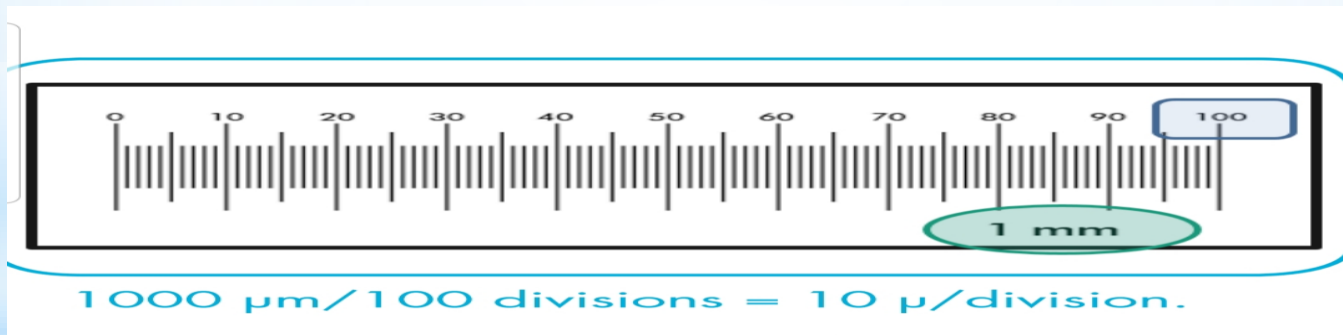




University of Isfahan
Biology Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
and Microbiology
Farzaneh Forouharfar

عنوان

اندازه‌گیری ابعاد اجسام میکروسکوپی در میکروسکوپ نوری



اهداف

1. کالیبره کردن (Calibration) میکرومتر چشمی (Eye Piece Micrometer) در بزرگنمایی های مختلف میکروسکوپ نوري
2. تعیین ابعاد (طول و عرض) یاخسته‌ها
3. اندازه‌گیری قطر اندامك‌ها یا سلول‌ها
4. تعیین سطح میدان دید و کاربرد آن

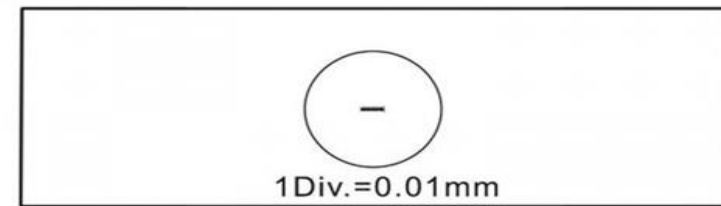
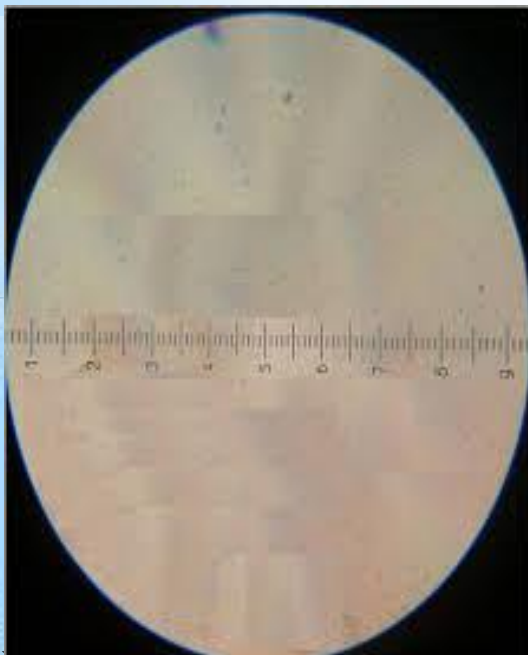
مقدمه

اندازه‌گیری ابعاد یاخته‌ها و اجزاء درون یاخته‌ای با استفاده از میکروسکوپ نوری یکی از راه‌های مهم تشخیص گونه‌های مختلف موجودات زنده مثل قارچ‌ها، باکتری‌ها، پروتوزوآها و غیره می‌باشد. همچنین اندامک‌های درون سلولی را با تعیین ابعاد آن‌ها می‌توان به طور دقیق‌تر شناسایی و بررسی کرد.

اندازه سلول‌های یک بافت مشخص در گونه‌های مختلف متفاوت است و در بدن يك موجود زنده در بافت‌های مختلف اندازه سلول‌ها یکسان نیست. وقتی يك سلول به اندازه طبیعی خود می‌رسد، رشد آن متوقف می‌شود و یا تقسیم می‌گردد. گاهی اوقات ممکن است سلول این روند طبیعی را طی نکند و دچار حالت غول‌پیکری و یا رشد کمتر از حد طبیعی شود که حالتی غیر طبیعی می‌باشد. بنابراین گاهی در مطالعات میکروسکوپی سلول‌ها و ارگانل‌های گونه‌های مختلف جانوری، گیاهی و سایر موجودات زنده نیاز به تعیین دقیق ابعاد سلولی یا اندامکی می‌باشد. برای تعیین اندازه واقعی نمونه در زیر میکروسکوپ به یک روش دقیق و استاندارد عمل می‌شود که با جزئیات کامل در این جلسه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

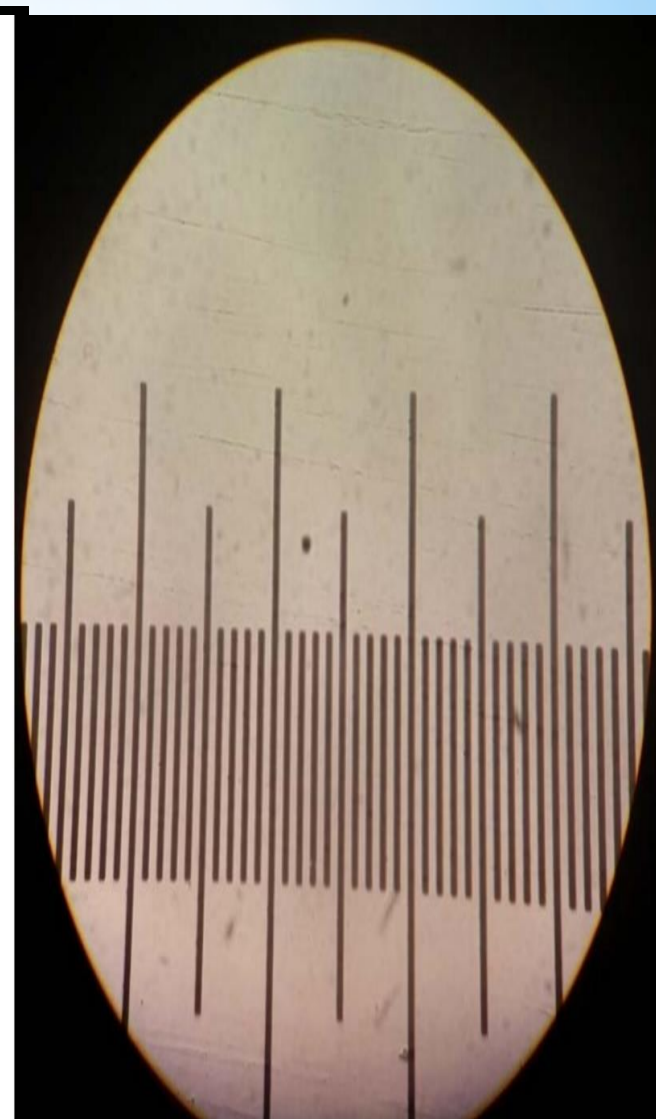
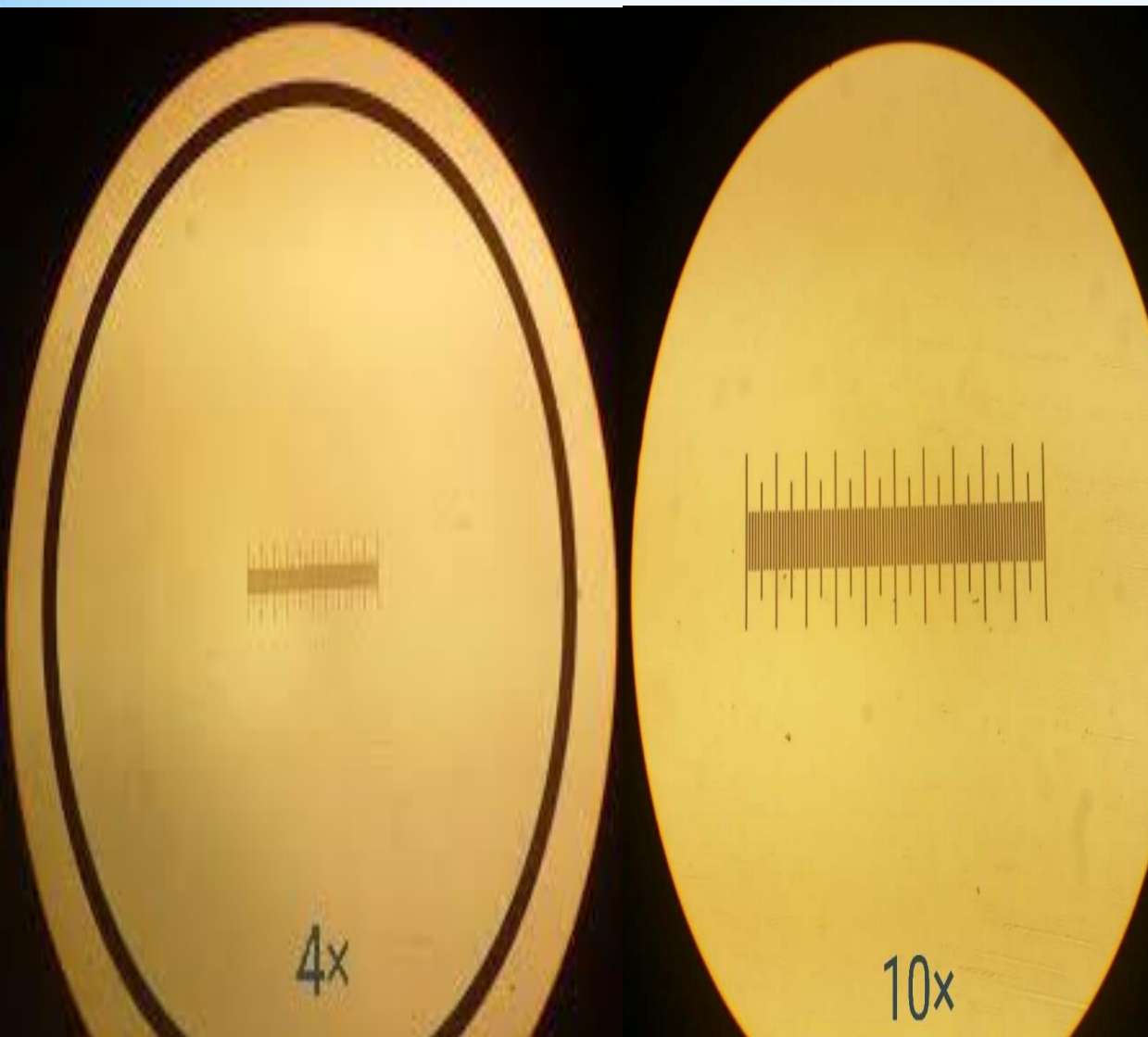
رایج‌ترین روش اندازه‌گیری در میکروسکوپ نوری استفاده از عدسی‌های چشمی خاصی به نام میکرومتر چشمی یا Eyepiecemicrometer یا اکولر مدرج می‌باشد. در درون این عدسی، خطی وجود دارد که به صد قسمت مساوی تقسیم شده و بدون مقیاس مشخصی می‌باشد.

وسیله دیگر مورد استفاده لام میکرومتری مدرج یا StageMicrometer می‌باشد. این لام شیشه‌ای قسمت مرکزی آن که با دایره سیاه‌رنگی مشخص و در آن یک فاصله 1 میلیمتری به 100 قسمت مساوی تقسیم شده است. بنابراین فاصله بین دو درجه متوالی در لام مدرج، $1/100$ میلیمتر است و چون هر میلیمتر معادل 1000 میکرون می‌باشد و در میکروسکوپ ابعاد را میکرومتری بیان می‌کنیم فاصله بین هر درجه یا دو خط متوالی از لام مدرج معادل 10 میکرون است.



TS-M1 / 106011

X Ruler $100 \times 0.01\text{mm} = 1\text{mm}$

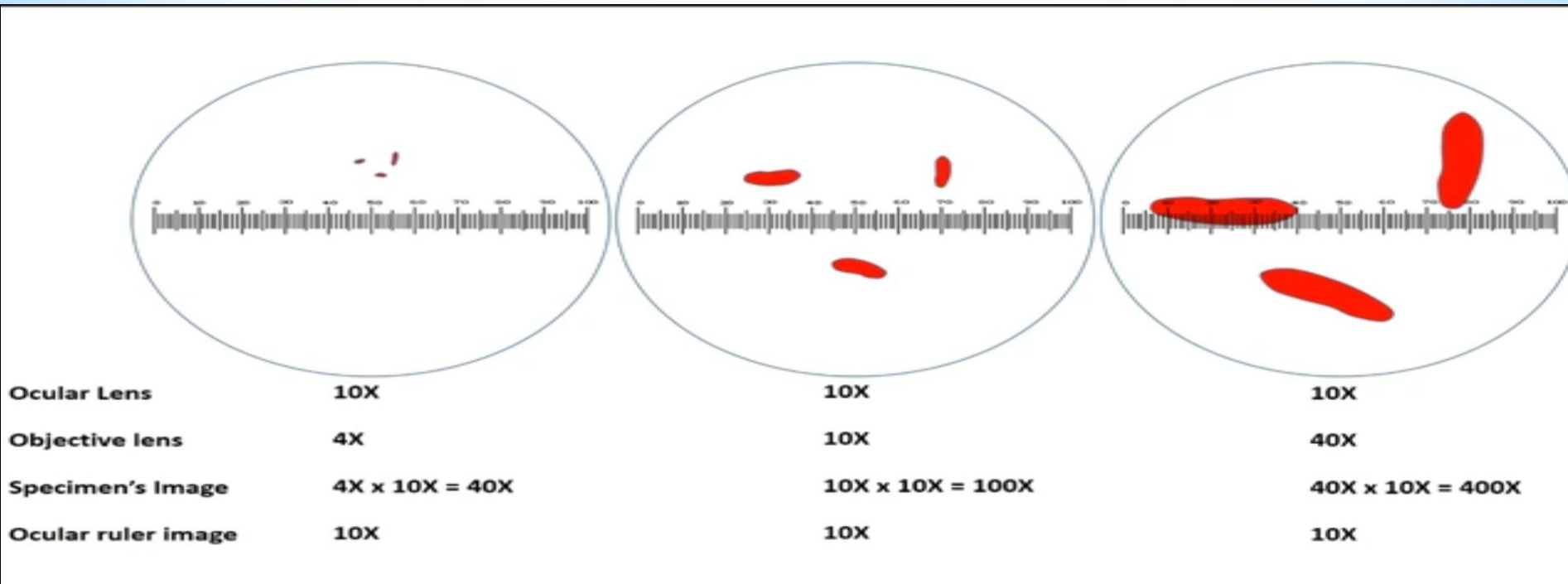


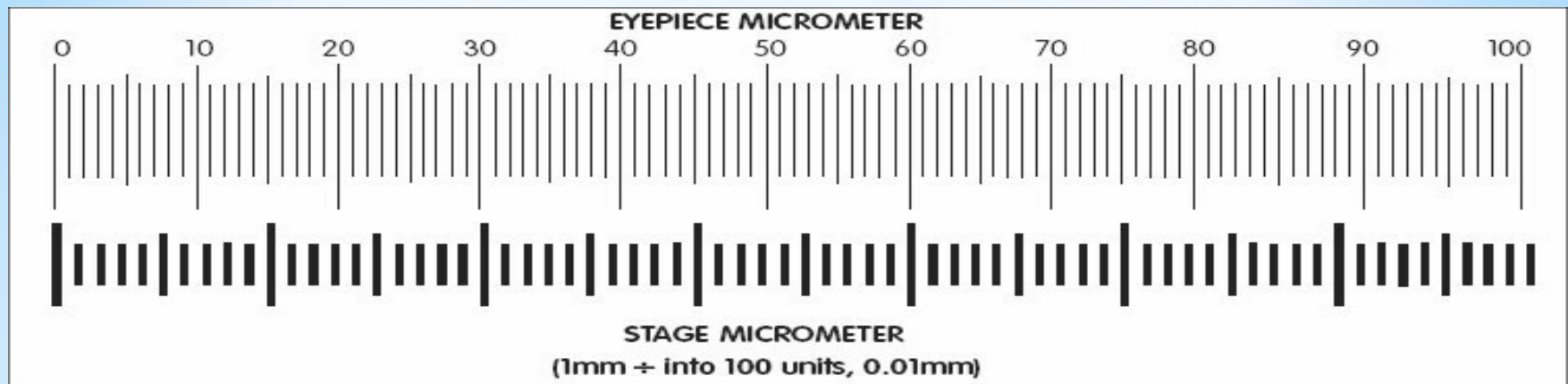
لام مدرج در بزرگنمایی های مختلف

40x

چرا برای اندازه گیری ابعاد نمونه های میکروسکوپی تقسیمات اکولر مدرج نمی تواند دارای مقیاس مشخص و ثابتی باشد؟

چون بزرگنمایی میکروسکوپ با استفاده از عدسی های شیئی مختلف تغییر می کند، بنابراین قبل از به کار بردن این میکرومتر جهت اندازه گیری ابعاد نمونه میکروسکوپی، لازم است مقیاس درجات آن برای بزرگنمایی های مختلف تعیین شود. به تعیین فاصله هر درجه از میکرومتر چشمی یا اکولر مدرج بر حسب میکرون در هر بزرگنمایی مشخص کالیبراسیون می گویند. برای این منظور از وسیله دیگری به نام لام مدرج یا StageMicrometer استفاده می شود.





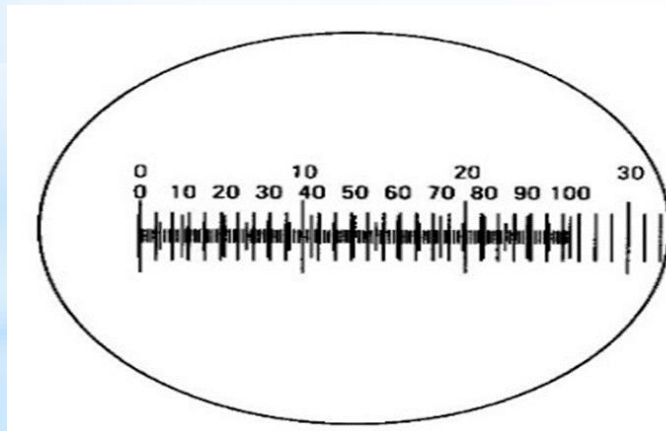
با بکاربردن این دو وسیله به طریقی که روش کار شرح داده شده است، در ابتدا بطور دقیق با استفاده از درجات منطبق شده از لام مدرج و میکرومتر چشمی عدد کالیبره میکرومتر چشمی برای هر بزرگنمایی محاسبه سپس با ضرب کردن عدد کالیبره در درجات منطبق شده میکرومتر چشمی بر روی نمونه میکروسکوپی ابعاد آن محاسبه می شود.

Calibration factor =

$$\frac{\text{number of SLIDE UNITS (s)}}{\text{number of EYEPIECE UNITS (e)}} \times 10\mu$$

Stage micrometer

- It is used to calibrate the Ocular micrometer.
 - It looks like a microscope slide but has a standard scale etched into it.
- The smallest divisions are 0.01mm
In length. It is just like a tiny ruler.
- $0.01\text{mm} = 10 \text{ micro m}$



لام مدرج و اکولر مدرج و طريقة انطباق آنها در میدان دید میکروسکوپ



مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1. لوگل

2. پیاز

3. لام مدرج

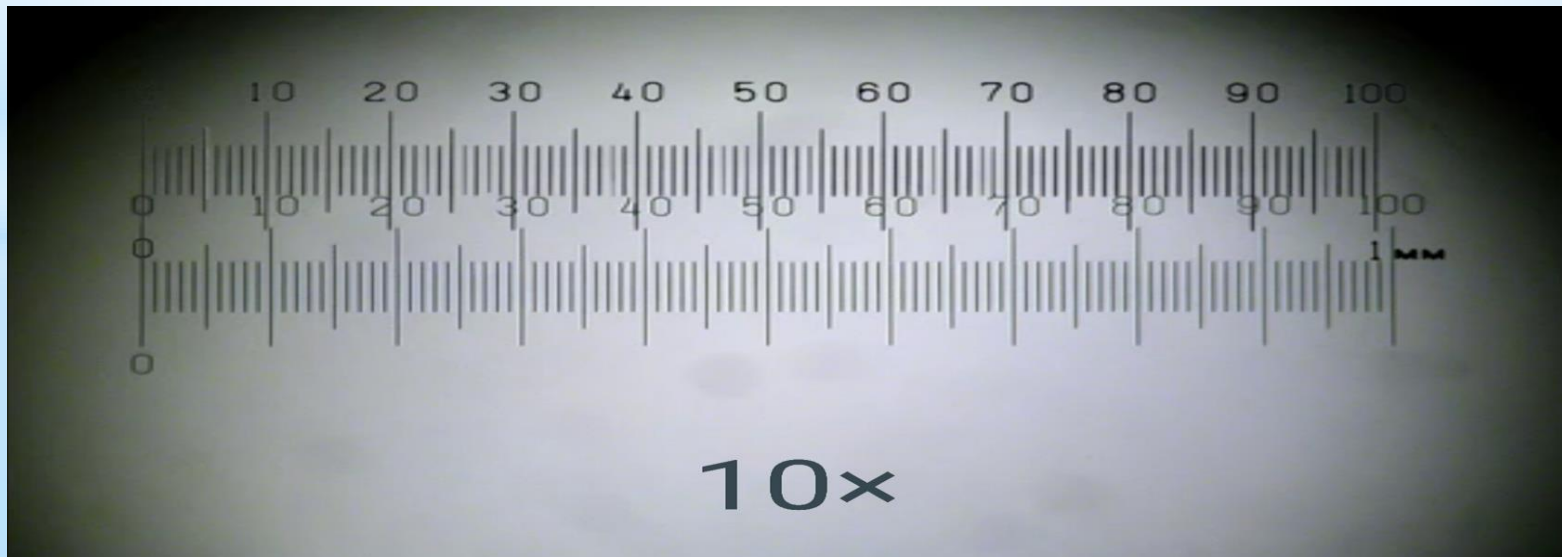
4. عدسی چشمی مدرج

5. میکروسکوپ نوری

6. لام ولامل

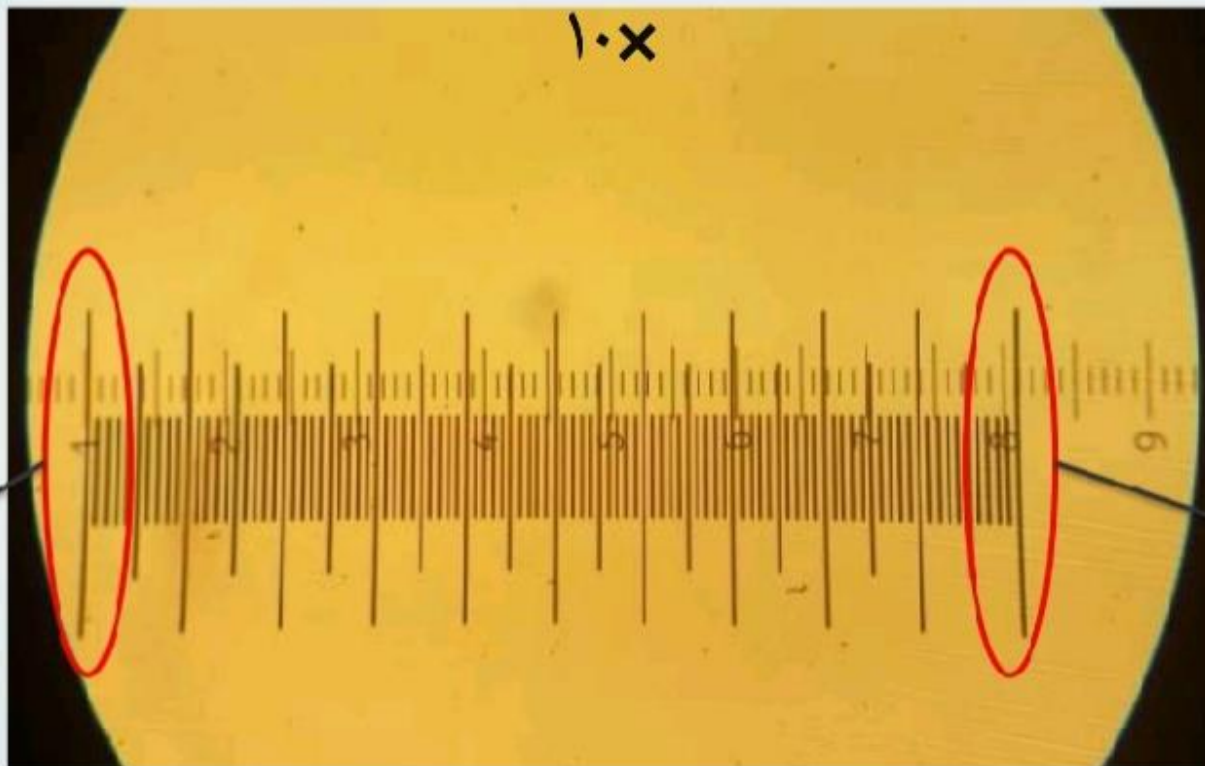
روش کار

1. برای تعیین مقیاس درجات اکولر چشمی یا اکولر مدرج در واقع کالیبره کردن این عدسی در بزرگنمایی‌های مختلف، عدسی چشمی معمولی میکروسکوپ را خارج کرده و به طور صحیح در جای مناسبی قرار دهید تا آسیب نبیند و اکولر مدرج را جایگزین کنید.
2. لام مدرج را روی صفحه میکروسکوپ قرار دهید و ابتدا در بزرگنمایی 4 و سپس در بزرگنمایی 10 و با بستن نسبی دیافراگم و کم کردن میزان نور ورودی میکروسکوپ کنتراست مناسب را تنظیم و بخش مدرج لام را پیدا کنید.
3. با حرکت تدریجی لام مدرج و چرخش اکولر مدرج هر دو درجه‌بندی را طوری بر هم منطبق کنید که از سمت چپ میدان دید اولین درجه‌ی لام مدرج دقیقاً در راستای اولین درجه‌ی اکولر مدرج باشد و این دو درجه را با پیچ‌های تنظیم کاملاً به هم نزدیک کنید.



تطابق لام و اکولر مدرج در بزرگنمایی

۱۰x



نقطه انطباق دوم

نقطه انطباق اول

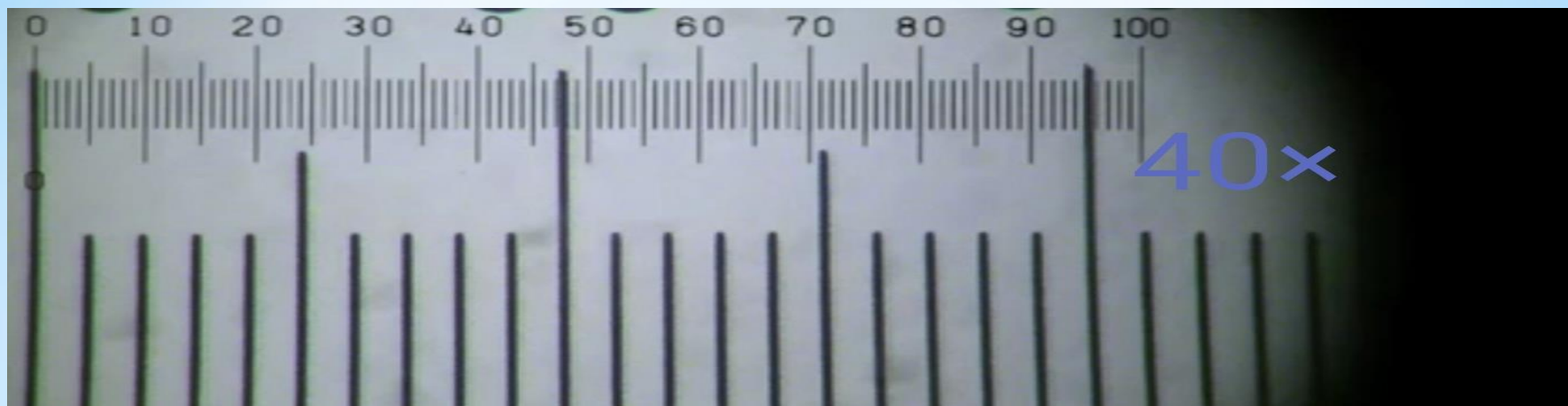
4. پس از انطباق در بزرگنمایی 10 از قسمت راست میدان دید آن دو درجه از لام و اکولر را که دقیقاً با هم انطباق دارند و مقابل هم هستند را شمرده و سپس حساب کنید که يك درجه از اکولر مدرج معادل چند میکرون می باشد. دقت شود که هر تعداد درجه که از لام شمرده شود بایستی در 10 میکرون ضرب کنید تا اندازه آن را بر حسب میکرون به دست آورید و این اندازه را معادل تعداد درجه ای از اکولر که شمردید قرار دهید و در تناسب مقدار 1 درجه از اکولر حساب کنید. عدد به دست آمده معادل با عدد کالیبره اکولر مدرج در بزرگنمایی 10 می باشد.

برای مثال با توجه به شکل اگر درجه 100 اکولر مدرج روی درجه 99 لام مدرج قرار گرفت خواهیم داشت : 100 درجه اکولر مدرج معادل 99 درجه لام مدرج ضربدر 10 میکرون یعنی 990 میکرون میباشد 1 درجه اکولر مدرج چند میکرون است؟

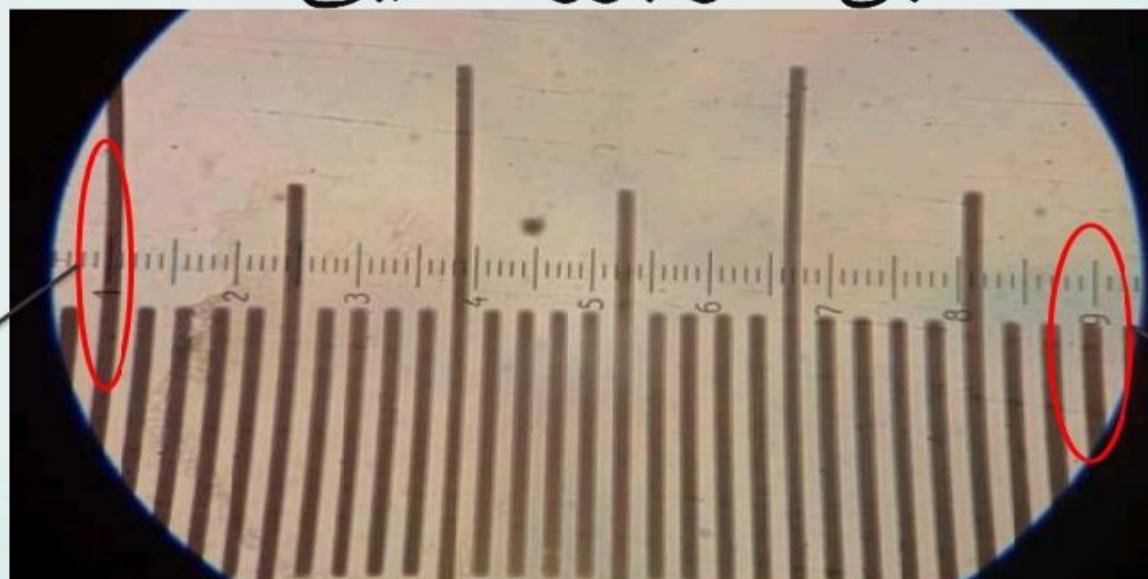
$$x = 9.9 \quad 100/1 = 99 * 10/x$$

بر اساس محاسبه فوق عدد کالیبره بزرگنمایی 10 یعنی فاصله يك درجه از اکولر در بزرگنمایی 10 معادل 9.9 میکرون می باشد.

5. با تغییر بزرگنمایی از 10 به 40 عدد کالیبره را برای بزرگنمایی 40 به دست آورید و کلیه موارد فوق را رعایت کنید. با توجه به تصویر درجه 95 اکولر مدرج دقیقاً بر درجه 20 لام مدرج منطبق است. پس 95 درجه معادل 200 میکرومتر در بزرگنمایی 40 میباشد. 1 درجه معادل چقدر است؟ که با یک تناسب ساده عدد 2.1 برای عدد کالیبره 40 بدست می آید.



تطابق در بزرگنمایی ۴۰x

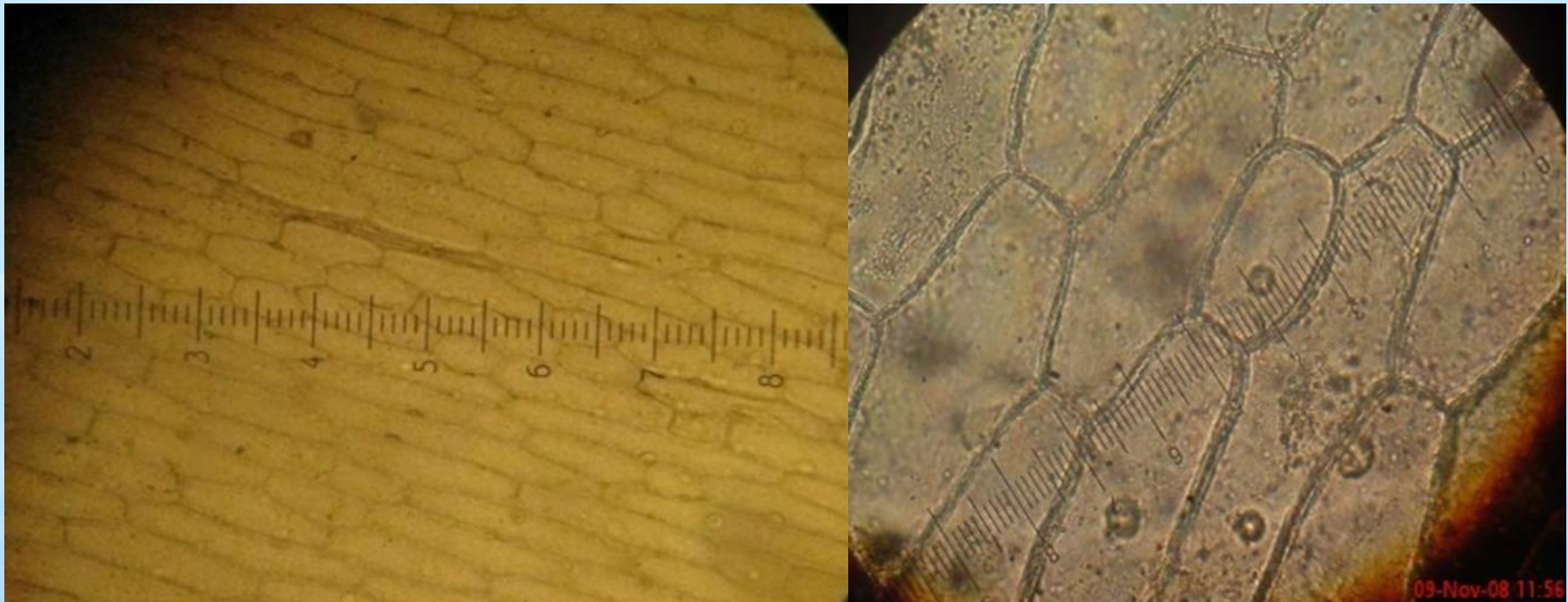


نقطه انطباق اول

نقطه انطباق دوم

6. اعداد کالیبره لنز 10 و 40 را یادداشت کنید تا در محاسبه ابعاد نمونه در بزرگنمایی‌های 10 و 40 از آنها استفاده کنید.

7. لام مدرج را از میکروسکوپ، خارج نموده و با استریپ گرفتن از بشره داخلی یا خارجی پیاز و رنگ آمیزی توسط لوگل، لام بشره را تهیه کنید و روی صفحه میکروسکوپ قرار دهید.

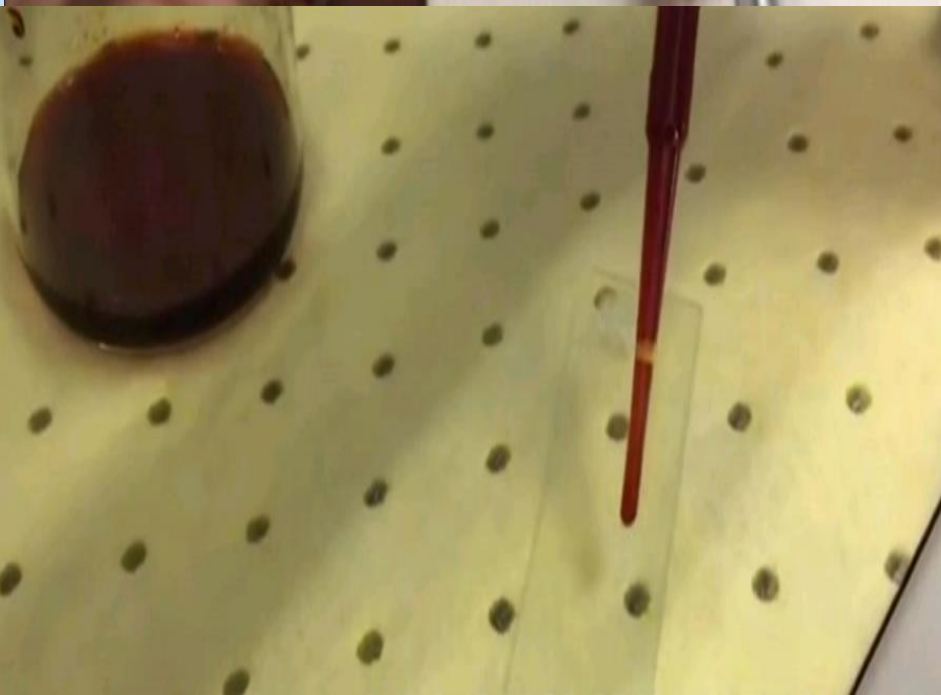


**اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های بشره پیاز و انطباق درجات
اکولر مدرج بر ابعاد سلول‌ها**

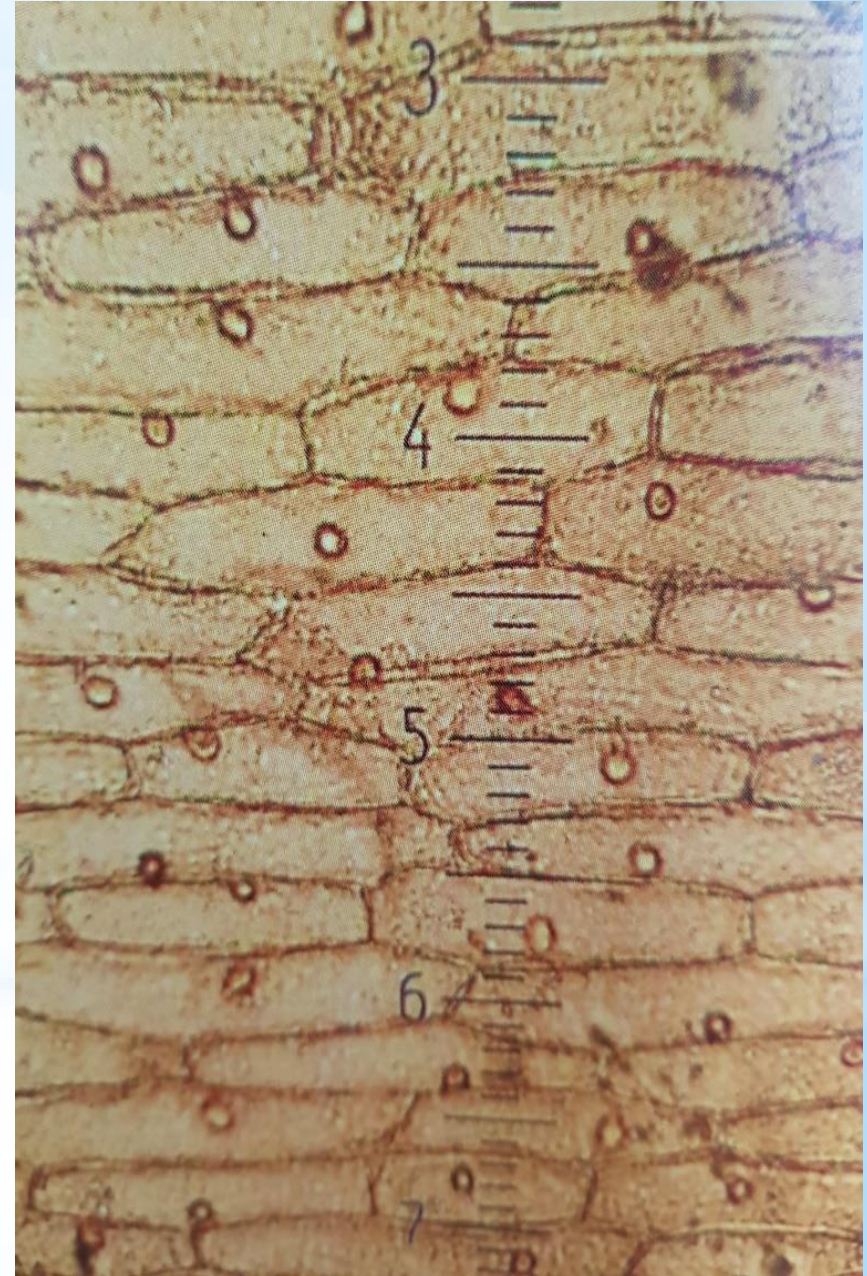
8. ابتدا در بزرگنمایی 10 طول سلول‌های پیاز را محاسبه کنید. به این منظور حدود 10 سلول در میدان‌های دید مختلف به طور تصادفی انتخاب و با چرخاندن اکولر مدرج، درجات آن را بر بزرگترین طول و بزرگترین عرض سلول منطبق و یادداشت کنید. سپس میانگین گرفته و در عدد کالیبره لنز 10 ضرب کنید. بدین ترتیب میانگین طول و عرض سلول‌های بشره پیاز به دست می‌آید. حتماً یادداشت کنید که از بشره خارجی نمونه برداری کردید یا از بشره داخلی تا در پایان آزمایش بتوانید اعداد و نتایج خود را با گروه‌های دیگر مقایسه کنید.

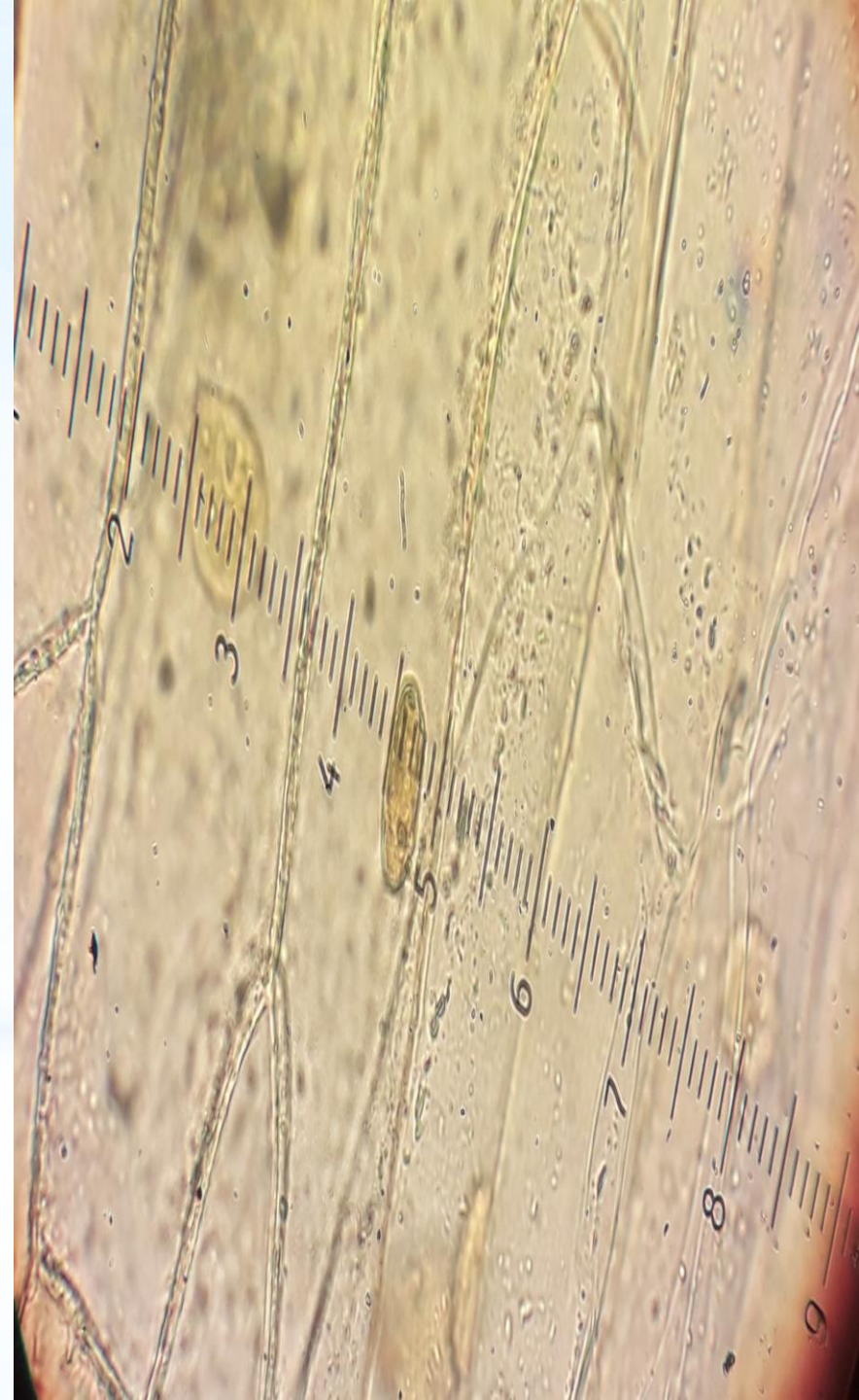
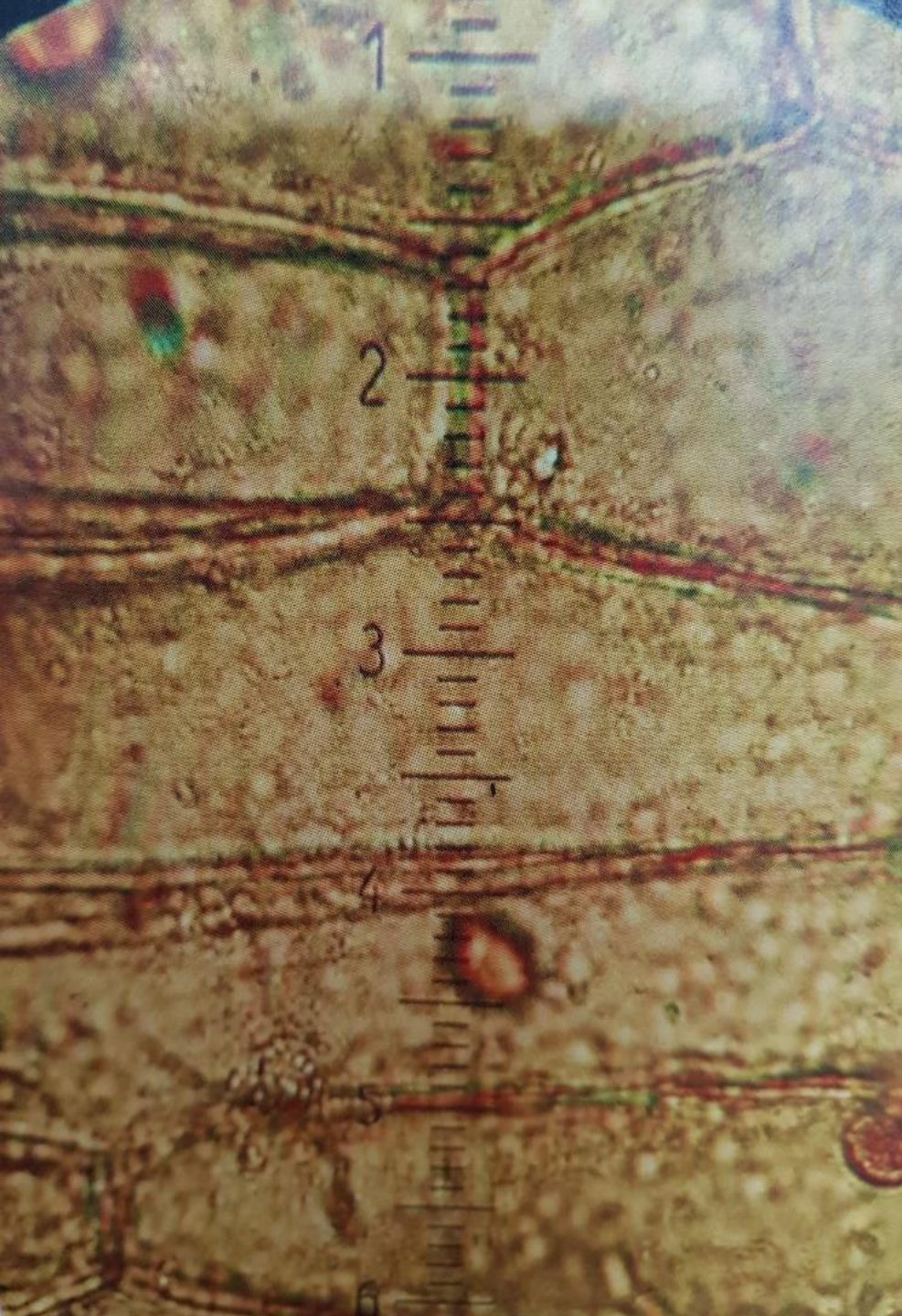
9. پس از رنگ‌آمیزی بشره با لوگل هسته به رنگ طلایی-زرد در می‌آید. در بزرگنمایی 40 میانگین قطر هسته را محاسبه کنید. (برای این منظور 10 هسته را انتخاب کنید.) و این بار میانگین درجات منطبق بر قطر هسته را در عدد کالیبره لنز 40 ضرب کنید.

به همین ترتیب شما قادر خواهید بود قطر برخی از سلول‌های کروی مانند گلبول‌های قرمز یا گلبول‌های سفید را محاسبه کنید و با مقایسه اعداد به دست آمده با قطر طبیعی سلول‌ها برخی از بیماری‌های خونی ناشی از تغییر اندازه سلول‌های خونی مانند تالاسمی را می‌توانید مشخص کنید.



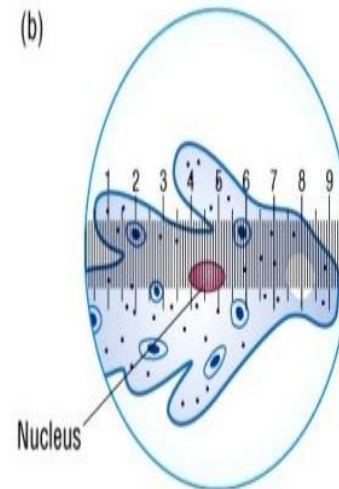
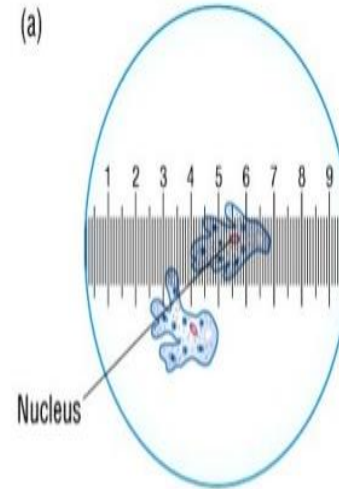
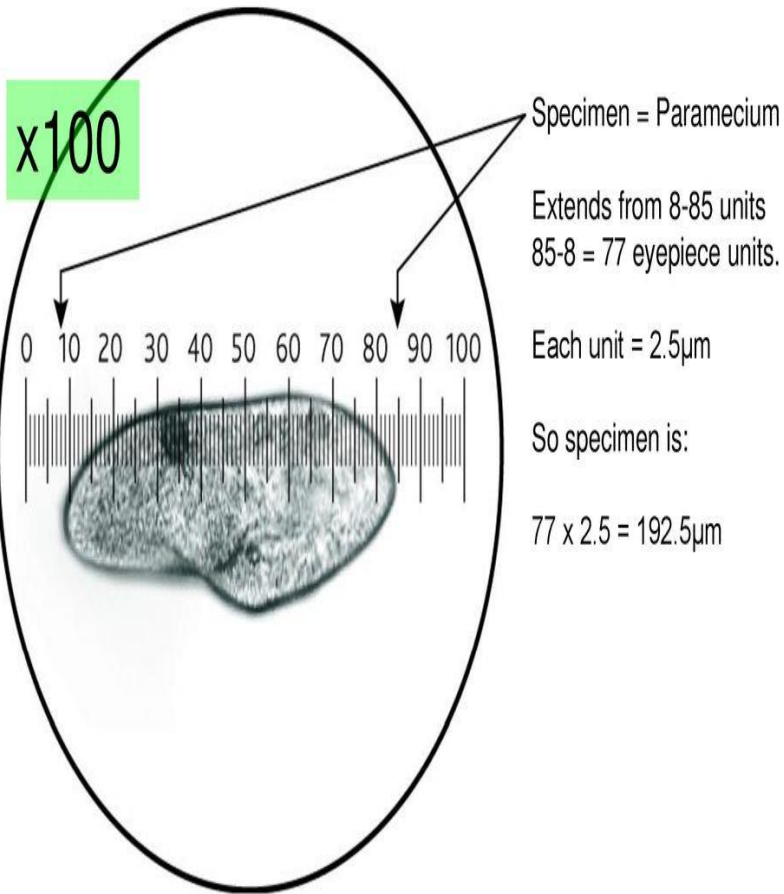
انطباق درجات اکولر مدرج بر ابعاد سلولها در بزرگنمایی های مختلف





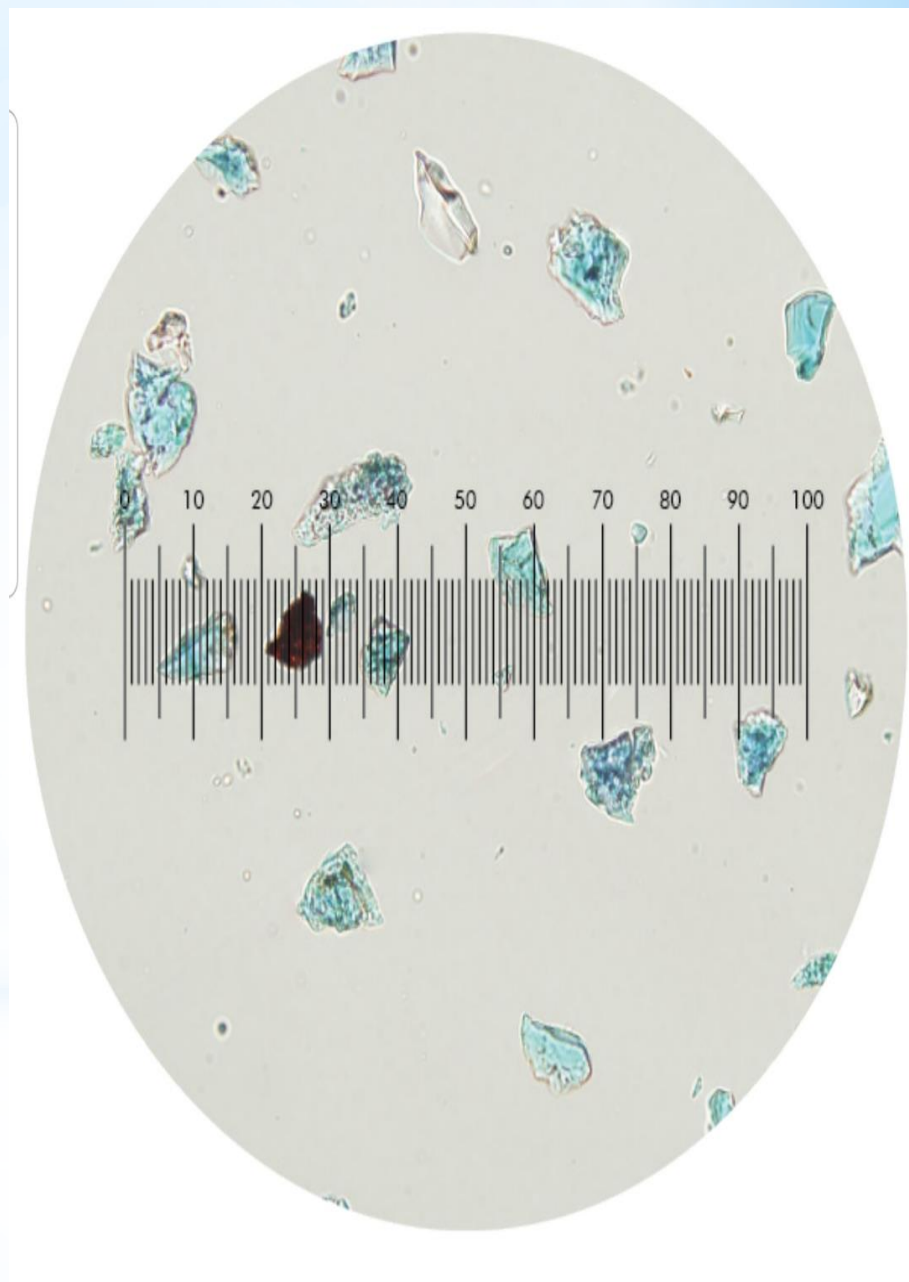
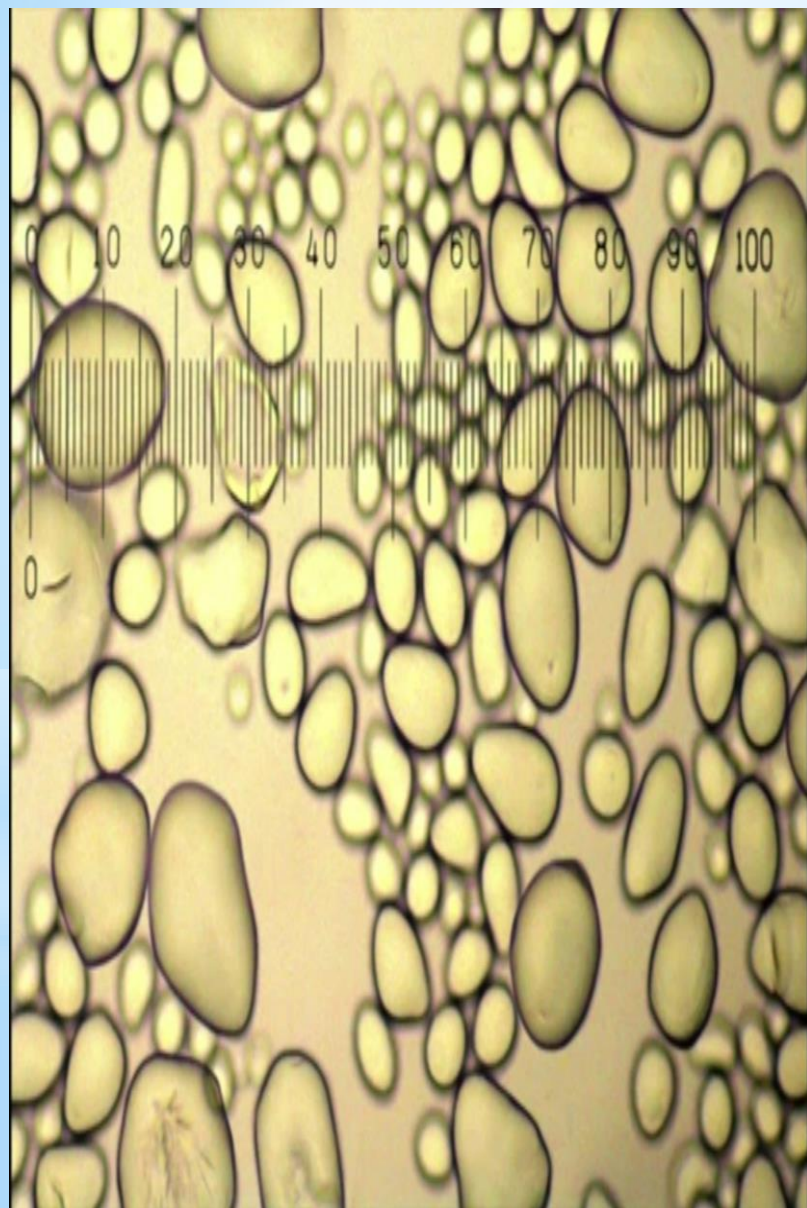
کاربردهای دیگر لام و اکولر مدرج در اندازه گیری ابعاد

Now measure specimen using calibrated eyepiece graticule

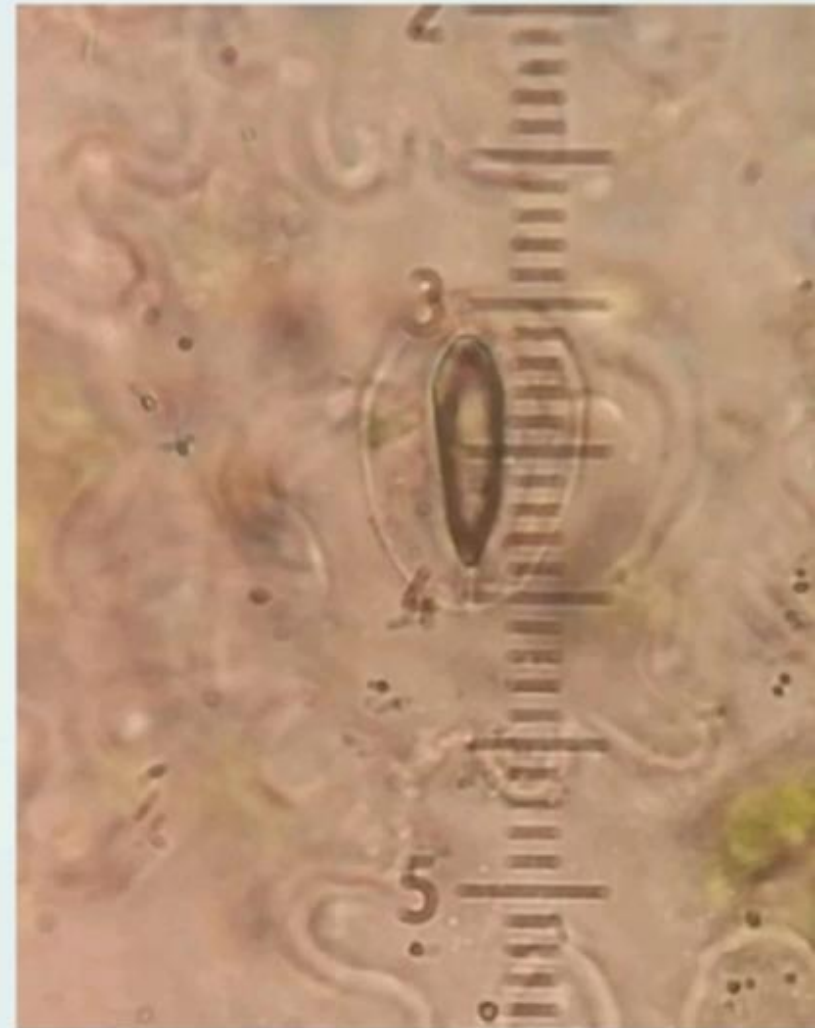


The eyepiece graticule remains constant no matter what magnification the cells are viewed at.

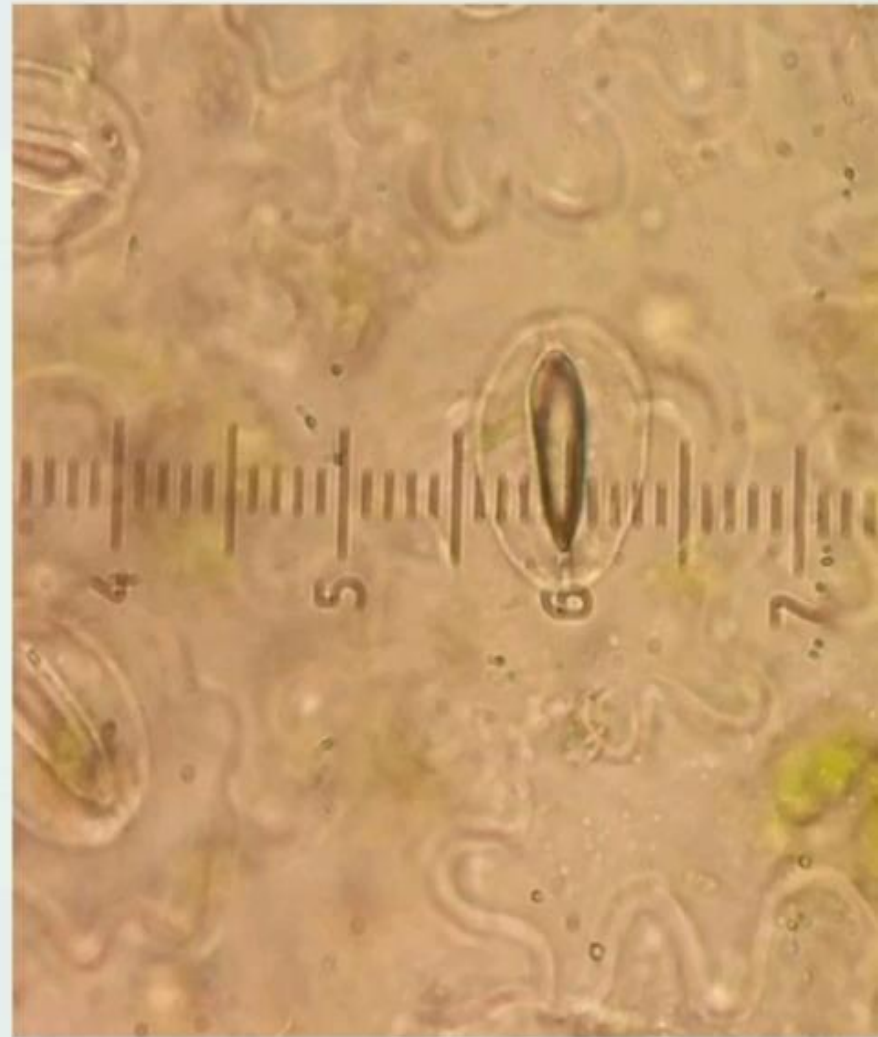




اندازه گیری طول سلول روزنه



اندازه گیری عرض سلول روزنه





اندازه‌گیری سطح میدان دید و کاربرد آن

یکی از موارد مهم استفاده از لام مدرج اندازه‌گیری مساحت میدان دید میکروسکوپ در بزرگنمایی‌های مختلف است، که با تعیین قطر میدان دید، یعنی شمارش تعداد درجات لام مدرج منطبق بر قطر دایره دید در هر بزرگنمایی و محاسبه شعاع میدان دید و مساحت دایره به دست می‌آید.

موارد مهم استفاده تعیین سطح میدان دید

تعیین یا شمارش تعداد و فراوانی ساختارهای ویژه در واحد سطح مثل فراوانی روزنه، کرک، غار روزنه‌ای Crypt یا فلس و غیره را در واحد سطح با این روش می‌توان محاسبه کرد.

پس با يك تناسب ساده پس از شمارش تعداد ساختار مورد نظر تعداد را در واحد سطح نمونه البته بر حسب نوع واحد خواسته شده مثلاً در 1 سانتی‌متر مربع یا 1 میلی‌متر مربع و غیره می‌توان به دست آورد.

مبحث فوق یعنی اندازه‌گیری سطح میدان دید میکروسکوپ و کاربرد آن مربوط به مباحث این جلسه نمی‌باشد.

به سوالات زیر پاسخ دهید:

- What is an ocular micrometer?
- What does it mean to calibrate the ocular micrometer?
- Why is calibration necessary?
- How do we do it?

