انواع میکروسکوپ

میکروسکوپ یا **ریزبین** از دو واژه یونانی **میکرو** به معنای کوچک و **سکوپ** به معنی روٌیت (مشاهده) تشکیل شده است. بنابراین میکروسکوپ در واقع ابزار مشاهده ساختارهای کوچک می‌باشد.

میکروسکوپ نوری

- نام دیگر میکروسکوپ نوری، زمینه روشن بوده و علت این نامگذاری این است که نور از میان قسمتی شفاف عبور می‌کند و زمینه اطراف شئ مورد مطالعه را روشن می‌نماید. در این میکروسکوپ، منبع نور دهنده، نور مرئی است.
- هر میکروسکوپ نوری از دو بخش مکانیکی و نوری تشکیل شده است

الف- بخش مکانیکی:

- بخش مکانیکی شامل قسمت‌هایی است که مستقیما در عبور و تشکیل تصویر نقش اصلی را به عهده ندارند و شامل کلیه بخش‌های نگهدارنده، حرکت دهنده و ثابت کننده یک میکروسکوپ است، مانند:

1- پایه،

2- دسته

3- صفحه میکروسکوپ،

4-صفحه گردان یا متحرک

5- پیچ‌های تنظیم ماکرومتر (سریع) و میکرومتر (دقیق)،

6- سیستم ورنیه

7- لوله میکروسکوپ

- **پایه میکروسکوپ:** به اشکال نعلی، مدور، مکعب مستطیلی و مانند آن ساخته می‌شود. جنس پایه معمولا از فولاد سنگین انتخاب می‌گردد تا در زمان مطالعات میکروسکوپی و عکس‌برداری از هر گونه لغزشی جلوگیری شود.
- **دسته میکروسکوپ:** برای جابجایی میکروسکوپ به کار می‌رود.
- **صفحه میکروسکوپ:** صفحه‌ای است فلزی یا کائوچویی که محل قرار دادن جسم مورد مطالعه می‌باشد. نور از منفذ تعبیه شده در وسط صفحه پلاتین عبور کرده و به نمونه مورد مطالعه می‌رسد. روی صفحه دو گیره برای نگهداشتن لام نصب شده است که لام را به طور افقی و درجهات مختلف حرکت می‌دهند.

- **پیچ های تنظیم کننده** : شامل پیچ تنظیم سریع یا ماکرومتر و پیچ تنظیم دقیق یا میکرومتر می‌باشد که بر روی دسته میکروسکوپ قرار دارند. این پیچ‌ها صفحه پلاتین را در جهت بالا به پایین و بالعکس جابجا می‌کنند. با پیچ بزرگ، صفحه پلاتین با سرعت بیشتری بالا و پائین برده می‌شود.
- **سیستم ورنیه:** از دو قسمت خط کش مانند درست شده است که طول وعرض مختصاتی نمونه را مشخص می کند ومی توان با یادداشت کردن این دو عددپس از جابجاشدن نمونه دو باره نقطه مورد نظر را به راحتی پیدانمود.

- **صفحه گردان:** قطعه فلزی است، تقریبا به شکل مخروط ناقص که در سطح پایین آن تعدادی سوراخ تعبیه شده است. به هر یک از این سوراخ‌ها، یک لوله عدسی شیئی پیچ می‌شود. با چرخاندن صفحه گردان، عدسی شیئی مورد نیاز در میدان دید قرار می‌گیرد.

- **لوله میکروسکوپ:** استوانه‌ای است به طول تقریبی 20 تا 25 سانتیمتر که عدسی چشمی در بالای آن قرار دارد و از پائین به صفحه گردان متصل است.

ب) بخش نوری

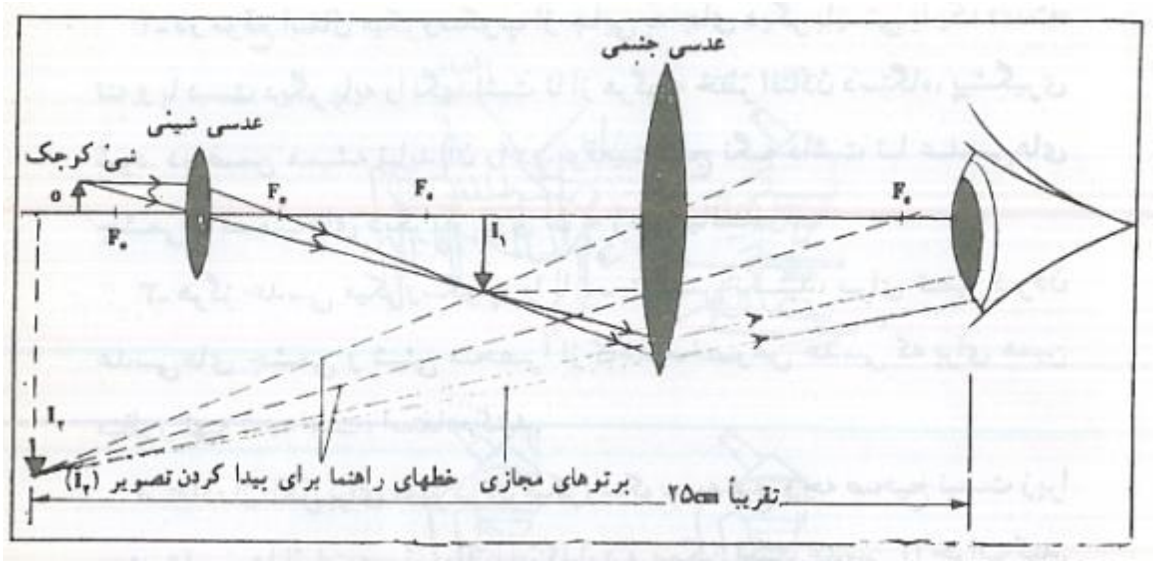
شامل سه بخش اساسی است: **دستگاه روشنایی، عدسی شیئی و عدسی چشمی.**

1- دستگاه روشنایی: از سه بخش تشکیل شده است.

- **منبع نور**: به لامپی است که در زیر کندانسور قرار دارد و نور را از سوراخ صفحه میکروسکوپ به جسم می‌تاباند.
- **کندانسور:** از مجموعه‌ای از عدسی‌های محدب (کوژ) یا محدب الطرفین ساخته شده که عمل آنها همگرا کردن پرتوهای نوری حاصل از منبع نور و تابانیدن آنها بر روی جسم است تا نور کافی برای مشاهده جسم تامین گردد.
- **دیافراگم:** وسیله تنظیم شدت نور میکروسکوپ است که یا میزان نوری را که منبع روشنایی به کندانسور می‌رسد، تنظیم می‌کند یا شدت نوری را که از کندانسور گذشته و به جسم می‌رسد تنظیم می‌کند

2- عدسی شیئی:. **تصویری بزرگتر از جسم، معکوس و حقیقی** ایجاد می کند . طول عدسی‌های شیئی با یکدیگر متفاوت است. عدسی کوچکتر، عدسی با بزرگنمایی ضعیف‌تری است، در حالی که عدسی بزرگتر، عدسی با بزرگنمایی قوی‌تر می‌باشد. عدسی‌های دارای بزرگنمایی کمتر (مثل: x4، x8، x10 یا x 25)را عدسی ضعیف و عدسی‌های دارای بزرگنمایی بیشتر (مثل: x40، x60 یا x100) را عدسی قوی می‌خوانند

3- عدسی چشمی: عدسی‌های چشمی اساسا از تعدادی عدسی محدب یا محدب الطرفین ساخته شده‌اند .عدسی چشمی در مجموع کار یک ذره‌بین را انجام می‌دهند و از تصویر ایجاد شده به وسیله عدسی شیئی، **تصویری مجازی، مستقیم** (معکوس نسبت به جسم اولیه) و **بزرگتر** درست می‌کند.



- **بزرگ‌نمایی:** میزان بزرگتر نمایش دادن تصویر نسبت به جسم را بزرگنمایی گویند که در میکروسکوپ نوری برابر است با حاصل ضرب بزرگنمایی عدسی شیئی در عدسی چشمی.

- **توان تفکیک:** کوچکترین فاصله قابل تشخیص بین دو نقطه واقع بر یک سطح را که به وسیله میکروسکوپ قابل تشخیص باشد، توان تفکیک آن گویند.

- ✓ هر چه مقدار عددی توان تفکیک کمتر باشد، قدرت تفکیک میکروسکوپ بیشتر است.

- ✓ حداقل حد تفکیک میکروسکوپ در نور سفید 0.25 میکرون است، در حالی که حد تفکیک چشم غیر مسلح حدود 0.1 میلی‌متر است.

نحوه کار با میکروسکوپ

1-آماده کردن نمونه میکروسکوپی

2-تنظیم و آماده کردن میکروسکوپ

آماده کردن نمونه میکروسکوپی

- جسمی با میکروسکوپ قابل مشاهده است که نور بتواند از آن عبور کند و از عدسی‌ها گذشته به چشم برسد. بعلاوه این جسم باید آن قدر نازک باشد که جزئیات ساختاری آن بوضوح دیده شود.

✓ بنابراین یا خود نمونه باید نازک باشد مانند نمونه هایی که در آزمایشگاه سلولی مشاهده می کنید

✓ برای مشاهده نمونه های ضخیم بافتی باید با استفاده از « روشهای ویژه تهیه برشها» مقاطع و ساختارهای سلولی نازک و مشخصی تهیه کرد (آزمایشگاه بافت شناسی)

- برای مشاهده نمونه مورد نظر در زیر میکروسکوپ، (لام) یا اسلاید تمیزی را روی میز قرار دهید و با قطره چکانی یک قطره آب در وسط آن بچکانید. سپس نمونه مورد نظر را با پنس روی یک قطره آب وسط لام قرار دهید. (لاملی) را بر دارید و یک لبه آن را با زاویه حدود ۴۵ درجه روی لام تکیه دهید و سپس آن را با نوک سوزن به آرامی پایین بیاورید تا نمونه را بپوشاند. با این عمل از تشکیل حباب هوا بین لام و لامل جلوگیری می‌شود. اگر با همه احتیاط معمول حباب هوا ایجاد شد با نوک مداد لامل را فشار دهید تا حباب خارج گردد. همیشه لبه لام و لامل را بگیرید و از تماس انگشتان با سطح آنها خودداری کنید.

تنظیم و آماده کردن میکروسکوپ

1- صفحه گردان را بچرخانید و کمترین عدسی (مثلا x4) را که کوتاهتر است در امتداد لوله میکروسکوپ قرار دهید ضمنا به صدای جا افتادن عدسی توجه کنید.

2-عدسی چشمی را برای فاصله‌ی بین دو مردمک چشم خودتنظیم کنید، طوریکه با هر دو چشم فقط یک میدان دید دایره‌ای را ببینید اگر این گونه نشود، سعی کنید با دور و نزدیک کردن دو عدسی چشمی از هم برای هر دو چشمتان یک میدان دید ایجاد کنید.

3- با کمک پیچ تنظیم ماکرو صفحه‌ی میکروسکوپ را تا پایین ترین حد ممکن قرار دهید.

4-اسلاید مورد نظر را بر روی صفحه‌ی میکروسکوپ قرار داده و توسط گیره در جای خود محکم و ثابت کنید.

5-لامپ میکروسکوپ را روشن کنید.

6- در عدسی چشمی نگاه کنید و همزمان با استفاده از پیچ ماکرو، صفحه را بالا بیاورید. این کار را ادامه دهید تا تصویر نمونه ظاهر گردد. این تصویر ممکن است چندان واضح نبوده، زیاد روشن یا نسبتاً تاریک باشد.

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

8- در صورت نیاز به عدسی‌های شیئی دیگر می‌توانید بدون جابجایی صفحه و استفاده از پیچ‌های ماکرو، عدسی‌های قوی‌تر را انتخاب کرده که در این مرحله ممکن است تصویر واضح نبوده و یا کاملاً محو گردد که با استفاده از پیچ‌های میکرو می‌توانید صفحه را کمی جابجا نموده تصویر را میزان کنید.

در صورت انتخاب عدسی x100 قبل از انتخاب و جا انداختن آن کارهای زیر را انجام دهید.

الف- با هر عدسی شیئی که کار می‌کنید، تغییر داده عدسی x4 را انتخاب و در جای خود قرار دهید.

ب- یک قطره روغن ایمرسیون یا روغن سدر در وسط اسلاید (محل تابش نور به نمونه) قرار دهید.

- ✓ در بزرگنمایی‌های بالا (x100) که به نور بیشتری نیاز است، از روغن ایمرسیون یا سدر استفاده می‌شود که ضمن آن مایع موجود در فاصله بین نمونه و عدسی شیئی کار یک عدسی محدب را انجام می‌دهد و پرتوهای نوری را کانونی و همگرا می‌کند و به عدسی شیئی می‌رساند و به این ترتیب از هدر رفتن آنها پیش‌گیری می‌کند.

ج- عدسی x100 را انتخاب و در جای خود قرار دهید و فاصله آن را از نمونه را تنظیم کنید

د-در صورت نیاز دیافراگم را باز تر و یا شدت نور لامپ را زیادتر کنید.

نکاتی که هنگام کار با میکروسکوپ باید توجه کنید

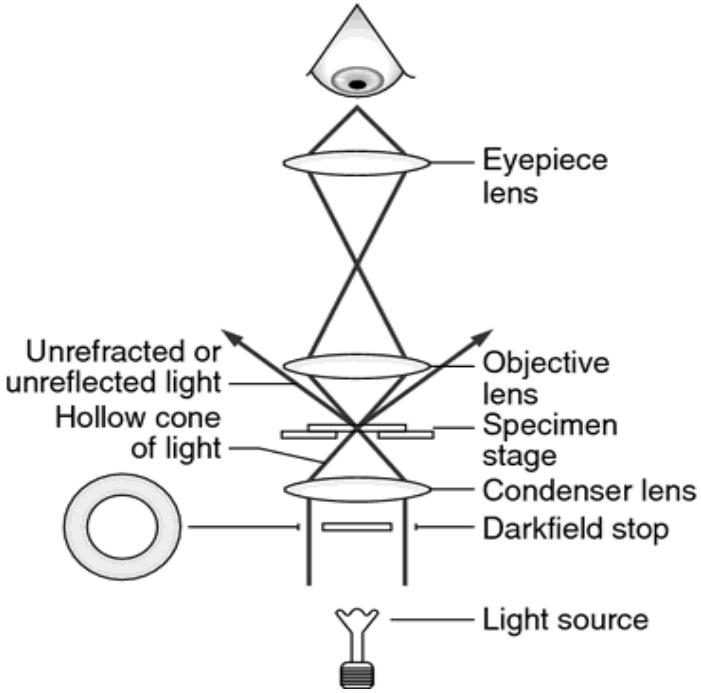
- هیچگاه نوک عدسی را بر روی لام فشار نیاورد.
- بعد از خاموش کردن میکروسکوپ حداقل ۱۰ دقیقه از حرکت دادن دستگاه اجتناب کنید.
- قبل ازاستفاده از میکروسکوپ به تمیز بودن عدسی‌ها مطمئن شوید. لنزهای میکروسکوپ به راحتی خراشیده می‌شوند و می‌بایست به خوبی مراقبت شوند. می‌توان با کاغذ لنز مرطوب با آب مقطر و یا الکل و مالیدن با حرکتی دایره‌ای لنز را تمیز کرد. هیچگاه از اجسام نوک تیز بر روی لنز میکروسکوپ استفاده نکنید و از استفاده کردن دستمال کاغذی جهت تمیز کردن لنزها پرهیز نمایید.
- همواره برای دیدن نمونه‌ها از عدسی‌های با شماره ضعیف به سمت عدسی‌های قوی بروید.
- در هنگام استفاده از عدسی های با قدرت بالا به همان نسبت شدت نور میکروسکوپ را بالا ببرید.
- در هنگام قراردادن اسلاید در میکروسکوپ و برداشتن آن از میکروسکوپ توجه داشته باشید که عدسی‌ها در تماس با اسلاید نباشند.
- بعد از استفاده کردن از روغن ایمرسیون عدسی را به وسیله زایلن تمیز نمایید.

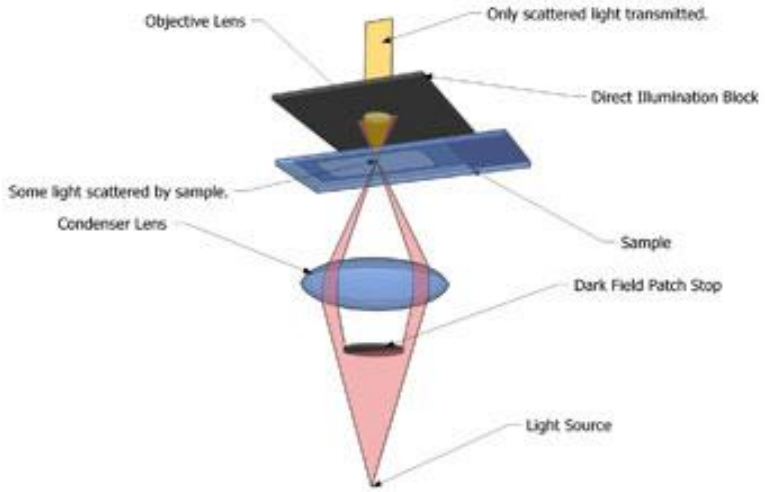
میکروسکوپ زمینه تاریک

- اساس ساختمان این میکروسکوپ همانند یک میکروسکوپ نوری معمولی است با این تفاوت که دیافراگم کندانسور آن بنحوی ساخته شده که **بخش میانی آن غیر شفاف و مانع عبور پرتوهای نوری مرکزی** است و **نور تنها از کناره های دیافراگم** و به طور مایل به جسم می تابد. با استفاده از این دیافراگم:

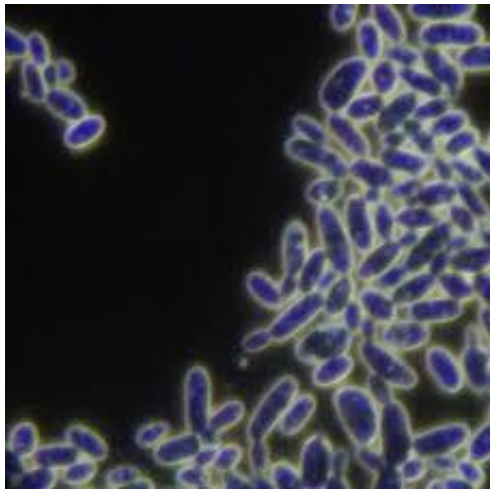
الف) زمینه رویت میکروسکوپ تاریک می شود

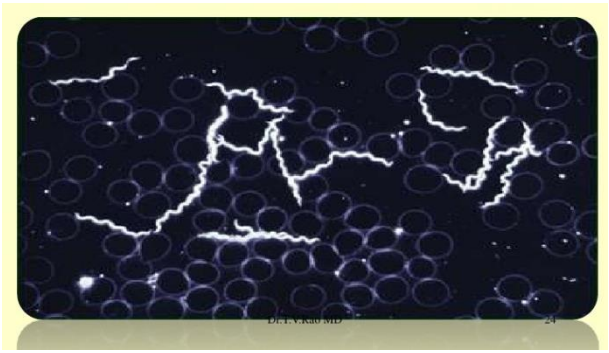
ب) از پرتوهای محیطی که به طور مایل به جسم می تابد، تنها بخش پراش یافته به وسیله سطح جسم وارد عدسی می شود و تصویر را به وجود می آورد. هیچ پرتویی که مستقیما از جسم بگذرد، وارد عدسی نخواهد شد

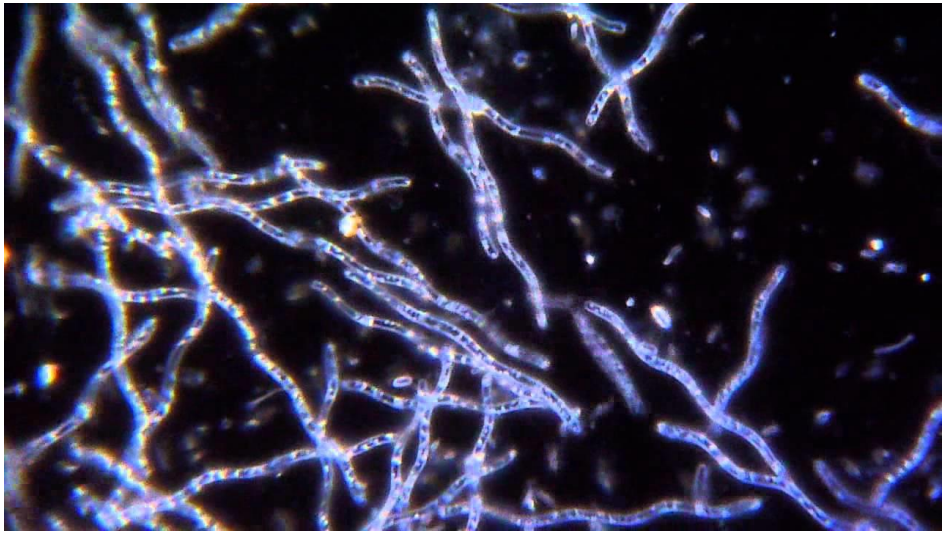




- میکروسکوپ زمینه تاریک می توان برخی ساختمان هایی را که ابعادشان پایین تر از حد دید میکروسکوپ نوری معمولی است رویت یا عکسبرداری کرد. بدیهی است، کاربرد این میکروسکوپ، بیشتر برای مطالعات ریخت شناسی و برخی حرکات سلولی یا اندامک های سلولی است.





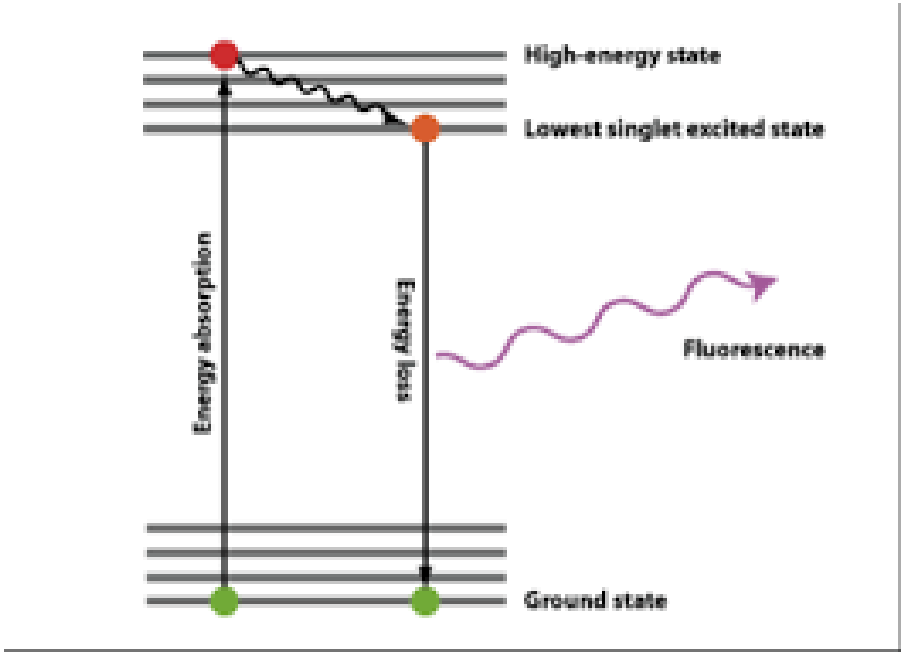


میکروسکوپ فلوئورسانس

مواد فلوئورسنت

- مواد فلوئورسنت به موادی گفته می شوند که خاصیت فلوئورسانس دارند و نور را در طول موج فرابنفش جذب می‌کنند و در طول موج بلندتری در طیف مرئی تابش میکنند.

- وقتی برخی اتم ها به وسیله محرکی از جمله پرتوهای دارای طول موج کوتاه مثل پرتو فرابنفش تحریک شود ممکن است الکترون ها تحریک و پرانرژی شده از مدار خود خارج شوند، به طور بدیهی نیروی جاذبه هسته اتم از فرار الکترون ها ممانعت خواهد کرد. برای آن که الکترون های تحریک شده بتوانند به مدار خود بازگردند بایستی مقداری از انرژی را که گرفته اند، از دست بدهند، چنانچه انرژی از دست داده شده به حد طول موجهای مرئی برسد، پدیده فلوئورسانس صورت گرفته میگیرد



بطور کلی مواد از لحاظ خاصیت فلوئورسانس دو نوعند :

- **فلورسانس اولیه یا اتوفلوئورسانس: این مواد ذاتاً خاصیت فلورسانس دارند و با تابش پرتوهای فرابنفش به آن‌ها روشنایی قابل روًیتی ایجاد می کنند.**

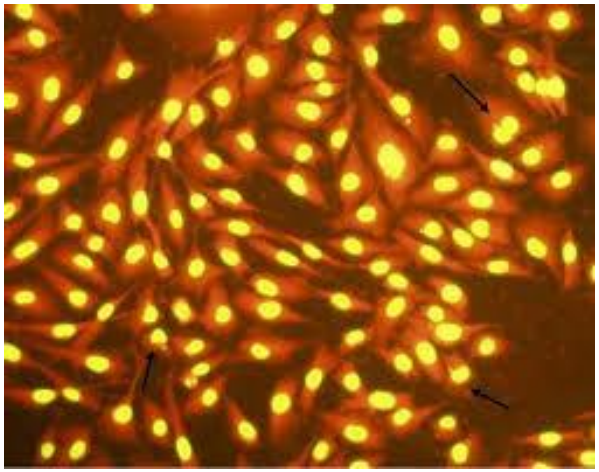
✓ از رایج ترن مولکول های اتوفلوئورسانس **NADPH ، فلاوین، ریبوفلاوین و کلروفیل II** می‌باشد. ماتریکس خارج سلولی نیز به علت خصوصیات ذاتی کلاژن و الاستین می‌تواند به اتوفلوئورسانس کمک کند.

- **فلوئورسانس ثانویه: این مواد از خود خاصیت فلوئورسانسی ندارد. در این حالت برای درخشان کردن آن ها از ترکیبات شیمیایی فلوئورسنت به اسم فلوئوروکروم ها (فلوئوروفور) استفاده می شود.**

فلوئوروکروم ها

الف) می تواند به عنوان یک رنگ برای رنگ آمیزی ساختارهای مشخص استفاده شوند مانند :

- ✓ **آبی آنیلین که** کالوز را تحت تابش فرابنقش به رنگ سبز درخشان درمی آورد.
- ✓ **نارنجی آکریدین :** برای رنگ آمیزی واکوئول های اسیدی (لیزوزوم، اندوزوم و اتوفاگوزوم) که باکاهش pH رنگ آن از زرد تا نارنجی و قرمز تغییر می کند- مشاهده RNA و DNA که می تواند DNA و RNA را در حضور پرتو U.V به ترتیب به رنگ سبز فسفری زرد به خود می گیرند.
- ✓ **اتیدیوم بروماید** که به عنوان یک رنگ فلوئورسنت در روش هایی مانند الکتروفورز ژل آگارز، DNA را به رنگ بنفش نشان می دهد.



ب) می توانند به طور کوالان به ماکرومولکول هایی مانند آنتی‌بادی ها، پپیتیدها و اسیدهای نوکلئیک متصل شود و به عنوان یک مارکر عمل کنند مانند:

- ✓ **فلورسئین** به عنوان یک **فلوئوروکروم سبز رنگ** در ساخت مشتقاتی مانند (Fluorescein isothiocyanate) FITC به کار میرود که در نشان‌دار کردن آنتی بادی و اسیدهای نوکلئیک استفاده می شود.
- ✓ **رودامین** یک ترکیب **فلوئوروکروم نارنجی رنگ** می باشد که مشتقاتی از آن مانند (Tetramethylrhodamineisothiocyanate) TRITC برای نشان دار کردن آنتی بادی ها و پروتئین ها استفاده می شود

میکروسکوپ فلوئورسانس

- در میکروسکوپ میکروسکوپ فلوئورسانس به جای لامپ معمولی، پرتوهای فرابنفش به کمک لامپ جیوه مخصوصی پس از رسیدن به گرمای مناسب تامین میشود.

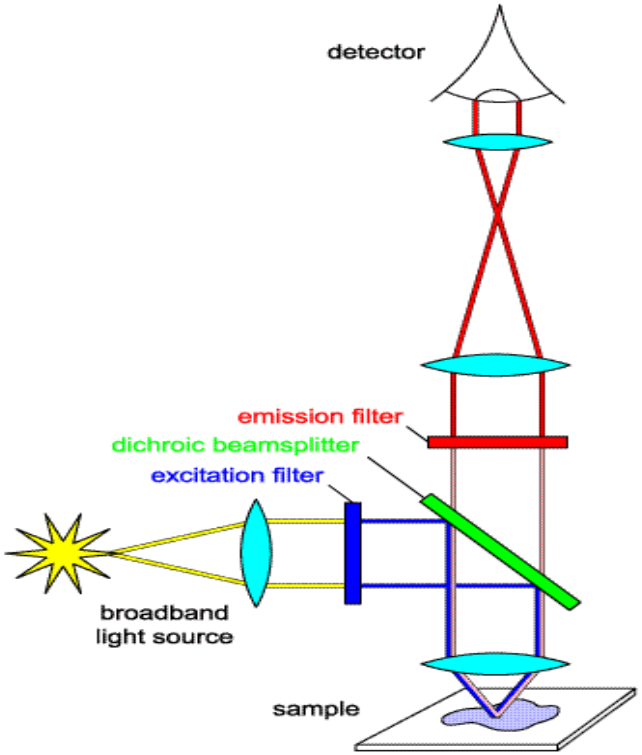
✓ **توان تفکیک** یک میکروسکوپ به **طول موج نوری** بستگی دارد که به نمونه می‌تابد. در حقیقت بین این دو رابطه مستقیمی وجود دارد یعنی هر چقدر طول موج تابشی کوچکتر باشد، حد تفکیک نیز کوچکتر و قدرت جداسازی بیشتر است.

- پرتوهای فرابنفش با **طول موج 400-200nm** در مقایسه با **نور مرئی با طول موج 400nm تا 800** دارای طول موج کوتاه تری هستند . بنابراین استفاده از پرتوهای فرابنفش که طول موج کوتاه تری از پرتوهای مرئی دارند، توان تفکیک میکروسکوپ را بهبود می بخشد

- **در میکروسکوپ های فلوئورسانس دو نوع فیلتر وجود دارد.**

✓ یک فیلتر بین منبع نور و نمونه قرار دارد: این فیلتر تنها طول موج های تحریک کننده را عبور می دهد که به وسیله ماده فلوئوروفور (نمونه) جذب می شود که این طول موج ها اغلب طول موج های کوتاهی هستند که باعث تحریک خاصیت فلوئورسنت نمونه می شود.

✓ فیلتر دیگر بین نمونه و عدسی قرار دارد و تنها طول موج های منتشر شده به وسیله ماده فلوئوروفور (نمونه) را عبور می دهد و مانع عبور نورهای ناخواسته خارج از این محدوده مخصوصا نورهای تحریک کننده می‌شود.



Fluorescein has an absorption maximum at 494 nm and emission maximum of 512 nm

میکروسکوپ استریو

- ایـن مـیـکروسکوپ که میکروسکوپ تشریحی نیز نامیده می شود
- یک نوع میکروسکوپ نوری است که برای مشاهده نمونه های نسبتا بزرگ، مثلا برای دیدن تمام یا قسمتی از سطح بدن یك حشره مورد استفاده می‌شود.
- در این نوع میکروسکوپ نور از سطح نمونه منعکس می‌شود به جای اینکه از آن عبور کند و یک تصویر سه بعدی از نمونه ایجاد می کند.

میکروسکوپ الکترونی

1- در هر دو نوع میکروسکوپ نوری و الکترونی، منبع پرتوها رشته‌ای از تنگستن ملتهب شده به وسیله جریان الکتریکی است.

- ✓ در میکروسکوپ نوری، پرتوهای نوری ایجاد شده از چنین رشته‌ای به وسیله کندانسور بر روی نمونه مورد مطالعه متمرکز می‌شوند.
- ✓ در میکروسکوپ الکترونی، الکترون‌های رها شده از اتم‌های تنگستن تهییج شده به صورت یک ستون یا دسته الکترونی به طرف نمونه مورد مطالعه شتاب داده می‌شود.

2-.عدسی‌های کندانسور، شیئی و پروژکتور به جای عدسی‌های شیشه‌ای از نوع بوبین‌های الکترومغناطیسی بسیار دقیقی هستند.

3-قدرت جداسازی میکروسکوپ‌های الکترونی از میکروسکوپ نوری بهتر است.

- ✓ بین حد تفکیک و طول موج نور تابیده شده به نمونه رابطه مستقیمی برقرار است، یعنی هر چقدر طول موج تابشی کوچکتر باشد، قدرت جداسازی بیشتر است.
- ✓ طول موج نور مرئی بین 400nm تا 700nm و بهترین حد تفکیک میکروسکوپ‌های نوری 200nm است.
- ✓ در میکروسکوپ‌های الکترونی به جای استفاده از امواج نور مرئی، از امواج الکترونها استفاده می‌شود. در شرایط مناسب، طول موج الکترونها به 0.005 nm می‌رسد بنابراین حد تفکیک با میکروسکوپ الکترونی برای مولکولهای تخلیص شده زیستی، حدود 0.1nm و برای سلول‌ها حدود 2nm است.

انواع میکروسکوپ الکترونی:

- ❖ **میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره یا عبوری یا Transmission Electron Microscope (T.E.M)**
- ❖ **میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره یا روبشی یا Scanning Electron Microscope (SEM)**

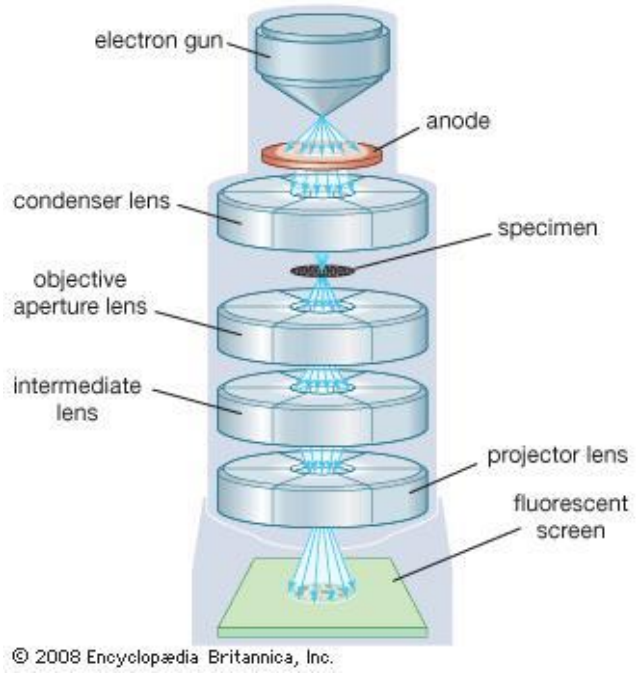
میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره یا عبوری یا (T.E.M)

- در برخورد دسته الکترونی با جسم، عده‌ای از الکترون‌ها از جسم می‌گذرند که این لکترون‌های گذرنده در نهایت و پس از عبور از عدسی‌های الکترومغناطیسی که مانند عدسی‌های شیئی و چشمی عمل می‌کنند جمع‌آوری می‌شوند و تصویر بزرگنمایی شده از شیء را ایجاد می شود

- الکترون‌ها سپس بر روی یک صفحه فلورسانس می‌تابند و آن را به حالت فلوئورسانس درآورده و تصویر سایه مانندی از نمونه ایجاد می‌شود.

- چون الکترون‌های گذرنده از جسم عامل تشکیل تصویر هستند این نوع میکروسکوپ را میکروسکوپ الکترونی گذاره نامند.

- این میکروسکوپ درشت نمایی‌های از 50000 تا 100000 برابر را میسر می‌کند و توان تفکیک آن در عمل حدود 2 تا 4 آنگستروم است



تهیه نمونه برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی گذاره و نوری

1- ثابت‌کردن و آب‌گیری:

✓ هدف اصلی از تثبیت، ممانعت از حرکت و جابجایی مولکولها و اندامکهای درون سلول است که در نتیجه، تصویر نهایی انعکاس صحیح‌تری از وضع سلول زنده خواهد بود.

- **فرمالدهید و گلوتار آلدئید** از جمله مواد ثابت‌کننده می‌باشند که اکثراً برای میکروسکوپ نوری استفاده می‌گردند.
- **گلوتار آلدئید و اسمیوم تتراکسید** نیز از جمله ثابت‌کننده‌های مورد استفاده در میکروسکوپ الکترونی می‌باشند.

✓ پس از مرحله ثابت کردن، نمونه با قرار گرفتن در سریالهایی از الکل یا استون که غلظت آن تدریجاً افزایش می‌یابد (از 30 درصد شروع و به 100 درصد ختم می‌گردد) آب‌گیری می‌شوند.

2- قالب گیری:

- ✓ معمولاً نمونه‌های بافت برای بررسی زیر میکروسکوپ بیش از حد ضخیم هستند و بنابراین باید آنها را به صورت برشهای بسیار نازك درآورد، به حدی که نور بتواند از آنها بگذرد برشهایی با ضخامت بین 1 تا 10 میکرومتر برای میکروسکوپ نوری مناسب‌اند.

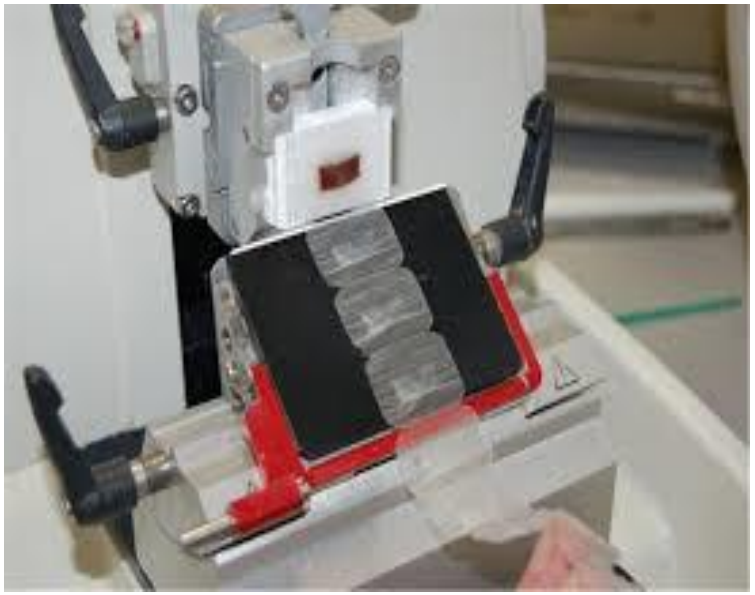
- ✓ به علت نرم بودن و شکنندگی بافتها، پیش از برش دادن، باید ابتدا بافتها را در پارافین مذاب یا مواد مشابه دیگری قرار دهیم. پارافین نه تنها اطراف نمونه را احاطه می‌نماید بلکه به درون آن نیز نفوذ نموده و زمانی که سرد شود استحکام خوبی به بافت می‌بخشد.

- ✓ مقاطع فوق نازکی (100 تا 500 آنگستروم) که برای میکروسکوپ الکترونی مورد نیاز می‌باشد ایجاب می‌کند که از مواد سخت‌تری مانند ترکیبات اپوکسی (ترکیبات اپوکسی از مخلوط رزین، سخت‌کننده‌ها و تسریع‌کننده‌ها ساخته شده‌اند) استفاده گردد. این مواد که ابتدا به صورت مایع هستند را در قالبهای کوچکی که محتوی قطعاتی از بافت ثابت شده می‌باشد ریخته و با حرارت دادن آن را پلیمریزه و در نتیجه به صورت پلاستیکی سخت در می‌آورند.

- ✓ روش دیگر برش‌گیری که نیاز به تثبیت کردن را برطرف میسازد، تهیه برش از بافت منجمد شده است.

3- مقطع گیری:

- ✓ قالبهای اصلاح شده با استفاده از **دستگاه میکروتوم** به صورت مقاطع نازکی برش داده می‌شوند.
- ✓ برای میکروسکوپ نوری، تیغه میکروتوم معمولا از جنس استیل بوده و مقاطعی با ضخامتهای چند میکرون را می‌توان تهیه نماید.
- ✓ برای میکروسکوپ الکترونی مقاطع باید بسیار نازکتر باشند و نیاز به میکروتوم مجهزتری به نام اولترامیکروتوم می‌باشد. تیغه این نوع میکروتوم معمولا از جنس الماس یا شیشه‌هایی که با روش خاصی برش داده شده‌اند (چاقوی شیشه ای) می‌باشد.

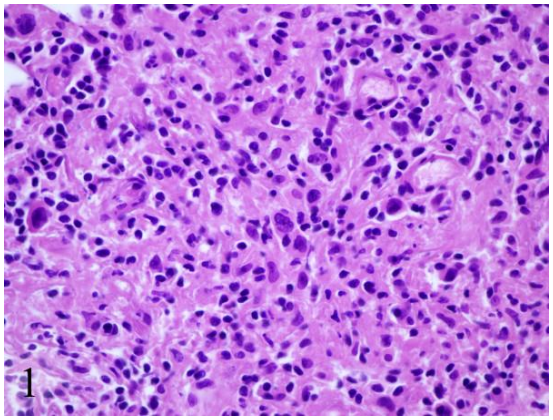


4- رنگ آمیزی و مونته کردن (نمونه های میکروسکوپ نوری)

- برای مشاهده با میکروسکوپ نوری، سلول‌ها بیرنگ هستند و نور تقریباً به میزان یکسان از بخشهای گوناگون آنها عبور می‌کند، در نتیجه اغلب اجزای سلول قابل تشخیص نیستند و تباین یا کنتراست مطلوبی در تصویرها حاصل نمی‌شود. برای ایجاد تباین و تشخیص قسمتهای مختلف، سلول را رنگ می‌کنند .

- رنگ آمیزی برش ها بافتی توسط هماتوکسیلین و ائوزین صورت می گیرد. .هماتوکسیلین نوعی رنگ بازی است و ساختارهایی را که با آن رنگ می‌گیرند به رنگ آبی تا بنفش در می‌آورد. این ساختارها به ساختارهای بازوفیل موسوم‌اند .ائوزین نوعی ماده رنگی اسیدی است و ساختارهایی را که با آن رنگ می‌شوند به رنگ قرمز در می‌آورد. این ساختارها به ساختارهای اسیدوفیل یا ائوزینوفیل موسوم‌اند .با این **روش رنگ‌آمیزی هسته‌ها به رنگ آبی و سیتوپلاسم به رنگ قرمز درمی‌آیند.**

- در نمونه‌های میکروسکوپ نوری، چسباندن که اصطلاحاً مونته کردن مقاطع نیز نامیده می‌شود، به این مفهوم است که بعد از رنگ آمیزی و قبل از مطالعه‌ی مقطع، باید روی آن لامل قرار گیرد تا حمل و نقل آن آسان باشد و از آسیب دیدن مقطع جلوگیری به عمل آید. از جمله مواد مونته کننده انتلان است که بر روی مقاطع یک تا دو قطره از آن ریخته می‌شود و سپس لامل را به طور مایل به مقطع نزدیك می‌کنیم و آن را به آرامی روی ماده مونته کننده قرار می‌دهیم.

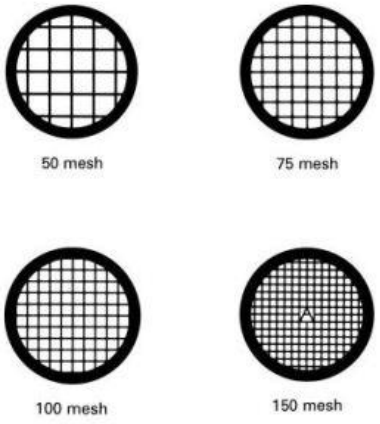


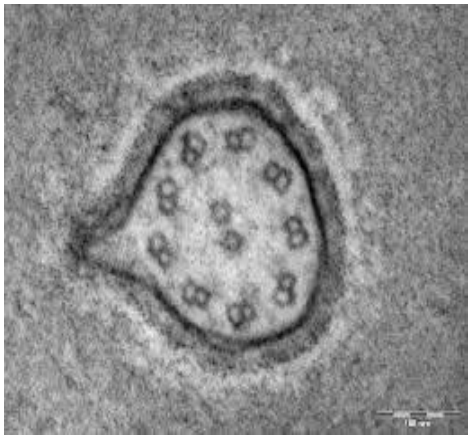
4- رنگ آمیزی و مونته کردن (نمونه های میکروسکوپ الکترونی)

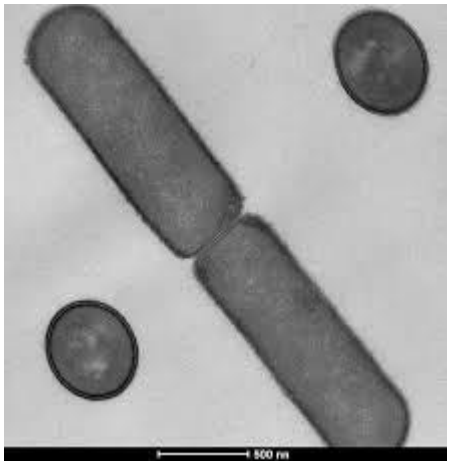
- در نمونه‌ی آماده شده برای میکروسکوپ الکترونی، کنتراست به عدد اتمی در اتم‌های نمونه بستگی دارد. عدد اتمی بالاتر باعث پراکنده شدن الکترون‌های بیشتر و کنتراست زیادتر می‌شود. نمونه‌های زیستی اغلب از اتم‌های با عدد اتمی خیلی پائین مانند کربن، اکسیژن و هیدروژن تشکیل شده‌اند، لذا برای قابل مشاهده شدن نمونه بایستی مقاطع نازک را رنگ آمیزی کرد. این کار را توسط **نمک‌های فلزات سنگین مانند سرب و اورانیوم** انجام می‌دهند و با استفاده از ترکیب‌هایی مانند **استات اورانیل، نیترات اورانیل و سیترات سرب**، کنتراست نمونه‌ها را افزایش داده، آن‌ها را به اصطلاح رنگ آمیزی می‌کنند تا مشاهده آن‌ها بهتر صورت پذیرد.

- **قسمت‌های تاریک‌تر** بیانگر این امر هستند که **الکترون‌های کمتری از این قسمت جسم عبور کرده‌اند** (این بخش از نمونه چگالی بیشتری دارد) و **نواحی روشن تر** مکانهایی هستند که **الکترون بیشتری از آنها عبور** کرده است (بخش‌های کم چگال‌تر). بر اساس مقدار نمکی که هر قسمت از ترکیبات بافت دریافت کرده باشد، سایه روشن‌های متفاوتی ایجاد می‌گردد.

- سپس مقاطع بر روی صفحات کوچک شبکه مانندی از **جنس مس یا طلا که گرید** نامیده می‌شوند و با لایه نازکی از کربن و یا پوشش ویژه‌ای از مواد پلاستیکی پوشیده شده ، چسبیده (مونته) می‌گردند.

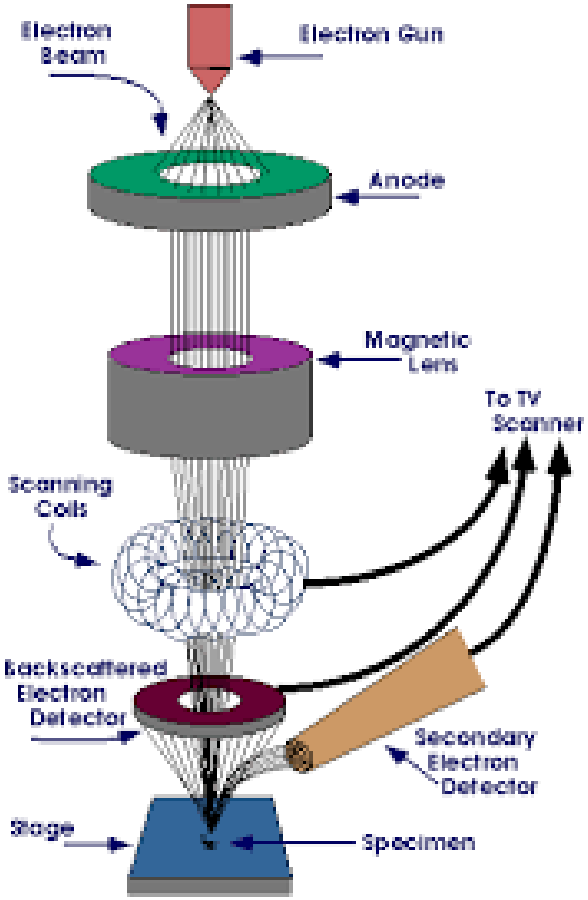






میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره یا روبشی یا (SEM)

- در میکروسکوپ نگاره، از الکترون‌های پراش یافته از سطح جسم و نیز الکترون‌هایی که در اثر تابش دسته الکترون‌های اولیه و تحریک سطح جسم، از سطح نمونه رها و پرتاپ می‌شوند و آن‌ها را الکترون‌های ثانویه نامند، برای تشکیل تصویر استفاده می‌شود.
- تفاوت مهم دیگر این میکروسکوپ با میکروسکوپ گذاره در این است که در میکروسکوپ گذاره، تصویر بر روی صفحه فلوئورسان تشکیل می‌شود و در اینجا بر روی صفحه تلویزیونی و به صورت نقاط تاریک و روشن تشکیل می‌شود.
- قدرت تفکیک این میکروسکوپ حدود 15 تا 30 آنگستروم می‌باشد.



تهیه نمونه برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره

- در استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره نیازی به تهیه برشهای خیلی نازك از نمونه نیست ولی چون اکثر اتمهای تشکیل دهنده سلول اتمهای الکترون چگالی نیستند معمولا قبل از مطالعه نمونه را با فلزی مثل طلا یا پلاتین می‌پوشانند که این پوشش در پراش دادن الکترون‌هایی که به سطح نمونه برخورد می‌نمایند و در ایجاد تعداد بیشتری از الکترون‌های ثانویه نقش دارد.

- این میکروسکوپ، در بررسی‌های ریخت شناسی سطوح سلول کاربرد زیادی دارند.