บทปฏิบัติการที่ 1
กล้องจุลทรรศน์และการใช้กล้องจุลทรรศน์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาส่วนประกอบที่สำคัญของกล้องจุลทรรศน์ และหลักการพื้นฐานในการทำงานของส่วนประกอบดังกล่าว
2. เพื่อศึกษาระเบียบวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์อย่างถูกต้อง
3. เพื่อทราบวิธีการเก็บและบำรุงรักษากล้องจุลทรรศน์ให้อยู่ในสภาพที่ดี

ความนำ

กล้องจุลทรรศน์เป็นเครื่องมือวิทยาศาสตร์ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาวิชาด้านชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถเห็นรายละเอียดของโครงสร้างด้วยตาเปล่าได้ กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป เป็นแบบที่เรียกว่า **กล้องจุทรรศน์เลนส์ประกอบ(compound microscope)**ที่ให้กำลังขยายสูงมาก เนื่องจากประกอบด้วยชุดของเลนส์ที่มีขนาดและคุณภาพแตกต่างกัน ชุดแรกคือ **เลนส์ใกล้วัตถุ(objective lens)** ชุดที่สองคือ **เลนส์ใกล้ตา(eyeplece** หรือ **ocular lens)** ปัจจุบันมีการปรับปรุงและประดิษฐ์กล้องจุลทรรศน์ในแบบต่างๆ ตามวัตถุประสงค์ในการใช้งาน แต่มีหลักการพื้นฐานในการส่องขยายขนาดวัตถุคล้ายคลึงกับกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ ต่างกันเฉพาะชนิดของเลนส์และแหล่งกำเนิดแสงในระบบการส่องสว่างเท่านั้น ตัวอย่างของกล้องเหล่านี้คือ **bright-field** microscope, **dark-field** microscope, **phase contrast** microscope, **fluorescence** microscope, **ultraviolet** microscope และ **electron** microscope เป็นต้น

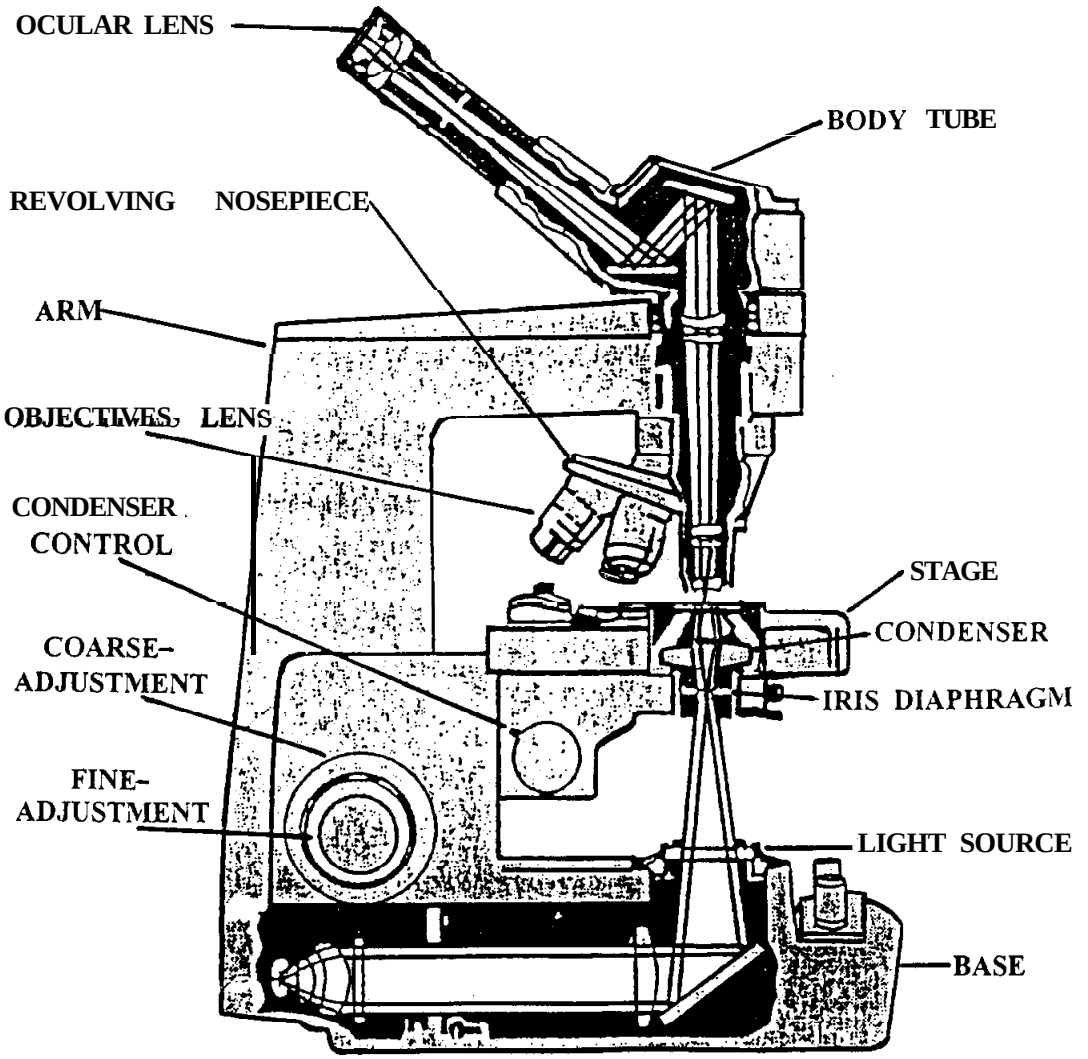
1.1 ส่วนประกอบของกล้องจุลทรรศน์

กล้องจุลทรรศน์ชนิดต่างๆ จะมีส่วนประกอบพื้นฐานคล้ายกัน แตกต่างกันที่รายละเอียดซึ่งเพิ่มมาเพื่อให้มีประสิทธิภาพและคุณภาพเหมาะสมกับลักษณะการใช้งาน โดยทั่วไปมีส่วนประกอบหลัก(รูป 1-1) ดังนี้

1.1.1 **ฐาน(base)** คือส่วนล่างสุดของกล้องจุลทรรศน์ทำหน้าที่รองรับส่วนอื่นของกล้องและช่วยให้กล้องตั้งอยู่อย่างมั่นคง มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปกลม รูปเกือกม้า และรูปสี่เหลี่ยม เป็นต้น

1.1.2 **แหล่งกำเนิดแสง(light source)**(รูป 1-2) คือส่วนที่ให้ความสว่างกับกล้องจุลทรรศน์ โดยทั่วไปเป็นหลอดไฟติดตั้งไว้ประกอบอยู่ที่ฐาน(built-in illuminator)ให้ลำแสงพุ่งขึ้นไปสู่ **คอนเดนเซอร์(condenser)**โดยตรง หรือใช้กระจกเงา(mirror) สะท้อนแสงจากภายนอก(แสงจากหลอดไฟ, แสงอาทิตย์)กล้องจุลทรรศน์ให้เข้าสู่ condenser ก็ได้ กระจกเงาที่ใช้มี 2 ด้าน คือ ด้านเรียบ และด้านเว้า ด้านเว้าสะท้อนแสงได้มากกว่าด้านเรียบ กล้องจุลทรรศน์ในปัจจุบันมักจะสามารถใช้กระจกเงาหรือหลอดไฟแทนก็ได้

รูป 1-1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ

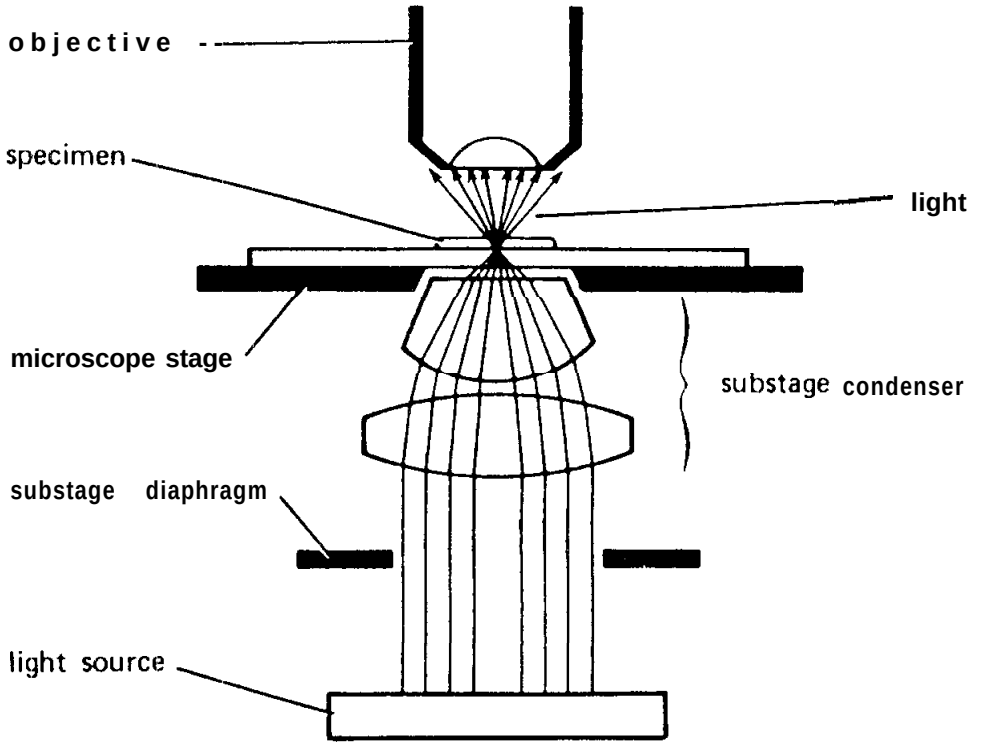


1.1.3 **ไอริสไดอะแฟรม(Iris diaphragm)** มีลักษณะเป็นแผ่นโลหะจัดเรียงให้เลื่อนได้ตามแนวนอนในลักษณะคล้ายม่าน มีตำแหน่งอยู่ใต้ **substage condenser**(รูป 1-2) ทำหน้าที่บังคับแสงจาก แหล่งกำเนิดแสงให้ผ่านเข้าสู่ substage condenser และเลนส์ใกล้วัตถุมาก-น้อยตามต้องการ

1.1.4 **คอนเดนเซอร์** คือเลนส์รวมแสง บางทีเรียกว่า substage condenser เป็นเลนส์ชุดที่ติดอยู่เหนือแหล่งกำเนิดแสงและอยู่ใต้แท่นวางวัตถุ ทำหน้าที่รวมแสงจากแหล่งกำเนิดแสง (ที่ผ่าน iris diaphragm ขึ้นมา)ให้มีความเข้มและหักเหแสงไปรวมกันที่วัตถุมากหรือน้อยตามต้องการ โดยปรับระดับ condenser ให้สูง-ต่ำด้วย ปุ่มปรับเลนส์รวมแสง(**condenser controlling knob**)

1.1.5 **แท่นวางวัตถุ(stage)**หรือสไลด์ตัวอย่างที่จะศึกษา ตรงกลางมีรูกลมให้แสงส่องผ่านจาก iris diaphragm และ condenser ผ่านมายังวัตถุได้ ในกรณีของกล้องแบบเก่า บนแท่นจะมี spring clip 1 คู่ ทำหน้าที่ยึดสไลด์กับ stage ในกรณีของกล้องแบบใหม่ แท่นได้รับการออกแบบมาให้มีที่ยึดสไลด์ติดแน่นกับแท่น แต่สามารถเลื่อนสไลด์ไป-มาตามแนวนอนได้ทั้ง 2 แกน(X และ Y) คือ ซ้าย-ขวา และหน้า-หลัง เรียกแท่นแบบนี้ว่า **mechanical stage**

รูป 1-2 ลักษณะแสงผ่าน substage condenser ไปยังวัตถุ



1.1.6 **อาร์ม(arm)** คือตัวกล้องที่ยึดอยู่ระหว่างฐานกับด้านบน มีลักษณะโค้ง เป็นแกนยึดส่วนต่างๆ ของกล้องไว้ให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง เพื่อให้ลำแสงผ่านส่วนต่างๆ เป็นเส้นตรงได้ ในกรณีที่ **ลำกล้อง(body tube)**ตั้งตรงในแนวดิ่ง อาร์มจะได้รับการออกแบบมาให้สามารถปรับลำกล้องและแท่นวางวัตถุจากสภาพปกติ(ลำกล้องตั้งตรงในแนวดิ่ง)โดยมี **inclination joint** เป็นข้อยึดฐานกับแท่นและอาร์มซึ่งมีลำกล้องติดอยู่ เพื่อให้เกิดความคล่องตัวในการดูภาพจากเลนส์ใกล้ตา

1.1.7 **ลำกล้อง** หรือ **mechanical tube** คือ ท่อกลวงที่ภายในใช้เป็นทางเดินของลำแสง ลำกล้องถูกยึดติดกับส่วนประกอบหลักอื่นดังกล่าวข้างต้นด้วยอาร์ม ปลายล่างของท่อติดตั้งไว้ด้วย **แป้นหมุนเปลี่ยน(revolving nosepiece)** ซึ่งเป็นส่วนที่มีเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่างกันติดตั้งไว้ ปลายด้านตรงข้ามกับ revolving nosepiece ภายในมี **ปริซึม(prism)** ทำหน้าที่หักเหลำแสงไปสู่เลนส์ใกล้ตา ลำกล้องมาตรฐานมีความยาว 160 มม. จะทำให้ภาพที่เห็น(**visual image**) อยู่ห่างจากตาประมาณ 10 นิ้ว หรือ 250 มม.

1.1.8 **ปุ่มปรับหาภาพ(adjustment knob)** คือวงล้อทำหน้าที่ปรับโฟกัส ติดตั้งอยู่บนอาร์ม มีกลไกทำให้ลำกล้องเลื่อนขึ้นและลง หรือทำให้แท่นวางวัตถุเคลื่อนที่ขึ้นลง ปรับหาระยะโฟกัสของเลนส์ใกล้วัตถุหรือหาระยะทำงานของเลนส์(**working distance**) เพื่อให้ได้ภาพของวัตถุชัดเจน มี 2 ชนิด คือ

(1) **coarse adjustment knob** วงล้อหยาบ ใช้ปรับหาระยะโฟกัสของเลนส์ใกล้วัตถุสามารถปรับได้ระยะทางมาก ควรใช้กับเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำ หรือกำลังขยายปานกลาง เนื่องจากระยะโฟกัสของเลนส์อยู่ห่างสไลด์

(2) **fine adjustment knob** วงล้อละเอียด ใช้ปรับหาระยะโฟกัสให้ละเอียดยิ่งขึ้น ปรับได้ระยะทางน้อย ควรใช้กับเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายสูง เนื่องจากระยะโฟกัสของเลนส์อยู่ใกล้สไลด์มาก ถ้าใช้วงล้อหยาบ อาจจะทำให้เลนส์ชนสไลด์ได้

1.1.9 **แป้นหมุนเปลี่ยน** เป็นส่วนที่อยู่ปลายล่างของลำกล้อง มีลักษณะเป็นแผ่นกลมมีช่องสำหรับใส่เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยายขนาดต่างกัน สามารถหมุนเปลี่ยนกำลังขยายต่างกันได้ เมื่อหมุนเลนส์ใกล้วัตถุเข้าที่แล้ว ลำแสงที่ส่องผ่านวัตถุจะเข้าสู่เลนส์ใกล้วัตถุ ผ่านลำกล้องแล้วถูกส่งไปยังเลนส์ใกล้ตา และนัยน์ตาของผู้ดูได้

1.1.10 **เลนส์ใกล้วัตถุ** สวมเป็นชุดอยู่กับแป้นหมุนเปลี่ยน ทำหน้าที่ขยายภาพของวัตถุบนแท่นวางวัตถุโดยนำแสงที่ผ่านวัตถุเข้าสู่เลนส์ใกล้วัตถุมาขยายให้เกิดภาพจริงใน ocular tube เป็นชิ้นส่วนที่สำคัญที่สุดของกล้องจุลทรรศน์ โดยทั่วไปได้รับการติดตั้งไว้ด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยาย 3 ขนาด คือ

(1) **low power objective** กำลังขยายต่ำ เช่น **4 X**

(2) **medium power objective** กำลังขยายปานกลาง เช่น **10 X**

(3) **high power objective** กำลังขยายสูง มี 2 ชนิด คือ

(i) **high dry objective** ไม่ต้องใช้กับน้ำมัน เช่น **40 X**

(ii) **oil immersion objective** ต้องใช้กับน้ำมัน เช่น **100 X**

1.1.11 **เลนส์ใกล้ตา** อยู่ปลายด้านบนของลำกล้องประกอบด้วยเลนส์ 2 อัน เลนส์ที่อยู่ด้านบนเรียกว่า **eye lens** เลนส์ที่อยู่ด้านล่างเรียกว่า **field lens** ทำหน้าที่ขยายภาพจริงของวัตถุซึ่งเกิดจากการขยายของเลนส์ใกล้วัตถุให้เกิดภาพเสมือนขนาดขยายอยู่ห่างจากตา 250 มม. หรือ 10 นิ้ว

ภาพจริงของวัตถุจะเกิดใน ocular tube เมื่อนำเส้นลวดขนาดเล็ก ยาว 3-4 มม. ติดไว้บริเวณนี้ สามารถใช้เป็นเข้มชี้ภาพของวัตถุได้ มีกำลังขยายขนาดประมาณ 5 X ถึง 20 X

กล้องที่มี ocular lens 1 ชุด เรียกว่า **monocular compound microscope**

กล้องที่มี ocular lens 2 ชุด เรียกว่า **binocular compound microscope**

กล้องที่มี ocular lens 3 ชุด เรียกว่า **triocular compound microscope**

สำหรับ triocular compound microscope จะมี ocular lens ชุดที่ 3 อยู่ในแนวดิ่งเพื่อติดตั้งอุปกรณ์ถ่ายรูป

1.2 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์

การทำงานของกล้องจุลทรรศน์มีพื้นฐานอยู่บนหลักการเรื่องแสงผ่านเลนส์ของวิชาฟิสิกส์ เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานของกล้องจึงควรทราบข้อมูลพื้นฐานดังต่อไปนี้

1.2.1 **เลขค่าปากช่อง(numerical aperture** หรือ **N.A.**) เป็นค่าความกว้างของกรวยแสงที่ผ่านจากวัตถุเข้าสู่เลนส์ใกล้วัตถุ ถือเป็นค่าคงที่ซึ่งแสดงถึงคุณสมบัติของเลนส์ที่สามารถรวบรวมหรือรับแสงที่ส่องมายังเลนส์ได้เพียงใด บอกถึงความสามารถในการแยกรายละเอียดของวัตถุ เลนส์ที่มีค่า N.A. สูง แยกรายละเอียดวัตถุได้ดี เลนส์ใกล้วัตถุที่ให้กำลังขยายต่างกันมีเลขค่าปากช่องต่างกันตามตาราง 1-1 เลขค่าปากช่องคำนวณได้จากสูตร

$N.A. = n \sin \Theta$

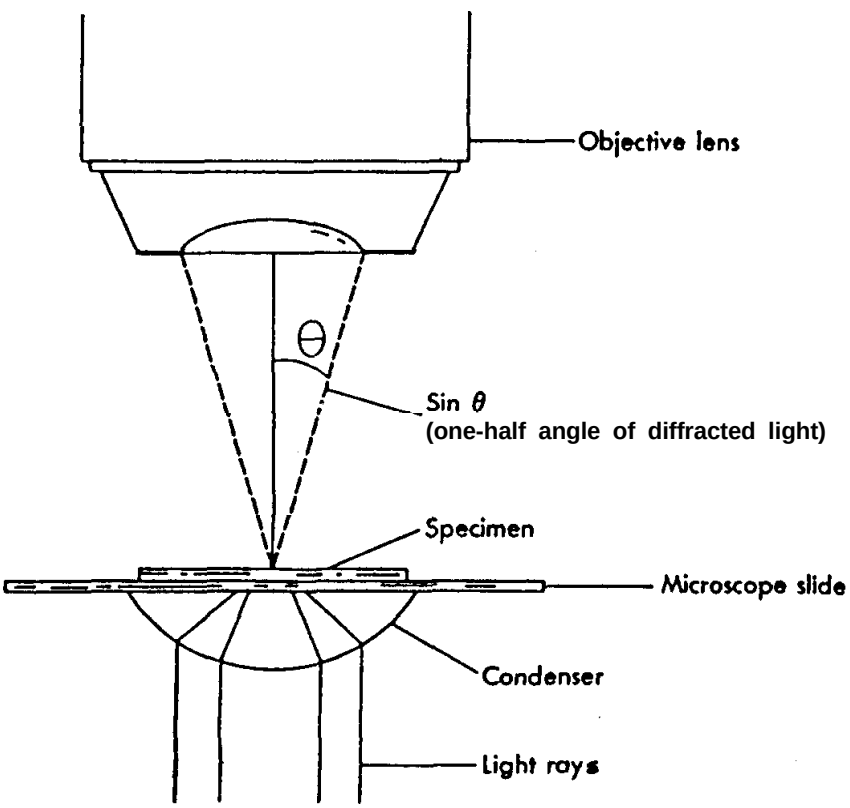
n = ดัชนีหักเหของแสงในตัวกลางระหว่างเลนส์ใกล้วัตถุกับวัตถุ

$\sin \Theta$ = ค่า sin ของมุมที่กว้างเป็นครึ่งหนึ่งของมุมยอดกรวยแสง ที่ผ่านจากวัตถุเข้าสู่เลนส์ใกล้วัตถุ

ตาราง 1-1 แสดงคุณสมบัติของเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่างๆ ที่ติดตั้งไว้กับกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้สำหรับงานประจำในห้องปฏิบัติการ

ชนิดของเลนส์ใกล้วัตถุ	กำลังขยาย	N.A.	ความหนาของกระจกปิด (มม.)	ระยะทำงานของเลนส์ใกล้วัตถุ (มม.)	ขนาดพื้นที่หน้าเลนส์ใกล้วัตถุ
low power	4 x	0.10		19.87	3.35
medium power	10x	0.25		5.40	1.34
high(dry) power	40 X	0.65	0.17	0.39	0.335
oil immersion	100x	1.3		0.1 1	0.134

รูป 1-3 แสดงค่า sin θ ที่ใช้คำนวณค่า N.A.



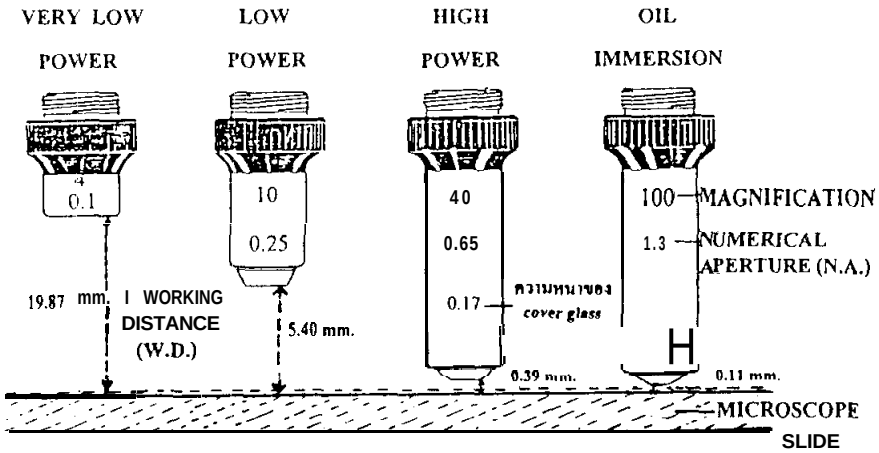
1.2.2 **ระยะทำงานของเลนส์(working distance)** (รูป 1-4) เป็นระยะห่างระหว่างผิวหน้าของเลนส์ใกล้วัตถุกับวัตถุบนแท่นวางวัตถุในขณะที่เห็นภาพของวัตถุชัดเจนที่สุด หรือเรียกว่า **ระยะโฟกัส**

เลนส์ใกล้วัตถุ ที่มีกำลังขยายต่ำ จะมีระยะทำงานยาว พื้นที่หน้าเลนส์กว้าง

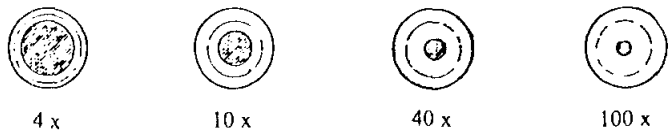
เลนส์ใกล้วัตถุ ที่มีกำลังขยายสูง จะมีระยะทำงานสั้น พื้นที่หน้าเลนส์แคบ

ให้ใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำ หาภาพของวัตถุได้ก่อนเนื่องจากมีกำลังขยายต่ำจะมองเห็นภาพได้บริเวณกว้าง แล้วจึงเปลี่ยนไปใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายปานกลาง และสูงตามลำดับ ขนาดของภาพจะขยายขึ้น แต่บริเวณที่เห็นจะแคบลง

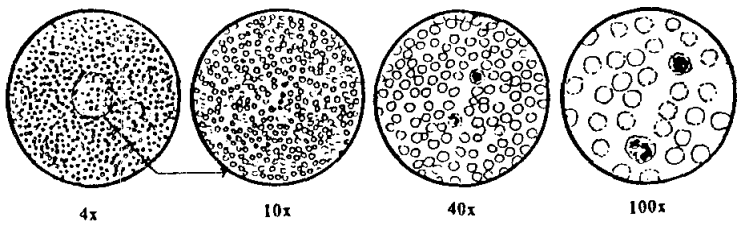
รูป 1-4 แผนภาพแสดงคุณสมบัติของเลนส์ใกล้วัตถุ ก. ระยะการทำงานของเลนส์ใกล้วัตถุ ข. ขนาดพื้นที่หน้าเลนส์ใกล้วัตถุ ค. ภาพที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ซึ่งขยายโดยเลนส์ใกล้วัตถุ



ก. ระยะการทำงานของเลนส์ใกล้วัตถุ



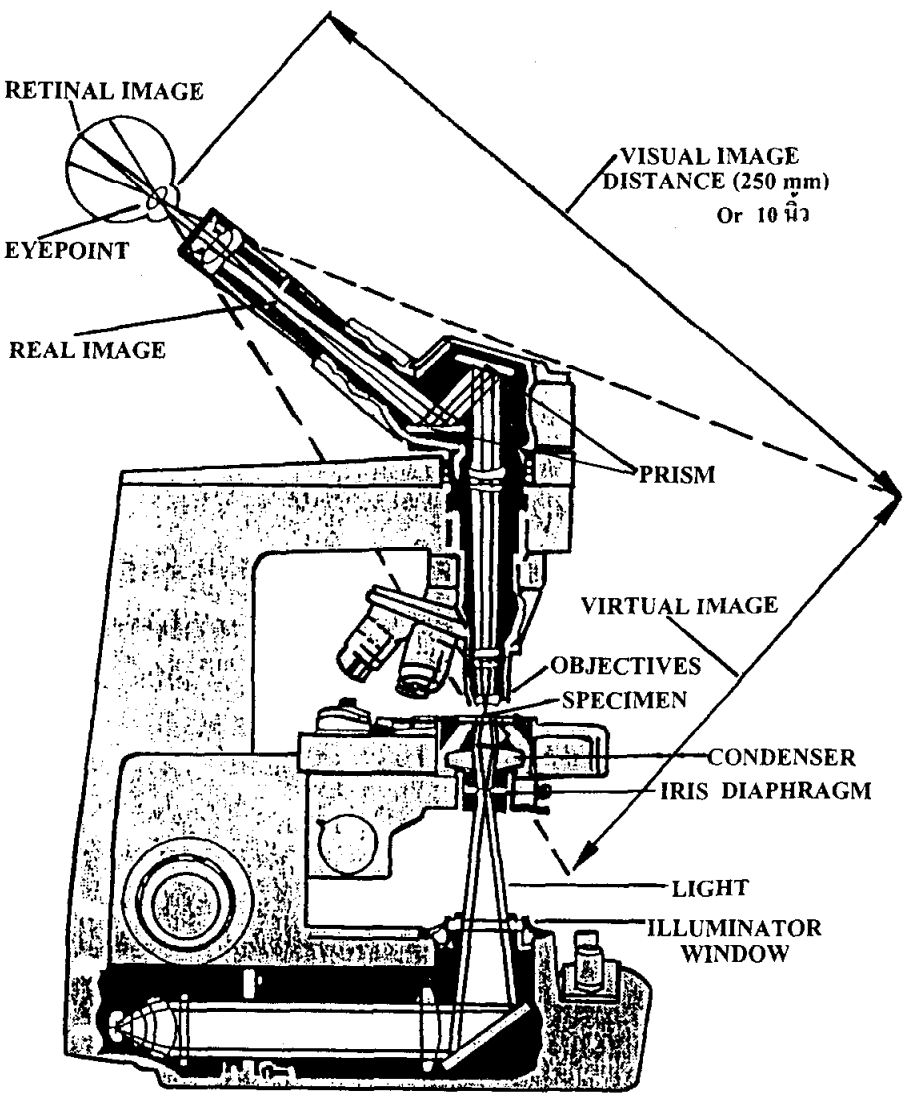
ข. ขนาดหน้าเลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยายต่างๆ



ค. ภาพที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ซึ่งขยายโดยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่างๆ

ใช้เลนส์ที่มีความยาวโฟกัสสั้นที่สุด เป็นเลนส์ใกล้วัตถุ เพื่อให้ได้ภาพที่กำลังขยายมากที่สุด โดยให้ระยะวัตถุอยู่นอกระยะความยาวโฟกัส แต่ไม่มากกว่า 2 เท่าของความยาวโฟกัส(2f > u > f) เพื่อให้เกิด **ภาพจริง(real image)** (รูป 1-5) ขนาดขยายภายใน body tube ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นวัตถุจริงของเลนส์ใกล้ตา โดยอยู่ในระยะโฟกัสของเลนส์ใกล้ตา ซึ่งเป็นเลนส์นูนความยาวโฟกัสสั้น เพื่อให้เกิด **ภาพเสมือน(visual image)**เป็นภาพที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง ที่ระยะ 250 มม. หรือ 10 นิ้ว ซึ่งเป็นระยะที่สั้นที่สุดของการเห็นชัดด้วยตา

รูป 1-5 แผนภาพแสดงทางเดินของแสงและการเกิดภาพในกล้องจุลทรรศน์



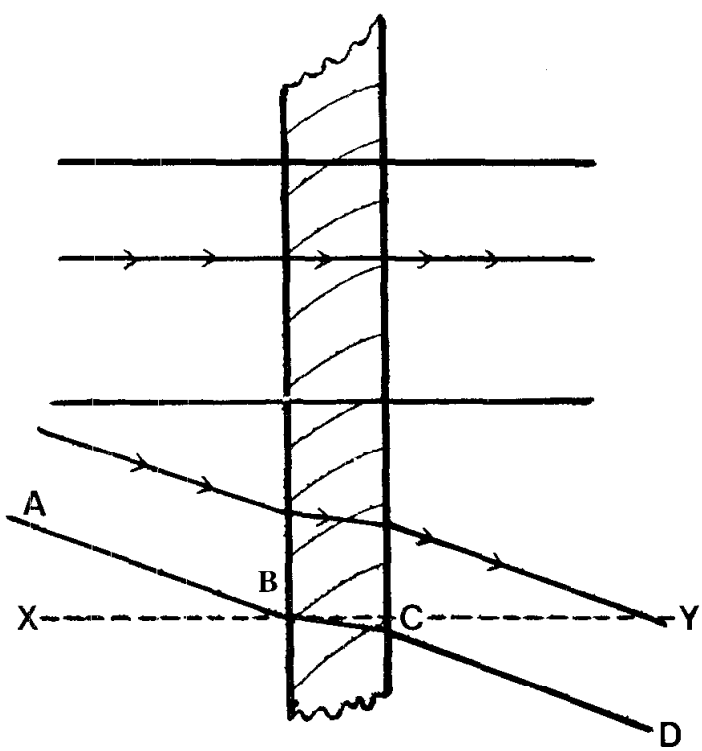
เมื่อแสงเดินทางผ่านตัวกลางที่มีค่าดัชนีหักเหของแสงต่างกัน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงแนวทางเดินของแสงเรียกว่า **เกิดการหักเหของแสง(refraction of light)**

เมื่อลำแสงเดินทางผ่านอากาศเข้าสู่แก้วในแนวตั้งฉาก(XY) (รูป 1-6) ทิศทางของลำแสงจะไม่เปลี่ยนแปลง ถ้าลำแสงไม่ทำมุมฉากกับแก้วจะเกิดการหักเหของแสง(AD) ค่าดัชนีหักเหของแสงในตัวกลางชนิดต่างๆ ศึกษาจากตาราง 1-2

ตาราง 1-2 ค่าดัชนีหักเหของแสงในตัวกลางชนิดต่าง ๆ

ตัวกลาง	ดัชนีหักเหของแสง(n)
อากาศ	1
น้ำ	1.33
mineral (paraffin) oil	1.47
cedar wood oil	1.52
แก้ว	1.52

รูป 1-6 แผนภาพแสดงการหักเหของแสง

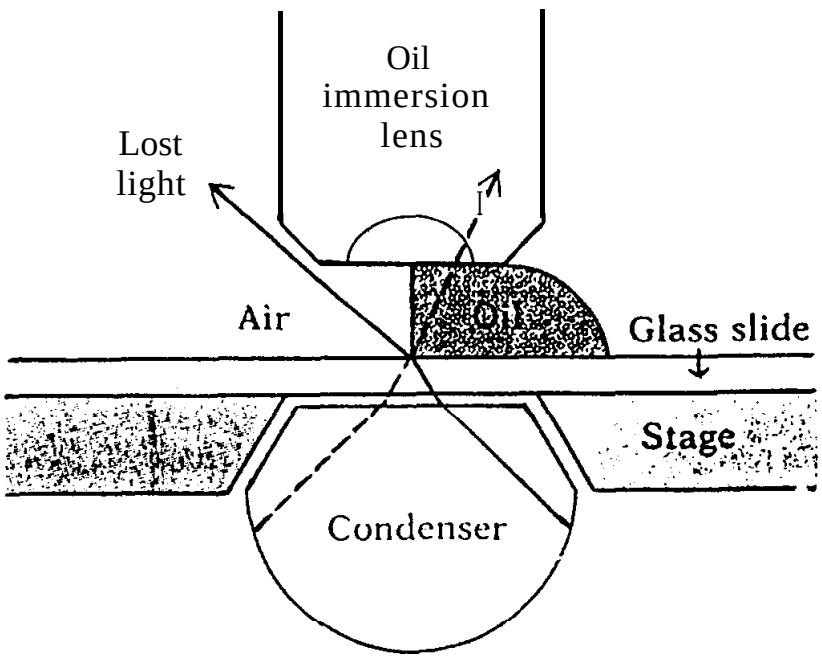


1.2.3 **การเพิ่มค่า n** ประสิทธิภาพของเลนส์ใกล้วัตถุทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยการเพิ่มค่า n หรือค่า sin Θ ค่าของ n หาได้จากตาราง 1-2 แล้วนำมาแทนค่าลงในสูตร N.A. = n sin Θ

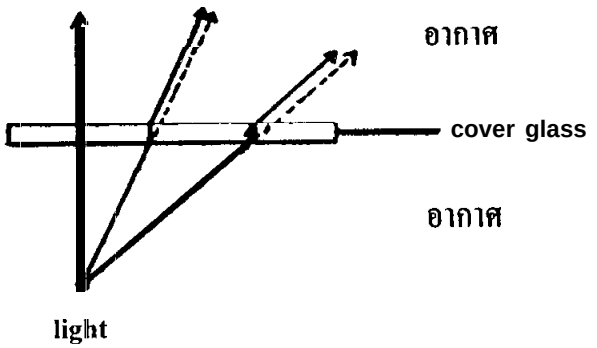
เมื่อตัวกลางหน้าเลนส์ใกล้วัตถุเป็นอากาศ ลำแสงที่เดินทางผ่านสไลด์มาสู่อากาศจะเกิดการหักเหขึ้น เนื่องจากสไลด์และอากาศมีค่าดัชนีหักเหของแสงต่างกัน ดังนั้นความเข้มของแสงที่ผ่านจากวัตถุเข้าสู่เลนส์ใกล้วัตถุจะลดลง ในกรณีที่ใช้เลนส์ใกล้วัตถุขนาดกำลังขยายต่ำ หน้าเลนส์จะกว้างสามารถรับแสงได้เพียงพอที่จะทำให้เกิดภาพที่ชัดเจน แต่ในกรณีที่ใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่มีขนาดกำลังขยายสูง โดยเฉพาะ oil immersion objective lens หน้าเลนส์จะมีความโค้งมาก พื้นที่รับแสงจึงแคบ รับแสงได้ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดภาพที่ชัดเจน ดังนั้น จึงต้องหยดน้ำมันลงบนสไลด์หรือกระจกปิด(รูป 1-7) ซึ่งมีค่าดัชนีหักเหของแสงใกล้เคียงหรือเท่ากับสไลด์และเลนส์ เพื่อลดการหักเหของแสงหรือป้องกันการหักเหของแสง จะช่วยให้เลนส์มีประสิทธิภาพดีขึ้น(N.A. เพิ่มขึ้น)

นอกจากนี้ความหนาของกระจกปิดมีผลต่อภาพที่เกิดด้วย เนื่องจากเมื่อแสงเดินทางผ่านกระจกปิดสู่อากาศจะเกิดการหักเห(รูป 1-8) ในกล้องจุลทรรศน์ทั่วไปมักจะกำหนดความหนาของกระจกปิดที่เหมาะสมกับเลนส์ใกล้วัตถุไว้ กระจกปิดมีความหนาตั้งแต่ 0.15-0.22 มม.

รูป 1-7 แผนภาพการใช้ immersion oil แทนที่อากาศเพื่อลดการหักเหของแสง



รูป 1-8 แผนภาพทางเดินของลำแสงผ่านกระจกปิดสู่อากาศจะเกิดการหักเห

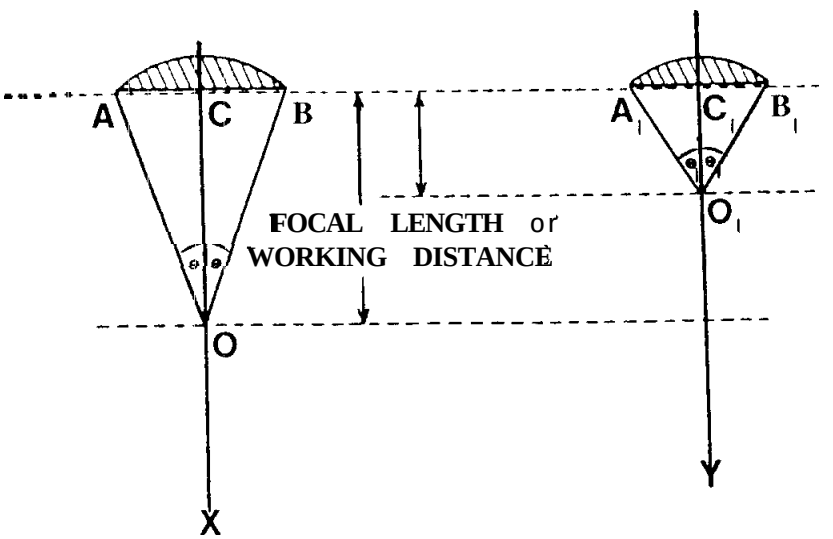


1.2.4 **การเพิ่มค่า sin θ** เลนส์ที่มีระยะโฟกัส(**focal length**) สั้นกว่าจะมีค่า sin θ มากกว่าดังแสดงในรูป 1-9

ค่าของ sin θ คำนวณได้จากสูตร

$$\sin \theta_1 = \frac{A_1C_1}{A_1O_1} > \sin \theta = \frac{AC}{AO}$$

รูป 1-9 แผนภาพเปรียบเทียบความผกผันระหว่าง FOCAL LENGTH หรือ WORKING DISTANCE และค่า sin θ



ดังนั้นเมื่อเลนส์มีระยะโฟกัสสั้น จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้น(N.A. เพิ่มขึ้น) ประสิทธิภาพของกล้องจุลทรรศน์ ขึ้นอยู่กับค่า **resolving power** หรือ **resolution(r)** ซึ่งหมายถึงความสามารถของระบบเลนส์หรือกล้องจุลทรรศน์ที่จะแสดงหรือแยกรายละเอียด โครงสร้างของวัตถุที่อยู่ชิดกัน ออกจากกันอย่างชัดเจน ค่านี้ถูกจำกัดโดยปัจจัย 2 อย่าง คือ ขนาดความยาวคลื่นแสง(λ) และ N.A. ของเลนส์

$$r = \frac{\lambda}{2 \times \text{N.A. ของ objective}}$$ (เมื่อกล้องมี condenser)

หรือ $$r = \frac{\lambda}{\text{N.A. ของ objective} + \text{N.A. ของ condenser}}$$

เนื่องจากมนุษย์มองเห็นวัตถุได้เมื่อวัตถุมีขนาดใหญ่กว่าครึ่งหนึ่งของขนาดความยาวคลื่นแสงที่ใช้ ดังนั้นถ้าใช้คลื่นแสงที่ขนาดสั้นมากจะสามารถมองเห็นวัตถุได้ขนาดเล็กมากด้วย

แสงที่ตามองดูได้ คือ **visible light** มีขนาดความยาวคลื่น ตั้งแต่ 400-700 nm. หน่วยวัดความยาวเปรียบเทียบศึกษาได้จากตาราง 1-3

ตาราง 1-3 เปรียบเทียบหน่วยวัดความยาวของคลื่นแสง

Angstroms(A)	Nanometers(nm)	Micrometers(μm)	Millimeters(mm)
1	0.1	0.0001	0.0000001
10	1.0	0.001	0.000001
10,000	1,000.0	1.00	0.001
10,000,000	1,000,000.0	1,000.0	1.00

ดังนั้น เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope สามารถมองเห็นวัตถุได้ขนาดเล็กที่สุด ประมาณ 0.15-0.21 μm คำนวณได้ดังนี้คือ

$$r = \frac{400}{2 \times 1.3}$$ (N.A.=1.3, ขนาดความยาวคลื่นแสงช่วง visible light สั้นที่สุด = 400 nm)

= 153nm

= 0.15 μm

$$r = \frac{550}{2 \times 1.3}$$ (N.A. = 1.3, ขนาดความยาวคลื่นแสงช่วง visible light เฉลี่ย = 550 nm)

= 211 nm

= 0.21 μm

1.2.5 **การหากำลังขยายของภาพ** ที่ได้จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เมื่อ body tube ยาว 160 มม.

กำลังขยายของภาพ = กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ X กำลังขยายของเลนส์ใกล้ตา

ขอบเขตของกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope มีขีดจำกัดขึ้นอยู่กับขนาดหรือระยะสั้นที่สุดที่แยกได้ด้วยตา(1-2 มม.) และระยะสั้นที่สุดที่แยกได้ด้วยเลนส์ใกล้วัตถุ คือค่า resolving power (เมื่อ ใช้ oil immersion objective lens)

$$\text{กำลังขยายสูงสุดของกล้องจุลทรรศน์} = \frac{\text{ระยะสั้นที่สุดที่แยกได้ด้วยตา}}{\text{ระยะสั้นที่สุดที่แยกได้ด้วยเลนส์ใกล้วัตถุ}}$$

$$= \frac{2 \times 10^{-2} \text{ ซม.}}{1.5 \times 10^{-5} \text{ ซม.}}$$

$$\cong 1300$$

$$\cong 1000 \times 1.3$$

∴ กำลังขยายสูงสุดของกล้องจุลทรรศน์ มีค่า ≅ 1000 X N.A.

ดังนั้นการเลือกใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้ตาจึงมีขีดจำกัด คือ

เลนส์ใกล้วัตถุ กำลังขยาย		**เลนส์ใกล้ตา** กำลังขยาย
4X 0.1 ใช้กับกำลังขยายสูงสุดไม่เกิน	$= \frac{1000 \times 0.1}{4}$	25X
10X 0.25 ใช้กับกำลังขยายสูงสุดไม่เกิน	$= \frac{1000 \times 0.25}{10}$	**25X**
40X 0.65 ใช้กับกำลังขยายสูงสุดไม่เกิน	$= \frac{1000 \times 0.65}{40}$	**16.25 X**
100X 1.3 ใช้กับกำลังขยายสูงสุดไม่เกิน	$= \frac{1000 \times 1.3}{100}$	**13x**

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. สไลด์ถาวรของวัตถุตัวอย่าง
3. น้ำมัน (immersion oil หรือ cedar wood oil)
4. กระดาษเช็ดเลนส์

ระเบียบวิธี

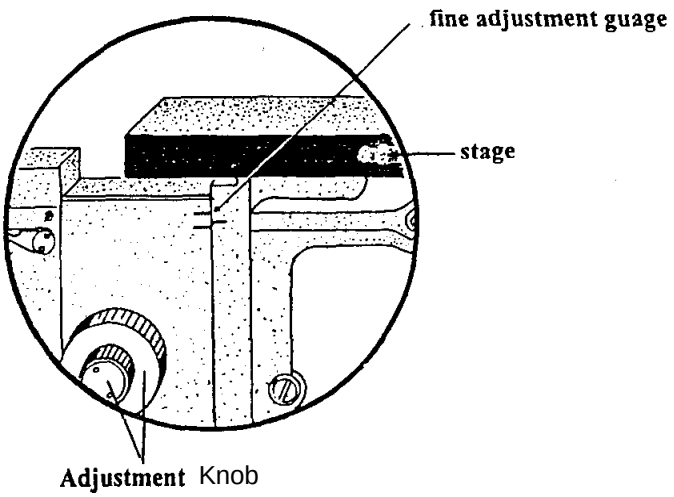
ในบทปฏิบัติการบทนี้ เป็นการศึกษาส่วนประกอบต่างๆ หลักการพื้นฐานในการทำงานและการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด bright-field microscope

1. **วิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์** ควรดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1.1 การนำกล้องจุลทรรศน์ออกจากตู้และการเก็บเข้าที่ต้องใช้มือข้างหนึ่งจับที่ arm และมืออีกข้างหนึ่งรองรับที่ฐาน ดึงให้ชิดลำตัว ให้กล้องอยู่ในสภาพตั้งตรง อุปกรณ์ของกล้องจะไม่ได้หลุดหรือตกขณะเคลื่อนย้าย แล้ววางลงบนพื้นที่เรียบและมั่นคง ห้ามดึงหรือดันกล้องเวลาเคลื่อนย้าย จะทำให้ส่วนประกอบที่บอบบางเสียหายได้

1.2 หมุน revolving nosepiece ให้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำสุด(4X) มาอยู่ตรงกลางแท่นวางวัตถุ ปรับ condenser ให้ขึ้นสูงสุด จัดแสงให้เข้าสู่ condenser โดยใช้นิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้จับที่ขอบกระเงา ปรับมุมกระจกเงาให้สะท้อนแสงเข้าสู่ condenser ให้มากที่สุด โดยตาดูที่เลนส์ใกล้ตา ถ้าเป็นแสงจากหลอดไฟแสงจะพุ่งสู่ condenser โดยตรงจัดความเข้มของแสงโดยใช้ iris diaphragm

รูป 1-10 ภาพจำลองแสดงตำแหน่ง fine adjustment guage



1.3 ก่อนปรับภาพของวัตถุ ให้ดูบริเวณใต้แท่นวางวัตถุด้านขวา มีขีด 3 ขีด หรือ 3 จุด คือเกจปรับละเอียด(**fine adjustment gauge**) ต้องหมุนวงล้อละเอียดให้เกจอยู่ในตำแหน่งที่หนึ่งขีดอยู่กึ่งกลางสองขีด(รูป 1-10) เพื่อความสะดวกขณะใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40X และ 100X

1.4 นำสไลด์ของวัตถุที่จะศึกษาวางบนแท่นในช่องวางสไลด์ เลื่อนสไลด์ให้วัตถุอยู่กึ่งกลางช่องเปิดกลางแท่นบริเวณที่แสงส่องผ่านจาก condenser หมุนวงล้อหยาบเลื่อนแท่นขึ้นมาใกล้กับเลนส์ใกล้วัตถุมากที่สุดในขณะที่ตามองปลายเลนส์ใกล้วัตถุจากภายนอกกล้อง แล้วจึงดูที่เลนส์ใกล้ตา หาระยะโฟกัสของภาพโดยหมุนวงล้อหยาบเลื่อนแท่นให้ถอยห่างจากเลนส์ใกล้วัตถุ(คำนึงถึงระยะทำงานของเลนส์ใกล้วัตถุหรือระยะโฟกัสด้วยทุกครั้ง) เมื่อได้ภาพชัดเจนแล้วหมุนวงล้อละเอียดเพื่อปรับภาพให้ชัดเจนยิ่งขึ้น กรณีที่ดูด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายสูงก็ทำเช่นเดียวกัน แต่การหาระยะทำงานของเลนส์ใกล้วัตถุให้ใช้วงล้อละเอียดแทน

กรณีที่ความเข้มของแสงสว่างไม่พอเหมาะ ปรับช่อง iris diaphragm เพื่อบังคับแสงให้เข้า condenser พอเหมาะก่อน แล้วปรับระดับของ condenser เพื่อรวมแสงมายังวัตถุตามความต้องการ

1.5 การปรับหาภาพของวัตถุ ควรเริ่มต้นด้วยการใช้กำลังขยายต่ำก่อนทุกครั้ง แล้วจึงค่อยเปลี่ยนไปใช้กำลังขยายที่สูงขึ้นต่อไปตามลำดับ เมื่อต้องการเปลี่ยนกำลังขยายของ เลนส์ใกล้วัตถุ หมุนเปลี่ยนที่ revolving nosepiece เลื่อนเลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยายสูงเข้าแทน ปรับภาพให้ชัดเจนอีกครั้งด้วยวงล้อละเอียด โดยไม่ต้องหาระยะโฟกัสใหม่ เนื่องจากเลนส์ใกล้วัตถุทุกขนาดกำลังขยายจะเป็น parfocal กัน คือเมื่อเปลี่ยนขนาดกำลังขยายแล้วจะอยู่ในระยะโฟกัสของเลนส์ใหม่พอดี เนื่องจากมีการเพิ่มความยาวของท่อบรรจุเลนส์ใกล้วัตถุให้ยาวขึ้นเป็นสัดส่วนเท่ากับระยะทำงานของเลนส์ใกล้วัตถุที่สั้นลง(รูป 1-4) กล้องจุลทรรศน์ซึ่งเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายขนาดต่างๆ ไม่เป็น parfocal กัน เมื่อเปลี่ยนขนาดกำลังขยายต้องหาระยะโฟกัสใหม่ โดยเลื่อนแท่นให้ห่างออกจากเลนส์ใกล้วัตถุเสียก่อน แล้วหมุน revolving nosepiece เลื่อนเอา เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายขนาดที่ต้องการเข้าแทน ปรับหาระยะโฟกัสใหม่ และปรับภาพให้ชัดเจนตามระเบียบวิธีในข้อ 1.4

1.6 ถ้าต้องการส่องดูวัตถุด้วย oil immersion objective lens ให้เริ่มดูจากเลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยายต่ำก่อน เมื่อเห็นภาพชัดเจนแล้ว จึงหมุนเลนส์ใกล้วัตถุนั้นออก หยด immersion oil ลงบนสไลด์ หรือบนหน้าเลนส์ เลื่อนเอา oil immersion objective lens เข้าแทนก็จะอยู่ในระยะโฟกัสพอดี เนื่องจากเลนส์ใกล้วัตถุทั้งชุดเป็น parfocal กัน ปรับภาพให้ชัดเจนขึ้นด้วยวงล้อละเอียด

เมื่อใช้ oil immersion objective lens แล้ว หากต้องการเปลี่ยนกำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ หรือเปลี่ยนสไลด์ ให้เปลี่ยนจากกำลังขยาย 100X ไปหาอัน 4X เสมอ ถ้าเปลี่ยนจาก 100X ไปหา 40X น้ำมันอาจเปื้อนเลนส์ 40X ได้ เนื่องจากระยะทำงานของเลนส์ใกล้เคียงกันมาก

1.7 ในการดูกล้องจุลทรรศน์ แบบ monocular compound microscope นั้น ควรลืมตาทั้ง 2 ข้าง เพื่อไม่ให้กล้ามเนื้อตาด้านในด้านหนึ่งทำงานหนักเกินไป

2. วิธีการเก็บรักษาหลังจากเลิกใช้กล้องจุลทรรศน์

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์เป็นเครื่องมือที่มีราคาสูง นักศึกษาจึงควรระมัดระวังในการใช้และดูแลรักษาให้กล้องจุลทรรศน์อยู่ในสภาพที่ดี ด้วยการปฏิบัติดังนี้

2.1 นำสไลด์ออกจากแท่นวางวัตถุ อย่าวางทิ้งไว้

2.2 ทำความสะอาด เลนส์ใกล้วัตถุ เลนส์ใกล้ตาด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ห้ามใช้กระดาษชนิดอื่น

2.3 เช็ดหยดน้ำและของเหลวอื่นบนแท่นวางวัตถุให้แห้ง ระวังอย่าทำให้กล้องเปียก จะทำให้ราขึ้นได้

2.4 หมุนเลนส์ใกล้วัตถุที่มีขนาดกำลังขยายต่ำ ให้มาอยู่ตรงกลางแท่นวางวัตถุแล้วเลื่อนแท่นให้ลงมาอยู่ต่ำสุด

2.5 ปิด iris diaphragm ให้เล็กที่สุด

2.6 เลื่อน condenser ลงมาต่ำสุด ปรับกระจกเงาให้ตั้งอยู่ในแนวดิ่ง

2.7 หากมีที่ปรับความเข้มของแสง ต้องลดความเข้มของแสงลงจนสุดก่อนจึงปิดสวิตซ์ ถอดปลั๊กไฟ เก็บสายไฟให้เรียบร้อย

2.8 เก็บกล้องใส่ไว้ในตู้ เพื่อกันแสงแดด ฝุ่นละออง และมีสารดูดความชื้นด้วย

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 1

1. เพราะเหตุใดเมื่อใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายขนาดหนึ่งหาภาพได้ชัดเจนแล้ว จึงสามารถหมุนเปลี่ยนไปใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายขนาดอื่นได้ โดยไม่ต้องหาระยะโฟกัสใหม่ ?
2. เมื่อเปลี่ยนขนาดกำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ ขนาดของวงภาพที่เห็นมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ อย่างไร?
3. ค่า numerical aperture ของเลนส์ใกล้วัตถุหมายถึงอะไร ขึ้นอยู่กับปัจจัยอะไรบ้าง ?
4. จงบอกวิธีการหากำลังขยายของภาพที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ ?

5. เพราะเหตุใดจึงต้องใช้น้ำมันกับเลนส์ใกล้วัตถุชนิด oil immersion objective lens และจะใช้น้ำมันกับเลนส์ใกล้วัตถุชนิดอื่นได้หรือไม่ ?
6. ค่า resolving power ของกล้องจุลทรรศน์หมายถึงอะไร และปัจจัยที่จะช่วยให้ค่า resolving power ของกล้องจุลทรรศน์ดีนั้นมีอะไรบ้าง
7. เพราะเหตุใดจึงไม่ควรใช้วัตถุหรือกระดาษชนิดอื่น สัมผัสหรือทำความสะอาดเลนส์ ?
8. จงบอกถึงวิธีการจัดส่วนประกอบต่างๆ ของกล้องจุลทรรศน์หลังจากเลิกใช้กล้องจุลทรรศน์แล้ว ?

บรรณานุกรม

อนันต์ ลือขจร, 2 5 3 5 **กล้องจุลทรรศน์และเทคนิคการถ่ายภาพทางชีววิทยา** พิมพ์ครั้งที่ 1. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.

Benford, J. R.., 1961 **Light (Optical) Mlctoscopy** In: **Clark, G.L. (eds.) The Encyclopedla of Mlcroscopy** Reinhold Publishing Corporation, New York, pp. 434-454.

Boyd, R. F., 1988 **General Mlctoblology 2nd edlt.** Times Mirror/Mosby College Publishing, Saint Louis.

Delaat, **A. N.** C., **1 979 Mlctoblology for the Allled Health Ptofesslons 2nd edlt.** Henry Kimpton Publishers, London.

Frobisher, M., 1968 **Fundamentals of Mlcroblology 8th edlt.** W. B. Saunders Company, Philadelphia.

King, M., 1983 **A Medlcal Laboratory for Developlng Counttles** Oxford University Press, London.

Pelczar, M. J. and R. D. Reid, 1976 **Mlctoblology 3rd edlt.** Tata Mcgraw-Hill Publishing Ltd., New Delhi.

Seeley, H. W. and P. J. 'Van Demark, 1972 **Selected Exercises from Mlctobes In Action: A. Laboratrory Manual of Mlctoblology 2nd edlt.** W. H. Freeman and Company, London.

Slayter, E. M., 1973 **Optical Microscope** In: **Gray, P. (eds.) Encyclopedla of Mlctoscopy and Mlctotechnlque** Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 328-389.