

مقدمه:

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه گیاه شناسی است. که در اینجا انواع آن را مورد بحث و بررسی قرار داده و طرز کار با میکروسکوپ نوری معمولی را به تفصیل ارائه مینمائیم.

میکروسکوپیهای مختلف دارای بزرگنماییهای متفاوتی میباشد که عموماً با وجود عدسیهای گوناگون، تصویر نمونه مورد نظر چند برابر میشود. اصول کلی در تمامی انواع میکروسکوپیها براساس عبور نور با طول موجهای متفاوت از چندین عدسی محدب میباشد که هرچقدر طول موج نور بکار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاهتر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. برای مثال قدرت تفکیک چشم انسان $0/1$ میلیمتر میباشد و میکروسکوپ نوری معمولی $0/24$ میکرون. بیشتر میکروسکوپهایی که تاکنون ابداع شده اند، میکروسکوپ نوری بودند. میکروسکوپهای نوری میکروسکوپهایی هستند که برای بررسی یک جسم، از پرتوهای نور استفاده می کنند و نور را به جسم موردنظر می تابانند. با این همه میکروسکوپ نوری یک ضعف عمده دارد که محدودیت قدرت تفکیک آن است. به دلیل ماهیت موجی نور، موج های مختلف موجود در یک پرتو نور، با یکدیگر تداخل می کنند. به همین دلیل، وقتی با استفاده از عدسی یک پرتو نور را متمرکز می کنیم، بسته به طول موج نور و زاویه یی که عدسی می تواند نور را جمع کند، یک نقطه نورانی به پهنای 200 نانومتر در جهت های X و Y و عمق 500 نانومتر در راستای Z تشکیل می شود. در دهه 1930 انواع میکروسکوپ های الکترونی ابداع شد. هر چند این میکروسکوپ ها همچنان گران است، اما استفاده از آنها متداول شد. با ابداع میکروسکوپ های الکترونی (که از پرتوهای الکترون به جای پرتو نور استفاده می کند) قدرت تفکیک به شدت افزایش یافت، زیرا طول موج پرتوهای الکترون کمتر از طول موج فوتون است. فوتون «ذره» تشکیل دهنده نور است. هر چند با ابداع میکروسکوپ های الکترونی دنیای کاملاً تازه یی از جزئیات به روی ما باز شد که پیش از آن مشاهده نکرده بودیم، اما استفاده از آن برای تصویربرداری از نمونه های زیستی چندان مناسب نیست. برای آنکه بتوانیم نمونه یی را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده کنیم، باید نمونه ها را در خلأ و به دور از هوا نگهداری کرد.

علاوه بر این پیش از اینکه بتوان جسم را زیر میکروسکوپ تماشا کرد، باید با استفاده از روش هایی آن را آماده کرد، از جمله برش جسم به لایه های نازک با استفاده از فلزهایی مثل اورانیوم، سرب یا پوشاندن نمونه با انواع فلزهای رسانا. در هر مورد ماده زیستی شناختی مشاهده شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی دیگر زنده نیست. هر چند میکروسکوپ الکترونی در زیست شناسی و پزشکی کاربردهای فراوانی دارد، اما مطلوب آن است که بدون کشتن نمونه ها بتوانیم قدرت تفکیک را زیاد کنیم گرچه سلول های انسان ها و حیوانات به قدر کافی بزرگ است و می توان با استفاده از میکروسکوپ های نوری آنها را مشاهده کرد. کارکرد سلول به سنتز و انتقال پروتئین هایی بستگی دارد که با یکدیگر بر هم کنش دارند یا به هم متصل می شوند تا کار ویژه یی را انجام دهند. برای مثال واکنش های ایمنی شناختی بدن ما به توانایی سلول ها برای تولید پروتئین هایی بستگی دارد که می توانند با اجسام خارجی مقابله کنند. علاوه بر این مرگ سلول ها نیز به پروتئین ها مربوط می شود و ناتوانی سلول ها برای مرگ کنترل شده به سرطان منجر می شود. با توجه به اینکه قدرت تفکیک میکروسکوپ های نوری معمولی حدود 200 نانومتر است، نمی توان چگونگی برهم کنش پروتئین را دید و دریافت که آیا پروتئین ها اصولاً با یکدیگر برهم کنش دارند یا خیر، چگونه پروتئین ها به بخش های خاصی از سلول منتقل می شوند و چرا وجود آنها در این بخش خاص ضروری است. درک این مکانیسم ها در پژوهش های پزشکی و ابداع روش های درمانی جدید بسیار ضروری است.

تاریخچه

بعضی از وقایع مهم مربوط به میکروسکوپ به شرح زیرند:

در سال 1655 روبرت هوگ که یک فیزیکدان بود، اولین مشاهده یی میکروسکوپی را انجام داد. وی برای اولین بار توانست بقایای دیواره ی سلولهای مرده ی گیاهی را در برشی از چوب پنبه مشاهده کند. در سال 1674 آنتونی وان لیوون هوک. که یک پارچه فروش بود، برای اولین

بار توانست تك سلولهاي زنده (پروتوزوا) را مشاهده کند. در سال ۱۶۸۳ آنتونی و آن لیوون هوگ با تکمیل میکروسکوپي که ساخته بود، توانست باکتریها را نیز مشاهده کند. در سال ۱۹۳۲ اولین میکروسکوپ الكتروني اختراع شد.

تاریخچه میکروسکوپ

در روزگاران قدیم، کوچکترین موجودات زنده ای که مردم می شناختند آنهایی بودند که به زحمت با چشم دیده می شوند. ولی آیا ممکن بود موجوداتی هم باشند که با چشم دیده نشوند؟ اگر با چشم دیده نمی شدند، با چه وسیله ای ممکن بود آنها را دید. البته در آن زمانم مردم به وسایلی می توانستند کاری کنند که چیزهای خیلی کوچک بزرگتر از آنچه بودند نشان داده شوند. مثلاً بعضی از مردم متوجه شده بودند که اگر از میان شیشه ای که سطح آن منحنی باشد به چیزهای خیلی کوچک نگاه کنند، آنها بزرگتر از آنچه هستند به نظر می آیند.

با این همه، فقط در حدود سال ۱۶۵۰ میلادی بود که دانشمندان با این شیشه های منحنی به چیزهای خیلی کوچک نگاه کردند و به دقت به بررسی آنها پرداختند. اسم این شیشه ها را، که سطح منحنی داشتند، عدسی گذاشتند، زیر اشکال آنها مثل شکل دانه های عدس بود. معمولاً برای اینکه به چیزهای بسیار کوچک نگاه کنند، بیش از يك عدسی به کار می بردند. عدسی ها را در دو انتهای يك لوله فلزی جا می دادند.

آنها را طوری بر جا می دادند که چیزهای بسیار کوچک بهتر دیده شوند. اسم این لوله را، با عدسی هایی که درون آن بود، میکروسکوپ گذاشتند.

میکروسکوپ از دو واژه یونانی میکرو، به معنی کوچک و سکوپ، به معنی دیدن، گرفته شده است. بنابراین میکروسکوپ یعنی دیدن چیزهای کوچک. یکی از موجودات کوچک زنده که دانشمندان بیش از همه آن را مورد مطالعه قرار دادند ك بود. برای همین بود که اسم اولین میکروسکوپ ها را شیشه های ککی گذاشته بودند.

قبل از اختراع میکروسکوپ در اواسط قرن هفدهم، مشاهده سلول مقدور نبود، زیرا سلول واحد بسیار کوچکی است که با چشم غیر مسلح قابل رویت نیست. روبرت هوک اول بار در سال ۱۶۶۵ زیر میکروسکوپ ابتدایی که خود ساخته بود سلولهای مرده را در برش های چوب پنبه و نوعی کمک مشاهده کرد. این سلولهای تو خالی و متصل به هم، شکل اتاقکهای لانه زنبور را داشتند و هوک آنها را سلولی نامید که به زبان لاتین مفهوم اتاقکهای کوچک را دارد.

چند سال بعد طبیعت شناسی بنام آنتونی وان لیوون هوک سلولهای زنده را در قطره های آبی که از برکه برداشته بود در زیر میکروسکوپ مشاهده کرد و آنها را جانوران کوچک نامید.

او چند نمونه خشک شده خود را بین سالهای ۱۶۷۴ و ۱۶۸۷ به فرهنگستان سلطنتي لندن فرستاد.

لیوون هوک بر روی هم توانست ۴۱۹ میکروسکوپ و عدسی بسازد. او هر بار که عدسی یا میکروسکوپ بهتری می ساخت، می توانست میکرو ارگانیسمهای کوچکتری ببینید.

در سال ۱۶۸۳ میلادی، عدسی دیگری ساخت که می توانست چیزهای خیلی کوچک را نشان دهد. لیوون هوک فکر می کرد که این چیزهای خیلی کوچک باید موجودات زنده ای باشند. ولی این چیزها به قدری کوچک بودند که فقط مثل نقطه ها و میله های کوچکی به نظر می آمدند. او نمی توانست عدسی دیگری بسازد که آن قدر قوی باشد که بتواند آنها را واضح نشان دهد. این بود که ناچار مطالعه آنها را رها کرد.

بعدها این چیزهای کوچک را که او نخستین بار دید باکتری نامیدند. باکتری از واژه ای یونانی به معنی میله کوچک گرفته شده است. لیوون هوک نخستین کسی بود که میکروبها را دید، و تا صد سال بعد هیچ کس دیگری پیدا نشد که بتواند کاری بهتر از او انجام دهد. سر انجام، در سالهای دهه ۱۷۸۰ میلادی، اوتوفریدريك مولر، زیست شناس دانمارکی ترتیبی داد که میکروبها اندکی واضعتر نشان داده شوند. او نخستین کسی بود که کوشید تا باکتریها را برحسب شلهای متفاوت آنها به گروههای مختلف تقسیم کند.

عدسیها برای اینکه چیزها را بزرگتر از آنچه هستند نشان دهند پرتوهای نور را می شکنند، ولی همه رنگ های نور را به يك اندازه نمی شکنند. نور معمولی ترکیبی است از چندین رنگ. در آن زمان، وقتیکه میکروسکوپها را طوری میزان می کردند که چیزهای کوچک را به یکی از این چند رنگ بطور واضح نشان دهند، رنگهای دیگر مبهم می شدند. برای همین باکتریهایی که زیر میکروسکوپ دیده می شدند مبهم به نظر می آمدند و مثل این بود که كرك رنگینی دورشان را گرفته باشد. ولی در سال ۱۸۳۰ میلادی، جوزف جکسون لیستر، عینکساز انگلیسی که سر و کارش با ساختن عدسی بود، دو نوع عدسی را با هم ترکیب کرد. هر يك از آنها رنگها را به نحو متفاوتی می شکست. هر تأثیری که يك عدسی در رنگها داشت، عکس آن تأثیر را عدسی دیگر در آنها داشت، چنانکه يك عدسی تأثیرهای نامساعد عدسی دیگر را خنثی می کرد. به این ترتیب، ترکیب این دو نوع عدسی با یکدیگر سبب می شد که چیزهای کوچک به رنگ اصلی خود و بطور واضح نشان داده شوند. با بهبود روشهای میکروسکوپی، دانشمندان توانستند بافتهای گوناگون را بررسی کنند.

اختراع میکروسکوپ تحول بزرگی در علم زیست شناسی بوجود آورد. با به کارگیری این ابزار قوی، بشر توانست ذراتی را که با چشم دیده نمی شوند مشاهده کند: يك سلول جانوری را در نظر بگیرید که قطر متوسط آن بین ۱۰ تا ۲۰ است این سلول ۵۰ بار کوچکتر از بزرگترین جسم قابل رویت با چشم غیر مسلح است بنابراین تنها با اختراع میکروسوپ نوری بود که آدمی توانست سلول را ببیند.

بعد از گذشت چند قرن، میکروسکوپ همچنان نقش مهمی در پژوهش های زیستی ایفا می کند و در سالهای اخیر تحولات شگرفی در بهبود کیفیت آن صورت گرفته است. یکی از عمده ترین پیشرفتهای در ساخت میکروسکوپ، اختراع نوع الکترونی آن در دهه ۱۹۴۰ بود که امکان مشاهده ذرات و اندامکهای درون سلولی را بهتر از گذشته فراهم کرد. در ضمن باید تأکید شود که امروزه میکروسکوپ نه تنها جهت بررسی شکل و ساختار نمونه های زیستی مورد استفاده قرار می گیرد، بلکه برای تعیین ارتباط بین ساختارهای تشکیل دهنده سلول و فعالیتهای گوناگون آنها نیز نقش به سزایی ایفا می کند. انواع میکروسکوپها شامل موارد زیر می باشد:

- ۱- میکروسکوپ زمینه روشن ۲- میکروسکوپ فلور سنت ۳- میکروسکوپ اختلاف فاز ۴- میکروسکوپ تداخلی ۵- میکروسکوپ زمینه سیاه ۶- میکروسکوپ الکترونی گذاره ۷- میکروسکوپ الکترونی نگاره ۸- میکروسکوپ STM

تقسیم بندی انواع میکروسکوپ

۱- میکروسکوپ نوري (Light Microscope)

منبع نور در این میکروسکوپ نور مرئي میباشد و با عبور از چندین عدسي محدب که در آن تعبیه شده است و نیز يك منشور که مسیر نور را تغییر میدهد (قدرت تفکیک ۰/۲۴ میکرون) .

میکروسکوپهای نوری

میکروسکوپ نوری زمینه روشن: قسمتهای مهم يك میکروسکوپ نوری عبارتند از:

۱- عدسی چشمی: این عدسی برای مطالعه و مشاهده تصویر است.

۲- عدسی شیئی: این عدسی برای بزرگنمایی است و شامل چهار عدسی می باشد:

الف) عدسی شماره ۴ (عدسی کوچک)

ب) عدسی شماره ۱۰ (عدسی خشک)

ج) عدسی شماره ۴۰ (عدسی خشک)

د) عدسی شماره ۱۰۰ (عدسی روغنی)

۳- کندانسور: کندانسور نور را جمع کرده و آن را بطور مستقیم روی نمونه هدایت می کند.

۴- دیافراگم: مقدار نور ورودی را کم و زیاد می کند.

۵- ماکرومتر: ماکرومتر صفحه میکروسکوپ را بالا و پایین برده و برای پیدا کردن تصویر نمونه بکار می رود.

۶- میکرومتر: تصویر تنظیم شده را واضحتر کرده و آن را برای مشاهده مشخص تر می کند.

بین عدسی شیئی (عدسی ۱۰۰) و نمونه فاصله ای در حدود $1/8 \text{ mm}$ وجود دارد که این فاصله را فاصله کانونی گویند که با روغن امرسیون این فاصله را پر می کنند در غیر این صورت بعلت وجود هوا و شکست نور عبوری از نمونه، تصویر ناواضح خواهد بود.

نمونه روی لام (تیغ شیشه ای) گذاشته می شود و سپس روی جایگاه نمونه میکروسکوپ قرار می گیرد. نور از چراغی در پایین میکروسکوپ توسط کندانسور بر سطح نمونه متمرکز می شود. نوری که توسط نمونه جذب نشده و از آن عبور کرده است به عدسی شیئی می رسد و در نتیجه تصویری بزرگ شده از نمونه بدست می آید. این تصویر بار دیگر توسط عدسی چشمی بزرگ می شود. بزرگنمایی نهایی، حاصل ضرب بزرگنمایی های دو عدسی است. چنانچه بزرگنمایی عدسی شیئی ۱۰۰ و بزرگنمایی عدسی چشمی ۱۰ باشد، بزرگنمایی نهایی ۱۰۰۰ برابر خواهد بود.

مهمترین ویژگی عدسی میکروسکوپ قدرت جداسازی یعنی توانایی تشخیص بین دو نقطه نزدیک به هم است. قدرت جداسازی یک میکروسکوپ در عمل نمایانگر کوچکترین جسم قابل رویت با آن میکروسکوپ است و هر چه بیشتر باشد، اجسام کوچکتری را با آن میکروسکوپ می توان دید. قدرت جداسازی هر میکروسکوپ معمولاً با حد تفکیک یا R مشخص می شود. حد تفکیک مساوی است با نزدیکترین فاصله بین دو جسم بطوریکه هر یک هنوز بصورت مجزا قابل مشاهده باشد. هر قدر میزان R کوچکتر باشد، قدرت جداسازی میکروسکوپ بیشتر و بهتر است. عوامل بسیاری در تعیین R دخالت دارند، از جمله طول موج تابش که با R رابطه مستقیم دارد. از لحاظ نظری، کوچکترین مقدار ممکن برای R در میکروسکوپ نور حدود 200 nm است که تنها بهترین میکروسکوپهای نوری این حد تفکیک را دارند. حد تفکیک در اغلب میکروسکوپ های نوری کمتر از 500 nm نیست، لذا اشیایی کوچکتر از 500 nm با آنها قابل مشاهده نیستند. مشاهده سلولهای باکتری و میتوکندری با میکروسکوپ نوری مقدور است، اما مشاهده ریبوزوم ها با آن ممکن نیست. تفکیک انواع سلولها، مثلاً گلبول های قرمز از گلبولهای سفید خون یا سلولهای فیبرو بلاستی از سلولهای پوششی با میکروسکوپ نوری امکان پذیر است. این میکروسکوپ در آزمایشات باکتری شناسی، انگل شناسی، قارچ شناسی، حشره شناسی و بافت شناسی کاربرد دارد.

اجزای میکروسکوپ نوری

۱- اجزای نوری : اجزای نوری عمدتاً مشتمل بر منبع تغذیه نور و قطعات مرتبط با آن میباشد ، از قبیل لامپ با ولتاژ ۲۰ وات ، فیلتر تصحیح نور و کندانسور که کندانسور مشمل بر پنج قطعه است که نور را تصحیح کرده و بر روی نمونه یا شیء مورد بررسی متمرکز میکند:

۱ - فیلتر رنگی (تصحیح نور) ۲ - دیافراگم که حجم نور را تنظیم میکند

۳ - دو عدد عدسی محدب ۴ - پیچ نگهدارنده کندانسور ۵ - پیچ تنظیم دیافراگم

۲ - اجزای مکانیکی :

۱ - پایه (Base) : کلیه قطعات میکروسکوپ بر روی پایه مستقر میباشد . در برخی از مدل‌های میکروسکوپ نوری منبع نور ، فیوز و کابل برق در پایه تعبیه میگردد .

۲ - دسته (Handle) : جهت حمل و نقل میکروسکوپ از دسته استفاده میشود . نکته قابل توجه آنکه به هنگام جابجایی میکروسکوپ آن را روی میز کار نمی کشیم .

۳ - لوله میکروسکوپ (Barrel) : مشتمل بر عدسی شیئی (Ocular lens) و عدسی چشمی (Objective lens) که با بزرگنمایی‌های مختلف طراحی می شوند. عدسی شیئی دارای بزرگنمایی‌های 4X, 10X, 40X, 60X و 100X و عدسی چشمی دارای بزرگنمایی‌های 10X, 15X, 18X میباشد که بسته به نوع میکروسکوپ متفاوت است. عدسی شیئی معمولاً از چندین عدسی محدب که در آن تعبیه شده است تشکیل میگردد.

۴ - صفحه گردان یا متحرک (Revolver) : عدسیهای شیئی بر روی این صفحه قرار میگیرند و با چرخاندن آن موقعیت عدسیهای شیئی تغییر میکند.

۵ - پیچ حرکات تند (Macrometrique) : این پیچ بر روی دسته تعبیه شده است و باعث میگردد که صفحه پلاتین با سرعت بیشتری در جهت عمودی جابجا شود.

۶ - پیچ حرکات کند (Micrometrique) : این پیچ بر روی پیچ حرکات تند قرار داد و صفحه پلاتین را در جهت عمودی و درحد میکرون جابجا میکند .

۷ - صفحه پلاتین (Platine plate) : صفحه ای است که نمونه مورد نظر روی آن قرار میگیرد و در جهت طول و عرض دارای دو خط کش مدرج میباشد که جهت ثبت و یادداشت مکان یک نمونه خاص بکار میرود .

۸ - پیچ طول و عرض : این پیچ زیر صفحه پلاتین قرار دارد که آن را در جهت طول و عرض جابجا میکند .

بزرگنمایی یک میکروسکوپ حاصل ضرب بزرگنمایی عدسی شیئی در بزرگنمایی عدسی چشمی میباشد .

۲ - میکروسکوپ ماوراء بنفش (Ultra Violet Microscope)

میکروسکوپ ماوراء بنفش یا میکروسکوپ U.V. که منبع تغذیه نور ، اشعه U.V. میباشد. نسبت به میکروسکوپ نوری معمولی قدرت تفکیک بالاتری داشته چراکه اشعه ماوراء بنفش طول موج کوتاهتری نسبت به نور مرئی دارد . عدسی شیئی بکار رفته در این میکروسکوپ از جنس کوارتز میباشد. بدلیل مضر بودن اشعه ماوراء بنفش برای چشم انسان، از تصویر شیء عکسبرداری شده و سپس بر روی صفحه مانیتور قابل مشاهده است (قدرت تفکیک ۶۰۰ آنگستروم).

۳ - میکروسکوپ فلورسانس (Fluorescence Microscope)

میکروسکوپ فلورسانس (fluorescent microscope)

انواع خاصی از میکروسکوپ نوری که منبع نور آن پرتوهای فرابنفش است. برای مشاهده نمونه زیر این میکروسکوپ ها بخش ها یا ملکول های ویژه داخل سلول با مواد فلورسانت یا نورافشان رنگ آمیزی می شوند. زمانی هدف تشخیص پروتئین های خاص یا جایگاه آنها در سلول باشد، روش های معمولی رنگ آمیزی که پروتئین ها را به طور عام رنگ می کنند قابل استفاده نیست. برای رنگ آمیزی اختصاصی، معمولاً از پادتن های اختصاصی متصل به مواد فلورسانت استفاده می شود. مواد فلورسانت نور را در طول موج فرابنفش جذب می کنند و در طول موج بلندتری در طیف مرئی تابش می کنند. تصویری که دیده می شود حاصل نور تابش شده از نمونه است. رودامین و فلورسئین دو نوع از رنگ های معمول فلورسانت هستند که به ترتیب نور قرمز و سبز از خود تابش می کنند.

کارکرد میکروسکوپ های فلورسانس

کارکرد میکروسکوپ های فلورسانس

در ابتدای قرن بیستم پدیده فلورسانس در ساخت میکروسکوپ به کار گرفته شد. فلورسانس یکی از پدیده های مربوط به نورتابی (لومین سانس) است. ما معمولاً وقتی جسمی را می بینیم که نور از آن جسم بازتاب می شود. رنگ جسم نیز به این موضوع وابسته است که جسم چه طول موجی را بازتاب می کند. در پدیده فلورسانس مولکول یک فوتون (یک ذره نور) با طول موج خاص را جذب و سپس آن را با طول موج بلندتری منتشر می کند. فلورسانس یکی از روش های بسیار متداول در تصویربرداری بافت های زیست شناختی است. مواد زیست شناختی معمولاً نور را به شدت متفرق می کنند و در نتیجه تماشای آن واری سطح سلول دشوار است. در پدیده فلورسانس معمولاً طول موج نور گسیل شده از طول موج نور تابیده شده بیشتر است، بنابراین نور متفرق شده از سطح سلول را می توان از نور تابیده شده به سلول تفکیک کرد. برای انجام این کار از آینه های دورنگی استفاده می کنند. این آینه ها نور تابیده شده را دوباره به نمونه برمی گردانند، اما نور فلورسانس از آن عبور می کند، در نتیجه تماشای ساختارهای درونی سلول امکان پذیر می شود. برخی مواد زیست شناختی به طور طبیعی فلورسنت هستند، اما رنگ ها و پروتئین های فلورسنت فراوانی نیز وجود دارد که می توان از آنها برای رنگ آمیزی بخش های ویژه یک سلول مثل هسته استفاده کرد. حتی می توان آنها را به پروتئین های خاص درون سلول متصل کرد، در نتیجه پیگیری حرکت آنها درون سلول امکان پذیر می شود. استفاده از رنگ ها و پروتئین های نور کلید زدنی فلورسنت که به تازگی کشف شده است، کاربردهای بسیاری در تصویربرداری فلورسانس دارد. این مولکول ها می توانند دو حالت داشته باشند؛ یک حالت درخشان یا حالت فلورسنت و یک حالت تاریک یا غیرفلورسنت. کلیدزنی بین این دو حالت با تاباندن نور با دو طول موج متفاوت انجام می شود.

یکی از کاربردهای مولکول های نور کلیدزنی ردیابی پروتئین ها است. اگر مولکول های فلورسنت به پروتئین های خاص متصل شوند و یک بخش کوچک از آنها فعال شود، پیگیری جابه جایی پروتئین ها بسیار آسان تر از حالتی است که همه پروتئین های درون سلول نور را گسیل کنند. علاوه بر این لحظه دقیق فعال سازی را می توان کنترل کرد.

قدرت تفکیک زیاد بدون کشتن نمونه

چگونه می توان بدون آنکه نمونه های زیست شناختی را از بین برد، میکروسکوپ هایی با قدرت تفکیک زیاد ساخت؟ از آنجایی که قدرت تفکیک یک میکروسکوپ به طول موج بستگی دارد، یک راه برای افزایش قدرت تفکیک کاهش دادن طول موج است.

برای مشاهده نمونه بوسیله این میکروسکوپ ها، بخش ها یا مولکول های ویژه در داخل سلول با مواد فلورسنت یا نور افشان رنگ آمیزی می شوند. زمانی که هدف تشخیص پروتئین های خاص یا جایگاه آنها در سلول باشد، روش های معمول رنگ آمیزی که پروتئین ها را به طور عام رنگ می کنند قابل استفاده نیستند. برای رنگ آمیزی اختصاصی، معمولاً از پادتن های اختصاصی متصل به مواد فلورسنت استفاده می شود.

در میکروسکوپ فلورسنت از ماوراء بنفش بعنوان نور استفاده می شود. ماوراء بنفش طول موج کمتر، انرژی بیشتر و قدرت نفوذ زیادی دارد. عدسی هایی که در میکروسکوپ فلورسنت به کار رفته اند از جنس کوارتز می باشد چون نور ماوراء بنفش از عدسی های معمولی عبور نمی کند.

این نوع میکروسکوپ به دو دسته فیلتر مجهز هستند. دسته اول بین منبع نور و نمونه قرار دارد و فقط اجازه می دهد که امواج تابش شده از ماده فلورسنت، عبور نمایند. دسته دوم بین نمونه و عدسی چشمی قرار دارد و تنها به امواج تابش شده از ماده فلورسنت، اجازه عبور می دهد. رود امین و فلورسئین دو نوع از رنگهای معمولی فلورسنت هستند که به ترتیب نور قرمز و سبز از خود تابش می کنند. این میکروسکوپ برای مطالعه انواع آنتی بادی از نظر ایمنی شناسی و بررسی بعضی از باکتریها مثل مایکو باکتریوم توبرکلوزیس (میکروب سل) از نظر باکتری شناسی کار برد دارد.

بطور کلی مواد از لحاظ خاصیت فلورسانس دو نوعند :

- فلورسانس اولیه که این مواد ذاتاً خاصیت فلورسانس دارند یعنی از خود نور ساطع میکنند مثل ویتامینها و رنگها .

- فلورسانس ثانویه که از خود خاصیت فلورسانسی نداشته و با رنگ آمیزی و معرفهای گوناگون از قبیل سولفات بربرین و نارنجی آکریدین خاصیت فلورسانسی را به آنها القاء میکنیم.

منبع تغذیه نور در این میکروسکوپ اشعه U.V. میباشد. در اینجا نیز از تصویر شیء عکسبرداری شده که بر روی صفحه مانیتور قابل مشاهده است

۴ - میکروسکوپ زمینه سیاه (Dark Field Microscope)

مطالعه سلول های زنده با این میکروسکوپ ها نیز مقدور است. سیستم های نوری خاصی در تمام این نوع میکروسکوپ ها وجود دارد که تباین کافی بین اجزاء سلول ایجاد کرده، مشاهده سلول های زنده را مقدور می سازند.

در میکروسکوپ زمینه سیاه نور حامله از منبع نوری به شکل مخروط در می آید و انوار از اطراف به نمونه تابیده می شود این کار توسط کندانسور خاص این میکروسکوپ انجام می گیرد. در نتیجه تصویر نمونه بصورت روشن در یک زمینه تاریک مشاهده می شود. استفاده از میکروسکوپ زمینه سیاه برای مشاهده حرکت باکتری معمول است (مثل اسپروکت تروپونها پالیدوم (عامل بیماری سیفیلیس).

منبع تغذیه نور در این نوع میکروسکوپ نور مرئی میباشد و با ایجاد انکسار نور توسط آئینه های محدب و مقعر شیء یا نمونه مورد بررسی، شفاف و نورانی در زمینه سیاه دیده میشود.

۵ - میکروسکوپ اختلاف فاز (Phase Contrast Microscope)

مزیت میکروسکوپ اختلاف فاز در این است که می توانیم با آن سلول های زنده را با جزئیات بیشتر مشاهده کنیم. تیمارهایی مثل تثبیت نمونه می توانند دگرگونی هایی در ساختار درونی سلول بوجود آورند. بنابراین مطالعه سلول های زنده که هیچ تیماری ندیده اند خیلی مطلوب است. می توان فرایندهایی مثل تقسیم میتوز (mitosis) در سلول های زنده را نیز با این میکروسکوپ ها مطالعه کرد. در برخی موارد برای عکس برداری پیوسته و دراز مدت از سلول فعال ، دوربینی به میکروسکوپ وصل می شود. مطالعه سلول های زنده با میکروسکوپ تداخلی (interference microscope) و میکروسکوپ زمینه سیاه (dark field microscope) نیز مقدور است. سیستم های نوری خاصی در تمام این نوع میکروسکوپ ها وجود دارد که به علت ویژگی آنها تباین کافی بین اجزای سلول ایجاد و

مشاهده ی سلول های زنده مقدور می شود. استفاده از میکروسکوپ زمینه سیاه برای مشاهده ی حرکت باکتری معمول است، که در این مورد ایجاد تباین بین سلول باکتری زنده و محیط اطرافش مهم است.

مزیت میکروسکوپ اختلاف فاز در این است که می توانیم با آن سلولهای زنده را با جزئیات بیشتر مشاهده کنیم. تیمهایی مثل تثبیت نمونه می توانند دگرگونی هایی در ساختار درونی سلول، بوجود آورند. بنابراین مطالعه سلول های زنده ای که هیچ گونه تیماری ندیده اند خیلی مطلوب است. می توان فرآیندهایی مثل تقسیم میتوز در سلول های زنده را نیز با این نوع میکروسکوپ ها مطالعه کرد. در برخی موارد، برای عکس برداری پیوسته و دراز مدت از سلول فعال، دوربین به میکروسکوپ وصل می شود.

در میکروسکوپ اختلاف فاز نور حاصله از منبع نوری به انوار مختلف شکسته شده و شکسته نشده تقسیم می شود این کار توس دیافراگم مخصوص این میکروسکوپ انجام می گیرد. انواری که می شکنند. به جسم یا نمونه نفوذ نمی کنند اما انواری که نمی شکنند به جسم یا نمونه نفوذ می کنند در نتیجه بین نمونه و محیط اطراف آن اختلاف بوجود می آید و نمونه به صورت شفاف دیده می شود.

منبع تغذیه نور در این نوع میکروسکوپ نور مرئی میباشد و برای بررسی بافتها یا نمونه هایی که اختلاف انکساری نوری کمی دارند مورد استفاده قرار میگیرد بدین منظور صفحه سوراخ داری به نام پلاک فاز در کندانسور تعبیه میشود .

روش استفاده از میکروسکوپ فاز – کنتراست

نحوه کار با میکروسکوپ فاز – کنتراست در انواع مختلف آن متفاوت است و لذا بایستی بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده عمل نمود و لیکن در اکثر آنها نحوه کار با آن به شرح زیر می باشد:

- لامپ را روشن نموده و سپس به تدریج شدت آنرا تا نصف یا $\frac{3}{4}$ شدت ماکزیمم افزایش دهید. روزنه لامپ و کندانسور substage را کاملاً باز نمائید. امتحان نمائید که فیلتر نوری در محل خود بطور مناسب واقع است. حلقه هایی که در زیر کندانسور واقع است را کنار بزنید.

- در ابتدا با استفاده از عدسی شیئی با توان بالا (4 mm عدسی شیئی خشک) شروع نمائید. فوکوس سیستم را تنظیم نموده به گونه ای که شیئی و stage را بخوبی بتوان تفکیک نمود. پس از آن عدسی شیئی را به موقعیت مربوطه اش منتقل نمائید.

- کندانسور زیر stage را بگونه ای تنظیم نمائید که حدود ۵ میلیمتر زیر stage واقع شود.

- اسلاید را که حاوی نمونه است و همچنین لامپ آن را بر روی stage قرار دهید به گونه ای که فیلم به سمت بالا واقع شود. با فشار کمی بر روی اسلاید اتصال یکنواختی با stage فراهم آورید.

- تصویر را فوکوس نموده و همچنین توجه شود که در وجود حباب بتوان آنرا مشاهده و سپس حذف نمود. جهت فوکوس نمودن اگر خطی بر روی اسلاید قرار دارد و یا آنکه در صورت نبودن می توان از خود نمونه برای فوکوس نمودن استفاده نمود. عمل فوکوس کردن با یدی بدقت انجام شود.

- یکی از عدسیهای چشمی را برداشته و بجایش تلسکوپ مربوطه را بگذارید. با حرکت دادن آن ، آنرا برای صفحه فاز در بالای عدسی شیئی فوکوس نمائید. فوکوس میکروسکوپ را تغییر نداده و توسط چشمی کنترل کندی که فوکوس آن تغییر نکرده است.

- صفحه دیافراگم مناسب عدسی شیئی مورد استفاده را در محل خود بین کندانسور و لامپ قرار دهید. سپس کندانسور را فوکوس نمائید بگونه ای که تصویر حلقه روشن از داخل تلسکوپ برابر با حلقه روی صفحه فاز باشد. مجدداً از طریق چشم دیگر که هنوز در محل خودش قرار دارد ببینید که هنوز تصویر فوکوس می باشد.

- با کنار زدن دیافراگم مجدداً به داخل تلسکوپ نگاه نموده و با تغییر پیچهای مربوط به کندانسور آنرا بگونه‌ای تنظیم نمائید که تصویر فیلمان بطور واضح روی حلقه مربوط به صفحه فاز قرار گیرد.
- دیافراگم را مجدداً به محل خود برگردانید در حالی که بداخل تلسکوپ نگاه می‌کنید و سپس دیافراگم را به مرکز بوسیله پیچهای مربوطه منتقل نمائید. حلقه روشن بایستی دقیقاً در بین حلقه‌های صفحه فاز قرار گیرند. لبه‌های این دو بایستی بر روی همدیگر بیفتند و در ضمن بایستی برنگ سفید باشد و نه رنگ دیگر. اندازه حلقه نوری را می‌توان با تنظیم فوکوس کندانسور تنظیم نمود.
- مجدداً از طریق عدسی چشمی که هنوز در محل خود قرار دارد به نمونه نگاه کرده و امتحان کنید که هنوز سیستم فوکوس می‌باشد. در صورت لزوم بایستی فوکوس را تنظیم نمود. در این حالت با نگاه به داخل تلسکوپ مجدداً حلقه نور را تنظیم نمائید.
- تلسکوپ را خارج نموده و مجدداً عدسی چشمی دوم را سر جایش بگذارید. نمونه را مورد مطالعه قرار داده ضمن آنکه در صورت نیاز بایستی نور را نیز تنظیم نمائیم با حرکت دادن نمونه می‌توان ضخامتها و نواحی مختلف نمونه را بررسی و مطالعه نمود. هر از چند گاهی با جایگزین تلسکوپ وضعیت حلقه روشن را امتحان نمائید.
- آزمایش با عدسی 2 mm امیرسیون روغنی: فوکوس سیستم را چرخانده به گونه‌ای که بوضوح بتوان اسلاید و عدسی شیئی را مشاهده نمود. دیافراگم را برداشته و سپس یک قطره روغن روی لامل قرار دهید. عدسی 2 mm امیرسیون روغنی را به محل خود منتقل نموده و سپس فوکوس را حرکت داده به گونه‌ای که بین عدسی شیئی و روغن تماس برقرار شود. مراحل ۱۴ تا ۱۱ را با استفاده از دیافراگم مناسب عدسی مورد استفاده تکرار نمائید.

۶ - میکروسکوپ الکترونی (Electron Microscope)

قدرت جداسازی میکروسکوپ الکترونی از میکروسکوپ نوری بهتر است به این معنی که با میکروسکوپ الکترونی اجزای کوچکتری را می‌توان دید. قبلاً گفته شد حد تفکیک (R) 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 R، نیز کوچکتر و قدرت جداسازی بیشتر است. در میکروسکوپ الکترونی بجای استفاده از نور مرئی از امواج الکترون ها استفاده می‌شود. در شرایط مناسب طول موج الکترون ها به $0.05/0\text{nm}$ می‌رسد. در این طول موج بهترین R ممکن حدود $0.02/0\text{nm}$ است. در عمل به علت محدودیت های دیگر ، قدرت جداسازی میکروسکوپ های الکترونی هیچ وقت به این خوبی نیست. حد تفکیک با میکروسکوپ الکترونی برای ملکول های تخلیص شده ی زیستی ، حدود $1/0$ نانومتر و برای سلول ها 2 نانومتر است که دست کم 100 برابر بهتر از بهترین میکروسکوپ های نوری است.

دو نوع میکروسکوپ الکترونی به نام میکروسکوپ الکترونی گذاره و میکروسکوپ الکترونی نگاره وجود دارد. میکروسکوپ الکترونی گذاره (transmission electron microscope) زودتر اختراع شد و قدرت جداسازی بهتری دارد. در این نوع میکروسکوپ ، الکترون ها هنگام برخورد به نمونه از برخی مناطق آن عبور می کنند و از مناطقی دیگر بازتابیده می شوند. عامل تعیین کننده در این امر در نهایت ویژگی اتم های تشکیل دهنده ی مناطق مختلف سلول است. الکترون های عبوری در دستگاه تشخیص داده می شوند و تصویری از نمونه حاصل می شود. سلول های زنده با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده نیست.

یکی از تجهیزات بزرگ علمی میکروسکوپ الکترونی است که براساس قوانین نوری کار میکند دراین دستگاه شار الکترون پر انرژی از يك منبع الکترون خارج شده و تحت شتاب به طرف هدف میرود در مسیر خود از روزنه های تعبیه شده در يك فلز عبور کرده وبا عبور از لنزهای مغناطیسی بر روی شی مورد نظر تابانده شده ودر نتیجه بازتاب نور تصویر شی دیده خواهد شد.

اطلاعاتی را که میکروسکوپ الکترونی ارائه میدهد:

۱ - توپوگرافی شیء : (نقشه برداری) که با اشکار کردن مشخصات سطح و بافت داخلی شیء میتوان به خواصی مانند سفتی و میزان ارتجاعی بودن آن پی برد.

۲ - مورفولوژی (ریخت شناسی): از آن رو که در این رویت شکل و سائز ذرات مشخص است میتوان به سختی و استحکام پی برد.

۳ - ترکیب: این میکروسکوپ میتواند عناصر سازنده شیء را مشخص نماید بنابراین میتوان به خواصی مانند نقطه ذوب اکتیویته شیء نیز دست یافت.

۴ - بلور شناسی: میکرو سکوپ الکترونی چگونگی چیده شدن اتمها را در مجاورت یکدیگر را می دهد و به این تر تیب میتوان آنها را از نظر رسانایی و خواص الکتریکی بررسی نمود.

منبع : khayam.persianblog.com

پیشرفته ترین میکروسکوپ قرن حاضر، با قدرت تفکیک ۲ آنگستروم است. در این میکروسکوپ با عبور پرتوهای الکترونی ساطع شده از رشته سیمی تنگستن با طول موج بسیار پائین از عدسی های متعدد که در نهایت بر روی یک صفحه فلورسنت یا صفحه مانیتور، عکسبرداری صورت گرفته و تصویر شیء قابل مشاهده میباشد.

قدرت جداسازی میکروسکوپهای الکترونی از میکروسکوپ نوری بهتر است به این معنی که با میکروسکوپهای الکترونی اجزای کوچکتر را می توان دید. قبلاً متذکر شدیم که بین R و طول موج نور تابیده شده به نمونه رابطه مستقیمی برقرار است، یعنی هر چقدر طول موج تابشی کوچکتر باشد، R نیز کوچکتر و قدرت جداسازی بیشتر است. طول موج نور مرئی بین 300nm تا 800nm و بهترین حد تفکیک میکروسکوپهای نوری 200nm است.

در میکروسکوپهای الکترونی به جای استفاده از امواج نور مرئی، از امواج الکترونها استفاده می شود. در شرایط مناسب، طول موج الکترونها به 0.005 نانومتر می رسد، یعنی حدود $100/000$ برابر کوتاهتر از طول موج نور مرئی. در این طول موج، بهترین R ممکن حدود 0.002 نانومتر است. در عمل، به علت محدودیتهای دیگر، قدرت جداسازی میکروسکوپهای الکترونی هیچ وقت به این خوبی نیست. حد تفکیک (R) با میکروسکوپ الکترونی برای مولکولهای تخلیص شده زیستی، حدود 0.1nm و برای سلول ها حدود 2nm است که دست کم صد برابر بهتر از میکروسکوپ های نور است.

دو نوع میکروسکوپ الکترونی بنام های میکروسکوپ الکترونی گذاره و میکروسکوپ الکترونی نگاره وجود دارد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره:

این میکروسکوپ زودتر اختراع شده و قدرت جداسازی بهتری دارد. در این نوع میکروسکوپ، الکترون ها هنگام برخورد به نمونه از برخی مناطق آن عبور می کنند و از مناطقی دیگر بازتابیده می شوند. الکترون ها هنگام برخورد به نمونه از برخی مناطق آن عبور می کنند و از مناطقی دیگر بازتابیده می شوند. الکترون های عبوری در دستگاه تشخیص داده می شوند و تصویری از نمونه حاصل می شود. جزئیات روش های تثبیت، برش گیری و رنگ آمیزی برای میکروسکوپ الکترونی اختصاصی است. به عنوان مثال، برای رنگ آمیزی نمونه از فلزات سنگین مانند طلا استفاده می شود تا الکترون ها از اندامک ها و ساختارهای درون سلولی، مثل ریبوزوم، و مولکول های بزرگ سلول مثل DNA، با میکروسکوپ الکترونی گذاره قابل تشخیص هستند، اما جایگاه اتم های تشخیص دهنده مولکول ها معمولاً تعیین نمی شود.

میکروسکوپ الکترونی نگاره:

میکروسکوپ الکترونی نگاره (scanning electron microscope) نوع ساده تر میکروسکوپ الکترونی است برای بررسی نمونه با این میکروسکوپ ، نمونه با لایه ای نازک از فلز سنگین به صورت یکنواخت پوشیده شود. الکترون های تابیده شده به سطح نمونه از هیچ ناحیه ای از آن عبور نمی کنند، بلکه در برخورد با سطح نمونه باعث تولید الکترون های بازتابیده می شوند. این الکترون ها تشخیص داده شده و تصویری سه بعدی از سطح نمونه حاصل می گردد. قدرت جداسازی میکروسکوپ الکترونی نگاره حدود 10nm است.

این نوع ساده ترین میکروسکوپ الکترونی است. برای بررسی نمونه با این نوع میکروسکوپ، نمونه با لایه ای نازک از فلز سنگین به صورت یکنواخت پوشیده می شود. الکترونهای تابیده شده به سطح نمونه از هیچ ناحیه ای از آن عبور نمی کنند، بلکه در برخورد با سطح نمونه باعث تولید الکترون های بازتابیده می شوند، این الکترونها تشخیص داده می شوند و تصویری سه بعدی از سطح نمونه حاصل می گردد. حد تفکیک میکروسکوپ الکترونی نگاره حدود 10nm است.

میکروسکوپ STM (Scanning Tunneling Microscope):

میکروسکوپ STM و میکروسکوپ پرتو X

STM حروف اول Scanning Tunneling Microscope است این نوع میکروسکوپ در دهه ۱۹۷۰ اختراع شد و مخترعان آن در سال ۱۹۸۱ جایزه نوبل را دریافت کردند. همانطور که گفته شد طول موج محدودیتی برای میزان R تعیین می کند. نوآوری STM در این است که در آن امواج نوری یا امواج نوع دیگر به کار گرفته نمی شودو هیچ نوع عدسی در آن وجود ندارد. بیان دقیق نحوه کار این میکروسکوپ خارج از توان این مطلب است ولی به طور خلاصه سوندی که نوک آن به اندازه یک اتم است، ویژگی های نمونه را در ابعاد اتمی روبش می کند. STM ساختار سطحی نمونه را بررسی می کند. اما میکروسکوپ مشابه دیگر ویژگی های الکتریکی ، مغناطیسی و یا دمای نمونه را تعیین می کنند. در حال حاضر این میکروسکوپ ها برای نمونه های زیستی و بیشتر برای نمونه های غیر زیستی مورد استفاده قرار می گیرند.

میکروسکوپ پرتو X نوع دیگری از میکروسکوپ های نوین است که کاربرد بیشتری برای نمونه های زیستی دارد. قدرت جداسازی آن چند صد آنگستروم و ضعیف تر از میکروسکوپ الکترونی است ، اما سلول های زنده با آن قابل بررسی هستند

STM حروف اول Scanning Tunneling Microscope است. این نوع میکروسکوپ در دهه ۱۹۷۰ اختراع شد و مخترعان آن در سال ۱۹۸۱ جایزه نوبل را دریافت کردند. همان طور که گفته شد طول موج، محدودیتی برای میزان R تعیین می کند. نوآوری STM در این است که در آن امواج نوری یا امواج نوع دیگری بکار گرفته نمی شوند و هیچ نوع عدسی در آن وجود ندارد. بطور خلاصه سوندی که نوک آن به اندازه یک اتم است، ویژگی های نمونه را در ابعاد اتمی روبش می کند. STM ساختار سطحی نمونه را بررسی می کند اما میکروسکوپ های مشابه دیگر ویژگی های الکتریکی، مغناطیسی و یا دمای نمونه را تعیین می کنند. در حال حاضر این میکروسکوپ ها برای نمونه ای زیستی و بیشتر برای نمونه های غیر زیستی مورد استفاده قرار می گیرند.

میکروسکوپ های پلاریزان

در بسیاری از مطالعات میکروسکوپی مثل مطالعه سنگها ، مواد شیمیایی کریستالی و بسیاری از ترکیبات آلی مثل ساختمان کراتین ، عضلات ، کلاژنها نیاز به استفاده از میکروسکوپیهای پلاریزان می باشد. جز اینها در مطالعات میکروسکوپی پلاریزان نور پلاریزه می باشد.

نور پلاریزه

نور معمولی متشکل از فوتونها هستند دارای بردارهای الکتریکی و مغناطیسی عمود بر هم می باشند. این دو میدان بطور سینوسی در حال نوسان می باشند و در ضمن در جهت عمود بر صفحه دو میدان و یا صفحه ارتعاشات این دو منتشر می شوند. ارتعاشات میدان الکتریکی

نور غیر پلاریزه در یک نقطه در همه جهات می‌باشد. اکثر مواد شیشه‌ای و بسیاری از مواد دارای این ویژگی هستند که وقتی یک دسته پرتو نوری به آنها وارد شود در آن صورت سرعت انتشار و نحوه انتشار نور در جهات مختلف در آنها مشابه و یکسان می‌باشد و تنها تغییری که در نحوه حرکت دسته پرتو ضمن عبور از این مواد حاصل می‌شود آن است که بر اساس قوانین اسنل مسیر و جهت آنها نسبت به قبل از ورودشان به آن ماده تغییر می‌کند. اینگونه مواد را مواد ایزوتروپیک (isotropic) می‌نامند. مواد ایزوتروپیک در همه جهات دارای ضریب شکست مشابه هستند.

بعضی مواد شفاف و نیمه شفاف دارای دو ضریب شکست می‌باشند، یعنی نحوه انتشار نور در داخل این مواد در جهات مختلف متفاوت است. وقتی که یک دسته پرتو نوری به داخل این گونه مواد وارد می‌شود اگر نور غیر پلاریزه باشد در آن صورت به دو دسته پرتو تقسیم می‌شود. این دو دسته پرتو در جهات عمود بر هم حرکت می‌کنند و ارتعاشات میدان الکتریکی آنها کاملاً بر هم عمود می‌باشد. هر دسته پرتو بنام نور پلاریزه شده و صفحه ارتعاش آنها را صفحه پلاریزاسیون می‌نامند. موادی که دارای این چنین خاصیتی هستند بنام مواد غیر ایزوتوپ می‌نامند. بعضی مواقع نیز اینگونه مواد را مواد با ضریب شکست دو گانه می‌نامند. در بررسیهای پلاریزاسیون لازم است که ما نور پلاریزه داشته باشیم این عمل را بوسیله یک صفحه پلاریزور می‌توان انجام داد. نور خارج شده از صفحه پلاریزور یک نور پلاریز است. میدان الکتریکی این فوتونها تنها در امتداد محور پلاریزاسیون صفحه پلاریزور ارتعاش می‌نماید.

روشهای تولید نور پلاریزه

نور پلاریزه را می‌توان به طرق مختلف ایجاد نمود. روشهای معمول عبارتند از:

بازتابش

شکست مضاعف

جذب انتخابی

پراکندگی

در اینجا دو روش ایجاد نور پلاریزه مورد نیاز در میکروسکوپیهای پلاریزان را مختصراً توضیح می‌دهیم:

منشور نیکول

این منشور از بلور کلسیت درست شده است (کلسیت یا کربنات کلسیم). نور هنگام عبور از بلور کلسیت به دو دسته پرتو تجزیه می‌شود به گونه‌ای که اگر این بلور را مثلاً بر روی نوشته‌ای قرار دهیم نوشته‌ها بصورت مضاعف دیده می‌شود. نور وارد شده به کلسیت به دو دسته پرتو تجزیه می‌شود، که یکی تابع قوانین اسنل است که آنرا شعاع عادی می‌نامند. دسته پرتو دیگر از قوانین نور عادی پیروی نمی‌کند لذا به آن پرتو غیر عادی گویند. مسیر نور عادی و نور غیر عادی و همچنین سرعت انتشار این دو دسته پرتو با همدیگر متفاوت است، البته هر دو دسته پرتو نور پلاریزه می‌باشند.

منشور نیکول (Nicol) بدین گونه ساخته می‌شود که یک بلور کلسیت را در امتداد قطرش برش می‌دهند سپس قطعات بدست آمده را بوسیله صمغ مخصوصی بنام صمغ کانادا (Canada blasm) به همدیگر می‌چسبانند. ضریب شکست این ماده $1/55$ است که از ضریب شکست کلسیت برای شعاع عادی $n=1/656$ کمتر است و از ضریب شکست شعاع غیر عادی $n=1/482$ بیشتر می‌باشد. لذا وقتی که نور به محل اتصال دو نیمه می‌رسد نور غیر عادی انعکاس کلی پیدا می‌کند و تنها نور عادی از آن خارج می‌شود و بنابراین نور خارج شده یک دسته پرتو پلاریزه شده می‌باشد. می‌توان پلاریزه بودن نور خارج شده را بوسیله یک منشور دوم امتحان نمود. در صورتی که دو منشور

نیکل به موازات همدیگر قرار گیرند نور خارج شده از اولی بدون تغییر از دومی نیز خارج می‌شود و در صورتی که محور پلاریزاسیون آنها عمود بر هم قرار گیرند نور پلاریزه خارج شده از اولی از دومی عبور نمی‌نماید.

تورمالین

نوع دیگری از پلاریزورها که بر اساس جذب انتخابی عمل می‌کنند موادی مثل تورمالین می‌باشند. اینگونه مواد وقتی نور غیرپلاریزه به آنها بتاید پس از ورود مثل بلور کلسیت در آن شکست مضاعف اتفاق می‌افتد و لیکن شعاع عادی آن در صورت ضخامت کافی بلور کاملاً در داخل بلور جذب می‌شود و شعاع غیر عادی از بلور خارج می‌شود. بنابراین بلور تورمالین ارتعاشات را در یک راستا جذب و ارتعاشات در جهت عمود بر آن را عبور می‌دهد. این خاصیت تورمالین مربوط به ساختمان ملکولی آن می‌باشد. ماده تورمالین را نمی‌توان به جای منشور نیکول استفاده نمود، بخاطر آنکه این بلور رنگین است لذا نور سفید از آن عبور نمی‌کند.

آنالیزور (Analyser)

آنالیزور یک پلاریزور دیگر است که نحوه کار آن دقیقاً مشابه پلاریزور است بجز آنکه محل نصب آن در پشت پلاریزور واقع می‌باشد. آنالیزور در میکروسکوپهای پلاریزان بین عدسی شیئی و چشم مشاهده کننده واقع است. موقعی که در میکروسکوپها از منشور نیکول استفاده می‌شود. معمولاً آنرا درست بالای عدسی شیئی و یا درست بالای عدسی چشمی قرار می‌دهند تا از ایجاد مانع در مقابل نور جلوگیری نماید و لیکن در میکروسکوپهایی که از فیلترهای پلاروئید به عنوان آنالیزور استفاده می‌شود این ----- در داخل لوله عدسی نصب می‌گردد و دارای ورنیه می‌باشد که درصد چرخش آنرا می‌توان مشخص نمود.

عمدتاً وقتی که نمونه‌ها را بوسیله نور پلاریزه مورد تابش قرار دهیم و مشاهده نمائیم تصویر مشابه حالتی است که از نور غیر پلاریزه استفاده می‌شود. اما وقتی که در مقابل آن یک آنالیزور قرار دهیم در آنصورت مشاهده می‌شود که با چرخش آنالیزور در جهات مختلف روشنایی تصویر متفاوت خواهد بود. در حالتی که محور پلاریزاسیون پلاریزور و آنالیزور بر همدیگر عمود باشند، در آن صورت نوری از آن به چشم مشاهده گر نمی‌رسد و در صورتی که دو محور به موازات هم باشند حداکثر نور خارج می‌شود. در این صورت می‌توان تأثیر نمونه در چرخش نور را مشاهده و اندازه گیری نمود. در حالتی که محور پلاریزاسیون پلاریزور و آنالیزور بر همدیگر عمود باشند کلیه نورهایی که مستقیماً از پلاریزور به آنالیزور می‌رسند متوقف می‌شوند و از آن خارج نمی‌شوند و تنها آن بخش از نورهایی که بوسیله نمونه خارج و تغییر جهت داده می‌شود بوسیله آنالیزور عبور داده می‌شود و می‌توان بنابراین تأثیر نمونه را بر روی نور پلاریزه عبوری مطالعه نمود.

عدسیهای مختلفی که در ساختمان میکروسکوپهای پلاریزان مورد استفاده قرار می‌گیرد بایستی بدون هیچگونه رگه باشد و علاوه بر آن نبایستی خود دارای اثر پلاریزه کنندگی باشند. در صورتی که از میکروسکوپهای معمولی بخواهیم برای بررسی خواص کندانسور استفاده نماییم باید آن را آزمایش نمود که این اشکالات در آنها وجود نداشته باشد. وجود زاویه در هر یک از عدسیها خود می‌تواند موجب اثر پلاریزه کنندگی نور شود و بنابراین برای مطالعه نمونه‌هایی که خاصیت پلاریزه کنندگی آنها کم است بهتر است روزنه نور را تا حد ممکن کم نمود تا تأثیر زاویه دار بودن کمتر شود.

وسایل ملحقات یک میکروسکوپ پلاریزان

با اضافه کردن وسایل لازمه به یک میکروسکوپ به گونه‌ای که بتوان در آن از نور پلاریزه استفاده نمود اطلاعات مفیدی از نمونه‌ها می‌توان بدست آورد. در حالت بسیار ساده می‌توان با افزودن یک صفحه ساده پلاریزور و یک صفحه آنالیزر که بشود آنها را چرخاند می‌تواند این کار انجام شود. لیکن در اندازه گیریهای دقیق و مواقعی که اندازه گیری مقداری مورد نیاز باشد بایستی از میکروسکوپ پلاریزان استفاده شود. تجهیزات اضافی یک میکروسکوپ پلاریزان را می‌توان بطور مختصر بصورت زیر برشمرد:

پلاریزور و آنالیزور که بتوانند به داخل و یا خارج محلهای مربوطه منتقل شوند و همچنین حول محور قائم بچرخند و در ضمن جهت آنها نیز نسبت به همدیگر قابل تعیین باشد.

خطوط متقاطع که بر روی چشمی نصب شوند بگونه‌ای که بتواند پس از نصب و تنظیم ثابت شوند و از چرخش آن جلوگیری نماید. خارهایی که بتوان خطوط را بطور ثابت بطرف شمال – جنوب ، شرق – غرب یا در زاویه ۴۵ درجه نسبت به این جهتها قرار دهد.

پایه نگه دارنده نمونه (mechanical stage) که بتوان آنرا به تدریج بوسیله یک ورنیه چرخاند.

وسیله مناسب برای چرخاندن و یا انتقال پایه (stage) و هم محور کردن با محور اپتیکی.

شیارهایی در بدنه جهت وارد کردن جبران کننده. جبران کننده‌ها در زیر پلاریزور در شکاف مخصوص خود قرار می‌گیرند. این وسایل جهت جبران تأخیر فاز نمونه‌های بلورین ناشناخته بکار می‌روند.

یکم مرحله کندانسور در بالای پلاریزور

یک عدسی برتراند و دیافراگم برزای امتحان و بررسی نوارهای تداخلی.

میکروسکوپ تداخلی

میکروسکوپیهای تداخلی بوسیله کمپانی‌های متعددی ساخته می‌شوند. این میکروسکوپیها دارای ساختارهای متعدد و متفاوتی می‌باشند، اساس کار این میکروسکوپیها بر مبنای تداخل نور عبور نموده از نمونه‌های شفاف که دارای فازهای متفاوت هستند و یا تداخل نور منعکس شده از نمونه‌های کدر یا پرتوهای نور دیگری که با این نورها دارای اختلاف راه هستند عمل می‌نماید و بدین طریق ساختار داخلی نمونه و یا سطح آن قابل مشاهده می‌شوند. در صورتی که از طریق تداخل نورهای عبور نموده از نمونه تصویر بدست آید، روش عمل کنتراست تداخلی دیفرانسیلی (DIC) و در صورتی که تصویر از انعکاس سطح نمونه حاصل شود آنرا میکروسکوپ تداخلی انعکاسی می‌نامند.

میکروسکوپ تداخلی DIC

در یک سیستم DIC نور عبور نموده از هر قسمت نمونه مواجه با بخشی از نمونه است که با قسمتهای مجاور دارای اختلاف فاز می‌باشد. علت این تفاوت فاز مربوط به ضریب شکست متفاوت نمونه می‌باشد. در اثر تداخل حاصله بین نورهای خارج شده از نواحی مختلف قابل مشاهده می‌شوند. نور حاصله از چشمه به دو بخش تقسیم می‌شود. دسته پرتو R بنام مرجع (Reference beam) شناخته شده است با دسته پرتو O که از نمونه مورد آزمایش عبور نموده است تداخل نموده و بخاطر آنکه دو دسته پرتو O,R دو دسته پرتو همدوس می‌باشند، لذا نوارهای تداخلی قابل تشخیص تشکیل می‌گردد. روش تصویر با استفاده از دسته پرتوهای مختلف و ایجاد تداخل برای مدت زمان بسیار طولانی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از طرقی که بسیار مورد استفاده قرار گرفته است، روش مربوط به جامین (Jamin) می‌باشد. در این روش با توجه به روش پلاریزاسیون دو دسته پرتو را از یک دسته پرتو ایجاد نموده و سپس آن دو را با همدیگر ترکیب می‌نماید.

تداخل سنج جامین (Jamin's interferometer)

شکل و نحوه کار سیستم اینترفرومتر ابداع شده بوسیله جامین در شکل مقابل نشان داده شده است.

نور از چشمه S توسط صفحه پلاریزور S به نور پلاریزه تبدیل می‌شود و سپس بوسیله صفحه کلسیت C به دو دسته پرتو عادی و غیر هعادی تبدیل می‌شود. پس از آن نور از یک صفحه نیم موج عبور نموده و نتیجتاً نور O به طور غیر عادی و نور E نور عادی تبدیل

می‌شوند. پس از آن این دو پرتو از صفحه کلسیت دوم عبور نموده ، این صفحه مشابه صفحه اول می‌باشد. در اثر پدیده فاز موج تغییر نموده و در نتیجه تداخل این دو موج تولید نوارهای تداخلی می‌شود که قابل دیدن است.

میکروسکوپ تداخلی اسمیت- بیکر

اسمیت و بیکر در واقع جز اولین کسانی بودند که با کاربرد سیستمهای تداخلی ، میکروسکوپ تداخلی را بصورت عملی طراحی نموده و با استفاده از آنها با توانائی زیاد توانستند تصاویر مناسب تهیه نمایند. روشهای متعدد دیگری نیز در ساختن میکروسکوپیهای پلاریزان بکار رفته است که در اینجا در مورد آنها توضیح داده نمی‌شود.

مقایسه با میکروسکوپ فاز کنتراست

در سیستم میکروسکوپیهای فاز کنتراست تفاوت اختلاف راه ایجاد شده که موجب تداخل می‌شود منحصر در اثر ماهیت نمونه می‌باشد. این در حالی است که در سیستم میکروسکوپیهای تداخلی عمل تداخل منحصر بوسیله نمونه ایجاد نمی‌شود، بلکه اختلاف راه حاصله مربوط به سیستم ساختمانی در میکروسکوپ است که در اثر چگونگی قرار گرفتن اجزاء ایجاد می‌شود. بنابراین موقعی که ماهیت نمونه به گونه‌ای باشد که نتواند به حد کافی موجب ایجاد تداخل شود در آنصورت می‌توان این عمل را بسادگی با استفاده از میکروسکوپیهای تداخلی انجام داد. استفاده از میکروسکوپیهای فاز کنتراست بعضی مواقع موجب آرتی‌فکتهائی می‌شود که این مشکل در سیستمهای میکروسکوپ تداخلی واقع نمی‌شود. میکروسکوپیهای تداخلی حتی می‌تواند برای نمونه‌های غیر شفاف (نمونه‌های رنگ شده) بکار رود و وضوح تصویر بسیار خوب باشد. تصویهای حاصله با میکروسکوپیهای تداخلی دارای حالت شبه سه بعدی تا حدی مشابه میکروسکوپیهای الکترونی می‌باشد. در این نوع میکروسکوپ معمولاً نوارهای تداخلی کناره‌های تصویر بخاطر اثر هال ظاهر نمی‌شود.

عمق میدان وضوح در میکروسکوپیهای تداخلی دو تا سه برابر بیشتر از میکروسکوپیهای فاز کنتراست می‌باشد. در صورت استفاده از نور تک‌رنگ روشنائی تصویر در میکروسکوپیهای تداخلی بیشتر از میکروسکوپیهای فاز کنتراست می‌باشد. در این نوع میکروسکوپها در صورتی که اختلاف فاز ایجاد شده حتی برابر چندین طول موج هم باشد باز هم تصویر دارای وضوح زیاد است و لذا نمونه با ضخامت حدود mm 5/0 هم باز قابل مشاهده با این میکروسکوپیها هستند، در حالی که میکروسکوپ فاز کنتراست برای نمونه‌های بسیار نازک حدود 10 میکرون یا کمتر می‌باشند به گونه‌ای که موجب اختلاف فاز زیاد نشوند.

میکروسکوپ تداخلی انعکاسی

سطوح با ضریب انعکاس کم و یا زیاد - سطوح فلزی یا غیر فلزی ، سطوح مناسبی برای امتحان با استفاده از میکروسکوپ تداخلی می‌باشد. تصویر بزرگ شده سطح را می‌توان بوسیله میکروسکوپ مشاهده نمود. در صورتی که سطح مورد مطالعه کاملاً مسطح و صاف باشد نوارهای تداخلی منظم و با فاصله مشخص تشکیل می‌شود. این در حالی است که اگر سطح دارای ترک و یا لکه‌ای باشد در آن صورت تصویر تداخلی تشکیل شده نامنظم و متفاوت خواهد بود. اگر چه سیستم عدسیهای استفاده شده متفاوت است و لیکن اساس کار آنها با همدیگر مشابه می‌باشد. نور به میکروسکوپ وارد شده و به سطح تحت آزمایش از طریق یک تابش کننده عمودی وارد می‌شود. بخشی از نور توسط سطح نیمه منعکس کننده R منعکس می‌شود و سطح t را مورد تابش قرار می‌دهد. از این سطح نور منعکس شده و با نور مربوط به سطح جسم ترکیب می‌شود. با تغییر اندکی روی سطح نگهدارنده شیئی با سطح تداخلی یک شیب فازی در سیستم ایجاد می‌شود و نتیجتاً موجب تشکیل نوارهای تداخلی در صفحه تصویر می‌شود.