



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

عنوان

اندازه گیری ابعاد اجسام میکروسکوپی
در میکروسکوپ نوری

اهداف

کالیبره کردن (Calibration) میکرومتر چشمی (Eye Piece Micrometer)
در بزرگنمایی های مخلف میکروسکوپ

تعیین ابعاد (طول و عرض) یاخته‌ها

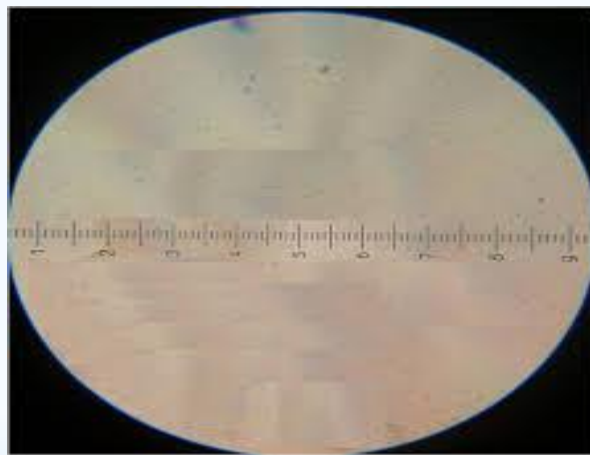
اندازه‌گیری قطر اندامک‌ها

تعیین سطح میدان دید و کاربرد آن

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

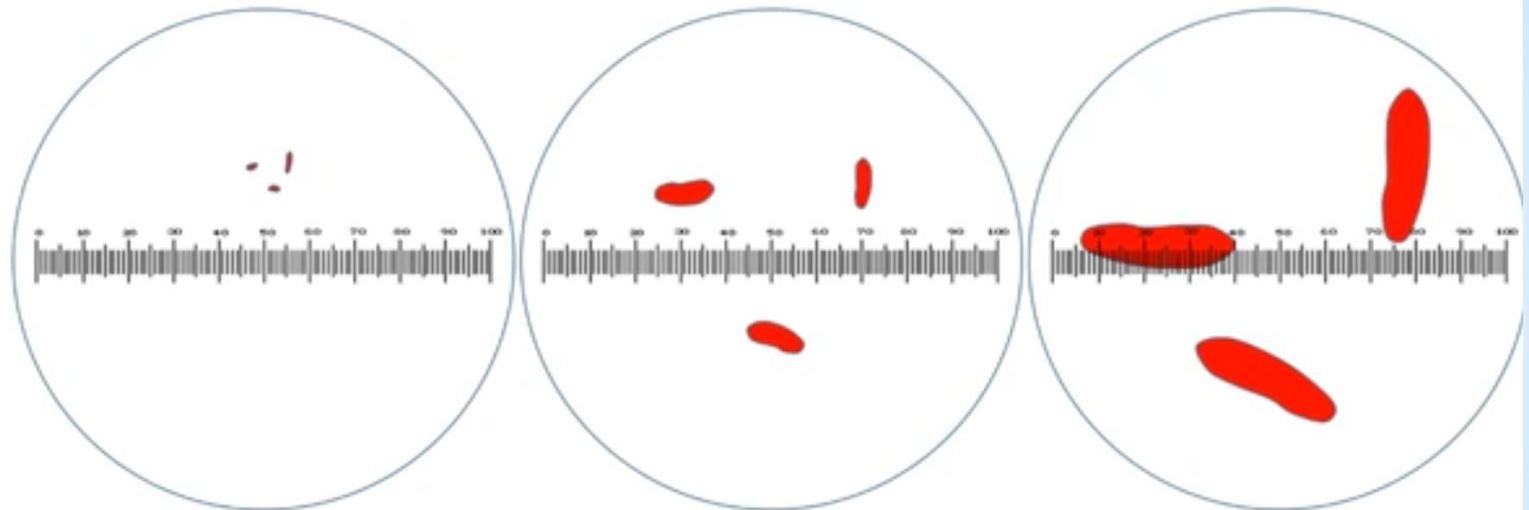
اندازه سلول‌های یک بافت مشخص در گونه‌های مختلف متفاوت است و در بدن یک موجود زنده در بافت‌های مختلف اندازه سلول‌ها یکسان نیست. وقتی یک سلول به اندازه طبیعی خود می‌رسد، یارشد آن متوقف می‌شود و یا تقسیم می‌گردد. گاهی اوقات ممکن است سلول این روند طبیعی را طی نکند و دچار حالت غول‌پیکری و یا رشد کمتر از حد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

رایج‌ترین روش اندازه‌گیری در میکروسکوپ نوری استفاده از عدسی‌های چشمی خاصی به نام میکرومتر چشمی یا **Eye piece micrometer** یا اکولر مدرج می‌باشد. در درون این عدسی، خطی وجود دارد که به صد قسمت مساوی تقسیم شده‌است. برای اندازه‌گیری ابعاد نمونه‌های میکروسکوپی تقسیمات این میکرومتر نمی‌تواند دارای مقیاس مشخص و ثابتی باشد.



چرا؟

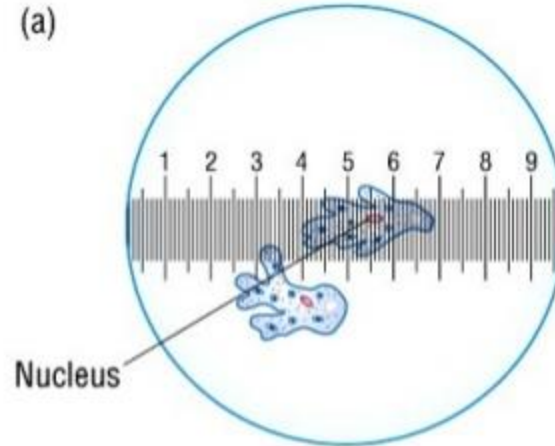
چون بزرگنمایی میکروسکوپ با استفاده از عدسی‌های شیئی مختلف تغییر می‌کند، بنابراین قبل از به‌کاربردن این میکرومتر جهت اندازه‌گیری ابعاد نمونه میکروسکوپی، لازم است مقیاس درجات آن برای بزرگنمایی‌های مختلف تعیین شود. به تعیین فاصله هر درجه از میکرومتر چشمی یا اکولر مدرج کالیبراسیون می‌گویند.



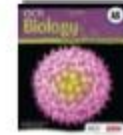
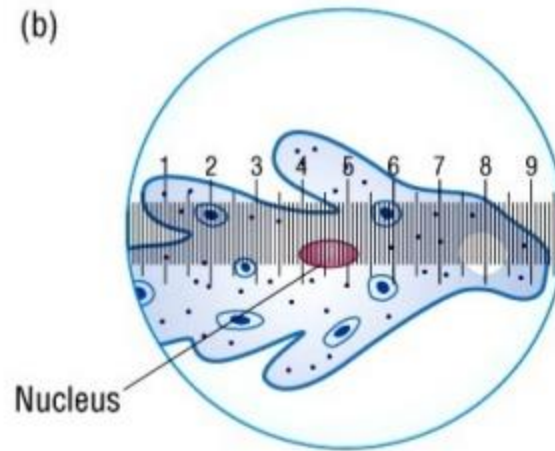
Ocular Lens	10X	10X	10X
Objective lens	4X	10X	40X
Specimen's Image	4X x 10X = 40X	10X x 10X = 100X	40X x 10X = 400X
Ocular ruler image	10X	10X	10X



(a)



(b)



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

برای این منظور از وسیله دیگری به نام لام مدرج یا Stage Micrometer استفاده می‌شود.

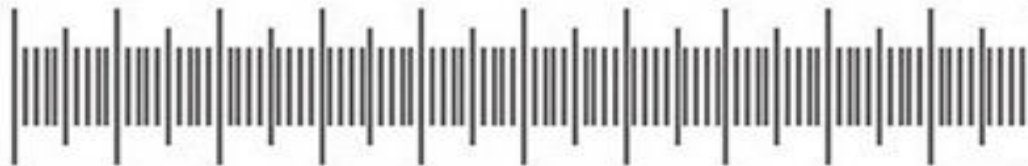
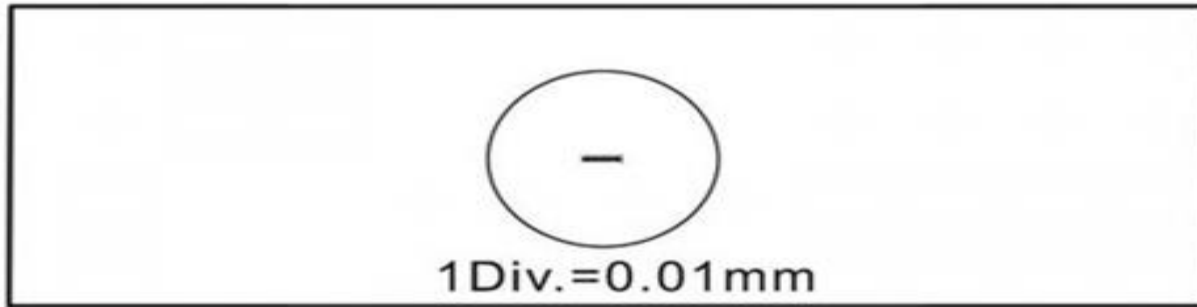
این میکرومتر يك لام شیشه‌ای است که قسمت مرکزی آن که با دایره سیاه‌رنگی مشخص و در آن يك فاصله‌ی 1 میلیمتری به 100 قسمت مساوی تقسیم شده است. بنابراین فاصله بین دو خط در لام مدرج، $1/100$ میلیمتر است و چون هر میلیمتر معادل 1000 میکرون میباشد و در میکروسکوپ ابعاد را میکرومتری بیان میکنیم فاصله بین هر درجه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



Stage micrometer

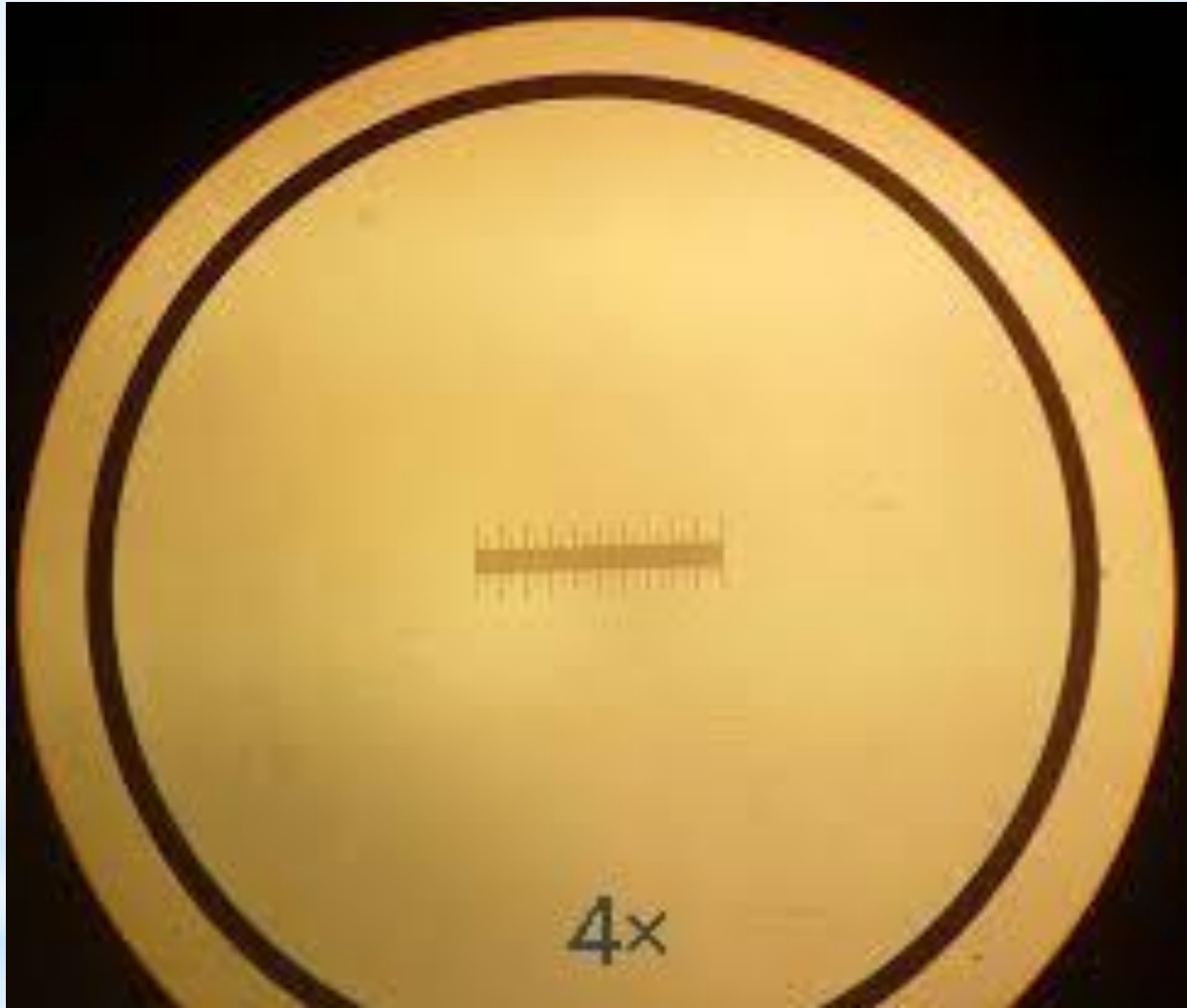
- It is used to calibrate the Ocular micrometer.
- It looks like a microscope slide but has a standard scale etched into it. The smallest divisions are 0.01mm in length. It is just like a tiny ruler.
- $0.01\text{mm} = 10 \text{ micro m}$

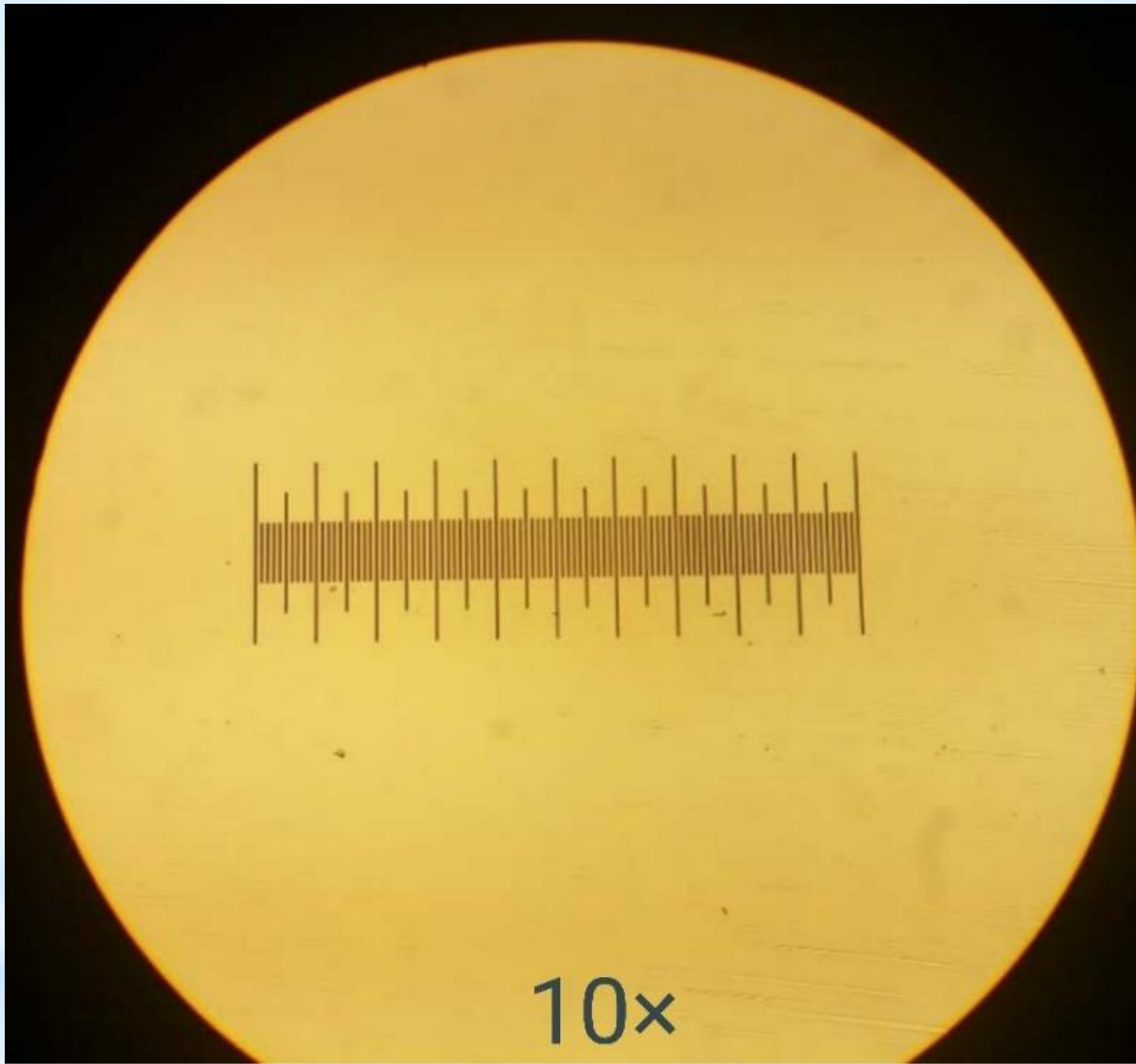


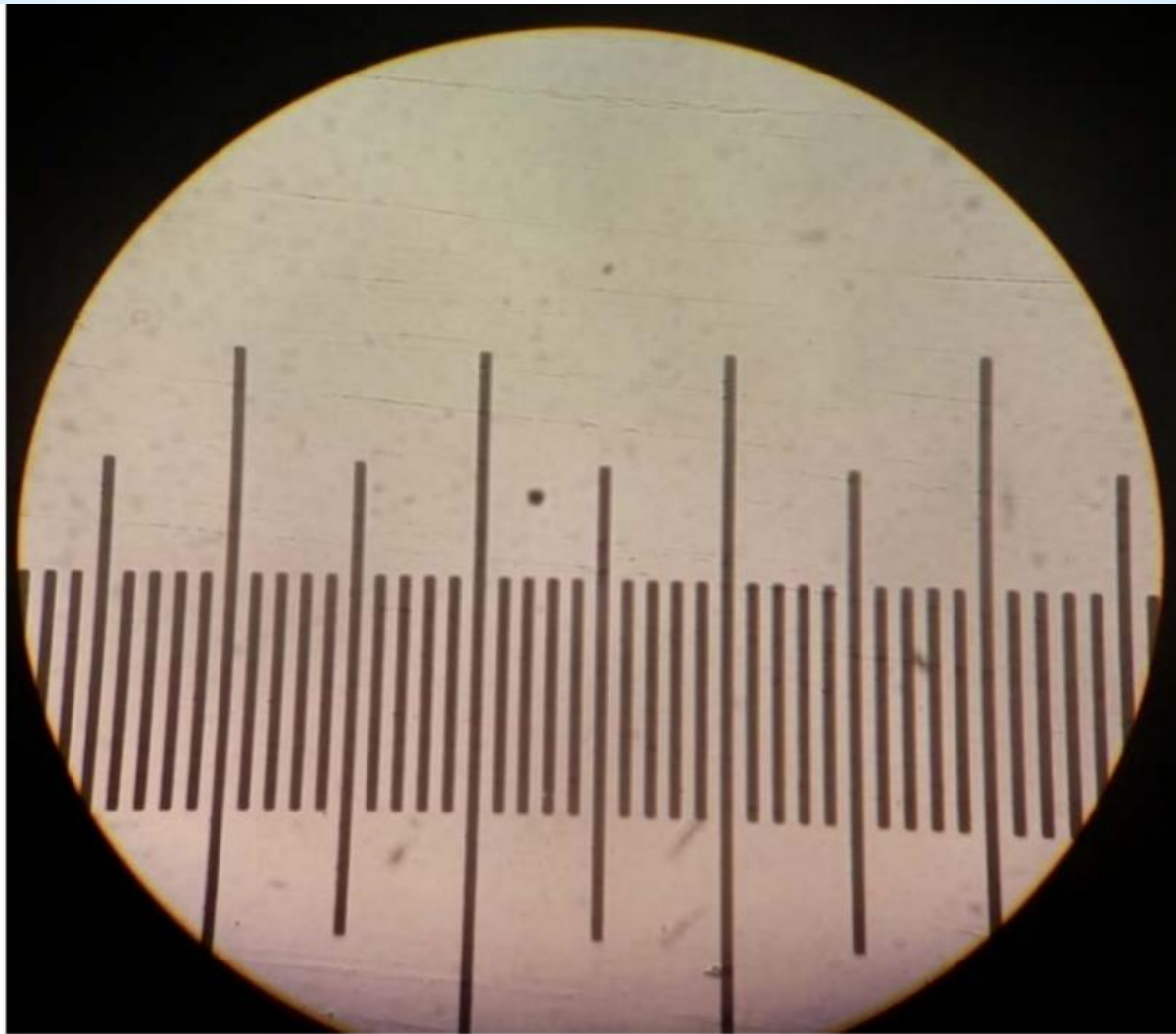


TS-M1 / 106011

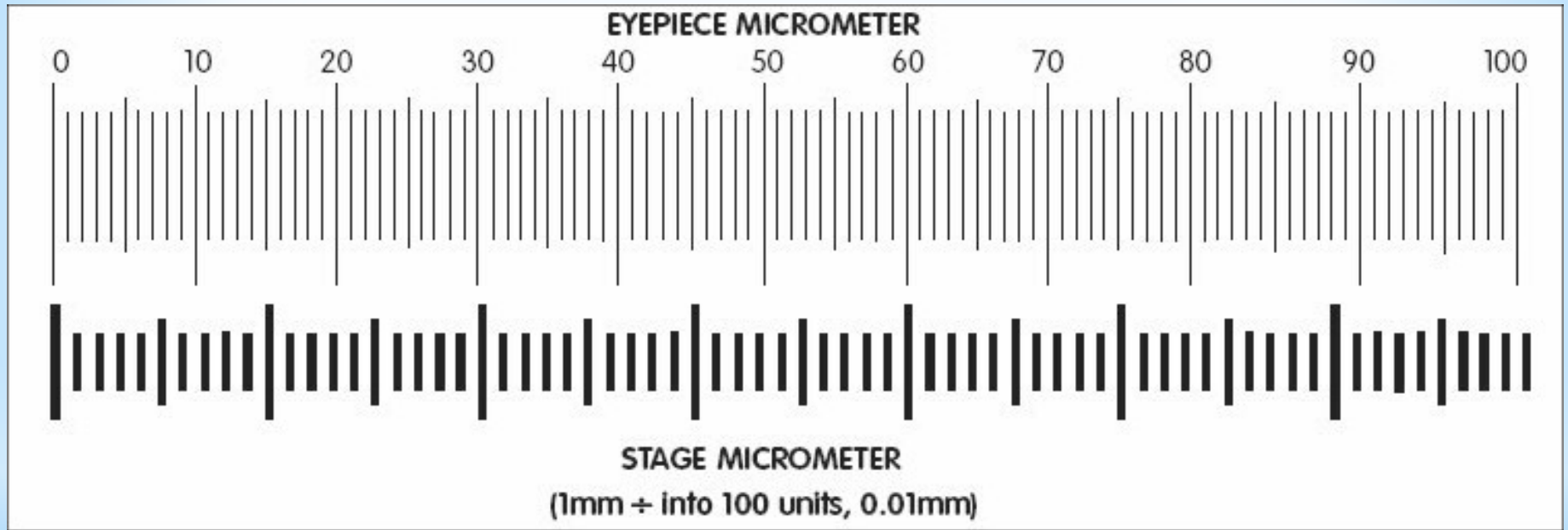
X Ruler $100 \times 0.01\text{mm} = 1\text{mm}$



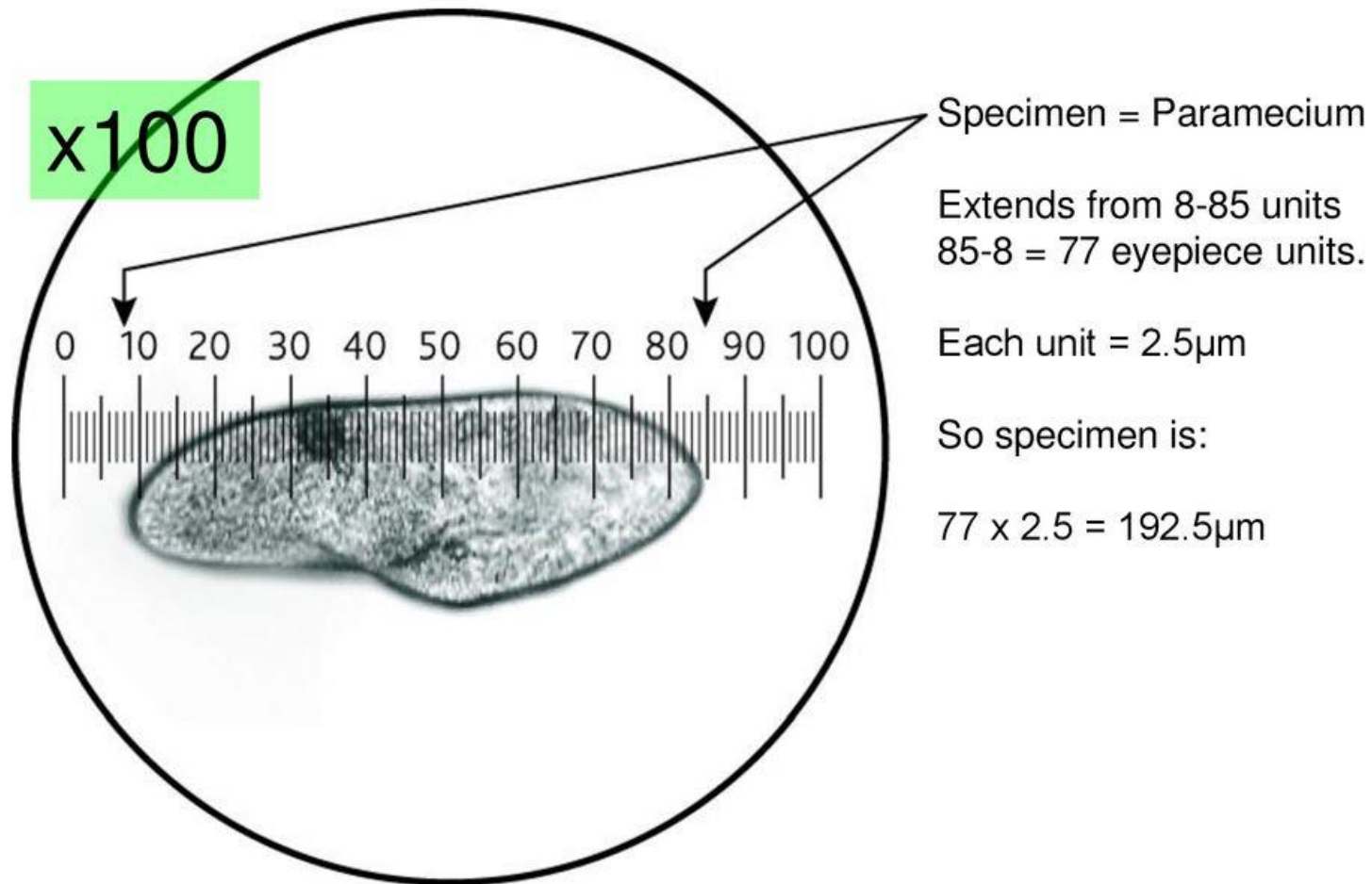




40x



Now measure specimen using calibrated eyepiece graticule





مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

لوگل

پیاز

لام مدرج

عدسی چشمی مدرج

میکروسکوپ نوری

لام ولامل

روش کار

1. برای تعیین مقیاس درجات اکولر چشمی یا اکولر مدرج در واقع کالیبره کردن این عدسی در بزرگنمایی‌های مختلف، عدسی چشمی معمولی میکروسکوپ را خارج کرده و به طور صحیح در جای مناسبی قرار دهید تا آسیب نبیند و اکولر مدرج را جایگزین کنید.

2. لام مدرج را روی صفحه میکروسکوپ قرار دهید و ابتدا در بزرگنمایی 4 و سپس در بزرگنمایی 10 و با بستن نسبی دیافراگم و کم کردن میزان نور ورودی میکروسکوپ کنتراست مناسب را تنظیم و بخش مدرج لام را پیدا کنید.

3. با حرکت تدریجی لام مدرج و چرخش اکولر مدرج هر دو درجه‌بندی را طوری بر هم منطبق کنید که از سمت چپ میدان دید اولین درجه‌ی لام مدرج دقیقاً در راستای اولین درجه‌ی اکولر مدرج باشد و این دو درجه را با پیچ‌های تنظیم کاملاً به هم نزدیک کنید.

4. پس از انطباق در بزرگنمایی 10 از قسمت راست میدان دید آن دو درجه از لام و اکولر را که دقیقاً با هم انطباق دارند و مقابل هم هستند را شمرده و سپس حساب کنید که يك درجه از اکولر مدرج معادل چند میکرون می باشد. دقت شود که هر تعداد درجه که از لام شمرده شود بایستی در 10 میکرون ضرب کنید تا اندازه آن را بر حسب میکرون به دست آورید و این اندازه را معادل تعداد درجه ای از اکولر که شمردید قرار دهید و در تناسب 1 درجه از اکولر حساب کنید. عدد به دست آمده معادل با عدد کالیبره اکولر مدرج در بزرگنمایی 10 می باشد. برای مثال با توجه به شکل اگر درجه 100 اکولر مدرج روی درجه ی 99 لام مدرج قرار گرفت خواهیم داشت :

100 درجه اکولر مدرج معادل 99 درجه لام مدرج ضربدر 10

میکرون یعنی 990 میکرون میباشد 1 درجه اکولر مدرج چقدر است؟

$$100/1=99*10/x$$

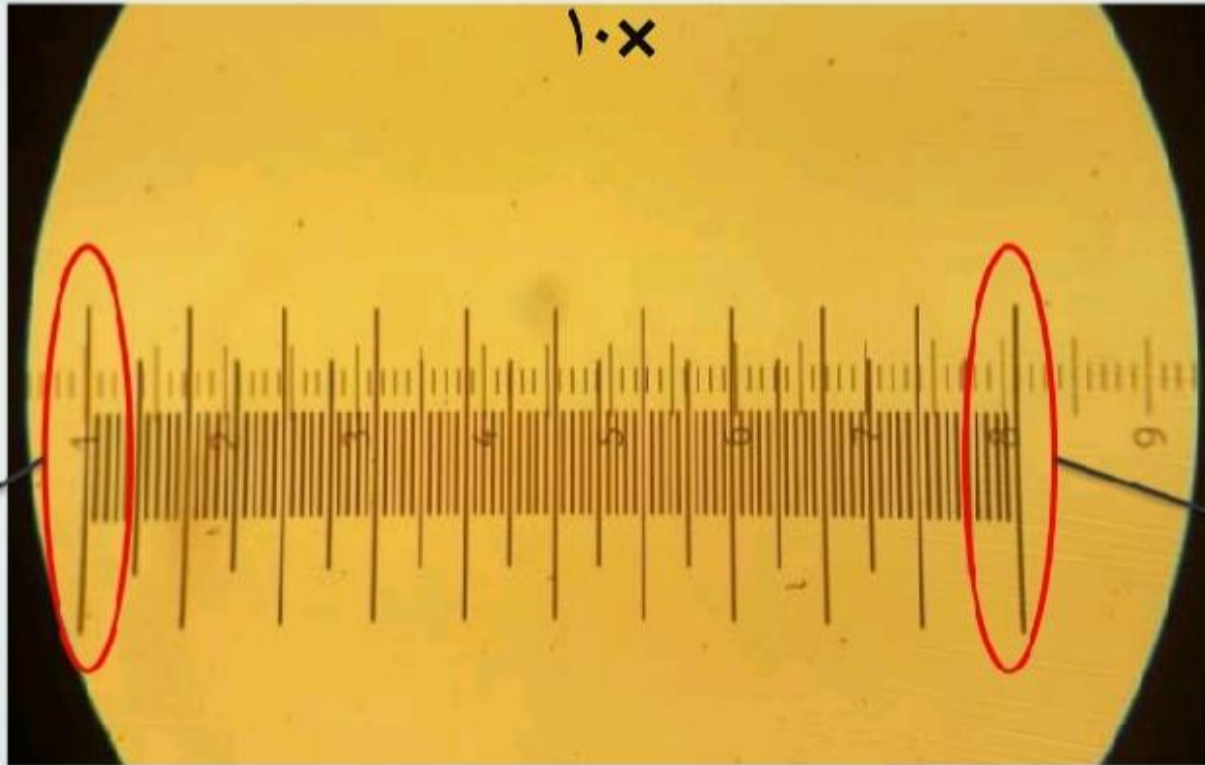
$$x=9.9$$

بر اساس محاسبه فوق عدد کالیبره بزرگنمایی 10 یعنی فاصله يك

درجه از اکولر در بزرگنمایی 10 معادل 9.9 میکرون می باشد.

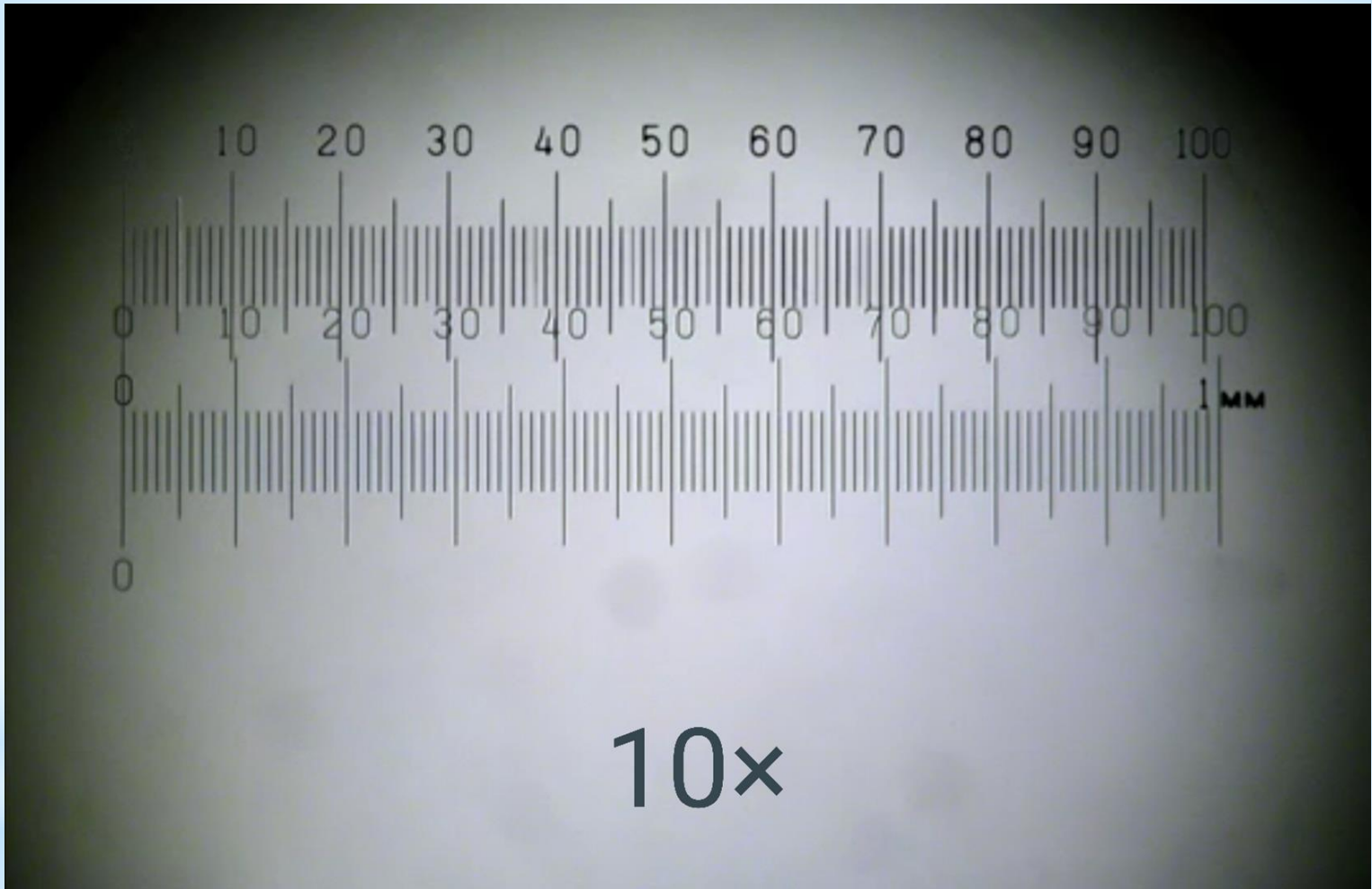
تطابق لام و اکولر مدرج در بزرگنمایی

۱۰x



نقطه انطباق اول

نقطه انطباق دوم



Calibration factor =

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

برای مثال با توجه به شکل اگر درجه 100 اکولر مدرج روی درجه 99 لام مدرج قرار گرفت خواهیم داشت :

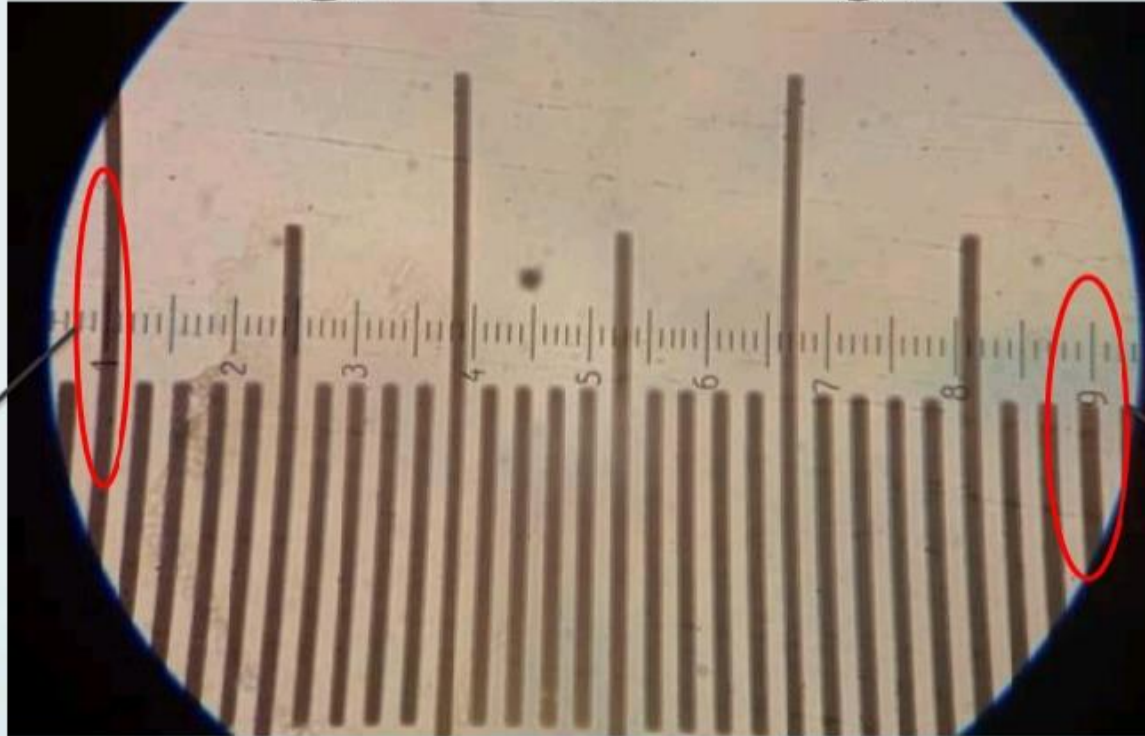
100 درجه اکولر مدرج معادل 99 درجه لام مدرج ضربدر 10 میکرون یعنی 990 میکرون میباشد 1 درجه اکولر مدرج چقدر است؟

$$100/1=99*10/x$$

$$x=9.9$$

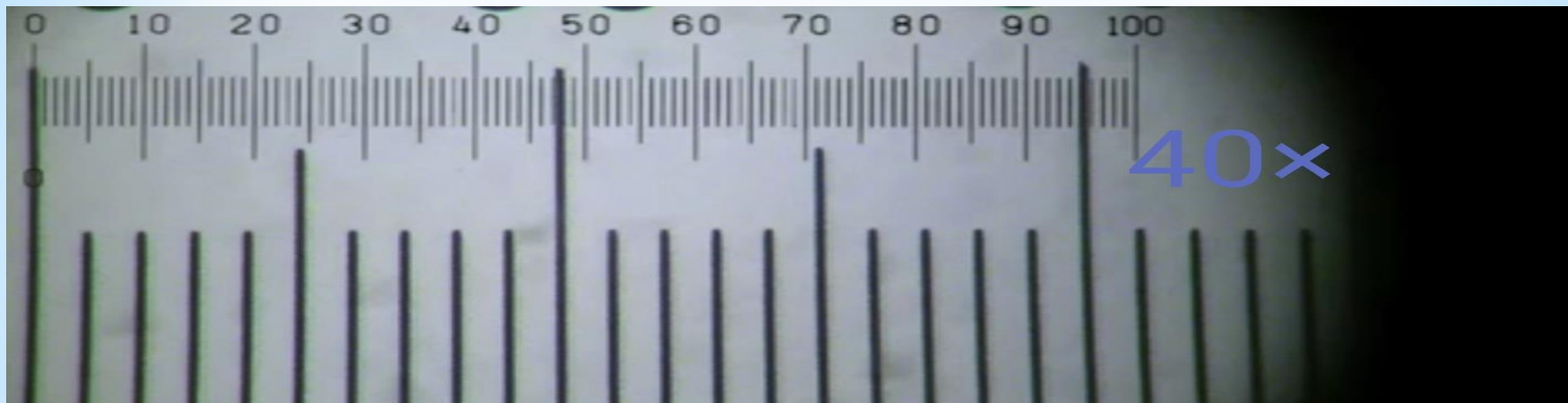
بر اساس محاسبه فوق عدد کالیبره بزرگنمایی 10 یعنی فاصله یک درجه از اکولر در بزرگنمایی 10 معادل 9.9 میکرون می باشد.

تطابق در بزرگنمایی ۴۰x



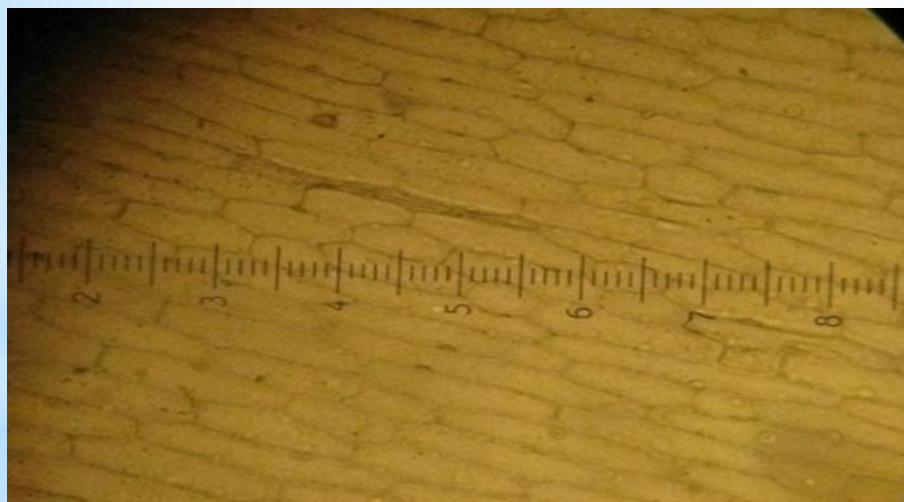
نقطه انطباق اول

نقطه انطباق دوم



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

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



اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های بشره پیاز و انطباق درجات

اکولر مدرج بر ابعاد سلول‌ها





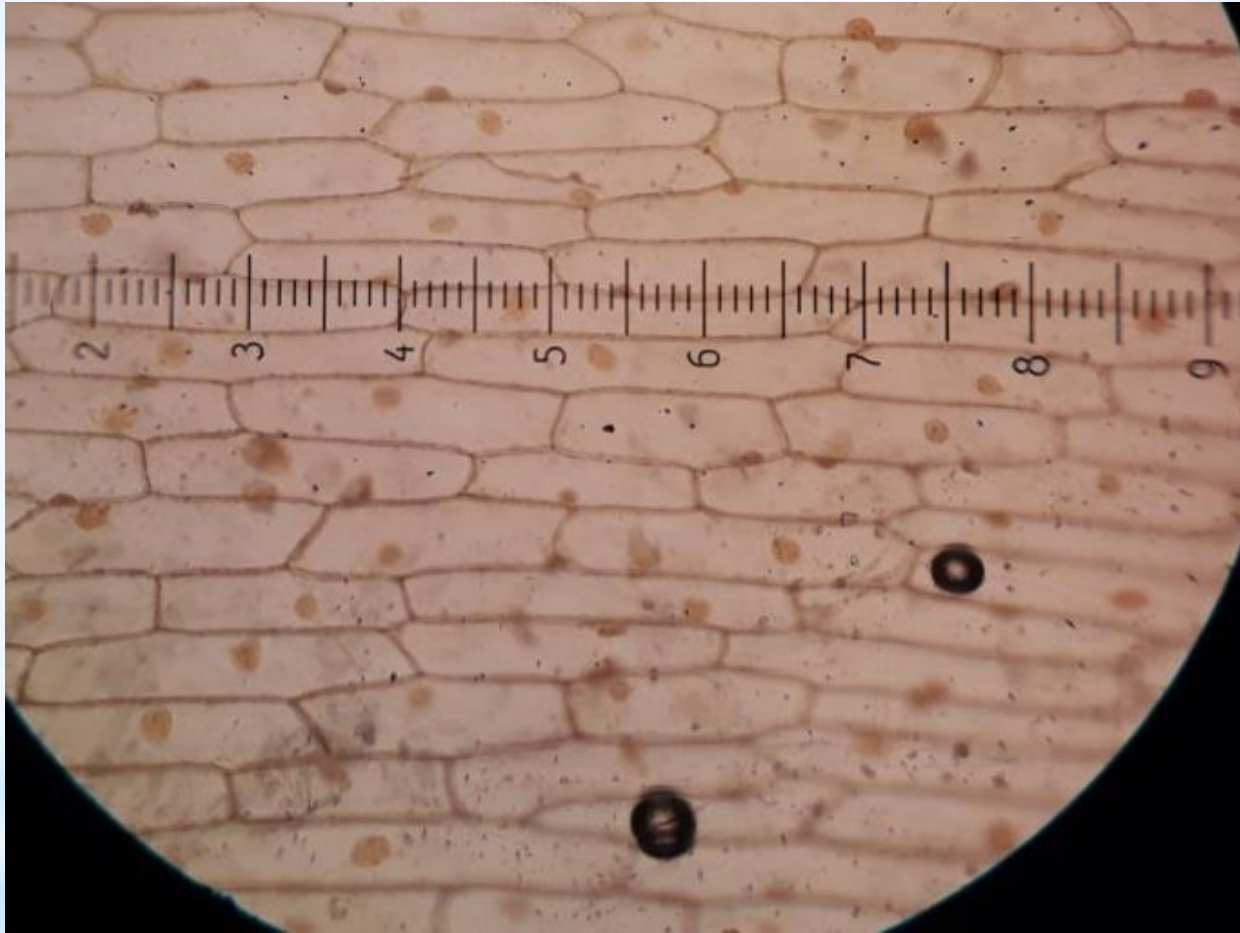


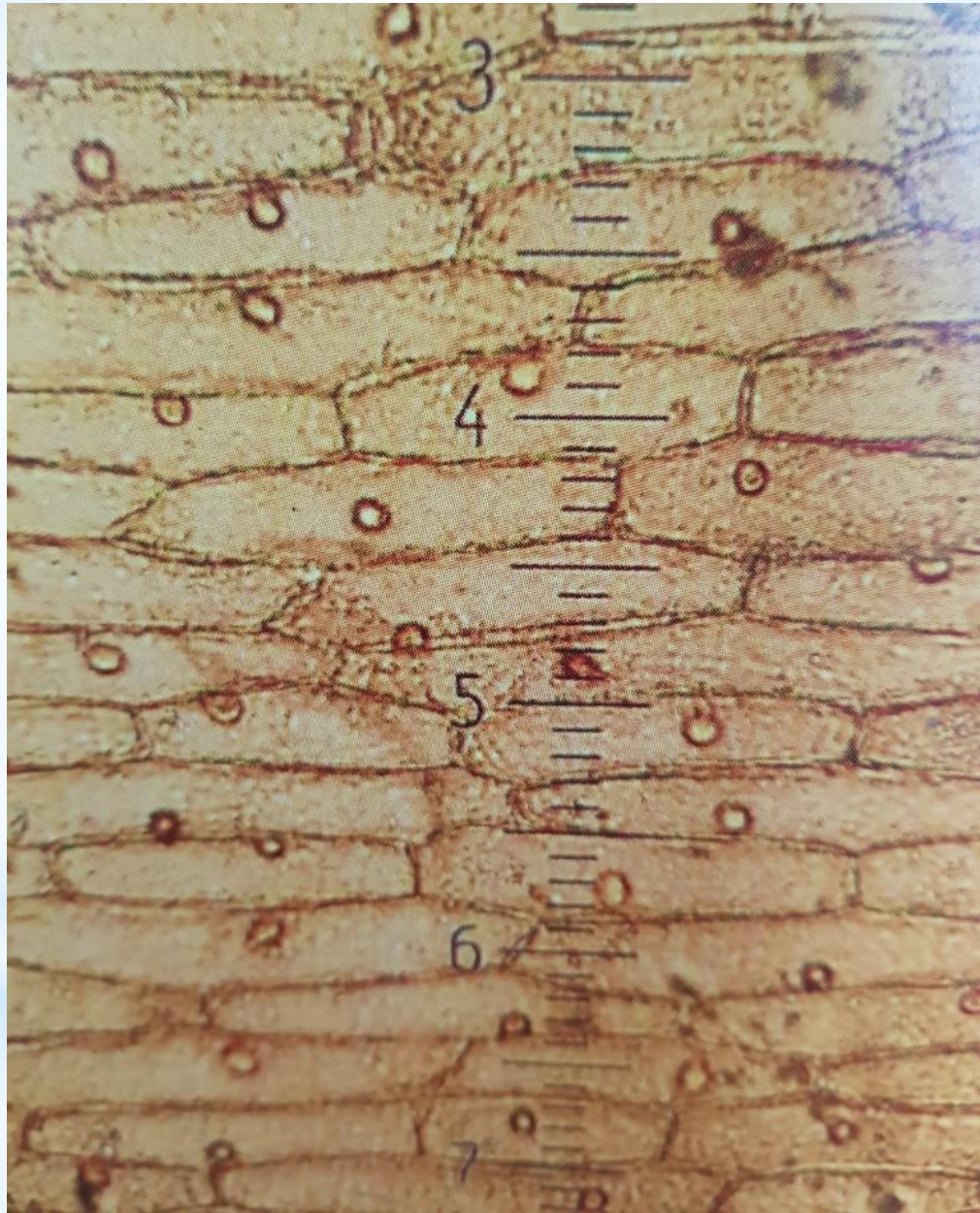


آزمایشگاه سلولی و

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

9. پس از رنگ‌آمیزی بشره با لوگل هسته به رنگ طلایی-زرد در می‌آید. در بزرگنمایی 40 میانگین قطر هسته را محاسبه کنید. (برای این منظور 10 هسته را انتخاب کنید.) و این بار میانگین درجات منطبق بر قطر هسته را در عدد کالیبره لنز 40 ضرب کنید. به همین ترتیب شما قادر خواهید بود قطر سلول‌های کروی مانند گلبول‌های قرمز یا گلبول‌های سفید را محاسبه کنید. با مقایسه اعداد به دست آمده با قطر طبیعی سلول‌ها برخی از بیماری‌های خونی ناشی از تغییر اندازه سلول‌های خونی را می‌توانید مشخص کنید.

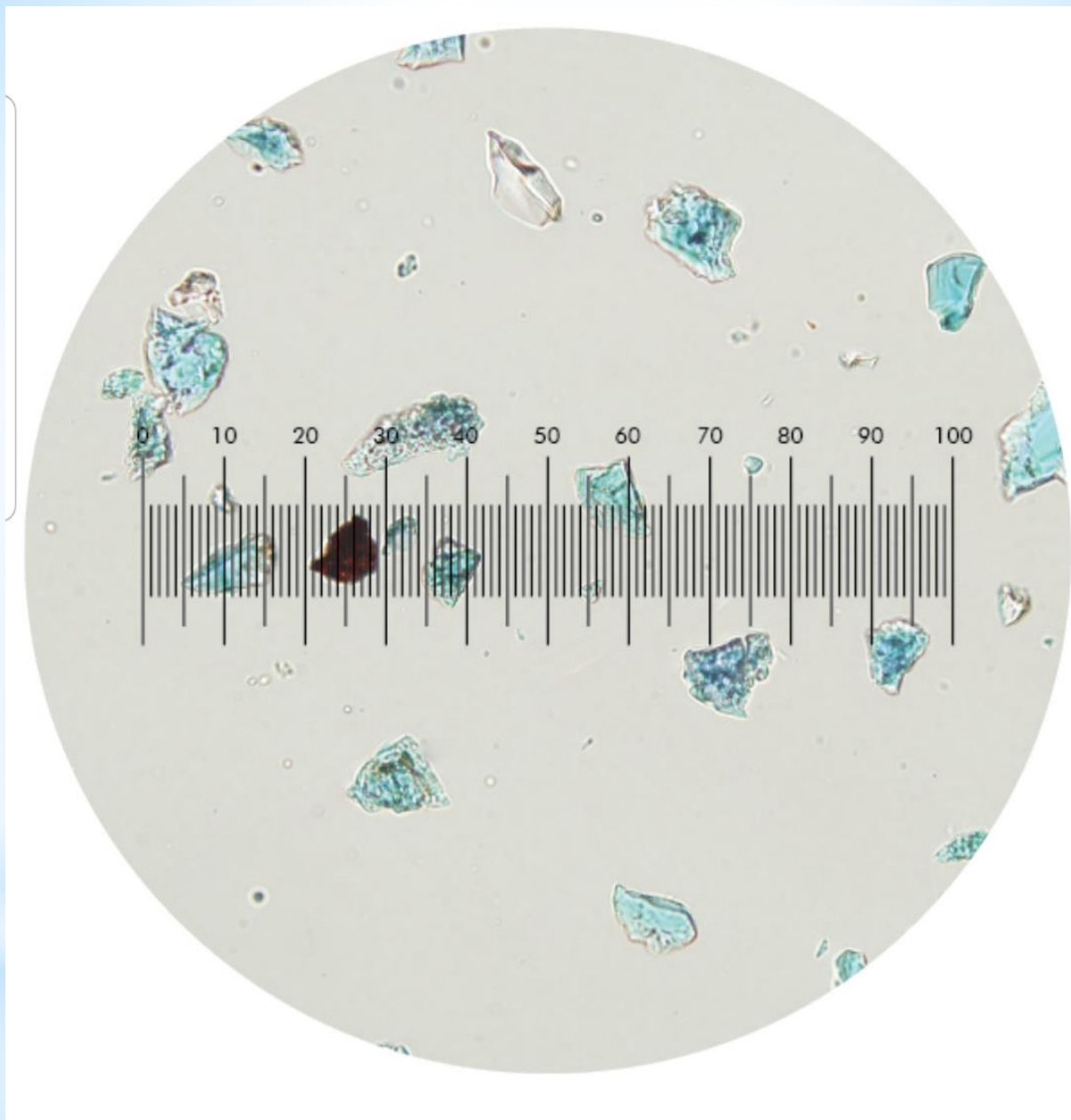




آزمایشگاه سلولی و



کاربردهای دیگر لام و اکولر مدرج در
اندازه گیری ابعاد نمونه های مختلف
میکروسکوپی



اندازه گیری طول سلول روزنه

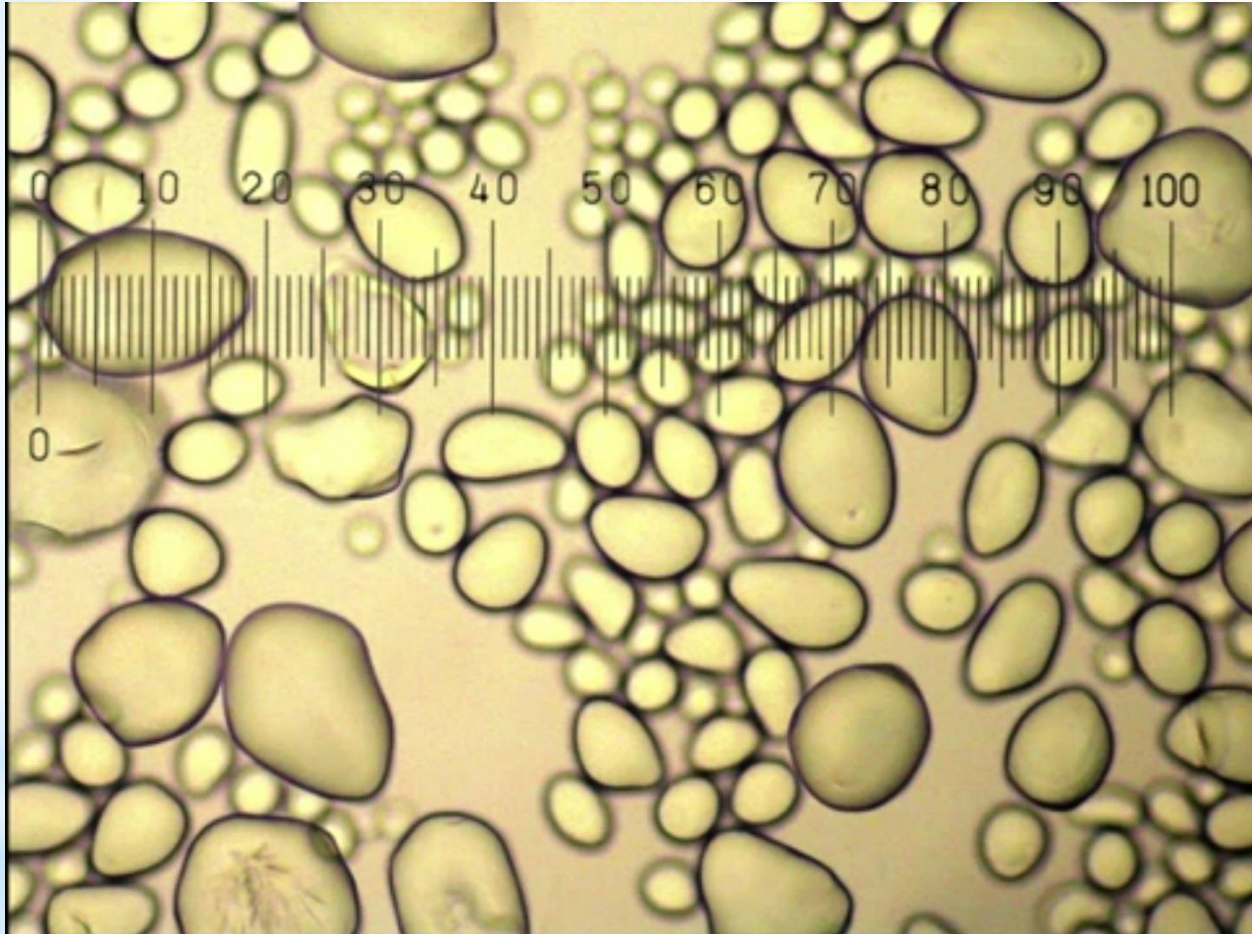


اندازه گیری عرض سلول روزنه





آزمایشگاه سلولی و



به سوالات زیر پاسخ
دهید:

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



اندازه‌گیری سطح میدان دید و کاربرد آن جهت مطالعه آزاد و تکمیل مطالب

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

محاسبه شعاع میدان دید و مساحت دایره به دست می‌آید.

موارد مهم استفاده تعیین سطح میدان دید

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

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

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