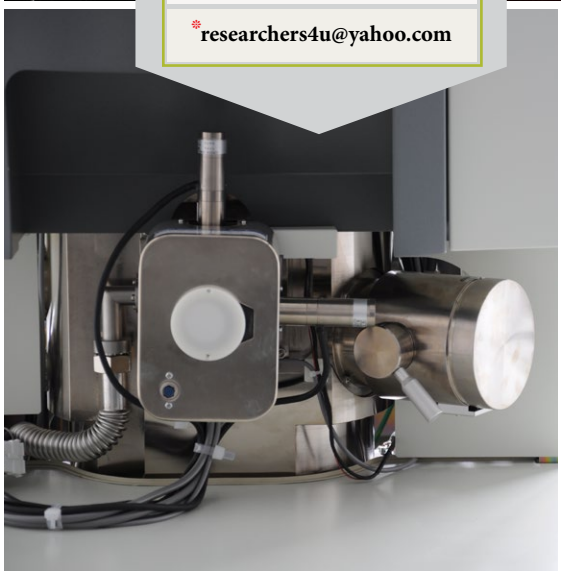
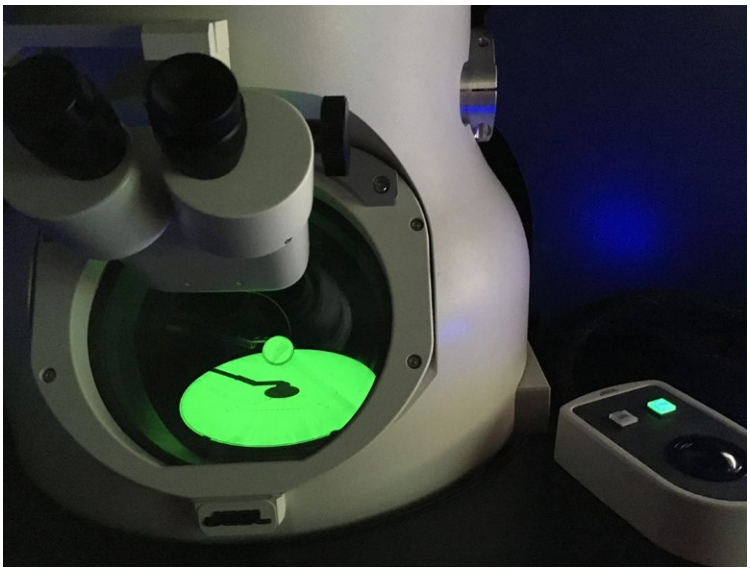
نویسندگان
سانازشبیکه[1]*
*researchers4u@yahoo.com





روش‌های آماده‌سازی و تصویربرداری از نمونه‌های زیستی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو

واژه‌های کلیدی
میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو، انجماد با اعمال فشار زیاد ، انجماد از طریق فرو بردن سریع[2].

چکیده

نخستین میکروسکوپ با منبع نور توسط زاکاریاس یانسن[3] هلندی در دهه ۱۶۰۰ میلادی و نخستین میکروسکوپ الکترونی با منبع الکترون نیز حدود ۳۰۰ سال بعد توسط مکس نول[4] و ارنست روسکا[5] در دهه ۱۹۳۰ اختراع شد [۱]. به دلیل استفاده از منبع الکترون، فضای خلاء، لنزها و میدان‌های مغناطیسی مختلف میکروسکوپ الکترونی عبوری[6] بزرگنمایی و رزولوشن بسیار بیشتری نسبت به میکروسکوپ معمولی ارائه می‌دهد. شکل‌گیری تصویر در میکروسکوپ‌های TEM مستلزم عبور الکترون-های زیادی از نمونه است. به همین منظور ضخامت نمونه باید آنقدر کم باشد که الکترون‌ها قادر به عبور از آن باشند. برآورده شدن این امر به‌خصوص در زمینه‌ی آماده‌سازی نمونه‌های بافتی و سوسپانسیون زیستی برای مشاهده درون میکروسکوپ TEM از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به پیشرفت‌های به وقوع پیوسته در حوزه‌های فناوری و پزشکی، مشکلات مربوط به روش‌های مرسوم آماده‌سازی نمونه‌های زیستی نظیر: آبگیری، نفوذدهی رزین پلاستیکی به جای آب درون بافت، حفظ ساختار درون سلولی آنها نزدیک به حالت زنده، طولانی بودن فرآیند آماده‌سازی، رنگ‌آمیزی منفی و غیره منجر شده‌است تا محققان حوزه زیست‌شناسی به دنبال روش‌هایی کارآمد برای آماده‌سازی و مشاهده‌ی نمونه‌های زیستی باشند. در دهه ۱۹۸۰ گروهی از پژوهشگران موفق به آماده‌سازی و تصویربرداری از یک نوع ویروس با روش انجماد درون میکروسکوپ TEM شدند. پس از مشاهده‌ی مزایای روش تصویربرداری در حالت انجماد، انگیزه‌ی اولیه برای طراحی میکروسکوپ الکترونی که دارای قابلیت نگهداری نمونه در دمای انجماد باشد در ذهن محققان این حوزه پدید آمد. این نوع میکروسکوپ‌ها با نام «میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو[7]» شناخته شده‌اند. منشاء کلمه CRYO یا CRYOS یونانی و به معنی «دمای انجماد» است. نمونه‌های زیستی برای مشاهده درون این نوع میکروسکوپ ابتدا سریع منجمد شده، و بیشتر آنها پس از طی کردن فرآیندی کوتاه بدون اعمال مرحله آبگیری آماده می‌شوند. در این مقاله، روش‌های آماده‌سازی نمونه‌های زیستی مختلف برای مشاهده و تصویربرداری درون میکروسکوپ Cryo-TEM به‌صورت کامل شرح داده شده‌است.

مقدمه

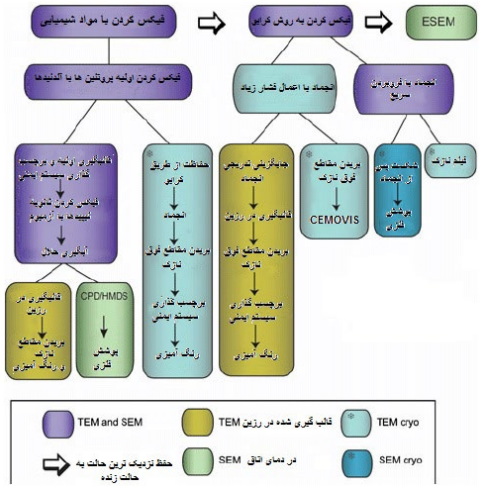
میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو نوعی از میکروسکوپ الکترونی عبوری مرسوم بوده که نمونه زیستی درون آن در دمای تبرید (معمولاً برابر با دمای نیتروژن مایع) بررسی می‌شود. لازم به ذکر است تا پیش از به‌وجود آمدن روش میکروسکوپ الکترونی کرایو، دو روش برتر و محبوب برای بررسی ساختار نمونه‌های زیستی در سطح مولکولی و اتمی با عناوین: بلور نگاری با استفاده از اشعه ایکس[۹] و طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای[۱۰] در اختیار محققان بوده‌اند. به دلیل محدودیت ساختار این مقاله از شرح دو روش فوق خودداری می‌شود. چالش‌های موجود در هر یک از این دو روش و نیاز محققان برای به حداقل رساندن میزان تخریب نمونه‌های زیستی توسط اشعه الکترونی برای تشخیص بهتر، منجر به ابداع روش CRYO-TEM شد. مقدار الکترون‌های ساطع شده از تفنگ الکترونی میکروسکوپ TEM که برای تصویربرداری از نمونه عبور می‌کند به اندازه‌ای است که قادر به تخریب ساختارهای حساس آن است. علاوه بر این، خلاء بالای موجود در ستون میکروسکوپ الکترونی، محیط کاملاً نامناسبی را برای نمونه‌ی زیستی ایجاد می‌کند.

محققان برای غلبه بر چالش خلاء از روش رنگ‌آمیزی منفی استفاده کردند که تا حدودی موفقیت‌آمیز بود. به دلیل اعمال مرحله آبگیری و جایگزین نمودن آب درون نمونه با رزین پلاستیکی، نمونه‌های زیستی درصورت قرار گرفتن در معرض تابش مستقیم الکترون‌ها مستعد به تخریب هستند. آب دشمن شماره یک متخصصین حوزه آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای میکروسکوپ الکترونی محسوب می‌شود. در بیشتر مواقع حتی با تجربه ترین متخصصان آماده‌سازی نمونه‌های زیستی در مرحله آبگیری مقلوب این دشمن می‌شوند (بدین معنی که مولکول‌ها پس از خارج کردن آب از نمونه تخریب می‌شوند). محققان پس از تلاش‌های بی‌شمار به این نتیجه رسیدند که با خنک نگاه داشتن نمونه زیستی می‌توان بر این چالش غلبه نموده و این دشمن را به یک دوست مفید مبدل ساخت. به‌طور کلی هدف اصلی از بکارگیری روش کرایو، انجماد سریع نمونه‌های زیستی بدون از بین بردن یا جایگزینی مایع درون آنها است.

استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو به محققان کمک می‌کند که بدون استفاده از رنگ‌های در برگیرنده فلزات سنگین (نظیر: اورانیل استات، سیترات سرب و غیره) کمپلکس‌های زیستی از قبیل: ویروس‌ها، ریبوزوم‌ها، میتوکندری‌ها، کانال‌های یونی و درشت مولکول‌های ۲۰۰ کیلو دالتونی یا بزرگتر ثابت نگاه داشته شده درون محیط یخ شیشه‌ای را مشاهده و تفسیر کنند. درصورت آماده‌سازی نمونه با کمک روش کرایو از مواردی نظیر: وقوع تغییرات فراساختاری، توزیع مجدد المان‌ها و شسته شدن مواد تشکیل دهنده‌ی نمونه جلوگیری به عمل می‌آید. به‌منظور حصول تصاویری باکیفیت و رزولوشن بالا از نمونه‌هایی که به‌طور سریع منجمد شده باید شرایط ذیل فراهم باشد: الف- کنترل و ثابت نگاه داشتن دمای انجماد نمونه در تمامی مراحل آماده‌سازی و تصویربرداری و ب- به حداقل رساندن ضخامت نمونه‌ی (۱۰۰-۳۰۰ nm) قرار گرفته شده روی گرید. بیشتر میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری کرایو برای ارائه رزولوشن بالا، در برگیرنده ولتاژ ۳۰۰ کیلوولتی هستند. بنابراین، میانگین الکترون‌های ساطع شده با کمک منبع ۳۰۰ کیلوولتی پیش از پراکنده شدن، تنها از ۲۶۰ نانومتر از سلول عبور می‌کنند. به همین دلیل در پایان مراحل آماده‌سازی باید نمونه ای با ضخامت کمتر از ۵۰۰ نانومتر به‌دست آید. به‌طور معمول به‌منظور کمینه‌سازی تخریب نمونه‌های قرار گرفته تحت اشعه در هنگام تصویربرداری از حالت دوز پایین الکترون استفاده می‌شود (حدود دوز الکترون در این حالت برابر با ۱۰-۲۰ e/A^2 است). علی‌رغم مزایای قابل توجه روش میکروسکوپ الکترونی کرایو برای مشاهده‌ی درون سلول‌ها با رزولوشنی نزدیک به سطح اتمی، این روش دارای معایبی نیز بوده که در ادامه این مقاله به آنها پرداخته می‌شود. ساختار کلی این مقاله به شرح ذیل است. در بخش (۲)، دو روش محبوب: انجماد با اعمال فشار زیاد[۱۱] و انجماد از طریق فرو بردن سریع[۱۲] به ترتیب برای آماده‌سازی نمونه‌های زیستی در قالب بافت و مایع به‌طور کامل شرح داده می‌شود. در بخش (۳)، مزایا و معایب استفاده از روش میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو به‌صورت فهرست‌وار ارائه شده‌است. بخش (۴)، روش‌های تصویربرداری و پردازش نوین وابسته به میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو را به‌طور خلاصه شرح می‌دهد. در بخش (۵) نیز نتیجه‌گیری کلی از این مقاله ارائه شده‌است.

روش‌های آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای Cryo-TEM

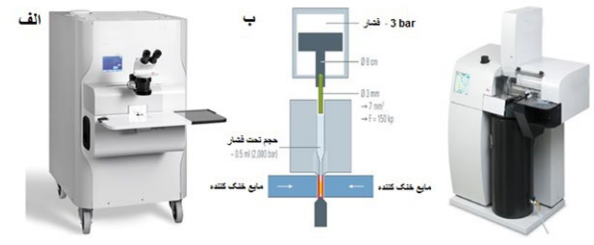
به‌طور کلی، نمونه‌های زیستی را می‌توان به دو دسته: ۱- نمونه‌های بافت و ۲- نمونه‌های سوسپانسیون تقسیم نمود. با توجه به این که ضخامت نمونه‌ها در میکروسکوپ الکترونی کرایو نباید از ۵۰۰ نانومتر تجاوز کند، لذا پژوهشگران برای کنترل ضخامت نمونه‌های متعلق به هر یک از این دو دسته، از روش‌های موثری استفاده می‌کنند. به‌منظور آشنایی اجمالی با انواع روش‌های آماده‌سازی موجود برای نمونه‌های زیستی، شکل (۱) ارائه شده‌است [۲]. لازم به ذکر است در این مقاله دو روش متدوال آماده-سازی نمونه‌های زیستی در آزمایشگاه‌های معتبر جهان برای تصویربرداری درون میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو به-صورت تفصیلی شرح داده می‌شوند.



شکل ۱: نمودار جامع روش‌های آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای میکروسکوپ‌های: Cryo-TEM، ESEM، SEM، TEM و Cryo-SEM [۲].

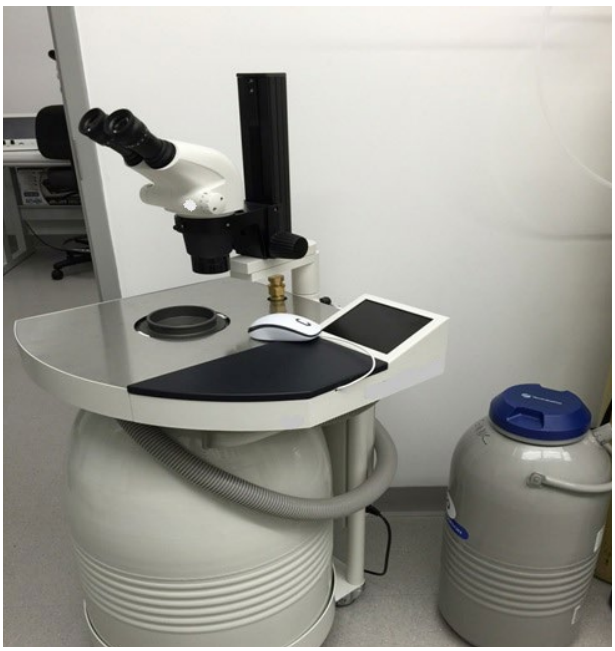
روش انجماد با اعمال فشار زیاد برای آماده‌سازی نمونه‌های بافت زیستی

روش HPF بکار برده شده برای آماده‌سازی نمونه‌های بافت زیستی خود به دو شاخه تقسیم می‌شود . ۱) در روش نخست به-منظور آماده‌سازی نمونه بافت برای میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو سه مرحله: انجماد به همراه اعمال فشار زیاد (شکل (۲))، جایگزینی تدریجی فرآیند انجماد[۱۳] و قالب‌گیری در دمای پایین[۱۴] به ترتیب برای حفظ بهینه ساختار کلی سلول ها باید با دقت اعمال شوند [۳]. ابتدا در مرحله انجماد با اعمال فشار زیاد، بافت‌ها یا سلول‌ها با آب داخلشان توسط اعمال فشار زیاد به-طور سریع منجمد می شوند. بدین ترتیب که بلوک تهیه شده از بافت، درون فریزری با فشار بالا (پر فشار) قرار می‌گیرد، این دستگاه فشار بسیار زیادی را بر بلوک بافت اعمال نموده و خیلی سریع از طریق نیتروژن مایع، درون بافت مذکور را منجمد می‌کند. دلیل اعمال این فشار زیاد، جلوگیری از تشکیل شدن بلورهای یخی درون بافت است. اگر آب را به آهستگی خنک کنید مولکول‌های آب به‌منظور یافتن پیوند هیدروژنی جنبش پیدا کرده و یک بلور یخی بزرگ را تشکیل می‌دهد. شایان ذکر است که تراکم بلور یخی کمتر از آب در حالت مایع است. در این حالت حجم آب همزمان با تشکیل بلورهای مذکور افزایش می‌یابد. درصورت وقوع این رویداد در هنگام انجماد یک بافت، سلول‌ها یکی پس از دیگری تخریب می‌شوند. البته اگر بافت مربوطه در معرض فشار زیاد قرار بگیرد، مولکول‌های آب جنبشی نداشته و بلورهای یخی نیز تشکیل نمی‌شوند.



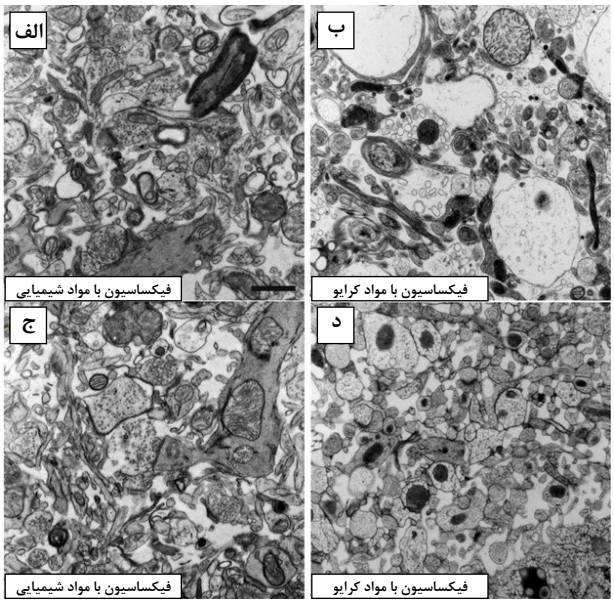
شکل ۲: دو نمونه مختلف از دستگاه انجماد با اعمال فشار بسیار زیاد (HPF) [۳].

در عمل شاید چند میکروبلور یخی درون بافت ایجاد شود، اما به حدی نیستند که سلول‌ها را نابود کنند. در مرحله جایگزینی فرآیند انجماد (شکل (۳)) هنگامی که بلوک بافت در دمایی پایین‌تر از دمای فریزر نگه‌داری شده، می‌توان عملیات فیکس کردن[۱۵]، آب‌گیری[۱۶] و نفوذپذیری[۱۷] با حلال بلوک مذکور را به تدریج در دماهای بالاتر (۲۰- درجه) انجام داد. در مرحله نهایی فرآیند آماده‌سازی یعنی قالب‌گیری در دمای پایین، عملیات تعبیه نمونه درون رزینی با قابلیت پخته شدن در دمای پایین صورت می‌پذیرد.



شکل ۳: نمونه‌ای از دستگاه جایگزینی تدریجی فرآیند انجماد [۳].

در این صورت سلول‌ها در نزدیک‌ترین حالت به حالت زنده بودن حفظ می‌شوند. پس از نفوذدهی رزین می‌توان نمونه را در دمای اتاق برش داد و به روش معمول رنگ‌آمیزی و درون میکروسکوپ الکترونی عبوری معمولی مشاهده کرد. البته در این حالت به دلیل نفوذدهی رزین و اعمال رنگ‌هایی با فلزات سنگین، دیگر نمی‌توان مولکول‌های زیستی درشت را مشاهده نمود زیرا رنگ‌های مذکور، آنها را می‌پوشانند. ۲) اگر بتوان نمونه‌ای که در معرض انجماد سریع است را در همین شرایط دمای پایین به‌طور مستقیم درون میکروسکوپ الکترونی عبوری وارد ساخته و با حفظ دمای پایین از آن تصویربرداری کرد نتیجه‌ی بسیار مطلوب‌تری بدست خواهد آمد (در شکل(۴) تفاوت نتایج حاصل شده از بکارگیری روش HPF در مقایسه با روش فیکساسیون با مواد شیمیایی برای آماده‌سازی نمونه‌ی قشر خاکستری مغز موش نمایش داده شده‌است) [۵]. برای این منظور می‌توان فرآیند HPF را اعمال نموده و از اجرای دو مرحله بعدی صرف نظر کرد. بدین صورت که ابتدا مرحله انجماد سریع با فشار بالا روی بلوک بافت اعمال شده، سپس با استفاده از دستگاهی با نام کرایو-اولترامیکروتوم[۱۸](شکل (۵)) به‌طور مستقیم از بلوک بافتی منجمد شده برش‌هایی با ضخامت کمتر از ۳۰۰ نانومتر تهیه می‌شود. در این هنگام روبان نهایی متشکل از چند برش نازک روی گرید منتقل می‌شود. در مرحله آخر نیز به راحتی گرید درون نگهدارنده نمونه کرایو[۱۹] (شکل (۶)) میکروسکوپ قرار گرفته و تصویرهای مورد نظر تهیه می‌شوند. لازم به ذکر است دمای نمونه در تمامی مراحل آماده‌سازی تا تصویربرداری با استفاده از دستگاهی به نام کنترل کننده هوشمند دما[۲۰] کنترل می‌شود.



شکل ۴: تفاوت نتیجه‌ی حاصل شده از آماده‌سازی قشر خاکستری مغز موش با مواد شیمیایی و آماده‌سازی همان قشر خاکستری با روش HPF. همان‌طور که از نتایج مشهود است ساختار نمونه در روش HPF بسیار بهتر حفظ شده‌است (اشکال (الف) و (ج) نشانگر بکارگیری مواد شیمیایی و اشکال (ب) و (د) نیز نشانگر اعمال روش HPF هستند) [۵].

شکل ۵: نمونه‌ای از دستگاه کرایو-اولترامیکروتوم به همراه مخزن نیتروژن مایع (سمت چپ تصویر) و دستگاه GLASS KNIFE MAKER[۲۱] (سمت راست تصویر) [۳].

چالش‌های بکارگیری کرایو التراميكروتوم عبارتند از: چروک و پاره شدن برش‌ها، پدیدار شدن اثر چاقوی الماس و غیره. یکی دیگر از معایب برش‌دهی نمونه‌های بافت زیستی در حالت کرایو این است که در برخی مواقع (به‌خصوص هنگام کار با باکتری‌ها) این امکان وجود دارد که به‌عنوان مثال سلول‌هایی که در حالت طبیعی دایره‌ای شکل هستند، به دلیل اعمال فشار بیش از حد با چاقوی الماس در زمان برش‌برداری، حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد به شکل بیضی در آیند.

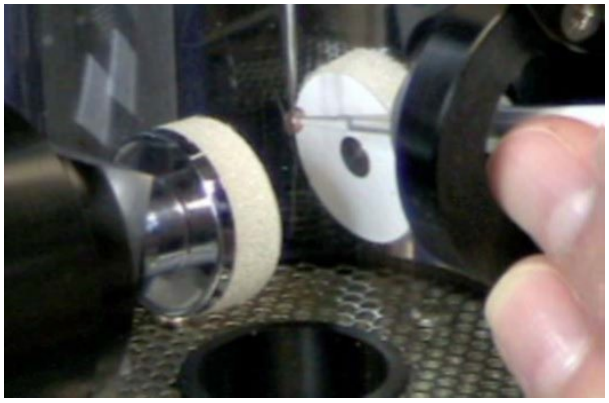
شکل ۶: ساختار ابزار جانبی نگهدارنده نمونه کرایو [۴].

روش انجماد از طریق فرو بردن سریع برای نمونه‌های سوسپانسیون

در این روش (PF) به‌منظور فرو بردن سریع نمونه‌های سوسپانسیون درون اتان مایع از دستگاهی به نام فروبر کرایو[۲۲] (شکل (۷)) خودکار یا دستی استفاده شده که مراحل ذیل با استفاده از آن انجام می‌شود [۴].

کاربر پس از انتخاب بهترین گرید برای این روش (یعنی C-flat)، ابتدا یک قطره از نمونه‌ی سوسپانسیون را روی گرید مربوطه قرار می‌دهد (شکل (۸)). در این دستگاه، گرید مذکور با پنسی که متصل به ستون متحرک (با حرکت به سمت بالا و پایین) است به‌طور معلق بالای مخزنی دو جداره قرار گرفته است.

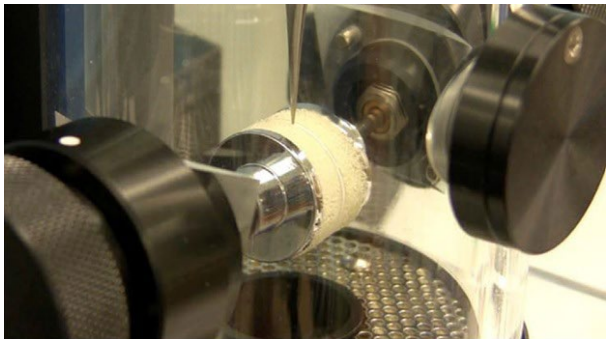
شکل ۷: نمونه‌ای از دستگاه خودکار مورد استفاده برای عملیات PF نمونه‌های سوسپانسیون (دستگاه فروبر کرایو) [۴].



شکل ۸: مرحله قرار دادن نمونه سوسپانسیون روی گرید واقع در دستگاه فروبر کرایو [۴].

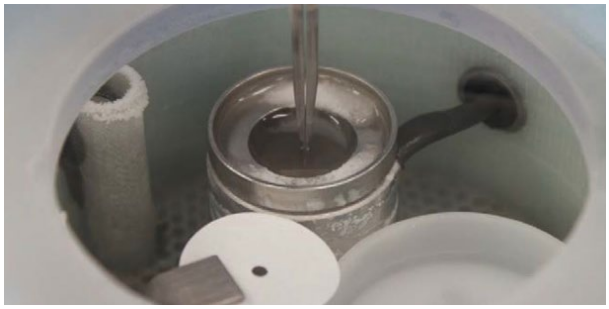
در مرحله بعد دستگاه با کاغذ فیلتر اضافی نمونه را از گرید خارج می‌کند (شکل (۹)). فضای داخل محفظه جذب مقدار اضافی نمونه سوسپانسیون در شکل (۱۰) نمایش داده شده‌است.

شکل ۹: مرحله جذب مقدار اضافی نمونه سوسپانسیون با کاغذ فیلتر درون محفظه [۴].



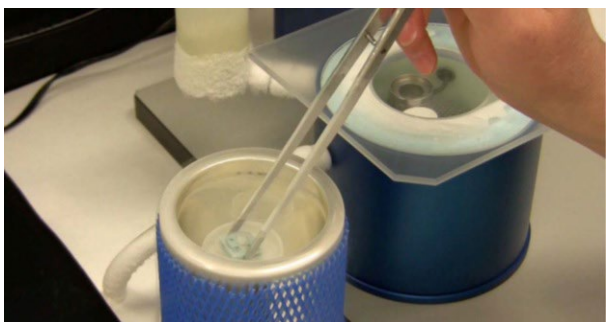
شکل ۱۰: نمای داخل محفظه جذب مقدار اضافی نمونه سوسپانسیون [۴].

سپس گرید حاوی نمونه سوسپانسیون به سرعت درون اتان یا پروپان مایع فرو برده می‌شود (شکل (۱۱)). همان‌طور که پیش‌تر نیز ذکر شد، مخزن مورد نظر دو جداره است، جداره بیرونی به‌منظور خنک نگاه داشتن دیواره محفظه داخلی با نیتروژن مایع و محفظه داخلی نیز با اتان مایع پر شده‌است. دمای اتان یا پروپان مایع حدود ۸۰ کلوین است. به‌طور معمول بدنه بیرونی این مخزن از جنس یونولیت است.

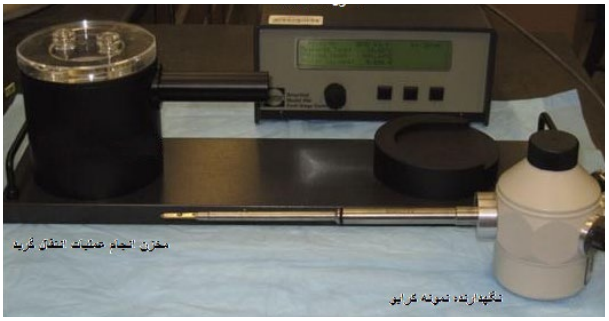


شکل ۱۱: نمای داخل محفظه پر شده از اتان مایع که اطرافش را نیتروژن مایع فرا گرفته است [۴].

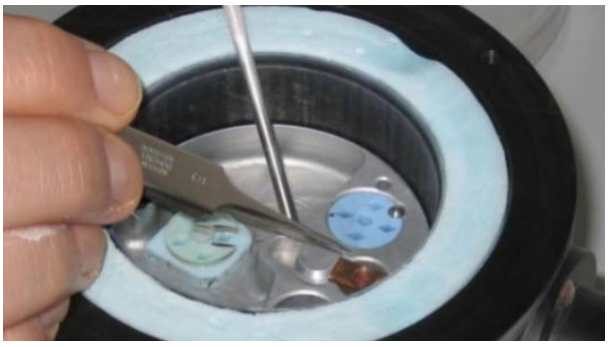
پس از طی شدن مراحل فوق، گرید حاوی نمونه سوسپانسیون برای قرار گرفتن درون نگهدارنده نمونه کرایو میکروسکوپ الکترونی عبوری با حفظ دمای انجماد در مخزن حامل انتقال می‌یابد (شکل (۱۲)). در شکل‌های (۱۳) و (۱۴) به ترتیب تجهیزات جانبی مورد نیاز برای کار با نگهدارنده نمونه کرایو و چگونگی قرار گرفتن گرید حاوی نمونه درون این دستگاه نمایش داده شده‌است.



شکل ۱۲: انتقال گرید آماده شده به Cryo-Specimen Holder با مخزن حامل [۴].



شکل ۱۳: تجهیزات جانبی مورد نیاز برای آماده‌سازی Cryo-Specimen Holder به‌منظور قرار گرفتن درون میکروسکوپ Cryo-TEM [۴].

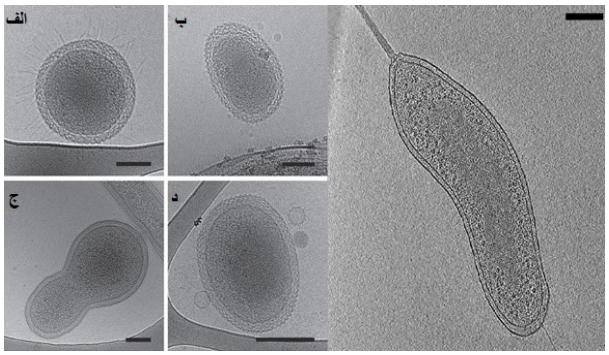


شکل ۱۴: چگونگی قرار دادن گرید درون Cryo-Specimen Holder [۴].

اگر لایه‌ی تشکیل شده از نمونه‌ی سوسپانسیون روی گرید به اندازه‌ی کافی باریک باشد، آنگاه گرمای نمونه به سرعت به اتان مایع منتقل شده و نمونه‌ی مذکور درون محیط یخ شیشه‌ای و شفاف محصور می‌شود. همچنین اگر ضخامت لایه نمونه و سرعت فرو بردن آن در اتان مایع مناسب باشد، آنگاه مولکول‌های آب دیگر فرصت جنبش و تشکیل پیوند با هیدروژن را نداشته و در نتیجه بلورهای یخی بزرگ ایجاد نمی‌شوند. درون دمای اتان مایع انرژی جنبشی آنقدر سریع از نمونه خارج شده که مولکول‌های آب و دیگر مولکول‌ها هر کجا که هستند از حرکت باز می‌ایستند. پس از فرو بردن گرید درون اتان مایع و انجماد سریع نمونه، گرید مربوطه به دستگاهی به نام سیستم انتقال نمونه کرایو (با کنترل دمای نیتروژن مایع)[۲۳] منتقل می‌شود. مدل مدرن دستگاه حامل و انتقال دهنده گرید در شکل (۱۵) نمایش داده شده‌است.

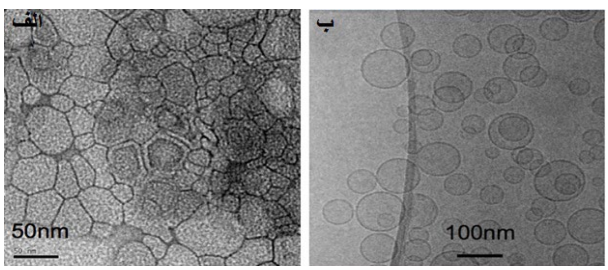
شکل ۱۵: ساختار دستگاه انتقال نمونه کرایو [۳].

از زمان فرو بردن گرید درون اتان مایع تا زمان انتقال آن به میکروسکوپ الکترونی، جابجایی آن باید در دمای نیتروژن مایع انجام شود. سپس گرید درون Cryo-Specimen Holder قرار گرفته و تصویربرداری انجام می‌گیرد. همان‌طور که در شکل (۱۶) مشاهده می‌شود، در این روش، نمونه در بهترین حالت یعنی نزدیک به حالت زنده ثابت نگاه داشته شده‌است [۶ و ۷] به طوری که در برخی از مقالات نشان داده شده، اگر گرید آماده شده از طریق روش PF را پس از اتمام کار درون محیط کشت قرار داده بیشتر باکتری‌ها از حالت انجماد خارج و به رشد خود ادامه می‌دهند.



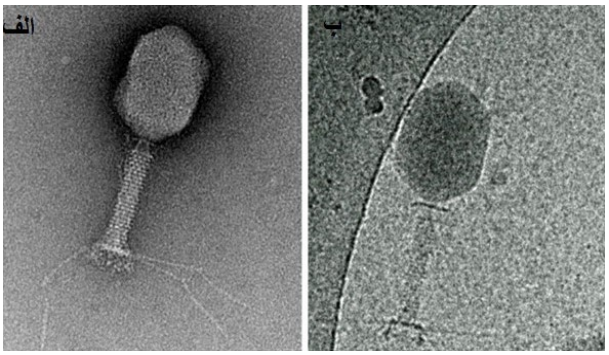
شکل ۱۶: نمونه‌هایی از باکتری‌های مختلف که آماده‌سازی آنها با روش PF انجام شده‌است. نوار مقیاس مربوط به چهار عکس (الف) تا (د) سمت چپ [۶] برابر با ۱۰۰nm و نوار مقیاس سلول کامل باکتری Bdellovibrio bacteriovorus cell (عکس تک سمت راست) نیز برابر با ۲۰۰nm است [۷].

استفاده از این روش برای پروتئین‌ها نیز امکان‌پذیر است. محققان درصورت استفاده از روش ذکر شده قادرند جزئیاتی را مشاهده کنند که در روش رنگ‌آمیزی منفی[۲۴] به دلیل حضور فلزات سنگین محو شده یا تغییر کرده‌اند. در این روش به دلیل حفظ حالت اولیه و آب درون پروتئین‌ها می‌توان ساختار ثانویه و حتی ساختار اتمی پروتئین‌ها را نیز مشاهده نمود. البته هنوز نمی‌توان به‌صورت با کیفیت جزئیات یک پروتئین را به‌طور منحصر بفرد مشاهده و تفسیر کرد، زیرا تعداد الکترون‌های مورد نیاز برای انجام این فرآیند، پروتئین را نابود می‌کند. این روش برای نمونه‌هایی مناسب است که در حالت عادی ضخامتی نازک (کمتر از ۵۰۰ نانومتر) داشته که بتوان پس از فرو بردن درون اتان مایع آن را بدون اعمال هر گونه



شکل ۱۷: تصویربرداری از لیپوزوم‌ها با دو روش مختلف: (الف) لیپوزوم های رنگ شده با اورانیل استات ۲ درصد و (ب) لیپوزوم‌های آماده شده با روش PF. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ساختار طبیعی با روش PF بهتر حفظ شده‌است [۸].

مرحله دیگری درون میکروسکوپ الکترونی عبوری قرار داده و از آن تصویربرداری کرد. شکل‌های (۱۷) و (۱۸) برای درک هر چه بهتر تفاوت نتایج حاصل از دو روش PF و رنگ‌آمیزی منفی ارائه شده‌است [۸ و ۹].



شکل ۱۸: تصویربرداری از فاژها با دو روش مختلف: (الف) فاژ رنگ شده با اورانیل استات ۲ درصد و (ب) فاژ آماده شده با روش PF. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ساختار طبیعی با روش PF بهتر حفظ شده‌است [۹].

مزایا و معایب میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو

مزایا و معایب بکارگیری روش آماده‌سازی و تصویربرداری کرایو برای نمونه‌های زیستی عبارتند از:

▣ مزایا

۱. ساختار اولیه و طبیعی نمونه‌های زیستی حفظ می‌شود؛
۲. به دلیل استفاده از روش انجماد، ساختار نمونه‌ی زیستی در خلاء میکروسکوپ مربوطه به خوبی حفظ می‌شود؛
۳. دیگر به اعمال رنگ‌هایی که دارای فلز سنگین و مواد شیمیایی اضافی که تا حدی ساختار اولیه و طبیعی نمونه را تخریب نموده نیازی نیست؛
۴. دمای پایین در طول فرآیند تصویربرداری به‌طور قابل توجهی مانع از تخریب نمونه توسط اشعه الکترونی می‌شود؛
۵. عدم نیاز به اجرای فرآیندهای زمان‌بر و سخت آماده‌سازی اولیه‌ی نمونه‌ی زیستی؛
۶. اندازه‌ی نمونه‌ی مورد نیاز بسیار کم است؛
۷. قابلیت تمایز آسان بین اسید نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها.

▣ معایب

۱. نسبت بسیار پایین سیگنال به نویز (درشت مولکول‌های زیستی به‌طور معمول از کربن، هیدروژن، اکسیژن و نیتروژن تشکیل شده‌اند. به همین دلیل الکترون بسیار کمی به چنین مولکول‌هایی جذب می‌شود. در نتیجه تصویری با کنتراست بسیار پایین از آنها با استفاده از میکروسکوپ Cryo-TEM به‌دست می‌آید)؛
۲. برش‌های تهیه شده از نمونه‌های بافت زیستی با استفاده از اولترامیکروتوم کرایو اغلب چروک یا دارای ضخامت بیش از اندازه هستند؛
۳. نمونه همیشه باید در حدود دمای منفی ۱۹۶ درجه سلسیوس نگهداری شود؛
۴. رزولوشن پایین نسبت به روش‌های X-ray یا NMR (البته محققان با ابداع دوربین‌هایی با قابلیت آشکارسازی مستقیم[۲۵] تا حدی بر این چالش فائق آمده‌اند)؛
۵. تجهیزات گران قیمت.

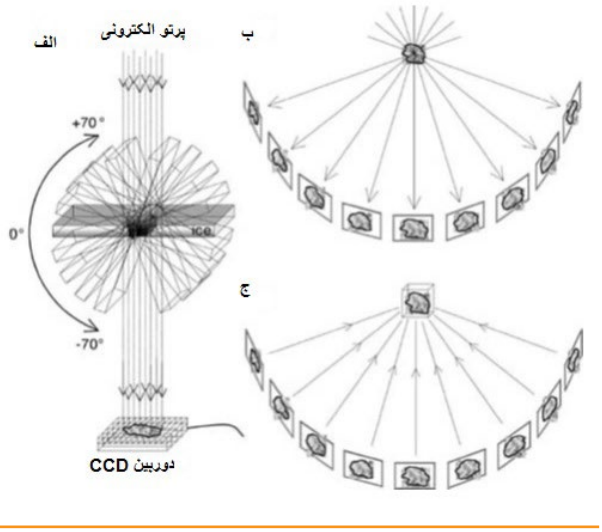
روش‌های تصویربرداری و پردازش نوین وابسته به میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو

از زمان ظهور میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو، محققان حوزه‌های مختلف زیست‌شناسی سعی نموده‌اند با استفاده از این دستگاه و نرم‌افزارهای مربوط، نیازمندی‌های خود به‌منظور مشاهده‌ی ساختارهای بسیار کوچک تشکیل دهنده نمونه‌های زیستی مد نظر را برآورده کند. به تازگی در این راستا چندین روش به‌صورت موفق و متداول میان جامعه پژوهشگران پدید آمده است. دانشمندان علوم زیستی با توجه به نیازهای تحقیقاتی خود قادر هستند از روش‌های ترکیبی تصویربرداری کرایو استفاده کنند. بررسی تخصصی روش‌های تصویربرداری و پردازش مذکور در قالب این مقاله نگنجیده، لذا به‌منظور آشنایی مقدماتی خواننده محترم با هر یک از روش‌های موجود در این قسمت، آنها به‌طور اجمالی معرفی شده‌اند. از مهمترین این روش‌ها می‌توان به روش‌های ذیل اشاره نمود:

▣ برش‌نگاری الکترونی کرایو[۲۶]

در حال حاضر از روش برش‌نگاری الکترونی کرایو به‌منظور آشکار نمودن ساختار سه‌بعدی اجزای درون سلولی یا سلول‌های کامل بسیار کوچک استفاده می‌شود. در این روش به‌منظور حفظ ساختار نمونه‌ها به نزدیک‌ترین حالت زنده‌ی خود، ابتدا آماده‌سازی آنها با یکی از فرآیندهای: HPF یا PF و سپس تصویربرداری نیز به واسطه قابلیت‌های مخصوص میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو انجام می‌گیرد. سپس گرید حاوی نمونه حول محور افقی بین زوایای ۷۰+ و ۷۰- درجه حرکت داده شده و یک سری عکس‌های دوبعدی به ازای هر ۲ درجه حرکت از نمونه مذکور تهیه می‌شود. تصاویر دوبعدی حاصل شده با توجه به منشاء مشترک تراز می‌شوند. در نهایت با استفاده از روش بازافکنش و فرآیند تبدیل فوریه، تصویری سه‌بعدی از نمونه‌ی مذکور بدست می‌آید. البته در روش CET به دلیل محدودیت حرکت گرید از ۷۰+ تا ۷۰- درجه، محققان برای بازسازی تصویر سه‌بعدی نهایی با مقداری فقدان داده روبرو هستند. در این روش باید ضخامت نمونه تا حد امکان کم باشد. به منظور کاهش قابل توجه فقدان داده در زمینه بازسازی تصویر سه‌بعدی نهایی برخی

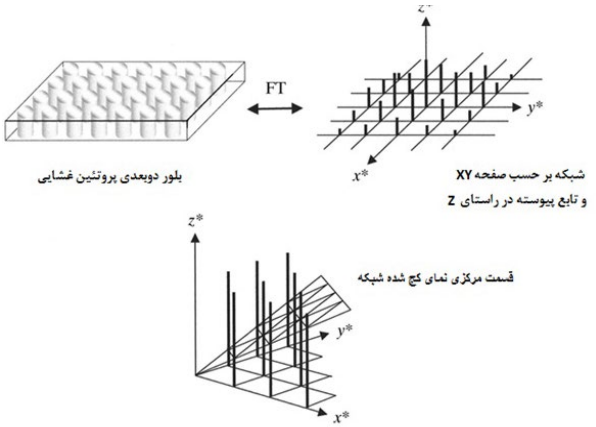
از ابزار مدرن نگهدارنده نمونه کرایو درون ستون میکروسکوپ الکترونی عبوری دارای قابلیت حرکت دادن نمونه حول دو محور هستند. البته به دلیل حرکت کردن نمونه حول دو محور، تعداد عکس‌های گرفته شده نیز دو برابر می‌شود. در نتیجه به قدرت پردازش بسیار بیشتری نیاز است. در شکل (۱۹) اصول دستیابی به تصویری سه‌بعدی از مجموعه تصاویر دوبعدی تهیه شده از یک نمونه با منشاءای مشترک حول یک محور شرح داده شده‌است [۱۰].



شکل ۱۹: فرآیند تصویربرداری و بازسازی ساختار سه‌بعدی نمونه‌های مورد نظر با استفاده از روش برش‌نگاری الکترونی کرایو [۱۰].

بلورنگاری الکترونی[۲۷]

به‌منظور تحلیل ساختار دوبعدی آرایه‌های بلوری (به‌خصوص پروتئین‌های غشایی) از روش بلورنگاری الکترونی استفاده می‌شود. این آرایه‌ها بر خلاف نامشان دوبعدی نبوده، تنها به دلیل ضخامت بسیار باریکشان چنین شهرتی را پیدا کرده‌اند. با توجه به این نکته که بلورها برای بررسی در روش بلورنگاری با استفاده از اشعه ایکس باید از اندازه‌ی بزرگی برخوردار باشند، لذا تحلیل بلورهای بسیار کوچک پروتئین با این روش امکان‌پذیر نیست. روش NMR نیز به مقدار زیادی از نمونه برای ارائه نتایجی دقیق نیازمند بوده، که این امر روش مذکور را برای بررسی پروتئین‌هایی با مقدار بسیار کم نامناسب می‌سازد. در روش بلورنگاری الکترونی، بازسازی آرایه‌های بلوری دوبعدی مسطح با تصاویر تهیه شده از پروتئین‌های غشایی و لیپیدها انجام می‌پذیرد (شکل (۲۰)) [۱۱]. در این صورت، استفاده از روش‌های آماده‌سازی نمونه برای میکروسکوپ الکترونی کرایو کمک بسیار زیادی به بالا بردن دقت فرآیند بلورنگاری الکترونی نموده، زیرا ساختار پروتئین‌ها و لیپیدها در حالتی بسیار نزدیک به حالت زنده حفظ می‌شود. یکی از عوامل مهم در این روش، نسبت لیپید به پروتئین بوده که برای حصول پیوندهای بهتری میان مولکول‌های پروتئین باید به اندازه کافی کم باشد. جمع‌آوری داده از بلورهای دوبعدی درون میکروسکوپ الکترونی کرایو به دو روش: تصویربرداری از نمونه در زوایای مختلف و الگوی پراش الکترونی انجام می‌گیرد. با وجودی که تبدیل‌های فوریه تصاویر تهیه شده حاوی دامنه و فاز ساختار نمونه بوده، اما برای تعیین دامنه‌های ساختار نمونه‌ی مورد نظر استفاده از الگوی پراش قابل اطمینان‌تر است (لازم به ذکر است الگوی پراش فاقد اطلاعات فاز است). در اینجا تصویربرداری با دوز پایینی از الکترون‌ها انجام می‌شود. با استفاده از بلورهای دوبعدی مرتب و منظم و میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو می‌توان به نقشه‌هایی سه‌بعدی با رزولوشن بهتر از (۳) آنگستروم دست پیدا کرد.

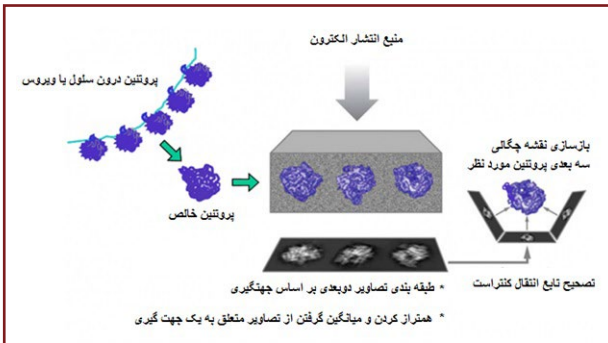


شکل ۲۰: روند دستیابی به ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های غشایی با استفاده از روش بلورنگاری الکترونی و پردازش تصاویر دوبعدی [۱۱].

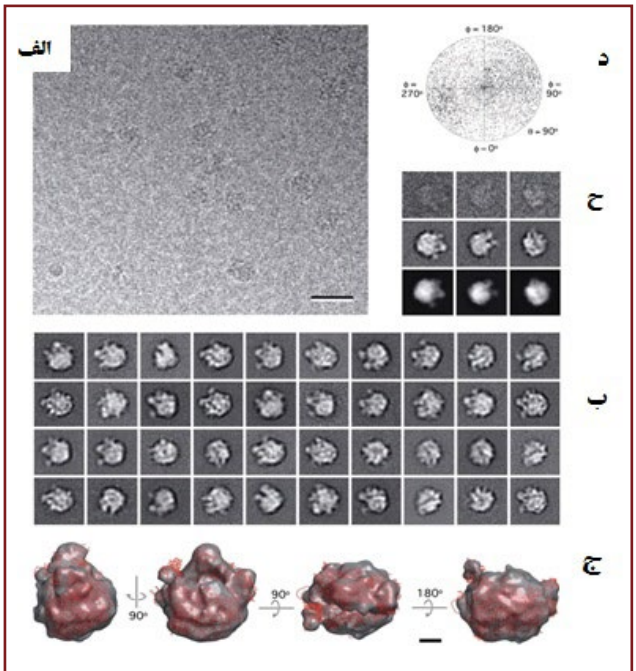
تحلیل تک ذره[۲۸]

از ترکیب روش تحلیل تک ذره و میکروسکوپ الکترونی کرایو می‌توان بدون نیاز به تشکیل بلور، ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها (به‌خصوص پروتئین‌های محلول) و درشت مولکول‌ها را تعیین نمود. لازم به ذکر است که استفاده از این روش برای نمونه‌هایی با وزن مولکولی بالا امکان‌پذیر است. با توجه به پیشرفت‌های انجام گرفته در حوزه فناوری آشکارسازها و الگوریتم‌های نرم‌افزاری هم اکنون Cryo-TEMها قادرند اطلاعات ساختار سه‌بعدی مولکول‌های نمونه‌های غیربلوری زیستی را در حد رزولوشن اتمی تعیین کنند. در حال حاضر از این روش بیشتر برای تعیین ساختار پروتئین‌های محلول استفاده می‌شود. نمونه‌ی مورد استفاده برای روش تحلیل تک ذره باید متشکل از مولکول‌های جداگانه بسیار زیاد با ساختاری یکسان باشد. در این روش به دلیل نیاز به تصویربرداری در رزولوشن بسیار بالا (حدود ۲ آنگستروم) و همچنین پایین بودن کنتراست نمونه‌ی منجمد، لذا تصویربرداری باید با تنظیمات فوکوس پایین انجام شود (در شرایط فوکوس بالا جزئیات نمونه از بین می‌رود).

به دلیل ضخامت بسیار کم نمونه و همچنین تسهیل فرآیند بازسازی ساختار سه‌بعدی، در این روش تصاویر خطی تهیه شده از پتانسیل کولنی[۲۹] مورد استفاده قرار می‌گیرند. سپس تصاویر تهیه شده با تابع انتقال کنتراست[۳۰] (یک تابع سینوسی شبه تناوبی درون فضایی متقابل که تناوب آن به‌طور عمده به تنظیمات فوکوس پایین بستگی داشته) مدوله می‌شوند (شکل (۲۱)) [۱۲]. البته لازم به ذکر است، هر چه میزان فوکوس پایین‌تر باشد با وجودی که کنتراست بهتری برای تصاویری با رزولوشن پایین بدست آمده، اما کنتراست تصاویر با قدرت تفکیک بالا به شدت افت می‌کند. بنابر این باید تا حدی فوکوس را پایین آورد که ذرات درون تصاویر با قدرت تفکیک پایین به خوبی قابل مشاهده و تفکیک‌پذیر باشند. بازسازی سه‌بعدی ساختار نمونه‌ی مورد نظر پس از پردازش دسته‌هایی حاوی تعداد بسیار زیادی تصاویر تهیه شده از تک ذره‌ها در زاویای مختلف انجام می‌پذیرد (شکل (۲۲)) [۱۳].



شکل ۲۱: فرآیند بازسازی تصویر سه‌بعدی نمونه پروتئینی از تصاویر دوبعدی با بکارگیری روش تحلیل تک ذره [۱۲].



شکل ۲۲: روند دستیابی به ساختار سه‌بعدی پروتئین تحت بررسی با استفاده از روش تحلیل تک ذره و حرکت نمونه حول دو محور [۱۳].

نتیجه‌گیری

محققان حوزه زیستی از ابتدای اختراع میکروسکوپ الکترونی عبوری برای ثابت نگاه داشتن ساختار کلی و همچنین رنگ-آمیزی نمونه‌های خود از مواد شیمیایی با قدرت و حساسیت بالا استفاده نموده‌اند. لازم به ذکر است، مواد شیمیایی بکار برده شده در فرآیند آماده‌سازی نمونه‌های زیستی هر یک تا حدی منجر به تخریب یا پوشانده شدن قسمتی از ساختارهای درون سلولی بسیار کوچک نمونه‌های مذکور می‌شوند. لذا پس از تحقیق‌های فراوان، پژوهشگران برای آشکار نمودن ساختار بدون تغییر درون سلولی نمونه‌ها در سطح مولکولی و اتمی به روشی به نام میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو دست پیدا کردند. در این روش، بیشتر نمونه‌های زیستی بدون نیاز به اعمال هر گونه مواد شیمیایی ابتدا در دمای بسیار پایین اتان مایع به سرعت منجمد شده و تا هنگام تصویربرداری نیز در این دمای پایین باقی می‌مانند. روش آماده‌سازی انجمادی مناسب با توجه به نوع نمونه‌های زیستی (بافت یا سوسپانسیون) انتخاب می‌شود. به دلیل عدم استفاده از مواد شیمیایی در روش کرایو می‌توان از نمونه‌ها در نزدیک‌ترین حالت به حالت زنده تصویربرداری کرد. البته این روش با توجه به مزایای فراوان دارای چالش‌هایی نیز بوده که در متن اصلی مقاله به آنها پرداخته شده‌است. البته محقق پیش از انتخاب روش میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو برای تصویربرداری از نمونه باید به دقت مزایا و معایب این روش را بررسی کند. در حوزه‌هایی که دستیابی به تصویری سه‌بعدی از کوچک‌ترین اجزای تشکیل دهنده نمونه زیستی از اهمیت بالایی برخوردار بوده می‌توان از میان روش‌های تصویربرداری وابسته به Cryo-TEM که در بخش (۴) این مقاله به‌طور اجمالی به پرکاربردترین آنها اشاره شد مناسب‌ترین فرآیند را انتخاب کرد. امید است کارشناسان فعال در حوزه آماده‌سازی نمونه‌های زیستی پس از مطالعه این مقاله با روش‌های جدید آشنا شده و محققان نیز راه حل‌هایی برای غلبه بر چالش‌های موجود در فرآیند آماده‌سازی و تصویربرداری از نمونه‌های زیستی در میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو ارائه دهند.

پی‌نوشت

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

2. Plunge Freezing

3. Zacharias Janssen

4. Max Knoll

5. Ernst Ruska

6. Transmission Electron Microscope (TEM)

7. Cryo-Transmission electron microscope (Cryo-TEM)

8. High Pressure Freezing

9. X-RAY CRYSTALLOGRAPHY

10. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY

11. High Pressure Freezing (HPF)

12. Plunge Freezing (PF)

13. Freeze-Substitution

14. Low-Temperature Embedding

15. Fixation

16. Dehydration

17. Infiltration

18. Cryo-Ultramicrotome

۱۹. نگهدارنده نمونه کرایو ابزاری که به واسطه آن نمونه در دمای نیتروژن مایع درون ستون Cryo-TEM قرار می‌گیرد. Cryo-Specimen Holder

20. Smart Set Controller

۲۱. دستگاه مورد استفاده برای ساخت دقیق تیغه‌های شیشه‌ای اولترامیکروتوم

22. Cryo Plunger

23. Cryo-Transfer System

24. Negative Staining

25. Direct Detection CCD

26. Cryo-electron Tomography (CET)

27. electron crystallography

28. single particle analysis

29. Coulomb Potential

30. Contrast Transfer Function (CTF)

مراجع

[۱] برگرفته از سایت Wikipedia.

[2]. Toward native-state imaging in biological context in the electron microscope by Anne E. Weston, Hannah Armer, and Lucy M. Collinson.

[۳] سایت شرکت Leica (www.leica-microsystems.com).

[۴] سایت شرکت Gatan (www.gatan.com).

[5]. Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfiusion with cryo fixation, by: Natalya Korogod et al.

[6]. Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater, by: Brigit Luef, Kyle R. Frischkorn, and Jillian F. Banfield.

[7]. En.wikipedia.org, Cryo-electron tomography

[8]. Faculty.washington.edu/lw32/cryoem_home.php

[9]. Is EM dead? , By: Graham Knott, Christel Genoud.

[10]. Opening Windows into the Cell, by: Kanika Khanna

[11]. Figure adapted from Amos et al. (1982). [Saibil, H. R. (2000). Acta Cryst. D56, 1215-1222. doi:10.1107/S0907444900010787].

[12]. https://cns.fas.harvard.edu/CryoEM

[13]. Monolayer purification: A rapid method for isolating protein complexes for single-particle electron microscopy, by: Deborah F. Kelly