

Z3 NOWOCZESNE METODY MIKROSKOPII OPTYCZNEJ W BADANIACH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH

1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest obserwacja układów biologicznych za pomocą współczesnych technik mikroskopii optycznej, takich jak mikroskopia kontrastowo-fazowa, mikroskopia z kontrastem różnicowo – interferencyjnym i mikroskopia fluorescencyjna.

2. Aparatura

- Mikroskop fluorescencyjny IX71 firmy Olympus z kamerą cyfrową
- Zasilacze
- Komputer z oprogramowaniem

3. Program ćwiczenia

- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii optycznej jasnego pola
- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii kontrastowo – fazowej
- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii z kontrastem różnicowo – interferencyjnym
- Obserwacja preparatów biologicznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej

4. Tematy do kolokwium

- Podstawowe zjawiska optyczne: dyfrakcja, interferencja, polaryzacja, fluorescencja
- Budowa i zasada działania mikroskopu optycznego
- Budowa i zasada działania mikroskopu kontrastowo – fazowego
- Budowa i zasada działania mikroskopu z kontrastem różnicowo – interferencyjnym
- Budowa i zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego

MIKROSKOPIA OPTYCZNA W BADANIACH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH

Wprowadzenie

Komórka, jako podstawowa jednostka życia, jest przedmiotem zainteresowania wielu nauk. Począwszy od biochemii, badającej jej skład molekularny, poprzez biologię i medycynę a kończąc na fizyce i biofizyce, które zajmują się określaniem jej parametrów fizycznych. Zrozumienie mechanizmów funkcjonowania pojedynczych komórek jest kluczem do zrozumienia funkcjonowania bardziej złożonych organizmów, dlatego też obserwuje się tak dynamiczny rozwój nauk związanych z mikrobiologią i biologią komórki.

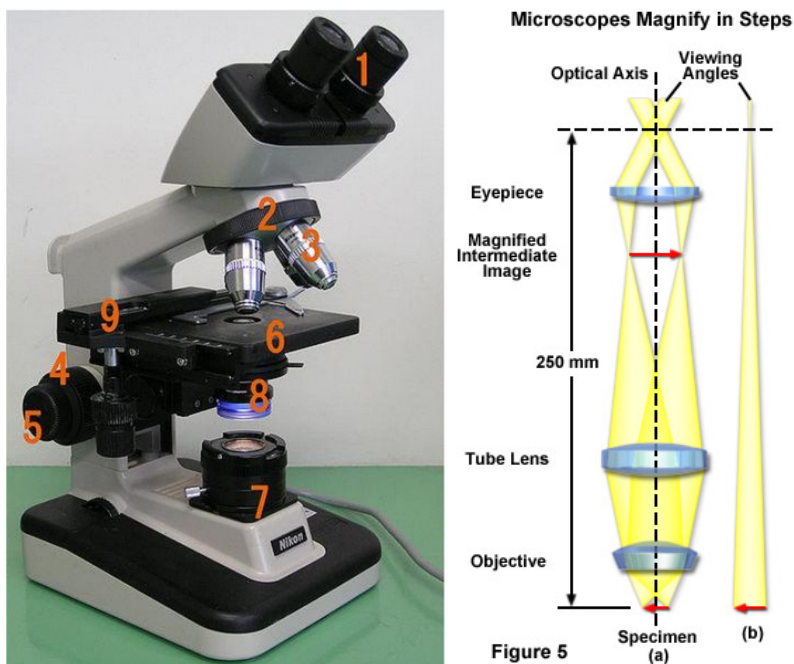
Ponieważ komórki są małe i złożone, niezwykle trudnym zadaniem jest obserwacja ich wewnętrznej struktury, badanie składu molekularnego oraz mechanizmów funkcjonowania poszczególnych komponentów. Narzędzia, którymi dysponujemy w badaniach warunkują to, jak wiele o komórkach i ich funkcjonowaniu jesteśmy w stanie się dowiedzieć, dlatego też stosowanie coraz to nowych technik skutkuje zwykle postępem w dziedzinie biologii komórki. Ponadto, zrozumienie obecnego stanu wiedzy na ten temat wymaga podstawowej znajomości wykorzystywanych metod badawczych.

Wynalezienie mikroskopu optycznego zapoczątkowało rozwój biologii komórki, a sam mikroskop optyczny wciąż jest podstawowym narzędziem wykorzystywanym w badaniu komórek.

Dzięki dynamicznemu rozwojowi technik mikroskopii optycznej, jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat, dysponujemy metodami specyficznego znakowania i obrazowania poszczególnych struktur komórkowych oraz rekonstrukcji obrazów w trzech wymiarach. Ważną zaletą mikroskopii optycznej jest fakt, że światło jest stosunkowo nieszkodliwe dla próbek biologicznych i nie powoduje ich uszkodzeń. Z drugiej strony jednak mikroskopia optyczna jest ograniczona przez skończoną zdolność rozdzielczą ze względu na długość fali światła widzialnego. [1]

Mikroskop – budowa i zasada działania

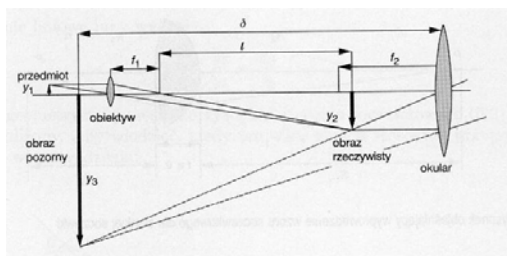
Mikroskop to przyrząd optyczny umożliwiający obserwację małych obiektów. Jego podstawowe elementy to źródło światła, obiektyw, który daje powiększony obraz przedmiotu oraz okular, który dodatkowo powiększa otrzymany obraz. Pozostałe elementy mikroskopu to stolik do mocowania próbek, rewolwer umożliwiający zmianę obiektywu, śruby makro- i mikrometryczna służące do zgrubnej (śruba makrometryczna) i precyzyjnej (śruba mikrometryczna) regulacji ostrości obrazu oraz kondensor, którego zadaniem jest równomierne oświetlenie obserwowanego przedmiotu. Wszystkie elementy umocowane są w statywie.



Rysunek 1. Budowa i zasada działania mikroskopu optycznego: 1. okular osadzony w tubusie; 2. rewolwer; 3. obiektyw; 4. śruba makrometryczna; 5. śruba mikrometryczna; 6. stolik; 7. źródło światła; 8. kondensor; 9. statyw [2, 3]

Powiększenie mikroskopu

Schemat biegu promieni w mikroskopie optycznym przedstawia Rysunek 2.



Rysunek 2. Schematyczny bieg promieni w mikroskopie optycznym.

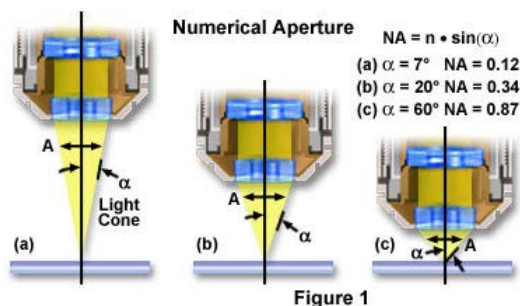
Powiększenie mikroskopu M zależy od powiększenia obiektywu i okularu:

$$M = M_1 \cdot M_2 \approx \frac{\delta}{f_1} \cdot \frac{l}{f_2}$$

Zdolność rozdzielcza mikroskopu

Zdolność rozdzielcza mikroskopu jest to najmniejsza odległość l dzieląca dwa punkty, które w obrazie mikroskopowym są dostrzegalne oddzielnie. Wielkością charakterystyczną, która określa możliwość optymalnego wykorzystania obiektywu w danym środowisku jest apertura numeryczna

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$



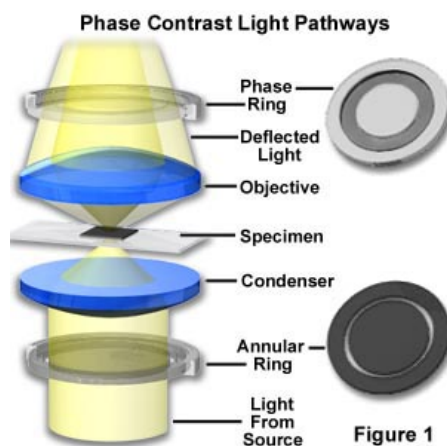
Rysunek 3. Apertura numeryczna [4]

Dla obiektywu pracującego w świetle monochromatycznym zdolność rozdzielcza wyraża się wzorem:

$$l = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

Mikroskop kontrastowo – fazowy

Żywe komórki oraz innego rodzaju bezbarwne próbki są zwykle słabo widoczne pod tradycyjnym mikroskopem jasnego pola. Dlatego do obrazowania tego typu obiektów wykorzystywany jest zwykle kontrast fazowy, opracowany po raz pierwszy w 1930 roku przez holenderskiego fizyka Fritza Zernike.



Rysunek 4. Schemat działania mikroskopu kontrastowo – fazowego [5].

W przypadku kontrastu fazowego nie chodzi o zwiększenie kontrastu pomiędzy jasnymi i ciemnymi obszarami obrazu, ale o uwidocznienie deformacji czoła fali, jaka powstaje podczas przechodzenia fali płaskiej o stałej amplitudzie przez ośrodek o niejednorodnym współczynniku załamania, np. wodę z okruchami szkła, które nie są widoczne. W metodzie tej źródło światła jest odwzorowane na pierścieniowej przesłonie umieszczonej w płaszczyźnie ogniskowej kondensora. Światło przechodzące przez tę przesłonę i kondensor przechodzi więc przez obserwowany przedmiot jako wiązka promieni równoległych. Na strukturze przedmiotu następuje dyfrakcja, ale promienie nie ugięte bieżą dalej, nie zmieniając kierunku i obiektyw mikroskopu skupia je na pierścieniowej przesłonie (płytkę fazowej). Obszar 0 zerowego rzędu ugięcia, który w zwykłym mikroskopie jest mały i obejmuje bliskie otoczenie punktu 0 jest

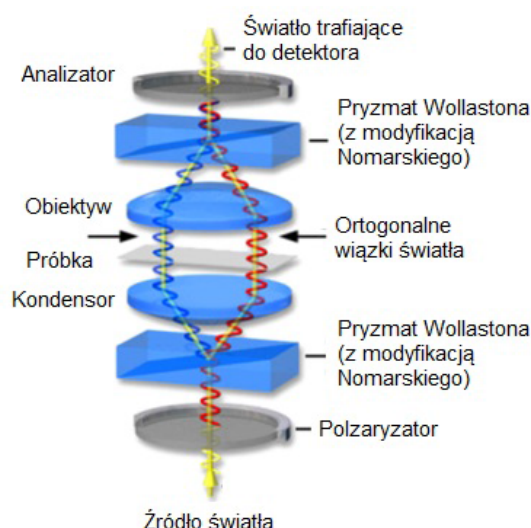
tutaj rozciągnięty na całym pierścieniu przesłony. Ten właśnie pierścień jest pokryty substancją, która osłabia natężenie światła i przesuwają jego fazę o 90 stopni [6].

Jeśli faza wiązki odniesienia zostanie przesunięta o nieparzystą wielokrotność połowy długości fali zobaczymy obraz obiektu jako jasny na ciemnym tle.

Mikroskop z kontrastem różnicowo interferencyjnym

Przeszkody utrudniające obrazowanie za pomocą kontrastu fazowego, takie jak występowanie tzw. halo, czyli jasnej bądź ciemnej otoczki widocznej wokół obserwowanych komórek, a także ograniczenie do bardzo cienkich preparatów [7] eliminuje kontrast różnicowo-interferencyjny DIC (ang. Differential Interference Contrast). Został on po raz pierwszy opracowany w 1955 roku przez Francisa Smitha, który włączył dwa pryzmaty Wolastona w układ optyczny tradycyjnego mikroskopu polaryzacyjnego. Współczesne mikroskopy z kontrastem różnicowo-interferencyjnym wykorzystują pryzmat Wolastona z modyfikacją Nomarskiego, zaprojektowany przez fizyka polskiego pochodzenia, Jerzego Nomarskiego.

Schemat obrazujący budowę i działanie mikroskopu z kontrastem różnicowo-interferencyjnym przedstawia Rysunek 5.



Rysunek 5. Zasada działania mikroskopu z kontrastem różnicowo-interferencyjnym [8]

Niespolaryzowana wiązka światła wychodząca ze źródła pada na polaryzator i zostaje spolaryzowana pod kątem 45 stopni. Następnie pada na pryzmat Wolastona z modyfikacją Nomarskiego i zostaje rozszczepiona na dwie składowe biegnące w nieco innych kierunkach i spolaryzowane prostopadłe względem siebie. Po przejściu przez kondensor składowe te są do siebie równoległe a odległość między nimi nie przekracza zdolności rozdzielczej obiektywu. Po przejściu przez obserwowany przedmiot każda z wiązek doświadcza różnej drogi optycznej ze względu na różną grubość badanej próbki oraz jej budowę. Po opuszczeniu próbki równoległe promienie są skupiane przez obiektyw a kolejny pryzmat Wolastona z modyfikacją Nomarskiego dokonuje rekombinacji obu wiązek. Aby uzyskać interferencję dwóch wiązek światła różniących się drogą optyczną należy drgania ich pól elektromagnetycznych sprowadzić do wspólnej płaszczyzny i osi. Cel ten jest zrealizowany poprzez ustawienie na drodze optycznej analizatora.

Efekty widoczne na obrazach uzyskanych tą techniką, tj. kolor, różne natężenie oświetlenia, są związane ze zmianami współczynnika załamania oraz grubości oglądanej próbki w różnych jej rejonach. W związku z tym, obraz sprawia wrażenie trójwymiarowego, co nie oddaje jednak rzeczywistej geometrii próbki, a jest jedynie wizualizacją tego jaką drogę optyczną światło pokonuje przy przejściu przez nią. Dlatego też obrazy uzyskane za pomocą kontrastu różnicowo-interferencyjnego nie nadają się do precyzyjnego mierzenia rzeczywistych wysokości.

Mikroskopia z kontrastem różnicowo-interferencyjnym ma wiele zalet. W porównaniu z mikroskopią kontrastowo-fazową istnieje możliwość pełnego wykorzystania apertury numerycznej (brak przysłony pierścieniowej) oraz zastosowania tzw. barwienia optycznego (ang. optical staining). Pozwala także na osiągnięcie znakomitej rozdzielczości.

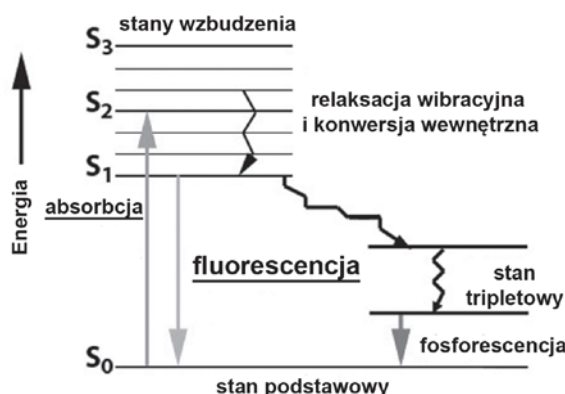
Użycie pełnej apertury numerycznej obiektywu umożliwia skupienie mikroskopu na cienkiej warstwie badanej próbki i uniknięcie przenikania się obrazów z płaszczyzn położonych wyżej lub niżej. Wyeliminowany też został efekt halo, utrudniający interpretację obrazów uzyskanych za pomocą kontrastu fazowego.

Wadą kontrastu interferencyjno-różnicowego jest fakt, iż naczynia do hodowli tkankowej wykonane z plastiku bądź szkła mogą wykazywać własności dwójłomne. Powodują one wówczas uzyskanie mylnych obrazów. [9]

Mikroskop fluorescencyjny

Mikroskopia fluorescencyjna stała się jedną z kluczowych technik stosowaną w biologii oraz naukach biomedycznych ze względu na zalety, których nie oferuje tradycyjna mikroskopia optyczna. Zastosowanie fluorochromów umożliwiło wysoce specyficzną identyfikację oraz obrazowanie komórek i struktur subkomórkowych, często bardzo trudnych, lub wręcz niemożliwych do zobrazowania za pomocą klasycznego mikroskopu świetlnego. W szczególności, mikroskopia fluorescencyjna jest zdolna do wykrycia pojedynczych cząsteczek lub organelli komórkowych.

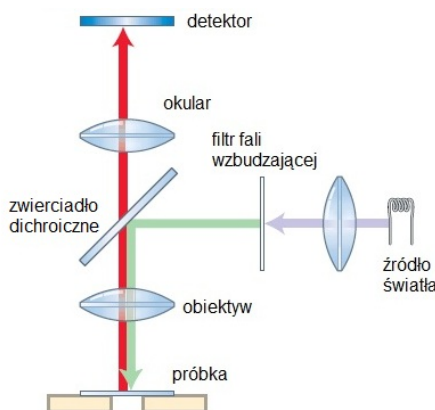
Mikroskop fluorescencyjny wykorzystuje zjawisko fluorescencji, czyli emisji promieniowania przez naświetlaną substancję, która jest związana z powrotem cząsteczek do stanu podstawowego o tej samej multipletowości spinowej co stan wzbudzony. Proces ten dobrze ilustruje tzw. diagram Jabłońskiego (Rysunek 6)



Rysunek 6. Diagram Jabłońskiego [10]

Podstawowym zadaniem mikroskopu fluorescencyjnego jest naświetlenie badanej próbki wiązką światła o zadanej, odpowiedniej dla zastosowanego fluorochromu, długości fali, a następnie wyodrębnienie znacznie słabszego światła wyemitowanego przez próbkę. W odpowiednio skonfigurowanym mikroskopie fluorescencyjnym do obserwatora powinno dotrzeć jedynie światło pochodzące z fluorescencji, obrazujące wybarwione struktury na ciemnym tle [11].

Zasadę działania mikroskopu fluorescencyjnego przedstawia Rysunek 7.



Rysunek 7. Zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego [12]

Lampa łukowa lub inne źródło światła emituje wiązkę o szerokim zakresie długości fal. Wiązka przechodzi przez filtr, który z całego zakresu wybiera jedną długość fali (bądź wąski zakres długości fal) odpowiednio zdefiniowany dla użytego fluorochromu (zwykle jest to ultrafiolet bądź niebieski lub zielony zakres światła widzialnego). Wyselekcjonowana wiązka pada na powierzchnię zwierciadła dichroicznego, które przez odbicie kieruje ją na wysokoaperturowy obiektyw, a następnie w stronę obserwowanej próbki. Obserwowany preparat fluoryzuje pod wpływem padającej wiązki, a emitowane światło jest ponownie zbierane przez obiektyw. Emitowana wiązka przechodzi przez zwierciadło dichroiczne i pada na filtr fali emitowanej, którego zadaniem jest usunięcie światła nie pochodzącego z fluorescencji próbki. Wiązka przechodzi przez okular, a następnie trafia do detektora, którym może być ludzkie oko, kamera CCD lub fotopowielacz. [11]

Mikroskopia fluorescencyjna posiada wiele niezaprzeczalnych zalet. Umożliwia specyficzne znakowanie substancji i organelli komórkowych oraz ich obserwacje. Jest metoda czuła oraz zapewnia uzyskanie obrazów o wysokiej jakości, charakteryzujących się wysokim kontrastem. Z drugiej jednak strony techniki mikroskopii fluorescencyjnej wymagają odpowiedniego przygotowania preparatów (aplikacja barwnika fluorescencyjnego). Niektóre z wykorzystywanych fluorochromów są toksyczne dla komórek, co wymaga ich uprzedniego utrwalenia (ang. fixation), a tym samym uniemożliwia ich obserwacje in vivo. [1]

Literatura

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Molecular Biology of the Cell, 5th Edition, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- [2] http://pl.wikipedia.org/wiki/Mikroskop_optyczny
- [3] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/introduction.html>
- [4] <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasna.html>
- [5] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phase.html>
- [6] <http://www.oficyna.pwr.wroc.pl/e-book/instrum2.pdf>
- [7] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>
- [8] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>
- [9] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicintro.html>
- [10] W. Brutkowski, Mikroskopia konfokalna a mikroskopia szerokiego pola – dwa podejścia do badań przyżyciowych, Kosmos 62 (2013) 171-180
- [11] <http://www.microscopyu.com/print/articles/fluorescence/fluorescencein>