Studencka

II Pracownia Fizyczna Vydział Fizyki, Astronom nformatvki Stosowanei



.2pf.if.uj.edu.pl



AUTOR:

Nowoczesne metody mikroskopii optycznej w badaniach układów biologicznych

Abstrakt

Celem ćwiczenia było zapoznanie studenta z metodami stosowanymi w nowoczesnej mikroskopii oraz przybliżenie zasady działania różnych rodzajów mikroskopii optycznej. Do zarejestrowania obrazów użyto mikroskopu świetlnego wraz z filtrami do mikroskopii fluorescencyjnej, a także do mikroskopii DIC (*differential interference microscopy* – mikroskopia różnicowo-interferencyjna). Do obserwacji wykorzystano preparaty z korzenia konwalii, przekroju poprzecznego rdzenia kręgowego i dzielących się komórek jaj nicienia rodziny Ascaradidae. Obrazy otrzymane z preparatów porównano dla różnych powiększeń, apertury numerycznej, czy też stanu zamknięcia przesłony kondensora danego podtypu mikroskopu. Korzystając z obrazów i oprogramowania obliczono wymiary widocznych struktur.

Opis teoretyczny

Mikroskopia jasnego pola – najprostszy rodzaj mikroskopii. Wymaga często przygotowania i wybarMikroskopia fluorescencyjna - wykorzystuje zjawisku fluorescencji. Preparat należy wybarwić sub-



Marzena Pierzchała

OPIEKUN: dr hab. Zenon Rajfur





wienia preparatu, aby zwiększyć kontrast i pozwolić dostrzec wcześniej niezauważalne struktury. Nie pozwala na obserwowanie preparatów fazowych.

Mikroskopia DIC – stosowana do obserwacji obiektów przezroczystych, fazowych. Ludzkie oko nie dostrzega różnicy w fazie obrazów, dlatego właśnie nie widzimy obiektów przezroczystych. Za pomocą zmodyfikowanego układu optycznego, zmienia różnicę faz preparatu na różnicę amplitud (Rys.1). Bierze się to zasady działania tego mikroskopu – dwie wiązki światła spolaryzowane wobec siebie o 90 stopni, przechodzą przez preparat w przystających do siebie punktach – różnica w grubości między tymi punktami powoduje zmianę fazy światła. Oprócz obserwacji obiektów, służy do mierzenia grubości preparatów, stężenia substancji i innych pomiarów fizycznych. [1][2]

stancją, która będzie zdolna do fluorescencji (np. metodą immunofluorescencji). Na czym w zasadzie polega fluorescencja? Jest to zdolność substancji do pochłonięcia kwantu energii i wzbudzenia elektronu na wyższy poziom energetyczny. Następuje konwersja, przy której nie jest tracona energia, natomiast elektron przechodzi w stan wzbudzenia S₁. Stąd może nastąpić powrót do stanu podstawowego z emisją energii w postaci fotonu. Taki proces nazywa się fluorescencją. Utracenie energii przez relaksację wibracyjną, powoduje, że światło emitowane będzie miało mniejszą energię, a co za tym idzie – fala będzie dłuższa. Różnica energii światła nazywa się przesunięciem Stokesa. Schemat procesu przedstawia Rys. 2.

Rys. 1. Schemat przedstawiający budowę i drogę optyczną dla mikroskopu DIC [3]



Zdolność rozdzielcza mikroskopu

Zdolność rozdzielcza r – określa odległość między dwoma rozróżnialnymi punktami na obrazie. Im mniejsza wartość zdolności rozdzielczej, tym więcej szczegółów można dostrzec. Opisuje ją wzór :

$$r = \frac{0,61\lambda}{NA} \tag{1}$$

gdzie λ – długość fali, NA – wartość apertury numerycznej. [5]

Schemat doświadczenia

Najpierw zapoznano się z obsługą mikroskopu i oprogramowaniem komputerowym. Następnie używając dowolnego preparatu histologicznego, ustawiono mikroskop zgodnie z zasadą Köhlera, celem uzyskania jednakowego oświetlenia preparatu. Dla mikroskopu jasnego pola obserwowano preparaty z rdzenia kręgowego dla różnych powiększeń i apertur numerycznych. Z kolei dla preparatów z jaj nicienia porównano obrazy zebrane w mikroskopii jasnego pola i DIC przy różnych powiększeniach. Dla korzenia konwalii zmieniono tryb mikroskopu na fluorescencyjny i porównywano obrazy przy różnych powiększeniach oraz kilku długościach światła wzbudzającego (białe, zielone i czerwone). Zmierzono wymiary wybranych struktur na otrzymanych obrazach i za pomocą wzoru 2, przeliczono na wymiary rzeczywiste.

Układ doświadczalny

Doświadczenie przeprowadzono za pomocą mikroskopu odwróconego IX71 firmy Olympus wyposażonym w kamerę CCD (Rys. 4). Kamera mikroskopu był podłączona do komputera z odpowiednim oprogramowaniem, umożliwiającym obserwację obrazu preparatu pod mikroskopem na komputerze w czasie rzeczywistym. Mikroskop IX71 ma możliwość zmiany filtrów, tak aby zmienić jego funkcję ze zwykłego mikroskopu jasnego pola do przykładowo fluorescencyjnego, a także DIC.



Tab. 1 Zestawienie obliczonych wymiarów danych struktur.

Struktura	Szerokość (µm)	Długość (µm)
Kanał centralny rdzenia kręgowego 20x	186,755	152,633
Kanał centralny rdzenia kręgowego 40x	156,113	191,674
Najmniejsza odle- głość między jajami	_	20,892

Rzeczywiste wymiary *R* obliczono ze wzoru:

ilość pikseli * rozmiar piksela (2) $\boldsymbol{R} =$ powiększenie obiektywu * powiększenie kamery

Rys. 5 Zdjęcia obrazu z mi-

Wyniki



Rys. 6 Zdjęcia obrazu z mikroskopu dla preparatu jaj nicienia z rodziny Ascaradidae. Obydwa zdjęcia dla powiększenia 20x. Po lewej obraz z mikroskopu jasnego pola. Po prawej z mikroskopii DIC.

Ze zdjęć z Rys. 6 widać, iż mikroskopia DIC, daje możliwość dostrzeżenia struktur i wymiarowości preparatu, której mikroskopia jasnego pola nie zapewnia. Na zdjęciach z mikroskopii DIC lepiej widać granice struktur jak np. błony komórkowe. Jednak na zdjęciach Rys. 6 w z mikroskopii jasnego pola można zobaczyć chromosomy w jądrach komórkowych (małe czarne kropki w kulkach), czego nie widać zbyt dobrze w DIC.



Rys.4 Zdjęcie przedstawiające mikroskop odwrócony IX71 Olympus [6]

Bibliografia

- [1] B. Murphy, R.Spring, W. Davidson "*Comparison of Phase contrast* and DIC Microscopy
- [2] https://www.uj.edu.pl/documents/2387936/4117775/cw2.pdf [3] - https://en.wikipedia.org/wiki/
- Differential_interference_contrast_microscopy, ostatni dostęp: 19.05.2020
- [4] P. Nery, M. Liegel, Fernandez ,,*Fluorescence and Chemiluminescence*: Teaching Bascis Principles by Simple Demonstration Experiments"
- [5] https://www.olympus-ims.com/en/microscope/terms/resolving_power/, ostatni dostęp: 19.05.2020
- [6] Broszura ze strony Olympus Life Sciences o mikroskopie IX71

kroskopu dla preparatów z rdzenia kręgowego. U góry powiększenie 20x, u dołu 40x.

Na podstawie zdjęć z Rys. 5, można wywnioskować, iż istnieje granica dla której możemy otrzymywać obrazy o dobrej rozdzielczości – na zdjęciu górnym stracono rozdzielczość na rzecz powiększenia. Zastosowanie olejków immersyjnych mogłoby pomóc uzyskać większą rozdzielczość, gdyż zwiększa NA (v. wzór 1).

Rys. 7 Zdjęcia obrazu z mikroskopu fluorescencyjnego dla preparatu z korzeni konwalii, powiększenie 10x. Światłem wzbudzającym jest kolejno 1 - czerwone; 2 - zielone; 3 - białe. Zdjęcie podpisane numerem 4powstało w wyniku nałożenia trzech pozostałych po uprzednim wybarwieniu w programie ImageJ.

Odmienny skład chemiczny danych struktur przekłada się na ich fluorescencję. Daje to duże pole do manewru w badaniach składu chemicznego i strukturalnych komórek oraz tkanek. Konwalia wykazuje naturalną fluorescencję, natomiast inne preparaty wymagają barwienia. Odpowiedni dobór barwnika i filtrów stanowi wyzwanie dla naukowców.