ili stanica pod visokim pritiskom. Vodeća funkcija zamrzavanja pod visokim tlakom (HPF) je brzo hlađenje uzorka koje iznosi  $-200^\circ\text{C}$  u 10 ms (Winey i sur., 2014). Brzo zamrzavanje omogućuje zaobilaženje sakupljanja staničnih struktura, gubitka difuznih iona, šećera, raznih proteina i antigena (Ryan, 1992). Led ima veći volumen od tekuće vode što može uzrokovati narušavanje izvorne strukture preparata. Tijekom formiranja kristala leda samo se čista voda smrzava, što rezultira odvajanjem otopljenih tvari unutar stanica. Kriofiksacija zahtijeva da se uzorak zamrzne vrlo velikom brzinom kako bi se voda prevela iz tekućeg stanja u čvrsto stanje bez međufaze u kojoj dolazi do stvaranja kristala leda (Ryan, 1992). Dok je i zbor uzoraka pogodnih za zamrzavanje velik, samo mali volumen uzorka će proizvesti traženi oblik leda - bez kristala. To znači da dok se virusi, proteini, organele i stanice mogu uspješno zamrznuti, mnogo je teže postići dobru kriofiksaciju za višestanične preparate.

### 2.3.2 DEHIDRACIJA UZORKA

Nakon fiksacije potrebno je dehidrirati uzorak. Proces dehidracije obuhvaća zamjenu sadržaja vode u uzorku organskim otapalom. Taj postupak sprječava miješanje epoksidne smole za uklapanje uzorka s vodom, no nije potreban kada se koriste smole koje se miješaju s vodom. Dehidracija se postiže upotrebom uzlazne serije otopina acetona, etanola, propilen oksida (Winey i sur., 2014) ili metanola u vodi postupno povećavajući koncentraciju otapala (Stadtländer, 2005). Moguća je dehidracija i kriofiksiranih preparata gdje se voda u preparatu zamjeni otapalom, najčešće acetonom ili metanolom, na temperaturi od  $-80$  do  $-90^{\circ}\text{C}$  (Winey i sur., 2014).

### 2.3.3 UKLAPANJE UZORKA

Uklapanje je proces prožimanja uzorka smolama koje se mogu polimerizirati u tvrdi plastiku prikladnu za tanko rezanje (Winey i sur., 2014). Dostupne su različite vrste smola za uklapanje, no epoksidne smole su među najjednostavnijima za rezanje i daju najbolje rezultate kod naknadnog bojanja preparata. Uklapanjem preparata u bilo koju smolu dobiva se tvrdi blok s uzorkom u sebi. Budući da su uzorci vrlo mali, krhki i porozni neophodno je da budu uklopljeni u odgovarajući materijal s kojim se može sigurnije rukovati i može biti uspješno izrezan na ultra tanke komade. Uz smole koje se ne miješaju s vodom postoje i one koje se miješaju, no najčešće se koriste prve. Smole koje se ne miješaju s vodom polimeriziraju se toplinom, dok se druga vrsta stvrdnjava toplinom ili ultraljubičastim zračenjem na niskim temperaturama. Primjer su epoksidne smole koje se obično polimeriziraju na  $60$ – $70^{\circ}\text{C}$ , dok metakrilatne smole to rade pri niskoj temperaturi i pod ultraljubičastim svjetlom (Winey i sur., 2014).

### 2.3.4 REZANJE UZORKA

Uzorak za TEM mora biti posebno pripremljen do debljine koja omogućuje prijenos elektrona kroz uzorak, slično kao što se svjetlost mora prenijeti kroz materijale u optičkom mikroskopu. Za promatranje uzorka u elektronskom mikroskopu, iz bloka smole u koju je uklopljen uzorak moraju se izrezati tanki dijelovi, idealno od 60 do 80 nm. U prvom koraku blok se mora stanjiti žiletom ili staklenim mikrotomskim nožem do debljine od maksimalno 1mm. Nakon što je stanjen, blok se postavlja u ultramikotom (Slika 6) koji ih reže na tanke prereze staklenim ili dijamantnim nožem. Ovako dobiveni prerezi su premali i krhki da bi se njima izravno rukovalo pa se stoga skupljaju u rezervoaru s vodom koji je ugrađen u nož. Susjedni prerezi prijanjati će jedan uz drugi i stvarati vrpce koja se zatim može pažljivo prenositi na metalne mrežice (Winey i sur., 2014).



Slika 6 Ultramikotom (Utah State University)

### 2.3.5 KONTRASTIRANJE (BOJANJE) UZORAKA

#### 2.3.5.1 POZITIVNO BOJANJE

Pozitivno bojanje povećava snagu raspršenja elektrona bioloških uzoraka. Povećanje raspršenja potrebno je jer se biološki uzorci uglavnom sastoje od elemenata niskog atomskog broja koji posjeduju relativno nisku moć raspršenja elektrona, a epoksidna smola u koju se uzorci ugrađuju ima isto biološko podrijetlo kao i uzorak te stoga posjeduje i iste atome. Zbog male razlike između uzorka i smole slika koja nastaje u mikroskopu nema dovoljan kontrast. Relativna moć raspršenja elektrona uzorka povećava se uvođenjem atoma teških metala (osmija, urana i olova) u uzorak. Tako dobivena slika zapravo predstavlja unutarstanični smještaj vezanih teških metala. Na filmu se područja koja propuštaju elektrone prikazuju kao tamna, a područja koja ih ne propuštaju se prikazuju kao svijetla. Te vrijednosti su na samom uzroku obrnute; tamna područja predstavljaju odsutnost elektrona, dok svijetla bilježe njihovu prisutnost. Uzorci se mogu bojati tijekom fiksacije, prije ili tijekom dehidracije, nakon ugradnje ali prije rezanja i/ili nakon rezanja. Vežanje iona teških metala ovisi o prostornom rasporedu makromolekula unutar uzorka i o kemijskim interakcijama između metala i njegove okoline. Da bi se postiglo odgovarajuće obojenje određena minimalna količina stanične tvari mora biti prisutna u presjeku uzorka. Većina boja najbolje prodire u uzorak kada se on ne osuši potpuno nakon rezanja (Hayat, 1968). Najčešće korištena metoda kontrastiranja ultratankih rezova je ona s uranil acetatom i olovnim citratom (Reynolds, 1963). Glavni problemi u bojanju su kontaminirane otopine za bojanje, nepotpuno ispiranje i niska specifičnost koja se može poboljšati kontrolom koncentracije boje, pH i trajanja samog procesa bojanja. Poželjne su svježe pripremljene otopine za bojanje, no u slučaju gdje to nije moguće otopine je potrebno

prije uporabe filtrirati. Nakon procesa bojanja sav višak otopine mora se ukloniti ispiranjem destiliranom vodom, inače će se osušiti na površini uzorka i stvoriti talog (Hayat, 1968).

Neke od najkorištenijih tehnika pozitivnog bojanja preparata su:

- akridin narančasta koja se veže na površinske glikozne i galaktozaminoglikanske spojeve
- *alcian* plava se koristi za bojenje materijala na površini stanica i komponenti hrskavice
- bizmut specifično boji Golgijeva zrnca i interkromatinske granule nakon fiksacije glutaralhidom, dok nakon fiksacije formaldehidom boji jezgrice, bazične proteine i biogene amine
- konkavalin A je biljni lektin, a koristan je za demonstraciju glikozilnih ostataka u materijalima stanične površine
- kobalt se koristi za prikazivanje živčanog sustava u kralješnjaka i beskralješnjaka i za lociranje strukture živčanih stanica
- indijev triklorid je učinkovit u obilježavanju nukleinske kiseline staničnih jezgri
- zlato se koristi za lokalizaciju unutarstaničnih antigena, polisaharida i biljnih lektina
- mješavina jodid-osmij tetroksida koristi se kao boja za prikaz sinaptičkih vezikula i Ca<sup>2+</sup> veznih mjesta
- željezno kisele mukosupstance posebno se boje otopinama željeza na pH 1,2-2,4
- lantan je koristan kao marker za izvanstanične i međustanične materijale kao što su mukopolisaharidi i glikoproteini (Hayat, 1968).

#### 2.3.5.2 NEGATIVNO BOJANJE

Negativno bojenje je jednostavna i brza metoda za proučavanje morfologije i strukture uzoraka kao što su virusi, dijelovi stanice poput organela i izoliranih makromolekula poput proteina. Negativno obojeni primjerci su često izvrsno očuvani jer, osim što stvaraju kontrast, također i čuvaju makromolekularnu strukturu te minimaliziraju oštećenja uzrokovana zračenjem. Uzorak se uranja u sredstvo za bojanje, a prilikom sušenja atomi metala s velikom gustoćom elektrona obavijaju uzorak. Razlika između uzorka i okolnih atoma teških metala s obzirom na njihovu gustoću proizvodi potreban kontrast. Uzorak izgleda svijetlo okružen tamnom pozadinom osušene boje. Elektronska zraka prolazi kroz dio uzorka s niskom gustoćom elektrona, ali ne kroz metalnu pozadinu. Jasnoća detalja ovisi o stupnju do kojeg boja ostaje ne-kristalizirana dok se suši, kao i o debljini osušene ovojnice boje oko uzorka. Metoda negativnog bojanja temelji se na tome da nema kemijskih reakcija između molekula boje i uzorka što se postiže prilagođavanjem pH na onu vrijednost gdje se boja i proteini najmanje

privlače. Dostupan je veliki broj negativnih boja čiji je izbor određen ciljem istraživanja. Neki od primjera su :

- amonijev molibdat se koristi u koncentracijama od 0,5-5,0% pri pH u rasponu od 5,0 do 8,0
- metilamin volframat se koristi u koncentraciji od 2% u destiliranoj vodi pri pH rasponu od 6,5-8,0
- kalijev (ili natrijev) fosfovolframat (PTA) priprema se titriranjem fosfovolframove kiseline do pH približno neutralnog s 0,1 M KOH, a može se primijeniti u koncentracijama od 0,5% do 3,0%
- uranil acetat se koristi u koncentracijama od 0,2-4,0% pri pH rasponu od 4,0 - 5,5, no treba mu oko 30 minuta da se otopi u destiliranoj vodi. Rukovanje uranil acetatom treba biti izrazito pažljivo jer je radioaktivan
- uranil format se koristi u koncentracijama od 0,5-1,0% pri pH rasponu od 3,5 - 5,0 (Hayat, 1986).

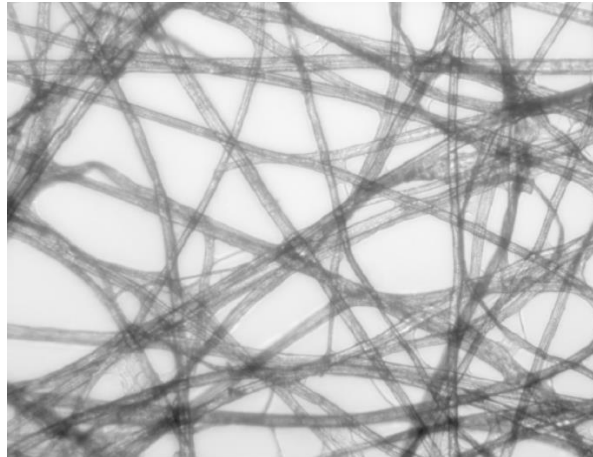
## 2.4 STVARANJE SLIKE

Modernim elektronskim mikroskopima i gotovo svim njihovim funkcijama može se sigurno rukovati preko jednostavnih računalnih programa. Jedna od tih funkcija je i stvaranje slike. Digitalni fotoaparati služe za snimanje slike, lociranje područja od interesa, fokusiranje i ispravljanje deformacija te su time gotovo potpuno zamijenili tradicionalni film.

Ispitivanje uzorka započinje pri malom povećanju u rasponu od 100 do 1000 puta kako bi se locirala i odabrala tražena područja na mreži koje se zatim ispituju na većem povećanju (Winey i sur., 2014). Različiti načini snimanja mogu se postići prilagođavanjem različitih dijelova elektronskog mikroskopa, poput otvora leća, koji daju različite rezultate.

### 2.4.1 SLIKA U SVIJETLOM POLJU (eng. *bright-field imaging*)

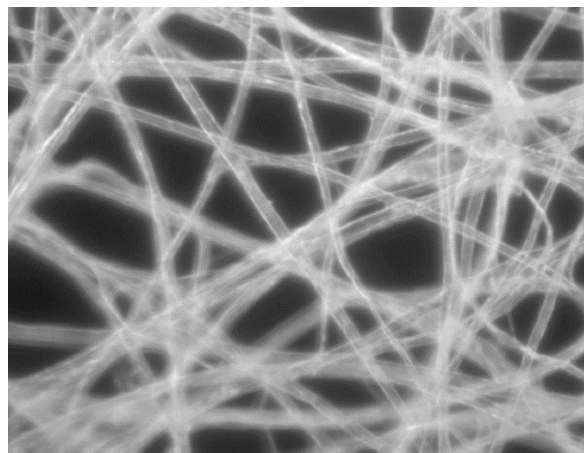
Najjednostavnija i najkorištenija metoda snimanja. U ovoj tehnici, propušteni elektroni odabiru se otvorom leće kako bi se dobila slika, što rezultira time da uzorak izgleda svijetlo, a pozadina tamna (Slika 7) (Tang i Yang, 2017).



Slika 7 Prikaz slike u svijetlom polju (Gaston i Le, 2022)

#### 2.4.2 SLIKA U TAMNOM POLJU (eng. *dark-field imaging*)

Tehnika suprotna od one u svijetlom polju. Otvor leće se koristi za odabir raspršenih elektrona, a blokira one propuštene. To daje sliku na kojoj se uzorak u prednjem planu čini tamnim, dok se pozadina čini svijetlom, čime se omogućuje proučavanje struktura kao što su kristalne rešetke koje mogu biti premalene da bi se mogle uočiti na slici u svijetlom polju (Slika 8) (Tang i Yang, 2017).

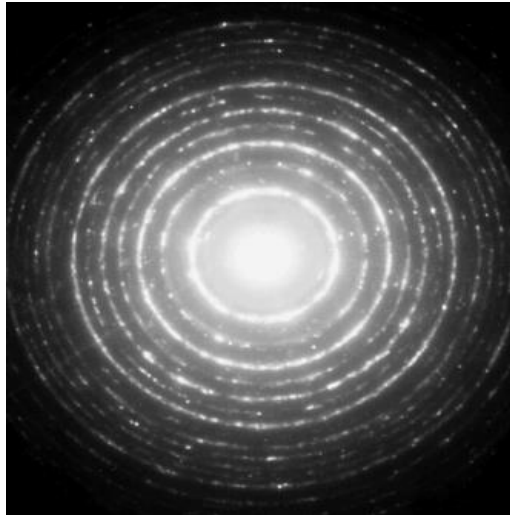


Slika 8 Prikaz slike u tamnom polju (Gaston i Le, 2022)

#### 2.4.3 DIFRAKCIJSKA SLIKA

Ova slika nastaje kao rezultat raspršenja elektrona uzrokovanog prolaskom zrake kroz kristalnu strukturu. Difrakcijske slike razlikuju se od uobičajenih TEM slika. Ovdje se stvara slika u stražnjoj žarišnoj ravnini (ispod uzorka) i vidi se ili kao skup prstenova ili kao skup točaka (Slika 9). Ovu vrstu slike također možemo upotrijebiti kod promatranja kristalnih struktura (Tang i Yang, 2017).

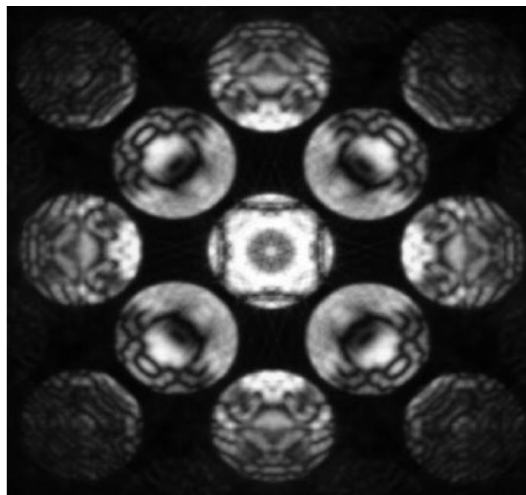




Slika 9 Prikaz difrakcijske slike uz pomoć TEM-a (Fikar, 2002)

#### 2.4.4 DIFRAKCIJA ELEKTRONA KONVERGENTNOG SNOPA (eng. *Convergent Beam Electron Diffraction, CBED*)

U CBED-u, umjesto prolaska snopa elektrona kroz uzorak, difrakcijski obrasci se snimaju korištenjem koncentriranog snopa koji konvergira u jednu točku na uzorku. Kristalnu strukturu uzorka možemo iščitati iz prstenova koji se formiraju difrakcijskim uzorkom (Slika 10) (Rollett i Barmak, 2014). To se postiže podešavanjem leće objektivna umjesto otvora leće objektivna kako bi se uzorak doveo u fokus.

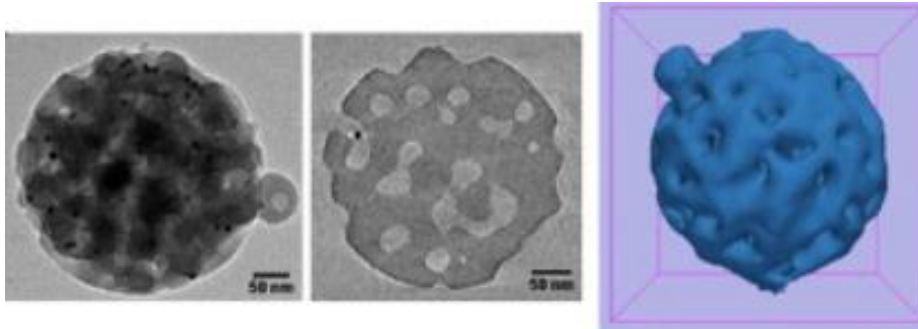


Slika 10 Prikaz kristalne strukture tehnikom CBED-a (Stegmann, i dr., 1999)

#### 2.4.5 3D-TEM

Trodimenzionalna transmisijska elektronska mikroskopija daje 3D slike uzorka (Slika 11). Ova metoda koristi višestruko snimanje uzorka u kombinaciji s analizom slike i daje strukturne informacije o uzorku s preciznošću koja nije dostupna kod ostalih načina snimanja (Rollett i

Barmak, 2014). Završna 3D slika na ekranu se može prikazati u boji, no to je rezultat naknadne obrade serije slika na računalu. Slika koja nastaje izravno TEM-om može biti samo crno-bijela.



Slika 11 Primjer stvaranja 3D slike uz pomoć TEM-a (Ersen i sur., 2007)



### 3 ZAKLJUČAK

Razvojem elektronske mikroskopije znanost je napravila golem korak prema brojnim novim, do sada nezamislivim, otkrićima. Transmisijska elektronska mikroskopija uporabom elektrona umjesto svjetlosnih zraka nudi veću razlučivost i povećanje, no slika koja njome nastaje može biti samo crno-bijela. Najbitniji korak u razvoju TEM-a bio je napredak rezolucije putem pojačanja napona i razvojem naprednijih leća. Sama priprema uzroka za ovu vrstu mikroskopije može biti vrlo zahtjevan i iscrpan proces koji zahtjeva izrazitu vještinu i preciznost. Dok kod optičkog mikroskopa možemo proizvesti samo jednu vrstu slike, TEM specifičnim pozicioniranjem leća, nagiba snopa elektrona i promjera otvora leće ima sposobnost stvaranja nekoliko vrsta slike od kojih svaka može prikazati različite strukture od interesa. Iako je ova tehnologija stara već gotovo sto godina, njezin razvoj nije ni blizu kraja.

## 4 LITERATURA

- Bradbury, S. (1968). *The Microscope Past and Present*. Oxford: Pergamon Press.
- Dykstra, M. J., & Reuss, L. E. (2003). Condenser Lens System. U M. J. Dykstra, & L. E. Reuss, *Biological Electron Microscopy Theory, Techniques and Troubleshooting* (str. 308). New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Dykstra, M. J., & Reuss, L. E. (2003). Electron lenses. U M. J. Dykstra, & L. E. Reuss, *Biological Electron Microscopy Theory, Techniques and Troubleshooting* (str. 291). Springer Science + Business Media, LLD.
- Dykstra, M. J., & Reuss, L. E. (2003). Objective Lens. U M. J. Dykstra, & L. E. Reuss, *Biological Electron Microscopy Theory, Techniques, and Troubleshooting* (str. 308-310). New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Dykstra, M. J., & Reuss, L. E. (2003). Specimen holders. U M. J. Dykstra, & L. E. Reuss, *Biological Electron Microscopy Theory, Techniques and Troubleshooting* (str. 312). Springer Science + Business Media, LLC.
- Dykstra, M. J., & Reuss, L. E. (2003). Traditional chemical fixation: Methods. U M. J. Dykstra, & L. E. Reuss, *Biological Electron Microscopy Theory, Techniques and Troubleshooting* (str. 3). New York: Springer Science + Business Media, LLD.
- Dykstra, M. J., & Reuss, L. J. (2003). Vacuum Pumps. U M. J. Dykstra, & L. J. Reuss, *Biological Electron Microscopy Theory, Techniques and Troubleshooting* (str. 323-336). Springer Science + Business Media, LLC.
- Ersen, O., Hirlimann, C., Drillon, M., Werckmann, J., Tihay, F., Pham-Huu, C., . . . Schultz, P. (2. Rujan 2007). 3D-TEM characterization of nanometric objects. *Solid State Sciences*, str. 1088-1098.
- Fikar, J. (2002). *Al-Cu-Fe quasicrystalline coatings and composites studied by mechanical spectroscopy*. Brno.
- Gaston, B., & Le, H. (22. Kolovoz 2022). *TEM: Bright field versus dark field*. Dohvaćeno iz LibreTexts Chemistry: [https://chem.libretexts.org/Courses/Franklin\\_and\\_Marshall\\_College/Introduction\\_to\\_Materials\\_Characterization\\_\\_CHM\\_412\\_Collaborative\\_Text/Electron\\_and\\_Probe\\_Microscopy/TEM%3A\\_Bright\\_field\\_versus\\_dark\\_field](https://chem.libretexts.org/Courses/Franklin_and_Marshall_College/Introduction_to_Materials_Characterization__CHM_412_Collaborative_Text/Electron_and_Probe_Microscopy/TEM%3A_Bright_field_versus_dark_field)
- Hausmann, K. (1988). In Memoriam: Ernst Ruska (1906-1988). *European Journal of Protistology*, str. 292.
- Hayat, M. A. (1968). Positive Staining. U M. A. Hayat, *Basic techniques for transmission electron microscopy* (str. 182-190). San Diego: Academic Press, INC.
- Hayat, M. A. (1986). Chemical Fixation, Introduction. U M. A. Hayat, *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy* (str. 1-4). San Diego: Academic Press, Inc.

- Hayat, M. A. (1986). Negative Staining. U M. A. Hayat, *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy* (str. 232-233). San Diego: Academic Press, Inc.
- JEOL. (2022). *Thermionic-emission gun*. Dohvaćeno iz JEOL:  
[https://www.jeol.co.jp/en/words/semterms/search\\_result.html?keyword=thermionic-emission%20gun](https://www.jeol.co.jp/en/words/semterms/search_result.html?keyword=thermionic-emission%20gun)
- Lalchhandama, K. (30. Lipanj 2020). The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike. *Science Vision*, str. 78-92.
- Marassi, R., & Nobili, F. (2009). *Structural and Chemical Properties: Scanning Electron Microscopy*. Camerino: Elsevier B. V.
- Matekalo, J. (2020). *Moderni mikroskopi*. Osijek.
- Neumeier, J. (08. Srpanj 2015). *Photophysics of Graphene Quantum Dots*. Dohvaćeno iz Research Gate:  
[https://www.researchgate.net/publication/327473293\\_Photophysics\\_of\\_Graphene\\_Quantum\\_Dots](https://www.researchgate.net/publication/327473293_Photophysics_of_Graphene_Quantum_Dots)
- Palucka, T. (10. Prosinac 2002). *Overview of Electron Microscopy*. Dohvaćeno iz History of Recent Science & Technology:  
[https://authors.library.caltech.edu/5456/1/hrst.mit.edu/hrs/materials/public/ElectronMicroscope/EM\\_HistOverview.htm](https://authors.library.caltech.edu/5456/1/hrst.mit.edu/hrs/materials/public/ElectronMicroscope/EM_HistOverview.htm)
- Porter, K. R., & Kallman, F. (1952). The Properties and Effects of Osmium Tetroxide as a Tissue Fixative with Special Reference to its use for Electron Microscopy. *Experimental Cell Research*, str. 127-141.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, str. 208-212.
- Rollett, A. D., & Barmak, K. (2014). Orientation Mapping. U D. Laughlin, & K. Hono, *Physical Metallurgy* (str. 1113-1141). Elsevier.
- Ryan, K. P. (5. Lipanj 1992). Cryofixation of Tissues for Electron Microscopy: A Review of Plunge Cooling Methods. *Scanning Microscopy*, str. 715-743.
- Shampo, M. A., & Kyle, R. A. (1997). Ernst Ruska - Inventor of the Electron Microscope. *Mayo Foundation for Medical Education and Research*, str. 148.
- Shouqing, L., Yunjie, C., Wang, Y., Qiang, X., & Binghui, G. (2020). A review of sample thickness effects on high-resolution transmission electron microscopy imaging. *Micron*.
- Šimeg, L. (2014). *Primjena elektronske mikroskopije u karakterizaciji prirodnih*. Zagreb.
- Stadtländer, C. T.-H. (Siječanj 2005). Dehydration and Rehydration Issues in Biological Tissue Processing for Electron Microscopy. *Microscopy Today*, str. 32-34.
- Stegmann, H., Steinmentz, M. O., Wepf, R. A., Stoffler, D., Schröder, R., Müller, S. A., . . . Aebi, U. (1999). Electron Microscopic Image Acquisition. U H. Haußecker, P.

- Geißler, & B. Jähne, *Handbook of Computer Vision and Applications* (str. 377). Heidelberg: Academic Press.
- Tang, C. Y., & Yang, Z. (2017). Transmission Electron Microscopy (TEM). U N. Hilal, A. F. Ismail, & T. Matsuura, *Membrane Characterization* (str. 148-149). Amsterdam, Kidlington, Cambridge: Elsevier.
- Tizro, P., Choi, C., & Khanlou, N. (2019). Sample preparation for transmission electron microscopy. U W. H. Yeoung, *Methods in Molecular Biology* (str. 417-424). New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Utah State University. (n.d.). *Ultramicrotome*. Dohvaćeno iz Microscopy Core Facility: <https://research.usu.edu/microscopy/mcf-instruments/ultramicrotome>
- Williams, D. B., & Carter, B. C. (2009). Apertures and Diaphragms. U D. B. Williams, & B. C. Carter, *Transmission electron microscopy : a textbook for materials science* (str. 101). New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Williams, D. B., & Carter, B. C. (2009). Depth of focus and depth of field. U D. B. Williams, & B. C. Carter, *Transmission electron microscopy : a textbook for materials science* (str. 110-111). New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Williams, D. B., & Carter, B. C. (2009). Electron lenses. U D. B. Williams, & B. C. Carter, *Transmission electron microscopy : a textbook for materials science* (str. 96-100). New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Williams, D. B., & Carter, B. C. (2009). Self supporting disc or use a grid? U D. B. Williams, & B. C. Carter, *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science* (str. 175). New York: Springer.
- Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings Jr, T. H. (25. Veljača 2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, str. 319-323.