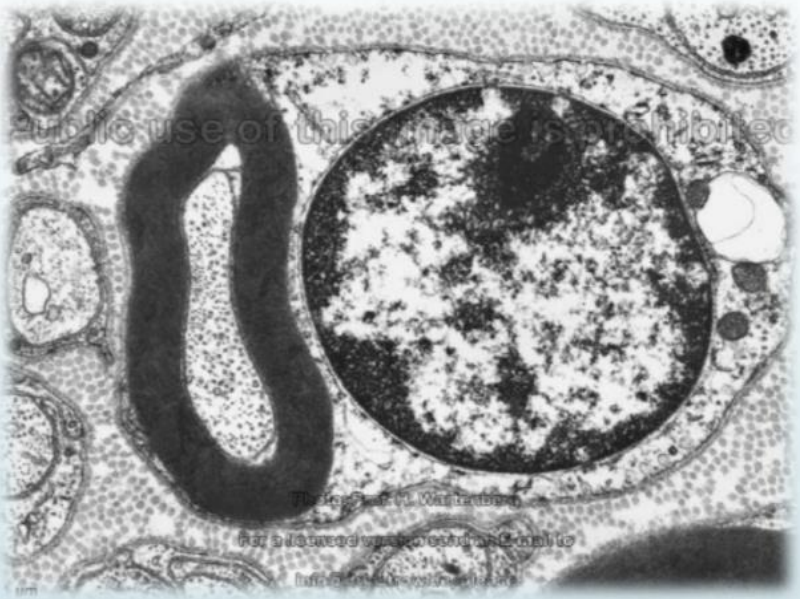
University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

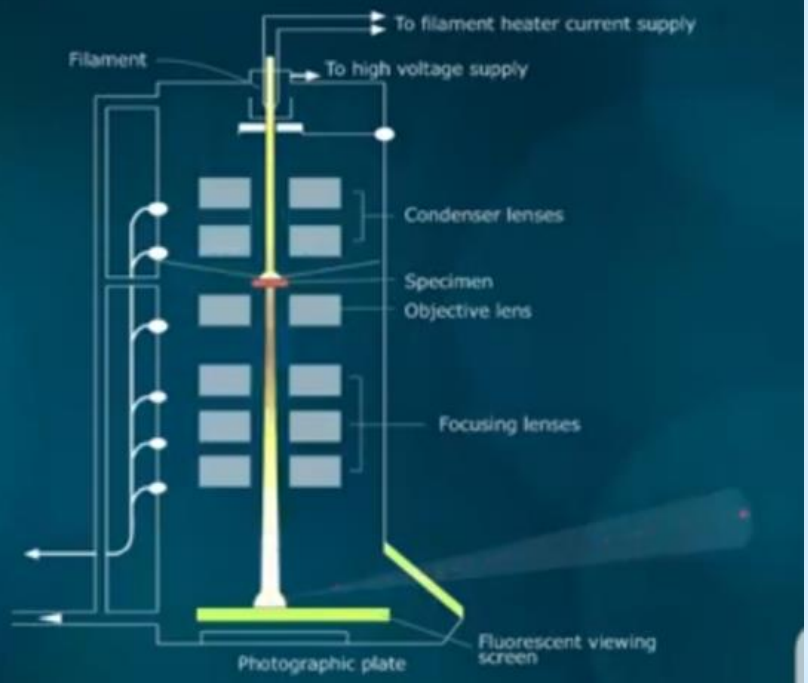
عنوان

میکروسکوپ الکترونی گذاره یاترانسمیشن(TEM)
ساختار وعملکرد و آماده سازی نمونه جهت مشاهده

Tem Microscopy



The Transmission Electron Microscope



میکروسکوپ الکترونی

یکی از نیازهای اساسی در مطالعات سیتولوژیکی موجودات مختلف وجود میکروسکوپی با بزرگنمایی و توان تفکیک بالا می‌باشد که این مسئله منجر به ابداع میکروسکوپ الکترونی شد. در این نوع میکروسکوپ‌ها از الکترون جهت ایجاد تصویر استفاده می‌شود. علی‌رغم اینکه اساس کلی یکسانی با میکروسکوپ‌های دیگر دارند، دارای ساختار به مراتب پیچیده تر از آن‌ها می‌باشند.

این نوع میکروسکوپ‌ها انواع مختلفی دارند، اما دو نوع مهم و اساسی آن عبارت اند از:

۱.میکروسکوپ الکترونی گذاره یا ترانس‌میشن

(Transmission Electron Microscope or TEM)

از فراساختار (Ultrastructure)نمونه اطلاعات دقیقی بدست آورد.

۲. میکروسکوپ الکترونی نگاره

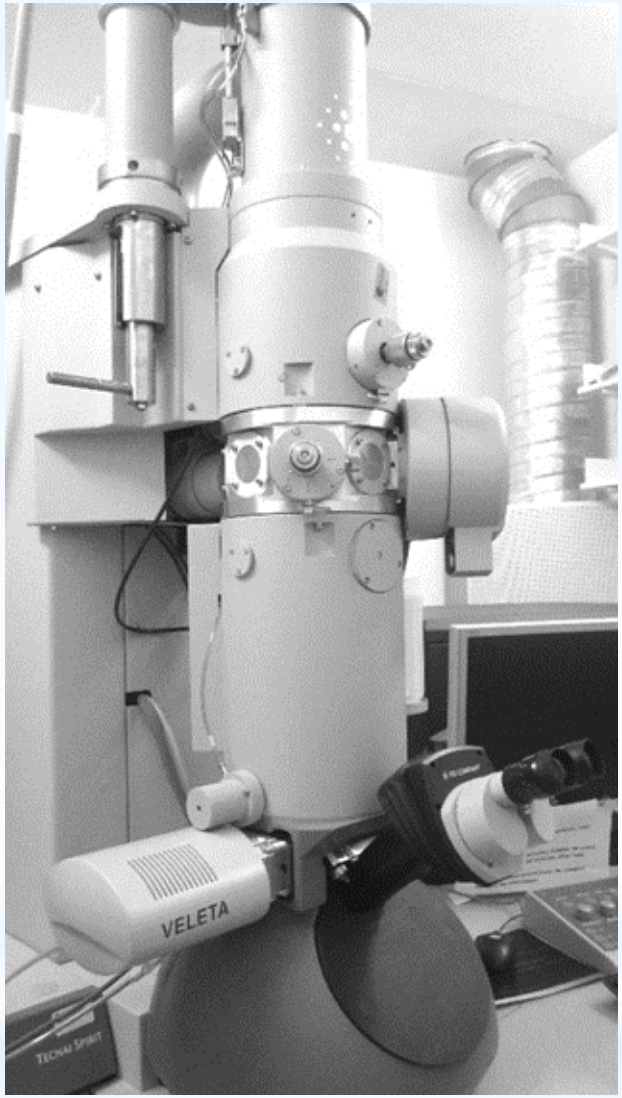
(Scanning Electron Microscope or SEM)

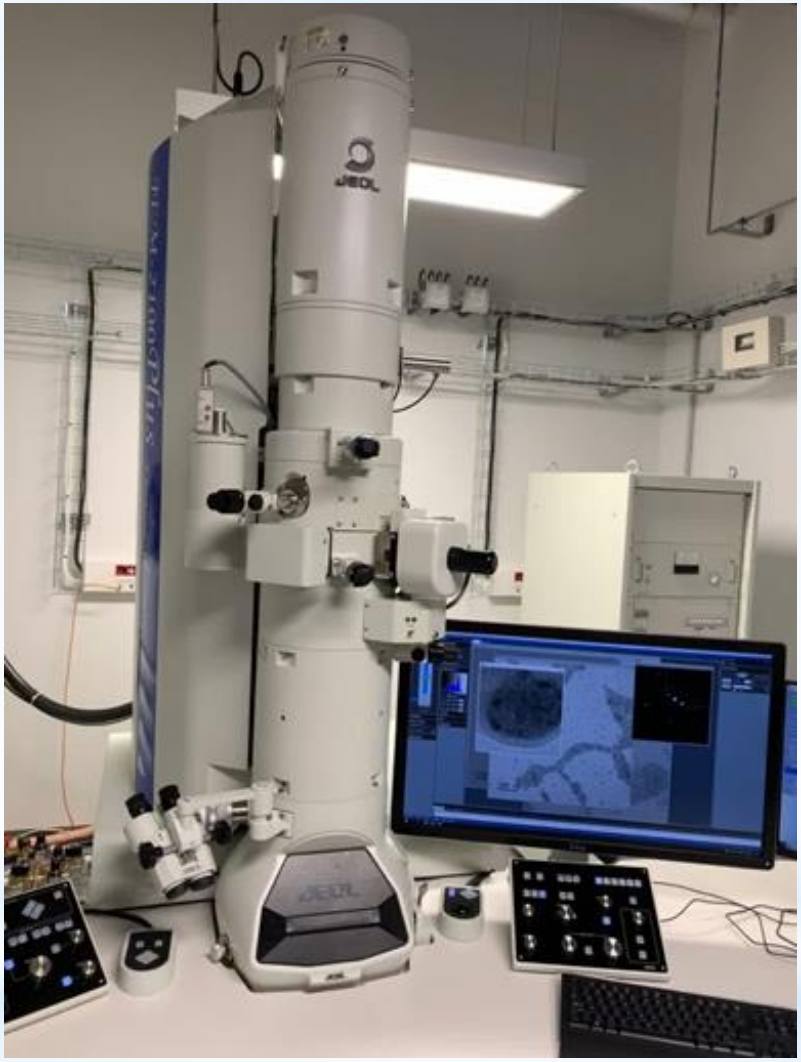
از سطح نمونه اطلاعات دقیقی بدست‌آورد.

هر کدام از انواع فوق مدل‌های مختلفی دارند که کارایی خاص خود را دارا می‌باشند.در میکروسکوپ الکترونی علی‌رغم بزرگنمایی و توان تفکیک بالا، نمونه را نمی‌توان به صورت زنده مشاهده نمود.

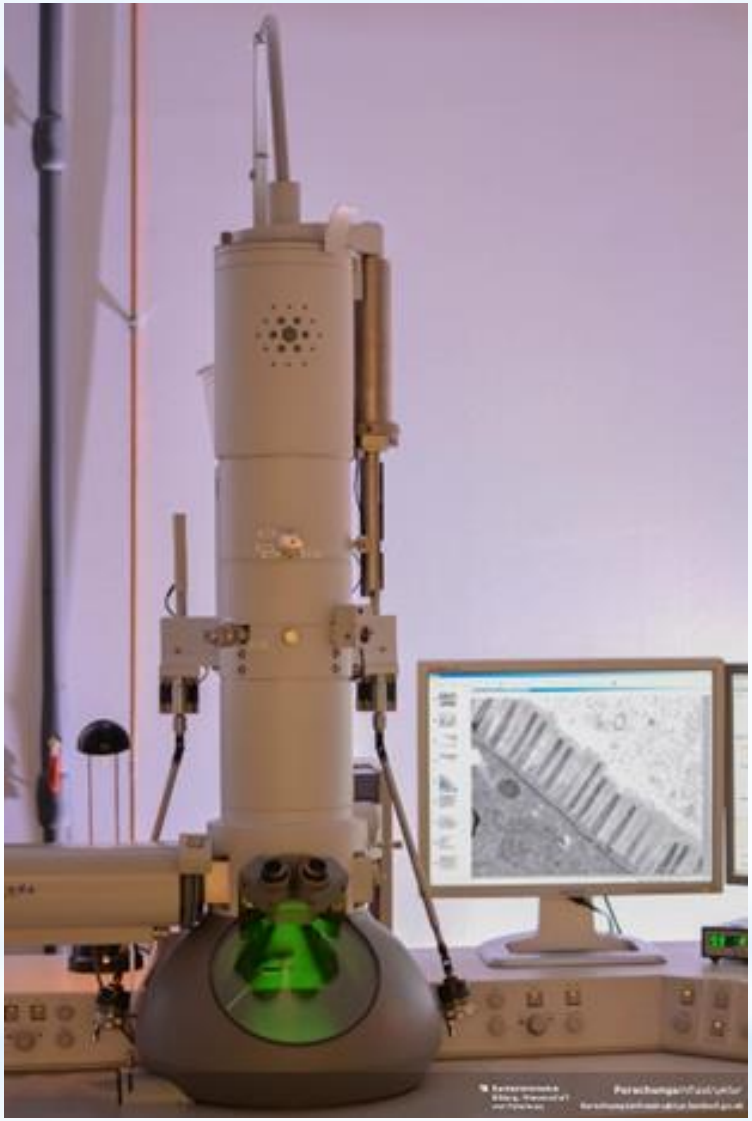
در میکروسکوپ الکترونی نگاره، اشعهٔ الکترونی به نمونه‌ای با ضخامت دلخواه تابیده می‌شود و در نهایت فقط از سطح نمونه تصویر تشکیل و اطلاعات دقیقی از آن به دست می‌آید (مثلاً تزئینات روی دانهٔ گرده یا ساختار سطح رسوب‌ها و سنگ‌های مختلف). در این میکروسکوپ نیازی به برش‌گیری نمونه نمی‌باشد و مراحل آماده‌سازی نمونه بسیار ساده‌تر از آماده‌سازی جهت مشاهده در میکروسکوپ الکترونی گذاره می‌باشد.

آزمایشگاه سلولی و مولکولی _ فرزانه فروهرفر


VELETA



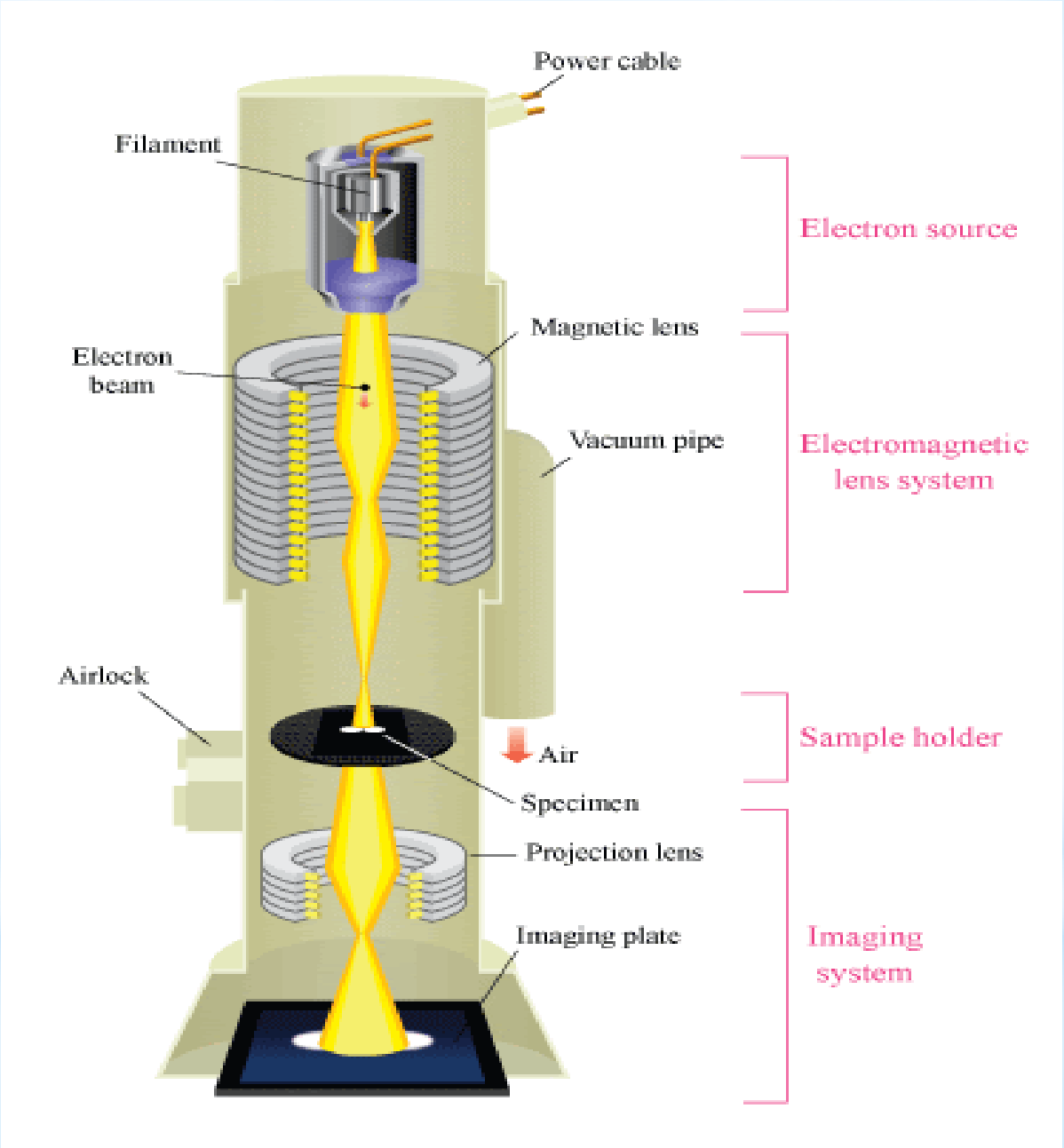
آزمایشگاه سلولی و مولکولی _ فرزانه فروهرفر

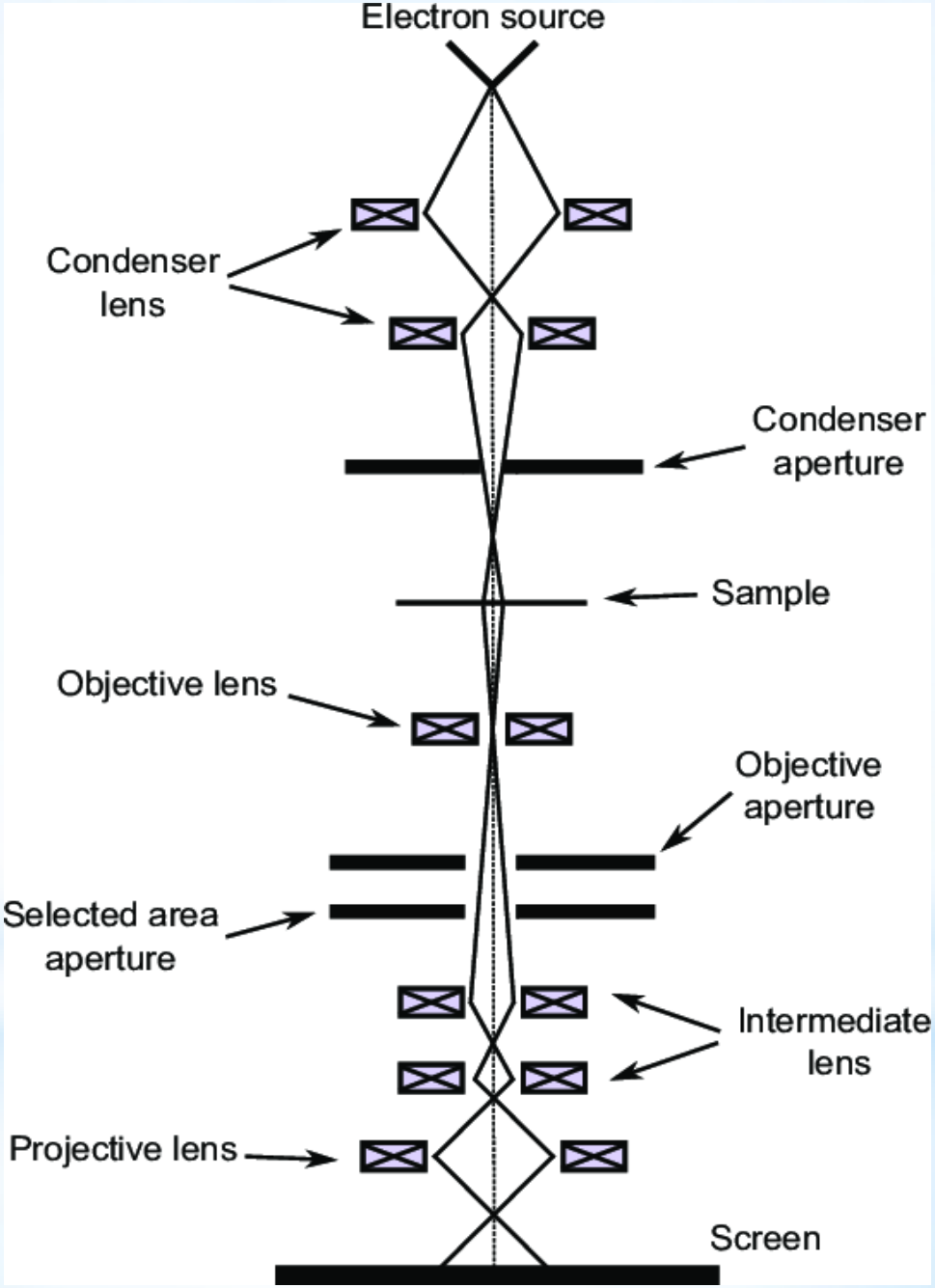


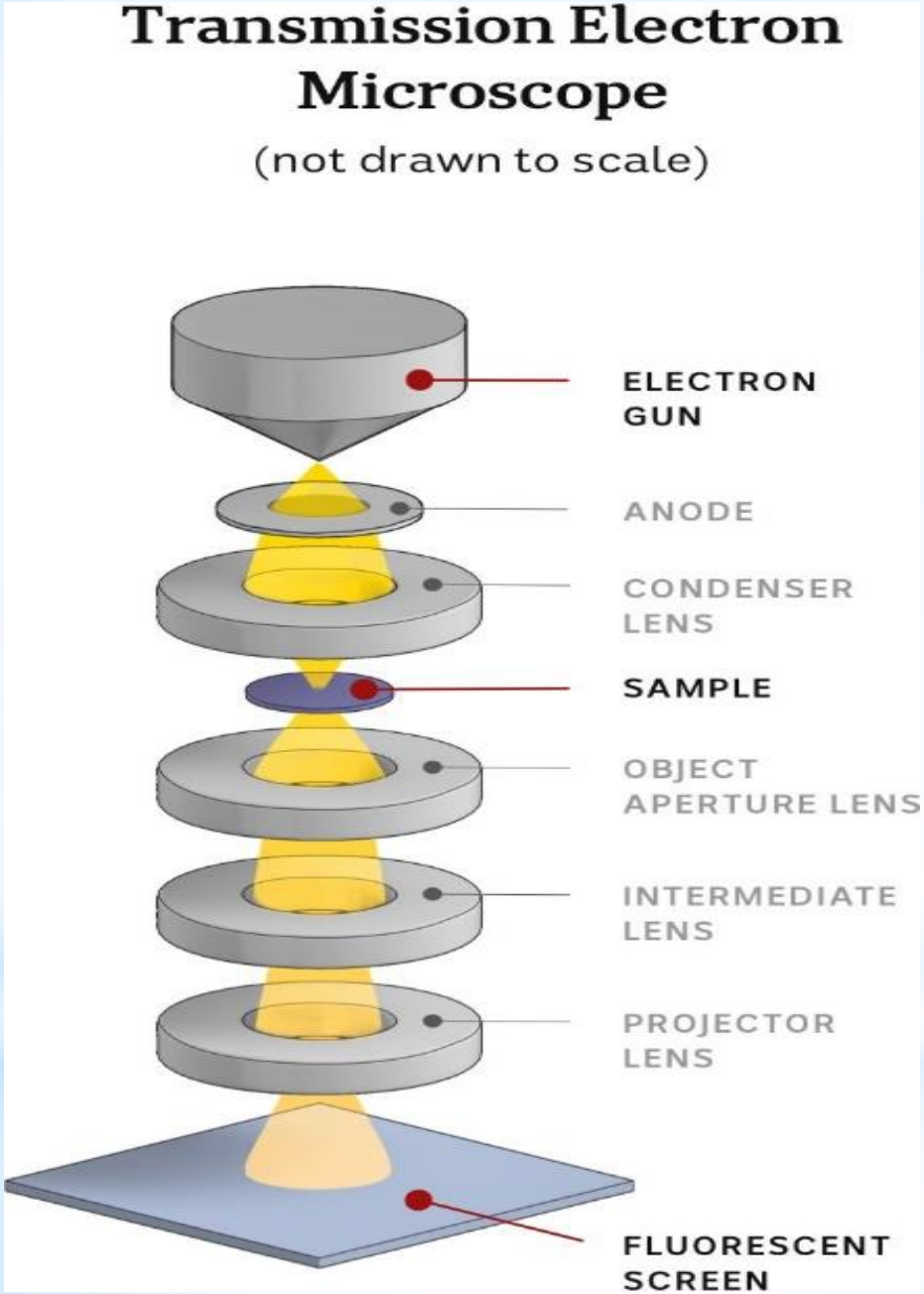
آزمایشگاه سلولی و مولکولی _ فرزانه فروهرفر

آزمایشگاه سلولی و مولکولی _ فرزانه فروهرفر

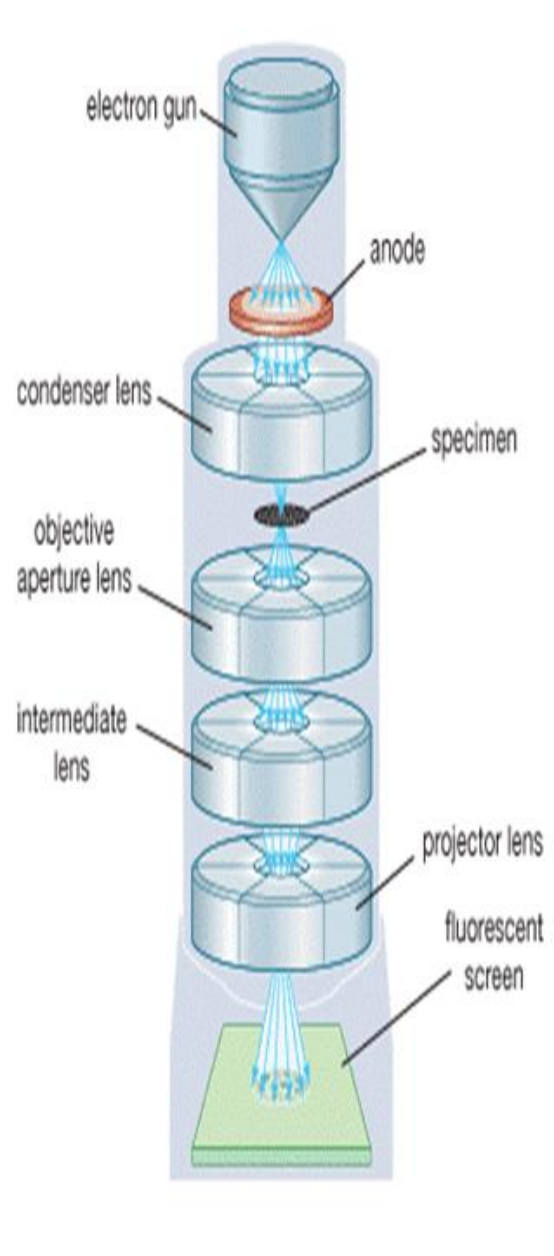
ZEISS
LIBRA 200MC

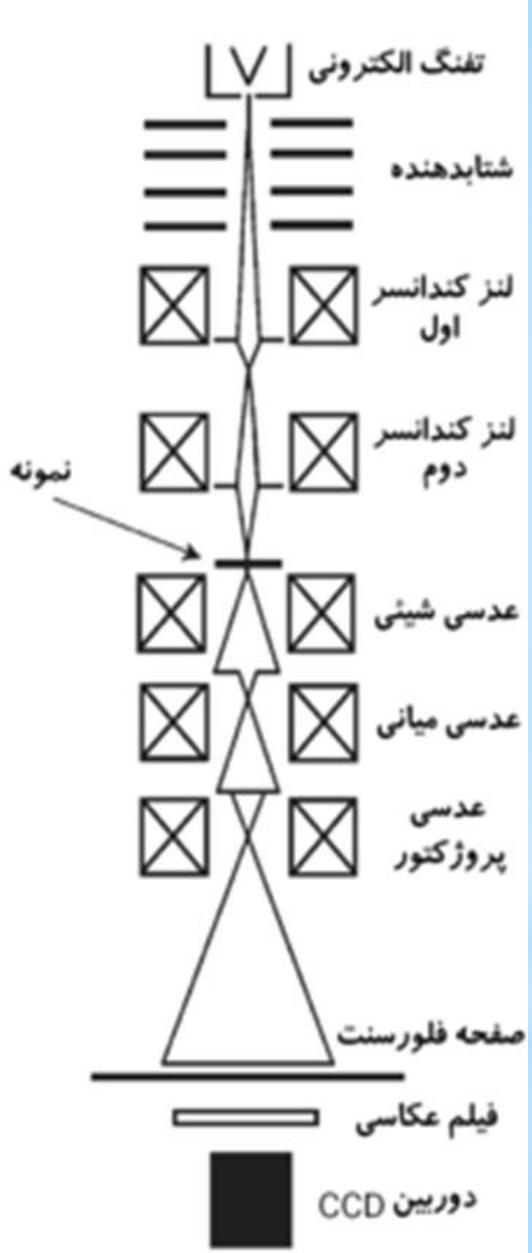

Power cable
Filament
Electron source
Magnetic lens
Electron beam
Vacuum pipe
Electromagnetic lens system
Airlock
Sample holder
Air
Specimen
Projection lens
Imaging plate
Imaging system

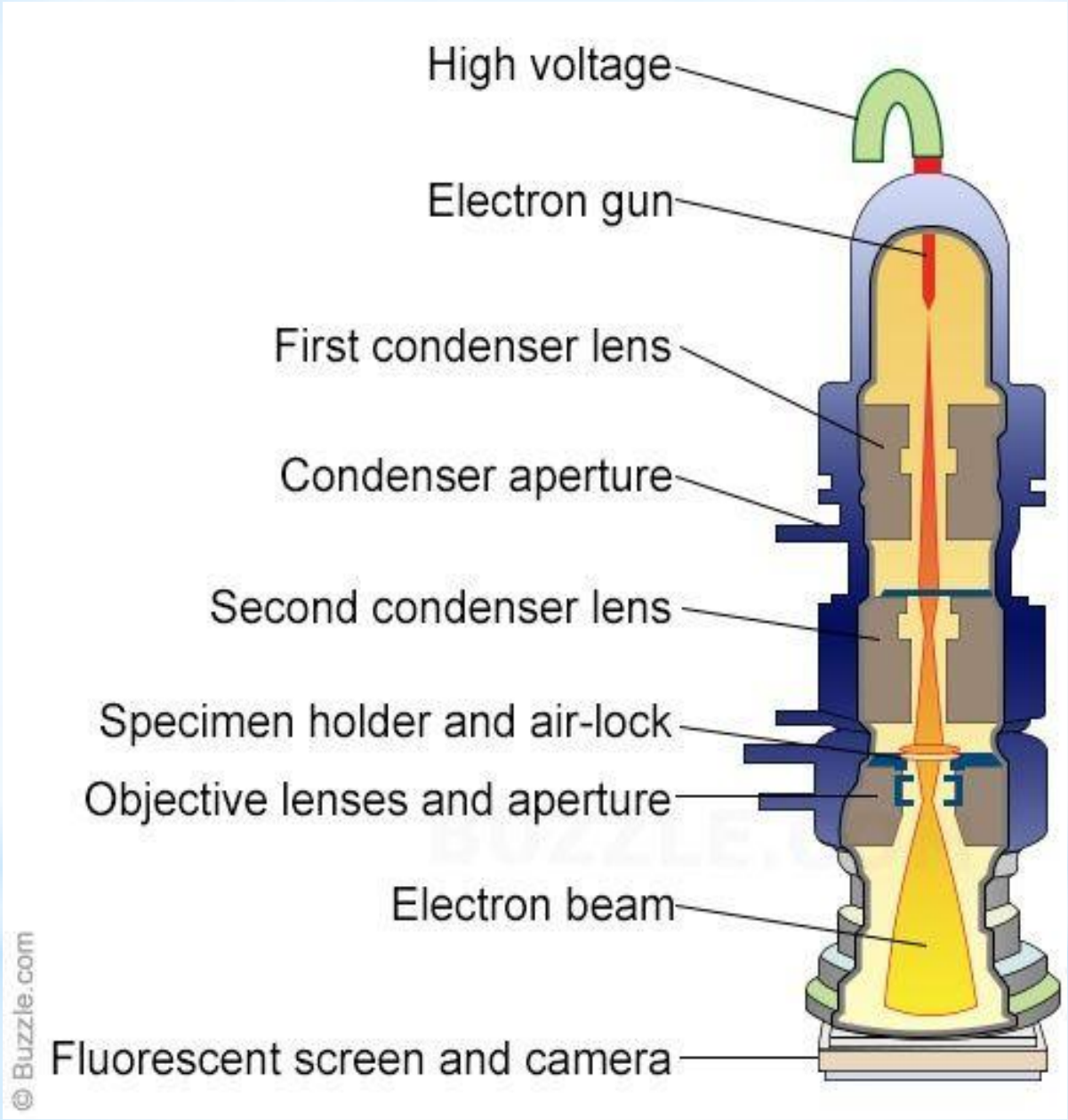

Electron source
Condenser lens
Condenser aperture
Sample
Objective lens
Objective aperture
Selected area aperture
Intermediate lens
Projective lens
Screen

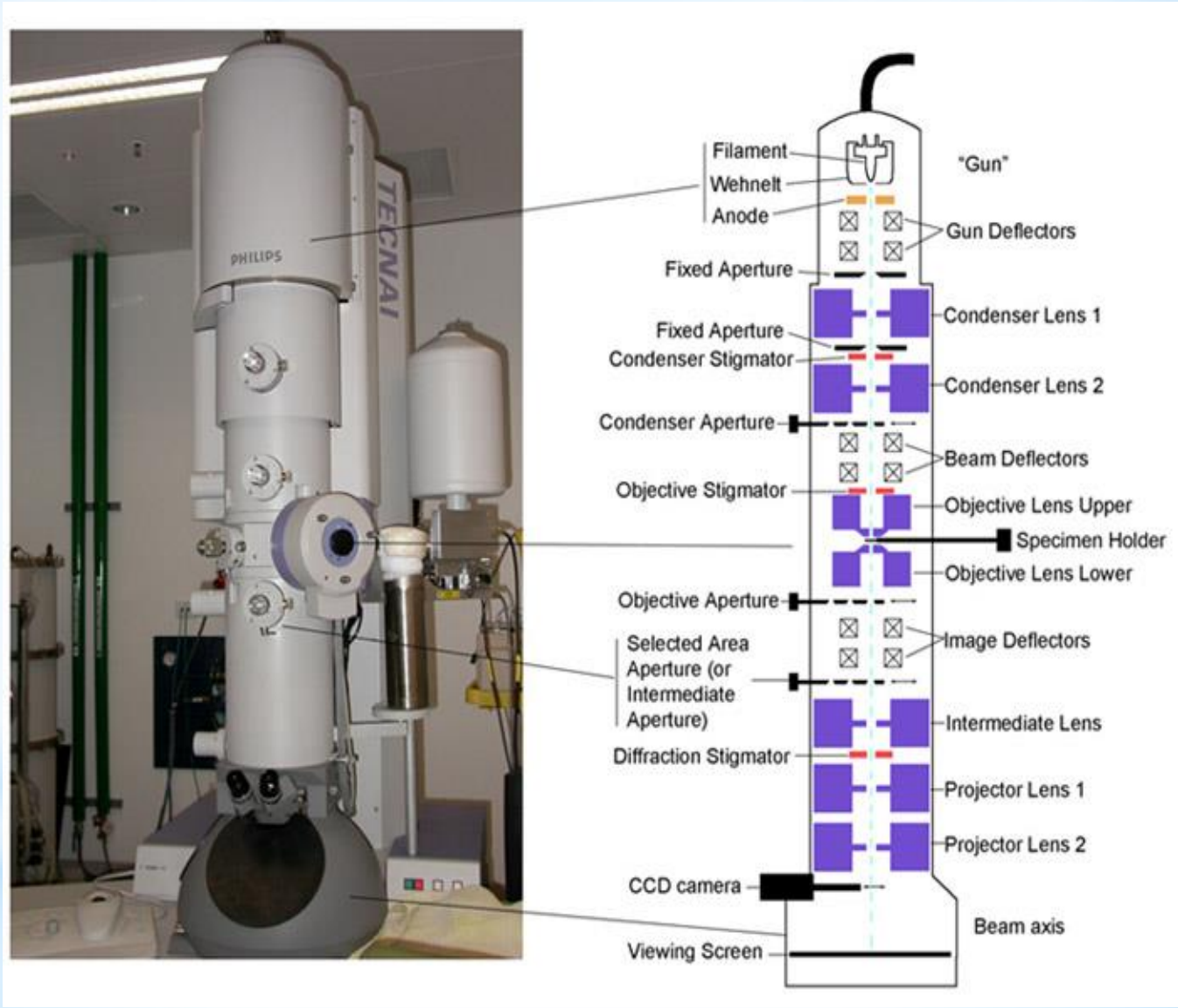

Transmission Electron Microscope
(not drawn to scale)
ELECTRON GUN
ANODE
CONDENSER LENS
SAMPLE
OBJECT APERTURE LENS
INTERMEDIATE LENS
PROJECTOR LENS
FLUORESCENT SCREEN

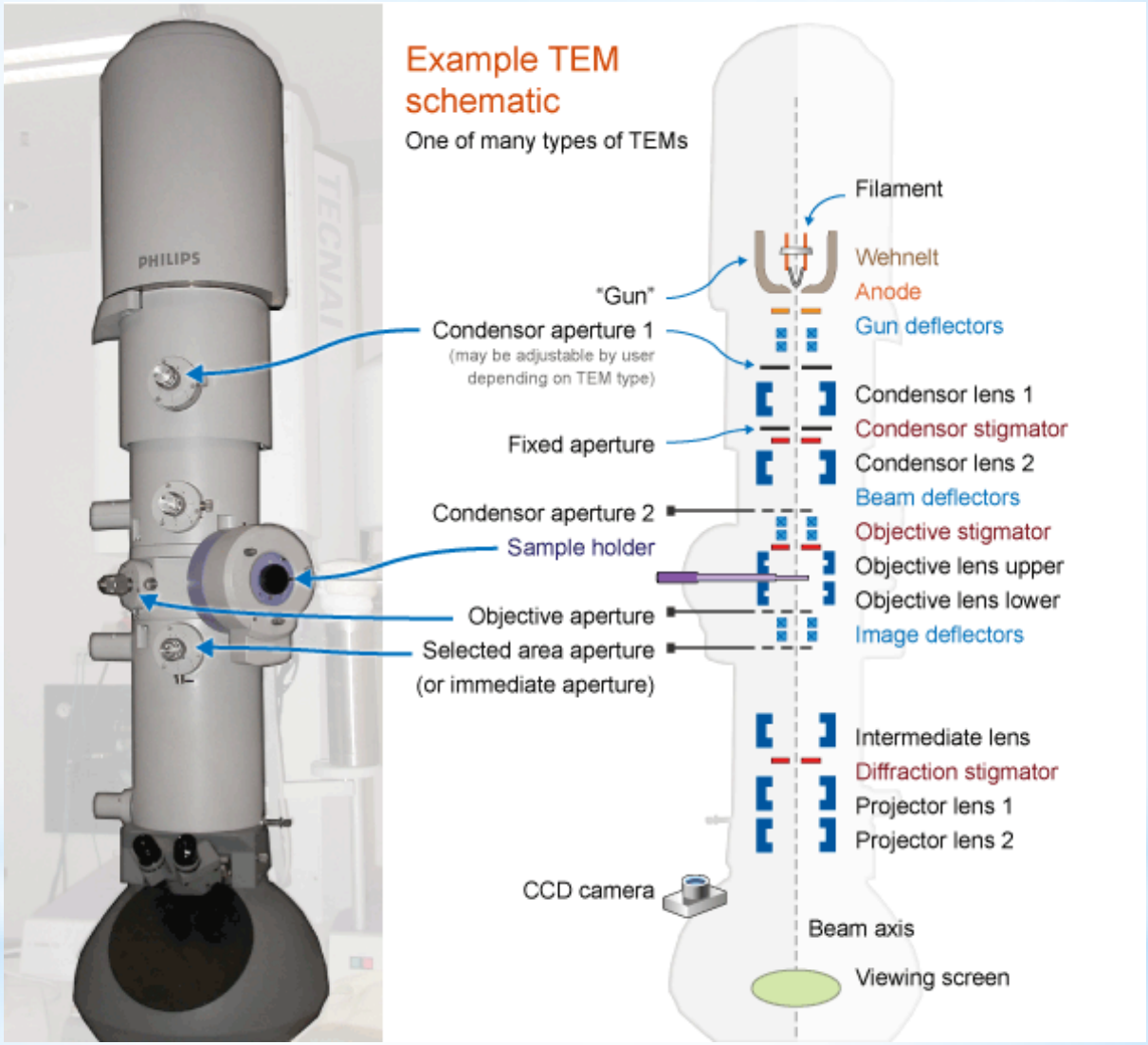
نمای طولی میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)






High voltage
Electron gun
First condenser lens
Condenser aperture
Second condenser lens
Specimen holder and air-lock
Objective lenses and aperture
Electron beam
Fluorescent screen and camera
© Buzzle.com


PHILIPS
TECNAI
Filament
Wehnelt
Anode
"Gun"
Gun Deflectors
Fixed Aperture
Condenser Lens 1
Fixed Aperture
Condenser Stigmator
Condenser Lens 2
Condenser Aperture
Beam Deflectors
Objective Stigmator
Objective Lens Upper
Specimen Holder
Objective Lens Lower
Objective Aperture
Image Deflectors
Selected Area
Aperture (or
Intermediate
Aperture)
Intermediate Lens
Diffraction Stigmator
Projector Lens 1
Projector Lens 2
CCD camera
Beam axis
Viewing Screen


Example TEM schematic
One of many types of TEMs
PHILIPS
Filament
Wehnelt
Anode
"Gun"
Gun deflectors
Condensor aperture 1
(may be adjustable by user depending on TEM type)
Condensor lens 1
Condensor stigmator
Fixed aperture
Condensor lens 2
Beam deflectors
Condensor aperture 2
Objective stigmator
Sample holder
Objective lens upper
Objective lens lower
Objective aperture
Image deflectors
Selected area aperture
(or immediate aperture)
Intermediate lens
Diffraction stigmator
Projector lens 1
Projector lens 2
CCD camera
Beam axis
Viewing screen

میکروسکوپ‌های نوری قادر به تفکیک اجزاء بسیار نزدیک به هم در نمونه نیستند و تنها راه افزایش قدرت تفکیک استفاده از پرتوهایی با طول موج کوتاهتر است. در میکروسکوپ الکترونی به جای پرتوهای نوری معمولی که طول موج متوسط حدود ۵۵۰۰ آنگستروم دارند، از پرتوهای الکترونی با طول موج کوتاه‌تر حدود ۰/۰۵ آنگستروم استفاده می‌شود. پرتوهای الکترونی جریان‌هایی از ذرات با بار منفی هستند که مثل نور خاصیت موجی و ذره‌ای دارند، اما برخلاف پرتوهای نوری قادر به عبور از شیشه یا شکسته شدن توسط شیشه یا عدسی نیستند.

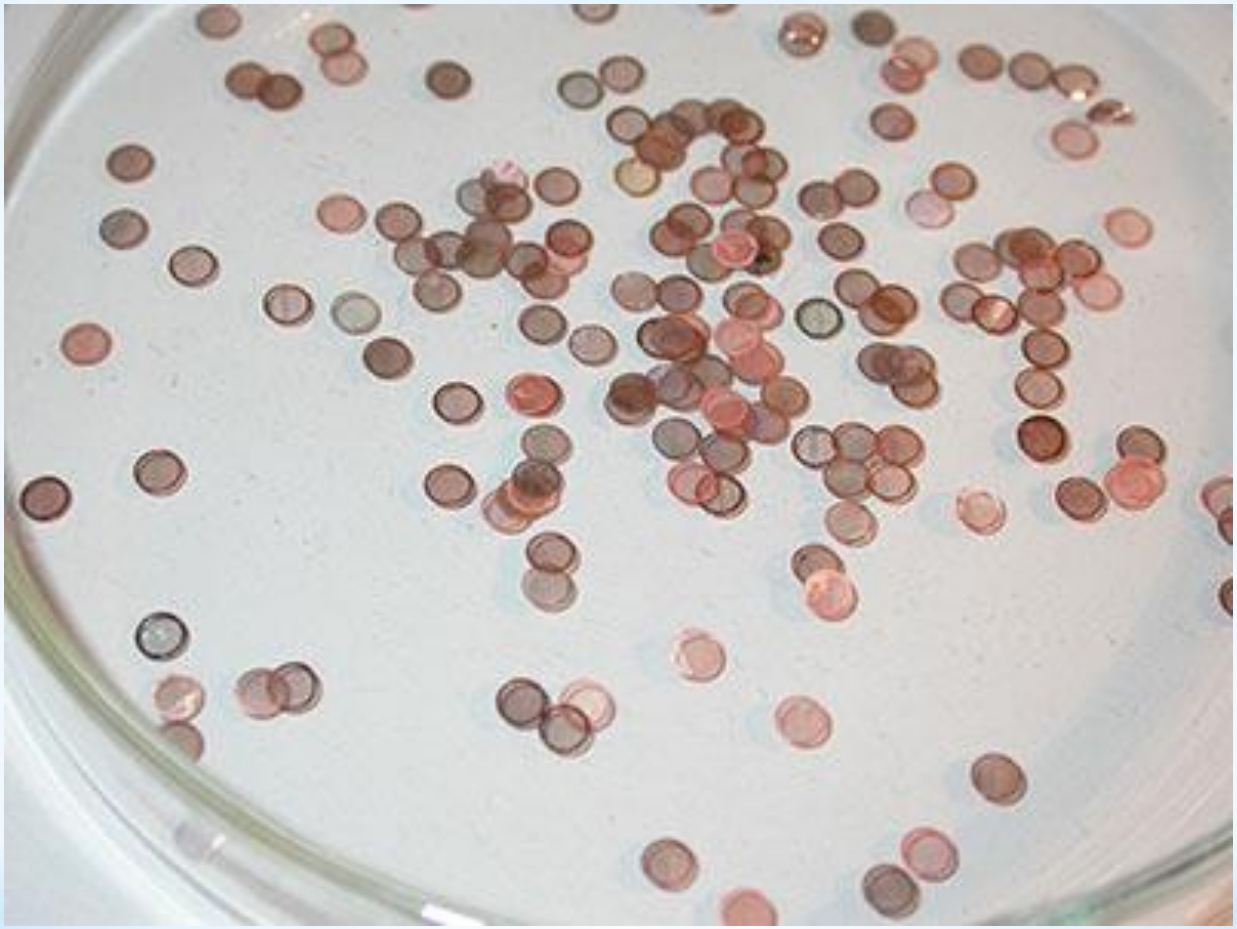
تفاوت دیگر بین میکروسکوپ الکترونی و نوری این است که در این میکروسکوپ جهت تنظیم مسیر حرکت الکترون‌ها از عدسی‌های الکترومغناطیسی(سولنوئید solenoid) استفاده می‌شود که به جای عدسی‌های شیئ کاربرد دارند. به جای عدسی چشمی هم یک عدسی پروژکتوری قرار دارد که تصویر را روی صفحه فلوئورسنت منعکس می‌سازد. با تغییر شدت جریان در سیم پیچ‌های الکترومغناطیسی می‌توان، قدرت این عدسی‌های الکترومغناطیسی را تغییر داد و با تغییر قدرت عدسی‌های پروژکتور می‌توان بزرگنمایی تصویر را کم یا زیاد نمود.

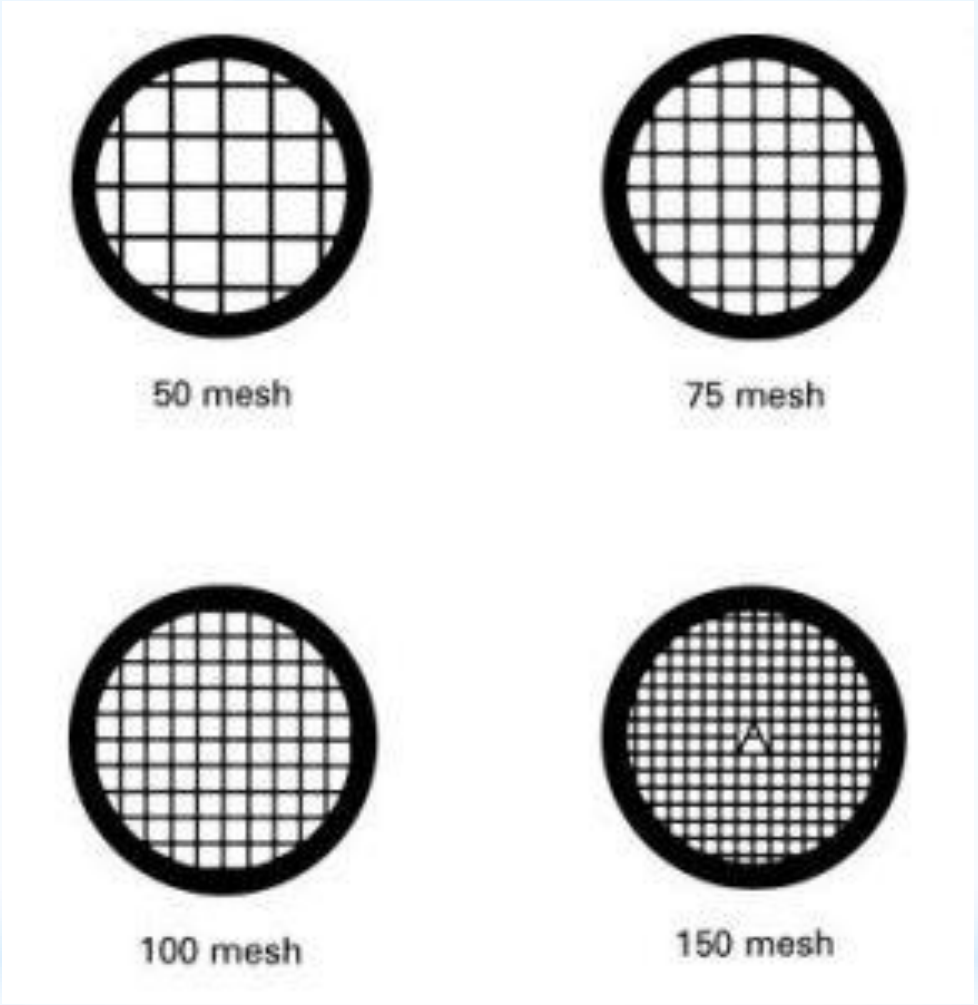
سیستم عملکردی میکروسکوپ الکترونی باید در محیطی عاری از هوا (خلأ) باشد. زیرا الکترون‌ها ذراتی باردار هستند و در اثر برخورد با مولکول‌های باردار هوا جذب یا منحرف می‌شوند. نمونهٔ میکروسکوپ الکترونی باید نازک و حدود ۲۵۰ آنگستروم ضخامت داشته باشد تا الکترون‌ها بتوانند به‌آسانی از آن عبور کنند. برای نمونه‌های ضخیم‌تر به ولتاژ بالا نیاز است. در نوعی از میکروسکوپ‌های الکترونی به نام میکروسکوپ الکترونی ولتاژ بالا (High Voltage Electron Microscope)، می‌توان ولتاژی تا حدود یک میلیون ولت به خاطر افزایش عمق نفوذ الکترون‌ها فراهم نمود. اولین میکروسکوپ الکترونی که ساخته شد، درست مانند میکروسکوپ نوری که شعاع نور را از داخل نمونهٔ مورد مطالعه عبور می‌دهد، شعاع الکترون را از داخل مقطع بسیار نازکی عبور می‌دهد. چون تراکم مواد در تمام قسمت های نمونهٔ مورد مطالعه یکسان نیست، میزان الکترونی که از قسمت های مختلف عبور می کند، متفاوت است. در نتیجه تصویری از قسمت های تاریک و روشن آن بدست می‌آید.

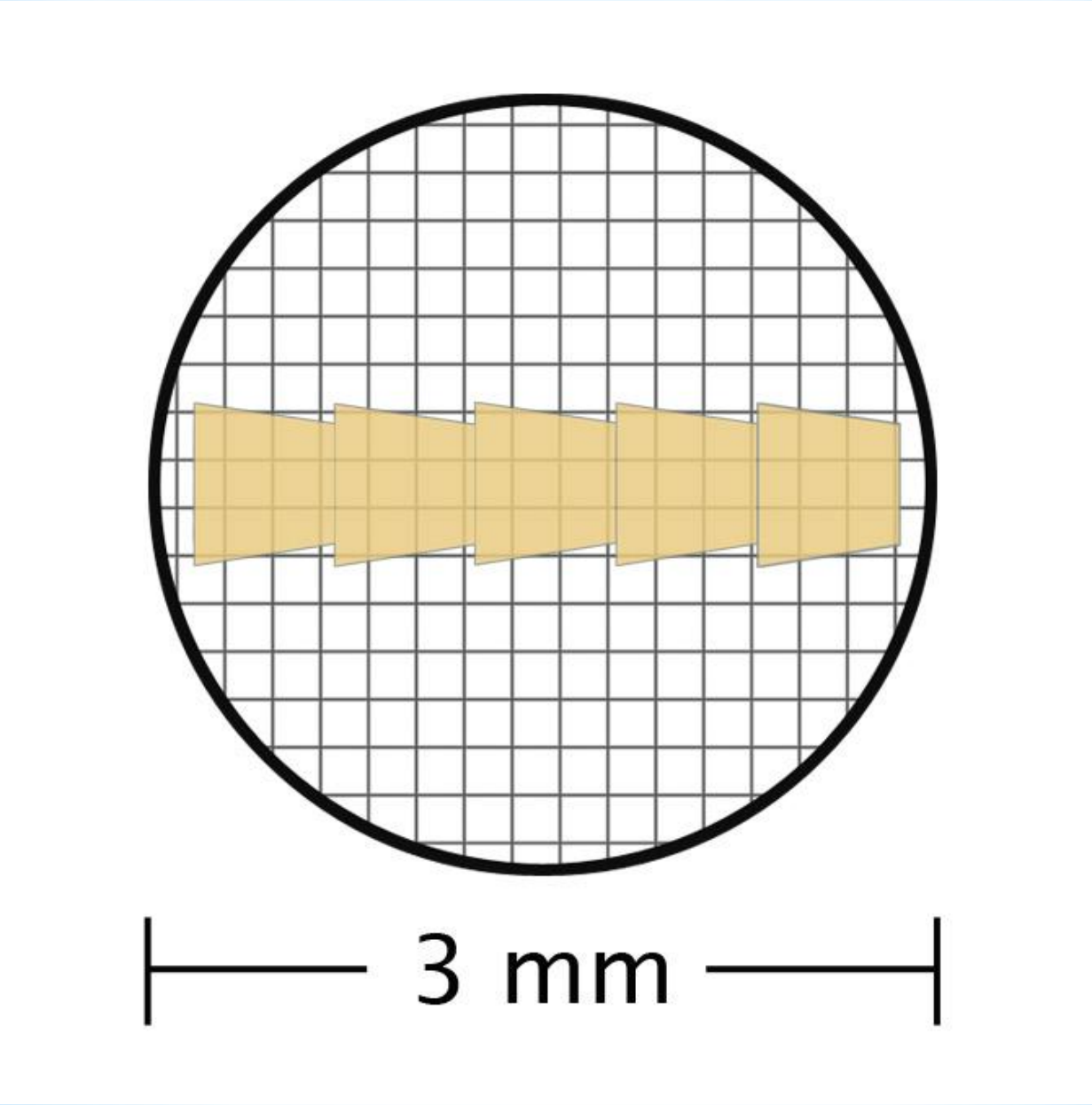
میکروسکوپ الکترونی دارای یک قسمت لوله‌ای شکل است که الکترون می-تواند آزادانه از آن عبور کند.منبع الکترون در میکروسکوپ الکترونی یک سیستم قوسی شکل از جنس تنگستن می‌باشد که کاتد را تشکیل داده و در درجه‌ی حرارت ۲۵۰۰-۲۰۰۰ سانتیگراد از خود الکترون ساتع می کند. از آنجاییکه حرکت الکترون‌ها از کاتد به طرف آند همراه با بی‌نظمی است در اطراف کاتد سیلندر ونلت (Wehnelt cylinder)تعبیه می‌شود. این سیلندر در اطراف کاتد فضای تخلیه الکترون ایجاد می کند، بنابراین الکترون‌ها بعد از سیلندر جریان الکترونی ثابتی به دست می آورند. این عمل با ایجاد اختلاف پتانسیل از ۲۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ ولت، بین کاتد و آند صورت می گیرد.در نتیجه یک شعاع الکترونی به‌سوی پایین قسمت لوله‌ای شکل، شتاب داده می‌شود. به این سیستم، تفنگ الکترونی می گویند.

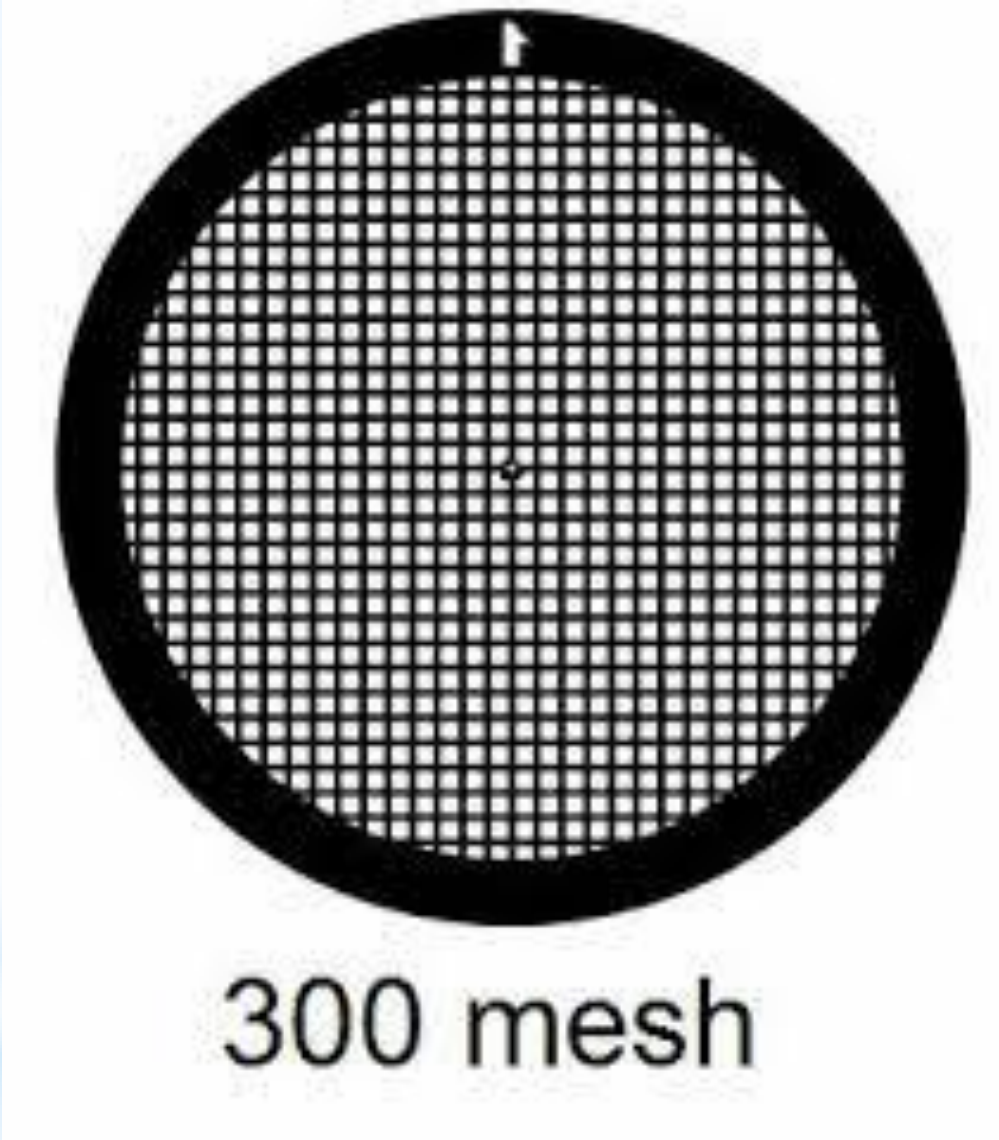
در طول لوله، عدسی‌هایی همگرا، اندازه و روشنایی شعاع الکترونی را قبل از برخورد با نمونه مورد مطالعه کنترل می کنند. مقطع مورد بررسی، روی یک صفحهٔ مشبک دایره شکلی به نام گرید (Grid)قرار داده می‌شود. شعاع الکترونی پس از عبور از مقطع و قبل از این که به حد بزرگنمایی نهایی برسد، از میان عدسی‌هایی شیئی، عبور کرده و تنظیم می‌شود. سپس توسط عدسی‌هایی بر روی صفحهٔ زیر میکروسکوپ منعکس می‌شود. در زیر این صفحه یک دوربین عکاسی قرار دارد که از تصویر روی صحنه عکس می گیرد و نهایتاً تصویر تشکیل شده در میکروسکوپ الکترونی معرف اختلاف در طرز پراکندگی الکترون‌ها به وسیله‌ی اجزاء مختلف نمونه حاصل گردد.

انواع گرید




50 mesh
75 mesh
100 mesh
150 mesh

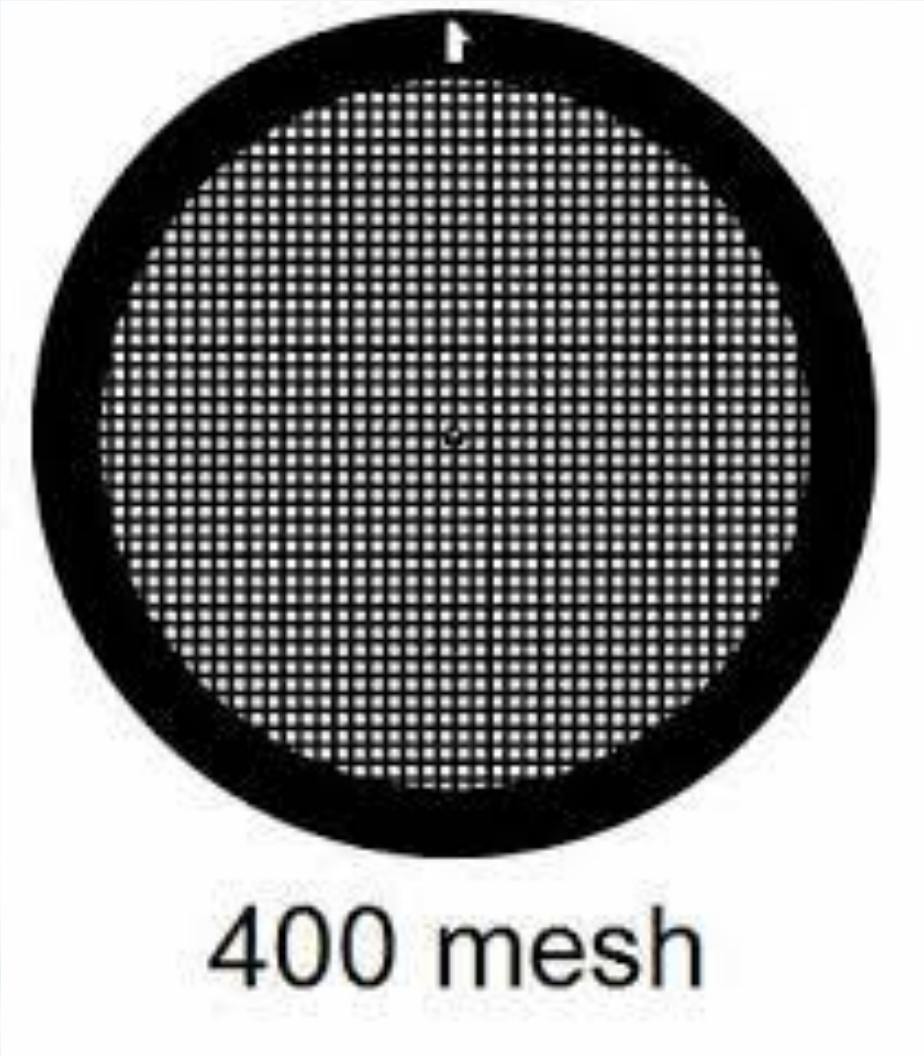

3 mm

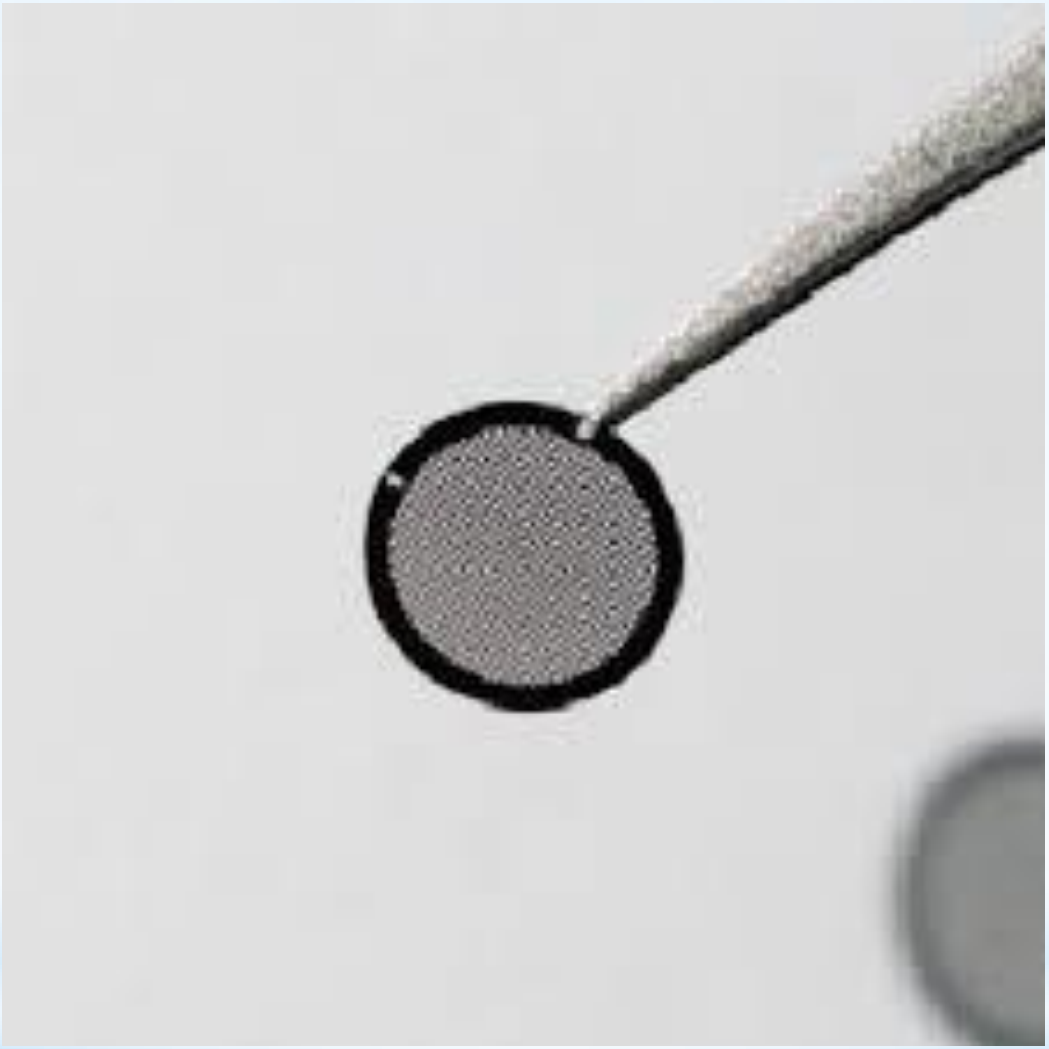

300 mesh

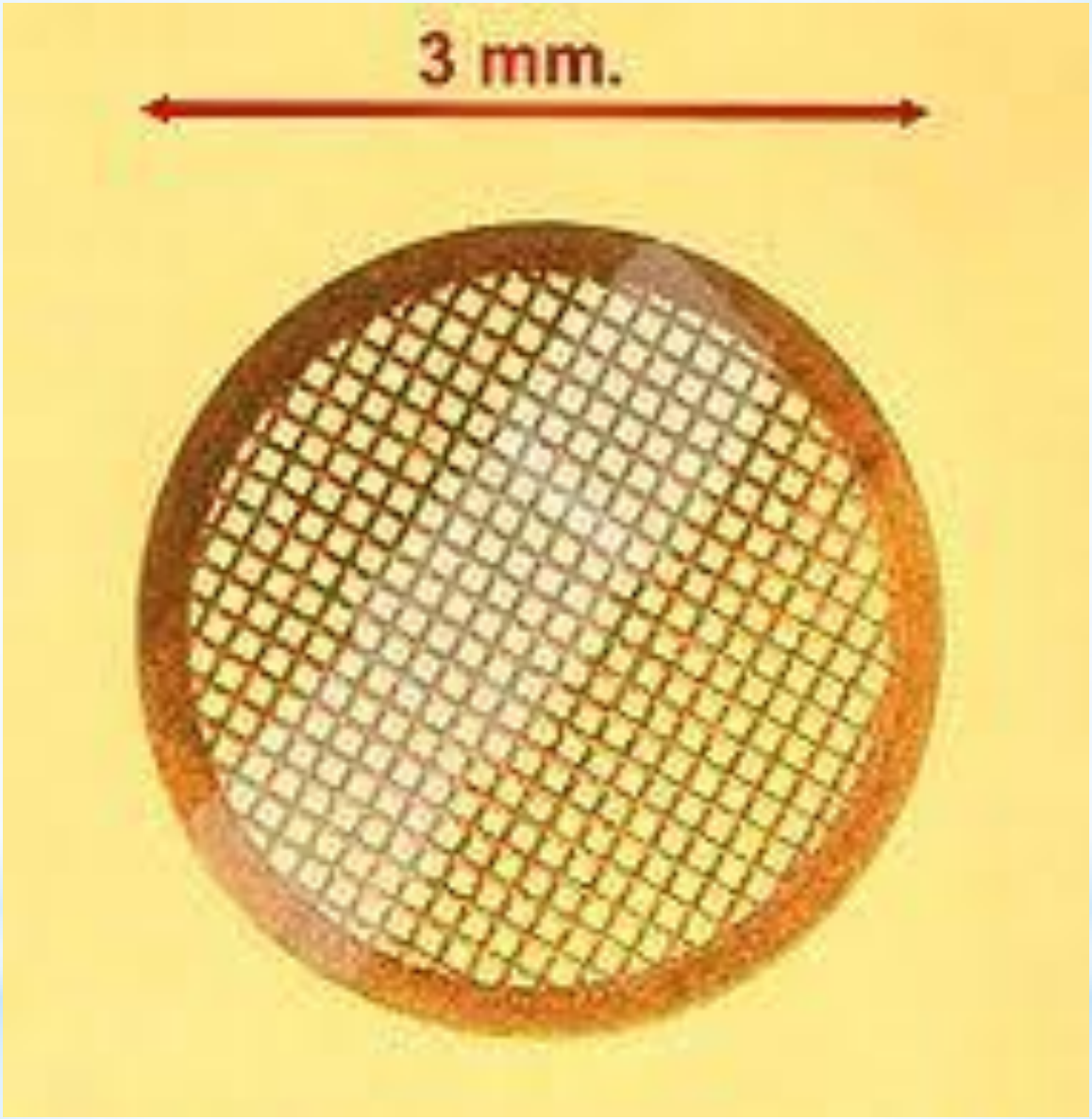
100 mesh

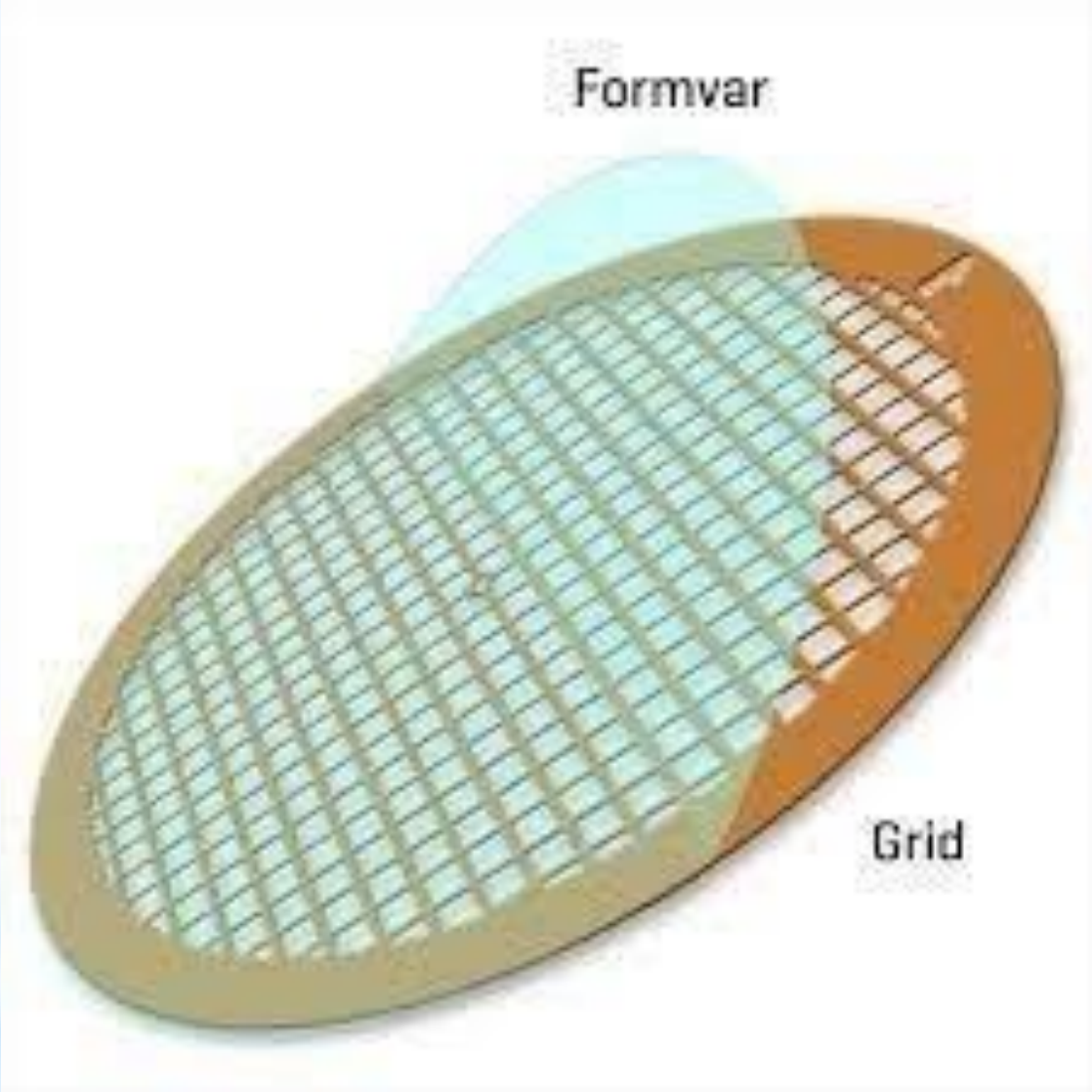
200 mesh

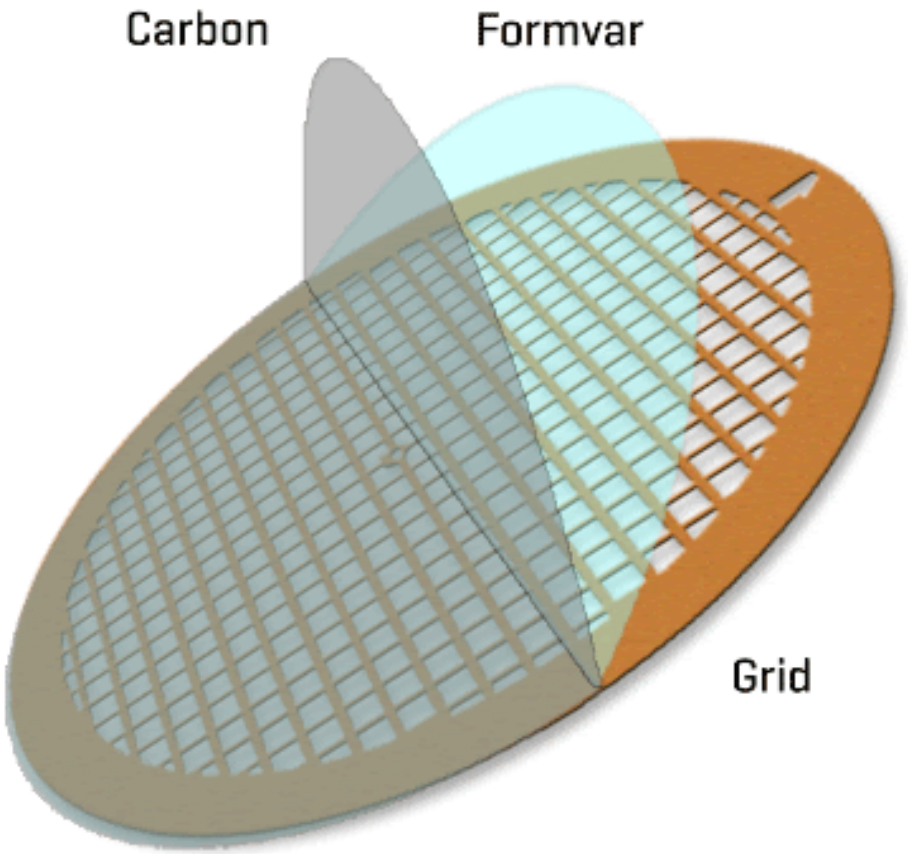
300 mesh

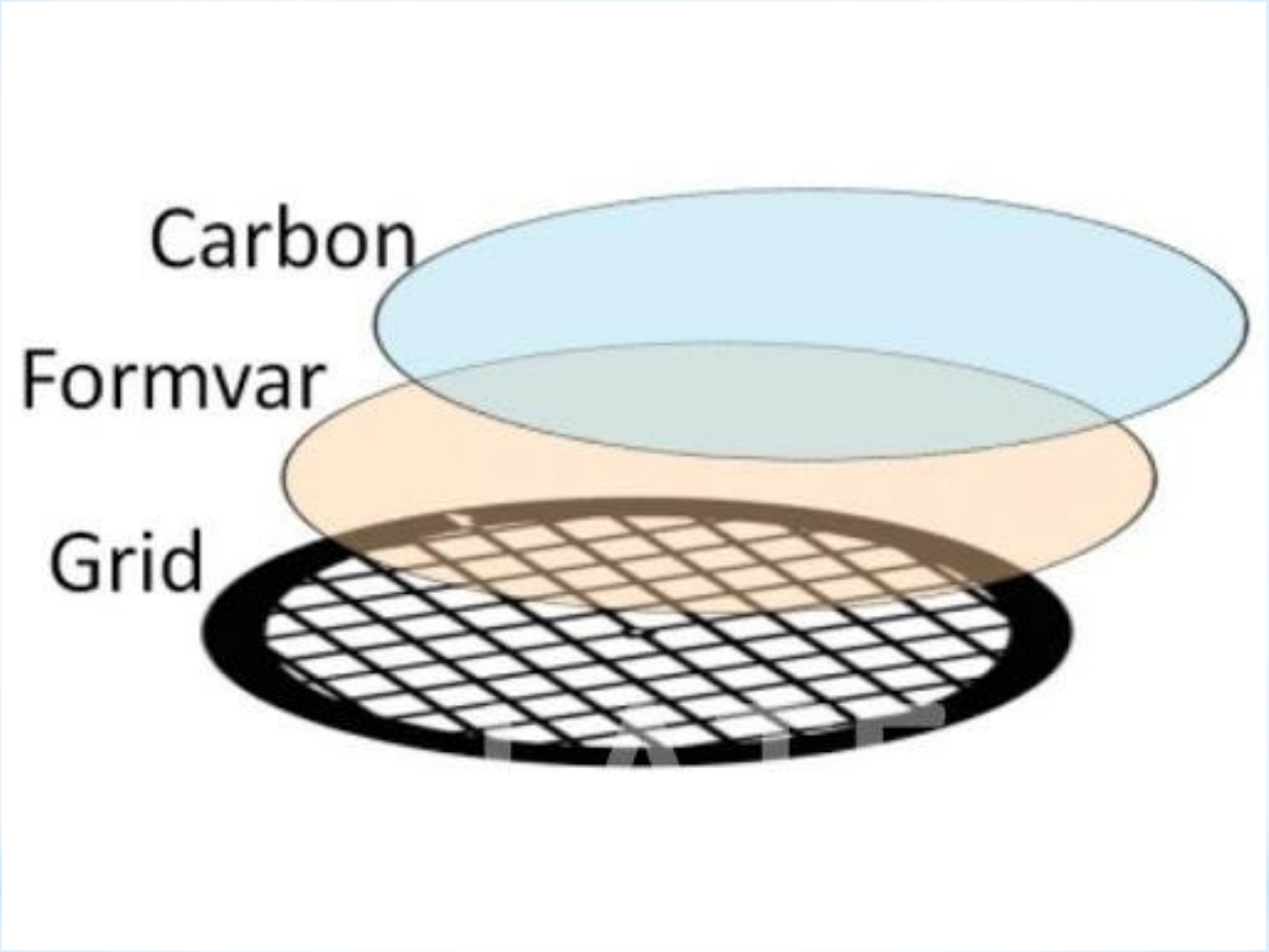

400 mesh

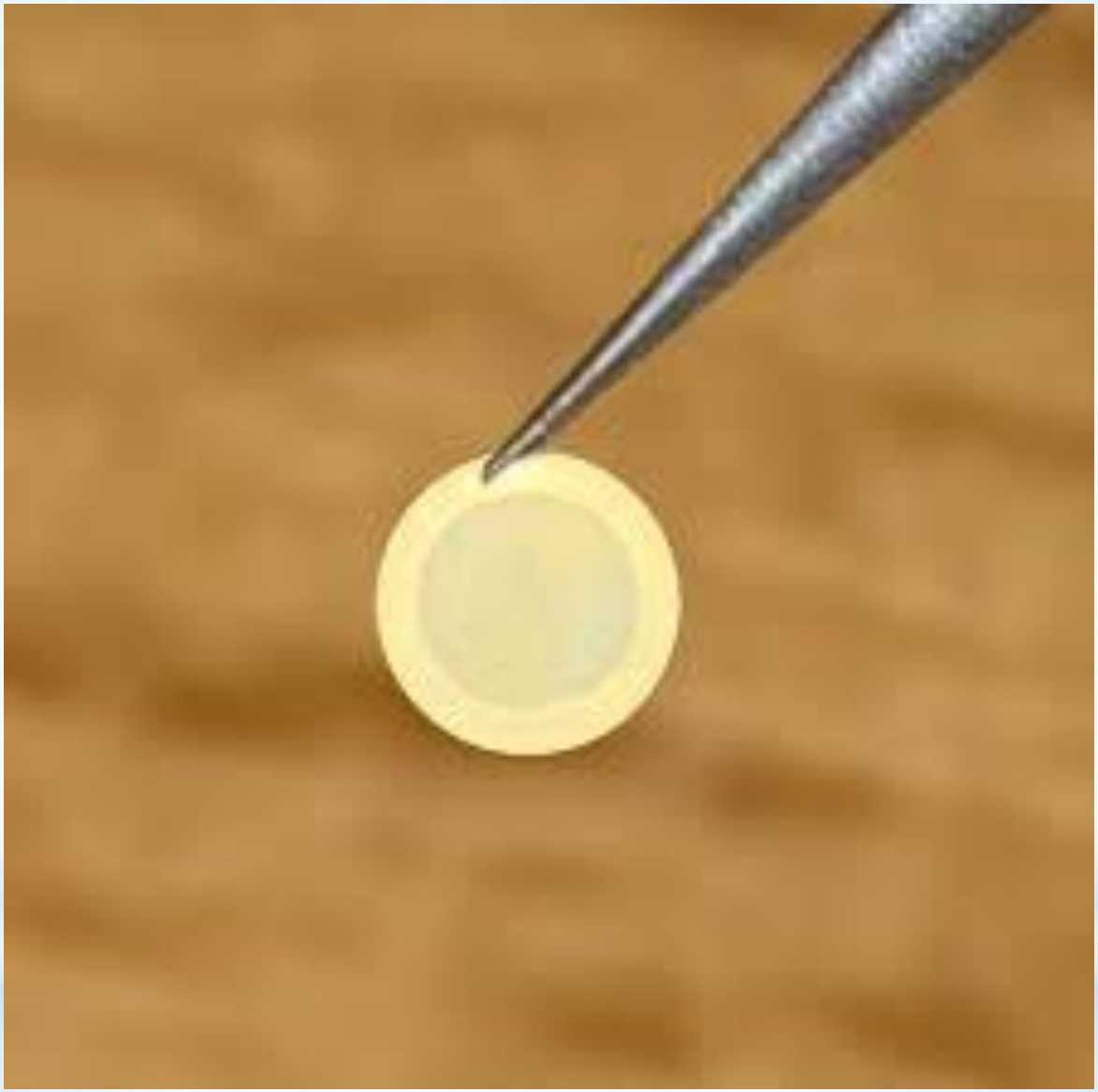


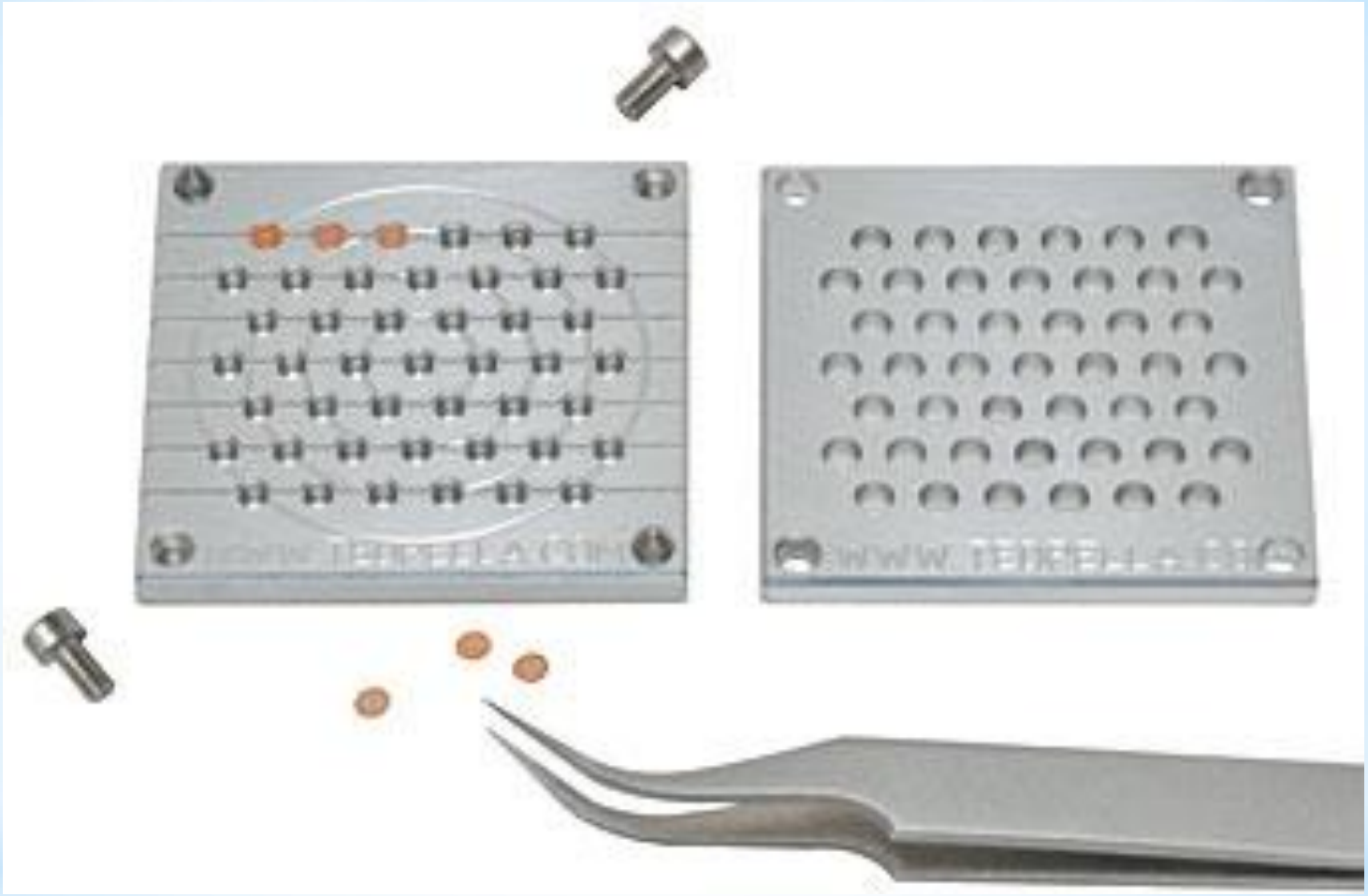

3 mm.

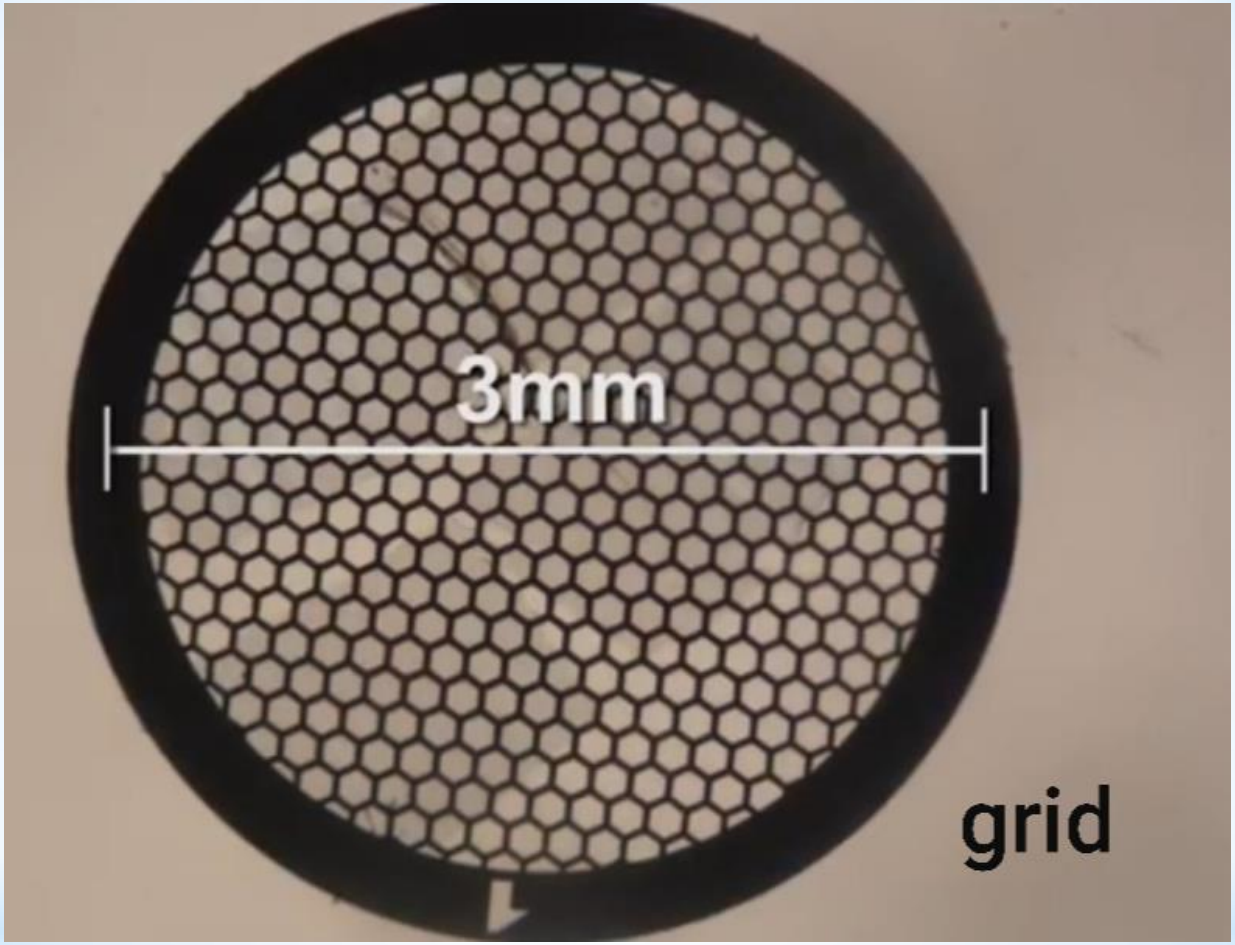

Formvar
Grid

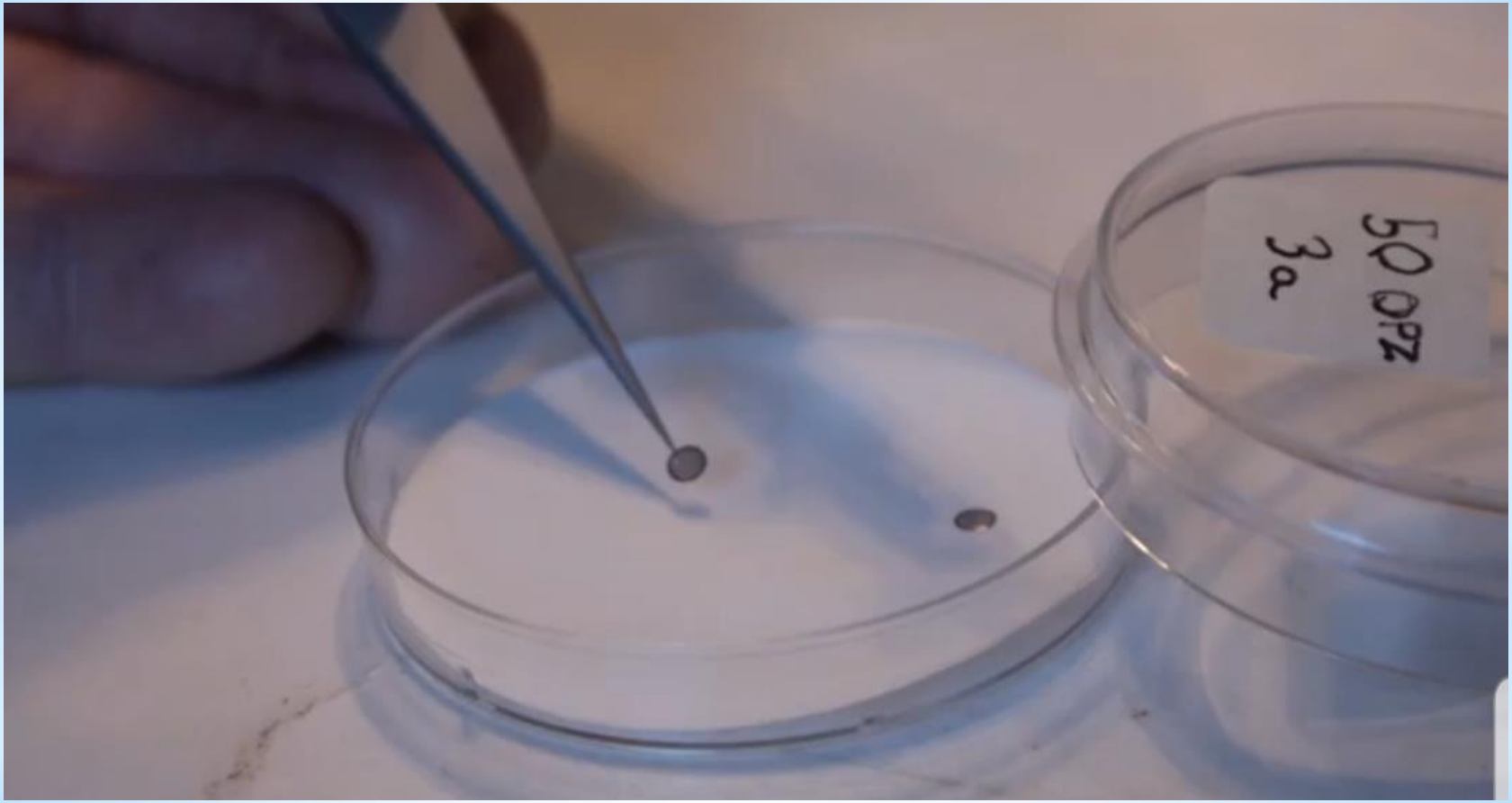

Carbon
Formvar
Grid


Carbon
Formvar
Grid






3mm
grid


50 DPZ
3a

ظرف مخصوص نگهداری grid

مواد و وسایل مورد نیاز

۱. محلول گلوتارآلدئید
۲. محلول اسمیوم تتراکساید
۳. محلول پروپیلن اکساید
۴. رزین
۵. استات اورانیوم
۶. سیترات سرب
آب
۷. آب ۲ بار تقطیر یا دی‌یونیزه شده
۸. میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)
۹. کپسول‌های استوانه‌ای یا قالب‌های مسطح
۱۰. پارافیلم
۱۱. گرید مسی یا طلایی
۱۲. دستگاه اولترامیکروتوم
۱۳. کارد شیشه‌ای
۱۴. دستگاه سازنده کارد
۱۵. چاهک‌ها یا حوضچه‌های
۱۶. پاستور پی‌پت
۱۷. ویال‌های کوچک

روش کار

جهت مشاهده نمونه‌های مختلف گیاهی ،جانوری یا انسانی در میکروسکوپ الکترونی گذاره، ابتدا بایستی حدود قسمتی که قرار است مورد بررسی قرار گیرد، توسط میکروسکوپ نوری کنترل گردد. سپس قسمت‌های اضافی حذف و نمونه به ابعاد ۱ میلیمتر جهت برش‌های طولی و عرضی برای مراحل زیر آماده شوند.

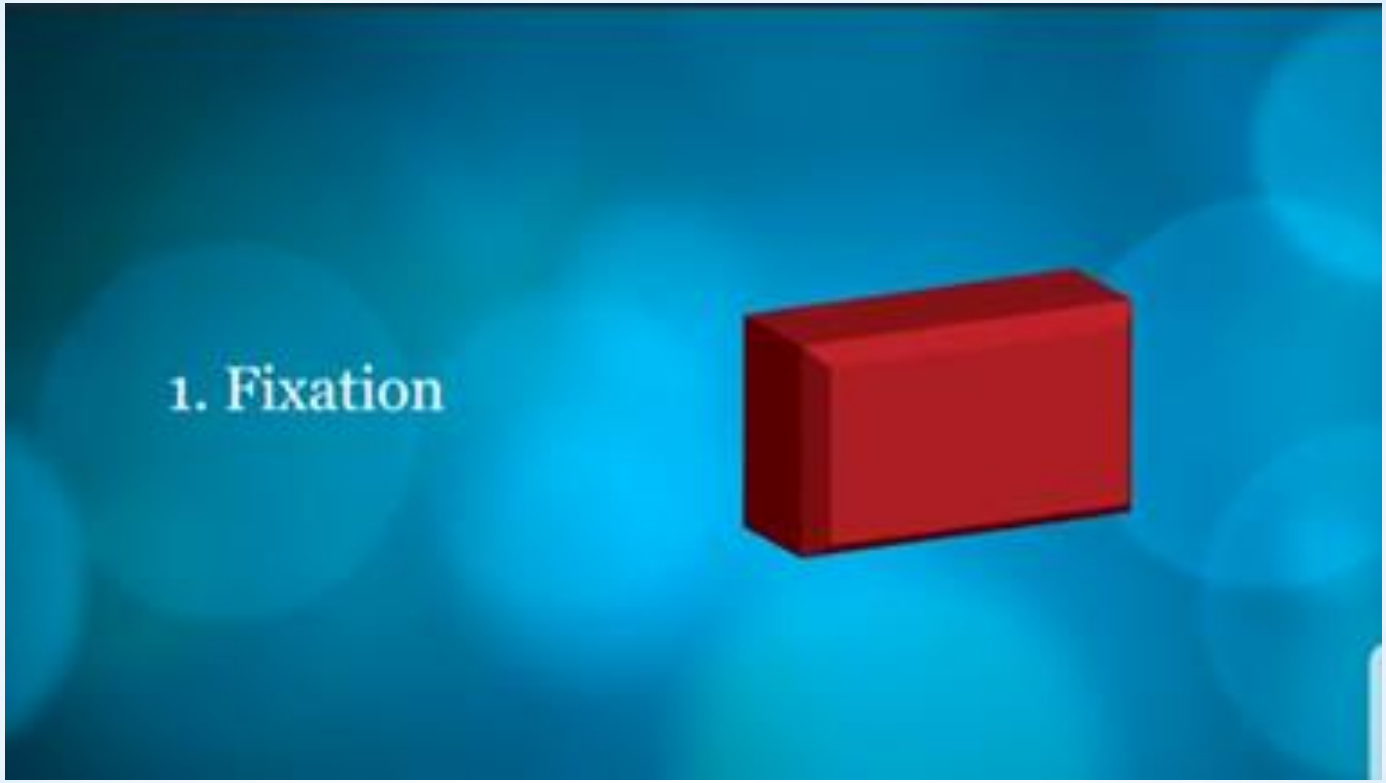
Tissue Processing for Electron Microscopy

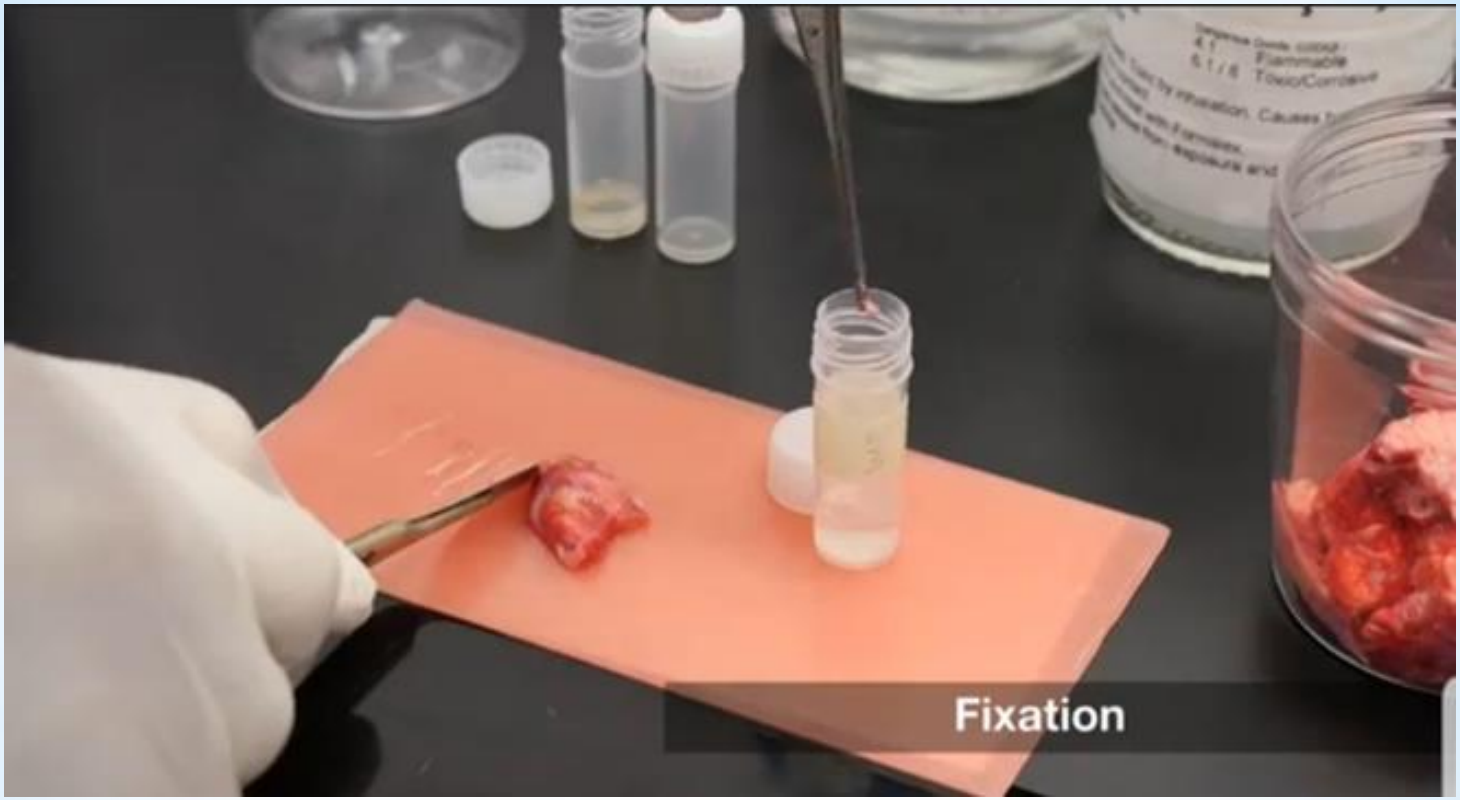
مراحل آماده سازی نمونه جهت میکروسکوپ TEM

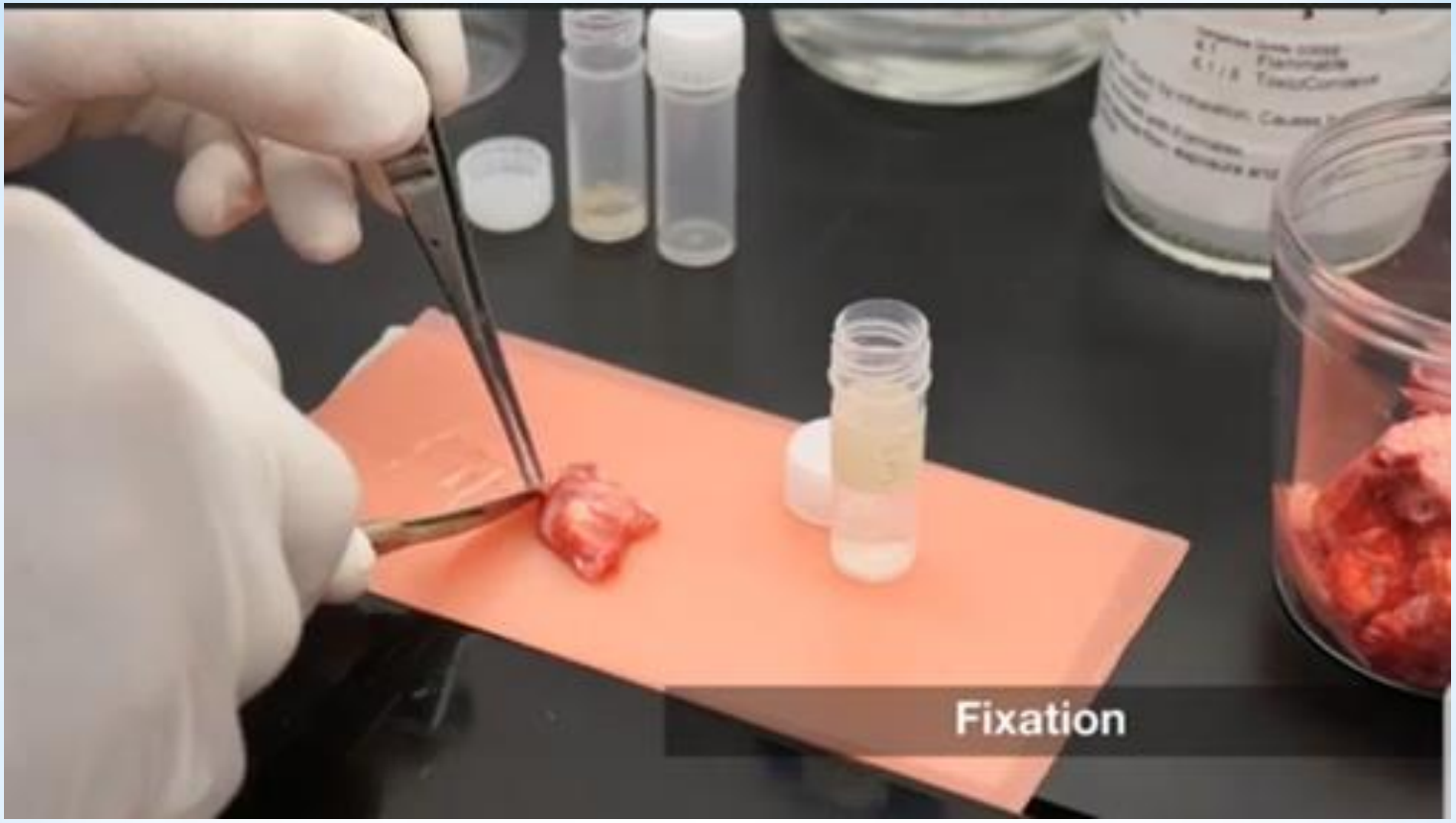
۱– تثبیت (Fixation)به دو مرحله مجزا تقسیم می‌گردد:

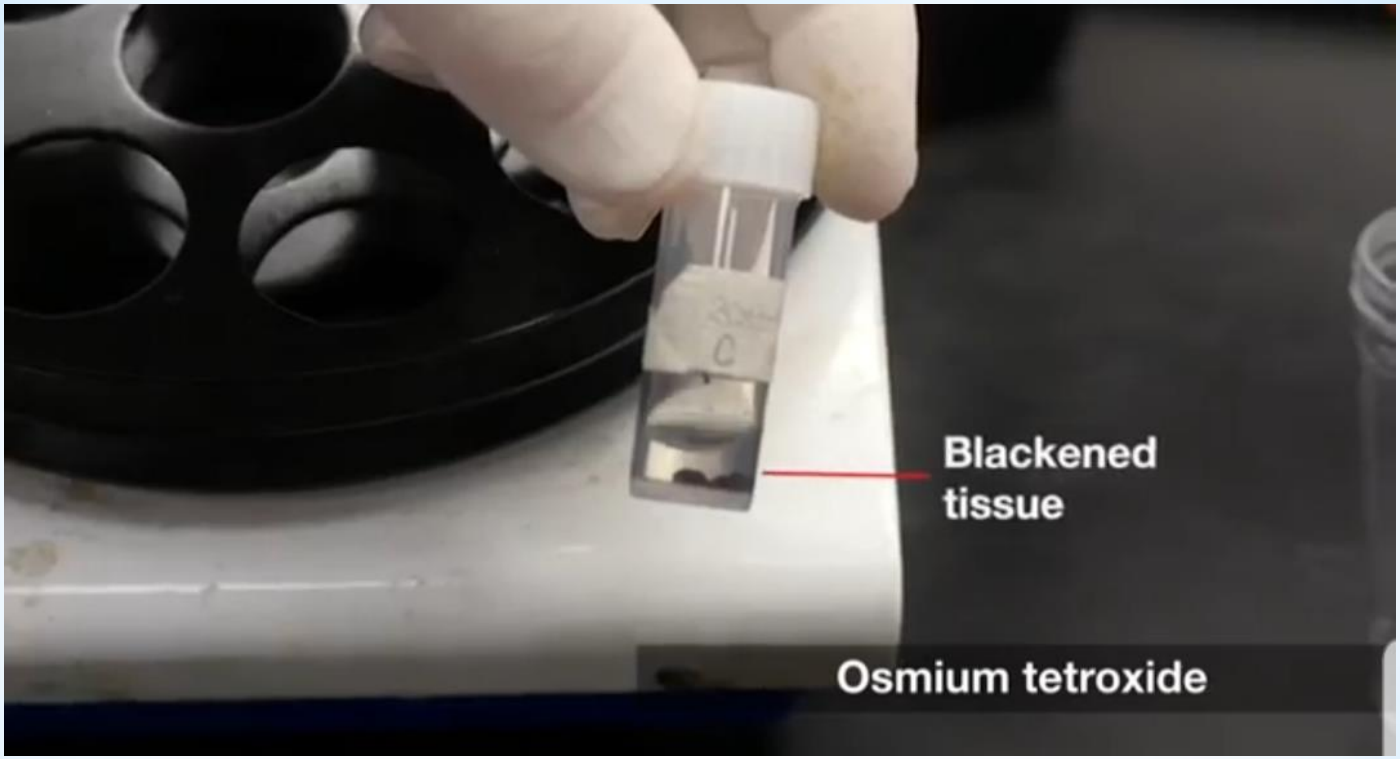
الف) تثبیت اولیه(First Fixation): نمونه‌ها در ظرف‌های مخصوص به مدت یک ساعت در محلول گلوتارآلدئید (Glutaraldehyde)قرارمی‌گیرد.

ب) تثبیت ثانویه(Post Fixation): پس از شست و شوی نمونه‌ها توسط بافر مناسب (بافر کاکودیلات Cacodulate Bufferسدیم یا بافر فسفات PhosPhate buffer)، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در محلول تتراکسید اسمیوم(Osmiumtetroxide) قرار می‌گیرد.

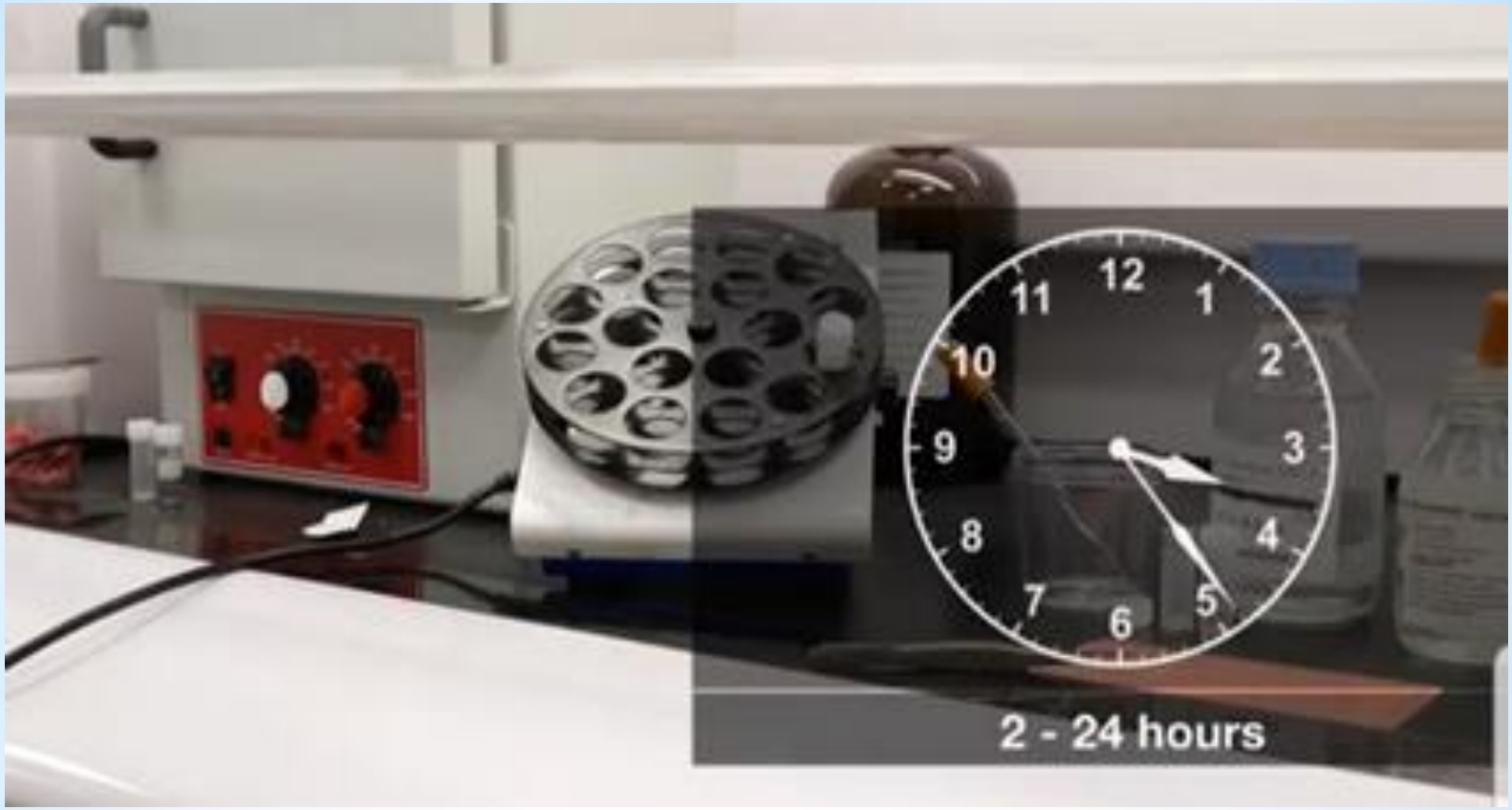

1. Fixation


Fixation


Fixation


Blackened
tissue
Osmium tetroxide

Glutaraldehyde & Paraformaldehyde

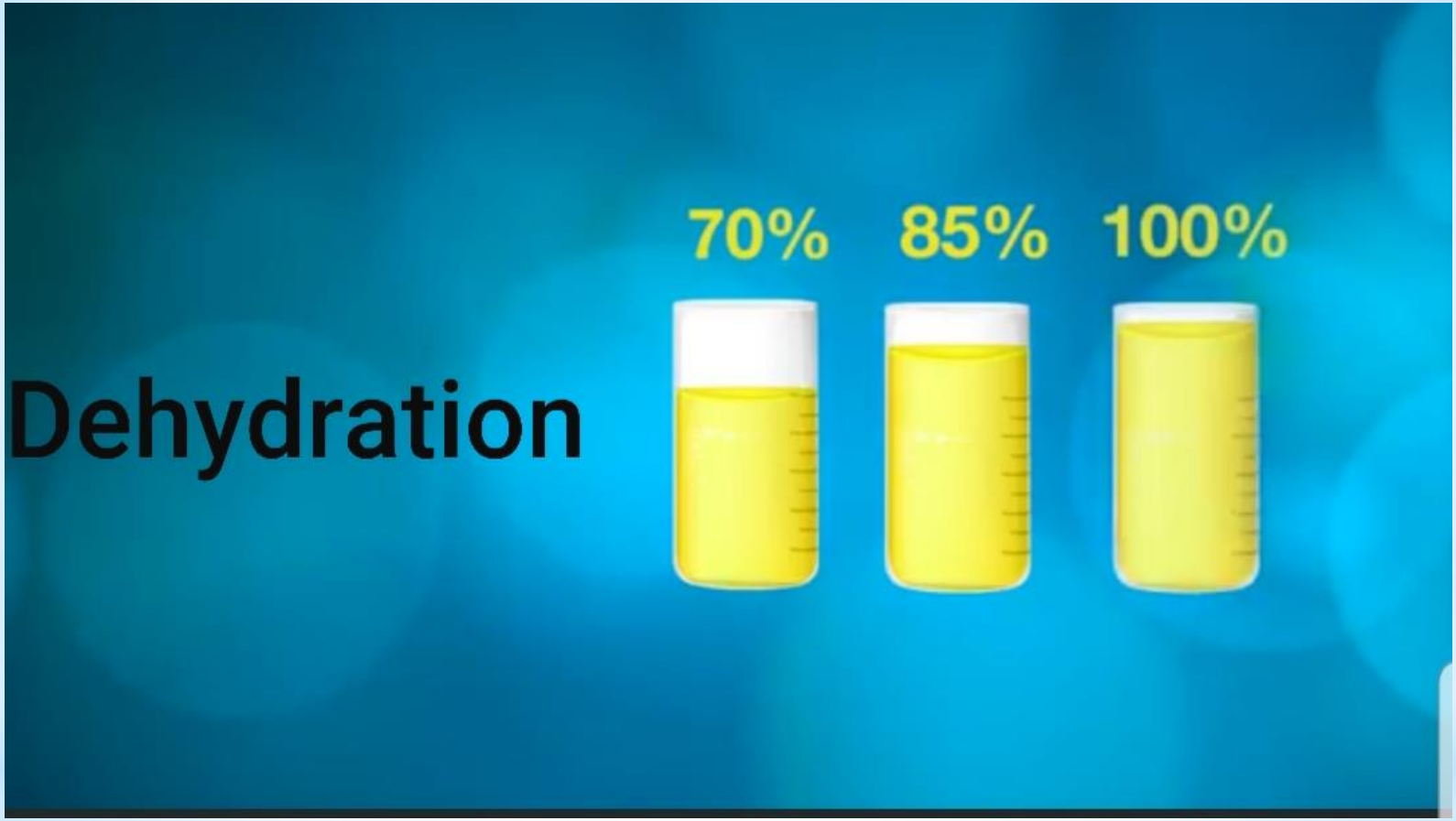

12
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
2 - 24 hours

Osmium tetroxide

۲- آبگیری(Dehydration):

نمونه‌ها به ترتیب و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در الکل اتانل (یا استون) با درصدهای ۱۰-۲۰-۳۰-۴۰-۵۰-۷۵-۹۶ قرا گرفته و سپس ۲ بار متوالی و هر بار به مدت ۱ ساعت در الکل ۱۰۰ درصد (مطلق) اتانل قرار می‌گیرند تا آبگیری نمونه به طور کامل انجام شود.

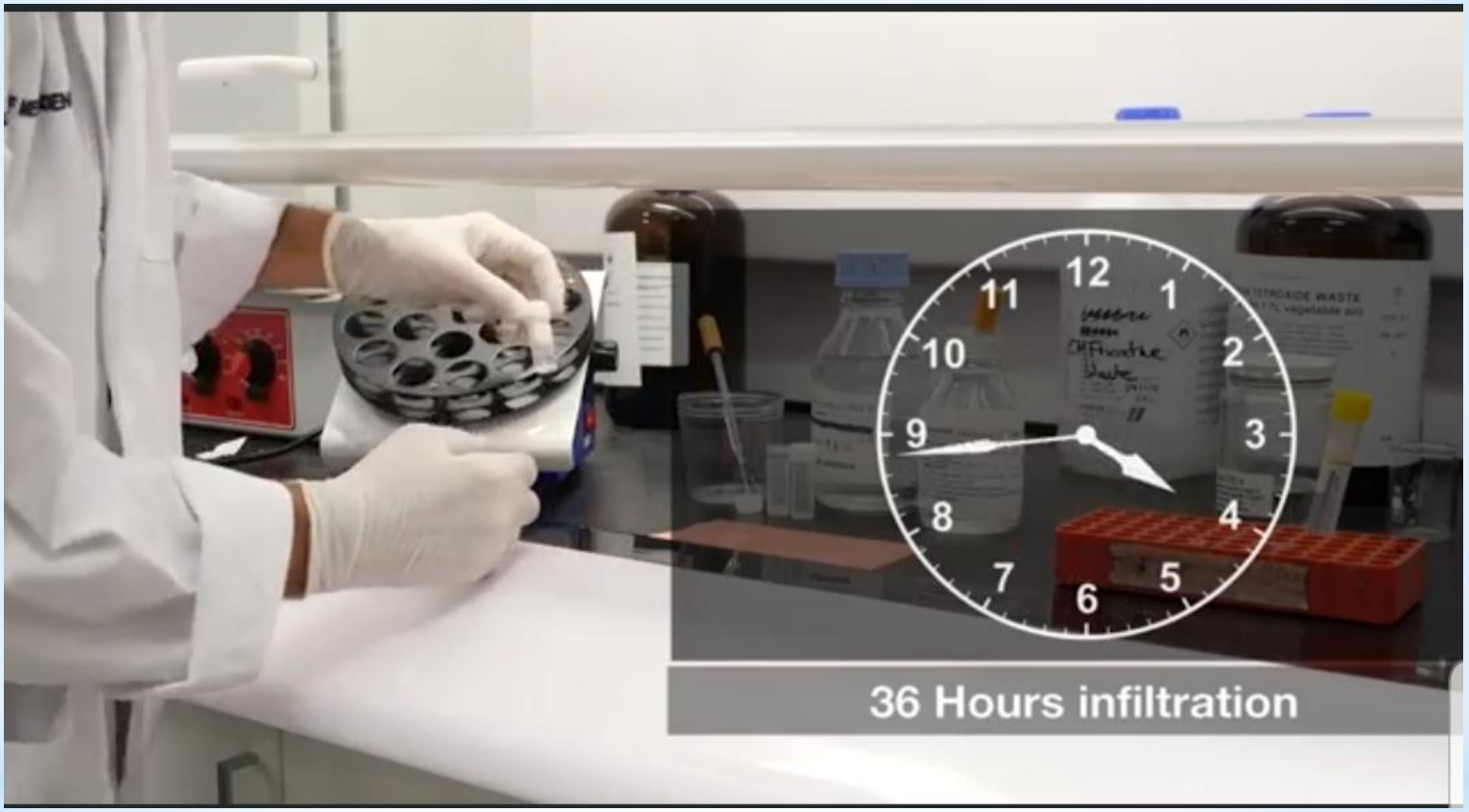
1. Dehydration


Dehydration
70%
85%
100%

۳– شفافیت دهی(Clearing):

نمونه‌ها دوبار و هربار به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اکسیدپروپیلن (Propylene Oxide) قرار گرفته تا درون سلول‌ها و اطراف آن‌ها شفاف‌گردند.

Propylene oxide
clearing


12
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
36 Hours infiltration

۴- نفوذ تدریجی ماده قالب گیری(Infiltration):

در این مرحله نمونه‌ها در محلولی با ترکیب رزین(Resin) و پروپیلن‌اکساید قرار می‌گیرند، به طوریکه به ترتیب در زمان‌های متوالی (حداقل ۲۰ دقیقه) می‌بایست درصد پروپیلن‌اکسید از ۹۰ درصد و رزین از ۱۰ درصد به پروپیلن‌اکسید ۱۰ درصد و رزین ۹۰ درصد تغییر پیدا کند. نهایتاً نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ظرفی حاوی رزین خالص قرار می‌گیرند. (رزین ترکیب تجارتی است که جهت قالب‌گیری نمونه‌ها، نفوذ تدریجی آن به داخل بافت، اطراف سلول و درون سلول از آن استفاده می‌شود).

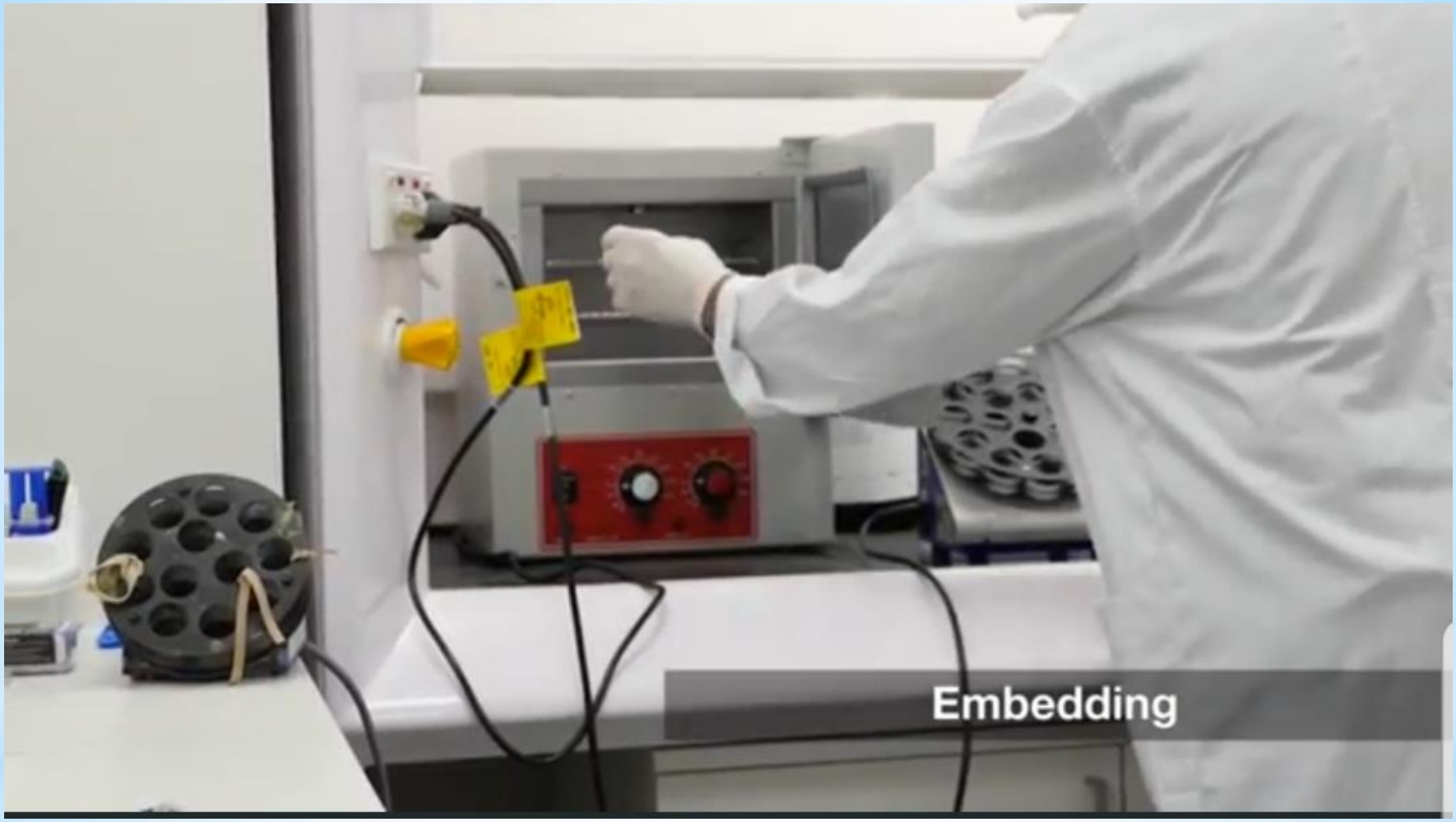
۵- قالب‌گیری(Embedding):

قالب‌گیری نمونه‌ها در رزین ۱۰۰ درصد در قالب‌های مخصوص استوانه‌ای(Rod Capsule) یا مسطح(Flat Mold) انجام می‌شود. در این مرحله، جهت‌گیری(Orientation)نمونه‌ها بسیار مهم بوده، تا بتوان برش‌های صحیح عرضی یا طولی و به طور کامل از نمونه به دست آورد. پس از قرار دادن نمونه‌ها با جهت صحیح در کپسول‌ها و پر کردن کپسول‌ها توسط رزین آن‌ها را به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا رزین که نمونه را در برگرفته سفت و پلیمریزه شده و استحکام محکمی اطراف نمونه به وجود آورد و در هنگام برش‌گیری نمونه از هم متلاشی نشود.

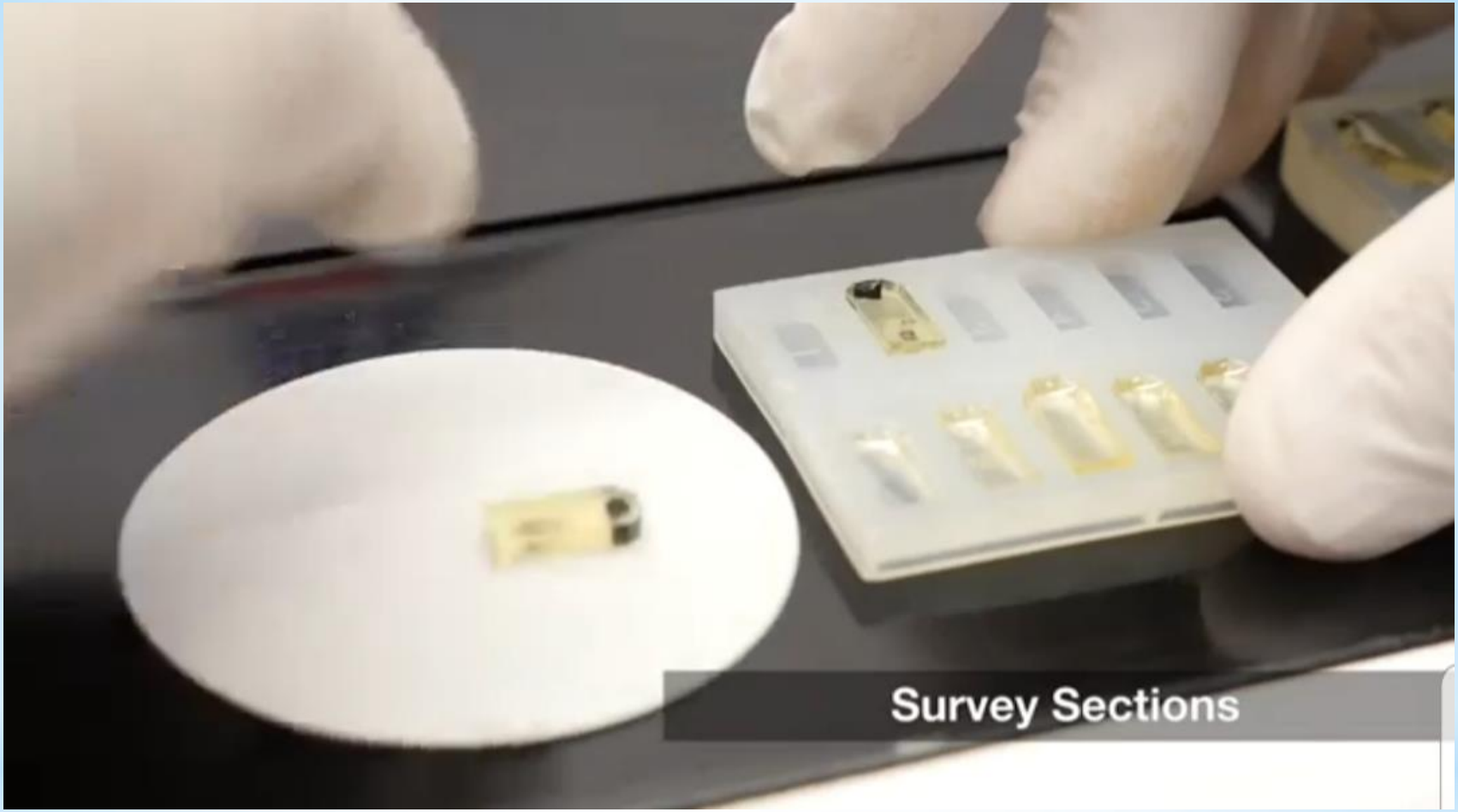
1. Embedding

Embedding

Embedding

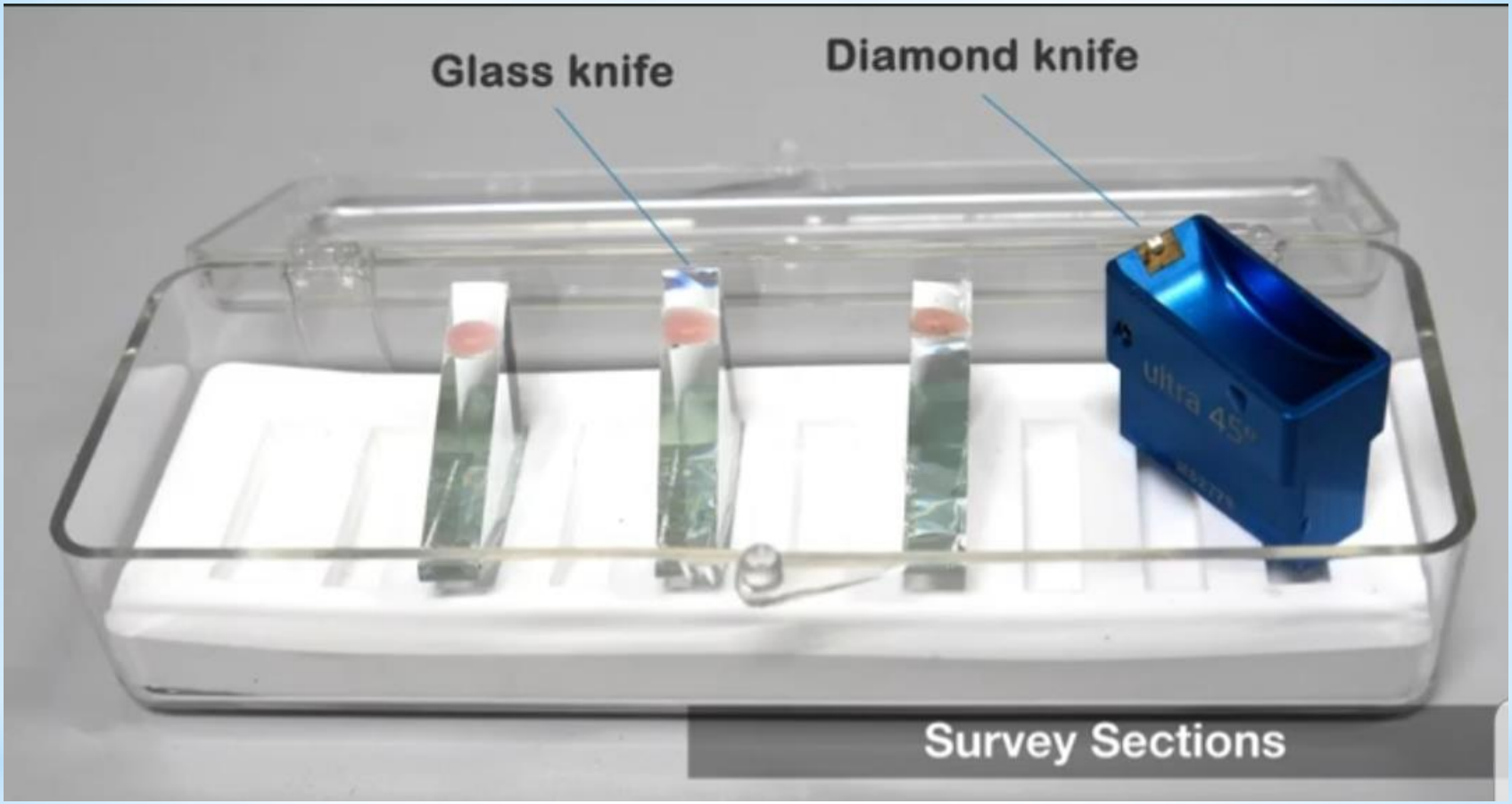

Embedding

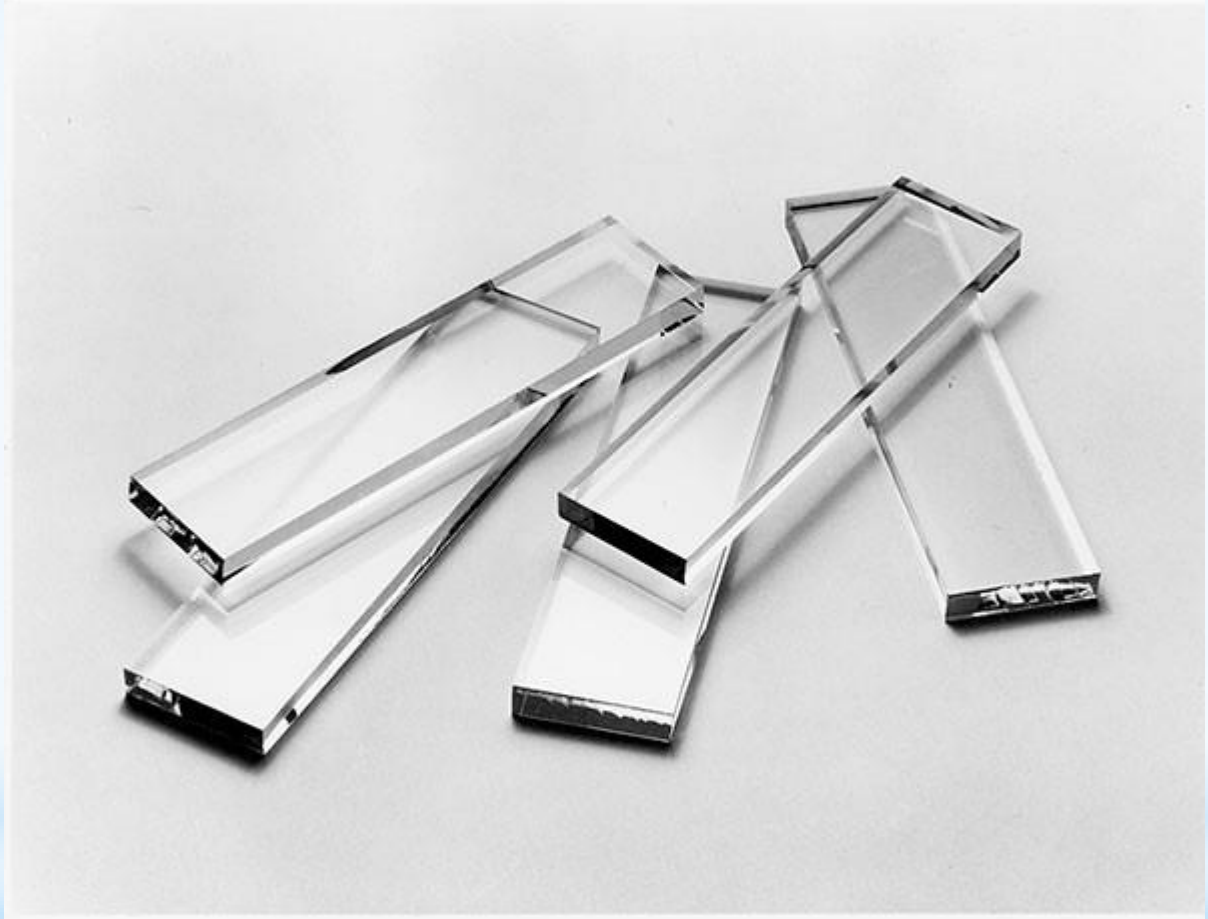
Embedding

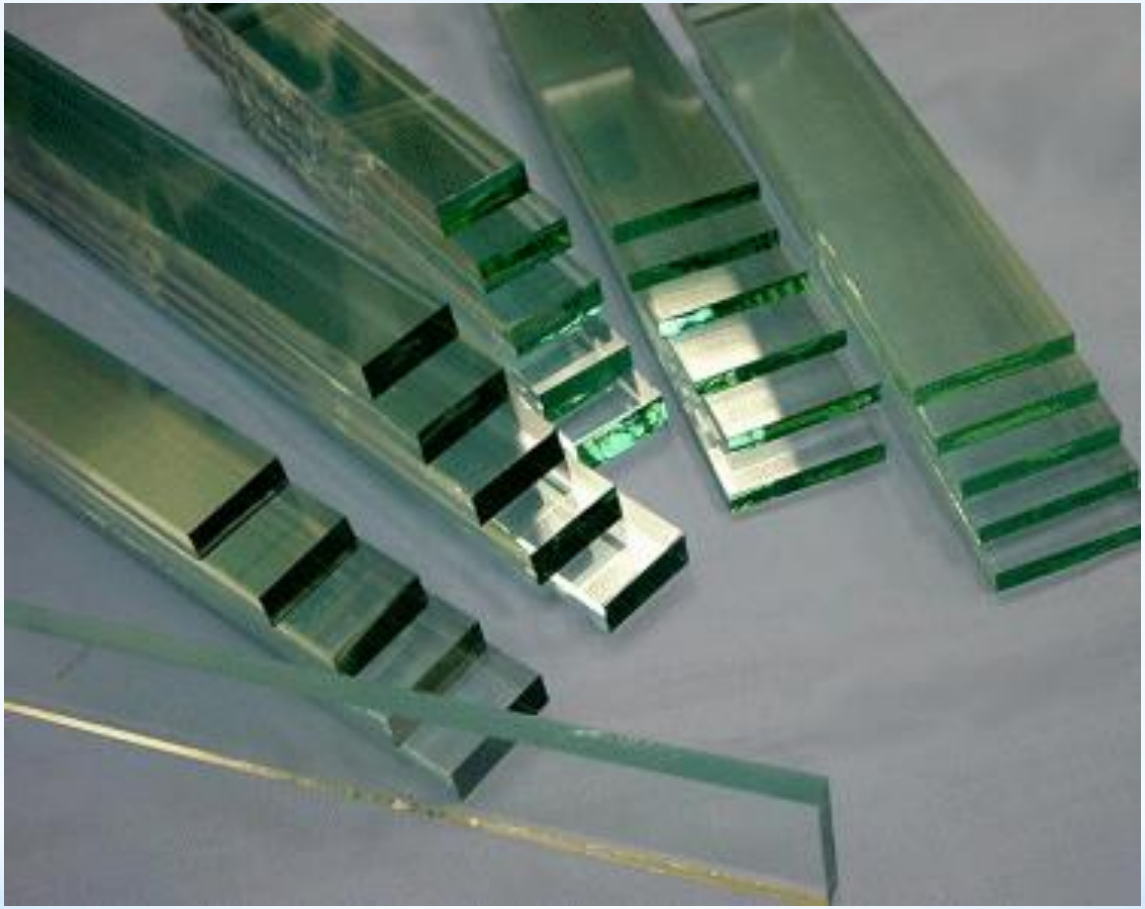

Survey Sections

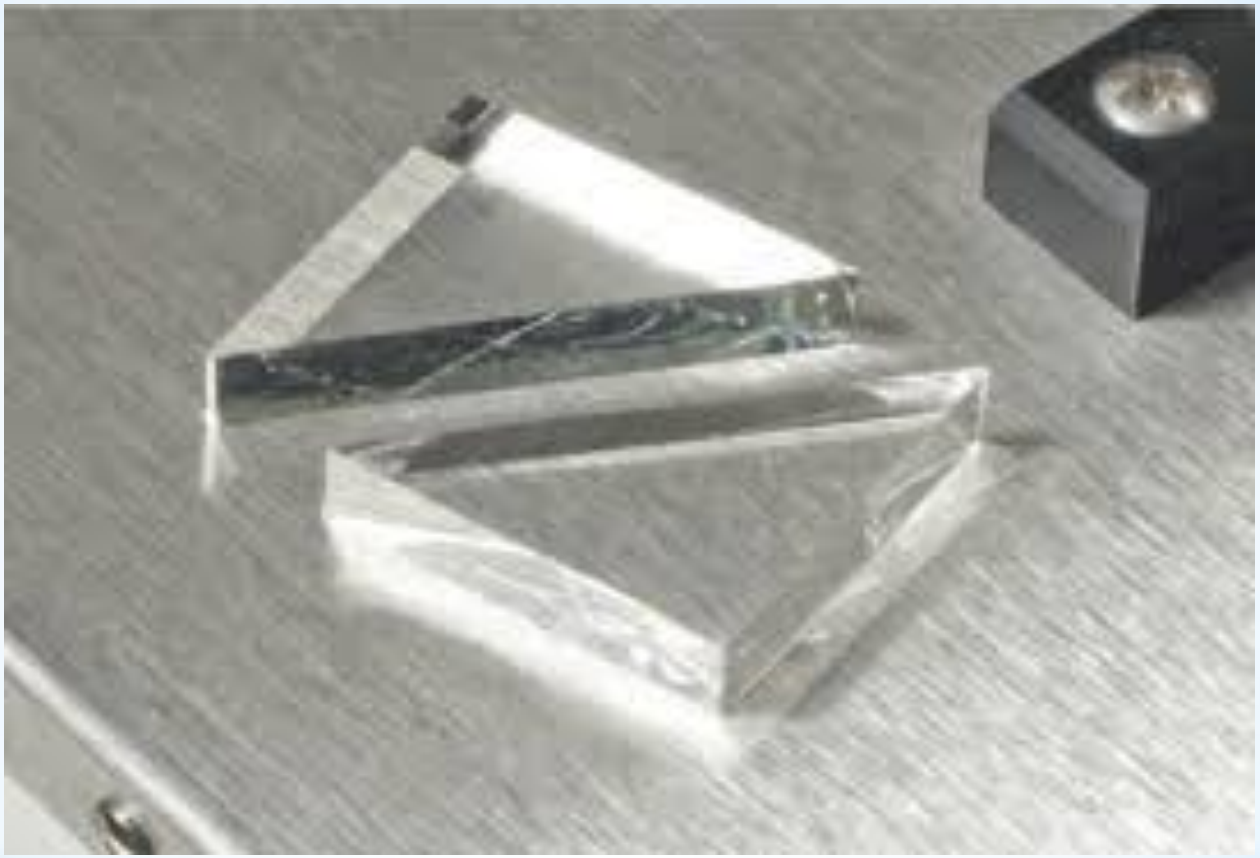
۶– اصلاح (Trimming):

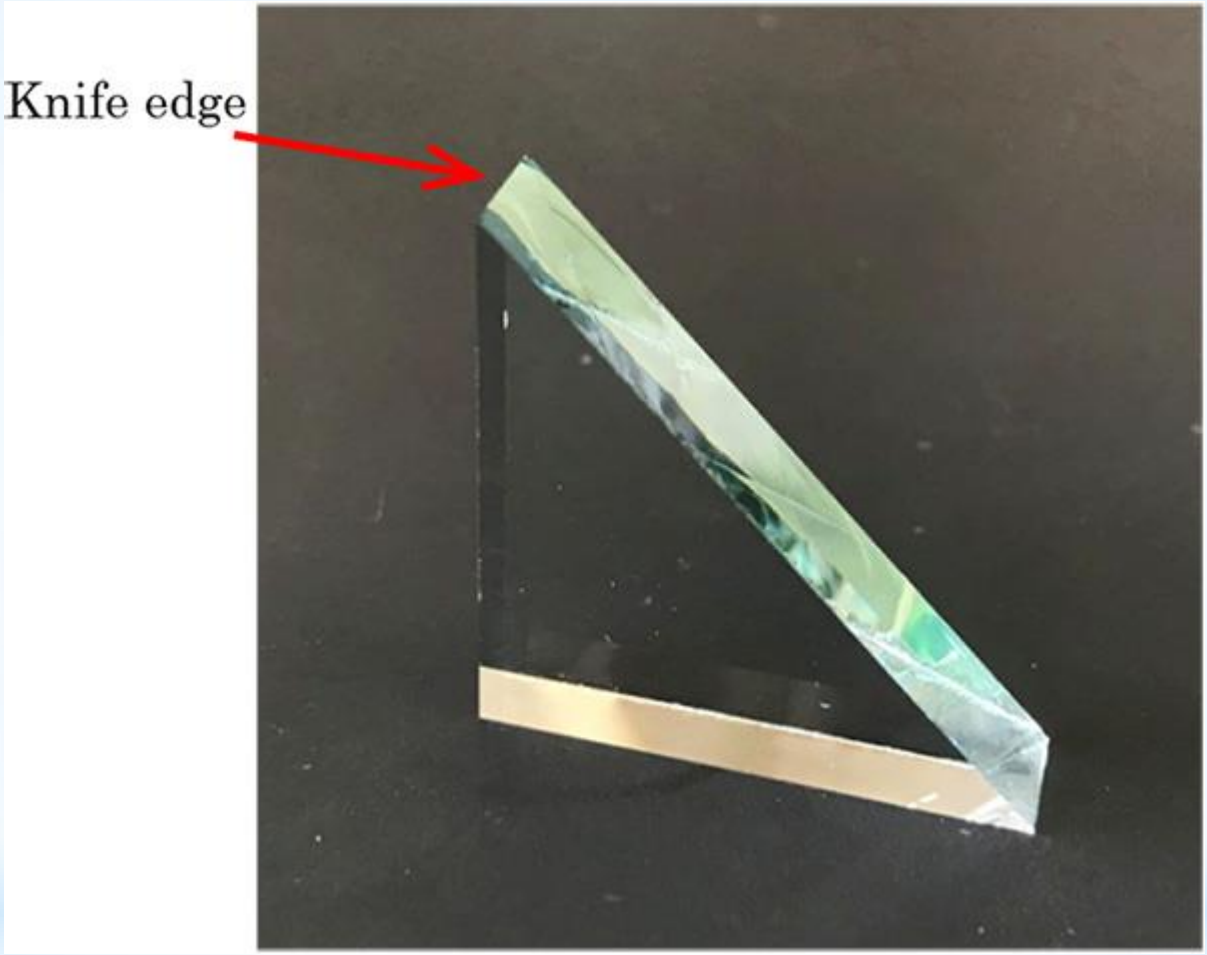
ته کپسولها که حاوی نمونه است بایستی به صورتی اصلاح گردد تا شکل هرم ناقص یا ذوزنقه که پایدارترین شکل هندسی دربرابر تیغ‌های بسیار تیز شیشه‌ای یا الماسی می‌باشند، به وجود آید.

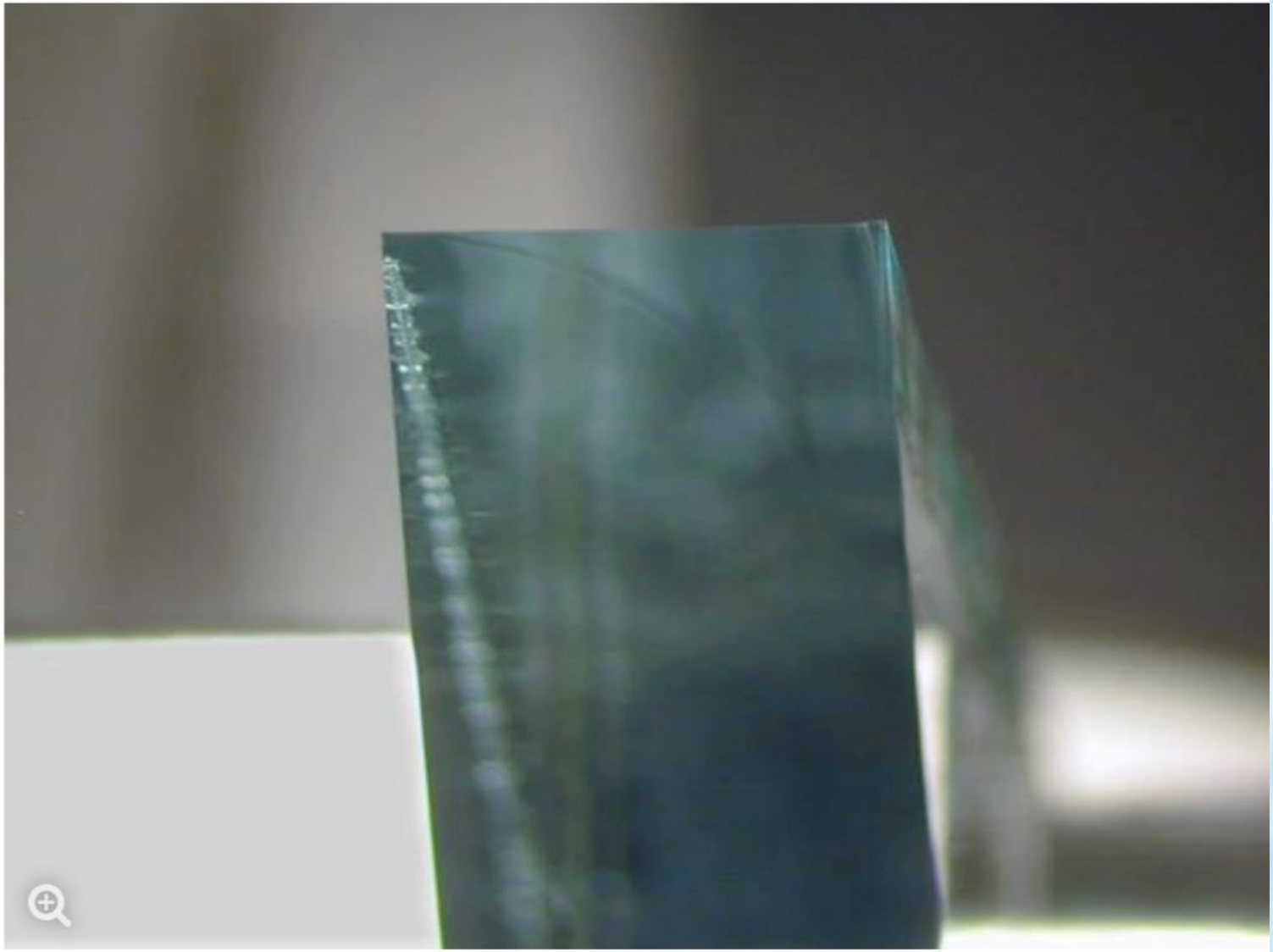

Glass knife
Diamond knife
Survey Sections

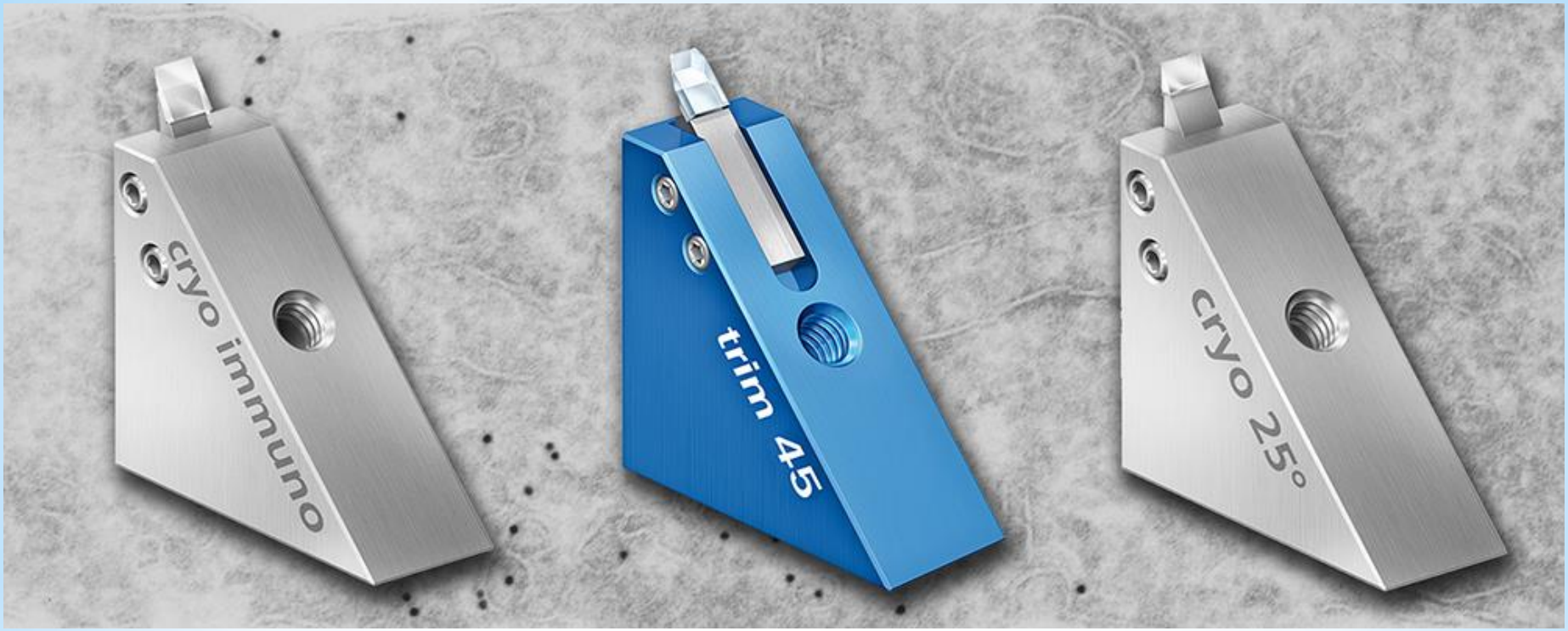






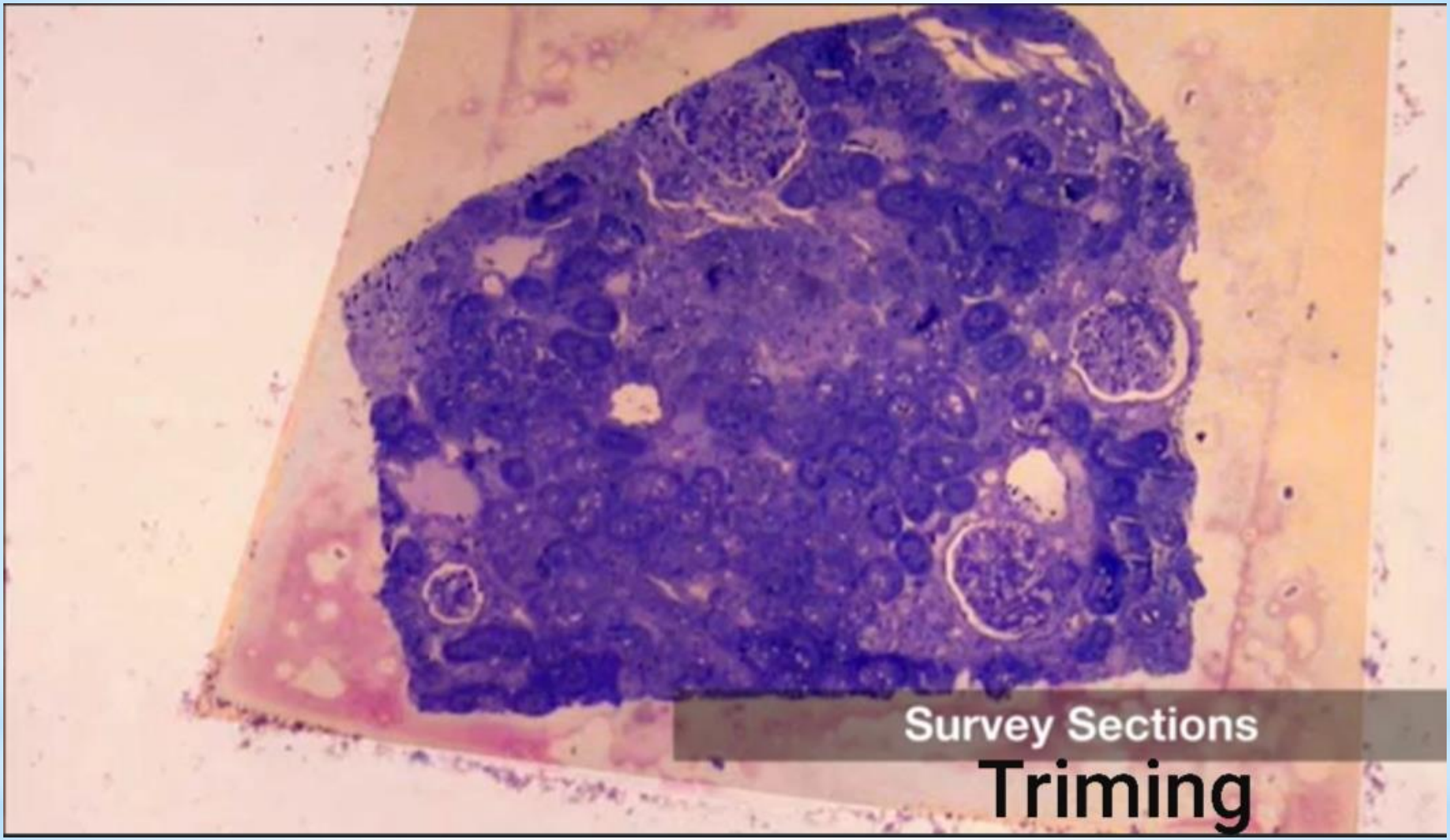

Knife edge

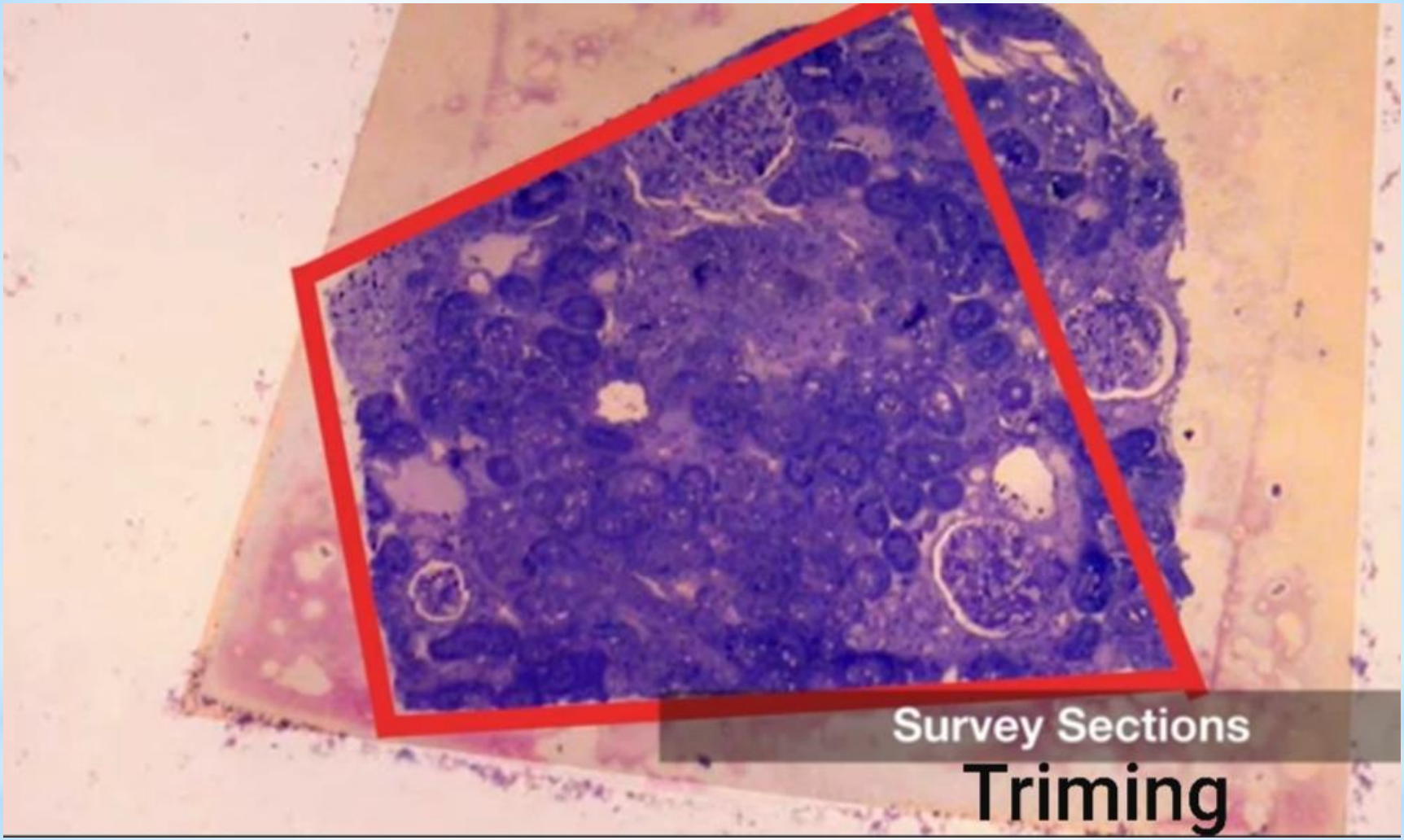


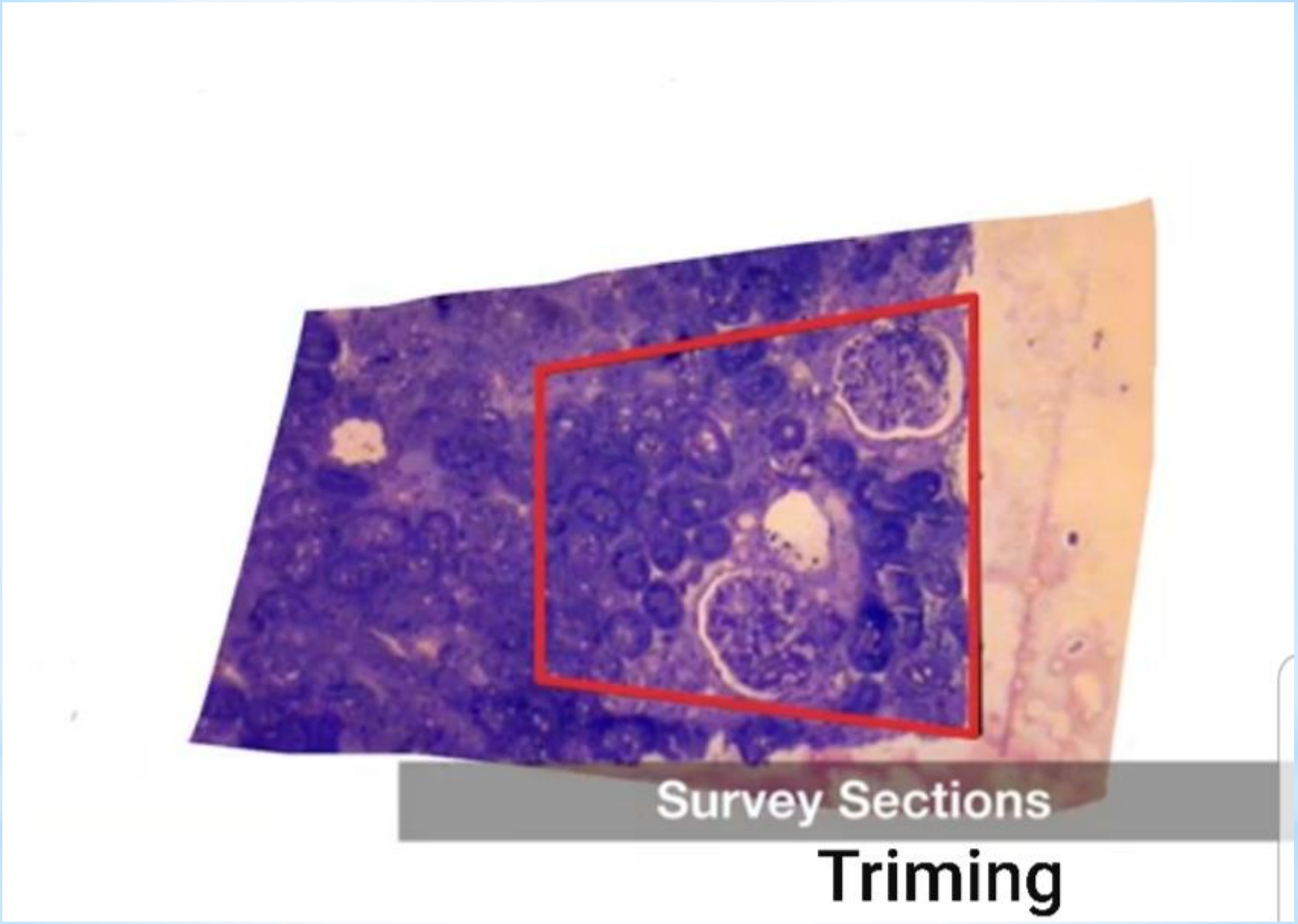

cryo immuno
trim 45
cryo 25°

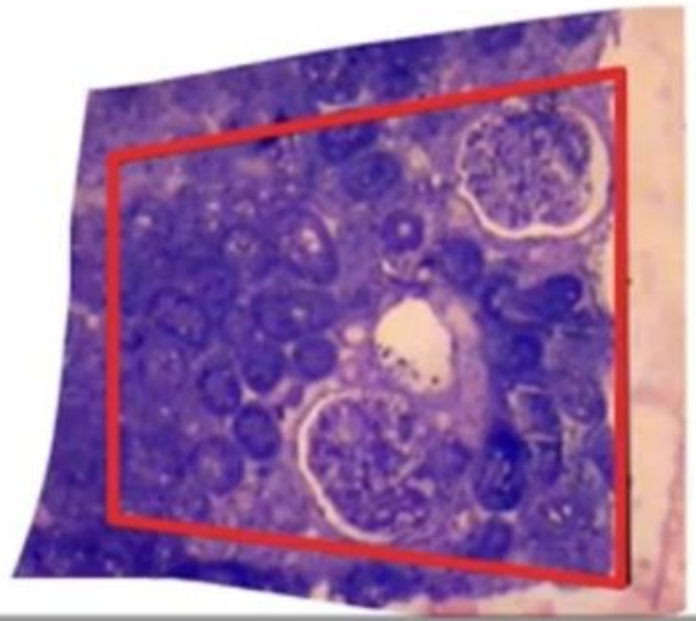
ULTRACUT

Triming
Survey Sections


Survey Sections
Triming


Survey Sections
Triming


Survey Sections
Triming



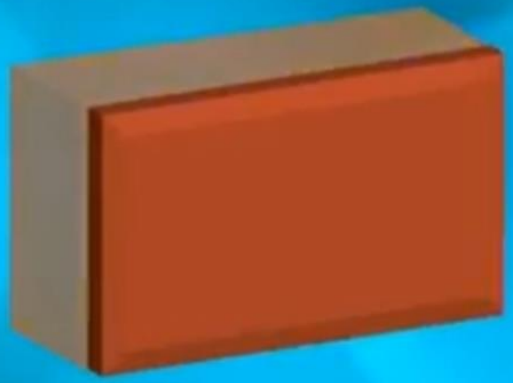
Survey Sections

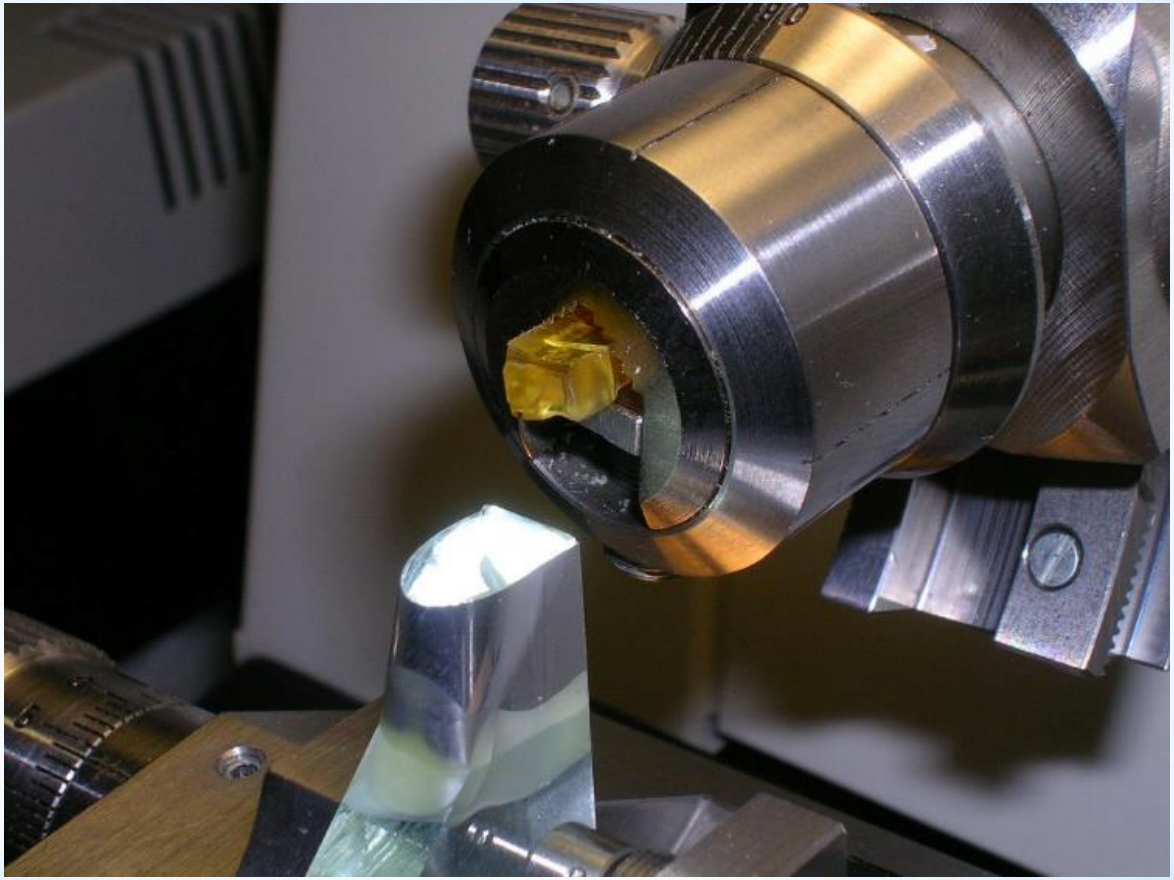
Triming

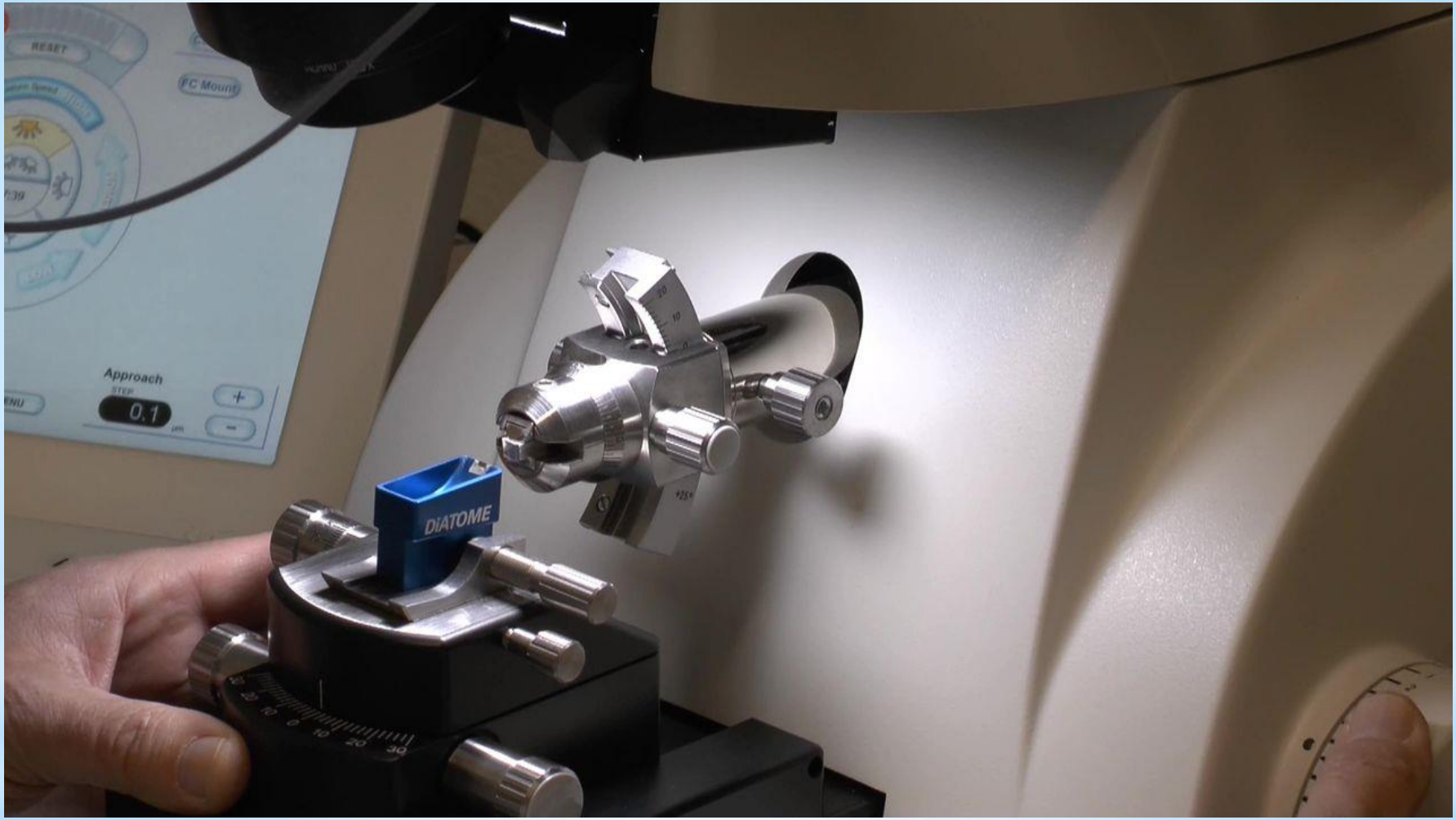
۷- برش‌گیری(Sectioning):

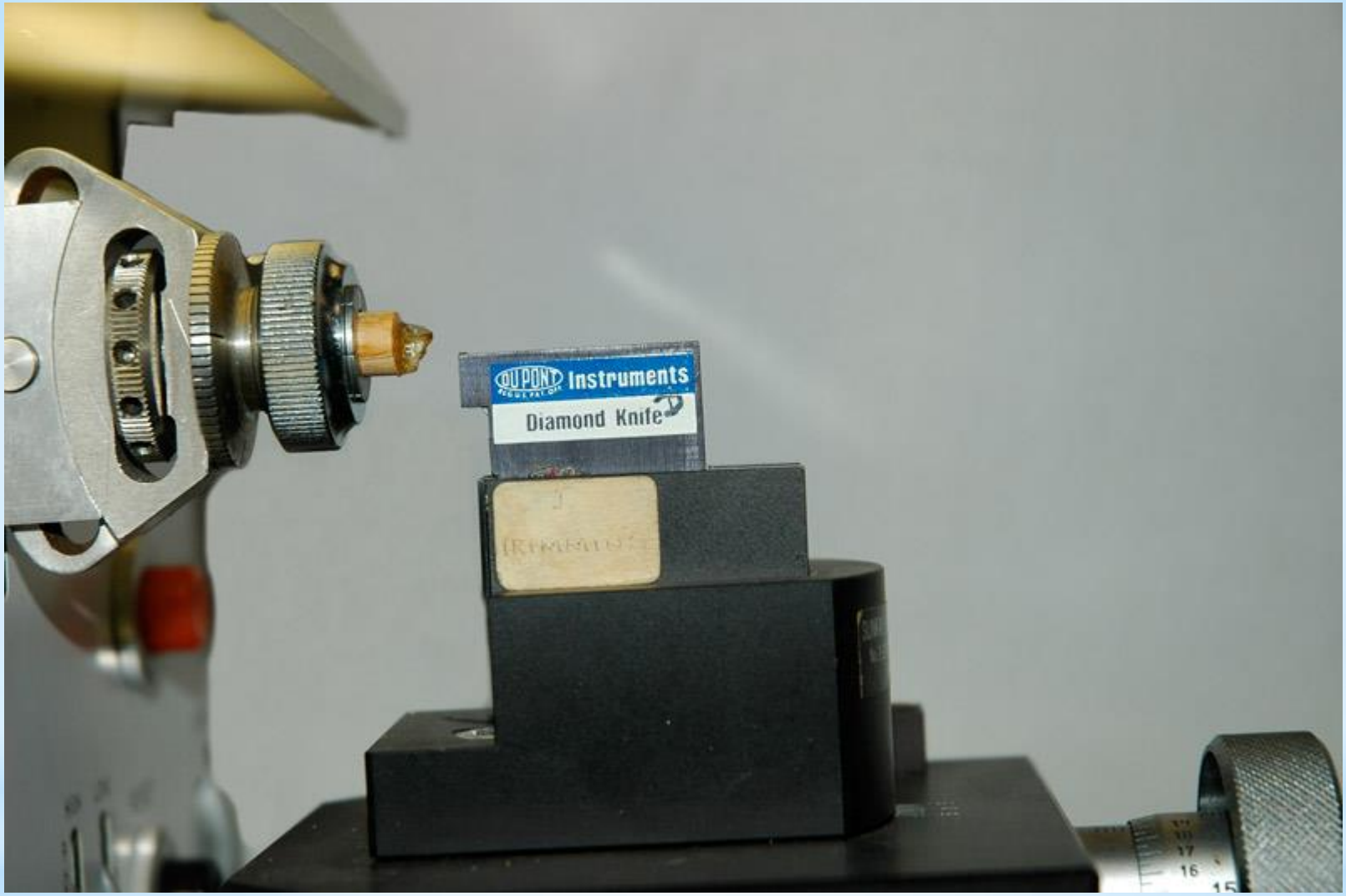
در دو مرحله برش‌گیری انجام می‌شود. ابتدا تهیه برش ضخیم(Thick Section) که حدود ۳۰۰-۲۰۰ نانومتر تهیه و تنظیم می‌شود و سپس مشاهده در میکروسکوپ نوری و حذف قسمت‌های اضافی و آماده کردن نمونه جهت گرفتن برش نازک(Thin Section) حدود ۸۰-۷۰ نانومتر جهت بررسی در میکروسکوپ الکترونی گذاره.برش‌گیری توسط دستگاه اولترامیکروتوم که مجهز به میکروسکوپ استریو (لوپ) می‌باشد و به وسیله کارد شیشه‌ای(Glass Knife) یا کارد الماسی(Diamond Knife) که از برنده‌ترین لبه‌های موجود در طبیعت می‌باشند، انجام می‌شود. کارد شیشه‌ای توسط دستگاه سازنده کارد(Knife Maker) آماده می‌شود.پس از تنظیم دستگاه اولترامیکروتوم و گرفتن برش‌های مناسب نمونه‌ها بر روی آب مقطر درون چاهک‌های ویژه و توسط وسیله‌ای از جنس مس یا طلا به نام گرید(Grid)جمع آوری می‌شوند. گریدها داری خانه‌بندی‌های متفاوتی هستند که با واحد مش(Mesh)بیان می‌شود. به عنوان مثال گرید ۲۰۰ مش یا ۳۰۰ مش.

1. Sectioning

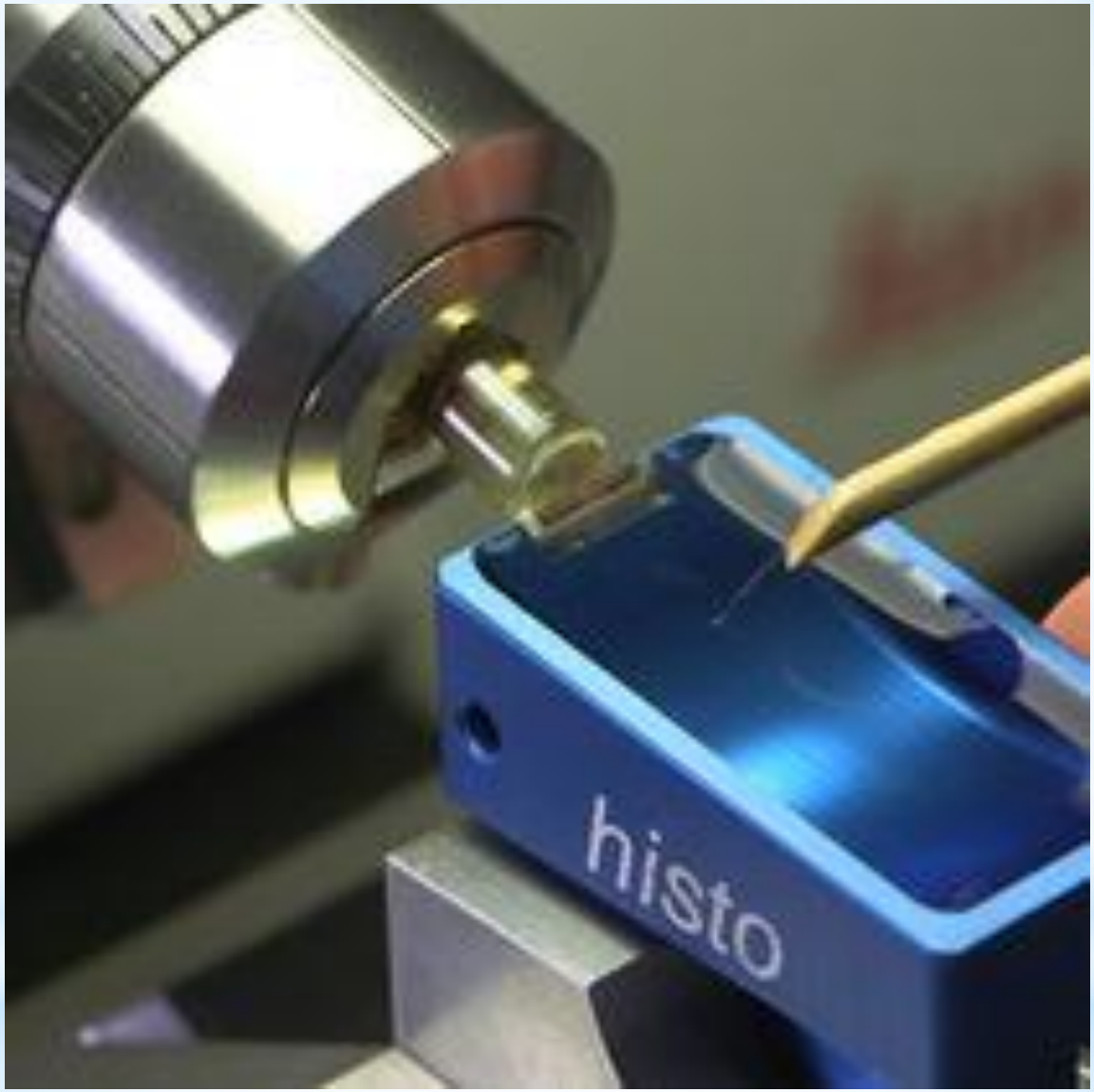


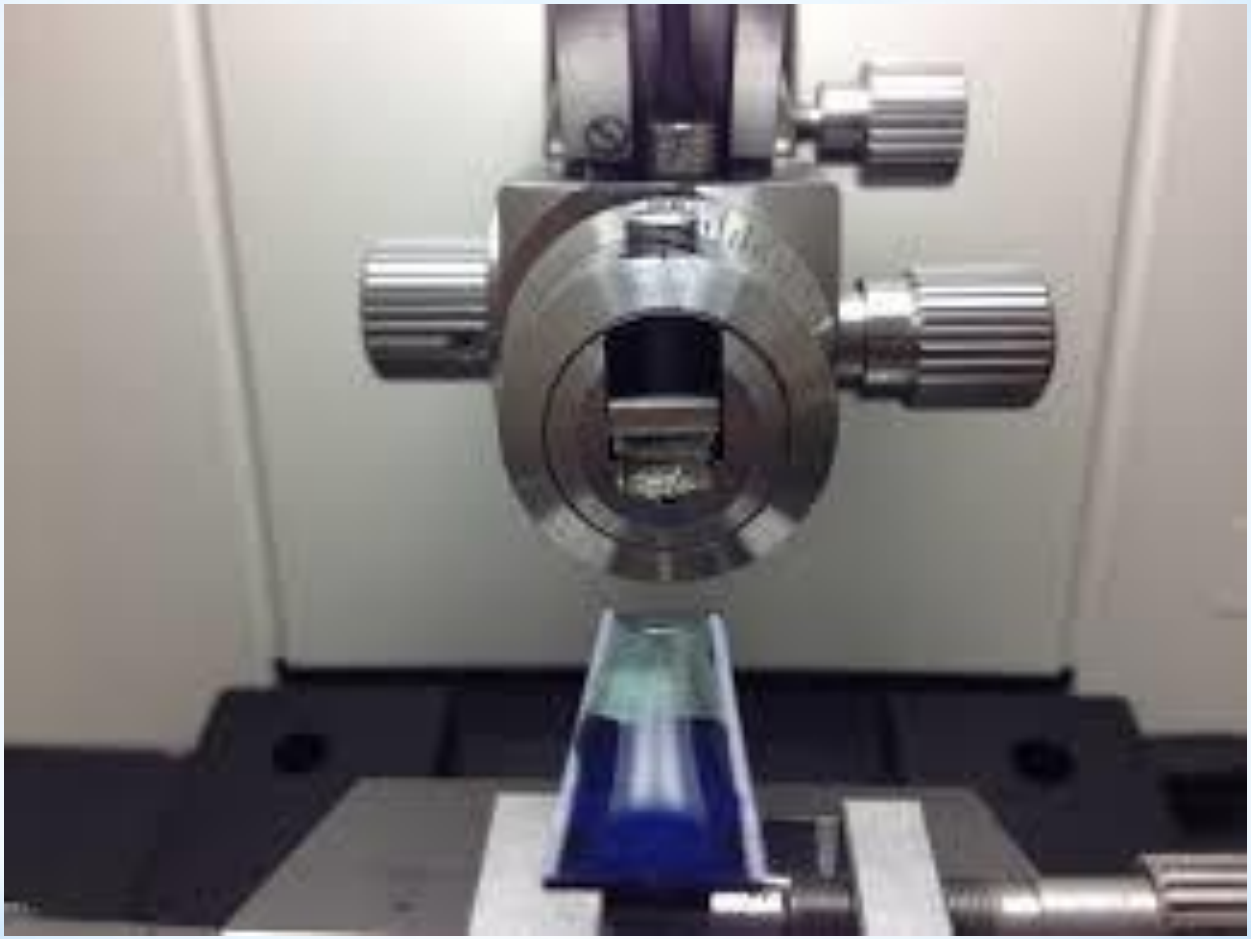


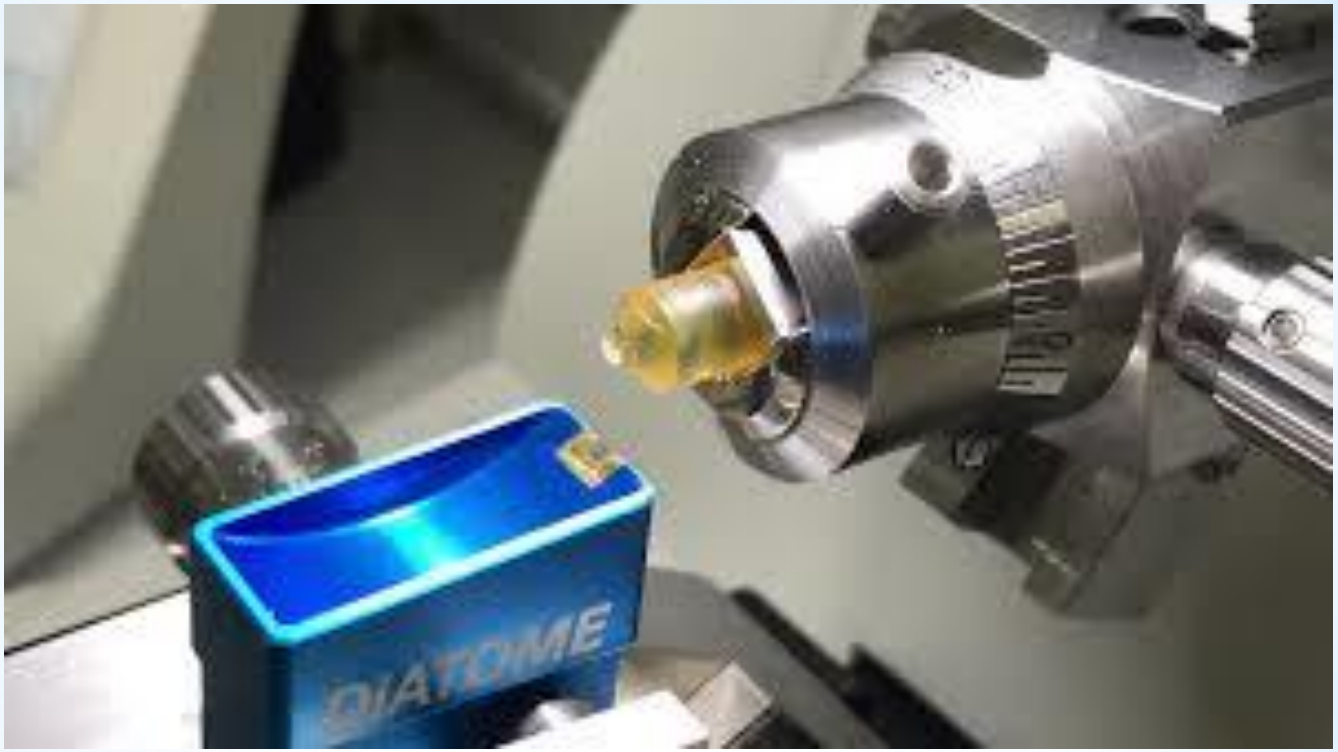

RESET
FC Mount
Approach
STEP
0.1
DIATOME

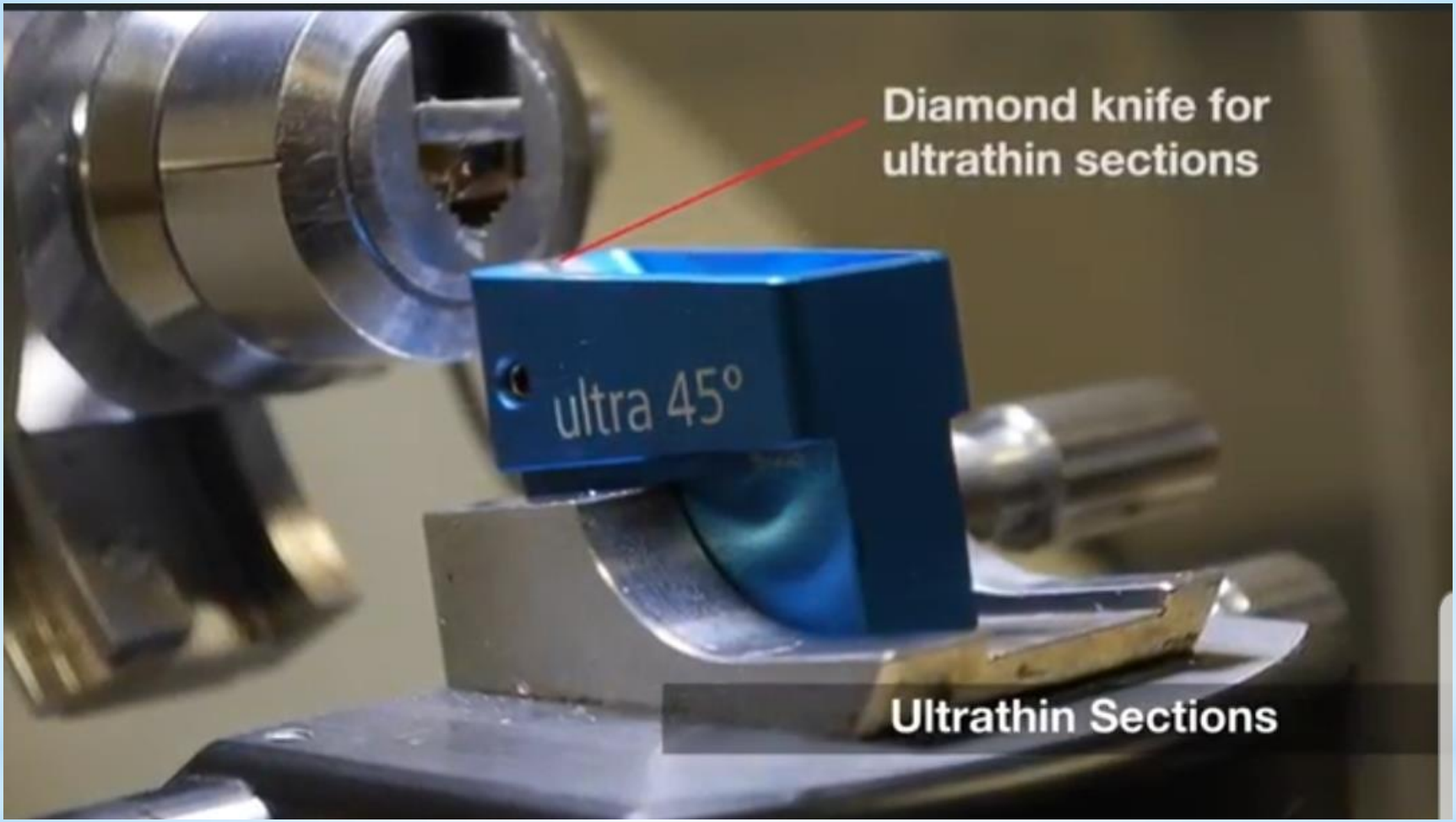

DUPONT
Instruments
Diamond Knife

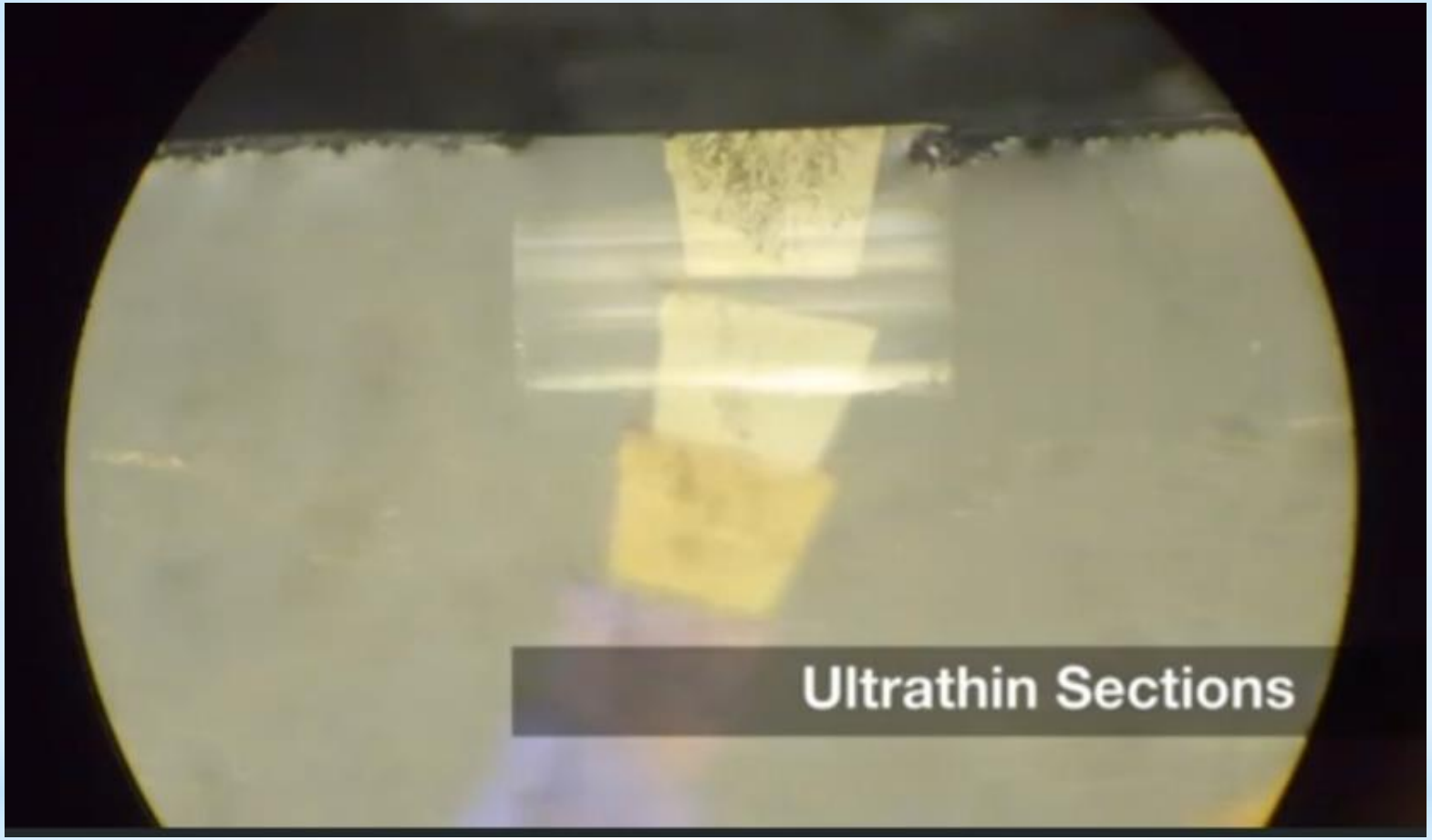
ULTRACUT S


histo




DIATOME


Diamond knife for
ultrathin sections
ultra 45°
Ultrathin Sections


Ultrathin Sections

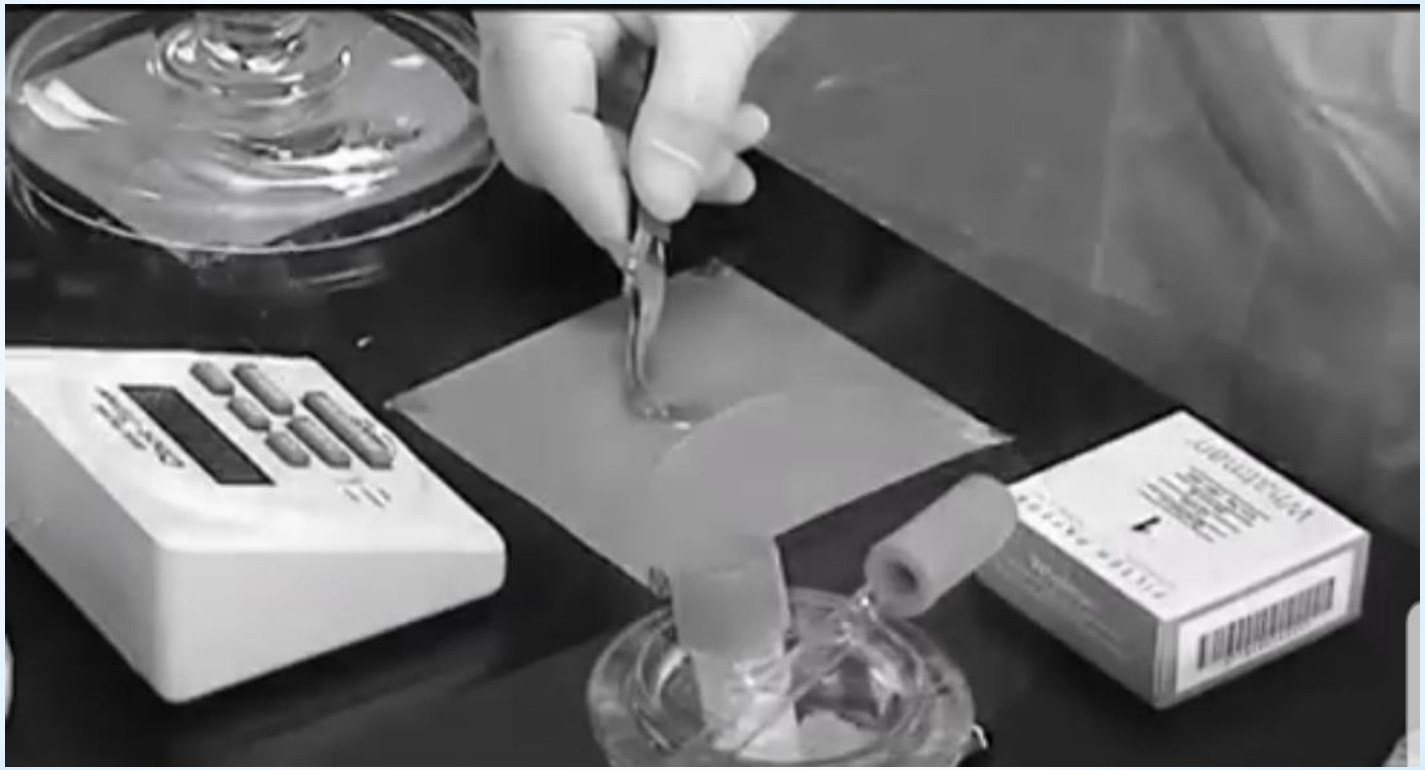
Survey Sections

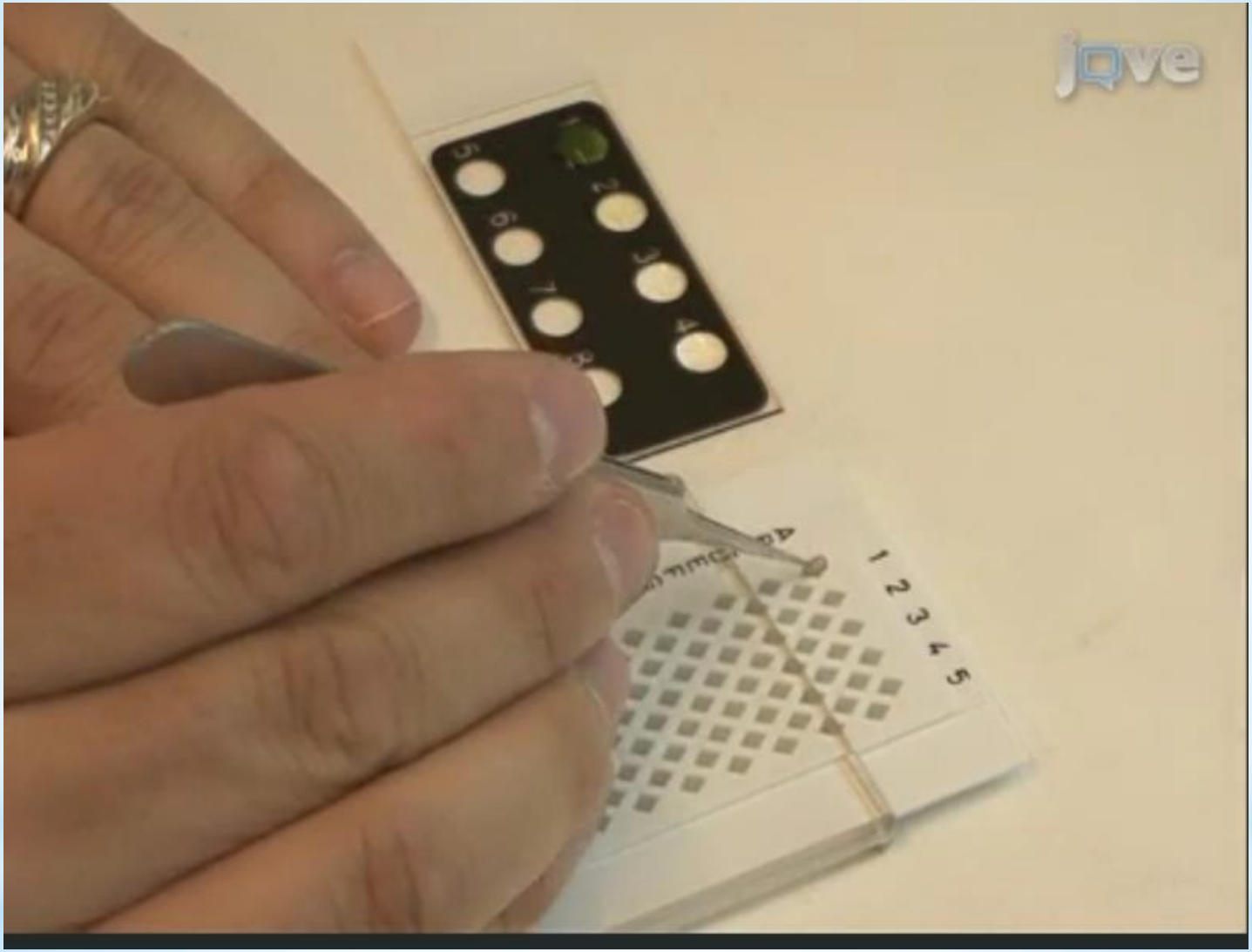
لازم به ذکر است که جهت مقاومت نمونه‌ها بر روی گرید در برابر بمباران الکترونی در میکروسکوپ، گریدها قبل از جمع‌آوری نمونه باید توسط پوششی به نام فرم وار ((Formvarپوشش‌دهی شوند تا احتمال کنده‌شدن نمونه از روی گرید کاهش یابد.

۸- رنگ آمیزی(Staining):

رنگ‌آمیزی در میکروسکوپ الکترونی به معنای عام آن نیست و با رنگ‌های رنگی(Color dyes) صورت نمی‌گیرد. بلکه به منظور دادن تضاد به نمونه، رنگ‌آمیزی توسط فلزات سنگین(Heavy metals) مثل استات اورانیوم (Uranium acetate) به مدت ۲۰ دقیقه و سیترات‌سرب(Lead citrate) به مدت ۱۰ دقیقه انجام می‌شود. بین دو مرحله رنگ‌آمیزی نمونه توسط آب مقطر بایستی شست و شو داده شود.

1. Staining




jove

۹–شستشو(washing):

شستشوی نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی بایستی توسط آب دو بار تقطیر شده یا آب دی یونیزه شده انجام شود تا نمونه کاملاً تمیز و عاری از آلودگی شود.

۱۰– مشاهده (Observation) تحت میکروسکوپ TEM

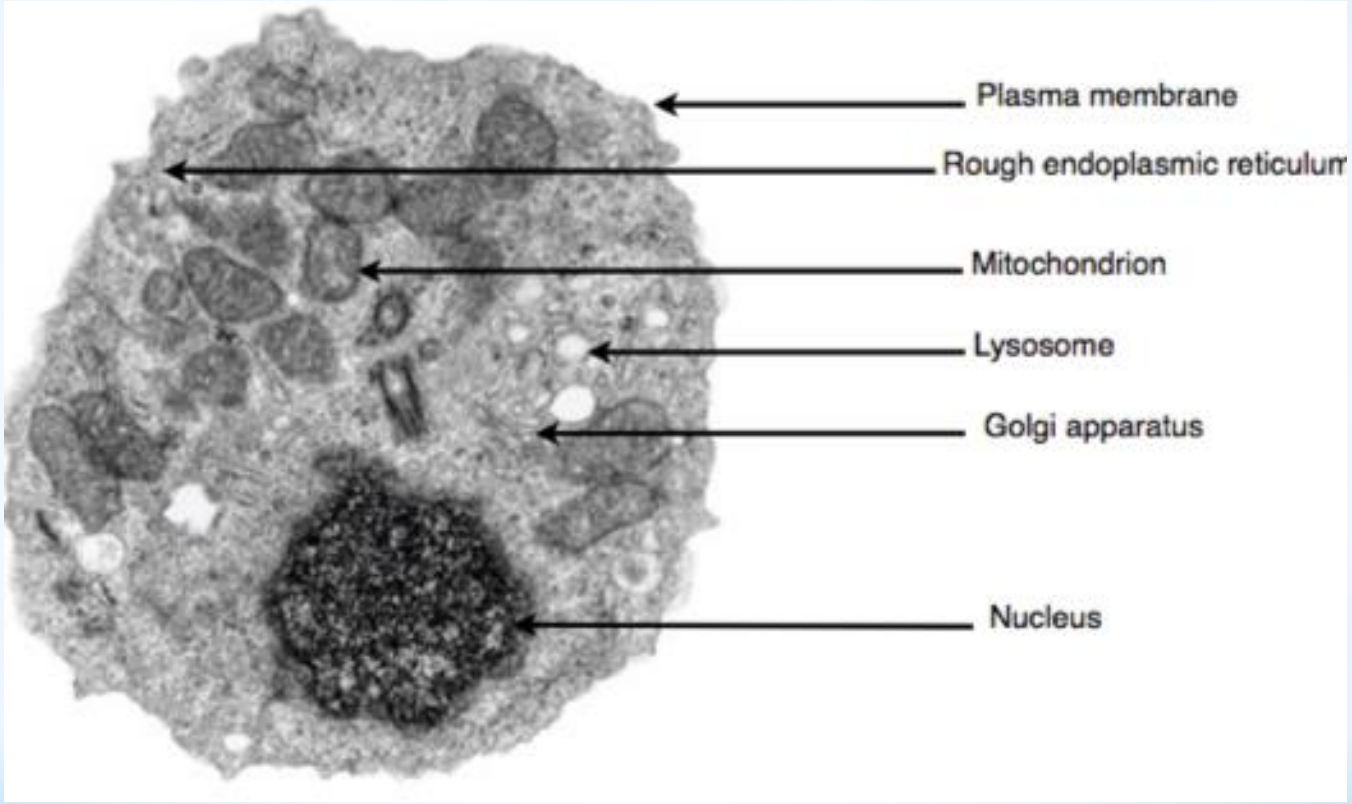
گریدهای حاوی نمونه در نگهدارنده‌های مخصوصی((Holderقرار گرفته و وارد میکروسکوپ شده و مشاهده می‌شوند. میکروسکوپ، دارای پیچ‌ها و دکمه‌های تنظیم ولتاژ، شدت جریان، بزرگنمایی، درخشندگی، وضوح و ... برای دید بهتر نمونه می‌باشد.

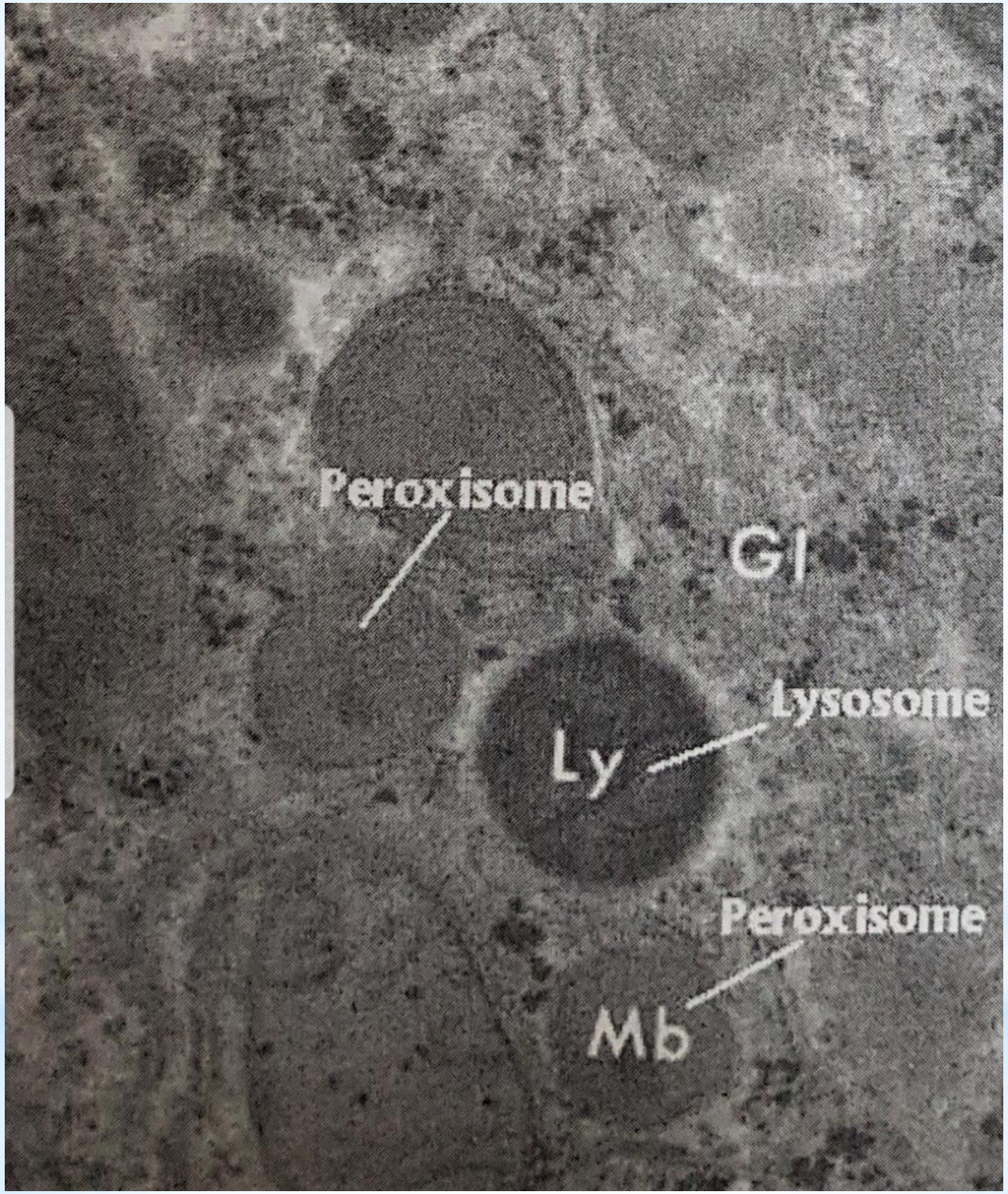
آزمایشگاه سلولی و مولکولی _ فرزانه فروهرفر

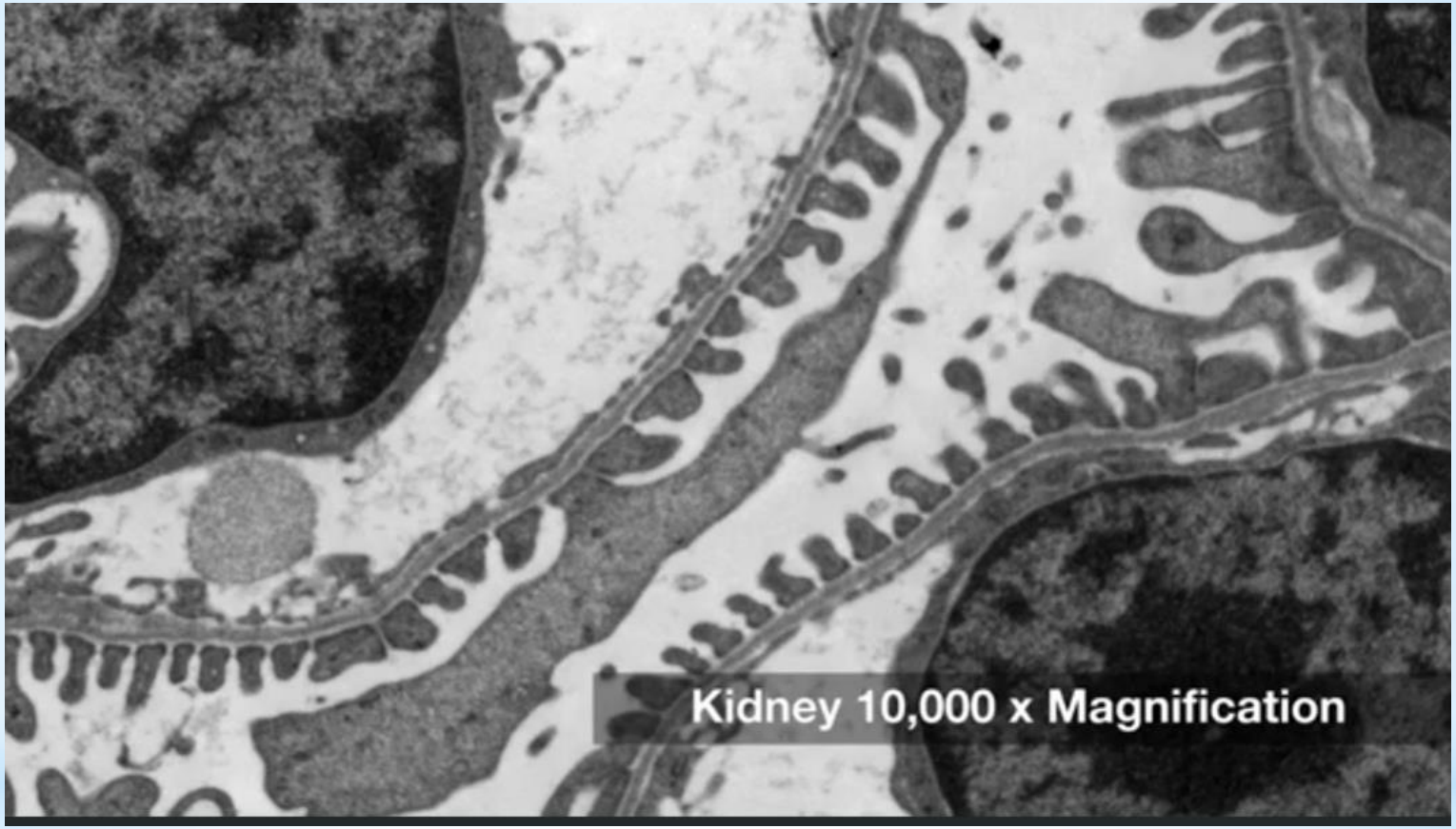
۱۱– عکسبرداری(Photography):

نتایج تحقیقات میکروسکوپ الکترونی حتماً باید بر روی فیلم‌های مخصوص ثبت و عکسبرداری شوند، تا بتوان نتایج را تفسیر و منتشر کرد.

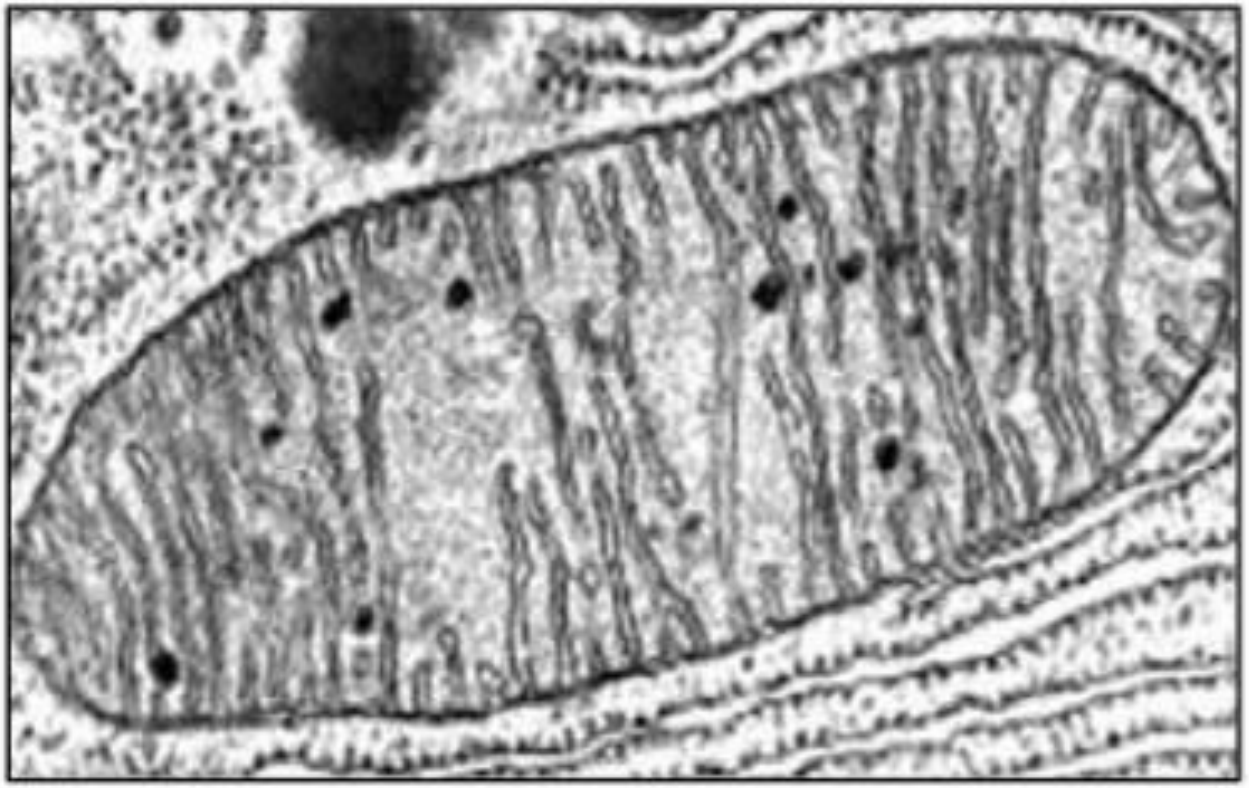
تصاویر در میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن


Plasma membrane
Rough endoplasmic reticulum
Mitochondrion
Lysosome
Golgi apparatus
Nucleus

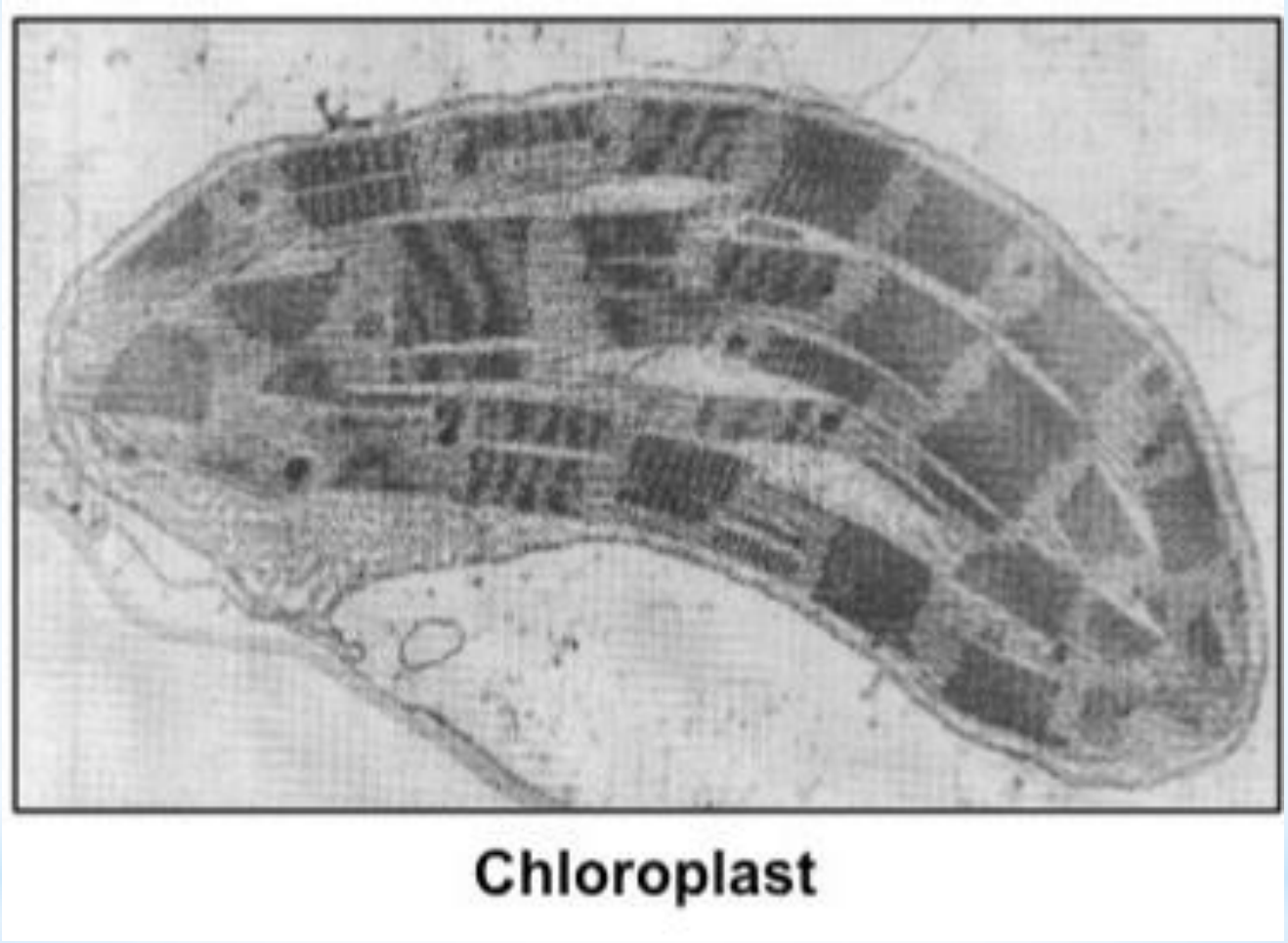

Peroxisome
Gl
Lysosome
Ly
Peroxisome
Mb


Kidney 10,000 x Magnification

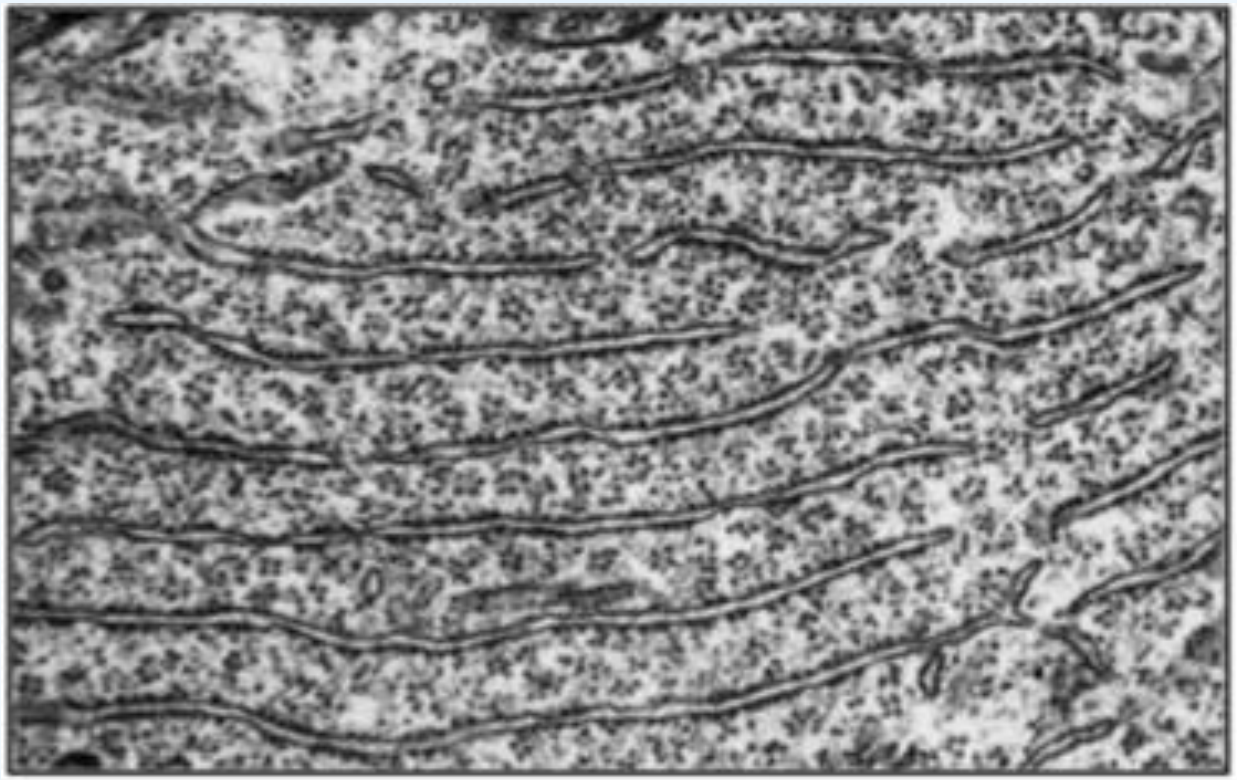
Golgi Apparatus



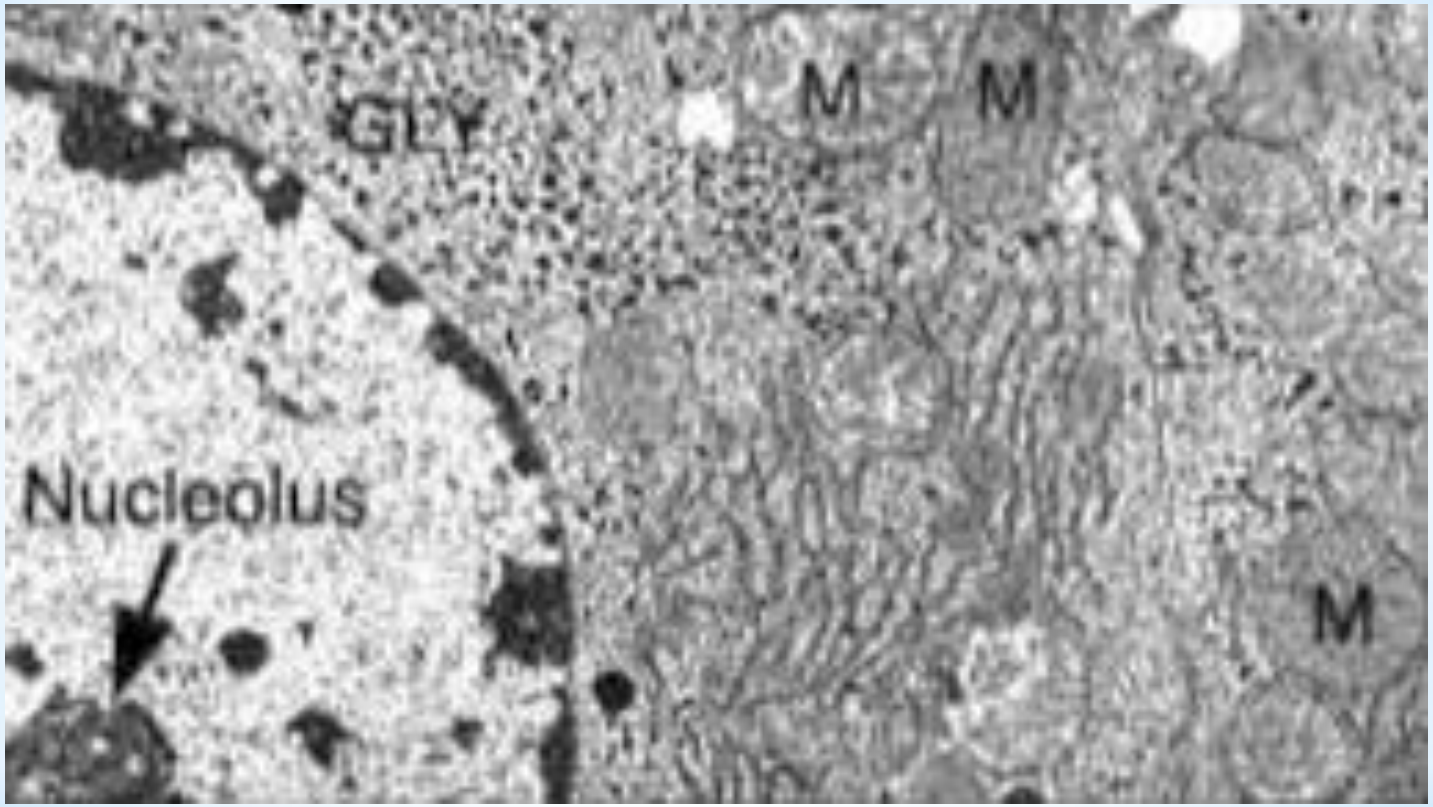
Mitochondrion

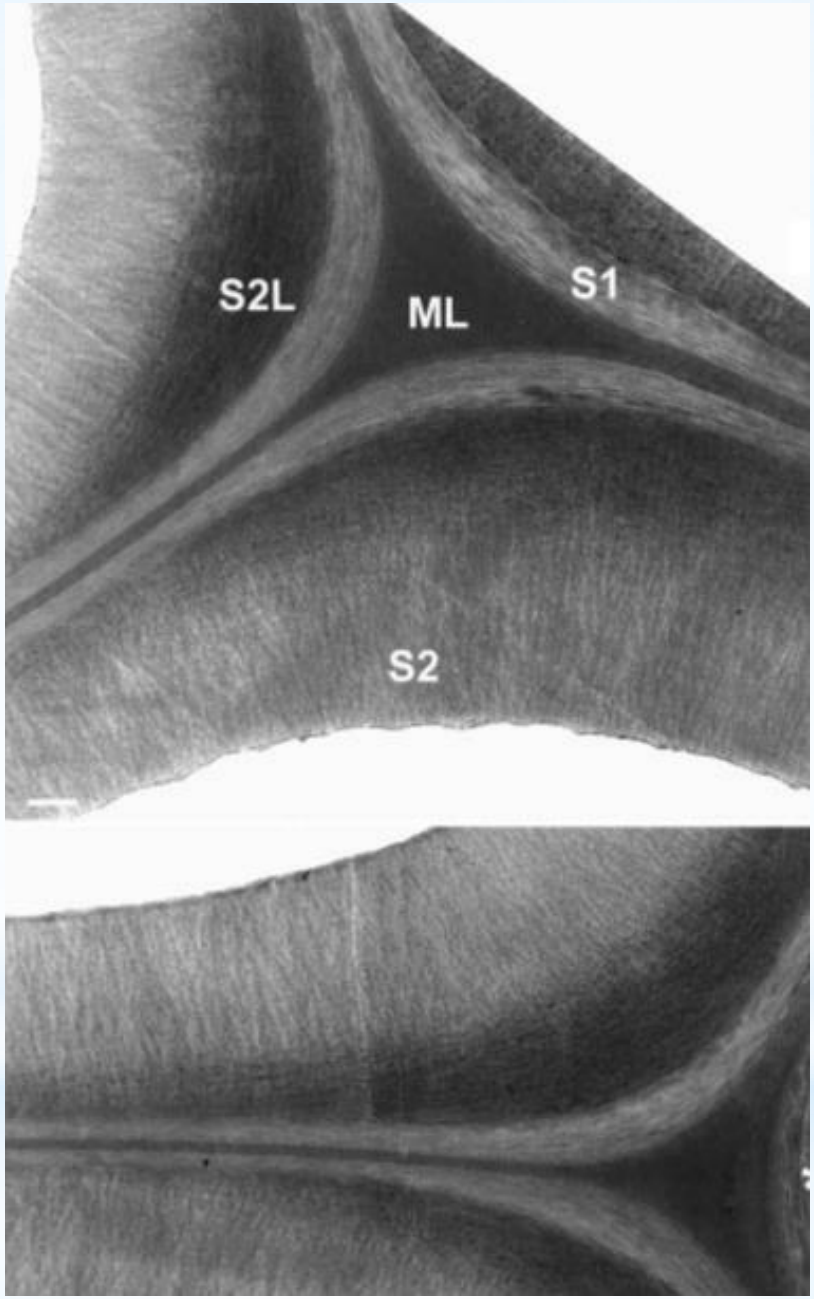


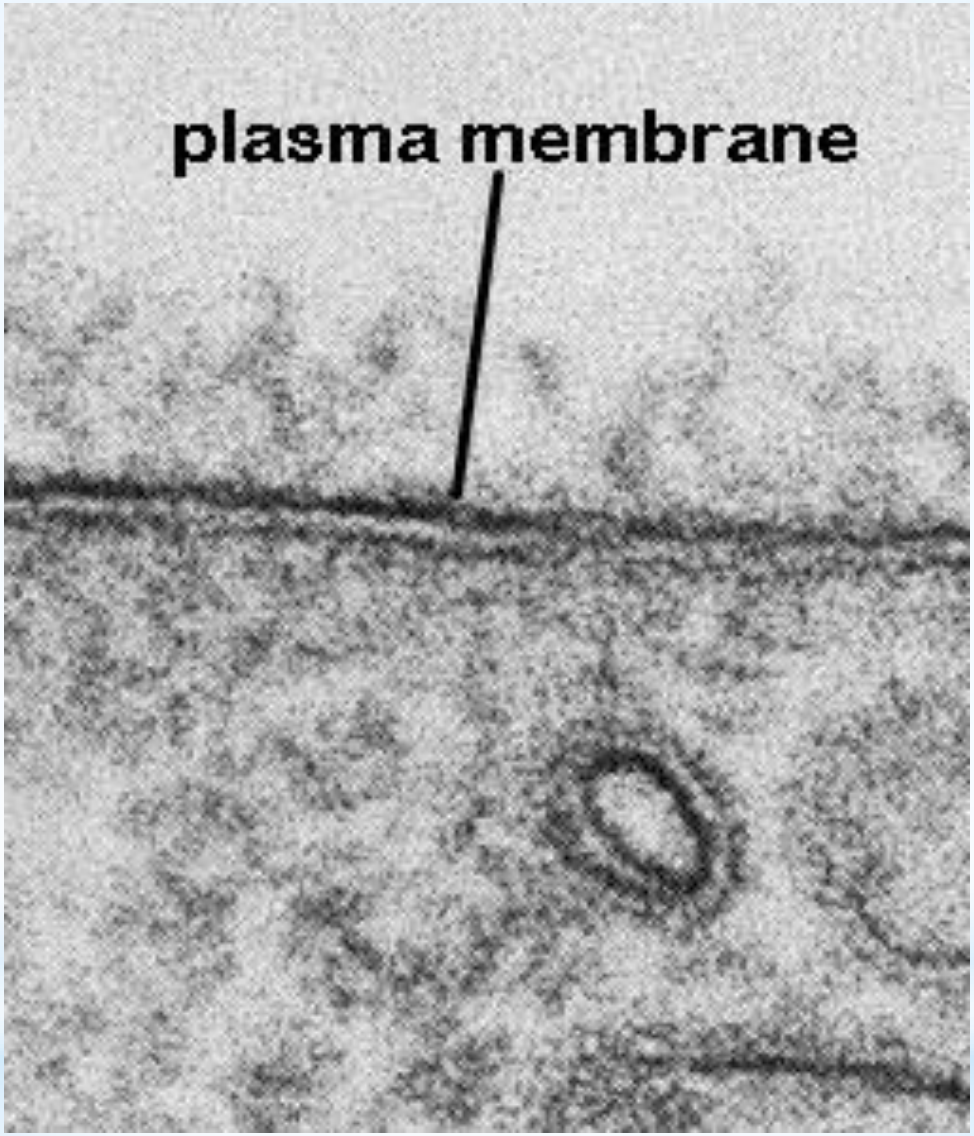
Chloroplast

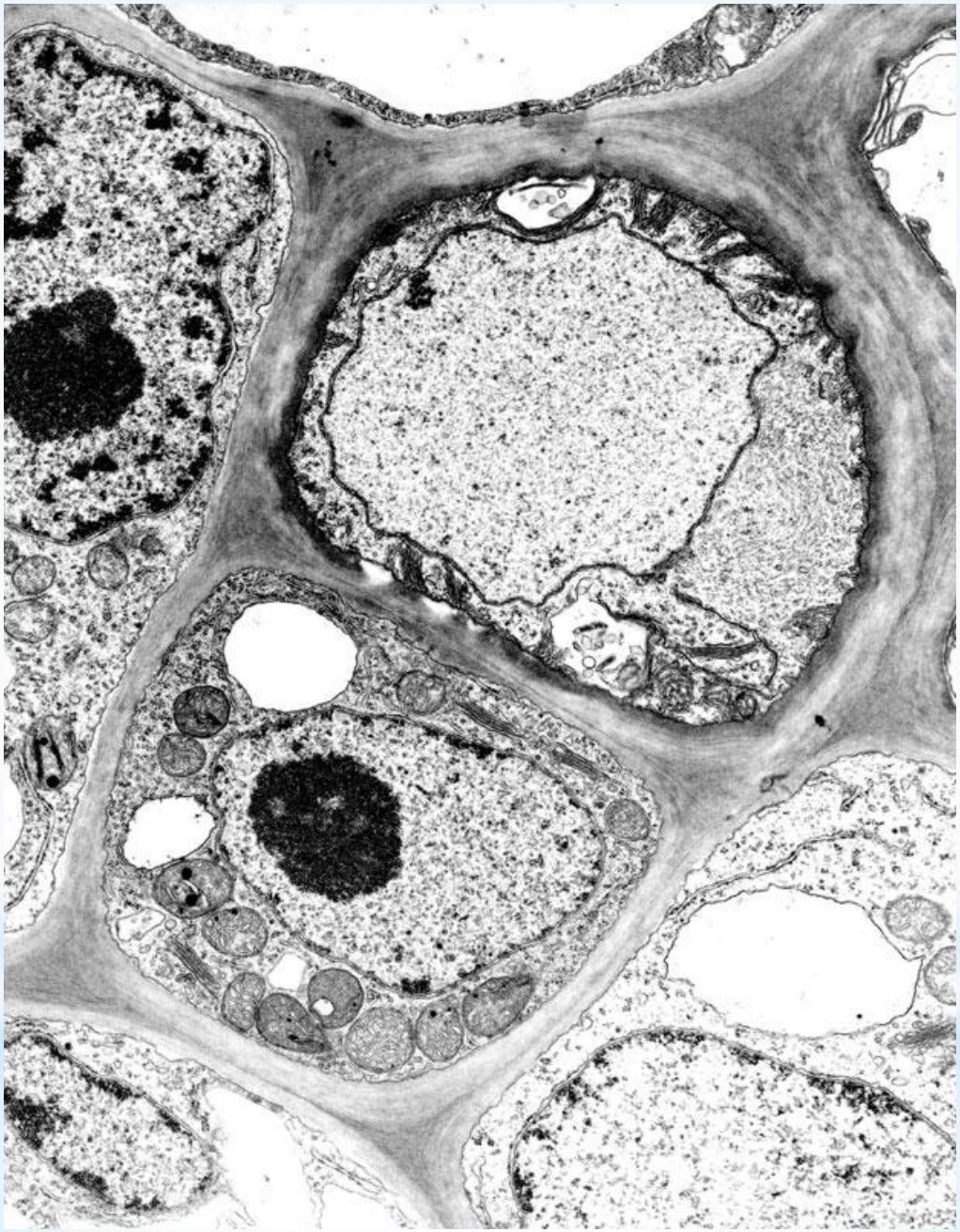


Endoplasmic Reticulum

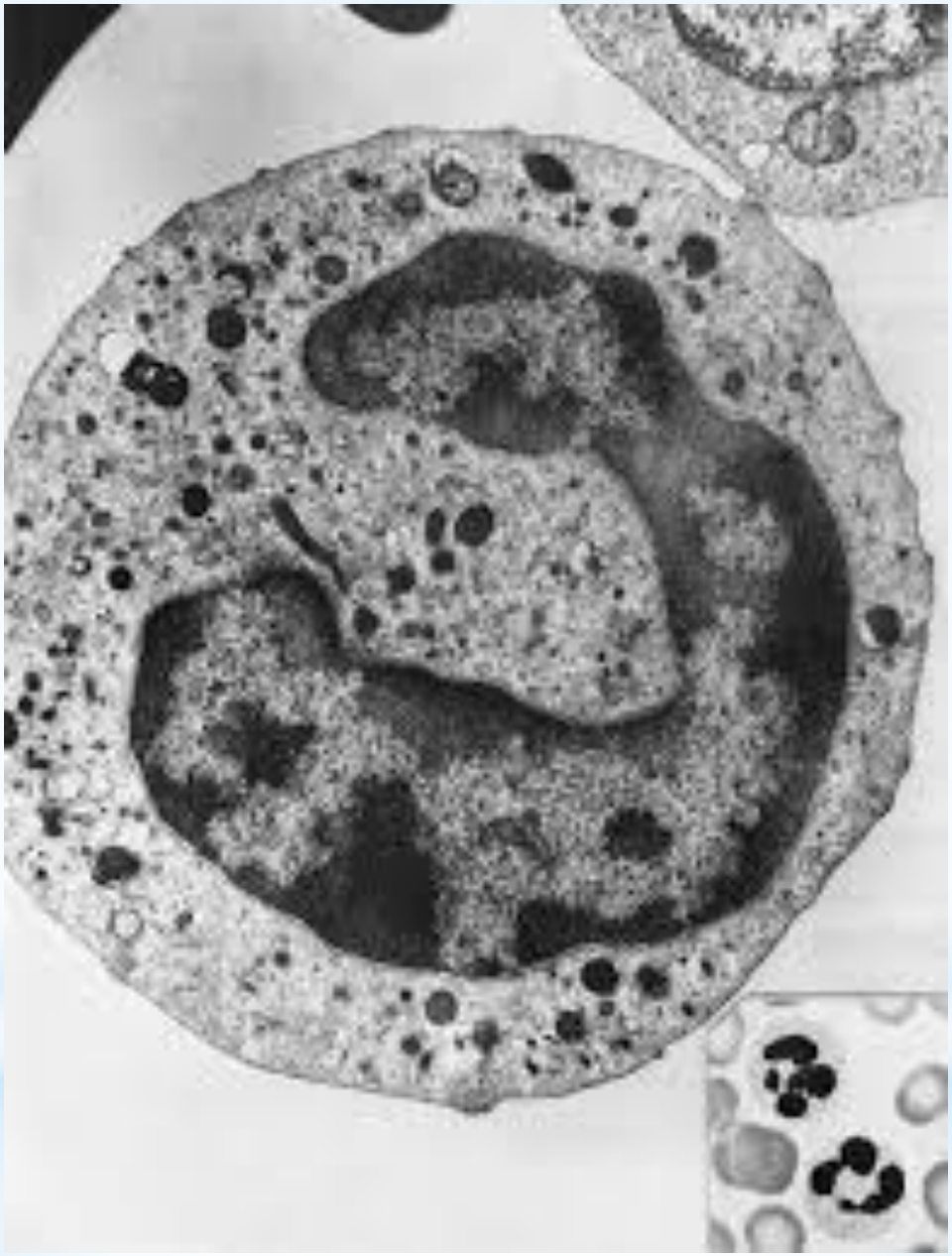

GLY
M
M
Nucleolus
M

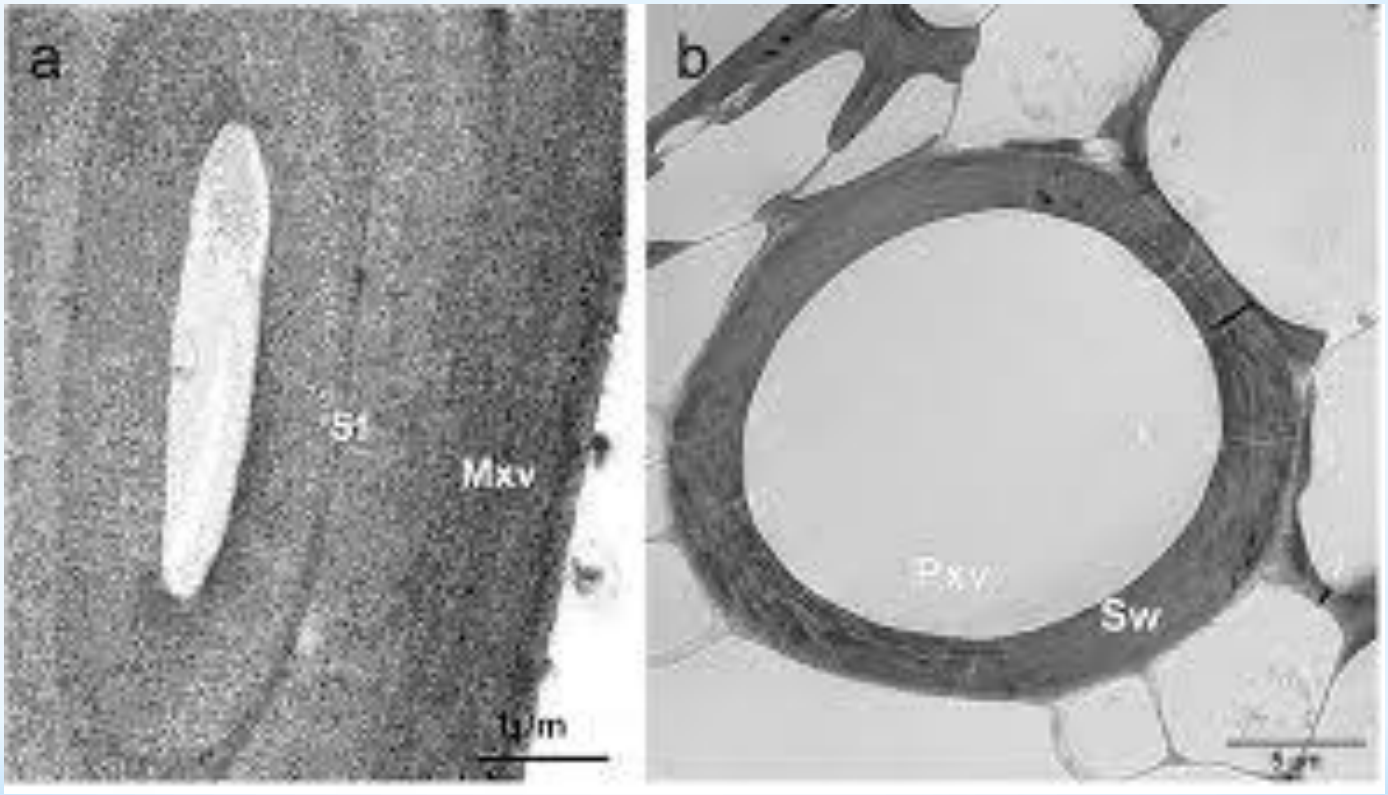

S2L
ML
S1
S2

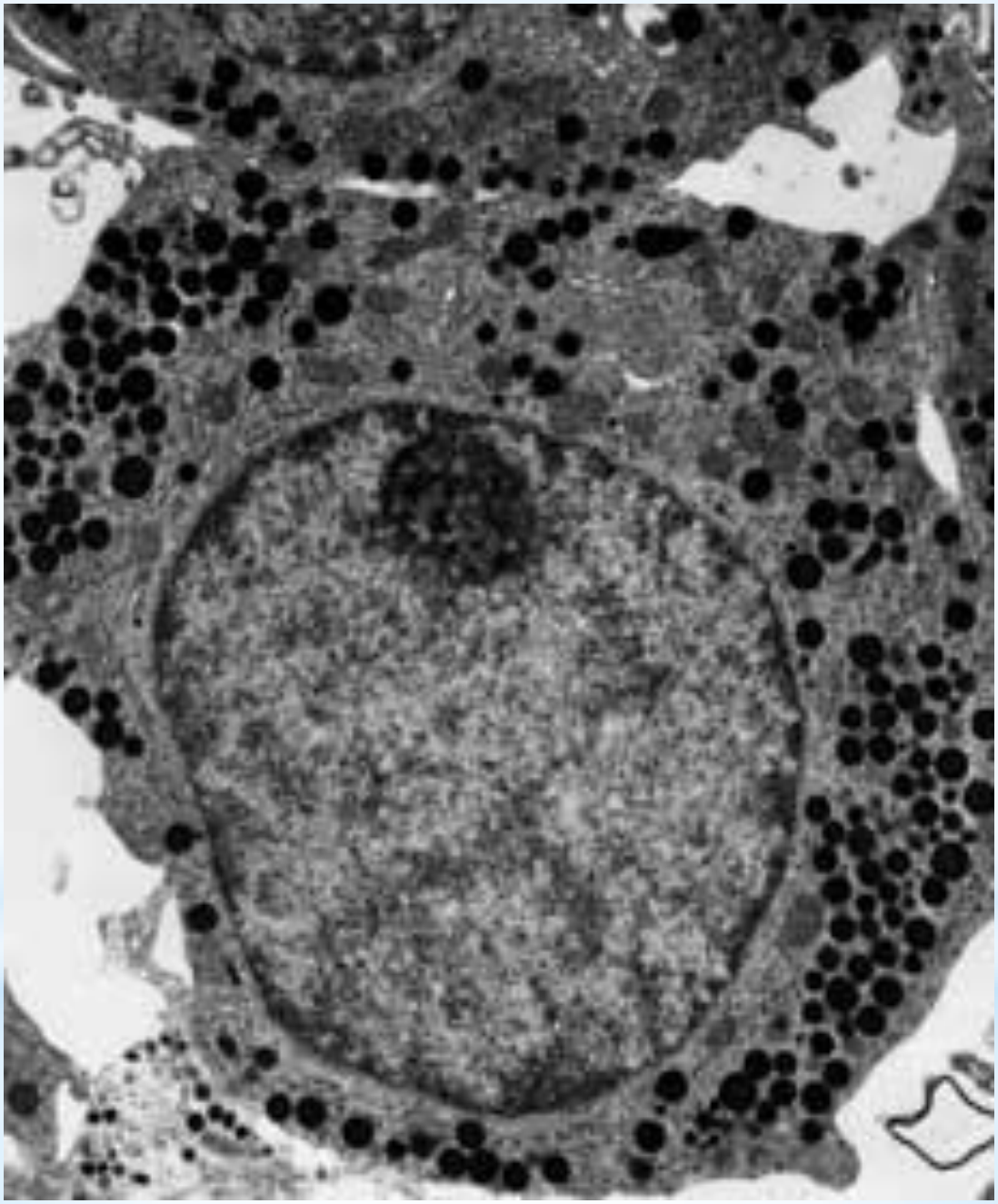

plasma membrane



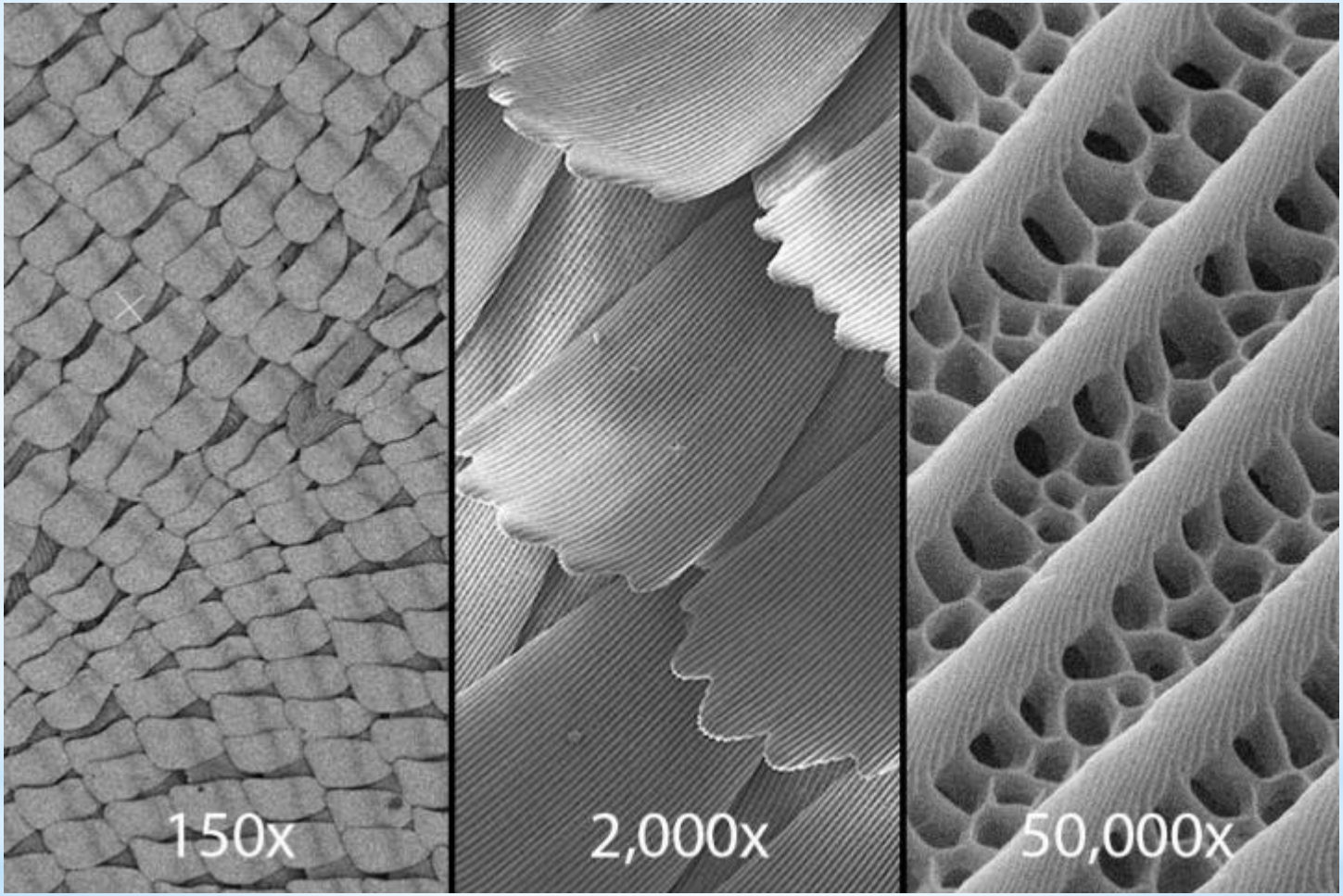
©Jose Luis Calvo / Shutterstock.com

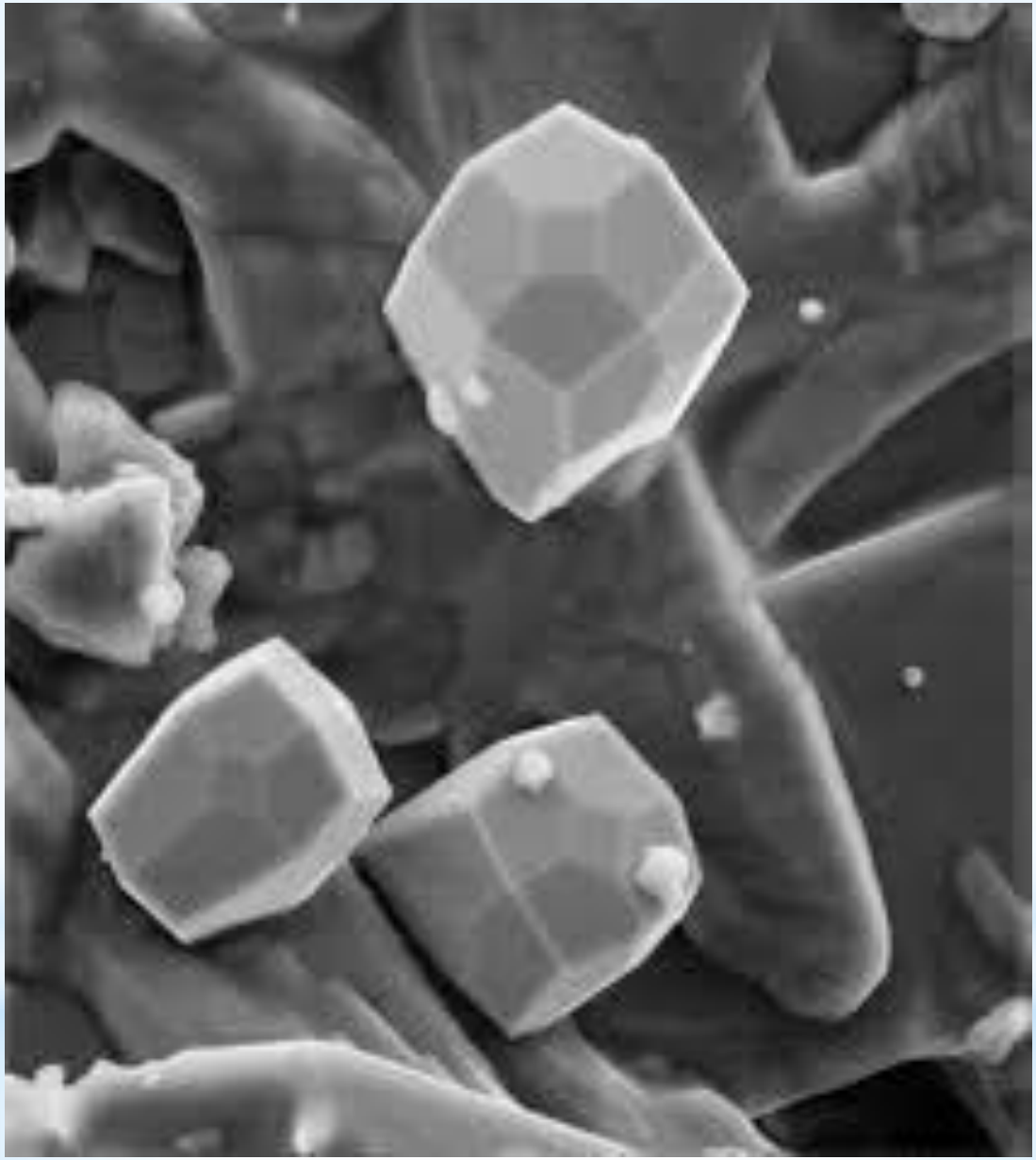


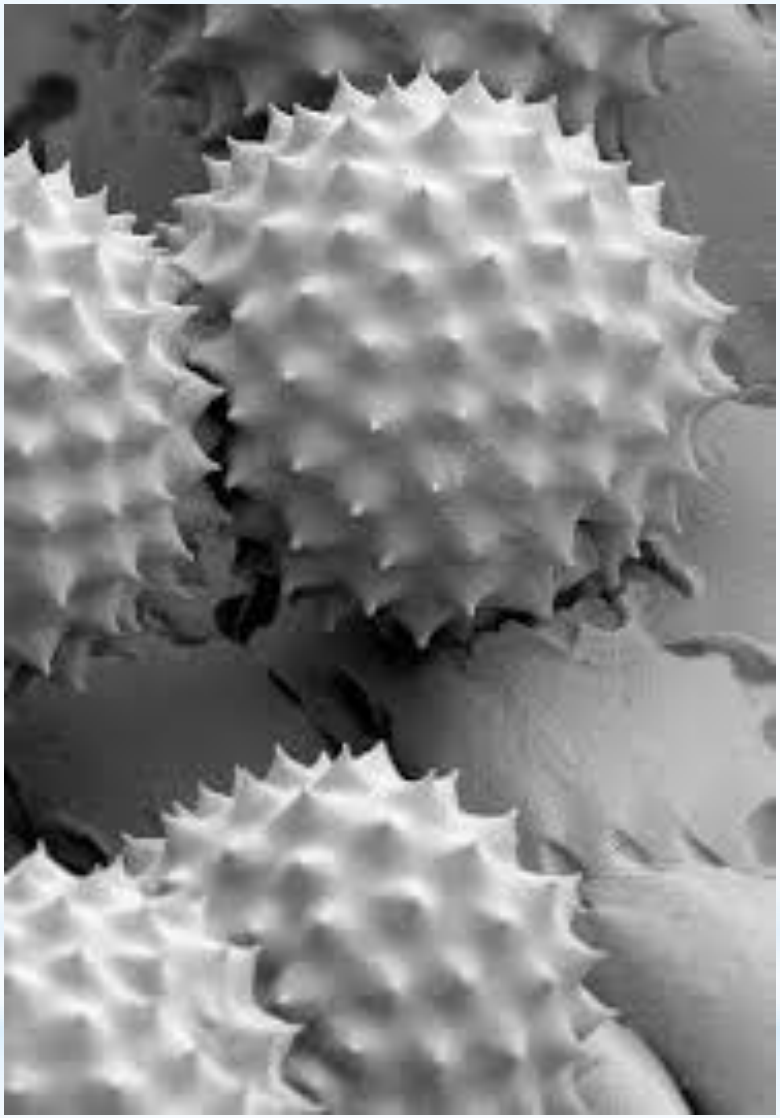

a
S1
Mxv
1µm
b
Pxv
Sw

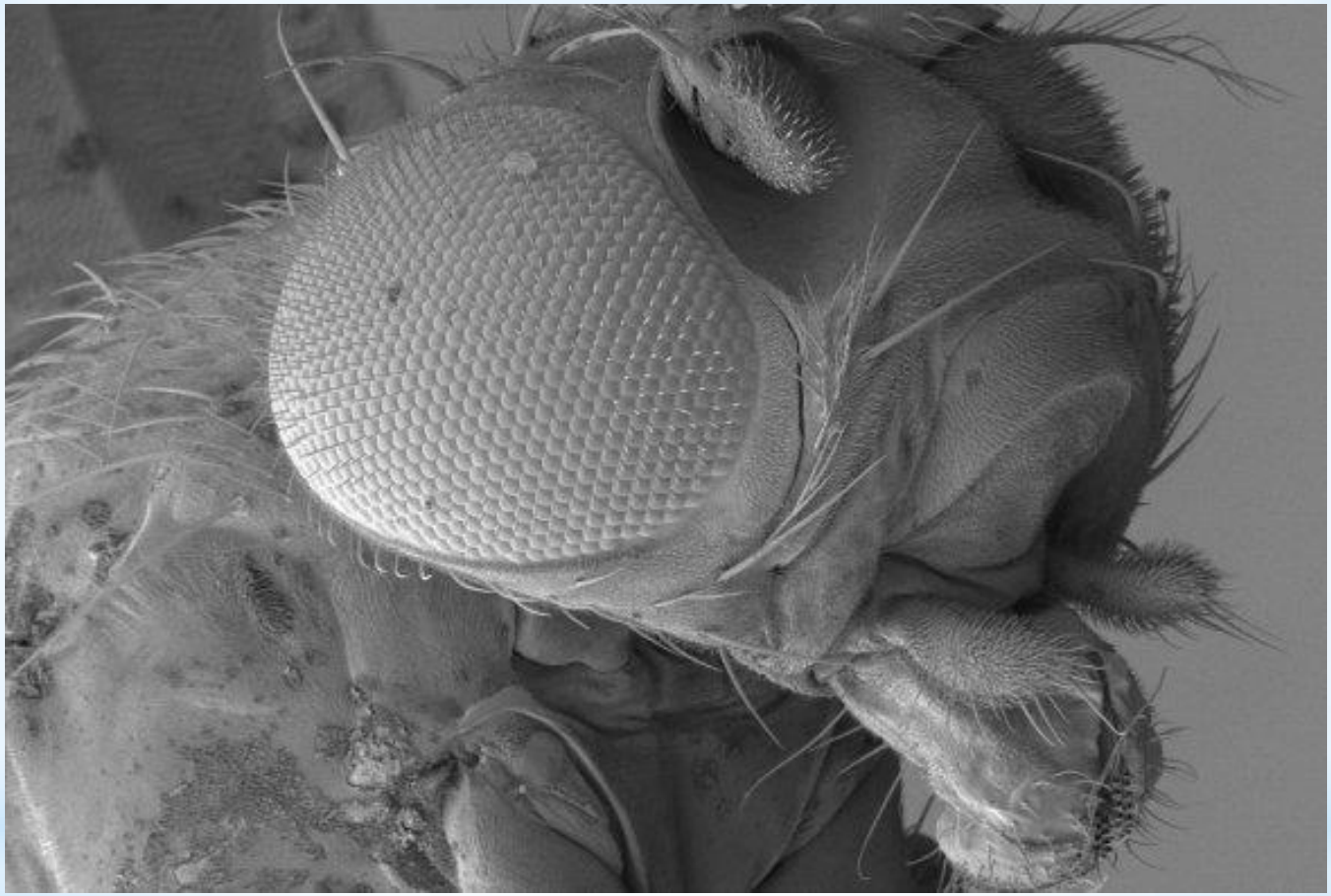


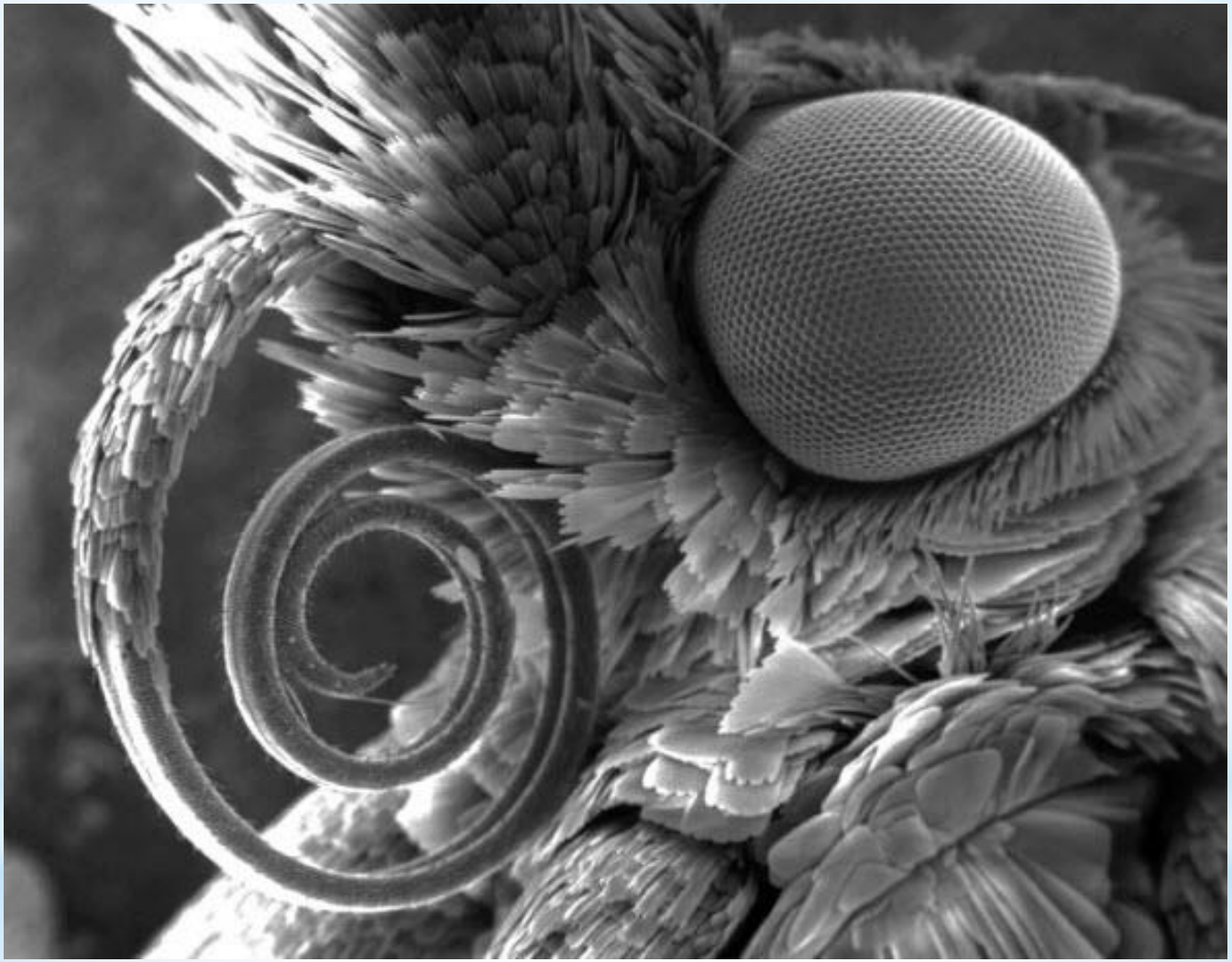
تصاویر در میکروسکوپ الکترونی اسکن

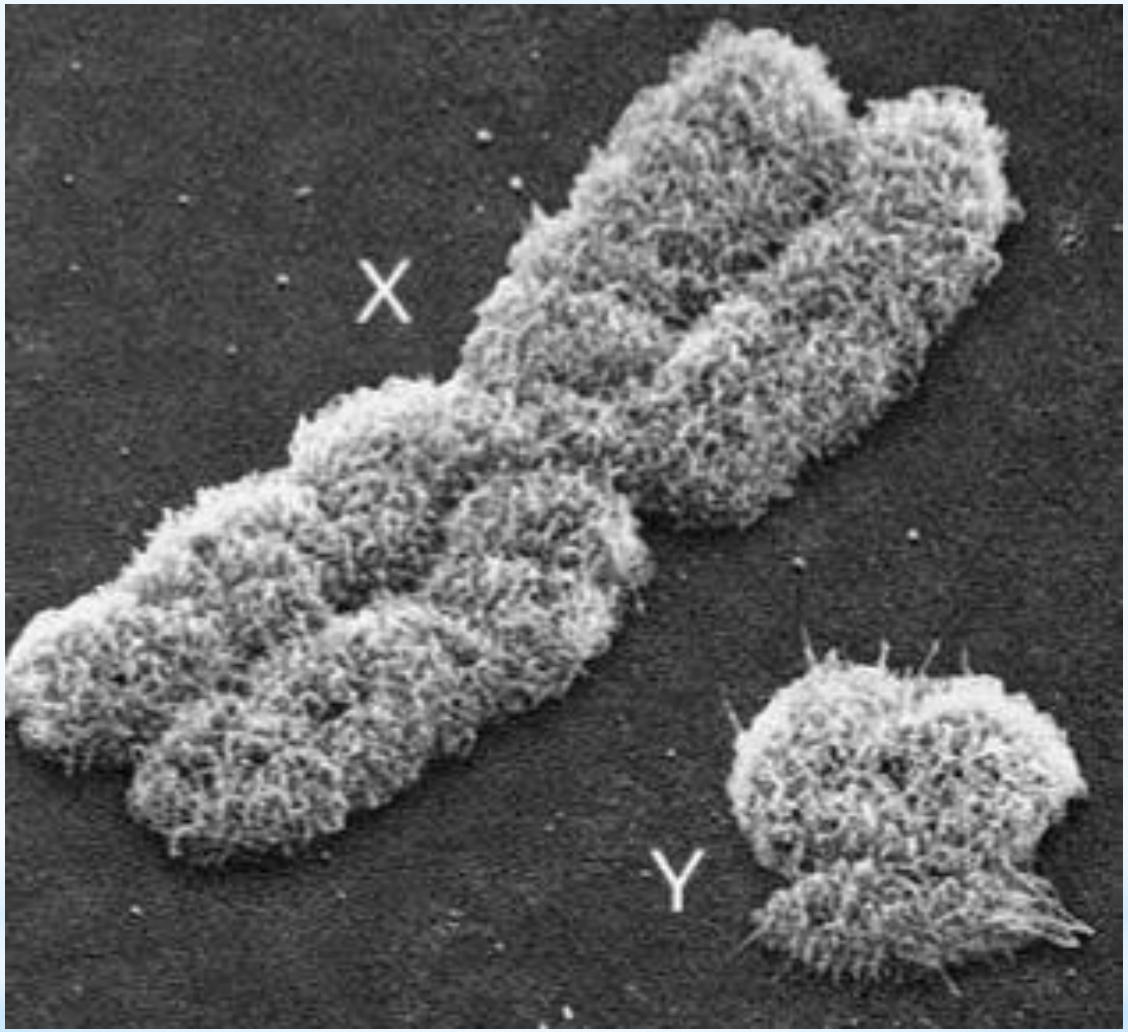

150x
2,000x
50,000x










X
Y