

NOWOCZESNE METODY MIKROSKOPII OPTYCZNEJ

Julia Gnatek, pod opieką dr. Kamila Awsiuka

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, UJ

ABSTRAKT

W przeprowadzonym doświadczeniu obserwowano układy biologiczne za pomocą nowoczesnych technik mikroskopii optycznej. Poznano techniki obserwacji takie jak jasne pole (BF), kontrast fazowy (PHC), kontrast interferencyjny Nomarskiego (DIC), techniki fluorescencyjne. Obserwowano zmiany w obrazach próbek w zależności od stosowanych technik mikroskopowych.

WPROWADZENIE

Mikroskop optyczny to przyrząd umożliwiający obserwację bardzo małych obiektów. Składa się ze źródła światła i dwóch elementów powiększających- obiektywu i okularu. Inne części mikroskopu to: stolik do mocowania próbek, rewolwer, pozwalający na łatwą zmianę obiektywu, śruba mikrometryczna i makrometryczna oraz kondensor.

Całkowite powiększenie mikroskopu to iloczyn powiększenia obiektywu i okularu. Natomiast zdolność rozdzielczą mikroskopu można zdefiniować jako najmniejszą odległość dzielącą dwa punkty, które w obrazie, powstałym w mikroskopie, dalej można rozróżnić jako 2 oddzielne punkty.



MIKROSKOP JASNEGO POLA

Podstawowa technika mikroskopii optycznej. Polega na oświetleniu badanej próbki wiązką światła i obserwacji różnic w pochłanianiu tego światła. Widoczny kontrast jest spowodowany zdolnością absorpcyjną preparatu.



Mrówka pod mikroskopem jasnego pola, powiększenie x4



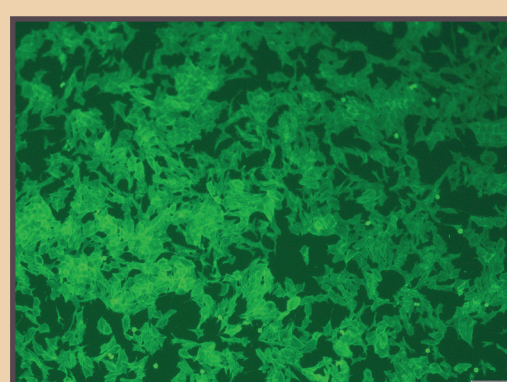
Muszka owocówka pod mikroskopem jasnego pola, powiększenie x4

MIKROSKOP FLUORESCENCYJNY

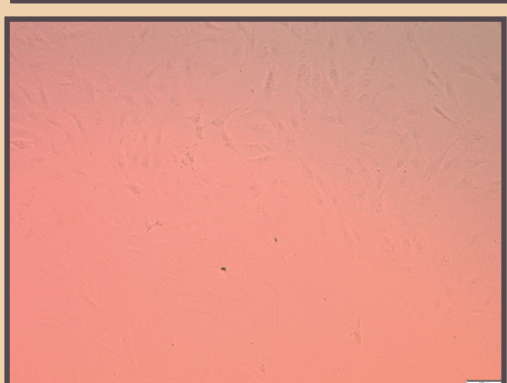
Zastosowanie fluorochromów pozwala na dokładną identyfikację i obrazowanie komórek. Metoda działania opiera się na zjawisku fluorescencji. Próbka jest naświetlana wiązką o odpowiedniej długości fali, która pada na zwierciadło dichroiczne, kierujące ją na obiektyw, z którego wiązka pada na powierzchnię badanej próbki.

Badany materiał fluoryzuje, emitowane przez próbkę światło jest zbierane przez obiektyw, przechodzi przez zwierciadło dichroiczne i pada na filtr fali emitowanej. Następnie wiązka przechodzi przez okular, po czym trafia do detektora.

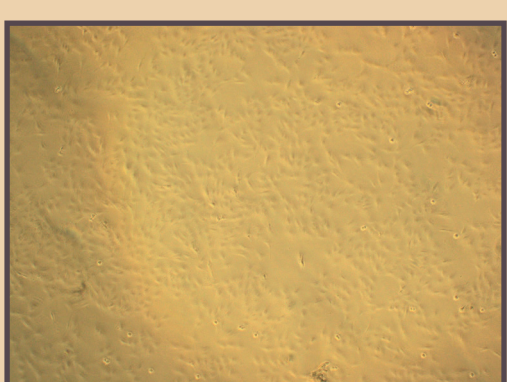
Mikroskopia fluorescencyjna jest czułą metodą, zapewniającą wysokiej jakości obrazy, ale wymaga odpowiedniego przygotowania preparatów.



←Linia komórkowa HCV-29 pod mikroskopem fluorescencyjnym



←Linia komórkowa HCV-29 pod mikroskopem różnicowo-interferencyjnym



←Linia komórkowa HCV-29 pod mikroskopem kontrastowo-fazowym

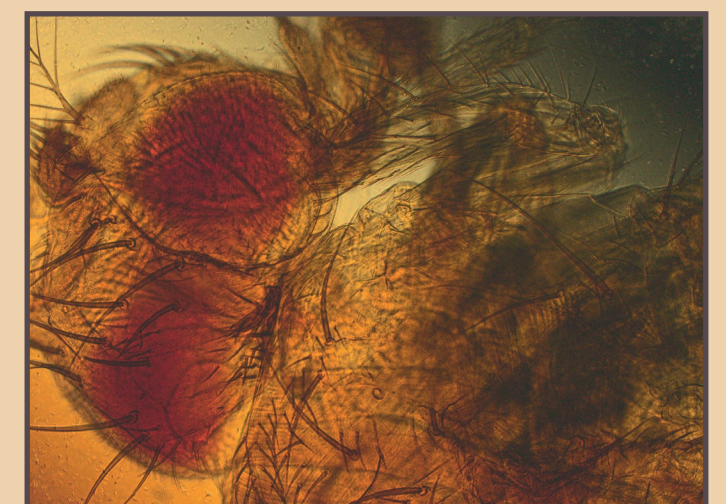
MIKROSKOP Z KONTRASTEM RÓŻNICOWO-INTERFERENCYJNYM

W tej technice pryzmat rozdziela spolaryzowane światło na dwie wiązki. Przejście tych wiązek przez kondensor sprawia, że składowe są do siebie równoległe, natomiast odległość między wiązkami nie wykracza poza zdolność rozdzielczą obiektywu. Przechodząc przez badaną próbkę, wiązki przebiegają różną drogą, ze względu na grubość badanego materiału i jego budowę. Po wyjściu z próbki wiązki są skupiane przez obiektyw na kolejny pryzmat Wollastona, który dokonuje rekombinacji obu wiązek w jedną. Wiazka następnie przechodzi przez analizator.



←Mrówka pod mikroskopem DIC, powiększenie x10

Muszka owocówka pod mikroskopem DIC, powiększenie x10 →



MIKROSKOP KONTRASTOWO-FAZOWY

Pozwala na badanie żywych komórek, które są słabo widoczne przy użyciu techniki jasnego pola, gdyż nie różnią się właściwościami absorpcyjnymi a grubością lub współczynnikiem załamania światła. Zasada działania opiera się o uwidocznienie deformacji czoła fali, która powstaje przy przechodzeniu fali płaskiej o stałej amplitudzie przez badany ośrodek o niejednorodnym współczynniku załamania.



Mrówka pod mikroskopem kontrastowo-fazowym, powiększenie x4



Muszka owocówka pod mikroskopem kontrastowo-fazowym, powiększenie x4

PODSUMOWANIE

Podczas ćwiczenia zbadano różne próbki biologiczne przy użyciu mikroskopu jasnego pola, mikroskopu fluorescencyjnego, mikroskopu z kontrastem różnicowo-interferencyjnym oraz mikroskopu kontrastowo-fazowego. Zauważono, iż mikroskopia z kontrastem różnicowo-interferencyjnym uwypukla szczegóły niewidoczne przy użyciu mikroskopu jasnego pola. Mikroskopia kontrastowo fazowa również pozwala na zauważenie wielu struktur niewidocznych przy użyciu mikroskopu jasnego pola. Linie komórkowe obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym nie były widoczne przy użyciu mikroskopu z kontrastowo-fazowego i mikroskopu z kontrastem różnicowo-interferencyjnym.

BIBLIOGRAFIA

- Skrypt z II pracowni fizycznej UJ, dostęp [kwiecień 2017] [http://www.fizyka.uj.edu.pl/II_pracownia/PDF/Z3.pdf]
- Zdjęcie mikroskopu marki Carl Zeiss z 1879 roku, dostęp [kwiecień 2007] [goo.gl/AxCmC7]