University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان
بررسی ساختار میکروسکوپ نوری معمولی و کاربرد بهینه قطعات آن در مطالعات سیتولوژیکی

اهداف

۱.آشنایی با ساختار میکروسکوپ نوری معمولی و کاربرد بهینه قطعات آن در مطالعات سیتولوژیکی

۲.آشنایی با میکروسکوپ استریو (Stereo Microscope)

۳.آشنایی با میکروسکوپ فلورسنت (Fluorescent Microscope)

۴.آشنایی با میکروسکوپ زمینه متضاد (Phase contrast Microscope)

۵.آشنایی با میکروسکوپ زمینه تاریک (Dark field Microscope)

۰۶آشنایی با میکروسکوپ کنتراست افترافی_تداخلیDIC (Differential interference contrast Microscope)

میکروسکوپ وسیله‌ای است برای مشاهده و بررسی اجسام بسیار ریزی که با چشم غیر مسلح قادر به رؤیت آن‌ها نیستیم. این دستگاه به شناخت بهتر جزئیات ساختاری اجزاء سلولی موجودات زنده اعم از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم ها کمک می کند.

با توجه به این مهم بایستی قبل از کار با میکروسکوپ اجزاء مختلف آن شناسایی و مورد بررسی قرارگیرند. کلمه میکروسکوپ از دو جزء میکرو به معنای کوچک و اسکوپ به معنای رؤیت و مشاهده تشکیل شده‌است. قسمت‌های مختلف ساختارهای زیستی به دلیل کوچکی و شفافی با چشم غیر مسلح قادر به رؤیت نیستند.

به همین منظور تلاش‌هایی در جهت افزایش بزرگنمایی(Magnification) سلولی،افزایش قدرت تفکیک (Resolution Power)و افزایش تضاد (Contrast)اجزاء سلولی صورت گرفته‌که منجر به ابداع میکروسکوپ شده‌است.

بررسی چند اصطلاح میکروسکوپی

توان تفکیک یا قدرت تمیز میکروسکوپ (Resolution Power)

کوچکترین فاصله قابل تشخیص بین دو نقطه واقع بر یک سطح که به وسیلهٔ یک سیستم قابل رؤیت باشد را توان تفکیک آن سیستم می‌گویند. هر چه مقدار عددی توان تفکیک کمتر باشد، توان تفکیک دستگاه نوری بیشتر خواهد بود مثلاً توان تفکیک دستگاهی که دو نقطه را با فاصله ۱۰۰ میکرون از هم تشخیص می‌دهد از توان تفکیک دستگاهی که فاصله ۲۰۰ میکرون را به عنوان کوچکترین فاصله بین دو نقطه تشخیص می‌دهد بیشتر است.

با استفاده از معادله آبه عدد توان تفکیک را می‌توان محاسبه کرد:

$$R = \frac{0.61\lambda}{n\sin\alpha}$$

λ = طول موج پرتو به کارگرفته شده برای رویت جسم

n = ضریب شکست محیط هوا یا مایع

α = نیم زاویه مخروط روشنایی که وارد عدسی شیئی می‌شود

توان تفکیک چشم غیر مسلح سالم حدود ۰/۱ میلی‌متر، میکروسکوپ نوری معمولی ۰/۲۴ میکرون و میکروسکوپ الکترونیکی ترانس‌میشن Transmission electron microscope در حد یک پیکومتر می‌باشد.

بزرگنمایی (Magnification)

میزان بزرگتر نمایش دادن تصویر نسبت به جسم را بزرگنمایی می گویند.

بزرگنمایی های مختلفی برای میکروسکوپ مطرح می‌شود:

۱- بزرگنمایی تجارتی

۲- بزرگنمایی مفید

۳- بزرگنمایی مخصوص

۴- بزرگنمایی تهی

بزرگنمایی تجارتی:

عبارت است از حاصلضرب بزرگنمایی عدسی شیئی و عدسی چشمی
با عدسی شیئی ۱۰۰ و عدسی چشمی ۱۰ خواهیم داشت:

$$G = G_{Obj} \times G_{Oc}$$

$$G = ۱۰۰ \times ۱۰$$

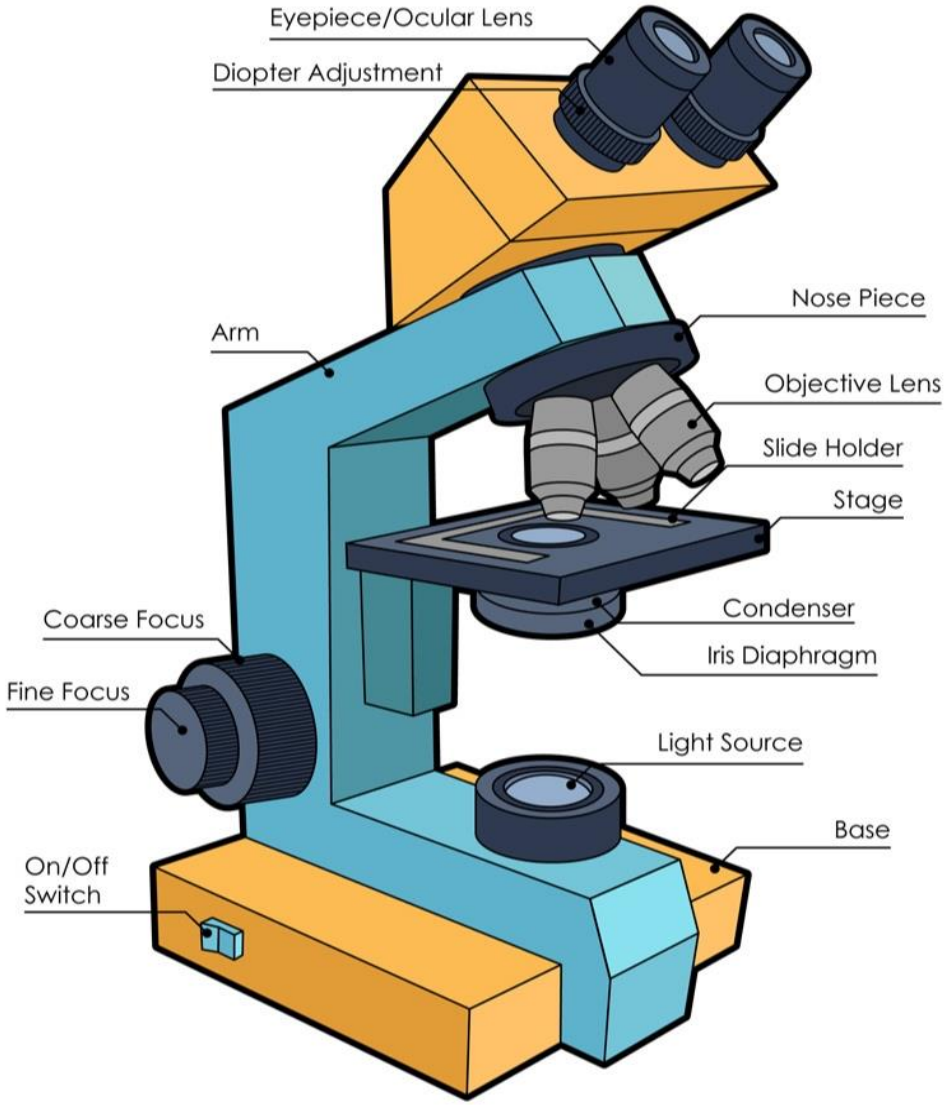
تضاد(Contrast):

به ایجاد سایه روشن و تضاد در نمونه‌های میکروسکوپی کنتراست گفته می‌شود. کنتراست را به کمک راه‌های مختلفی در نمونه‌های بیولوژیکی می‌توان به وجود آورد و تنظیم نمود تا قسمت‌های مختلف نمونه با وضوح بیشتری قابل تشخیص گردد.

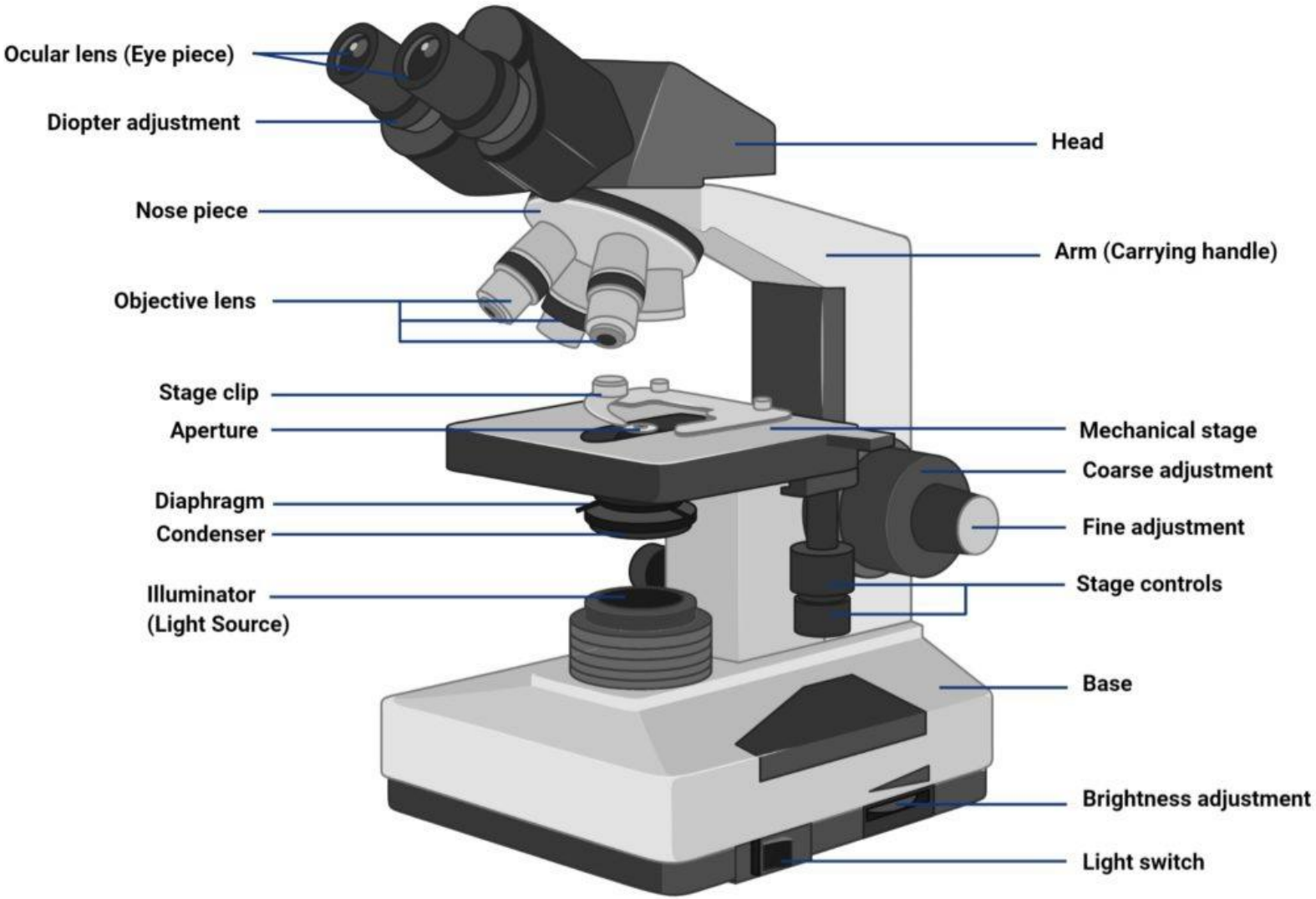
در آزمایشگاه تنظیم کنتراست میکروسکوپ توسط تکنیکهای نوری و نمونه توسط رنگهای رنگی و فلزات سنگین، یکی از راه‌های مهم مطالعهٔ نمونه‌های سیتولوژیکی می‌باشد که به روش‌های مختلف قابل تنظیم است.

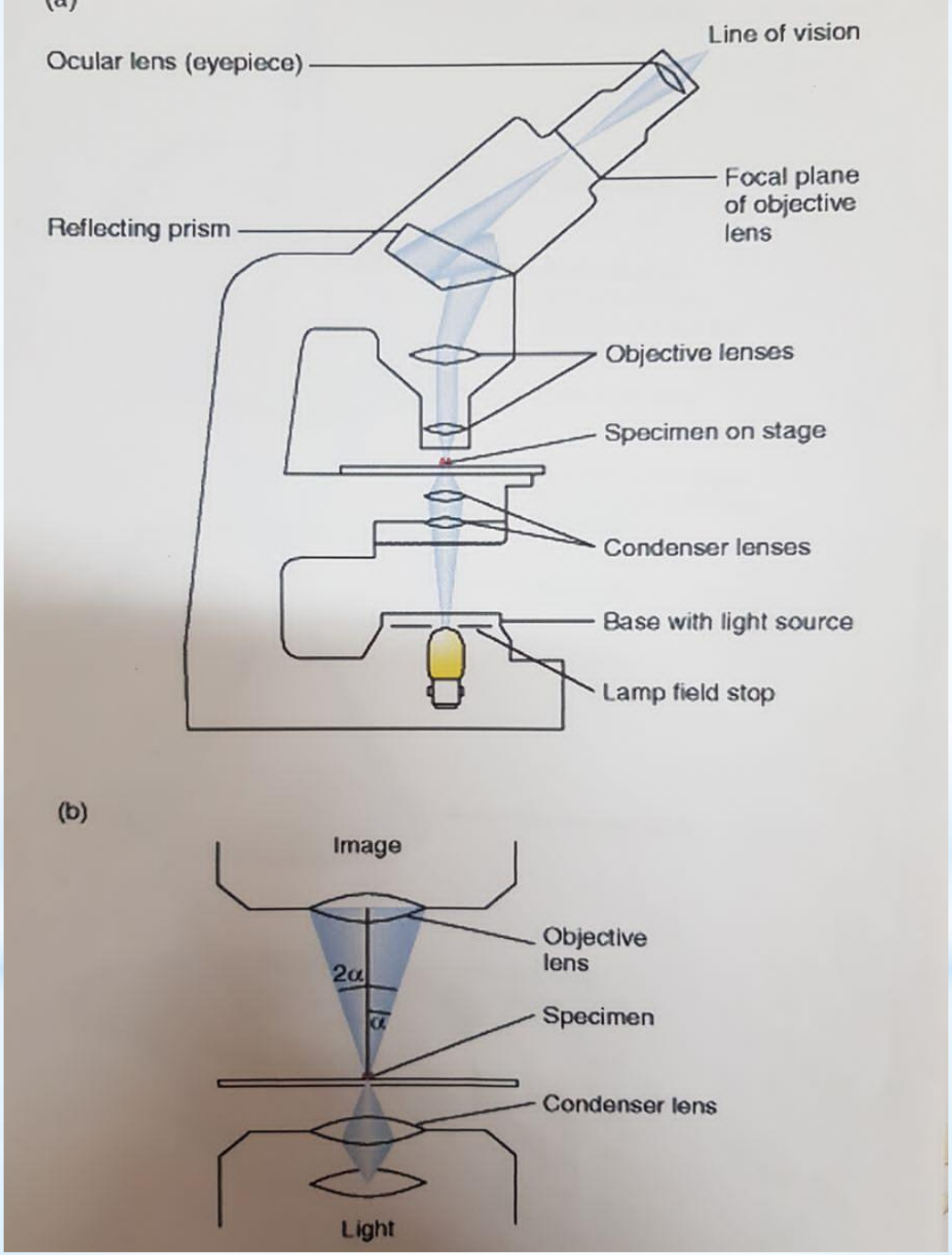
بررسی قسمت های مختلف میکروسکوپ نوری

Parts of a Microscope



Microscope Parts




Line of vision
Ocular lens (eyepiece)
Focal plane of objective lens
Reflecting prism
Objective lenses
Specimen on stage
Condenser lenses
Base with light source
Lamp field stop
(b)
Image
Objective lens
2α
α
Specimen
Condenser lens
Light

۱- عدسی چشمی Eye Piece Ocular:

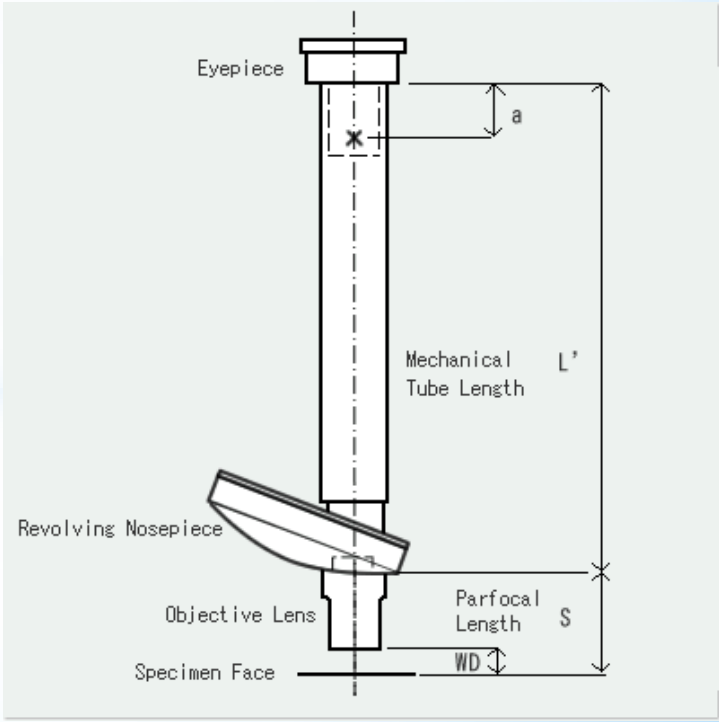
عدسی های چشمی به صورت دوتایی و در انتهای لوله کوتاهی نصب و در بالای لوله میکروسکوپ قرار می‌گیرند. هر لنز بزرگنمایی‌های مختلف ۱۰×، ۱۲×، ۲۵× می‌تواند داشته باشد، ولی معمولاً در آزمایشگاههای آموزشی از بزرگنمایی ۱۰× استفاده می‌شود.

این عدسی‌ها اساسا از تعدادی عدسی محدب الطرفین ساخته‌شده‌اند که در مجموع کار یک ذره‌بین را انجام می‌دهند. مقایسه فاصله کانونی عدسی‌های چشمی و عدسی‌های شیئی نشان می‌دهد که به طور کلی عدسی‌های چشمی فاصله کانونی بزرگتری (در حد چند سانتیمتر) دارند، در حالیکه فاصله کانونی عدسی‌های شیئی کمتر (در حد چند میلیمتر) است.
به همین دلیل میزان درشتنمایی عدسی‌های شیئی اغلب بیشتر از عدسی‌های چشمی می‌باشد.

انواع عدسی چشمی

۲- لوله میکروسکوپ Tube:

استوانه ای به طول ۲۵-۱۶ سانتیمتر می‌باشد. از بالا به عدسی چشمی و از پایین به صفحه گردان میکروسکوپ متصل شده‌است. این لوله در بعضی از میکروسکوپ‌ها دوقسمتی است به طوریکه قسمتی از لوله بالایی می‌تواند در لوله پایینی بالا و پایین برود.



۳- صفحه گردان Nose Piece:

صفحه‌ای است که عدسی‌های شیئ روی آن نصب شده‌اند. با گرداندن این صفحه، عدسی شیئی با بزرگنمایی دلخواه در مسیر میدان دید قرار می‌گیرد. این صفحه یک قطعه فلزی، به شکل مخروط ناقص است و در سوراخ‌هایی که روی آن تعبیه شده عدسی‌های شیئ جای می‌گیرند که تا ۶ عدد می‌توانند باشند و در بالا به لوله میکروسکوپ متصل می‌گردند.

Only the objective
lens converter included,
Not include other items.

۴- عدسی شیئی objective:

هر عدسی شیئی درون لوله‌ی کوتاهی قرار گرفته که به صفحه گردان میکروسکوپ متصل شده‌است و بزرگنمایی‌های متفاوتی دارد: ۴×، ۱۰×، ۲۵×، ۴۰×، ۶۰×، ۱۰۰× عدسی‌های شیئی اساساً از تعداد زیادی عدسی تشکیل شده‌اند ۴ تا ۱۰ عدسی که پشت سرهم و با رعایت قوانین فیزیکی قرار گرفته‌اند.

عدسی‌های شیئی اولین تصویر را از جسم تشکیل می‌دهند. این تصویر از جسم بزرگتر، معکوس و حقیقی است. عدسی شیئی مهم‌ترین بخش نوری هر میکروسکوپ است. وجنس‌های مختلفی دارند: از جمله: کرون crown، فلینت Flint، فلئورین Fluorine و کوارتز Quartz.

عدسی‌های کرون:
قدرت تفرق (پراش) نوری کمی دارند و برای ساخت عدسی‌های محدب‌الطرفین به کار می‌روند.

عدسی‌های فلینت:
قدرت تفرق زیادی دارند و برای ساخت عدسی‌های مقعرالطرفین به کار می‌روند.

عدسی‌های فلوئورین:
برای ساخت هر دو عدسی محدب‌الطرفین و مقعرالطرفین استفاده می‌شود.

عدسی‌های کوارتز:
مرغوبترین عدسی‌ها هستند و در میکروسکوپ ماوراءبنفش Ultraviolet (UV)مورد استفاده قرار می‌گیرند.

Crown

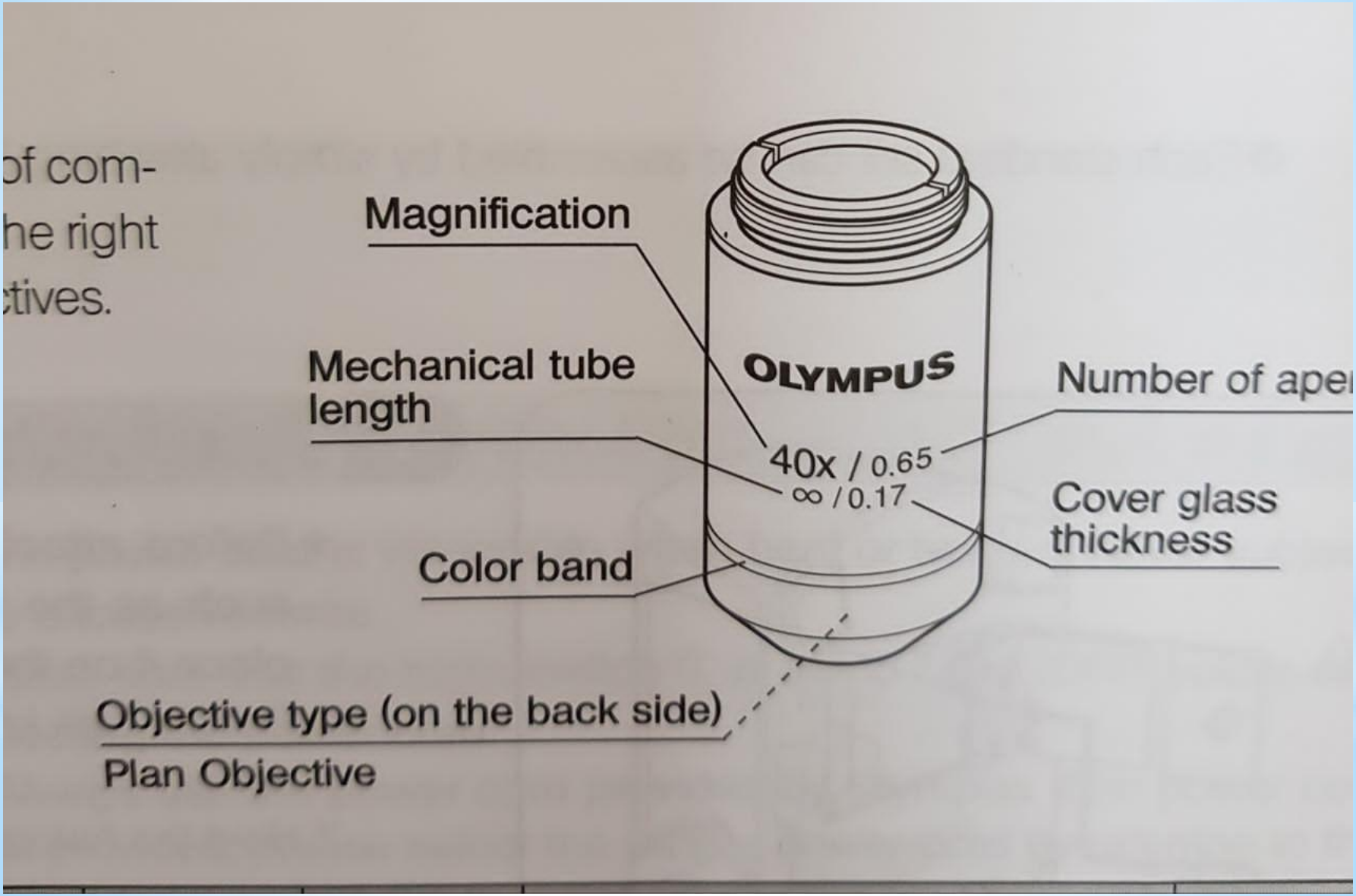
Flint

Fluorine

Quartz

بر روی عدسی‌های عدسی شیئی معمولا اعداد مختلفی حک شده‌است که نشان دهنده بزرگنمایی، زاویه گشودگی Numerical Apreture، طول لوله عدسی ،شماره سریال و ضخامت لامل مناسب برای عدسی شیئی می‌باشد.

مشخصات دیگر حک شده روی آن‌ها عبارت‌اند از: oil (برای عدسی ایمرسیون)، ph (برای مشاهده زمینه تضاد)، Plan (برای ابژکتیو معمولی)، pol (برای میکروسکوپ پلاریزه)، fl (برای عدسی‌های فلینت)، وجود نوارهای رنگی نیز برای تشخیص سریع‌تر درشنمایی‌ها می‌باشد(۴× نوار آبی، ۱۰× نوار قرمز، ۴۰× نوار زرد، ۱۰۰× نوار سفید).


of com-
he right
ctives.
Magnification
Mechanical tube length
OLYMPUS
40x / 0.65
∞ / 0.17
Number of ape
Cover glass thickness
Color band
Objective type (on the back side)
Plan Objective

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

10/0.25
160/0.17

NIR Plan Apo
50X/0.67
∞/0/f=200
NUV Plan Ap
20X/0.4
∞/0/f=200
Plan Apo
10X/0.28
∞/0/f=200

عدسی‌های شیئی برحسب روش به‌کارگیری و کارایی به دو نوع عدسی شیئی خشک Dry Objective و عدسی ایمرسیون یا روغنی Oil Immersionتقسیم می‌شوند.

وقتی محیط بین جسم و عدسی شیئی هوا باشد عدسی شیئی اصطلاحاً خشک تعریف می‌گردد. اما اگر این فاصله توسط مایعی مثل گلیسیرین، روغن ایمرسیون، و غیره پرشود، ابژکتیو روغنی می‌باشد.

در بزرگنمایی‌های بالا که به نور بیشتری نیاز است از عدسی ایمرسیون استفاده می‌شود. مایع موجود در این فاصله کار یک عدسی محدب را انجام می‌دهد و پرتوهای نوری را کانونی یا همگرا می‌سازد و به عدسی شیئی می‌رساند و از هدررفتن آن‌ها جلوگیری می‌کند.

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

۵- صفحه میکروسکوپ Stage:

صفحه‌ای است فلزی با سوراخی گرد در وسط آن که محل قرار دادن نمونه مورد مطالعه است. از وسط سوراخ نور عبور کرده و به جسم می‌تابد. در میکروسکوپ‌های ساده نمونه توسط دوگیره روی صفحه ثابت می‌شود.

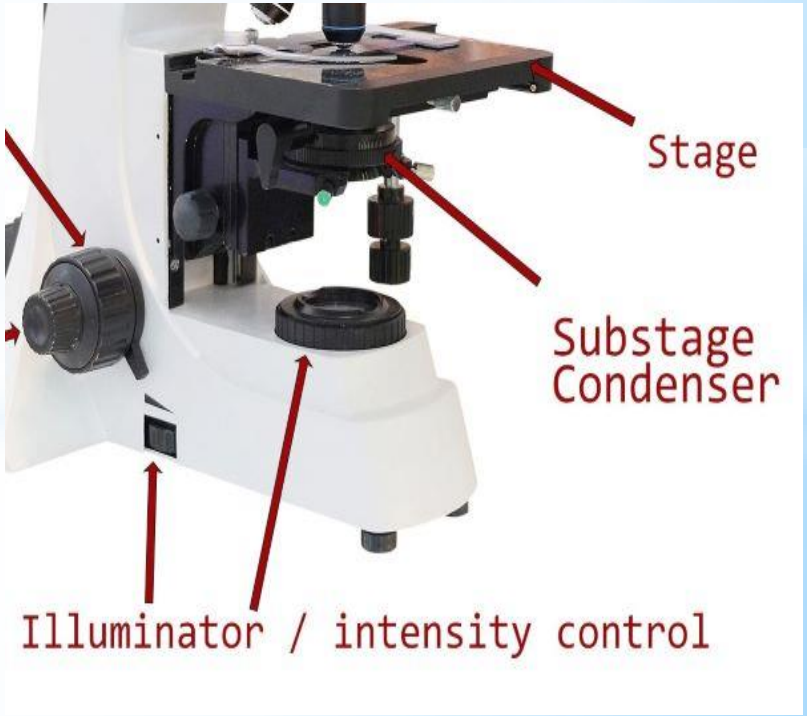
در میکروسکوپ‌های جدیدتر برای سهولت جابه‌جایی صفحه و جسم، سیستمی به نام شاریوت Chariot وجود دارد که شامل دو بخش تیغه‌ای برای نگهداری نمونه‌است. پیچ‌هایی در زیر دارد که توسط آن‌ها می‌توان نمونه و صفحه را به بالا، پایین، چپ و راست حرکت داد.

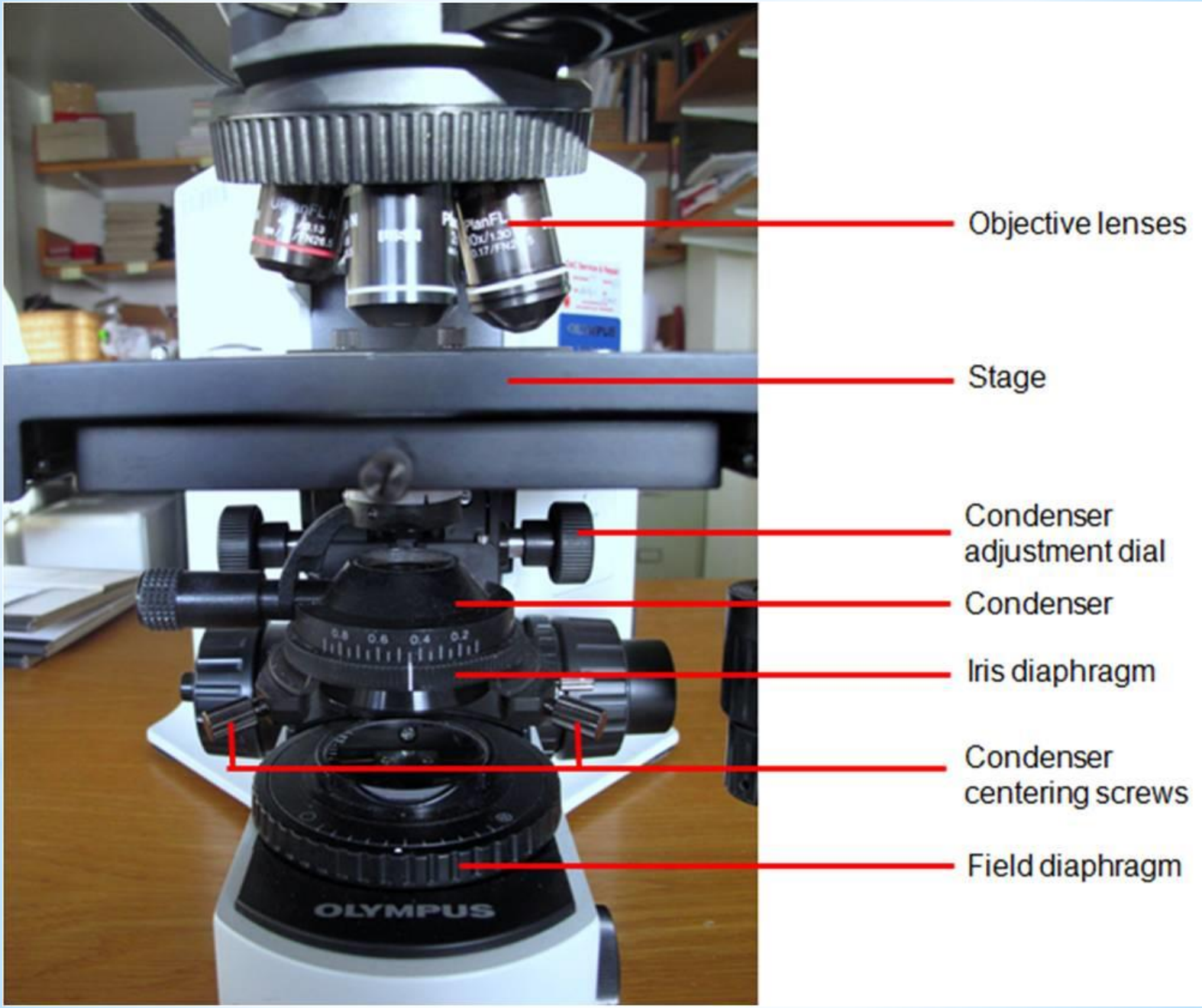
سیستم ورنیه در دو قسمت عمود برهم و مدرج برای پیش‌بینی میزان جابه‌جایی جسم و بازیابی منطقه خاصی از جسم طراحی شده‌است.

صفحه میکروسکوپ

۶– کندانسور Condenser:

از مجموعه عدسی‌های محدب ساخته شده که عمل آن‌ها همگرا کردن پرتوهای نوری حاصل از منبع نور است تا نور کافی برای مشاهده جسم تأمین گردد.




Objective lenses
Stage
Condenser adjustment dial
Condenser
Iris diaphragm
Condenser centering screws
Field diaphragm
OLYMPUS

۷- دیافراگم Diaphragm:

دیافراگم معمولاً جزء بخش مکانیکی میکروسکوپ به حساب می‌آید.
اما چون به دنبال کندانسور قرار گرفته‌اند، همراه با قسمت‌های نوری شرح داده می‌شود. دیافراگم وسیلهٔ تنظیم شدت نور میکروسکوپ است.

هر میکروسکوپ می‌تواند دارای دیافراگم زمینه، دیافراگم کندانسور و دیافراگم عدسی چشمی باشد.دیافراگم زمینه،میزان نوری که از منبع روشنایی به کندانسور می‌رسد را تنظیم می‌کند و در بالای منبع روشنایی قرار گرفته‌است.
دیافراگم کندانسور شدت نوری را که از کندانسور گذشته و به جسم می‌رسد را تنظیم می‌کند و اغلب زیر کندانسور قرار دارد.

دیافراگم عدسی چشمی در جای مشخصی از سری عدسی‌های خاص عدسی چشمی قرار گرفته‌است.در بعضی از میکروسکوپ‌ها برای عدسی شیئی هم دیافراگم تعبیه شده که شدت نوری را که از عدسی شیئی به عدسی چشمی می‌رسد را تنظیم می‌کند.
دیافراگم انواع مختلفی دارد.

دیافراگم ساده Simple Diaphragm:

صفحه‌ای فلزی یا کائوچویی، دارای چند سوراخ با قطرهای متفاوت است که با افزایش درشتنمایی عدسی شیئی سوراخ وسیعتر دیافراگم در مسیر نور قرار می‌گیرد تا نور مورد نیاز تأمین شود.

دیافراگم مردمکی Iris Diaphragm :

این دیافراگم همانند مردمک چشم، امکان تنگ و گشاد شدن را دارد و از تعداد نسبتاً زیادی صفحات نازک انعطاف پذیر و قابل لغزش بر روی هم ساخته شده است. انطباق صفحات نازک بر روی هم با باز شدن سوراخ میانی و عبور نور بیشتری همراه است.

دیافراگم حلقوی Annular Diaphragm:

دارای حلقه‌هایی با قطرهای متفاوت برای عبور نور است. ساختمان آن به نحوی است که از عبور نور و پرتوهای نوری مرکزی جلوگیری می‌کند و پرتوهای محیطی که پراش بیشتری پیدا می‌کنند را به جسم می‌تاباند. از این نوع دیافراگم در میکروسکوپ زمینه متضاد استفاده می‌شود. قطر حلقه با بزرگنمایی عدسی شیئی مورد استفاده نسبت مستقیم دارد. اگر نور بیشتری مورد نیاز باشد، دیافراگم با حلقه وسیع تر در مسیر نور قرار می‌گیرد.

دیافراگم زمینه تاریک یا هلالی Dark Diaphragm:

این دیافراگم از عبور پرتوهای نوری مرکزی جلوگیری و فقط پرتوهای نوری کناری از منطقه تقریباً هلالی شکل را عبور داده و به کندانسور می‌تاباند. به کمک این دیافراگم پرتوها کاملاً محیطی شده و به طور بسیار مایل به جسم می‌تابند و بخش عمده‌ای از آن‌ها در محیط جسم پراش می‌یابند به طوریکه تنها بخشی از پرتوهای پراش یافته امکان ورود به عدسی شیئی را پیدا می‌کنند.

۸- بازو Arm:

بخشی که لوله و پیچ‌های تنظیم و سایر قسمت‌های میکروسکوپ، روی آن نصب شده است. هم‌چنین برای حمل و نقل میکروسکوپ از آن استفاده می‌شود و به فرم‌های نعل اسبی و هلالی شکل می‌باشد.

۹- پیچ تنظیم سریع Coarse Focus:

پیچ بزرگی در بالای بازوی میکروسکوپ است که محل استقرار صفحه میکروسکوپ (محل قرار گرفتن نمونه) را نسبت به عدسی شیئی جابه‌جا می‌کند و برای تنظیم سریع تقریبی فوکوس نمونه به کار می‌رود.

۱۰– منبع نور Light Source:

معمولاً از لامپ های کوچک ۱۰-۶ ولت استفاده و در زیر کندانسور یا پایه میکروسکوپ قرار گرفته می‌شود و پرتوهای نوری را به زمینه می‌تاباند. در میکروسکوپ‌های قدیمی نور لازم با آینه و چراغ رومیزی تأمین می گردید. آینه معمولاً دو رو، در نورشدید از آینه مسطح و در نور ضعیف از آینه مقعر استفاده می گردید.

۱۱– پیچ تنظیم دقیق Focus Fine:

پیچ کوچکتر بر روی پیچ تنظیم سریع قرار گرفته و لوله میکروسکوپ را به میزان کم بالا و پایین می‌برد و برای تنظیم دقیق میکروسکوپ به کار می‌رود. این پیچ مدرج بوده و بنابراین فوکوس دقیق قابل اندازه‌گیری است.

۱۲– پایه میکروسکوپ Base:

قسمت مکعب مستطیل شکلی از جنس فولاد سنگین است تا هنگام مطالعات میکروسکوپی و عکسبرداری از لغزش میکروسکوپ و تکان آن جلوگیری شود.تمام قسمت‌های میکروسکوپ بر روی پایه سوار می‌شوند.

تصویر در میکروسکوپ نوری

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

تنظیم میکروسکوپ:

.صفحه گردان را را بچرخانید و کمترین عدسی(X4)را که کوتاه تر است در امتداد لوله میکروسکوپ قرار دهید صدای جا افتادن عدسی توجه کنید.
.عدسی چشمی را برای فاصله بین دو مردمک چشم خود تنظیم کنیم با هر دو چشم فقط یک میدان در دید دایره ای را ببیند اگر اینگونه نشود، سعی کنید با دور و نزدیک کردن دو عدسی چشم از هم برای هر دو چشمتان یک میدان دید ایجاد کنید.
.اسلاید مورد نظر را بر روی صفحه میکروسکوپ قرار داده و در جای خود محکم و ثابت کنید.
.لامپ میکروسکوپ را روشن کنید.
.در عدسی چشمی نگاه کنید و همزمان با استفاده از پیچ ماکرو، صفحه را بالا بیاورید ادامه دهید تا تصویر نمونه ظاهر گردد. این تصویر ممکن است چندان واضح نبوده، روشن یا نسبتاً تاریک باشد.

.در صورت عدم وضوح تصویر با کمک پیچ میکرو صفحه را طوری میزان کنید که تصویر واضح در عدسیهای چشمی ظاهر گردد این مرحله را میزان کردن تصویر می‌نامند. شدت نور لامپ و میزان باز و بسته بودن دریچه دیافراگم رانیز در این مرحله تنظیم کنید برای کم و زیاد کردن نور می توانید روزنه دیافراگم را آنقدر تغییر دهید تا میدان دید روشن و واضح شود ولی نور شدید و زننده نباشد.

.در صورت نیاز عدسی های شیئی دیگر بدون جابجایی صفحه ، عدسی های قوی تر را انتخاب کرده که در این مرحله ممکن است تصویر واضح نبوده و یا کاملا محو گردد که با استفاده از پیچ های میکرو وماکرو فوکوس میتوانید تصویر را میزان کنید.

معرفی برخی از انواع میکروسکوپ‌های تحقیقاتی

۱- میکروسکوپ لوپ یا میکروسکوپ با دید برجسته:

این نوع میکروسکوپ جهت مشاهده و تشریح اجسام بزرگی که حتی با کوچکترین عدسی میکروسکوپ‌های نوری معمولی قابل رؤیت نیستند به کار می‌رود. در حقیقت از دو میکروسکوپ یک چشمی تشکیل شده که به وسیله ی آن نمونه از دو جهت مشاهده و در نتیجه تصویر سه بعدی و کاملاً برجسته به دست می‌آید.

تصویر در این میکروسکوپ مستقیم است. بنابراین جهت تشریح جانداران کوچک می‌توان ازآن استفاده نمود.
ضمناً چون فاصله‌ی نمونه مورد مطالعه با عدسی شیئی زیاد است نمونه مستقیماً از بالا توسط یک منبع نورانی روشن می‌گردد.

در این نوع میکروسکوپ نمونه اغلب در مایعی قرار گرفته و مشاهده می‌شود.
جهت مطالعه
سطح خارجی اسکلت بی‌مهرگان یا ساختارهایی مثل مو، شاخک، حشرات و امثال آن استفاده می‌گردد.

میکروسکوپ لوپ

تصویر نمونه در لوپ

تصویر در میکروسکوپ استریو

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

۲- میکروسکوپ فلورسنت:

فلورسانس یک پدیده اپتیکی است که در بعضی از مولکولها دیده می‌شود. این مولکولها فلوروفور Fluorophoreنامیده می‌شوند. مولکولهای مذکور پرتوهای فرابنفش یا امواج مرئی با طول موج بسیار کوتاه نظیر آبی یا بنفش را جذب کرده و سریعاً آن‌ها را به صورت امواج نوری با طول موج بلندتر از خود ساطع می‌کنند.

نور ساطع شده از این نوع مولکولها را می‌توان با استفاده از یک سیستم خاص میکروسکوپی موسوم به میکروسکوپ فلورسنت تشخیص داد. با توجه به این که نور ساطع شده از ترکیبات فلوروفور نسبت به نوری که ابتدا به این ترکیبات برخورد می‌کند طول موج بلندتری دارد، می‌توان میکروسکوپ نوری معمولی را تنها با استفاده از چند جزء اضافی به یک میکروسکوپ فلورسنت تبدیل نمود (دو فیلتر اضافی و یک منبع نوری متفاوت).

الف) فیلتر برانگیزاننده Exciter Filter:

این نوع فیلتر بین نمونه و منبع نور قرار می‌گیرد و به آن فیلتر اولیه نیز می‌گویند. رنگ این فیلتر بسته به طول موج نوری که جهت انگیزش مورد استفاده قرار می‌گیرد بنفش یا آبی است از این رو کار این فیلتر تاباندن پرتو نوری با طول موج خاص بر روی نمونه است.

ب) فیلتر سد کننده Barrier Filter:

به این فیلتر، فیلتر ثانویه نیز می‌گویند که بین نمونه و چشم قرار می‌گیرد و برای جلوگیری از رسیدن امواج انگیزشی مثل UV به چشم و حفاظت چشم از آسیب این نوع امواج به کار می‌رود. فیلتر سد کننده معمولا به رنگ زرد روشن است ولی می‌توان از سایر فیلترهای رنگی بسته به رنگ نور فلورسنت استفاده نمود.

ج) منبع نوری ویژه با شدت نور زیاد Specific light source:

این منبع در طیف امواج مرئی تا فرابنفش مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی معمولاً در میکروسکوپ فلورسنت از لامپهای حاوی بخار جیوه،لامپهای تنگستن یا هالوژن به عنوان منبع نور استفاده می‌گردد.

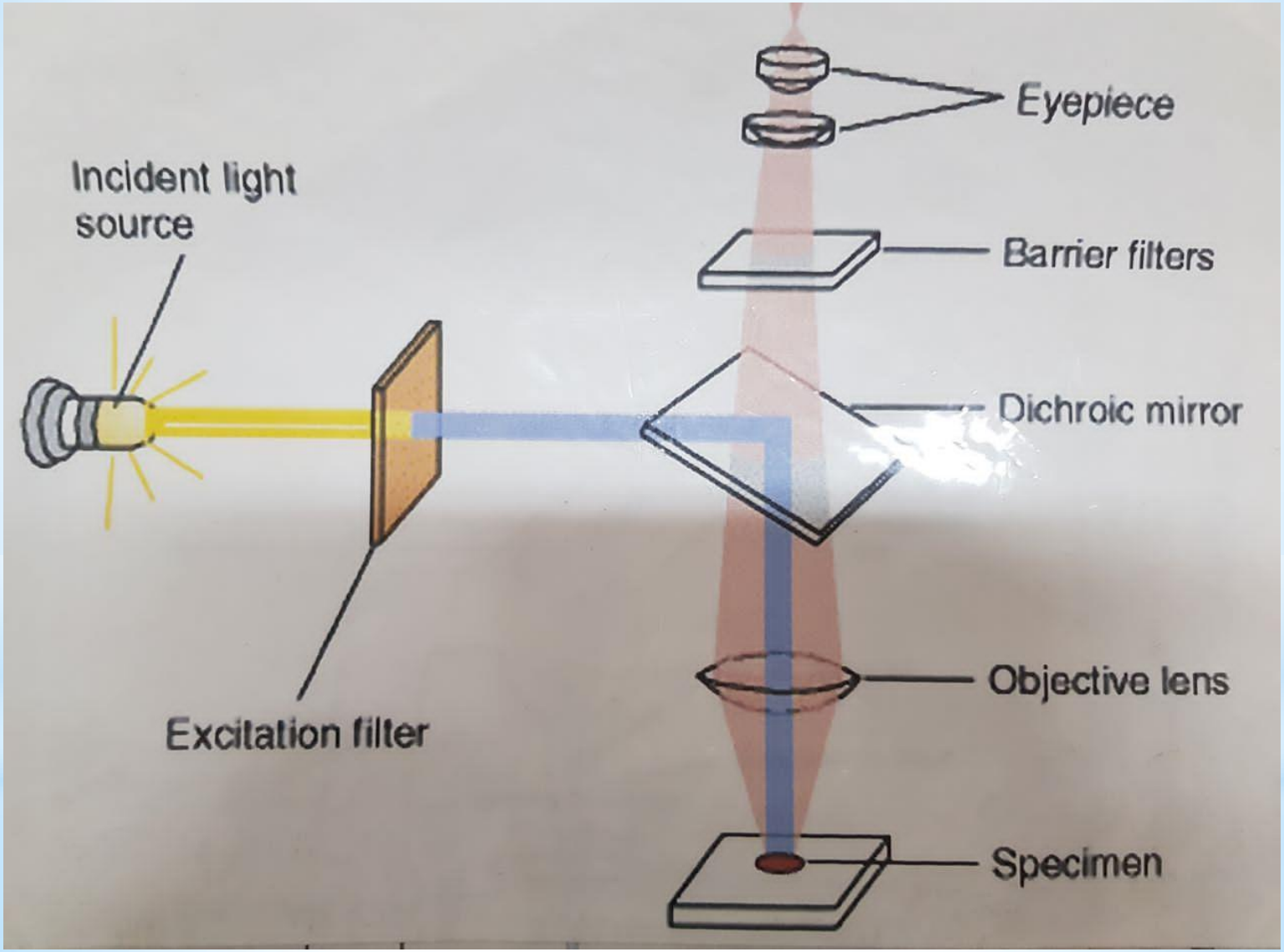
به طور کلی مواد از لحاظ خاصیت فلورسانس دو نوع اند:

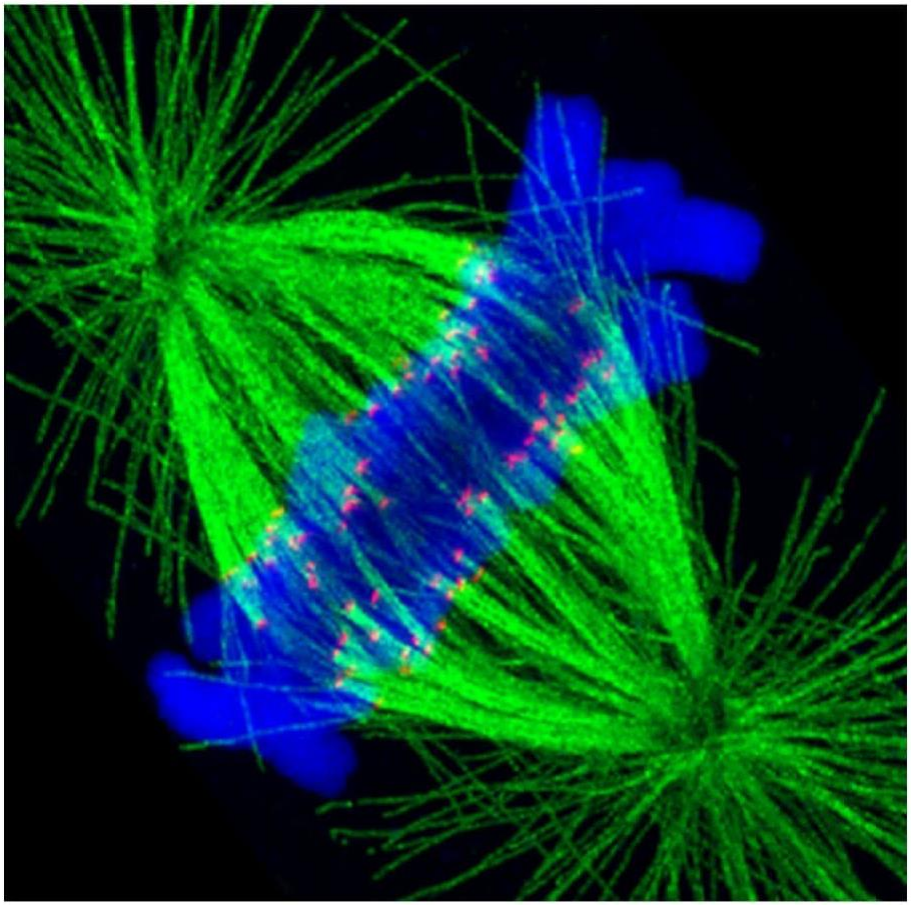
فلورسانس اولیه یا اتو فلورسانس: این مواد ذاتا خاصیت فلورسانس دارند و با تابش پرتوهای فرابنفش به آنها روشنایی قابل رویت ایجاد می کنند.

رایج ترین مولکولهای اتوفلورسانس فلاوین، ریبوفلاوین و کلروفیل می باشد .

فلورسانس ثانویه: این مواد از خود خاصیت فلورسانسی ندارند و برای فلورسنس کردن آنها از ترکیبات شیمیایی فلوروکروم یا (فلوروفور) استفاده می شود.

میکروسکوپ فلورسانس
mydars.com


Eyepiece
Incident light source
Barrier filters
Dichroic mirror
Objective lens
Excitation filter
Specimen



=orouharfar

تصویر میکروسکوپ فلورسانس از میکروتوبول های سلولی(سبز) و کروموزوم های قرار گرفته در کمربند سلولی(آبی) در حین تقسیم سلولی میتوز

۳- میکروسکوپ زمینه متضاد:

مطالعه بافتها و یاخته‌ها با میکروسکوپ وقتی امکان پذیر است که اولاً به قدر کافی نازک باشند تا نور یا الکترون از آن‌ها عبور کنند، ثانیاً بین بخشهای مختلف آن‌ها کنتراست یعنی اختلاف میزان نور یا تفاوت رنگ وجود داشته باشد تا بتوان هر جزء را از اجزاء دیگر تمیز داد.با استفاده از تکنیک‌های رنگ آمیزی و تثبیت، آبگیری،قالب‌گیری و برش‌گیری بافت های زنده تغییرات ظاهری و شیمیایی پیدا می‌کنند و حالت طبیعی خود را از دست می‌دهند. مهمترین راه مطالعه بافت های زنده استفاده از تکنیک‌های خاص نوری نظیر میکروسکوپ فازکنتراست است که بدون آسیب رساندن به سلولها مشاهده جزئیات ساختاری آن‌ها را ممکن می‌سازد.

در میکروسکوپ فازکنتراست اولاً وجود یک دیافراگم حلقوی در زیر کندانسور که نور را به صورت مخروط توخالی به جسم می‌تاباند، باعث کاهش شدت شعاع‌های مستقیم Straight می‌شود و در نتیجه مشارکت شعاع‌های پراشیده شده Diffract را در ایجاد تصویر بیشتر می‌کند. ثانیاً وجود صفحه شفاف حاوی شیار حلقوی کدر در سطح کانونی پشتی عدسی شیئی (بین عدسی شیئی و چشمی) موسوم به صفحه فازی باعث می‌شود که شعاع‌های نوری مستقیم(S) و پراشیده شده (D) بر هم منطبق شوند و با این انطباق تفاوت‌های جزئی داخل نمونه تقویت شده و به صورت تیرگی و روشنی (در واقع تغییرات دامنه و شدت نور) جلوه‌گر شوند.

Motic
BA310
Motic
EF-N Plan
4X/0.10
BA310

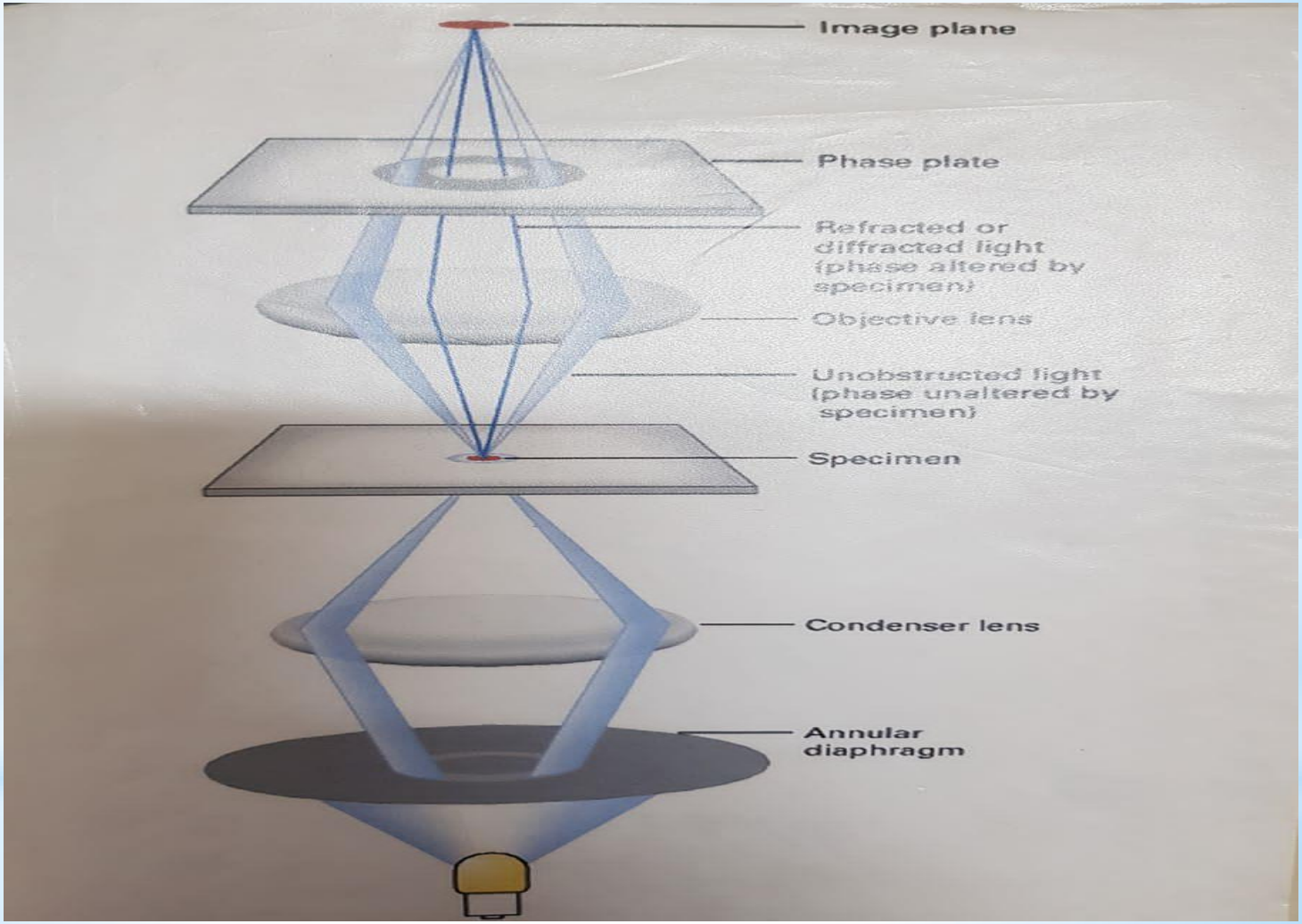
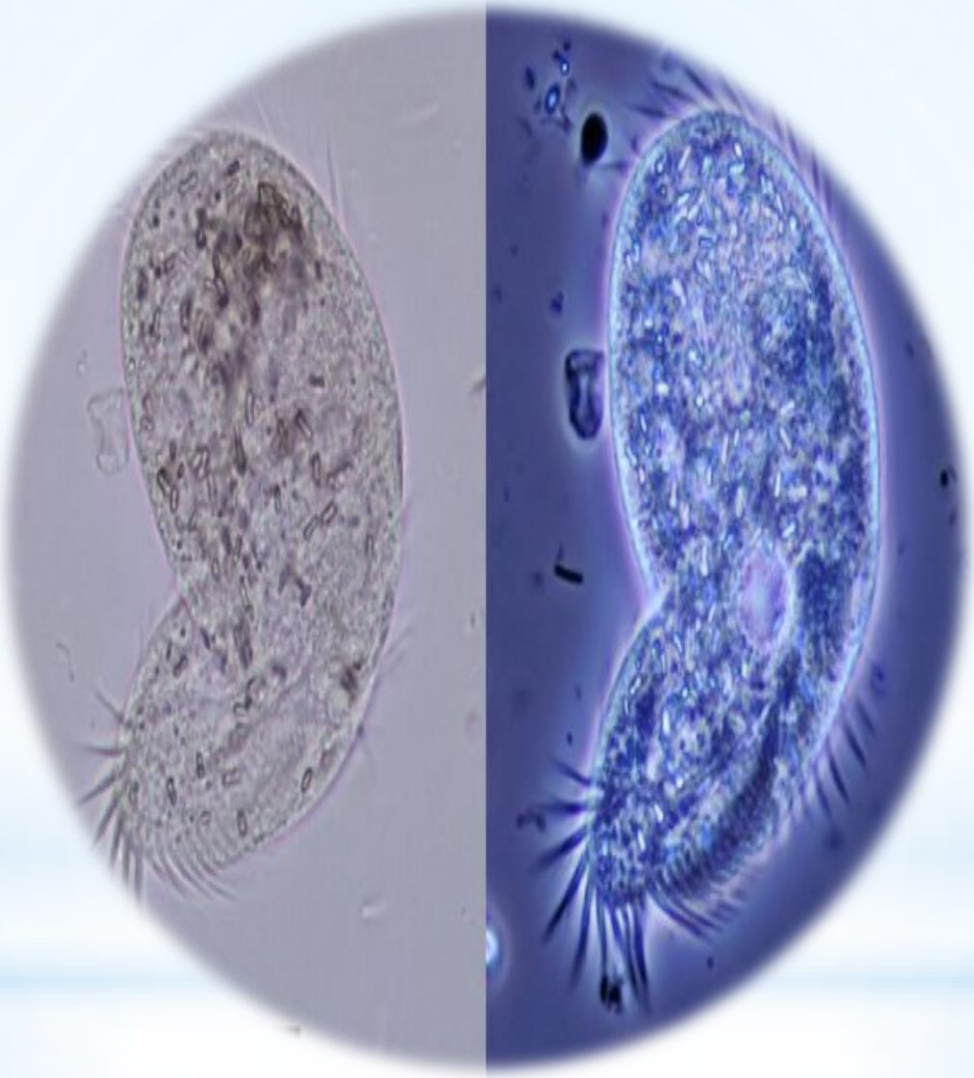


Image plane
Phase plate
Refracted or diffracted light (phase altered by specimen)
Objective lens
Unobstructed light (phase unaltered by specimen)
Specimen
Condenser lens
Annular diaphragm



تصویر در میکروسکوپ فازکنتراست

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

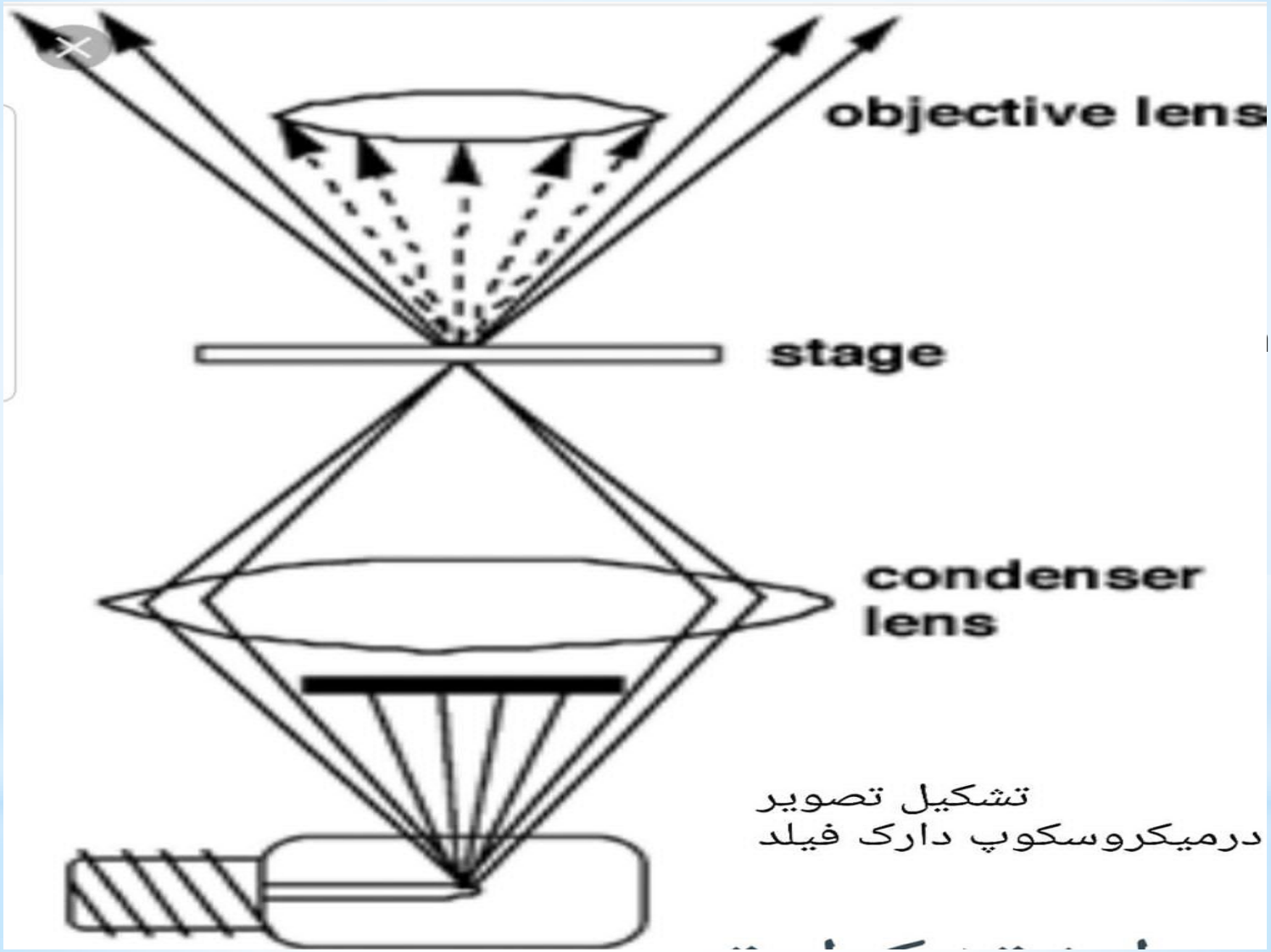
۴- میکروسکوپ زمینه تاریک:

میکروسکوپ زمینه تاریک نیز قادر به ایجاد کنتراست در نمونه رنگ آمیزی نشده می‌باشد. در این میکروسکوپ به جای کندانسور معمولی، کندانسوری وجود دارد که به طور مایل یا مورب نور را به جسم می‌تاباند. به سبب وجود این کندانسور هیچ نوری مستقیماً وارد عدسی شیئی نمی‌شود و زمینه میکروسکوپ تیره به نظر می‌رسد.

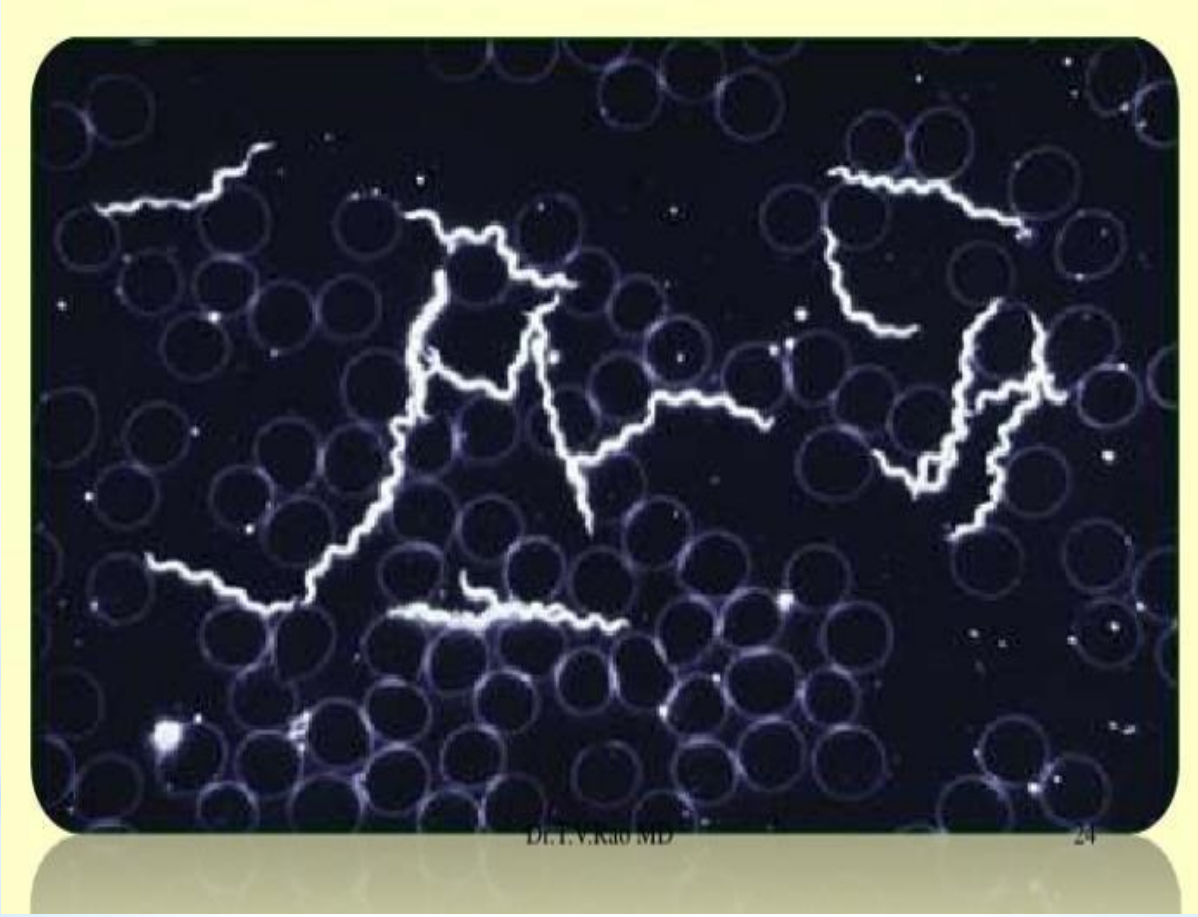
هنگامیکه اجسامی با ضریب شکستی بیش از محیط پیرامون خود مثل باکتریها که در محیط مایع حرکت می‌کنند، در میدان دید میکروسکوپ قرا گیرند نوری را که از گوشه یا پهلو به آن‌ها تابیده می‌شود به داخل عدسی شیئی میکروسکوپ منحرف کرده و به صورت اجسامی روشن در زمینه ای تاریک رؤیت می‌شوند.

با میکروسکوپ زمینه تاریک اجسامی که کوچکتر از حد تفکیک میکروسکوپ نوری معمولی هستند را می‌توان دید ولی جزئیات ساختاری آن را نمی‌توان تشخیص داد .از اختصاصات ویژه این میکروسکوپ وجود صفحه مات و کدر در زیر کندانسور است که در بعضی از میکروسکوپ‌ها در وضعیت مایل قرارگرفته است.

mydars.com
میکروسکوپ زمینه تاریک


objective lens
stage
condenser lens
تشکیل تصویر
درمیکروسکوپ دارک فیلد

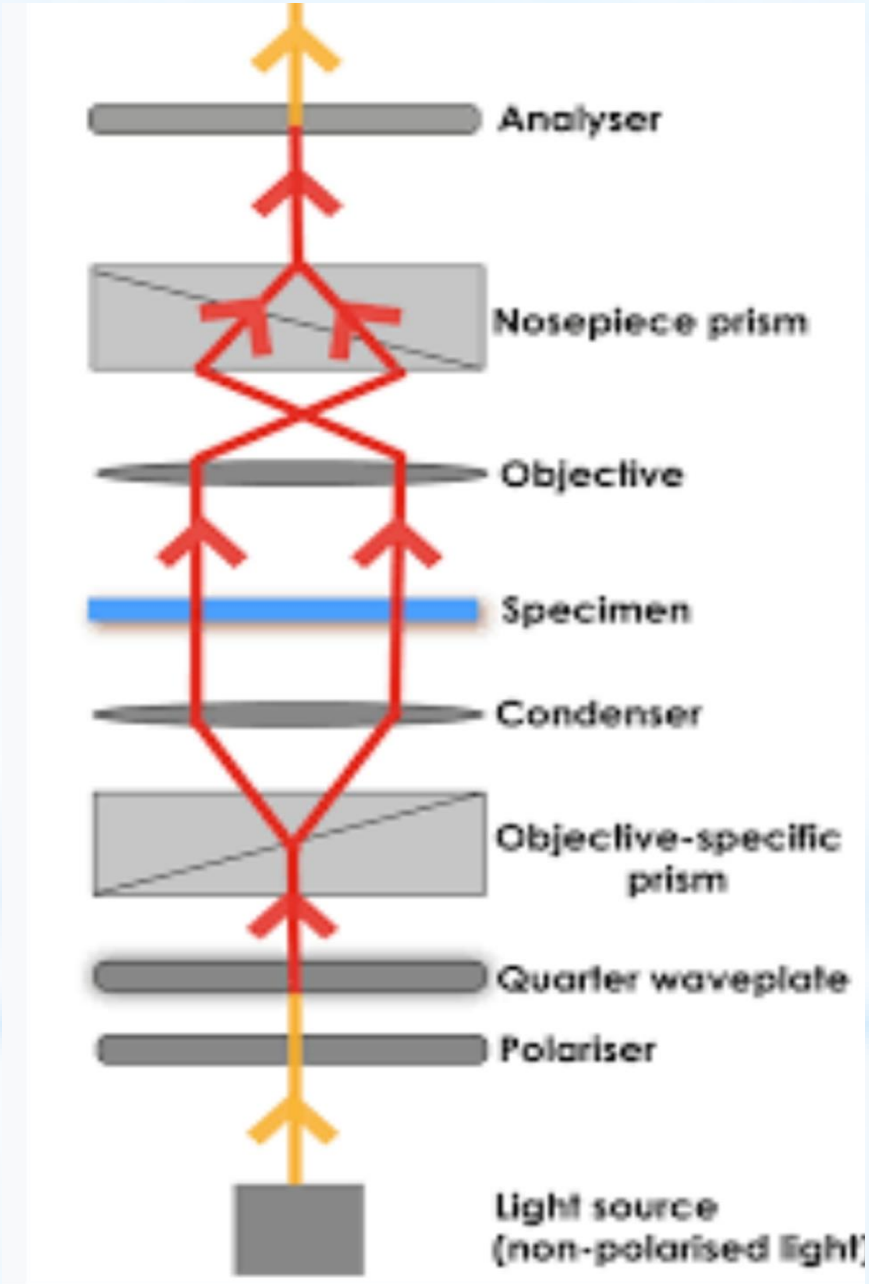
arfar



تصویر در میکروسکوپ زمینه تاریک

۵-میکروسکوپ کنتراست افترافی_ تداخلی DIC

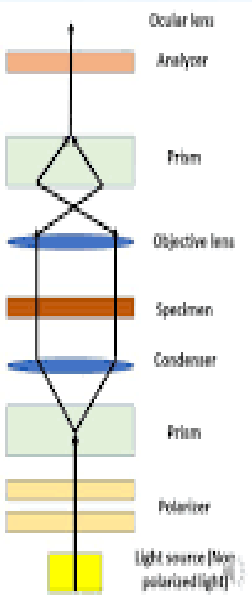
نوعی میکروسکوپ نوری که از تولید نور پلازیره (نور در یک سطح) از یک پلاریزان در کندانسور خود بهره می گیرد سپس نور پلاریزه از یک منشور عبور می کند که باعث تولید دو پرتو مجزا می گردد این پرتوها از نمونه عبور می کنند و وارد از عدسی شیئی می شوند. در انجا مجدداً با هم ترکیب شده و یک پرتو را به وجود می آورند. چون دو پرتو از میان مواد مختلف با تفاوت اندک در شاخص انکساری، عبور می کنند، پرتوهای ترکیب شده کاملاً در یک فاز نیستند ولی در عوض اثر تداخلی را به وجود می آورند این اثر به طور محسوسی تفاوت های جزئی در ساختار های سلولی را تشدید می کند. بنابراین با استفاده از این میکروسکوپ ساختارهای سلولی نظیر هسته سلول های یوکاریوتی، واکوئل ها و گرانول های سلول های باکتریایی، سه بعدی تر در تشکیل تصویر پایدار می شوند.


Analyser
Nosepiece prism
Objective
Specimen
Condenser
Objective-specific prism
Quarter waveplate
Polariser
Light source
(non-polarised light)

Microscopy lecture 9

DIFFERENTIAL INTERFERENCE CONTRAST (DIC) MICROSCOPY

Study smart in 'minutes'



DIC microscope