تقنية المجهر الإلكتروني

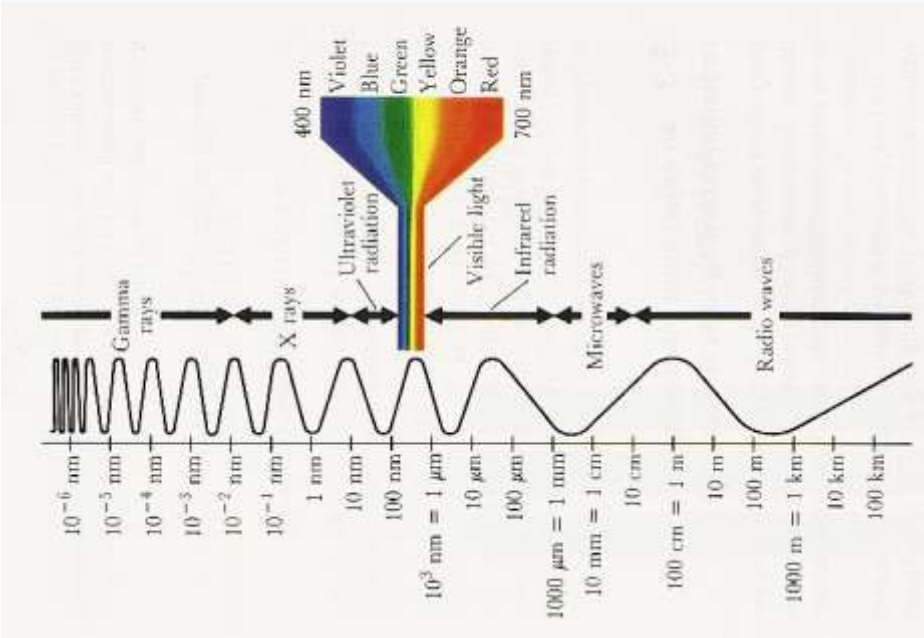
قوة التكبير في المجهر الضوئي تتراوح بين 1000 X للمجهر الضوئي ,25x للمجهر البسيط أو المجهر التشريحي وهي **Magnification power** (**M.P.**) وتساوي حاصل ضرب العينية × الشيئية لذلك مهما بلغت قوة التكبير عند الضوئي فلن تصل إلى أن تعطي تفاصيل واضحة داخل الخلية ومكوناتها خاصة مع الكائنات الدقيقة الحية مثل البكتريا و غيرها وتعتمد قوة التكبير على قوة التمييز و التبيين

قوة التكبير تعرف بإنها النسبة بين حجم الجسم الأصلي الى حجم الصورة ويرمز لها بالرمز X ومقدار التبين يعرف بأنه اقصر مسافة بين جسمين مفصولين بحيث يمكن رؤيتهما بوضوح

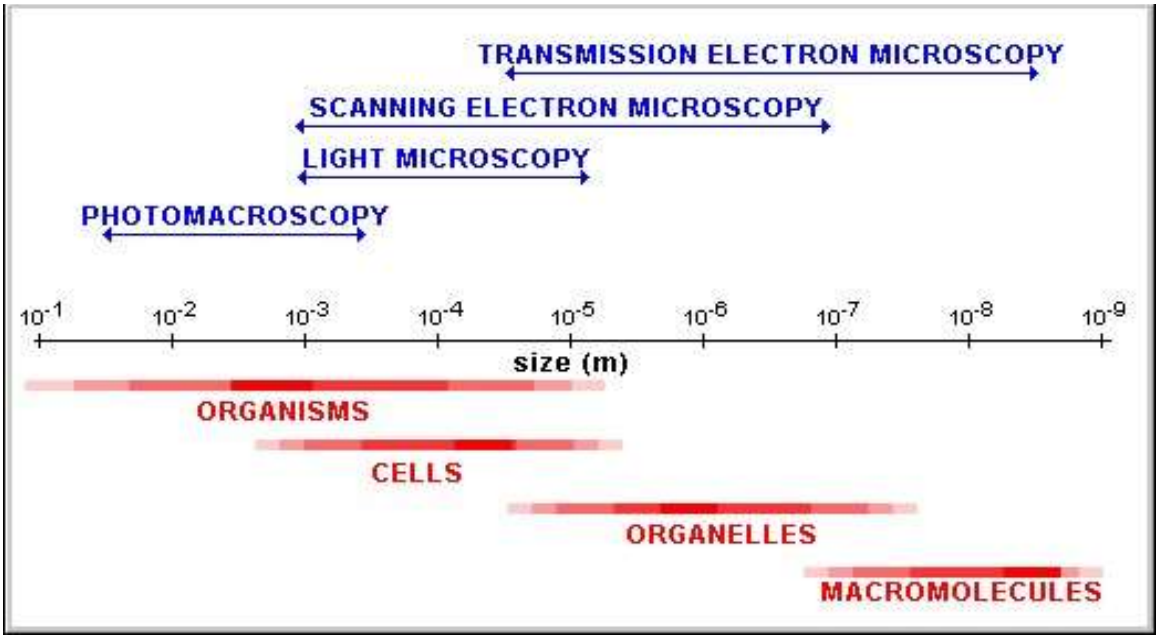
وذلك تعرف بقوة التبيين أو قوة التمييز **Resolution power** (**R.P.**

$$R.P. = \frac{0.64\ \lambda}{N.A}$$

- **N.A. = n (sine α)**
- **n = index of refraction** معامل انكسار الوسط
- **α = half angle of illumination** نصف قطر العدسه الشيئية

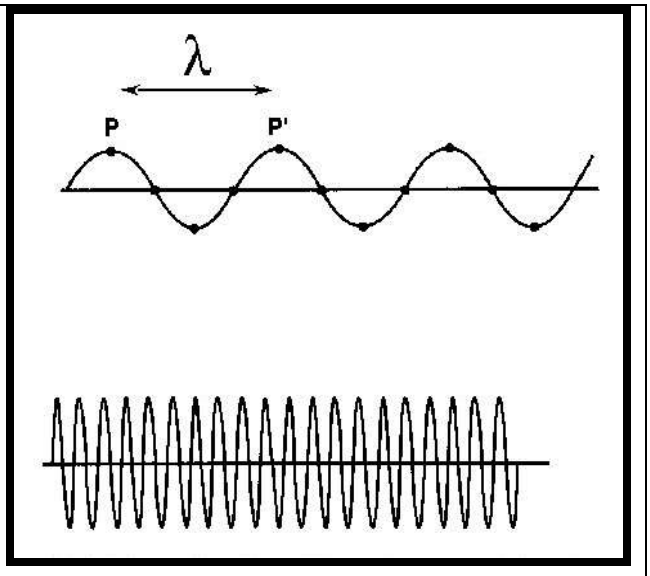


الطول الموجي للموجات بداية موجات أشعة جاما وإنتهاء بموجات الراديو لاحظ الطول الموجي للضوء المنظور.



العلاقة بين مقياس الاشياء والمجاهر المستخدمة

لويس دي براولي 1923



$$\lambda = \frac{h}{mv} \qquad v \text{ is velocity}$$

اول مجهر الكتروني تم تصنيعه عام 1940

ويتركب المجهر الالكتروني من هذه الوحدات الخمس:

1. وحدة الاضاءة
2. وحدة تكوين الصور العدسات
3. غرفة العينات
4. وحدة تفريغ الهواء
5. وحدة تسجيل الصور

.1 Illumination system.

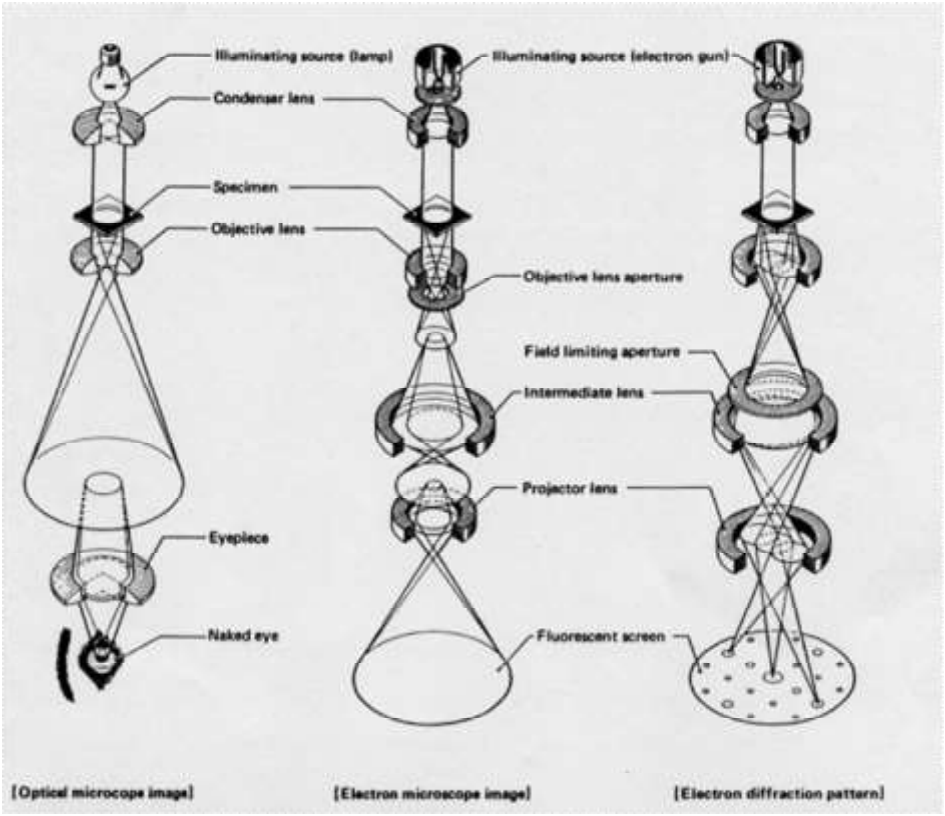
.2 Imaging system.

.3 Specimen stage.

.4 Vacuum pump system.

.5 Image recording system.

مقارنة بين المجهر الالكتروني النفاذ والمجهر الضوئي من حيث التركيب



- **نظام الإضاءة**

يتكون من بيت المهبط Cathodeالذي يوجد أعلى الجهاز (العمود) ويحتوي على:

مدفعه الالكترونات Electron gun التي تحتوي على الفتيل Filament وهي المهبط Cathode وهو على شكل حرف V . المهبط / الفتيل يصنع عادة من سلك معدني يمتاز بسهولة تحرير الالكترونات عند تسخينه (تذكر مبدأ اللمبة عند تسخين سلكها تعطي الضوء) وهذا خاص بمعدن التنجستين حيث يتحمل درجة حرارة تصل إلى أكثر من (3000 درجة مئوية) والذي يتحكم بدرجة الحرارة هو قوة التيار المار فيه عند الاستخدام. فمثلاً في المجال البيولوجي مقدار الفولتية المستخدمة ما بين 1 K eV وحتى30 K eV 30000(– 1000 فو لت) وهناك مجاهر حديثة يصل فيها الفولت حتى مليون فولت .

نظام تكوين الصورة العدسات:

يتكون المجهر الالكتروني النفاذ من أربع عدسات إلكترونية

تعمل على تكوين الصورة المكبرة والعدسات هي:

العدسة المكثفة 1– Objective lens (O.L.)

العدسة الشيئية 2– Projector lens (P.L.)

العدسة المتوسطة 3– Intermediate lens (I.L.)

4-العدسة العارضة Condenser lens (C.L.)

تصنع كل عدسة من معدن قابل للتمغنط وتتكون من:- ملف كهربائي :

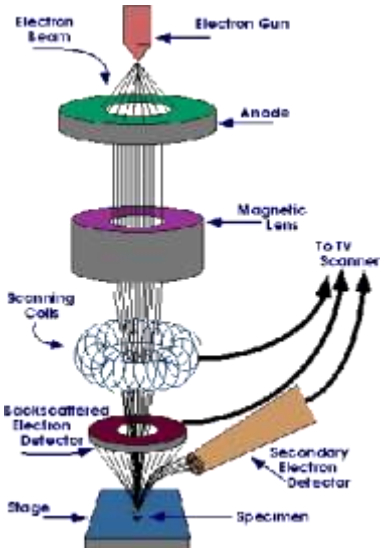
وهو عبارة عن سلك ملفوف آلاف المرات يشبه الأنبوب ويمر فيه تيار كهربائي تصل قوته إلى واحد أمبير و المجال المغناطيسي الناتج من مرور التيار الكهربائي يركز بواسطة محفظة حديدية ناعمة تحيط بهذه اللفات ويساعد في تركيز هذه الحزم الالكترونية قطع من الحديد تعرف بالقطع القطبية وهما:

قطعتين إحداهما عليا يمكن تحريكها والسفلى مبرومة في علبة العدسة ويعتمد البعد البؤري للعدسة الالكترونية على قوة التيار الكهربائي الذي يصل لهذه القطع ويمكن أن نغير البعد البؤري بتغيير شدة التيار وغالباً يصل البعد البؤري للعدسات الالكتر ونية إلى عدة ملليمترات (3-5mm) .

المجهر الالكتروني الماسح:

الفرق بين المجهر الالكتروني الماسح والمجهر الالكتروني النفاذ

1. يشبة العمود ذلك الموجود في المجهر النافذ
2. يحتوي على المواد المنتجة لأشعة الإلكترونات فقط والمستعملة لمسح العينة المراد فحصها
3. تتمثل هذة المواد في بندقية الالكترونات المندفعه كما في المجهر النافذ.
4. كذلك وجود العدسات المكثفة التي تعمل على تكوين حزمة ضيقة من الإلكترونات
5. يصل القطر الحقيقي لبقعة المسح حوالي 5nm
6. ومجموعة من الملفات الحارفة مع دائرة تتسبب في جعل الشعاع يمسح العينة
7. عمود المجهر الماسح مفرغ تماما أم مسرح العينة وملحقاته من أجهزة وإمالة العينة فتوجد عند قاعدة العمود من المجهر.



المجهر الالكتروني الماسح وتحليل العناصر بأشعة X

المجهر الالكتروني الماسح

خطوات معالجة العينة كيميائيا لتحضيرها للفحص بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح

Obtaining the specimen	الحصول على العينة
Primary Fixation G 2.5 %	التثبيت الاولي محلول الجلترالدهيد تركيز 5.2 %
Washing with Buffer Soln.	الغسيل بالمحلول المنظم
Secondary Fixation OsO4 1%	التثبيت الثانوي محلول رابع اكسيد الاوزميوم
Washing with Buffer Soln.	الغسيل بالمحلول المنظم
Dehydration	نزع الماء
Clearing with Probalen Oxide	التخلص من آثار المادة المستخدمة في نزع الماء
Critical Point drying	التجفيف بالنقطة الحرجة
Specimen stubs	التحميل على الحوامل العينات
Specimen Sputtering	الطلاء باستخدام معدن ثقيل
Specimen Examination	الفحص

التثبيت Fixation

- يكون على مرحلتين المثبت الأول **Primary Fixation** بمحلول الجلتر الدهيد 2%. **5Buffered glutraaldhyd** عند درجة حرارة الغرفة لمد 2–3 ساعات – أو ليلة كاملة في الثلاجة وهو مهم في تثبيت مادة **glycogen & protein** في النسيج والخلايا.
- المثبت الثانوي **Secondary Fixation** باستخدام رابع اكسيد الأوزميوم OsO_4 1% عند درجة حرارة الغرفة وهو مهم في تثبيت المادة الدهنية **Lipid** في النسيج والخلايا يزيد من عملية التوصيل الكهربائي بين العينة وشعا ع الحزم الإلكترونية وذلك يؤدي إلى زيادة التباين بسبب زيادة التوصيل الكهربائي.

أهمية التثبيت العامة :

- الحفاظ على العينة من التفتت والتفسخ.
- الحفاظ على العينة من التحلل الذاتي بفعل الإنزيمات والبكتيريا .
- إعطاء العينة شئ من الصلابة والقسوة وتحويل محتوى النسيج السائل إلى صلب .
- حماية النسيج من عيوب الانكماش .
- يعمل كوسيط بين المثبتات والكحول .
- بقاء النسيج على طبيعتة وحالته في مصدرة .

عوامل هامة تؤثر على التثبيت

- تركيز المثبت الأولي قبل أخذ العينة
- حجم العينة (تكون صغيرة)
- سرعة نقل العينة من مصدرها
- مدة التثبيت يجب أن تتناسب مع حجم العينة
- كمية التثبيت
- جودة المثبت (جديد – قديم – متأكسد أم لا – بدون لون – أصفر – أسود)
- نوع المحلول المنظم
- درجة الحموضة
- الإسموزية

غسيل العينات Washing

غسيل العينة بين المثبتات وبعدها أمر هام حيث بقائه أو آثاره لفتر ة طويلة يؤثر على النسيج وكذلك قد تتغلغل مكونات المثبت مع المادة التي تليها فينتج عن هذا التفاعل تغيرات في مكونات النسيج والخلية ويكون الغسيل بإستخدام المحلول المنظم المستخدم في تحضير المثبتات.

نزع الماء dehydration

- عملية نزع الماء من العينة
- هي عملية التخلص من جزيئات الماء H_2O من النسيج والخلايا الحيوانية والنباتية وذلك بواسطة احد انواع الكحولات فقط الميثانول أوالإيثانول أو بواسطة مادة الاسيتون بشرط التدرج بالتركيز من الأقل للأعلى وحسب الجدول التالي كلما زاد وقت تعرض العينة لمادة نزع الماء كلما قلت مدة نزع الماء كلما زادت سلبية الانكماش

حلول الفترة	عدد المرات	تركيز الكحول المستخدم
10 MIN	1X	25% ETHANOL
10 MIN	1X	50% ETHANOL
10 MIN	1X	75% ETHANOL
10 MIN	1X	90% ETHANOL
10 MIN	2X	100% ETHANOL

عوامل هامة لعملية نزع الماء

1. التدرج الخفيف تعريض العينة للكحولات والبداية من 25% للعينة الحيوانية بل في بعض عينات النباتات نبدأ من 5% ثم 10% وحتى 100% حيث ان مكونات السيتوبلازم لها القابلية للانفصال عن خدران الخلية وكذلك عدم التدرج قد يؤدي الى الإنكماش والتشوه للخلية
2. التتابع– الالتزام بالترتيب
3. الاستقرار على احد الكحولات الذي يتم تحضيره مع الماء المقطر

4. الوقت والفترة (تعتمد علي نوع العينة) الخلايا← أقل وقت بينما الانسجة (كبيرة– طرية– قاسية) اكثر وقت.

التجفيف باستخدام مجفف النقطة الحرجة Critical Point Drying

جهاز

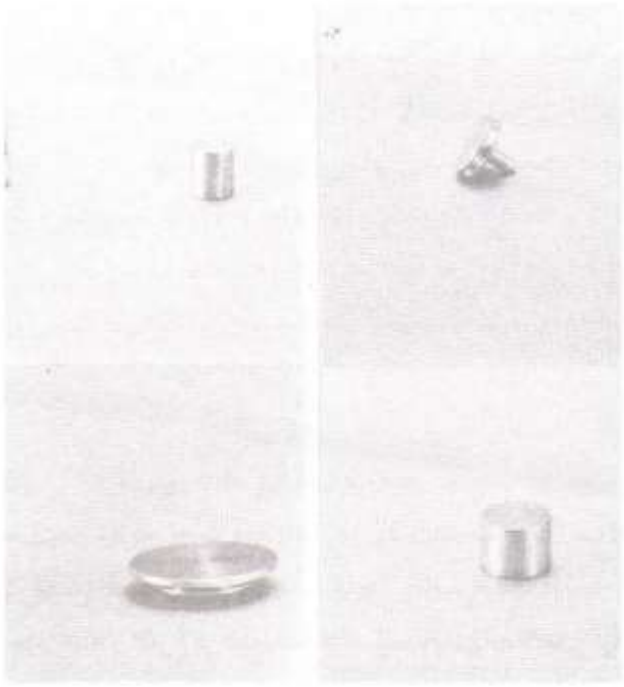
مجفف النقطة الحرجة

التجفيف عن طريق جهاز مجفف النقطة الحرجة ذو ضغط عالي وغاز Co وأيثانول . وهذا يسمى التجفيف النهائي أى أنها بعد مرورها عبر التراكيز الكحولية لابد أن تكون فيها كمبة من الماء . لذا نضيفها في هذا الجهاز ليمتص جميع جزيئات الماء وهذة الطريقة تسمى (طريقة التجفيف بالنقطة الحرجة) ويمكن الإستعاضة عن هذا الجهاز بإستخدام مادة تسمى HMDS وهي مادة تجفيف عالية تكافئ 60–70% من جهاز النقطة الحرجة لكن هذة المادة مسرطنة وخطورة عالية وسريعة التطاير ولكن تجفيفها قوى بالنسبة للباحث .

توضع هذة المادة في العينة لمد نصف ساعة حيث يضاف كمية 1– 2 مل إلى العينة ثم نأخذ العينة وتجفف في الهواء بعد التخلص منها.

التحميل على الحوامل:

يتم تحميل العينة على الحامل المناسب تبعا لحجم العينة باستخدام الشريط الكربوني اللاصق



مجموعة

من الحوامل الخاصة بالمجهر الالكتروني الماسح

التغطية Sputtering :

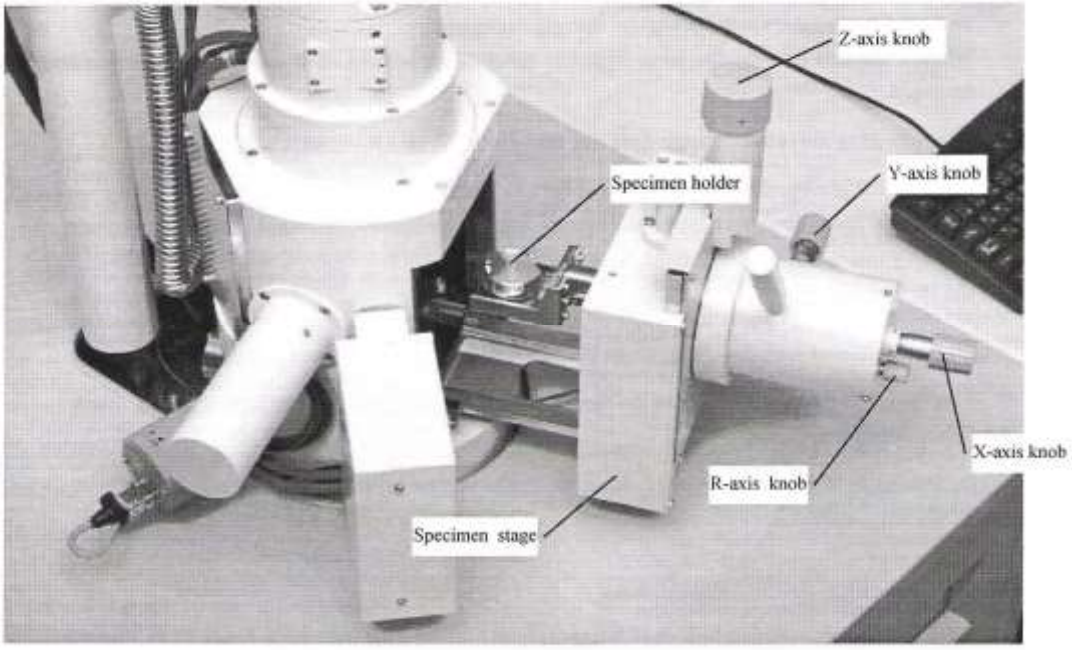
وتسمى **Coating** وهي تغطية العينات بجزيئات من مادة تساعد في عملية التصوير وهذة التغطي ة ت تم ع ن طري ق إس تخدام م ادة ال ذهب **Gold** ← للجزيئ ات الكبي رة أو البلات ين

Platinum ← للجزيئات الصغيرة أو الكربون **Carbon** ← للتكبير العالي.

جهاز

الطلاء بالمعدن الثقيل

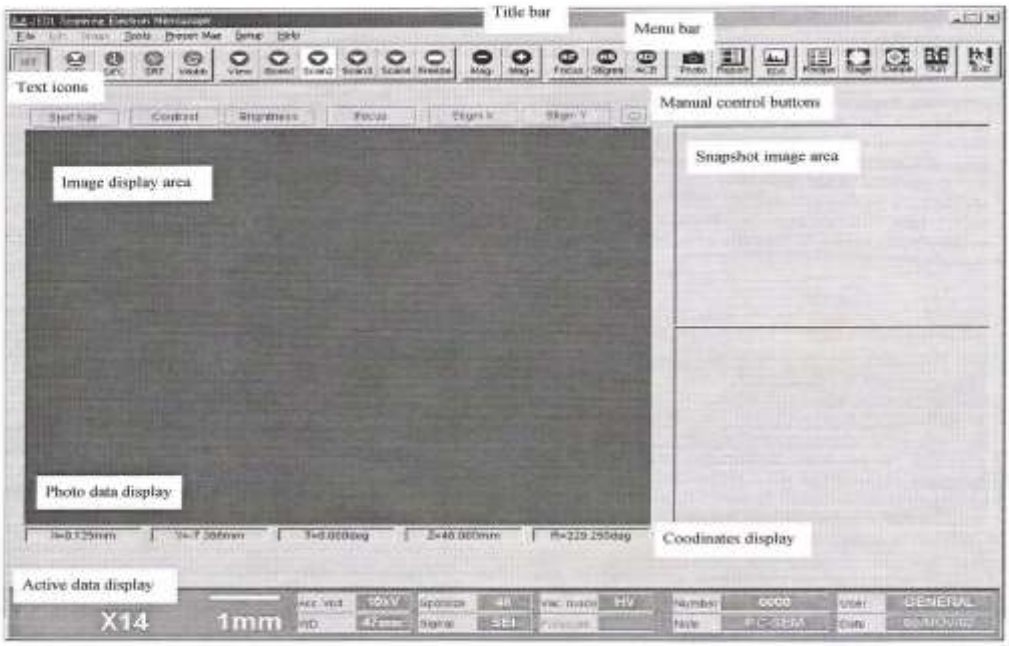
وضع العينة للفحص تحت المجهر



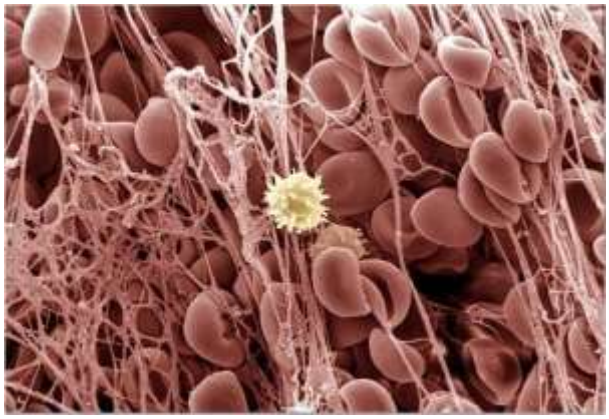
وضع العينة للفحص تحت المجهر

3.1 GUI layout

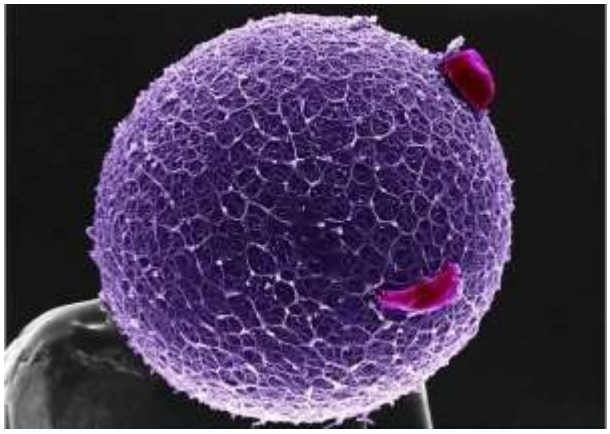
GUI (Graphical User Interface) is layouted as followings:



البرنامج الخاص بالفحص تحت المجهر الالكتروني



خلايا الدم



بويضة المرأة

النملة

الفراشة

المجهر الالكتروني النفاذ

خطوات معالجة العينة كيميائيا لتحضيرها للفحص بواسطة المجهر الإلكتروني النفاذ

Obtaining the specimen	الحصول على العينة
Primary Fixation G 2.5 %	التثبيت الاولي محلول الجلترالدهيد تركيز 5.2 %
Washing with Buffer Soln.	الغسيل بالمحلول المنظم
Secondary Fixation OsO4 1%	التثبيت الثانوي محلول رابع اكسيد الاوزميوم
Washing with Buffer Soln.	الغسيل بالمحلول المنظم
Dehydration	نزع الماء
Clearing with Probalen Oxide	التخلص من آثار المادة المستخدمة في نزع الماء
Impregnation or Infiltration	التخلل
Embedding	الطمر
Trimming	التشذيب
Thick Section	القطع السميك
Thin Section	القطع الدقيق
Cu Grid mounting	التحميل على الشبكات النحاسية
Staining	الصبغ
Specimen Examination	الفحص

التثبيت المضاعف:

حاليا لا يستخدم رابع اكسيد الأوزميوم كمثبت لوحدة لعينات المجهر الألكتروني بل يستخدم معه مثبت اخر لذلك تعتبر عملية التثبيت مضاعفة حيث يستخدم مثبتين الأول الجلوترألدهيد والثاني رابع اكسيد الأوزميوم. يقوم الجلوترألدهيد بتثبيت البروتينات للخلية بينما رابع اكسيد الأوزميوم يثبت الدهون المتعادلة والفسفورية ، بينما مثبت البرمنجنات(البوتاسيوم) تستخدم لتثبيت العينات النباتية فهي مادة تؤكسد تشبه رابع اكسيد الأزميوم لكنها تؤثر على الأنسجة بشكل مختلف وتعمل على تحطيم الحمض النووى الريبوزي والهستونات ،كما انها تذيب بعض البروتينات ،وتتاثر العينات المثبته بالبرمنجنات بالكحولات عند نزع الماء فيما بعد حاليا استبدلت بمثبتيا الجلوترألدهيد و رابع أكسيدالأوزميوم.

.1 (Buffered Aldehyde consists of 2.5 % glutaraldhyde in a Buffer Soln. as following:

- 40 ml of D. water.
- 10 ml of 25% glutaraldhyde.
- 50 ml of 0.2 M Buffer stock solution at 7.2 pH.

.2 POST FIXING IT IN OSMIUM TETROXIDE FOR 1 HOUR:

- $2OsO_4$ is used as post fixing after aldehyde fixation prepare 2% aqueous solution (1 g of OsO_4 in 50 ml D. water) a working fixative is prepared just before use by mixing equal parts of 2% aqueous stock OsO_4solution with an equal parts of 0.2M Buffer stock solution.

المحاليل المنظمة Buffer Solutions

المحاليل المنظمة هي التي تمتزج مع المثبتات للمجهر الإلكتروني وتشمل:

منظمات فوسفاتية : Phosphate Buffers

شائع الإستعمال لكلا المثبتات رابع أكسيد الأوزميوم و الألدهيدات ويعرف بالمحلول الفسيولوجي نظرا لوجوده في الأعضاء الحية ،وليس له تأثير سمي يمتاز بأن قوته التعددية عند الأس الهيدروجيني7.2 الى .PH. 7.4

0.2 M BUFFER STOCK SOLUTION AT 7.2 PH CONSISTS OF:

- 28 ml of Monobasic sodium phosphate (2.76 g of $NaH_2PO_4.H_2O$ in 100 ml water)
- 72 ml of dibasic sodium phosphate (7.17 g of $Na_2HPO_4.12H_2O$ in 100 ml water).

منظم الكاكوديلات Cacodylate Buffer لقد استعمل سباتيني وزملاؤه محلول الكاكوديلات الصوديوم المنظم منذ 1963م كمحلول منظم لمثبت الجلوترألدهيد ،لكن هذا المحلول يتأثر بكل من رابع أكسيد الأوزميوم والألدهيد ، ومع هذا يعتبر أفضل من محلول الفوسفات المنظم .ويناسب أنسجة معينة.

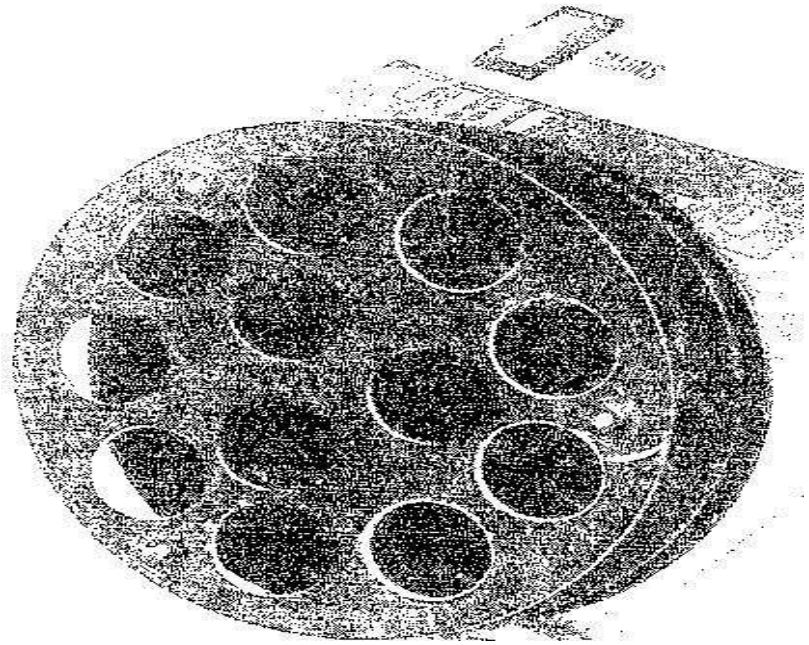
0.2 M BUFFER STOCK SOLUTION AT 7.2 PH CONSISTS OF:

- 91.6 ml of Sodium cacodylate solution (4.28 g/100 mL distilled water),
- 8.4 ml of 0.2 *N* HCl (1.7 mL concentrated HCl/100 mL distilled water).

ثانيا: نزع الماء والطمر للمجهر الإلكتروني Dehydration and Embeding for EM

للحصول على قطاعات رقيقة جدا للمجهر الإلكتروني لابد أن تتخلل مواد الطمر إلى داخل النسيج ،ومواد الطمر لا تمتزج مع الماء لذا لابد من نزع الماء من العينات ويستخدم الأسيتون او الكحول الأيثلي لنزع الماء من العينات .ولان الكحول مذيب للدهون لابد من سرعة تمرير العينات فيه بسرعة تمرر العينات بعد التثبيت في تراكيز تصاعدية متدرجة من الكحولات(25-50-75-90-100%- 100%) ولمدة 10 دقيقة لكل تغيير إذا كانت مادة الطمر تمتزج مع الكحول لا مانع من نقلها إليها و إن كانت لا تمتزج فإ ا تنقل الى مادة الأبوكسي بروبان للتخليل(Epoxy propane) ولمدة نصف ساعة. ثم تنقل العينات إلى مزيج 1:1من مادة الأبوكسي بروبان ومادة الطمر الراتنج(Resin) 4-6ساعات بعدها تنقل إلى مادة راتنج نقية ويترك ليلة كاملة على جهاز التحريك.ثم تنقل العينات الى الكبسولات التي سوف تطمر ا ويصب عليها مادة الطمر الراتنج.

تنقل العينات المطمورة الى الفرن م40مْ لمدة 24 ساعة حتى تتبلمر الراتنج او تتصلب .



جهاز التحريك Rotator

تستخدم مواد الطمر للمجهر الإلكتروني بحيث يمكن تقطيعها إلى قطاعات رقيقة جدا(100نانومتر (1.0ميكرون) والتي لا تتوفر في مواد الطمر العادية للمجهر الضوئي

مواد الطمر للمجهر الإلكتروني تشمل:

مادة الميثا أكرليت: Methaacrylate

- **من أولى المواد التي استخدمت للطمر للمجهر الإلكتروني ، تعمل على انكماش النسيج ، وكثرة الفقاعات الهوائية المتكونه حول العينة المطمورة، كما أن القطاعات يحصل لها تكسر نتيجة لتأثرها بالحرارة عند فحصها بالمجهر الإلكتروني.**

راتنجات الأبوكسي Epoxy Resin

- لقد وصف جلاارت(**Glauert**) **1958**م مادة الأرالديت(**Araldite**) كمادة طمر.
- ثم وصف كل من كوشيدا **1959** وفينك **1960** مادة الأيبون كماد مناسبة للطمر
- فأصبح الأرالديت والأيبون هما مادتي الطمر الروتينية في عمليات المجهر الإلكتروني.
- كما وصف العالم سبر **1969**م راتنجات سبر يتميز بلزوجة منخفضة وسرعة نفاذ عالية لكنة سريع التطاير وسام جدا.

راتنجات عديد الاستر: **Polyester Resins**

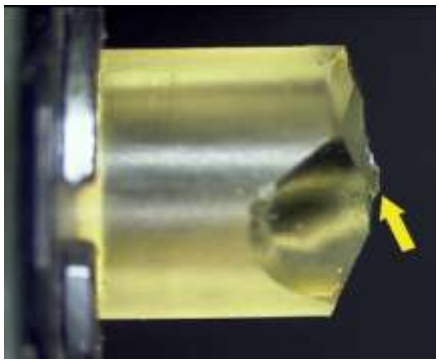
- تماثل الرتنجات الأبوكسي لكنها صعبة التقطيع وبعض مكوناتها قصيرة العمر.

البلوك

بعد اتمام عملية الطمر

تشذيب العينة : **Trimming the block**

يزود جهاز التقطيع بماسك للعينة (**Chuck**) تثبت به يتم تشذيب مادة الطمر من حول العينة وترك اقل كمية ممكنة حولها لإبراز العينة للتقطيع. حاليا يمكن استخدام جهاز التشذيب للعينات(**LKB Trimmer**للتشذيب الأولي أما التشذيب النهائي فيتم باليد وبشفرات جديدة حادة تحت المجهر لجهاز التقطيع.



جهاز التشذيب

التقطيع Sectioning

أولا القطع السميك ويتم باستخدام السكاكين الزجاجية

السكاكين::**Knives**

في البداية كانت تستخدم السكاكين الفولاذية **Steel knives** التي تستخدم للمجهر الضوئي ثم استبدلت بالسكاكين الزجاجية والماسية ، والزجاجية هي الشائعة لسهولة الصناعة ورخص الثمن.

الموصفات الخاصة بالسكاكين المجهر الإلكتروني:

يجب ان يكون نصف قطر حافتها المستعمل للقطع أصغر من سمك أرق قطاع مطلوب ، ان تكون صلبة بدرجة كافية لقطع العينات الصلبة، أن تكون مصنعة من مادة نقية بحيث تكون حافة القطع متجانسة في جميع اجزائها ،أن تكون مقاومتها للتأكل الكيميائي عالية.

طريقة عمل السكاكين الزجاجية

يقطع قضيب الزجاج الى مربعات صغيرة ثم كل مربع يقطع قطريا إلى مثلثين كل مثلث عبارة عن سكين ذات حافة واحدة فقط تصلح للتقطيع ، حافة القطع يجب ان تكون مستقيمة ومتساوية وسطحا المقابل للعينة ناعما جزا من حافة القطع يكون صالحا للتقطيع بينما الباقي يكون مشرشرا ، الجزء الصالح غالبا يكون على يسار السكين عند وضعها في ماسك جهاز القطع. يحبذ وضع السكين في جهاز التقطيع بشكل مائل بزاوية(5د) لمحاولة تجنب لمس العينة لحافة السكين الخلفية.

جهاز صنع السكاكين الزجاجية والسكاكين الزجاجية

جهاز القطع السميك والدقيق. **Ultra Microtome**

صعوبات التقطيع: 1- Difficulties in sectioning

صعوبة الحصول على قطاعات رقيقة:

أ- العينة ربما كبيرة الحجم أو تحتوي على نسيج صلب جدا ب- السكين رديئة أو تحتاج الى توجيه مكاني

ج- خلل في جهاز القطع وإحكام ربط ماسك العينة وماسك السكين.

2- اختلاف في سمك القطاعات:

أ- غالبا خلل في جهاز القطع أو ارتفاع في درجة حرارة للجهاز أو أي اهتزاز.

ب- يجب تفادي اشعة اللهب أو الشمس.

ج- السكين غير حادة.

3- حدوث بعض الخدوش على القطاعات عند الزاوية اليمنى لحافة السكين أ- حافة القطع في السكين غير جيدة

ب-أو الزاوية بجهاز القطع للسكاكين غير سليمة تماما.

صبغ القطاعات البلاستيكية السميكة:

من الضروري عمل بعض القطاعات السميكة للعينات المعدة للمجهر الإلكتروني لكي تفحص بالمجهر الضوئي مما تسهل عملية المتابعة والفحص بالمجهر الالكتروني و هناك عدة طرق لصبغ مثل هذه القطاعات البلاستيكية السميكة:

1- تنقل القطاعات إلى قطرة من 20% استون على شريحة زجاجية

2- تسخن بلطف على صفيحة ساخنة او على لهب هادئ لبسط القطاعات ولتجف

3- تغمر القطاعات في محلول صبغة أزرق الميثلين او ازرق التلوين لمدة 30 ثانية الى 2 د. ثم تسخن بلطف

4-ثم تغسل الشرائح بالماء المقطر ثم تجفف في مكان دافئ.

5- تطمر القطاعات بقطرة من مادة الطمر البلاستيكية ثم تغطى بغطاء الشريحة

5- ثم بعد أن تجف تفحص بواسطة المجهر الضوئي لمعرفة تركيب أجراء القطاع ليسهل دراسته بالمجهر الإلكتروني .

معاملة القطاعات في الحوض المائي:

- عند عمل القطاعات تلتف بعض القطاعات ولفردها يمكن وضعها في حمام مائي دافئ
- او إضافة قطرة من الأسيتون للحوض المائي
- أو وضع طرف ورقة ترشيح مغموسة في الكلوروفورم فوق حوض المائي الذي فيه القطاعات تعمل على تمددها.

الشبكات النحاسية:

الشبكات هي لتحميل العينات للمجهر الإلكتروني فهي تماثل الشرائح الزجاجية بالنسبة للمجهر الضوئي توجد عدة أشكال للشبكات على حسب الإستعمال المجهري وطبيعة العينة وغالبا ما تكون الشبكات مصنوعة من النحاس وأحيانا من المولبيدينوم أو البلاتين عندما يلزم تسخين العينية المفحوصة أو معاملتها بمواد كيميائية أنواع الشبكات:

أ- الشبكة ذات 100-150 فتحة غير المنتظمة : يصل قطر ثقوبها إلى 100 ميكرون وفتحتها غير منتظمة وتستخدم لفحص العينات الكبيرة عندما يراد تصويرها.

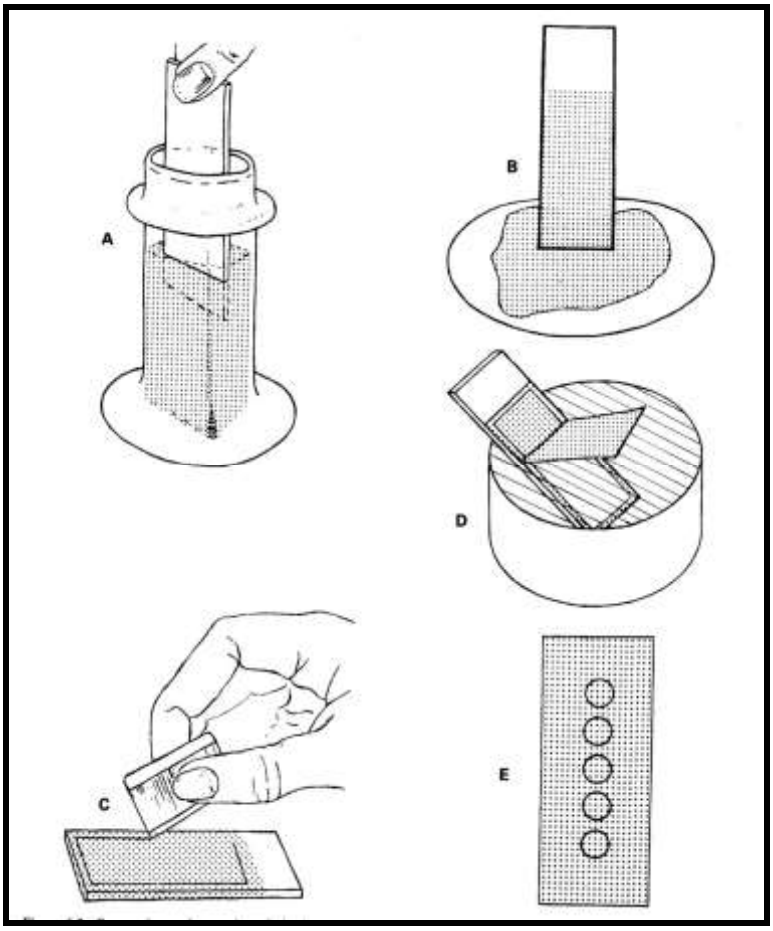
ب- الشبكات ذات 100-150 فتحة منتظمة : تمتاز بتنظيم توزيع ثقوبها وتسهل فحص العينة والحصول على اكبر حقل لتصوير العينية

ج- الشبكات مربعة الثقوب : بها 100-200 ثقب مربع وهي الأكثر استخدما.

تحميل القطاعات على الشبكات النحاسية:

- لتحميل القطاعات العائمة في الحوض المائي للسكين
- تقرب القطاعات من بعضها بمساعدة فرشاة مكونة من شعرة واحدة تؤخذ عادة من رمش العين وتثبت بعود اسنان رقيق .
- بعدها يمكن إلتقاط القطاعات من حوض الماء كالأتي:
- غمر الشبكة تحت القطاعات في الماء ثم رفعها. ثم وضع الشبكات على ورقة ترشيح
- أو بوضع الشبكة فوق القطاعات ثم قلبها
- ثم وضع الشبكات على ورقة ترشيح للتجفيف موضوعة في طبق بتري.

انه من الضروري استخدام أغشية داعمة للشبكات خاصة للعينات الدقيقة جدا ، هذه الأغشية لابد وان تكون رقيقة بحيث تسمح بمرور شعاع الإلكترونات.، كذلك لا بد أن تكون مقاومة لمدفع الإلكترونات .كما انه لا بد من عدم ظهور للمواد الداخلة في صناعتها عند الفحص بالتكبيرات العالية. من المواد الشائعة الإستعمال لعمل أغشية دعامية رقيقة سمكها يتراوح 5-20 ميكرون من مادة السلودين(**Colloidin**) والفورمفار (**Formvar**) والكربون وغيرها . اغشية السلودين والفورمفار لا تفي بالأغرض المذكور سابقا لأنها مواد عضوية تتحلل بواسطة مدفع الإلكترونات، لذا يستخدم الكربون غالبا.



هناك عدة طرق للإعداد الأفلام بطريقة التجفيف

طريقة الغمر Immersion method

تملأ أنبوبة زجاجية ذات فوهة واسعة بمحلول 1.0–5.0 % سلودين ، تغمر شريحة زجاجية نظيفة جدا رأسيا في هذا المحلول ثم تسحب من المحلول بلطف ، سوف يصبح جانبي الشريحة الزجاجية مغطيان بالسلودين . اقطع عند الحواف الشريحة بواسطة شفرة حادة ، ثم اغمر هذه الشريحة بوضع مائل 30° في طبق بتري يحتوى على ماء مقطر وعندها سوف يطفو الفيلم من على الشريحة ويصبح عائما على سطح الماء.

ملاحظة: أحيانا يكون الفيلم رقيقا تصعب رؤيته لذا يفضل وضع مصدر إضاءة بالقرب من الفيلم لكي ينعكس الضوء من ثم تسهل رؤيته. إذا كان الفيلم رقيق جدا فأنه من الضروري تحضير محلول 1% بيودين وهو مكون 90 مل الإيثان ثنائي الكلوريد(Dichloroethane) ، 10 مل كحول ميثيلي ، 1جم من(TAC) إذا أضيف هذا المحلول إلى الحواف الفيلم فإنه يصبح من السهل رؤيته طافيا فوق سطح الماء.

الصبغ Staining:

يعني الصبغ بالنسبة للمشتغلين في مجال المجهر الإلكتروني زيادة التباين(**Contrast**) للشيء المفحوص بوضع ذرات عنصر ذو عدد ذري أعلى من تلك الداخلة في تركيب النسيج أو العينة المفحوصة مثل الكربون والأكسجين والنيتروجين والهيدروجين وغيرها.والتي غالبا ما تكون مواد عضوية.

فالتثبيت برابع أكسيد الأوزميوم سوف تضيف مبدئيا بعض ذرات عالية العدد الذري=(**76**)على الأجزاء التي تتفاعل معها من العينة المثبته مثل أغشية الدهون الفوسفاتية ،و الدهون غير المشبعة وبعض مجاميع البروتينات كذلك البرمنجنات تصبغ أغشية الدهون الفو سفاتية ولكن مثبتات الألدهيدات لا تزيد في عمليات التباين.

وعمليات الصبغ للمجهر الإلكتروني لا تختلف في مضمونها عن المجهر الضوئي لكن الصبغ في المجهر الضوئي عبارة عن تفاعل بين مواد ذات ألوان (صبغات) مع مكونات النسيج فيأخذ الوان تختلف في درجة امتصاصها للضوء بينما الصبغ في المجهر الإلكتروني تعني قدرة هذه المواد الكيميائية ذات الأوزان الذرية العالية مع مكونات الخلية المختلفة على تشتيت الإلكترونات (شكل **11–1**أ– ب.) هناك صبغتان يمكن استعمالهما قبل أو بعد عمليات الطمر هما:

صبغات الرصاص(**Lead stains**)

تعطي صبغة الرصاص قوة تباين عالية وتصبغ معظم مكونات الخلية

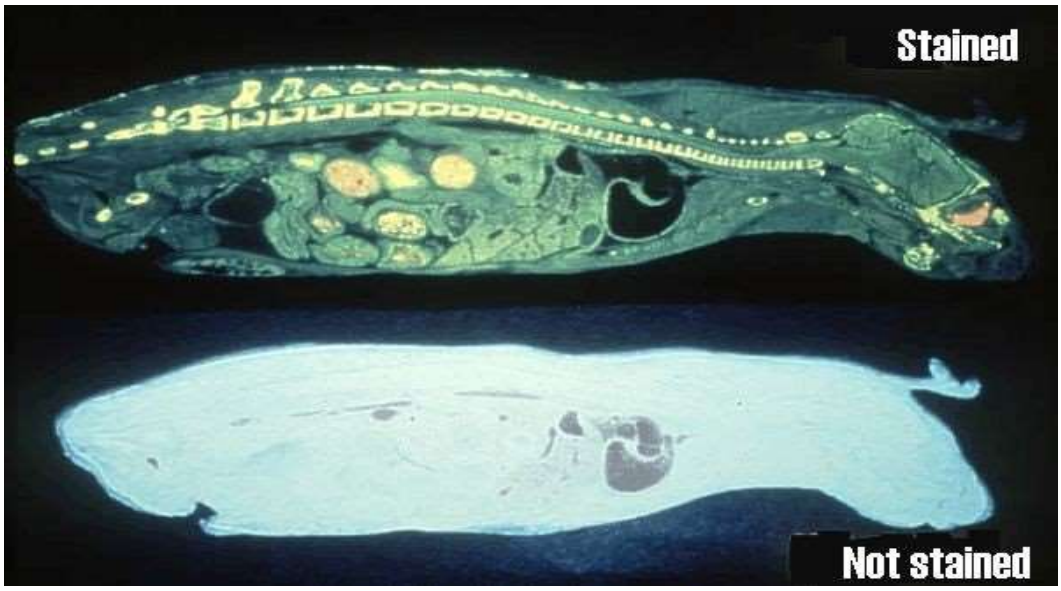
وتستعمل إما بمفردها أو بعد الصبغ القطاعات بالخلات اليورانيل كصبغة روتينية للقطاعات الرقيقة.

إن صبغات الرصاص تتفاعل مع بقايا ثاني اكسيد الكربون مكونة كربونات الرصاص غير الذائبة ،لذا يجب اخذ الإحتياط ومنع ذلك بواسطة استخدام ماء مقطر مغلي لمدة **10** د. لمحلول الصبغة ،وكذلك حفظ الصبغة في انابيب مغطاة بإحكام ، بعدها تغسل الشبكات بالماء المقطر خالي من ثاني اكسيد الكربون

خلات اليورانيل(**Uranyl acetate**)

وكلاهما تذوبان في مذيبات قابلة للجفاف.أو يمكن استخدام محلولهما المائي في صبغ القطاعات.

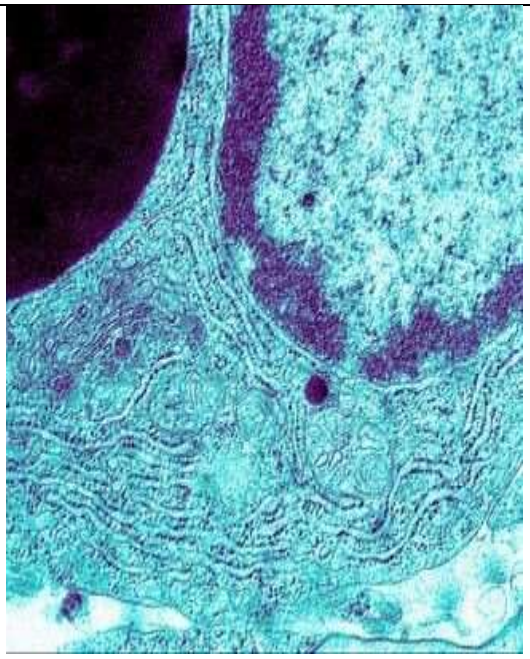
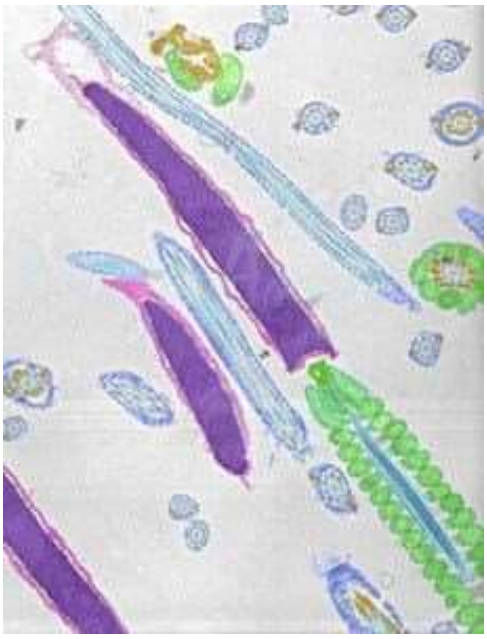
وتختلف الصبغتان عن بعضهما البعض بأن الأولى ذات شحنة موجبة (كاتيون(**Cationic**) لذا ترتبط بالبروتينات وتعتبر صبغة جيدة للحويصلات الإفرازية والليبيفات العضلية والكولاجين. أما صبغة خلات اليورانيل فهي ذات شحنة سالبة (انيونك**Anionic**) وهي صالحة لصبغ الحموض النووية وكذلك البروتينات إلى حد ما.



تأثير الصبغة على القطاعات

الفحص تحت المجهر

المجهر الالكتروني النفاذ.

	
Muscles	**sperms**