المملكة العربية السعودية
جامعة الملك سعود
كلية العلوم
قسم علم الحيوان

التحضيرات المجهرية
مقرر 261 – 262
حين
الجزء العملي

إعداد

د. عمر حامد محمد عبد القادر

استاذ المجهر الإلكتروني المساعد

2012–1433

بسم الله الرحمن الرحيم

المجاهر هي من الأجهزة الأوسع استخداماً في علم الأحياء. والمجهر **Microscope** هو جهاز يعطينا صورة مكبّرة للشيء الذي ننظر إليه به ، و يستخدم لدراسة الكائنات الحية والخلايا وأجزائها الصغيرة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة ، تكبّر المجاهر شيئاً ما وتكشف تفاصيله في آن واحد. التكبير **Magnification** هو زيادة الحجم الظاهر لشيء معين. أما التمييز **Resolution** فهو القدرة على إظهار التفاصيل. وتتفاوت المجاهر في مجال قدرة التكبير والتمييز التي تختص بهما و يعتبر المجهر بالنسبة للبيولوجيين الأحيائيين عبارة عن العامود الفقري الذي ترتكز عليه جميع فروع علم الأحياء التي تقوم بدراسة التركيب والتشريح الداخلي لمكو ناتها وفهو يعمل على تكبير المكونات إلى الأحجام التي تستطيع العين المجردة من رؤيتها والتعرف عليها وتمييزها ودراستها.

المجاهر الضوئية Optical Microscopes

يستعمل المجهر الضوئي المركب عادة (م.ض) **Compound light microscope** لرؤية الكائنات الحية الصغيرة والخلايا التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة ولكي ترى بواسطتة تضع العينة على شريحة زجاجية، لكن يجب أن تكون العيّنة رقيقة بما يكفي لتصبح شفافة، أو أن تكون صغيرة جداً. توضع الشريحة التي تحمل العينة فوق فتحة في منضدة المجهر. ومن مصدر ضوء، كمرآة أو مصباح مثبت في القاعدة، يوجَّ هـ الضوء إلى الأعلى. يمر الضوء عبر العينة وعبر العدسة الشيئية **Objective lens** الموضوعة مباشرة فوق العينة، فتكبر العدسة الشيئية تلك العينة. بعد ذلك يتم إسقاط الصورة المكبرة عبر القصبة **Body tube** نحو العدسة العينية **Ocular lens** المثبتة في قطعة العين **Eyepiece** حيث تكبر أكثر. تحتوي معظم المجاهر الضوئية على مجموعة عدسات شيئية ذات درجات تكبير مختلفة. يمكن اختيار عدسة وتركيزها في حقل الرؤية عبر إدارة القطعة الأنفية **Nosepiece**. تقوم العدسة الشيئية الكبرى في مجهر ضوئي مركب بتكبير صورة لتبلغ 100 ضعفاً للحجم الأصلي للعينة. يسمى عامل التكبير هذا قدرة التكبير **Power of magnification** للعدسة الشيئية، والتي يرمز إليها في هذه الحالة بـ 100× (× تعني عدد مرات التكبير) ومن ناحية أخرى تكبر العدسة العينية العينة 10 مرات(10×). ولاحتساب قدرة تكبير المجهر، يجب

ضرب قدرة تكبير العدسة الشيئية الكبرى(100× في هذه الحالة) في قدرة تكبير العدسة العينية(10×). يكون الحاصل قدرة تكبير إجمالية تساوي 1000×.

تاريخ تطور صناعة المجاهر الكهربائي المركب

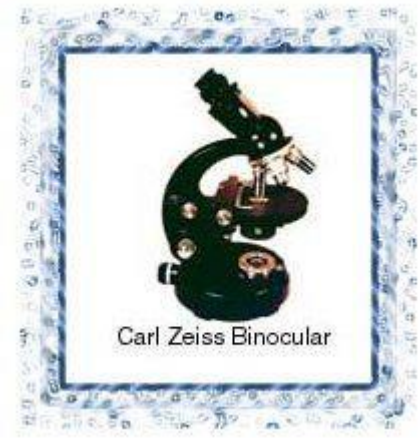
History of the development industry, electrical compound microscopes

- أبسط صورة من صور المجاهر هي العدسة اليدوية وهي عبارة عن إطار معدني مثبت به عدسة واحدة زجاجية ثنائية التحدب أو ثنائية التقعر ، وتزود هذه العدسة بمقبض لتحريكها للأسفل والأعلى.

- أول مرة اخترع الإنسان مجهر ضوئي مركب على نظام بصري كان سنة 1611م في بداية القرن السابع عشر على يد العالم Kepler الذي اقترح لأول مرة طريقة الصناعة لمجهر ضوئي مركب.
- جاء العالم هوك سنة 1655م في منتصف القرن السابع عشر ولأول مرة استخدم أول مجهر ضوئي مركب على ضوء نظرية العالم Kepler وأدى ذلك إلى اكتشاف الخلية وتسميتها بهذا الإسم أبان فحصه لقطاع من الفلين.

- **جاء العالم الهولندي المشهور لوفنهوك سنة1674 م ووضع ثاني أشهر مجهر ضوئي في التاريخ والذي بواسطته تمكن من اكتشاف عالم الكائنات الدقيقة مثل الحيوانات الأولية والبكتيريا والحيوانات المنوية وتمكن من اكتشاف أن الإخصاب هو ناتج اندماج الحيوان المنو ي مع** البويضة
- **في عام 1876 قدم العالم أبي Abbe تحسينات هامة في صناعة المجاهر الضوئية**

- **عام 1886م قام العالم زيوس Zeiss بإضافة العديد من التحسينات إلى صناعة العدسات والمجاهر الضوئية المركبة التي ما وصلت عليه** الآن



- عام 1898م قام العالم جولجي Golgi باكتشاف العضية المسماة باسمه وهي أجهزة جولجي أو صفائح جولجي.
- عام 1924م أي في بداية القرن العشرين قام العالم لاكاساجي Lacassagne اخترع لأول مرة تقنية التصوير الإشعاعي الذاتي باستخدام البولونيوم المشع أي محاولة رصد النشاط الإشعاعي لعضيات محتوية على عناصر مشعة عن طريق تغذية الكائن على

مادة مشعة Autoradiography radio activity polonium .

- عام 1930 اخترع العالم لابديف Labedeff المجهر التداخلي

Interference microscope

- عام 1932م اخترع العالم زيرنكي Zernicke المجهر المتباين الأطوار

Phase contrast microscope

- عام 1941م استخدم العالم كونز Coons لأول مرة المضادات الحيوية بالاشتراك مع الصبغات الفلوروسنتية لتعليم الخلية وعضياتها وبالذات الأنتيجينات.
- عام 1952م اخترع العالم نومارسكي Nomarski مجهر أكثر تطوراً من المجهر الضوئي ذو الأطوار المتباينة differential interference contrast microscope
- عام 1981م قام العالمان ألن و انوى allen & Inoue بإدخال كاميرات الفيديوا إلى تقنيات التصوير من المجاهر الضوئية وبالذات المجاهر ذات الطوار المتباينة.
- عام 1988م شاع استخدام المجهر الضوئي الماسح.

- **Scanning Optical microscope**

كيف نعرف قوة التكبير في المجهر بصورة

مبسطة كيف نعرف قوة التكبير في المجهر:

ونستطيع معرفة قوة التكبير، بضرب الرقم الموجود على العدسة العينية والذي يدل على قوة التكبير، بالرقم الموجود على العدسة الشيئية . فإذا كانت قوة تكبير العدسة العينية 10 وقوة تكبير العدسة الشيئية 40، كانت قوة تكبير المجهر في هذه الحالة 10×40=400مرة .

مبدأ عمل المجهر المركب (فكرة المجهر Compound Microscope)

- عدسة عينية و هي مثبتة في الطرف العلوي للأسطوانة المعدنية الموجو دة في أعلى جزء من المجهر و من خلال هذه العدسة تنظر العين إلى الداخل لرؤية العينة المراد فحصها .

- عدسات شيئية و هي مثبتة على قرص متحرك بالطرف السفلي للأسطوانة المعدنية و تكون قريبة من الشيء المراد تكبيره ، لذلك سميت بالعدسات الشيئية و يتراوح عدد هذه العدسات بين(2 – 4) عدسات و تتدرج في قوة تكبيرها .

- ضابطان أحدهما للضبط التقريبي و الآخر للضبط الدقيق يمكن تدويرهما لرفع أو خفض العدسات عن العينة المدروسة لتوضيحها بعد اختيار قوة التكبير المطلوبة بأي من العدسات الأربع .

- منضدة (مسرح) مسطح مستو و يمكن رفعه أو خفضه أو يكون ثابتا و في وسطه توجد فتحة و ماسكان معدنيان لتثبيت الشريحة الزجاجية التي توضع عليها العينة المطلوب تكبيرها .

- مرآة و توجد في أسفل المنضدة و وظيفتها توجيه الضوء لينفذ من فتحة المنضدة و يسلط على العينة المثبتة على الشريحة ، و هناك بعض المجاهر تكون مزودة بمصباح كهربائي بدلا من مرآة .

تصل قوة التكبير في المجهر الضوئي إلى حوالي 2000 مرة ويتركب هذا المجهر من مجموعة آلية ومجموعة ضوئية ، وتتكون المجموعة الآلية من قطع معدنية تحمل المجموعة الضوئية.

تتركب المجموعة الآلية من قاعدة يرتكز عليها المجهر وذراع أو حامل يحمل أنبوبة العدسات كما نستعمل الذراع لحمل المجهر عند ما ننقله من مكان لآخر، ويوجد على الذراع

الضابط الكبير الذي يحرك أنبوبة المجهر حركة كبيرة ، والضابط الصغير الذي يحر ك أنبوبة المجهر حركة دقيقة . والمنضدة في مركزها ثقب لإمرار الضؤ المنعكس عن المرآة أو مصدر ضوئي كهربائي، توضع على المنضدة الشريحة المراد فحصها وعلى المنضدة ضاغطان أو ما سكان لتثبيت الشريحة.

أما المجموعات الضوئية فتتكون من المرآة (ووظيفتها عكس الأشعة الضوئية نحو المكثف) والمكثف (وظيفته جمع الأشعة الضوئية المنعكسة عن المرآة وتوجيهها نحو الشريحة) ، وتحمل أنبوبة العدسات، عدسة عينية أو عدستين في الأعلى. وفي الأسفل تحمل عدسات شيئية تتحرك على قرص، ويتفاوت عددها فقد تكون اثنين أو ثلاثة أو أربعة ولها تكبيرات مختلفة

مجهر الأطوار المتباينة Phase contrast microscope

لفحص العينات الحية الغير مثبتة والغير معاملة بالصبغات .

يعمل هذا المجهر على أساس أن الأجزاء المختلفة لشيء ما لها معاملات انكسار مختلفة للضوء.

أساس عمل المجهر ذو الأطوار المتباينة يحدث بالتدرج التالي :

الأجزاء المختلفة لشيء ما لها معاملات انكسار مختلفة للضوء وأجزاء الخلية (عضياتها) لها معاملات انكسار مختلفة عندما يسقط الضوء بزاوية معينة على الخلية فإن الأجزاء المختلفة للخلية تعكس وتكسر الضوء بدرجات مختلفة وتعطي معاملات انكسار مختلفة للضوء بعض

الأجزاء تبدو مضيئة وأخرى أقل إضاءة وبالتالي تتباين الإضاءة المنبعثة من الأجسام المختلفة هذا يؤدي إلى إعطاء تباين / تغاير/ خلفيات contrast هذا المجهر هو المجهر الأكثر مناسبة لفحص العينات الحية.

1. **مجهر الأطوار المتباينة هو عبارة عن مجهر عادي مزود بحلقات من العدسات حيث توجد عدسة حلقية في المكثف وعدسة حلقية أخرى بعد الـ Objective وهذه العدسات الحلقية تتحكم في زوايا سقوط الضوء وتعطي انكسارات مختلفة الضوء يؤدي إلى حدوث تباين فتظهر الصور واضحة بالخلفيات يمكن التحكم في زوايا سقوط الضوء لإحداث التباين .**
2. **عند مرور الضوء في خلية مصبوغة فإن موجاته يحدث لها انكسارات وتعطي معاملات انكسار مختلفة مما يؤدي إلى حدوث التباين.**
3. **عند مرور الضوء في خلية غير مصبوغة فإنه بالتحكم في العديسات وطريقة سقوط الضوء عليها يمكن الحصول على نفس الأطوار المتباينة للإنكسارات.**
4. **عند مرور الضوء في الفراغ فإنه يمشي في خطوط متموجة متوازية وعند دخوله للخلايا فإنه ينعكس.**

مجهر الحقل المظلم Dark Field microscope

نوع من أنواع المجاهر الضوئية ، ولكن يتم التحكم في الضوء حيث يكون الضوء على هيئة حلقة حول الشيء المراد رؤيته

مجهر الحقل المظلم مناسب لفحص الكائنات الصغيرة جداً المكورة والمنحصرة مثل **ميكروب الزهري** Syphilis حيث انه لا يمكن رؤيته بالمجهر الضوئي العادي حتى بالعدسة الزيتية ولكن يمكن رؤيته باستخدام مجهر الحقل المظلم للضوء.

- هناك بعض الكائنات الدقيقة من الصغر بحيث يصعب رؤيتها بالمجهر الضوئي العادي ، لو أضيئت بالضوء النافذ العادي **Transmition light** ، إلا أنه يسهل رؤيتها البراقة لو أضيئت من حولها أو من الجانب الإضاءة الدائرية لأن ذلك من شأنه أعطاء خلفية مظلمة تحيط بالشيء فيظهر براقاً تجاه الخلفية المظلمة.
- مثال ذلك ذرات الغبار التي تظهر براقة في الغرفة المظلمة المضاءة بأشعة الشمس النافذة من خلال ثقوب الجدران الموجودة بالغرفة فمجهر الحقل المظلم يقوم على أساس المجهر المتباين الأطوار إلا أنه يستغل معاملات الإنكسار بطريقة أكثر ، وبالتالي يمكن استعمال عينات حية أو غير حية
- الفرق بينه وبين مجهر متباين الأطوار أن حزمة الضوء للمجهر المظلم الحقل تكون بزاوية واحدة أما مجهر تباين الأطوار فيكون بزوايا مختلفة في مجهر الحقل المظلم لا نحتاج إلى عملية صبغ وتعتمد على تفاوت الكثافات البسيط جداً في أجزاء الشيء الواحد. حيث نقوم بتثبيت الشيء ونتحكم في زاوية سقوط الضوء.

المجهر الفلورسنتي Fluorescent microscope

من المجاهر الضوئية الحديثة التي حسنت كثيراً من القدرة الإيضاحية حيث يعتمد هذا المجهر على الصبغات الفوسفورية أو الفلورسينية. مبدءان يقوم عليهما عمل المجهر الفلورسنتي لفحص عينات مصبوغة بصبغة فلورسينية

a. الجزيئات الفلورسينية تمتص الضوء بطول موجي معين وتشعه بطول موجي أكبر.

b. عند إضاءة هذه الجزيئات الفوسفورية ومن ثم فحصها خلال مرشحات زجاجية تسمح فقط للضوء المشع من هذه الجزيئات بالمرور خلاله يجعل هذه الجزيئات متوهجة في خلفية مظلمة .

- النظام البصري لمجهر فلورسنتي حديث مرشح مانع أو حاجز يسقط الضوء عليه الضوء الأزرق بطول موجي (450– 490(nm
- يسقط الضوء بعد ذلك على مرآة تحدث فيه انشطاراً أو تجزء أو تقسيم لحزمة الضوء الأزرق إلى 510nm أو أكبر من ذلك ويقوم بإخراج الضوء بلون مخضر بعد أن كان مزرق
- مرشح آخر يعمل على استبعاد العلامات الفلور سينية الغير مرغوب فيها حيث أننا نريد العلامات المحصورة بين 520– 560nm بعد ذلك يذهب إلى العدسة العينية وتتم الرؤية.
- أكثر الصبغات الفلوسنية المستخدمة: الفلورسين Fluorescein تعطي لون أخضر ، تيراميثل رودامين Tetramethylrodamine تعطي لون أحمر.

- الدائرة البرتقالية تشير إلى المجموعة الكيميائية النشطة القابلة للتفاعل ، وفي هذا المكان تتكون الرباطة التساهمية بين الصبغة والبروتين أو أي جزيئات أخرى أي أن هذا الجزء البرتقالي هو جزء من الصبغة يتفاعل مع أجزاء من الخلية ويرتبط بها.
- يمكن التحكم في هذا الجزء من الصبغة وتغييره بمجموعات أخرى لإعطاء الصبغة قابلية للتفاعل مع أكبر عدد من جزيئات الخلية وكذلك يمكن ربطها مع الأجسام المضادة للتفاعل مع الأنتيجينات تجارياً هناك صور أخرى من البروتين مثل **SH** ، ...**NH2**حيث تكون هذه المجموعات **Selective** للإرتباط بالبروتينات.
- يمكن إصطحاب الصبغ بالصبغات الفلورسنتية بدمجها مع المضادات الحيواية ، وبذا يمكن التعرف على الإنتيجينات وهي مصبوغة في الصبغة الفلورسنتية.

المجهر الفلورسنتي يجعل رؤية الجزيئات الكبيرة ممكنة مثل البروتينات.