مقدمه مؤلفین

سپاس و ستایش مخصوص خدایی است که زیبایی‌های آفرینش را برای ما انتخاب کرد و بهره‌ای از معرفت خود را به ما ارزانی فرمود و برخی از درهای نامتناهی علم به ربوبیتش را به سوی ما گشود. مطالعات گسترده چند دهه گذشته در کشف فرایندهای مولکولی درون و برون سلولی موجودات زنده سبب افزایش دانش شده و تلاش جهت تقلید از این فرایندها در محیط آزمایشگاهی سبب تحول در علوم و فناوری‌های مختلف گردیده است. حاصل این دستاوردها، انقلابی را در زمینه زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) ایجاد نموده است به نحوی که قرن حاضر را عصر تسخیر فناوری‌های مولکولی، نوترکیبی DNA (مهندسی ژنتیک) و سایر علوم و فناوری‌های کلیدی چون نانوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی نامیده‌اند. به جرأت می‌توان گفت روش‌های مولکولی با گذشت نزدیک به سه دهه از ابداعشان، مرزهای دانشی موجود را در هم نوردیده و امروزه جزو پایه‌های مهم تشخیص در علوم پزشکی قرار گرفته‌اند. جهت آموزش‌های پژوهش محور و بسط این روش‌ها، مراکز علمی به متون و کتاب‌هایی نیاز دارند که دربرگیرنده ابتدایی‌ترین مفاهیم تا پیچیده‌ترین آن‌ها بوده و سلسله مباحث در آنها به گونه‌ای ارائه شود که ضمن افزایش دانش نظری مخاطب به کسب مهارت‌های عملی او کمک نماید.

این کتاب با توجه به ضرورت آشنایی محققین و دانشجویان مقاطع مختلف تحصیلی در رشته‌های علوم زیستی و پزشکی، مانند میکرب‌شناسی، ایمنی‌شناسی، بیوشیمی، سلولی و مولکولی، پزشکی، داروسازی، ژنتیک، دامپزشکی، کشاورزی و علوم گیاهی با اصول اولیهٔ و پیشرفته تکنیک‌های سلولی و مولکولی به نحوی ساده و قابل فهم توسط مؤلفین نگاشته شد.

در نگارش این کتاب روش‌های متنوع مولکولی و سلولی با تفکیک موضوعی مورد بحث قرار گرفته و مطالب کلیدی و اصلی به صورت ایجاز ارائه گردیده است و در ارائه مطالب سعی شده است که با استفاده از تصاویر گویا درک مطالب تسهیل گردد.

پیشاپیش از کلیه اندیشمندانی که ضمن ارائه نظرات سازنده خود ما در جهت رفع نواقص و خطاهای احتمالی موجود در کتاب یاری نموده، زمینه ارتقاء آن را در چاپ‌های بعدی فراهم می‌نمایند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

با تشکر مؤلفین

behroozjohari@yahoo.com

فهرست

بخش اول. تکنیک‌های آزمایشگاهی سلولی

فصل اول: میکروسکوپ نوری Error! Bookmark not defined.

مقدمه ۱۴
۱- انواع میکروسکوپ نوری ۱۴
۱-۱ میکروسکوپ نوری ۱۵
۱-۱-۱- میکروسکوپ زمینه روشن ۱۵
۱-۱-۲ میکروسکوپ زمینه تاریک ۱۵
۱-۱-۳ میکروسکوپ فاز متضاد (فاز کنتراست) ۱۵
میکروسکوپ فلورسانس ۱۵
۲- اجزاء یک میکروسکوپ ۱۶
۲-۱ بخش چشمی ۱۷
۲-۲ لوله میکروسکوپ ۱۷
۲-۳ Nose-piece ۱۷
۲-۴ عدسی‌های شیئی ۱۸
۲-۵ صفحه مکانیکی ۱۸
۲-۶ کاندنسور ۱۸
۲-۷ آینهٔ دو طرفه ۱۹
۲-۸ منابع نوری داخلی ۱۹
۲-۹ فیلترها ۱۹
۲-۱۰ پیچ‌های بزرگ و کوچک برای متمرکز کردن ۲۰
۲-۱۱ لامپ هالوژن ۲۰
۳- روغن ایمرسیون ۲۰
۴- کارکرد میکروسکوپ ۲۰
۴-۱ کار کردن با میکروسکوپ ۲۱
۵- مراقبت از میکروسکوپ ۲۳
۵-۱ نکته اساسی در مراقبت از میکروسکوپ ۲۴
۵-۲ مایع تمیز کننده لنزها ۲۴
۵-۳ کاغذ لنز ۲۴
۵-۴ فیوز و لامپ‌های نور ۲۴
۵-۵ برس هوا ۲۴
کاور میکروسکوپ ۲۴
۵-۶ عوامل خشک کننده ۲۵
۶- رشد قارچ‌ها بر روی میکروسکوپ ۲۵
فاکتورهای تسهیل کننده رشد قارچ ۲۵
چگونه از رشد قارچ پیشگیری کنیم؟ ۲۵
روش جایگزین ۲۵
۷- کار کردن صحیح با میکروسکوپ ۲۶

فصل دوم: میکروسکوپ الکترونی ۲۸

مقدمه ۲۸
روش‌های استفاده ۳۲
میکروسکوپ الکترونی گذاره *(TEM)* ۳۲
آماده‌سازی متعارف نمونه برای *TEM* ۳۲
فیکس کردن ۳۲
هدف اولیه از فیکس کردن نمونه ۳۲
آبگیری، فیلتراسیون و فرونشاندن ۳۳
مقطع گیری و رنگ‌آمیزی ۳۳
آماده‌سازی نمونه مایکروویو ۳۴
رنگ‌آمیزی منفی ۳۴
برچسب‌گذاری ایمنی ۳۴
توپوگرافی الکترونی (ET) ۳۵
EFTEM ۳۶
کاربردهای TEM ۳۷
میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۳۷
SEM معمول ۳۷
میکروسکوپ الکترونی نگاره محیطی (ESEM) ۳۸

فصل سوم: کشت سلولی ۳۹

مقدمه ۳۹
کشت اولیه ۳۹
رده سلولی ۳۹
نژاد سلولی ۳۹
رده سلولی محدود در برابر رده سلولی پیوسته ۳۹
شرایط کشت ۴۰
محافظت سرمایی ۴۰
مرفولوژی سلول‌ها در کشت ۴۰
کاربردهای کشت سلولی ۴۱
تجهیزات کشت سلول ۴۱
تجهیزات و وسایل اصلی و پایه‌ای ۴۱
آزمایشگاه کشت سلول ۴۲

منطقه کاری ضدعفونی ۴۲
هود کشت سلولی ۴۲
انواع کلاس هودهای کشت سلولی ۴۲
کلاس I: ۴۲
کلاس II: ۴۲
کلاس III: ۴۲
ویژگی‌های جریان هوا در هودهای کشت سلولی ۴۲
طراحی هود کشت سلولی ۴۳
انکوباتور ۴۴
انواع انکوباتورها ۴۴
ذخیره‌سازی ۴۴
یخچال‌ها ۴۴
فریزرها ۴۵
نگهداری و ذخیره‌سازی با استفاده از سرما ۴۵
شمارنده سلول ۴۵
تکنیک‌های ضدعفونی ۴۶
منطقه کاری استریل ۴۶
بهداشت فردی مناسب ۴۶
مواد استریل و محیط‌های کشت ۴۶
کار کردن در شرایط ضدعفونی ۴۷
لیست تکنیک‌های ضدعفونی ۴۷
منطقه کاری ۴۷
بهداشت فردی ۴۷
واکنشگرها و محیط‌های کشت ۴۸
کار کردن ۴۸
آلودگی بیولوژیک ۴۸
باکتری‌ها ۴۸
مخمرها ۴۹
قارچ‌ها ۵۰
ویروس‌ها ۵۰
مایکوپلاسما ۵۱
آلودگی‌های متقاطع ۵۱
استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ۵۲
مبانی کشت سلول ۵۲
رده‌های سلولی ۵۲
انتخاب رده سلولی مناسب ۵۲
دیگر معیارها ۵۳
به دست آوردن رده‌های سلولی ۵۳
شرایط محیط کشت ۵۳
کشت چسبنده در برابر سوسپانسیون ۵۳
محیط‌های کشت ۵۴
محیط‌های پایه ۵۴
محیط‌هایی با سرم کم ۵۴
محیط‌های فاقد سرم ۵۴
PH ۵۵
CO_2 ۵۶
دما ۵۶
مرفولوژی سلولی ۵۷
سلول‌های پستانداران ۵۷
تنوع در مرفولوژی سلول پستانداران ۵۷
مرفولوژی سلول‌های ۲۹۳ ۵۷
سلول‌های حشرات ۵۷
مرفولوژی سلول‌های *SF21* ۵۷
مرفولوژی سلول‌های *SF9* ۵۹
خطوط راهنمای نگهداری سلول‌های کشت شده ۶۰
ساب کالچر چیست؟ ۶۰
چه موقع ساب کالچر انجام می‌شود؟ ۶۲
تراکم سلولی ۶۲
سلول‌های پستانداران ۶۲
سلول‌های حشرات ۶۲
اتمام محیط کشت ۶۳
سلول‌های پستانداران ۶۳
سلول‌های حشرات ۶۳
برنامه (جدول) Subculture ۶۳
محیط‌های توصیه شده ۶۳
کشت سلول یوکاریوت ۶۶
جدا کردن سلول‌های چسبنده ۶۶
آنزیم‌های جدا کننده TypLE™ ۶۶
پاساژ دادن سلول‌های چسبنده ۶۷
مواد مورد نیاز ۶۷
پروتکل برای پاساژ دادن سلول‌های چسبنده ۶۷
نکاتی درباره پاساژ دادن سلول‌ها چسبنده حشرات ۶۸
پاساژ دادن سلول‌های سوسپانسیون ۶۹
ظروف کشت سوسپانسیون ۶۹
مواد مورد نیاز کشت سوسپانسیون ۷۰
پروتکل پاساژ دادن سلول‌های سوسپانسیون ۷۰

رشد سلول‌ها در فلاسک‌های لرزان ۷۰
رشد سلول‌ها در فلاسک‌های همزن‌دار ۷۱
نکاتی درباره پاساژ دادن سلول‌های سوسپانسیون حشرات ۷۲
منجمد کردن سلول‌ها ۷۳
محافظت سرمایی ۷۳
راهنمای محافظت سرمایی ۷۳
محیط کشت انجمادی ۷۴
پروتکل برای محافظت سرمایی سلول‌ها ۷۵
ذوب کردن سلول‌های فریز شده ۷۵
راهنمای ذوب کردن ۷۵
پروتکل برای ذوب کردن سلول‌های فریز شده ۷۶
پروتکل شمارش سلول‌ها ۷۶
شمارش سلول‌ها با استفاده از هموسایتومتر ۷۶
رنگ‌آمیزی تریپان آبی ۷۷

فصل چهارم: ایمنوهیستوشیمی ۷۸

آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها ۷۸
ساختار آنتی‌بادی ۷۸
میانکنش‌های Ag-Ab ۸۰
آنتی‌ژن‌ها (Ags) ۸۱
انتخاب ایمونوژن ۸۱
آنتی‌بادی منوکلونال و پلی کلونال ۸۱
Ab های منوکلونال ۸۳
Tissue Microarrays ۸۳
فواید روش Tissue microarrays ۸۳
تثبیت کردن ۸۵
فرمالدهید و فیکساتیوهایی که موجب اتصال متقاطع می‌شوند ۸۵
تأثیر فیکس کردن بر واکنش‌پذیری ایمنولوژیک Ag ها ۸۷
فیکساتیوهای دیگر ۸۷
پردازش بافت و انکوباسیون بافرها ۸۸
بازیابی Ag ۸۸
AR با آنزیم ۸۹
بازیابی اپی توپ القا شده با حرارت ۸۹
سیستم‌های تشخیصی ۹۰
روش‌های مستقیم ۹۱
روش‌های غیرمستقیم ۹۱
روش آویدین- بیوتین ۹۲
روش پراکسیداز- آنتی پراکسیداز (PAP) ۹۳
روش دو مرحله‌ای لیبل کردن پلیمری ۹۴
روش تکثیر Tyramine ۹۴
ابعاد دیگر واکنش‌های ایمنوهیستوشیمی ۹۶
سیستم‌های تشخیص پلی والانت ۹۶
افزایش حساسیت تشخیص Ag ۹۶
شناسایی چند Ag در یک برش بافتی ۹۶
IHC بر روی بافت‌های موش ۹۷
رنگ واکنش Ag-Ab ۹۷
علل رنگ پس زمینه در ایمنوهیستوشیمی ۹۸
فعالیت پرواکسیداز اندوژن ۹۸
آلکالین فسفاتاز اندوژن ۹۹
آویدین و بیوتین به عنوان منبع رنگ پس زمینه ۹۹
آلدهیدهای آزاد ۹۹
رسپتورهای FC ۱۰۰
پیگمان‌ها ۱۰۰

فصل پنجم: فلوسایتومتری ۱۰۱

اجزای دستگاه فلوسایتومتری ۱۰۲
۱) سیستم جریان مایع ۱۰۲
۲) سیستم نوری ۱۰۳
۳) پردازش سیگنال ۱۰۴
جداسازی الکترواستاتیک سلول‌ها ۱۰۵
مبانی فلورسانس ۱۰۵
فلوروکروم‌ها ۱۰۷
آماده‌سازی نمونه برای فلوسایتومتری ۱۰۷
مزایای سیستم فلوسایتومتری بر سایر روش‌های اندازه‌گیری فلوروسانس ۱۰۷
آنالیز داده‌ها ۱۰۸
لکه‌گذاری سطح سلول ۱۰۸
لکه‌گذاری آنتی‌ژن‌های داخل سلولی ۱۰۹
قابلیت‌های فلوسایتومتری ۱۰۹
تعیین ویژگی فنوتایپی سلول‌های خونی ۱۰۹
اندازه‌گیری شناساگرهای آپوپتوز ۱۰۹
شناسایی سایتوکاین‌های بین سلولی ۱۱۰
موارد استفاده از فلوسایتومتری در علوم پزشکی ۱۱۰

کنترل کیفی ۱۱۰

بخش دوم. تکنیک‌های آزمایشگاه مولکولی

فصل ششم: روش‌های جداسازی RNA، DNA و پروتئین ۱۱۲
مراحل استخراج RNA و DNA ۱۱۲
شکستن سلول ۱۱۲
رسوب دادن DNA و RNA ۱۱۲
جدا کردن *DNA* و *RNA* ۱۱۲
رسوب پروتئین‌ها ۱۱۲
جدا کردن DNA و RNA از یکدیگر ۱۱۳
بررسی وجود DNA و RNA در محلول ۱۱۳
جداسازی قطعات ۱۱۳
سانتریفیوژ منطقه‌ای با دور بالا ۱۱۳
الکتروفورز ۱۱۳
ژل پلی آکریلامید ۱۱۴
ژل آگارز ۱۱۵
تکنیک SDS PAGE ۱۱۶
الکتروفورز در میدان الکتریکی ضربان‌دار ۱۱۶
الکتروفورز با ژل پالس فیلد(PFGE) ۱۱۷
ایزوالکتروفوکوسینگ ۱۱۷
الکتروفورز دوبعدی ۱۱۷
الکتروفورز ریزتراشه ۱۱۸
سانتریفیوژ ۱۱۸
تکنیک ته نشین سازی تعادلی ۱۲۰
دیالیز (تراکافت) ۱۲۰
کروماتوگرافی ۱۲۰
انواع کروماتوگرافی ۱۲۱
۱ -کروماتوگرافی مایع – جامد ۱۲۱
۲ -کروماتوگرافی گاز – جامد ۱۲۱
۳ -کروماتوگرافی مایع – مایع ۱۲۱
۴ -کروماتوگرافی گاز- مایع ۱۲۱
کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی ۱۲۱
کروماتوگرافی تعویض یونی ۱۲۲
کروماتوگرافی تمایلی ۱۲۲
کروماتوگرافی مایع تحت فشار بالا کروماتوگرافی HPLC ۱۲۴
عرضه نمونه‌ها ۱۲۴
کروماتوگرافی مایع فاز معکوس ۱۲۵
کروماتوگرافی کایرال ۱۲۵
طیف‌سنجی جرمی ۱۲۵
اصول اسپکتروفتومتری جرمی ۱۲۶
ساختار شماتیک یک طیف‌سنج جرمی ۱۲۶
چند روش یونیزاسیون در طیف‌سنجی جرمی ۱۲۷
تعیین جرم دقیق یک پروتئین با طیف‌سنجی جرمی ۱۲۷
اصول MALDI ۱۲۸

فصل هفتم: تکنیک‌های تعیین توالی ۱۳۰
روش سانگر ۱۳۰
روش ماکسام-گیلبرت ۱۳۱
پایروسکوئنسینگ ۱۳۲
تعیین توالی شات گان ۱۳۳
تکنیک توالی‌یابی شات گان سلسله مراتبی ۱۳۵
مکانیسم تعیین توالی شات گان ۱۳۶
موقعیت برچسب ۱۳۶
استراتژی برچسب‌گذاری برای تعیین توالی DNA سانگر ۱۳۷
سیستم آشکارسازی کمی لومینسانس ۱۳۸
رنگ‌های انتقال انرژی ۱۳۸
پلیمرازهای مورد استفاده تعیین توالی ۱۳۸
وکتورهای کلونینگ برای تعیین توالی DNA ۱۳۹
وکتور فاژی تک رشته‌ای ۱۳۹
وکتورهای پلاسمیدی دو رشته‌ای ۱۳۹
وکتورهای فاژمید ۱۳۹

فصل هشتم: ریزآرایه ۱۴۱
مقدمه ۱۴۱
استخراج و خارج کردن نمونه‌های RNA ۱۴۱
ریزآرایه‌ی پروتئین ۱۴۳
کاربردهای رایج ریزآرایه پروتئین ۱۴۳
شیمی سطوح ریزآرایه پروتئین‌ها و طرح‌های باند شدن ۱۴۴

ریزآرایه با استفاده از سطوح شیشه‌ای ۱۴۶
استخراج RNA از اسکارهای بافتی ۱۴۶
هیبرید کردن ۱۴۶
منابع DNA الگو ۱۴۷
بررسی بیان ژن‌ها ۱۴۷

فصل نهم: تکنیک‌های PCR ۱۴۸
مقدمه ۱۴۸
عناصر اساسی مخلوط واکنش PCR ۱۵۰
کاربردهای کلی PCR ۱۵۱
ARMS PCR ۱۵۲
اصول طراحی پرایمر ۱۵۳
تکنیک RT-PCR ۱۵۴
RT-PCR استاندارد ۱۵۴
RT-PCR کمی ونیمه کمی ۱۵۴
RT-PCR نیمه کمی ۱۵۴
روش PCR/OLA ۱۵۴
کلون کردن انتهای cDNA با PCR ۱۵۵
تکثیر cDNA ۱۵۵
تعریف و مفهوم Real Time PCR ۱۵۵
مزایای روش Real -Time PCR ۱۵۶
امکان قطع واکنش در زمان دلخواه ۱۵۶
کاربردهای Real Time PCR ۱۵۶
انواع رنگ‌های مورد استفاده در Real Time PCR ۱۵۷
تکنیک Real Time PCR به روش Non spesefic for mat ۱۵۸
آشکارسازی شیمی مورد استفاده در Real Time PCR ۱۵۹
انجام یک آزمایش Real -Time RTPCR ۱۶۶
منحنی‌های استاندارد ۱۶۷
آستانه ۱۶۸
تاریخچه آشکارسازی اسید نوکلئیک و تعیین مقدار کردن آن ۱۶۸
تکنیک Real –Time RT PCR ۱۷۰
طراحی پرایمر ۱۷۰
No Reverse Transcriptase Control ۱۷۱
کنترل مثبت ۱۷۱
تعیین مقدارکردن داده‌ها ۱۷۱
تعیین مقدار کردن نسبی Relative quantification ۱۷۲
جدا کردن RNA از نمونه بافتی ۱۷۳
طراحی پرایمر به صورت مرحله به مرحله ۱۷۳
β-اکتین برای ارزیابی تعیین مقدار cDNA ۱۷۳
بهینه کردن پرایمر ۱۷۴
تعیین مقدار دقیق بیان ژن ۱۷۴
تعیین مقدار نسبی ژن ۱۷۵

فصل دهم: بلاتینگ و تکنیک‌های تشخیصی ایمنولوژی ۱۷۷
مقدمه ۱۷۷
فواید تکنیک مستقیم ۱۷۸
مضرات تکنیک مستقیم ۱۷۸
فواید تکنیک غیرمستقیم ۱۷۸
مضرات تکنیک غیرمستقیم ۱۷۸
محدودیت‌های بلاتینگ ۱۷۹
تکنیک DOT BLOT ۱۷۹
استفاده رایج و تکنولوژی‌های جدید ۱۸۰
Eeastern blot ۱۸۰
Far –Westhern Blot ۱۸۰
نورتووسترن بلات ۱۸۰
الایزا ۱۸۱
الایزای مستقیم ۱۸۲
پروتکل ۱۸۲
محاسن ۱۸۲
معایب ۱۸۲
روش کار ۱۸۲
الایزای غیرمستقیم ۱۸۲
پروتکل ۱۸۲
محاسن ۱۸۲
معایب ۱۸۲
روش کار ۱۸۲
الایزای ساندویچی ۱۸۴
پروتوکل الایزا ۱۸۴
میکروسکوپ ۱۸۵
میکروسکوپ ایمنوفلورسانت ۱۸۵

میکروسکوپ الکترونی ایمنوسوربنت ۱۸۵

فصل یازدهم: کلونینگ ژن‌ها و مهندسی ژنتیک ۱۸۶

وکتورهای کلونینگ ژن: پلاسمیدها و باکتریوفاژها ۱۸۶
پلاسمیدها ۱۸۶
گروه‌بندی پلاسمیدها ۱۸۷
اندازه و تعداد کپی ۱۹۰
کونژوگاسیون و سازگاری ۱۹۰
پلاسمیدها در موجوداتی غیر از باکتری‌ها ۱۹۱
باکتریوفاژها ۱۹۲
چرخه آلوده‌کنندگی فاژ ۱۹۲
چرخه لیتیک ۱۹۴
فاژهای لیزوژن ۱۹۲
سازماندهی ژنی در مولکول DNA فاژ لامبدا ۱۹۴
اشکال خطی و حلقوی فاژ لامبدا ۱۹۵
M13، یک فاژ رشته‌ای ۱۹۷
وکتورها در تکنیک نمایش فاژی ۱۹۷
خالص‌سازی DNA از سلول‌های زنده ۲۰۱
تهیه کل DNA سلول ۲۰۱
خالص‌سازی DNA از عصاره سلولی ۲۰۲
استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص DNA از عصاره سلولی ۲۰۲
خارج کردن آلودگی‌ها با استفاده از حلال‌های آلی و هضم آنزیمی ۲۰۳
استفاده از سیلیکا برای تخلیص DNA از عصاره سلولی ۲۰۳
تهیه DNA پلاسمیدی ۲۰۷
جداسازی بر اساس ساختار فضایی ۲۰۷
نوکلئازها ۲۰۷
لیگازها ۲۰۸
پلیمرازها ۲۰۸
آنزیم‌های تغییر دهنده DNA ۲۰۸
اندونوکلئازهای محدودالاثر (Restriction Enzyme) ۲۰۹
اندونوکلئازهای محدودالاثر نوع II ۲۱۰
نحوه عملکرد آنزیم DNA لیگاز ۲۱۱
انتهاهای چسبنده ۲۱۱
قرار دادن انتهاهای چسبنده روی مولکول با انتهای تراز ۲۱۱
وارد کردن DNA به درون سلول‌های زنده ۲۱۲
برداشت DNA توسط سلول باکتریایی یا همان ترانسفورم کردن (Transformation) ۲۱۳
شناسایی سلول‌های حاوی DNA نوترکیب ۲۱۴
مثالی در مورد غیرفعال سازی الحاقی یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ۲۱۵
غیرفعال سازی الحاقی با وکتور pUC8 ..... ۲۱۵
کلونینگ با وکتور pUC8 ..... ۲۱۶
وارد کردن DNA فاژی به درون سلول باکتری ۲۱۷
بررسی کلونی‌های آلوده به فاژ روی محیط آگار ۲۱۸
غیرفعال سازی الحاقی ژن cI فاژ λ ۲۱۹
انتخاب با استفاده از فنو تیپ Spi ۲۱۹
انتخاب بر اساس اندازه ژنوم λ ۲۲۰
ترانسفورم کردن سلول‌های خاص ۲۲۰
ترانسفورم کردن گیاهان و جانوران ۲۲۰
وکتورهای کلونینگ بر اساس پلاسمیدهای E.coli ۲۲۱
وکتور pBR327 ..... ۲۲۳
pUC8 پلاسمیدی با شاخص انتخابی Lac ۲۲۳
pGEM3Z – رونوشت بردار DNA کلون شده در invitro ۲۲۳
وکتورهای کلونینگ بر اساس باکتریوفاژ M13 ..... ۲۲۳
M13 ..... ۲۲۳
وکتورهای دورگه پلاسمید و فاژ M13 ..... ۲۲۴
وکتورهای کلونینگ بر اساس باکتریوفاژ λ ۲۲۴
۱-وکتورهای الحاقی ۲۲۵
۲-وکتورهای جایگزینی ۲۲۵
کاسمید ۲۲۵
وکتورهای کلونینگ برای یوکاریوت‌ها ۲۲۷
وکتورهایی برای مخمر و دیگر قارچ‌ها ۲۲۷
انواع دیگر وکتورهای کلونینگ مخمر ۲۲۸
وکتورهای کلونینگ برای گیاهان عالی ۲۳۰
کلونینگ ژن‌ها در گیاهان با انتقال مستقیم ژن ۲۳۱
وکتورهای کلونینگ در جانوران ۲۳۲
وکتورهای کلونینگ در حشرات ۲۳۲
وکتورهای کلونینگ بر اساس ویروس‌های حشرات ۲۳۲
کلونینگ در پستانداران ۲۳۴
استفاده از وکتورهای ویروسی ۲۳۴
کلونینگ ژن بدون وکتور ۲۳۶

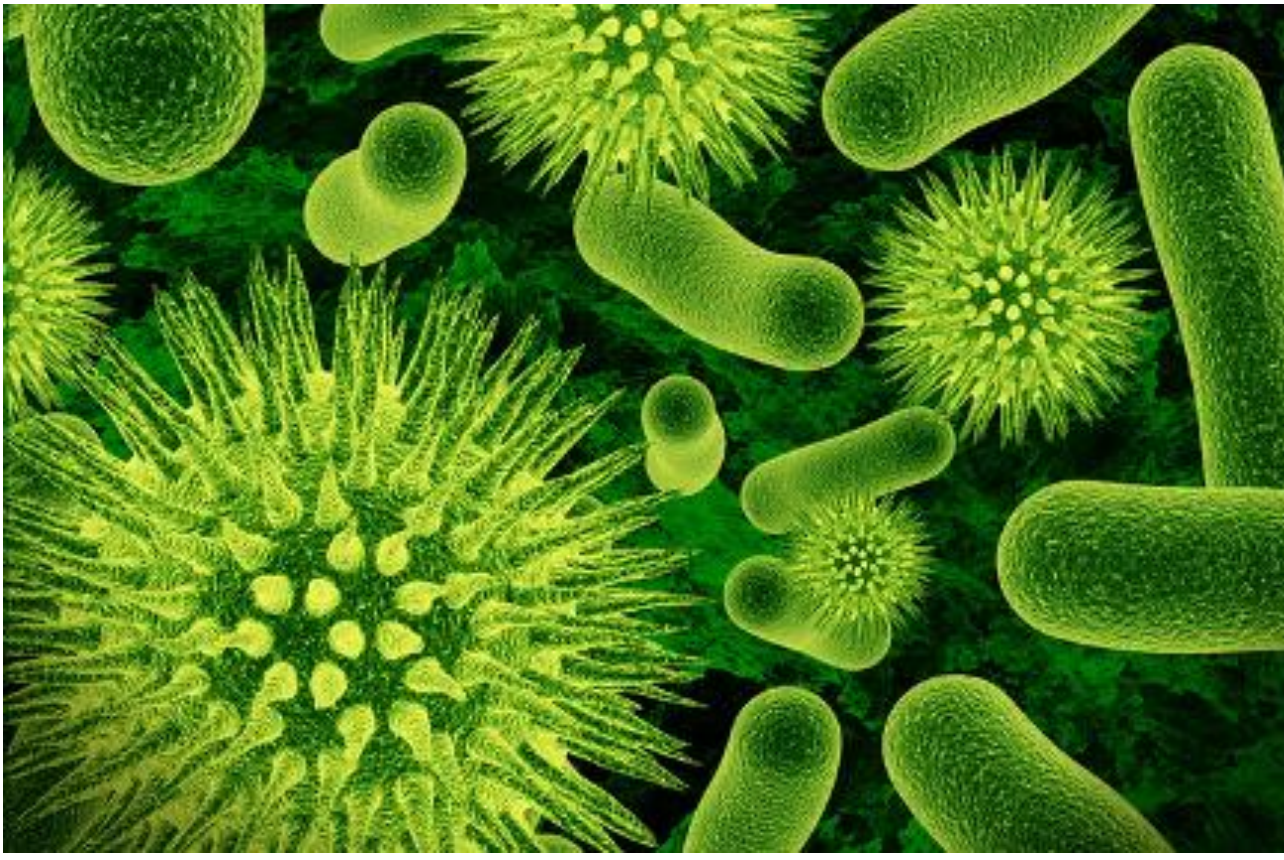
به دست آوردن کلون از یک ژن خاص ۲۳۶
انتخاب مستقیم..... ۲۳۸
شناسایی یک کلون از کتابخانه ژنی ۲۳۸
کتابخانه‌های ژنی..... ۲۳۹
روش‌هایی برای شناسایی کلون‌ها..... ۲۳۹

فصل دوازدهم: مطالعه بیان و عملکرد ژن ۲۴۰
مطالعه رونوشت RNA یک ژن..... ۲۴۰
تعیین حضور رونوشت و مشخص کردن توالی نوکلئوتیدی آن..... ۲۴۰
نقشه‌برداری رونوشت با هیبریداسیون بین ژن و RNA ۲۴۱
آنالیز رونوشت با PCR:..... ۲۴۲
تعیین محل‌های اتصال پروتئین روی مولکول DNA..... ۲۴۳
۱-تأخیر حرکتی کمپلکس‌های DNA-پروتئین در ژل ۲۴۳
۲- روش ردپا با آنزیم Dnase I..... ۲۴۳
۳- سنجش تداخل ناشی از تغییر..... ۲۴۳
تعیین توالی‌های کنترلی به وسیله آنالیز حذفی..... ۲۴۴
تشخیص و مطالعه محصول ترجمه یک ژن کلون شده. ۲۴۴
تولید پروتئین از ژن‌های کلون شده:..... ۲۴۶
وکتورهای مخصوص بیان ژن‌های خارجی در E.coli..... ۲۴۶
پروموتر، مهم‌ترین جزء یک وکتور بیانی..... ۲۴۷
مثال‌هایی از پروموترهای استفاده شده در وکتورهای بیانی..... ۲۴۸
مشکلات تولید پروتئین نوترکیب در E.coli..... ۲۴۹
تولید پروتئین نوترکیب با سلول‌های یوکاریوتی..... ۲۴۸
پروتئین نوترکیب از مخمر و قارچ‌های رشته‌ای..... ۲۴۹
ساکارومیسس سرویزیه میزبانی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب..... ۲۴۹
پیکیا پاستوریس..... ۲۵۰
استفاده از سلول‌های جانوری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب..... ۲۴۸
تولید پروتئین در سلول‌های پستانداران ۲۵۰
تولید پروتئین در سلول‌های حشرات ۲۵۰
فارمینگ در جانوران..... ۲۵۰

فصل سیزدهم: ویرایش ژنوم با استفاده از اندونوکلئازهای هدف‌یاب ۲۵۲
ترمیم DSB..... ۲۵۳
ZFN_S..... ۲۵۴
TALEN ها..... ۲۵۵
CRISPR/Cas9: در خط اول تکنولوژی‌های ویرایش ژنوم ۲۵۷
سیستم CRISPR/Cas9 به‌عنوان سیستم ایمنی اکتسابی در پروکاریوت‌ها..... ۲۵۹
کاربرد CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم..... ۲۵۹
اختصاصیت کمپلکس CRISPR/Cas9..... ۲۶۰
استراتژی‌های ایجاد دو شکاف (Double Nicking) و دایمر FokI-dCas9 به منظور افزایش اختصاصیت.. ۲۶۱
نرم‌افزارهای تحت شبکه برای طراحی gRNA و پیش‌گویی Off target ها..... ۲۶۲
ساخت وکتورهای CRISPR/Cas9..... ۲۶۳
روش‌های وارد کردن CRISPR/Cas9 به سلول‌ها و جانداران..... ۲۶۳
کاربردهای دیگر *CRISPR/Cas9* در مطالعات علوم زیستی..... ۲۶۴

فصل چهاردهم: اصول ایمنی زیستی در آزمایشگاه‌ها ۲۶۶
مقدمه..... ۲۶۶
۲-۱- فاکتورهای مؤثر در تعیین میزان خطر ۲۶۶
۶-۱ – امنیت زیستی..... ۲۶۷
سطوح ایمنی زیستی..... ۲۶۸
طبقه‌بندی آزمایشگاه از نظر سطح خطر..... ۲۶۸
گروه خطر ۱ ..... ۲۶۸
گروه خطر ۲ ..... ۲۶۸
گروه خطر ۳ ..... ۲۶۸
گروه خطر ۴ ..... ۲۶۸
روش‌های استاندارد کاری (SOP)..... ۲۷۰
۲-۲- نکات عمومی جهت کار در آزمایشگاه..... ۲۷۰
۲-۳- آزمایشگاه سطح ۱ ایمنی زیستی (BL1) ۲۷۱
- آزمایشگاه سطح ۲ ایمنی زیستی (BL2)..... ۲۷۱
روش‌ها و الزامات آزمایشگاهی..... ۲۷۲
۲-۵-۱- نکات مورد توجه در آزمایشگاه سطح ۲..... ۲۷۳
۲-۱۲- روش‌های کنترل آزمایشگاه (کنترل‌های

مهندسی) ۲۷۴
۱-۱۲-۲- سدهای اولیه ۲۷۴
۲-۱۲-۲- سدهای ثانویه ۲۷۴
۱۳-۲- انتقال مواد خطرناک به محل نگهداری ۲۷۵
ایمنی زیستی آزمایشگاه‌های سطح ۳ ..... ۲۷۷
۱-۳- نکات لازم برای کار در ایمنی زیستی آزمایشگاه‌های سطح ۳ ..... ۲۷۷
۲-۳- طراحی تأسیسات و آزمایشگاه سطح ۳ ..... ۲۷۷
۱-۲-۳- چگونگی طراحی سیستم تهویه ساختمان. ۲۷۸
۴-۳- پایش‌های پزشکی ۲۷۸
۵-۳- روش‌های جابجایی و دفع ضایعات و مواد آلوده.. ۲۷۹
۱-۵-۳- مواد و ضایعات لب تیز ۲۷۹
۲-۵-۳- دفع مواد آلوده ۲۷۹
ایمنی سطح ۴ (حداکثر سطح آلودگی آزمایشگاهی) ۲۸۰
۱-۴- نکات ایمنی کار در آزمایشگاه ایمنی سطح ۴ ..... ۲۸۱
۲-۴- طراحی آزمایشگاه و تأسیسات و وسایل ۲۸۱
۱-۲-۴- محفظه ایمنی بیولوژیکی سطح ۳ ..... ۲۸۱
۲-۲-۴- لباس‌های مخصوص محیط‌هایی با درجه خطر بالا ۲۸۲
۳-۲-۴- دسترسی کنترل شده ۲۸۲
۴-۲-۴- سیستم کنترل شده هوا ۲۸۲
۵-۲-۴- برق اضطراری ۲۸۲
۳-۴- رفع آلودگی فاضلاب‌ها ۲۸۲
۴-۴- رفع آلودگی زباله‌ها ۲۸۲
۵-۴- روش‌های جابجایی و دفع ضایعات و مواد آلوده. ۲۸۳
نکات مهمی که در آزمایشگاه سطح ۴ باید رعایت نمود: ۲۸۳
دستورالعمل‌های ایمنی ۲۸۴
۱-۱۸- دستورالعمل ایمنی هنگام کار با اتوکلاو ۲۸۴
۲-۱۸- نکات ایمنی در اتاق کشت بافت ۲۸۴
۳-۱۸- دستورالعمل ایمنی هنگام کار با سانتریفوژ ۲۸۵
۴-۱۸- دستورالعمل ایمنی جهت رفع آلودگی سطوح. ۲۸۵
۵-۱۸- دستورالعمل ایمنی کار در آزمایشگاه ۲۸۶
۶-۱۸- دستورالعمل ایمنی هنگام قرار دادن نمونه درون یخچال ۲۸۷
۷-۱۸- دستورالعمل استفاده از پوشش فردی و روپوش در آزمایشگاه ۲۸۷
۸-۱۸- نکات ایمنی هنگام کار با پی‌پت ۲۸۸
۹-۱۸- موارد لازم پس از پایان کار روزانه ۲۸۸
۱۰-۱۸- دستورالعمل ایمنی در هنگام کار با هودهای میکروبی ۲۸۸
۱۱-۱۸- دستورالعمل ایمنی هنگام تهیه اسمیرهای (لام) میکروبی ۲۸۹
۱۲-۱۸- دستورالعمل ایمنی کار در حیوان خانه ۲۸۹



بخش اول

تکنیک‌های آزمایشگاهی سلولی

۱ | میکروسکوپ نوری
۲ | میکروسکوپ الکترونی
۳ | کشت سلولی
۴ | ایمنوهیستوشیمی
۵ | فلوسایتومتری

فصل اول
میکروسکوپ نوری

مقدمه

میکروسکوپ وسیله‌ای است که برای دیدن اشیایی بسیار کوچکی که با چشم غیرمسلح دیده نمی‌شوند، بکار می‌رود. سابقه استفاده از میکروسکوپ به حدود ۴۰۰ سال قبل برمی‌گردد و نخستین میکروسکوپ کارامد در اوایل سال‌های ۱۶۰۰ در هلند پا به عرصه علم و فن‌آوری گذاشت.

در قرن هجدهم با ساخت عدسی‌هایی که انحنای زیادتری داشته و از بزرگنمایی بیشتری برخوردار بودند و همچنین بهره‌مندی از تکنیک ترکیب چندین عدسی با یکدیگر، قدرت تفکیک میکروسکوپ‌ها زیاد شد.

با ارائه نظریه‌های علمی جدید و امکان بهره‌مندی از فناوری‌های جدید، امکان ابداع انواع دیگر میکروسکوپ‌ها در قرن بیستم فراهم شد. اکثراً اشیایی که توسط میکروسکوپ نوری مشاهده می‌شوند، نسبت به نور شفاف بوده و اجزای آنها نیز وقتی قابل مشاهده می‌شوند که این اجزا نسبت به زمینه دارای کنتراست باشند.

میکروسکوپ‌ها جهت مشاهده شکل باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها و سلول‌های میزبان به صورت انواع مختلف رنگ شده و بدون رنگ‌آمیزی بکار برده می‌شوند.

این فصل به‌طور خلاصه به مطالعهٔ میکروسکوپ و دیدن تصاویر با آن می‌پردازد.

۱- انواع میکروسکوپ نوری

میکروسکوپ‌های مورداستفاده در کارهای بالینی، عمدتاً به میکروسکوپ‌های نوری[1] تعلق دارند. آن‌ها به این دلیل میکروسکوپ نوری نامیده می‌شوند که از اشعه نورانی[2] برای دیدن تصویر استفاده می‌کنند. میکروسکوپ نوری مرکب[3] مرسوم‌ترین میکروسکوپ مورد استفاده در میکروبیولوژی می‌باشد. این میکروسکوپ دارای دو سیستم لنزی (ترکیبی از لنزها) جهت بزرگنمایی تصاویر است.

هر لنز قدرت بزرگنمایی متفاوتی دارد. یک میکروسکوپ نوری مرکب با یک بخش چشمی منفرد، تک چشمی[4] و میکروسکوپ با دو بخش چشمی، دو چشمی[5] نامیده می‌شود.

میکروسکوپ‌های مختلف دارای بزرگنمایی‌های متفاوتی می‌باشند که عموماً با وجود عدسی‌های گوناگون، تصویر نمونه مورد نظر چند برابر می‌شود. هرچقدر طول موج نور بکار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه‌تر باشد، قدرت تفکیک آن بیشتر خواهد بود. کوتاه‌ترین فاصله دو نقطه که بتوان آنها را به‌وسیله میکروسکوپ به‌صورت دو جزء جداگانه دید، قدرت تفکیک نام دارد. قدرت تفکیک چشم انسان ۰/۱ میلی‌متر و میکروسکوپ نوری معمولی ۰/۲۴

1. light Microscope
2. beam
3. Compound
4. monocular
5. binocular

میکرون می‌باشد.

به علت محدودیت تفکیک میکروسکوپ‌های نوری (که تصاویر آنها از طول موج نور مرئی حاصل می‌شود) میکروسکوپ‌های الکترونی که در آنها بجای اشعه نورانی از باریکه الکترونی استفاده می‌شود، پا به عرصه وجود گذاشتند. اما بعدها مشخص شد که استفاده از الکترون در این میکروسکوپ‌ها باعث بهبود همزمان قدرت تفکیک و عمق میدان می‌گردد. این میکروسکوپ‌ها با بزرگنمایی بسیار زیاد برای مشاهده میکروارگانیسم‌های بسیار کوچک نظیر ویروس‌ها، اندامک‌های سلولی نظیر ریبوزوم و یا حتی ساختارهای غشایی و اجزای تحت سلولی به کار گرفته می‌شوند.

۱-۱ میکروسکوپ نوری

۱-۱-۱- میکروسکوپ زمینه روشن[1]

این نوع میکروسکوپ نوری، از جمله میکروسکوپ‌های رایج مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها می‌باشد که در آنها تصویر ایجاد شده از اشیاء در زمینه بسیار روشن مشاهده می‌شود. برای مشاهده با این میکروسکوپ، نیاز به آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی نمونه است و میکروارگانیسم‌ها و دیگر ساختارها به دلیل دانسیته‌های متفاوتشان قابل‌رؤیت می‌شوند. بسته به ویژگی‌های ساختارها و ارگانیسم‌های مختلف، ممکن است از رنگ‌آمیزی‌های متنوع بهره جست.

۲-۱-۱ میکروسکوپ زمینه تاریک[2]

در میکروسکوپ زمینه تاریک، تصویر روشن از نمونه در زمینه تاریک مشاهده می‌شود. در این میکروسکوپ که امکان مشاهده سلول‌های زنده و برخی از اجزاء آن بدون نیاز به رنگ‌آمیزی نیز وجود دارد، از یک کندانسور ویژه استفاده می‌شود که سبب تبدیل نور مرئی خروجی از منبع نورانی به شکل مخروطی و تابیدن نور از اطراف به شیئی می‌شود. با ایجاد انکسار نور توسط آیینه‌های محدب و مقعر، تصویر روشن از نمونه در زمینه تاریک ایجاد می‌شود.

این میکروسکوپ برای مشاهده و همچنین تصویربرداری از نمونه‌های رنگ نشده و یا تصاویری رنگ نشده‌ای که به افزایش کنتراست نیازمند هستند مناسب بوده و برای مشاهده حرکت باکتری‌هایی زنده نظیر ترپونها پالیدوم (عامل سفلیس) و لپتوسپیرا (عامل لپتوسپیروزیس) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۳-۱-۱ میکروسکوپ فاز متضاد (فاز کنتراست)

با میکروسکوپ فازکنتراست می‌توان سلول‌های زنده و ساختارهای درونی آنها را بدون رنگ‌آمیزی و با جزئیات بیشتر مشاهده و فرآیندهایی مثل تقسیم میتوز را مطالعه کرد. منبع تغذیه نور در این نوع میکروسکوپ نور مرئی می‌باشد و برای بررسی بافت‌ها یا نمونه‌هایی که اختلاف انکساری نوری کمی دارند نیز کاربرد زیادی دارد.

کاندنسورها و عدسی‌های شیئی ویژه‌ای در میکروسکوپ‌های فاز متضاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. این میکروسکوپ رابطهٔ فازی نور عبوری از جسم و نور عبوری از حاشیه جسم را اصلاح می‌کند.

میکروسکوپ فلورسانس[3]

منبع نورانی این میکروسکوپ‌ها پرتوهای فرابنفش است که دارای طول موج کمتر، انرژی بیشتر و قدرت

1. Bright field microscopy
2. Darkfield microscopy
3. Fluorescent microscopy

نفوذ بیشتری نسبت به نور مرئی است. برای مشاهده نمونه به‌وسیله این نوع از میکروسکوپ‌ها بخش‌ها و یا مولکول‌های اختصاصی داخل سلول می‌بایست با مواد فلورسانت یا نورافشان رنگ‌آمیزی شوند. بنابراین در میکروسکوپ فلورسانس، نمونه‌ها با یک فلوروکروم یا مجموعه‌ای از فلوروکروم‌ها رنگ‌آمیزی می‌شوند.

برای رنگ‌آمیزی اختصاصی، معمولاً از آنتی‌بادی‌های متصل به مواد فلورسانت استفاده می‌شود. مواد فلورسانت نور را در طول موج فرابنفش جذب می‌کنند و در طول موج بلندتری در طیف مرئی تابش می‌کنند.

نور با انرژی بالا یا طول‌موج کم (از لامپ‌های هالوژنی یا لامپ‌های بخار جیوه) جهت تهییج مولکول‌های درون نمونه یا مولکول‌های رنگ متصل به نمونه بکار گرفته می‌شود. این مولکول‌های تهییج شده نور با طول‌موج‌های مختلف را (اغلب با رنگ‌های درخشان) ساطع می‌کنند.

رنگ‌آمیزی مختلف amine برای باسیل‌های اسید- فاست یکی از کاربردهای این تکنیک است. رودامین و فلورسئین از رنگ‌های معمول فلورسانت می‌باشند که به ترتیب نور قرمز و سبز از خود تابش می‌کنند.

۲- اجزاء یک میکروسکوپ

اجزاء اصلی یک میکروسکوپ شامل بخش چشمی، لوله میکروسکوپ، nose-piece، عدسی شیئی، صفحه مکانیکی، کاندنسور، پیچ فوکوس بزرگ و کوچک منبع نور می‌باشد.

شکل ۱-۱. تصویر شماتیک میکروسکوپ و اجزای آن

شکل ۲-۱. بخش چشمی میکروسکوپ

۲-۱ بخش چشمی[1]

تصویر نمونه‌ها از طریق بخش چشمی میکروسکپ مشاهده می‌شوند (شکل ۲-۱). بخش چشمی دارای لنزی است که تصویر تشکیل شده به‌وسیله عدس شیئی را بزرگ می‌نماید. قدرت بزرگنمایی عدسی بخش چشمی در محدوده ۵x-۲۰x می‌باشد. در برخی از میکروسکوپ‌ها ممکن است یک نشانگر متحرک در درون بخش چشمی تعبیه گردد.

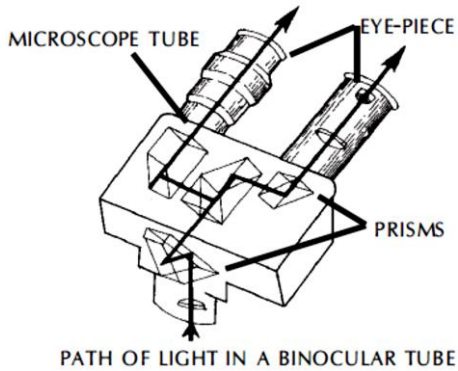
در میکروسکوپ‌های دو چشمی، دو بخش چشمی می‌توانند به یکدیگر نزدیک و یا دور شده و برای فاصله بین دو چشم کاربر تنظیم شوند.

۲-۲ لوله میکروسکوپ

لوله میکروسکوپ به قسمت فوقانی بازوی میکروسکوپ متصل می‌شود. قسمت انتهایی آن به بخش چشمی که می‌تواند به صورت تک چشمی و یا دو چشمی باشد، متصل می‌گردد.

در میکروسکوپ‌های جدید، بخش چشمی لوله‌ای نیست و به‌صورت محفظه‌ای که در درون آن چند منشور نورانی تعبیه شده دیده می‌شود. این منشورها سبب انکسار در نور ورودی شده، زاویه دید مناسب را ایجاد می‌کنند.

1. Eye-piece



شکل ۳-۱. لوله میکروسکوپ

نکته! اگر طول مکانیکی لوله خاص متفاوت می‌باشد، عدسی‌های شیء را بین دو میکروسکوپ متفاوت تعویض نکنید.

۲-۳ Nose-piece

قسمت Nose-piece به زیر بازوی لوله میکروسکوپ متصل (شکل ۴-۱) و عدسی‌های شیئی به ترتیب قدرت بزرگنمایی در آن جاگذاری می‌شوند. قابلیت چرخش این قسمت بهره‌مندی از عدسی مناسب شیئی را در اختیار کاربر قرار می‌دهد.

شکل ۴-۱. قسمت Nose-piece

شکل ۵-۱. عدسی شیئی

۲-۴ عدسی‌های شیئی

عدسی‌های شیئی با قدرت بزرگنمایی 40x,10x,4x و 100x به‌طور رایج استفاده می‌شوند (شکل ۵-۱). قدرت بزرگنمایی این لنزها توسط شرکت‌های تولیدکننده، روی بدنه آنها نگاشته شده و معمولاً برای تشخیص آسان به صورت رنگی درج می‌گردد. باید توجه داشت که برای استفاده از عدسی شیئی 100x باید از روغن ایمرسیون استفاده نمود.

حد تفکیک میکروسکوپ‌ها با استفاده از فرمول $R=0.61\lambda/n.\sin\alpha$ محاسبه می‌گردد. در این فرمول R حد تفکیک است که به کوچک‌ترین فاصله قابل تشخیص بین دو نقطه واقع بر یک سطح که به وسیله سیستم نوری که قابل تشخیص باشد، اطلاق می‌گردد. هر چه مقدار عددی حد تفکیک کوچکتر باشد، قدرت تفکیک میکروسکوپ نوری بیشتر خواهد بود.

به $n.\sin\alpha$ عدد گشادگی (Numerical aperture)، مقدار زاویه گشودگی یا شماره مدخل لنز گفته می‌شود. در این فرمول α نماینده نیم زاویه مخروط روشنایی یا نیم زاویه مدخل گشادگی، λ طول موج نور بکار گرفته شده برای رؤیت جسم (برحسب میکرون) و n ضریب شکست محیط شفاف بین جسم و عدسی شیئی می‌باشد.

بطور کلی هر چه مقدار عددی حد تفکیک کاهش یابد، توان میکروسکوپ افزایش می‌یابد.

برای کم کردن حد تفکیک دو امکان زیر وجود دارد:

۱- استفاده از نورهای با طول موج کوتاه‌تر

۲- استفاده از لنز با عدد گشادگی بیشتر

جهت بهترین تصویر در بزرگنمایی بالا، روغن ایمرسیون را بین نمونه و عدسی ایمرسیون روغنی (100x) قرار می‌دهند. برخلاف هوا، روغن ایمرسیون شاخص انعکاسی مشابهی نظیر شیشه دارد. از این رو، کیفیت تصویر را بهبود می‌بخشد. اگر روغن ایمرسیون استفاده نشود، تصویر به صورت مه‌آلود و تیره دیده خواهد شد.

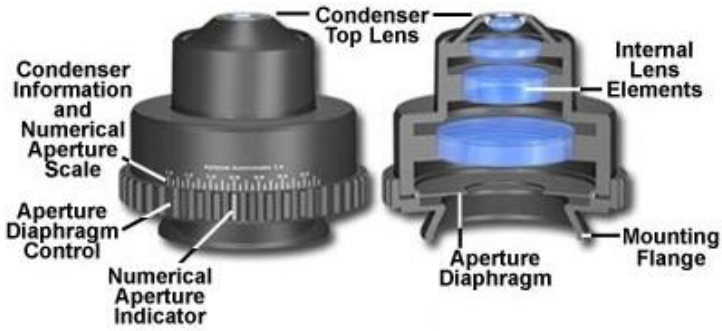
۲-۵ صفحه مکانیکی

صفحه مکانیکی نمونه‌ها را نگه می‌دارد و به‌وسیله چرخاندن پیچ‌ها امکان حرکت نمونه را به سمت جلو، عقب، چپ و راست فراهم می‌کند.

۲-۶ کاندنسور

کاندنسور میزان نور و کنتراست را کنترل می‌کند (شکل ۶-۱). انواع مختلفی از کاندنسور وجود دارد. برخی کاندونسورها دارای یک مکانیسم چرخ‌دنده‌ای برای تنظیم حرکت به سمت بالا و پایین هستند. در مورد کندانسور توجه به نکات زیر ضروری می‌باشد.

- میزان NA یک کاندنسور می‌بایست برابر و یا بزرگ‌تر از حداکثر میزان NA عدسی شیئی باشد.
- یک دیافراگم iris در زیر کاندنسور تعبیه شده است. این قطعه میزان NA کاندنسور را به هنگام استفاده از عدسی‌های شیئی با قدرت بزرگنمایی کمتر تنظیم می‌کند.



شکل ۶-۱. کاندنسور

شکل ۷-۱. آینه دو طرفه

- یک نگهدارنده فیلتر (مدل آویزان) می‌تواند بالا یا پایین کاندنسور قرار گیرد. البته در برخی میکروسکوپ‌ها نگهدارنده فیلتر نمی‌تواند از مدل آویزان باشد. نگهدارنده فیلتر وظیفه نگه داشتن فیلترهای قابل جدا شدن را بعهده دارد.

۲-۷ آینهٔ دو طرفه

آینه ساده‌ترین منبع روشنایی[1] می‌باشد که در میکروسکوپ‌های اولیه برای گسیل دادن نور به سمت نمونه، استفاده می شده است. آینه دو طرفه روشنایی لازم را از طریق انعکاس نور طبیعی یا مصنوعی فراهم می‌کند. این آینه دو سمت دارد، یک سطح صاف برای نور مصنوعی و طرف دیگر که مقعر می‌باشد برای نور طبیعی تعبیه شده است (شکل۷-۱).

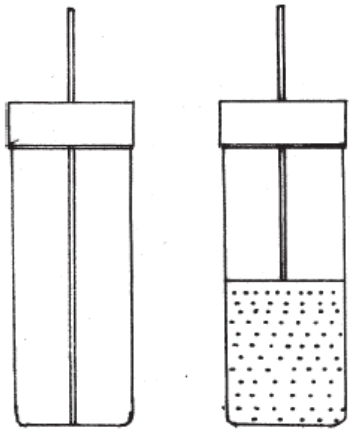
۲-۸ منابع نوری داخلی

درون پایه میکروسکوپ یک قسمت بعنوان منبع تولید نور وجود دارد. در بسیاری از میکروسکوپ‌های نوری از یک لامپ هالوژن برای تولید بهترین روشنایی بهره گرفته می‌شود. در قسمت بالایی تأمین‌کننده روشنایی عموماً یک نگهدارنده فیلتر تعبیه می‌شود که فیلتر نوری (آبی، سبز، بی‌رنگ متراکم و غیره) برای دستیابی به طول موج مناسب نوری را در خود جای می‌دهد.

۲-۹ فیلترها

- فیلتر آبی جهت تغییر نور از لامپ‌های الکتریکی موسوم به نور سفید طبیعی‌تر بکار می‌روند.
- فیلترهای متراکم (چگال) بی‌رنگ که جهت کاهش نور بدون تغییر رنگ پس زمینه بکار می‌روند.
- فیلترهای سبز برای برخی شرایط ویژه مورد استفاده قرار می‌گیرند.

1. illuminator



شکل ۸-۱. به نظر می‌رسد که میله شیشه‌ای در روغن ایمرسیون با شاخص انکساری ۱/۵ ناپدید می‌شود.

۲-۱۰ پیچ‌های بزرگ و کوچک برای متمرکز کردن

این پیچ‌ها برای تغییر فاصله بین نمونه و عدسی شیئی استفاده می‌شوند. پیچ بزرگ این فاصله را به سرعت تغییر می‌دهد و برای آوردن نمونه به درون میدان دید استفاده می‌شود؛ اما پیچ کوچک فاصله را به آهستگی تغییر داده و امکان دید بهتر از شیء را فراهم می‌کند.

۲-۱۱ لامپ هالوژن

لامپ‌های هالوژن، لامپ‌هایی با توان کم و شدت زیاد بوده و بعنوان منبع تولید نور مناسب می‌باشند. هزینه خرید این لامپ‌ها در مقایسه با لامپ‌های تنگستنی زیادتر است اما در مقابل از مزایایی زیر در مقابل آنها برخوردار هستند:

- نور سفید ساطع می‌کنند.
- روشنایی بیشتری ایجاد می‌کنند.
- دارای فیلامنت ضخیمی هستند.
- طول عمر بیشتری دارند.

۳- روغن ایمرسیون

به منظور استفاده از عدسی‌های شیئی که NA بیشتر از ۱/۰ دارند، باید روغن ایمرسیون بکار رود. این روغن قدرت تفکیک عدسی شیئی را افزایش می‌دهد. یک روغن ایمرسیون با ویسکوزیته متوسط و شاخص انعکاسی ۱/۵ مناسب است (شکل ۸-۱).

توجه شود که روغن گیاه صدر به دلیل باقی گذاشتن مولد چسبنده نباید بکار گرفته شود. اگر از این روغن استفاده شود، مراقبت ویژه‌ای برای اطمینان از تمیزی عدسی‌های شیئی (با استفاده از زایلن) پس از هر بار استفاده ضروری خواهد بود. اگر زایلن در دسترس نباشد، می‌توان برای تمیز کردن از بنزین استفاده کرد.

از آنجائی که پارافین مایع شاخص انعکاس پایینی دارد و باعث ایجاد تصویر نامطلوب می‌شود، نباید از آن بجای روغن ایمرسیون استفاده شود. از طرفی دیگر باید توجه داشت که در صورت استفاده از این ماده در مقایسه با روغن ایمرسیون، بررسی‌های میکروسکوپی دقیق نیازمند زمان طولانی‌تری خواهند بود.

۴- کارکرد میکروسکوپ

در یک میکروسکوپ نوری مرکب سه قطعه نوری اصلی دیده می‌شود. تمام این اجزاء برای دیدن یک تصویر واضح ضروری هستند. این سه جزء عبارتند از:

۱. کاندانسور
۲. عدسی شیئی
۳. قطعات چشمی

کاندانسور توسط تبدیل کردن یک دسته نور موازی روی شیء از یک منبع طبیعی یا توکار آن را روشن می‌کند. عدسی شیئی یک تصویر بزرگ شده معکوس از شیء تهیه می‌کند. قطعه چشمی تصویر