شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

ISSN 2538-3450

سال دوازدهم ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۳ ■ شماره پیاپی ۴۷

ریسک در بی‌طرفی آزمایشگاه

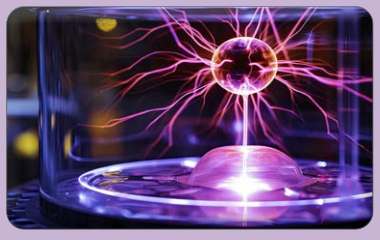
یازدهمین نشست سراسری مدیران مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی

محصولات تراریخته: دوست یا دشمن

اندازه‌گیری وزن مولکولی ملکول‌های زیستی با استفاده از تجهیزات تفرق نور پویا

ارزیابی خطر ناشی از فلزات سنگین کادمیوم و سرب نمونه‌های گندم وارداتی در استان خراسان

کاربرد میکروسکوپ Cryo-FIB-SEM برای آماده‌سازی لاملا میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو از نمونه‌های زیستی منجمد



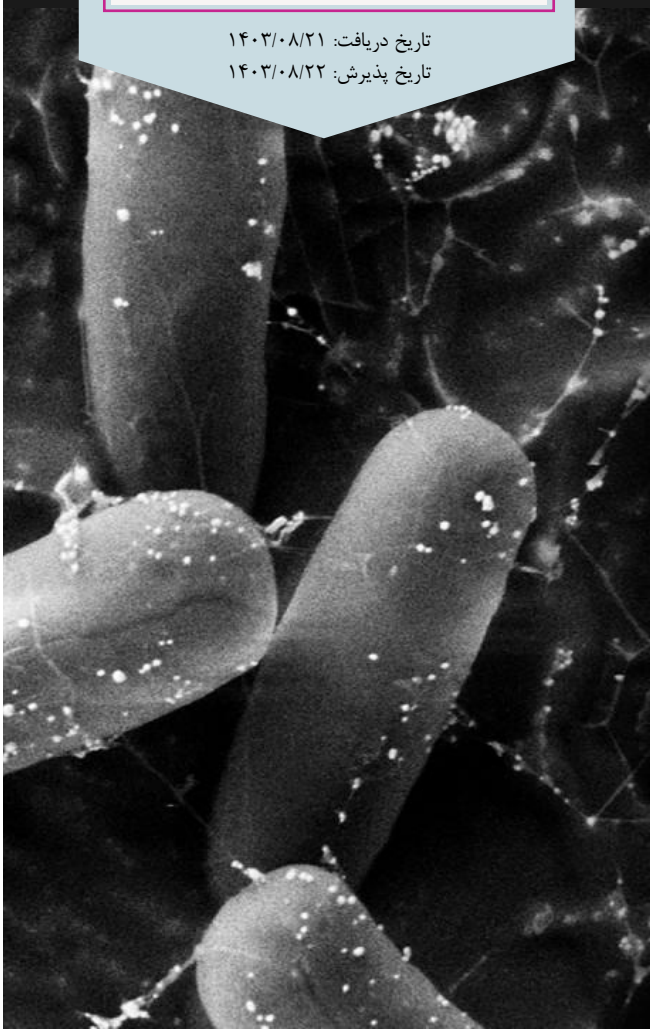
کاربرد پلاسمای سرد در کشاورزی و مواد غذایی

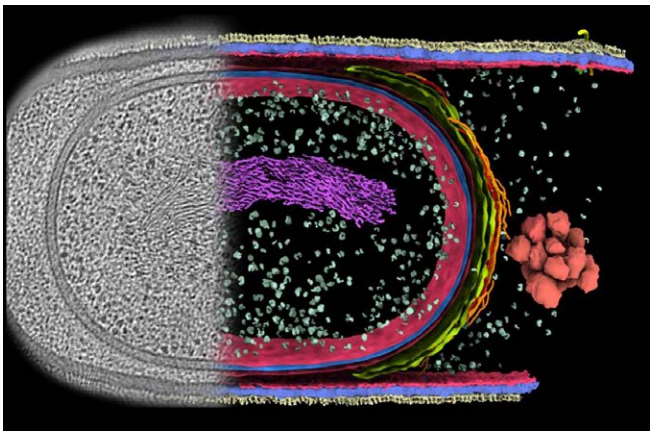
www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

کاربرد میکروسکوپ Cryo-FIB-SEM برای آماده‌سازی لاملا میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو از نمونه‌های زیستی منجمد

نویسنده
ساناز شبیکه [۱ و ۲*]
۱. کارشناس آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری دانشگاه شیراز
۲. عضو کارگروه تخصصی ملی میکروسکوپ الکترونی عبوری
*researchers4u@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲





چکیده

در سال‌های اخیر، میکروسکوپ الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز، کاربرد قابل توجهی در تحقیقات زیستی داشته است. این دستگاه دربرگیرنده میکروسکوپ الکترونی روبشی و سیستم تولیدکننده پرتو یون متمرکز درون یک ستون است. در نتیجه، می‌توان هر دو پرتو مذکور حاوی الکترون و یون را به‌طور هم‌زمان روی یک نقطه یکسان از نمونه متمرکز نمود. استفاده از دستگاه کرایو-اولترامیکروتوم در حوزه تهیه مقاطع نازک (با ضخامتی کمتر از ۲۰۰ نانومتر) از نمونه‌های زیستی منجمد برای تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری به‌عنوان روشی مرسوم محسوب می‌شود. اما به دلیل برخی معایب و محدودیت‌ها، محققان همیشه به دنبال روشی مطلوب‌تر بوده که کمتر مستعد به خطا باشد. آنها پس از آزمودن روش‌های مختلف به این نتیجه رسیدند که استفاده از پرتو یونی متمرکز، دقت و سرعت عملیات تهیه مقاطع مورد نظر را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. در ضمن، انتخاب مکان مورد نظر در نمونه زیستی به دلیل حضور ویژگی تفکیک‌پذیری نانومتری در پرتو یونی متمرکز امکان‌پذیر است. با توجه به تعاریف فوق، این دستگاه هم‌اکنون یکی از مهمترین کاربردهای دستگاه تولیدکننده پرتو یونی متمرکز آماده‌سازی نمونه‌های زیستی منجمد برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو به شمار می‌آید. در این دستگاه، به‌منظور نفوذ مطلوب پرتو الکترونی از نمونه‌های زیستی منجمد به‌صورت یکنواخت مقاطعی بسیار نازک (لاملا) تهیه می‌شود. در این مقاله، روش نوین و بهینه آماده‌سازی مقاطع نازک به نام لاملا از نمونه‌های زیستی منجمد با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی کرایو دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز برای تصویربرداری درون میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو شرح داده شده‌است.

واژه‌های کلیدی
میکروسکوپ الکترونی روبشی کرایو دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز، لاملا، میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو.

مقدمه

از زمان اختراع نخستین میکروسکوپ نوری توسط رابرت هوک[1] در سال ۱۶۶۵، محققان با دستیابی دنیای شگفت‌انگیز میکروسکوپی، تمایل زیادی به مشاهده سطوح ریزتر با بزرگنمایی و قدرت تفکیک‌پذیری بالاتر داشته‌اند. کشف محدودیت پراش[2] در سال ۱۸۹۶ منجر شد دانشمندان با دیدگاهی واقع گرایانه‌تر به موضوع دستیابی به تصاویری با جزئیات دقیق در مقیاس‌های بسیار پایین‌تر بنگرند. لازم به ذکر است، اشعه ایکس نیز در سال ۱۸۹۵ توسط ویلهلم کنراد رونتگن[3] کشف شد. در سال ۱۸۹۷ جوزف جان تامسون[4] الکترون‌ها و همچنین منشاء نامعلوم اشعه‌های ایکس که شباهت زیادی به نور دارند را کشف نمود. اولین میکروسکوپ الکترونی عبوری[5] در سال ۱۹۴۰ اختراع و به‌کارگیری الکترون‌ها در فرآیند مشاهده و تصویربرداری منجر به کاهش قابل توجه محدودیت پراش نوری شد. درون دستگاه TEM به‌منظور دستیابی به قدرت تفکیک‌پذیری بسیار فراتر از نور، از منبع تولیدکننده الکترون استفاده می‌شود. برخلاف میکروسکوپ‌های نوری، تمام تجهیزات اصلی میکروسکوپ الکترونی عبوری درون خلاء فوق‌العاده بالا قرار گرفته است. تنها با استفاده از این نوع خلاء می‌توان الکترون‌ها را کنترل کرد. در این شرایط، از طریق اعمال قوانین فیزیک، دستیابی به تصویر نهایی با بزرگنمایی بسیار بالا و جزئیات کاملاً واضح امکان‌پذیر است. بیشتر نمونه‌های زیستی حاوی آب بوده و یا به‌صورت مایع در طبیعت و محیط‌زیست موجود هستند. در روش مرسوم آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای TEM، ابتدا عملیات پایدارسازی با استفاده از مواد شیمیایی برای آنها انجام و سپس عملیاتی نظیر: آبگیری، نفوذدهی با حلال، نفوذدهی با رزین، قالب‌گیری، تهیه برش‌های بسیار نازک و رنگ‌آمیزی با فلزات سنگین اجرا می‌شوند. در مرحله نفوذدهی با رزین، نمونه عاری از آب درون رزین تعبیه می‌شود. در این مرحله، رزین، جایگزین آب موجود درون نمونه‌های مذکور شده‌است. لازم به ذکر است، الکترون‌ها تنها قادرند از سطحی بسیار نازک عبور کرده و تصویر نهایی را تشکیل دهند. با توجه به این امر، از اولترامیکروتوم برای تهیه برش‌هایی بسیار نازک با قابلیت عبور دادن پرتو الکترونی استفاده می‌شود. به‌منظور بالا بردن کنتراست تصویر نهایی نمونه از فلزات سنگین برای رنگ‌آمیزی برش‌های نازک به‌دست آمده از اولترامیکروتوم استفاده می‌شود. همان‌طور که پیش‌تر نیز ذکر شد، به دلیل وجود خلاء بسیار بالا درون ستون TEM مرسوم و قسمت نگهدارنده نمونه آن نمی‌توان از نمونه‌های حاوی آب و نمونه‌های مایع به‌صورت عادی تصویربرداری کرد. باید توجه داشت که آبگیری نمونه‌های زیستی و همچنین استفاده از مواد شیمیایی و رنگ‌آمیزی با فلزات سنگین علاوه‌بر خارج کردن نمونه‌های مذکور از محیط طبیعی‌شان منجر به تخریب جزئی اما قابل توجه ساختار نانومتری آنها و همچنین ایجاد آسیب می‌شود. دانشمندان پس از تحقیقات فراوان و انجام دستکاری محدود درون ساختار نگهدارنده نمونه میکروسکوپ الکترونی عبوری مرسوم موفق به ارائه دستگاهی با عنوان میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو[6] شدند. مشاهده نمونه‌های زیستی در این نوع میکروسکوپ بدون نیاز به آبگیری و رنگ‌آمیزی با فلزات سنگین تنها با استفاده از دستگاه‌های مخصوص و نیتروژن مایع منجمد انجام‌پذیر است. برای این منظور از دستگاه کرایو-اولترامیکروتوم برای تهیه لایه‌هایی بسیار نازک از نمونه‌های زیستی منجمد و مشاهده و تصویربرداری آنها درون Cryo-TEM استفاده می‌شود. پس از گذشت مدتی، محققان به معایب استفاده از دستگاه کرایو-اولترامیکروتوم پی بردند. آنها از دیرباز و هم اکنون نیز معتقد هستند که انجماد، بهترین روش برای آماده‌سازی نمونه‌های زیستی با هدف تصویربرداری درون TEM است. لذا باید روشی را برای تهیه لایه‌های بسیار نازک و به نسبت ایده‌آل از نمونه‌های منجمد زیستی نیز پیدا کنند. محققان پس از آزمودن روش‌های مختلف برای دستیابی به شرایطی نزدیک به ایده‌آل به‌منظور تهیه لایه‌های بسیار نازک از نمونه‌های زیستی منجمد برای مشاهده و تصویربرداری درون Cryo-TEM، دریافتند که بهترین روش با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی کرایو دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز حاصل می‌شود. آنها به‌منظور تمیز دادن بین لایه‌های فوق‌العاده نازک حاصل شده از این روش و لایه‌های بسیار نازک با استفاده از دستگاه کرایو-اولترامیکروتوم، لایه‌های فوق‌العاده نازک به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی کرایو دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز[7] را «لاملا» نامیدند. در این مقاله، علاوه‌بر چگونگی آماده‌سازی نمونه‌های زیستی TEM با استفاده از روش انجماد و شرح مختصری از ساختار درونی Cryo-FIB-SEM، روش آماده‌سازی لاملا از نمونه‌های زیستی منجمد با استفاده از میکروسکوپ FIB-SEM به‌منظور مشاهده و تصویربرداری در میکروسکوپ TEM به‌طور جامع شرح داده شده‌است.

آماده‌سازی نمونه‌های زیستی TEM با روش انجماد

همان‌طور که پیش‌تر نیز ذکر شد، مرسوم‌ترین روش برای آماده‌سازی نمونه‌های زیستی TEM، استفاده از مواد شیمیایی خاص است. هدف نهایی روش مذکور، تثبیت نمونه‌ها به‌گونه‌ای است که حداقل تغییر ممکن در حجم و ریخت‌شناسی آنها رخ دهد. لازم به ذکر است که مراحلی نظیر: تثبیت شیمیایی، آبگیری، تعبیه درون رزین، رنگ‌آمیزی با فلزات سنگین و تهیه برش‌های بسیار نازک با اولترامیکروتوم منجر به وقوع آسیب‌هایی درون نمونه می‌شوند. به‌عنوان مثال، استفاده از ماده شیمیایی گلوتارآلدئید برای مرحله تثبیت، منجر به وقوع پدیده شبکه‌ای شدن می‌شود. این پدیده به نوبه خود منجر به تجمع پروتئین‌ها، افت شدید گلیکان‌ها[8] و از بین رفتن لیپیدها می‌شود. تعبیه درون رزین و پخت آن نیز به‌منظور ارائه حالتی جامد و انعطاف‌پذیر به نمونه برای تهیه برش‌های بسیار نازک که قابلیت عبور دادن الکترون‌ها را دارند، الزامی است. اما همین مرحله در ریخت‌شناسی نمونه نسبت به حالت زنده‌اش تغییراتی را ایجاد می‌کند. رنگ‌آمیزی با فلزات سنگین نیز آسیب‌هایی از نوع رسوبات را درون نمونه ایجاد می‌کند. هنگام تهیه برش‌های بسیار نازک از نمونه تعبیه شده درون رزین نیز احتمال اعمال آسیب توسط دستگاه مذکور و شرایط محیط وجود دارد. وقوع آسیب‌ها قدرت تفکیک‌پذیری نهایی تصویر تهیه شده از نمونه را به شدت کاهش می‌دهند. لازم به ذکر است که میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری پیشرفته، دربرگیرنده تفنگ الکترونی نشر/گسیل میدانی در زمینه تصویربرداری قدرت تفکیک‌پذیری زیر آنگستروم را ارائه می‌دهند. به همین دلیل پژوهشگران درصورت استفاده از روش آماده‌سازی نمونه‌ها با استفاده از مواد شیمیایی، از نظر قدرت تفکیک‌پذیری با محدودیت زیادی روبرو خواهند شد. از این نظر، دستیابی به روش نزدیک به ایده‌آل برای آماده‌سازی نمونه‌ها با هدف رفع محدودیت قدرت تفکیک‌پذیری به یکی از چالش‌های اصلی محققان تبدیل شده‌است. آنها پس از تحقیقات فراوان به این نتیجه رسیدند که با استفاده از روش انجماد می‌توان آب درون سلول‌های نمونه را حفظ کرد. آنها این روش را «تثبیت کرایو» نامیدند. در روش تثبیت کرایو، دیگر نیازی به اعمال مراحلی نظیر: تثبیت شیمیایی، آبگیری، تعبیه درون رزین و رنگ‌آمیزی با فلزات سنگین وجود ندارد. در این روش، آب درون نمونه به سرعت به حالت جامد آمورف یا همان غیربلوری همچون شیشه به‌طور کامل شفاف تبدیل می‌شود. به دلیل خارج کردن سریع گرما از نمونه، مولکول‌های آب فرصت بلوری شدن ندارند. روش‌های متغیری برای انجماد نمونه‌های مختلف زیستی وجود دارد. برخی از این روش‌ها عبارتند از: انجماد با اعمال فشار زیاد[9] برای آماده‌سازی نمونه‌های بافتی و انجماد از طریق فروبری سریع[10] برای آماده‌سازی نمونه‌های سوسپانسیون. درصورت استفاده از هر یک از روش‌های تثبیت کرایو، به نگهدارنده نمونه TEM مجهز به کنترل دما نیاز است. میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری مجهز به این نوع نگهدارنده‌ها «Cryo-TEM» نامیده می‌شوند. همانند روش تثبیت با مواد شیمیایی که برای مشاهده و تصویربرداری از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم برش‌های بسیار نازک از نمونه‌های مورد نظر تهیه می‌شود، در روش تثبیت کرایو نیز برای امکان‌پذیر بودن مشاهده و تصویربرداری از نمونه‌ها درون Cryo-TEM، نمونه‌ها باید ضخامتی فوق‌العاده نازک داشته باشند. درصورت آماده‌سازی نمونه‌های سوسپانسیون می‌توان ضخامت را با استفاده از روش فروبری سریع تعیین نمود. اما هنگام آماده‌سازی نمونه‌های بافتی، به‌منظور حفظ حالت انجامد نمونه‌ها در روش تثبیت کرایو حتی در مرحله تهیه برش‌های بسیار نازک نیز باید از دستگاهی با عنوان «کرایو اولترامیکروتوم» استفاده کرد. استفاده از کرایو اولترامیکروتوم منجر به وقوع آسیب‌هایی نظیر: اثر چاقو، خطوط افقی، چروکیدگی و شکاف‌های عمودی روی برش‌های بسیار نازک نهایی از نمونه می‌شود. باید توجه داشت که برش‌های نهایی تهیه شده با کرایو اولترامیکروتوم بدون رنگ‌آمیزی درون Cryo-TEM مشاهده و تصویربرداری می‌شوند. در این صورت، کنتراست تصویر تهیه شده در مقایسه با نمونه‌های آماده شده با استفاده از روش تثبیت با مواد شیمیایی کاهش می‌یابد. علاوه‌بر این امر، وقوع آرتیفکت‌ها در هنگام تهیه برش‌های بسیار نازک از نمونه‌های منجمد نیز منجر به افت شدید قدرت تفکیک‌پذیری می‌شوند. پژوهشگران به‌منظور از بین بردن آرتیفکت‌های مذکور در هنگام تهیه برش از نمونه‌های منجمد از روش جایگزین میکروسکوپ الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز به جای کرایو اولترامیکروتوم استفاده می‌کنند. در دو بخش بعدی، به‌منظور آشنایی هر چه بیشتر خواننده محترم میکروسکوپ الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز تشریح و پیکربندی و ساختار درونی آن تعریف شده‌است.

معرفی میکروسکوپ Cryo-FIB-SEM

نخستین سیستم تجاری پرتو یونی متمرکز مبتنی بر فناوری نشر/گسیل میدانی توسط لوی-ستی[11] و اورلاف-سوانسون[12] با به‌کارگیری منابع یونیزاسیون میدان گازی[13] در سال ۱۹۷۵ ساخته شد. سپس سلیگر[14] و همکارانش در سال ۱۹۷۸ پیشنهاد استفاده از منبع یون فلز مایع[15] درون دستگاه FIB را ارائه نمودند. این منبع مزایای زیادی از جمله: چگالی جریان بالا، روشنایی بالا و پخش انرژی یون پایین را فراهم می‌آورد. در سال‌های اخیر فرآیند آماده‌سازی نمونه‌های مختلف TEM نظیر: نیمه هادی‌ها، فلزات، سرامیک‌ها، پلیمرها، بافت‌ها و نمونه‌های زیستی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز رشد قابل توجهی داشته است. در این مقاله،

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران
سال دوازدهم ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۳ ■ شماره پیاپی ۴۷

آماده‌سازی نمونه‌های زیستی منجمد با روشی بهینه مورد بررسی قرار می‌گیرد. دانشمندان حوزه زیستی به‌طور مرسوم از اولترامیکروتوم[16] و کرایو-اولترامیکروتوم[17] به ترتیب برای آماده‌سازی نمونه‌های زیستی و زیستی منجمد استفاده کردند. درصورت فراهم بودن شرایط ایده‌آل، اولترامیکروتوم و کرایو-اولترامیکروتوم لایه‌های فوق نازک بسیار مطلوبی را از نمونه ارائه می‌دهند. اما فراهم آوردن شرایط به‌طور کامل ایده‌آل امکان‌پذیر نبوده و همیشه نقایصی در روند آماده‌سازی وجود خواهد داشت. یکی دیگر از معایب استفاده از این دو دستگاه برای آماده‌سازی لایه‌های فوق نازک از نمونه‌های زیستی، عدم آشکار شدن نقایص تعبیه شده تا زمان مشاهده زیر میکروسکوپ الکترونی عبوری است. محققان این حوزه اخیراً به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌های زیستی منجمد با حداقل آسیب و همچنین مشاهده هم‌زمان فرآیند آماده‌سازی و نتیجه نهایی پیش از تصویربرداری درون TEM به‌طور موفقیت‌آمیزی از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی کرایو دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز استفاده کردند. در میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) الکترون‌هایی با جرم به نسبت پایین به‌صورت غیر مخرب با سطح نمونه برخورد نموده و منجر به تولید الکترون‌های ثانویه می‌شوند. درصورت جمع‌آوری این الکترون‌ها، دستیابی به تصویری با کیفیت و با قدرت تفکیک‌پذیری زیر نانومتری امکان‌پذیر می‌شود. پس از مدتی، دانشمندان برای افزایش کارایی میکروسکوپ SEM از دو پرتو درون آن استفاده کردند. آنها این میکروسکوپ را میکروسکوپ الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز (FIB-SEM) نامیدند. پس از ایجاد تغییراتی در محفظه نگهدارنده نمونه این نوع میکروسکوپ، محققان موفق به دستیابی به Cryo-FIB-SEM برای آماده‌سازی نمونه‌های زیستی و دیگر نمونه‌های مورد نیاز در حالت انجماد شدند. در حال حاضر، کاربردهای Cryo-FIB-SEM در حوزه علوم زیستی عبارتند از:

(الف): آماده‌سازی لایه بسیار نازک لاملا برای تحیل درون TEM؛

(ب): مکان‌نگاری نمونه‌های تعبیه شده درون ماتریکس؛

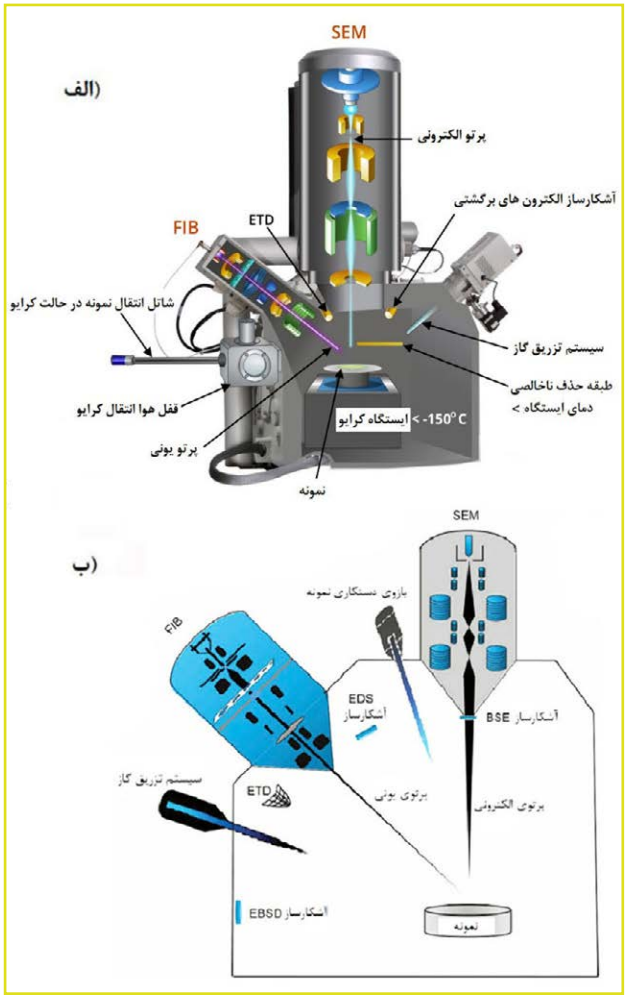
(ج): فرزکاری مکانی معین با استفاده از FIB و تصویربرداری با طیفی گسترده از بزرگنمایی‌ها با SEM.

FIB مشابه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بوده، اما به جای الکترون از پرتوی یون‌های گالیوم[18] (Ga+) استفاده می‌کند. یون‌های (Ga+) ۱۳۰۰۰۰ برابر سنگین‌تر از الکترون‌ها است، به همین دلیل برخورد آنها با سطح نمونه به‌طور قابل توجهی اثری قوی‌تر بر جای می‌گذارد. لازم به ذکر است که سطح نفوذ این یون‌ها پایین‌تر است. بنابراین، یون‌های مورد نظر پیوندهای شیمیایی را شکسته و منجر به یونیزاسیون اتم‌های زیرلایه می‌شوند. از آنجایی که پرتو یونی قابل تمرکز و کنترل‌پذیر بوده، لذا می‌توان از این ویژگی‌ها برای اصلاح کردن ساختار نمونه در مقیاس نانومتری استفاده کرد. به‌عبارت دیگر، می‌توان از پرتو یونی متمرکز (FIB) تعبیه شده درون ساختار SEM در ابعاد نانو به‌عنوان چاقوی جراحی برای آشکار ساختن جزئیات مکان خاصی از سطح زیرین ریزساختارها استفاده کرد. استفاده از دو ستون تولید کننده الکترون و یون درون میکروسکوپ الکترونی روبشی قابلیت دستیابی هم‌زمان به تصاویر SEM با تفکیک‌پذیری بسیار بالا توسط پرتو الکترون و همچنین انجام اصلاحات مورد نیاز روی نمونه با به‌کارگیری پرتو یونی را فراهم می‌کند. درصورت به‌کارگیری ستون‌های تولید کننده الکترون و یون درون میکروسکوپ الکترونی روبشی می‌توان هم‌زمان عملیات اصلاح نمونه‌های زیستی با پرتو یونی را اجرا و با استفاده از پرتو الکترونی و قدرت تفکیک‌پذیری بالا به‌صورت زنده شاهد آن عملیات بود. در این صورت، برخلاف اولترامیکروتوم و کرایو-اولترامیکروتوم می‌توان در هر لحظه به‌طور بلادرنگ از وقوع آسیب، نقص و یا خطا در عملیات تهیه مقاطع فوق‌العاده نازک اطلاع پیدا کرد. این امر به نوبه خود مزیتی بزرگ محسوب می‌شود. کاربردهای معمول این نوع میکروسکوپ دو پرتویی عبارتند از: تهیه سطح مقطع، آماده‌سازی لایه فوق‌العاده نازک به نام «لاملا» از نمونه میکروسکوپ الکترونی عبوری، بازسازی حجمی سه‌بعدی نمونه و لیتوگرافی یونی و الکترونی. از طرف دیگر، هنگامی که نیازی به استفاده از ستون FIB نباشد، می‌توان از این میکروسکوپ تنها به‌عنوان یک میکروسکوپ الکترونی روبشی میدانی معمولی نیز استفاده کرد.

پیکربندی و اصول عملکرد میکروسکوپ الکترونی روبشی کرایو دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز

دستگاه‌های تولید کننده پرتوهای یونی متمرکز (FIB) به‌عنوان یک فناوری بسیار مهم در نظر گرفته می‌شوند. امروزه، FIBهای مختلف نظیر: سیستم‌های FIB مستقل، میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز با منبع گالیوم[19]، میکروسکوپ‌های FIB-SEM با منبع پلاسما و میکروسکوپ‌های FIB-SEM با منبع هلیوم برای دستیابی به پاسخ‌های تحقیقاتی و انجام عملیات نانوساخت به‌عنوان ابزاری کلیدی محسوب می‌شوند. در سال ۱۹۵۹ ریچارد فینمن بیان کرد که روزی در دنیای میکروسکوپی فناوری معرفی خواهد شد که به‌عنوان چشمان و دستان محققان، عملیات‌های فوق‌العاده ریز را انجام می‌دهد. ۴۰ سال پس از این سخنان، نخستین میکروسکوپ الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز (FIB-SEM) به‌طور تجاری در اختیار همگان قرار گرفت. با استفاده از این دستگاه می‌توان مکان معینی از طیف گسترده‌ای از مواد را با دقت نانومتری برش داد. به دلیل استفاده از فقط یون‌ها درون FIB می‌توان این گونه بیان کرد که سیستم مذکور تنها مواد اضافی از اطراف نمونه مورد نظر را حذف می‌کند. لذا به‌منظور دسترسی به سیستمی که قابلیت افزودن مواد

روی سطح نمونه درون دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی را نیز داشته باشد، باید از سیستم تزریق گاز[20] استفاده کرد. GIS سیستمی است که به‌طور محلی، گاز آلی فلزی را روی نمونه اضافه می‌کند. علاوه‌بر این، با استفاده از گاز واکنشی مناسب می‌توان نرخ زدایش را ارتقاء بخشید و یا حتی فرآیند لایه‌نشانی/رسوب‌دهی بخار شیمیایی[21] را در مناطقی معین اجرا کرد. در فرآیند لایه‌نشانی/رسوب‌دهی، الکترون‌های ثانویه تولید شده توسط پرتو یون اصلی، موفق به شکستن گازهای پیش‌ماده هیدروکربن شده و منجر به رسوب‌دهی/لایه‌نشانی یک ماده رسانا (نظیر: تنگستن، پلاتینیوم، کربن و غیره) یا عایق (همانند: مونوکسید سیلیکون[22]) می‌شوند. علاوه‌بر به‌کارگیری سیستم GIS، از طریق تعبیه یک ریزبازوی مکانیکی دستکاری نمونه (برای برداشتن و حرکت دادن نمونه‌ها و یا برش‌هایی از نمونه‌ها با دقت نانومتری) درون محفظه اصلی میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز می‌توان FIB را به یک واحد نانوساخت پیشرفته تبدیل نمود (شکل (۱)).



شکل (۱): (الف): سطح مقطعی از پیکربندی دستگاه تجاری دنیای واقعی Cryo-FIB-SEM [۱]. (ب): نمایی از میکروسکوپ الکترونی روبشی دربرگیرنده پرتو یونی متمرکز (FIB-SEM) مجهز به سیستم GIS و ریزبازوی مکانیکی [۲].

مهمترین قسمت دستگاه FIB، منبع تولید کننده پرتوی یونی آن است؛ زیرا درنهایت، ارزیابی سیستم‌های پرتو یونی متمرکز براساس کیفیت پرتوی برخورد کننده با نمونه انجام می‌شود. پرتوی یونی نهایی تحت تاثیر بسیاری از جوانب قرار گرفته که مهمترین آنها عبارتند از: منبع یونی و ستون دستگاه (شکل (۲)).

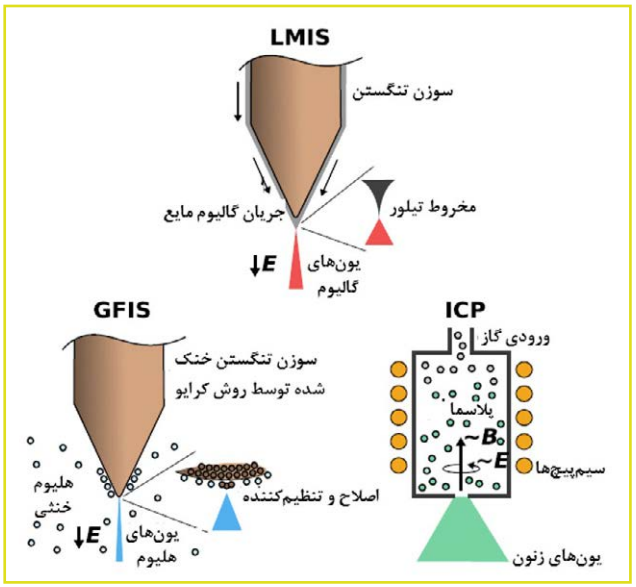
شکل (۲): نمایی از ستون FIB. (الف): ستون FIB دربرگیرنده منبع یونی (LIMS) و (ب): ستون FIB دربرگیرنده منبع یونی پلاسما [۳].

سال‌های متمادی، گالیوم به دلیل ارائه مزایایی نظیر: نقطه ذوب پایین (29/8°C)، فراریت و بی‌ثباتی پایین، فشار تبخیر پایین، انرژی آزاد سطح پایین، مشخصات انتشار و ویژگی‌های خلاء مناسب به‌عنوان منبع یون محبوب برای دستگاه FIB مورد استفاده قرار گرفته است. گالیوم به اندازه کافی سنگین بوده و قابلیت کندوپاشی طیف گسترده‌ای از مواد مختلف را دربر دارد. البته لازم به ذکر است که پرتوی متمرکزی از یون‌های گالیوم مشکلات مهمی را هنگام پردازش برخی مواد ایجاد می‌کند. این امر هنگام در نظر گرفتن برهم‌کنش‌های یون-جامد به وضوح قابل مشاهده است. پرتو یونی مورد نظر به نمونه برخورد کرده و در نتیجه، یون‌های بکار رفته به روش‌های مختلف با اتم‌های نمونه برهم‌کنش می‌کنند. یون‌ها (هر نوع یونی) در زمان برخورد با اتم‌های نمونه، انرژی خود را از دست می‌دهند. در هنگام وقوع هر یک از برهم‌کنش‌های مذکور، انرژی در طول این فرآیند آماری منتقل (و یا اتلاف)

می‌شود. اتلاف انرژی مورد نظر در بیشتر مواقع ناشی از اتلاف‌های انرژی هسته (الاستیکی) $[dE/dx]_{nucl}$ و اتلاف‌های انرژی الکترونیکی (غیرالاستیکی) $[dE/dx]_{elec}$ به وقوع می‌پیوندد (رابطه (۱)):

رابطه ۱ $$dE/dx = [dE/dx]_{nucl} + [dE/dx]_{elec}$$

همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود، منبع تولید کننده پرتوی یون هلیوم (منبع یونیزاسیون میدان گازی-GFIS) به دلیل استفاده از نوک تیز و یونیزاسیون میدانی از لحاظ تئوری با منبع یون فلزی مایع قابل مقایسه بوده اما لازم به ذکر است که اتم‌های هلیوم خنثی در انتظار تبدیل شدن به یون به جای جاری شدن در سرتاسر سوزن درون حالت خلاء حول نوک سوزن به سیستم وارد می‌شوند. هنگام رسیدن اتم هلیوم به نوک سوزن مورد نظر این امکان وجود دارد که به دلیل وجود میدانی قوی در سطح نوک مذکور، این اتم یونیزه شود. دستکاری انتهای نوک سوزن مورد نظر به‌گونه‌ای که درنهایت شکل آن به‌صورت یک هرم سه طرفه تغییر پیدا کند، منجر به حصول عملکرد عالی می‌شود. با وجودی که در برخی موارد، عملکرد هلیوم بهتر از گالیوم بوده اما باید در نظر داشت که این نوع منبع یونی دارای معایبی همچون: بهره کندوپاشی پایین و جریان کل پایین است. یکی دیگر از منابع تولید کننده یون، منابع یونی مبتنی بر پلاسما هستند. منابع یونی مبتنی بر پلاسما دربر گیرنده یک مزیت و یک عیب هستند که به ترتیب عبارتند از: جریان بالا و روشنایی پایین. اخیراً دانشمندان منبع پلاسمای جفت شده القایی[۲۳] روشنی را ساخته‌اند که هم‌زمان با بالا نگاه داشتن جریان، قدرت تفکیک‌پذیری بالایی را نیز ارائه می‌دهد. این نوع منبع، یون‌های زنون سنگین و ساکن را تولید می‌کند. به‌منظور مقایسه منابع با یکدیگر و انتخاب بهترین منبع برای کارکردهای مختلف به جدول (۱) مراجعه نمایید.



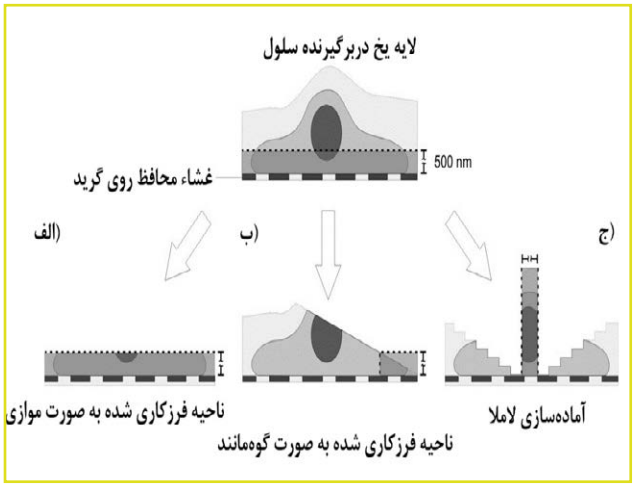
شکل (۳): سه منبع پرکاربرد برای تولید یون در ساختار دستگاه FIB. اشکال سمت چپ، میانی و سمت راست به ترتیب نمایانگر منبع تولید کننده یون‌های گالیوم، منبع تولید کننده یون‌های هلیوم و منبع تولید کننده یون‌های زنون هستند [۴].

جدول (۱): مقایسه منابع یونی تجاری به همراه مشخصات مهم آنها [۴].

واحد سنجش	ICP	GFIS	LMIS	
A/m²srV	۹/۱ × ۱۰³	۱ × ۱۰⁹	۶ × ۱۰⁵	روشنایی
eV	۶/۷	≤ ۱	۵	توزیع انرژی fwhm
nm	۷/۲ × ۱۰³	≤ ۰/۲۵	۳۸	اندازه مجازی منبع
nA	۲۵۰	۰/۱	۳۰	بیشینه مقدار جریان پرتو
	Xe	He	Ga	گونه‌های اصلی یونی
	H, He, Ne, Ar, O_2, …	Ne	B, Be, Si, Sn, Au, …	گونه‌های سازگار

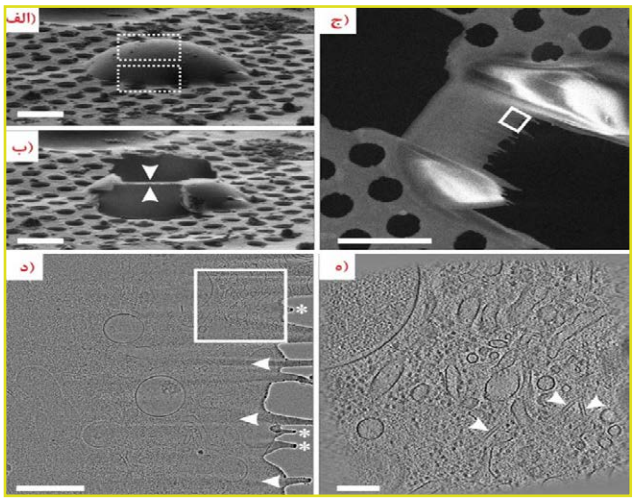
▣ رویه تهیه مقاطع بسیار نازک معروف به لاملا از نمونه‌های زیستی منجمد با استفاده از میکروسکوپ Cryo-FIB-SEM

دانشمندان پس از تحقیقات فراوان اثبات کردند که استفاده از روش فرزکاری با دستگاه FIB برای آماده‌سازی نمونه‌های زیستی منجمد بسیار کاربردی است. در روش فرزکاری نمونه منجمد، از یک لایه بسیار نازک از یون‌ها (به‌طور معمول گالیوم) به‌منظور ایجاد برش در سطح نمونه از طریق فرآیند کندوپاشی استفاده می‌شود. به‌منظور حصول اطمینان از آماده‌سازی نمونه‌ای بهینه، تمام رویه ذکر شده با استفاده از سیستم SEM موجود درون دستگاه Cryo-FIB-SEM مورد نظارت قرار می‌گیرد. به دلیل احتمال صدمه دیدن نمونه باید حتماً برهم‌کنش مستقیم بین یون‌ها و نمونه منجمد در نظر گرفته شود. لازم به ذکر است، به‌کارگیری یون گالیوم با مشخصاتی نظیر: جریان ۱۰ pA و ولتاژ ۳۰ kV منجر به خارج شدن نمونه از حالت انجماد نمی‌شود. علاوه‌بر این، برهم‌کنش یون‌های FIB با نمونه منجمد منجر به ایجاد لایه‌ای یونی با ضخامتی بین ۵ تا ۲۰ نانومتر روی سطح در حال فرآیند فرزکاری می‌شود. به عبارت دیگر، می‌توان بیان نمود که ضخامت لایه یونی ایجاد شده در شرایط وجود نمونه‌های منجمدی با ضخامت تقریبی ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر را می‌توان نادیده گرفت. گذشته از این، لایه یونی مذکور در مقایسه با شکاف‌های یافت شده درون برش‌های منجمد، دارای ضخامتی بسیار نازک‌تر است. ریزماشین کاری FIB از نمونه‌های منجمد، به‌صورت تقریبی روشی نوین بوده که در سال‌های اخیر برای آماده‌سازی نمونه‌های سلولی فراوان روی گریدهای میکروسکوپ الکترونی عبوری بکار برده شده‌است. به این صورت که سلول‌ها ابتدا روی گریدهای میکروسکوپ الکترونی عبوری تعبیه شده و سپس با روش انجماد از طریق فروبری سریع منجمد می‌شوند. پس از مرحله انجماد، نمونه‌های منجمد برای انجام مرحله تهیه برش‌های بسیار نازک با دقتی در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر به دستگاه Cryo-FIB-SEM منتقل می‌شوند. در این مرحله، استفاده از روش‌های فرزکاری متفاوتی با استفاده از FIB برای آماده‌سازی نمونه‌های سلولی منجمد مذکور امکان‌پذیر است. به‌عنوان مثال، شکل هندسی بهینه برای سلول‌های کوچک پروکاریوتی[۲۴] گوه‌مانند بوده که برای این منظور، ماده منجمد با زاویه باز (منفرجه) (به‌طور تقریبی ۱۰ درجه) نسبت به سطح گرید مورد نظر بریده می‌شوند. از ماده منجمد گوه مانند می‌توان با طول شفافیت تا ۳ um و شیب ضخامتی کمتر از ۴۰۰ نانومتر تصویربرداری کرد (شکل (۴)).



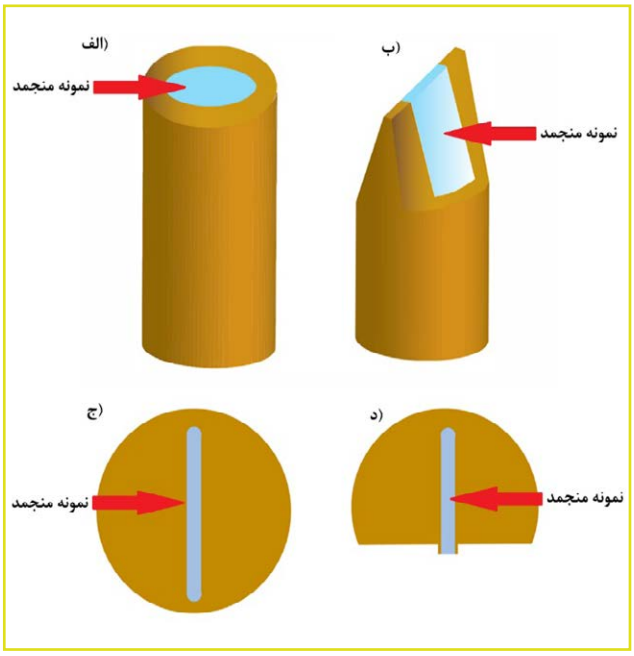
شکل (۴): نمایش روش‌های موجود فرزکاری نمونه‌های سلولی منجمد با FIB. (الف): روش فرزکاری موازی: در این روش، زاویه برخورد پرتو یونی موازی با سطح گرید میکروسکوپ الکترونی عبوری است. (ب): فرزکاری گوه‌مانند: در این روش، فرزکاری با استفاده از تاباندن پرتو یونی با زاویه منفرجه روی نمونه سلولی منجمد انجام می‌شود. (ج): آماده‌سازی کرایو لاملا: در این روش، نمونه منجمد برای دستیابی به لاملایی باریک فرزکاری شده که در این صورت مشخصات سلولی آن در امتداد محور z به‌طور بهینه حفظ می‌شود [۵].

سلول یوکاریوتی[۲۵] و دیگر سلول‌های هم شکل و هم اندازه آن، درون یک غشاء مستقل فرزکاری می‌شوند. در طول این فرآیند ابتدا ناحیه مورد نظری از نمونه مشخص می‌شود و سپس بخش بالایی و پایینی ناحیه مذکور به‌صورت مستطیل شکل بریده شده که درنهایت، منجر به حصول یک غشاء بسیار نازک معروف به «لاملا» می‌شود (شکل (۵)).

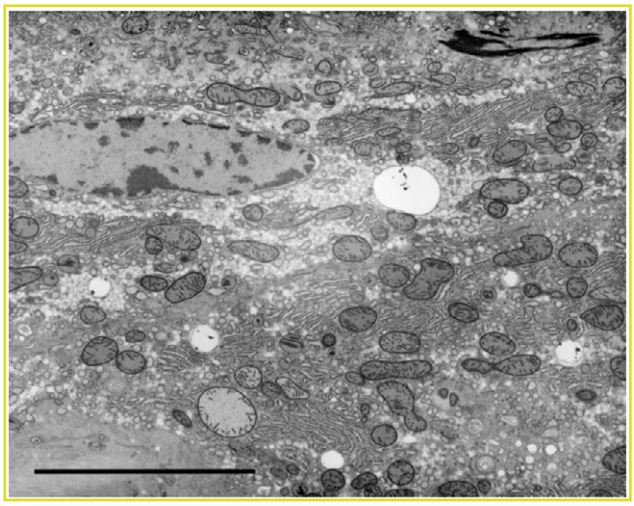


شکل (۵): نمایش فرآیند فرزکاری سلول D. discoideum . (الف): تصویری از سلول مذکور تعبیه شده درون لایه‌ای نازک از یخ و چسبیده به گرید میکروسکوپ الکترونی عبوری. (ب): فرزکاری نواحی بالایی و پایینی نمونه برای دستیابی به لاملا باریک نهایی. (ج): نمایی با زاویه مختلف از لاملا نهایی تهیه شده. (د): پس از انتقال لاملا نهایی درون TEM این تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از مربع سفید واقع درون شکل (ج) تهیه شده‌است. در این تصویر، سیتوپلاسم سلول مذکور مشهود است (ستاره‌های سفید نماینده قطرات برجسته گالیوم و سر پیکان‌های سفید نیز نمایش دهنده آسیب پرده‌ای است). (ه): تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از مربع سفید رنگ واقع درون شکل (د) [۶].

یکی دیگر از گزینه‌ها برای دستیابی به لاملا، روش مرسوم به بیرون کشیدن FIB است. لازم به ذکر است تا مدتی پیش به دلیل دشواری لایه‌نشانی پلاتینیوم در دماهای انجماد، این روش غیر ممکن محسوب می‌شد. در این روش، ابتدا ناحیه مورد نظر با استفاده از SEM شناسایی می‌شود. سپس نمونه با استفاده از پلاتینیوم (Pt) در فضای کرایو لایه‌نشانی شده و دو شیار در دو طرف لاملا مورد نظر فرزکاری می‌شود. این امر به‌منظور استخراج لاملا انجام می‌شود. در مراحل بعدی، اطراف و پایین لاملا بریده شده و سپس لاملا با استفاده از ریزبازوی مکانیکی دستکاری نمونه کرایو در مقیاس نانو بیرون کشیده می‌شود. در مرحله بعدی، لاملای بیرون کشیده شده با لایه‌نشانی پلاتینیوم به گرید TEM چسبانده می‌شود. در مرحله نهایی نیز لاملای چسبیده به گرید آنقدر نازک شده تا الکترون‌ها در TEM بتوانند از آن عبور کرده و در نتیجه، تصویر واضح و شفافی به‌دست آید. روش تهیه لاملا از نمونه نسبت به روش برش گوه‌مانند بهتر است؛ زیرا در روش برش گوه‌مانند، هندسه برش ساده اجازه یافتن و هدف قرار دادن ساختارهای مورد نظر تعبیه شده در اعماق حجم سلولی را نمی‌دهد. لازم به ذکر است، نمونه‌های ضخیم و سوسپانسیون سلول‌ها و همچنین نمونه‌های بافتی درون لوله مسی یا درون صفحات مدور تخت فلزی به روش انجماد با اعمال فشار زیاد آماده می‌شوند (اشکال (۶) و (۷)).



شکل (۶): نمایی از برش دادن نمونه‌های منجمد شده با اعمال فشار زیاد درون کرایو اولترامیکروتوم. (الف) و (ب): نمونه‌های منجمد شده درون لوله‌های مسی. فلز اضافی با استفاده از کرایو اولترامیکروتوم حذف شده و تنها سطحی گوه‌مانند (همانند سقف منزل) بر جای گذاشته که این امر فرآیند فرزکاری درون Cryo-FIB-SEM را تسهیل می‌کند. (ج) و (د): نمایش دهنده نمونه‌های منجمد و تعبیه شده درون صفحات تخت آلومینیومی استاندارد (همانند کلاه). در اینجا نیز به‌طور مشابه فلز اضافی حذف شده و سپس ضخامت نمونه آشکار شده به ۲۰ um کاهش می‌یابد [۷].



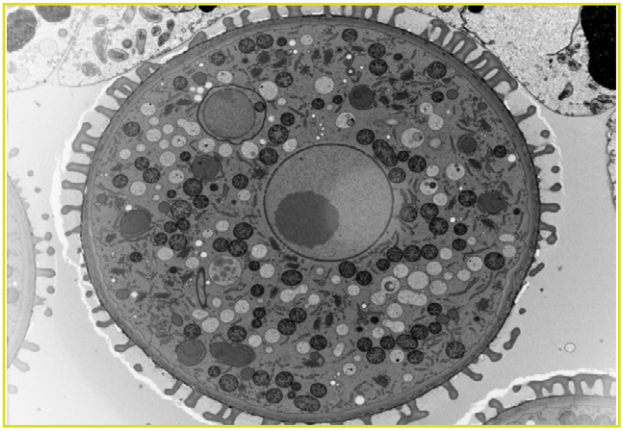
شکل (۷): تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از بافت کبد موش آماده شده به روش انجماد با اعمال فشار زیاد که برش نهایی از آن برای تصویربرداری درون میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو توسط Cryo-FIB-SEM تهیه شده‌است [۸].

این نوع نمونه‌ها ابتدا در مرحله پیش اصلاح با استفاده از کرایو-اولترامیکروتوم برش داده می‌شوند. متعاقباً، نمونه منجمد به درون دستگاه Cryo-FIB-SEM انتقال یافته و مطابق با روش قالب H فرزکاری روی آن انجام می‌گیرد. درنهایت، لاملا مورد نظر با ضخامت بهینه از نمونه اصلی تهیه می‌شود. سپس لاملا برای تصویربرداری در حالت دوز پایین درون میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو قرار می‌گیرد. نکته مهم در مراحل تشریح شده، انجام هر یک از آنها در دمای انجمادزدایی و به حداقل رساندن فرآیند تشکیل برفک در طول مراحل انتقال نمونه بین دستگاه‌ها است. همین امر، استفاده از تجهیزات سفارشی و مخصوص را برای هر یک از دستگاه‌های تجاری موجود الزامی می‌سازد. برای نمونه‌های منجمد شده با روش فروبری سریع ایستگاه‌های انتقال FIB کرایو و ابزار جابجایی FIB کرایو (اشکال (۸) و (۹)) موجود بوده، در حالی که نمونه‌های منجمد شده با استفاده از روش انجماد با اعمال فشار زیاد به سیستم‌های انتقال پیشرفته و پیچیده‌ای نظیر سیستم میز نانوکرایو یا نگهدارنده نمونه میانی(شکل (۱۰)) نیازمند هستند.

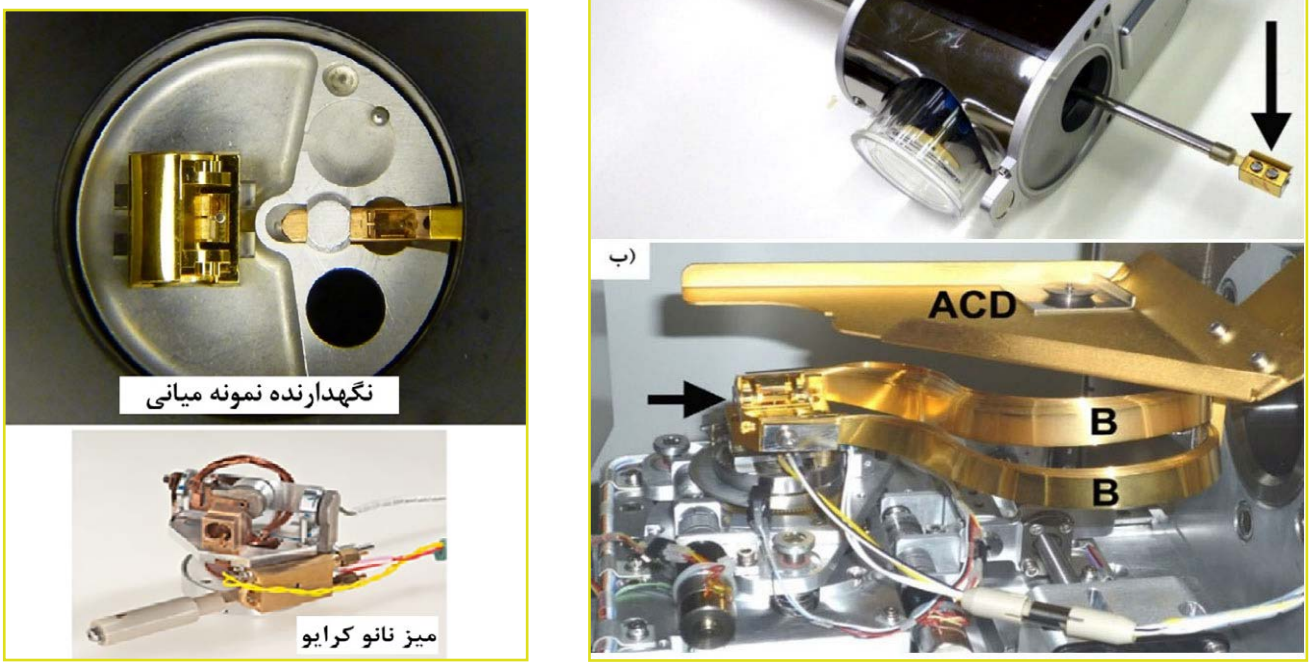
روش آماده‌سازی نمونه با تجهیزات Cryo-FIB-SEM دسترسی قابل کنترل به ساختارهای ابرمولکولی خاص دفن شده درون سلول مورد نظر را فراهم می‌آورد. علاوه‌بر این، بیشتر کمپلکس‌های درشت مولکولی موجود در تعداد کپی پایین را می‌توان با استفاده از روش درون محیط سلولی طبیعی خود بررسی کرد. دلیل این امر، قابلیت آماده‌سازی لاملاهایی با محیطی بیشتر از $100um^2$ است. البته توان عملیاتی این روش آماده‌سازی به چندین دلیل پایین است. همان‌طور که پیش‌تر نیز ذکر شد، پرتو یونی تابیده شده باید تا حد امکان دوز پایینی داشته باشد؛ زیرا علاوه‌بر اینکه هر چه زاویه فرزکاری کوچکتر باشد ناحیه مشاهده بزرگتری به‌دست می‌آید، این امر اثر لایه‌نشانی نمونه فرزکاری شده را نیز به حداقل می‌رساند. مورد دوم ذکر شده رابطه متقابلی با جریان‌های فرزکاری یا دیگر عوامل در طول فرآیند نازک‌سازی نمونه ندارد. ترکیبات ناهمگن و متغیر نمونه‌های منجمد

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال دوازدهم ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۳ ■ شماره پیاپی ۴۷

دلیل وقوع یکی از عیوب اصلی این روش آماده‌سازی به نام حالت پرده‌ای هستند. درنهایت، حالت پرده‌ای منجر به حصول ناهمگنی شدید در ضخامت لاملاها می‌شود. این اثرات را می‌توان به‌طور قابل توجهی از طریق لایه‌نشانی پلاتینیوم آلی فلزی با استفاده از سیستم تزریق گاز (بدون ساطع نمودن پرتو الکترونی یا یونی) روی نمونه مورد نظر پیش از آماده‌سازی لاملا به حداقل رسانید. یکی دیگر از مسائل، میزان اطلاعات به‌دست آمده از نمونه‌های آماده شده در طول فرآیند توموگرافی الکترونی کرایو است. در طول فرآیند فرزکاری با Cryo-FIB-SEM بخشی از نمونه منجمد در امتداد تمام محورها به‌طور فیزیکی نابود می‌شود. به‌منظور رفع این مسئله، پس از حصول یک سری از برش‌های متوالی از نمونه منجمد در شرایط کرایو، بیشتر اطلاعات در امتداد محورهای مذکور (به‌خصوص محور z) بازیابی می‌شوند. مسئله دیگر، زمان مورد نیاز برای آماده‌سازی نمونه پیش از مرحله تصویربرداری و مشاهده است. به‌عنوان مثال، به دلیل اندازه بزرگ‌تر سلول‌های یوکاریوتی در مقایسه با نمونه‌های پروکاریوتی، زمان فرزکاری آنها نیز بیشتر خواهد بود. یکی دیگر از مسائل مربوط به اندازه نمونه‌های منجمد، شناسایی و هدف‌گیری مناطق خاص در آنها است. به‌عنوان مثال، باسیل اشرشیاکلی[۲۶] دربرگیرنده اندازه کوچک بوده لذا تشخیص آن از یخ منجمد شفاف آسان است. در مقابل، سلول‌های یوکاریوتی به دلیل اندازه‌شان، با یخ ضخیم احاطه شده و در نتیجه، شناسایی منطقه مورد نظر در آنها آسان نیست. به‌منظور غلبه بر این محدودیت می‌توان برای یافتن منطقه مورد نظر در نمونه منجمد تا حد امکان مناطق مجاور را فرزکاری کرد یا از روش‌های همبسته میکروسکوپ الکترونی و نوری استفاده کرد. بدین صورت که پیش از مرحله انجماد سلول‌ها، روی گریدهای میکروسکوپ الکترونی عبوری رشد داده شده و سپس تصاویر میکروسکوپ نوری از آنها تهیه می‌شود. در ادامه، براساس همین تصاویر، مناطق مورد نظر برای انجام فرآیند فرزکاری Cryo-FIB-SEM انتخاب می‌شوند. درنهایت، پیش از آماده‌سازی نمونه با استفاده از Cryo-FIB-SEM، از نمونه منجمد مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ کرایو فلورسانس برای انجام تحلیل‌های بیشتر تصویربرداری به عمل می‌آید.



شکل (۹): تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از دانه گرده گیاه آرابیدوپسیس (رشادی گوش‌موشی) آماده شده به روش انجماد از طریق فروبری سریع که برش نهایی ۱۰ نانومتری از آن برای تصویربرداری درون میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو با Cryo-FIB-SEM تهیه شده‌است [۸].



شکل (۸): ابزار جابجایی نمونه‌های منجمد شده با روش فروبری سریع بین کرایو اولترامیکروتوم، Cryo-FIB-SEM و میکروسکوپ الکترونی عبوری. (الف): این شکل نشان‌دهنده شاتل جابجایی نمونه‌های منجمد شده با استفاده از روش فروبری سریع (پیکان مشکی) است. (ب): این شکل نیز نمایش دهنده ایستگاه پذیرش نمونه منجمد شده با روش فروبری سریع (پیکان مشکی) درون Cryo-FIB-SEM است [۷].

شکل (۱۰): (الف): نگهدارنده نمونه میانی برای انتقال نمونه‌های منجمد شده با استفاده از روش انجماد با اعمال فشار زیاد درون ایستگاه کاری [۷]. (ب): سیستم پیشرفته و پیچیده میز نانوکرایو برای انتقال نمونه‌های منجمد شده با استفاده از روش انجماد با اعمال فشار زیاد [۹].

نتیجه‌گیری

آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری به‌طور مرسوم از طریق به‌کارگیری مواد شیمیایی، فلزات سنگین و اولترامیکروتوم انجام می‌پذیرد. لازم به ذکر است، هر یک از موارد مذکور به نوعی آسیب روی نمونه‌های زیستی بر جای گذاشته و در نتیجه منجر به افت کیفیت و کاهش شدید تفکیک‌پذیری تصاویر نهایی TEM می‌شوند. به همین منظور، آماده‌سازی و برش‌برداری از نمونه‌های زیستی باید به‌گونه‌ای انجام شود که میزان وقوع آسیب به حداقل رسیده و درنهایت، تصاویر TEM با کیفیت و تفکیک‌پذیری بالایی حاصل شوند. دانشمندان برای تحقق این امر، روش‌های مختلفی را بررسی نموده و به این نتیجه رسیدند که درصورت منجمد ساختن نمونه‌های زیستی و برش‌برداری از آنها در همان حالت انجماد می‌توان آنها را در نزدیک‌ترین حالت به حالت طبیعی‌شان نگاه داشت. در این صورت، تصاویر TEM تهیه شده از چنین نمونه‌هایی حاوی بیشترین اطلاعات ممکن از حالت طبیعی حفظ شده خواهد بود. آنها ابتدا موانع مربوط به آماده‌سازی انجمادی نمونه‌های زیستی را رفع کرده و سپس به عیوب موجود مربوط به مرحله تهیه مقاطع بسیار نازک از نمونه‌های مذکور با استفاده از کرایو-اولترامیکروتوم پرداختند. پس از تحقیقات فراوان به این نتیجه رسیدند که استفاده از میکروسکوپ Cryo-FIB-SEM بهترین نتایج را ارائه می‌کند. این دستگاه دربرگیرنده میکروسکوپ الکترونی روبشی و سیستم تولیدکننده پرتو یون متمرکز درون یک ستون است. در نتیجه می‌توان هر دو پرتو مذکور حاوی الکترون و یون را به‌طور هم‌زمان روی یک نقطه یکسان از نمونه متمرکز نمود. بدین معنی که در این دستگاه، هنگام تهیه مقاطع بسیار نازک معروف به (لاملا) از نمونه‌های زیستی منجمد در حالت کرایو با سیستم پرتو یونی متمرکز (FIB) می‌توان به‌طور واضح و بلادرنگ عملیات مربوطه را از طریق سیستم میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشاهده و هدایت کرد، که این امر به نوبه خود، مزیتی بسیار مطلوب محسوب می‌شود. در این مقاله، دستگاه Cryo-FIB-SEM معرفی و نیازمندی شدید محققان فعال در این حوزه به آن نیز شرح داده شده‌است. همچنین رویه تهیه مقاطع بسیار نازک معروف به لاملا از نمونه‌های زیستی منجمد نیز به‌طور تفصیلی توضیح داده شده‌است.

پی‌نوشت

1. Robert Hooke
2. Diffraction Limit
3. Wilhelm Conrad Röntgen
4. Joseph John Thomson
5. Transmission Electron Microscope (TEM)
6. Transmission electron cryomicroscopy (CryoTEM)
7. Cryogenic focused ion beam and scanning electron microscopy (cryo-FIB/SEM)
8. Glycan
9. High-pressure freezing (HPF)
10. Plunge freezing (PF)
11. Levi-Setti
12. Orloff and Swanson
13. Gas Field Ionization Sources (GFISs)
14. Seliger
15. Liquid Metal Ion Source(LMIS)
16. Ultramicrotome
17. Cryo-Ultramicrotome
18. Gallium (Ga+)
19. Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM)
20. Gas Injection System (GIS)
21. Chemical Vapor Deposition (CVD)
22. SiOx
23. The inductively coupled plasma (ICP)
24. prokaryotic
25. Eukaryotic
26. Escherichia coli

مراجع

[1] https://myscope.training/CRYO_Introducing_cryo_FIB.

[2] Wolff A. Focused ion beams: An overview of the technology and its capabilities. Wiley Analytical Science. (2020).

[3] http://www.orsayphysics.com/what-is-fib.

[4] Kouwen L.V. Introduction to focused ion beams, ion sources, and the nano-aperture ion source. In: Advances in Imaging and Electron Physics Including Proceedings CPO-10; 2019, pp. 181-216.

[5] Rigort A, Bäuerlein F.J.B, Leis A, Gruska M, Hoffmann C, Laugks T, et al. Micromachining tools and correlative approaches for cellular cryo-electron tomography. Elsevier, Journal of Structural Biology 172 (2010) 169–179.

[6] Rigort A, Bäuerlein F.J.B, Villa E, Eibauer M, Laugks T, Baumeister W, et al. Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography. PNAS, March 20, 2012, vol. 109, no. 12, 4449–4454.

[7] De Winter D.A.M, Hsieh C, Marko M, Hayles M.F. Cryo-FIB preparation of whole cells and tissue for cryo-TEM: use of high-pressure frozen specimens in tubes and planchets. Journal of Microscopy, Vol. 281, Issue 2 2021, pp. 125–137.

[8] Kizilyaprak C, Stierhof Y.D, Humbel B.M. Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography. Elsevier, Tissue and Cell. (2018).

[9] Hayles M.F, De Winter D.A.M, Schneijdenberg C.T.W.M, Meeldijk J.D, Luecken U, Persoon H, et al. The making of frozen-hydrated, vitreous lamellas from cells for cryo-electron microscopy. Elsevier, Journal of Structural Biology 172 (2010) 180–190.

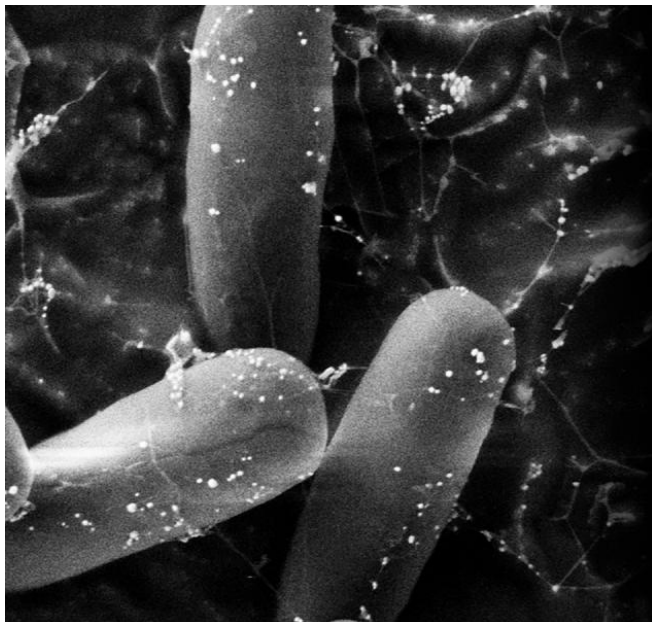
Author

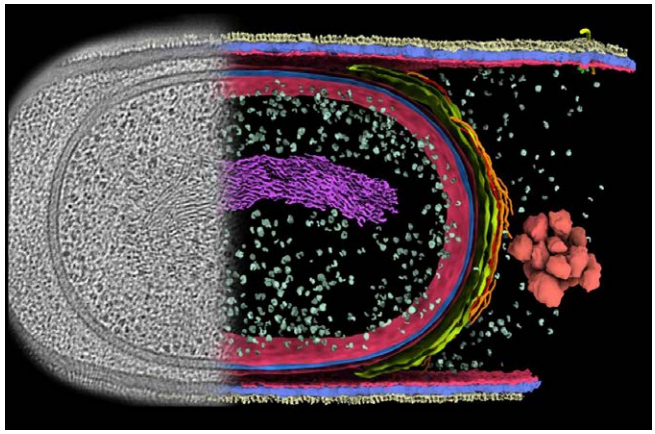
Sanaz Shobikeh[1,2*]

*researchers4u@gmail.com

1. Shiraz University Transmission Electron Microscope Laboratory Specialist

2. Member of National TEM Experts work group





Application of Cryo-FIB-SEM for Cryo-TEM lamella preparation from frozen biological specimen

Abstract

In recent years, Cryo-Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope (Cryo-FIB-SEM) has been used extensively in biological specimen preparation filed. This device is actually comprising of a Scanning Electron Microscope and a Focused Ion Beam system generating Gallium ions both integrated inside one column. As a result, it can focus both beams containing electrons and ions on one coincident point. Using Cryo-Ultramicrotome to prepare thin sections (less than 200nm thick) of frozen biological specimen for imaging inside Cryo-Transmission Electron Microscope (Cryo-TEM) is considered a routine procedure in many TEM laboratories across the world. Due to presence of some artifacts in this procedure, researchers looked for other possible options that are less prone to errors. After experimenting with some options, they are convinced that using Cryo-FIB-SEM for preparation of thin sections from frozen biological specimen is the best way to minimize the artifacts associated with this method. It is also should be noted that FIB offers nanometer resolution, and therefore it is possible to select a specific location of frozen biological specimen and apply sectioning procedure on that very spot. FIB uses ion beam instead of electrons to prepare uniformly thin sections (called: lamella) of samples. In this article, detailed preparation process of aforementioned lamella from frozen biological specimen for viewing inside Cryo-TEM using FIB has been depicted.

Keywords

Cryo Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope, lamella, Cryo Transmission Electron Microscope.

Iran Nanotechnology Laboratory Network

Iranian Journal of laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

Volume 12 ■ Issue 3 ■ Fall 2024 ■ No.47

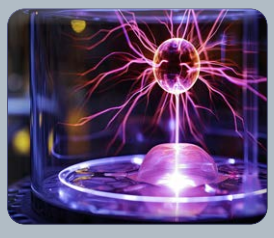
Risk in Third-Party Experiment

Application of Cryo-FIB-SEM for Cryo-TEM lamella preparation from frozen biological specimen

Transgenic products: friend or enemy

Aprossessment of the risk caused by heavy metals cadmium and lead in imported wheat samples in khorasan vince

Biomolecules Molecular weight measurements using Dynamic Light Scattering equipments



Application of cold plasma in agriculture and food

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir