STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 2: Fyzika

Elektronová difrakce na biologických preparátech

Veronika Skyvová Jihomoravský kraj

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 2: Fyzika

Elektronová difrakce na biologických preparátech

Electron diffraction of biological specimens

Autoři: Veronika Skyvová Škola: Gymnázium Brno Křenová, Křenová 304/36, 602 00 Brno Kraj: Jihomoravský kraj Konzultant: Ing. Jaromír Bačovský, Ph.D.

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 26.1.2023 Veronika Skyvová

Poděkování

Ráda bych chtěla poděkovat mému lektorovi Ing. Jaromíru Bačovskému, Ph. D. za získané dovednosti, znalosti a cenné rady. Také bych mu chtěla poděkovat za jeho trpělivost při mikroskopování a psaní práce.

Chtěla bych i poděkovat Helmutovi Gnaegimu za nakrájení vzorků a za trpělivost, jelikož se nejednalo o jednoduchý úkol.

Také děkuji mému profesorovi fyziky Mgr. Tomáši Kaňovi za podporu a poskytnuté materiály.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým rodičům a přátelům za podporu.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.





jihomoravský kraj

Anotace

Mým cílem bylo využít nízkovoltovou elektronovou difrakci na biologických preparátech. Hlavním vzorkem byla kostní tkáň. U kosti se předpokládalo, že by mohla vykazovat krystalovou strukturu, jelikož obsahuje organickou i anorganickou složku. Bylo zapotřebí určit, jaká část kosti bude pro provedení difrakce nejideálnější. Zkoumala jsem i další anorganické preparáty, tedy se schopností krystalizovat. Difrakci jsem prováděla na transmisním elektronovým mikroskopu LVEM 25 a LVEM 25E. Nízkovoltová difrakce se povedla, měla jsem možnost pozorovat jasné monokrystaly i polykrystaly.

Klíčová slova

elektronový mikroskop; transmisní (prozařovací) elektronová mikroskopie (TEM); elektronová difrakce

Annotation

My goal was to use low-voltage electron diffraction of biological specimens. The main sample was bone tissue. The bone was assumed to have a crystal structure as it contains both organic and anorganic components. It was necessary to determine which part of the bone would be the most ideal for diffraction. I also investigated other anorganic preparations with the ability to crystallize. The diffraction was perfomed on a transmission electron microscope LVEM 25 and LVEM 25E. The low-voltage diffraction was successful. I was able to observe clear monocrystals and polycrystals.

Keywords

electron microscope; transmission electron microscopy (TEM); electron diffraction

Obsah

1 ÚVOD	7
2 HISTORIE ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU	9
3 BRNO VELMOC ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE 1	.0
4 ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP 1	.1
4.1 Typy elektronové mikroskopie 1	.1
5 ELEKTRONOVÁ OPTIKA-ČOČKY [11] 1	.5
6 ELEKTRONOVÁ DIFRAKCE [13] 1	.7
7 PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PRO TEM [14] 1	.8
8 LVEM 25 [2]	20
8.1 LVEM 25E [16]	21
9 PRAKTICKÁ ČÁST	23
9.1 Úvod k praktické části	23
10 POPIS MIKROSKOPOVÁNÍ LVEM 25 [17]	24
11 VZORKY	27
11.1 Nepatogenní bakterie 2	27
11.2 Močovina	27
11.3 Kost	27
11.4 Lastura	28
12 POZOROVÁNÍ	0
13 ZÁVĚR	8
BIBLIOGRAFIE	9

1 ÚVOD

Všechno kolem nás se skládá z atomů, z částic, které definují vlastnosti dané látky. Atom je složený z neutronu, protonu a elektronového obalu. A právě elektrony byly pro mě v téhle práci důležitou složkou. Pracovala jsem s elektronovým mikroskopem a objevovala, co taková malá částice může dokázat.

Elektronový mikroskop zabírá oproti světelnému mikroskopu více místa, jeho pořizovací cena je vysoká a jeho mechanismy nejsou pro nás zas tak známé. Obor elektronové mikroskopie vznikl teprve ve 20. století. K jeho rozvoji značně přispěla Česká republika konkrétně Brno, Mekka elektronové mikroskopie. Brno vyprodukuje přibližně jednu třetinu světové produkce elektronových mikroskopů.

Má oproti světelnému konvenčnímu mikroskopu řadu výhod a možností. Charakterizuje struktury vzorků v nanoměřítku tedy vlastnosti látek či buněk. Místo světla se používají elektrony, což jsou menší částice než fotony, a tím při pozorování vidíme větší detaily nebo můžeme zkoumat malé organismy jako bakterie a viry, které světelným mikroskopem nelze zkoumat. V určitých režimech dokáže rozlišit chemické složení látky nebo provést elektronovou difrakci. Na druhou stranu jsou tyto možnosti a benefity vykoupeny výrazně složitější obsluhou a vyššími nároky na přípravu vzorku.

Elektronovou difrakcí analyzujeme uspořádání atomů v krystalu. Difrakce elektronů byla poprvé uskutečněna v roce 1927, kdy byl proveden Davissonův-Garmerův pokus. Američtí fyzici Clinton Joseph Davisson a Lester Halbert Germer provedli experiment, kdy nechali dopadnou svazek urychlených elektronů napětím na krystalovou mřížku niklu. Elektrony se odrazily na povrchové vrstvě atomů krystalu. Při měření intenzity rozptýlených elektronů byla patrná maxima a minima. K vysvětlení použili de Broglieho vlnovou hypotézu. Přišli s řešením, že elektrony se rozptylují na atomech krystalu podobně jako paprsky rentgenového záření. [1]

Elektronovou difrakci jsem prováděla na biologických preparátech. Bylo za potřebí vybrat vhodné vzorky, tedy aby měly krystalovou strukturu. Šlo nám tedy hlavně o preparáty anorganického charakteru, které dokážou krystalizovat, a zároveň jsou standardně přítomny v biologických objektech. Mým hlavním vzorkem se stala kostní tkáň. Menší problémy se vyskytly při jejím krájení na tenké řezy, ale za to vzorek vykazoval jasnou krystalovou strukturu a povedla se mi provést elektronová difrakce. Zachytila jsem jak monokrystaly, tak i polykrystaly.

Praktická část probíhala na transmisních elektronových mikroskopech LVEM 25 a LVEM 25E od společnosti Delong Instruments.

Jedná se o nízkovoltové mikroskopy (LVEM-Low voltage transmission electron microscope). Magnetické pole hlavních čoček vytváří permanentní magnety, čímž nepotřebují aktivní chlazení, jsou velmi stabilní a značně miniaturizované. Jejich hlavní výhodou oproti konvenčním transmisním elektronovým mikroskopům s vyšším urychlovacím napětím 60kV a více je vysoký kontrast v obraze, a to i vzorků složených z lehkých látek, typicky biologické vzorky, které se skládají hlavně z uhlíku. Zdrojem elektronů je elektronová tryska Schottkyho typu. Mezi emitovanými elektrony a preparátem dochází k silné interakci, která je zodpovědná za výše zmíněný neobvykle vysoký kontrast. Umožňují práci v režimech TEM, STEM, ED, a dokonce LVEM 25E i v módech SEM a EDS. [2]

2 HISTORIE ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU

Elektronová mikroskopie je relativně nový obor, ale přesto pro nás velmi významný. Kořeny elektronového mikroskopu sahají na počátek 20. století.

Německý fyzik Hans Busch se významně podílel na elektronové optice. Stojí za objevem první elektronové optiky a elektronových čoček, které usměrňují proud elektronů. Tento objev sloužil jako podklad pro další vývoj elektronového mikroskopu. Busch dostal později přízvisko "Otec elektronové optiky". [3]

Na Buschovy poznatky navázal německo-americký elektroinženýr Reinhold Rudenberg. Rudenbergův syn onemocněl virem obrny. To Rudenberga motivovalo k tomu, aby mohl vir analyzovat a zjistit, jak se chová, kde se jeho syn mohl nakazit a po případně jak se dá léčit. Vir je ovšem malá částice a nedá se pod světelným mikroskopem pozorovat. Domníval se, že pomocí elektronů by si vir mohl dostatečně přiblížit. V roce 1931 si nechal patentovat elektronový mikroskop. [4]

Zároveň se v roce 1931 podařilo německému fyziku Ernstu Ruskovi a Maxi Knollemu sestrojit první elektronový mikroskop. Ruskovi byla roku 1986 udělena Nobelova cena za fyziku za zásadní práci v elektronové optice a za návrh prvního elektronového mikroskopu. V roce 1933 oba vědci zprovoznili elektronový mikroskop. Svými zobrazovacími schopnostmi překonal dosud známý světelný mikroskop. Ernst Ruska začal v roce 1937 spolupracovat s německým fyzikem Bodo von Borriesem a německým lékařem Helmutem Ruskou na zdokonalení elektronového mikroskopu, aby se dal využívat při biologických a lékařských výzkumech. Ernst Ruska se také spojil se švýcarským fyzikem Heinrichem Rohrerem a německým fyzikem Gerdem Binnigem a sestrojili rastrovací tunelový mikroskop (STM). Za tento objev získali společně v roce 1986 Nobelovu cenu za fyziku. [3]

V roce 1937 německý fyzik Manfred von Ardenne zkonstruoval první řádkovací elektronový mikroskop, který se hojně začal využít v biologii.

Firma Siemens-Schuckert začala v roce 1939 vyrábět transmisní elektronové mikroskopy (TEM), které sklízely obdiv po celém světě. A v roce 1965 firma Cambridge Instrument Company uvedla na trh SEM. [5]

V současnosti mezi největšího producenta elektronových mikroskopů patří právě Česká republika. Elektronové mikroskopy vyrábí řada firem, ale všechny staví na zákledech Ernsta Rusky a Maxe Knolla. Mikroskopy dnes mají v sobě zabudované vědecké kamery, jejich velikost je něco menší a více kompatibilní s laboratořemi.

3 BRNO VELMOC ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE

Česká republika je špičkou v elektronové mikroskopii, konkrétně tedy Brno, které si vysloužilo přezdívku Mekka elektronové mikroskopie. V Brně sídlí tři velké firmy Delong Instruments, Tescan Orsay, Thermo-Fischer Scientific. Problematikou elektronové optiky se dále zabývá Ústav přístrojové techniky Akademie věd ČR. Společně stojí za produkcí jedné třetiny všech elektronových mikroskopů. Brno většinu high-tech produktů exportuje do zahraničí. Díky tomu se Brno stalo hlavním městem elektronové mikroskopie.

Roku 1951 vysokoškolský profesor Aleš Bláha spolu se svými studenty Arminem Delongem, Vladimírem Drahošem a Ladislavem Zobačem sestrojili první elektronový mikroskop Tesla BS 241. Později se tento model začal sériově vyrábět.

V roce 1954 sestrojili model stolního elektronového mikroskopu Tesla BS 242. Za tento model získali roku 1958 zlatou medaili na světové výstavě EXPO v Bruselu.

Roku 1958 vznikl Ústav přístrojové techniky (ISI). Ústav zajišťoval Akademii věd přístrojové vybavení.

V šedesátých letech tak došlo k velkému rozvoji elektronové mikroskopie, a to hlavně díky tehdejšímu řediteli ústavu profesoru Delongovi a vedoucímu oddělení elektronové optiky profesoru Drahošovi. Tento tým stojí za konstrukcí transmisních a rastrovacích mikroskopů. Vyřešili problémy vysokonapěťových a vysoce stabilních proudových zdrojů, problematiku vakua a ultravysokého vakua. Provedli analýzu zbytkových plynů.

V sedmdesátých letech byl sestrojen model Tesla BS 350 se spektrometrem Augerových elektronů a autoemisní tryskou. Došlo tak k vývoji elektronového litografu pracující s autoemisní tryskou vyráběnou firmou Tesla Brno. Později v roce 1975 byl sestrojen transmisní elektronový mikroskop Tesla BS 413 s rozlišením až 0,6 nm. [6]

Po sametové revoluci se ústav Akademie věd se zaměřil na základní výzkum a zapojení do mezinárodních spoluprací. Zřídilo se zároveň centrum Aplikační laboratoře mikrotechnologií a nanotechnologií (ALISI). [7]

Delongův student a kolega Vladimír Kolařík s dalšími kolegy založili roku 1992 firmu Delong Instruments. Firma vyrábí nízkonapěťové transmisní elektronové mikroskopy LVEM a Schottkyho elektronová zdroje DIGUN. Jejich zařízení využívají vědci po celém světě.

V roce 1991 bývalí zaměstnanci Tesly založili firmu Tescan (Tesla + scan). Prvotně se zabývali opravováním mikroskopů, ale později začali s výrobou elektronů. V roce 2013 začala jejich spolupráce s francouzskou firmou Orsay Physics za vzniku Tescan Orsay Holding se zaměřením na rastrovací mikroskopy, které umožňují zkoumání struktur materiálů na nanoúrovni.

Dále byla v devadesátých letech založená firma Delmi, kterou později koupila nizozemská společnost Philips a dnes patří firmě Thermo Fisher Scientific. Vyrábí elektronové mikroskopy, spektrometry a další vědecká vybavení. [8]

4 ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP

Mikroskopy patří k běžnému vybavení laboratoří. Díky jeho zobrazovacím schopnostem můžeme pozorovat částice pro běžné oko neviditelné. Existuje několik druhů mikroskopů, nejvíce známé jsou světelné a elektronové. V elektronovém mikroskopu se namísto světla využívají elektrony. Proto se v tubusu elektronového mikroskopu nachází vakuum. V atmosféře není možné vyslat elektrony na vzorek, protože v plynech jsou elektrony silně rozptylovány. Namísto skleněných čoček se používají magnetické čočky nebo elektromagnetické čočky. Elektronový mikroskop dosahuje rozlišení až 0,1 nm, zatímco světelný pouze 200 nm. Světelný mikroskop zabírá méně prostoru a jeho pořizovací cena je násobně nižší, ale bez elektronového mikroskopu by nedošlo k tak velkému rozvoji lékařství, patologie a dalších oborů.

Díky elektronovému mikroskopu dokážeme pozorovat viry, bakterie, atomární složení látky aj. Pozorování virů a bakterií vedlo a stále vede k rozvoji lékařství. Tvoří nepostradatelnou složku v řadě odvětví jako je biologie (struktura buněk), chemie (výzkum polymerů) nebo fyzika (struktura kovů). Mimo jiné se elektronové mikroskopy využívají v mikroelektronice, například k vývoji a zkoumání čipů. [9]

4.1 Typy elektronové mikroskopie

Existuje několik režimů, ve kterých elektronový mikroskop může pracovat, a to jsou transmisní elektronový mikroskop (TEM), skenovací transmisní elektronový mikroskop (STEM), skenovací elektronový mikroskop (SEM) a elektronová difrakce (ED). Každý jednotlivý mód se hodí na určité pozorování a vyžaduje určitá specifika jako například správnou tloušťku vzorku nebo krystalovou mřížku.

TEM umožňuje zobrazení a měření strukturních, chemických a mechanických vlastností látek až na atomové úrovni a krystalové struktury včetně jejich poruch. Princip TEMu spočívá v tom, že vzorkem prochází proud elektronů, proto musí být vzorek velmi tenký (standardní tloušťka je mezi 70nm-150nm, pro TEM by hodnota měla být pod 100 nm). Má difrakční a přímý zobrazovací režim. Pro zobrazeni využívá techniky světlého pole (BF bright field) a tmavého pole (DF dark field). U světelného pole jsou pro vytvoření obrazu využity málo rozptýlené elektrony prošlé vzorkem. Lze dosáhnout až atomárního rozlišení. U režimu temného pole dochází k výběru elektronů rozptýlených ve vybraném směru na vybraných atomových rovinách vzorku (vyšší difrakční řád). U tohoto principu zobrazení můžeme pozorovat jiný druh kontrastu ve vzorku (například defekty krystalové mřížky).

TEM se využívá k změření výskytu chemických prvků (kombinace s EDS), krystalových mřížek, mechanického napětí nebo orientaci krystalových zrn, k pochopení vlastností a jevů určující makroskopické chování materiálů. Používá se především v biologii, medicíně nebo materiálových vědách. [10]

Vzorek se vkládá do mikroskopu přes airlock neboli přechodovou komoru. Elektrony jsou elektromagnetickým polem fokusovány do tenkého svazku. Zdrojem elektronů je katoda. Součástí mikroskopu je také několik clon. V elektronovém mikroskopu je zabudovaná vědecká kamera, která ale umožňuje pořizovat pouze černobílé snímky. Elektrony se musí přeměnit na

fotony (světlo) a ty jsou detekovány kamerou. Samotně elektrony jsou bezbarvé, tudíž nelze pořídit barevný snímek vzorku. Tubus mikroskopu je tvořen elektronovou tryskou, kondenzory, objektivem, projektivem (projekčním systémem). Hlavní projektiv je nastavený na určitou hodnotu zvětšení, pomocný projektiv mění zvětšený v celém rozsahu.



Obrázek 1 a) Schéma tubusu transmisního elektronového mikroskopu, b) odpovídající řez přístrojem JEOL, převzato z [11]

STEM skenuje vzorek pomocí vychylovaného elektronového paprsku, kdy elektronový paprsek je zfokusován do co nejmenšího bodu. Některé modely mikroskopu dokážou pracovat s rozlišením až 0,05 nm, atakujícím atomárním rozlišením (pozorování rovin křemíku). Slouží k chemické analýze, v tom mu pomáhá RTG záření (EDS). [11]



Obrázek 2 Schéma rastrovacího transmisního elektronového mikroskopu (STEM), převzato z [11]

SEM se používá k analýze mikrostruktur, krystalografického uspořádání, chemického složení materiálů. Informace získáváme interakcí elektronového svazku se vzorkem. Na rozdíl od TEMu elektrony skenují vzorek po řádcích a vzorkem neprochází. Musí mít detektory pro sběr informací. Sbírá informace z povrchu a malého objemu pod povrchem vzorku. Velikost vzorku není specifikovaná, záleží na velikosti vakuové komory, do které se vzorek vkládá. Vzorek ale musí být vodivý, když není, musí se naprašovačkou naprášit vrstvou kovu například zlatem. Používá se k topografické analýze materiálů především malých objektů.

Skenovací elektronový mikroskop může být vybaven řadou různých detektorů, podle druhu interakce elektronů primárního elektronového svazku s materiálem vzorku.

Detektory SEM:

SE-sekundární elektrony (secondary electrons): Jsou elektrony generované z místa dopadu primárního svazku do hloubky desítek nanometrů. Jsou to topografické nositelé informací, zobrazují tvar povrchu vzorku. Díky trojrozměrného efektu slouží k analýze povrchů, struktur a měření rozměrů částic.

BSE-Zpětně odražené elektrony (back scattered electrons): Elektrony pronikají do větší hloubky interakčního objemu materiálů (desítky až stovky nanometrů). Přináší topografické a materiálové informace. Umožňuje i mód difrakce, čímž můžeme zkoumat krystalogii materiálů.

RTG záření: Vysílá signál z hloubky jednotek mikronů interakčního objemu. Na vzorek dopadá primární svazek elektronů, to slouží ke zkoumání chemického složení materiálů.

Katoluminiscence a Augerovy elektrony: Katoluminiscencí se pozoruje reálný barevný obraz vzorku. Dochází k interakci primárního svazku elektronů se vzorkem.

Augerovy elektrony jsou přechod elektronů z vyšších energetických hladin do vakance. Při přechodu se uvolní velké množství energie. Využívá se na analýzu materiálů.

FIB-Fokusovaný iontový svazek (focused ion beam): SEM-FIB mikroskopy používají primární a fokusovaný iontový svazek elektronů. Usměrněným tokem ionizovaných elektronů umožňuje mikroobrábění vzorků. Používá se k přípravě ultratenkých lamel, jakožto vzorků pro transmisní mikroskopii. [12]



Obrázek 3 Detektory SEM, převzato z http://fyzika.jreichl.com/main.article/print/1678-interakce-elektronu-se-vzorkem

5 ELEKTRONOVÁ OPTIKA-ČOČKY [11]

Existují dva způsoby, jak ovlivňovat dráhu nabitých částic, respektive v případě elektronových mikroskopů elektronů: elektrické a magnetické pole. Lze tedy použít elektrostatické nebo magnetické čočky. Magnetické čočky se používají v nejkritičtějších částech zobrazovací soustavy (objektivová čočka), jelikož magnetické čočky mají menší zobrazovací vady. V prostoru gapu mezi pólovými nástavci je magnetické pole koncentrováno, díky tomu má silnější fokusační efekt. Síly působící na elektron magnetické čočky lze vyjádřit pomocí Lorentzovy síly:

$$\mathbf{F} = -\mathbf{e} (\mathbf{v} \cdot \mathbf{B})$$

Z vektorového součinu pak dostáváme:

$$F_{z} = +ev_{\phi}B_{r}$$

$$F_{\phi} = -e(v_{z}B_{r} - B_{z}v_{r})$$

$$F_{z} = -ev_{\phi}B_{z}$$

V trajektorii elektronu jsou významné předmětová a obrazová rovina a dále roviny měnící indukci magnetického pole. Roviny jsou vymezeny fokusačním účinkem. Elektron proudí z předmětové roviny po přímce mírně nakloněné k optické ose. Jeho dráhu ovlivňuje radiální složka indukce. Tím vznikne azimutální síla a dráha elektronu se stočí od optické osy. Ve střední části čočky elektron rotuje kolem optické osy za vzniku radiální síly. Vzniklá síla působí na optickou osu. Radiální složka rychlosti elektronu se od optické osy zmenšuje. Rovina středu čočky je kolmá na optickou osu a tím dosáhne nulové hodnoty. Elektron se začne pohybovat po spirále. Fokusační účinek vznikne, jestliže se elektron pohybuje směrem doprava od středu čočky. Azimutální složka rychlosti dosáhne maximální hodnoty ve středu čočky a kvůli působící azimutální síle se zmenší na nulovou hodnotu. Pohyb elektronu po spirále skončí a začne proudit po přímkové dráze k optické ose. Tato dráha protíná optickou osu. Přímka je pootočená tím i obraz pootočený a převrácený. Jestliže se v případě elektromagnetické čočky zvýší budící proud, zvětší se i úhel rotace.



Obrázek 4 Trajektorie elektronu v magnetické čočce, převzato z [11]

Cívka nebo permanentní magnet v elektromagnetických čočkách vytváří kolem sebe nehomogenní symetrické magnetické pole, čímž ovlivňuje trajektorii nabitých částic. Jinými slovy magnetická síla ovlivňuje pohyb elektronů v cívce. Elektrony se pohybují různými rychlostmi, a tak jejich pohyb po trajektorii je různorodý.

V mikroskopu jsou typicky dvě až tři magnetické čočky tvořící kondenzor. V případě LVEM 25 a LVEM 25E je kondenzor tvořený pouze jednou čočkou z permanentních magnetů podpořenou regulovatelnou elektrostatickou čočkou.

Existují i čočky s vícepólovými nástavci, ale jsou rotačně nesymetrické. Zobrazení elektronovým mikroskopem je vždy zatíženo elektronově optickými vadami. U TEMu jsou nejzásadnější sférická (otvorová), chromatická (barevná) vada a osový astigmatismus.

6 ELEKTRONOVÁ DIFRAKCE [13]

Jedná se o jev, kdy dochází k ohybu vlnění za překážkou – v našem případě krystalovou mřížkou. Mezirovinné vzdálenosti musí být srovnatelné s vlnovou délkou vlnění. Jestliže vlny mají v určitém místě stejný směr výchylky z jejich rovnovážné polohy, vzniká tak konstruktivní interference, díky které nastávají difrakční maxima. Umístění difrakčních maxim popisuje Braggův zákon:

 $2 \cdot d \cdot sin\alpha = m \cdot \lambda$

m=1, 2, 3, ...

- m...řád maxima intenzity
- d...vzdálenost krystalových rovin
- α...difrakční úhel
- λ ...vlnová délka

Abychom mohli provádět elektronovou difrakci preparátu, musí mít krystalickou strukturu (krystalovou mřížku). Celkem existuj 14 druhů krystalových mřížek, které jsou členěny do sedmi základních soustav. Jejich poruchy lze pomocí difrakce pozorovat.

Pokud chceme zjistit uspořádání atomů v krystalech, určíme určitou soustavu krystalových rovin, přičemž mezirovinnou vzdálenost známe. Roviny odráží různé vlnové délky pod různými úhly.

Při difrakci polykrystalu jsou částice umístěné těsně vedle sebe a vytváří tak souvislý kruh. U monokrystalu je to přesně naopak. Jednotlivé částice se nachází od sebe v určité vzdálenosti a nejsou dokola spojeny.



Obrázek 5 Polykrystal, ED LVEM 5: grafen, převzato z https://sd.delong.cz/dwnld/EEBYSZJH



Obrázek 6 Monokrystal, ED LVEM 5: grafitová vločka, převzato z https://sd.delong.cz/dwnld/EEBYSZJH

7 PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PRO TEM [14]

Abychom se vzorkem mohli pracovat, je potřeba dodržet zásadní kroky jeho přípravy. Vzorek musí mít malé rozměry, v průměru zhruba 2 mm, a zároveň aby ním mohly procházet elektrony měl by být dostatečně tenký, do 200 nm.

U odebraného biologického preparátu je potřeba nejprve provést fixaci aldehydy. Tím se zajistí jeho stabilizace a zachová se jeho struktura, tedy aby se jeho stav, co nejblíže podobal původnímu stavu. Následuje postfixace oxidem osmičelým (OsO₄), který zachová strukturu biologických membrán. Vodu v systému je třeba nahradit. Provedeme dehydrataci (odvodnění), kdy do roztoku přidáme dehydratační činidlo, například alkoholy nebo aceton a do takto připraveného roztoku vložíme vzorek. Po dehydrataci vzorek zalijeme pryskyřicí, což umožní vzorek nakrájet. Následně připravený vzorek nakrájíme ultramikrotomem, zařízením pro přípravu ultratenkých řezů. K řezu se používají buď skleněné, nebo diamantové nože. Skleněné nože jsou výrazně levnější, lze s nimi nakrájet 30 řezů a poté je potřebná jejich výměna. Diamantové nože provádí kvalitnější řezy, není potřebná po více použití jeho výměna. Ale při poškození se musí znovu nabrousit za vysokou částku peněz. Tenký řez vzorku se nanese na podložní síťku. Podložní síťka se obvykle vyrábí z niklu, zlata anebo mědi. Podložní síťka se vloží do držáku a následně do vakuové komory.

Vzorek lze připravit i jinými způsoby, které nám umožní pozorovat například větší detaily či strukturu vzorku.

Pozitivní kontrastování ultratenkých řezů:

Používá se u řezů s nízkým kontrastem. Na síťku se vzorkem se nakape roztok s těžkým kovem např. uranyl acetát, který se naváže na vzorek. Místa, která jsou roztokem navázána ztmavnou.

Negativní kontrastování:

Se využívá pro pozorování malých částic jako jsou bakterie, viry, makromolekuly nebo buněčné organely. Na vzorek nakapeme fixační roztok, roztok zčásti penetruje vzorek. Vzorek je lépe viditelný.

Imunoznačení:

Na vzorek navážeme jinou látku, respektive protilátku s těžkým kovem (zlato, stříbro), při pozorování jsou selektivně označena specifická místa s navázaným těžkým kovem. Díky tomu můžeme určit umístění specifických molekul. [15]

Kryofixace:

Vzorek ošetříme kryoprotektantem, chemicky zmrazíme (například tekutým dusíkem), avšak musíme dávat pozor, aby se na vzorku nevytvořily krystalky ledu. Pokud chceme pozorovat zmražený vzorek je potřeba vzorek se síťkou umístit do kryodržáku a při pozorování dávat pozor, aby nedocházelo k zahřívání a tání ledu. Vzorek je zapotřebí ozařovat minimálně. Vzorek lze také pomocí sublimace ledu vysušit a přidáním další látky zvýšit jeho kontrast. Ovšem pro co nejpřesnější výsledek, je nejlepší pozorovat zmražený vzorek. Kryofixace se používá při pozorování membrán.

8 LVEM 25 [2]

LVEM 25 je transmisní elektronový mikroskop společnosti Delong Instruments. Oproti konvenčním elektronovým mikroskopům pracuje s nižší energií v rozmezí 10-25 kV s rozlišením až 1,0 nm. Zdrojem elektronů je elektronová tryska Schottkyho typu (Schottky Field Emission Gun (FEG)). Vzorky jsou umístěné na standardní podložní síťku o průměru 3,05 mm. Jako jediný TEM využívá magnetickou čočku, jejímž zdrojem magnetického pole jsou permanentní magnety, díky tomu nepotřebuje aktivní chlazení a celý přístroj může být značně miniaturizován. Ovládá se pomocí kontrolní konzole. Je vybaven vědeckou CMOS digitální kamerou. Tato kamera umožňuje pořizovat snímky při slabém osvětlením s vysokým dynamickým rozsahem. Mikroskop umožňuje práci v následujících módech: TEM, STEM, ED. Režimy lze snadno přepínat bez jakékoliv manipulace se vzorkem.

TEM

Pracuje s napětím 25kV a rozlišením 1,0 nm. Pozorujeme živý obraz vzorku o vysoké frekvenci.

STEM

Funguje ve dvou režimech, a to s rozlišením 1,0 nm při napětí 10 kV, anebo s rozlišením 1,3 nm ale s napětím 15 kV. Oba režimy nabízí obraz s vysokou úrovní kontrastu. Skvěle se hodí pro práci se silnějšími vzorky až do tloušťky 200 nm pro biologické preparáty.

ED

Charakterizuje strukturu krystalických materiálu či látek elektronovou difrakcí s velikostí sondy v rozmezí 500–8000 nm.

Vleze se do jakékoliv laboratoře díky svým malým rozměrům a komptabilitě. Je vhodný pro výzkum. Využívá se např. ve virologii, patologii či lékařství.



Obrázek 7 LVEM 25, převzato z https://delongamerica.com/lvem25/product-details

8.1 LVEM 25E [16]

Jedná se o transmisní elektronový mikroskop, který na rozdíl od LVEM 25 pracuje také v módech SEM a EDS. Dokáže změřit vnější a vnitřní struktury vzorku a analyzovat jeho chemické složení. Funguje na stejném principu jako LVEM 25.

SEM

Princip metody spočívá v detekci zpětně odražených elektronů. Elektrony vzorkem tedy neprochází. Analyzuje povrch vzorků, čímž zjistíme tvar a povrch preparátu.

EDS

Se používá pro analýzu chemického složení vzorku. Vytvoří barevnou mapu složení prvků.

Nalezne uplatnění zejména v materiálových laboratořích, například výzkum nanomateriálů a polymerů. Ale uplatní se i v oborech jako onkologie, imunologie nebo biochemie



Obrázek 8 LVEM 25E: EDS mapa výskytu prvků zlata, převzato z https://delongamerica.com/lvem25e/gallery?i=stem15kv-cl500v-tilt-16sample-sio-au-04-02-immunology



Obrázek 9 LVEM 25E, převzato z https://delongamerica.com/lvem25e/product-details

9 PRAKTICKÁ ČÁST

9.1 Úvod k praktické části

V praktické části jsem se seznámila s jednotlivými přípravami vzorků a připravila vzorek močoviny. Příprava vzorku pro TEM a světelný mikroskop je zcela odlišná. V případě TEM je vzorek potřeba stabilizovat (v případě biologických materiálů), nahradit vodu v jeho systému, zalít do pryskyřice a na konec nakrájet pomocí skleněných nebo diamantových nožů na ultramikrotomu. Diamantové nože jsou dražší, ale oproti skleněným nožům mají delší životnost. V případě materiálových vzorků je příprava ultratenkých vzorků pro TEM odlišná, jelikož se vzorek upne přímo na ultramikrotom a nakrájí. Materiálové vzorky jsou pevné a stále, tudíž není potřeba provést jejich fixaci a stabilizovat je. I přes to, že kost a lastura se řadí do protokolu pro biologické vzorky, použili jsme protokol pro přípravu vzorků materiálových.

Naučila jsem se pracovat s transmisním elektronovým mikroskopem LVEM 25 a LVEM 25E na uživatelské úrovni v režimu TEM, STEM a ED. Pomocí nichž jsem zobrazovala jednotlivé preparáty. Volba vhodných vzorků byla náročná, jelikož jsme potřebovali vzorky hlavně krystalické povahy a zároveň anorganického charakteru, což není zcela běžné. Může to však některých případech mnoho vypovědět o patologických jevech probíhajících v organismu nebo o struktuře skeletu organismu. Mikroskopovala jsem v režimech TEM, ED a STEM 15.

10 POPIS MIKROSKOPOVÁNÍ LVEM 25 [17]

V postupu samotného mikroskopování najdeme značné rozdíly mezi elektronovým a světelným mikroskopem počínaje už přípravou vzorku a konče ovládání systému.

Nejprve vzorek položený na podložní síťce umístíme pomocí pinzety do držáku. Musíme být opatrní, jelikož je podložní síťka tenká a při jejím poškození, bychom mohli poškodit i vzorek. Držák upneme do stolu. Pinzetou odklopíme planžetu. Na spodní svorku opatrně položíme vzorek (síťku) a horní planžetu dáme do původní pozice. Držák vložíme do vakuové komory (v tuhle chvíli už musíme mít zapnutý mikroskop). Zapneme mikroskop a následně software k mikroskopu. Mikroskop funguje ve třech základních režimech. Po přihlášení do softwaru uživatel pokračuje buď ve výchozím režimu-TEMu, anebo si zvolí některý ze zbývajících režimů. V průběhu práce se může přejít na jiný režim. Pokud jsou hodnoty vakua v pořádku, aktivujeme elektronovou trysku, tj. spustíme emisi. Náběh emise trvá přibližně 2 minuty. Pro přesnou práci je vhodnější nechat mikroskop stabilizovat cca 15 minut, než se emise stabilizují.



Obrázek 10 Stojan s držákem vzorkuotočená horní planžeta do boku, položená podložní síťka s preparátem na spodní svorce



Obrázek 11 Stojan s držákem vzorku

Mikroskop lze ovládat pomocí konzole nebo v samotném softwaru.

Vzorek si nejprve celý prohlédneme v režimu s velkým zorným polem (Low Mag) a najdeme zajímavá místa k bližšímu pozorování. Místa se dají ukládat a zpětně se k nim vracet. Po preparátu se pohybujeme pomocí joysticku.

Po zvolení vhodné části k pozorování je potřeba si místo dostatečně přiblížit pomocí Magnification a zároveň přepnout mikroskop do režimu TEM. Magnification se používá ke zvětšení části vzorku v režimu TEM (ovládá projektivy mikroskopu). Ve STEMu je zvětšení realizováno jinak-elektronicky pomocí změny velikosti rastrované oblasti.

Zkoumanou část je potřeba umístit doprostřed. K tomu lze použít kromě mechanického manipulátoru i image shift dostupný Corrector control panel, který slouží k přesnému pohybu po osách x a y. Během pozorování můžeme kdykoliv pořídit snímek příkazem Save image.

Intenzitu osvětlení preparátu v režimu TEM lze nastavit pomocí funkce Illumination, která řídí napětí na elektrostatické kondenzorové čočky, nižší napětí znamená intenzivnější světlo.

Obraz je třeba doostřit. K tomu máme k dispozici dvě pomůcky. Pro hrubé zaostření Focus Wobler a pro jemnější doladění fokusu FFT (Fast Fourrier Transformation). Focus wobbler používáme k zaostřování pouze v TEMu. Ostříme pomocí mechanického posunu vzorkem podél optické osy mikroskopu (osa z). To je realizováno otáčením hlavičky joysticku. V případě rozostřeného obrazu uvidíme po zapnutí focus wobbleru dva obrazy, které umístíme na sebe, do jednoho a snímek se tak zaostří (obr. 13 a 14). Pro jemné doostření slouží Fine focus, který vzorek doostří bez změny vertikální polohy vzorku (elektrickým nastavením optiky mikroskopu).

Veškeré úkony popsané výše lze realizovat za pomoci kontrolní konzole (obr. 12) nebo dialogového okna v softwaru k mikroskopu.



Obrázek 12 Kontrolní konzole: 1) on/off pro zapnutí, vypnutí mikroskopu; 2) Illumination; 3) režimy mikroskopu; 4) Focus wobbler; 5) Corrector control; 6) Fine focus; 7) Magnification; 8) Save image; 9) joystick, převzato z [17]



Obrázek 13 Rozostřený snímek (použití Focus wobbler), převzato z [17]



Obrázek 14 Zaostřený snímek (použití Focus wobbler), převzato z [17]

Může se stát, že vzorek kvůli proudu elektronů spálíme. Pokud tahle situace nastane, lze ještě na preparátu nalézt nepoškozené místo. Jestliže nejsem při manipulaci s podložní síťkou a celkově se vzorkem opatrní a poškodíme ho, nemusí se povést jeho zkoumání. Na pokrouceném vzorku se těžko hledá vhodné místo k bližšímu zkoumání, zároveň se může protrhnout a narušit strukturu preparátu.

11 VZORKY

11.1 Nepatogenní bakterie

Na začátku jsem se zabývala speciálním druhem nepatogenních bakterií, které produkují krystalky manganu usazujících se podél buněk. Příprava vzorku proběhla standardně dle protokolu pro přípravu biologických vzorků, popsané v kapitole 7.

Pokud je bakterie nepatogenní, nemůže poškodit, usmrtit nebo způsobit onemocnění u jiných organismů, tudíž nehrozilo žádné riziko při manipulování se síťkou.

11.2 Močovina

Močovina (CO(NH₂)₂) je diamid kyseliny uhličité. Jedná se o první organickou sloučeninu vyrobenou z anorganických látek. Jedná se odpadní látku metabolismu dusíkatých látek savců, obojživelníků a některých ryb. Používá se na výrobu hnojiv a plastů. [18]

Močovina (urea) je pro lidský organismus nepotřebná a škodlivá látka. V buňkách lidského těla vznikají při chemických reakcích dusíkaté sloučeniny, které jsou nebezpečné pro tělo. Jsou přeneseny krví do jater, kde se přemění na močovina. Močovina pak dále putuje v krvi k ledvinám. Ledviny ji pomocí ledvinných kanálků přefiltrují na moč. Močovina spolu s dalšími škodlivými látkami je v podobě moči vyloučena z organismu. Pokud je v krvi zvýšená hladina močoviny, znamená to onemocnění ledvin nebo nadměrnou konzumaci bílkovin. [19]

Vzorek močoviny jsem připravila dle následujícího protokolu. Močovina se smíchá s deionizovanou vodou. Roztok jsem napipetovala do zkumavky, která se následně vložila do ultrazvukové myčky, kde se vzorek dostatečně promíchal (sonifikováno po dobu 15 minut). Následně byl pipetou nakápnut v množství přibližně 3 µl na podložní síťku s ultratenkým uhlíkovým filmem.



Obrázek 15 Vzorec močoviny

11.3 Kost

Kost (lat. os) je nejtvrdší tkáň, její funkce je opora těla a ochrana měkké tkáně. Z 55 % ji tvoří anorganické látky: ionty kalcia a fosfátu ve formě hydroxyapatitu, kalciumfosfát a minerální soli vápníku. Základní jednotkou stavby kosti je osteocyt.



Obrázek 16 Stavba dlouhé kosti, převzato z https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3704

Pracovala jsem se stehenní kuřecí kostí (lat. femur), která se řadí mezi dlouhé kosti. Dělí se na epifýzu (hlavička kosti), metafýzu (obsahující růstové chrupavky) a diafýzu (dutá část obsahující kostní dřeň). [20] Šlo o kompaktní kost, která je součástí dlouhých kostí. Tvoří ji kostní tkáň obsahující organickou i anorganickou složku. Šlo nám zejména o anorganickou část, aby mohla být provedena difrakce. Proto byl vzorek odebraný z diafýzy. [21]

K pozorování byla použita kuřecí stehenní kost. Nejprve se musela vyvařit, aby došlo k její sterilizaci a odstranilo se, co nejvíce organických zbytků. Příprava vzorku neproběhla standardně pro biologické preparáty, jak je popsáno v kapitole 7, ale příprava proběhla jako u materiálu, protože nám nešlo o zachování buněčné struktury. Vzorek mi v rámci spolupráce nakrájel Helmut Gnaegi ze společnosti Diatom.

Suché krájení kosti bylo neúspěšné, poněvadž se plátky nedařilo umístit na síťku. Z toho důvodu se pan Gnaegi rozhodl krájet ve vodě, což se také povedlo. Nastal ale problém, protože řez nemohl být umístěný na běžnou podložní síťku, ale musela se použít mřížka s uhlíkovou fólií s otvory o průměru 2µm.

11.4 Lastura

Lasturu tvoří převážně uhličitan vápenatý (CaCO₃), dále konchiolin a aragonit. Jedná se o dvoudílnou schránku mlžů a díky ní se rozpoznávají jednotlivé druhy mlžů.



http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%200208%20mekkysi/m%C4%9Bkk%C3%BD%C5%A1i%20web.html

Vzorek mi opět nakrájel ve spolupráci Helmut Gnaegi. Příprava vzorku proběhla stejnou cestou jako u kosti.

Lastura byla krájena diamantovým kotoučem a kryo nožem při pokojové teplotě. Lasturu nešlo nařezat ve vodě, neboť vzorek je hydrofilní. Pokládání vzorku na síťku je náročná záležitost, protože se vzorek snadno poškodí. Preparát se podařilo umístit na podložní síťku, ke správnému přichycení na síťku pomohla vlhkost.



Obrázek 18 Vzorek kosti



Obrázek 19 Vzorek lastury



siť kami se vzorky lastury a kosti

12 POZOROVÁNÍ

První jsem pozorovala nepatogenní bakterii v režimech TEM, STEM15, ED. V mikrografii lze vidět řez buňkami a výrazné oblasti manganových depozitů produkovaných okolními buňkami. Jelikož má mangan vyšší hustotu než okolní bakterie (které jsou složeny převážně z uhlíku), jeví se na snímku tmavší, protože zde dochází k většímu rozptylu procházejících elektronů.



Obrázek 21 TEM nepatogenní bakterie, manganové depozity se nachází ve vyznačené oblasti



Obrázek 22 TEM nepatogenní bakterie, zvětšená oblast manganových depozitů



Obrázek 23 STEM 15 nepatogenní bakterie, zvětšená oblast manganových depozitů

U obrázku 22 je stejná oblast jako u předchozího snímku, s větším rozlišením. Na vedlejším obrázku lze spatřit opět stejnou oblast, ale tentokrát v režimu STEM 15. Pozorovaná část lze v TEMu lépe vidět, jelikož poskytuje lepší prostorové rozlišení. STEM se využívá především pro tlustší vzorky, kde je potřeba omezit vliv chromatické vady, dané dodatečným rozšířením energiové šířky svazku preparátem.



Obrázek 24 ED nepatogenní bakterie

Bakterie jasně krystalizovala. Vzorek byl správně zvolený. Jelikož jsou jednotlivé kruhy spojeny, jedná se o polykrystal.

Vzorek močoviny nekrystalizoval, a proto se na něm difrakce nezdařila. Vzorek byl docela tlustý, nebyla optimálně zvolena metoda přípravy vzorku. Pokud by byl preparát připravený jinou metodou, měl by krystalizovat.



Obrázek 25 ED močovina

Dále jsem zkoumala lasturu.



Obrázek 26 TEM lastura

Mým zkoumaným objektem je tmavá část, kterou jsem difraktovala.



Obrázek 27 TEM lastura, vyznačený je vzorek v oku podložní síťky

Preparát s menším zvětšení. Šestiúhelník je oko mřížky podložní síťky. Černá místa jsou podložní síťka.



Obrázek 28 ED lastura



Obrázek 29 ED lastura

Vzorek měl krystalickou povahu a difraktoval. Na prvním pohled lze spatřit, že se jedná jak o polykrystal, tak i o monokrystal. Monokrystaly jsou jasněji vidět na prvním snímku. Při změně pozice na vzorku místy převažovaly monokrystaly a místy polykrystaly.

Na závěr jsem zkoumala můj hlavní preparát a to kost.



Obrázek 30 TEM kost

I přes problémy s krájením, byla síťka plná preparátu.



Obrázek 31 TEM kost

Přiblížená oblast, na které jsem prováděla difrakci. Vzorek je "přikrytý" tmavší vrstvou s otvory, jde o uhlíkovou fólii viz. kapitola 11.3. Tato síťka s periodicky rozmístěnými kruhovými otvory se nazývá quantifoil.



Obrázek 32 ED kost

Preparát vykazoval jasnou krystalovou strukturu. Na snímku je zobrazený polykrystal.



Obrázek 33 ED kost

U prostředního kruhu jsou slabě vidět monokrystaly. Na preparátu převažovaly polykrystaly.

13 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo rozvinout metodu elektronové difrakce se vzorky biologické povahy. Difrakce byla provedena na čtyřech biologických preparátech (bakterie s manganovými depozity, močovina, kost, lastura). Nepatogenní bakterie s manganovými depozity jasně krystalizovala a výsledkem je difrakce polykrystalů. Ač je močovina anorganického původu, nekrystalizovala. Na vině byl patrně špatně zvolený protokol přípravy. Močovina by měla mít krystalovou strukturu, proto bych příště zvolila jinou metodu přípravy podporující vznik krystalické struktury.

Hlavní vzorky, kost a lastura poskytly nejlepší difraktogramy, neboť jsem při pozorování viděla jasnou difrakci polykrystalů společně s monokrystaly. Monokrystaly převažovaly hlavně u lastury. Pro difrakci kosti byla vybrána kuřecí stehenní kost (dlouhá kost). Vzorek byl odebrán z diafýzy kvůli anorganické části. Postup přípravy byl zvolen pro protokol přípravy materiálu, jelikož nám nešlo o zachování buněčných struktur. Problém se vyskytl při jejich krájení, ale naštěstí si s tím Helmut Gnaegi, který mi vzorek kosti a lastury krájel, poradil. Celkově lze říci, že mikroskopování bylo úspěšné.

V biologických materiálech anorganického charakteru dochází ke krystalizaci podobně jako u některých vzorků materiálových. V kostech se tato anorganická složka (především ionty kalcia a fosfátu) vyskytuje ve formě krystalových destiček. Ve šlachách jsou tyto destičky umístěny v paralelních vrstvách napříč fibrilami. Jejich krystalografii lze pozorovat pouze pomocí elektronové difrakce. Díky téhle metodě chápeme základní mechanismy krystalů v tkáních, jak nukleují a rostou. Problém nastává v přípravě vzorku, která je složitá viz kapitoly 11.3 a 11.4 (krájení vzorků). Proto se pomocí elektronové difrakce biologické preparáty často nezkoumají.

Nízkovoltová elektronová difrakce by se dala využít při procesech biomineralizace např. v biologických laboratořích a v nanotechnologii. Máme možnost zjistit atomární rozložení krystalů a jejich mezirovinné vzdálenosti a zjistit, jak se krystaly chovají v biologických preparátech. Zdali jsou růst a nukleace krystalů řízené či nikoliv a co to může ovlivnit. Nebo také zda na tyto procesy mají vliv výchylky-poruchy krystalových mřížek.

BIBLIOGRAFIE

[1] HORSKÝ: Univerzitní příprava gymnaziálních učitelů fyziky, kapitola II., podkapitola 6 Davissonův-Germerův pokus (online), získáno z <u>https://kof.zcu.cz/st/dp/horsky/html/2daviss.html</u>

[2] Delong Instruments: LVEM25 Electron Microscope (online), získáno z <u>https://delongamerica.com/lvem25/product-details</u>

[3] Y. SMITH, B. PHARM (2018). News Medical Life Sciences: History of the Electron Microscope, získáno z https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-the-Electron-Microscope.aspx

[4] H. G. RUDENBERG, P. G. RUDENBERG, (2010), Chapter 6 – Origin and Background of the Invention of the Electron Microscope: Commentary and Expanded Notes on Memoir of Reinhold Rudenberg, získáno z <u>https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1076567010600067</u>

[5] KRÁLOVÁ M. Techmania Science Center: Elektronový mikroskop (online), získáno z http://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/kvanta/elektronovy-mikroskop

[6] Ústav přístrojové techniky AV ČR: Elektronová mikroskopie (online), získáno z <u>https://www.isibrno.cz/en/electron-microscopy</u>

[7] ALISI: Proč projekt ALISI (online), získáno z http://alisi.isibrno.cz/proc-projekt-ALISI

[8] M. RYCHLÍK, 2017, Electron microscopy, the pride of the Czech Republic, získáno z http://www.czech-research.com/electron-microscopy-pride-czech-republic/

[9] HÁJKOVÁ, Z., BAUEROVÁ, P., FEJFAR, A., & ŠLOUF, M. (2018). Elektronový mikroskop – klíč k odhalení tajemství mikro – a nanosvěta. Chemické Listy, 112(2), 128–134. Získáno z <u>http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2995</u>

[10] Matca: Transmisní elektronový mikroskop (TEM), (online), získáno z <u>https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/tem/</u>

[11] KARLÍK M. Úvod do transmisní elektronové mikroskopie. České vysoké učení technické, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, 2011. ISBN: 978-80-01-04729-3. strany 13-36

[12] Matca: Skenovací elektronový mikroskop (SEM), (online), získáno z <u>https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/sem/</u>

[13] WALKER J., KOMRSKA J. Fyzika vysokoškolská učebnice obecné fyziky Část 4 Elektromagnetické vlny-optika-relativita. překlad: Obdržálek J., Dub P. 1. české vydání. Praha: Prometheus, 2000. ISBN: 80-214-1868-0. kapitola 37- difrakce

[14] JAROŠ J. Úvod do elektronové mikroskopie, TEM (online) získáno z https://is.muni.cz/el/sci/jaro2020/Bi8920/um/Elekronova_mikroskopie_uvod_Jaros.pdf

[15] https://portal.cvut.cz/wp-content/uploads/2016/11/Karlik_247.pdf

[16] Delong Instruments: LVEM25E Electron Microscope (online), získáno z <u>https://delongamerica.com/lvem25e/product-details</u>

[17] Brožura k LVEM 25, Delong Instruments

[18] kolektiv autorů. Odmaturuj z chemie. druhé vydání. Brno: Didaktis, 2014. ISBN: 978-80-7358-232-6. strany 73, 137, 184

[19] Medixa.org: Urea-močovina (online), získáno z https://www.medixa.org/lecba/urea-mocovina

[20] NOVÁKOVÁ L., ŠAJDÍKOVÁ M. Funkce buněk a lidského těla: 1. Funkční morfologie kostí a chrupavky (online), získáno z http://fblt.cz/skripta/iv-pohybova-soustava/1-funkcni-morfologie-kostia-chrupavky/

[21] NZIP: Kompaktní kost (online), získáno z https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3704