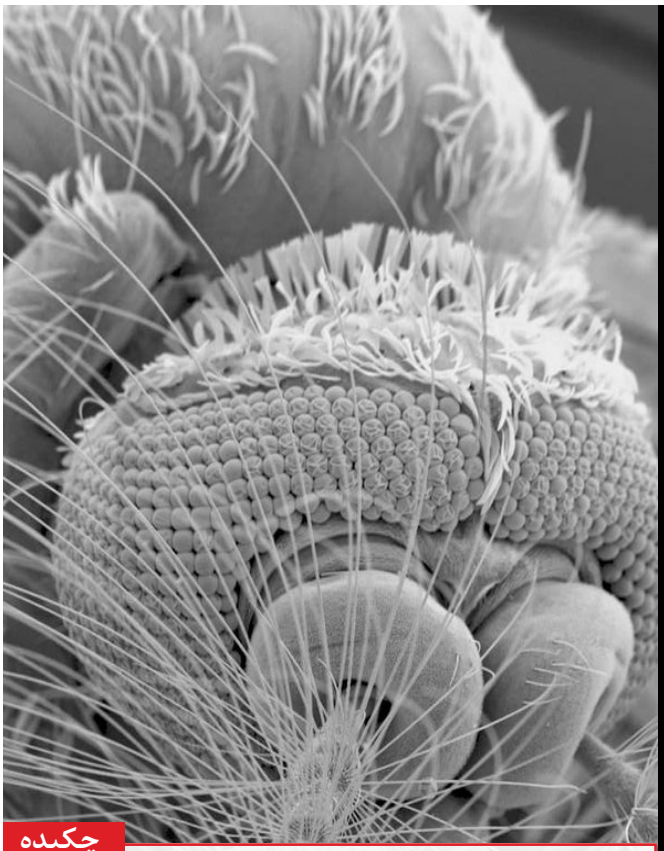
rchive of SID



نویسندگان
مریم خانی‌نور[۱و۴*]
مسعود رسولی[۲و۴]
نفیسه هاشمیان[۳و۴]
*M.khaninour@basu.ac.ir

# آماده‌سازی نمونه‌های زیستی به‌منظور تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

چکیده

میکروسکوپ الکترونی روبشی[۵] یکی از بهترین روش‌های آنالیزی است که در حوزه‌های مختلف کاربردهای فراوانی دارد. این میکروسکوپ، امکان بررسی سطح و ریزساختار داخلی را در ابعاد میکرونی و نانومتری فراهم آورده است. امروزه یکی از حوزه‌های تخصصی و مورد توجه، نمونه‌های زیستی و بافت‌های زنده است. مشاهده این نمونه‌ها و بررسی ریز ساختارهای آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نیازمند آماده‌سازی خاصی است. به دلیل حساسیت بالای نمونه‌ها در صورتی که هر مرحله از آماده‌سازی با دقت کافی صورت نگیرد باعث ایجاد چروکیدگی، فروپاشی و یا آسیب به ساختار نمونه می‌شود و روی کیفیت تصاویر نهائی تاثیر می‌گذارد، بنابراین بسیار مهم است که شرایط و مراحل آماده‌سازی بافت با دقت و با روش استاندارد انجام پذیرد.

روش‌های بسیار متنوعی برای آماده‌سازی انواع بافت‌های زیستی و آنالیز آن‌ها وجود دارند که با توجه به نوع بافت و ساختار آن متفاوت هستند.

در این مقاله به بررسی روش‌های کلی آماده‌سازی نمونه‌های زیستی و بافت‌های زنده شامل: (الف) تثبیت‌های مختلف (تثبیت شیمیایی و تثبیت فیزیکی)، (ب) آبگیری با درصدهای مختلف الکل و (ج) روش‌های مختلف خشک کردن (خشک کردن در هوا، خشک کن نقطه بحرانی، خشک کن انجمادی و خشک کن‌های شیمیایی) به‌منظور مشاهده ساختارهای زیستی در نزدیک‌ترین حالت به ساختار زنده آن‌ها در SEM با قدرت تفکیک بالا پرداخته شده‌است.

واژه‌های کلیدی
میکروسکوپ الکترونی روبشی، نمونه‌های زیستی، بافت‌های زنده، آماده‌سازی نمونه.

www.SID.ir

Archive of SID



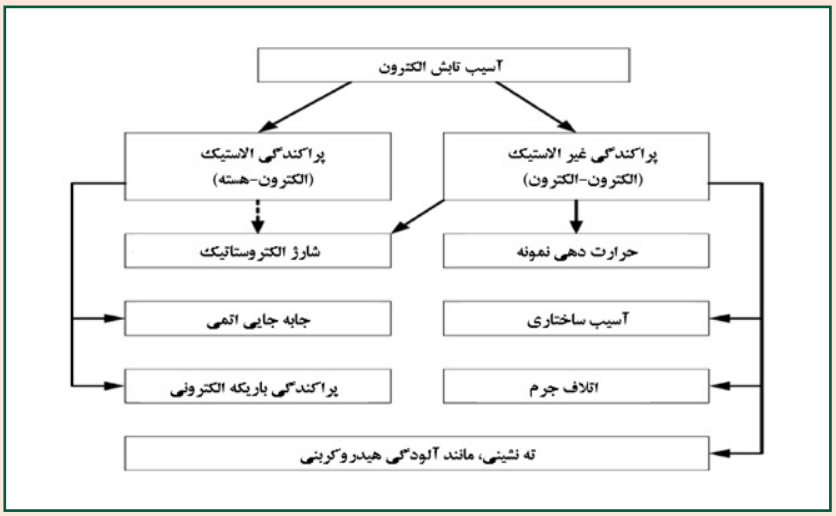
مقدمه

امروزه، میکروسکوپ الکترونی روبشی نه تنها در علوم مواد، شیمی و فیزیک به کار می‌رود، بلکه در زمینه‌های متعددی همچون علوم پزشکی و زیستی کاربرد دارد. قدرت تفکیک بالای SEM آن را به یکی از ابزارهای قدرتمند و جامع برای بررسی و تحلیل محدوده وسیعی از مشخصات ریزساختار نمونه‌ها در مقیاس نانومتر تا میکرومتر تبدیل می‌کند.

مواد زیستی، بافت‌های زنده‌ای هستند که در اصل ۹۹ درصد ساختار شیمیایی آن‌ها را عناصر سبک (Z=۱-۲۰) تشکیل می‌دهند، به طوری که بیشتر از عناصر H, C, N, O و درصد کمتری از عناصر Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca ساخته شده‌اند. ۱ درصد باقیمانده به‌طور عمده از عناصر Z=۲۴-۳۰ تشکیل شده‌اند که شامل عناصر کمیاب Cr،Co، Cu، Fe، Mn، Zn و I است و در متالوآنزیم‌ها و کوآنزیم‌های مختلف نقش مهمی دارند. آب جزء اصلی نمونه‌های زیستی زنده است و ماکرومولکول‌های آلی پیچیده‌ای مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها را شامل می‌شود. عناصر مختلف تشکیل دهنده سلول عبارتند از: ۵۹ درصد هیدروژن (H)، ۲۴ درصد اکسیژن (O)، ۱۱ درصد کربن (C)، ۴ درصد نیتروژن (N)، ۲ درصد دیگر موارد، مثل فسفر (P)، سولفور (S) و غیره [۲].

یکی از مهمترین چالش‌ها در تفسیر تصاویر SEM نمونه‌های زیستی، توانایی ایجاد تمایز بین ویژگی‌هایی است که منعکس کننده ساختار طبیعی و ویژگی‌هایی که در هنگام پردازش به‌صورت مصنوعی ایجاد می‌شوند، هستند. اگر این تمایز صورت نگیرد، حتی بهترین و با کیفیت‌ترین قدرت تفکیک‌ها می‌توانند تصاویر بی‌مفهومی را نتیجه دهند. این ساختارهای مصنوعی القا شده را آرتیفکت (مصنوعات) می‌نامند. مسئله تمایز ساختارهای واقعی از آرتیفکت‌ها با این واقعیت همراه است که بیشتر تصاویر میکروسکوپی به‌طور مستقیم از ساختارهای زیستی به‌دست نمی‌آیند، بلکه لکه‌ها، رنگ‌ها یا روکش‌ها نیز به نمونه‌ها اضافه می‌شوند تا بخش مورد نظر را قابل مشاهده سازند که خود عامل ایجاد آرتیفکت هستند [۳].

علاوه بر فراهم نمودن اطلاعات سودمند، باریکه الکترونی به کار رفته در یک SEM می‌تواند آسیب موقت یا دائمی را در ساختار سطحی و یا ساختار بالک نمونه ایجاد کند. روش دسته‌بندی این آسیب براساس نوع پراکندگی الکترونی (الاستیک یا غیرالاستیک) است (شکل (۱)) [۴]. مواد زیستی از رساناهای ضعیف یا نارساناهای حرارت و الکتریسیته هستند که نسبت به آسیب تابشی بسیار حساسند [۵].




**شکل (۱): طبقه‌بندی آسیب تابشی با توجه به نوع الکترون و تاثیر ایجاد شده در نمونه [۴].**

به‌منظور مشاهده ریزساختار بافت‌های زنده با استفاده از SEM، برخی ملاحظات مورد نیاز خواهند بود. SEMهای متداول در خلاء بالایی کار می‌کنند تا از تداخل مولکول‌های گازی با باریکه الکترونی اولیه و همچنین الکترون‌های ثانویه[۶] یا الکترون‌های پس پراکنده شده[۷] از نمونه جلوگیری کنند. این بدان معناست، هر نمونه‌ای که وارد SEM می‌شود باید کاملا خشک و بدون هر گونه آلاینده آلی که ممکن است به‌صورت بالقوه در محیطی با خلاء بالا گاز خارج کند، باشد. این قضیه مشکلی را در بررسی نمونه‌های زیستی که تا حد زیادی از آب تشکیل شده‌اند به وجود می‌آورد و اعمال مراحل آماده‌سازی اضافی به‌منظور حفظ ساختار طبیعی موجود زنده الزامی است. مراحل لازم به نوع نمونه و هدف

www.SID.ir

rchive of SID



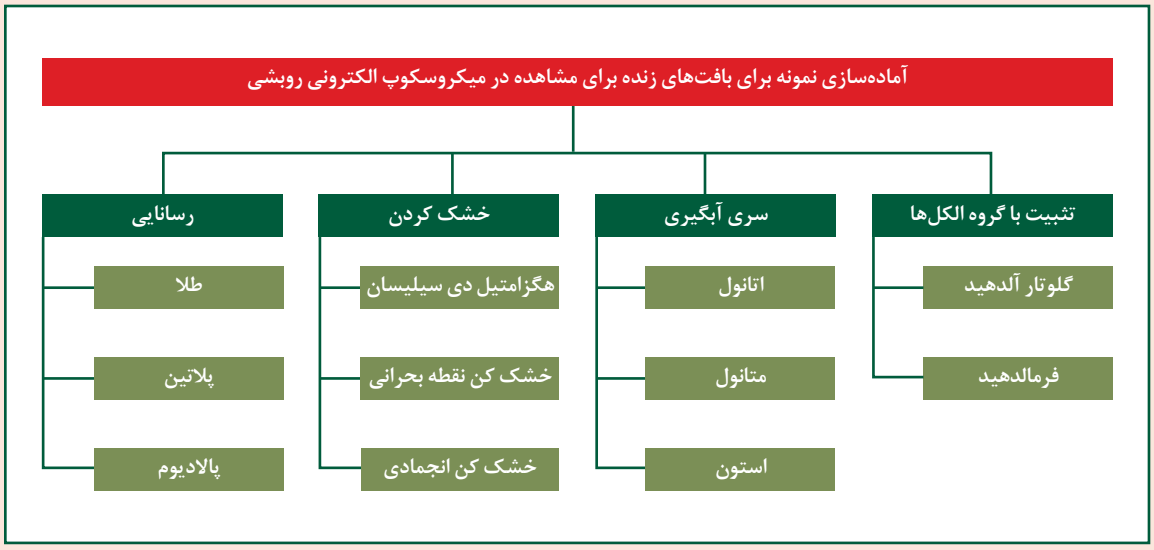


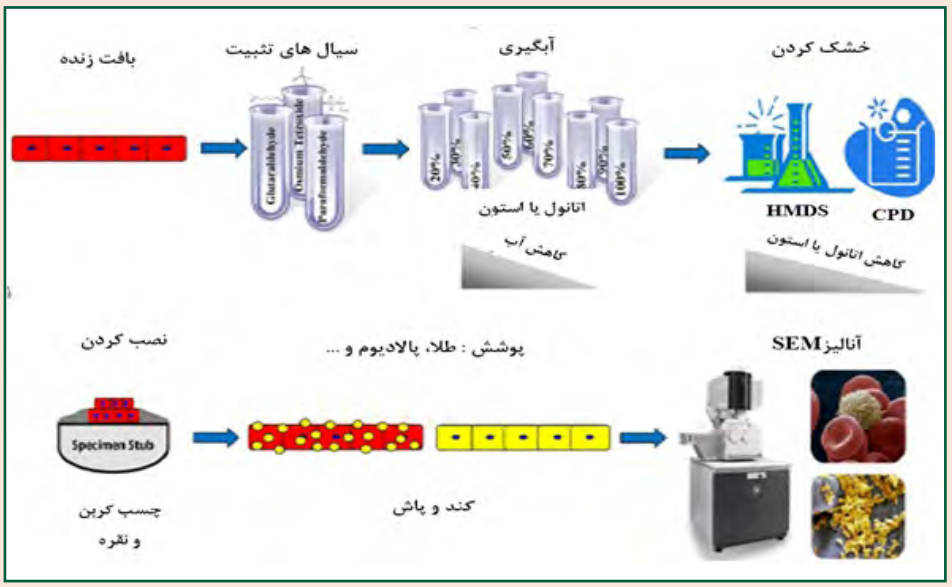
بررسی بستگی دارند، برخی از انواع بافت‌ها یا نمونه‌های زیستی نیازمند پردازش کمتری برای حفظ ساختار خود هستند در حالی که آماده‌سازی دیگر نمونه‌های حساس‌تر، به زمان و دقت بیشتری نیاز دارند تا از ایجاد آرتیفکت‌های ناشی از خشک شدن، مانند چروکیدگی و فروپاشی بافت جلوگیری شود [۵].

نتایج مطالعات مورفومتریک[۸] روی برش‌های بافت ممکن است به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر روش‌های آماده‌سازی نمونه مانند تثبیت، آبگیری و جاسازی[۹] و در واقع نوع بافت قرار بگیرد. بسیاری از نمونه‌های زیستی از طریق تثبیت و آبگیری آماده‌سازی شده و پس از خشک شدن با فلزی همچون طلا، پلاتینیوم یا پالادیوم روکش می‌شوند تا سطوح آن‌ها از نظر الکتریکی برای تحلیل SEM رسانا باشد. نمودار (۱) و شکل (۲)، به ترتیب مراحل اصلی به کار رفته در آماده‌سازی تمامی نمونه‌های زیستی برای مشاهده توسط SEM را شرح می‌دهند. ماهیت و ترکیب مراحل به کار رفته با توجه به ماهیت نمونه، نوع روش میکروسکوپی و اهداف خاص علمی متغیر است. به‌منظور بررسی بیشتر روش‌های مختلف آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای SEM، لطفا به مراجع [۸-۶] مراجعه کنید. در اینجا هر مرحله به‌صورت مختصر توصیف می‌شود [۵].

جدول (۱): نمودار پیشنهادی آماده‌سازی بافت‌های زنده [۵].

جدول (۱): نمودار پیشنهادی آماده‌سازی بافت‌های زنده [۵].




شکل (۲): فرآیند آماده‌سازی بافت‌های زنده برای تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی [۵].

www.SID.ir

فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران
سال هفتم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۸ ■ شماره پیاپی ۲۵
Archive of SID

## جمع‌آوری نمونه

جمع‌آوری نمونه از بافت‌ها حائز اهمیت و بر نتایج نهایی موثر است. در جمع‌آوری نمونه زیستی، برش بافت‌ها باید به دقت انجام شود. برای مثال، در زمان برش یک قسمت کوچک از بافت‌ها برای اهداف تشخیصی، باید در چگونگی نگه داشتن و برش نمونه دقت کافی به کار گرفته شود [۵].

## تثبیت

اولین و مهمترین مرحله پس از انتخاب نمونه برای مطالعه بافت‌های زنده، روش تثبیت سریع و مناسب آنهاست. هدف اولیه تثبیت، پایدارسازی ساختار نمونه است به طوری که بتواند مراحل پردازش و آزمایش را با SEM تحمل کند. پیش از آنکه تجزیه سلولی بلافاصله پس از مرگ یک اندام زنده اتفاق بیفتد، باید سلول‌ها را تثبیت نمود تا از تغییرات ساختار از طریق تجزیه، جلوگیری به عمل آید. تثبیت متداول شامل شبکه‌سازی شیمیایی پروتئین‌ها (برای جلوگیری از حرکت آنزیم و گوارش) و حذف آب برای تغییر بیشتر پروتئین‌های سلولی است. یک ساختار تثبیت شده سبب توقف فرآیندهای سلولی شده و با هدف حفظ نمونه در نزدیکترین حالت ممکن به حالت طبیعی ایجاد می‌شود. مشخصات یک تثبیت کننده مناسب عبارتند از:

- نفوذ راحت به سلول‌ها؛
- عملکرد سریع؛
- تغییرناپذیری؛
- عدم ایجاد آرتیفکت‌های تثبیت [۵].

روش‌های تثبیت به دو نوع اصلی تقسیم می‌شوند: شیمیایی و فیزیکی (جدول (۲)). تثبیت شیمیایی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما استفاده از روش‌های فیزیکی، به‌خصوص انجماد، افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است [۳].

**جدول (۲): تثبیت کننده‌های زیستی رایج برای میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی [۳].**

| ستون | زمان آنالیز |
|---|---|
| روش‌های شیمیایی | استون<br>الکل<br>فرمالدهید[۱۰]<br>گلوتارآلدهید[۱۱]<br>تتروکسید اوسمیوم[۱۲]<br>واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئینی |
| روش‌های فیزیکی | انجماد<br>حرارت‌دهی |

### تثبیت شیمیایی

در مبحث تاثیرات تثبیت کننده‌های شیمیایی روی نمونه‌ها، چند عامل باید در نظر گرفته شود:

- ماهیت ماده تثبیت کننده؛
- ساختار حاملی که ماده تثبیت کننده در آن حل شده‌است؛
- شرایط فیزیکی که تثبیت تحت آن صورت گرفته است.

مواد تثبیت کننده شیمیایی در دو دسته اصلی قرار می‌گیرند: آن‌هایی که با تغییر ماهیت و انعقاد ماکرومولکول‌های زیستی تثبیت می‌کنند و دسته دیگر با شبکه‌سازی کووالانسی ماکرومولکول‌ها باعث تثبیت می‌شوند. مواد تثبیت کننده‌ای مانند استون، اتانول، و متانول (که سبب تغییر ماهیت می‌شوند) سبب حفظ بسیار ضعیف ریزساختار شده و تقریبا فقط برای میکروسکوپی نوری[۱۳] سودمند هستند. در مقایسه، مواد تثبیت کننده شبکه‌ساز، از طریق معرفی شبکه‌های بین مولکولی و گاهی درون مولکولی بین ماکرومولکول‌ها، حفاظت ساختاری عالی را فراهم می‌کنند. رایج‌ترین مواد تثبیت کننده شبکه‌سازی شامل فرمالدهید برای میکروسوپ نوری و گلوتارآلدهید و تتروکسید اوسمیوم برای SEM هستند [۵].

#### فرمالدهید (FA)

فرمالدهید (FA) با فرمول ($CH_2O$) یک مونو آلدهید است که با گروه‌های آمین واکنش داده و شبکه‌هایی را بین ماکرومولکول‌های مجاور، به‌طور عمده پروتئین‌ها، تشکیل می‌دهد. به دلیل آنکه شبکه‌سازی براساس تشکیل یک پل متیلن بین دو مولکول فرمالدهید است، شبکه‌ها کوتاه بوده و می‌توانند با هیدرولیز به حالت اولیه برگردند. فرمالدهید برای میکروسکوپ نوری بسیار سودمند است. کاربرد فرمالدهید برای قدرت تفکیک بالا محدود است. برای SEM، تثبیت فرمالدهید باید همراه با تثبیت بیشتر در گلوتارآلدهید باشد [۵].

#### گلوتارآلدهید

گلوتارآلدهید (GA) یک دی آلدهید است که می‌تواند به‌صورت هم‌زمان با دو آمین واکنش دهد تا شبکه‌های درون و بین مولکولی، به‌طور عمده با پروتئین‌ها، را به وجود آورد. گلوتارآلدهید همچنین با خودش واکنش می‌دهد تا مولکول‌های شبکه‌ای چند ظرفیتی شاخه‌دار و بلندی را تشکیل دهد. این مولکول‌های شبکه‌ای می‌توانند فاصله بین پروتئین‌های مجاور را در بر بگیرند و شبکه‌های چندگانه و اساسا بازگشت ناپذیری را به وجود آورند که سیتوپلاسم کل سلول را به یک ژل ماکرومولکولی تبدیل کند. گلوتارآلدهید یک ساختار ظریف را حداقل تا سطح تفکیک‌پذیری ماکرومولکولی حفظ نموده و آن را نسبت به مراحل پردازش مختلف مورد نیاز به‌منظور آماده‌سازی برای SEM بسیار مقاوم می‌سازد به طوری که این تثبیت کننده را به انتخابی ثابت، تقریبا برای تصویربرداری میکروسکوپی تمام نمونه‌های زیستی تبدیل می‌کند. با وجود آن گلوتارآلدهید لیپیدها را تثبیت نمی‌کند، اما به خوبی سبب تثبیت غشاهای زیستی می‌شود که در مقابل استخراج با


www.SID.ir

Archive of SID





مواد شوینده مقاوم بوده و سلول‌های تثبیت شده با گلوتارآلدهید از لحاظ اسمزی برای مدتی پس از تثبیت فعال باقی می‌مانند [۳، ۶، ۹].

نسبت نفوذ گلوتارآلدهید به داخل بافت بسیار آهسته است، در بافت‌های فشرده نسبت نفوذ، کمتر از ۱ mm/h است. گلوتارآلدهید معمولا به‌صورت تجاری در غلظت ۲۵ درصد وجود دارد که با استفاده از بافر فسفات[۱۴] (۰/۱ M) و یا بافرکاکودیلات[۱۵] (۰/۱ M) رقیق شده و غلظت بین ۱/۵ درصد تا ۳ درصد (با توجه به نوع بافت) به‌دست آمده و در شرایط دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و PH = ۷/۲ – ۷/۴ مورد استفاده قرار می‌گیرد. گلوتارآلدهید باید در یخچال نگهداری شده تا از پلیمریزه شدن آن جلوگیری شود، از طرفی این تثبیت کننده بسیار سمی است به طوری که باید از تنفس و تماس با آن بشدت احتراز نمود و حتی‌الامکان در زیر هود قوی با این ماده سمی کار شود [۱۰].

### تتروکسید اوسمیوم

تتروکسید اوسمیوم (OT) به‌عنوان یک ماده تثبیت کننده ثانویه رایج برای SEM است، چرا که با بیشتر لیپیدها شبکه‌سازی کرده و آن‌ها را نسبت به استخراج توسط حلال‌های آلی به کار رفته در مرحله آبگیری مقاوم می‌سازد .با وجود آن که تتروکسید اوسمیوم از غشاهای زیستی محافظت می‌کند، اما سبب غیرفعال شدن آن‌ها از نظر اسمزی شده و آن‌ها را نسبت به آب نفوذپذیر می‌سازد. اما به دلیل آن که تتروکسید اوسمیوم می‌تواند به پروتئین‌ها و دیگر اجزا آسیب برساند، بهتر است که نمونه‌ها با اوسمیم تثبیت نشوند، مگر آن که علت خاصی برای استفاده از آن وجود داشته باشد [۱۲-۱۱].

نسبت نفوذ تتروکسید اوسمیوم ۰/۵ mm/h است. نمونه‌هایی که از این اندازه بزرگتر باشند در وسط بافت تثبیت نشده باقی می‌مانند و برای میکروسکوپ الکترونی مناسب نیستند. تتروکسید اوسمیوم معمولا با غلظت ۱تا ۲ درصد و در زمان ۱ تا ۱/۵ ساعت استفاده می‌شود. بخار تتروکسید اوسمیوم هم برای چشم و هم برای تنفس بسیار سمی است و حتما باید در زیر هود کار شود. تتروکسید اوسمیوم را می‌توان هم در آب مقطر و هم در بافر تهیه کرد و در ظرف شیشه‌ای داخل یخچال نگهداری نمود [۱۰].

### واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئینی

واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئینی دو عملکردی، شبکه‌های درون و بین مولکولی بین پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند، در نتیجه مشابه با گلوتارآلدهید عمل می‌کنند، به جز آنکه که برای تشکیل واکنش‌گرهای چند ظرفیتی به خود وابسته نیستند (با خود واکنش نمی‌دهند). فاصله‌ای که آن‌ها می‌توانند شبکه‌ها را تشکیل دهند، با طول مولکول بین دو انتهای واکنشی آن تعیین می‌شود.

انواع زیادی از واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئین دو عملکردی به‌صورت تجاری در بازار موجود هستند، که به‌طور عمده توسط پیرس[۱۶] معرفی شدند، اما تعداد کمی از آن‌ها به‌عنوان مواد تثبیت کننده برای میکروسکوپی آزمایش شدند [۳].

www.SID.ir

### تثبیت بخار

به‌صورت کلی، همان‌طور که گفته شد، تثبیت نمونه‌های زیستی برای SEM از اصول و مواد یکسانی بهره می‌گیرد. اما برخی از نمونه‌ها به سادگی دچار آسیب می‌شوند، بنابراین غوطه‌وری در مایع برای آن‌ها مناسب نخواهد بود. این به‌خصوص برای هایف‌های[۱۷] قارچی و هاگدان‌های آن‌ها (کونیدی)[۱۸] که با لمس کردن از گیاه والد خود جدا می‌شوند حائز اهمیت است. تثبیت بخار شامل استفاده از یک قطره ماده تثبیت کننده در نزدیکی نمونه در یک محفظه کاملا بسته است. در مورد ماده برگ، تتروکسید اسمیوم ۴ درصد (ساخته شده در آب)، در حدود بعد از ۱ ساعت نمونه را تثبیت می‌کند. این نمونه درصورت تثبیت شدن به رنگ مشکی در می‌آید که این تغییر رنگ به ارزیابی پیشرفت کمک می‌کند. پس از تثبیت می‌توان نمونه را با قرار دادن در یک بلوک فلزی که با نیتروژن مایع خنک می‌شود، منجمد نمود و سپس به روش خشک کردن انجمادی (فریز درای)[۱۹] خشک کرد. معمولا تثبیت کننده ثانویه تتروکسید اوسمیوم را می‌توان حذف کرد، ولی نمونه‌هایی که دارای «مشکل شارژ شدن» هستند و منجر به اعوجاج تصویر می‌شوند، بیشتر می‌توانند از تثبیت با محلول اسید اسمیک بهره‌مند شوند [۱۳].

## ▣ تثبیت فیزیکی

همان‌طور که قبلا در جدول (۲) ذکر شد، دو جایگزین برای مواد شیمیایی به‌منظور تثبیت مواد زیستی حرارت‌دهی و انجماد هستند. هر دو روش برای میکروسکوپ نوری به کار می‌روند، اما انجماد (تثبیت کرایو) بهترین جایگزین برای تثبیت شیمیایی به‌منظور حفظ ساختار ظریف زیستی در میکروسکوپی با قدرت تفکیک بالا است [۵].

### تثبیت کرایو

انجماد سریع نمونه‌های زیستی پتانسیل خوبی در توقف همه حرکت‌های مولکولی دارد و تقریبا بلافاصله ساختار ظریف را در محل منجمد می‌سازند. آسیب به بلورهای یخ مانع اصلی برای یک تثبیت کرایوی خوب است. رشد بلور یخ تحت تاثیر سرعت انجماد قرار می‌گیرد، سرعت انجماد نیز به نوبه خود با نرخ انتقال حرارت خنک کننده و ابعاد نمونه تعیین می‌شود. برای اجتناب از آسیب فرا ساختاری به نمونه که به علت رشد بلورهای یخ بزرگ ایجاد می‌شود، انجماد سریع ضروری است. پروپان مایع با نرخ انتقال حرارت ۳۹۰۰ °C/s موثرترین خنک کننده‌ای است که تاکنون آزمایش شده‌است و ارزان و خیلی راحت قابل استفاده است [۵]. برای بدست آوردن بلورهای یخ آزاد منجمد شده، سلول‌ها باید در نرخ بالای ۱۰۰۰ °C/s منجمد شوند. نمونه‌های خیلی ریز مثل سلول‌های منفرد می‌توانند خیلی سریع منجمد شوند، اما نرخ انجماد پایین‌تر برای نمونه‌های ضخیم‌تر مانند بافت‌ها، منطقه آزاد بلور یخ را به یک لایه چند میکرومتری با نزدیک‌ترین فاصله ازسطح یا محیط انجماد محدود می‌کند [۱۴و۱۵].

Archive of SID



### ▣ نکات کلی درخصوص تثبیت کردن نمونه‌ها

هنگام آماده‌سازی نمونه‌ها، یکی از اولین مفاهیم در نظر گرفته شده، تفاوت بین از بین بردن و تثبیت کردن نمونه است. بیشتر اوقات، اصطلاح تثبیت کردن برای هر دو فرآیند استفاده و گاهی باعث می‌شود فراموش کنیم که آن‌ها یکسان نیستند. بیشتر تثبیت کننده‌های اولیه که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند از گروه تثبیت کننده‌های آلدئیدها هستند و به خوبی اثبات شده‌است که سلول‌ها پیش از مرگ، می‌توانند مدت زمان قابل توجهی را به‌منظور پاسخ به محلول‌های تثبیت کننده داشته باشند. آمیب کپک لجن رشد یافته روی یک سطح آگار می‌تواند به‌صورت گرد دیده شود و بعد از آن که مخلوط گلوتارآلدهید روی آن ریخته می‌شود، در ۳۰ ثانیه اول فضاهای بین مولکولی ایجاد می‌کند. اگر، ظرف پتری حاوی سلول‌ها ابتدا در معرض بیش از یک قطره تتروکسید اسمیوم ۱ درصد برای ۳ دقیقه قرار بگیرد، گلوتارآلدهید اضافی باعث هیچ گونه تغییر موفولوژی واضحی در سلول‌ها نمی‌شود. بنابراین، بخارات بسیار فرار و سمی تتروکسید اسمیوم سلول‌ها را از بین می‌برد و سپس گلوترآلدئید آن را تثبیت می‌کند. مهم است فراموش نکنیم که این فرآیندها منحصر به فرد نیستند و می‌توانند متفاوت باشند [۱۳].

به‌طور خلاصه تثبیت آلدهید معمولا کافی است. دو تثبیت کننده اصلی برای این هدف، گلوتارآلدهید و فرمالدهید است. گلوتارآلدهید به سرعت و به‌صورت غیر قابل برگشت از طریق گروه‌های آمین‌هایشان به پروتئین‌ها متصل می‌شوند به طوری که به آرامی در داخل بافت نفوذ کرده و معمولا به‌صورت ترکیبی با فرمالدهید به کار می‌رود. فرمالدهید به‌صورت قابل برگشت به پروتئین‌ها متصل شده اما به علت اینکه مولکولی کوچک است به سرعت در بافت نفوذ می‌کند [۱۶].

تعادل اسمولاریته[۲۰] محلول تثبیت کننده با اسمولاریته داخلی سلول‌ها یا بافت‌های تثبیت شده، به‌منظور حفظ مورفولوژی طبیعی و ساختار خوب حیاتی است [۱۷]. اگر اسمولاریته تثبیت کننده کمتر از سلول‌ها باشد، سلول‌ها آب‌دار و متورم خواهند شد و اگر بیشتر باشد سلول‌ها آب از دست داده و چروک می‌شوند. استرس اسمزی می‌تواند باعث پارگی محفظه‌های داخلی غشاء و توزیع مجدد اجزای داخل سلولی شوند. گلوتارآلدهید، فرمالدهید و تتروکسید اوسمیوم آزادانه از غشاء عبور کرده و فشار اسمزی به سلول‌ها و بافت‌ها کمک نمی‌کند [۳، ۷، ۱۷].

بسیاری از ساختارهای زیستی به دما حساس هستند. توصیه شده دمای محلول در ابتدای تثبیت شدن همان دمایی باشد که نمونه موقع زنده بودن در آن نگهداری شده‌است. پس از آن که نمونه به خوبی تثبیت شد، دما می‌تواند تا حد دمای اتاق و برای نگهداری طولانی مدت تا ۴ درجه سانتی‌گراد پایین بیاید. همچنین برای جلوگیری از آلوده شدن نمونه‌ها به مرور زمان، می‌توان آن‌ها را در یخچال نگهداری نمود. دیگر دلایل تثبیت نمودن در دماهای پایین‌تر (۴°C-۰) عبارتند از:

- کاهش تحرک جانبی پروتئین‌های غشا؛
- کاهش انتشار مولکول‌های بین سلولی
- کاهش نرخ تثبیت که باید با تتروکسید اوسمیوم یا مخلوط تتروکسید اوسمیوم وگلوتارآلدهید صورت گیرد [۳].

زمان مورد نیاز کافی به‌منظور تثبیت سلول‌ها و بافت‌ها تا حد زیادی به سرعت پخش تثبیت کننده در نمونه و نرخی که تثبیت کننده با اجزای نمونه واکنش می‌دهد، بستگی دارد. حداقل زمان مورد نیاز برای تثبیت به نوع و اندازه نمونه بستگی دارد. به‌عنوان مثال، به نظر می‌رسد سلول‌های کشت تقریبا بلافاصله تثبیت شوند، اگر چه ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در (۳۷°C)، زمانی امن برای اطمینان از تثبیت کافی است. سلول‌های باکتریایی ممکن است فقط نیاز به ۳۰ دقیقه زمان داشته باشند، در حالی که به‌منظور اطمینان از نفوذ کامل تثبیت کننده، یک قطعه ضخیم‌تر از بافت یک حیوان یا گیاه نیاز به یک شب یا حتی چند روز (تقریبا ۸ ساعت) غوطه‌وری در تثبیت کننده خواهد داشت. درصورت لزوم، تقریبا تمام نمونه‌ها را می‌توان در گلوتارآلدهید سرد برای مدت زمان طولانی ذخیره نمود. اما نگهداری نمونه به‌صورت طولانی مدت در تتروکسید اوسمیوم می‌تواند بسیار مخرب باشد و باید اجتناب شود و در نهایت ماهیت برگشت‌پذیر پیوند فرمالدهید ذخیره‌سازی طولانی مدت در تثبیت کننده فرمالدهید را غیرممکن می‌سازد. در نهایت، باید تمام تثبیت کننده‌ها به‌منظور حفظ pH در حدود pH فیزیولوژیک نمونه، بافر شوند که به‌طور معمول برای بافت‌های پستانداران ۷/۲ تا ۷/۴ است [۳].

## آبگیری

برای مطالعه نمونه‌های زیستی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی لازم است قبل از آنالیز و تصویربرداری، آب و مایعات آلی از نمونه‌ها حذف و یا بی‌حرکت شوند. به عبارت دقیق‌تر، اصطلاح «آبگیری» برای توصیف حذف آب استفاده می‌شود. از آنجا که مواد زیستی به‌طور عمده از آب تشکیل شده‌اند، آبگیری آن‌ها به‌صورت بالقوه با توجه به موارد زیر، فرآیندی بسیار مخرب و ایجاد کننده آرتیفکت است:

۱. استخراج مولکول‌ها توسط حلال آب‌گیر؛
۲. از بین رفتن مولکول‌ها در اثر از دست دادن آب؛
۳. چروکیدگی نمونه به دلیل از دست دادن آب؛
۴. شکستن نمونه توسط فصل مشترک هوا و حلال.

چروکیدگی یک آرتیفکت اجتناب‌ناپذیر در آبگیری است، زیرا از دست دادن حلال آب موجود در اطراف مولکول‌ها موجب به هم فشردگی زیاد مولکول‌ها می‌شود [۱۹، ۱۸، ۳]. بنابراین، نمونه‌ها باید طوری آبگیری شوند که به آهستگی منقبض شده و در اثر از دست دادن سریع آب از هم نپاشند [۳].

بدین منظور بسیاری از روش‌های مختلف از جمله خشک کردن در هوا و آبگیری شیمیایی معرفی می‌شوند. رایج‌ترین حلال‌های آبگیری متانول، اتانول و استون هستند. اتانول و استون به‌طور معمول به‌منظور آبگیری و حفظ ساختار اصلی نمونه‌های زیستی مانند بافت پروتئین استفاده می‌شوند. روند


www.SID.ir

Archive of SID





آبگیری با عبور بافت از یک سری غلظت‌های افزایش یافته الکل انجام می‌شود. بلوک‌های بافت به ترتیب در الکل‌های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد قرار گرفته و آبگیری می‌شوند [۲۳-۲۰]؛ سپس برای اطمینان از اینکه تمام آب حذف شده‌است، بلوک‌ها مجددا در اتانول ۱۰۰ درصد قرار می‌گیرند. توجه داشته باشید که باید از اتانول خالص استفاده شود و از آنجایی که اتانول جاذب رطوبت است و بخار آب را از هوا جذب می‌کند باید اطمینان حاصل شود که هیچ گونه آبی جذب نشده و اتانول خالص است. به همین دلیل، معمولا شروع آبگیری در ۱۵ درصد تا ۳۰ درصد حلال در آب است و غلظت حلال در گام‌های ۱۵ درصد تا ۲۰ درصد، در نهایت به ۱۰۰ درصد افزایش می‌یابد [۳]. مهم است که بین آبگیری و خشک کردن تمایز قائل شویم، بافت‌ها هرگز نباید در مجاورت هوا خشک شوند. آبگیری شامل خروج آهسته آب از بافت با یک حلال آلی است. آبگیری باید نسبتا سریع صورت گیرد تا از استخراج بیش از حد الکل و ترکیبات محلول در استون جلوگیری شود، اما برای جلوگیری از پلاسمولیز[۲۱] به اندازه کافی آهسته باشد. کنترل استخراج اجزای نمونه دشوار است. کربوهیدرات‌ها به‌خصوص با وزن مولکولی پایین، حساس هستند چون اگر کربوهیدرات‌ها در تمام تثبیت کننده‌ها قرار بگیرند، معمولا اتصال ضعیفی برقرار می‌کنند. پروتئین‌ها در حین تثبیت اولیه و چربی‌ها در حین تثبیت ثانویه به ترتیب تمایل دارند به گلوتارآلدهید و تتروکسید اوسمیوم متصل شوند. کربوهیدرات‌ها اساسا تثبیت نشده هستند. علاوه بر مشکل استخراج، مشکل چروکیدگی نیز وجود دارد، هر یک از این مشکلات در غلظت‌های پایین سری‌های آبگیری بسیار جدی هستند. به‌طور کلی، راه حل این مسایل آبگیری سریع است. با استفاده از الکل ۷۰ درصد بافت تا حد زیادی چروک نمی‌شود اما شروع به سخت شدن می‌کند. در حقیقت، دوره‌های طولانی آبگیری در غلظت‌های بالاتر الکل، می‌تواند بافت را کاملا شکننده کند. اگر در مراحل تثبیت نمونه توقفی نیاز باشد، بیشتر بافت‌شناسان الکل ۷۰ درصد تا ۱۰۰ درصد را به‌عنوان مکان مناسبی برای توقف نمونه در طی شب می‌دانند. اگر در حین آبگیری پلاسمولیز رخ دهد، ممکن است مراحل اضافه‌تر آبگیری لازم باشد. غشاهای سلولی گاهی بعضی از فعالیت‌های اسمزی را پس از مدت کوتاهی از تثبیت حفظ می‌کنند. زمان‌های طولانی‌تر تثبیت در گلوتارآلدهید می‌تواند حساسیت‌های اسمزی را به خوبی کاهش دهد. غشاها اساسا به تغییرات اسمزی پس از ۴۸ ساعت تثبیت در گلوتارآلدهید غیرحساس می‌شوند. تثبیت ضعیف سبب تشدید مشکلات آبگیری خواهد شد. آبگیری در دمای یخچال کمی سبب کند شدن فرآیند شده و تمایل به سفت کردن بافت دارد و همچنین ممکن است پلاسمولیز را قدری کاهش دهد. بافت‌های زنده خیلی به آبگیری ضعیف حساس هستند، بنابراین آبگیری سرد (در دمای یخچال) برای اینگونه بافت‌ها توصیه می‌شود. همچنین باید در هنگام تعویض محلول دقت نمود تا نمونه خشک نشود، نکته‌ای که خیلی از افراد نسبت به آن بی‌توجه هستند.

www.SID.ir

به‌طور کلی برای آبگیری بافت‌های زنده مراحل زیر توصیه می‌شود:

۱. نمونه‌ها با بافر تازه (هیچگونه تثبیت کننده‌ای اضافه نشود) سه مرتبه زیر هود فیوم شستشو شود.

۲. سپس نمونه‌ها در کمترین غلظت الکل (اتانول) از سری غلظت‌های الکل در نظر گرفته شده برای آبگیری، قرار داده شود (مثلا الکل ۵۰ درصد به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه).

۳. مراحل را به ترتیب با الکل‌های درصد بیشتر ادامه داده تا نمونه به الکل ۱۰۰ درصد برسد، سپس مراحل الکل ۱۰۰ درصد تکرار شود.

۴. نمونه‌ها اکنون آبگیری شده و آماده خشک شدن هستند.

## خشک کردن

بسیاری از نمونه‌های زیستی حاوی مایعات (بیشتر آب) هستند. تبخیر این مایعات می‌تواند تاثیر منفی بر عملکرد دستگاه داشته باشد، بنابراین، بهتر است نمونه قبل از گذاشته شدن در محفظه میکروسکوپ الکترونی روبشی کاملا خشک شود.

هنگامی که آبگیری کامل شد، حلال باید بدون ایجاد آرتیفکت‌های ناشی از خشک کردن یا تنش سطحی در نمونه از بافت خارج شود. این امر از طریق استفاده از یک جریان انتقالی و معمولا به کمک دستگاه‌هایی مانند خشک کن در نقطه بحرانی[۲۲] و خشک کن سرمایشی[۲۳] و گاهی اوقات با استفاده از دی‌اکسید کربن مایع و یا یک سری از حلال‌ها مانند هگزامتیل دی سیلیزان[۲۴]، فرئون ۱۱۳، تترامتیل سیلان[۲۵] و PELDRI II برای خشک کردن در هوا به‌دست می‌آید. روش‌های ذکر شده نیروهای کشش سطحی بالا را که باعث فروپاشی و چروکیدگی سلول‌ها و ویژگی‌های سطحی آن‌ها می‌شود، کاهش می‌دهد [۲۴، ۲۵، ۵].

اگر نمونه‌های زیستی پس از آبگیری در هوا خشک شوند، آرتیفکت‌هایی از قبیل چروکیدگی و فروپاشی ساختارهای سطح به علت اثرات کشش سطحی می‌توانند مشکل‌زا باشند. همان‌طور که سطح مشترک بین آب و هوا، ابتدا از سطح و سپس از بخش توده‌ای نمونه می‌گذرد، نیروهای کشش سطحی مربوط به سطح مشترک می‌توانند تا ۱۳/۸ مگاپاسکال افزایش یابند که در نتیجه ۴۵ درصد چروکیدگی در مرحله نهایی خشک کردن در هوا رخ می‌دهد [۲۶]. همچنان که ساختارهای در حال خشک شدن کوچکتر می‌شوند این نیروها به‌طور فزاینده‌ای بزرگتر می‌گردند. افزایش چشم‌گیر نیروهای کشش سطحی به شدت ساختار یکپارچه نمونه‌های نرم را از شکل طبیعی خارج می‌کند و حتی می‌تواند منجر به فروپاشی کامل نمونه‌های توخالی شود. هر تغییر شکلی که رخ می‌دهد می‌تواند به‌صورت

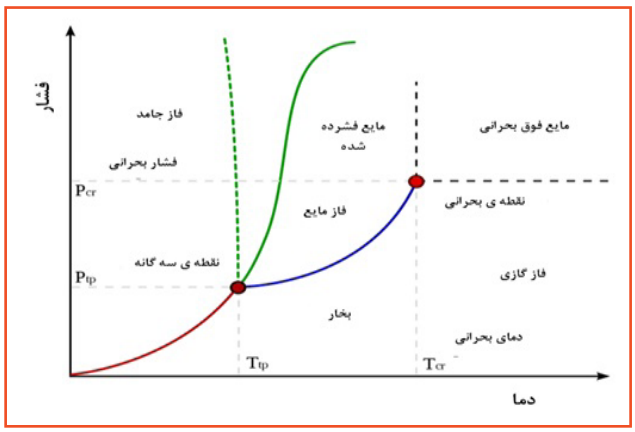
Archive of SID



اشتباه به‌عنوان ویژگی ذاتی نمونه یا به‌عنوان تاثیر یک رفتار اعمال شده خاص تشخیص داده شود. افزایش نیروهای کشش سطحی همچنین مشکلاتی برای نمونه‌های شامل محلول‌های آلی و غیرآلی حل شده ایجاد می‌کند [۵].

## خشک کن نقطه بحرانی

خشک کن نقطه بحرانی (CPD) یک روش متداول آبگیری بافت‌های زیستی قبل از آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی است. این روش اولین بار به‌صورت تجاری برای آماده‌سازی نمونه‌های SEM توسط پلارن[۲۶] در سال ۱۹۷۰ معرفی شد. به‌طور سنتی نمونه‌های زیستی به‌منظور جلوگیری از چروکیدگی توسط CPD مورد پردازش قرار گرفته‌اند [۲۷ و ۲۸]. خشک کن نقطه بحرانی بر این اصل استوار است که در شرایط دما و فشار معین (در نقطه بحرانی)، یک مایع و بخار آن غیر قابل تشخیص خواهند شد (شکل (۳)). در این نقطه، تبادل یکسانی از مولکول‌ها بین فازهای مایع و گاز وجود دارد و کشش سطحی نمونه برابر صفر خواهد شد.




**شکل (۳): نقطه بحرانی مایع – بخار در نمودار فاز دما فشار در دمای بالای مرز فاز گاز و مایع است. خطوط نقطه‌چین سبز رفتار غیرعادی آب را نشان می‌دهد [۵].**

برای نمونه‌های زیستی که مساله اصلی حذف آب است نقطه بحرانی (برای آب) با مقادیر ۳۷۴°C+ و ۳۲۱۲ PSI نامناسب بوده و باعث آسیب حرارتی به نمونه می‌شود. دما و فشار بحرانی متانول و دیگر مایعات مشابه نیز بسیار بالاست. در مقابل، دماهای بحرانی فرئون ۱۳ (یک سرد کننده فلوئور و کربنی) و دی‌اکسید کربن مایع کم هستند. با وجود فشار بحرانی کم برای فرئون ۱۳ اما فشار کربن دی‌اکسید مایع مقدار بالایی دارد. از این اطلاعات به نظر می‌رسد که فرئون ۱۳ و دیگر فلوئوروکربن‌های مشابه بهترین گزینه برای خشک کن نقطه بحرانی هستند. اما تصاویر گرفته شده از مواد زیستی نشان می‌دهد که یکپارچگی ساختاری بهتر، زمانی حفظ می‌شود که دی‌اکسید کربن مایع به جای فلوئوروکربن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. فلوئوروکربن‌ها به‌عنوان ماده سرد کننده ممنوع هستند، چرا که به‌طور مستقیم با تخریب لایه ازون و گرم شدن جهانی در ارتباطاند و دیگر به‌طور کلی در دسترس نیستند.

به همین دلیل، کربن دی‌اکسید مایع برای خشک شدن در نقطه بحرانی به کار می‌رود. جدول (۲) دما - فشار بحرانی برخی از مواد را نشان می‌دهد.

**جدول (۲): دما و فشار بحرانی مواد شیمیایی که در خشک کن نقطه بحرانی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳].**

| ماده شیمیایی | دمای بحرانی (C) | فشار بحرانی (MPa) |
|---|---|---|
| آب | ۳۷۵ | ۲۲/۱۲ |
| متانول | ۲۴۰ | ۷/۹۵ |
| فرئون ۱۳ | ۲۹ | ۳/۸۷ |
| دی‌اکسید کربن | ۳۱ | ۷/۳۹ |

نمونه‌ای که آبگیری شده‌است باید در مقدار کافی الکل درصد بالا (معمولا اتانول ۱۰۰ درصد) که به‌طور کامل آن را می‌پوشاند، قرار بگیرد و در محفظه یک دستگاه خشک کن نقطه بحرانی قرار داده شود. محفظه مهر و موم می‌شود و با استفاده از آب خنک شده و سپس $CO_2$ مایع مکررا وارد محفظه و اتانول خارج می‌شود تا هنگامی که تمام اتانول با $CO_2$ مایع جایگزین شود. در مرحله بعد، محفظه مجدد مهر و موم شده، خنک کردن محفظه متوقف می‌شود و در عوض به آرامی شروع به گرم کردن می‌کند. هنگامی که فشار از ۱۰۷۲ PSI و دمای محفظه از ۳۱°C تجاوز کرد یک نقطه بحرانی به‌دست می‌آید که طبق آن فاز مایع و گاز با هم در تعادل هستند. اگر دمای محفظه بالاتر برده شود و از دمای بحرانی عبور کند (برای مثال، ۳۸-۳۶°C)، دی‌اکسید کربن مایع ناپدید شده و محفظه می‌تواند گاز $CO_2$ را بدون هیچگونه احتمال تبدیل مجدد به $CO_2$ مایع و تولید کشش سطحی روی نمونه‌های زیستی، خارج کند. این فرآیند از پنجره محفظه قابل مشاهده است. در نهایت محفظه باید به آرامی از گاز $CO_2$ تخلیه شود، باید توجه داشت خروج گاز از طریق یک دیافراگم کوچک (دریچه تخلیه) در سرعت بالا منجر به کاهش دما خواهد شد اگر دما به زیر نقطه بحرانی افت کند سطوح نمونه می‌تواند دوباره مرطوب و آسیب‌های ناشی از کشش سطحی را متحمل شود، به همین خاطر دماسنج باید دائما مشاهده شده و دما تحت نظر باشد[۱۳ و ۲۹]. زمانی که محفظه از فشار اتمسفر پر شد، باید به سرعت نمونه‌های کاملا خشک زیستی را برداشته و بلافاصله آنها به ظرف در بسته منتقل و داخل دسیکاتور نگهداری نمود. این کار باید خیلی سریع انجام شود زیرا نمونه‌های بدون آب می‌توانند سریعا آب اتمسفر را جذب کنند [۳]. در شکل (۴) دو نمونه از مدل‌های

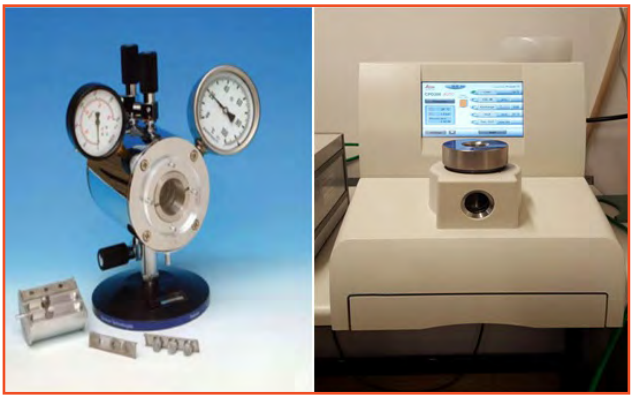
www.SID.ir

Archive of SID





مختلف دستگاه خشک کن نقطه بحرانی (CPD) نشان داده شده که ظاهر متفاوتی دارند اما در عملکرد و ساختار یکسان هستند.



**شکل (۴): دو نمونه متفاوت از خشک کن نقطه بحرانی (CPD) با ظاهری متفاوت ولی عملکردی یکسان [۱].**

### معایب خشک کن نقطه بحرانی

اگر چه خشک کن نقطه بحرانی مشکلاتی را که در اثر تاثیرات ناشی از کشش سطحی ایجاد می‌شود، برطرف می‌کند، شواهد قانع کننده‌ای وجود دارد آبگیری و سپس توسط خشک کن نقطه بحرانی می‌تواند به دو روش نمونه‌های نرم را تخریب کند:

■ یکپارچگی ساختاری: یک سری از مطالعات دقیق (بوید و همکاران، ۱۹۷۷ - بوید و مکناچی، ۱۹۷۹) نشانگر آن است که خشک کن نقطه بحرانی سبب افزایش (تا ۷۰ درصد) تغییرات ابعادی ناخوشایند و نابرابر در بیشتر نمونه‌ها می‌شود. بوید و مکناچی (۱۹۷۹)، وولوبر و همکاران (۱۹۸۱) و گاملیل (۱۹۸۵) در مورد مزایای افزودن فلزات سنگین مختلف، عناصر با چگالی بالا و افزودنی‌های آلی که می‌تواند در مراحل تثبیت صورت بگیرد و چروکیدگی را تا ۵ درصد کاهش دهد، بحث می‌کنند. گرچه فرسایش و اختلال ویژگی‌های سطح هنوز یک مسئله است [۳].

■ یکپارچگی شیمیایی: دی‌اکسید کربن مایع، که معمولا دی‌اکسید کربن فوق بحرانی نامیده می‌شود، یک حلال قوی است. برای مثال، می‌تواند برای مواد فلزی، حل کردن یون‌های فلزی، چربی‌ها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها، بدون کافئین کردن چای و قهوه و حتی از بین بردن کل نیکوتین‌ها از برگ‌های پیچیده تنباکو مورد استفاده قرار گیرد. خشک کن نقطه بحرانی روشی نیست که برای مطالعات ساختاری با قدرت تفکیک بالا در نمونه‌های آلی حساس و ظریف یا بررسی‌های تحلیلی روی هر نوع نمونه استفاده شود. در بزرگنمایی پایین، به‌عنوان مثال، بزرگنمایی ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ برابر، خشک کن نقطه بحرانی احتمالا برای مطالعات ساختاری قابل قبول است. نمونه‌هایی که در خشک کن نقطه بحرانی در مقایسه با نمونه‌هایی که در هوا خشک می‌شوند خیلی کیفیت عکس الکترونی بالاتری دارند [۳].

در نهایت باید به این نکته اذعان کرد که خشک کن نقطه بحرانی روش عالی نیست. چروکیدگی همچنان به میزان ۱ درصد، ۱۵ درصد در مواد سیستم عصبی مرکزی، ۱۲ تا ۱۳ درصد در جنین و بافت‌های جنینی و ۲۰ درصد چروکیدگی برای ریه، کلیه، کبد و پوست مشاهده شده‌است [۱۳، ۲۶، ۲۹، ۳۰].

همواره باید در نظر داشت، دستگاه خشک کن نقطه بحرانی که گاهی اوقات بمب نامیده می‌شود، در فشار بسیار بالا کار می‌کند و بطور بالقوه بسیار خطرناک است و باید صرفا توسط افراد آموزش دیده و با رعایت دستورالعمل‌های سازندگان استفاده شود [۱].

### ■ خشک کن انجمادی

در تئوری باید خشک کن انجمادی (FD) چروکیدگی کمتری نسبت به خشک کن نقطه بحرانی (CPD) داشته باشد [۳۰]، همچنین خشک کن انجمادی از خطرات مشاهده شده (به علت فشار بالا) در فرآیند خشک کن نقطه انجمادی جلوگیری می‌کند. مراحل آماده‌سازی (تثبیت و آبگیری) نمونه با دستگاه خشک کن نقطه انجمادی یکسان است.

کاربرد خشک کن سرمایشی فراتر از آن است که تنها نمونه را به وسیله تصعید آبگیری نماید بلکه احتمالا برای کارهای میکروسکوپی و آنالیز همواره به‌صورت یک فرآیند تجربی کاربرد خواهد داشت. اگرچه دستورالعمل‌های کلی برای کار با دستگاه وجود دارد، اما باید دستورالعمل‌های تجربی برای نمونه‌های موردنظر در راستای بالا بردن کیفیت تصاویر میکروسکوپ الکترونی و صحت آنالیزهای شیمیایی در نظر گرفته شود [۱]. در کاربرد میکروسکوپی، دستگاه خشک کن انجمادی برای خارج ساختن حلال از ساختمان مواد زیستی و خشک کردن نمونه‌ها بواسطه ایجاد خلاء در دماهای بسیار پائین بدون تغییر در ساختار استفاده می‌شود. روش کلی کار به این صورت است که حلال منجمد شده موجود در نمونه به وسیله فرآیند تصعید به‌صورت بخار از نمونه خارج و سپس توسط پمپ خلاء از داخل محفظه خشک‌کن مکیده می‌شود. گرمای مورد نیاز برای تصعید از طریق هدایت یا تشعشع، تامین می‌شود.

عملیات خشک کردن انجمادی دارای سه مرحله است: انجماد اولیه، خشک کردن اولیه به‌صورت تصعید در شرایط خلاء و خشک کردن ثانویه با استفاده از تبخیر در شرایط خلاء.

انجماد اولیه: هنگامی که نمونه در اتانول ۱۰۰ درصد است، می‌تواند در نیتروژن مایع یخ بزند یا به راحتی از حالت اصلی خود خارج شود.

خشک کردن اولیه به‌صورت تصعید در شرایط خلاء: نمونه در جا نمونه‌ای از پیش سرد شده در دمای $-40^{\circ}$ تا $-80^{\circ}$ و در شرایط خلاء کم (۲-۱/۳۳۱۰ Pa یا کمتر) نگهداری می‌شود و برای بیشتر نمونه‌ها ۶-۸ ساعت، مونومرها تنها ۱ تا ۲ ساعت، و نمونه‌ای با ضخامت ۳-۱ mm ممکن است تا ۳ روز باقی بماند. هنگامی که دیگر یخ زدگی در جا نمونه‌ای قابل رویت نباشد، نشان می‌دهد که تمام اتانول منجمد شده تصعید شده‌است و به‌صورت بخار درآمده است [۵].

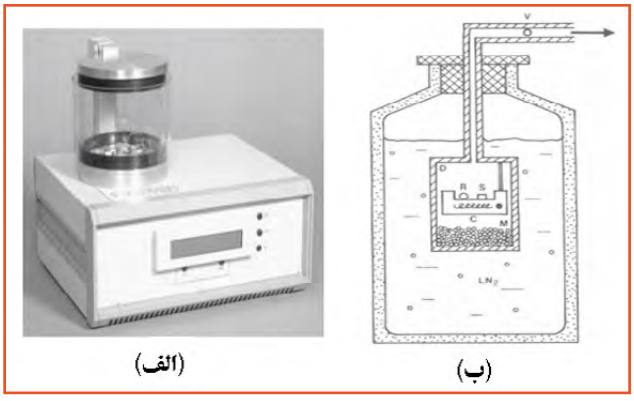
خشک کردن ثانویه با استفاده از تبخیر در شرایط خلاء: نمونه

www.SID.ir

Archive of SID



به تدریج در یک بازه ۶ ساعته یا بیشتر گرم می‌شود و هنگامی که دمای جانمونه‌ای و نمونه کمی بالاتر از شرایط محیطی قرار بگیرد، بخار موجود در محفظه می‌تواند تخلیه شود. جداسازی بخار، پرهزینه‌ترین بخش فرآیند است. عملی کردن روش خشک کن انجمادی متکی بر این مرحله خلاء است. پمپ خلاء علاوه بر این که بخار حلال منجمد را از محیط خارج می‌کند، موجب پایین نگه داشته شدن فشار در اتاقک خلاء در زیر فشار اتمسفری می‌شود. حذف گازهای غیرقابل میعان، مقاومت در مقابل حرکت بخار آب به داخل کندانسور را کاهش می‌دهد. چون این گازها، موجب کاهش راندمان خشک کن انجمادی می‌شود، پمپ خلاء به کار رفته باید قادر به کاهش فشار اتاقک خلاء تا حداقل ۰/۵ mbar، باشد [۱]. در شکل (۵) تصویر دستگاه خشک کن سرمایشی آورده شده‌است.




**شکل (۵): (الف) نمایی از محفظه یک خشک کن سرمایشی خنک شده با نیتروژن مایع، (V):تخلیه، (D): محفظه خشک کننده، (S): نمونه یخ زده شده، (M): الک مولکولی، (LN۲) نیتروژن مایع. (ب) تصویری کلی از دستگاه خشک کن سرمایشی [۱].**

## معایب خشک کن سرمایشی

اگرچه به‌طور کلی خشک کن سرمایشی روشی بی‌نظیر برای حذف مایع از نمونه‌های زیستی، مرطوب و خیس مطرح می‌شود، اما آسیب نمونه و آرتیفکت می‌تواند اتفاق بیفتد. آسیب معمولا در طی فرآیندهایی قبل از خشک شدن اتفاق می‌افتد. تثبیت شیمیایی ناقص یا ناکافی، شکست برای حذف محلول و اجزای سطح ذرات و سرد کردن ضعیف رطوبت نمونه فهرستی از مشکلات را ایجاد می‌کند. آسیب و آرتیفکت‌های ناشی شده از خشک کن سرمایشی می‌تواند در سه سطح آرتیفکت مولکولی، آرتیفکت ساختاری و در نهایت، آرتیفکت تحلیلی مطرح شود [۱].

## ■ عامل‌های خشک کننده شیمیایی

عامل‌های خشک کننده شیمیایی به‌منظور حذف نیاز به سرمایه‌گذاری مالی برای دستگاه‌های CPD یا FD و پیچیدگی‌های آن‌ها پیشنهاد شده‌است. تصاویر منتشر شده از نمونه‌های آماده شده با HMDS و TMS نقش موثر هر دو عامل شیمیایی را به‌عنوان محلول خشک کننده نشان می‌دهد [۱۳و۳۱]. این عامل‌ها به نوبه خود بدون فشار آوردن نیروی‌های کشش سطحی آب یا حتی بدون آسیب ناشی از تبخیر اتانول (که در مورد CPD و FD دیده می‌شد) بخار می‌شوند. نمونه‌ها در حلال (ترجیحا اتانول) می‌توانند ابتدا در یک محلول ۵۰:۵۰ اتانول و HMDS قرار گیرند و سپس به محلول ۱۰۰ درصد HMDS منتقل شود (۲ تغییر). در نهایت در محلولی که کاملا روی نمونه را گرفته است برای تبخیر زیر هود فیوم قرار داده می‌شود. این مراحل برای نمونه‌های بسیار کوچک چند دقیقه و برای نمونه‌های بزرگ چند روز طول می‌کشد. هنگامی که نمونه‌ها برای محفظه خشک کن نقطه انجمادی مناسب نیستند عامل‌های شیمیایی جایگزینی مناسب برای این دستگاه است. با این وجود تمام نمونه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی با HMDS خشک نمی‌شوند؛ بنابراین، یک آزمایش و امتحان، قبل از اینکه این روش به‌عنوان یک روند استاندارد انتخاب شود، مفید است [۱۳و۳۲].

این روش برای کار با بیشتر انواع نمونه‌های زیستی ثابت شده‌است و با وجود این روش نیازی به کار با دستگاه گران و زمان‌بر خشک کن نقطه بحرانی احساس نمی‌شود.

این روش ساده است:

۱. نمونه را از اتانول ۱۰۰ درصد به محلول HMDS: اتانول ۱۰۰ درصد به نسبت ۲:۱ برای ۲۰ دقیقه در آن باقی بماند.

۲. نمونه را در محلول تازه HMDS: اتانول ۱۰۰ درصد به نسبت ۱:۲ برای ۲۰ دقیقه قرار دهید.

۳. اکنون نمونه را برای ۲۰ دقیقه در HMDS ۱۰۰ درصد قرار دهید و این مرحله را تکرار کنید.

۴. هنگامی که نمونه در محلول HMDS ۱۰۰ درصد غوطه‌ور می‌شود در حالی که محلول روی نمونه را کامل پوشانده است، به مدت یک شب در زیر هود قرار می‌گیرد.

۵. تمامی مراحل HMDS نیاز دارند که در زیر هود فیوم انجام شوند و وسایل حفاظت فردی لازم پوشیده شود چون HMDS بسیار سمی است.

۶. HMDS تبخیر خواهد شد و نمونه برای پوشش دهی و تصویربرداری آماده است.

به‌عنوان نکته ایمنی توجه داشته باشید که بخار HMDS نباید تنفس شود و هر محلول مخلوط شده با اتانول نباید در یک بطری بسته شده ذخیره شود چون می‌تواند فشار بخار بسازد و باعث انفجار شود.

به‌طور خلاصه، خشک کن نقطه بحرانی دارای فرآیندی زمان‌گیر و با تکرارپذیری پایین نمونه بود، در حالی که روش خشک کردن HMDS همان‌طور که گفته شد ثابت کرد که می‌تواند جایگزینی مقرون بصرفه برای این روش باشد [۳۳]. قابلیت HMDS و TMS به‌عنوان یک حلال برای آخرین مرحله در آبگیری نمونه‌های زیستی برای میکروسکوپ الکترونی روبشی امتحان شده بود. برای هر دو روش‌های خشک کردن HMDS و TMS ابتدا باید تثبیت نمونه و آبگیری انجام شود. پس از مرحله نهایی آبگیری، عامل آبگیری با عامل شیمیایی خشک کردن جایگزین می‌شود و در نهایت HMDS و TMS در دمای اتاق تبخیر می‌شوند.


www.SID.ir

Archive of SID





## نصب نمونه‌های زیستی

نمونه‌ها باید بر نگهدارنده‌هایی نصب شوند که مخصوص دستگاه SEM است. بیشتر پایه‌های نمونه از جنس برنج یا آلومینیوم هستند، هر چند برنج از آلومینیوم گران‌تر است و هیچ مزیت بیشتری ندارد. نمونه‌ها یا روکش‌هایی با مواد پایدار ممکن است به پایه‌هایی با قلم نقره کلوییدی، چسب نقره کلوییدی، قلم کربن کلوییدی، چسب کربن یا چسب دوطرفه متصل شوند. اگر چسب دوطرفه نارسانا استفاده شود، برخی از قلم‌های رسانا یا چسب‌های رسانا باید بین پایه و سطح نمونه اتصال برقرار کنند. در مورد پوشش‌ها که نارسانا هستند هم باید به همان صورت عمل شود. این چسب‌ها و قلم‌های رسانا باید قبل از اینکه داخل محفظه SEM با خلاء بالا قرار بگیرند کاملا خشک شوند، در غیر اینصورت از ایجاد خلاء مناسب جلوگیری خواهند کرد [۱۳].

## پوشش کندوپاش و هدایت سطح

دو هدف اولیه برای پوشش دادن نمونه وجود دارد:

۱. به‌منظور رسانای الکتریکی ساختن نمونه‌ها بطوری که الکترون‌های اضافه‌ای که با استفاده از اتم‌های نمونه به دام افتاده‌اند بتوانند به زمین منتقل شوند.

۲. ایجاد کنتراست به‌منظور قابل مشاهده کردن آن‌ها در میکروسکوپ الکترونی.

همان طور که قبلا ذکر شد، به‌طور کلی بافت‌های زیستی عایق‌های خوبی هستند و منجر به آرتیفکت‌های تصویربرداری ناشی از شارژ در SEM می‌شود. هنگامی که نمونه‌ها خشک شوند، باید بر پایه‌های نمونه نصب شده، پوشش داده و با بیشترین سرعت ممکن بررسی شوند. اگر نمونه‌ها نیاز به ذخیره شدن دارند، باید در محفظه‌هایی برای به حداقل رساندن هیدراتاسیون[۲۷] مجدد ناشی از رطوبت هوا قرار گیرند. به‌طور خاص، اگر نمونه پوشش داده شده از نظر هیگروپلاستی[۲۸] متورم شود و یک شکستگی مویی را در پوشش نازک فلزی که به‌منظور افزایش رسانندگی روی آن قرار گرفته، ایجاد کند در معرض کاهش کیفیت تصویر قرار می‌گیرد.

در خلاء بالای مناسب، جریان پرتو الکترونی اولیه هیچ راهی برای رسیدن به پتانسیل زمین ندارد، بنابراین اگر جریان نمونه خالص به زمین نرسد، نتیجه اعوجاج تصویر به این علت است که نمونه یک بار منفی از باریکه را تولید می‌کند و باریکه توسط بار منفی نمونه دفع می‌شود. سوختن نمونه در نواحی تولید شارژ، می‌تواند یک معضل باشد.

به استثنای کربن، از فلزات سنگین برای پوشش‌دهی الکتریکی نمونه‌های زیستی به‌منظور مشاهده با استفاده از میکروسکوپ‌های SEM، STEM، TEM استفاده می‌شود. فلزات سنگین برای ایجاد هدایت الکتریکی و منبعی از الکترون‌های ثانویه برای SEM مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از لایه نازک نانومتری از فلزات سنگین اجازه عبور الکترون‌ها از سطح نمونه به زمین، بدون تاثیر قابل توجهی بر خواص سطح نمونه را می‌دهد [۱].

فراهم کردن یک لایه چگال فلزی روی نمونه‌هایی که به‌طور عمده از عناصر سبک از قبیل کربن و نیتروژن تشکیل شده‌اند، همچنین به افزایش سیگنال‌های بازگشتی از عناصر سبک نمونه کمک می‌کند و کنتراست و جزییات بیشتری از سطح را فراهم می‌آورد. نمونه‌های زیستی معمولا در SEM با طلا، طلا - پالادیوم یا پلاتین پوشش داده می‌شوند چون اندازه دانه ظریف برای SEM معمولی مورد نیاز است. هنگام تفسیر تصاویر با قدرت تفکیک بالای پوشش داده شده توسط فلزات، سه مورد در نظر گرفته شده‌است:

۱. ضخامت پوشش فلزی؛

۲. یکنواختی پوشش فلزی؛

۳. دانه دانه بودن ذرات پوشش.

تمام پوشش‌ها موادی را به سطوح نمونه اضافه می‌کنند، ساختارها ضخیم‌تر و باعث می‌شود که آن‌ها در میکروسکوپ بزرگتر ظاهر شوند. اگر به اندازه کافی ضخیم باشد، پوشش زیرساختارهای نمونه پایه را مبهم خواهد کرد. بنابراین، به‌منظور کار با وضوح بالا، اندازه‌گیری فلز پوشش داده شده و استفاده از یک لایه تا اندازه ممکن نازک برای کارها، مهم است. اهمیت یکنواختی با استفاده از مواد پوشش داده شده روی نمونه با روش میکروسکوپی تغییر می‌کند. در SEM پوشش یکنواخت به‌منظور جلوگیری از شارژ الکتریکی ضروری است. مشکل اساسی با پوشش‌های فلزی این است که پوشش ممکن است زیر ساختار دانه‌ای خودش را داشته باشد که در تصاویر با وضوح بالا دیده خواهد شد. در برخی موارد دانه دانه بودن پوشش می‌تواند جزئیات سطح نمونه را بهبود ببخشد، در حالی که در موارد دیگر، دانه دانه بودن پوشش ممکن است ساختارهای زیرین را نادیده بگیرد یا مصنوعات تولید کند. بنابراین، هنگامی که با وضوح بالا کار می‌کنید دانه دانه بودن پوشش در تفسیر تصاویر باید مورد توجه قرار بگیرد [۳]. برای SEM با قدرت تفکیک بالا، این مهم است که پوشش فلزی به اندازه لازم نازک و بدون دانه باشد به طوری که ساختار ماکرومولکولی که در زیر قرار گرفته مبهم نشده باشد. بنابراین، استفاده از فلزات مقاوم از قبیل تنگستن، تانتالیوم و نایوبیوم ارتقاء داده شد، زیرا آن‌ها پوشش‌هایی را تولید می‌کنند که بسیار ریز دانه و تقریبا بدون دانه هستند. این اجازه می‌دهد، که فلزات در لایه‌های نازک پیوسته (۰/۵-۲ nm) که از لحاظ الکتریکی رسانا هستند و تعداد کافی الکترون ثانویه برای میکروسکوپ الکترونی تولید می‌کنند، رسوب داده شود [۳۵، ۳۴، ۱۸].

به‌طور خلاصه، پوشش‌های رسانا سیگنال‌های الکترون ثانویه (و در نتیجه کنتراست) را افزایش می‌دهند. عناصر با عدد اتمی بالاتر نسبت به عناصری که عدد اتمی کمتری دارند (مواد زیستی) دارای بازده بیشتری از الکترون‌های ثانویه هستند [۵].

www.SID.ir

Archive of SID



## نتیجه گیری

برای میکروسکوپ الکترونی روبشی هر مرحله مورد نیاز در آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای تصویربرداری می‌تواند ساختار نمونه را تغییر داده و ساختارهای جدید نامطلوبی مانند چروکیدگی و آرتیفکت را ایجاد کند. از این رو باید روش‌های فنی به‌منظور آماده‌سازی این نوع نمونه‌ها مورد توجه قرار گیرد. انجام مراحل آماده‌سازی با توجه به نوع بافت و ساختار برای هر نمونه در کلیات مانند تثبیت، آبگیری و خشک کردن یکسان اما در جزییات مراحل مانند نوع ماده تثبیت کننده، درصدهای مختلف الکل و نوع الکل (اتانول و متانول) و طریقه خشک کردن ( نوع دستگاه یا ماده) متفاوت است که از روی دستورالعمل‌های موجود یا برای نمونه‌های جدید به‌عنوان یک کار تجربی نو قابل دسترسی است.

## پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد فیزیک، دانشگاه بوعلی سینای همدان
۲. کارشناس فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر تهران
۳. کارشناس ارشد مهندسی مواد ،دانشگاه فردوسی مشهد
۴. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ الکترونی روبشی

5. Scanning Electron Microscope (SEM)
6. Secondry Electron
7. Backscattered Electron
8. Morphometric
9. Embedding
10. Formaldehyde (FA)
11. Glutaraldehyde (GA)
12. Osmium tetroxide (OT)
13. Light Microscope (LM)
14. Phosphat buffer
15. Phosphat buffer
16. Pierce
17. hyphae

۱۸. کنیدی، اسپور غیرجنسی و غیرمتحرک قارچ است.

19. Freez-dry

۲۰. اسمولاریته، تعداد اسمول ( تعداد ذرات معلق در محلول) در یک لیتر محلول است.
۲۱. پلاسمولیز،کنش وارون آماسیدگی (باد کردن و حجیم شدن یاخته‌های گیاهی در اثر ورود آب به درون یاخته) است.

22. Critical Point Drying (CPD)
23. Freeze-Drying (FD)
24. HexaMethylDiSilazane (HMDS)
25. TetraMethylSilane (TMS)
26. Polaron Ltd

۲۷. یون‌های منفی در محلول‌های آبی توسط جاذبه یون‌ها و اتم‌های هیدروژن مولکول آب، آبپوشیده می‌شوند. این عمل «هیدراتاسیون» یا «آبپوشی یون‌ها» نامیده می‌شود.
۲۸. هیگرپلاستی یا نم‌بینی به توان یک ماده در جذب مولکول آب از فضای پیرامون و نگهداری آن گفته می‌شود.

www.SID.ir

rchive of SID





## مراجع


[1] Echlin P. Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. UK: Springer; 2009.

[2] Alberts A, Johnson J, Lewis J, Raff M, Roberts k, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5th ed. 2007.

[3] Bell PB, Safiejko-Mroczka B. Preparing whole mounts of biological specimens for imaging macromolecular structures by light and electron microscopy. Intl J Imag Sys Tech. 1997; 8(3):225-39.

[4] Egerton RF, Li P, Malac M. Radiation damage in the TEM and SEM. Micron. 2004; 35(6):399-409.

[5] Mehdizadeh Kashi A, Tahermanesh K, Chaichian SH. How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). GMJ.2014; 3(2):63-80

[6] Brunk U, Bell PB, Collins VP, Forsby N.SEM of cells in culture: Osmotic effects during fxation. SEM/IITRI. 1975; 8:379-86.

[7] Arborgh B, Bell P, Brunk U, Collins VP.The osmotic effect of glutaraldehyde during fxation. A transmission electronmicroscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study. J Ultrastruct Res.1976; 56(3):339-50.

[8] Anderson PJ. Purifcation and QuantitationOf Glutaraldehyde and Its Effect on Several Enzyme Activities in SkeletalMuscle. J Histochem Cytochem.1967; 15(11):652-61.

[9] Torack RM. The extracellular space of ratbrain following perfusion fxation with glutaraldehyde and hydroxyadipaldehyde.Zeitschrift für Zellforschung.1965; 66(3):352-64.

[10] احمدیان, شهین جزوه آموزشی آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای TEM، بهار ۱۳۸۵، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران.

[11] Hayat MA. Glutaraldehyde: Role in electron microscopy. Micron and Microscopica Acta. 1986; 17(2):115-35.

[12] Maupin-Szamier P, Pollard TD. Actin filament destruction by osmium tetroxide. J Cell Biol. 1978; 77(3):837-52.

[13] Dykstra MJ, Reuss LE. Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting. 2nd Ed: Springer; 2003.

[14] Dalen H, Lieberman M, LeFurgey A,Scheie P, Sommer JR. Quick-freezing of cultured cardiac cells in situ with special attention to the mitochondrial ultrastructure. J Microsc. 1992; 168(Pt3):259-73.

[15] Dalen H, Scheie P, Nassar R, High T, Scherer B, Taylor I, Wallace NR, Sommer JR. Cryopreservation evaluated with mitochondrial and Z line ultrastructure in striated muscle. J Microsc. 1992; 165(Pt 2):239-54.

[16] Sabatini DD, Bensch K, Barrnett RJ. CYTOCHEMISTRY AND ELECTRON MICROSCOPY: The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. J Cell Biol. 1963; 17(1):19-58.

[17] Brunk U, Ericsson JE. The demonstration of acid phosphatase in in vitro cultured tissue cells. Studies on the signifcance of fxation, tonicity and permeability. In: Stoward PJ, editor. Fixation in Histochemistry: Springer US; 1973. P.121-35

[18] Bell PB, Lindroth M, Fredriksson BA. Comparison of the effects of critical point-drying and freeze-drying on cytoskeletons and microtubules. J Microsc. 1988; 151(Pt 2):103-14.


www.SID.ir

Archive of SID

[19] Boyde A, Bailey E, Jones SJ, Tamarin A. Dimensional changes during specimen preparation for scanning electron microscopy. SEM/IITRI. 1977; 10:507-18.

[20] Fazel Anvari-Yazdi A, Talaei-Khozani T, Yazdani A, Anarkoli AO, editors. Morphological and Viability Study of WJ-Stem Cells on Different Nano-Bioactive Ceramics for Bone Tissue Engineering Application. The 2nd international and the 7th joint conference of Iranian metallurgical engineering and Iranian foundry men societies; 2013; Semnan, Iran: Hamayeshnegar.

[21] Fazel Anvari-Yazdi A, Talaei T, Yazdani A. The biocompatibility study of bio-inert and bio-active ceramics to Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Artifcial Organs. 2013; 37(7):A27-A50.

[22] Fazel Anvari-Yazdi A, Yazdani A, Talaei T, Kalantar M. Extraction and Viability Checking of Various Carbonated Hydroxyapatite by Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell. Sci Intl. 2013; 1(5):132-8.

[23] Moradi F, Bahktiari M, Joghataei MT, Nobakht M, Soleimani M, Hasanzadeh G, Fallah A, Zarbakhsh S, Hejazian LB, Shirmohammadi M, Maleki F. BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration. J Neuro Res. 2012; 90(12):2335-48

[24] Kan FW. Use of Peldri II as a sublimation dehydrant in place of critical-point drying in fracture-label cytochemistry and in backscattered electron imaging fracture-label. J Electron Microsc Tech. 1990; 14(1):21-31.

[25] Kennedy JR, Williams RW, Gray JP. Use of Peldri II (a fluorocarbon solid at room temperature) as an alternative to critical point drying for biological tissues. J Electron Microsc Tech. 1989;11(2):117-25

[26] Hayat MA. Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy: University Park Press; 1978.

[27] Bartlett AA, Burysten HP. A review of the physics of critical point drying SEM/IITRI. 1975; 8:305-16.

[28] Cohen AL. A critical look at critical point drying theory, practice and artefacts. SEM/IITRI. 1977; 10:525-35.

[29] Boyde A, Franc F, Maconnachie E. Measurements of critical point shrinkage of glutaraldehyde fxed mouse liver. Scanning. 1981; 4(2):69-82

[30] Boyde A, MacOnnachie E. Volume changes during preparation of mouse embryonic tissue for scanning electron microscopy. Scanning. 1979; 2(3):149-63.

[31] Forge A., Nevill G., Zajic G., Wright A. Scanning electron microscopy of the mammalian organ of Corti: assessment of preparative procedures. Scanning Microsc. 1992; 6(2):521-34

[32] Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. J Biomed Mater Res. 1995; 29(9):1111-20.

[33] Kühnel T, Köveker G, Müller GH. Drying with hexamethyldisilizane--a time-saving alternative to the "critical point" method. Handchir Mikrochir Plast Chir. 1989; 21(3):164-5.

[34] Lindroth M, Bell PB, Fredriksson BA, Liu XD. Preservation and visualization of molecular structure in detergent-extracted whole mounts of cultured cells. Microsc Res Tech. 1992; 22(2):130-50

[35] Bell PB, Lindroth M, Fredriksson BA, Liu XD. Problems associated with the preparation of whole mounts of cytoskeletons for high resolution electron microscopy. Scanning Microsc Suppl. 1989; 3:117-34


www.SID.ir