Laboratorium **Zaawansowane techniki optyki biomedycznej**

3

Mikroskopia kontrastu fazowego i ciemnego pola

UWAGA: W trakcie konfiguracji układów pomiarowych Studenci są zobowiązani do zachowania szczególnej ostrożności podczas bezpośredniego kontaktu ze wszystkimi elementami optycznymi w celu ich zabezpieczenia przed uszkodzeniem (m.in. należy sprawdzić stabilność zamocowania elementów). Nie należy dotykać powierzchni tych elementów optycznych powodujących ich zabrudzenie.
Studenci są odpowiedzialni materialnie za uszkodzenie lub zniszczenie elementów optycznych z własnej winy.
Studenci są zobowiązani sprawdzić (przed i po wykonaniu ćwiczenia), czy liczba powierzonych elementów jest taka sama.

CEL ĆWICZENIA:

- zapoznanie z budową i obsługą mikroskopu optycznego ciemnego pola oraz kontrastu-fazowego,
- określenie jego zdolności rozdzielczej mikroskopu,
- przygotowanie oraz obserwacja preparatów mikroskopowych,
- obserwacja struktury fazowej preparatów.

1. WPROWADZENIE TEORETYCZNE

W konwencjonalnych mikroskopach optycznych pracujących w jasnym polu możemy obserwować obiekty, które w różnym stopniu pochłaniają światło w stosunku do otaczającego je ośrodka (środowiska). Innymi słowy są one obiektami amplitudowymi wpływającymi jedynie na amplitudę fal świetlnych w wyniku pochłaniania światła przez znajdujące się w nich różnego rodzaju chromofory. W tym przypadku możemy zaobserwować naturalną kontrastowość pomiędzy badanym obiektem a tłem, czyli otaczającym go ośrodkiem. Istnieją jednak obiekty, które nie absorbują światła, a od otoczenia różnią się jedynie współczynnikiem załamania światła. Obiekty takie nazywamy obiektami fazowymi, gdyż

modulują jednie fazę oświetlającej je fali świetlnej. W przypadku tych obiektów, nie jesteśmy w stanie zaobserwować ich za pomocą konwencjonalnych technik mikroskopowych, ponieważ są ona całkowicie transparentne. Dzieje się tak, ponieważ przestrzenna modulacja fazy fali świetlnej nie jest bezpośrednio obserwowalna za pomocą konwencjonalnych technik mikroskopach jasnego pola oraz za pomocą detektorów rejestrujących natężenie światła, czyli czułych jedynie na przestrzenne zmiany amplitudy fali świetlnej.

Przykładem takich obiektów mogą być np. komórki bakterii umieszczone w wodnym roztworze, które nie są widoczne w zwykłym mikroskopie. Wówczas konieczne jest zastosowanie dodatkowych technik polegających na wybarwieniu tych obiektów, które umożliwia ich obserwację w konwencjonalnych mikroskopach. Jednakże technika ta może prowadzić do zmian strukturalnych zachodzących w komórkach podczas wybarwiania, które sprawią, iż obserwowany obraz komórki nie będzie odpowiadał rzeczywistej strukturze badanego obiektu lub też mogą one prowadzić do śmierci komórek. Dodatkowo często konieczne jest przeprowadzenie procesu utrwalenia komórek, który również prowadzi do ich śmierci. Inną metodą jest zastosowanie dodatkowych znaczników fluorescencyjnych, które pozwalają na obserwację preparatów w mikroskopie fluorescencyjnym. Jednakże metoda ta wymaga zastosowania specjalistycznej aparatury oraz odczynników, co znacznie zwiększa koszty tego badania.

Oprócz wyżej wymienionych metod istnieje też grupa technik pozwalająca na wyeliminowanie światła nieugiętego lub też światła, które nie zostało rozproszone na obiekcie oraz przekształcenie przestrzennej modulacji fazy wiązki świetlnej przez obiekt w przestrzenną modulację jej natężenia, co umożliwia zobrazowanie obiektów fazowych przy pomocy konwencjonalnych detektorów. Do technik tych zaliczyć należy mikroskopię ciemnego pola oraz mikroskopię kontrastu fazowego [1,2,3,4,5]. Największą zaletą tych technik jest fakt, iż umożliwiają one badania struktur fazowych w żywych komórkach.

1.1 Mikroskopia kontrastu fazowego

Z optyki falowej (fourierowskiej) wiadomo, że amplitudowo – fazowe własności obiektu mogą być scharakteryzowane przez funkcję przedmiotową określaną mianem transmitancji amplitudowej i wyrażonej w następujący sposób [3,5]:

$$t(x,y) = |t_0(x,y)| \exp\{i\phi(x,y)\}$$

gdzie człon $|t_0(x,y)|$ opisuje właściwości amplitudowe obiektu (pochłanianie przez niego światła) i może być traktowany za 2D współczynnik transmisji obiektu, a człon $\phi(x,y)$ opisuje właściwości fazowe obiektu, czyli modulację fazową, jakiej ulega podająca na niego wiązką świetlna. W przypadku obiektu całkowicie fazowego, czyli nieabsorbującego, człon $|t_0(x,y)|$ jest równy jedności. Dodatkowo wyraźmy fazę w następujący sposób $\phi(x,y)=\phi_0+\Delta\phi(x,y)$. Jeżeli zastosujemy przybliżenie małej fazy, czyli założymy, że modulacja fazowa, lub też przesunięcie fazowe $\Delta\phi(x,y)$, jakiemu ulegnie fala świetlna padająca na rozważany obiekt jest niewielkie w porównaniu z 2π radianami, wówczas transmitancja amplitudowa przybiera następującą postać:

$$t(x,y)=\exp\{i(\phi_0+\Delta\phi(x,y))\}\approx e^{i\phi_0}\left[1+i\Delta\phi(x,y)\right]$$

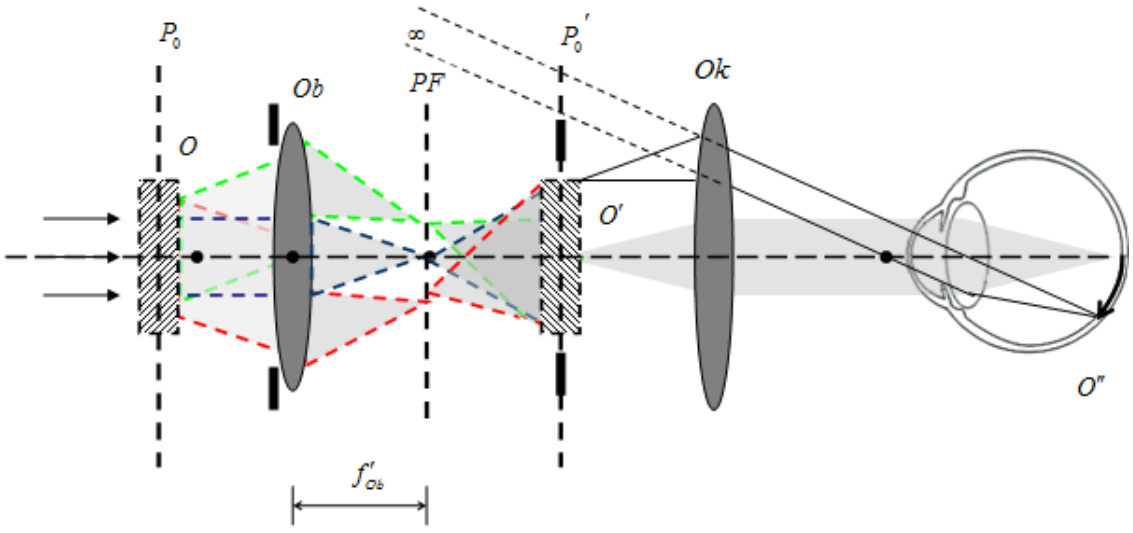
W powyższej zależności zastosowaliśmy rozwinięcie transmitancji amplitudowej w szereg potęgowy i ograniczyliśmy się tylko do dwóch pierwszych wyrazów. Jeżeli przyjmiemy, że ϕ_0 reprezentuje średnie przesunięcie fazowe zachodzące w rozważanym obiekcie, wówczas z definicji człon $\Delta\phi(x,y)$ nie posiada składowej stałej lub też składnika częstości zerowej. Jeżeli obiekt ten oświetlimy płaską falą świetlną o jednostkowej amplitudzie, wówczas człon $e^{i\phi_0}$ reprezentuje fale, które przechodząc przez obiekt ulegają jednorodnemu w całej jego objętości przesunięciu fazowemu, lecz nie zmieniają kierunku propagacji i dalej rozchodzą się wzdłuż osi optycznej. Człon ten reprezentuje składową stałą widma fourierowskiego badanego obiekty zlokalizowaną w płaszczyźnie Fouriera wokół zerowej częstości przestrzennej. Z kolei drugi człon opisuje znacznie słabsze fale świetlne, które zostały ugięte, odchylone od osi optycznej i rozchodzą się w kierunkach zależnych od przesunięcia fazowego $\Delta\phi(x,y)$.

Jeżeli fale tę będą odwzorowane przez układ optyczny konwencjonalnego mikroskopu, wówczas utworzą one obraz obiektu, który możemy opisać w następujący sposób:

$$I\approx\left|1+i\Delta\phi(x,y)\right|^2\approx 1$$

Tym samym nie zaobserwujemy tych obiektów, gdyż obraz będzie miał postać jednorodnie oświetlonej powierzchni, w której kształt oraz struktura wewnętrzna obiektu nie będą się wyróżniać od tła – ośrodka, w którym został umieszczony ten obiekt. W 1935 Frits Zerknie zaproponował modyfikację konwencjonalnych technik mikroskopowych poprzez umieszczenie w odpowiednich płaszczyznach przesłon pierścieniowych oraz nieprzeźroczystych ekranów. Zauważył On, iż głównym problemem, jest fakt, iż fale ugięte

na obiekcie fazowym są znacznie słabsze od fal nieugiętych (o zerowych częstościach przestrzennych), które stanowią tło obrazu mikroskopowego. Odwołując się do teorii tworzenia obrazu w mikroskopie według Abbego [3] (patrz Rys. 1), proces ten możemy podzielić na dwa etapy. W pierwszym z nich, gdy skolimowana wiązką świetlna, którą możemy przybliżyć falą płaską, padając na przedmiot w płaszczyźnie P_0 ulega dyfrakcji i tworzy szereg fal płaskich rozchodzących się w różnych kierunkach zależnych od częstości przestrzennych, które padając na obiektyw są skupiane w jego obrazowej płaszczyźnie ogniskowej, którą jak wiemy możemy traktować za płaszczyznę Fouriera *PF*, tworząc specyficzny rozkład punktów świetlnych stanowiących obraz dyfrakcyjny przedmiotu – jego widmo fourierowskie. Widzimy zatem, iż w tym etapie mamy do czynienia z analizą harmoniczną transmitancji amplitudowej, czyli ich rozkładem na poszczególne składowe widma Fouriera. Z kolei w drugim etapie teorii Abbego, zachodzi synteza obrazu, który powstaje w wyniku superpozycji sferycznych fal świetlnych wyemitowanych przez punktowe źródła światła zlokalizowane w płaszczyźnie Fouriera (*PF*). Fale te nakładają się w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej okularu P'_o, w której powstaje obraz geometryczny podobny do analizowanego przedmiotu. Kolejna soczewka-okular działa w podobny sposób jak obiektyw, lecz na Rys. 1 ten proces został pominięty. Oczywistym się staje, iż w świetle tej teorii zniekształcenie obrazu w stosunku do obiektu, tłumaczyć możemy skończonymi rozmiarami obiektywu. Skończona średnica apertury obiektywu sprawia, iż część fal ugiętych na przedmiocie nie dociera do obiektywu, a tym samym zostaje wyeliminowana z widma fourierowskiego, co w konsekwencji sprawia, że fale te nie biorą udziału w syntezie obrazu. Prowadzi to do utraty części informacji na temat obiektu zawartych w falach ugiętych o wysokich częstościach przestrzennych.



Rys. 1 Schemat tworzenia obrazu w mikroskopie optycznym według Abbego

Opierając się na tej teorii Zernik zauważył, że nieugięte na przedmiocie fal świetlne w płaszczyźnie Fouriera skupiają się w pobliżu zerowej częstości przestrzennej, wokół osi optycznej podczas, gdy fale ugięte skupiają się w przestrzeni odpowiadającej wyższym częstościom przestrzennym. Dlatego też zaproponował, iż w celu zmiany relacji fazowej pomiędzy falami nieugiętymi a ugiętymi należy umieścić w obrazowej płaszczyźnie ogniskowej obiektywu płytkę fazową. Płytka wykonana była z transparentnego szkła, lecz w jej centrum znajdował się przeźroczysty dysk, którego grubość oraz współczynnik załamania światła były tak dobrane, aby wprowadzać przesunięcie fazowe $\pi/2$ lub $3\pi/2$. Dzięki umieszczeniu tej płytki w płaszczyźnie Fouriera obiektywu, nieugięte na przedmiocie fale świetlne ulegają przesunięciu fazowemu podczas, gdy fale ugięte przechodzą przez tą płytkę bez przesunięcia fazowego. W tym przypadku obraz utworzony przez mikroskop możemy opisać następującymi zależnościami:

$$I = \left| e^{i\frac{\pi}{2}} + i\Delta\phi(x,y) \right|^2 = \left| i(1+\Delta\phi(x,y)) \right|^2 \approx 1 + 2\Delta\phi(x,y)$$

oraz

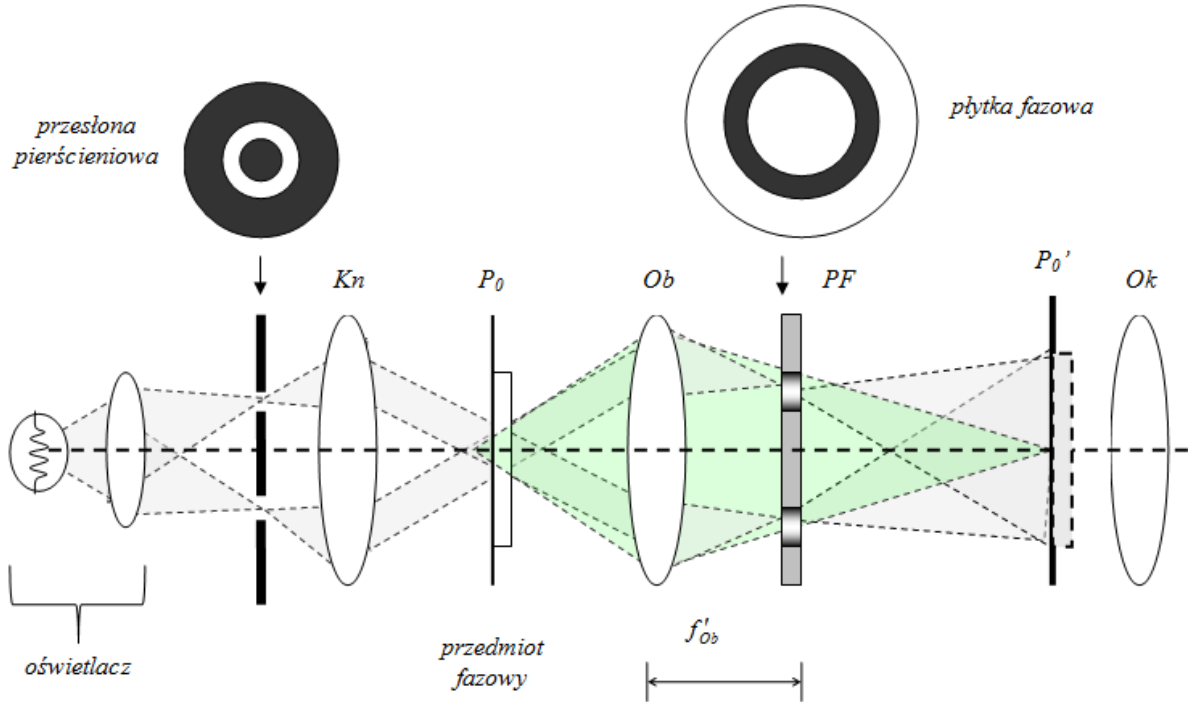
$$I = \left| e^{i\frac{3\pi}{2}} + i\Delta\phi(x,y) \right|^2 = \left| -i(1+\Delta\phi(x,y)) \right|^2 \approx 1 - 2\Delta\phi(x,y).$$

Widzimy zatem, iż powyższe zależności pokazują, że przestrzenny rozkład natężenia obrazu jest w sposób liniowy zależny od przestrzennych zmian fazy obiektu. Tym samym w rejestrowanych obrazach mikroskopowych widoczne będą obiekty fazowe, które nie mogły być widoczne w obrazach otrzymanym za pomocą konwencjonalnych mikroskopów. W zależności od przesunięcia fazowego wprowadzanego przez płytkę fazową wyróżniamy dwie techniki kontrastu fazowego: *jasnego pola* dla przesunięcia $\pi/2$, *ciemnego pola* dla przesunięcia $3\pi/2$. Widzimy zatem, iż obrazy mikroskopowe zarejestrowane w obu przypadkach mają odwrócony kontrast względem siebie.

Obecnie powszechnie stosowana technika kontrastu fazowego nieco odbiega od oryginalnie zaproponowanego przez Zernika rozwiązanie, jednakże podstawy tej techniki zostały niezmienione tzn. polegają na wprowadzeniu odpowiedniego przesunięcia fazowego fal, które nie uległy dyfrakcji na obiekcie, czyli fal zerowego rzędu ugięcia lub o zerowej częstości przestrzennej (patrz Rys. 2).

Obecnie stosuje się pozaosiowe oświetlenie przedmiotu poprzez umieszczenie w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej kondensora *Kn* pierścieniowej przesłony tak,

iż wiązki świetlne przechodzące przez tą przesłonę oraz kondensor *Kn* oświetlając przedmiot fazowy są wiązkami równoległymi rozchodzącymi się pozaosiowo pod pewnym kątem w stosunku do osi optycznej układu mikroskopu. Padając na przedmiot fazowy ulegają one dyfrakcji, jednak fale nieugięte biegną dalej nie zmieniając swojego kierunku tak, iż obiektyw *Ob* skupia je w swojej płaszczyźnie Fouriera *PF*, gdzie zlokalizowana jest pierścieniowa płytka fazowa. Pierścień na tej płytce pokryty jest substancją, o określonej grubości oraz współczynniku załamania, która osłabia natężenie oraz wprowadza dodatkowe przesunięcie fazowe fal nieugiętych na obiekcie.



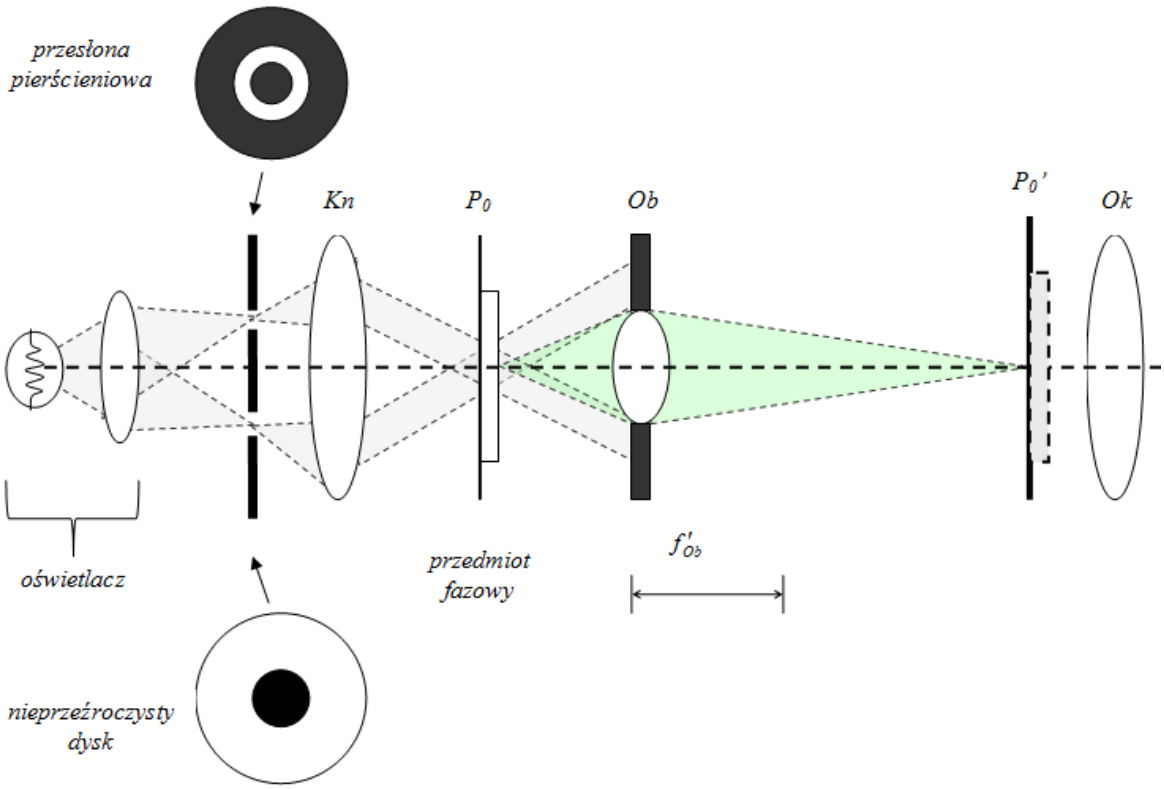
Rys. 2 Schemat współczesnego mikroskopu z kontrastem fazowym

Z kolei fale ugięte, które w tym przypadku zlokalizowane są wokół pierwotnego kierunku rozchodzenia się fali zerowego rzędu ugięcia, czyli fal nieugiętych, przechodzą bez jakiejkolwiek zmiany przez obszary płytki otaczające pierścień modulujący fazę i amplitudę fal nieugiętych. W konsekwencji podobnie, jak w poprzednim przypadku w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej P_0' okularu powstaje obraz geometryczny zbliżony do obiektu, który następnie jest odwzorowywany przez okular.

Mikroskopia kontrastu-fazowego pozwala na obserwację żywych komórek, w których widoczne są ruchy cytoplazmy, co oznacza, że technikę też można z powodzeniem stosować do badania wpływu działania różnych czynników, czy też stresu środowiskowego, na żywotność komórek bez konieczności stosowania kosztownych metod biochemicznych.

1.2 Mikroskopia ciemnego pola

Mikroskopia ciemnego pola jest techniką dość zbliżoną do techniki kontrastu-fazowego i polega na pozaosiowym oświetleniu badanego obiektu [4] (patrz Rys. 3). W tym celu w przedmiotowej płaszczyźnie kondensora *Kn* wprowadza się przesłonę pierścieniową lub nieprzeźroczysty dysk. W konsekwencji przedmiot fazowy oświetlony jest przez pozaosiowo rozchodzące się wiązki świetlne.



Rys. 3 Schemat mikroskopu ciemnego pola

Technika ta opiera się na odwzorowaniu przez obiektyw jedynie fal świetlnych ugiętych, bądź też rozproszonych, na badanym obiekcie. Fale świetlne, które nie uległy dyfrakcji, bądź też rozproszeniu, biegną dalej w tym samym kierunku, jak po przejściu przez kondensor. Kąt pod jakim propagują wiązki oświetlające przedmiot, jest dobrany w taki sposób, aby nieugięte fale świetlne nie trafiały do obiektywu. W konsekwencji mamy do czynienia z całkowitym wyeliminowaniem fal zerowego rzędu ugięcia, czyli innymi słowy fal tworzących tło obrazu tworzonego przez obiektyw w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej okularu. Sprawia to, iż obraz obiektu utworzonego wyniku odwzorowania światła ugiętego bądź rozproszonego widoczny jest na ciemnym polu widzenia. Stąd też bierze się nazwa omawianej techniki.

Technika ta pozwala na obserwację obiektów, których wielkość jest na granicy lub też nawet poniżej zdolności rozdzielczej mikroskopu. Stosuje się ją do obserwacji obiektów w płynnym środowisku np. zawiesin komórek drożdży, bakterii, protoplastów. Można ją

również stosować w przypadku wybarwionych lub słabo wybarwionych przeoratów, lub też jakichkolwiek innych obiektów, które będą lepiej widoczne w ciemnym polu.

2. UKŁAD POMIAROWY

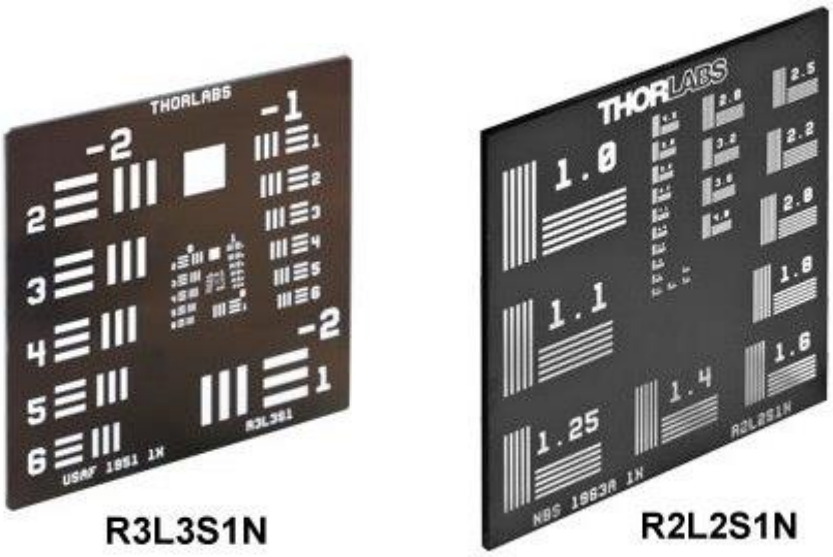
W trakcie zajęć laboratoryjnych Studenci będą korzystać z mikroskopu optycznego Nikon Eclipse 2000 (patrz Rys. 4). Przed rozpoczęciem pomiarów Studenci powinni wysłuchać uwag Prowadzącego dotyczących użytkowania mikroskopu.

Rys. 4 Mikroskop optyczny Nikon Eclipse 2000

3. PRZEBIEG ĆWICZENIA

3.1 Określenie zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego

Korzystając z testów liniowych udostępnionych przez prowadzącego należy zrejestrować ostre obrazy najbliżej siebie położonych linii równoległych testu, które można jeszcze do siebie odróżnić. Następnie należy określić zdolność rozdzielczą mikroskopu. W celu odczytania zdolności rozdzielczej na podstawie dostarczonych przez Prowadzącego testów należy skorzystać z informacji dostępnych na stronie www ich producenta:
http://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4338



Rys. 5 Przykładowe testy rozdzielczości: (a) zdolność rozdzielcza wyrażona jest w liczbie linii/mm (lines/mm); (b) zdolność rozdzielcza wyrażona w **największej częstości przestrzennej linii/ mm (cycles/mm) [5]**

3.2 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).

3.2.1 Przygotowanie preparatu z łuski cebuli według wskazówek Prowadzącego.

3.2.2 Przygotowanie preparatu z drożdży spożywczych według wskazówek Prowadzącego.

3.2.3 Wybarwianie preparatów.

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

3.2.4 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.

3.2.5 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.

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 ***Lucia*** (skrót na pulpicie). W trakcie zajęć Studenci zostaną zapoznani przez Prowadzącego ze sposobem korzystania z oprogramowania akwizycji obrazów. Należy zarejestrować zdjęcia wszystkich preparatów przez i po wybarwieniu uzyskana za pomocą mikroskopu pracującego w jasnym polu, mikroskopy działającego w trybie ciemnego pola oraz kontrastu-fazowego. Należy zaobserwować wszelkie równice pomiędzy wszystkimi rodzajami próbek i wszystkimi technikami odwzorowania ich obrazów.

3.4 Obserwacje gotowych preparatów.

Należy znaleźć i zarejestrować obrazy wybranych przez prowadzącego gotowych preparatów mikroskopowych przy największym możliwym powiększeniu oraz zaznaczyć charakterystyczne struktury komórkowe.

4. OPRACOWANIE WYNIKÓW

W sprawozdaniu należy umieścić wyniki wszystkich przeprowadzonych zadań pomiarowych oraz odpowiednio je skomentować. Należy również załączyć i podpisać wszystkie zarejestrowane obrazy. We wnioskach należy zmieścić wyczerpujące porównanie różnic pomiędzy obrazami rejestrowanymi za pomocą różnych technik mikroskopowych, jak również obserwowalnych różnic pomiędzy analizowanymi preparatami wybarwionymi, niewybarwionymi itp.

LITERATURA:

[1] F. Ratajczyk, *Instrumenty optyczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.

[2] E. Hecht, *Optics*, Addisson Wesley, San Francisco 2002.

[3] J.W. Goodman, I*ntroduction to Fourier Optics*, Roberts and Company Publisher, Colorado 2005.

[4] E.U. Kurczyńska, D. Dorowska – Wykręt, *Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej. Ćwiczenia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.

[5] I.Wilk, P.Wilk, Optyka fizyczna cz.1, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1995.

Pytania kontrolne:

1. Wyjaśnij pojęcia przedmiotu fazowego, amplitudowego oraz amplitudowo – fazowego.
2. Wymień i opisz dwa podstawowe etapy tworzenia obrazu w mikroskopie optycznym według Abbego.
3. Z czym związane jest zniekształcenie obrazu przedmiotu odwzorowywanego przez mikroskop w stosunku do samego przedmiotu w ujęciu teorii Abbego?
4. Opisz na czym polega technika kontrastu fazowego oraz narysuj schemat mikroskopu kontrastu fazowego. Czym różni się technika kontrastu fazowego jasnego i ciemnego pola?
5. Opisz na czym polega technika ciemnego pola oraz narysuj schemat mikroskopu ciemnego pola? Do obserwacji jakich obiektów jest ona stosowana? Jakie są różnice pomiędzy techniką ciemnego pola a techniką kontrastu fazowego?

Opracował: dr inż. Igor Buzalewicz

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Wydziału PPT Politechniki Wrocławskiej