

## میکروسکوپ معکوس سه‌چشمی (Inverted Trinocular Microscope)

میکروسکوپ معکوس سه‌چشمی یکی از تجهیزات تخصصی آزمایشگاه‌های کشت سلول، بیولوژی مولکولی و تحقیقات پزشکی است. برخلاف میکروسکوپ‌های معمولی (راست)، در این میکروسکوپ منبع نور در بالای نمونه و عدسی‌های شیئی در زیر نمونه قرار می‌گیرند. این طراحی امکان مشاهده سلول‌های زنده در محیط کشت (مانند فلاسک‌ها و پلیت‌ها) را بدون نیاز به لام می‌دهد. اصطلاح "سه‌چشمی" به معنای وجود دو چشمی برای مشاهده و یک خروجی مجزا برای اتصال دوربین است.

### ۱. اصول عملکرد و کاربردها

برخلاف میکروسکوپ‌های معمولی که نمونه روی لام بالای منبع نور قرار می‌گیرد، در میکروسکوپ معکوس، منبع نور (لامپ هالوژن ۶ ولت/۳۰ وات یا LED در بالای نمونه و عدسی‌های شیئی در زیر آن نصب شده‌اند). این طراحی به کاربر اجازه می‌دهد تا سلول‌های زنده و در حال رشد را مستقیماً درون ظروف کشت سلول (فلاسک‌ها، پلیت‌های ۶، ۲۴ یا ۹۶ چاهک، و دیسک‌های پتری) مشاهده کند بدون آن که نیاز به جدا کردن یا انتقال سلول‌ها به لام باشد.

این دستگاه برای مشاهده نمونه‌هایی است که در کف ظروف شیشه‌ای یا پلاستیکی مخصوص کشت سلول رشد می‌کنند. وجود عدسی با ( "Working Distance" فاصله کاری) مناسب که معمولاً برای اهداف با بزرگنمایی ۵ تا ۲۰ برابر کافی است، ضروری می‌باشد.

### ۲. ویژگی کلیدی: خروجی سه‌چشمی (Trinocular)

مهم‌ترین تفاوت این میکروسکوپ با مدل دوچشمی معمولی، وجود مسیر نوری سوم است. این ویژگی شامل اجزای زیر است:

جزء	توضیح
دو چشمی (Binocular Tube)	برای مشاهده مستقیم نمونه توسط اپراتور با چشمان مجزا که قابلیت تنظیم فاصله بین دو چشم (Interpupillary Distance) و جبران دیوپتر (Diopter) را دارند
خروجی جانبی یا عمودی (Photo/Video Port)	یک لوله یا پورت جداگانه که نور را به سمت دوربین (CCD) یا CMOS هدایت می‌کند. بسته به مدل، این خروجی می‌تواند در بالای دستگاه یا کنار آن قرار گیرد
اهرم تقسیم نور (Light Path Selector)	یک اهرم فیزیکی (که معمولاً روی لوله سه‌چشمی قرار دارد) که به شما اجازه می‌دهد مسیر نور را تنظیم کنید: - ۱۰۰٪ به چشمی‌ها: برای کار با چشم - ۱۰۰٪ به دوربین: برای عکس‌برداری و فیلم‌برداری - تقسیم مساوی (۵۰/۵۰): همزمان مشاهده از چشمی و تصویربرداری

مزیت کاربردی: این قابلیت به کاربر اجازه می‌دهد همزمان که از چشمی‌ها نگاه می‌کند، تصویر را روی مانیتور هم ببیند یا ثبت کند، بدون آن که نیاز به قطع مشاهده دستی داشته باشد.

### ۳. روش کار گام به گام

مرحله ۰: نکات ایمنی

خطر	نکته ایمنی
لامپ داغ و فشار قوی	لامپ هالوژن بسیار داغ می‌شود. قبل از تعویض حتماً کابل را از برق بکشید و ۲۰-۳۰ دقیقه صبر کنید تا خنک شود
آلودگی نمونه	ظروف کشت سلول و پلیت‌ها حاوی محیط کشت استریل هستند. دستکش بپوشید و از تماس نوک عدسی با مایع نمونه خودداری کنید
آسب فیزیکی (Crash)	در حین فوکوس، مراقب باشید عدسی به کف پلیت برخورد نکند. همیشه فوکوس را با دور کردن عدسی از نمونه شروع کنید
مواد شیمیایی	برای تمیزکاری عدسی‌ها از اتانول ۷۰٪ استفاده کنید. هرگز از استون استفاده نکنید زیرا چسب نگهدارنده لنزها را حل می‌کند

#### تجهیزات حفاظت فردی (PPE) اجباری:

- دستکش نیتریل (بدون پودر) ✓
- روپوش آزمایشگاهی ✓
- عینک ایمنی ✓

#### مرحله ۱: آماده‌سازی و راه‌اندازی

۱. گرم شدن: اگر دستگاه سرد است، اجازه دهید به دمای اتاق برسد. رطوبت و سرمای اضافی می‌تواند عدسی‌ها را بخار کند.
۲. اتصال برق: کابل برق را به پریز متصل کرده و دستگاه را روشن کنید. لامپ هالوژن معمولاً با کلید Rocker در جلوی پایه روشن می‌شود.
۳. شدت نور: لغزنده یا دیال 亮度 را طوری تنظیم کنید که دید راحتی داشته باشید. روشنایی بیش از حد باعث خستگی چشم می‌شود.
۴. تنظیم فاصله بین دو چشم: (IPD) از چشمی نگاه کنید. دو لوله چشمی را به سمت داخل یا خارج حرکت دهید تا جایی که یک میدان دید دایره‌ای کامل (بدون هلال سیاه) ببینید.
۵. تنظیم دیوپتر (جبران بینایی): این مرحله برای رفع اختلاف بینایی دو چشم بسیار حیاتی است:

- حلقه دیوپتر روی هر دو چشمی را روی صفر قرار دهید.
- با عدسی ۱۰ برابر روی نمونه فوکوس کنید.
- چشم چپ را ببندید. با حلقه دیوپتر چشمی راست، تصویر را واضح کنید.
- چشم راست را ببندید. با حلقه دیوپتر چشمی چپ، تصویر را واضح کنید.

#### مرحله ۲: بارگذاری نمونه

نمونه (مانند فلاسک کشت سلول یا پلیت) را روی **استیج (Stage)** قرار دهید. برخلاف میکروسکوپ راست، استیج در این دستگاه ثابت است و عدسی‌ها بالا و پایین می‌روند.

**نکته حیاتی:** در میکروسکوپ معکوس، نمونه باید به گونه‌ای قرار گیرد که **رو به پایین** باشد تا سلول‌ها در پایین ظرف و نزدیک عدسی قرار گیرند.

#### مرحله ۳: فوکوس (اصول استاندارد)

بهترین روش برای جلوگیری از برخورد عدسی به نمونه، روش "**Focus Out**" (باز کردن فوکوس) است:

۱. از کوچک‌ترین بزرگنمایی (عدسی ۴ یا ۱۰ برابر) شروع کنید.
۲. در حالی که از چشمی نگاه نمی‌کنید (به دستگاه از پهلو نگاه کنید)، دسته فوکوس درشت (Coarse Focus) را بچرخانید تا عدسی به سقف یا دور از نمونه حرکت کند.
۳. سپس به آرامی دسته را در جهت مخالف بچرخانید تا عدسی به نمونه نزدیک شود (تا فاصله ۲-۳ میلی‌متری).
۴. حالا از چشمی نگاه کنید و با **دسته فوکوس ریز (Fine Focus)** تصویر را واضح کنید.
۵. برای بزرگنمایی بالاتر، گرداننده (Nosepiece) را بچرخانید و مجدداً فقط با فوکوس ریز (Fine Focus) وضوح تصویر را تنظیم کنید.

#### مرحله ۴: عکس‌برداری (برای مدل سه‌چشمی)

۱. **اتصال دوربین:** دوربین را به لوله خروجی (Trinocular Port) متصل کنید.
۲. **اهرم تقسیم نور:** اهرم یا حلقه مربوطه را روی بدنه سه‌چشمی تنظیم کنید:
  - اگر می‌خواهید تصویر هم در چشمی باشد و هم روی مانیتور، اهرم را روی حالت **۵۰/۵۰** قرار دهید.
  - اگر نور کافی نیست و فقط می‌خواهید تصویربرداری کنید، اهرم را روی **۱۰۰٪ دوربین** (یا موقعیت معادل آن) قرار دهید.
۳. **تنظیم نور و فوکوس:** برای تصویربرداری نهایی، شدت نور را کمی بیشتر کنید و با فوکوس ریز دقت وضوح را بالا ببرید.

#### مرحله ۵: خاموش کردن و جمع‌آوری

۱. کلید روشنایی را خاموش کنید. برای افزایش طول عمر لامپ هالوژن، در صورت عدم استفاده طولانی مدت، حتماً آن را خاموش کنید.
۲. کابل برق را از پریز بکشید.
۳. نمونه را از روی استیج بردارید و در جای مناسب (مانند انکوباتور) قرار دهید.
۴. گرد و غبار روی لنزها و بدنه را با کاور یا گون پاک کنید.
۵. لاگ بوک را تکمیل کنید (تاریخ، کاربر، نام نمونه، زمان استفاده و وضعیت دستگاه).

#### ۴. عیب‌یابی مشکلات رایج

مشکل	علت احتمالی	راه حل
میدان دید خیلی تاریک یا روشن است	تنظیم نبودن brightness یا تنظیم نبودن دیافراگم میدان (Field Diaphragm)	شدت نور را تنظیم کنید. دیافراگم میدان را بازتر ببندید.
تصویر دوتایی یا خستگی چشم	فاصله بین دو چشمی (IPD) یا دیوپتر به درستی تنظیم نشده است	مرحله تنظیم IPD و دیوپتر را مجدداً انجام دهید.
فوکوس در بزرگنمایی بالا به هم می‌ریزد	نمونه وارونه (upside down) قرار گرفته است یا ضخامت ظرف کشت خیلی زیاد است	نمونه را برگردانید (سمت سلول‌ها رو به پایین). اگر ظرف دارای ته ضخیم است، از ظروف مخصوص کشت سلول (با کف نازک) استفاده کنید.
گرد و غبار یا لکه داخل تصویر دیده می‌شود	چشمی یا لنز شیئی کثیف است	با دستمال مخصوص لنز (Lens Paper) و اتانول ۷۰٪ لنزها را تمیز کنید. از دستمال کاغذی معمولی استفاده نکنید.
لامپ نمی‌سوزد	لامپ سوخته یا فیوز معیوب است	دستگاه را خاموش کنید. پس از خنک شدن، لامپ را تعویض کنید. فیوز پشت دستگاه را چک کنید.

#### ۵. نگهداری و تمیزکاری

- تمیزکاری هفتگی لنزها: برای اطمینان از کیفیت تصویر، به آرامی با دستمال مخصوص لنز آغشته به اتانول ۷۰٪ لنزهای شیئی و چشمی را تمیز کنید. از الکل صنعتی یا تینر استفاده نکنید.
  - تعویض لامپ:
۱. دستگاه را از برق بکشید و بگذارید خنک شود.
  ۲. درپوش محفظه لامپ را باز کنید.
  ۳. لامپ قدیمی را خارج کنید. لامپ جدید را با دست خالی لمس نکنید؛ روغن دست باعث سوختن زود هنگام لامپ می‌شود. از پارچه یا دستمال استفاده کنید.

- تمیزکاری لکه‌ها: در صورت ریختن نمونه روی استیج، بلافاصله با الکل ۷۰٪ تمیز کنید و خشک نمایید.
- سرویس دوره‌ای: توصیه می‌شود سالی یک بار توسط تکنسین مجرب سرویس شود تا کالیبراسیون و تمیزی داخلی بررسی شود.

## ✦ جمع‌بندی نهایی

میکروسکوپ معکوس سه‌چشمی یکی از کلیدی‌ترین ابزارها در رصد سلول‌های زنده و انجام آزمایش‌های دینامیک سلولی است. با رعایت اصول زیر می‌توانید بیشترین بهره را از این دستگاه ببرید:

۱. **نمونه را درست قرار دهید** - همیشه اطمینان حاصل کنید نمونه در ظرف مخصوص کشت سلول است و سطح نمونه به سمت پایین (نزدیک عدسی) باشد.
۲. **از قانون "Focus Out" استفاده کنید** - هرگز در ابتدا عدسی را به سمت نمونه پایین نیاورید. ابتدا فاصله را زیاد کنید تا از برخورد جلوگیری شود.
۳. **تمیزی اولویت اول** - قبل از شروع، لنزها را چک کنید. استفاده از دستمال مخصوص لنز اجباری است، از دستمال کاغذی استفاده نکنید.
۴. **استفاده از خروجی سه‌چشمی** - این قابلیت به خصوص برای گرفتن خروجی تصاویر با کیفیت از پروسه‌های طولانی مدت (مانند Time-lapse) بسیار کارآمد است.
۵. **تنظیمات دیوپتر و -IPD** انجام صحیح این تنظیمات از خستگی چشم در کارهای طولانی جلوگیری می‌کند.