Electron Microscopy

Electromicrograph of Bacterial Cells Using Transmission Electron microscope (TEM) (Jeol JSM-1011 electron microscope)

Transmission Electron microscope (TEM)

- عندما اخترع العالم ليفنهوك المجهر الضوئي اندهش الناس من دقة تفاصيله لمعالم العينة, وبتطوير المجهر الضوئي المركب تقدمت المعرفة في علوم كثيرة مثل التشريح والأنسجة والخلية والوراثة مما أدى إلى نقله كبيره في الدراسات العلمية،ولكن الحدث الأكثر أهمية في هذا المجال كان اختراع المجهر الإلكتروني الذي تصل قوة تكبيره العالية ليس فقط لفحص الكائنات الحية الدقيقة بل إلى أمكانيه مشاهدة أدق التفاصيل الدقيقة بها.

- المجهر الالكتروني تستخدم فيه الإلكترونات كمصدر للإضاءة بدلا من الضوء الكهربائي, تم تزويده بعدسات كهرومغناطيسية - تعمل على تركيز الشعاع الالكتروني - الحصول على تكبيرات عالية تصل إلى مئات الالف.

الجدول التالي يوضح أهم الفروق بين المجهر الالكتروني والمجهر الضوئي

وجه المقارنة	المجهر الضوئي Light Microscope	المجهر الالكتروني Electron Microscope
مصدر الإضاءه	المصباح الكهربائي	فتيلة التنجستين
نوع العدسات	زجاجية	كهرومغناطيسية
العدسات	العدسة العينية العدسة الشيئية العدسة المكثفة	العدسة الشيئية العدسة المكثفة العدسة المتوسطة العدسة العارضة
تغيير التكبير	تحريك العدسة الشيئية	تغيير التيار المار بالمجال الكهرومغناطيسي للعدسة الشيئية و المتوسطة
ضبط البعد البؤري	تغيير المسافة بين العدسة الشيئية والعينية	تغيير شدة التيار الكهربائي المار بالعدسة الكهرومغناطيسية

أنواع الميكروسكوب الإلكتروني
Types of Electron Microscope

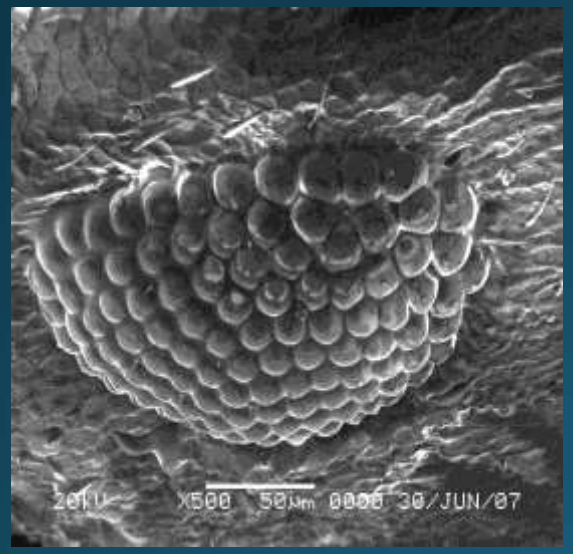
- 3 **أنواع رئيسية** (تبعا لتفاعل الشعاع الالكتروني مع العينة):

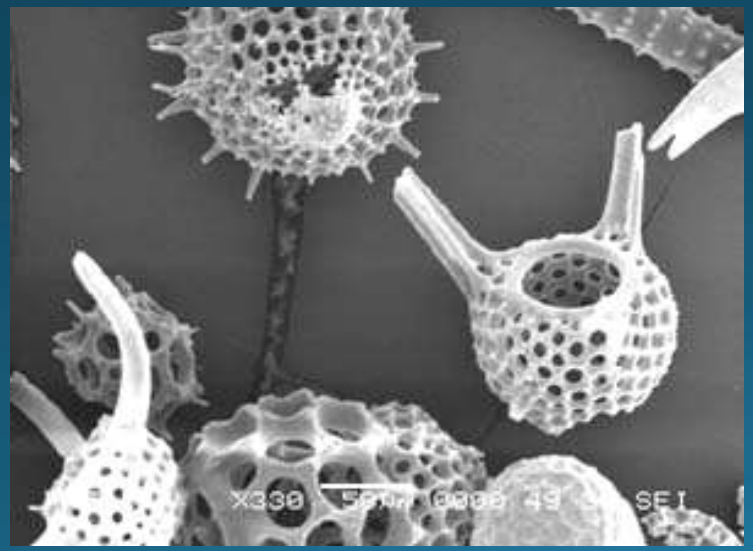
1- المجهر الالكتروني الماسح (SEM):
2- المجهر الالكتروني النافذ (TEM):
3- المجهر الالكتروني الماسح النافذ (STEM):

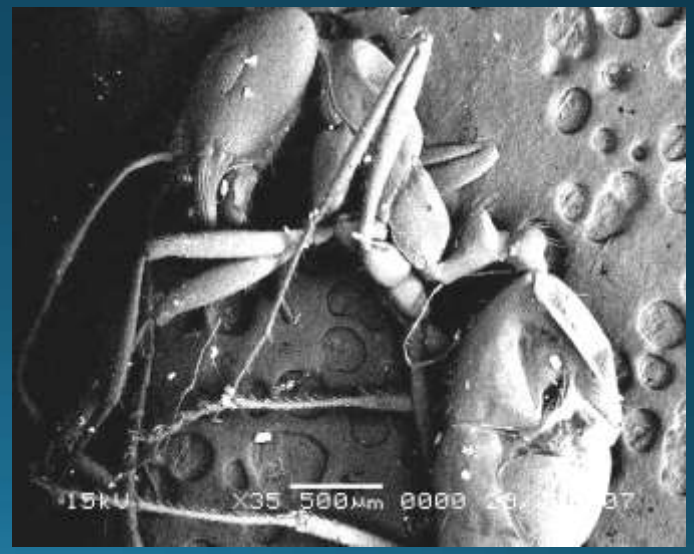
أنواع الميكروسكوب الإلكتروني
Types of Electron Microscope

1- المجهر الالكتروني الماسح (SEM):

- وهو يعطي صورة ثلاثية الأبعاد, نتيجة مسح سطحي و خارجي شامل للأنسجة أو الخلايا.



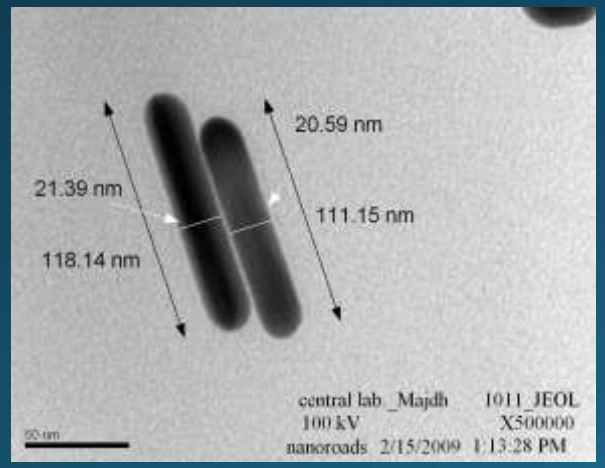


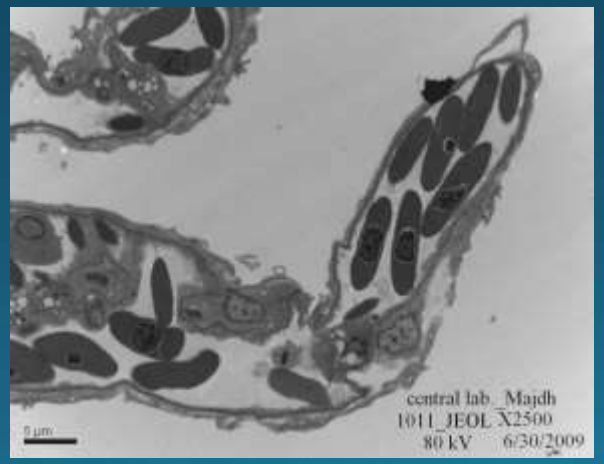


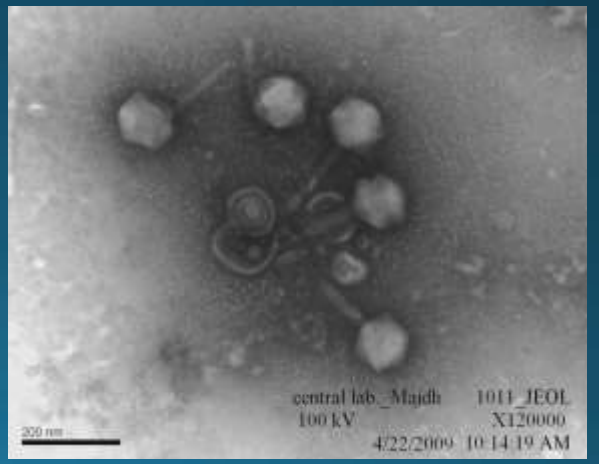
أنواع الميكروسكوب الإلكتروني
Types of Electron Microscope

- 2- المجهر الالكتروني النافذ (TEM) :

وهو يتميز بإعطاء صورة من بعدين طولي وعرضي, نتيجة لنفاذ الشعاع الالكتروني داخل المقاطع الرقيقة من الأنسجة أو الخلايا.







أنواع الميكروسكوب الإلكتروني
Types of Electron Microscope

3- المجهر الالكتروني الماسح النافذ (STEM) :

- وهو يقدم صورة ثلاثية الأبعاد, نتيجة لقدرته على اختراق العينات الصغير وبالتالي يعطي صورة تحتوي التفاصيل الدقيقة الداخلية للعينة والخارجية أيضا.

الميكروسكوب الإلكتروني النافذ TEM

- يعمل على المبادئ الأساسية نفسها التي يعمل عليها المجهر الضوئي ولكنه يستخدم الإلكترونات كمصدر للإضاءة عوضاً عن الضوء المرئي.
- ما نراه بواسطة المجهر الضوئي غالباً محدود بالطول الموجي للضوء المرئي الذي يقدر ب 500 نانومتر - حيث أننا لا نستطيع مشاهدة الجسيمات التي تبعد عن بعضها مسافة يقل قطرها عن نصف الطول الموجي للشعاع المار خلالها .
- تستخدم الالكترونات "كمصدر للإضاءه" وهي تعطي أطوال موجيه أقصر بكثير من الطول الموجي للضوء المرئي وبالتالي الحصول على تبيين أفضل ألف مرة من المجهر الضوئي.يمكننا المجهر من رؤية الأشياء في حدود بضعة أنجستروماتٍ. مثلاً, من الممكن دراسة التفاصيل الصغيرة في الخلايا أو مختلف المواد الصغيرة القريبة من المستوى الذري. واعتماداً على إمكانات التكبير العالي المتوفرة لديه أصبح المجهر الالكتروني النافذ أداة قيمة سواء في الطب والبيولوجيا والمواد البحثية.

الأجزاء الرئيسية لجهاز المجهر الالكتروني النافذ:

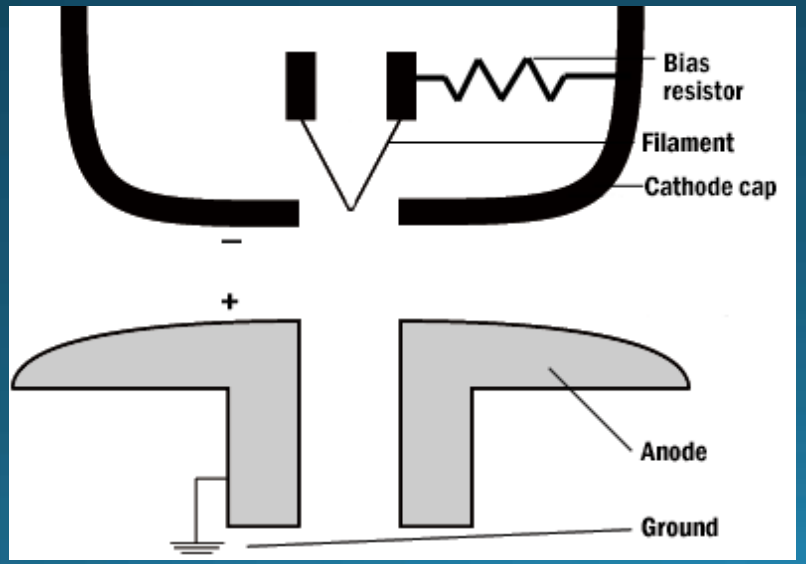
جميع المجاهر الالكترونية النافذة لديها نفس التركيب الأساسي. فهي تحتوي على:

- نظام الإضاءة(illumination system)
- نظام تكوين الصورة(imaging system)
- نظام ضبط عمل مضخات التفريغ (vacum pump system)
- نظام تبريد العمود(cooling system)
- نظام التقاط الصور(image recording system)
- حامل خاص بالعينة(specimen stage)
-

كيف تتكون الصورة؟

في قمة عمود الجهر توجد فتيلة التنجستن- وتعرف بمدفعه الالكترونات وهي موجودة في بيت الكاثود - تسخن الفتيلة عند مرور تيار كهربائي بها وتتوهج وتقوم بإطلاق الكترونات التي تسرع بواسطة الانود ثم تنتقل عبر عمود المجهرالمفرغ هوائياً وذو ضغط ثابت على شكل حزمه كحزمه الضوء.

عوضاً عن العدسات الزجاجية المركزة للضوء في المجهر الضوئي , يستخدم المجهر الالكتروني النافذ العدسات الكهرومغناطيسية لتركيز الالكترونات الموجودة في الشعاع الالكتروني الرفيع جداً.



كيف تتكون الصورة؟

- ينتقل الشعاع الالكتروني بعد ذلك خلال العينة المراد فحصها. اعتماداً على كثافة المواد الموجودة في العينة بعض الالكترونات ترتد من الشعاع الالكتروني وتختفي. بينماالالكترونات الغير مرتدة تكمل انتقالها إلى أسفل المجهر وتعمل على تسخين الشاشة الفلوروسنتية, مما يؤدي إلى ظهور "صورة الظل" للعينة مع أجزائها مختلفة وهي تظهر كعتامه مختلفة "درجات من اللون الأسود" اعتماداً على كثافتها. يمكن دراسة الصورة مباشرة بواسطة شاشة المجهر أو عن طريق الصورة الملتقطة بواسطة الكاميرا الرقمية الموصولة بجهاز كمبيوتر أو المأخوذة بواسطة أفلام التصوير (negative film).

مكونات وحدة المجهر الإلكتروني النافذ

- **أولا: الأجهزة:**
- **المجهر الإلكتروني النافذ**
- **جهاز المعالجة الكيميائية الأوتوماتيكية أو جهاز التدوير**
- **جهاز التشذيب**
- **جهاز تقطيع المقاطع الرقيقة**
- **جهاز تقطيع السكاكين الزجاجية**
- **جهاز إعداد القوارب**
- **مجهر ضوئي ومجهر تشريحي**
- **فرن كهربائي**
- **جهاز التسخين الحراري**
- **قضبان زجاجية**

مكونات وحدة المجهر الإلكتروني النافذ

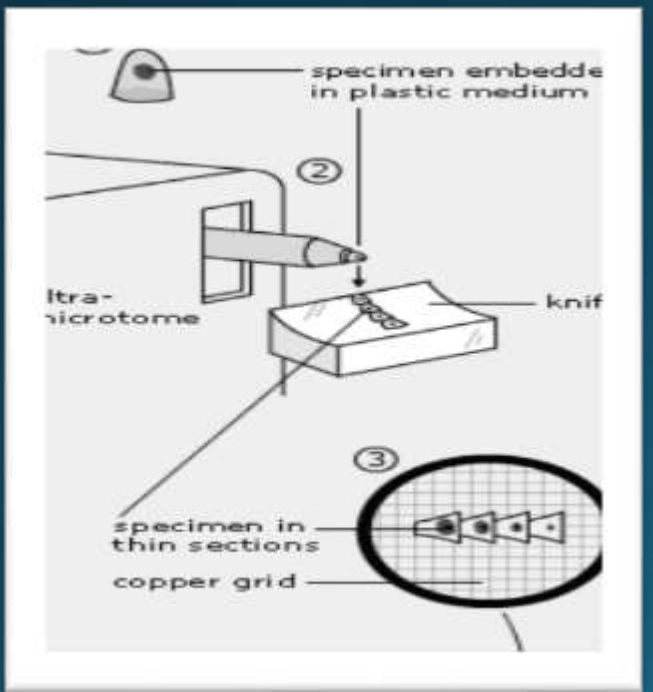
- **ثانيا: الأدوات:**
  - شبكات نحاسية
  - سكينة ماسية
  - ملاقط حادة
  - أطباق بتري
  - مشارط
  - شرائح زجاجية
  - أوراق ترشيح
  - عبوات زجاجية صغيرة
  - ابر تلقيح
  - قوالب خاصة بطمر العينات
  - ماصات دقيقة
  - قصدير
  - بارا فيلم (ورق مشمع)
  - شمع الأسنان أو طلاء الأظافر
  - قوارب خاصة بإعداد السكاكين الزجاجية

تحضير العينات الخاصة بالمجهر الالكتروني النافذ

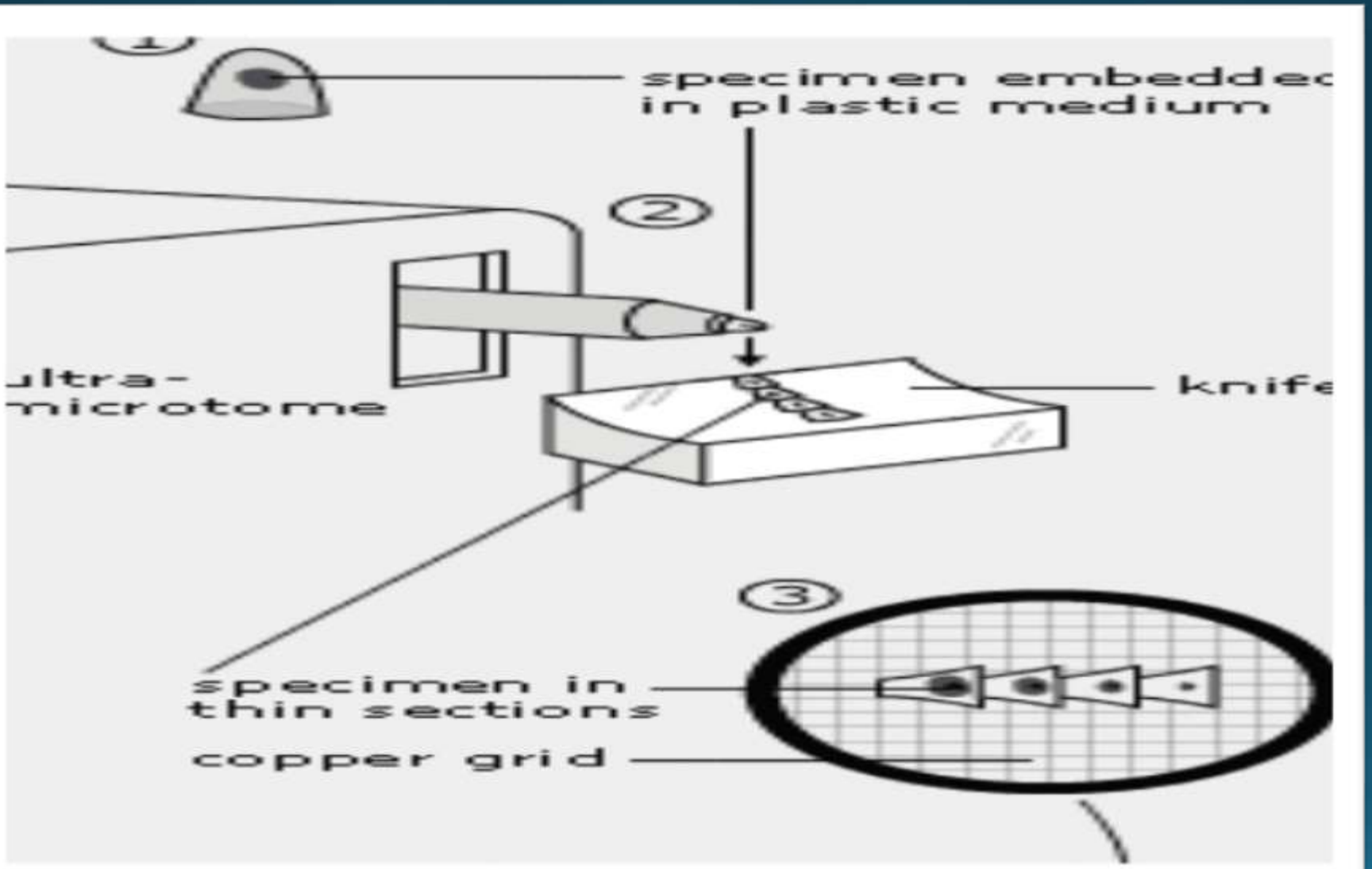
- في المجهر الالكتروني النافذ, العينة المراد فحصها لابد أن تكون قليلة السماكة حتى تسمح بمرور الالكترونات خلال النسيج. توجد عدة طرق لتحضير المواد اعتماداً على الغرض من دراستها. من الممكن تقطيع مقاطع رقيقة جداً من العبنة المأخوذة من قطعه من النسيج وبعد معالجتها بطرق كيميائية خاصة, تثبت بعد ذلك أما في مادة راتنجية(بلاستيكية)قابله للبلمرة أو يتم العمل عليها وهي في الحالة التجمد(frozen).توجد طريقة مختلفة لتحضير العينة المعزولة (Isolated Material) ودراستها في محلول مثل الفيروسات والجزيئات الحرة بواسطة المجهر الالكتروني النافذ.
- ومن الممكن صبغ العينة بطرق مختلفة لتحديد تفاصيل معينة من النسيج.من الممكن مثلاً, الصبغ بواسطة المعادن الثقيلة مثل اليورانيوم و الرصاص, التي لديها القدرة على عكس الإلكترونات جيدا وتحسن التباين في الصورة.

مثالان لشرح بعض التفاصيل: 1- المقاطع من المواد المطمورة

المواد البيولوجية تحتوي على كمية كبيرة من الماء. وحيث أن العمل في جهاز المجهر الالكتروني النافذ يتم تحت ظروف التفريغ الهوائي, لذلك لابد من إزالة الماء من العينة.لتجنب أي إخلال ناتج من وجود اقل كمية من الماء. يحفظ النسيج في مثبتات (fixatives)مختلفة تعمل على المحافظة على تفاصيل النسيج كما لو كان في مصدره الاصلي وذلك بتثبيت المحتوى البروتين والجليكوجيني والدهني وغيرها من التراكيب الداخلية. ثم ينزع الماء من النسيج بواسطة الكحول (غالباً الإيثانول) أو الأستون بالتدرج من التراكيز المنخفضة حتى التراكيز المركزة.

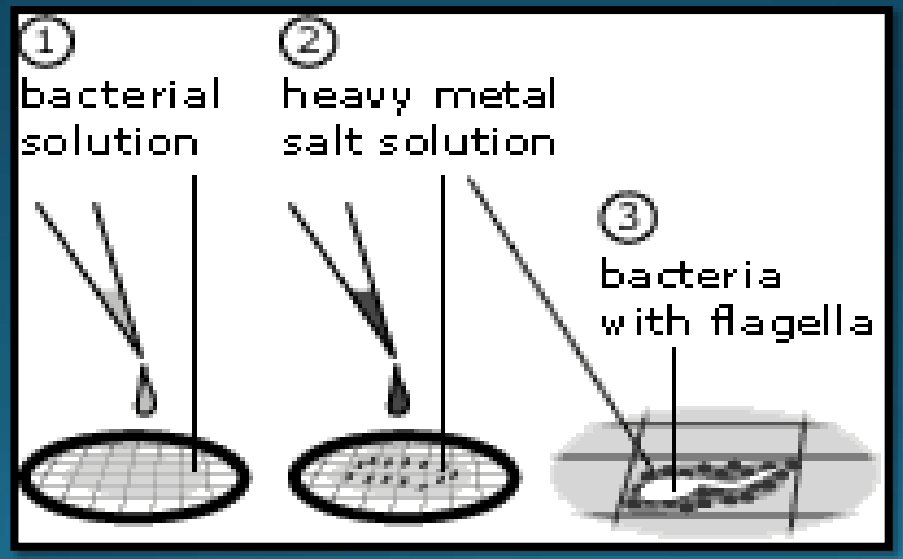


وبعد ذلك, تطمر العينة في مادة راتنجية(resin) قابلة للبلمرة داخل قوالب بلاستيكية خاصة, مع مراعاة مركزة العينة في قاع القالب.ثم تنقل القوالب الى الفرن عند درجة حرارة معينة وبوقت كافي حتى تتصلب مادة الرزن. تخرج القوالب (blocks)وبعد تبريدها اصبح من الممكن تقطيعها إلى مقاطع فائقة الرقه بواسطة السكين الماسية(diamond knife) باستخدام جهاز تقطيع المقاطع فائقة الرقه(ultramicrotome)ولابد أن تتراوح سماكة المقاطع بين 50-100 نانومتر. ومن ثم تحمل هذه المقاطع على شبكات نحاسية(copper grid) وتصبغ بواسطة المعادن الثقيلة(heavy metal) وبعدها تكون جاهزة للفحص تحت الشعاع الالكتروني.


specimen embedded
in plastic medium
2
ultra-
microtome
knife
3
specimen in
thin sections
copper grid

2.المواد المعزولة واستخدام الصبغ السالب (Negative Staining) :

المواد المعزولة قد تكون محلول بكتيري أو محلول فيروسي أو محلول من جزيئات معزولة, تمد على شبكة نحاسية مغطاة بفلم دعامي خاص(مثل الشبكات النحاسية المغطاة بغشاء الفورمافار).بعد ذلك يضاف قطرة من محلول من المعدن الثقيل- اليورانيوم مثلاً- حيث أن محلول ملح اليورانيوم لا يرتبط مع العينة وانما يترسب حولها على الشبكة النحاسية. العينة سوف تظهر عند فحصها بواسطة المجهر الالكتروني النافد مثل الصورة السالبة(negative picture).



Steps of Treatment microbiology sample
خطوات معالجة عينة احياء دقيقة

- **Primary Fixation:**
  - by buffered **Glutaraldehyde 2.5%** over night in refrigerator,(use centrifuge to remove each solution at 7000 rps for 5 min) then wash by phosphate buffer pH=7.2 .
- **Secondary fixation:**
  - by buffered **Osmium Tetroxide 1%** over night in refrigerator
  - **Dehydration:** by series conc. Of **ethanol**
  - **Embedding:** by **resin** mixture from SPI (SPI-Pon™ - Araldite® Epoxy Embedding Kit).
- **Cutting:**
  - the block well be cut by **Ultramicrotome** (Leica UC6 Ultramicrotome) the section thickness is between 70-80 nm.
  - Loading in **cupper grid** then stain by **aqua's uranyl acetate** and **lead citrate**, exam under Transmisstin Electron microscope (TEM) (Jeol JSM-1011 electron microscope).

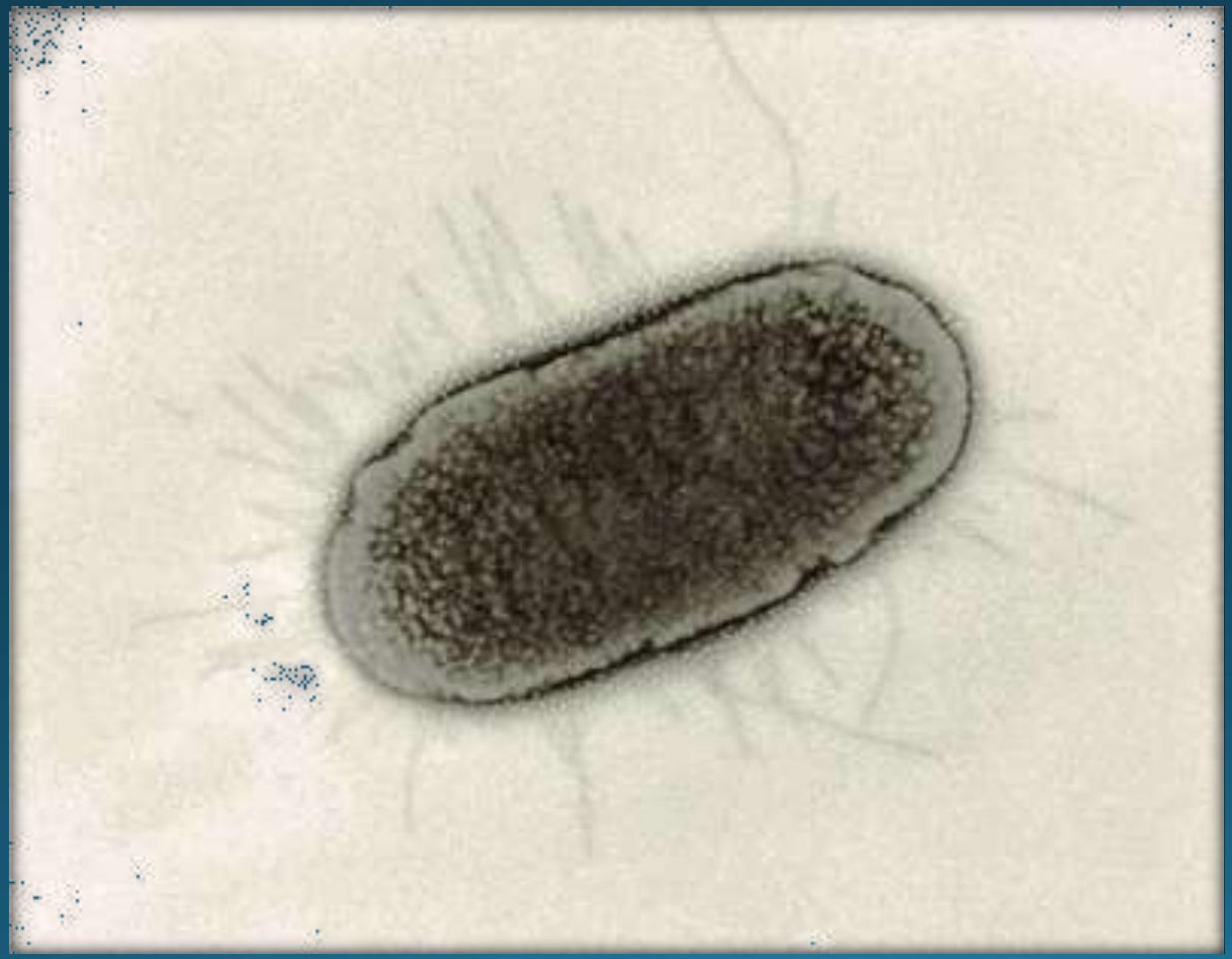
الخطوات 1-2

العملية	المحلول	عدد المرات	الزمن
التثبيت	2,5% جلوتر الدهيد	1	6 -8 ساعات أو ليلة كاملة في الثلاجة
الغسيل	محلول الفوسفات منظم pH=7.2	4	نصف ساعة وأخر مرة ليلة كاملة في الثلاجة
التثبيت	1% رابع اوكسيد الاوزميوم	1	1 ساعة أو ليلة كاملة في الثلاجة
الغسيل	محلول منظم	4	ربع ساعة
التجفيف	ايثانول 30%	2	5 د
	ايثانول 50 %	2	5 د
	ايثانول 70%	2	5 د
	ايثانول 80 %	2	5 د
	ايثانول 90%	3	10 د
	ايثانول100%	3	10 د

الخطوات 2-2

الخطوة	المحلول	عدد المرات	الوقت
الترويق	استون	2	10 د
التخلل والتشرب	استون و رزن 2:1	1	1 ساعة
	استون و رزن 1:2	1	1 ساعة
	رزن نقي (SPI-Pon™ - Araldite® Epoxy Embedding Kit) from SPI	1	1 ساعة
البلمرة	الفرن درجة الحرارة 60-70 م		16-14 ساعة
الصبغة المزدوجة	خلات اليورانيوم و سترات الرصاص	1 1	30 د 10 د

A transmission electron micrograph of *Escherichia coli (E. coli)*, negatively stained to enhance contrast. Note the projecting pili, which may be involved in mechanisms of infection.



صور الكتروميكروسكوبية لبكتيريا القولون