

LABORATORIUM OPTYKI GEOMETRYCZNEJ I INSTRUMENTALNEJ

ĆWICZENIE OG-4 PODSTAWY MIKROSKOPII OPTYCZNEJ

1 Cele ćwiczenia

Zapoznanie się z budową i podstawową obsługą mikroskopu optycznego, pracującego w jasnym polu w świetle przechodzącym. Nauka kalibracji oraz pomiaru apertury numerycznej i zdolności rozdzielczej mikroskopu. Obserwacja próbek i preparatów.

2 Zakres wymaganych zagadnień wstępnych

Do poprawnego wykonania ćwiczenia niezbędna jest znajomość poniższych zagadnień, weryfikowanych w trakcie egzaminu wejściowego:

- budowa mikroskopu,
- powstawanie obrazu w mikroskopie,
- powiększenie liniowe,
- apertura numeryczna mikroskopu,
- zdolność rozdzielcza.

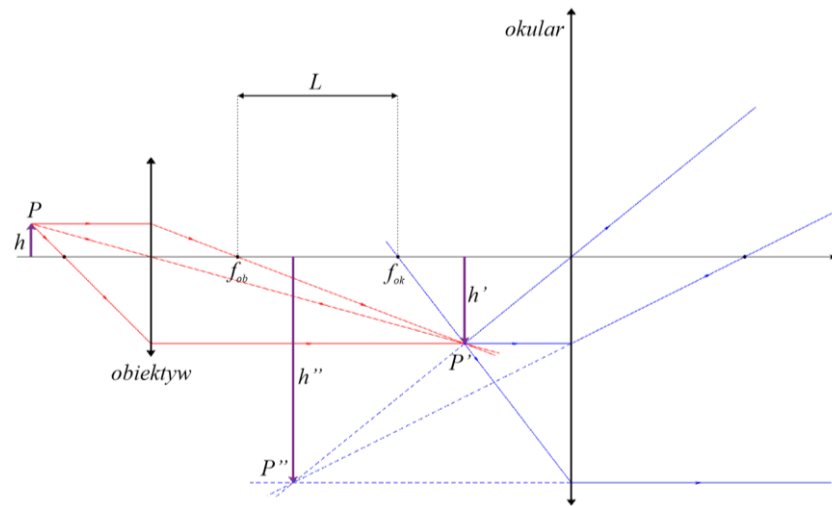
3 Wstęp teoretyczny

Mikroskop optyczny jest jednym z podstawowych narzędzi badawczych, wykorzystywanych w nauce i technice, w tym biologii i medycynie. Istnieje wiele rodzajów układów mikroskopowych, ale podstawowa idea działania jest wspólna.

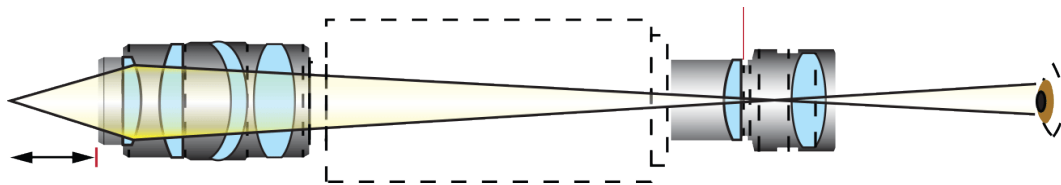
Układ optyczny mikroskopu składa się z obiektywu i okularu, rozmieszczonych na końcach rury zwanej tubusem. Przedmiot ustawia się w odległości większej niż ogniskowa obiektywu, a mniejszej niż podwójna ogniskowa. Dzięki temu, powstający obraz jest rzeczywisty, powiększony i odwrócony. Obraz ten staje się przedmiotem rzeczywistym dla okularu, w którym powstaje obraz prosty, powiększony i pozorny. Aby to było możliwe, ten przedmiot musi pojawić się w odległości od okularu mniejszej niż jego ogniskowa. Schemat optyczny mikroskopu przedstawiono na rysunku 1.

W rzeczywistych realizacjach, aby uzyskiwać możliwie najlepsze obrazy mimo występujących aberracji, obiektywy i okulary mikroskopów tworzą złożone układy optyczne, składające się z kilku soczewek różnych kształtów i wykonanych z różnych materiałów (rys. 2). Dodatkowo, w obrębie tubusu ustawia się dodatkowe soczewki i przysłony.

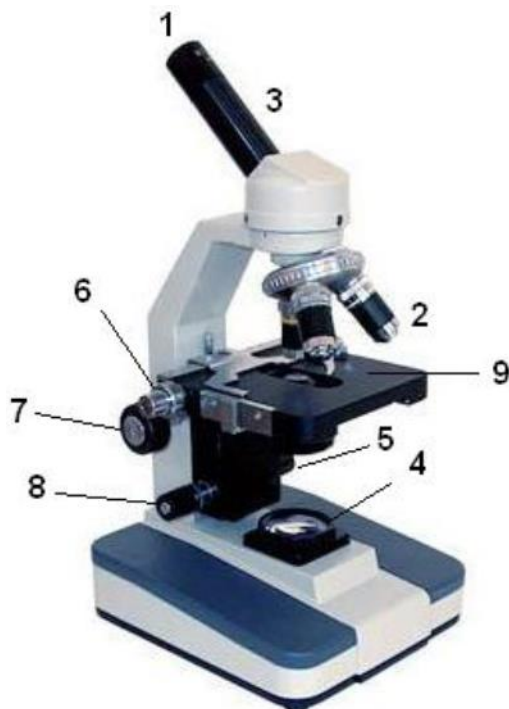
Jednym z rodzajów mikroskopów jest mikroskop pracujący w tzw. jasnym polu w świetle przechodzącym. Jego charakterystyczną cechą jest umieszczenie oświetlenia po przeciwnej stronie próbki (np. preparatu biologicznego) niż obiektyw mikroskopu. W układzie mikroskopowym taka próbka obserwowana jest w świetle przechodzącym. Podstawowe elementy mikroskopu tego typu przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 1. Schemat powstawania obrazu w mikroskopie.



Rysunek 2. Przykład budowy rzeczywistego mikroskopu optycznego.

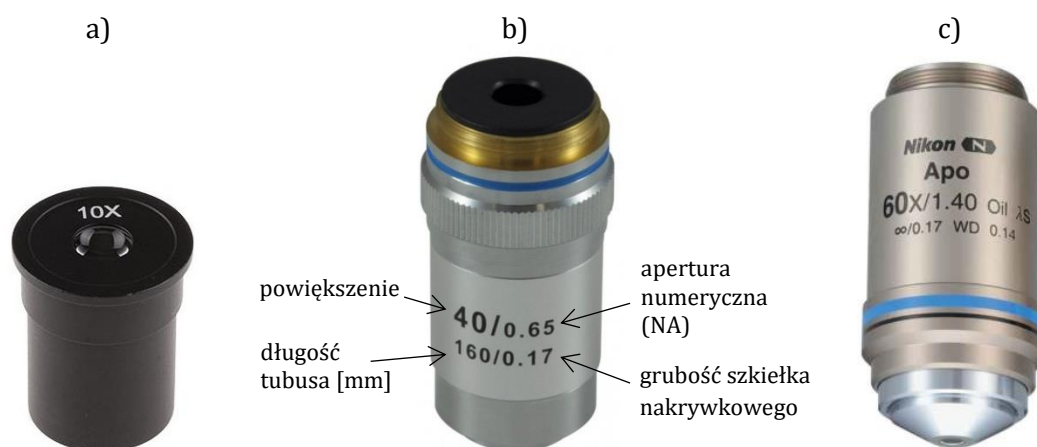


- 1 – okular,
- 2 – obiektyw,
- 3 – tubus,
- 4 – zwierciadło lub oświetlacz,
- 5 – kondensator,
- 6 – śruba mikrometryczna do przesuwu stolika,
- 7 – śruba do zgrubnego przesuwu stolika góra/dół,
- 8 – dokładna zmiana położenia stolika góra/dół,
- 9 – stolik przedmiotowy.

Rysunek 3. Podstawowe elementy mikroskopu jasnego pola w świetle przechodzącym.

W mikroskopie obiektywy i okulary mogą być wymieniane, aby uzyskać odpowiednie do potrzeb powiększenie. Na okularze standardowo podawana jest jedynie informacja o powiększeniu (rys. 4a). W przypadku obiektywów podaje się przede wszystkim takie informacje jak (rys. 4b): powiększenie, apertura numeryczna, długość tubusa, do pracy z którym jest przewidziany dany

obiektyw oraz odległość pracy czyli odległość w jakiej powinien znajdować się preparat od pierwszej powierzchni optycznej (czołowej) obiektywu. Jednak często podawane są również inne istotne z punktu widzenia użytkownika informacje (rys. 4c).



Rysunek 4. Oznaczenia na: a) okularze, b, c) obiektywie mikroskopowym.

Powiększenie obiektywu mikroskopowego P_{ob} wyrażone jest wzorem (1), powiększenie okularu P_{ok} wzorem (2) a powiększenie całkowite P_c mikroskopu wzorem (3):

$$P_{ob} = \frac{L}{f_{ob}}, \quad (1)$$

$$P_{ok} = \frac{D}{f_{ok}}, \quad (2)$$

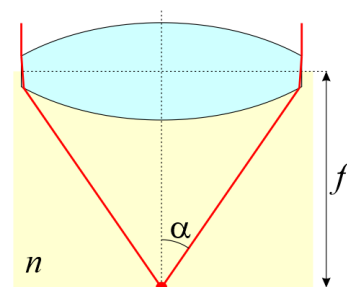
$$P_c = \frac{h''}{h} = P_{ob}P_{ok} = \frac{L}{f_{ob}} \frac{D}{f_{ok}}, \quad (3)$$

gdzie L jest długością optyczną tubusu mikroskopu (odległość między ogniskiem obrazowym obiektywu a ogniskiem przedmiotowym okularu), f_{ob} jest ogniskową obiektywu, f_{ok} jest ogniskową okularu, $D = 250$ mm jest odległością dobrego widzenia a h i h'' są odpowiednio wysokością przedmiotu i wysokością końcowego obrazu.

Wielkością charakterystyczną obiektywu, określającą możliwość jego optymalnego wykorzystania w danym środowisku jest apertura numeryczna NA dana wzorem (4)

$$NA = n \sin(\alpha), \quad (4)$$

gdzie n jest współczynnikiem załamania środowiska między przedmiotem i obiektywem, zaś α jest połową maksymalnego kąta pod jakim promienie wychodzące z przedmiotu mogą przejść przez obiektyw (rysunek 5). Wielkość apertury numerycznej jest ściśle związana z powiększeniem obiektywu, tzn. im większe powiększenie obiektywu tym większa apertura numeryczna.



Rysunek 5. Apertura numeryczna obiektywu mikroskopowego.

Od apertury numerycznej zależy również zdolność rozdzielcza oraz głębia ostrości obiektywu. Zdolność rozdzielcza d zdefiniowana jest wzorem (5)

$$d = \frac{0,61 \lambda}{NA}, \quad (5)$$

gdzie λ jest długością fali światła użytego do obrazowania. Jest ona zdefiniowana jako najmniejsza odległość pomiędzy dwoma punktami próbki, które mogą być wciąż rozpoznawalne przez obserwatora jako osobne elementy (rysunek 6). Głębina ostrości g zdefiniowana jest wzorem (6)

$$g = \frac{71,5}{P_c NA} \left(1 + \frac{1}{P_c}\right). \quad (6)$$



Rysunek 6. Ilustracja zdolności rozdzielczej.

4 Opis elementów części pomiarowej ćwiczenia

4.1 Kalibracja mikroskopu

Mikroskop służy nie tylko do obserwacji małych elementów. Może być również wykorzystywany do pomiarów. Aby uzyskiwane wyniki odpowiadały rzeczywistości konieczna jest kalibracja mikroskopu. W tym celu wykorzystuje się przedmiot o znanych wymiarach (linijka). Porównanie rzeczywistych rozmiarów przedmiotu z wynikami odczytanymi w układzie mikroskopowym pozwalają na eksperymentalne określenie powiększenia układu obiektyw-okular w mikroskopie.

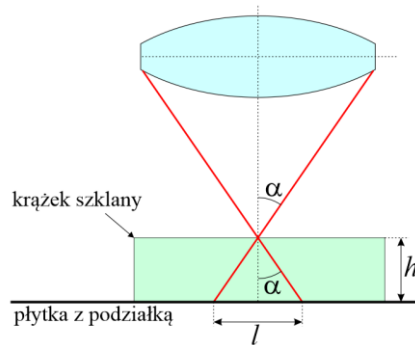
4.2 Pomiar grubości włosa i światłowodu

Wykalibrowany układ mikroskopowy jest gotowy do użytku, tzn. pozwala na pomiar rzeczywistych rozmiarów próbki. Jako próbki o nieznanymi wielkościami wykorzystane zostaną światłowody i włosy.

4.3 Pomiar apertury numerycznej

Aperturę numeryczną obiektywu mikroskopowego można zmierzyć zgodnie z ideą przedstawioną na rysunku 7. Pomiar odbywa się w dwóch krokach. Najpierw ustawiamy obiektyw w takiej odległości od próbki aby widzieć ostro jej górną powierzchnię. Następnie, między obiektyw a próbkę wkładamy krążek szklany o znanej grubości, wyjmujemy okular mikroskopowy i patrząc przez tubus i obiektyw odczytujemy jak duże jest pole widzenia obiektywu. Ostateczną wartość apertury numerycznej wyznacza się ze wzoru (7)

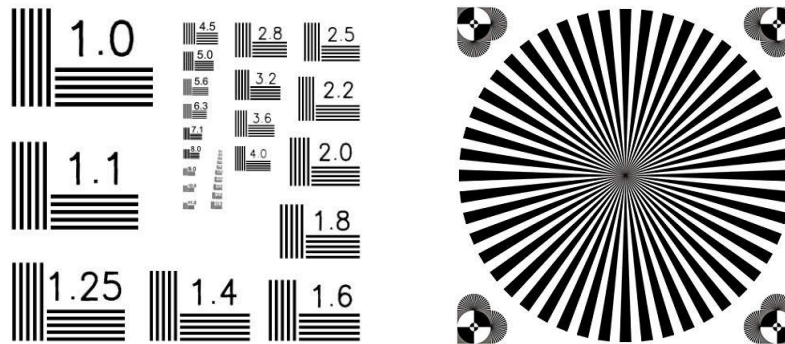
$$\sin(\alpha) = \sqrt{\frac{tg^2(\alpha)}{1+tg^2(\alpha)}} = \frac{l}{\sqrt{4h^2+l^2}} \quad (7)$$



Rysunek 7. Bieg promieni przy pomiarze apertury numerycznej obiektywu mikroskopowego.

4.4 Pomiar rozdzielczości mikroskopu

Rozdzielczość mikroskopu określa się wykorzystując odpowiednie testy (rys. 8). Pomiar polega na określeniu granicznych odległości pomiędzy elementami przedmiotu, których nie można traktować jako dwa osobne elementy.



Rysunek 8. Przykładowe testy rozdzielczości (zdolności rozdzielczej) mikroskopu.

4.5 Obserwacja preparatów biologicznych

Ostatnia część ćwiczenia poświęcona jest obserwacji różnych preparatów biologicznych.

5 Wykonanie ćwiczenia i opracowanie wyników

A. Kalibracja mikroskopu

1. Ustaw rewolwer mikroskopowy w taki sposób, aby korzystać z obiektywu o powiększeniu x10.
2. Jako przedmiot wykorzystaj płytkę ze skalą o podziałce 10 μm .
3. Ustaw podziałkę okularu w takim położeniu, aby pokrywała się z podziałką na płytce ze skalą.
4. Odczytaj liczbę podziałek skali okularu odpowiadającą liczbie podziałek skali na płytce. Zrób to wykorzystując całą podziałkę okularu.
5. Określ, jaka wielkość odpowiada jednej podziałce na okularze.
6. Pomiary powtórz dla obiektywu o powiększeniu x40.

B. Pomiar grubości włosa i światłowodu

1. Jako przedmiot wykorzystaj własny włos.
2. Umieść go na płytce podstawkowej.
3. Określ grubość włosa w ilości podziałek na okularze.
4. Korzystając z wyników kalibracji oblicz rzeczywistą grubość włosa.
5. Powtórz pomiar dla drugiego obiektywu.
6. Powtórz pomiary mierząc grubość światłowodów.
7. Zwróć uwagę na ograniczoną głębokość ostrości mikroskopu.

C. Pomiar apertury numerycznej

1. Na stoliku mikroskopu połóż płytkę ze skalą wzorcową o podziałce 100 μm .
2. Dla obiektywu o powiększeniu $\times 10$ znajdź ostry obraz podziałki. Ustaw ją w taki sposób, aby była średnicą pola widzenia.
3. Pomiedzy przedmiot a obiektyw wsuń krążek szklany (należy go trochę pobrudzić). Jeśli krążek nie mieści się, to należy nieco obniżyć stolik.
4. Patrząc przez okular znajdź ostro widzianą górną powierzchnię krążka.
5. Wyjmij okular i na jego miejsce włóż przysłonę z otworkiem.
6. Usuń delikatnie płytkę szklaną.
7. Patrząc przez otworek i nie zmieniając położenia próbki odczytaj liczbę działek (n) widocznych na skali.
8. Przelicz liczbę n działek na długość l wyrażoną w milimetrach.
9. Zmierz za pomocą suwmiarki grubość krążka szklanego h .
10. Aperturę numeryczną oblicz ze wzoru 7.
11. Powtórz pomiar dla obiektywu o powiększeniu $\times 40$.

D. Pomiar rozdzielczości mikroskopu

1. Ustaw obiektyw o powiększeniu $\times 10$.
2. Jako przedmiot wykorzystaj dostarczony slajd.
3. Staraj się znaleźć taki obrazek, dla którego jesteś w stanie określić, że ma strukturę wewnętrzną a nie jest prostokątem.
4. Odczytaj numer obrazu.
5. Wiedząc, że dłuższy bok slajdu ma 35 mm i slajd został przygotowany w ten sposób, że na tej długości znajdują się 8192 piksele wyznacz rozdzielczość mikroskopu (numer przy każdym obrazku określa ile pikseli szerokości ma każdy biały lub czarny obszar).

E. Obserwacja preparatów biologicznych

1. Dokonaj obserwacji 2 wybranych preparatów mikroskopowych po jednym dla obiektywów o powiększeniach $\times 10$ i $\times 40$.
2. Postaraj się zrobić zdjęcie oglądanych preparatów.
3. Korzystając z kalibracji podaj wymiary rzeczywiste wybranych charakterystycznych elementów obrazu.

Literatura:

1. <http://www.microscopyu.com/museum/labophot.html>
2. M.W. Davidson, M. Abramowitz, "Optical microscopy"
3. <http://www.kmimp.agh.edu.pl/pliki/cz6.pdf>
4. <http://wwwnt.if.pwr.wroc.pl/kwazar/jaktopracuje/135501/index.html>

5. <http://www.optec.pl/>
6. <http://www.w12.pwr.wroc.pl/swiatlowody/pdf/mikroskop.pdf>