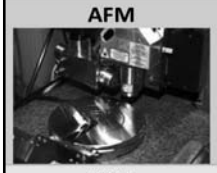
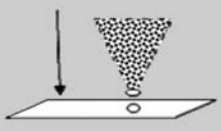
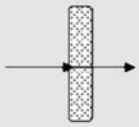
بررسی تطبیقی میکروسکوپ های الکترونی در آماده سازی نمونه

میکروسکوپ های الکترونی ابزاری نیرومند و دارای قابلیت های فراوانی برای تصویر برداری، آشکار سازی و ارائه اطلاعات مفید درباره‌ی پدیده‌های کوچک و بسیار کوچک هستند. این ابزارها با خانواده‌های متفاوت و عناوینی خاص مرتبط با اساس عملکردشان مطرح می شوند که از یک سو از لحاظ ساختار و اجزای داخلی قابل بررسی و ارزیابی اند و از سوی دیگر، از لحاظ روش های آنالیز و دریافت داده ها از نمونه قابل مقایسه و مطالعه هستند.

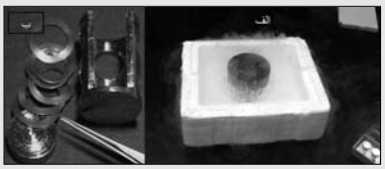
اگرچه میکروسکوپ‌های الکترونی شباهت‌های اساسی با یکدیگر دارند ولی تفاوت‌های قابل ملاحظه آنها باعث وجود گونه‌ها و خانواده‌های مختلف (میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی، تراگسیل، کاوشی) شده است.

آماده سازی و نوع نمونه ها بر اساس ساختار و عملکرد پردازش اطلاعات از نمونه متفاوت است به طوری که در بعضی از میکروسکوپ های الکترونی آماده سازی به دشواری و با شرایط خاص همراه است و در بعضی دیگر، روش های آماده سازی نمونه های بیولوژی و غیر بیولوژی متفاوت است. داده های حاصل از پردازش اطلاعات از نمونه ها، از یک منظر در ساخت و تولید ریز تراش ها، سیستم های متنوع الکترونی و الکترومکانیکی اهمیت خاص دارد و از منظر دیگر در به کارگیری نمونه های بیولوژی (سلول ها، پروتین ها و...) برای طراحی و ساخت ریزتراشه های زیستی و سیستم های زیستی نانومتری نقش بسزایی را ایفا می کند. میکروسکوپ های الکترونی ابزاری نیرومند و دارای قابلیت های فراوانی برای تصویر برداری، آشکار سازی و ارائه اطلاعات مفید درباره پدیده های کوچک و بسیار کوچک هستند. این ابزارها با خانواده های متفاوت و عناوینی خاص مرتبط با اساس عملکردشان مطرح می شوند که از یک سو از لحاظ ساختار و اجزای داخلی قابل بررسی و ارزیابی اند و از سوی دیگر، از لحاظ روش های آنالیز و دریافت داده ها از نمونه قابل مقایسه و مطالعه هستند.

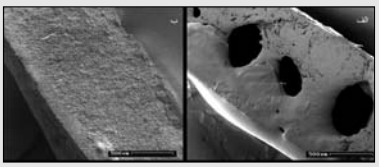
در میکروسکوپ های الکترونی نمونه های بیولوژی و غیر بیولوژی در دو دسته مشخص و تفکیک شده مورد مطالعه قرار می گیرند. روش های آماده سازی نمونه، برای هر دسته متفاوت و بر اساس روش کار و پردازش داده ها توسط میکروسکوپ های الکترونی است. آماده سازی نمونه در بعضی سیستم ها با اندود سازی نمونه با سایر عناصر شکل می گیرد و در بعضی دیگر با آبگیری و تثبیت همراه است. در هر صورت دستیابی به داده ها از نمونه های بیولوژی و غیر بیولوژی باید متناسب با روش های استاندارد و قابل استناد باشد تا

میکروسکوپ الکترونی	اقدام و کنش پرتو	طرح ساده کار
SEM	بازتاب پرتو دارد عبور پرتو ندارد	
AFM 	بازتاب پرتو ندارد عبور پرتو ندارد	
TEM	بازتاب کمی پرتو دارد عبور پرتو دارد	

شکل۱): ترسیمی ساده از کنش پرتو یس الکترون پر انرژی در سه میکروسکوپ متداول



شکل۲:الف) محفظه قراردادن نمونه در میکروسکوپ الکترونی روبشی.
ب) روش انجماد بااستفاده از نیتروژن مایع در حدود ۱۹۰ درجه سانتگراد زیر صفر [٤]



شکل۳:تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی
الف) دانه برنج پیش از پخت
ب) دانه برنج بعد از پخت است (٤]

از یک سو اطلاعات کامل و با حداقل خطا باشند و از سوی دیگر نمونه های با ارزش و زمان آماده سازی به هدر نرفته و کار با موفقیت به انجام رسد. اگرچه، میکروسکوپ‌های الکترونی شباهت های اساسی با یکدیگر دارند ولی تفاوت های قابل ملاحظه آن ها باعث وجود گونه ها و خانواده های مختلف (میکروسکوپ های الکترونی روبشی، تراگسیل، کاوشی) شده است. این تفاوت بر اساس نوع و روش دستیابی به اطلاعات همانند روش روبش، تراگسیل، کاوش است. علت وجود روش های متفاوت، بررسی و مطالعه بهتر و آسان تر و نیز هدفمند نمونه ها است.

فناوری در میکروسکوپ های الکترونی

پیش از ورود به مبحث آماده سازی نمونه، نگاهی کلی و گذرا بر اصول و روش کار میکروسکوپ های الکترونی اگرچه به مختصر امری ضروری است. میکروسکوپ های الکترونی براساس ساختار و روش کار میکروسکوپ های نوری ساخته شده اند و از این رو دارای شباهت ها و تفاوت هایی با یکدیگرند. اولین مولفه قابل ارزیابی بین این دو گروه، نوع منبع است که در میکروسکوپ های الکترونی، الکترون پر انرژی و متمرکز برای دستیابی به تصویر و اطلاعات نمونه به جای نور مورد استفاده قرار می گیرد. مولفه دیگر ، عدسی ها هستند که میکروسکوپ های الکترونی، عدسی های الکترومغناطیسی با قابلیت تنظیم فاصله کانونی دارند. با تغییر میزان جریان الکتریکی، میزان بزرگنمایی قابل کنترل است. این درحالی است که عدسی های شیشه‌ای در میکروسکوپ های نور با فاصله کانونی ثابت فاقد این توانایی است و در نتیجه اطلاعات با قابلیت دسترسی محدودتری را در اختیار محققان قرار می دهند.

چگونگی دسترسی و دریافت داده ها، آشکارسازی و نمایش نتایج حاصله از نمونه، توسط میکروسکوپ های الکترونی دارای مراحل اساسی مشترک زیر هستند:

۱.جریانی از الکترون ها توسط منبع الکترونی ایجاد و با استفاده از یک پتانسیل الکتریکی مثبت به طرف نمونه شتاب داده می شود.

۲.جریان الکترونی با کمک عدسی های مغناطیسی و دهانه ها به یک پرتوی تک فام ظریف و متمرکز تبدیل می شوند.

۳.پرتوی الکترونی حاصل با استفاده از یک عدسی مغناطیسی در روی نمونه کانونی می شود.

۴.برخورد پرتو الکترونی به نمونه سبب بر هم کنش های مختلفی در داخل نمونه ها می شود که خود پرتو الکترونی نیز تحت تاثیر قرار می گیرد.

۵.سیگنال های حاصل از این بر هم کنش ها و آثار آن، جمع آوری شده تا امکان دستیابی به اطلاعات با ارزش را میسر سازد [۱].

در این مراحل کلی، نمایی مناسب از روش کار میکروسکوپ های الکترونی حاصل شد. در هر صورت، قابلیت های ممتاز و توانایی های زیاد میکروسکوپ های الکترونی موجب عدم محدودیت در استفاده و به کارگیری آن ها نمی شود. به طور کلی؛ مهم ترین عوامل محدود ساز: گران و پرهزینه بودن ، ظرافت و پیچیدگی کاربری، حساسیت بعضی از مواد نسبت الکترون های پر انرژی و دشواری آماده سازی نمونه در بعضی از گروه ها هستند.

گونه های متداول و معروف میکروسکوپ الکترونی، که دارای زیر مجموعه های گسترده‌ای نیز هستند عبارتند از: میکروسکوپ الکترونی تراگسیل (TEM)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) که در شکل ۱ ترسیمی ساده از کنش

پرتو در هر یک از سه میکروسکوپ مذکور نمایش داده شده است.

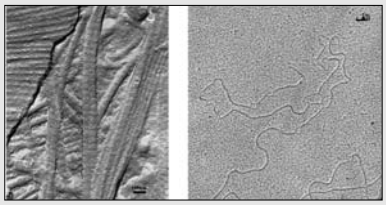
میکروسکوپ های الکترونی روبشی(SEM):

میکروسکوپ های الکترونی روبشی قادرند سیگنال های حاصل از برخورد الکترون ها به نمونه (الکترون های ثانویه) را به تصویری با کاربردهای متنوعی تبدیل کنند. این دستگاه ها معمولا جهت مطالعه ساختارهای سطحی و یا نزدیک به سطح نمونه، تهیه تصاویر توپوگرافیک، تعیین ترکیب و تصاویر ترکیبی و یا مطالعه کاتدولومینسانس استفاده می شود. تصاویر در این دستگاه از آن جهت که شبیه تصاویری است که انسان با چشم می بیند، خیلی راحت تر تفسیر می شوند [۲و۳].

معمولا برای تهیه تصاویر بهینه در آنالیز میکروسکوپ های الکترونی روبشی سطوح کاملا پرداخت شده (پولیش) نیاز است. مسلما کاهش میزان آمادگی سطوح موجب کاهش کنتراست و البته کاهش میزان کیفیت تصویر خواهد شد. از طرف دیگر نمونه های غیر مسطح دشواری های زیادی را در آنالیز در پی خواهند داشت. با این وجود، فضای بزرگی که در میکروسکوپ های الکترونی روبشی برای قرار دادن نمونه ها وجود دارد کار با کنترل های مکانیکی را آسان می سازد. روش های تهیه نمونه های بیولوژیک برای مطالعات این سیستم بستگی زیادی به نوع نمونه دارد. بسیاری از نمونه های بیولوژیک (خارج از بدن موجود زنده)، به مرور زمان آب خود را از دست داده، چروکیده و دیگر به یک بافت و ارگانیسم زنده شباهت

جدول۱) روش های مناسب تثبیت در آماده سازی نمونه بیولوژیک [۱]

منبع	سیستم بافر(Buffer)	تثبیت کننده	نمونه
Watson و همکاران (۲۰۰۳)	کاکودیلیت، فسفات استات ورونال	گلوترالدئید، تترااکسید اسمیوم	پروکاریوتها
Watson و همکاران (۱۹۸۴)	کاکودیلیت، فسفات هیچ کاکودیلیت	گلوترالدئید/ OsO_4 بخارات OsO_4 گلوترالدئید و در ادامه استات اورانیل مایع	قارچها
Maugel و همکاران (۱۹۸۰)	کاکودیلیت، کولیدین هیچ فسفات، کاکودیلیت	گلوترالدئید/ فرمالدئید باردوز گلوترالدئید و در ادامه OsO_4	موجودات زنده آبی (پروتوزنرها، اسفنجها، متازوآها)
Falk (۱۹۸۰)	بافر فسفات هیچ هیچ هیچ	گلوترالدئید و در ادامه OsO_4 FAA به تنهایی و یا در ادامه با OsO_4 فرمالدئید و در ادامه انجماد خشک بخارات اسمیوم	گیاهان عالی
Nowell و Pawley (۱۹۸۰)	کاکودیلیت یا فسفات کاکودیلیت با انواع فسفات کاکودیلیت یا فسفات هیچ	گلوترالدئید و در ادامه OsO_4 گلوترالدئید/ فرمالدئید گلوترالدئید با گلوترالدئید/ فرمالدئید و در ادامه OsO_4 FAA	جانوری



شکل ٤: تصاویر میکروسکوپ الکترونی تراگسیل
الف) تصویر رشته DNA که با روش contrast Decoration-Shadowing انجام شده است (آزمایشگاه مولکولی فرانسه).
ب) تصویر رشته کلاژن (۱ ساعت در یخ) با روش Freeze-Fracture آماده شده است (دانشگاه لیون فرانسه) [۵].

نخواهند داشت. این مسئله باعث می شود که سبک های ویژه ای برای آماده سازی نمونه ها اعمال شود که به قرار زیرند:

۱.نمونه تا حد ۵ میلیمتر برش داده شود زیرا محلول های تثبیت کننده و خشک کننده به سرعت قادر به نفوذ در نمونه های ضخیم تر نیستند.

۲.نمونه تثبیت شود، یعنی عوامل شیمیایی خاص برای پایداری ساختار نمونه در آب استفاده شود (روش های دیگر در جدول ۱ آمده است).

۳.آب نمونه گرفته شود.

۴.مواد خشک کننده از نمونه جدا شود.

۵.نمونه با لایه ای در حدود ۲۰۰ Å با فلزات طلا یا پالادیوم اندود شود.

۶.نمونه به یک قاب استوار و برای مشاهده آماده شود.

اساسا، تثبیت و آبگیری باعث پایداری نمونه های نرم و مرطوب می شود. در صورت عدم تثبیت و آبگیری نمونه های بیولوژیک در خلا دستگاه تغییر شکل خواهند داد. بعد از استواری بر قالب آلومینیومی (نمونه های بزرگ) یا نواری با لایه

پوشانی مضاعف (نمونه های کوچک)، نیاز به لایه پوشانی نمونه با یک لایه نازک فلزی برای رسانایی سطح نمونه است (شکل ۲). لایه فلزی نباید در عبور، برگشت و برهم کنش الکترون ها با نمونه اثر بگذارد. بدیهی است که برای هر نمونه ممکن است یک مرحله یا چند مرحله حذف شود، به طور مثال برای نمونه های خشک همچون تخم گیاهان نیازی به تثبیت و خشک کردن نیست (شکل ۳). انجماد سریع بافت های تازه با کمک ابزارهای خاص راهی برای محافظت از ساختار و شیمی بعضی نمونه ها است که سطح یخ زده نمونه با اعمال حرارت ملایم قابل حذف است [۱و۳].

میکروسکوپ های الکترونی تراگسیل(TEM)

میکروسکوپ های الکترونی تراگسیل با دریافت سیگنال های حاصل از برخورد پرتوی الکترونی به نمونه و عبور آن، داده ها قابل استنادی فراهم می سازند. عبور الکترون از نمونه باعث آشکارسازی اطلاعات داخلی و ساختاری نمونه می شود از این رو نیاز به نمونه های خیلی نازک ضروری است. این دستگاه ها ابزارهایی مناسب جهت شناسایی ساختار مواد بلورین و مطالعات ریزساختاری تفصیلی مواد هستند که قادر به ارائه بزرگنمایی زیاد و دارای قدرت تفکیک پذیری بالایی هستند. این امر باعث به کارگیری این دستگاه ها در تحقیقات پیشرفته کانی شناسی، بلورشناسی، علم مواد شده است.

جدول ۲) روش ها و تکنیک های آماده سازی و اندازه گیری در میکروسکوپ الکترونی تراگسیل [۵]

'Negative staining' Contrast	Full bath chemical thinning
'Positive staining' Contrast	Full bath electrolytic thinning
Chemical fixation	Holey support film
Chemical polishing	Immunolabelling
Continuous support film	Indirect replica
Crushing	Ion beam thinning
Cryo-ultramicrotomy	Mechanical polishing
Decoration-shadowing contrast	Physical fixation: cryo-fixation
Dimpling	Sandwich technique
Direct replica	Substitution-infiltration-embedding at low temperatures
Electropolishing	Substitution-infiltration-embedding at room temperature
Embedding	Tripod polishing
Extractive replicas	Twin jet chemical thinning
Fine particles dispersion	Twin jet electrolytic thinning
Focused ion beam thinning (FIB)	Ultramicrotomy
Freeze-Fracture	Ultrasonic grinding
Frozen hydrated film of single particles	Wedge cleavage
	Wheel or wire sawing

نمونه استاندارد در مطالعه و بررسی توسط میکروسکوپ های الکترونی تراگسیل باید داری شرایط زیر باشد[۱]:

۱.نمونه تحت آنالیز، بیانگر کل ماده مورد نظر باشد.

۲.پایداری نمونه باید در مدت آزمایش حفظ شود.

۳.نازک بودن نمونه باید بقدری باشد که الکترون از آن عبور کند.

۴.نمونه باید دارای یال های موازی باشد تا از تغییرات شدید در کنتراست ضخامت اجتناب شود.

۵.عدم ایجاد تغییرات در مدت آماده سازی نمونه

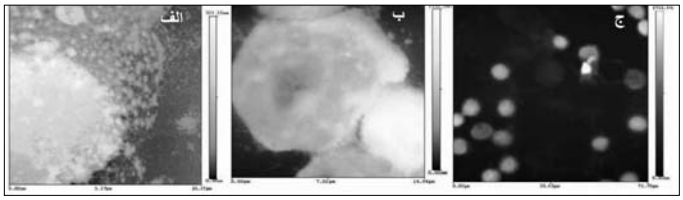
۶.اندود سازی نمونه نارسانا

فراهم آوردن تمامی شرایط، دشوار و به ندرت قابل انجام است با این وجود باید تا حد امکان دقت در امر آماده سازی نمونه لحاظ شود. روش های گوناگونی برای آماده سازی نمونه های بیولوژیک برای مطالعات میکروسکوپ های الکترونی تراگسیل وجود دارد (جدول ۲). یکی از قابلیت های روش ها و تکنیک های جدید، آماده سازی مجدد نمونه پس از پردازش توسط دستگاه است. در هر صورت، روش های معمول آماده سازی عبارتند از: تهیه لایه و فیلم های بسیار نازک، تهیه مقاطع نازک و رنگ آمیزی مثبت یا منفی است [۲].

یکی از متداول ترین و مهم ترین روش های آماده سازی نمونه، اولترامیکروتومی است که روشی استاندارد در تهیه نمونه های بسیار نازک در بیولوژی و همچنین بسیار مفید در آماده سازی نمونه ها برای میکروسکوپ های الکترونی تراگسیل است. در این روش برش های کمتر از ۱×۱ میلیمتری با چاقوی الماسه انجام می شود. سپس برش ها را در یک مایع جمع آوری کرده و پیش از به کارگیری در دستگاه بر یک شبکه قرار می دهند. معمولا نمونه های حاصله نیازی به آماده سازی

جدول ۳) مقایسه شرایط نمونه ها در آماده سازی برای میکروسکوپ های الکترونی

نام دستگاه / خصوصیات	میکروسکوپ الکترونی تراگسیل	میکروسکوپ الکترونی روبشی	میکروسکوپ نیروی اتمی
نوع پردازش	الکترون عبوری	الکترون ثانویه	کاوشگر تیز
نوع حالت نمونه	جامد	جامد	جامد-مایع و گاز
آماده سازی نمونه	با مهارت زیاد (دشوار)	ساده	ساده
ضخامت نمونه	خیلی نازک (چند ده نانو)	ضخیم	متغییر
سطح نمونه	صاف	صاف (پولیش)	متغییر
اثر پردازش بر نمونه	تخریبی	غیرتخریبی	غیر تخریبی
روش آماده سازی نمونه	اندودسازی (غیربیولوژی) رنگ آمیزی (بیولوژی)	اندوسازی با کربن(غیربیولوژی) فلزات سنگین(بیولوژی)	بدون نیاز



شکل۵) تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی: تصاویر از سلول های خون تثبت شده بر روی شیشه مخصوص، که اندازه ها در هر مرحله متفاوت است. (الف-۷۱×۷۱ میکرومتر، ب-۲۴×۲۴ میکرومتر، ج-۱۰×۱۰ میکرون) [۶]

دیگری ندارند هرچند که ضخامت آن ها بستگی به نوع اطلاعات مورد نظر دارد. این روش نیاز به مهارت فراوان دارد و باید توسط یک متخصص با تجربه انجام شود (شکل ۴).

میکروسکوپ های نیروی اتمی(AFM):

میکروسکوپ های الکترونی نیروی اتمی به دلیل قابلیت های منحصر به فرد آن توسط محققان، "چشم نانو تکنولوژی" نامیده شده است. [۱] میکروسکوث نیروی اتمی بر اساس نیروی وان دروالسی بین اتمی بنا شده است. این دستگاه به کمک یک پروب فوق العاده تیز، خصوصیات سطح نمونه را به وسیله نیروی برهم کنشی با اتم های سطح جسم، اندازه گیری می کند و با ثابت نگه داشتن مقدار نیرو در حالی که پروب سطح نمونه را می پیماید، امکان ایجاد نگاشت ها و تصاویر سه بعدی از سطح را فراهم می کند. داده ها و سیگنال های دریافتی در این دستگاه نمایانگر اطلاعاتی در مورد ساختار مولکولی و ساختار اتمی نمونه است.علاوه بر این، در میکروسکوپ های نیروی اتمی دو قابلیت مهم موجب افزایش و گسترش میزان به کارگیری آن در زمینه بیولوژی و مهندسی پزشکی شده است. یکی محیط داخلی دستگاه است که نیازی به خلاء نداشته و هوا، گاز و حتی مایع نیز می تواند در آن محیط قرار گیرد. مسلما، این امر استفاده از نمونه های بیولوژی (همانند سلول ها، پروتئین ها) به صورت زنده و فعال (حتی خارج از بدن موجود زنده) را امکان پذیر می کند (شکل ۵).

قابلیت مهم دیگر دستگاه، عدم نیاز به اندود سازی نمونه ها است که موجب حذف مراحل سخت و دشوار آماده سازی نمونه می شود.[۳] فرآیند تصویربرداری از سیال برای این دستگاه مزیتی محسوب می شود که همراه با امکانات دیگرش امکان مشاهده فرآیندهای زیستی در زمان واقعی را میسر می سازد.

نتیجه گیری

در میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه تخریب نمی شود اما در رسانا ها نیاز به اندود سازی با کربن برای عدم اتصال الکترون با زمین و در نمونه های بیولوژی با کنتراست پایین که شامل نیتروژن، اکسیژن، کربن و هیدروژن هستند نیاز به فلزات سنگین برای آماده سازی نمونه است. اما در طی عملیات میکروسکوپ های الکترونی تراگسیل نمونه دچار تخریب می شود و اگر رسانا نباشد باید به وسیله یک رسانا اندود شود. این شرایط بسیار دشوار نیاز به مقاطع نازک، نازک سازی و قاب گرفتن برای یک نمونه دارد. نمونه بیولوژی با روش تهیه لایه های بسیار نازک، تهیه مقاطع نازک و رنگ آمیزی مثبت و منفی لازم است. اما در نمونه میکروسکوپ های نیروی اتمی برای مشاهده نیازی به آماده سازی خاص (استفاده از اندود سازی با کربن و فلزات) ندارد و نمونه در طول عملیات دچار تغییر یا تخریب نمی شود، آماده سازی نمونه نسبت به سایر میکروسکوپ های الکترونی ارزان تر است. در این دستگاه نمونه ها بیولوژی بدون نیاز به شرایط خاص قابل مطالعه و بررسی هستند از این رو در آنالیزها و تحلیل طراحی و ساخت سیستم های مبتنی بر عناصر زیستی (مانند بیو تراشه ها) بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند. در جدول ۳ با ارائه خلاصه جمع بندی و نتیجه گیری مبحث را به پایان می رسانیم.

منابع

[1]M.Razmara¡ The Principles & Applications of Electron Microscopy & advanced Analysis. Mashhad¡ Arsalan¡ 1384.
[2]B.Bhushan¡ Springer Handbook of Nanotechnology¡ Springer 2004¡ The Ohio State University¡USA
[3]S.M.Zendehbad¡ Automation of Analyses of Electronic Microscopy Images of Their Biomedical Structure Surface¡ Armenia¡ Yerevan¡ State Engineering University of Armenia¡ 2009
[4]John P. Shields; SEM preparation; University of Georgia; 2007
[5]TEMsamprep - techniques d'aide a la preparation d'echantillon; Transmission Electron Microscopy (TEM) : sample preparation guide ;www.techniques.com
[6]N.Starostina¡ P.West; Sample Preparation for AFM Particle Characterization;Pacific Nanotechnology 3350 Scott Blvd. Santa Clara¡ CA 95054¡2006