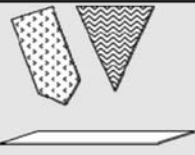
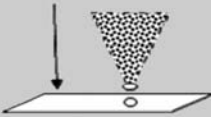
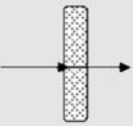


# بررسی تطبیقی میکروسکوپ‌های الکترونی در آماده‌سازی نمونه

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	

شکل ۱):  
ترسیمی ساده از  
کنش پرتویس  
الکترون پراکنشی در  
سه میکروسکوپ  
متداول

میکروسکوپ‌های الکترونی ابزاری  
نیرومند و دارای قابلیت‌های فراوانی  
برای تصویربرداری، 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 می‌شوند  
که از یک سواز لحاظ ساختار و اجزای  
داخلی قابل بررسی و ارزیابی اند و از  
سوی دیگر، از لحاظ روش‌های آنالیز  
و دریافت داده‌ها 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.

آماده‌سازی و نوع نمونه‌ها بر اساس  
ساختار و عملکرد پردازش اطلاعات  
از نمونه متفاوت است به طوری که در  
بعضی از میکروسکوپ‌های  
الکترونی آماده‌سازی به دشواری و با  
شرایط خاص همراه است و در بعضی  
دیگر، روش‌های آماده‌سازی  
نمونه‌های بیولوژی و غیر بیولوژی  
متفاوت است. داده‌های حاصل از  
پردازش اطلاعات از نمونه‌ها، از یک

منظر در ساخت و تولید ریز تراش‌ها، سیستم‌های متنوع الکترونی و  
الکترومکانیکی اهمیت خاص دارد و از منظر دیگر در به کارگیری  
نمونه‌های بیولوژی (سلول‌ها، پروتین‌ها و...) برای طراحی و ساخت  
ریز تراشه‌های زیستی و سیستم‌های زیستی نانومتری نقش بسزایی را  
ایفا می‌کند. میکروسکوپ‌های الکترونی ابزاری نیرومند و دارای  
قابلیت‌های فراوانی برای تصویر برداری، آشکار سازی و ارائه  
اطلاعات مفید درباره پدیده‌های کوچک و بسیار کوچک هستند. این  
ابزارها با خانواده‌های متفاوت و عناوینی خاص مرتبط با اساس  
عملکردشان مطرح می‌شوند که از یک سواز لحاظ ساختار و اجزای  
داخلی قابل بررسی و ارزیابی اند و از سوی دیگر، از لحاظ روش‌های  
آنالیز و دریافت داده‌ها از نمونه قابل مقایسه و مطالعه هستند.

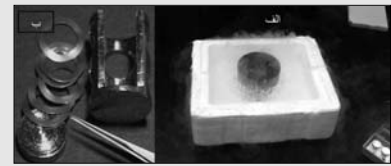
در میکروسکوپ‌های الکترونی نمونه‌های بیولوژی و غیر  
بیولوژی در دو دسته مشخص و تفکیک شده مورد مطالعه قرار  
می‌گیرند. روش‌های آماده‌سازی نمونه، برای هر دسته متفاوت و بر  
اساس روش کار و پردازش داده‌ها توسط میکروسکوپ‌های  
الکترونی است. آماده‌سازی نمونه در بعضی سیستم‌ها با آندود سازی  
نمونه با سایر عناصر شکل می‌گیرد و در بعضی دیگر با آبگیری و تثبیت  
همراه است. در هر صورت دستیابی به داده‌ها از نمونه‌های بیولوژی و  
غیر بیولوژی باید متناسب با روش‌های استاندارد و قابل استناد باشد تا

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 پراثرژی 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 در حالی است که عدسی های شیشه ای 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.

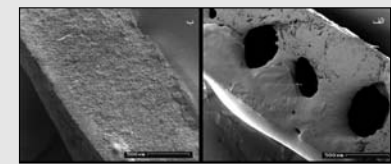
چگونگی دسترسی و دریافت داده ها، آشکار سازی و نمایش نتایج حاصله از نمونه، توسط میکروسکوپ های الکترونی دارای مراحل اساسی مشترک زیر هستند:

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 برهم 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 برهم 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 پراثرژی و دشواری آماده سازی نمونه در بعضی از گروه ها هستند.

گونه های متداول و معروف میکروسکوپ الکترونی، که دارای زیر مجموعه های گسترده ای 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



شکل ۲: الف) محفظه قرار دادن نمونه در میکروسکوپ الکترونی روبشی. ب) روش انجماد با استفاده از نیتروژن مایع در حدود ۱۹۰ درجه سانتیگراد زیر صفر [۴]

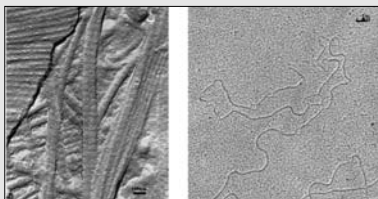


شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی الف) دانه برج پیش از پخت ب) دانه برج بعد از پخت است [۴]

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، میکروسکوپ های 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 بر اساس ساختار و روش کار میکروسکوپ های نوری ساخته



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ الکترونی تراکسیل الف) تصویر رشته DNA که با روش contrast Decoration-Shadowing انجام شده است (آزمایشگاه مولکولی فرانسه)، ب) تصویر رشته کلانژن (اساعت در یخ) با روش Freeze-Fracture آماده شده است (دانشگاه لیون فرانسه) [۵].

پروتو 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 معمولاً جهت مطالعه ساختارهای سطحی و یا نزدیک به سطح نمونه، تهیه تصاویر توپوگرافیک، تعیین ترکیب و تصاویر ترکیبی و یا مطالعه کاتدولو مینسانس 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 [۲ و ۳].

معمولاً برای تهیه تصاویر بهینه در آنالیز میکروسکوپ های الکترونی روبشی سطوح کاملاً پرداخت شده (پولیش) نیاز است. مسلماً 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

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 آمده است).

۳. آب نمونه گرفته شود.

۴. مواد خشک کننده از نمونه جدا شود.

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

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

اساساً، 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

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

منبع	سیستم بافر (Buffer)	تثبیت کننده	نمونه
Watson و همکاران (۲۰۰۳)	کاکودیلیت، فسفات استات و رورنال	گلوترالدید، تتراکسید آسیوم	پروکاریوتها
Watson و همکاران (۱۹۸۴)	کاکودیلیت، فسفات هیچ کاکودیلیت	گلوترالدید / $OsO_4$ بخارات $OsO_4$ گلوترالدید و در ادامه استات اوراتیل مایع	قارچها
Maugel و همکاران (۱۹۸۰)	کاکودیلیت، کولیدین هیچ فسفات، کاکودیلیت	گلوترالدید / فرمالدئید یازدوز گلوترالدید و در ادامه $OsO_4$	موجودات زنده آبی (پروتوزوئرها، اسفنجها، منازوآها)
Falk (۱۹۸۰)	بافر فسفات هیچ هیچ هیچ	گلوترالدید و در ادامه $OsO_4$ FAA به تنهایی و یا در ادامه با $OsO_4$ فرمالدئید و در ادامه انجماد خشک بخارات آسیوم	گیاهان عالی
Nowell و Pawley (۱۹۸۰)	کاکودیلیت یا فسفات کاکودیلیت یا اسوات فسفات کاکودیلیت یا فسفات هیچ	گلوترالدید و در ادامه $OsO_4$ گلوترالدید / فرمالدئید گلوترالدید یا گلوترالدید / فرمالدئید و در ادامه $OsO_4$ FAA	جانوری

'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

جدول (۲)  
روشن‌ها و تکنیک‌های  
آماده‌سازی و  
اندازه‌گیری در  
میکروسکوپ الکترونی  
تراکسیل [۵]

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

### میکروسکوپ‌های الکترونی

#### تراکسیل (TEM)

میکروسکوپ‌های الکترونی تراکسیل با دریافت سیگنال‌های حاصل از برخورد پرتوی الکترونی به نمونه و عبور آن، داده‌ها قابل استنادی فراهم می‌سازند. عبور الکترون از نمونه باعث آشکارسازی اطلاعات داخلی و ساختاری نمونه می‌شود از این رو نیاز به نمونه‌های خیلی نازک ضروری است. این دستگاه‌ها 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 دستگاه‌ها در تحقیقات پیشرفته کانی‌شناسی، بلورشناسی، علم مواد شده است.

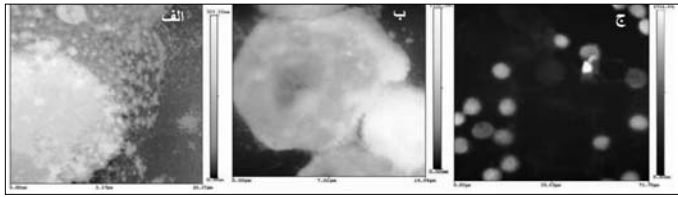
جدول (۳)  
مقایسه شرایط  
نمونه‌ها در  
آماده‌سازی برای  
میکروسکوپ‌های  
الکترونی

نمونه استاندارد در مطالعه و بررسی توسط میکروسکوپ‌های الکترونی تراکسیل باید دارای 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 یال‌های موازی باشد تا از تغییرات شدید در کنتراست ضخامت اجتناب شود.  
۵. عدم ایجاد تغییرات در مدت آماده‌سازی نمونه  
۶. اندود سازی نمونه نارسا

فراهم آوردن تمامی شرایط، دشوار و به ندرت قابل انجام است با این وجود باید تا حد امکان دقت در امر آماده‌سازی نمونه لحاظ شود. روش‌های گوناگونی برای آماده‌سازی نمونه‌های بیولوژیک برای مطالعات میکروسکوپ‌های الکترونی تراکسیل وجود دارد (جدول ۲). یکی از قابلیت‌های روش‌ها و تکنیک‌های جدید، آماده‌سازی مجدد نمونه پس از پردازش توسط دستگاه است. در هر صورت، روش‌های معمول آماده‌سازی عبارتند از: تهیه لایه و فیلم‌های بسیار نازک، تهیه مقاطع نازک و رنگ آمیزی مثبت یا منفی است [۲]. یکی از متداول‌ترین و مهم‌ترین روش‌های آماده‌سازی نمونه، اولترامیکروتومی است که روشی استاندارد در تهیه نمونه‌های بسیار نازک در بیولوژی و همچنین بسیار مفید در آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ‌های الکترونی تراکسیل است. در این روش برش‌های کمتر از ۱×۱ میلیمتری با چاقوی الماسه انجام می‌شود. سپس برش‌ها را در یک مایع جمع‌آوری کرده و پیش از به کارگیری در دستگاه بریک شبکه قرار می‌دهند. معمولاً نمونه‌های حاصله نیازی به آماده‌سازی

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





شکل (۵)  
تصاویر میکروسکوپ  
نیروی اتمی: تصاویر از  
سلول های خون تثبیت  
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 هر چند 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] میکروسکوپ 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. مسلماً، 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 روشی نمونه تخریب نمی شود اما در رساناها 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. Zendeabad; 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