آشنایی با میکروسکوپ و رسم‌های علمی

برگردان‌کننده: فایقه شمس

آزمایش اول

اهداف آموزشی:

بعد از تکمیل نمودن این آزمایش شما قادر به انجام فعالیت‌های آتی خواهید بود:

۱. آماده ساختن نمونه‌ی مورد آزمایش برای مشاهده در میکروسکوپ.
۲. شناسایی قسمت‌هایی از میکروسکوپ و استفاده‌ی موثر از آن‌ها.
۳. توانایی ترسیم بیولوژیکی حجرات حیوانی و نباتی.
۴. تشریح سیکل (دوران) حجروی را.
۵. شناسایی مراحل میتوز از سلاید های آماده شده.
۶. با آزمایش نمودن ناحیه مایتوتیک، محاسبه‌ی یک نوک ریشه پیاز مدت زمان را که حجره در هر مرحله ای سیکل حجروی.

فعالیت اول: میکروسکوپ مرکب

نمودار ذیل بخش‌هایی از میکروسکوپ استریو مرکب را نشان می دهد. میکروسکوپ‌های مختلفی وجود دارند که برای انواع مختلفی از کاربردها مورد استفاده قرار می گیرند. انتخاب نمودن نوع میکروسکوپ به اندازه نمونه‌ی مورد آزمایش و شفافیت آن بستگی دارد. با استفاده از منبع نوری که از قسمت تحتانی می‌آید می‌توان اجسامی را که از خود اجازه عبور نور را می‌دهند، مانند عروس دریایی، مشاهده کرد. اما، اجسامی که از خود اجازه عبور نور را نمی‌دهند، مانند شبش، را باید با استفاده از نوری که از بالا بتابد، مشاهده کرد. این میکروسکوپ دارای منبع نوری تحتانی بوده و برای دیدن اشیای کوچک و شفاف مانند اجسام یک حجروی مناسب است. میکروسکوپ استریو دارای دو عدسیه می باشد که مشاهده‌کننده می‌تواند با استفاده از هر دو چشم اشیا را مشاهده کند. بنا بر این با این میکروسکوپ می‌توان تصویر را در سه بعد مشاهده کرد، بر خلاف تصویر های مسطح 2-D که با ابعاد یک‌پارچه مشاهده می‌شود. این میکروسکوپ دارای عدسیه چشم (ذره‌بین) با بزرگ‌نمایی 10X برابر کار می‌کند. این میکروسکوب، که میکروسکوب مرکب خوانده می‌شود. با عیار نمودن أن به 4X،10X، 40X، 100X اجسام را می‌توانیم به ترتیب به بزرگ‌نمایی 40X،400X،100X، 1000X مشاهده نماییم.

برای شروع آزمایش، بر روی نماد (شروع تور - start tour) کلیک کنید، در حین انجام تور، قسمت های میکروسکوپ را روی نمودار (شکل) ذیل علامت‌گذاری و مشاهده کنید. سپس مهارت‌های آموخته شده را به روی یک سلاید تمرین کنید. (۵ نمره)

بعد از این که با دامنه مجازی تمرین کردید، می‌توانید میکروسکوپ مرکب از راه دور RWSL را امتحان کنید، قبل از سلایدهای أماده شده، باید از طریق أموزش RWSL پیش بروید تا تمرین‌های زیر را انجام دهید.

مواد لازم برای آزمایش:

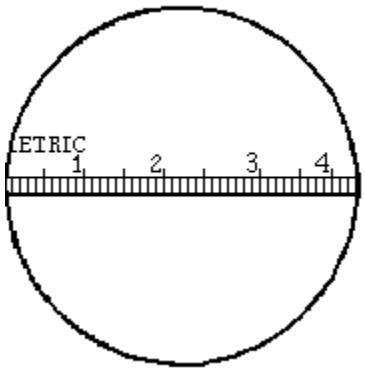
کاغذ سپید

پنسل

کمپیوتر (متوصل به ریموت میکروسکوپ)

طرز العمل:

۱. به ریموت میکروسکوپ وارد شوید.
۲. بزرگنما را به کوچکترین رقم (40X) تنظیم نمایید.
۳. با استفاده از مایکرومتر (خط کشی که در قسمت ناحیه مشاهده شما موجود است) عرض حرف ‘e’ را در هر سه بزرگنما اندازه نمایید.
۴. با استفاده از مایکرومتر عرض ناحیه دید را (لبه تا لبه ناحیه مشاهده) را در هر یک از سه بزرگنما محاسبه کنید.



a. با استفاده از کوچکترین بزرگنما (4X)، خط کش میلی متر را در مرکز ستیج قرار دهید تا مقیاس از طریق میکروسکوپ قابل مشاهده باشد.
b. 0 میلی متر را همراه خط عمودی با سمت چپ ناحیه‌ی دید دایره‌یی در یک ردیف قرار دهید.
c. تعداد میلی مترهای موجود از یک طرف ساحه (میدان) دید به طرف مقابل بشمارید. اگر قسمت سمت راست میدان (ساحه دید) با یکی از خطوط مطابقت نداشته باشد، باید کسری از ملی متر را تخمین بزنید. اطمینان حاصل کنید که کنار(لبه) خط کش در وسط میدان (ساحه) دید باشد، بنا بر این شما در حال اندازه‌گیری قطر کامل هستید.
d. اکنون بزرگنما را به (10X) تنظیم نمایید بعد همین ساحه دید را از (100X) تخمین بزنید.
e. بزرگنما را به (40X) تنظیم کنید. مشاهده خواهید کرد که ساحه (میدان) دید کمتر از ۱ میلی متر است. به جای اندازه‌گیری درست مستقیم، محاسبه‌ی قطر با معلدله ذیل دقیق تر است:

(Field of View 1) X (Magnification 1) = (F of View 2) X (Mag. 2)

جدول ۱: ساحه‌ی دید اندازه‌گیری

	mm µm
40X fieldof view	
100X fieldof view	
400X fieldof view	

دو سلاید برای شما وجود دارد که می توانید در میکروسکوپ آن را مشاهده و مطالعه نمایید که یکی از سلایدها با حرف e و دیگر آن با سه نخ رنگی همپوشانی دارد. از این سلایدها در پاسخ به سوالات ذیل استفاده نمایید.

۱. سلاید e در سمت راست روی ستیج قرار گرفته است. کدام جهت را تحت مطالعه و مشاهده قرار می‌دهید؟ (۱ نمره)
۲. ستیج را به سمت چپ عیار کنید. E به کدام روش حرکت می‌کند؟ اکنون ستیج را به سمت بالا راست و پایین عیار نموده و حرکتی را از طریق لنز مشاهده می کنید ضبط کنید. (۲نمره)
۳. سه موضوع (نخ) در یک سلاید قرار داده شده است که به ترتیب خاص با ها همپوشانی دارند. از (Fine focus) استفاده کنید تا مشخص شود کدام نخ در بالا، وسط و پایین قرار دارد. با استفاده از فوکس (یعنی فاصله کانونی لنز ها) جوانب و عمق های مختلف سلاید ها را مشاهده کنید. (۲ نمره)
۴.

فعالیت دوم: نقشه‌های بیولوژیکی

یکی از مهمترین مهارت‌هایی که یک زیست‌شناس باید داشته باشد، مشاهده‌ی دقیق و سپس برقراری ارتباط با آن چه که دیده است. نقشه‌های بیولوژیکی یک روش عالی برای تمرین هر دو مهارت است و چیزی خواهد بود که ما اغلب در آزمایشگاه‌های شما دوباره مورد بررسی قرار می دهیم. معیارهای خاص برای نقشه‌های بیولوژیک قابل قبول، تعیین شده است. قبل از انجام فعالیت‌های زیر از طریق پیوست A استاندردهای قبول شده را مرور کنید.

طرزالعمل:

آماده‌سازی نقشه‌های بیولوژیکی (۱۰ نمره برای ۲ نقشه که هر یک ۵ نمره)

1 - نقشه‌های بیولوژیکی مناسبی از حجرات حیوانی و حجرات نباتی را در اسلاید های تهیه شده برای میکروسکوپ از راه دور (ریموت میکروسکوپ) تهیه کنید.
2 - حتما نمودارهای خود را به روشی که در ضمیمه‌ی (Appendix A) توضیح داده شده است، برچسب‌گذاری کنید، از جمله بزرگنمایی واقعی که محاسبه می‌شود (می‌توانید از مایکرومتر یا اندازه‌گیری ساحه (میدان دید) خود محاسبه شده در فعالیت ۱ استفاده کنید).
3 - این نقشه‌ها از طریق ایمیل به مربی (استاد) شما ارسال خواهد شد.

فعالیت سوم: تهیه نمودن سلاید مرطوب و سلاید ثابت

تهیه سلاید مرطوب

اگر چه برخی از نمونه‌ها را می‌توان مستقیم در میکروسکوپ مشاهده و مطالعه کرد. بسیاری از نمونه‌ها وقتی مرطوب می‌گردند (قطره‌ی آب را روی سلاید می‌ریزیم) بهتر در میکروسکوپ مشاهده می‌گردند. آب به نگهداری و تقویت نمونه‌ی ما بیشتر کمک نموده و باعث می‌شود تا نور طور مساوی از بین سلاید ها، نمونه‌ها و لغزش پوشش عبور کند. سلایدهایی که به این روش أماده می‌شوند به نام سلایدهای مرطوب معروف اند. برای آماده ساختن یک سلاید مرطوب، نمونه‌ی خود را روی سلاید قرار دهید. با استفاده از قطره‌چکان، یک قطره آب را روی نمونه‌ی مورد آزمایش بریزید. یک کنار (لبه) از پوشش را روی کنار سلاید با زاویه ۴۵ درجه قرار دهید و به آرامی به قطره آب نزدیک شوید. هنگامی که کنار (لبه) پوشش نمونه را لمس کرد، آن را به دقت آهسته آهسته پایین برانید. هدف از این کار جلوگیری از ایجاد حباب های هوا در بین پوشش و سلاید نمونه است. انکسار نوری آب و هوا متفاوت است، اگر تحت پوشش که بالای سلاید نمونه قرار می‌گیرد هوا جا گزین شود دشوار خواهد بود تا آنچه را که شما دنبال آن هستید پیدا و مشاهده کنید. پوششی که بالای سلاید نمونه قرار می‌دهید آن را فشار ندهید، زیرا باعث آسیب و خراب شدن نمونه می‌گردد. برای نمایش ویدیویی این آزمایش (لینک) پیوند ذیل را دنبال کنید:

http://www.youtube.com/watch?v=HCQNyjl-iFQ

آب صرف باید فضای بین سلاید فوقانی (پوشش) و سلاید نمونه را پر کند. اگر آب به مقدار بیشتر موجود است و تحت پوشش شناور باشد با نگه داشتن لبه یا کنار حوله کاغذی در کنار لبه پوشش، مقداری آب آنرا بردارید. اگر آب خیلی کم وجود دارد و هنوز قسمت بخشی از فضای تحت پوشش هنوز هم خشک است با قرار دادن قطره‌یی درست در کنار خلال پوشش، آب بیشتری به آن اضافه کنید. یک تمرین کوچک به شما کمک می‌کند که یاد بگیرید تا چه مقدار آب اضافه کنید.

مواد لازم برای آزمایش:

سلاید و پوش سلاید

سواب پنبه‌یی گوش پاک‌کن

آب مقطر

دستمال کاغذی

طرزالعمل: سلاید مرطوب حجره گونه

۱: با استفاده از یک سلاید تمیز یک قطره آب مقطر را در وسط آن بریزید.

۲: با استفاده از سواب پنبه‌یی (گوش پاک‌کن) نوک Q و یا چوب خلال دندلن سطح داخلی دهن خود را یعنی از سمت عقب گونه‌ی خود را آهسته آهسته بتراشید تا سلول (حجره) جدا شود، طوری که باعث جرح یا زخم در سطح داخلی دهن تان نشود .

۳: انتهای خلال دندلن یا سواب پنبه‌یی را از دهن خویش خارج نموده و با آب مقطر روی سلاید آماده شده مخلوط کنید.تا حجراتی که در نوک سواب از دهن گرفته شده است، روی سلاید قرار بگیرند.

۴: کاور سلیپ یعنی پوشش روی سلاید را بالای سلاید آماده شده قرار دهید، ولی مواظب باشید که از روش شرح شده در بالا استفاده نمایید تا اطمینان حاصل گردد که هوا بین سلاید و پوشش جا نگرفته باشد.

۵: سلاید تهیه شده را در میکروسکوپ خویش قرار دهید با کوچکترین بزرگنما آغاز نموده و تا بزرگنمای x۱۰۰ نمونه را مشاهده نمایید. آیا می توانید سلول‌های گونه را به راحتی مشاهده کنید؟

ثابت نمودن و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها:

هنگام مشاهده‌ی نمونه‌ها، گاهی تشخیص دادن آن‌ها از محیطی که در آن قرار دارد، دشوار است. به طور مثال: یک حجره‌ی گونه بسیار شبیه به درپ پایه مرطوب دیده می‌شود. یک راه برای کمک به تجسم چنین نمونه‌یی، اضافه کردن یک رنگ به سلاید است. رنگ‌آمیزی باعث می شود نمونه‌های خاصی بیشتر قابل مشاهده باشند و به این ترتیب امکان مشاهده راحت‌تر مورفولوژی آن‌ها (مانند اندازه و شکل) فراهم می‌شود. در بعضی از موارد، از رنگ‌های خاص می‌توان برای تجسم ساختارهای سلولی خاص (فلاژلا، کپسول ها، آندسپور ها و غیره) استفاده کرد.
چندین روش رنگ‌آمیزی به طور معمول برای سلایدها به خصوص باکتری‌ها استفاده می‌شود.این روش‌ها ممکن است به صورت ۱: ساده یا غیر اختصاصی ۲: دیفرانسیل یا خاص، طبقه‌بندی شوند.

رنگ‌های ساده با تمام میکروب‌ها به روش یکسان عکس‌العمل نشان می‌دهند. آن‌ها صرف برای افزایش تضاد مفید استند، به طوری که می‌توان مورفولوژی، اندازه و ترتیب موجودات را تعیین کرد. از جانب دیگر، رنگ‌های افتراقی مرتبط به ارگانیسم تحت مطالعه نتایج متفاوتی می‌دهند. این نتایج در شناسایی نوع خاص باکتری مفید است.

رنگ‌ها به طور کلی نمکی هستند که در آن یکی از آیون‌ها رنگی است. به یاد داشته باشید که نمک ترکیبی است که از آیون دارای چارج مثبت و یک آیون با چارج(بار) منفی تشکیل شده است. به عنوان مثال، متلین رنگ آبی در حقیقت نمک کلرید آبی است. این ترکیب نمکی در آب از یک آیون آبی متلین با چارج (بار) مثبت (به رنگ آبی) و آیون کلراید با بار منفی (بی رنگ) جدا می‌شود. سایتوپلازم تمام حجرات باکتریایی چارج (بار) منفی کم دارند (در صورت خنثی بودن در محیط) به همین دلیل با رنگ‌های ساده رنگ خواهد شدند. برخی از نمونه‌های رنگ‌های ساده عبارتند اند از: کریستال بنفش، سافرانین، فوکسین ابتدایی و میتلین آبی.

هنگام رنگ آمیزی یک نمونه، معمولاً رنگ با ماتریس نمونه‌ی مرطوب یکجا می‌شود. متاسفانه، به طور کلی برای مشاهده‌ی حجرات پیش زمینه زباد وجود دارد (رنگ اضافی. بنا بر این شما باید رنگ اضافی را بردارید. شستن رنگ باعث از بین رفتن حجرات همراه با رنگ اضافی می‌شود. حجرات باید برای ثابت نگه داشتن رنگ پس زمینه ، روی سلاید ثابت شوند. روش ساده برای خشک کردن هوا است که به دنبال آن گرمازدگی (قرار دادن سلاید روی حرارت) انجام می‌شود. بعد از خشک نمودن سلاید ارگانیسم ها توسط هوا توسط شعله مشعل گاز ذریعه حرارت ثابت می‌گردند. حرارت پروتین های ارگانیسم ها را منعقد می کند و باعث می شود باکتری ها به سلاید بچسپند ، درست مثل پختن تخم مرغ در یک ماهیتابه.

ارگانیسم‌ها در هنگام ثابت کردن نباید بیش از حد گرم شوند و یا نمونه تحریف شود. تخم مرغ سرخ شده را به خاطر داشته باشید: وقتی تخم مرغ خام را روی ماهیتابه سرد قرار می دهید، شکل خاص دارد. شروع به گرم کردن آن و پروتین‌ها (البومین) موجود در سطح زیرین تخم مرغ رسوب داده و تخم مرغ را در تابه ثابت کنید. در این مرحله شکل لولیه تخم مرغ حفظ می شود و به تابه می چسپد. در صورت گرم نگه داشتن ماهیتابه، تخم مرغ سر انجام تغییر

می کند و پروتین‌ها با تغییر کامل شکل می‌گیرند تا اینکه سر انجام چیزی باقی نمی‌ماند. هدف این است که شکل نمونه‌ها حفظ شود، اما کافی است آن را به اندازه کافی برطرف کنید که به سلاید چسپیده باشد.

شما یک سلاید ماست طبیعی را که حاوی کلچر زنده باکتری است، فکس خواهید کرد. ممکن است شما با اصطلاحاتی مانند (پروبیوتیک) که شرکت های مواد غذایی برای تبلیغ ماست‌های خود به کار می‌برند، آشنا باشید. بسیاری از باکتری‌های یا بی‌ضرر استند یا در واقع به سلامتی ما مفید هستند، و کلچرهای موجود در ماست نمونه‌ی خوبی از چنین باکتری‌ها هستند.

مواد لازم برای آزمایش:

سلاید تهیه شده از حجرات گونه‌ها (طرزالعمل قبلی)

میتلین بلو

دستمال کاغذی

ماست با کلچر باکتری

شمع با حرارت کم (Tea light candle)

پوشش پلاستیکی

آب مقطر

طرزالعمل: ثابت نمودن نمونه‌ی مرطوب

۱: با استفاده از سلاید مرطوب حجره‌ی گونه‌ی خود که تهیه کرده اید، یک قطره‌ی کوچک از متلین بلو را در لبه ی کنار چپ سلاید بریزید.

۲: یک پارچه از کاغذ را در سمت راست سلاید خویش قرار دهید.

۳: شما حتما باید جذب شدن آب را توسط کاغذ در سلاید خود مشاهده نمایید؛ در ضمن باید قادر به دیدن نشر شدن میتلین بلو در نمونه‌ی خود باشید.

۴: پس از رنگ نمودن نمونه، آن را باید در مایکرسکوپ مشاهده کنید. رنگ میتلین بلو باید هسته‌ی حجرات گونه‌ها را رنگ نمایید. حجرات در مایکرسکوپ مانند یک تخم مرغ سرخ شده با زرده آبی معلوم خواهد شد (زرده)، هسته حجره است.

طرزالعمل: ثابت نمودن با حرارت و رنگ نمودن نمونه (۱۰ نمره)

۱: یک اسمیر نازک از ماست را با استفاده از تیغ بالای سلاید تمیز آماده کنید (از آب استفاده نکنید).

۲: نمونه را بالای تمام سلاید منتشر و فلم نازک از آن تهیه کنبد.

۳: اجازه دهید نمونه به طور کامل خشک شود.

۴: سلاید را به سرعت از بالای آتش شمع به سرعت ۳-۴ بار عبور دهید.

۵: اگر کنارهای سلاید بعد از حرارت تغییر رنگ، به رنگ قهوه‌یی نماید، یعنی سلاید را بیش از حد حرارت داده اید. با استفاده از یک سلاید تمیز پروسیجر را دوباره از سر انجام دهید.

۶: اسمیر را با میتلین بلو بپوشانید.

۷: اجازه دهید رنگ حدود ۱ دقیقه روی اسمیر باقی بماند. (توجه داشته باشید که زمان رنگ‌آمیزی بسیار مهم نیست. در جایی بین ۳۰ ثانیه و ۲ دقیقه باید رنگ قابل قبول به شما بدهد. هر چه مدت زمان طولانی‌تر رنگ را رها کنید (به طور کلی رنگ تیره تر است).

۸: رنگ اضافی را با استفاده از آب مقطر شستشو کنید. با ریختاندن یک جریان ملایم آب بالای سلاید به آرامی میتلین اضافی را از سطح سلاید بشویید. هر رنگی که در قسمت پایین سلاید قرار دارد را بشویید.

۹: رنگ‌های اضافی را با استفاده از کاغذ جاذب از بین ببرید. سلاید را با کاغذ مالش ندهید، بلکه سلاید را در بین در صفه کاغذ قرار دهید و به آرامی فشار دهید. کاغذ رنگ اضافی را جذب می‌کند. بگذارید تا سلاید کاملا خشک شود.

۱۰: این سلاید از طریق نامه به مربی تان ارسال خواهد شد تا بعدا در میکروسکوپ RWSL مشاهده شود. آن را در بسته بندی پلاستیکی بپیچید و آن را در پاکت تهیه شده قرار دهید.

سوالات بحث:

!: چرا رنگ‌ها در میکروسکوپ استفاده می شوند؟ ۲ نمره

۲: شکل و ظاهر حجرات گونه را با میتلین بلو و بدون میتلین بلو شرح دهید. ۲ نمره

۳: به نظر خود تان شیمی چگونگی برداشت رنگ میتلین بلو را در نسج حجرات را توضیح دهید.

به نظر شما ایا شکل حجرات به اثر رنگ تغییر نموده است یا خیر؟ ۴ نمره

ماخذ:

6th Ed. Courtenay: ، *Principles of modern Biology*، C. (2005). *Laboratory manual for Bio 102*،Hodgson North Island College.

Third Edition. St. Louis: Mosby-Year Book Inc. ، R. a. (1992). *Biology*،Johnson

from ، 2009، 01 08). *Simple Stains: Direct and Indirect Staining*. Retrieved 09 30، T. P. (2001،University ENVE 301: Environmental Microbiology Laboratory: http://www.personal.psu.edu/faculty/k/h/khb4/enve301/301labs/Lab2_Simple