

مؤسسه علمی آموزشی
فرهیختگان راه دانش



زیست شناسی سلولی و مولکولی

درسنامه - نکات کلیدی - تست های فصل به فصل



مؤلف: علی بزرگمهر

دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی

به نام خالق

زیست شناسی سلولی و مولکولی

تألیف و گردآوری: علی بزرگمهر

«دکترای سلولی و مولکولی»

مقدمه:

مؤسسه علمی آموزشی فرهیختگان راه دانش با هدف ارائه کیفی ترین خدمات آموزشی و با تلاش گسترده توانست مجموعه‌ای از خدمات آموزشی را که از نظر علمی، به روز بودن مطالب، پوشش دادن مطالب رفرنس‌ها و بازدهی در زمره بهترین‌ها است ارائه دهد.

مشاوره و پشتیبانی تحصیلی:

مشکل عدیده ای که بیشتر داوطلبان با آن مواجه هستند و هر ساله با وجود صرف هزینه‌های مالی و زمان زیاد نمی توانند در آزمون قبول شوند به این دلیل می‌باشد که داوطلبان آگاهی کافی از منابع مطالعاتی، روشهای مطالعه و مرور مطالب صحیح، روشهای تست زنی و مدیریت زمان را ندارند بنابراین مؤسسه فرهیختگان جهت تحکیم رسالت خود که همواره ارتقاء کیفیت آموزش بوده است جمعی از برترین مشاورین و رتبه‌های تک رقمی را به خدمت گرفته است تا با ارائه منابع مطالعاتی کاربردی، آموزش روش‌های مطالعه و مرور مطالب هر درس، نحوه تست‌زنی صحیح و برنامه مطالعاتی روزانه و هفتگی به داوطلبان، آنها را از سردرگمی درآورده و با ایجاد انگیزه و تمرکز در داوطلبان سبب موفقیت آنها در آزمون گردد.

بسته‌های آموزشی مؤسسه:

بسته‌های آموزشی که به داوطلبان ارائه می‌گردد حاصل ماه‌ها تلاش بی پایان گروه علمی مؤسسه (که ترکیبی از رتبه‌های تک رقمی دکتری و کارشناسی ارشد و اساتید دانشگاه‌های تهران) می‌باشد که با در نظر گرفتن منابع وزارت بهداشت تالیف گردیده است. در این بسته‌ها تلاش شده است که درسنامه به صورت شرح جامعی از دروس ارائه گردد و جهت تفهیم بیشتر مطالب، نکات کلیدی منابع وزارت بهداشت و نکات تستی سوالات کنکور سال‌های اخیر نیز به درسنامه اضافه گردیده است و جهت محک و خودآزمایی داوطلبان، تست‌های هر فصل همراه با پاسخنامه گنجانده شده است. به این ترتیب بسته‌های آموزشی مؤسسه فرهیختگان را از نظر پوشش دادن سرفصل‌های آزمون به مجموعه‌ای کم نظیر تبدیل نموده به نحوی که داوطلب با مطالعه و جمع‌بندی بسته‌های آموزشی مؤسسه همراه با مطالعه منابع وزارت بهداشت براحتی پاسخ‌گوی بیشتر سوالات کنکور خواهد بود. بسته‌های آموزشی مؤسسه هر سال ویرایش و به روز گردیده و نکات، مطالب و تست‌های جدید نیز به آن اضافه می‌گردد.

آزمونهای آزمایشی :

داوطلبان رشته‌های مختلف بایستی جهت محک و خودآزمایی خود و جمع‌بندی مطالب بایستی برنامه ریزی مطالعاتی صحیح داشته باشند. مؤسسه با در نظر گرفتن شرایط داوطلبان مختلف اقدام به برگزاری آزمون‌های آزمایشی ۷ مرحله‌ای و ۳ مرحله‌ای در ۲۸ رشته نموده است.

۲ نکته بارزی که آزمون‌های آزمایشی موسسه فرهیختگان را از دیگر موسسات متمایز می‌نماید این است که در آزمون‌های آزمایشی موسسات دیگر، سوالات زبان به صورت جامع و کلی طرح می‌گردد که این موضوع سبب سردرگمی داوطلبان گردیده و داوطلبان نمی‌دانند مطالعه درس زبان انگلیسی را از کدام منبع مطالعاتی شروع کنند، به همین دلیل اکثریت قریب به اتفاق داوطلبان مطالعه درس زبان را رها نموده و این موضوع لطمه بزرگی به داوطلب وارد می‌کند به نحوی که ممکن است داوطلب در چندین درس یک رشته تسلط کافی داشته باشد و در آزمون اصلی نیز درصدهای خوبی را کسب کرده باشد ولی با توجه به اینکه درس زبان را مطالعه نکرده معمولاً این درس را سفید و یا درصد بسیار ضعیفی کسب نماید که این مقوله سبب عدم قبولی داوطلب با وجود شایستگی‌های علمی وی می‌گردد. موسسه فرهیختگان جهت برطرف نمودن این مشکل و چه بسا معضل، اقدام به ارائه طرح درس و سرفصل زبان انگلیسی در آزمون‌های آزمایشی خود نموده تا داوطلبان بتوانند با برنامه ریزی صحیح مطالعه زبان انگلیسی (که ضریب بالایی دارد) را انجام داده و دچار سردرگمی نشوند، این روش سبب می‌شود که داوطلب با طبقه بندی مبحثی، درس زبان را مطالعه نمایند.

نکته دوم اینست که فواصل زمانی آزمون‌های آزمایشی (۴ مرحله طبقه بندی و ۳ مرحله جامع) با توجه به حجم مطالب تنظیم گردیده است، تا داوطلب بتواند با مطالعه بدون استرس و صحیح و مرور و جمع بندی مطالب به آمادگی کامل دست یابد. **داوطلبان می‌توانند بعد از ثبت نام جزوه روش‌های مطالعه صحیح، روشهای مرور و تست‌زنی را به صورت رایگان از موسسه دریافت نمایند.**

کلاسهای آمادگی :

با توجه به این که بیشتر دانشجویان در دانشگاه به دلیل ساعات کلاسی کم، موفق به یادگیری مطالب دروس تخصصی نمی‌شوند و با مطالعه چند باره جزوات نیز، بسیاری از نکات برای آنها قابل فهم و یادگیری نمی‌باشد. موسسه فرهیختگان با در نظر گرفتن شرایط داوطلبانی که امکان استفاده از کلاس‌های آمادگی حضوری را ندارند اقدام به تهیه و تدوین DVDهای آموزشی (با استفاده از تدریس اساتید برتر دانشگاه‌های تهران) در دروس مختلف نموده است. سبک تدریس در این کلاس‌ها بمانند کلاس‌های حضوری شامل شرح درس، نکته گویی و حل تست می‌باشد.

داوطلبان رشته‌های مختلف می‌توانند جهت بهره‌گیری از خدمات آموزشی موسسه (بسته‌های آموزشی، آزمون‌های آزمایشی، کلاس‌های آمادگی و مشاوره و پشتیبانی تحصیلی) می‌توانند به نمایندگی‌های سراسر کشور مراجعه نموده و یا با دفتر مرکزی موسسه ۲۴ ۹۵ ۹۷ ۶۶ - ۰۲۱ تماس حاصل فرمایند.

امید است که در سایه حق تعالی و بهره‌مندی از تلاش خود و خدمات آموزشی موسسه شما عزیزان به موفقیت‌های بزرگتری دست یابید.

با آرزوی موفقیت

مدیریت موسسه فرهیختگان راه دانش

مؤسسه علمی آموزشی

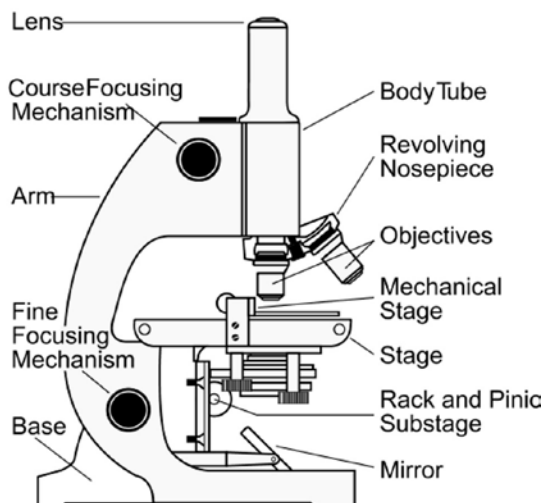
فرهیختگان
راه دانش



روش‌های کاربردی در علوم سلولی و مولکولی

روش‌های کاربردی در علوم سلولی و مولکولی:

به طور کلی یک میکروسکوپ نوری دارای ساختار زیر است:



پایه (Base): معمولاً از جنس فلزی چگال انتخاب می‌شود تا بتواند میکروسکوپ را به طور ثابت در جای خود نگه دارد.

دسته (Arm): به صورت زاویه‌دار طراحی می‌شود تا بتوان به کمک آن میکروسکوپ را جابه‌جا کرد.

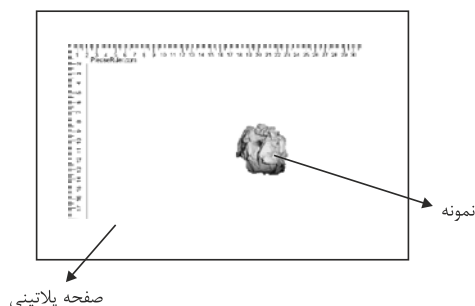
صفحه پلاتینی (Stage): روی آن نمونه قرار می‌گیرد و به منظور امکان عبور نور از نمونه، در وسط صفحه پلاتین سوراخی ایجاد شده است.

شاریو (Chariot): به منظور نگه‌داری و جابه‌جایی نمونه روی صفحه پلاتینی استفاده می‌شود.

پیچ تنظیم تند (Coarse adjustment): به کمک آن می‌توان فاصله صفحه پلاتین تا لوله میکروسکوپ را کم یا زیاد کرد و به آن ماکرومتر هم گفته می‌شود.

پیچ تنظیم کند (Fine adjustment): عملی مشابه پیچ تنظیم تند دارد ولی به کمک آن با دقت بیشتری می‌توان فاصله را تنظیم نمود، به آن میکرومتر هم گفته می‌شود.

سیستم ورنیه: برای تعیین موقعیت نمونه روی صفحه پلاتینی استفاده می‌شود و معمولاً به صورت دو خط‌کش عمود بر هم است.





صفحه گردان (m Revolver): به صورت صفحه‌ای دایره‌ای شکل است که چند عدسی جبهه‌ای با ویژگی-

های متفاوت در آن جای دارند و با چرخاندن صفحه می‌توان از هر یک از عدسی‌های موجود استفاده کرد.

لوله میکروسکوپ: لوله‌ای است در بالاترین قسمت میکروسکوپ که لنز چشمی در آن قرار دارد. میکروسکوپ

ممکن است یک لوله برای دید یا یک چشم و یا دو لوله برای دید با هر دو چشم را داشته باشد.

منبع نور (Light source): در میکروسکوپ‌های نوری معمولی یک لامپ ۱۰-۶ ولت است که نور را از زیر به

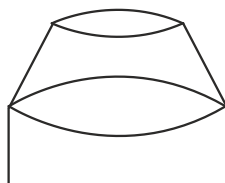
نمونه می‌تاباند و نور پس از عبور از نمونه وارد لوله میکروسکوپ و چشم بیننده می‌شود.

کوندانسور: ساختار آن متشکل از چند عدسی است که نور آمده از منبع نور را همگرا کرده و به نمونه می‌تاباند.

دو نوع مهم کوندانسورها عبارتند از:

۱- **نوع Abbe:** از دو عدسی محدب الطرفین ساخته می‌شود و مهم‌ترین ایراد آن عدم تصحیح انحرافات کروی

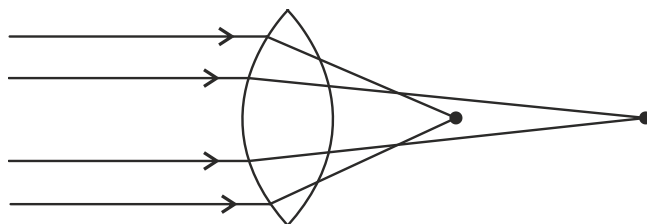
نور است:



انحرافات کروی (Spherical aberration) به این علت ایجاد می‌شوند که همه پرتوهای عبوری از عدسی‌های

محدب به یک میزان منحرف نمی‌شوند و پرتوهایی که از کناره‌های عدسی می‌گذرند به علت شکست بیشتر در

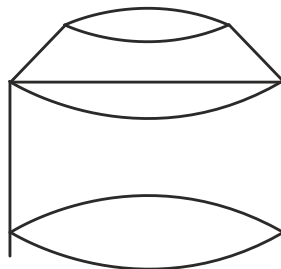
فاصله‌ای نزدیک‌تر به عدسی متمرکز می‌شوند:



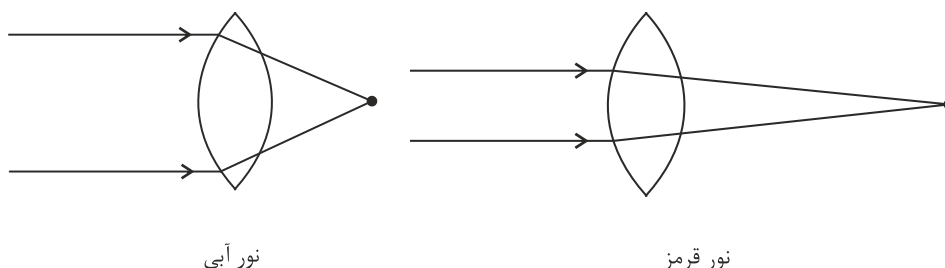
این انحرافات باعث می‌شوند که بخش‌های مرکزی روشن‌تر و بخش‌های کناری تیره‌تر به نظر برسند.

۲- **نوع Aplanatic:** در این نوع کوندانسور یک عدسی که تنها یک طرف آن محدب است در میان دو عدسی

محدب الطرفین قرار می‌گیرد و به تصحیح انحرافات کروی تا حد زیادی کمک می‌کند.



علاوه بر انحرافات کروی، نوع دیگری از انحرافات نوری به نام انحرافات رنگی (Chromatic or optic aberration) وجود دارد که به علت شکست‌های متفاوت طول موج‌های مختلف نوری با گذر از عدسی‌های محدب ایجاد می‌شود. به طور کلی نورهای دارای طول موج‌های کمتر مثل نور آبی نسبت به نورهای دارای طول موج‌های بیشتر مثل نور قرمز، با عبور از عدسی‌های محدب شکست بیشتری دارند و در فاصله‌ای نزدیک‌تر به عدسی متمرکز می‌شوند.

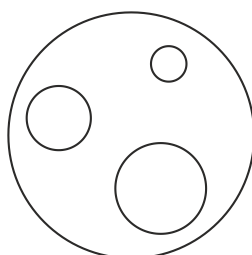


برای برطرف کردن این نوع انحرافات می‌توان از نور تک رنگ استفاده کرد و برای بدست آوردن نور تک رنگ می‌توان از فیلترهای رنگی استفاده کرد. مثلاً فیلتر آبی فقط اجازه عبور نور آبی می‌دهد. همچنین فیلترهای مادون قرمز با جذب اشعه مادون قرمز، اجازه ورود آن به نمونه و گرم شدن آن را نمی‌دهند.

دیافراگم: وسیله تنظیم شدت نور میکروسکوپ است و به طور کلی سه دیافراگم در هر میکروسکوپ وجود دارد:
دیافراگم زمینه: نوری را که از منبع روشنایی به کوندانسور می‌رسد تنظیم می‌کند.
دیافراگم کوندانسور: شدت نوری را که از کوندانسور به نمونه می‌رسد تنظیم می‌کند.
دیافراگم اکولر: شدت نوری را که از نمونه به چشم می‌رسد تنظیم می‌کند. محل آن یا در داخل اکولر است (اکولر منفی) و یا قبل از عدسی جبهه‌ای قرار دارد (اکولر مثبت)

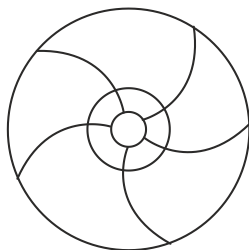
انواع دیافراگم زمینه و کوندانسور عبارتند از:

دیافراگم ساده: صفحه‌ای دایره‌ای شکل و دارای چند سوراخ با اندازه‌های متفاوت است و می‌توان روی هر سوراخ فیلتر رنگی قرار داد.

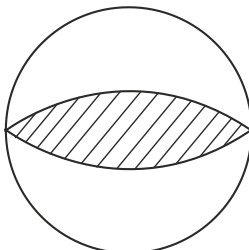




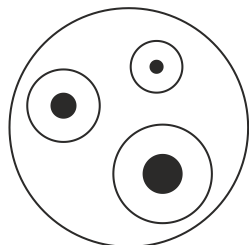
دیافراگم آیریس (Iris): دارای یک سوراخ در مرکز است که قابلیت تنگ و گشاد شدن را دارد.



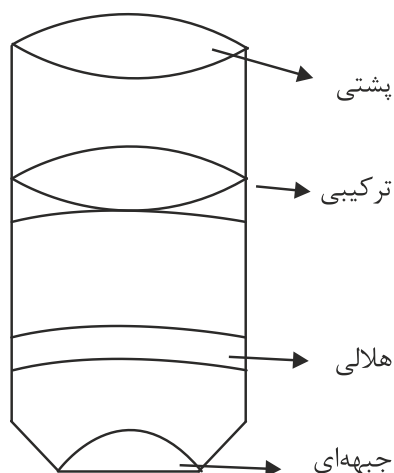
دیافراگم حلقوی (Annular): این نوع دیافراگم که در میکروسکوپ فاز متضاد استفاده می‌شود از عبور پرتوهای مرکزی جلوگیری می‌کند و فقط پرتوهای کناری از آن عبور می‌کنند.



دیافراگم زمینه تاریک یا هلالی: از این نوع دیافراگم نیز که فقط اجازه عبور پرتوهای کناری را می‌دهد در میکروسکوپ زمینه تاریک استفاده می‌شود.



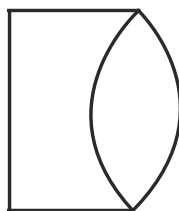
ابژکتیو (Objective): دارای ۴، ۸ و یا ۱۶ عدسی با بزرگنمایی‌های متفاوت است و اولین تصویر را که بزرگتر، معکوس و حقیقی است از نمونه ایجاد می‌کند. اولین عدسی ابژکتیو که به نمونه نزدیک‌تر است، عدسی جبهه‌ای یا شی‌ای نام دارد. از عدسی‌های دیگر ابژکتیو نیز در تصویر زیر نشان داده شده‌اند:



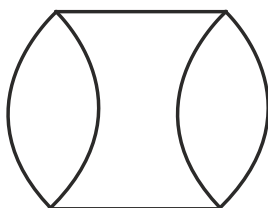
در ساخت عدسی‌های ابژکتیو از کرون برای ساخت عدسی‌های محدب الطرفین و دارای قدرت پراش کم، از فلینیت برای ساخت عدسی‌های مقعر الطرفین دارای پراش زیاد و از فلوئورین برای ساخت عدسی‌های محدب و مقعر الطرفین استفاده می‌شود.

در میکروسکوپ‌های فرابنفش معمولا عدسی‌های ابژکتیو را از کوارتز که مرغوب‌ترین جنس است می‌سازند. بر حسب روش یم کارگیری، ابژکتیوها را به دو نوع خشک و ایمرسیون تقسیم بندی می‌کنند. در ابژکتیو خشک فاصله بین عدسی جبهه‌ای و نمونه (فاصله Frontal) هوا یا گاز است ولی در ابژکتیو ایمرسیون این فاصله با مایعاتی مثلا آب، گلیسرین و آلفا برمونفتل پر می‌شود که این مایعات خود مانند یک عدسی محدب عمل کرده و نور بیشتری را به انژکتیو وارد می‌کنند.

بر حسب ترکیب و کارایی عدس‌ها نیز ابژکتیوها به دو نوع آکروماتیک و آپوکروماتیک تقسیم می‌شوند. در ابژکتیوهای آکروماتیک (Achromatic) عدسی‌ها به صورت ترکیبات دوتایی محدب و مقعر هستند و این ترکیب باعث می‌شود پرتوهای قرمز و آبی در یک کانون جمع شده و نور سبز- زرد ایجاد کنند.



در ابژکتیوهای آپوکروماتیک (Apochromatic) عدسی‌ها به صورت مجموعه‌های سه‌تایی قرار دارند که دقت را افزایش داده و در عکسبرداری‌های میکروسکوپی مناسب هستند.

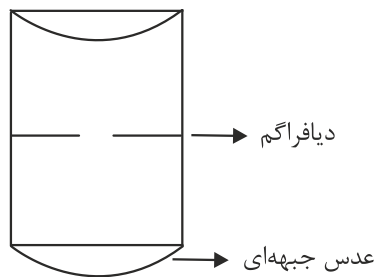


درشت‌نمایی ابژکتیو نیز از فرمول‌های زیر قابل محاسبه است:

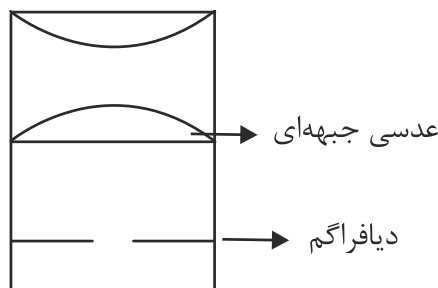
$$Mob = \frac{\text{ویت کژبای سدع زاری و صت هل صاف}}{\text{ویت کژبای سدع زام س ج هل صاف}} = \frac{\text{ری و صت ه زادن ا}}{\text{م س ج ه زادن ا}} = \frac{\text{پوکس ورک یم هل ول لوط (mm)}}{\text{ویت کژبای سدع ین و ناک هل صاف (mm)}}$$

به طور کلی با افزایش تحدب عدسی فاصله کانونی آن کاهش و بزرگنمایی ابژکتیو افزایش می‌یابد.

اکولر (Ocular): از ترکیب چند عدسی محدب یا محدب الطرفین ساخته می‌شود و از تصویر ایجاد شده توسط ابژکتیو، تصویری مجازی، مستقیم و بزرگتر می‌سازد. بر حسب موقعیت قرارگیری دیافراگم، اکولرها به دو نوع مثبت و منفی تقسیم می‌شوند. در اکولر منفی سطوح صاف عدسی‌ها به سمت بالا قرار دارند و دیافراگم درون لوله و بالای عدسی جبهه‌ای قرار دارد. از انواع اکولر منفی می‌توان به اکولرهای هیجن و دولوند اشاره کرد:



در اکولرهای مثبت سطوح محدب عدسی‌ها به سوی یکدیگر است و دیافراگم زیر عدسی جبهه‌ای قرار دارد. از انواع اکولرهای مثبت می‌توان به اکولرهای اشاره کرد.



فاصله کانونی اکولرها بزرگتر از فاصله کانونی ابژکتیوهاست، پس در کل بزرگنمایی ابژکتیو بیشتر است.

بزرگنمایی میکروسکوپ: برای میکروسکوپ‌ها به طور کلی سه نوع بزرگنمایی در نظر گرفته می‌شود:

۱- **بزرگنمایی تجاری:** از حاصلضرب بزرگنمایی‌های ابژکتیو، اکولر و لوله میکروسکوپ در یکدیگر محاسبه می‌شود.

$$GM = G_{ob} \cdot G_{oc} \cdot G_t$$

$$G_{ob} = \text{بزرگنمایی ابژکتیو} \quad G_{oc} = \text{بزرگنمایی اکولر} \quad G_t = \text{بزرگنمایی لوله}$$

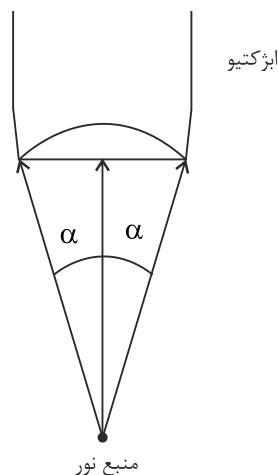
۲- **بزرگنمایی مفید:** از حاصلضرب شماره مدخل یا زاویه گشودگی یا میزان کارایی ابژکتیو در عدد ۱۰۰۰ به

$$GM = N.A \times 1000 \quad \text{دست می‌آید:}$$

زاویه گشودگی نیز از فرمول زیر محاسبه می‌شود: $N.A = n \sin \alpha$

در فرمول مذکور n ضریب شکست محیط و α زاویه نیم مخروط روشنایی است که از ورود پرتوها به ابژکتیو

حاصل می‌شود.



همان‌طور که در شکل بالا مشخص است، پرتوهای نوری از منبع روشنایی به صورت یک مخروط وارد ابژکتیو می‌شوند و نیم زاویه مخروط ایجاد شده همان α است.

۳- **بزرگنمایی مخصوص:** فرمول زیر طریقه به دست آوردن بزرگنمایی مخصوص میکروسکوپ را نشان می‌دهد:

$$GM = \frac{\text{م‌ش‌چ‌ح‌ض‌ا‌و‌د‌ی‌د‌ط‌س‌و‌ت‌م‌ه‌ل‌ص‌ا‌ف}}{Fob(mm)}$$

فاصله متوسط دید واضح چشم حدود ۲۵۰mm است. Fob نیز همان فاصله کانونی ابژکتیو می‌باشد.

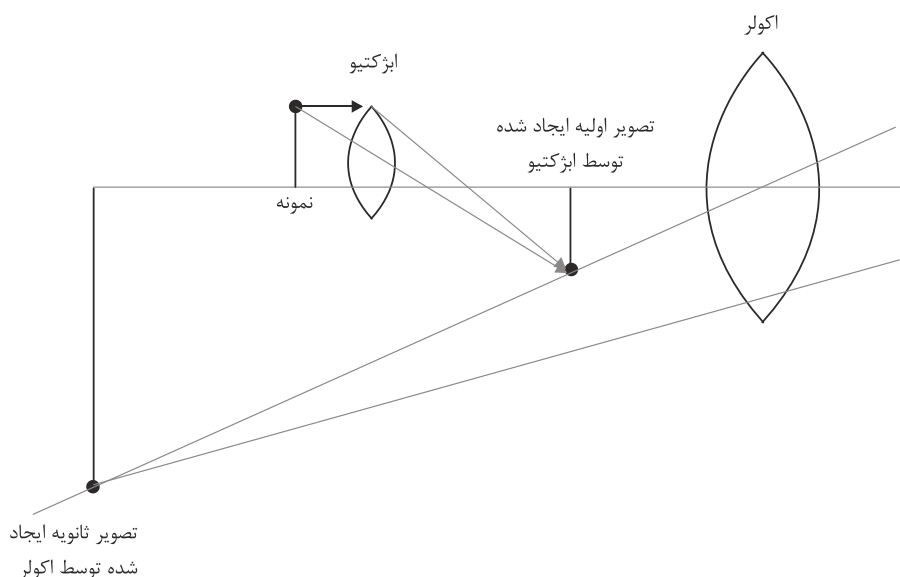
توان تفکیک یا قدرت تمیز میکروسکوپ (Resolution power):

کوچکترین فاصله قابل تشخیص بین دو نقطه واقع بر یک سطح که توسط میکروسکوپ قابل تشخیص است قدرت آن میکروسکوپ است و از معادله زیر به دست می‌آید:

$$\Sigma = \frac{0.61\lambda}{n \sin n} = \frac{0.61\lambda}{N.A}$$

در معادله مذکور که به معادله Abbe مشهور است، هر چه میزان Σ کوچکتر باشد نشان‌دهنده قدرت تفکیک بهتر میکروسکوپ است.

نحوه ایجاد تصاویر در میکروسکوپ: همان‌طور که گفته شد، نور با عبور از نمونه وارد ابژکتیو می‌شود و ابژکتیو تصویری بزرگتر، معکوس و حقیقی از نمونه ایجاد می‌کند. اکولر نیز از تصویر ایجاد شده توسط ابژکتیو تصویری بزرگتر، مستقیم و مجازی ایجاد می‌کند. نحوه ایجاد تصویر در میکروسکوپ در شکل زیر به صورت شماتیک نشان داده شده است.





میکروسکوپ فاز متضاد یا تباینی (Phase-contrast): در این نوع میکروسکوپ یک دیافراگم حلقوی بین منبع نور و نمونه قرار دارد و باعث می‌شود فقط پرتوهای نور محیطی به نمونه بتابد. از طرفی ساختاری به نام صفحه فاز بین اکولر و ابژکتیو قرار می‌گیرد که اختلاف فاز میان پرتوهای پراش یافته توسط نمونه و پرتوهایی که مستقیماً از نمونه عبور کرده‌اند را تشدید می‌کند. در نهایت نمونه به صورت روشن در زمینه تاریک (تضاد منفی) یا به صورت تیره در زمینه روشن (تضاد مثبت) دیده می‌شود. از این میکروسکوپ می‌توان برای بررسی سلول‌های زنده و تغییرات هسته سلول و دیگر اندامک‌ها هنگام تقسیم استفاده کرد بدون نیاز به رنگ‌آمیزی و یا تثبیت سلول‌ها که موجب مرگ آن‌ها می‌شود.

میکروسکوپ تداخلی (Interference): در این میکروسکوپ که اصول کلی آن شبیه عملکرد میکروسکوپ فاز متضاد است. یک دسته اشعه بدون عبور از نمونه وارد ابژکتیو می‌شود و دسته‌ای با عبور از نمونه دچار تاخیر فازی می‌شود که این تاخیر به ضخامت نمونه (t) و اختلاف بین ضریب شکست جسم و محیط ($n_0 - n_m$) بستگی دارد:

$$n_0 - n_m = \frac{t}{\lambda}$$

n_0 : ضریب شکست نمونه n_m : ضریب شکست محیط t : ضخامت نمونه λ : زمان تاخیر

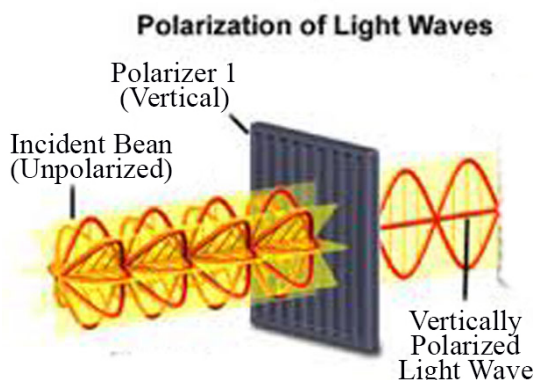
$$n_0 - n_m = \frac{t}{\lambda}$$

به کمک این میکروسکوپ می‌توان اطلاعات کمی در مورد وزن خشک اجزای نمونه و همچنین تغییرات ممتد ضریب شکست نمونه را نیز در حالت زنده و بدون نیاز به تثبیت و رنگ‌آمیزی بررسی کرد.

میکروسکوپ زمینه تاریک (Dark field): در این نوع میکروسکوپ به علت داشتن دیافراگمی خاص تنها پرتوهای محیطی به صورت مایل به جسم می‌تابد و تنها پرتوهای پراش یافته توسط جسم وارد ابژکتیو می‌شود. با مطالعه سلول توسط این میکروسکوپ، بخش‌هایی مثل هسته، هستک، میتوکندری، ذرات لیپیدی و میسل‌ها به صورت درخشان و سیتوپلاسم به صورت تاریک رؤیت می‌شود. کاربرد اصلی این میکروسکوپ در مطالعات ریخت‌شناسی و برخی حرکات درون سلولی است.

میکروسکوپ پلاریزان (Polarizing): از این نوع میکروسکوپ در مطالعات ساختارهای آنیزوتروپیک که آرایش اتم‌ها و مولکول‌های آن‌ها در جهات مختلف متفاوت است استفاده می‌شود. در این نوع میکروسکوپ دو قطعه منحصر به فرد وجود دارد:

۱- **قطبی‌کننده (Polarizer):** این قطعه نور غیر قطبی آمده از منبع نوری را به نور پلاریزه یا قطبی تبدیل می‌کند. نور پلاریزه نوری است که امواج آن تنها در یک صفحه نوسان دارند



نور پلاریزه با ورود به نمونه انیزوتروپیک کمی می‌چرخد و با زاویه‌ای متفاوت از آن خارج می‌شود.

۲- **آنالیزور یا تجزیه کننده (Analyzer):** نور پلاریزه خروجی از نمونه وارد صفحه‌ای با نام آنالیزور می‌شود. بر روی آنالیزور شکافی وجود دارد که وقتی با جهت صفحه نور پلاریزه خروجی از یک نمونه موازی باشد اجازه عبور حداکثر نور را می‌دهد و به این ترتیب ساختار آنیزوتروپ به صورت روشن در زمینه‌ای تاریک دیده می‌شود. به منظور مطالعه فراساختارهای سلولی و اندامک‌ها می‌توان از این نوع میکروسکوپ استفاده کرد.

میکروسکوپ فرابنفش: اساس کار این میکروسکوپ مشابه میکروسکوپ نوری معمولی است با این تفاوت که در آن به جای نور معمولی از نور فرابنفش (UV) استفاده می‌شود که طول موج کوتاهتری دارد (250Å – 150Å) و قدرت تفکیک میکروسکوپ را افزایش می‌دهد. در این میکروسکوپ‌ها نور UV توسط لامپ جیوه‌ای تامین می‌شود. از میکروسکوپ فرابنفش می‌توان برای بررسی ساختارهای دارای خاصیت فلورسانس ذاتی یا اکتسابی نیز استفاده کرد.

علت پدیده فلورسانس این است که برخورد نور فرابنفش به الکترون‌ها باعث رفتن آن‌ها به مدار بالاتر می‌شود و این الکترون‌ها در بازگشت به مدار اصلی خود نوری با طول موج کوتاهتر از نور تابیده شده را ساطع می‌کنند. برخی ساختارها مثل موم‌ها، کراتین و لیپیدها تا حدی خاصیت فلورسانس ذاتی دارند. برای مطالعه ساختارهایی که خاصیت فلورسانس ذاتی ندارند یا آن‌ها را با رنگ‌های فلورسانس رنگ‌آمیزی می‌کنند و یا آن‌ها را در معرض انتی‌بادی‌های دارای خاصیت فلورسانس قرار می‌دهند تا از تابش فلورسانس ثانویه آن‌ها را مورد مطالعه قرار دهند.

برخی از رنگ‌های فلورسانس عبارتند از آبی آنیلین که به کالوز متصل شده و در صورت برخورد نور UV به آن به رنگ سبز دیده می‌شود و یا نارنجی آکریدین که با اتصال به ترکیبات چوبی آن‌ها را در زیر نور UV به رنگ قرمز در می‌آورد. تریپتوفلان‌ها، سولفات بربرین و شلیدونین نیز از دیگر رنگ‌های فلورسانس (فلوئوروکروم‌ها) به حساب می‌آیند.

آماده‌سازی نمونه جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری:

مراحل آماده‌سازی نمونه برای مشاهده به صورت غیر زنده با میکروسکوپ‌های نوری به ترتیب زیر است:



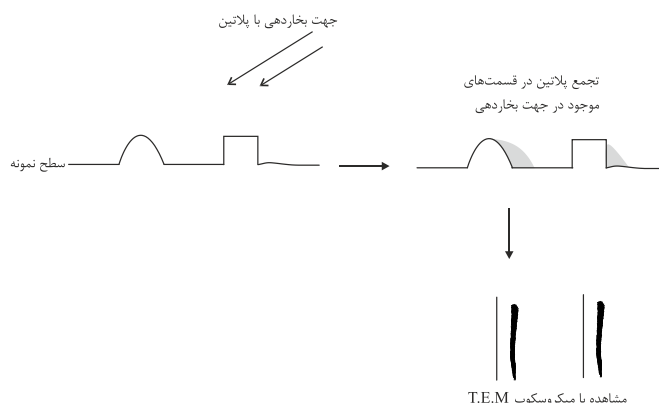
- ۱- **تثبیت (Fixation):** در مرحله تثبیت مولکول‌ها و ساختارهای سلولی را توسط روش‌های فیزیکی مثل انجماد سریع در فرئون مایع (به علت جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ) و گرم کردن سریع و یا توسط محلول‌های شیمیایی مثل گلوآل‌دهید، فرمالدهید، تتراکسید اسمیوم، گلوآل‌دهید، مایع کارنوی و مایع فلمینگ و مایع بوان برای هسته، مایع رگو و بیکرومات پتاسیم و فرمل برای سیتوپلاسم و کندریوم و مایع چند منظوره تثبیت می‌کنند.
- ۲- **آبگیری (Dehydration):** این مرحله با اضافه کردن ترکیبات الکلی به سلول انجام می‌شود.
- ۳- **قالب‌گیری (Embedding):** برای قالب‌گیری بافت بدون آب را در پارافین مذاب قرار می‌دهند تا پارافین جای آب از دست رفته را بگیرد و باعث سفتی بافت به منظور برش بهتر شود.
- ۴- **برش‌گیری (Sectioning):** برای این که نور بتواند از نمونه عبور کند نیاز به برش‌های نازکی از نمونه است که آن‌ها را با میکروتوم و یا اولترامیکروتوم (تهیه برش‌های بسیار نازک) تهیه می‌کنند.
- ۵- **رنگ‌آمیزی:** به منظور مشخص شدن ساختاری خاص و مشاهده آن با میکروسکوپ، سلول را رنگ‌آمیزی می‌کنند. از مهم‌ترین رنگ‌های مورد استفاده می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:
 - سرخ خنثی و آبی کرنیل که به طور انتخابی وارد واکوئل‌ها شده و در آنها تجمع می‌یابند. ورود این رنگ‌ها به مناطق دیگر سلول نشان دهنده مرگ سلول و ترکیدگی واکوئل‌هاست.
 - سبز ژانوس و بنفش متیل برای رنگ‌آمیزی میتوکندری
 - بنفش دالیا و بنفش کریستال، فوشین بازی، بنفش ژانوسین، سافرانین، سبز متیل و تیونین که همگی رنگ‌های بازی هستند و در رنگ‌آمیزی قسمت‌های اسیدی سلول مثل هسته و ریبوزوم‌ها کاربرد دارند.
 - رنگ‌های اسیدی مثل فوشین اسیدی، سبز لومیر و ائوزین
 - رودامین برای رنگ‌آمیزی کلروپلاست
 - رنگ‌های دارای منشا طبیعی مثل همتوکسیلین، کارمن و اورسئین
 - تیونین آبی که برای رنگ‌آمیزی ترشحات مخاطی قارچ‌ها استفاده می‌شود و با اتصال به ساختارهای مورد نظر به رنگ قرمز در می‌آید. به این تغییر رنگ پدیده متاکرومازی گفته می‌شود.
- میکروسکوپ الکترونی:** در میکروسکوپ الکترونی به جای نور معمولی یا فرابنفش از امواج الکترونی استفاده می‌شود که طول موج بسیار کوتاهی در حدود $0.05 \text{ \AA}$ دارند و این خصوصیت باعث توان تفکیک بسیار بالای این میکروسکوپ‌ها می‌شوند. الکترون‌ها از لامپ تنگستن رها می‌شوند و به جای عدسی‌های شیشه‌ای از میدان‌های الکترومغناطیسی عبور می‌کنند. در مسیر حرکت الکترون‌ها شرایط خلا برقرار می‌شود چون الکترون‌ها جرم خیلی کمی دارند و در اثر برخورد با مولکول‌های هوا از مسیر خود منحرف می‌شوند. سه نوع میکروسکوپ الکترونی که بیشترین استفاده را در علوم سلولی مولکولی دارند عبارتند از میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره، نگاره و ولتاژ بالا.

میکروسکوپ الکترونی گذاره (T.E.M):

در این نوع میکروسکوپ اختلاف ولتاژی در حدود $50,000-100,000$ ولت برقرار است. برای مشاهده نمونه با میکروسکوپ T.E.M باید به وسیله اولترامیکروتوم برش‌های بسیار نازکی از آن تهیه کرد و از طرفی باید قبل از برش بافت را با رزین پر کرد تا هم برش آن امکان پذیر شود هم افزایش دمای نمونه در اثر عبور الکترون‌ها موجب تخریب ساختار نمونه نشود. برای رنگ آمیزی نمونه نیز از رنگ‌های الکترون چگالی مثل استات اورانیل، نیترات اورانیل و سیترات سرب استفاده می‌شود.

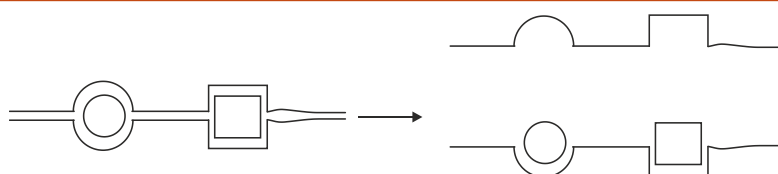
کاربردهای ویژه T.E.M:

سایه اندازی (Shadow casting): برای بررسی ذرات برجسته در سطح نمونه استفاده می‌شود. در این تکنیک بخاری از فلز الکترون چگال پلاتین را با زاویه‌ای خاص روی سطح نمونه می‌افشانند تا در قسمت‌های جلویی برجستگی‌ها انباشته شوند و به قسمت‌های پشتی نرود. پس از مطالعه با میکروسکوپ T.E.M قسمت‌های الکترون چگالی تر تیره و قسمت‌های دیگر روشن تر به نظر می‌رسند:

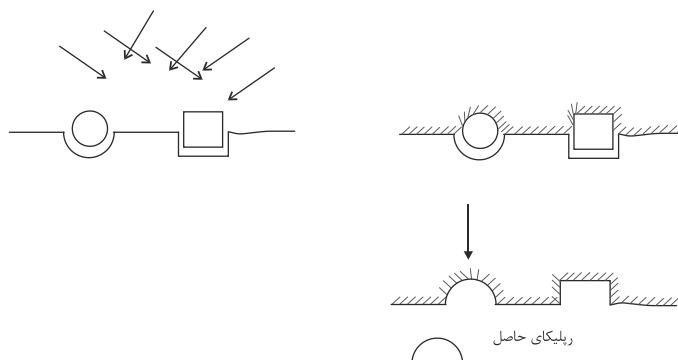


رنگ آمیزی منفی (Negative staining): در این تکنیک ماده‌های الکترون چگالی مثل اسید فسفو تنگستیک را روی نمونه می‌ریزند تا به منافذ رسوخ کند. با بررسی نمونه توسط میکروسکوپ T.E.M منافذ به رنگ تیره و مناطق دیگر به صورت روشن دیده می‌شوند.

انجماد - شکاف (Freeze-fracture): در این روش ابتدا بافت را با گلیسرول اشباع کرده و سپس آن را در فرئون مایع به دمای -130°C می‌رسانند تا به سرعت منجمد شود و بعد بافت را در محیط خلا دارای دمای حدود -100°C توسط تیغه‌ای بسیار نازک مورد شکست قرار می‌دهند. در عمل شکست اتصالات سستی مثل پیوندهای هیدروژنی و یا میانکنش‌های آبگریز از یکدیگر جدا می‌شوند:



در مرحله بعدی مخلوطی از کربن و پلاتین را روی سطوح جدا شده می‌ریزند و سپس خود بافت اصلی را جدا می‌کنند تا فقط قالبی از آن (رپلیکا) باقی بماند تا با میکروسکوپ T.E.M مطالعه شود. تصویر حاصله می‌تواند به صورت سه بعدی تهیه شود.



میکروسکوپ الکترونی نگاره (S.E.M): در بررسی‌های ریخت‌شناسی سطوح سلولی کاربرد زیادی دارند. ویژگی‌های میکروسکوپ S.E.M بسیار شبیه میکروسکوپ T.E.M است با این تفاوت که در کار با S.E.M، تصویر از الکترون‌های پراش یافته از سطوح نمونه ایجاد می‌شود. الکترون‌های پراش یافته ممکن است همان الکترون‌های تولید شده توسط میکروسکوپ (الکترون‌های اولیه) و یا الکترون‌های جدا شده از خود نمونه (الکترون‌های ثانویه) باشند.



در این نوع میکروسکوپ الکترون‌ها تحت اختلاف پتانسیلی حدود $30/000 - 10/000$ ولت ایجاد می‌شوند و پس از پراش توسط فتومولتی‌پلیر به جریان الکتریکی تبدیل می‌شوند و روی لامپ CRT ثبت می‌شوند. در استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره نیازی به تهیه برش‌های خیلی نازک از نمونه نیست ولی چون اکثر اتم‌ها تشکیل دهنده سلولی اتم‌های الکترون چگالی نیستند معمولاً قبل از مطالعه نمونه را با فلزی مثل طلا یا پلاتین می‌پوشانند.

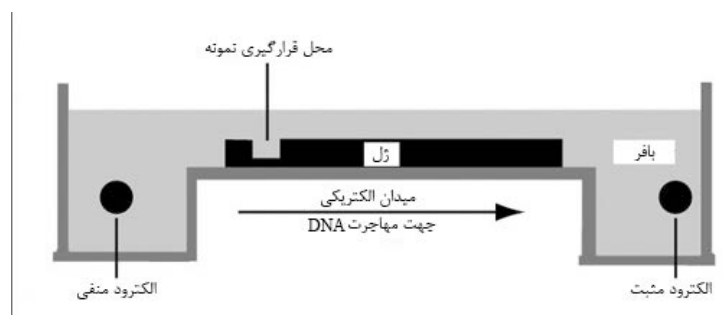
میکروسکوپ الکترونی فشار قوی یا ولتاژ بالا (H.V.E.M):

اختلاف پتانسیل موجود در این میکروسکوپ حدود $4 - 1$ میلیون ولت است. در این نوع میکروسکوپ الکترونی نیز مثل میکروسکوپ الکترونی گذاره، تصویر از الکترون‌های گذرنده از نمونه ایجاد می‌شود ولی در میکروسکوپ

تلفن دفتر مرکزی: ۰۲۱-۶۶۹۷۹۵۲۴

الکتروفورز: اساس این روش جداسازی اجزای سلولی در محیطی ژل مانند تحت تاثیر نیروی الکتریکی است و این جداسازی به بار الکتریکی اجزاء، اندازه و شکل آنها بستگی دارد. بیشترین کاربرد الکتروفورز در جداسازی قطعات DNA و همچنین پروتئین‌ها از یکدیگر است که به ترتیب روی ژل آگاروز و ژل پلی‌آکریل‌آمید انجام می‌شود.

الکتروفورز روی ژل آگاروز: در این روش قطعات DNA براساس اندازه از یکدیگر تفکیک می‌شوند. همان‌طور که می‌دانیم اسیدهای نوکلئیک به طور کلی دارای بار منفی هستند و با قرارگیری در میدان الکتریکی به سمت قطب مثبت (آند) حرکت می‌کنند که در این میان هر چه قطعات اسیدهای نوکلئیک کوچکتر باشد راحت‌تر از میان منافذ ژل آگاروز حرکت کرده و سریعتر به انتهای ژل می‌رسند. با قرار دادن مارک‌های مولکولی می‌توان تا حدی به اندازه اسیدهای نوکلئیک تفکیک شده پی برد. این نوع الکتروفورز معمولاً به صورت افقی انجام می‌شود:

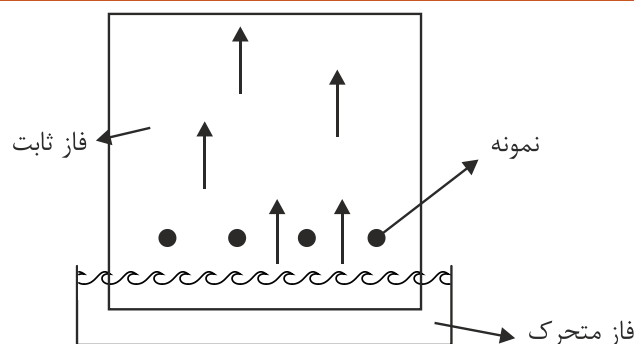


الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید: ژل پلی‌آکریل‌آمید از پلیمریزاسیون آکریل‌آمید و بیس آکریل‌آمید در حضور کاتالیزوری به نام TEMED (تترامیل اتیلن دی‌آمین) حاصل می‌شود. در این روش پروتئین‌ها ی طبیعی براساس شکل و بار الکتریکی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. برای جداسازی پروتئین‌ها براساس جرم مولکولی آنها ابتدا آنها را دناتوره کرده و تحت تاثیر ۲ مرکاپتواتانول یا دی‌تیوتری‌تول پیوندهای دی‌سولفیدی را احیا می‌کنند سپس رشته پلی‌پپتیدی حاصل را در مجاورت سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و یا لوریل سولفات قرار می‌دهند تا هر رشته پلی‌پپتیدی متناسب با طول خود دارای بار منفی شود. پس هرچه رشته پلی‌پپتیدی طول بیشتری داشته باشد دارای بار منفی بیشتری شده و سریعتر به سمت آند حرکت خواهد کرد.

کروماتوگرافی: در این روش مولکول‌ها براساس اندازه، جرم و یا میل ترکیبی از یکدیگر جدا می‌شوند. مهم‌ترین روش‌ها عبارتند از:

کروماتوگرافی کاغذی: روش سریع و آسان جهت سنجش خلوص و یا شناسایی مولکول در این کروماتوگرافی فاز ثابت (Stationary phase) تکه‌ای کاغذ دارای خاصیت فیلتراسیون قوی و فاز متحرک (Mobile phase) هم محلولی است که با خاصیت موئینگی از کاغذ بالا می‌رود و در مسیر صعود، مولکول‌های قرار گرفته در سر راه خود را نیز با خود به بالا می‌رود.

هر نوع مولکول برحسب میزان تمایلش به فاز ثابت نسبت به فاز متحرک تا فاصله خاصی بالا می‌رود.



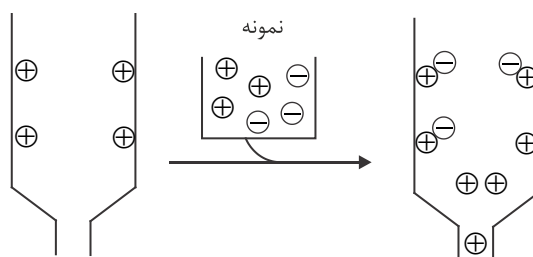
هر مولکول دارای یک فاکتور بقا (Retention factor) یا RF منحصر به فرد است که از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$RF = \frac{\text{هنومن طسوت هدش یط هل صاف}}{\text{لالح طسوت هدش یط هل صاف}}$$

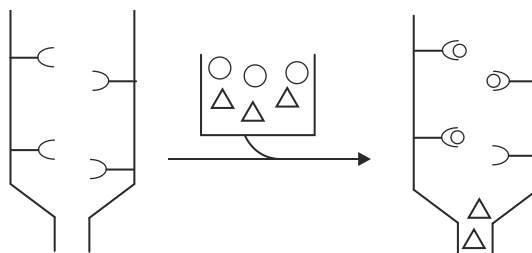
با مقایسه RF نمونه مجهول با RFهای استاندارد می‌توان تا حدی به ماهیت نمونه پی برد.

کروماتوگرافی لایه نازک: اصول کار این کروماتوگرافی مشابه کروماتوگرافی کاغذی است ولی فاز ثابت در آن لایه‌ای نازک از ماده جاذبی خاص است که روی صفحه شیشه‌ای یا پلاستیکی گسترده می‌شود. برحسب نوع مولکول‌های مورد جداسازی می‌توان از جاذب‌های مختلفی مثل سیلیکاژل و آلومینا برای اسیدهای آمینه، پلی‌پپتیدها و چربی‌ها، سلسیت برای استروئیدها، پودر سلولز برای اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها، هیدروکسی آپاتایت برای پلی‌پپتیدها و پلی‌اتیلن ایمین برای نوکلئوتیدها و الیگونوکلئوتیدها استفاده کرد. به طور کلی کروماتوگرافی لایه نازک نسبت به نوع کاغذی دارای سرعت بیشتر و تفکیک دقیق‌تر است و انجام آن نیاز به مقادیر کمتری از نمونه دارد.

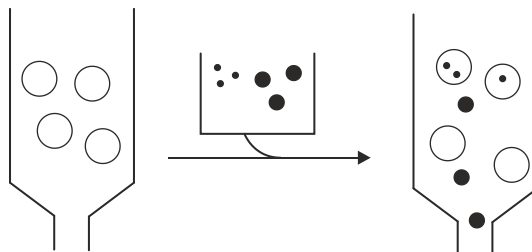
کروماتوگرافی تبادل یونی: اساس جداسازی مولکول‌ها در این نوع کروماتوگرافی بار الکتریکی آنهاست. مولکول‌های دارای بار منفی را می‌توان با اتصال به تعویض‌گرهای آنیونی که خود دارای بار مثبت هستند (مثل دی-اتیل آمینواتیل سلولز و سفادکس) از سایر مولکول‌ها جدا کرد و همچنین مولکول‌های دارای بار مثبت را می‌توان با اتصال به تعویض‌گرهای کاتیونی که خود دارای بار منفی هستند (مثل کربوکسی متیل سلولز و هیدروکسی آپاتایت) از سایر مولکول‌ها جدا کرد. هر چه مولکول دارای بار الکتریکی بیشتر مثبت یا منفی باشد اتصالش به ستون کروماتوگرافی محکمتر خواهد بود به عنوان مثال اگر پروتئین دارای پنج بار مثبت و هشت بار منفی باشد نسبت به پروتئینی که دارای یک بار مثبت و چهار بار منفی است محکمتر به ستون متصل می‌شود علی‌رغم اینکه هر دو پروتئین دارای بار خالص ۳- و تحرک الکتروفورتیک برابری هستند. مولکول‌های باردار متصل شده به ستون کروماتوگرافی در نهایت با تغییرات غلظت یونی یا PH از ستون جدا می‌شوند.



کروماتوگرافی میل ترکیبی: اساس کار این نوع کروماتوگرافی شبیه کروماتوگرافی تعویض یونی است ولی در آن مولکول‌ها براساس میل ترکیبی و اتصال به یکدیگر از سایر مولکول‌ها جدا می‌شوند. به عنوان مثال جدا کردن آنتی‌ژنی خاص توسط آنتی‌بادی مکمل آن یا جداسازی سوبسترای خاص براساس اتصال به آنزیم و همچنین اتصال پلی‌نوکلئوتیدهای مکمل به یکدیگر. در نهایت با تغییرات غلظت یونی و یا PH محیط این اتصالات شکسته می‌شوند.



کروماتوگرافی تخریبی یا فیلتراسیون ژلی: در این روش ستون کروماتوگرافی از دانه‌هایی که دارای منافذی در سطح خود هستند پر می‌شوند. مولکول‌هایی که بزرگتر از منافذ سطح دانه‌ها هستند وارد دانه‌ها نشده و سریع‌تر از ستون خارج می‌شوند و آنهایی که می‌توانند وارد دانه‌ها شوند با تاخیر از ستون خارج می‌شوند.



در همه انواع کروماتوگرافی‌های ستونی می‌توان فاز ثابت درون ستون را به صورت فشرده تهیه کرد و فاز مایع متحرک را با فشار زیاد از میان آن عبور داد که باعث جداسازی دقیق‌تر می‌شود و به آن کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) گفته می‌شود.

کروماتوگرافی گازی: در این نوع کروماتوگرافی نمونه را به حالت گازی در می‌آورند و سپس آن را توسط فاز متحرک که آن هم گازی بی‌اثر مثل هلیوم، نیتروژن یا آرگون است به سمت فاز ثابت حرکت می‌دهند. فاز ثابت نیز می‌تواند مایع و یا جامد باشد. این روش برای جداسازی لیپیدها کاربرد زیادی دارد. بلاتینگ: در روش‌های بلاتینگ حضور یک یا چند توالی پروتئین و یا اسید نوکلئیکی بعد از تفکیک آن‌ها توسط الکتروفورز به کمک پروب‌های نشاندار بررسی می‌شوند.

وسترن بلاتینگ: در این تکنیک پروتئین‌های تفکیک شده روی ژل پلی‌آکریل‌آمید را به همان صورت روی یک غشای نیتروسلولزی انتقال می‌دهند و برای بررسی حضور یک یا چند پروتئین خاص، از آنتی‌بادی‌های ساخته شده علیه آن قطعات که توسط مواد رادیواکتیو یا فلورسانس نشانه‌دار شده‌اند استفاده می‌شود.

ساترن بلاتینگ: در این تکنیک قطعات DNA را پس از انتقال به غشای نیتروسلولزی با قرار دادن در معرض محلول‌های بازی دناتوره کرده و به حالت تک رشته‌ای در می‌آورند. برای بررسی حضور توالی خاص در میان قطعات تفکیک شده نیز از DNA تک رشته‌ای نشانه‌دار مکمل توالی‌های مورد نظر استفاده می‌شود که توانایی هیبرید شدن با یکدیگر را داشته باشند.

نور ترن بلاتینگ: اساس این روش مشابه ساترن بلاتینگ است ولی در آن از پروب‌های نشانه‌دار طراحی شده به صورت RNA برای بررسی حضور قطعات RNA استفاده می‌شود. این تکنیک تا حدودی به بررسی بیان ژن‌ها در شرایط مختلف کمک می‌کند.

ایسترن بلاتینگ: از این روش نیز به منظور بررسی تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌ها استفاده می‌شود. **دات بلاتینگ:** در این روش پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک بدون جداسازی توسط الکتروفورز و به صورت مستقیم با انتقال به غشای نیتروسلولزی مورد بررسی قرار می‌گیرند که نسبت به روش‌های بلاتینگ دیگر راحت‌تر است و سریع‌تر انجام می‌شود ولی اطلاعات کمی در مورد طول و یا وزن مولکولی محلول‌های آنالیز شونده در اختیار محقق قرار نمی‌دهد.

هیستوشیمی: در روش‌های هیستوشیمی حضور مواد شیمیایی خاص درون سلولی یا بافت توسط روش‌های مختلف بررسی می‌شود که به بررسی مهم‌ترین این روش‌ها می‌پردازیم:

روش‌های شناسایی اسیدهای نوکلئیک:

واکنش فولگن: در این روش نمونه تحت تاثیر هیدروکلریک اسید در دمای 60°C قرار می‌گیرد که این عمل باعث تجزیه DNA به آلدئیدها خواهد شد. آلدئیدهای حاصل از تجزیه DNA در صورت قرار گیری در معرض معرف شیف به رنگ قرمز در خواهد آمد.

تست برآشه: در این روش در اثر قرار گیری DNA در معرض رنگ سبز متیل به رنگ سبز و RNA در اثر قرار گیری در معرض رنگ پیرونین به رنگ گلبهی در می‌آید. به وسیله این تست امکان تشخیص همزمان RNA و DNA وجود دارد ولی این روش برای تشخیص RNA ارجحیت دارد.

از دیگر روش‌های هیستوشیمی برای تشخیص اسیدهای نوکلئیک می‌توان به روش‌های توررجینی، کاستل و خوان کین اشاره کرد.

روش‌های شناسایی لیپیدها: لیپیدها در اثر قرار گیری در معرض رنگ سودان III به رنگ قرمز و در اثر قرار گیری در معرض رنگ سودان سیاه به رنگ سیاه در می‌آیند.



روش‌های شناسایی پروتئین‌های غیر آنزیم:

واکنش ساکاگوچی: در واقع برای شناسایی گروه گوانیدینو در آمینواسید آرژنین مورد استفاده قرار می‌گیرد.

واکنش میلون: این روش برای شناسایی زنجیره جانبی آمینواسید تیروزین مورد استفاده قرار می‌گیرد.

واکنش نین هیدرین: در اثر واکنش نین‌هیدرین همه آمینواسیدها به جز پرولین به رنگ بنفش (بنفش رومان) درمی‌آیند. پیرولین در این واکنش موجب تولید رنگ زرد می‌شود.

از دیگر واکنش‌های مورد استفاده در شناسایی پروتئین‌ها و آمینواسیدها می‌توان به واکنش‌های پائولی‌دیازو، هاپکین‌کول، ایساتین و ... اشاره کرد.

روش‌های شناسایی پلی‌ساکاریدها:

روش پرئودیک اسید - شیف (PAS):

در این روش برخی از گروه‌های مونوساکاریدها در اثر ترکیب با پرئودیک اسید، اکسید و به آلدئید تبدیل می‌شوند. آلدئیدهای حاصل نیز در اثر مجاورت با معرف شیف به رنگ ارغوانی در می‌آیند.

ریشه‌های سولفات یا کربوکسیل گلیکوپروتئین‌ها نیز در اثر تماس با رنگ آبی آلیسین تشخیص داده می‌شوند.

روش‌های شناسایی آنزیم‌ها:

شناسایی اسید فسفاتازها با روش گوموری: اسید فسفاتازها می‌توانند گلیسروفسفات را به گلیسرول و فسفات تجزیه کنند که فسفات حاصل در صورت مجاورت با نیترات سرب به صورت رسوب بی‌رنگی در جایگاه فعال آنزیم در می‌آید و با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است. اگر به رسوب مذکور سولفید آمونیوم اضافه شود رسوب سیاه رنگ سولفید سرب در جایگاه فعال ظاهر می‌شود که این تغییر رنگ با چشم هم قابل مشاهده است.

شناسایی دهیدروژنازها:

دهیدروژنازها با گرفتن H^+ از یک سوبسترای مناسب و دادن آن به تترازول، موجب تبدیل تترازول به فرمازون می‌شوند که ماده‌ای نامحلول و رنگی است که در جایگاه فعال آنزیم رسوب می‌کند.

شناسایی پراکسیدازها:

پراکسیدازها سوبسترای مثل ۳ و ۳-دی‌آمینوبنزدین را در حضور H_2O_2 به رسوب نامحلول قهوه‌ای رنگی تبدیل می‌کند.