

Scanning- Elektron Mikroskobu

Kübra Asena TERİM KAPAKİN✉

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı -ERZURUM

Geliş ve kabul tarihi: 05.06.2006-04.08.2006, ✉ Sorumlu araştırmacı, 312 3170315/242, kbraterim@yahoo.com

ÖZET

Elektron mikroskobu (EM) görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur. EM büyük bir alan derinliğine sahiptir, yüksek büyütme yapar. Görüntünün kalitesi, netliği ve detay zenginliği rezolüsyona bağlıdır ki EM'da rezolüsyon gücü 2-20 angstromdur. Scanning- Elektron Mikroskobu (SEM) biyoloji, tıp, madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 100.000 kez büyütürken yüzey yapılarını görüntüleyerek yüzeyde meydana gelen farklılıkları değerlendirir. Üç boyutlu hayali bir görüntü oluşturur.

Anahtar Kelimeler: Scanning elektron mikroskobu, fiksasyon, kaplama.

Scanning-Electron Microscopy

SUMMARY

The electron microscope (EM) is a scientific instrument that utilizes a beam of electrons, rather than light, to image a specimen. Electron microscopes (EM) have a large depth of field and provide a high level of magnification. The quality, clarity and opulence of details of the image are dependent on resolution, and the resolution achieved by electron microscopes ranges between 2-20 angstroms. Scanning electron microscopy (SEM) magnifies specimens pertaining to biology, medicine, matter sciences and earth sciences, 100 000 times, and enables evaluation of differences in the surface by means of imaging surface structures. SEM reconstructs a visionary three-dimensional image.

Keywords: Scanning electron microscopy, fixation, cower.

GİRİŞ

Elektron mikroskobu (EM) görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur. EM ışık mikroskobuyla (IM) karşılaştırıldığında bir çok avantajının olduğu görülür. EM'da IM'nun aksine aydınlatma kaynağı olarak ışık yerine vakum içinde hızlandırılmış elektron demeti kullanılır. IM'da genellikle boyanmış preparatlar ışığın, örneğin içinden geçmesi yolu ile incelenerek, tıp, bilim ve mühendislik gibi birçok alanda kullanılır. Ancak atom gibi çok küçük cisimcikleri görmemiz için gerekli olan yüksek büyütmeleri veremezler. EM ise; yüksek büyütme yapar. Büyük bir alan derinliğine sahiptir, yani yüksek rezolüsyonlu görüntüler oluşturur. Görüntünün kalitesi, netliği ve detay zenginliği rezolüsyona bağlıdır ki IM'nun rezolüsyon gücü 0,5-1 mikron iken EM'da bu oran

2-20 angstromdur (1,3,9,16). İlk EM'u Knoll ve Ruska tarafından Almanya'da geliştirilmiştir (3,12,14). EM'nun, Transmission Electron Microscopy (TEM) ve Scanning Electron Microscopy (SEM) olmak üzere iki temel tipi vardır. Daha az kullanım alanına sahip Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)'da üçüncü tipi olarak bilinmektedir (3,9,17).

SEM: Biyolojik botanik, hücre biyolojisi, tıp (Adli Tıp, anatomi, mikrobiyoloji, biyokimya, fizyoloji, toksikoloji, patoloji), madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 100.000 kez büyütürken yüzey yapılarını görüntüleyerek yüzeyde meydana gelen farklılıkları değerlendirilir (1,3,8,10,16). Üç boyutlu hayali bir görüntü oluşturur. Her geçen gün geliştirilen özellikleri ile SEM, IM'undan 300 defa daha fokus

derinliğine ve 20 ile 100.000 arasında net görme oranına sahiptir (3,8,10).

TEM: Biyoloji, tıp, madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 600.000 kez büyütürken iç yapılarını görüntüler (1,3,15).

STEM: Hem TEM hem de SEM'in özelliklerine sahiptir. Örnekte atomik elementlerin yayılımı ve varlığını saptamada ve elektron demetlerinin ince örnekleri delerek taranmasında kullanılır. Bu yüzden başlıca kullanım alanı analizlerdir (3,17).

SEM'in Kullanım Alanları

Medikal kullanım: Sağlıklı, sağlıksız kan ve doku örneklerini veya hastalığa sebep olan etkenleri belirlemede, ilaç verilen hastalarla verilmeyenler arasındaki farkları gözleyerek ilacın hasta üzerindeki etkilerini belirlemede kullanılabilir.

Adli Tıp: Metal parçaları, boya ve mürekkep gibi maddeleri karşılaştırmada ya da saç veya iplik gibi maddeleri inceleyerek polis laboratuvarlarında delilleri incelemeye kullanılır.

Metaller: Soğuk ve sıcak gibi farklı koşullar altında metallerin dayanıklılığını belirlemede, güvenlik nedeniyle güçlü bir metal kullanımı gerektiren uçak, tren, gemi ve otomobil gibi araçların yapımında kullanılan metallerin dayanıklılığını belirlemede kullanılır.

Bilimsel Araştırmalar: Biyologlar bitki ve hayvan dokularına bakmak, kimyagerler mikroskobik kristalleri incelemek, metallerin, plastiklerin ve seramiklerin yapısını incelemek gibi bilimsel araştırmalarda SEM'in kullanılabilirliği pek çok farklı alan vardır (9).

EM. İçin Örnek Alma

İlk adım kullanacağımız örnekleri uygun bir şekilde almak ve onları hazırlamaktır. Bunlar bitki, insan veya hayvanlardan alınan örnekler, olabileceği gibi bakteri, virus gibi hücre elemanları ve çok çeşitli yüzeyler olabilir. Örnek boyutları fiksasyon için uygun (5x5 mm) boyda olmalıdır (1,3,6,16).

EM'de Fiksatifler ve Fiksasyon

Fiksasyon EM için biyolojik örneklerin hazırlanmasındaki ilk basamaktır. Amacı alınan örneği canlı organizmayla karşılaştırıldığında mümkün olduğunca en az farklılık oluşturacak şekilde hazırlamak ve örnekten bloklar oluşturmaktır. Dehidrasyon, gömme ve elektron demetine maruz kalmada bile ultrastrüktürel ilişkilerin korunduğu şekle getirip sabitlemeyi amaçlamaktadır (1,2,3,4,5,16), (Tablo 1).

EM Fiksatiflerinin Geliştirilmesi:

IM için kullanılan fiksatiflerinin çoğu EM için yetersizdir. İlk EM çalışmalarında fiksasyon için IM'da kullanılan formaldehit denenmiş fakat yeterli sonuç alınmayınca 1950'lerde osmik asit kullanılmaya başlanılmıştır. Osmium tetra oksit (OsO₄) EM'da fiksatiflerin temelini oluşturur. OsO₄'le lipitler ve karbonhidratlar çok iyi bir şekilde tespit edilirken, proteinlerin çoğunluğu tespit edilmez ya da parçalanır. Bu yüzden de enzim araştırmalarında primer fiksasyon için kullanılamaz. Kesiti alınan örneklerin boya maddelerine karşı affinitesini artırır. Dokulara çok yavaş işlediğinden örnekler çok küçük olmalıdır. OsO₄ ve sonrasında potasyum permanganat hem zarlar hem de bitkiler için alternatif fiksatiflerdir (1,3,5,10,13). 1963'de Sabatini, Bensch, Barnett (15) primer fiksatif olarak aldehit kullanımını özellikle de glutraldehiti, sekonder fiksatif olarak da OsO₄ kullanımını önermişlerdir. Günümüzde en çok kullanılan ve en çok tercih edilen bir fiksatif glutraldehit olup bunun başlıca sebebi ise glutraldehitin karbonhidratlar, proteinler ve enzimlerin çoğunu fikse edebilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca fiksasyondan sonra örnekler tamponlarda büzüşmeden uzun bir süre muhafaza edilebilir. Glutraldehitin bunların yanında lipitleri iyi fikse edememesi ve bunlarla tespit edilmiş örneklerin boyaları yeterince alamaması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu yüzden aldehitle fiksasyondan sonra OsO₄'le postfiksasyon zorunluluğu vardır (1,3,5,13,16). Tersiyer fiksatif olarak uranil asetat kullanılabilir ki özellikle lipitler için iyi bir fiksatifdir (5).

Tampon Çözeltiler: EM'da sıklıkla Fosfat, Cacodylate, Veronal acetate, Collidine tamponlar kullanılır (1,3,5,6,16). Fosfat tamponlar hariç diğerlerinin insanlar ve EM cihazı üzerine yan etkileri vardır. Fosfat tamponlar EM'da kullanılan en fizyolojik tampondur.

Ekstrasellüler sıvıları taklit ederler ve hücre kültürlerine toksik değildir. Perfüzyon fiksasyonu, OsO₄ gibi yavaş penetre ve reaktif olan fiksatifler için mükemmel tampondurlar. Tek dezavantajları diğer tamponlara nazaran fiksasyon sırasında presipitat oluşturmaları ve yavaşta olsa mikroorganizmalarla kontamine olmasıdır. Günümüzde en çok monobazik-

dibazik sodyum fosfat karışımı olan Sörensen tamponu kullanılmaktadır (3,5,8,16).

Tamponların pH'si: EM fiksatifleri tamponlarla nötral pH'da tutulmaya çalışılır (3,5). Çoğu fiksatifler pH 6,5-8 arasındadır. Albumin için pH 7 veya daha az, nükleer materyal ve akromatik demetler için ise pH 6 civarlarında olmalıdır (2,3,5,8,16).

Osmolarite: Hipertonik ortam veya fiksatifler hipotoniklerden daha az zararlıdır. Fiksatifin osmolaritesi tampon konsantrasyonu değiştirilerek ayarlanabilirken, glukoz-sükroz ve Na-kolloid de eklenebilir. Glukoz ve sükroz albuminin iyi fiksasyonuna izin vermeyeceği için primer OsO₄ fiksatifleriyle kullanılmamalıdır. Sekonder OsO₄ ve glutraldehit fiksatiflerle uyumludurlar. Sodyum klorid tampona pH tam oluşturmadan eklenmelidir. Aksi takdirde pH değişikliğe uğrar. Glutraldehit ve formaldehit osmolarite de inaktiflerdir (3,5,8,16).

Primer Fiksasyon: Fiksasyon zamana, ısıya, örneğin boyutuna ve fiksatifin yapısına bağlıdır. Veronal acetate ve collidine tamponlar primer fiksasyonda daha üstündürlükler. İzole hücreler birkaç dakikada, tüm dokular saatler içerisinde fikse olurlar. Özellikle ısı çok düşükse OsO₄'le primer fiksasyon için 0 °C'de 2 saat uygundur. Aldehitler içinde buna yakın bir süre gereklidir. Aldehitlerle fiksasyonda lipitlerin yıkımına yol açacağından bu süre uzatılmamalıdır (1,3,5,16). Aldehit-OsO₄'le fiksasyonda ise ısı değişikliği 0-25 °C'de çok az yapısal değişiklik oluşur. Ancak mikrotübüller düşük ısıda korunamazlar. Yüksek ısıda mitokondriler de büzüşme ve sitoplazmada granülarite oluşur. Isının 0-4 °C sınırlandırılması aktiviteyi de sınırlar. OsO₄, glutraldehit ve potasyum permanganatla çok kısa başlangıç fiksasyonundan sonra oda ısısında ana fiksasyon önerilir (1,2,3,5,6,13,16).

Yıkama: Birden fazla fiksatif kullanılacaksa ilk maddenin fiksasyona katılmayan kısmı yıkanır. Yıkama özellikle aldehit sonrası OsO₄ kullanılacaksa önem taşımaktadır. Çünkü her iki madde de birbirleriyle etkileşmektedir. Bunların yanısıra çok sayıda örnek için yıkamadan kaçınılmalıdır. Örneğin: sinaptik veziküller, sükrozlu cacodylat tamponda 30 dakika bekletilirse düzleşmeye başlarlar (1,4,3,5). Yıkama nedeniyle oluşan artefaktlar glutraldehit-OsO₄ kombine olarak kullanıldığında önlenemez. Genellikle 4 °C'de, pH 7,4'de 2 saat içerisinde 3 kez yıkama çözümü değişimi uygulanır (1,3,5,6,8,13,15). Glutraldehit ile fikse edilen örnekler, fiksasyon sonrası gece boyunca yıkama solüsyonunda bırakılabilirken formaldehitle fikse edilen örnekler bırakılmaz çünkü formaldehit dokularda reversible reaksiyona girer. Yıkama fiksasyonla aynı ısıda yapılmalıdır. Yıkama solüsyonunun osmolaritesi fiksatifinkinden farklı olmalıdır. Çünkü fiksasyonda zarın osmotik yapısı genellikle değişir (3,5).

Sekonder Fiksasyon: Süre ve ısı primer fiksasyondan daha az önemlidir. En çok %1'lik OsO₄'le fikse edilirler ve primer fiksasyonda kullanılanla aynı tampon çözelti 4 °C'de veya oda ısısında bir saat süreyle uygulanır (1,3,5,13,16).

Organ ve Dokuların Fiksasyonu:

1) İmmersiyon fiksasyonu: Deri gibi kan akımının kesilmesine dayana bilecek dokular in vitro olarak immersiyon yöntemiyle fikse edilebilirler. Alınacak dokunun büyüklüğü fiksatife ve doku yoğunluğuna göre değişir. Primer fiksasyon için en fazla 0,5 mm'lik küplere kesilir. Aldehit fiksasyonunda ise örnekler biraz daha büyük olabilir.

2) İn vivo fiksasyonu: Denek anestezisi altındayken doku ortaya çıkartılır. Fiksatif dokunun içine ya da üstüne damlatılır. Damlatma tekniği, yeterince penetrasyon olmadığından yalnızca yüzeysel tabakalar incelendiğinde etkilidir. Fiksatif 10-20 dakika süreyle sürekli olarak damlatılır ve fazlası emdirilir. Burada temel olarak veronal asetat tamponlu OsO₄ % 1-2 konsantrasyonda kullanılır. Sonrasında primer fiksasyon immersiyon yöntemindeki gibi devam ettirilir. Oda ısısında ya da soğuk ortamda 1-4 saat sürdürülür. Bu tekniğin dezavantajı anestezik maddenin doku hasarı oluşturma olasılığıdır (3,5,6,16).

3) Perfüzyon fiksasyonu:

a) Anestezî tipi: Rat, fare, hamster gibi küçük deneklerde eter veya halotan kullanılır. Daha büyüklerde

ise nembotal, kloral hidrat, urethan intraperitoneal ya da intra venöz kullanılır.

b) Perfüzyon sıvısı vermek: Bu yöntem denek büyüklüğü, doku ve uygulayıcının yeteneğine bağlıdır. Ör: küçük hayvanlarda en uygun yöntem aortadan perfüzyon sıvısının verilmesidir (3,5).

Perfüzyon sıvısı ve fiksatifler: Perfüzyon sıvısının optimum sıcaklığı hakkında genel bir fikir birliği yoktur. Ayrıca fiksatif uygulamadan önce tuz ile yıkanıp yıkanmaması konusunda da bir fikir birliği yoktur (3). Başlangıç deneyleri için oda sıcaklığında fiksatif yararlıdır. Toksisite azlığı veya yokluğu, kolloid ozmotik basınçta önemlidir. Tuz kullanılacaksa fiksatif uygulama yolundaki hazne tamamen tuz ile doldurulmalıdır. Büyük deney hayvanlarında ayrı hazne olmalı ve bunlar 3 yollu vanayla bağlantılı olmalıdır. Bu haznelerinde fiksatif değerinde ise tuz olmalıdır (3,5,6). Fiksatifin ısısı arttıkça fiksasyon daha hızlı ve etkilidir. Enzim histokimyası için fiksatif oda ısısında olmalı, labil enzimler için 0°C'da bir ısı gereklidir. Vücut ısısının altındaki değerlerde perfüzyon sıvılarını vazokontrüksiyona yol açıp perfüzyon etkinliğini bozabilir (3,5,16).

Tablo 1: SEM' de yaygın olarak kullanılan fiksatifler*

| Örnekler | Fiksatifler | Tampon solüsyonu |
|--|--|---|
| Prokaryotlar | Gluteraldehit | cacodylate, phosphate |
| | OsO ₄ | veronal-acetate |
| | FAA (%10 formalin,% 85 ethanol, %5 glacial acetic acid) | Kullanılmaz |
| Mantarlar | OsO ₄ takiben Gluteraldehit / OsO ₄ | cacodylate,phosphate |
| | buhar OsO ₄ | kullanılmaz |
| | Sıvı Uranyl acetate takiben gluteraldehit | cacodylate |
| Suda yaşayan organizmalar (protozoa, mantarlar gibi) | gluteraldehit / formoldehit,OsO ₄ takiben gluteraldehit | cacodylate, phosphate, deniz ya da göl suyu |
| | OsO ₄ takiben gluteraldehit | phosphate |
| Bitkiler | FAA (%10 formalin,% 85 ethanol, %5 glacial acetic acid) | phosphate |
| | Dondurularak kurutmayı takiben formoldehit | kullanılmaz |
| | Buhar, Osmium | kullanılmaz |
| Hayvanlar | Gluteraldehit ya da OsO ₄ takiben gluteraldehit / formoldehit | cacodylate ya da phosphate |
| | OsO ₄ | cacodylate ya da phosphate |
| | gluteraldehit / formoldehit | çeşitlidir |
| | FAA (%10 formalin,% 85 ethanol, %5 glacial acetic acid) | kullanılmaz |

* Bozzola JJ, Russell LD' den alınmıştır.

Dehidrasyon

Dehidrasyonun asıl etkisi örneklerden lipitlerin çıkarılmasıdır. Bu oran %95'i bulur. Proteinlerin ise % 4'ü çıkarılır. Bu oranlar fazla olursa dokuların hücre ve hücre içi yapıları büzüşür (3,5).

Dehidrasyonda kullanılan ajanlar: Aseton, etanol, etilen glikol, polietilen glikol ve propilen oksid'tir.

Bunlar içerisinde en fazla tercih edilen etanol ve aseton'dur. Aseton, beyin dokusunun dehidrasyonunda hücreyi daha iyi koruduğu için etanole göre daha çok tercih edilir. Gömme materyallerinden polyester resin etanolde çözünmediği için aseton içinde dehidrate edilir. Epoksi resinler, etanol ve asetona göre propilen oksidde daha kolay çözünmediğinden dehidrasyonunda en çok

propilen oksid kullanılır (3,5,6,8,16). Dehidrasyon öncesi örnekler OsO₄ ile fikse edilirse, kullanılması gereken ajan yerine yanlış ajan kullanılması, dehidrasyon işlemi düşük ısıda ve yüksek hızda yapılırsa dokulardan lipidlerin uzaklaştırılması azalır (2,3,5,16).

Standart Dehidrasyon İşlemi: Dehidrasyonda kullanılacak çözeltinin miktarı numune hacminin 10 katı olacak şekilde kullanılır. Dehidrasyon oda ısısında yapılmalıdır. Şayet dehidrasyon soğukta başlamışsa ısı oda ısısına yükseltilir (1,3,5,16).

SEM'de Dehidrasyon çizelgesi: - % 25'lik, -% 50'lik, -% 75'lik, 2x % 96'lik, 2x-% 100'lük aseton veya etanol içinde 15-20 dk. (1,3,5,6,8,10,16).

SEM'de Kurutma

1) Havada kurutma (Air drying): Havada kurutulmaya bırakılan canlı örneklerin (yumuşak dokularda) yüzeyinde ıslaklıktan kaynaklanan bir su tabakası mevcuttur. Bu su tabakası ile hava arasında yüksek gerilim kuvvetlerine sahip bir ara yüz oluşur. Havada kurutma nedeni ile su tabakasında buharlaşma yolu ile uzaklaştırılan moleküller su- hava ara yüzündeki yüksek yüzey gerilim kuvvetlerine karşı koyamaz. Bu durum incelenen canlı örneklerin yüzeyindeki hassas yapıların zarar görmesiyle sonuçlanan büzüşmelere neden olur. Bu nedenle havada kurutma sert dokuların kurutulmasında (ör: kemik,diş) tercih edilir (3,16).

2) Kritik noktada kurutma (Critical point drying): Dokudaki aseton,etanol veya amil asetat ile sıvı CO₂'in yer değiştirmesi esasına dayanır. Sıvı CO₂ kritik noktada, belirli basınç ve sıcaklıkta gaz haline geçerken örnek deforme olmadan kurumuş olur (3,8,10,16).

Kritik Noktada Kurutma Basamakları

Örnekler saf aseton içeren bir havuzun içerisine bir sepet yardımıyla yerleştirilerek cihazın vanaları kapatılır ve içerisine sıvı CO₂'in dolması sağlanır.10 dk.sonra hava vanası açılır. Tekrar sıvı CO₂ almaya başlanır (bu işlem 3 defa tekrarlanır). 3-10 dk. sonunda sıcak su vanası açılır. Sıcaklık 35 °C olduğunda su vanası kapatılarak, tüm vanalar açılır ve basınç düşürülerek örnek alınır (3,16) .

SEM'de Kaplama

Yüzeyin görüntülenmesi için elektronları yansıtacak bir madde ile kaplanması gereklidir. Bu madde gold paladium'dur. Kaplamanın kalınlığı örneğe göre ayarlanır ki genellikle 100 Angström'dür. Kaplamada kullanılan materyalin yüzeyinde küme şeklinde toplanmamasına dikkat edilmelidir (3,8,10,16).

Altın Kaplama Basamakları

Örnekler metal stab üzerine iki taraflı yapışkan bant ile yapıştırılır. Gerekirse örnek çevresine gümüş boyası sürülerek kaplama cihazına yerleştirilir. Yüzeyin parlamasını önlemek için argon gazıyla havanın yer değiştirmesi sağlanır. Plazma fazına geçen gold paladium sayesinde kaplama gerçekleşir. Kaplanan örnekler desikatörde saklanmalıdır (3,10,16).

KAYNAKLAR

1. Benjamin FT, Raymond T J (1978): Diagnostic Electron Microscopy, Volum 1. John Wiley and Sons, Inc. New York.

2. Bharatan S, Desroches KS (1997): Transmission Electron Microscopy Charaterization of Lattice Damage, Erişim:http://www.info.newcastle.edu.au Erişim Tarihi:12.05.2002.

3.. Bozzola JJ, Russell LD (1998): Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologist, 2th Edition. Jones and Bartlett Publishing, Inc. London..

4.Ghadially FN (1982): Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix, 2th. Edition. London..

5. Glauert AM (1975): Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens, American Elsevier Publishing Co., Inc. New York.

6. Glauert AM (1998): Lewis PR Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. Erişim:editorial @ portlandpress.com Erişim Tarihi: 03.05.2002

7. Glauert AM (1956): Rogers G E: A new embedding medium for electron microscopy. Nature, October: 803

8. Hayat M A (1978): Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy, Volum 6. Litton Educational Publishing, Inc. New York.

9. Iowa State Universtiy (1999): What is the EM?.Erişim:http://www.mse.iastate.edu/microscopy/uses.html, Erişim Tarihi:12.04.2002

10. Joel LTD (1999): Questions and Answers on Snanning Electron Microscope. Erişim: http://www.jeol.com./external.html, Erişim Tarihi:26.03.2002.

11. Lewis PR, Knight DP (1992): Cytochemical staining methods for electron microscopy.

12. Marton L (1968): Early history of the electron microscope. San Francisco Press, Inc. pp: 1:1-8. San Francisco.

13. Palada GE (1952): A study of fixation for electron microscopy. J. Exptl. Med.95:285-298.

14. Peven DR, Gruhn JD (1985) : The Development of Electron Microscopy. Arch. Pathol Lab. Med, July: 683-691.

15. Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ (1963): Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structure and enzymic activity by aldehyde fixation. J Microsc. 92:69. "Alınmıştır." Glauert AM (1975): Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. American Elsevier Publishing Co., Inc.. New York.

16. Wagner, R.J (2000): Techniques in Biological Electron Microscope, Erisim: 28499 @ udel. Edu., Erişim Tarihi:22.04.2002

17. Wall JS: Scanning Transmission Electron Microscop, Erişim:Wall @ bnl.gov., Erişim Tarihi:26.03.2002.