

# WYZNACZANIE SUCHEJ MASY KRWIWEK CZERWONYCH PRZY UŻYCIU MIKROSKOPU POLARYZACYJNO-INTERFERENCYJNEGO

Mikroskop polaryzacyjno-interferencyjny jest przyrządem opartym na podobnej zasadzie działania co mikroskop kontrastowo-fazowy. Jednak w porównaniu z mikroskopem kontrastowo-fazowym znajduje on znacznie szersze zastosowanie. Oprócz możliwości obserwacji obiektów fazowych pozwala on dokonywać licznych pomiarów, między innymi przesunięcia fazowego, grubości obiektów, współczynnika załamania światła, stężenia substancji, zawartości suchej masy w komórkach oraz wielu innych wielkości fizycznych.

Zasada działania mikroskopu interferencyjnego opiera się na pomiarze przesunięcia fazowego światła przechodzącego przez dany obiekt w stosunku do środowiska o innym współczynniku załamania, np. tła. To przesunięcie fazowe jest proporcjonalne do współczynnika załamania światła. Ponieważ wielkość współczynnika załamania światła zależy od stężenia substancji rozpuszczonych w roztworze można na tej podstawie, stosując proste obliczenia matematyczne wyznaczyć np. suchą masę komórki.

Jedną z odmian mikroskopu interferencyjnego, znajdującą obecnie szerokie zastosowanie w biologii komórki jest mikroskop interferencyjny o kontraście różnicowym (DIC). Ten układ optyczny uwidacznia struktury różniące się współczynnikiem załamania światła, wykorzystując bardzo nieznaczne przesunięcie w fazie interferujących promieni świetlnych, rzędu zdolności rozdzielczej obiektywu mikroskopowego. Wytwarzane w ten sposób obrazy sprawiają wrażenie „trójwymiarowości”.

## Zakres materiału obowiązujący do ćwiczeń:

1. Budowa i zasada działania mikroskopu polaryzacyjno-interferencyjnego (metoda prążkowa i metoda dyferencjalna).
2. Załamanie, interferencja i dyfrakcja światła oraz prawa dotyczące tych zjawisk.
3. Dwójłomność, polaryzacja światła, skręcenie płaszczyzny polaryzacji.

## Wykonanie ćwiczenia:

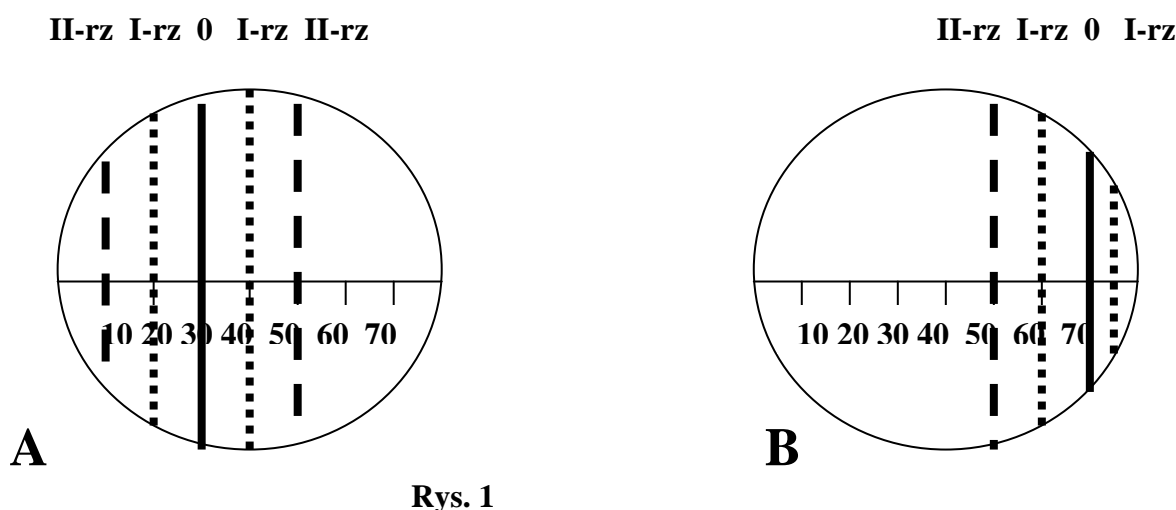
**Uwaga!** W nawiasach podane są numery stron instrukcji obsługi mikroskopu.

1. Zapoznać się z częściami mikroskopu polaryzacyjno-interferencyjnego (str. 21-29).
2. Złożyć mikroskop MPI-5. Założyć kondensor z przesłoną szczelinową oraz okulary ortoskopowe 12.5x. Wkręcić do dysku rewolwerowego obiektywy achromatyczne (**bez oznaczenia PI**) 20x i 100x.
3. Przygotować preparat z krwinek
4. Ustawić oświetlenie według zasady Köhlera, stosując obiektyw 20x. Do ustawienia oświetlenia należy użyć przygotowanego preparatu z krwinek i postępować zgodnie z instrukcją obsługi mikroskopu (str.30-31).
5. W miejsce jednego okularu umieścić okular pomiarowy 12 x MO. Ostrożnie ustawić nad preparatem obiektyw 100x, korygując ostrość jedynie śrubą mikro.
6. Wiedząc, że najmniejsza działka okularu pomiarowego odpowiada 0.59  $\mu\text{m}$  wykonać pomiar średnicy dla 10 krwinek i obliczyć średnią średnicę krwinki.
7. Nad preparatem ponownie ustawić obiektyw 20x i założyć okulary ortoskopowe 12.5x.
8. Przygotować mikroskop do pracy w polu prążkowym postępując zgodnie z instrukcją obsługi mikroskopu (str. 35-36).

## Wyznaczanie odległości międzyprążkowej $h$ dla pryzmatu prążkowego nr 2

Wartość  $h$  jest równa wielkości przesunięcia pryzmatu dwójłomnego, które powoduje przemieszczenie obrazu prążków w polu widzenia o odcinek równy odległości pomiędzy sąsiednimi prążkami.

Aby wyznaczyć wartość  $h$  należy w miejsce jednego okularu założyć okular pomiarowy 12xMO.



Najdokładniej można ją wyznaczyć przemieszczając obraz prążków o odległość pomiędzy jak najdalej od siebie leżącymi, ale jeszcze wyraźnie widocznymi prążkami. Na Rys. 1 przedstawiono przykład takiego pomiaru.

1. Ustawić środek prawego prążka  $k$ -tego rzędu na wybraną działkę okularu pomiarowego (na rys. 1A prążek prawy II rzędu ustawiony jest na działkę 50).
2. Odczytać wartość położenia pryzmatu ( $W1$ ) na podziałce śruby mikrometrycznej (służącej do przesuwu pryzmatu w kierunku prostopadłym do osi optycznej). Działka elementarna tej podziałki wynosi 0,01 mm.
3. Następnie na wybranej działce okularu pomiarowego ustawić środek lewego prążka  $k$ -tego rzędu (na rys. 1B prążek lewy II rzędu ustawiony jest na działkę 50).
4. Odczytać wartość położenia pryzmatu ( $W2$ ) na podziałce śruby mikrometrycznej.

Im większe  $k$  uda się uzyskać tym pomiar wartości  $h$  będzie dokładniejszy. W przykładzie na Rys. 1, wartość  $k=2$  (zarówno dla prążka leżącego po prawej, jak i lewej stronie prążka zerowego)

**NASTĘPNIE DZIELĄC RÓŻNICĘ POMIĘDZY DWOMA POŁOŻENIAMI PRYZMATU ( $W1-W2$ ) PRZEZ LICZBĘ ODLEGŁOŚCI MIĘDZYPRAŻKOWYCH ( $k_{pr} + k_l$ ) (w przykładzie na rys. 1 liczba ta wynosi 4, bo  $k_z$  prawej strony = 2 i  $k_z$  lewej strony = 2) OTRZYMUJEMY POSZUKIWANĄ WARTOŚĆ  $h$ :**

$$h = (W1-W2)/(k_{pr} + k_l)$$

Każda osoba w zespole wykonuje 2 oznaczenia wartości  $h$ , biorąc różne wartości  $k$ .

Następnie ze wszystkich obliczonych wartości  $h$ , należy obliczyć wartość średnią.

### Wyznaczanie stałej $p'$

**Stała  $p'$**  jest wartością konieczną do pomiaru różnicy drogi optycznej w polu prążkowym.

Do jej wyznaczenia należy użyć jako preparatu szkiełka mikrometrycznego. Obserwowany obraz podziałki powinien być rozdwojony. Kreski podziałki szkiełka mikrometrycznego należy ustawić równoległe do prążków interferencyjnych, a następnie przesunąć pryzmat dwójłomny w kierunku prostopadłym do osi optycznej, nastawiając środek ciemnego prążka zerowego na prawy obraz wybranej kreski i odczytać na podziałce śruby mikrometrycznej wielkość dokonywanego przy tym przesuwu pryzmatu dwójłomnego ( $p'_1$ ). Następnie nastawić środek ciemnego prążka zerowego na lewy obraz wybranej (tej samej) kreski i odczytać na podziałce śruby mikrometrycznej wielkość dokonywanego przy tym przesuwu pryzmatu dwójłomnego ( $p'_2$ ).

Różnica pomiędzy odczytanymi wartościami jest stałą  $p'$ .

$$p' = p'_1 - p'_2$$

Każda osoba w zespole wykonuje 2 oznaczenia wartości  $p'$ .

Następnie ze wszystkich obliczonych wartości  $p'$ , należy obliczyć wartość średnią.

### Wyznaczanie różnicy drogi optycznej $\phi$

Metoda ta polega na pomiarze wielkości przemieszczenia  $p$  pryzmatu dwójłomnego, jakie jest potrzebne do maksymalnego zaciemnienia tego samego fragmentu w obydwu rozdzielonych obrazach badanego przedmiotu

1. Przygotować świeży preparat z krwink.

Pomiary prowadzić przy dolnym położeniu pryzmatu dwójłomnego. Każdy pomiar wykonać dla innej krwinki.

Przyjąć, że  $\lambda = 550 \text{ nm}$

2. Włożyć do tubusów normalne okulary. Następnie przesuwając pryzmat w położeniu prostopadłym do osi optycznej zaciemnić prawy obraz krwinki i odczytać na śrubie przesuwu pryzmatów położenie pryzmatu ( $p_1$ ). Należy zauważyć, że prawy obraz krwinki zaciemnia się po lewej stronie prążka zerowego, a lewy obraz krwinki po jego prawej stronie (wynika stąd, że  $n_{\text{krwinki}} > n_{\text{ośrodek}}$ , czyli  $\phi < 0$  (patrz tabela III, str. 90). Następnie należy zaciemnić lewy obraz tej samej krwinki i ponownie odczytać położenie pryzmatu ( $p_2$ ).

- 3.

Różnica pomiędzy odczytanymi wartościami jest szukaną wartością  $p$ .

$$p = p_1 - p_2$$

Każda osoba w zespole wykonuje 2 oznaczenia wartości  $p$ .

Następnie ze wszystkich obliczonych wartości  $p$ , należy obliczyć wartość średnią.

Wszystkie obliczone wcześniej wartości tzn.  $h$ ,  $p'$  i  $p$  wyrazić w  $\mu\text{m}$ .

Korzystając ze wzoru 16 na stronie 45 obliczyć różnicę drogi optycznej  $\phi$ .

## Wyznaczanie suchej masy krwinki

1. W oparciu o wartość różnicy drogi optycznej  $\delta$  obliczyć suchą masę krwinki (wzór 40, str. 67). Różnica pomiędzy współczynnikiem załamania światła dla wody i soli fizjologicznej jest znikoma i można ją pominąć.
2. Zakładając, że na suchą masę krwinek składa się głównie hemoglobina w ilości 95% suchej masy oblicz ile % hemoglobiny znajduje się we krwi przy założeniu, że w 1 mg krwi znajduje się  $4.5 \times 10^6$  krwinek.

## Obserwacja obiektów biologicznych w dyferencjalnym (różnicowym) polu interferencyjnym

Przygotowanie mikroskopu do pracy metodą dyferencjalną (str 32)

1. Włączyć pryzmat 1.
2. Skrzyżować polaroidy (tzn. polaryzator ustawić na „x”, a analizator na „45”)
3. Ustalić szerokość przesłony szczelinowej kondensora tak, aby z pierwszego prążka barwnego wycinała tylko barwę purpurową. Prążek ten sprowadza się na obraz szczeliny, przesuwając pryzmat dwójłomny za pomocą pokrętki przesuwu poprzecznego pryzmatu.
4. Jeżeli szczelina pokrywa dokładnie purpurową część prążka interferencyjnego, to pole widzenia obserwowane przez okular powinno być całkowicie zabarwione również na kolor purpurowy.
5. Jeżeli pole widzenia nie jest całkowicie zabarwione na kolor purpurowy tzn. że pryzmat dwójłomny nie znajduje się w odpowiedniej odległości od ogniska obiektywu. Należy wówczas pokręcić pierścieniem moletowanym w jednym lub drugim kierunku, aż do uzyskania pola widzenia zabarwionego jednorodnie.
6. Jeżeli w czasie wykonywania tych czynności barwa purpurowa będzie zanikać należy delikatnie przesunąć pryzmat w kierunku prostopadłym do osi optycznej, przy użyciu pokrętki śruby mikrometrycznej.
7. Przygotować świeży preparat z krwinek czerwonych i komórek nabłonkowych z jamy ustnej, a następnie porównać ich obrazy z otrzymanymi przy użyciu mikroskopu jasnego pola i mikroskopu kontrastowo-fazowego.

## Sprawozdanie

**W sprawozdaniu należy umieścić wszystkie zmierzone wielkości i obliczenia.  
Policzyć suchą masę krwinki oraz procentową zawartość hemoglobiny we krwi.**

