

Wydział PPT

Laboratorium PODSTAWY BIOFOTONIKI

Ćwiczenie nr 5

Zastosowania mikroskopii optycznej

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z budową i obsługą mikroskopu optycznego oraz dokonanie przy jego pomocy obserwacji przygotowanych preparatów mikroskopowych.

1. Wprowadzenie teoretyczne

1.1. Mikroskopia w jasnym polu

Mikroskop to instrument optyczny służący do oglądania w powiększeniu małych obiektów. Najprostszy układ optyczny mikroskopu składa się z dwóch elementów: obiektywu i okularu.

Całkowite wizualne powiększenie mikroskopu P_c jest iloczynem powiększenia poprzecznego obiektywu β_{ob} i powiększenia wizualnego okularu P_{ok} :

$$P_c = \beta_{ob} \cdot P_{ok} \quad , \text{gdzie:}$$

$$\beta_{ob} = - t / f_{ob}$$

$$P_{ok} = - D / f_{ok} \quad , \text{gdzie:}$$

t – długość optyczna tubusu mikroskopu wyrażona w mm, która w przybliżeniu odpowiada odległości pomiędzy ogniskiem obrazowym obiektywu a ogniskiem przedmiotowym okularu,

D – odległość dobrego widzenia (250 mm),

f_{ob} – ogniskowa obiektywu,

f_{ok} – ogniskowa okularu.

Zdolność rozdzielcza mikroskopu:

Przez zdolność rozdzielczą mikroskopu rozumie się najmniejszą wzajemną odległość l czarnych linii o grubości l rozdzielanych przez oko w sensie Rayleigha (rozróżnienie dwóch punktów jest możliwe, jeśli maksimum punktowej funkcji rozmycia odpowiadające jednemu punktowi przypada na pierwsze minimum dyfrakcyjne punktowej funkcji rozmycia odpowiadającej drugiemu punktowi). Zdolność rozdzielcza mikroskopu l wynosi:

$$l = \frac{1,22\lambda}{NA_{OK} + NA_{OB}} \quad , \text{gdzie}$$

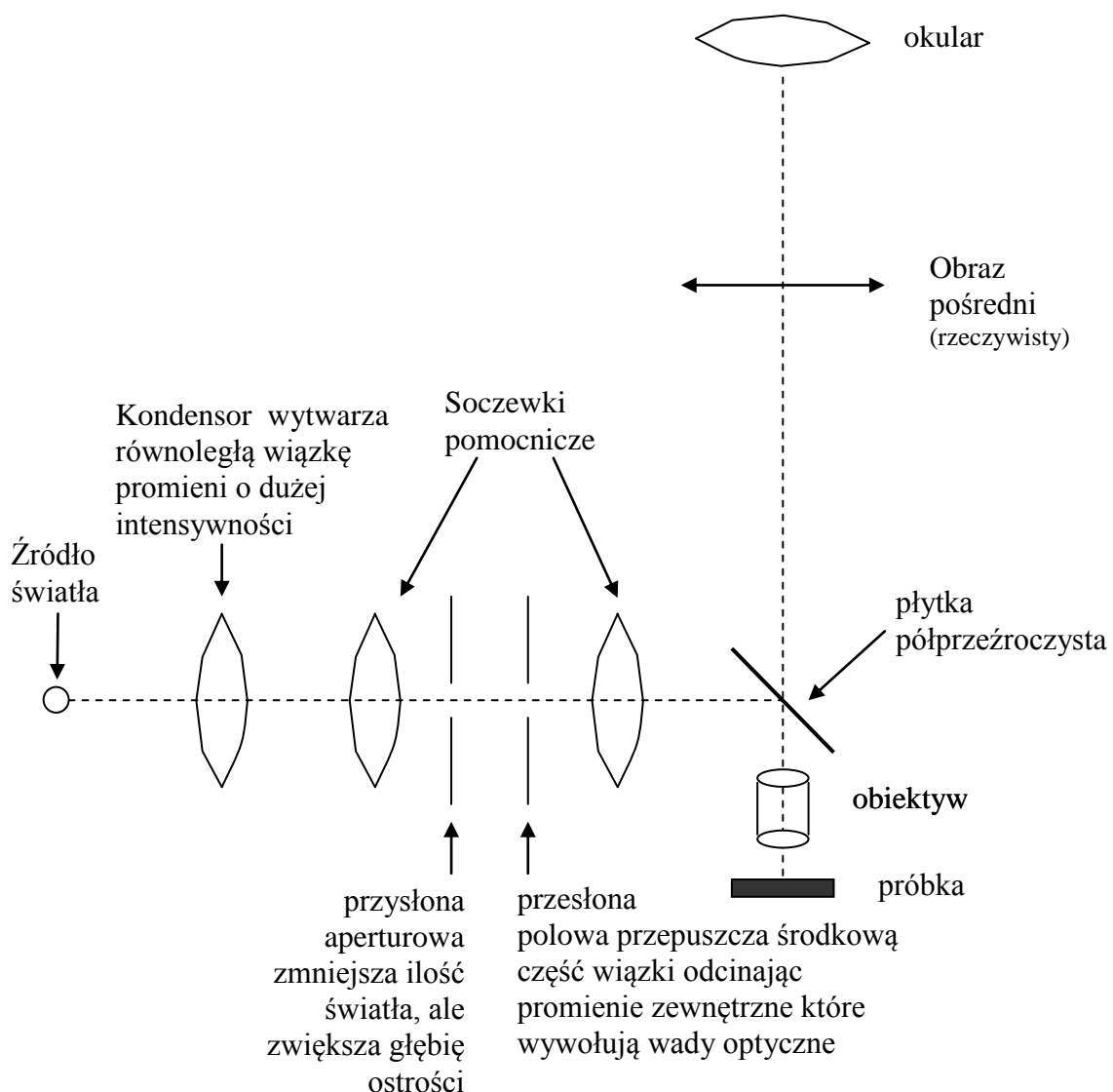
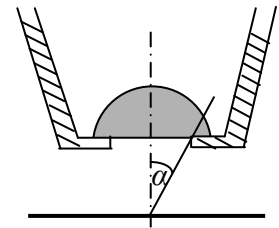
λ – długość fali promieniowania,

NA – apertura numeryczna obiektywu, charakteryzuje możliwość efektywnego wykorzystania obiektywu dla uzyskania obrazu o możliwie największej ilości szczegółów.

$$NA = n \cdot \sin \alpha, \text{ gdzie:}$$

n – współczynnik załamania światła (np. dla powietrza $n = 1$, dla oleju immersyjnego $n=1,5$)

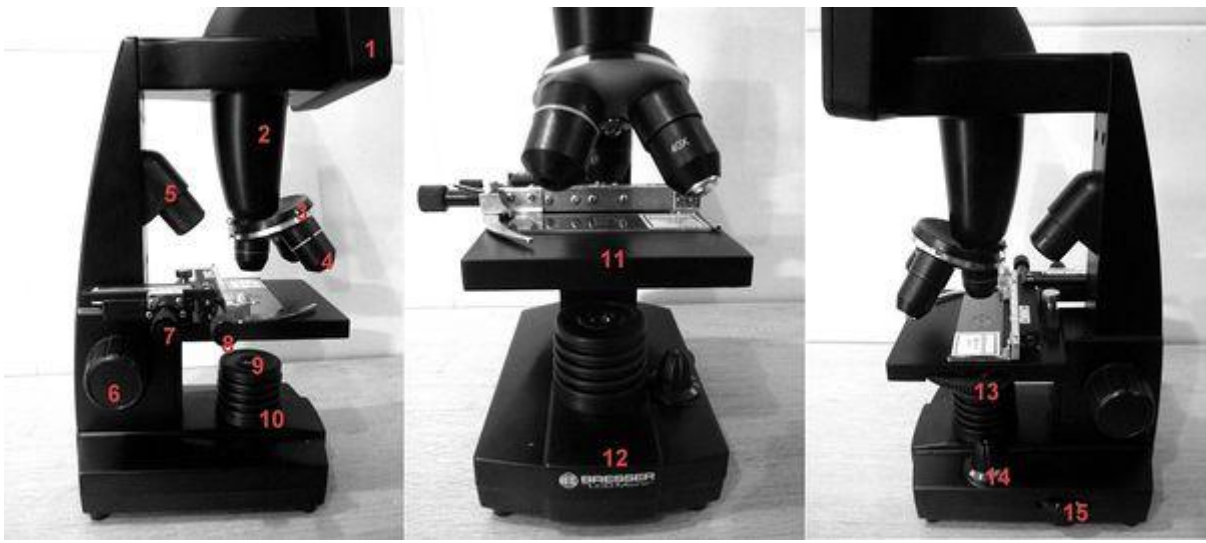
α – przedmiotowy kąt aperturowy, czyli kąt pomiędzy osią optyczną obiektywu a skrajnym promieniem aperturowym. Skrajny promień aperturowy jest promieniem, który wychodzi z osiowego punktu i przechodzi przez skraj przesłony aperturowej.



Rys. 1. Przykładowy schemat układu optycznego mikroskopu

2. Układ pomiarowy

Obserwacja tkanek i komórek wykonywana będzie za pomocą mikroskopu optycznego Bresser Biolux wyposażonego w kamerę USB, która umożliwi zachowywanie obrazu preparatu oraz nagranie filmu. Mikroskop pozwala na obserwację w świetle przechodzącym i odbitym oraz na wykonywanie zdjęć pojedynczych lub seryjnych (co 5 sekund). Trzy obiektywy (4x, 10x i 40x) w połączeniu z okulem (10x) pozwalają uzyskać powiększenia 40x, 100x i 400x. Maksymalna rozdzielczość uzyskiwanych zdjęć to: 2048 x 1536 (inne dostępne rozdzielczości zdjęć: 640 x 480, 800 x 600, 1024 x 768, 1280 x 960, 1600 x 1200, 2048 x 1536).



Rys. 2. Mikroskop optyczny Bresser.

Budowa mikroskopu optycznego Bresser:

1. Monitor LCD.
2. Tubus.
3. Uchwyt obiektywów.
4. Obiektywy.
5. Oświetlenie górne LED.
6. Pokrętko ustawiania ostrości.
7. Pokrętko przesuwu stolika do przodu i tyłu.
8. Pokrętko przesuwu stolika w lewo i prawo.
9. Zespół oświetlacza.
10. Oświetlacz transmisyjny.
11. Zespół oświetlacza.
12. Podstawa.
13. Zestaw kolorowych filtrów.
14. Przełącznik wyboru trybu oświetlenia.
15. Pokrętko regulacji natężenia oświetlenia.

Oświetlenie próbek (górne i dolne) zapewniają diody LED emitujące światło białe. Natężenie promieniowania emitowanego przez diody może być regulowane za pomocą odpowiednich pokręteł. Przełącznik wyboru oświetlenia umożliwia przeprowadzanie badań w świetle:

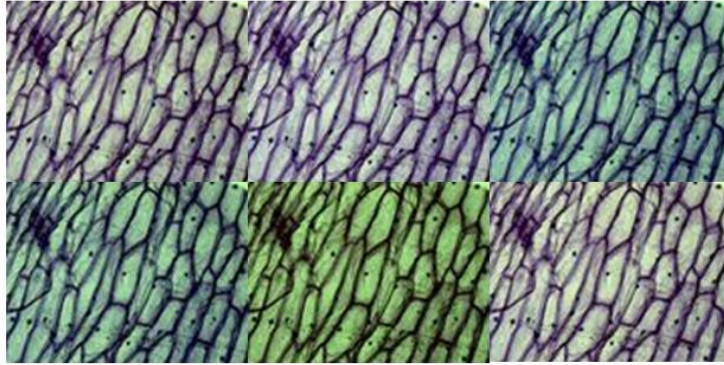
- **przechodzącym** - w tym trybie dokonuje się obserwacji przedmiotów przezroczystych. Podczas takiej obserwacji światło pada na preparat od spodu. Obraz uzyskany po przejściu światła przez próbkę zostaje powiększony przez soczewki obiektywu i matrycę okularu, a następnie dostaje się do oka. Wiele mikroorganizmów żyjących w wodzie, części roślin i najmniejszych części organizmów zwierzęcych charakteryzuje się naturalną przejrzystością, inne wymagają jednak specjalnego spreparowania.
- **odbitym** - w tym trybie dokonuje się obserwacji przedmiotów nieprzezroczystych. Podczas takiej obserwacji światło pada na obserwowany przedmiot, zostaje od niego odbite, a następnie po przejściu przez układ optyczny mikroskopu dostaje się do oka.
- **przechodzącym i odbitym jednocześnie** - w tym trybie dokonuje się obserwacji semi-kolorowych preparatów. Ten tryb nie jest zalecany dla przepuszczających światło obiektów na szkiełkach mikroskopowych, gdyż powoduje odbijanie światła od preparatu.

Ustawienia przełącznika trybu oświetlenia:

- położenie "I" - podświetlenie preparatu od dołu (światło przechodzące)
- położenie "II" - oświetlenie górne (światło odbite)
- położenie "III" - oświetlenie górne i dolne jednocześnie.

Różne tryby oświetlenia z regulacją natężenia każdego z nich umożliwiają dobór odpowiednich dla danego preparatu warunków oświetlenia.

Obrotowy zestaw kolorowych filtrów poniżej stolika mikroskopu jest użyteczny podczas oglądania jasnych, barwionych preparatów. W osi optycznej mikroskopu należy ustawić odpowiedni rodzaj filtra dobrany od obserwowanego obiektu. Kolorowe części obiektu (np. cząsteczki skrobi, pojedyncze komórki) będą lepiej widoczne



Rys. 3. Preparat z wewnętrznej łuski cebuli przy zastosowaniu różnych filtrów.

3. Przebieg ćwiczenia

3.1. Przygotowanie preparatów mikroskopowych.

Badaną próbkę należy umieścić centralnie na szkiełku podstawowym. Następnie próbkę należy ostrożnie przykryć szkiełkiem nakrywkowym, pamiętając o tym, że szkiełka powinny do siebie przylegać (próbka musi być odpowiednio płaska).

3.1.1. Przygotowanie preparatu z łuski cebuli według wskazówek prowadzącego.

3.1.2. Przygotowanie preparatu z drożdży spożywczych według wskazówek prowadzącego.

3.2. Wybarwianie preparatów.

Należy wykonać kolejne preparaty z drożdży. Wybarwianie ma miejsce bezpośrednio przed nakryciem próbki szkiełkiem nakrywkowym.

3.2.1. Przyżyciowe barwienie protoplazmy i glikogenu w komórkach drożdży.

Odczynniki: płyn Lugola

Postępowanie: w kropli płynu Lugola, umieszczonej na środku szkiełka przedmiotowego, rozprowadzić badane drożdże, przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym i po 2-3 minutach oglądać pod mikroskopem.

Wynik barwienia: protoplazma komórki jasnożółta, glikogen brunatny.

3.2.2. Przyżyciowe barwienie wakuoli w komórkach drożdży.

Odczynniki: czerwień obojętna

Postępowanie: umieścić badane drożdże w kropli barwnika, przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym, natychmiast oglądać.

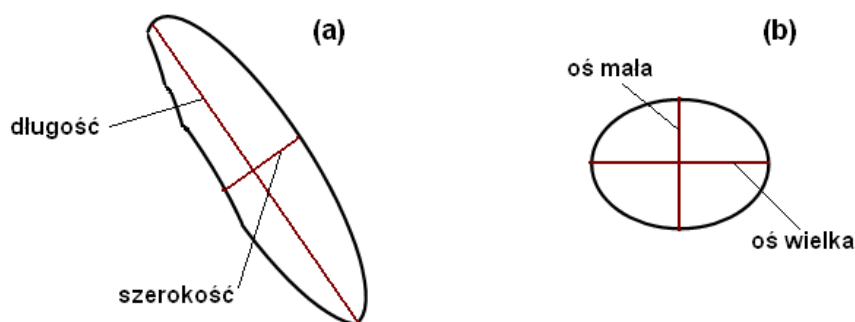
Wynik barwienia: wodniczki czerwono-purpurowe (UWAGA! Po 15-20 minutach barwnik jest wydalany z wakuol i zabarwia cytoplazmę na kolor brązowo-różowy).

3.3. Wykonanie pomiarów na przygotowanych preparatach.

Obserwacja i rejestracja obrazów

Po przygotowaniu mikroskopu do pracy należy włączyć komputer i przez port USB podłączyć do niego umieszczoną w mikroskopie kamerę. Następnie na pulpicie należy utworzyć swój folder (np. Imię_Nazwisko) i uruchomić program *Webcam VideoCap* (skrót na pulpicie). Po uruchomieniu programu należy ustawić ścieżkę zapisu rejestrowanych obrazów. W tym celu należy z zakładki *File* wybrać *Set Snapshot File Folder*, następnie wybrać swój folder i zatwierdzić.

Rejestracji obrazów dokonuje się poprzez wybór opcji *SnapShot* z zakładki *Capture*. Obraz w postaci pliku JPG zostanie zapisany w wybranym wcześniej folderze. Zaleca się zmianę nazwy pliku na znaczącą (np. „drożdże niebarwione”) zaraz po rejestracji obrazu.



Rys. 4. Sposób wymiarowania komórek w badanych preparatach.

Określenie rozmiarów komórek występujących w przygotowanych preparatach

W przypadku preparatu z łuski cebuli należy określić szerokość i długość 3 wybranych komórek oraz wyliczyć średnią arytmetyczną z uzyskanych wyników. Sposób pomiaru ilustruje Rys. 4a.

W przypadku wybranego preparatu z drożdży spożywczych należy określić wymiary osi małej i osi wielkiej 10 wybranych komórek oraz wyliczyć średnią arytmetyczną z uzyskanych wyników. Sposób pomiaru ilustruje Rys. 4b.

Aby wykonanie pomiarów rozmiarów komórek w przygotowanych preparatach było możliwe, należy postępować zgodnie z poniższym schematem.

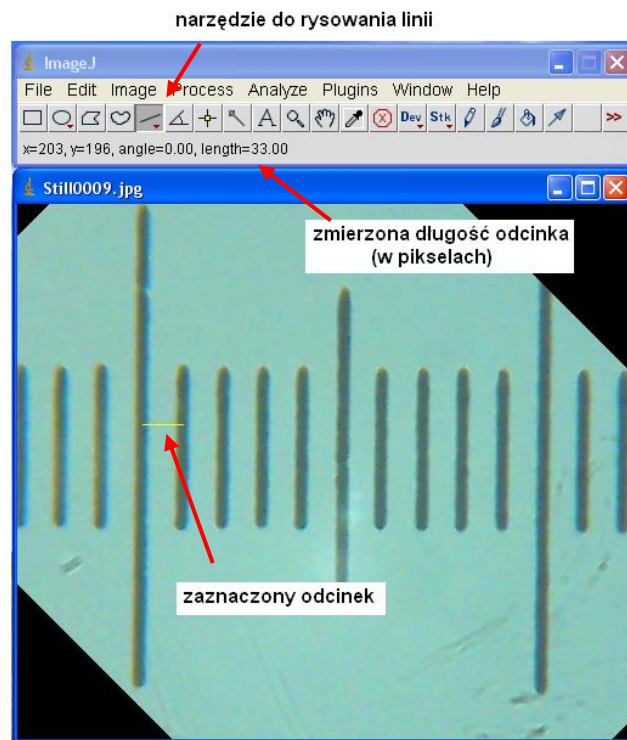
1. Po uzyskaniu ostrego obrazu preparatu przy maksymalnym powiększeniu należy (nie zmieniając obiektywu) zarejestrować obraz podziałki umieszczonej na specjalnej płytce. Odległość między najmniejszymi działkami tej podziałki wynosi 0,01 mm.
UWAGA! Poszczególne działki powinny być równoległe do krawędzi bocznej okna, w którym wyświetlany jest obraz podziałki (patrz Rys. 5.). Jeżeli tak nie jest, należy kamerę odpowiednio obrócić w tubusie mikroskopu (kamerę, NIE KABEL!)
2. Należy uruchomić program ImageJ (skrót na pulpicie) i wczytać do niego obraz podziałki:
Zakładka *File* > *Open* > wybrać odpowiedni plik
3. Jeżeli uzyskany obraz wymaga obrotu:

Zakładka *Image* > *Transform* > *Rotate* > przy *Angle (degrees)* wpisać wartość kąta (w stopniach), o którą obraz ma być obrócony zgodnie z ruchem wskazówek zegara.

4. Za pomocą narzędzia do rysowania linii należy zaznaczyć odległość między najbliższymi działkami, a dokładniej między środkami linii tworzących najbliższe działki. Odległość ta będzie wyrażoną w pikselach. Sposób pomiaru zilustrowano na Rys. 4.
5. Następnie należy wprowadzić przelicznik skali (określona liczba pikseli odpowiada określonej odległości wyrażonej w μm).

Zakładka *Analyze* > *Set Scale* > przy *Known Distance* wpisać 10, przy *Unit of Length* wpisać μm . UWAGA! Zaznaczyć opcję *Global*, by przelicznik był stosowany przy obróbce wszystkich zdjęć.

6. Otworzyć zdjęcie preparatu i korzystając z narzędzia do rysowania linii zmierzyć określone wymiary komórek.
7. Wyniki pomiarów (w μm zebrać w tabeli i wyliczyć odpowiednie średnie arytmetyczne). Tabelkę zamieścić w sprawozdaniu.



Rys. 5. Sposób pomiaru odległości między kolejnymi działkami podziałki.

3.4. Obserwacje gotowych preparatów.

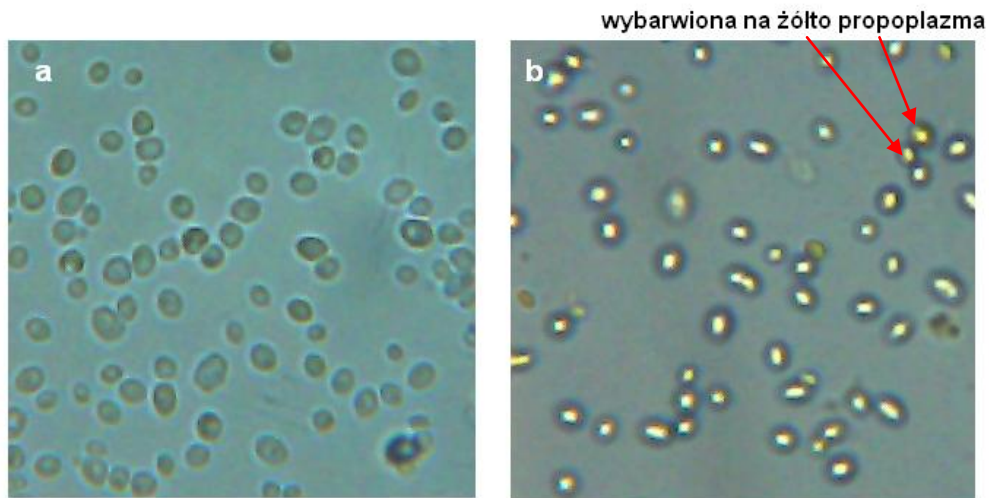
Należy znaleźć i zarejestrować obraz pantofelka (gotowy preparat) przy największym możliwym powiększeniu.

4. Opracowanie wyników

W sprawozdaniu należy umieścić i podpisać zarejestrowane obrazy przygotowanych preparatów. Obrazy preparatów z drożdży (niewybarwionych i wybarwionych) należy umieścić obok siebie i porównać. Zaobserwowane różnice należy zaznaczyć na obrazach, jak pokazano na Rys. 5.

Sprawozdanie powinno zawierać tabelę z odczytanymi wymiarami komórek i wyliczonymi średnimi arytmetycznymi każdego z wymiarów.

W sprawozdaniu należy umieścić zarejestrowany obraz pantofelka oraz zaznaczyć na nim zidentyfikowane organelle.



Rys. 6. Zarejestrowany obraz a) niewybarwionych drożdży (powiększenie 400x), b) drożdży wybarwionych płynem Lugola (powiększenie 400x).

Opracowanie: dr inż. Agnieszka Ulatowska-Jarża, mgr inż. Joanna Pucińska
Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Wydziału PPT Politechniki Wrocławskiej

5. Literatura

- [1] J.Nowak, M. Zając: Optyka: Kurs elementarny, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 1998.
- [2] F.Ratajczyk: Instrumenty optyczne, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2002.