الباب الثاني

المجاهر الإلكترونية

ELECTRONE MICROSCOPES

الفصل الأول: المجهر الإلكتروني النافذ

الفصل الثاني: المجهر الإلكتروني الماسح

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصل الأول:

المجهر الإلكتروني النافذ
TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE -TEM-

- التركيب وطريقة الاستخدام
- تحضير وفحص العينات

obeikandl.com

تركيب واستخدام المجهر الإلكتروني النافذ
CONSTRUCTION AND OPERATION OF TEM

ذكرنا في الجزء الخاص بالمجهر الضوئي أن قوة التكبير magnification power والتمييز resolving power تعتمد على كل من الطول الموجي للضوء المستخدم والقيمة العددية للعدسة الشيئية، بحيث تزداد قوى التكبير والتمييز كلما قصر الطول الموجي للضوء.

ولأن الطول الموجي للضوء المرئي يتراوح بين 0.4-0.7 µm وأكبر قيمة لفتحة عددية في المجهر الضوئي تساوي 1.4 فإن أعلى قوة تمييز للمجهر الضوئي تساوي 0.28 µ m.

ومن هذا المنطلق تم التفكير في المجهر الإلكتروني electron microscope باستخدام الإلكترونات electrons – ذات الطول الموجي القصير جداً – كمصدر للإضاءة بدلاً من الضوء المرئي. والطول الموجي للإلكترونات يقصر كلما زادت قيمة الفولتية الكهربية electrical volt كما تتضح من المعادلة التالية:

$$\delta = \sqrt{1.5} / v$$

حيث إن: δ هي الطول الموجي للإلكترونات ويقاس بالنانوميتر (nm)
(µm 1nm = 1/1000)

V هي قيمة الفولتية للتيار الكهربي المستخدم.

فإذا استخدمنا تياراً كهربياً ذات 60.000 فولت فإن الطول الموجي للإلكترونات المنبعثة يكون (0.000020 µm) 0.02 nm، أي أقل بسبعة عشر

ألف مرة عن الطول الموجي للضوء العادي، وهذا الفارق الكبير في الطول الموجي يقابله فارق كبير في قوى التكبير والتمييز بين المجهر الضوئي والإلكتروني. علماً بأن زيادة الفولتية تزيد من عدد الإلكترونات مما يؤدي أيضاً إلى زيادة قوى التكبير والتمييز بالمجاهر الإلكترونية.

ولقد بدأت أول المحاولات لصنع المجهر الإلكتروني في بداية عام ١٩٣٠م بألمانيا، حيث قام كل من نول knoll ورسكا Ruska أثناء الفترة ما بين ١٩٣٠م – ١٩٣٣م بصنع مجاهر إلكترونية. وفي بداية ١٩٣٢م نشر العالمان بروش Brushe وجوهانسن Johanson وصفاً لمجهر إلكتروني أمكن بواسطته رؤية الأشكال مضيئة. ولقد كان المجهر الإلكتروني المصنوع في ذلك الوقت لا يمتاز كثيراً من ناحية الوضوح وقوة التمييز عن أي مجهر ضوئي جيد الصنع. ثم طرأت على هذا المجهر بعض التحسينات حيث استطاع العالم رسكا في سنة ١٩٨٣م أن يصمم مجهراً متقدماً ذا قوة تمييز تساوي 100 Å، غير أنه لم يكن صالحاً للاستعمال في فحص العينات البيولوجية. ومن المعروف أن أول مجهر إلكتروني تجاري هو الذي قامت بصنعه شركة سيمنز الألمانية عام ١٩٣٩م. ولقد وجد العالمان نول ورسكا أنه يمكن التحكم في شعاع من الإلكترونات وتكبير الصور بواسطة عدسات كهرومغناطيسية electromagnetic lenses، ويمكن الحصول على هذه الصور الإلكترونية إذا مرت الإلكترونات في وسط مفرغ جيداً (الضغط أقل من 10 mm زئبق)، حيث إن الشعاع الإلكتروني يتشتت عند اصطدامه بالإلكترونات وجزيئات الغاز. ولذلك لابد من وضع العينة ومصدر الإلكترونات والعدسات والشاشة المفلورة والصفائح الفوتوغرافية في عمود مجوف محكم يتصل بمضخات

تفريغ vacuum pumps. وحيث إن شعاع الإلكترونات يمكن تشتيته بسهولة فإن العينات يجب أن تكون رقيقة جداً.

ومع أن المجاهر الإلكترونية أصبحت في متناول اليد تجارياً منذ عام ١٩٣٩م إلا أن استعمالها في دراسة الخلايا والأنسجة لم يتم إلا في عام ١٩٥٢–١٩٥٣م وذلك بسبب الحاجة إلى الحصول على قطاعات رقيقة جدا من الأنسجة لفحصها بهذه المجاهر. وقد ارتبط التقدم في دراسة الأنسجة والخلايا بتطوير وسائل وطرق التحضيرات التقنية preparation techniques. ففي الفترة ما بين ١٩٤٠ – ١٩٥٠م قام بيز Pease وبيكر Baker وآخرون بتطوير أجهزة القطع العادية microtomes لتحضير قطاعات أقل سمكاً من تلك المستعملة في المجهر الضوئي. أما نيومان Newman وبوريسكو Borysko وسوردلو Swerdlow فقد استحدثوا مادة من البلاستيك methacrylate لطمر العينات embedding. كما قام كل من لاتا Latta وهارتمان Hartmann بإدخال واستعمال سكاكين مصنوعة لغرض تحضير قطاعات يتراوح سمكها بين 200 - 2000Å. وقد وجد العالمان بورتر Porter وجوستراند Jostrand أن مثبت رابع أكسيد الأوزميوم osmium tetraoxide الذي يستعمل للمجهر الضوئي يمكن استعماله كمثبت وصبغة في نفس الوقت للمجهر الإلكتروني.

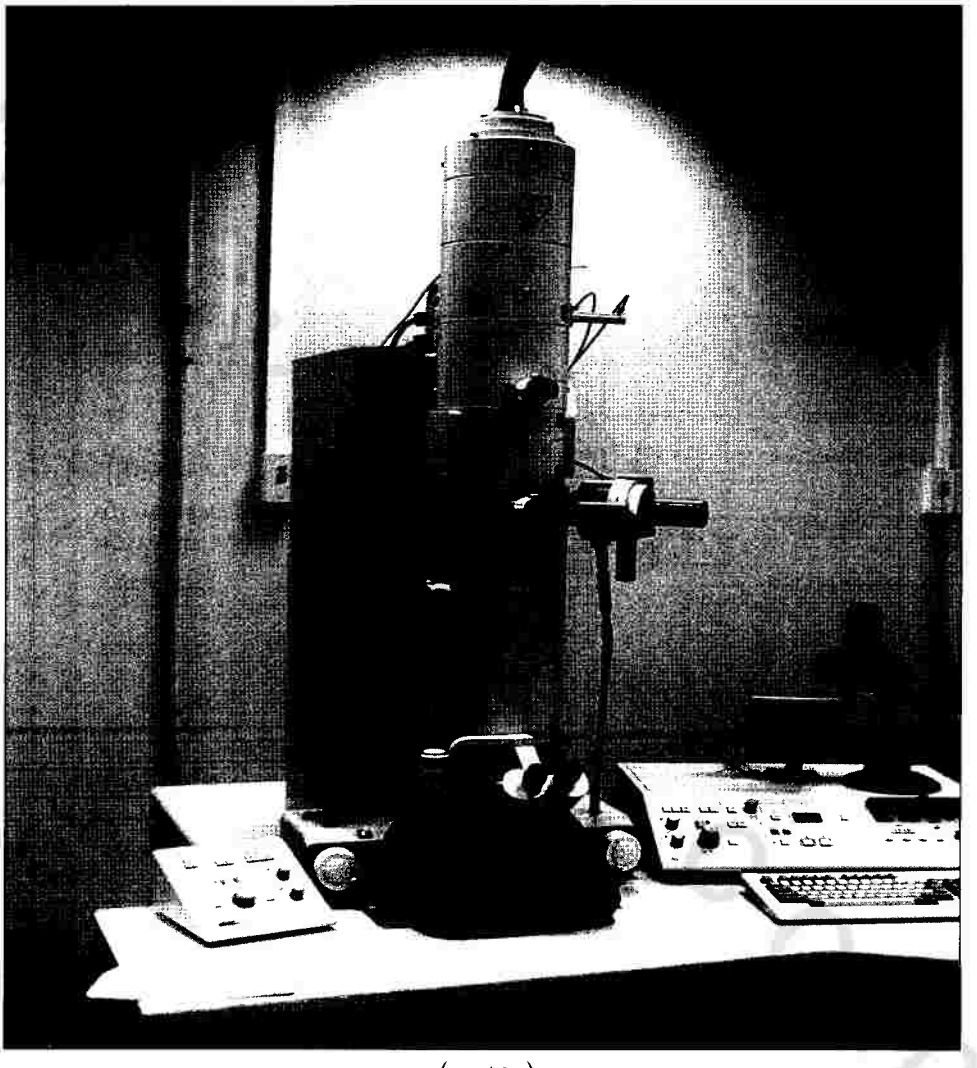
مصدر الإضاءة في المجهر الإلكتروني عبارة عن مدفعة إلكترونات electron gun (شكل٢٥A) وهي تتكون من فتيلة filament مصنوعة من التنجستين تمثل المهبط cathode ومصعد anode يتوسطه ثقب صغير.

عند توصيل تيار كهربي ذي فولتية عالية بمدفع الإلكترونات تسخن الفتيلة وتنطلق منها الإلكترونات كحزمة ضيقة في اتجاه المصعد المخالف لها

في الشحنة وتستمر بسرعتها العالية حتى تتعرض للعينة وتمر من خلالها حتى تصل إلى شاشة العرض الفلورسينية fluorescent screen.

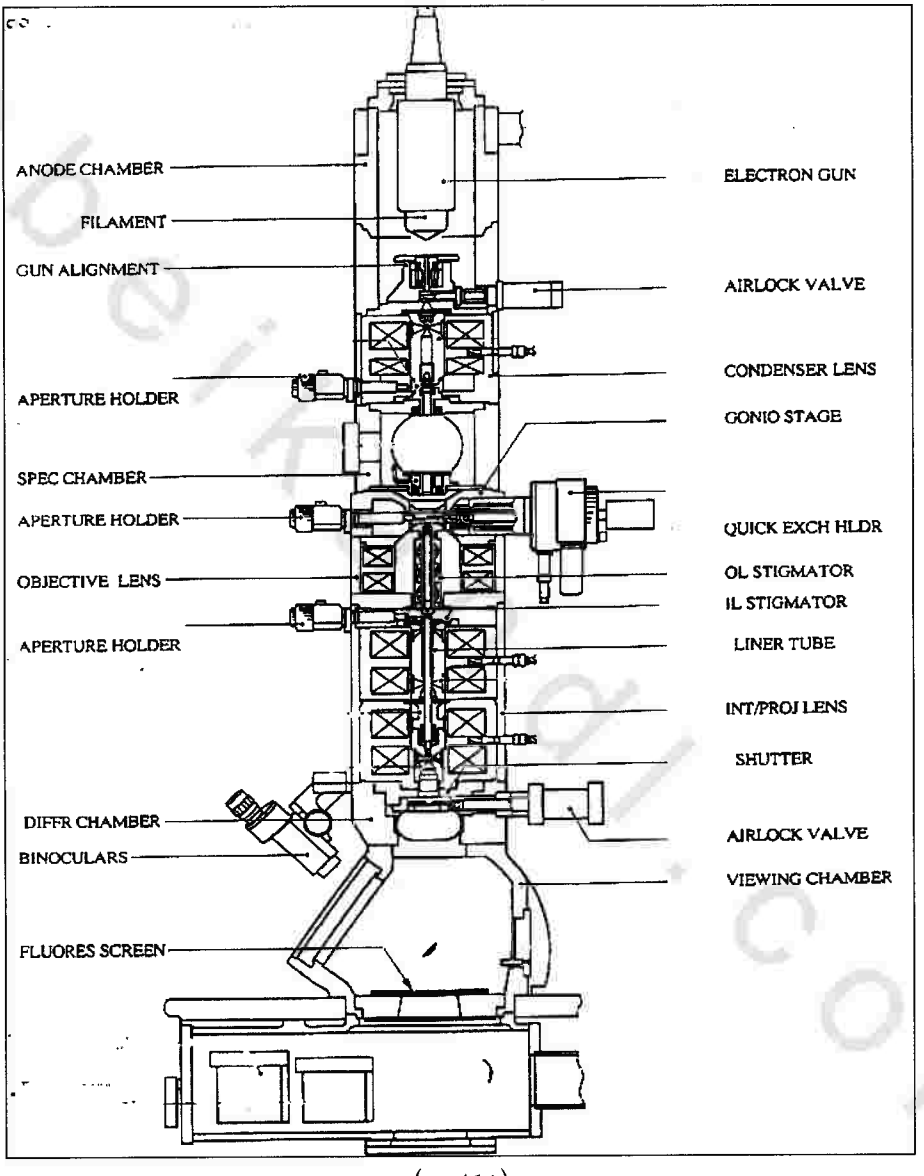
في المجهر الإلكتروني النافذ (شكل ٢٧ ، ٢٨) تتراوح فولتية التيار المستخدم من 40، 000 – 180، 000 فولت، وتصل إلى مليون فولت في الحديث منها، ويتبع ذلك زيادة مطردة في قوى التكبير والتمييز لهذه المجاهر حيث تصل قوة التكبير حتى 1، 600، 000 مرة (أقصى تكبير للمجاهر الضوئية يساوى x1500) وقوة التمييز بين Å 10-2 أي حوالي 1000ضعف قوة تمييز أقوى المجاهر الضوئية.

يتم التحكم في مسار الحزمة الإلكترونية بواسطة عدسات كهرومغناطيسية electromagnetic lenses تجعلها وسط العمود المفرغ vacuumed column، كما يتم التحكم في قطر هذه الحزمة الإلكترونية لتكون ضيقة جداً بحيث لا تتعرض لجميع أجزاء العينة في نفس الوقت فتتلف (العينة) بسرعة.



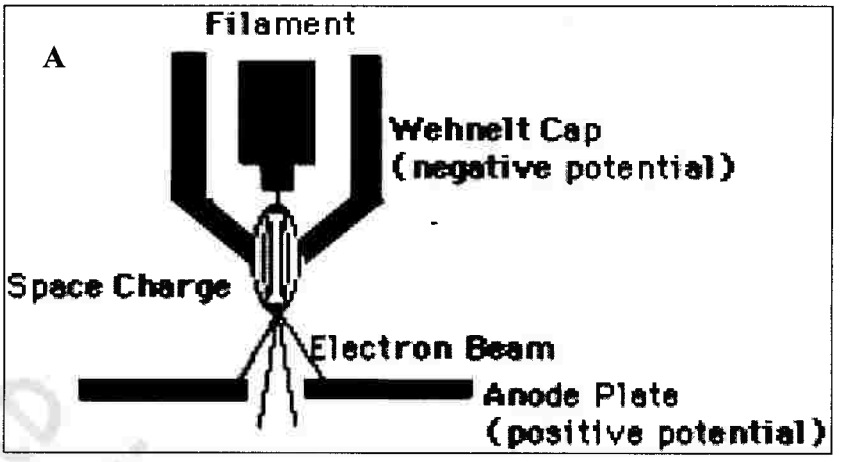
(شكل ٢٧)

صورة للمجهر الإلكتروني النافذ



(شكل ٢٨)

قطاع طولي في المجهر النافذ



(شكل ٢٩)

A مدفعة الإلكترونات في المجهر الإلكتروني

B غرفة الفحص في المجهر الإلكتروني النافذ

العدسات فوق العينة من النوع المكثف condenser وذلك لتركيز الإلكترونات على العينة، وقوة الإضاءة للشاشة تعتمد على ضبط هذه العدسات. كما توجد مجموعة أخرى من العدسات لضبط الصورة وتوضيحها وتكبيرها.

تحمل العينة في هيئة قطاعات رقيقة بسمك من 60-100 nm على شبكات نحاسية mesh grids، وذلك بعد صباغتها بصبغة الرصاص واليورونيل اسيتات lead and uranyl acetate.

تتكون الصورة على الشاشة الفلورسنتية الموجودة في غرفة الفحص أسفل العمود المفرغ (شكل٢٤B)على أساس أن الإلكترونات التي تقابل عضيات القطاع تعطي صورة داكنة، بينما الإلكترونات التي لا تقابل عضيات القطاع تعطي مناطق مضيئة على الشاشة.

أساسيات استخدام المجهر الإلكتروني النافذ -TEM- Principles of using the :

توجد أنواع وماركات عديدة من المجاهر الإلكترونية النافذة والتي من الممكن أن تختلف في الشكل وطرق الاستخدام والتشغيل، ولكن في النهاية تعتبر القواعد الفيزيائية المستخدمة في جميع هذه الأنواع متشابهة.

وهناك عدة نقاط أساسية يجب ملاحظتها عند استخدام المجهر الإلكتروني النافذ:

١. سمك القطاع يجب أن لا يزيد عن 600Å حتى تتمكن الإلكترونات من اختراقه.

٢. عمود المجهر يجب أن يفرغ تماماً قبل تسخين فتيل الإلكترونات.

٣. يجب أن تكون الإضاءة مركزه وذلك بجعل الإلكترونات تمر في خط عمودي متصل باستخدام عدد من مفاتيح التشغيل.

٤. هناك العديد من مفاتيح التشغيل الخاصة بعملية التكبير ودرجة وضوح الصورة والإضاءة كلها تعمل بواسطة ضبط العدسات المختلفة.

٥. من الممكن ضبط الصورة على شاشة العرض fluorescent screen ثم على شاشة الضبط الدقيق focusing screen باستخدام عدسات عينية binocular lenses.

٦. للحصول على صورة microphotograph ترفع الشاشة ليسمح لشعاع الإلكترونات بالسقوط على أفلام التصوير.

العوامل التي تؤثر على الصورة المتكونة Factors that influence the image formation:

وجود العينات داخل المجهر الإلكترونى يجعلها تتعرض لعديد من العوامل والتي من أهمها:

١. تفريغ العمود vacuum وتعرض العينات لقذائف الإلكترونات electron bombardment.

٢. قوة المجهر التوضيحية resolving power of the microscope والتباين في الإضاءة contrast.

أولاً: التفريغ والتعرض للإلكترونات:

تتأثر العينات وبالتالي صورتها النهائية بهذين العاملين كما يلي:

أ - بعض العينات وخاصة تلك التي تتميز بدرجة انصهار منخفضة low melting point لا تتحمل التفريغ العالي لعمود الجهاز ولا تتحمل أيضاً التسخين الناتج من هذا الوابل من الإلكترونات.

ب - لأن الإلكترونات تركز على جزء صغير من العينة فإن ذلك يؤدي إلى تغييرات جزيئيه molecular changes في هذه العينة كما تقتل المواد الحية living material بها تحت تأثير الجفاف dehydration والتأين ionization التي تحدثه الأشعة الإلكترونية ولذلك لا يمكن فحص أي من المواد الحية بالمجهر الإلكتروني.

ثانياً: قوة التوضيح للمجهر والتباين في الإضاءة:

علمنا فيما سبق أن قوة التوضيح (التمييز) resolving power هي أقل مسافة بين نقطتين يمكن عندها رؤية كل نقطة منهما بوضوح تام دون التداخل مع الأخرى، وهذه الصفة خاصة بمواصفات المجهر وهي تؤثر على جودة ودرجة وضوح الصورة إلى جانب تأثير مدى كفاءة تحضير العينة quality of specimen preparation.

أهم العوامل التي تؤثر على درجة تمييز المجهر:

أ) سمك القطاع The thickness of the section:

إن وضوح الصورة يعتمد كثيراً على معدل انتشار الإلكترونات بعد مقابلتها للقطاع بأجزائه المختلفة؛ ولذلك فإن القطاعات الرقيقة تعطي صورة أوضح.

وهناك قاعدة تنص على أن درجة وضوح الصورة تعادل 1/10 من سمك القطاع، فإذا كانت قوة التمييز للمجهر تعادل 5Å فإن سمك القطاع يجب أن لا يزيد عن 50Å.

ب) قوة انتشار العينة The scattering power of the object:

المقصود بذلك مدى انتشار الإلكترونات عند مقابلتها للقطاع، وهي تؤثر بدرجة كبيرة على وضوح الرؤية، ولذلك نجد أحياناً قطاعات غير سميكة ولكن يكون لها تركيب خاص مثل: جزيئات البروتين التي تؤثر على درجة انتشار الإلكترونات خلالها فتظهر الصورة ضعيفة التباين contrast.

ونلخص القول بأن قوة الانتشار تعتمد على كل من سمك القطاع thickness والتركيب الجزيئي للعينة molecular structure.

obeikandl.com

تحضير العينات للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ
PREPARATION OF SPECIMEN FOR TEM EXAMINATION

تجهز العينات للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ بتطبيق العمليات التالية:

١. التثبيت Fixation
٢. الإنكاز Dehydration
٣. التروّيق Clearing
٤. التشريب Infiltration
٥. الطمر Embedding
٦. التقطيع Sectioning
٧. التحميل Mounting
٨. الصبغ Staining

١. التثبيت Fixation:

الهدف من عملية التثبيت هو حفظ التراكيب الخلوية cellular structures داخل النسيج في حالة مشابهة لما كانت عليه في الكائن الحي، مانعة استمرار التفاعلات البيوكيميائية وكذلك التحلل الذاتي والبكتيري وإكساب العينة صلابة كافية لتتحمل العمليات التالية من إنكاز وطمر وتقطيع وصبغ وفحص.

إن عملية التثبيت الناجحة تفيد كثيراً في تجنب المشاكل التي قد تحدث أثناء العمليات التالية لها، وبالتالي فإن عدم تثبيت العينة بطريقة سليمة قد يؤدي في النهاية إلى تفتيت النسيج عند التقطيع وفي أثناء الفرد في حمام مائي أو عند التعرض للإلكترونات، كما يؤدي إلى سوء صباغة القطاعات فتظهر الصبغة غير متجانسة التوزيع.

أنواع المثبتات:

من الممكن تقسيم المثبتات إلى نوعين:

النوع الأول مثبتات تسبب تجلط البروتين protein coagulant fixatives الموجود بالأنسجة – مثل الكحول الإيثيلي – حيث تنزع جزيئات الماء من البروتين فتصبح المجاميع الفعالة reactive groups حرة فتتحد مع بعضها ومع مجاميع حرة مختلفة قد تتواجد في النسيج فيحدث التخثر ويتحول البروتين إلى خليط معتم من الحبيبات أو شبكة صلبة متعلقة في محلول reticular solids suspended in fluid. يتضح من ذلك حدوث تغير ملحوظ في تركيب البروتينات ومن ثم اختلال في التركيب الدقيق للنسيج، مما يجعل العينة غير جاهزة للفحص بالمجهر الإلكتروني.

النوع الثاني مثبتات لا تسبب تجلط البروتين non-protein coagulant fixatives. هذه المثبتات تتحد مع البروتين بروابط آيونية ionic bonds أو روابط تساهمية covalent bonds فيتحول هذا البروتين إلى مادة جيلاتينية شفافة وبهذا يتم تثبيتها دون أضرار كبيرة لتراكيب النسيج. من أمثلة هذا النوع من المثبتات osmium tetraoxide, formalaldhyde, gluteraldhyde:

- **Gluteraldhyde**:

الجلوترالدهيد هو glutaric acid dialdhyde

CHO – CH2 – CH2 – CH2 –CHO

وهو من أكثر المثبتات المستخدمة في التحضيرات الدقيقة لما له من مميزات نوجزها فيما يلي:

١. يثبت التراكيب الدقيقة المختلفة ويحافظ عليها من تأثير الخطوات التالية.

٢. يمكن ترك العينات فيه لعدة ساعات دون أن يؤثر عليها.

٣. يساعد على زيادة معدل نفاذية المواد المستخدمة في عملية الطمر.

٤. مثبت جيد للبروتينات إلا أنه ذو تأثير ضعيف في تثبيت المواد الدهنية.

فمن الملاحظ أن الجلوترالدهيد لا يؤثر كثيراً على الغشاء الخلوي cell membrane لاحتوائه على طبقتين من الدهون؛ لهذا السبب يستخدم osmium tetraoxide كمثبت إضافي – بعد استخدام الجلوترالدهيد – لتثبيت الدهون فيما يعرف بالتثبيت المزدوج double fixation.

يحضر الجلوترالدهيد على هيئة محلول تركيزه 25 % في الماء، ثم يحفظ في الثلاجة لأنه ضعيف الثباتية في درجة حرارة الغرفة.

- **Osmium tetraoxide (OsO4)**

يعتبر رابع أكسيد الأوزميوم من أفضل المثبتات التي تحافظ على التراكيب الخلوية، وبالإضافة لذلك فإنه يعتبر ملحاً معدنياً salt of heavy metal وبالتالي من الممكن أن يضيف كثافة density للأنسجة تساعد على

إيضاحها عند الفحص حيث إنه يصبغها باللون الأسود مما يسهل تحديدها أثناء العمليات التالية من التجهيز. ومن صفات هذا المثبت أنه يخترق النسيج ببطء ولكنه يتفاعل معه سريعاً. وقد لوحظ أنه يؤدي إلى نزع البروتينات من النسيج الذي يتعرض له فترة طويلة. وهو مثبت جيد للدهون.

- **Formalaldhyde**

هو أكثر استخداماً في تثبيت العينات التي تحضر للفحص بالمجهر الضوئي، ولقد تناولناه بشيء من التفصيل في ذلك الجزء.

من الهام العلم بأن المثبتات مواد سامة toxic substances سريعة التطاير يجب تناولها بحذر باستعمال القفازات وفي داخل غرفة الأمان hood، وخاصة مثبت OsO4 فإن أبخرته شديدة السمية تقتل الخلايا الطلائية لقرنية العين والخلايا الطلائية المخاطية للمجاري التنفسية والفم.

العوامل والاحتياطات التي يجب مراعاتها عند اختيار المثبت وأثناء عملية التثبيت:

١. معدل الحموضة والقلوية (الأس الهيدروجيني للمثبت) pH:

لأن المثبتات المستخدمة عبارة عن محاليل حمضية acidic فإن استخدامها كما هي يؤدي إلى ترسيب البروتينات والأحماض الأمينية واختلال في التفاعلات الكيميائية الحيوية والتي تتأثر بشدة بدرجة الحموضة pH؛ ولذلك يجب أن تكون درجة الحموضة pH للمثبت مماثلة لما هي عليه داخل الأنسجة؛ وذلك لتجنب تأثير هذا العامل على البروتينات، وبالتالي تجنب التأثير على التراكيب الدقيقة للخلايا.

يمكن استخدام محلول منظم buffer solution لتعديل pH المثبت لتعادل pH النسيج مع مراعاة أن لكل نسيج طبيعة ودرجة pH خاصة به، فمثلاً أغلب

الأنسجة الحيوانية تكون درجة الـ pH لها 7.4 تقريباً، أما الطبقة المخاطية للمعدة فدرجة الـ PH لها تعادل 8.5، وأغلب الأنسجة النباتية تتراوح الpH فيها بين 6.8–7.1 .

وأكثر المحاليل المنظمة استخداماً:

- الفوسفات المنظم phosphate buffer
- الكاكوديلات المنظم cacodylate buffer

الفوسفات المنظم يعتبر أنسب المحاليل المستخدمة في تعديل درجة pH لكلا من مثبتات الألدهيدات ورابع أكسيد الأوزميوم. يرجع ذلك إلى وجود هذا المنظم داخل الأنسجة الحية، ولذلك يسمى بالمحلول الفسيولوجى المنظم. وليس لهذا المحلول أي تأثير سام على المكونات الخلوية.

أما محلول الكاكوديلات فهو يستخدم لتنظيم pH مثبت الجلوترألدهيد أفضل من تنظيم pH المثبتات الأخرى، علماً بأن له تأثيراً ساماً ويجب الحذر عند استخدامه.

وعموماً يمكن تحضير مثبت الجلوترالدهيد في المحلول المنظم buffered gluteraldhyde (4%) كما يلي:

- جلوترالدهيد 16 ml
- محلول منظم 50 ml
- ماء مقطر 34 ml

ويمكن حفظ هذا المحلول لمدة أسبوع في درجة حرارة 4°c. ويجب عدم استخدامه إذا تعكر turbidity.

أما مثبت رابع أكسيد الأوزميوم في المحلول المنظم buffered osmium tetraoxid فيحضر بتركيز 1% كما يلي:

- رابع أكسيد الأوزميوم 1 g
- محلول منظم 50 ml
- ماء مقطر 50 ml

٢. معدل الأسموزية (الضغط الأسموزي) Osmosis :

من المعروف أن الماء ينتقل من الوسط الأقل تركيز إلى الوسط الأعلى تركيز ويكون هذا بعكس اتجاه الأملاح التي تنتقل من الوسط الأعلى تركيز إلى الوسط الأقل تركيز، وعلى هذه الحقيقة يمكن تصنيف محاليل التثبيت التي تتعرض لها الأنسجة الحية كما يلي:

١. محلول متعادلة أسموزيا مع الأنسجة isotonic solution ; هذا المحلول يكون في حالة توازن تقريباً مع سوائل النسيج (سوائل السيتوبلازم) ولذلك فإن معدل اختراقه للنسيج يكون بطيئا وضعيفا.

٢. محلول أعلى أسموزية solution hypertonic من النسيج ; هذا المحلول يؤدي إلى خروج الماء من الخلايا مسبباً كرمشة shrinkage النسيج.

٣. محلول أقل أسموزية hypotonic solution ; وهو يؤدي إلى اندفاع الماء منه إلى داخل الخلايا مسبباً انتفاخ النسيج tissue swelling.

والأصلح والأنسب أن يكون المحلول المستخدم في التثبيت متميزا بزيادة طفيفة في الأسموزية solution slightly hypotonic حتى يتمكن من اختراق النسيج بمعدل مناسب. ويمكن الحصول على هذا النوع من المحاليل بإضافة ملح كلوريد الصوديوم sodium chloride أو سكروز sucrose إلى المحلول المثبت.

٣. درجة الحرارة Tempretur:

تتأثر نفاذية أي مثبت بدرجة حرارته، حيث لوحظ أن معدل نفاذية المثبت تكون بطيئة في درجات الحرارة المنخفضة، كما لوحظ أن تحلل الأنسجة يكون أسرع مع درجات الحرارة المرتفعة.

٤. الوقت المخصص للتثبيت Duration of fixation:

يؤخذ في الاعتبار عامل الوقت المخصص للتثبيت، ويتوقف هذا على:

سمك العينة – نوع المثبت – درجة الحرارة – نوع المحلول المنظم

ويلاحظ أن وجود العينة لفترة طويلة في المثبت من الممكن أن يؤثر على المواد الموجودة داخل الخلايا ويعمل على سحبها إلى الخارج. يلاحظ هذا بوضوح عند استخدام osmic acid حيث إنه لا يستطيع اختراق البروتينات وتثبيتها، وبالتالي فإنها سوف تسحب خارج العينة مع استخدام المواد في الخطوات التالية، بينما تكون باقي المكونات قد تم تثبيتها. هذه المشكلة لا تظهر بوضوح عند استخدام الجلوترألهيد glutaraldhyde.

والوقت المناسب للتثبيت عادة يكون ما بين hour 2 - ½.

٥. حجم العينة Tissue specimen size:

لأن بعض المثبتات لا تستطيع النفاذ إلى داخل النسيج الذي يزيد سمكه عن 1 mm مثل مثبت الجلوتر ألدهيد gluteraldhyde، يجب تقطيع العينة إلى مكعبات ذات أحجام أقل من ذلك حتى لو كان المثبت سريع النفاذية، وذلك لضمان وصوله إلى عمق النسيج وتثبيت كل أجزاء العينة بدرجة متساوية. أما مثبت حامض الأوزميك osmic acid فهو يثبت جيداً العينات التي يتراوح حجمها ما بين mm^3 0.5 - 0.25؛ ولذلك فإن الحجم المناسب للعينة يجب أن لا يزيد عن

mm^3 1 وعند استخدام osmic acid كمثبت ثاني في نظام التثبيت المزدوج double fixation يجب تقليص هذا الحجم إلى $0.5\ mm^3$.

٦. الوسيلة والطريقة المستخدمة في التثبيت:

حفظ وتثبيت العينة بشكل جيد يتوقف أيضاً على الوسيلة والطريقة المستخدمة في ذلك. وقد لوحظ أن أفضل طريقة لإيصال المثبت للعينة هي طريقة الحقن لمحاليل التثبيت عن طريق الأوعية الدموية perfusion ويتم ذلك أثناء حياة الحيوان in vivo.

أحياناً يتم التثبيت بطريقة موضعية فيما يعرف بالتثبيت الموضعي in situ وذلك بوضع المثبت على الأنسجة المراد تثبيتها مع تخدير الحيوان، ومن الممكن حقن المثبت في الأوعية الدموية الخاصة بالعضو المراد تثبيته microinjection.

دلائل التثبيت الجيد:

هناك بعض المظاهر والعلامات الهامة تدل على جودة المثبت وصحة عملية التثبيت يمكن أن يستدل عليها بفحص قطاع من النسيج المثبت بالميكروسكوب الضوئي، من أهم هذه المظاهر والعلامات:

- التراكيب الغشائية membranous components تظهر كاملة ومتصلة تحت الميكروسكوب.
- عدم وجود أي تغيرات في ترتيب التراكيب lack of distortion.
- عدم وجود فراغات empty spaces في القطاع.

اختيار المثبت وفقاً للتركيب الكيميائي للنسيج المفحوص Choise of fixative according to the structure to be seen:

الأحماض النووية Nucleic acids:

توجد الأحماض النووية في DNA داخل الأنوية وفي RNA بالسيتوبلازم وهذه الأحماض تتفاعل ببطء مع المثبتات، ولكن يمكن رؤيتها من خلال احتوائها على الدهون والبروتينات المصاحبة لها. ويمكن صباغتها بوضوح باستخدام صبغة uranyl acetate.

الدهون الفوسفاتية Phosphplipids:

توجد هذه الدهون في الأغشية membranes وهي تثبت جيداً باستخدام osmic acid، وتصبغ بوضوح باستخدام صبغة الرصاص lead.

البروتينات Proteins:

توجد البروتينات في الإنزيمات enzymes ومتعلقات الخلية inclusions وفي الحبيبات الإفرازية secretory granules. وهي تثبت جيداً بالألدهيدات.

الدهون Fats:

الدهون المشبعة saturated fats لا تتفاعل مع الـ osmic acid وبالتالي فهي تزال بالمواد المستخدمة في المعاملات التالية. أما الدهون غير المشبعة unsaturated fats فهي تثبت جيداً بواسطة osmic acid وتظهر على هيئة مناطق داكنة اللون dense deposit.

المواد السكرية Polysaccharides:

هذه المواد ليس لها مثبت محدد، ولكنها تحفظ وتظهر على هيئة مناطق غير محددة، وهي تصبغ بوضوح بالرصاص.

التثبيت المزدوج Double fixation :

ذكرنا فيما سبق أن الجلوترألدهيد glutaraldhyde يستخدم كمثبت جيد للبروتينات دون الدهون، ولكنه يخترق الأنسجة ببطء مقارنة بمثبت osmic acid الذي يتميز بتثبيته الجيد للدهون المتعادلة والدهون الفوسفورية دون البروتينات؛ لذلك يفضل استخدام المثبتان بالتوالي حتى نحصل على نتيجة أفضل في عملية التثبيت.

٢. الغسيل والإنكاز Washing and dehydration :

لأن مواد الطمر المستعملة في مجال المجهر الإلكتروني النافذ عديمة الامتزاج بالماء، فلابد من نزع الماء من النسيج أولاً قبل طمر العينة. ويتم نزع الماء (الإنكاز) بمواد مجففة مثل: الكحول الإيثيلي والميثيلي والأسيتون.

الكحول الإيثيلي ethanol من أكثر المواد المجففة استعمالاً مع الأخذ في الاعتبار أنه يتفاعل مع رابع أكسيد الأوزميوم OsO4 مما يؤدي إلى حدوث ترسبات داكنة اللون داخل الأنسجة؛ لذلك يجب غسل النسيج من هذا المثبت عدة مرات بالمحلول المنظم buffer قبل بداية عملية الإنكاز.

الأسيتون acetone لا يؤدي إلى حدوث ترسبات، ولكنه يؤدي إلى تحلل مكونات الخلية dissolves cell components.

الكحول الميثيلي methanol يعتبر أفضل المواد المجففة لأنه لا يؤثر في طبيعة التراكيب الخلوية، حيث إنه لا يتفاعل مع رابع أكسيد الأوزميوم ولا يتسبب في تحلل مكونات الخلية.

تتم عملية الإنكاز بتمرير النسيج في سلسلة من التركيزات التصاعدية لأحد هذه المحاليل (50، 70، 90، 100 %) ولمدة نصف ساعة تقريباً للتركيز

الأول (% 50) ثم ربع ساعة في التركيزات 70%، 90% ثم نصف ساعة في المحلول المطلق، ويفضل استبدال هذا المحلول وتترك العينة به لمدة نصف ساعة أخرى.

من المعلوم أن الكحولات مذيبة جيدة للدهون؛ ولذلك قد تؤدي عملية الإنكاز بالكحولات إلى إستخلاص extraction المواد الدهنية المشبعة saturated fats من النسيج الدهني. وعملية الإنكاز عموما قد تؤدي إلى إزالة مكونات أخرى من الخلايا. لذلك يجب تقليل الوقت وإنجاز هذه العملية بسرعة، وخاصة عند معاملة النسيج في الخطوة الأخيرة بالمجفف المطلق absolute dehydrant.

٣. الترويق Clearing:

إذا كانت مادة الطمر لا تمتزج مع محلول الإنكاز فلابد من نقل النسيج إلى سائل يمتزج مع محلول الإنكاز (الكحول) ومادة الطمر لغرض ترويق النسيج.

من السوائل المستخدمة في ذلك مادة أكسيد البروبيلين propylene oxide الذي يساعد على إزالة بقايا الماء من النسيج وهو يمتزج بسهولة مع البلاستيك resins الذي يستخدم في عملية الطمر، ومن مميزاته أيضاً أنه مادة متطايرة volatile إذا ما تبقى منها شيء داخل النسيج.

يوضع النسيج في هذه المادة لمدة نصف ساعة، ويمكن استخدام الأسيتون أو الأيبوكس بروبان epoxypropane كمحلول ترويق.

٤. التشبع أو التشريب Infilteration:

يتم في هذه العملية إحلال تدريجي للبلاستيك السائل (resin) ليحل محل محلول الإنكاز والترويق. يتم ذلك بمعاملة النسيج بنسب متدرجة من محلول الترويق propylene oxide والبلاستيك(راتنج) يبدأ بنسبة 1:1 ثم 1:2 ثم 1:3 ثم بلاستيك مطلق absolute resin على أن يترك النسيج ليتشبع في كل تركيز لمدة تتراوح بين ساعة إلى أربع ساعات اعتماداً على:

١. طبيعة العينة.

٢. نوع الراتنج المستعمل.

٣. استخدام جهاز التحريك (الهزاز) لهز العينة agitation للمساعدة في إدخال الراتنج للعينة.

٥. الطمر Embedding:

بعد تشبع العينة بمادة الراتنج (resin) تنقل لتطمر في مادة راتنج جديدة داخل الوعاء (الكبسولة) النهائي. يمكن توجيه العينة داخل الكبسولة لتكون في الاتجاه المناسب والمرغوب (قطاع طولي أو عرضي) في أثناء عملية التقطيع، مع كتابة بيانات العينة بطريقة مناسبة لتكون مصاحبة للكبسولة.

تنقل الكبسولات بعد ذلك إلى الفرن عند درجة حرارة 40° ولمدة يوم واحد، ثم ترفع درجة الحرارة إلى 60° لمدة يوم آخر حتى تتم عملية البلمرة ويتصلب الراتنج، بعد ذلك تخرج الكبسولات وتحفظ حتى وقت التقطيع.

مواد الطمر Embedding media:

من أكثر الراتنجات المستخدمة في عملية الطمر للعينات المدروسة بالمجهر الإلكتروني النافذ هو راتنج الإيبوكسي epoxy resin؛ لأن هذا الراتنج يتميز بما يأتي:

١. تتم عملية البلمرة polymerization فيه بانتظام.

٢. لا يتسبب في كرمشة shrinkage العينة كثيراً.

٣. يجعل العينة ثابتة لا تتأثر بالإلكترونات.

يلفت النظر إلى أن هذا الراتنج يسبب حساسية للجلد عند التعرض له.

أيضاً من الراتنجات المستخدمة في عملية الطمر راتنج الدوركوبان durcupan resin وراتنج ميثاأكريلات الجليكول glycol methacrylate حيث تمتاز هذه الراتنجات بأنها:

١. مواد قابلة للذوبان في الماء water soluble resin تجعل عملية التجفيف (الإنكاز) غير ضرورية، فهي نفسها تنزع الماء من النسيج في أثناء الطمر.

٢. تسهل عملية صبغ القطاعات.

أوعية الطمر:

توجد أنواع متعددة من الأوعية والأواني البلاستيكية التي تستخدم لطمر العينات في الراتنج وعمل الكتل blocks. هذه الأوعية منها ما يوجد على هيئة كبسولات، ومنها ما يوجد على هيئة أقراص مسطحة.

الكبسولات هي الأفضل الأكثر استخداماً وذلك لأنها:

١. ذات أحجام مناسبة للعينات.

٢. من الممكن تثبيتها جيداً في جهاز التقطيع الدقيق ultramicrotome.

٣. لا نحتاج معها لإزالة الكثير من راتنج الطمر من حول العينة trimming.

٦. التقطيع Sectioning:

علمنا أن قوة التوضيح resolving power للمجهر تتأثر كثيراً بسمك القطاع المفحوص، فكلما قل سمك القطاع زادت قوة التوضيح؛ ولذلك تطورت أجهزة التقطيع microtomes حتى أمكن تصنيع أجهزة التقطيع الدقيق ultramicrotomes التي يمكن بواسطتها الحصول على قطاعات رقيقة جداً يصل سمكها إلى 500Å (0.05 µm). ويتم استقبال هذه القطاعات في أحواض أو قوارب boats مصنوعة من المعدن أو البلاستيك ومملوءة حتى حافتها العليا بماء مقطر أو محلول 10% أسيتون، على أن يتم لصق هذه القوارب على السكين الزجاجية بمادة الشمع الأحمر (شكل).

ويجب أن نشير هنا إلى عملية التشذيب trimming التي يقصد بها تجهيز الكبسولة للتقطيع، حيث يجب إجراء هذه العملية للكبسولات التي تحتوي على العينات قبل عملية التقطيع بجهاز التقطيع الدقيق. وتتم هذه العملية يدوياً بشفرة حادة جداً أو بجهاز التشذيب الآلي (شكل A ٣١) ويتم اتباع الخطوات التالية:

١) تثبت الكبسولة في مكانها الخاص بجهاز التشذيب أو بالميكروتوم الدقيق.

٢) يزال البلاستيك الزائد حول العينة.

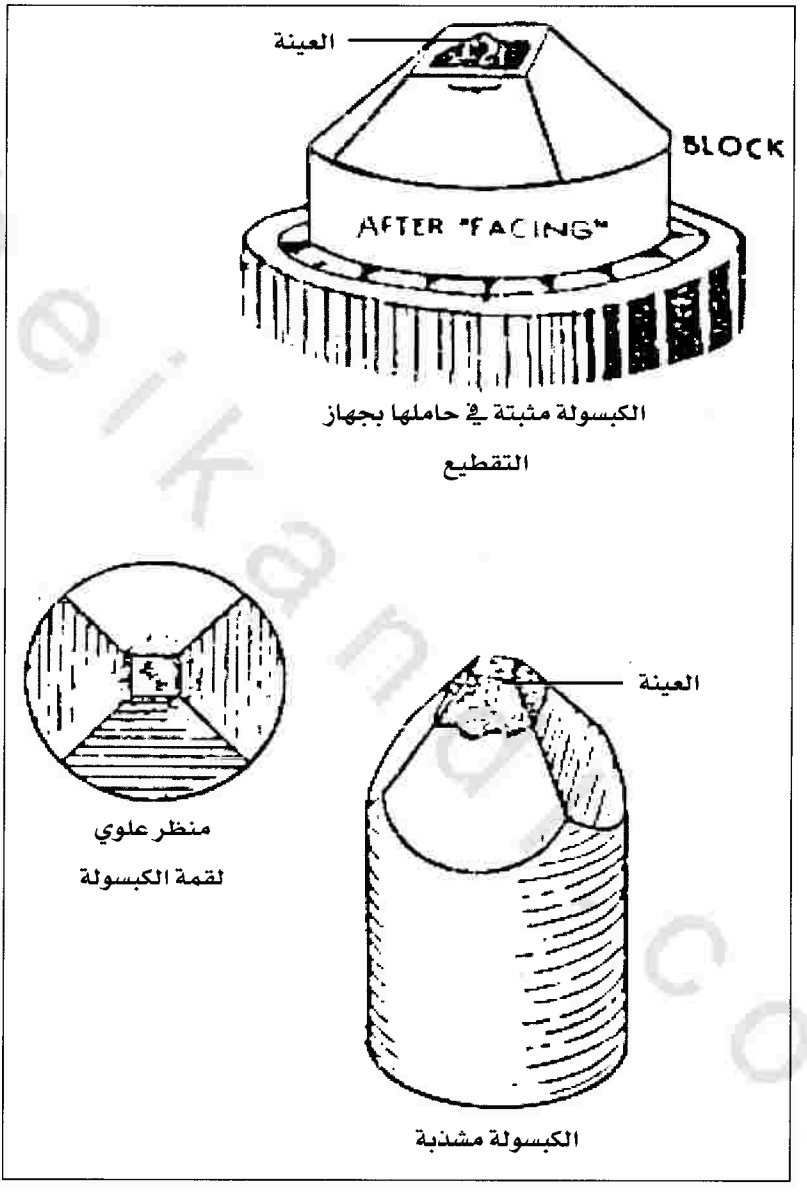
٣) يجهز وجه العينة على شكل شبه منحرف وذلك لسهولة تحديد الاتجاهات عند عمل القطاعات.

٤) تقطع عدة قطاعات شبه رقيقة semi thin sections بسمك ١ ميكرون ويتم تحميلها على شريحة زجاجية ثم صبغها بصبغة التوليدين الأزرق toludine blue، والهدف من هذه العملية هو تحديد المكان المراد عمل قطاعات رقيقة thin sections فيه بسمك 700Å للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ.

٥) بعد تحديد مكان التقطيع يعاد تجهيز (تشذيب) وجه العينة في الكبسولة؛ ليكون على شكل مستطيل ويراعى إخلاء البلاستيك حول العينة بقدر الإمكان.

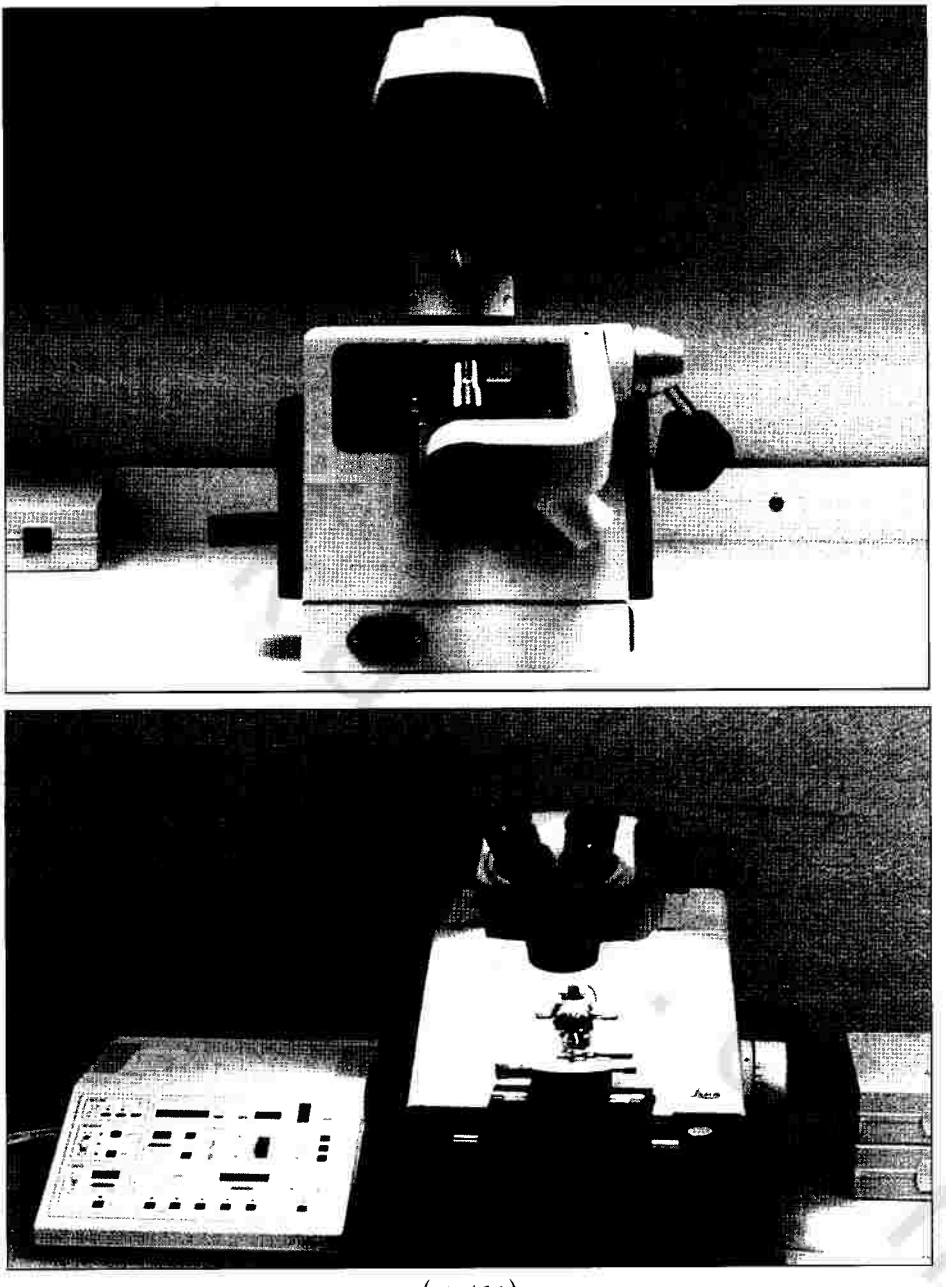
وهناك بعض الأمور التي يجب أخذها في الاعتبار أثناء تجهيز العينة للتقطيع من أهمها:

- يفضل أن يكون شكل الكبسولة على هيئة هرم؛ وذلك لتثبت جيداً في جهاز التقطيع فتسهل عملية التقطيع.
- يجب تغيير السكين الزجاجية قبل الشروع في تقطيع القطاعات الدقيقة.
- يتم مراقبة عمليات التشذيب والتقطيع بواسطة الميكروسكوب المزود بجهازي التقطيع والتشذيب.



(شكل ٣٠)

صور توضح شكل الكبسولة بعد التشذيب



(شكل ٣١)

A صورة لجهاز التشذيب Ultramicrotome

B صورة لجهاز التقطيع الدقيق

جهاز التقطيع الدقيق Ultramicrotome :

يتركب جهاز التقطيع الدقيق طبقاً لمواصفات Leica ultracut المصنع بواسطة Leica Mikrosysteme-Austeria (شكل B ٣١ و٣٢) من:

A. ميكروسكوب تكبير وتقريب stereo zoom microscope تتراوح قوة التكبير له من x10 حتى x60، وذلك للمتابعة والتحكم في عمليات التشذيب اليدوي manual trimming والتقطيع اليدوي أو الآلي.

B. حاجب للتنفس breath shield يمنع وصول تنفس الفني إلى منطقة التقطيع.

C. قالب السكين knife block وهو يسمى أيضاً ماسك السكين knife holder حيث تثبت به السكين جيداً.

D. مسرح السكين knife stage يثبت عليه قالب السكين، ويمكن تحريكه ليقترب أو يبعد عن العينة.

E. مغير التكبير والتقريب zoom magnification changer يتم بواسطته التحكم في قوة التكبير والتقريب للميكروسكوب.

F. ضابط التوضيح focusing knob يستخدم للتحكم في وضوح الصورة تحت الميكروسكوب.

G. ضابط حركة الميكروسكوب يميناً ويساراً N-S movement knob.

H. قطعة قوسيه arc segment يثبت عليها ماسك العينة specimen holder، وهذه القطعة قابلة للدوران، وهي تستخدم في ضبط توجيه العينة نحو السكين.

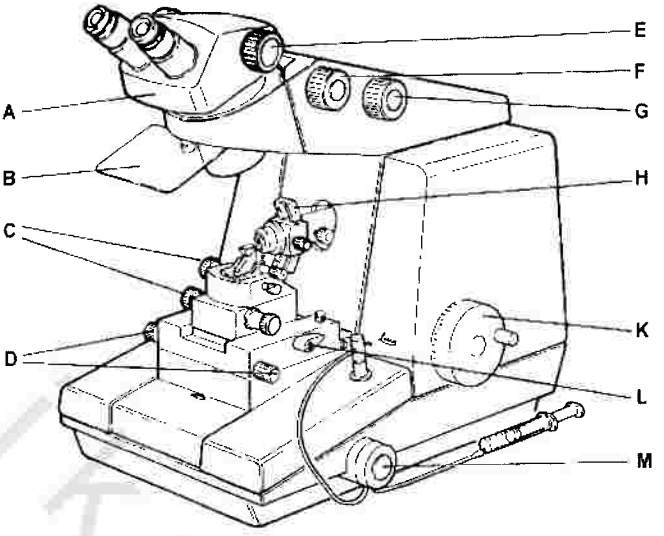
K. عجله يدوية hand wheel تستخدم للتقطيع اليدوي.

L. قامط locking lever يستخدم لتثبيت قالب السكين knife block فوق المسرح.

M. مضخة ماء مزودة بضابط يتحكم في ملء القارب بالماء reflexomat

ويوصل الجهاز بلوحة تحكم operation control unite، حيث يتم من خلالها التحكم في معدل التقطيع الذي يتراوح بين 0.05 إلى 100 mm/sec وكذلك في سمك القطاعات وعددها.

obeikandl.com



A Stereo Zoom Microscope
magnification 10x to 60x

B Breath Shield

C Knifeblock
rotates 360°, clearence angle setting from -2° to +15° graduated in 1° steps

D Knifestage
lateral movement of 25mm

E Zoom Magnification Changer

F Focusing Knob

G N - S Movement Knobs
for microscope carrier

H Segment Arc
for specimen transillumination, 360° rotatable, 2 selflocking precision drives for eucentric movement of ±22° and +47° +3°

K Handwheel
with cutting stroke indication

L Locking Lever
for knife block

M Reflexomat II
with fine control that permits the pumping of water in and out of the TRUFS

(شكل ٣٢)

منظر تفصيلي لجهاز التقطيع الدقيق

Ultramicrotome

أداة التقطيع في جهاز التقطيع الدقيق ultramicrotome هي السكين، وبالتالي لابد من الاهتمام باختيار نوع وجودة السكين المستخدم؛ لأن ذلك يتوقف عليه جودة القطاعات الناتجة.

السكاكين المستخدمة في عمليات التقطيع وتحضير القطاعات للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ لابد وأن تتوفر فيها الشروط الآتية:

١. يجب أن تكون السكين من الصلابة لتقطع العينات الصلبة.

٢. يجب أن تكون مصنوعة من مادة نقية حتى تكون حافة القطع ناعمة ومتجانسة في جميع أجزائها.

٣. يجب أن يكون نصف قطر حافتها المستعملة للقطع أصغر من سمك أرق قطاع مرغوب.

٤. يجب أن تكون السكين مقاومة للتآكل الكيميائي.

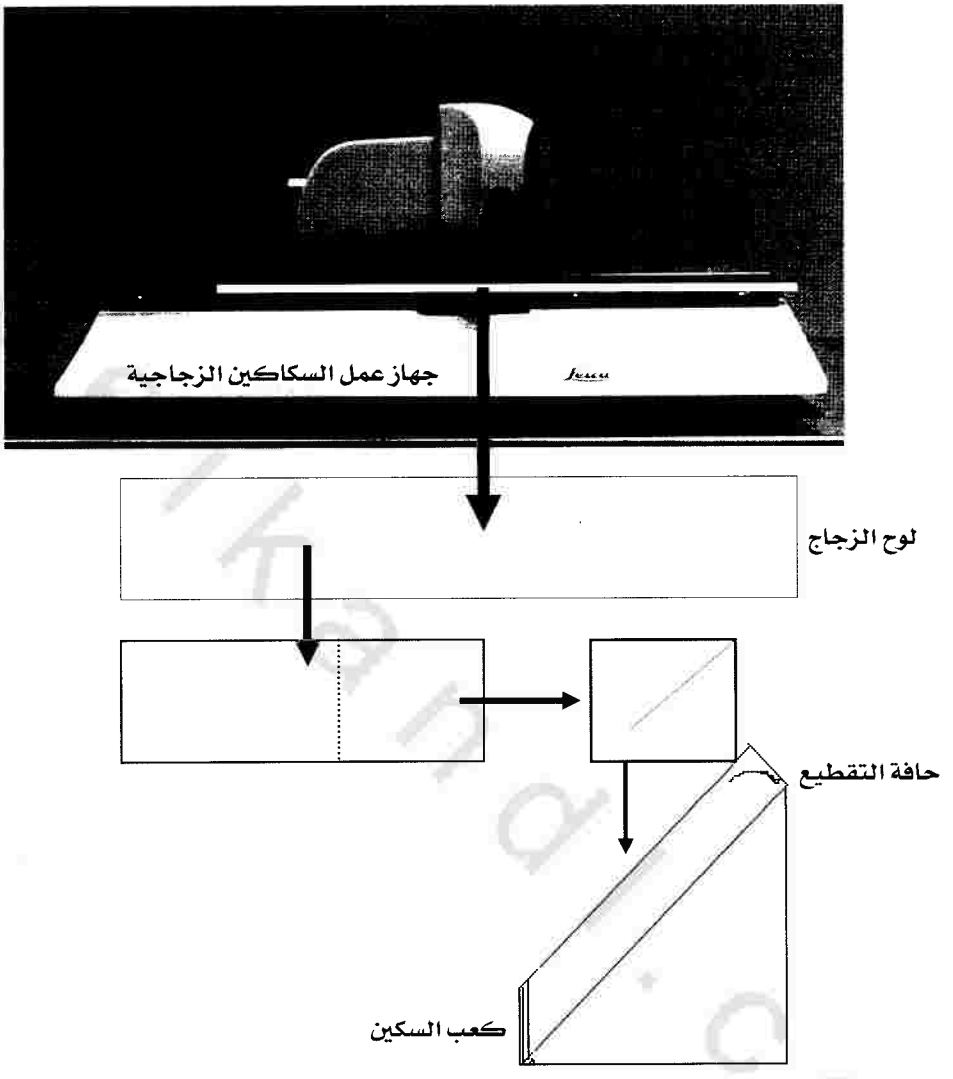
ويستخدم نوعان من السكاكين في عمليات التقطيع بأجهزة الميكروتوم، النوع الأول عبارة عن سكاكين زجاجية glass knifes تصنع في وحدة المجاهر، أما النوع الثاني فهي سكاكين ماسية diamond knifes متوفرة تجارياً (جاهزة الصنع).

السكاكين الزجاجية Glass knifes:

هذا النوع من السكاكين هو الأكثر شيوعاً واستخداماً في مجال تقنية المجاهر الضوئية والإلكترونية؛ وذلك لما تمتاز به من رخص الثمن وسهولة التصنيع.

وتصنع هذه الأنواع من الساكين داخل وحدات المجاهر باستخدام أجهزة عمل السكاكين الزجاجية knife makers (شكل ٣٣) وهي متوفرة ولا غنى عنها في أي مكان يهتم بالتقنيات المجهرية.

السكاكين الزجاجية تكون مثلثة الشكل بزاوية 45°، وهي تصنع من قضبان أو شرائح زجاجية glass strips يتراوح سمكها بين 10 mm - 6 وعرضها بين 38 mm - 25، حيث تقطع القضبان الزجاجية إلى مربعات ثم يشطر كل مربع قطرياً إلى مثلثين متشابهين (شكل ٣٣). وتكون حافة السكين الصالحة للقطع غالباً على يسار السكين (الثلث الأيسر)عند تثبيتها في ماسك السكين knife holder الموجود بجهاز التقطيع الدقيق. ويجب أن تكون حافة القطع هذه مستقيمة ومستوية وناعمة. وتعتمد مقاومة حافة القطع (صلاحيتها لعمل عدد كبير من القطاعات) على نوع الزجاج المستعمل في عمل السكاكين وكذلك على صلابة العينة ومادة الطمر وحجم العينة وسمك القطاعات المرغوبة.



(شكل ٣٣)

خطوات عمل السكين الزجاجية

السكاكين الماسية Diamond knifes :

هذه السكاكين مصنوعة من الماس، وبالرغم من أنها غالية الثمن إلا أنها تتميز بما يلي:

١. توفر الوقت والجهد الذي يضيع في تصنيع وتعديل السكاكين الزجاجية.

٢. حافة القطع في هذه السكاكين تكون حادة جداً مما يجعلها الأصلح لعمل قطاعات رقيقة وجيدة حتى مع المبتدئين. وكذلك عمل القطاعات من العينات الصلبة مثل الأظافر والأسنان والعظام.

٣. يمكن استعمال السكاكين الماسية لمدة طويلة تصل إلى عامين إذا أحسن استعمالها.

٤. يمكن شحذها (سنها) عند الحاجة بشرط خلو حافة التقطيع من الخدوش العميقة.

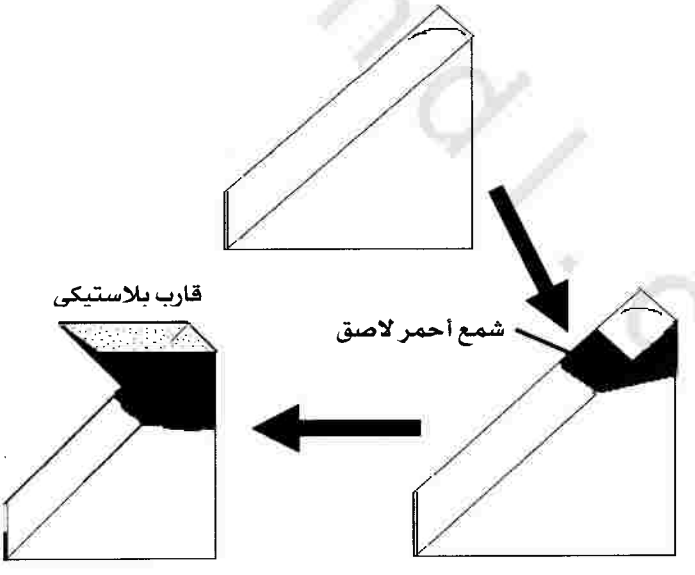
الاحتياطات التي يجب مراعاتها للحفاظ على السكاكين الماسية تتمثل في تجنب تعريض حافة السكين للصدمات والحفاظ عليها دائماً نظيفة، ومن الأفضل أخذ القطاعات الأولى بسكين زجاجية لكي نضمن سطحاً ناعماً قبل التقطيع بالسكين الماسية.

استخدام جهاز التقطيع الدقيق Ultramicrotome في تحضير قطاعات المجهر النافذ وأهم الاحتياطات والأخطاء الشائعة

إن جهاز التقطيع الدقيق ultramicrotome إذا أحسن استخدامه يساعد في تحضير قطاعات ذات جودة عالية يصل سمكها إلى (0.5µm) 500Å وتكون هذه القطاعات على هيئة شريط متصل ribbons ويتم استقبالها على سطح مائي في

أحواض مصنوعة من البلاستيك أو شرائط معدنية، حيث يتم لصق هذه الأحواض أو الشرائط على السكاكين الزجاجية بواسطة الشمع لتكون محكمة الالتصاق على السكين لمنع تسرب الماء منها (شكل ٣٤). وبالنسبة للسكاكين الماسية تكون الأحواض مثبتة بها تجارياً. ويراعى ملء الحوض بالماء تماما حتى يكون مستوى سطح الماء مساويا لمستوى حافة السكين وذلك لتجنب التفاف وتلف القطاعات عند حافة القطع بالسكين، كما يجب تجنب زيادة مستوى سطح الماء عن حافة السكين حتى لا تبلل العينة بالماء أثناء التقطيع.

تتم مراقبة عملية التقطيع بواسطة العدسات الميكروسكوبية التي يزود بها جهاز التقطيع الدقيق وذلك لرؤية القطاعات العائمة في حوض الماء ولتحميل القطاعات على الشبكات النحاسية. كما يزود الجهاز بمصدر ضوئي عبارة عن أنبوبة فلورسينية صغيرة مثبتة خلف السكين لينعكس ضوؤها على سطح الماء.



(شكل ٣٤) خطوات تركيب القارب البلاستيكي على السكين الزجاجية

تظهر القطاعات طافية على سطح الحوض المائي بألوان مختلفة لها مدلول على سمك هذه القطاعات كما يلي:

- قطاعات رمادية يكون سمكها بين 0.060 – 0.010 µm.
- قطاعات فضية يكون سمكها بين 0.090 – 0.060 µm.
- قطاعات ذهبية يكون سمكها بين 0.190 – 0.090 µm.
- قطاعات زرقاء يكون سمكها بين 0.240 – 0.190 µm.
- قطاعات خضراء يكون سمكها بين 0.280 – 0.240 µm.
- قطاعات صفراء يكون سمكها بين 0.320 – 0.280 µm.

القطاعات التي تتدرج ألونها من الأزرق إلى الأصفر هي قطاعات سميكة لا تصلح للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ.

وحتى يمكن الحصول على قطاعات جيدة صالحة وجاهزة للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ TEM لابد أن تتوافر الشروط التالية:

١. أن تكون عملية الطمر ناجحة وسليمة.

٢. شكل الكتلة block التي تثبت عليها الكبسولة في أثناء التشذيب والكبسولة capsule الخاص بالعينة يكون سليماً، بمعنى أن تكون عملية تشذيب trimming الكبسولة سليمة.

٣. أن تكون حافة السكين سليمة.

٤. استخدام جيد لجهاز التقطيع.

٥. فرد القطاعات ومنع تجعدها باستخدام الكلوروفورم، وذلك لفصل القطاعات وسهولة تحميلها على الشبكات grids.

٦. الجمع السليم للقطاعات على الشبكة وذلك للآتي:

- تجنب وضع القطاعات فوق بعضها.
- تجنب تغطية القطاعات لسطحي الشبكة.
- فرد القطاعات وتجنب تجعدها.

٧. الصباغة السليمة.

٨. مراعاة النظافة التامة لكل الأدوات المستخدمة في تحضير القطاعات.

العوامل التي تؤثر في عملية التقطيع:

١. وجود بعض المتعلقات الصلبة hard inclusions داخل العينة، مما يؤدي إلى صعوبة التقطيع وعدم تجانس القطاعات.

٢. الاهتزازات vibrations، وهي قد تؤدي إلى عدم تساوي أو تجانس سمك القطاع، وقد تظهر علامات للسكين على القطاع. ويمكن إيجاز الأسباب التي تؤدي إلى حدوث الاهتزازات في النقاط التالية:
- عدم تثبيت جهاز التقطيع ultramicrotome جيداً – حركة الأشخاص المحيطين بجهاز التقطيع. – عدم تثبيت السكين جيداً – عدم تثبيت حامل العينة specimen holder جيداً.

٣. عوامل تؤدي إلى اختلاف (عدم انتظام) سمك القطاع. قبل أن نذكر هذه العوامل يلزم العلم بأن لهذا الاختلاف عدة مظاهر، من أهم هذه المظاهر:

- اختلاف السمك من قطاع إلى آخر ولكن سمك كل قطاع يكون متساوياً.
- اختلاف السمك في نفس القطاع بحيث يكون هذا الاختلاف متوازيا مع حرف السكين.
- اختلاف السمك في نفس القطاع ويتبعه تأثير في التراكيب داخل القطاع علماً بأنه يمكن أن تحدث كل هذه المظاهر في نفس الوقت داخل أحد القطاعات. أما العوامل التي تؤدي إلى ذلك (اختلاف سمك القطاع) فمن أهمها:

• اهتزاز الميكروتوم والسكين.
• عيوب في حرف السكين.
• وجود مساحة كبيرة من الوسط المستعمل في عملية الطمر مثلما يحدث عند عمل قطاعات من وعاء دموي blood vessel، في هذه الحالة يفضل استخدام السكين الماسية diamond knife؛ وذلك لكونها حادة ودقيقة التقطيع.

٧. التحميل Mounting:

بعد الحصول على القطاعات في هيئة شريط متصل يطفو فوق سطح الحوض المائي يبقى تجهيز هذه القطاعات للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ، حيث يتم تحميلها فوق شبكات نحاسية copper grids وذلك إما بوضع الشبكة فوق القطاعات الطافية فوق سطح الماء ثم قلب الشبكة بحيث تكون القطاعات لأعلى، أو بغمر الشبكة تحت القطاعات fishing from below ورفع القطاعات عليها (تستخدم هذه الطريقة في حالة استخدام شبكات خالية من الأفلام الدعامية) وفي كلتا الحالتين يتم وضع الشبكات

وما عليها من قطاعات فوق ورق ترشيح للتخلص من الماء الزائد. ويمكن استخدام شعرة من رمش العين بعد تثبيتها في حامل خاص للمساعدة في تحميل القطاعات على الشبكات.

الشبكات النحاسية التي تحمل عليها القطاعات تتوفر تجارياً وأغلبها تكون ذات قطر طوله 3.05 mm وهو الطول الأنسب لقطر الشبكة. وتوجد أنواع وأشكال مختلفة من الشبكات من حيث عدد ثقوبها وأحجام هذه الثقوب ويتوقف استخدام كل شكل على طبيعة الاستخدام المجهري والعينة المدروسة.

وفيما يلي بعض أنواع الشبكات (شكل ٣٥)

١. شبكات ذات 100 أو 150 ثقب: هذا النوع من الشبكات يصل قطر ثقوبها (منتظمة أو غير منتظمة) إلى 100 µm وهي تناسب فحص العينات الكبيرة نسبياً وخاصة عندما يراد تصويرها.

٢. شبكات ذات 100، 150، 200 ثقب مربع: وغالباً ما تستخدم هذه الشبكات في فحص العينات البيولوجية لما تمتاز به من مدى واسع في مجال الفحص.

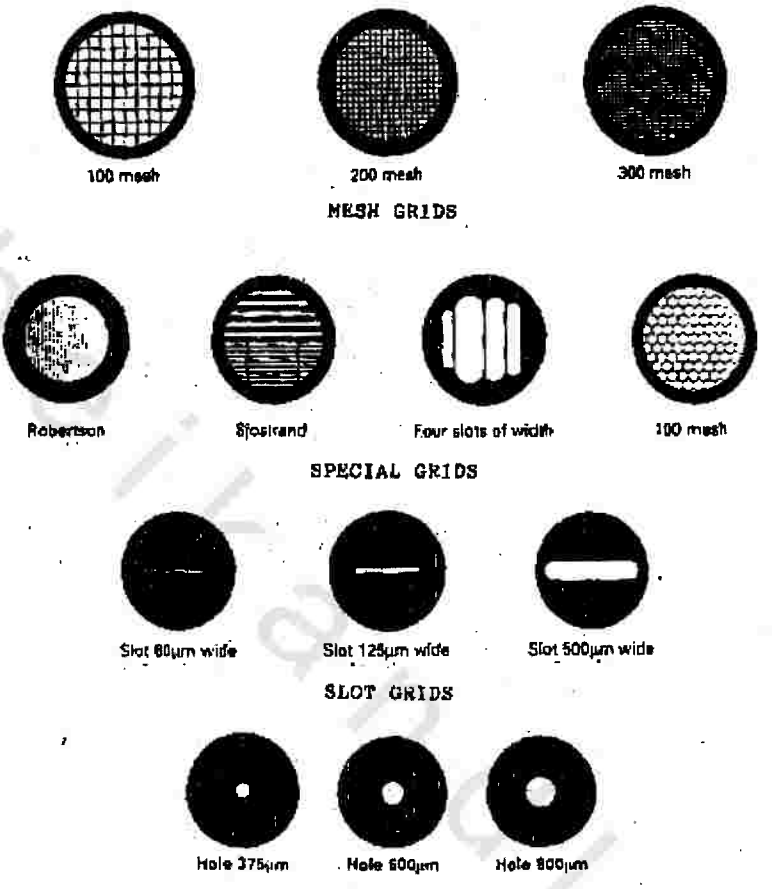
٣. شبكات ذات ثقب واحد: يستعمل هذا النوع في العينات المحضرة بطريقة القوالب، وقد تستخدم في فحص العينات الصغيرة الحجم (مثل الجزيئات) القليلة العدد والتي تستتر في الحدود الكثيفة إذا ما استخدمت الشبكات متعددة الثقوب.

٤. شبكات ذات شقوق: تستخدم هذه الأنواع من الشبكات في فحص العينات البيولوجية الطويلة نسبياً مثل الألياف، كما تستخدم أيضاً في فحص الجزيئات القليلة العدد.

٥. شبكات ذات 300، 400 ثقب: هذه الشبكات تكون مريحة في الاستخدام لأن ثقوبها ضيقة وكثيفة فلا تحتاج إلى عمل فيلم دعامي لها.

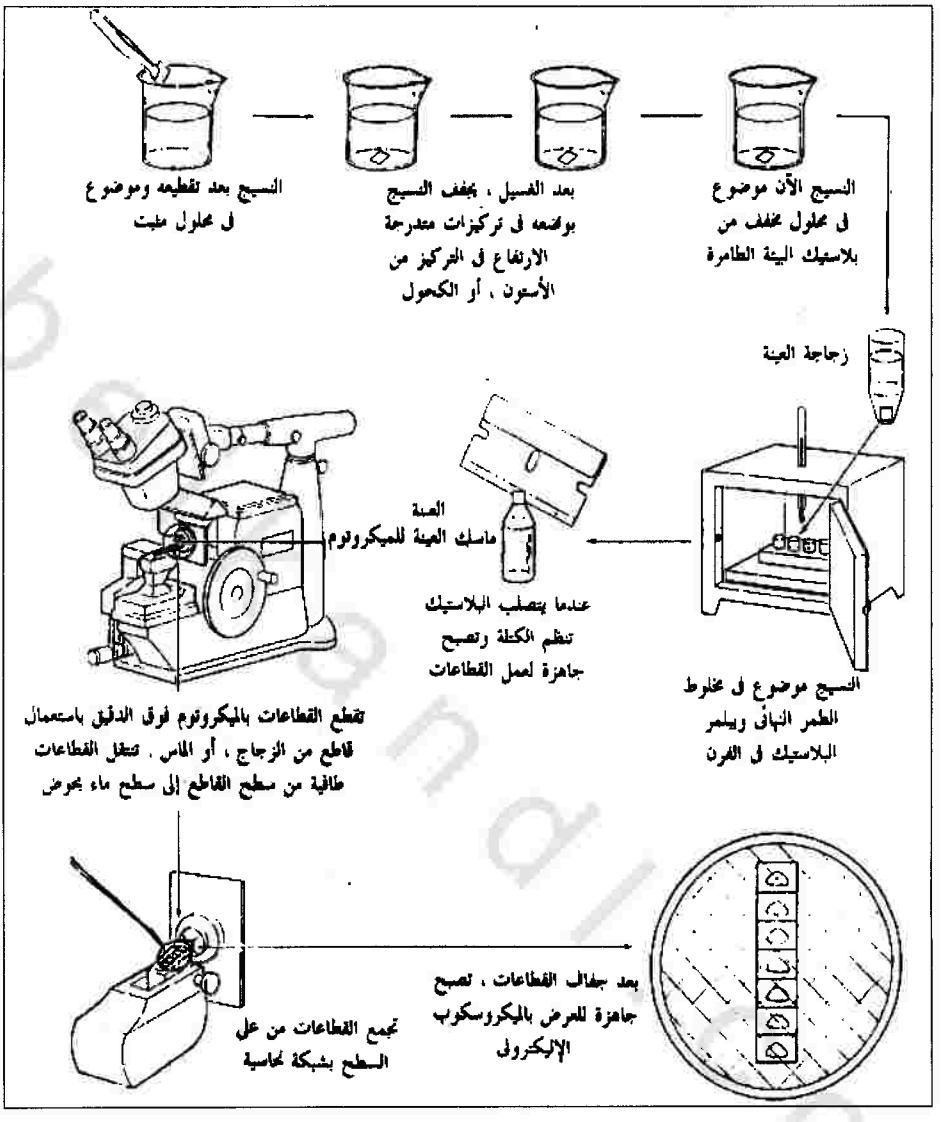
قد تكون العينات المحضرة دقيقة جداً مثل الفيروسات وجزيئات المواد مما يلزم معها عمل أغشية أو أفلام دعامية support films لهذه الشبكات. ومن الأفلام الدعامية التي تستخدم على نطاق واسع أفلام السلويدين celloidin films والفورمفار formvar films والكربون carbon films.

هذه الأفلام يجب أن تكون من الرقة (5-20μm) لتسمح بمرور شعاع الإلكترونات وأن تكون من الثبات لتتحمل هذا السيل من الإلكترونات بدون أي تغير يحدث بها، وأن لا تظهر المواد الداخلة في تركيبها بأي هيئة عند استخدام التكبيرات العالية. ولأن السوليدين والفرمفار مواد عضوية قابلة للتحلل بالألكترونات، يجب أن تغطى الأفلام الدعامية المصنوعة من هذه المواد بطبقة رقيقة من الكربون.



(شكل ٣٥)

أشكال مختلفة للشبكات النحاسية



(شكل ٣٦)

رسم توضيحي لتجهيز العينات وتحضير القطاعات وتحميلها على شبكات الفحص

٨. الصبغ Staining:

آلية عمل الصبغات المستخدمة في تحضيرات المجاهر الضوئية تتمثل في ذوبان الصبغة أو تفاعلها كيميائيا مع مكونات الأنسجة المختلفة حسب درجة الحموضة أو القلوية لكل من الصبغة ومكونات النسيج، مما ينتج عنه التباين contrast في تلوين هذه المكونات organelles بألوان الصبغات المستخدمة التي تختلف في درجة امتصاصها للضوء المرئي. أما في حالة المجاهر الإلكترونية فتكون الصبغات عبارة عن مواد كيميائية ذات أوزان ذرية عالية يزيد وزنها الذري عن 96، وتكون ذات تفاعلات متباينة مع المكونات المختلفة في الخلية ولها القدرة على تشتيت الإلكترونات، فيتكون المنظر النهائي نتيجة التباين في امتصاص وعكس الإلكترونات بواسطة الأجزاء المختلفة في العينة، وتنعكس الإلكترونات بمقدار الاختلاف في سمك وكثافة العينة. ولو أن الإلكترونات المنعكسة من العينة دخلت جميعها في العدسات الإلكترونية فلن يظهر أي فرق بين المناطق التي تعكس الإلكترونات بقدر أكبر من الأخرى؛ ولذلك فإنه يركب فتحات دائرية circular apertures لاستقبال وإخراج الإلكترونات الواسعة الانعكاس، وبالتالي فإن المناطق التي تتسبب في انعكاسها تظهر قاتمة، أما المناطق التي تعكس الإلكترونات بقدر ضئيل فإنها تظهر أقل إعتاماً وتسمى هاتين المنطقتين بالمناطق المعتمة electron opaque، والمناطق التي تسمح بمرور الإلكترونات من خلالها تظهر شفافة وتسمى مناطق شفافة للإلكترونات electron transparent. وعلى ذلك يمكننا القول بأن عكس وامتصاص الإلكترونات يعتمد على سمك وكثافة مكونات العينة.

ولقد وضع العالمان فالنتين Valentine وهورن Horne مواصفات الصبغة الجيدة في النقاط التالية:

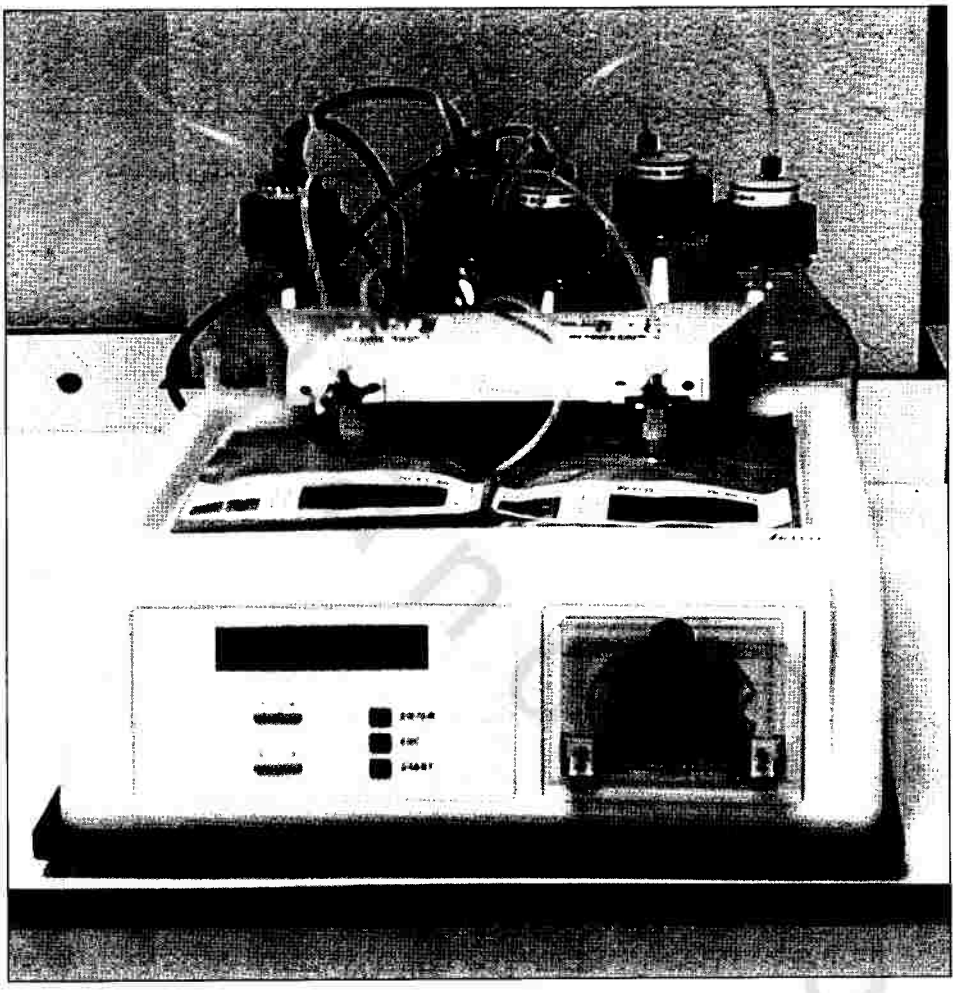
١. يجب أن تتميز الصبغة بكثافة عالية high denisity وذلك للحصول على درجة ثبات عالية.

٢. يجب أن تتميز الصبغة بدرجة ذوبان عالية high dissolving power بحيث لا تقل عن 80gm/100ml.

٣. يجب أن تتميز الصبغة بدرجة غليان boiling point ودرجة انصهار milting point عاليتين، وذلك حتى لا تتأثر بالحرارة الناتجة من الشعاع الإلكتروني.

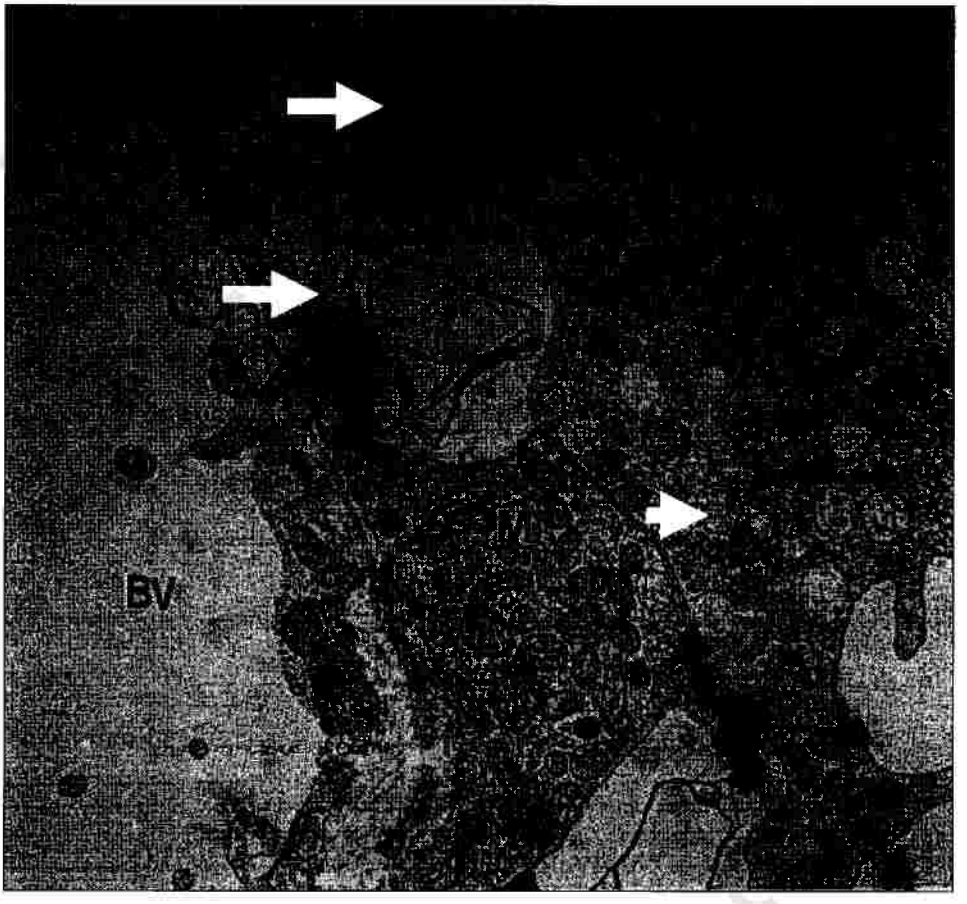
٤. يجب أن يكون راسب الصبغة غير بلوري amorphous في حدود قوة تمييز الجهاز.

ويمكن صبغ العينات staining قبل طمرها في مادة الطمر resin أو بعد عملية التقطيع. ومن أهم الصبغات المستخدمة في صبغ العينات التي تفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ صبغات الرصاص lead stains وصبغات خلات اليورانيل uranyl acetate stain والصبغات المزدوجة double stains، وجميعها تحضر في زجاجات معتمة ويمكن حفظها لمدة ثلاثة أشهر في درجة حرارة الغرفة مع الأخذ في الاعتبار ترشيحها قبل الاستعمال. علماً بأن عملية الصبغ يمكن إجراؤها آلياً باستخدام جهاز خاص يسمى جهاز الصبغ الآلي (شكل٣٣) حيث تمرر فيه العينة بمحاليل الصبغة بطريقة آلية بعد ضبط درجة الحرارة وزمن التمرير في كل محلول.



(شكل ٣٧)

جهاز الصبغ الآلي



(شكل ٣٨)

صورة توضح تأثير الصبغة غير الجيدة على الصورة المتكونة بالمجهر الإلكتروني النافذ (لاحظ ظهور ترسبات للصبغة على الصورة)

أولا : صبغات الرصاص lead stain :

تستخدم هذه الصبغة على نطاق واسع لصبغ القطاعات الرقيقة حيث إنها تنتج تبايناً contrast عالياً في النسيج الذي يصبغ بها وهي تصبغ معظم مكونات الأنسجة والخلايا. ويجب الأخذ في الاعتبار أن هذه الصبغة تتفاعل مع آثار ثاني أكسيد الكربون CO2 مكونة كربونات كالسيوم CaCO3 غير ذائبة؛ ولذلك يجب التخلص من ثاني أكسيد الكربون الموجود في الماء المقطر المستعمل في تحضير الصبغة وذلك بغلي الماء لمدة عشر دقائق.

وتصبغ القطاعات المحملة على الشبكات النحاسية بتعويم الشبكات أو غمرها في نقاط قليلة من محلول الصبغة ولمدة مناسبة، ثم يتم التخلص من الصبغة الزائدة بغمر الشبكات في ماء مقطر سبق غليه أو في محلول مخفف (0.1N) من هيدروكسيد الصوديوم NaOH.

يذكر أن مركبات الرصاص التي تعتبر المكون الرئيسي أو المادة الفعالة active ingredient لهذه الصبغة تكون عبارة عن أحادي أكسيد الرصاص lead monoxide (طريقة كارنوفسكي Karnovsky 1961) أو أملاح رصاص مثل طرطرات الرصاص lead tartrate (طريقة ميلونج Melong method) أو نترات وسترات رصاص lead nitrate and lead cetrate (طريقة رينولد Reynold method1963) أو خلات رصاص lead acetate (طريقة دالتون وزيجل Dalton & Zeigle1960).

ويجب الحذر أثناء استخدام هذه الصبغات لأن مركبات الرصاص سامة جداً.

ثانياً: صبغات خلات اليورانيل Uranyl acetate stains:

تستعمل هذه الصبغة على نطاق واسع لصبغ القطاعات الرقيقة نظراً لإعطائها قوة تبين عالية، ويمكن استخدامها للعينة الكلية أثناء عمليات التثبيت. وهذه الصبغة تصبغ الأحماض النووية nucleic acids والبروتينات proteins.

تحضر صبغات خلات اليورانيل كمحاليل كحولية alcoholic solutions بإذابة خلات اليورانيل في 50% كحول إيثيلي ethanol أو في 30% كحول ميثيلي methanol، أو تحضر كمحاليل مائية aqueous solutions بإذابة خلات اليورانيل في الماء المقطر (1% – 0.5).

يتراوح الزمن اللازم لعملية صبغ القطاعات بخلات اليورانيل الكحولية الذائبة في الكحول الإيثيلي بين 15-30 min عند درجة حرارة الغرفة room temperature، ويتروح بين 10-20 min عند الصبغ بمثيلتها الذائبة في الكحول الميثيلي، بينما يزيد عن نصف ساعة في حالة استخدام خلات اليورانيل المائية. وعموما يمكن تقليل زمن الصبغ برفع درجة الحرارة لتكون بين 40-70 ^{o}c. وتزال الصبغة الزائدة بالمحلول المذاب الصبغة فيه إن كان كحول إيثيلي أو كحول ميثيلي أو ماء مقطر.

ورغم التوفير في الوقت والتباين العالي التي تظهره الصبغة المذابة في الكحول الميثيلي إلا أن هذا الكحول له من القدرة ليذيب الفيلم الدعامي الذي قد يستخدم لتدعيم الشبكات.

يجب الحذر الشديد عند استعمال مركبات اليورانيل لما لليورانيل من خواص إشعاعية وتأثيرات سامة. ولأن هذه المحاليل تتأثر بالضوء فلابد من حفظها في زجاجات معتمة وفي أماكن مظلمة.

ويفضل صبغ العينة الكاملة بخلات اليورانيل بعد عمليات التثبيت المزدوج double fixation بالجلوترالدهيد ورابع أكسيد الأوزميوم علماً بأن هذه الصبغة تعمل على تثبيت الدهون الفوسفورية phospholipids والبروتينات proteins وتجعلها أقل تأثيراً بالكحول خلال عمليات التجفيف. ويمكن تلخيص هذه الطريقة في النقاط التالية:

١. تثبت العينة بطريقة التثبيت المزدوج (سبق شرحها).

٢. تغسل العينة عدة مرات في محلول منظم buffer solution ذات درجة حموضة pH =5.2 لمدة نصف ساعة.

٣. تصبغ العينة بمحلول الصبغة لمدة ساعتين عند درجة 4°c وفي الظلام.

٤. تمرر العينة في الكحول أو الأسيتون ثم تطمر في الراتنج resin.

ثالثاً: الصبغة المزدوجة Double stain:

المقصود بطريقة الصبغة المزدوجة (الثنائية) هو استخدام صبغة خلات اليورانيل لصبغ القطاعات ثم تبعها بصبغة أملاح الرصاص. ومن المعروف أن القطاعات التي تصبغ بهذه الطريقة تظهر أعلى تباين contrast ممكن عما لو استخدمت هذه الصبغات بطريقة فردية، ولذلك يفضل استخدام الصبغة المزدوجة لمعظم التحضيرات التي تفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ.

ويمكن صبغ القطاعات بطريقة الصبغ المزدوج باتباع الخطوات التالية:

١. تحضر صبغة خلات اليورانيل الكحولية وصبغة سترات الرصاص ثم ترشح كل منها.

٢. يحضر طبق بتري نظيف وتوضع فيه ورقة ترشيح مبللة بالكحول لتوفير جو مشبع أثناء عملية الصبغ.

٣. يتم عمل مربع (لوح شمعي) مساحته 25cm تقريباً من مادة شمع الأسنان dental wax ثم نقلة على ورقة الترشيح في الطبق.

٤. تنقل نقاط قليلة من صبغ خلات اليورانيل uranyl acetate (الصبغة الأولى) فوق اللوح الشمعي.

٥. تصبغ القطاعات المحملة على الشبكات وذلك بالتقاط الشبكات بواسطة ملقاط forceps مناسب ثم توضع في الصبغة بحيث تكون القطاعات ملامسة لسطح قطرة الصبغة ولمدة 15 min ، ويجب الانتباه إلى تغطية الطبق أثناء عملية الصبغ.

٦. تلتقط الشبكات بالملقاط ثم تغمس في كحول فترة وجيزة، ثم تغسل برفق بماء مقطر سبق غليه، ومن ثم تجفف بحافة ورق الترشيح.

٧. تصبغ القطاعات بعد ذلك بالصبغة الثانية (صبغة سترات الرصاص lead citrate) بتكرار نفس خطوات الصبغة الأولى. مع الأخذ في الاعتبار النقاط التالية:

- وضع بعض قطع من هيدروكسيد الصوديوم بالقرب من لوح الشمع في الطبق لكي يمتص ثاني أكسيد الكربون من الجو المحيط بالصبغة.
- تبلل ورقة الترشيح بماء مقطر بدلاً من الكحول.
- تكون مدة الصباغة بهذه الصبغة 10 min.

- تلتقط الشبكات بالملقاط وتغسل بالماء المقطر ثم تجمع فوق ورق ترشيح داخل طبق بتري بحيث تكون القطاعات لأعلى.

الصبغ السالب Negative stain:

تستعمل طريقة الصبغ السالب عادة لفحص البكتيريا والفيروسات والمكونات الجزئية الخلوية fractionating cell components مثل الأغشية membranes وبعض العضيات الخلوية cell organelles. وتعرف هذه الطريقة أيضاً بطريقة الفحص المباشر direct observation، وهي من أبسط وأسرع الطرق المستخدمة في صبغ التحضيرات البيولوجية للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ.

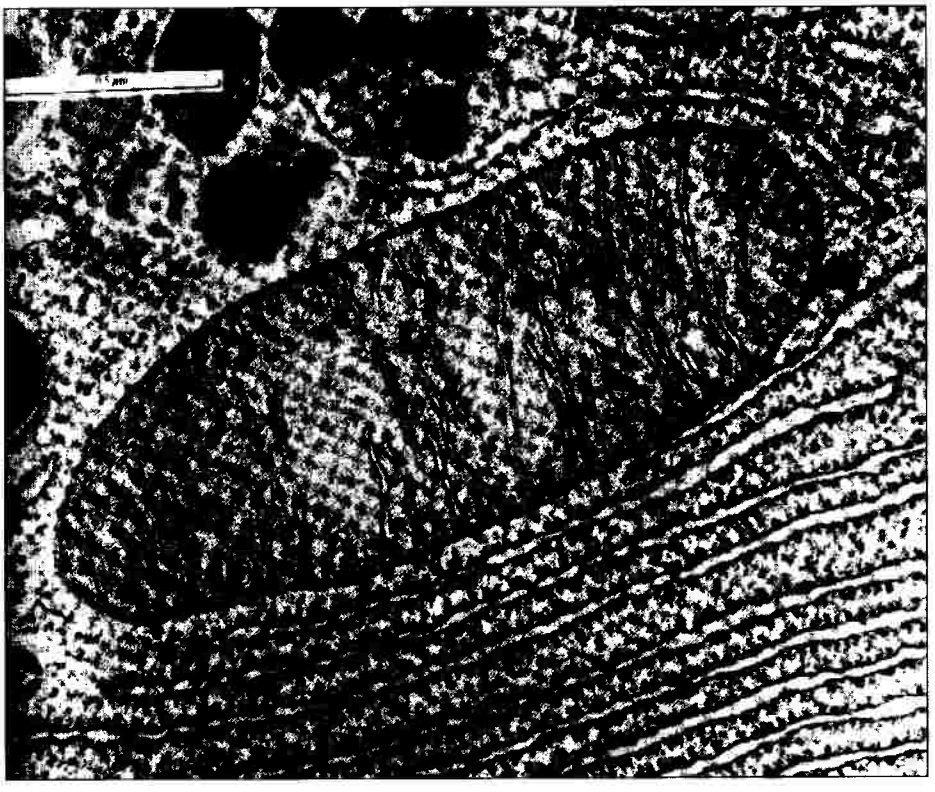
يكون التباين contrast الناتج عن معاملة العينة بالصبغ السالب عكس ذلك الناتج عن المعاملة بالصبغ الموجب (كما في الطرق السابقة). فالصبغ السالب تصبغ في الحقيقة الخلفية back ground الموجود عليها العينة. وعلاوة على توفير الوقت والجهد فإن هذه الصبغة تمتاز أيضاً بقدرتها على اختراق تجاويف السطوح غير الملساء فتظهر التفصيلات الدقيقة لسطوح تلك العينات.

يتم إجراء هذه الطريقة بعمل معلق suspension من العينة في 1% من محلول ملح المعدن الثقيل heavy metal salt solution مثل فوسفوتنجستات البوتاسيوم potassium phosphotungstate أو خلات اليورانيل uranyl acetate، ثم ترش قطرات من معلق العينة على شبكات الفحص النحاسية المغطاة بالكربون carbon coated grids، ثم تجفف بحافة ورق ترشيح وتترك لتجف تماما في الهواء ويفضل في جو مفرغ.

ويمكن استخدام طريق ثانية لصبغ العينات بهذه الصبغ، وذلك بوضع قطرات من معلق العينة على شبكة الفحص، ثم اتباعها بقطرات من محلول الصبغة، ثم تترك لتجف وتحفظ في مكان نظيف حتى تفحص بالمجهر.

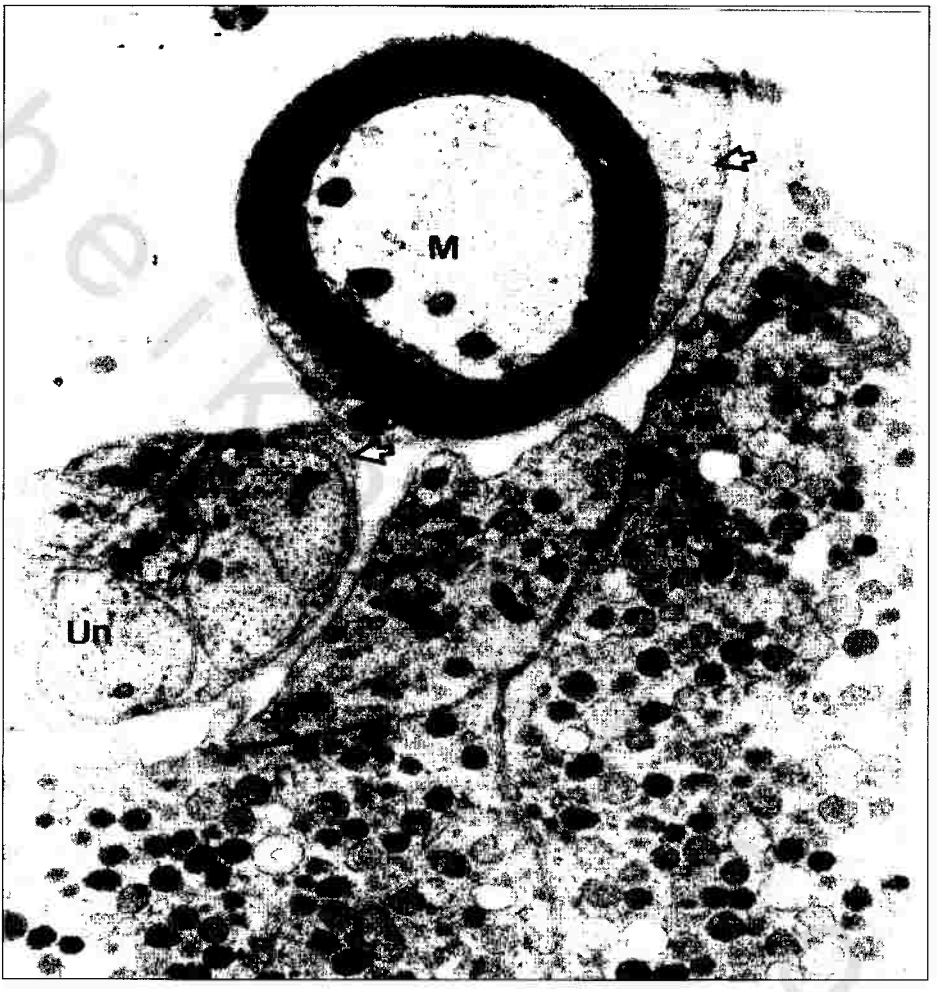
(شكل ٣٩)

صورة لخلية حيوانية ألتقطت بالمجهر الإلكتروني النافذ ويظهر فيها عضيات السيتوبلازم المختلفة الميتوكوندريا (M)، الشبكة الإندوبلازمية (ER)، الريبوسومات (R)، أجسام جولجي (G)، الأجسام المحللة (ليسوسومات) (S)، أجسام عديدة التجاويف (MV)، محور عصبي (AX).



(شكل ٤٠)

صورة بالمجهر الإلكتروني النافذ لجزء من خلية تبين الشبكة الإندوبلازمية ذات السطح الخشن rough endoplasmic reticulum تحمل عليها الريبوسومات ribosomes ويتوسط الصورة ميتوكوندريا كبيرة نسبياً.



(شكل ٤١)

صورة بالمجهر الإلكتروني النافذ لمجموعة ألياف عصبية في لب الغدة الكظرية (فوق الكلوية) في حيوان الخنزير الغيني