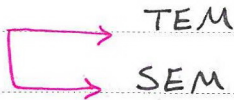


Electron microscopy



چیزی که برای ما در مایکروسکوپی های مختلف مهم است این می باشد که رزولوشن و بزرگنمایی خوب داشته باشیم. یعنی برای ما این مهم است که به رزولوشن در مقیاس های در حد نانو و یا در حد پیکو دست یابیم.

یادآوری: ما با استیصال مایکروسکوپی می توانیم به رزولوشن $0.17 \mu m$ دست یابیم.

اما $0.17 \mu m$ برای ما مناسب نیست چنانچه ایجاد سلول از حدود $6 \mu m$ میلرود و شروع می شود و تا چند دهه مایکروسکوپی ادامه می یابد. برای دیدن ساختارهای درون سلولی مثل هسته، میتوکندری، واکول و... نیاز به رزولوشن در حد نانوداریم. پس استیصال مایکروسکوپی تنها برای غریبان ساده به کار می آید.

وقتی رزولوشن خوبی داشته باشیم می توانیم بینشهای مناسبی هم داشته باشیم. از ویژگی های ذاتی که برای افزایش رزولوشن می تواند تغییر کند می توانیم به λ اشاره کنیم.

$$d = \frac{0.69 \lambda}{n \sin \alpha}$$

رزولوشن

در استیصال مایکروسکوپی λ از 400 nm تا 700 nm می باشد بهترین رزولوشن در طول موج 400 nm یعنی همان آبی پوست می آید. تفاوت اساسی مایکروسکوپی الکترونی با مایکروسکوپی اپتیکال در منبع تولید طول موج می باشد. در اینجا الکترونی که ستاب گرفته و موج پهنی آن باید نیروی دلیله بالاشن شده می تواند به طول موجی را به ما ارائه دهد، پس ما با ایجاد طول موج های الکترونی سر و کار داریم. **چگونگی محاسبه طول موج های الکترونی:**

$$\lambda_e = \frac{h = 6.62 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg} / \text{s}}{m \cdot v}$$

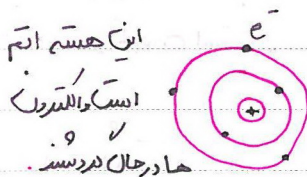
سرعت الکترون $m \cdot v$

واحد $\frac{\text{m}^2 \text{ kg}}{\text{s}}$

$1.09 \times 10^{-31} \text{ kg}$

طول موج به الکترون از فکول رربه رو بدست می آید:

الکترون چگونه در یک مایکروسکوپی الکترونی ایجاد می شود؟ در لامپ های قذیفی یک رشته هایی از جنس تنگستن وجود داشت

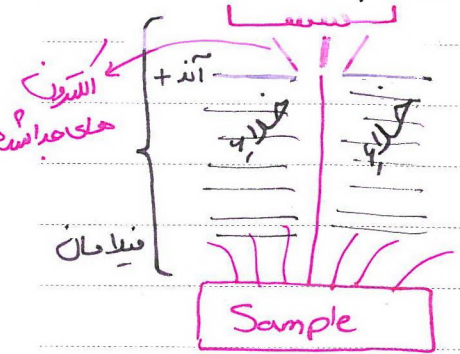


ما می خواهیم در مایکروسکوپی الکترونی یک الکترون را آزاد کنیم. آزاد شدن الکترون باروشن های مختلفی امکان پذیر است. ما می خواهیم بدین انرژی انحصاری غلبه کنیم و این الکترون را در اختیار بگیریم. یعنی می خواهیم ارتباط و اتصال آنرا با جسته مست از بین ببریم. روشی که در TEM ما الکترون را آزاد می کنیم روش فریبند و ایکی باشد.

ما در تنگستن برای خیلی زیادی ایجاد می کنیم به طوری که بسیار زیاد انرژی می شود و می تواند انرژی لازم برای غلبه بر اتصال این **Binding (انرژی بستگی هسته)** را به الکترون تحویل دهد. و با این کار نه تنها می تواند انرژی لازم برای غلبه بر این انرژی را آن به خود بدهد بلکه می تواند به آن یک انرژی جنبشی اضافه شده هم بدهد. پس به طور کلی تحت احوال یک نیروی حرارتی الکترون ها از اتم ها جدا شده و ما زاد انرژی باعث ستاب زدن آنها

می شود. و اینها با سرعت، یک انرژی جنبشی بدست می آورند.

برای اینکه بتوانیم این الکترون را در یک مسیر مشخص هدایت کنیم یک قطب الکتریکی مثبت (آند) با ولتاژ مشخص مطابق سطح روبه رو در مسیر الکترون های رها شده قرار می دهیم. اما به سرعتی که انرژی مثبت این قطب الکتریکی نتواند انرژی خند الکترون را خنثی کند سپس الکترون با یک سرعت ثابت و بدون ستاب به سرعت خودش ادامه می دهد.



بدست آوردن طول موج یک الکترون:

میت $ev = \frac{1}{2} m_e v^2$
 که ولتاژ منفه آند

$$v = \sqrt{\frac{2V_e}{m_e}}$$

$$\lambda = \frac{h}{m_e v} = \frac{h}{\sqrt{2m_e eV}}$$

طول موج الکترونی با ولتاژ اعمالی رابطه عکس دارد.

که هر چه ولتاژ اعمالی بیشتر شود احتمال آن که بتوانیم به طول موج های کوچکتر و به رزولوشن های مناسب نزدیک تر بشویم.

$$\lambda = \frac{h}{p}$$

که p تکانه

$p = mv$ در حالت های طبیعی

حالت ها الکترونی و لوایتمونی و در $p = \gamma m v$
 واقع شوی

$\gamma = \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}}$
 سرعت نور

نتیجه گیری:

$$\lambda_e = \frac{h}{\sqrt{2m_e eV \left(\frac{1+eV}{2m_e c^2} \right)}}$$

ساده تر $\lambda_e = \frac{1.5}{\sqrt{(V + 10^{-6} V^2)}}$
 که ولتاژ
 که ولتاژ

که در این فرمول همه واحدها نشان داده و تائیدی با همند.

✓ Example: اختلاف پتانسیل 10.1 keV باشد، طول موج را حساب کنید.

$$\lambda_e = \frac{1.5}{\sqrt{10 + 10^6 (10^2)}} = 0.149 \text{ nm} \quad \underline{149 \text{ pm}}$$

چون الکترون در این جهت در خدای حرکت می کند و n خلاء برابر با 1 می باشد $n=1$ از فرمول d حذف می شود و چون الکترون در یک مسیر مستقیم حرکت می کند به جای $\sin \alpha$ خود α را می گذاریم پس:

✓ اند α را حدود 5 در نظر بگیریم و آنالیز را در 10.1 keV انجام دهیم

$$d_{\min} = \frac{0.1611}{\alpha}$$

احتمالاً 1 ای در حدود 3.7 pm بدست می آوریم و با توجه به این عدد

می توانیم رزولوشن یا همان $d_{\min}$ را هم بدست آوریم:

$$d_{\min} = 0.4514$$

الکترون فائده سلولی می تواند حدود 10^6 برابر رزولوشن را بهبود دهد. اما مسئله این است که رزولوشن دقیقاً 0.45 pm نیست پس اگر چه که سر راه آن یک سری اثرات مغناطیسی قرار داد که این اندازه ها به آن نیروهای شعاعی وارد می کنند و سعی می کنند این Focus شود. اما الکترون چون پراش می آید و پراش می آید پس گاهی به محیط اطرافش آسیب می زند. و در حقیقت تمام سطح آن نمی تواند به کار رود و رزولوشن مناسب را به ما بدهد. نهایت رزولوشنی که می توانیم انتظار داشته باشیم در حد 7 nm است.

در ارزیابی های بیولوژیک همین نانوتقوا آنالیز هم خیلی از نیازهای ما را برطرف می کند. و بایدی که در الکترون فائده سلولی رخ می دهد:

الکترون پس از ترمینال می بیند به سمت Sample می رود و با آن برخورد می کند که ممکن است پس از برخورد با Sample به عقب برگردد.



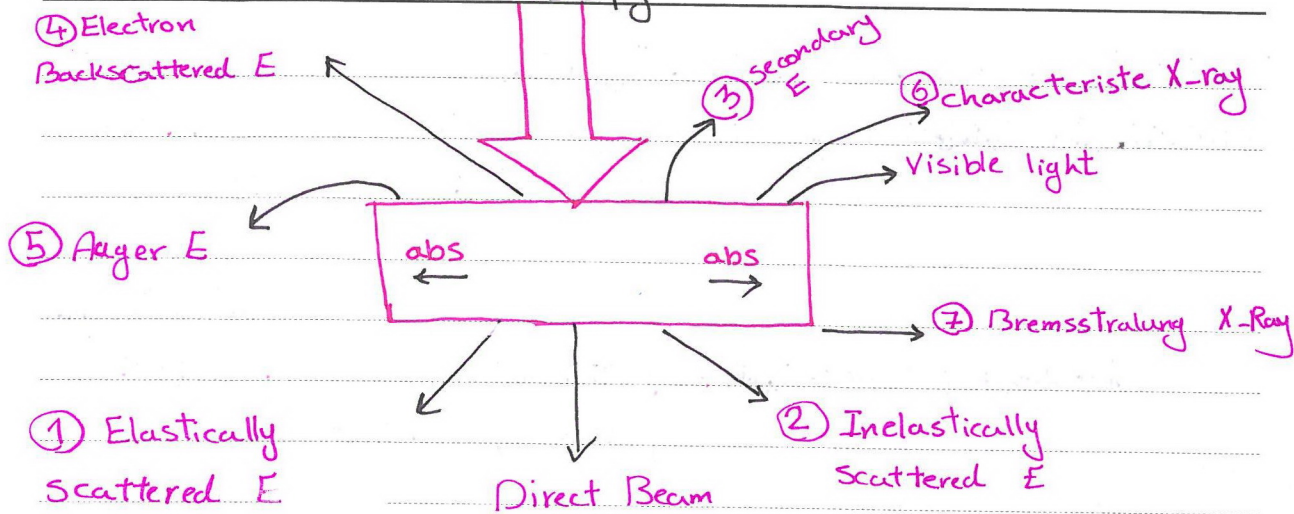
یا اینکه به سمت جلو حرکت کند یعنی ما می توانیم $\text{backward scattering}$ (پراش معکوس) داشته باشیم یا اینکه $\text{forward scattering}$ (پراش رو جلو) داشته باشیم

و پرتو یا الکترون به مسیر خودش ادامه می دهد اما این بار دیگر در مسیر مستقیم نیست بلکه از مسیر اصلی خودش منحرف شده است و برخی از الکترون ها هم

absorb Sample → abs

می توانند جذب Sample شوند و از بین بروند.

Microscopy



1. الکترونی است که در حال حرکت بوده اما در مسیرش فقط به یک ماده برخورد کرده و جهتش عوض شده (اگر انرژی اش تغییر نکرده است).

2. برهم کنش کرده، یک مقدار از انرژی اش را به سلب تحول داده و جهتش هم عوض شده، در حقیقت همان الاستیک است که انرژی اش هم تغییر کرده.

3. به سطح می خورد و بعد یک الکترون از سطح جدا می کند چون بسیار پر انرژی است، پس در واقع الکترونی که جدا شده الکترون نمونه (Secondary E) می باشد. (پس در واقع الکترون منفه است که توسط الکترون ورودی جدا شده است).

4. الکترونی است که ما زده ایم به نمونه برخورد کرده، هنوز هم انرژی دارد اما به سمت عقب برگشته (از هسته فرار کرده) انرژی آن کمتر از (Secondary E) می باشد.

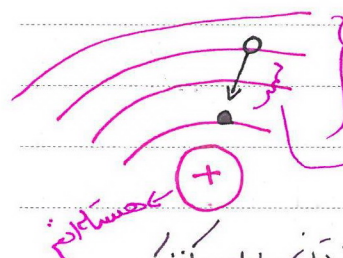
5. الکترونی است که در صورت برخورد الکترون دلیلی به آن جدا شده، و توسط الکترون دوم جدا می شود.

6. UVB به قدری پر انرژی هستند که می توانند الکترون های لایه آخر را جدا کنند و به الکترون های لایه های درونی برانند.

گاهی اوقات یک الکترون پر انرژی به الکترون های درونی برانند لایه برخورد می کند و این الکترون ها را به لایه های بالاتر می رانند.

می کنند سپس از لایه های بالاتر، وقتی این الکترون ها می خواهند به جای خود بازگردند یک فوتون ساطع می کنند که ما به آن **characteristic x-ray** می گوئیم.

چون هر اتم تعداد لایه های مشخصی دارد انرژی های **Binding** (مستوی) مشخصی هم دارد پس انرژی که می تواند جدا کند به ازای هر لایه، افزایش آن ویژه است، یعنی خصل آن ماده است. به همین دلیل به آن **characteristic x-ray** می گوئیم.



7. الکترون پراشگری تحت جاذبه هسته و ذرات الکترون قرار می گیرد. اتفاق می افتد باعث می شود که نتواند این الکترون را بلند کند، اما مقداری مسیر آن منحرف می شود و به دنبال آن انرژی جنبشی آن نیز متفاوت می شود. تفاوت انرژی اولیه و انرژی ثانویه را به صورت یک فوکل ساطع می کنند (پرتوی X تفرقی)

مابرای مثل تصویربرداری

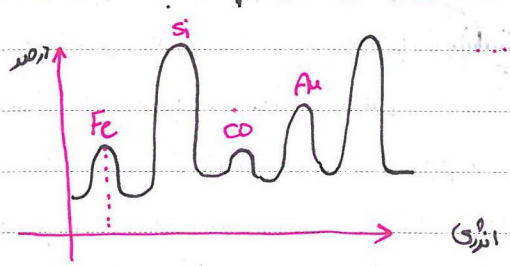
Transmission electron ← TEM
Microscopy Direct Beam
← الکترون های عبوری را detect می کند

Secondary electron ← SEM
Direct Beam
← الکترون های سطحی را detect می کند

characteristic x-ray می توانیم به کمک خوداربینیم و مشخص کنیم که چه ماده ای دقیقاً در نمونه ما وجود دارد.

TEM - EDX
SEM - Energy dispersive X-ray spectroscopy
یا است که باید وجود داشته باشد

جلسه ۵
وقتی که لیزر کنیم
X-ray ساطع می شود ما می توانیم یک Detector داشته باشیم که این X-ray را Detect کند و طبعی همانند خوداربینی روی دهد. (انرژی بر اساس در صد و احتمال به ما می دهد) و اپراتور برای ما فارسی می کند که در هر کجا چه چیزی داریم، مثلاً در اینجا Fe داریم یا در اینجا Co داریم و...
جلسه ۶



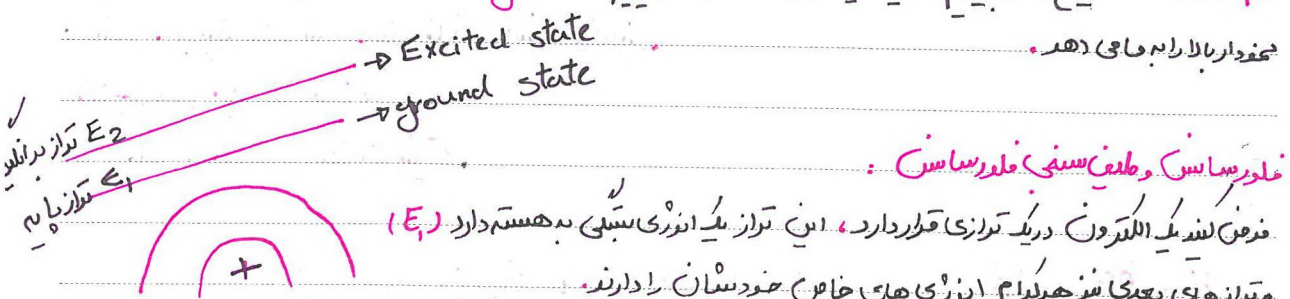
ما با آنالیز (Energy dispersive X-ray Spectroscopy) EDA X

EDX به ما می‌گوید که چه الکترون‌هایی در Sample ما وجود دارد. فرض کنید ما یک نانوذره ساخته ایم و بعد می‌خواهیم ببینیم آیا در ذره ای که ساخته ایم چه موادی که استفاده کردیم در ساخت آن شرکت کرده اند یا نه؟! که EDX به ما می‌گوید که واقعاً این کار انجام شده است یا خیر.

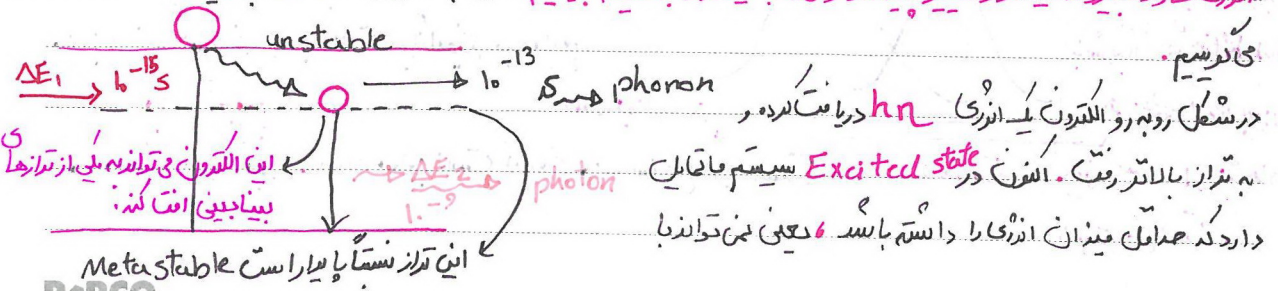
این دستگاه یک Mode دیگر هم دارد آن هم این است که جدای از این که به ما طیف بدهد، می‌توانیم روی حالت X آن Mark کنیم تا لایترنیک. X-ray آن را detect کند و بعد از آن بخواهیم که هر چه Detector آن لایترنیک X-ray از Fe گرفت در اینجا به صورت یک نقطه نمایش دهد.  و به صورت نقطه نقطه فراوانی آهن را در هر جایی از Sample که دانسته باشیم نمایش می‌دهد.

حال فرض کنید روی یک سلول، یک سری نانوذره را به صورت هدفمند هدایت کردیم. (ما می‌دانیم که receptor ما در نقاط خاصی از سلول تجمع دارند) محلاً تصویر SEM ما یک تصویر سیاه و سفید می‌باشد. برای اینکه مطمئن شویم ذرات نشان داده شده همان آهن مورد نظر ما هستند Map آنرا می‌گیریم. Map به این شکل بود و مطمئن بودیم که ذره ما آهن وجود دارد. می‌فهمیم که انتقال هدفمند ما به درستی صورت گرفته است.

Map روشن به prove کردن کار مهندسی ما کمک می‌کند. وقتی که در Mode EDX است می‌توانیم از آن تنها Map (نقشه توزیع) را بگیریم. یا اینکه اگر در EDX بخواهیم هر چه X-ray گرفتگی را به ما نشان بدهد، طیف بخواهیم که دوباره را به ما می‌دهد.



حال الکترون می‌تواند بین ترازهای مختلف بفرود آید (اما نه به صورت خود به خودی)، بلکه برای این کار به یک انرژی Activation نیاز دارد. در زمان تراز ما یک انرژی به اندازه $\Delta E = E_2 - E_1$ توسط یک فوتون به الکترون می‌دهیم (یعنی الکترون می‌تواند به قدری انرژی ما را جذب بکند که یک تراز تغییر پیدا کند و عملاً به یک تراز برانگیخته بیاورد). حال به الکترونی که در تراز برانگیخته است Excited می‌گوئیم.



انرژی ما زاد زیاد باقی میماند پس به این تراز **unstable** می‌گویند. یعنی تراز است که الکترون اصلاً نمی‌تواند در آن پایدار باقی بماند. جذب فوتون در بازه ای در حدود 10^{-15} s اتفاق می‌افتد. در ترازهای پایدار **lifetime** یا بقای الکترون بسیار کم است. الکترون به محض قرار گرفتن در این تراز **decay** می‌کند. یعنی بازمی‌گردد و انرژی آزاد می‌کند.

ما در بین این دو تراز می‌توانیم ترازهای بیابینی داریم که می‌توانند پرسوند. مخصوصاً زمانی که مقیاس را ملوکولی تصور کنیم. الکترون‌های مختلف از یک اتم و ترازهایی که حالت پیوندی ایجاد کرده اند داریم.

این الکترون می‌تواند به یکی از این ترازهای بیابینی افتد. یعنی الکترون حاضر است انرژی خودش را از دست بدهد و به یکی از این ترازهای بیابینی که به آنها **Metastable** می‌گویند افتد. (تراز نیمه پایدار)

تراز **Metastable** تنها یک مقداری از تراز **unstable** پایدارتر است. که این جابجایی در بازه 10^{-13} s اتفاق می‌افتد. الکترون در **Metastable** باز هم پایدار است و تحویل دارد انرژی از دست بدهد و **Decay** کند. (وقتی تراز پائین تر است یعنی عملاً انرژی آن کمتر است و الکترون برای بازگشت یک مقدار انرژی به صورت **phonon** (سببهای

انرژی حرارتی که انرژی جنبشی سبک را افزایش می‌دهند) آزاد می‌کند. تا سبب **phonon** منجر به افزایش انرژی جنبشی ساختار و در نتیجه تولید حرارت می‌شود.

الکترون در تراز **Metastable** هم نمی‌تواند باقی بماند پس به حالت پایه خود بازمی‌گردد. در نتیجه آن فوتون آزاد می‌شود. به پرتو آزاد شده، پرتو فلورسانس می‌گویند.

مقاسم طول موج پرتوها:

نکته: فوتون اصلاً پرتو نیست.

$$E = \frac{hc}{\lambda} = hf$$

$$\Delta E_1 > \Delta E_2 \rightarrow \lambda_2 > \lambda_1$$

فلورسانس طول موجی بلندتر است.

پرتو پرتو

Excited

Emit

اولین طول موج، طول موجی است که کوتاهتر است و ما با آن الکترون را به حالت برانگیخته برده ایم

(طول موج تحریک)

طول موج

الطیف ما به قدری روبرو با سبب آن می‌باشد که **Stokes shift** یا **Redshift** بسیار

یعنی به سمت طول موج های بلندتر رفته است.

دومین طول موج، طول موجی است که این ماده ساطع کرده است (Emission)

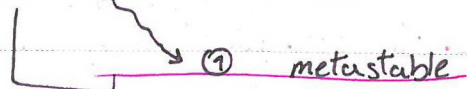
در حالت کوانتومی برای ما احتمال لذایح مختلف وجود دارد یعنی هم می تواند مستقیم به تراز پایه برود و یا اینکه ابتدا یک فوتون و بعد یک فوتون ساطع کند و به حالت پایه بازگردد.

نسبت به این که کدام احتمال قوی تر است ما آن رخ داد را در نظریه هم (نسبت به حالت حضور الکترون) فلوتورسانس و فسفرسانس بیشتر در طول موج های مرئی اتفاق می افتد. فلوتورسانس در روز فرو تا برد خاکی ندارد اما پایه تمام حقیقت است.

فسفرسانس:

① unstable

Basic فلوتورسانس و فسفرسانس یکی است.



ترازهای Singlet ΔE_1 → triplet

★ در فسفرسانس به الکترون انرژی می دهیم و بعد به حالت برانگیخته می رود.

برانگیخته ای که unstable است و باز هم می تواند

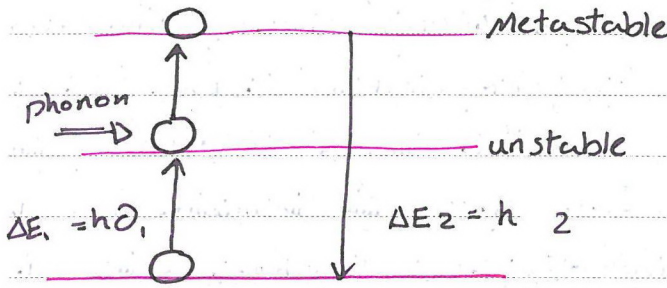
13- ما شایه در آن بجاند.

از unstable ، decay می کند و به metastable می آید ، اگر از اینجا Decay کند و این باید فلوتورسانس می شود اما بعضی از حوادث هستند که این کار را انجام نمی دهند و از اینجا Decay نمی کنند و به پایین نمی آیند ، در اتم های مجاور این الکترون یک لذر انجام می دهد که به آن لذر درون سلولی می گویند (Enter system crossing)

به این ترازها ، ترازهای Singlet می گویند یا همان ترازهای یگانه ، و به ترازهای که در آن لذر انجام میدهد تراز triplet می گویند . چون جایی داریم الکترون هایی که در اوربیتال قرار می گیرند نمی توانند Spire های یگانه داشته باشند . یک الکترون با Spire مسدود را تصحیح کردیم ، با همان Spire به تراز یگانه بازگشت اما برای بازگشت به تراز triplet باید جهت Spire خود را عوض کند ، در اوربیتال سلف Spire الکترون مقداری باید از تراز هم می شود که باید از آن می تواند از چند رانیم ، چند دقیقه ، چند روز و متفاوت باشد .

حال اگر تراز triplet ، decay کند و به تراز پایه بیاید فسفرسانس رخ داده است و طول موج شایه را ساطع می کند . اتفاق دیگری که ممکن است رخ دهد این است که دوباره به تراز Singlet بازگردد و spin خودش را بدست آورد و بعد به تراز پایه بازگردد که می گویند آن فلوتورسانس تأخیری انجام داده است .

در فلورسانس :

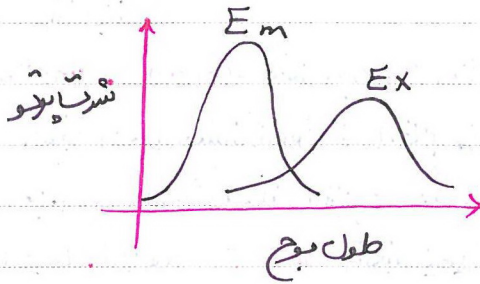


یک مفهوم دیگه در فلورسانس وجود دارد، یعنی یک حالت دیگه هم محصل است و آن این است که شما تر از فلورسانس پایه دارید و الکترون شما در این تراز پایه قرار دارد، به آن یک انرژی به اندازه

$\Delta E_2 > \Delta E_1 \rightarrow \lambda_2 < \lambda_1$ می دهیم که برابر با همان ΔE است و این به تراز **Excited** می رود. اما حالت تراز **Metastable** کمی بالاتر داریم و تقریبات شبیه ما زیاد است.

این می تواند یکلیج انرژی جنبی از شبکه دریافت کند (فوتون) و تراز خودش را ارتقا دهد. حال می تواند از حالت **Metastable** که ΔE بیشتر از فوتون است **decay** کند و به حالت پایه بازگردد.

الکتن $\Delta E_2 = h\nu_2$ است که در نتیجه آن $\Delta E_2 > \Delta E_1 \rightarrow \lambda_2 < \lambda_1$ است که طیف فلورسانس آن به صورت زیر است.



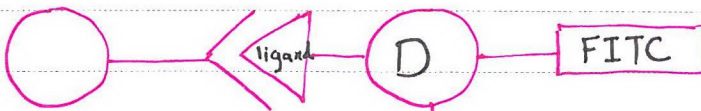
به این حالت **Antistockshift** می گویند.

کاربرد فلورسانس :

حالی تو اینم یک سری مواد فلورسانس را با به سلول معرفی کنیم مثل **FITC** (فلورسین)

فرض کنید ما یک سیستم نانو داریم که این سیستم نانو وظیفه دارد یک سری تعیینات پروتئینی یا تعیینات ژنتیکی در سلول ایجاد کند، ما برای همین اینکه آیا این سیستم نانو توانسته است به سلول برسد و **Bind** شود به پروتئین یا خیر، نیاز داریم که سیستم خود را **Mark** در کنیم، برای **Mark** در کردن از این ماده فلورسین استفاده می کنیم.

یک سامانه است که در آن دارو و یا هر چیزی (دارو، پروتئین، ...) وجود دارد. و غاروی این سامانه **FITC** را قرار می دهیم، از طرفی یک **ligand** می گذاریم که این **ligand** می تواند به بهم گش خاص بایک سری **Receptor** خاص انجام دهد.



PAPCO سامانه حمل دارو (Drug Delivery System)

حالا اگر این **ligand** واقعاً به یک **Receptor** در یک سلولی اتصال پیدا کند چون به این سازه‌ها یک ماده فلورسسان را اتصال پیدا کرده، اگر ما آن طول موج را قرار دهیم عملاً سلول‌ها خاصیت فلورسسان را از خودش نشان می‌دهد. ما در سلول‌ها **GFP** داریم (**Green Fluorescence pro**) پروتئین فلورسسان زای سبز. این پروتئین‌ها به صورت ذاتی در سلول‌ها وجود دارد و خیلی از آزمایشات بالینی را بر اساس خاصیت فلورسسان زایی این سلول‌ها طبع ریزی و ارزیابی می‌کنند.

گاهی اوقات میزان این پروتئین در سلول سالم و ناسالم تغییر می‌کند. (از طریق سرت فلورسسان می‌توانیم سالم یا ناسالم بودن سلول را تشخیص دهیم)

و حتی که فلورسسان ما یک تصویر معمولی دارد که در تصویر معمولی در زیربنای قلع می‌توانیم ببینیم که سلول کی قرار دارد.

حالا وقتی که نگاه می‌کنیم و وارد **Made** فلورسسان ما یک تصویر می‌شویم و می‌بینیم که الان دقیقاً کدام قسمت‌ها به سلول سلول فلورسسان دریافت می‌کند و یا به صورت فضاهای خارج سلولی فلورسسان دریافت می‌کند. آن موقع می‌توانیم بفهمیم که این سازه‌ها درون سلول است یا خارج سلول.

آزمایش‌های ما **in-vitro** و **in-vivo** هستند. اول ما **in-vitro** (بیرون تنی یا درون آزمایشگاهی) انجام می‌دهیم. گاهی اوقات که از **in-vitro** نتیجه مناسب گرفتیم بعد سراغ **in-vivo** (همان درون تنی) می‌رویم (آزمایش‌های درون تنی انجام می‌دهیم)