



چگونه می توان در تدوین استاندارد بین المللی ایزو مشارکت داشت؟



تفکر مبتنی بر ریسک برای آزمون شیمیایی



میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری

پیشرفت های اخیر در
مواد پر کننده ی ستون در
کروماتوگرافی مایع
با کارایی بالا

کارشناسان منتخب و رتبه بندی رابطین مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری های راهبردی در سال ۱۳۹۶ اعلام شد

پژوهشگاه شیمی، میزبان گردهمایی سالانه رابطین مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی

نویسندگان

ساناز شبیکه^۱

researchers4u@yahoo.com



میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری

چکیده

فینمن^۲ به منظور دستیابی به قابلیت مشاهده فعالیت‌های زیستی، از فیزیکدانان درخواست نمود تا میکروسکوپ‌های الکترونی بهتری طراحی کنند. با وجودی که امروزه دستیابی به تصاویری با وضوح یا قدرت تفکیک پذیری اتمی امکان پذیر بوده اما به دلیل آسیب رساندن پرتو الکترونی به نمونه‌های حساس نظیر: پلیمرها یا تک پروتئین‌ها، هنوز تهیه تصاویری با قدرت تفکیک پذیری بالا از نمونه‌های ذکر شده با مشکلات فراوانی روبرو است. در این مقاله با استفاده از شبیه‌سازی نشان داده می‌شود که چگونه بدون میانگین‌گیری از ساختارهای درون چندین تصویر پیاپی و تنها با بهره‌گیری از پروتکل اندازه‌گیری چندگذری ساده در میکروسکوپ الکترونی عبوری می‌توان با حداقل صدمه و قدرت تفکیک پذیری بالا از تک پروتئین‌ها تصویربرداری نمود. در این مقاله، روش چند گذری برای تصویربرداری از اهدافی خاص بررسی شده است اما از آن می‌توان به‌طور گسترده برای ارتقای قدرت تفکیک‌پذیری و حساسیت انواع مختلف حالات تصویربرداری با کمک میکروسکوپ الکترونی نظیر تصویربرداری روبشی و طیف‌نگاری استفاده نمود. این رویکرد در واقع روش بهینه مکانیکی - کوانتومی بوده که در شرایط ایده‌آل بدون برخورد و تعامل در نظر گرفته می‌شود. اما در عمل، کاهش دادن مرتبه بزرگی فرایند آسیب در قدرت تفکیک‌پذیری مشابه امکان پذیر است.

واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری، تفکیک‌پذیری مکانی محدود به دوز، نسبت سیگنال به نویز، جابجایی‌های فاز، نویز ضربه‌ای.



تنها تعداد محدودی از الکترون‌ها پیش از آسیب دیدن ساختار مورد نظر قادر به پروب نمونه زیستی هستند [۱]. این امر به همراه آمار شمارش الکترون (نویز ضربه‌ای) منجر به وقوع نسبت متناهی سیگنال به نویز (S/N) و تفکیک‌پذیری مکانی محدود به حداکثر دوز الکترون مجاز مربوط به نمونه (به جای کیفیت نورشناسی الکترونی) می‌شود. هنگام تصویربرداری از پروتئین‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو در صورت وجود شرایط ایده‌آل حداکثر تفکیک‌پذیری مکانی قابل دسترس برابر با ۲ nm است [۲]. به‌طور مرسوم برای بازسازی مدل یک پروتئین در تفکیک‌پذیری اتمی باید از هزاران تصویر تهیه شده از تک پروتئین میانگین گرفت [۳ و ۴]. این فرایند علاوه بر وقت‌گیر بودن و درصد خطای بالا، به‌صورت معمول فرض را بر این گذاشته که تمام پروتئین‌هایی که تصاویرشان تهیه شده دارای ساختاری یکسان هستند [۵]. اجرای روش‌های میانگین‌گیری برای پلیمرها، مولکول‌های آلی ناهمگن و ماده نرم حساس به پرتو نامتناوب امکان‌پذیر نیست. در تحقیق پیشین تمرکز اصلی به سمت دستیابی به تفکیک‌پذیری با دوز محدود^۳ تعیین شده با استفاده از نویز ضربه‌ای^۴ و دوز بحرانی نمونه معطوف شده بود. در میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری^۵ مدرن محدودیت تفکیک‌پذیری مکانی فرایندهای طیف‌سنجی و تصویربرداری به جای نورشناسی الکترونی به آسیب تابشی مربوط می‌شود. اخیراً پیشرفت قابل توجهی [۶ و ۷] در زمینه آشکارسازهای نوین [۸]، عناصر نوری الکترونی [۹ و ۱۰] و روش‌های آماده‌سازی نمونه [۱۱ و ۱۲] انجام شده‌است. به زودی دسترسی به DLR مرسوم بهینه شده نیز امکان‌پذیر خواهد بود [۴]. نمونه‌های زیستی در میکروسکوپ الکترونی عبوری به‌عنوان اشیائی با فاز ضعیف در نظر گرفته می‌شوند. انجمن اندازه‌گیری کوانتومی حساسیت دسترس‌پذیر در فرایندهای اندازه‌گیری فاز را مورد بررسی قرار داده است [۱۳]. حداقل خطای اندازه‌گیری دسترس‌پذیر با استفاده از ذرات پروب ناهمبسته برابر با $1/\sqrt{N}$ است؛ که در آن: N نماینده تعداد برخورد و تعاملات نمونه - ذره پروب است. با استفاده از ذرات همبسته می‌توان بر محدودیت نویز ضربه‌ای غلبه نمود و خطای مورد نظر را نیز به $1/N$ کاهش داد (محدودیت هایزنبرگ) [۱۴]. فوتون‌های به اندازه کافی درهم تنیده^۶ این همبستگی‌های مورد نیاز را فراهم می‌آورند. از این روش در میکروسکوپ‌های نوری استفاده شده‌است [۱۵ و ۱۶]. در اینجا باید به دشوار بودن فرایند ایجاد این حالت‌های درهم تنیده اشاره نمود. در ضمن، حالت‌های $N00N$ نیز به ماهیت بوزونیک^۷ فوتون‌ها^۸ وابسته هستند [۱۷]. در تئوری می‌توان سیستم‌های درهم تنیده (ترکیبی) که با استفاده از فرمیون‌ها^۹ دستیابی به محدودیت هایزنبرگ را امکان‌پذیر ساخته را بررسی نمود. اما اجرای این سیستم‌ها در عمل دشوار است [۱۸ و ۱۹]. یکی دیگر از روش‌های پیشنهادی برای دستیابی به محدودیت ذکر شده، استفاده از تعامل یا برخورد چند مرتبه‌ای یک ذره پروب با شیء فازی است [۲۰]. در صورت وجود تعداد معینی از برخوردهای نمونه - ذره پروب می‌توان این روش را به‌عنوان رویکردی بهینه برای اندازه‌گیری در نظر گرفت [۲۱]. این روش با استفاده از حفره‌های تصویرسازی خودکار [۲۲] درون میکروسکوپ‌های نوری میدان کامل بکار برده شده‌است [۲۳ و ۲۴]. در این مقاله با استفاده از شبیه‌سازی‌های مختلف نشان داده می‌شود که پروتکل چند گذری قادر به افزایش حساسیت و تفکیک‌پذیری مکانی میکروسکوپ الکترونی عبوری با دوز محدود است. شبیه‌سازی‌های تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری^{۱۰} تهیه شده از ساختارهای پروتئین قرار گرفته درون محیط یخ شیشه‌ای نشانگر بهینه‌سازی مرتبه بزرگی در آزمایش‌های انجام گرفته با میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو است. با استفاده از شبیه‌سازی‌های تصاویر گرافن تک لایه نیز محدودیت‌های روش چند گذری شرح داده می‌شود.

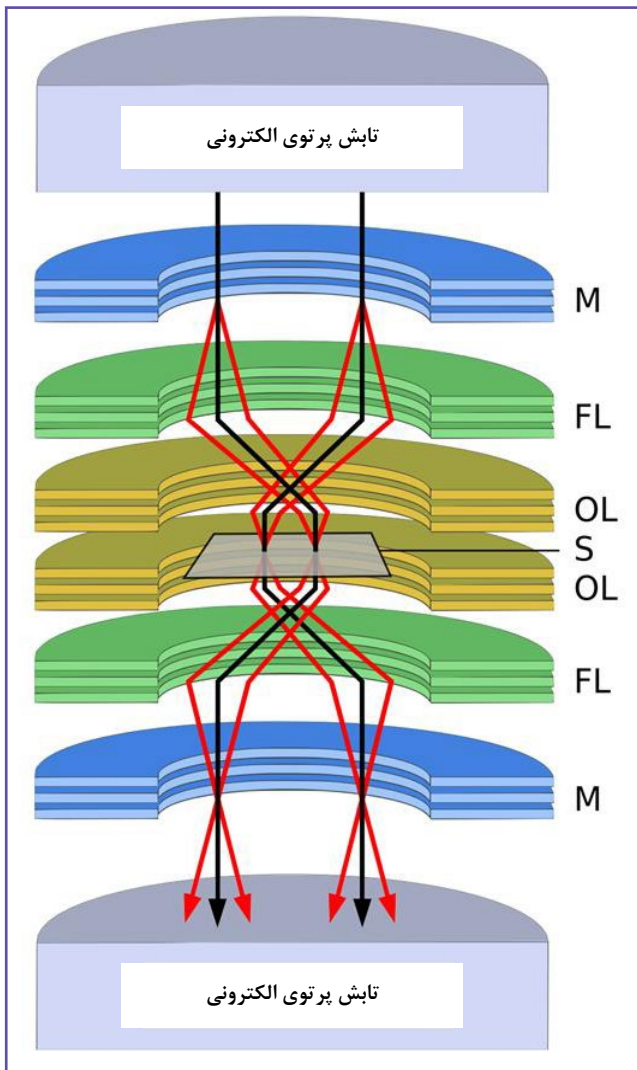
نتایج

کاهش آسیب رسیدن به نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری چندگذری:

کاهش آسیب رسیدن به نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری چندگذری در شکل (۱) به نمایش گذاشته شده‌است. تصویر مورد نظر با استفاده از تجهیزات فاقد ابیراهی^{۱۱} از طریق تکرار تابع عبوری تک گذری t نمونه بدست می‌آید. به ازای m گذر، تابع عبوری t_m برای $t_m = t^m = |t|^m e^{im\Phi}$ خواهد بود. که در آن: $|t|$ نماینده دامنه عبوری و Φ نیز نشان‌دهنده جابجایی فاز توسط پتانسیل

مربوطه است. هر دو عامل فوق از نظر مکانی تغییر می‌کنند. در صورت وجود نمونه ضعیف ($m\Phi \ll 1$) با قابلیت عبوردهی بالا ($1 - |t|^m \ll 1$) درون میکروسکوپ فازی [۲۵ و ۲۶]، اگر تعداد N_0 الکترون ناحیه δ^2 ثبت شده درون یک پیکسل از آشکارساز را روشن نمایند، آنگاه نمونه مذکور تعداد $N(x, y) \sim N_0 [1 - 2m\Phi(x, y)]$ الکترون را آشکار خواهد ساخت [۲۶]. بنابراین، طراحی چند گذری مورد نظر با ارائه نویز ضربه‌ای تقریبی $\sqrt{N(x, y)}$ ، سیگنال و حساسیت را به اندازه m برابر افزایش می‌دهد. در اینجا نسبت سیگنال به نویز برابر است با:

$$SNR = |N_S - N_B| / \sqrt{N_S + N_B} \sim \sqrt{2N_0 m \Delta \Phi}$$

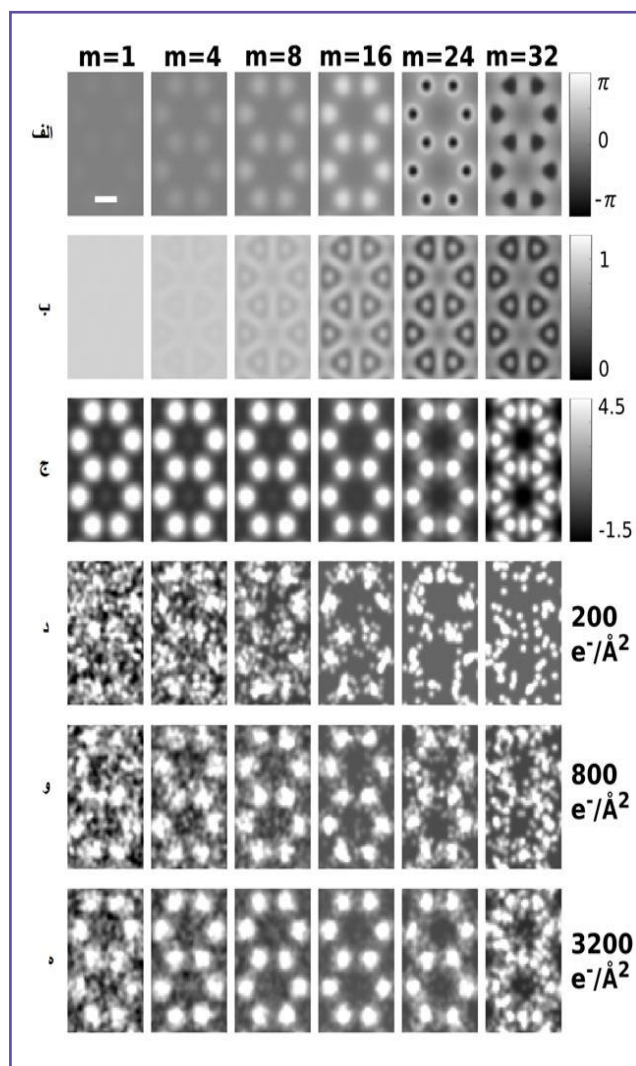


شکل ۱: طرح کلی میکروسکوپ چند گذری. نمونه S میان دو عدسی شیئی و میدانی (به ترتیب OL و FL) قرار گرفته است. این پیکربندی میان دو آینه M استقرار یافته که می توان آنها را برای تزویج ورودی و خروجی پرتو الکترونی مهار نمود. پرتو پروب پالسی به درون مسیر نوری میکروسکوپ چند گذری تزویج شده و نمونه S را روشن می کند. موج خروجی در ادامه دوباره تصویربرداری شده و روی نمونه (که هم اکنون توسط تصویر واضح خود روشن شده) برمی گردد. این فرایند تا زمانی که استخراج تزویجی پالس مورد نظر صورت پذیرفته و تصویرش روی آشکارساز شکل گیرد، چندین (M) مرتبه تکرار می شود. برای درک بهتر، اشعه های میدانی (سیاه رنگ) و تصویربرداری (قرمز رنگ) در شکل فوق نمایش داده شده اند. این اشعه ها پس از یک دور کامل دوباره فرایند را از سر می گیرند.

شبیه سازی های میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری:

در قسمت ذیل شبیه سازی های میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری مربوط به سه سیستم نمونه از ساختارهای معین گرافن [۳۳ و ۳۴]، واحد شش وجهی شبکه (HIV-1 Gap-ID:5I4TPDB) نابالغ CTD-SP1HIV-1 Gap [۳۵] و ویروس ماربورگ VP35 [۳۶] شرح داده شده است. در شبیه سازی های میکروسکوپ ذکر شده، پرتو الکترونی چندین مرتبه از نمونه عبور می کند. پس از m عبور، موج خروجی

که در آن: N_B و N_S به ترتیب نماینده تعداد الکترون های آشکار شده هنگام تصویربرداری از نمونه و پس زمینه هستند. هنگام انجام عملیات در نرخ ثابتی از آسیب، تعداد ذرات پروب ورودی را باید به گونه ای انتخاب کرد که تعداد کل برخوردهای پروب - ذره نمونه مستقل از m باشد (به عنوان مثال: $N_{0,m} \sim N_{0,1}/m$). این امر منجر به حصول SNR^{12} در نرخ آسیب ثابت متناظر با $\sqrt{m}$ و به تبع آن، کاهش نرخ آسیب در SNR ثابت متناظر با $1/m$ می شود. این امر برای روش های آشکارسازی حالت میدان تاریک و ثابت پراکندگی نیز صادق است. روش چند گذری در شرایط ایده آل دارای مقیاس مشابهی از آسیب نسبت به روش های بدون برخورد (پیشنهاد شده برای آشکارسازی غیر تخریبی نمونه های کاملاً جذب کننده) است [۲۷ و ۳۰]. به منظور درک بهتر شرایط ذکر شده، فرض را بر این گذاشته که SNR آستانه برای آشکارسازی شیء فازی برابر است با: $SNR = \sqrt{2N_0 m \Delta \Phi} \sim 1$. از طرف دیگر، تعداد الکترون های آسیب وارد کننده با استفاده از پراکندگی غیرالاستیکی خود نیز برابر با: $N_{inel} = N_0(1 - |t_{inel}|^{2m}) \sim 2N_0 m \alpha$ در نظر گرفته می شوند. در فرمول فوق، $\alpha = 1 - |t_{inel}|$ و افت الاستیکی را نیز می توان نادیده گرفت (بدین معنی که: هیچ الکترونی خارج از روزه 13 میکروسکوپ پراکنده نشده است). منطقه بدون برخورد کوانتومی به ازای $\frac{\alpha}{m \Delta \Phi^2} \ll 1$ قابل دسترسی است. بنابراین، پیکربندی چند گذری را می توان به عنوان پیکربندی بدون برخورد مناسب برای نمونه های ضعیف در نظر گرفت. دستورالعمل های بدون برخورد اصلی [۲۷ و ۲۸] برای آشکارسازی جاذب های کامل طراحی شده اند، در صورتی که روش چند گذری قادر به ارائه اطلاعات فازی و مقیاس خاکستری در رابطه با نمونه های بسیار شفاف و نازک است. در قسمت ذیل، کاهش قابل توجه آسیب در فرایند تصویربرداری از نمونه های زیستی نازک در شرایط واقعی با بکارگیری میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری اثبات می شود. در هر صورت پیشنهاد می شود تصویربرداری به طور کامل بدون برخورد تنها به عنوان محدودیت نظری مورد استفاده قرار گیرد. کاهش آسیب به طور مستقیم به ارتقای تفکیک پذیری مکانی محدود به دوز (DLR) می انجامد. از آنجائی که SNR در نرخ آسیب ثابت متناظر با $\sqrt{N_0 m \Delta \Phi}$ بوده، لذا حتی در شرایط $m=1$ تا زمانی که N_0 به اندازه کافی بزرگ باشد کوچکترین شیء فازی با SNR بالا قابل آشکارسازی هستند. لازم به ذکر است، تشعشع قادر به تخریب ویژگی های ساختاری مورد نظر است، لذا تصاویر به صورت معمول در دوز تک گذری $D = \frac{eN_0}{\delta^2}$ که تقریباً دو برابر دوز بحرانی D_c بوده بدست می آیند [۳۱ و ۳۲]. این امر منجر به حصول حداقل اندازه ویژگی/مشخصه δ قابل تصویربرداری با SNR معین می شود. با استفاده از معادلات فوق می توان به فرمول $\delta \propto 1/\sqrt{m}$ دست پیدا کرد. این تناسب برای کنتراست پراکندگی نیز صادق است.



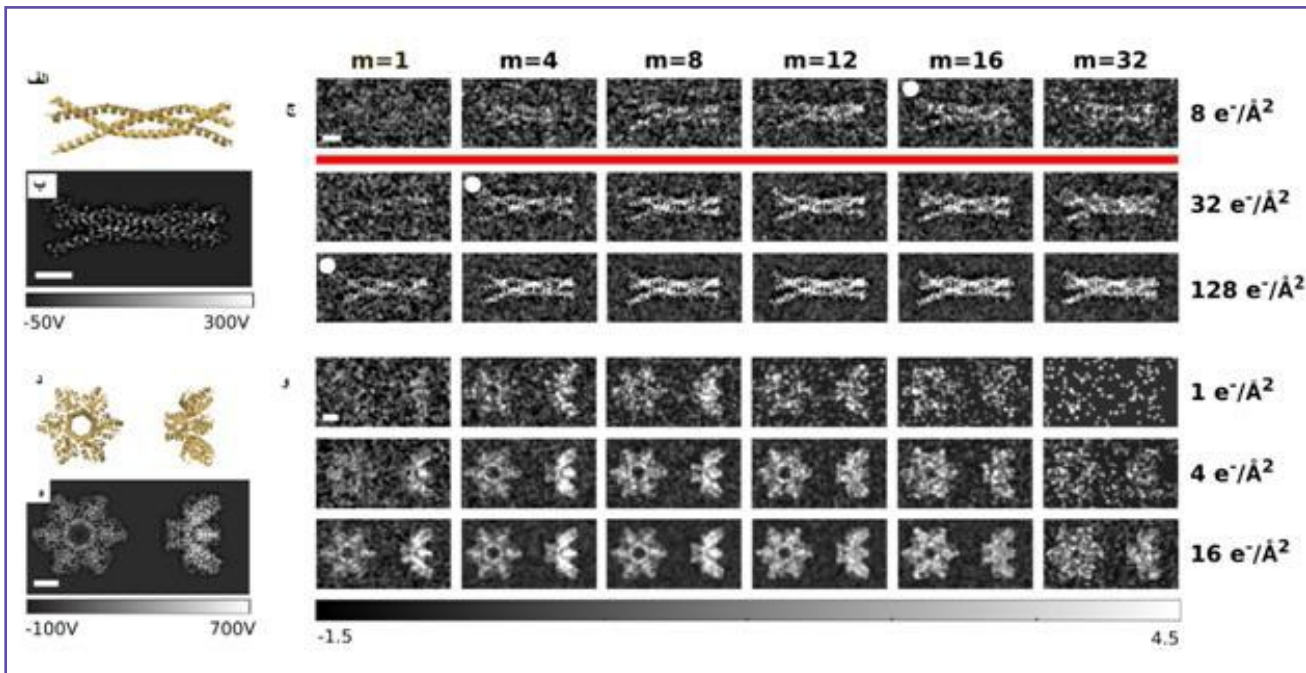
شکل ۲: شبیه‌سازی میکروسکوپ الکترونی عبوری چندگذری از نمونه گرافن. (الف) و (ب) به ترتیب فاز و دامنه تابع موج خروجی پس از تعداد معینی فرایند عبور را نمایش می‌دهند. تصاویر شبیه‌سازی شده بدون نویز میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری در شکل (ج) و همچنین تصاویر شبیه‌سازی شده در سطوح مختلفی از دوز مؤثر نیز در شکل‌های (د) و (ه) نمایش داده شده‌اند. مقیاس رنگی برای شکل‌های (ج) و (ه) بر حسب واحدهای انحراف استاندارد از متوسط میزان شدت هر تصویر محاسبه شده‌است. نوار مقیاس برابر است با ۰/۱۴.

میانگین غیرالاستیک برابر با ۳۵۰ nm خواهد بود [۴۲]. در شکل (۳-ج) نتایج شبیه‌سازی شده میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری در سطوح‌های مختلفی از دوزهای مؤثر نمایش داده شده‌است. در ازای وجود دوز مؤثر معین (D_{eff})، کیفیت تصویر هم‌زمان با افزایش تعداد گذرها بهینه می‌شود. بهترین SNR پس از اجرای ۱۲ الی ۱۶ گذر حاصل می‌شود. در این هنگام یک شش ضلعی آلفا در دوزی پایین‌تر از دوز بحرانی تعیین شده برای نمونه‌های زیستی به وضوح مشاهده می‌شود. در صورت بالاتر رفتن تعداد فرایندهای گذر SNR به دلیل افت‌های غیرالاستیک و افزایش جایجایی‌های فاز دوباره کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل (۳-ج) مشاهده می‌شود در ازای وجود SNR ثابت، آسیب به اندازه $1/m$ کاهش می‌یابد. پیش از در نظر

حاصل شده روی آشکارسازی ایده‌آل تصویر مورد نظر را شکل می‌دهد. در اینجا طرح آشکارسازی حساس به فاز در برگرنده یک پله یا صفحه فازی به‌منظور جابجایی فاز پرتوی نپراشیده به اندازه $\pm\pi/2$ مدنظر است. دستیابی به چنین آشکارسازی از چندین روش امکان‌پذیر است [۹،۲۵،۳۷،۳۹]. به‌منظور شبیه‌سازی نویز ضربه‌ای در واقع نویز پواسونی^{۱۵} به میزان شدت آشکار شده اعمال می‌شود. دوز الکترون ورودی به‌گونه‌ای انتخاب شده که دوز مؤثر (تعداد برخوردهای الکترون - نمونه و در نتیجه صدمه وارد شده با استفاده از الکترون) مستقل از m باشد. این امر برای نمونه بدون افت بدین معنی است که دوز ورودی توسط $1/m$ مقیاس‌گذاری شود. در شبیه‌سازی‌های مربوطه هر دو افت الاستیکی و غیرالاستیکی در نظر گرفته شده‌اند: شبیه‌سازی‌های مربوط به نمونه گرافن برای به حداقل رساندن آسیب با استفاده از انرژی الکترونی برابر با ۶۰ KeV انجام پذیرفته‌اند [۴۰]. در شکل (۲-الف) و (۲-ب) به ترتیب فاز و دامنه تابع موج خروجی شبیه‌سازی شده به‌عنوان تابعی از تعداد برخوردها نمایش داده شده‌است. جابجایی‌های فازی به‌صورت خطی افزایش یافته و در نهایت به بیش از π می‌رسند. دامنه تابع موج خروجی با تعداد برخوردها کاهش می‌یابد. با وجودی که افت در سرتاسر سلول واحد همگن [۴۱] در نظر گرفته شده، اما ساختار شبکه کلی در تعداد بالاتری از برخوردها و تعاملات ظاهر می‌شود. دلیل این امر، وقوع اثر عدسی^{۱۶} قابل توجه در اثر جابجایی‌های فازی با توزیع مکانی است. در این منطقه، کنتراست فاز حتی در غیاب پله فازی نیز به کنتراست دامنه تبدیل می‌شود. تصویر بدون نویز تابع موج خروجی در شکل (۲-ج) نمایش داده شده‌است. اثر منفی و مخرب شمارش آمار براساس تفکیک‌پذیری مکانی در شکل‌های (۲-د) و (۲-ه) که تصاویر شبیه‌سازی شده به‌عنوان تابعی از دوز مؤثر نمایش داده شده‌اند، آشکار می‌شود.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، ساختار شبکه توری پس از یک تعامل و برخورد به‌طور واضح در شکل‌های (۲-د) و (۲-و) قابل تشخیص نیست، به همین دلیل برای بهینه‌سازی SNR و تفکیک‌پذیری مکانی از روش چند گذری استفاده می‌شود. در صورت وقوع تعداد بالاتری از تعاملات، SNR دوباره کاهش می‌یابد. در این حالت، کاهش SNR به دلیل اینکه جابجایی‌های فاز به درجه‌ای رسیده که دیگر نمی‌توان از میکروسکوپ فازی استاندارد به‌عنوان دستگاه تحلیلی کارآمد استفاده نمود به وقوع می‌پیوندد (شکل (۲-ج)). در صورت حصول تعداد برخوردهای بالاتر، وقوع افت‌های الکترون‌ها نیز رویت‌پذیری را کاهش می‌دهد.

در شکل (۳-الف) و (۳-ب) به ترتیب نمودار نواری و پتانسیل تصویر شده VP35MARV تعیبه شده درون یخ شیشه‌ای برای عملیات میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو نمایش داده شده‌است. افت‌های غیرالاستیکی بیشتر به دلیل وقوع پراکندگی درون یخ شیشه‌ای شکل می‌گیرند (به ازای اعمال الکترون‌ها با انرژی 300 KeV، پویش آزاد



شکل ۳: شبیه‌سازی ساختارهای پروتئینی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی چند گذری. (الف) نمودار نواری و (ب) پتانسیل تصویر شده نمونه MARV VP35 را نمایش می‌دهد. (ج) تصاویر شبیه‌سازی شده میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری در ازای اعمال الکترون‌هایی با انرژی 300 KeV را در سه سطح نسبی از دوز موثر محاسبه نموده (مشاهده شده در قسمت راست) و نمایش می‌دهد. توجه کنید که دوز ورودی برای هر PANEL تقریباً به اندازه m برابر کمتر از دوز موثر است. دایره‌های سفید رنگ، نماینده شکل‌هایی با SNR یکسان هستند. خط قرمز رنگ، نماینده دوز بحرانی ($20 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$) تعیین شده برای نمونه‌های زیستی است [۳۲]. (د) و (و) نتایج مربوط به دو جهت تصویربرداری مختلف از نمونه HIV-1 Gag را نمایش می‌دهند. تمامی نوارهای مقیاس برابر با ۲ nm هستند. مقیاس رنگ برای شکل‌های (ج) و (و) بر حسب واحد انحراف‌های استاندارد از میانگین شدت هر تصویر تعیین شده است.

شرح مطالب

تحلیل‌های انجام گرفته در این مقاله نشان می‌دهد که تقویت سیگنال مورد نظر از طریق بکارگیری دستورالعمل‌های چند گذری امکان آشکارسازی نمونه‌های در بر گیرنده قابلیت فوق‌العاده عبوردهی الکترون با حداقل آسیب ممکن را فراهم می‌آورد. همان‌طور که در بخش‌های پیشین اشاره شد با استفاده از این روش می‌توان در شرایط تصویربرداری واقعی و بدون میانگین‌گیری جزئیات نمونه‌های حساس به دوز را آشکار ساخت. میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری رویکرد کوانتومی بهینه‌ای را برای تحقیق در زمینه تک پروتئین‌ها، DNA و پلیمرها برای محققان ارائه می‌کند.

روش‌ها

میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری کنتراست پراکندگی (مقیاس خاکستری):

در این نوع میکروسکوپ، کنتراست از تغییرات مکانی افت الکترون به دلیل وقوع رویدادهای پراکندگی الاستیک و غیرالاستیک بدست می‌آید. لازم به ذکر است، کنتراست پراکندگی نسبت به جابجایی‌های ضعیف فاز حساس نیست. بنابراین می‌توان ویژگی‌های عبوردهی محلی و واقعی T نمونه را بر حسب λ_p تعریف کرد:

گرفتن افت‌ها می‌توان SNR یک تصویر با مشخصات $(m=1, D_{\text{eff}}=128 \text{ e}^-/\text{\AA}^2)$ را با تصاویری با مشخصات $(m=4, D_{\text{eff}}=32 \text{ e}^-/\text{\AA}^2)$ و $(m=16, D_{\text{eff}}=8 \text{ e}^-/\text{\AA}^2)$ برابر دانست. در شکل‌های (۳-د) و (۳-و) شبیه‌سازی‌های مربوط به HIV-1 Gag از دو جهت مختلف نمایش داده شده است. به دلیل وجود رویداد روی هم افتادگی فاز^{۱۷} بهترین SNR به ترتیب برای تصویرسازی در امتداد محور نازک و ضخیم پروتئین مورد نظر پس از وقوع ۸ الی ۱۲ و ۴ الی ۸ گذر حاصل می‌شود. میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری قابلیت شناسایی جهت‌گیری پروتئین‌هایی با اندازه متوسط را در دوز فوق‌العاده پایین فراهم می‌آورد.

یکی از کاربردهای مهم این فرایند، ضبط تصاویر متحرک با دوز تقسیم‌بندی شده و همچنین سطوح پرتودهی موثر پایین‌تری به ازای هر فریم در مقایسه با سطوح مورد نیاز برای تنظیم فریم‌های متوالی است. یکی از دلایل اهمیت انجام این کار به شرح ذیل است:

حرکت ناشی از پرتو الکترونی در طول نخستین ۲ الی $4 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ فرایند پرتودهی بسیار زیاد بوده و در عین حال ویژگی‌های تفکیک‌پذیری و وضوح بالای نمونه نیز در مدت زمان مذکور به سرعت آسیب خواهد دید [۴۳]. انتظار می‌رود با استفاده از روش کاهش حرکت فریم به فریم، بیشتر سیگنال تفکیک‌پذیری و وضوح بالا حفظ شود.

نمونه جابه‌جا کننده کامل فاز Φ^2 m^2 به‌دست می‌آید [۲۶].
نویز ضربه‌ای نیز در بر گیرنده مقیاسی مشابه m بوده و این
امر منجر به حصول قوانین مقیاس‌گذاری یکسان برای SNR
و DLR (مشابه قوانین موجود برای روش‌های حالت میدان
روشن) می‌شود.

شبیه‌سازی‌های چند مقطعی میکروسکوپ الکترونی عبوری چندگذری:

شبیه‌سازی‌های چند مقطعی با استفاده از روش‌ها و
پتانسیل‌های اتمی ارائه شده در مقاله کرکلند [۴۴] انجام
شده که شامل کدنویسی سفارشی و اختصاصی با نرم‌افزار
متلب^{۱۹} است. یک موج صفحه‌ای ایده‌آل در جهت‌های
متناوب بدون اعمال ابیراهی‌های جبهه موج میان مسیره‌های
گذر از نمونه عبور داده می‌شود (فرض بر این است که
عدسی‌ها و آینه‌های درون سیستم نوری قادر به جبران
ابیراهی یکدیگر هستند). برای هر دو نمونه‌های پروتئینی و
گرافنی به اندازه $0.1 \text{ \AA}$ پخش حرارتی بر پتانسیل‌های اتمی
اعمال شده‌است. این امر برای نمونه گرافن با ۳۲ پیکربندی
فونون منجمد و برای نمونه‌های پروتئینی از طریق اعمال
درهم پیچش گاوسی بر پتانسیل‌های اتمی انجام می‌پذیرد.
حداکثر زاویه پراکندگی مجاز بین هر فرایند گذر تعیین
شده توسط تابع قطع روزنه برای نمونه‌های پروتئینی و
گرافنی به ترتیب برابر است با 20 mrad و 50 mrad . از طریق
حذف بخشی از موج الکترونی هر یک از فرایندهای گذر، با
فرض دسترس پذیر بودن قابلیت حذف موثر الکترون‌های
در بر گیرنده افت‌های غیرالاستیک بالا ($> 5 \text{ eV}$) در هر
فرایند گذر با استفاده از پشته نوری، می‌توان افت‌های
غیرالاستیک را نیز در نظر گرفت. در صورت تصویربرداری
از گرافن با انرژی 60 keV می‌توان افت غیرالاستیک را به
ازای هر فرایند گذر برابر با $1/54$ درصد در نظر گرفت (این
عدد از طریق اندازه‌گیری افت‌های ثبت شده در طیف
ترکیبی میکروسکوپ الکترونی عبوری/روشنی - طیف نگاری
افت انرژی الکترون^{۲۰} بدست آمده از دستگاه میکروسکوپ
الکترونی عبوری شرکت نیون^{۲۱} واقع در موسسه سوپر
استم^{۲۲} حاصل شده‌است). در صورت تصویربرداری از نمونه
پروتئینی فرض بر این است که بخش یخ شیشه‌ای نمونه
بر افت‌های غیرالاستیک غلبه می‌کند. اگر ضخامت یخ
برابر با 20 nm فرض شود، آنگاه با استفاده از مراجع موجود
می‌توان افت تقریبی $5/5$ درصد را به ازای هر فرایندگذر در
شرایط اعمال انرژی 300 keV محاسبه کرد [۴۲]. ساختارهای
پروتئینی از بانک داده‌های پروتئینی استخراج شده‌اند
پروتئین مورد نظر مدل پیوسته یخ شیشه‌ای ارائه شده توسط
شانگ^{۲۳} و سیگورث^{۲۴} [۴۵] با استفاده از یکپارچه‌سازی سه
بعدی بکار برده شده‌است. سرانجام فرض بر این گذاشته

$$T(\alpha_0) = |t(\alpha_0)|^2 = e^{-S/\lambda_f(\alpha_0)}$$

که در آن: S : نماینده ضخامت محلی نمونه و λ_f : نماینده
طول پویس آزاد میانگین بین هر رویداد پراکندگی که منجر
به وقوع افت می‌شود، است.

به دلیل آشکار نشدن الکترون‌های پراکنده شده در زاویه‌های
بالا تر، λ_f به α_0 (روزنه عدسی شیئی) وابسته است. نمونه در
میکروسکوپ الکترونی عبوری به‌طور معمول روی فیلم محافظ یا
درون محیطی همگن (به‌عنوان مثال، درون آب منجمد شیشه‌ای
برای میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو) قرار می‌گیرد. ضریب
انتقال/عبور نمونه T_S و محیط یا فیلم پس‌زمینه T_B را می‌توان
مطابق با فرمول شماره (۱) محاسبه کرد. اگر فرض بر وجود
آشکار سازی الکترون محدود به نویز ضربه‌ای باشد، آنگاه SNR
میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری کنتراست پراکندگی را
می‌توان از فرمول ذیل بدست آورد:

$$SNR_m = \sqrt{N_0} \frac{|T_S^m - T_B^m|}{\sqrt{T_S^m + T_B^m}}$$

عبور دادن الکترون ورودی به اندازه تعداد دفعات معین از
نمونه منجر به افزایش میزان کل دوز قابل تحمل توسط نمونه
مورد نظر می‌شود. در نتیجه، دوز چند گذری موثر به‌صورت
ذیل تعریف می‌شود:

$$D_{\text{eff}} = \frac{eN_0}{\delta^2} \sum_{i=1}^m T_S^{i-1} = \frac{eN_0}{\delta^2} \frac{1 - T_S^m}{1 - T_S}$$

در ازای $1 \rightarrow T_S$ ، $D = m \frac{eN_0}{\delta^2}$ بدست خواهد آمد. در صورت $m=1$
معادله‌های ذکر شده نتایج مورد نیاز برای یک گذر را ارائه
می‌دهند. به‌منظور تعیین یک ویژگی با $SNR = SNR_0$ و اعمال
دوز موثر معین $D_{\text{eff}} = D_{\text{eff},0}$ ، اندازه ویژگی مذکور باید برابر با:

$$\delta_m = \frac{SNR_0 \sqrt{e} \sqrt{T_S^m + T_B^m}}{\sqrt{D_{\text{eff},0}} |T_S^m - T_B^m| \sqrt{\frac{1 - T_S^m}{1 - T_S}}}$$

باشد. از این طریق می‌توان DLR چند گذری را تعیین
کرد. مقیاس δ_m برای نمونه‌هایی با قابلیت عبوردهی فوق‌العاده
الکترون‌ها ($T_S \rightarrow 1, T_B \rightarrow 1$) برابر با $1/\sqrt{m}$ است. تصویر با
تفکیک‌پذیری ثابت را می‌توان در دوز موثر m مرتبه کمتر نیز
تهیه کرد (بدین معنی که آسیب، m مرتبه کمتر خواهد بود).

SNR و DLR در میکروسکوپ الکترونی عبوری چندگذری با حالت میدان تاریک:

در روش‌های تصویربرداری حالت میدان تاریک پرتوی
پراشیده نشده مسدود می‌شود و سیگنال مورد نظر برای یک

یکدیگر استفاده کرد [۴۶]. زمان‌های ذخیره‌سازی طولانی و اندازه‌گیری‌های پیشرفته حفره درون تله‌های ذرات شارژ شده و حلقه‌های انبارش نمایش داده شده‌اند [۴۷ و ۴۸]. دستیابی به تزویج ورودی و خروجی پرتوی ذرات شارژ شده از طریق بکارگیری الکترودهای ورودی و خروجی پالسی و فرایند قطع سریع پرتو امکان‌پذیر است [۴۹]. طرح بهینه تجاری برای میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری هم اکنون در دست بررسی است. اثبات مفهومی شبیه‌سازی‌های مذکور در شرایط طراحی تمام الکترواستاتیک میدان کامل با استفاده از آینه تترود برای اصلاح ابیراهی‌های به وقوع پیوسته با عدسی شیئی، تصویربردای مجدد با انرژی ۱۰ KeV تا ۴ nm را امکان‌پذیر می‌داند.

شد که یک صفحه فازی ایده‌آل (با جابجایی فاز $-\pi/2$ برای پرتو مرکزی پراکنده نشده) درست پس از خروج موج تخت الکترونی از حفره نوری با استفاده از فرایند تزویج بر آن اعمال می‌شود (طرح نزدیک به ایده‌آل صفحه فازی به صورت آزمایشی در مرجع ارائه شده است [۱۰]).

مهندسی و طراحی تجهیزات میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری

فناوری تولید قطعات و تجهیزات مورد نیاز برای ساختن میکروسکوپ الکترونی عبوری چند گذری به سرعت در حال پیشرفت است. از عدسی‌ها و آینه‌های بدون افت بکار رفته در این نوع میکروسکوپ می‌توان برای اصلاح ابیراهی‌های

پی‌نوشت

۱. لیسانس الکترونیک، کارشناس آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری دانشگاه شیراز، عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ الکترونی عبوری شبکه آزمایشگاهی

2. Feynman

3. Dose Limited Resolution (DLR)

4. Shot-Noise

5. Transmission Electron Microscope (TEM)

6. entangled

7. bosonic

8. photons

9. fermions

10. Multi-Pass Transmission Electron Microscope

11. Aberration

12. Signal to Noise Ratio

13. Aperture

14. Oligomerization Domain P4222 (MARV VP35, PDB ID: 5TOI)

15. Poissonian noise

16. Lensing

17. Phase Wrapping

18. Kirkland

19. MATLAB

20. STEM-EELS

21. NION

22. SuperSTEM

23. Shang

24. Sigworth

مراجع

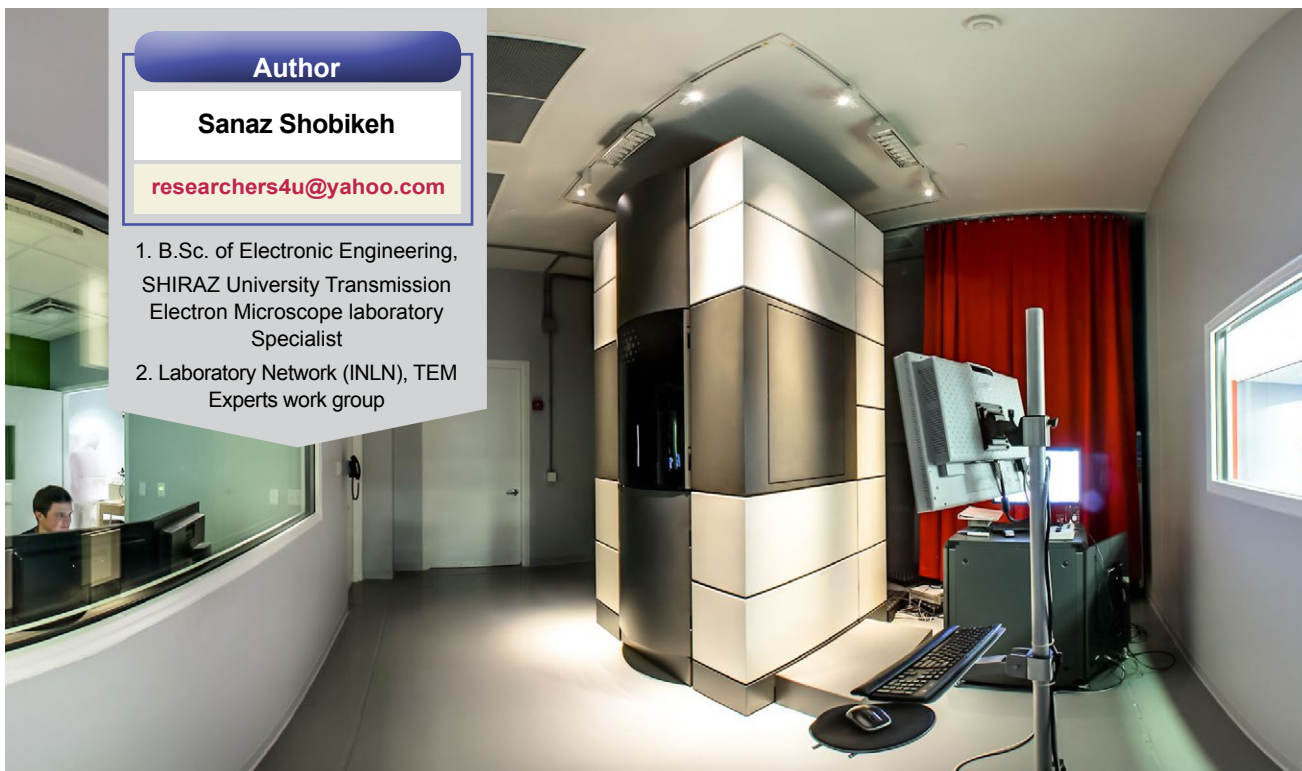
[1] Thomas Juffmann, Stewart A. Koppell, Brannon B. Klopfer, Colin Ophus, Robert M. Glaeser & Mark A. Kasevich, Multi-pass transmission electron microscopy, Scientific Reports volume 7, Article number: 1699 (2017)

Author

Sanaz Shobikeh

researchers4u@yahoo.com

1. B.Sc. of Electronic Engineering, SHIRAZ University Transmission Electron Microscope laboratory Specialist
2. Laboratory Network (INLN), TEM Experts work group



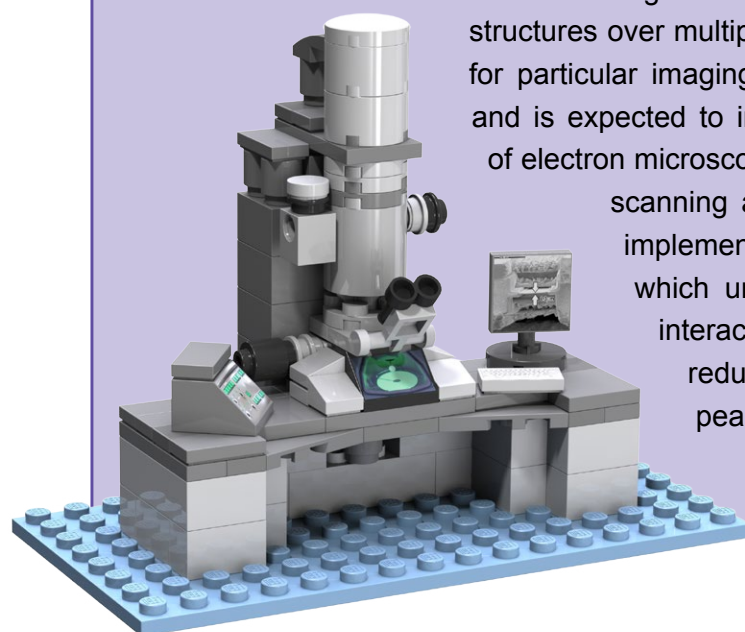
Multi-pass Transmission Electron Microscope

Abstract

Feynman once asked physicists to build better electron microscopes to be able to watch biology at work. While electron microscopes can now provide atomic resolution, electron beam induced specimen damage precludes high resolution imaging of sensitive materials, such as single proteins or polymers. Here, we use simulations to show that an electron microscope based on a simple multi-pass measurement protocol enables imaging of single proteins at reduced damage and at nanometer resolution, without averaging structures over multiple images. While we demonstrate the method for particular imaging targets, the approach is broadly applicable and is expected to improve resolution and sensitivity for a range of electron microscopy imaging modalities, including, for example, scanning and spectroscopic techniques. The approach implements a quantum mechanically optimal strategy which under idealized conditions can be considered interaction-free. In practice, an order-of-magnitude reduction in damage at equivalent resolution appears feasible.

Keywords

spatial resolution, Signal-to-noise, shot-noise, Phase Wrapping, Transmission Electron Microscope





Recent Developments in HPLC Column Packing Materials



Risk-based thinking for
chemical testing



How can we participate in the
drafting of the ISO
International Standard?



Multi-pass Transmission
Electron Microscopy