

BUDOWA I DZIAŁANIE MIKROSKOPU Z KONTRASTEM FAZOWYM STEREOSKOPOWYM

1. Zasada działania mikroskopu z kontrastem fazowym (KF)

Mikroskop z kontrastem fazowym stereoskopowym jest szczególnie przydatny w obserwacjach preparatów cyto- i histologicznych komórek hodowanych *in vitro*. Umożliwia on obserwację przedmiotów fazowych tzn. nie wykazujących naturalnego kontrastu.

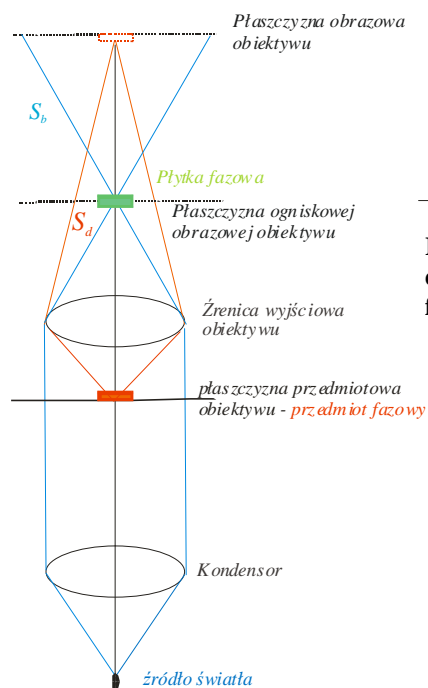
Przedmioty fazowe – nie wykazują różnic w pochłanianiu światła, różnią się od otaczającego je środowiska współczynnikiem załamania lub grubością, promienie świetlne przechodzące przez nie ulegają tylko przesunięciu fazowemu, nie zmienia się ich amplituda

Przedmioty amplitudowe- wykazują różnice w pochłanianiu światła, amplituda promieni świetlnych przez nie przechodzących ulega zmniejszeniu, co manifestuje się widoczną dla oka zmianą natężenia światła- naturalnym kontrastem obserwowanym w mikroskopie.

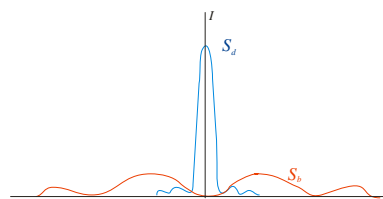
Kontrast fazowy w mikroskopii polega na bezpośrednim przekształceniu zmian fazowych fali świetlnej w badanym preparacie na widoczne dla oka zmiany natężenia światła w obrazie mikroskopowym tego preparatu.

Analizując przebieg promieni świetlnych w układzie optycznym mikroskopu KF (rys.1) oświetlających przedmiot fazowy, obserwuje się w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej obiektywu wyraźne odgraniczenie światła dyfrakcyjnego S_d od światła bezpośrednio przechodzącego przez preparat S_b (rys.2). Od tego uzależniona jest techniczna realizacja kontrastu fazowego, ponieważ dzięki temu można w źrenicy wyjściowej obiektywu zmieniać fazę i amplitudę światła bezpośredniego bez oddziaływania na światło dyfrakcyjne i na odwrót.

Kontrast fazowy polega na wytworzeniu między światłem bezpośrednim i dyfrakcyjnym dodatkowej różnicy fazy $\psi = 90^\circ$, a także na zmniejszeniu natężenia światła bezpośredniego, ponieważ efektywnie interferują fale świetlne zgodne lub przeciwne w fazach i o takich samych amplitudach. Do takiej modulacji światła bezpośredniego służy płytka fazowa. Pierścień fazowy składa się z 2 warstw: substancji dielektrycznej (kriolit lub MgF) zmieniającej fazę światła i substancji metalicznej (Cr, Al) osłabiającej jego natężenie.



Rys.1. Zasada kontrastu fazowego



Rys.2. Typowy rozkład natężenia światła bezpośredniego i dyfrakcyjnego w żyrenicy wyjściowej obiektywu; przedmiot fazowy strukturalnie złożony

2. Budowa mikroskopu

Nie składaj mikroskopu! Zapoznaj się z budową i przeznaczeniem następujących elementów (porównaj: instrukcja „Mikroskop z kontrastem fazowym stereoskopowym MB 30S, str.5-8):

statyw mikroskopu (pokrętko ruchu zgrubnego, pokrętko ruchu drobnego)

- oświetlacz (lustro oświetlacza, oprawa żarówki oświetlacza, dźwignia diafragmy pola)
- zasilacz oświetlacza

kondensator (w gnieździe wspornika) (pokrętki centrujące kondensator, pokrętko przesuwu kondensora, wkręt zaciskowy kondensora), **pierścieniowa przesłona kondensatorowa, diafragma aperturowa**

Kondensator ma dysk rewolwerowy, który zawiera 1 otwór przelotowy oraz 4 przestony pierścieniowe różniące się wymiarami przezroczystych pierścieni, które dopasowane są do pierścieni fazowych w odpowiadających im obiektywach. Przesłony te służą do ustawienia oświetlenia w kontraście faz. Przesłona pierścieniowa to dwie szklane płytki (jedna ze szklanych płytek pokryta jest czarną substancją, w której jest wykonany przezroczysty pierścień), między którymi zaklejone są dodatkowo dwa półkoliste polaroidy. Polaroidy są

tak skonstruowane, aby drgania przechodzącego przez nie światła zachodziły w kierunkach do siebie prostopadłych. Polaryzacja światła jest konieczna w celu uzyskania efektu stereoskopii.

- stolik krzyżowy (pokrętka przesuwu stolika, dźwignia zaciskowa)
- rewolwer obiektywowy
- obiektywy z wbudowanymi płytkami fazowymi zawierającymi pierścienie fazowe
- łącznik z półfalówką i soczewką Bertranda (dźwignia do włączania półfalówki, pokrętka do włączenia soczewki Bertranda, pokrętka ruchu ogniskującego soczewkę Bertranda)

Soczewka Bertranda jest elementem pomocniczym mikroskopu KF, służy do obserwacji źrenicy wyjściowej obiektywu i scentrowania obrazu pierścieniowej przesłony kondensorowej z pierścieniem płytki fazowej. Przystona kondensora jest optycznie sprzężona z pierścieniem fazowym obiektywu: bezpośredni obraz pierścieniowego otworu kondensorowego tworzy się na pierścieniu fazowym

- dwuoczna nasadka okularowa (pierścień dioptryjny, polaryzatory)
- polaryzatory umieszczone w nasadce okularowej służą do wygaszania spolaryzowanego światła wychodzącego z przesłony kondensorowej*
- okulary

W celu uzyskania obrazów ostrych i bez zniekształceń stosuje się w układach optycznych diafragmy (pola i aperturowa) ograniczające szerokości kątowe wiązek świetlnych wchodzących do danego układu (wycina się w ten sposób z wiązki promienie pozaosiowe, pozostawiając przyosiowe)

3. Ustawienie mikroskopu do pracy

- a. złożyć mikroskop (wg instrukcji, str. 9)
- b. ustawić kondensor na pozycji „0”
- c. maksymalnie otworzyć diafragmy pola i aperturową,
- d. wyłączyć soczewkę Bertranda,
- e. wyłączyć polaryzatory w nasadce dwuocznej
- f. przygotować preparat i umieścić na stoliku mikroskopu
- g. zogniskować mikroskop na badanym preparacie

- h. ustawić oświetlenie mikroskopu wg zasady Köhlera do obserwacji w jasnym polu (patrz instrukcja obsługi, str.9)
- i. ustawić mikroskop do obserwacji kontrastowo-fazowej stereoskopowej (wg załączonej instrukcji str.9 i 10)

4. Przygotowanie preparatów mikroskopowych

Przygotowanie szkiełek przedmiotowych i nakrywkowych

- dokładnie z obu stron wymyć szkiełka wata, zanurzoną w alkoholu, nawiniętą na pęsetę
- dokładnie wytrzeć szkiełka gazą
- na odtłuszczone szkiełka podstawowe nałożyć

a) **skórkę łuski spichrzowej cebuli** w kropli 0,9% NaCl – przykryć czystym szkiełkiem nakrywkowym;

preparaty oglądać w kontraście fazowym i w jasnym polu

b) **wazelinowy odcisk palca** - na palec nabrać odrobinę wazeliny, wytrzeć palec gazą, a następnie zrobić odcisk palca na szkiełku podstawowym; preparatu nie przykrywać szkiełkiem nakrywkowym;

preparaty oglądać w kontraście fazowym dodatnim i ujemnym

c) **nabłonek błony śluzowej jamy ustnej** - palcem zeskrobać odrobinę nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, a następnie przenieść go na czyste szkiełko podstawowe, nie przykrywać szkiełkiem nakrywkowym;

preparaty oglądać w kontraście fazowym i w jasnym polu pod różnymi powiększeniami

Zakres materiału obowiązujący do ćwiczeń:

- podstawowe pojęcia optyki, charakterystyka fali świetlnej;
- budowa mikroskopu świetlnego jasnego pola;
powiększenie, zdolność rozdzielcza mikroskopu, apertura numeryczna,
- rodzaje mikroskopów świetlnych
- budowa i zasada działania mikroskopu kontrastowo-fazowego
- stereoskopia