



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
و
مقایسه آن با ساختار چند نوع میکروسکوپ تحقیقاتی

اهداف

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

(Light Microscope)

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)

۶. آشنایی با میکروسکوپ کنتر است افتراقی-تداخلی

DIC(Differential interference contrast Microscope)

مقدمه

کلمه میکروسکوپ از دو جزء میکرو به معنای کوچک و سکوپ به معنای رؤیت و مشاهده تشکیل شده است و 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 میکروارگانیسم‌ها کمک می‌کند. با توجه به این مهم بایستی قبل از کار با میکروسکوپ اجزاء مختلف آن به طور دقیق شناسایی و مورد بررسی قرار گیرد.

همانطور که می‌دانید ساختار و قسمت‌های مختلف نمونه‌های زیستی به دلیل کوچکی و شفافیت با چشم غیر مسلح قادر به رؤیت نیستند به همین منظور تلاش‌هایی توسط محققین علوم زیست‌شناسی در جهت افزایش قدرت تفکیک (Resolution Power)، افزایش بزرگنمایی (Magnification)، و افزایش تضاد (Contrast) اجزاء سلولی صورت گرفته که نتایج آنها منجر به ابداع انواع میکروسکوپ شده است. در این راستا قبل از شناسایی و آموزش اصولی اجزا و قطعات مختلف میکروسکوپ لازم است چند اصطلاح مهم میکروسکوپی مورد بررسی قرار گیرند.

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 وسیله 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. توان تفکیک چشم غیر مسلح سالم حدود 0/1 میلی‌متر، میکروسکوپ نوری معمولی 0/24 میکرون و میکروسکوپ الکترونیکی ترانس‌میشن Transmission electron microscope در حد یک پیکومتر می‌باشد.

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 تابش مخروط روشنایی که وارد عدسی شیئی می‌شود

بزرگنمایی (Magnification)

میزان بزرگتر نمایش دادن تصویر نسبت به جسم را بزرگنمایی می‌گویند.
بزرگنمایی‌های مختلفی برای میکروسکوپ مطرح می‌شود:

۱- بزرگنمایی تجارتي

۲- بزرگنمایی مفید

۳- بزرگنمایی مخصوص

۴- بزرگنمایی تهی

بزرگنمایی تجارتي

بزرگنمایی تجارتي مهمترين بزرگنمایی براي محققين مي باشد و عبارت است از حاصل ضرب بزرگنمایی عدسی شیئی و عدسی چشمی میکروسکوپ.

محاسبه بزرگنمایی با عدسی شیئی ۱۰۰ و عدسی چشمی ۱۰ :

$$G = G_{Obj} \times G_{Oc}$$
$$G = 100 \times 10$$

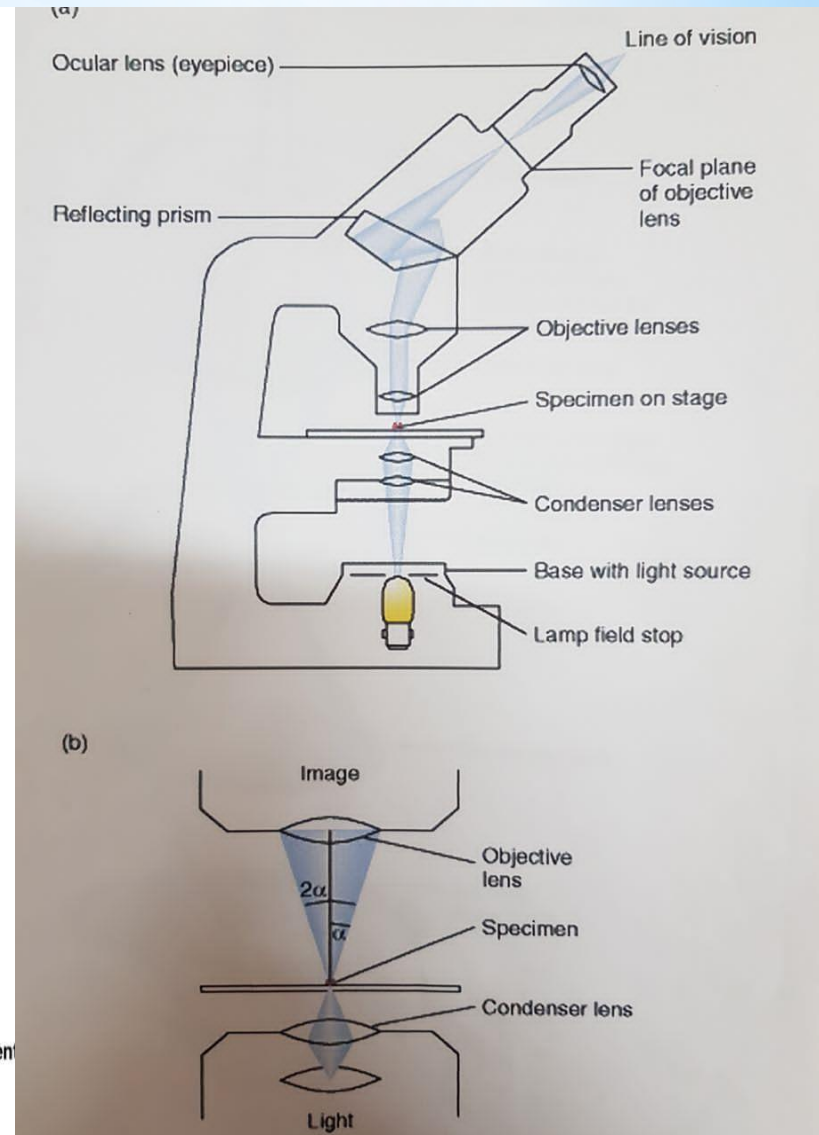
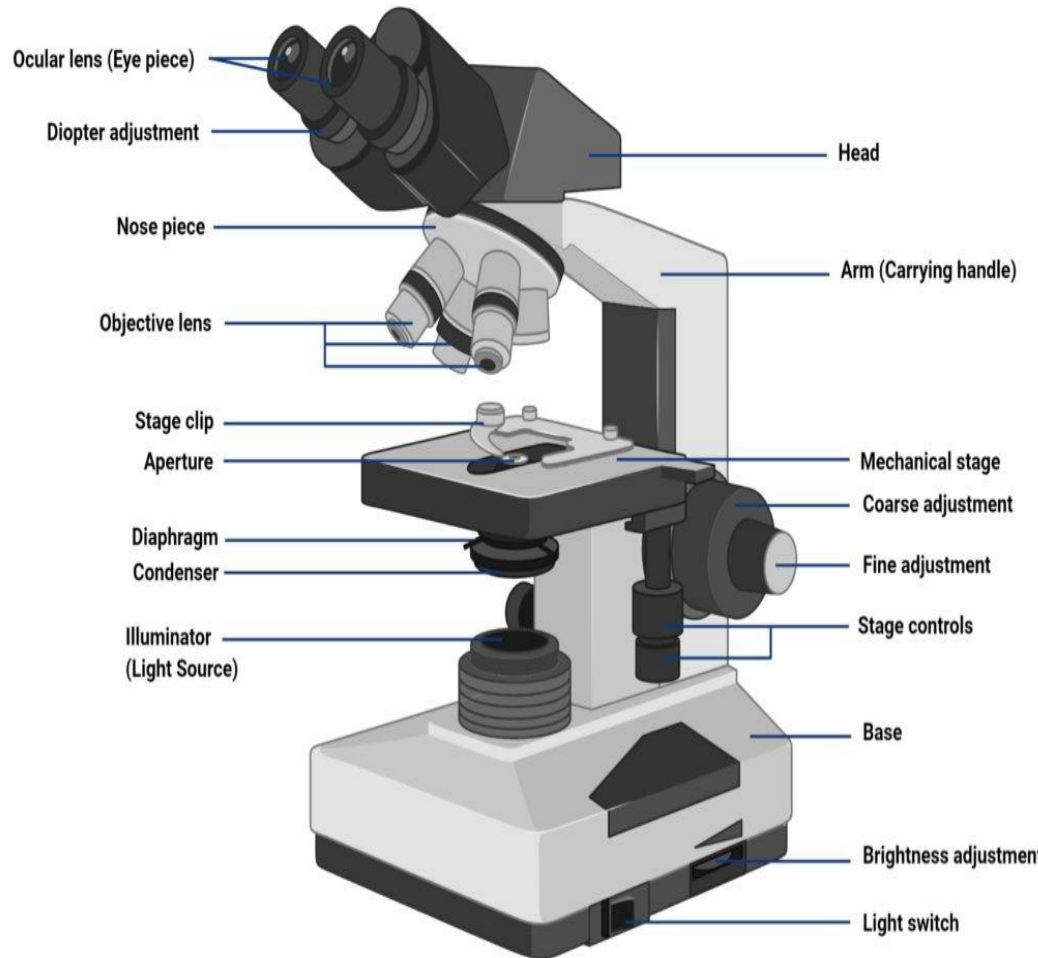
تضاد (Contrast)

به ایجاد سایه روشن و تضاد در نمونه‌های میکروسکوپی کنتراست گفته می‌شود. کنتراست را با روش های 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 در میکروسکوپ توسط تکنیکهای نوری و در نمونه توسط تکنیکهای مختلف رنگ آمیزی با استفاده از رنگهای رنگی Color dyes و فلزات سنگین heavy metals ، یکی از راه‌های مهم مطالعه نمونه‌های بیولوژیکی و تفکیک قسمتهای مختلف آنها است، که به روش‌های مختلف قابل اجرا و تنظیم می باشد.

بررسی قسمت های مختلف میکروسکوپ نوری

Microscope Parts



۱- عدسی چشمی Eye Piece یا Ocular

عدسی های چشمی به صورت دوتایی و در انتهای لوله کوتاهی نصب و در بالای لوله میکروسکوپ قرار می گیرند. هر لنز بزرگنمایی های مختلف $\times 10$ ، $\times 12$ ، $\times 25$ می تواند داشته باشد، ولی معمولاً در آزمایشگاههای آموزشی از بزرگنمایی $\times 10$ استفاده می شود.

این عدسی ها اساساً از تعدادی عدسی محدب الطرفین ساخته شده اند که در مجموع کار یک ذره بین را انجام می دهند. مقایسه فاصله کانونی عدسی های چشمی و عدسی های شیئی نشان می دهد که به طور کلی عدسی های چشمی فاصله کانونی بزرگتری (در حد چند سانتیمتر) دارند، در حالیکه فاصله کانونی عدسی های شیئی کمتر (در حد چند میلیمتر) است.

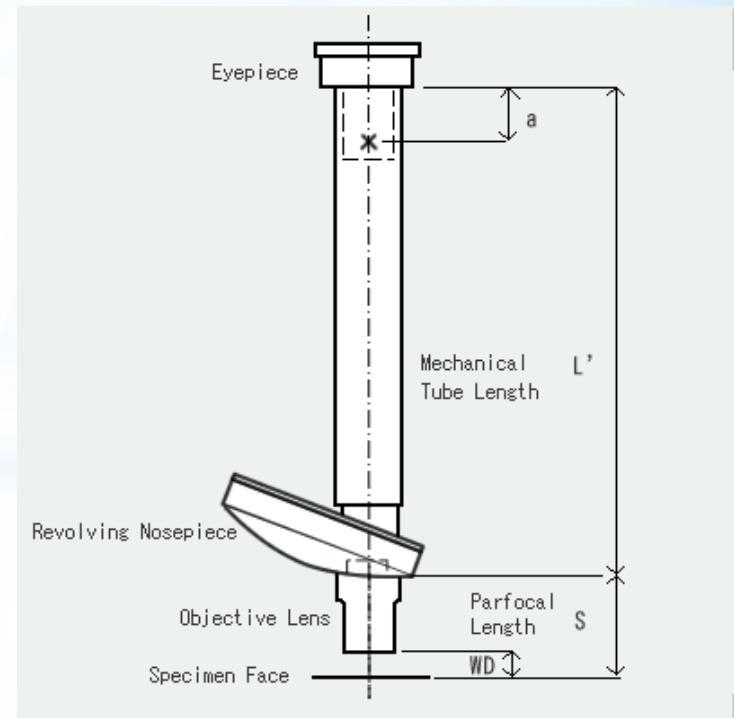
به همین دلیل میزان درشتنمایی عدسی های شیئی اغلب بیشتر از عدسی های چشمی می باشد.



انواع عدسی چشمی

۲-لوله میکروسکوپ Tube

استوانه ای به طول ۲۵-۱۶ سانتیمتر می باشد. از بالا به عدسی چشمی و از پایین به صفحه گردان میکروسکوپ متصل شده است. این لوله در بعضی از میکروسکوپها دو قسمتی است به طوریکه قسمتی از لوله بالایی می تواند در لوله پایینی بالا و پایین برود.



۳- صفحه گردان Nose Piece

صفحه‌ای است که عدسی‌های شیئی 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 شیئی جای می‌گیرند که تا ۶ عدد می‌توانند باشند و در بالا به لوله میکروسکوپ متصل می‌گردند.



۴- عدسی شیئی objective

هر عدسی شیئی درون لوله‌ی کوتاهی قرار گرفته که به صفحه گردان میکروسکوپ متصل شده است و بزرگنمایی‌های متفاوتی دارد: $\times 4$ ، $\times 10$ ، $\times 25$ ، $\times 40$ ، $\times 60$ ، $\times 100$. 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:

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

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

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

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



Crown



Flint



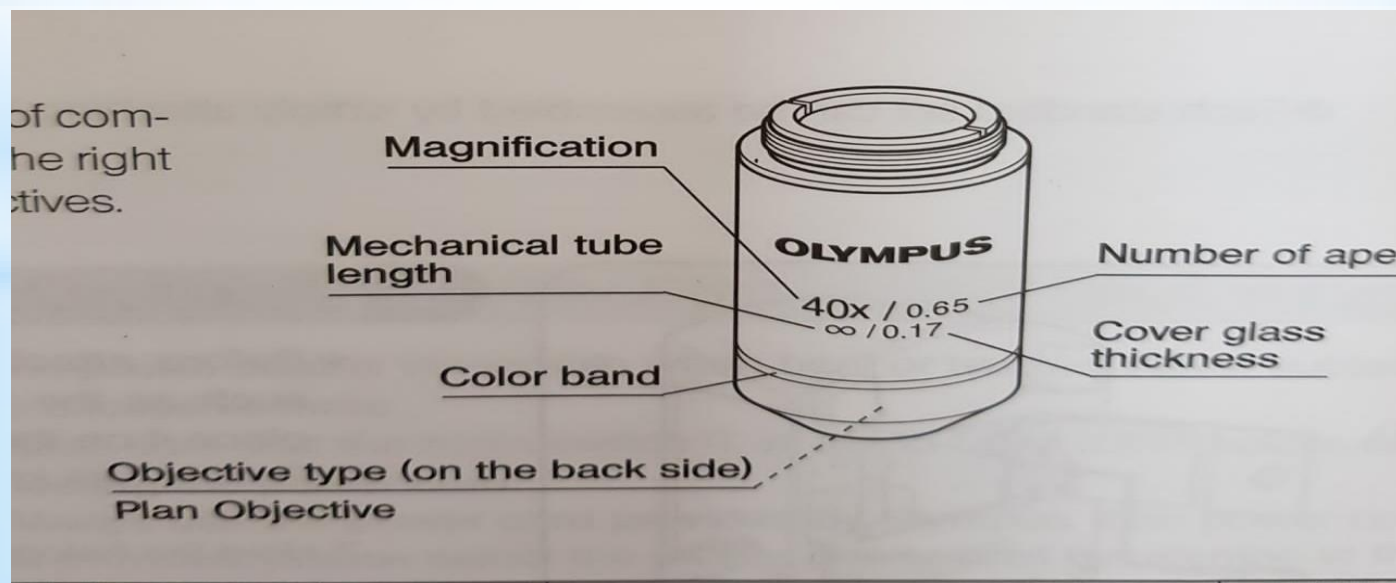
Fluorine



Quartz

بر روی عدسی‌های عدسی شیئی معمولاً اعداد مختلفی حک شده‌است که نشان دهنده بزرگنمایی، زاویه گشودگی Numerical Aperture، 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).





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

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

در بزرگنمایی 100 که به نور بیشتری نیاز است از عدسی ایمرسیون استفاده می‌شود. روغن یا مایع مورد استفاده در فاصله بین نمونه و عدسی، کار یک عدسی محدب را انجام می‌دهد و پرتوهای نوری را کانونی یا همگرا می‌سازد و به عدسی شیئی می‌رساند و از هدر رفتن آن‌ها جلوگیری می‌کند.



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.

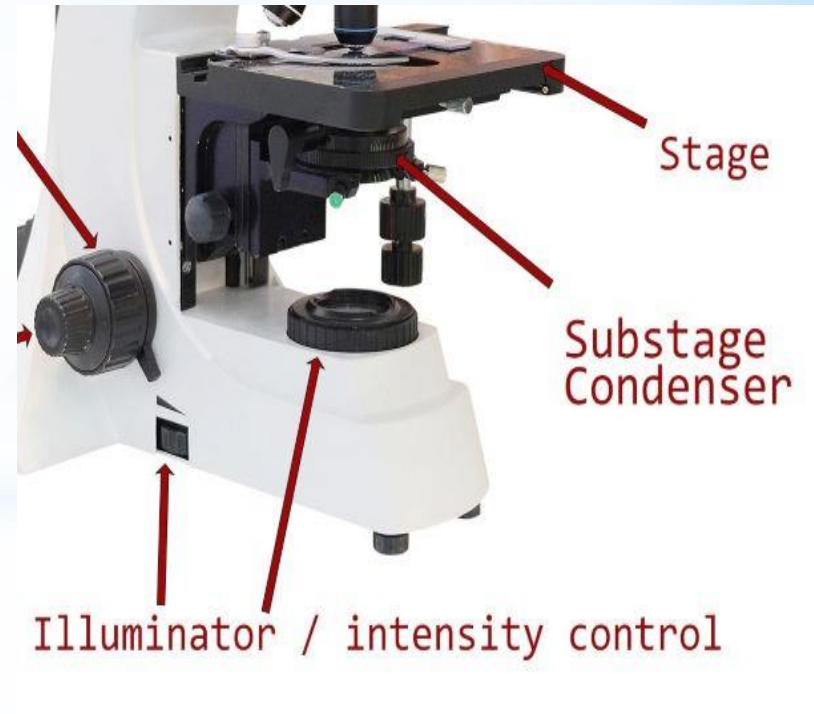
در میکروسکوپ‌های جدیدتر برای سهولت جابه‌جایی صفحه و جسم، سیستمی به نام شاریوت Chariot وجود دارد که شامل دو بخش تیغه‌ای برای نگهداری نمونه است و با پیچ‌های تنظیم در زیر می‌توان نمونه روی صفحه را به بالا، پایین، چپ و راست حرکت داد.

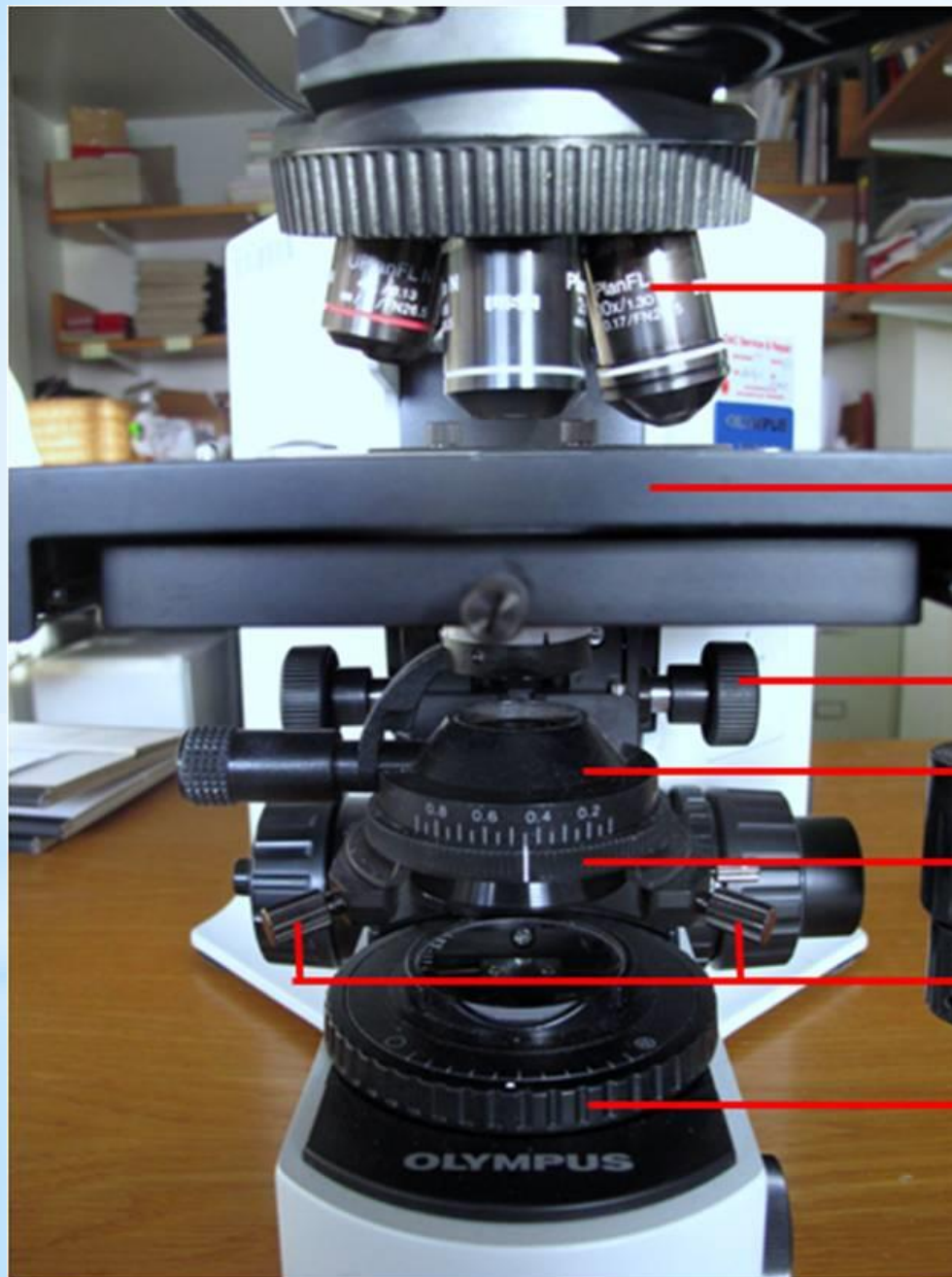
سیستم ورنیه در دو قسمت عمود برهم و مدرج برای پیش‌بینی میزان جابه‌جایی جسم و بازیابی مختصات و محل دقیق منطقه خاصی از نمونه طراحی شده است.



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. معمولاً باید در بالاترین وضعیت خود باشد اما گاهی میتوان با توجه به ماهیت نمونه برای دید بهتر موقعیت آن را تغییر داد.





Objective lenses

Stage

Condenser
adjustment dial

Condenser

Iris diaphragm

Condenser
centering screws

Field diaphragm

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 وسیله 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 ساده

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 مردمکی



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 وسیع‌تر 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.

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.

9- 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 لامپ‌های 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 می‌گردید. آینه معمولاً دو رو، در نورشدید از آینه مسطح و در نور ضعیف از آینه مقعر استفاده می‌گردید.

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 نمونه در در میکروسکوپ نوری



تنظیم میکروسکوپ

صفحه گردان را با 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 می نامند. 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 کاملاً محو گردد که با استفاده از پیچ های میکرو و ماکرو فوکوس میتوانید تصویر را میزان کنید.

معرفی برخی از انواع میکروسکوپ‌های تحقیقاتی

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 وسیله‌ی 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 از آن 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. تصویر نمونه در میکروسکوپ استریو



میکروسکوپ لوپ

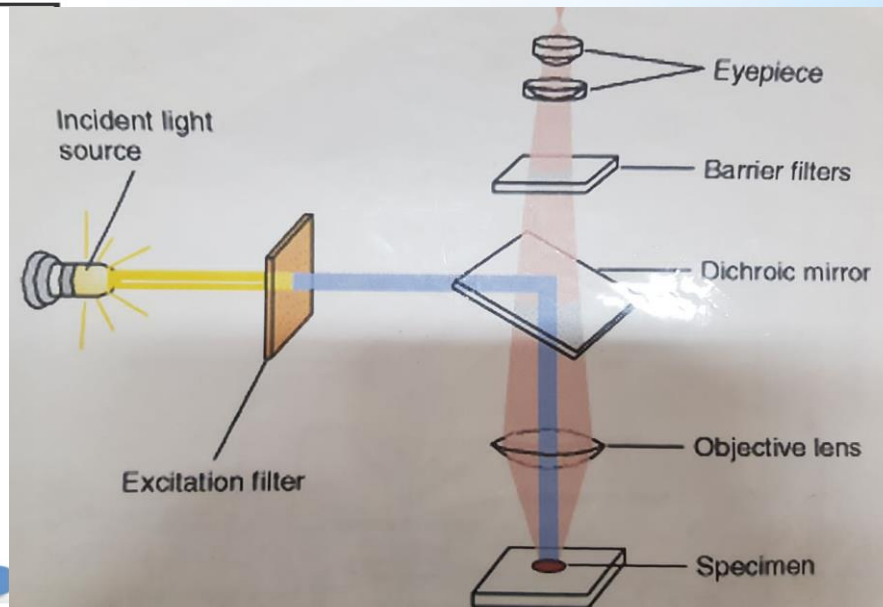


تصویر نمونه در لوپ

میکروسکوپ فلورسنت

فلورسانس یک پدیده اپتیکی است که در بعضی از مولکولها دیده می‌شود. این مولکولها فلوروفور **Fluorophore** نامیده می‌شوند. مولکولهای مذکور پرتوهای فرابنفش یا امواج مرئی با طول موج بسیار کوتاهه 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.

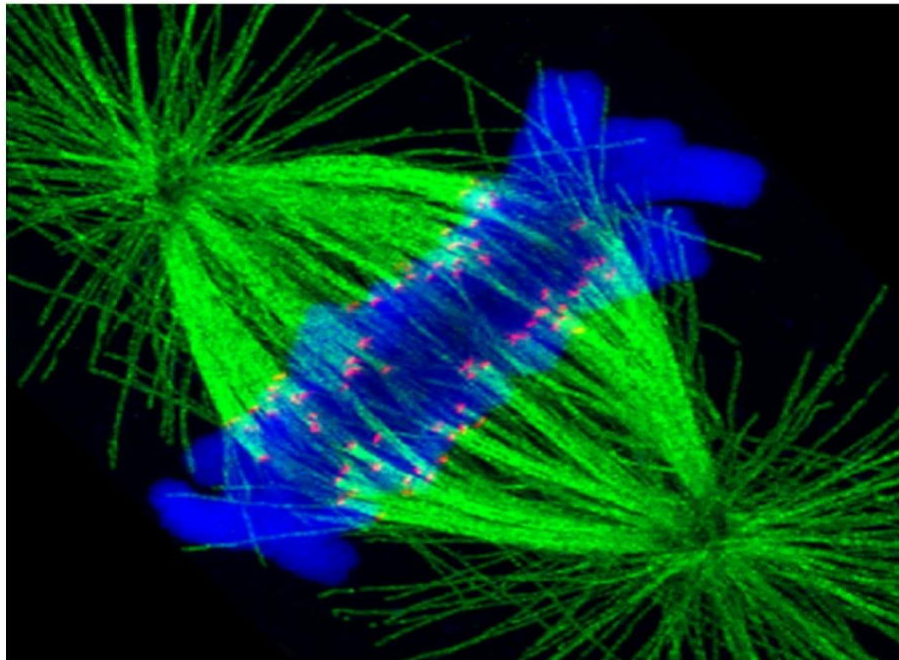
ب) فیلتر سد کننده Barrier Filter

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

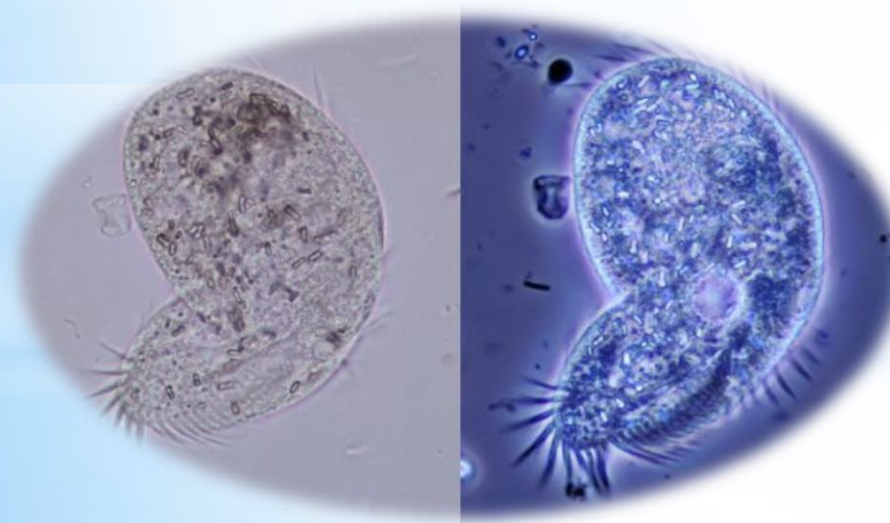


تصویر نمونه در میکروسکوپ فلورسانس
از میکروتوبول های سلولی (سبز)
وکروموزوم های قرار گرفته در کمربند
سلولی (آبی) در حین تقسیم سلولی میتوز

میکروسکوپ زمینه متضاد

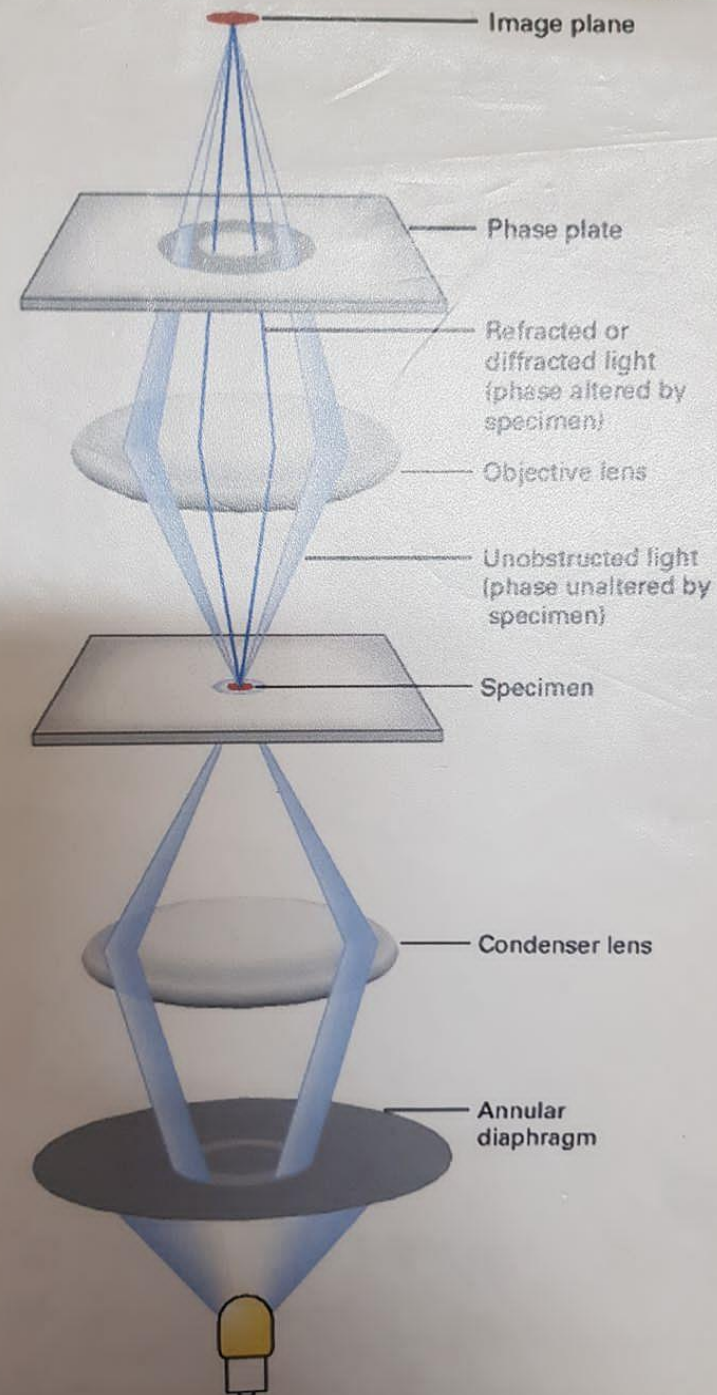
مطالعه بافتها و یاخته‌ها با میکروسکوپ وقتی امکان پذیر است که اولاً به قدر کافی نازک باشند تا نور یا الکترون از آنها عبور کنند، ثانیاً بین بخشهای مختلف آنها کنتراست یعنی اختلاف میزان نور یا تفاوت رنگ وجود داشته باشد تا بتوان هر جزء را از اجزاء دیگر تمیز داد. با استفاده از تکنیک‌های رنگ آمیزی و تثبیت،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

در میکروسکوپ فاز کنتراست 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.



تصویر در میکروسکوپ فاز کنتراست

آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر



میکروسکوپ زمینه تاریک

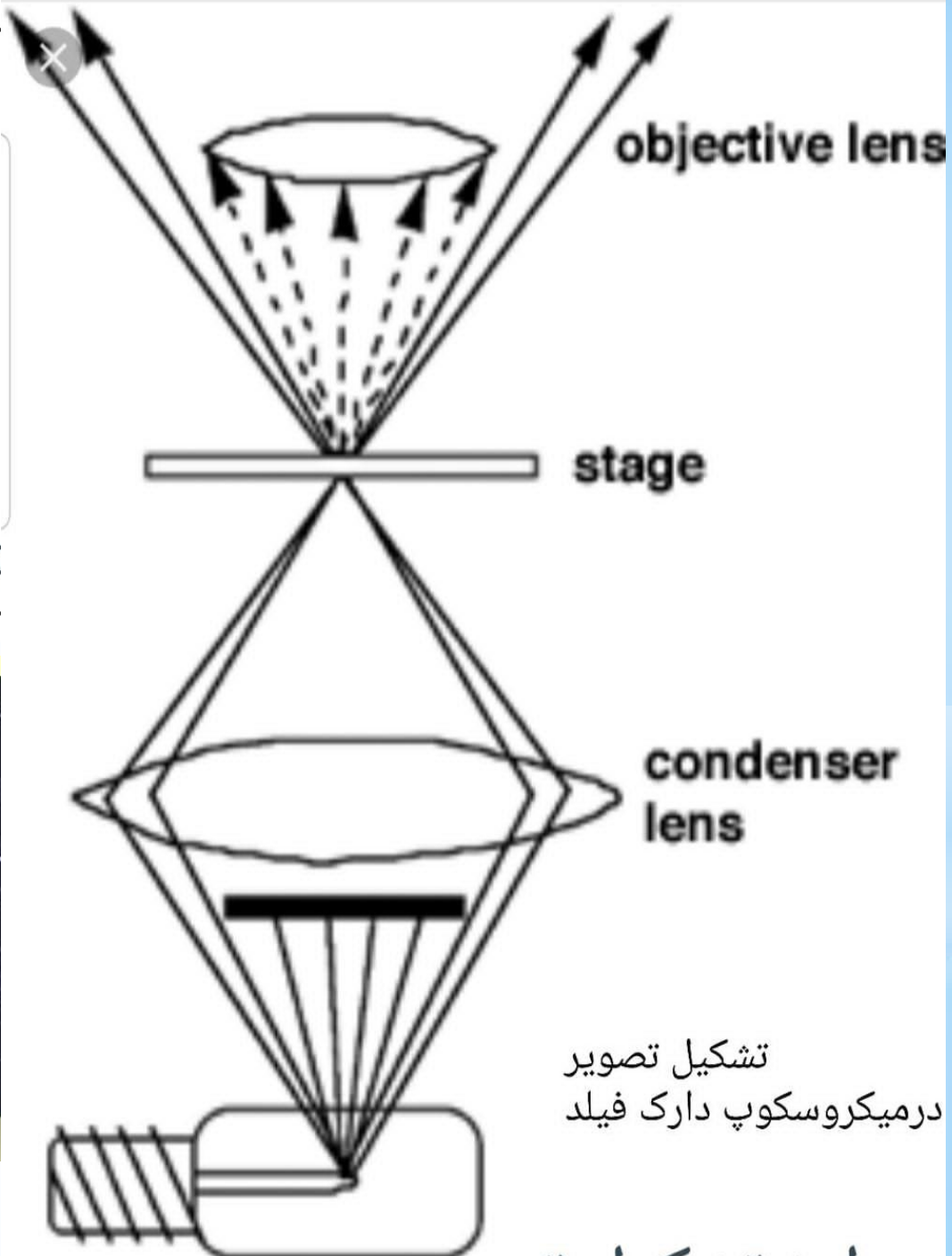
میکروسکوپ زمینه تاریک نیز قادر به ایجاد کنتراست در نمونه رنگ آمیزی نشده می‌باشد. در این میکروسکوپ به جای کندانسور معمولی، کندانسوری وجود دارد که به طور مایل یا مورب نور را به جسم می‌تاباند. به سبب وجود این کندانسور هیچ نوری مستقیماً وارد عدسی شیئی نمی‌شود و زمینه میکروسکوپ تیره به نظر می‌رسد.

هنگامیکه اجسامی با ضریب شکستی بیش از محیط پیرامون خود مثل باکتریها که در محیط مایع حرکت می‌کنند، در میدان دید میکروسکوپ قرار 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.

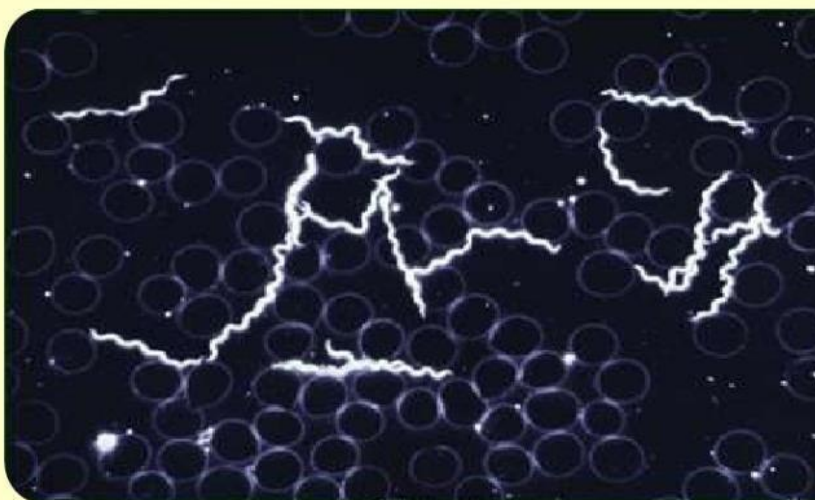
با میکروسکوپ زمینه تاریک اجسامی که کوچکتر از حد تفکیک میکروسکوپ نوری معمولی هستند را می‌توان دید ولی جزئیات ساختاری آن را نمی‌توان تشخیص داد. از اختصاصات ویژه این میکروسکوپ وجود صفحه مات و کدر در زیر کندانسور است که در بعضی از میکروسکوپها در وضعیت مایل قرار گرفته است.



میکروسکوپ زمينه
تاریک



تشکیل تصویر
در میکروسکوپ دارک فیلد

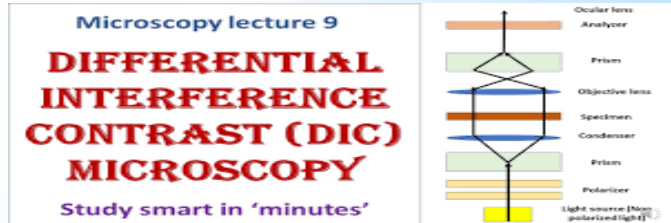
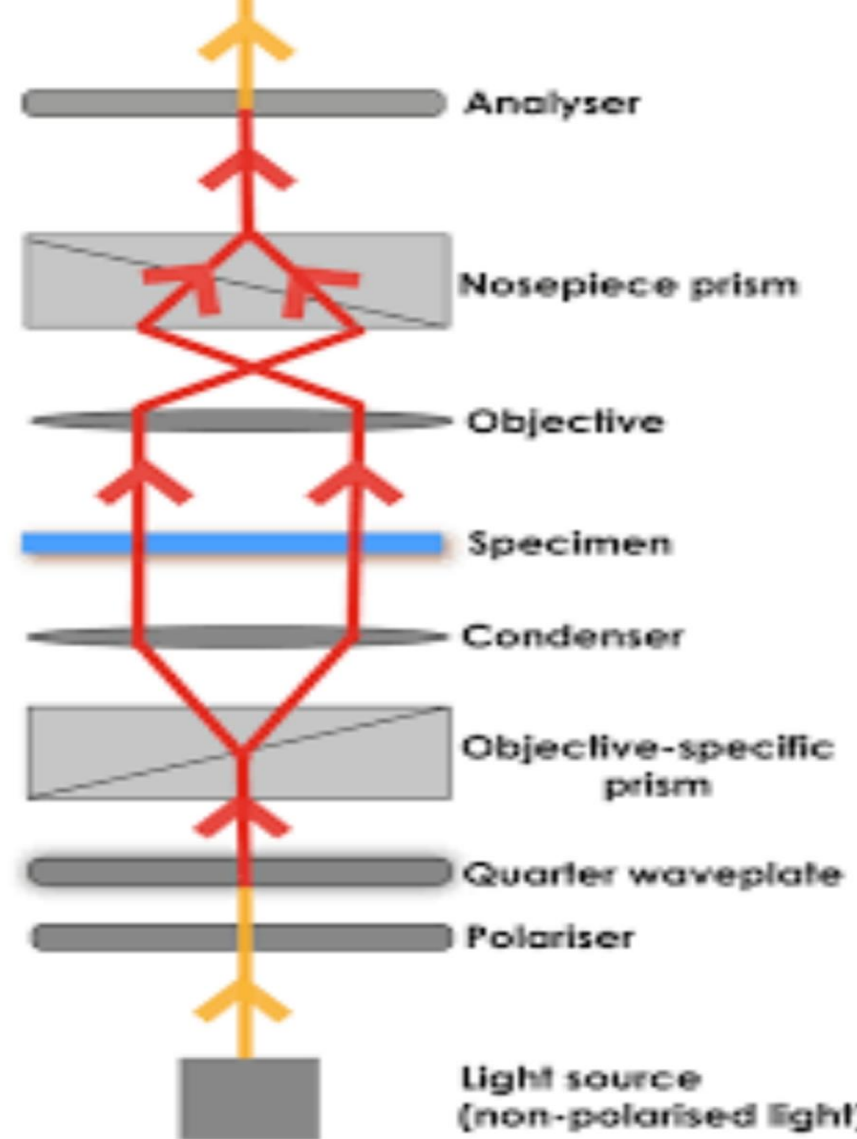
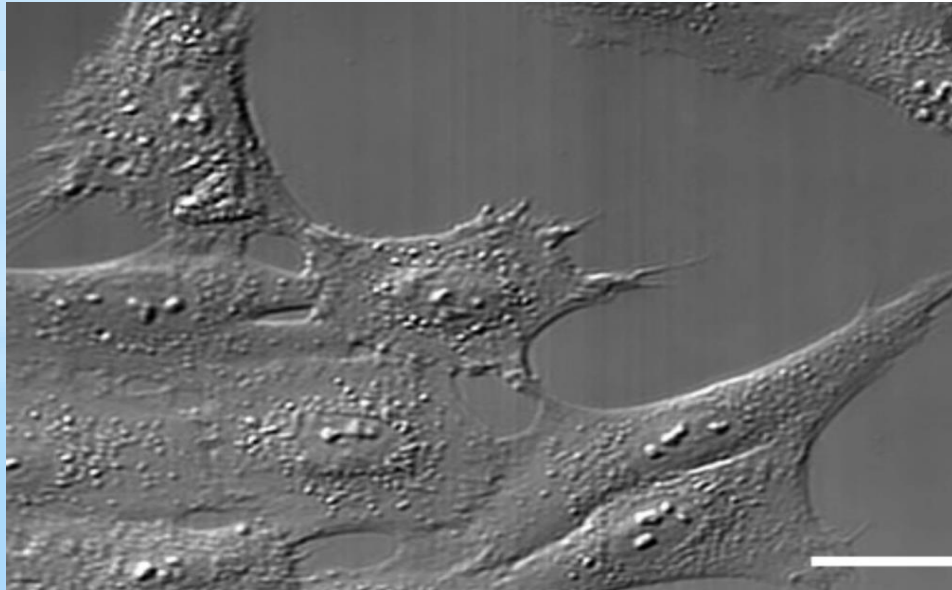
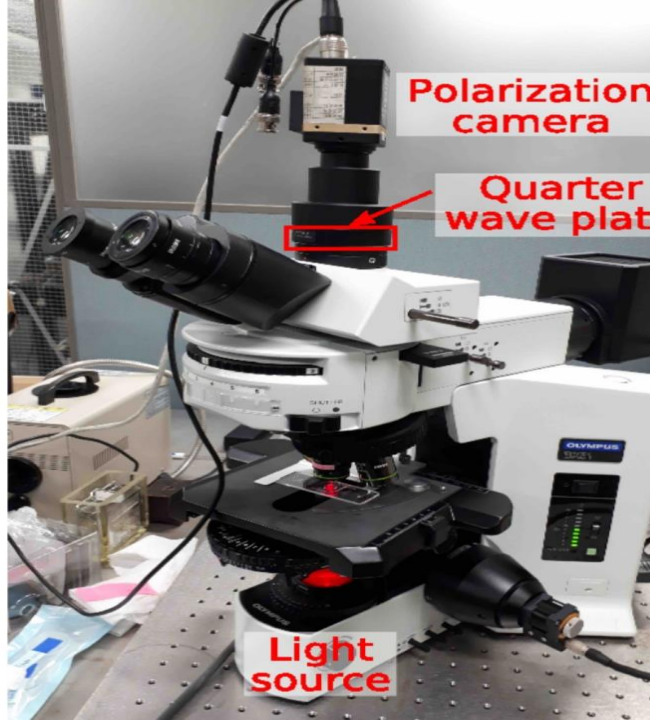


تصویر در میکروسکوپ زمينه تاریک
آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر

میکروسکوپ کنتراست افتراقی - تداخلی DIC

نوعی میکروسکوپ نوری که از تولید نور پلاریزه (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 اینجا 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.

DIC microscope



تصویر نمونه در میکروسکوپ کنتراست افتراقی-تداخلی
آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر