XXI

Studencka Sesja Plakatowa

Instytut Fizyki
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ

Nowoczesne metody mikroskopii optycznej w badaniach układów biologicznych

AUTOR:
Paweł Filo

OPIEKUN:
dr hab. Joanna Raczkowska

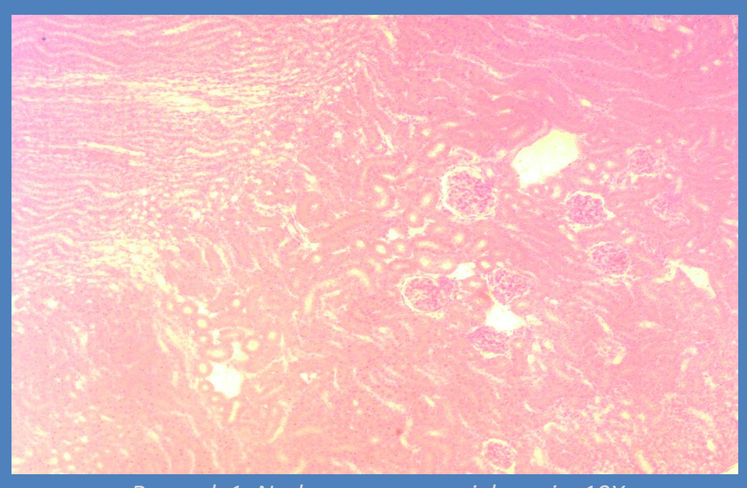
08

1. Abstrakt

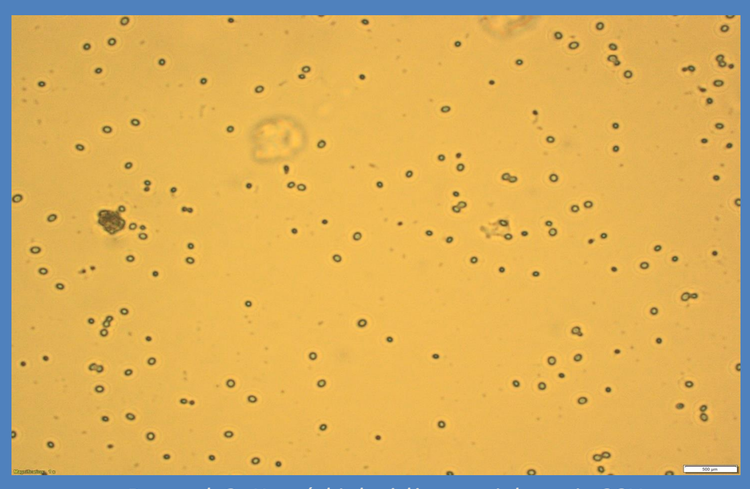
Celem ćwiczenia było poznanie możliwości, jakie niosą ze sobą nowoczesne metody mikroskopii optycznej. Przeprowadzono obserwacje preparatów biologicznych za pomocą technik, takich jak: mikroskopia jasnego pola, mikroskopia różnicowo-interferencyjna oraz mikroskopia kontrastowo-fazowa. Obserwowano także warstwy polimerów przewodzących za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Zaznajomiono się obsługą mikroskopów oraz do jakiego typu próbek są one stosowane. W mikroskopii jasnego pola dodatkowo wykonano serię zdjęć w celu oszacowania średniej wielkości promienia komórek drożdży z rodzaju Saccharomyces Cerevisiae.

2. Mikroskopia jasnego pola oraz wyznaczenie wielkości komórki drożdży

Za pomocą mikroskopii jasnego pola obserwowano preparaty biologiczne pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, jak przedstawiony na Rysunku 1 preparat nerki szczura. Przeprowadzono także doświadczenie mające na celu wyznaczenie rozmiaru komórki drożdży (Rysunek 2). Mikroskop jasnego pola jest podstawowym mikroskopem używanym w laboratoriach. Omawiając kolejno jego części można wyszczególnić źródło światła, używane do oświetlania próbek; stolik, na którym próbki umieszczone są w szkiełkach; śruby mikrometryczne oraz makrometryczne służące do regulacji ostrości obserwowanych obrazów jak również rewolwer, na którym znajdują się obiektywy. Powiększenie obrazu zachodzi zarówno w obiektywnie jak i okularze i to one są podstawowymi składowymi każdego mikroskopu[1]. Aby określić wielkość komórek drożdży w jednostkach układu SI dokonano kalibracji mikroskopu. W tym celu wykonano zdjęcie wzorca jakim było zdjęcie linijki oraz komórek używając tego samego obiektywu, a następnie zmierzono ilość pikseli dla wzorca i przyrównano ją do ilości pikseli dla komórek drożdży. Ostatecznie otrzymane wyniki wielkości średnicy komórek drożdży wyniosły 5.1 ± 6.1 µm, przy czym wartość literaturowa odpowiadająca badanemu szczepowi drożdży to 5.0 – 10,0 µm [2].



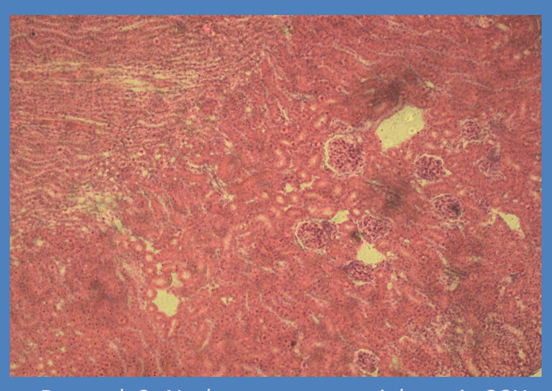
Rysunek 1: Nerka szczura, powiększenie 10X



Rysunek 2: Komórki drożdży, powiększenie 20X

3. Mikroskopia kontrastowo-fazowa

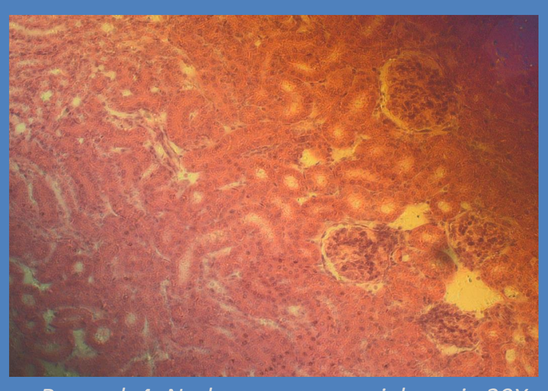
Jedną z niewielu technik mikroskopii optycznej umożliwiających otrzymanie obrazów dobrej jakości dla niebarwionych preparatów pochodzących z organizmów żywych jest mikroskopia kontrastowo – fazowa. Zasadą jej działania jest zjawisko ugięcia fali światła emitowanego przez źródło światła, o stałej amplitudzie, przechodzącego przez ośrodek o elementach o niejednorodnych współczynnikach załamania światła. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu dwóch dodatkowych elementów takich jak przesłony pierścieniowe oraz pierścień fazowy [1]. Przykładowy obraz otrzymany za pomocą tej techniki dla preparatu z nerki szczura przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3: Nerka szczura, powiększenie 20X

4. Mikroskopia różnicowo-interferencyjna

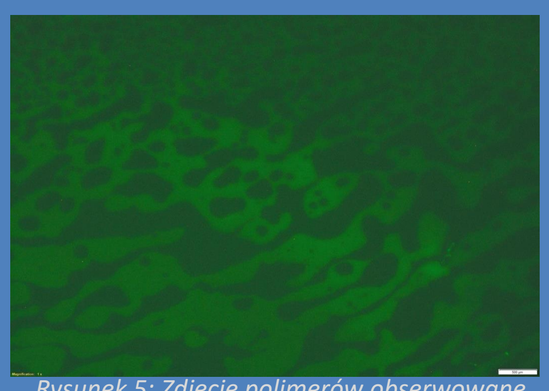
Ten typ mikroskopii optycznej umożliwia obserwację preparatów o nieograniczonej grubości (w pewnym zakresie), w odróżnieniu od mikroskopii kontrastowo – fazowej. Nie dotyczą jej także zjawiska typu halo, czyli tworzenia się barwnego pierścienia wokół obserwowanego obiektu. W mikroskopii różnicowo-interferencyjnej wykorzystuje się dwa pryzmaty Wollastona z modyfikacjami Nomarskiego oraz polaryzatory. Negatywnymi zjawiskami występującymi przy tym typie mikroskopii jest powstanie mylnych obrazów, gdy w badanych próbkach znajdują się elementy o właściwościach dwójłomnych. Przykładowy obraz otrzymany za pomocą tej techniki dla preparatu z nerki szczura przedstawiono na Rysunku 4.



Rysunek 4: Nerka szczura, powiększenie 20X

5. Mikroskopia fluorescencyjna

W mikroskopii fluorescencyjnej wykorzystuje się zjawisko fluorescencji. Wymaga to zastosowania specyficznych fluoroforów, czyli specjalnych barwników, które pod wpływem światła pochłaniają jego energię i zostają wzbudzone. Podczas przechodzenia do stanu podstawowego zostaje wyemitowany kwant światła o energii niższej od zaadsorbowanej. W rezultacie obserwowany jest efekt 'świecenia' badanego preparatu światłem o długości większej niż długość fali wzbudzającej, zwany fluorescencją. Mikroskopia fluorescencyjna jest powszechnie stosowana zarówno do obrazowania materiału biologicznego jak i próbek innego rodzaju, jak na przykład warstwy polimerów przewodzących (Rysunek 5).



Rysunek 5: Zdjęcie polimerów obserwowane w mikroskopii fluorescencyjnej

6. Podsumowanie

Pomiary przeprowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych metod mikroskopii optycznej uwidoczniły różnice istniejące między nimi, zwłaszcza w przypadku badania preparatów biologicznych. Zwracano uwagę w szczególności, jakie typy mikroskopii należy zastosować do przeprowadzania obserwacji konkretnych preparatów. Wykonano także badania umożliwiające określenie wielkości struktur obecnych w materiale próbki.

7. Literatura

[1] - Instrukcja do ćwiczenia Z3 (http://www.2pf.if.uj.edu.pl/cwiczenia)
[2] –https://pl.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisia