

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

УТВЕРЖДАЮ

Исполняющий обязанности
руководителя отделения электронной
инженерии ИШНКБ, к.т.н., доцент
_____ П.Ф. Баранов

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Методические указания к выполнению лабораторной
работы по дисциплине «Биофизика» для студентов,
направления 12.03.04 «Биотехнически системы и
технологии»

УДК 577.3.

Физические основы оптической микроскопии: Метод. указ. к выполн. лаб. раб. по дисциплине «Биофизика» для студентов, направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии». – Томск: Изд. ТПУ, 2024. – 9 с.

Составители: А.А. Аристов

Рецензент д.т.н. К.С. Бразовский

Методические указания рассмотрены и рекомендованы
к изданию методическим семинаром отделения электронной инженерии
23 декабря 2024 г.

©Томский политехнический университет, 2024
©Оформление. Издательство ТПУ, 2024

Цель работы: определить цену деления окулярного микрометра; 2) измерить размер малого предмета.

Приборы и принадлежности: отсчетный микроскоп, окулярный микрометр, камера Горяева, в качестве объективного микрометра.

Теоретическое обоснование:

Световой микроскоп предназначен для формирования изображения структур, мелкие детали которых нельзя различить невооруженным глазом, и для измерения линейных размеров этих деталей. Для этого видимое изображение должно быть увеличенным, достаточно контрастным и, кроме того, должно обеспечивать правильное воспроизведение характерных особенностей рассматриваемых структур.

По принципу действия микроскопы делятся на отражательные, просвечивающие и универсальные (рис. 1).

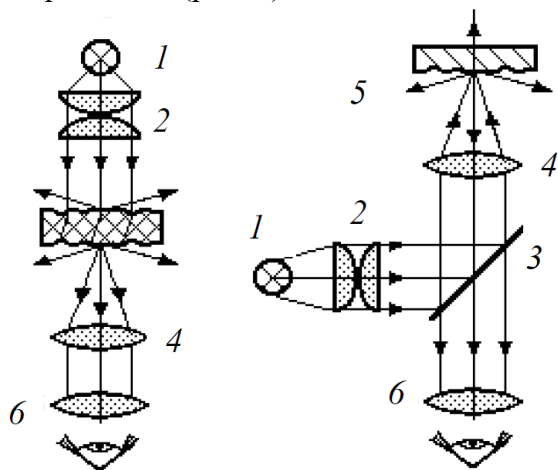


Рис. 1. Схема микроскопов на просвет (а) и отражение (б): 1 – источник света; 2 – конденсор; 3 – объект; 4 – объектив; 5 – окуляр; 6 – полупрозрачное зеркало

В микроскопе на просвет исследуемый объект, помещенный на предметный столик микроскопа, освещают световым пучком. Свет частично рассеивается на верхней и нижней поверхностях образца, преломляется и поглощается в его теле. Различие в оптических свойствах отдельных участков объекта обуславливает разную интенсивность прошедших через него лучей. В результате – получается "теневое" изображение объекта.

В микроскопе на отражение контраст изображения формируется за счет гашения или отражения света на микронеровностях поверхности обычно непрозрачного объекта. Очевидно, что в этом случае на полированной гладкой поверхности нельзя различить детали микроструктуры. Поэтому при работе "на отражение" объект специально приготавливают с целью создания микрорельефа, связанного с его внутренним строением.

Оптическая система микроскопа состоит из двух систем линз: объектива и окуляра.

Если предмет расположен между оптическим центром и фокусом собирающей линзы, то изображение будет мнимым и его можно увидеть, располагая глаз на оптической оси линзы, как показано на рис. 2а. Собирающая линза в этом случае называется лупой. При использовании лупы предмет располагается вблизи фокуса, а лупа – вблизи глаза, поэтому увеличение лупы приблизительно равно $\beta = L / f$, где L – расстояние наилучшего зрения ~ 25 см.

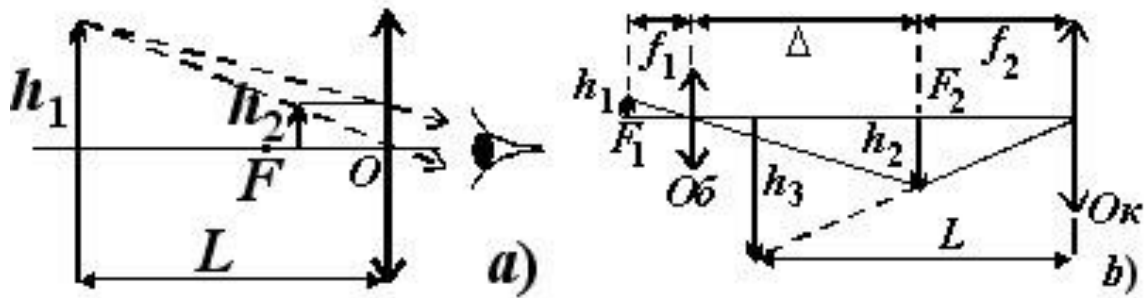


Рис. 4.

Рис. 2. Построение изображения предмета в лупе (а) микроскопе (б)

Для получения еще больших увеличений служит микроскоп. Ход лучей в микроскопе показан на рис. 2б. Предмет располагается вблизи фокальной плоскости объектива Об, в котором получается промежуточное изображение предмета h_2 . Это изображение рассматривается с помощью окуляра Ок. Окуляр здесь играет роль лупы. Увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра:

$$\beta = \frac{h_3}{h_1} = \frac{h_2 L}{h_1 f_2} = \frac{L \Delta}{f_1 f_2}. \quad (2-1)$$

Здесь L – расстояние наилучшего зрения, Δ – оптическая длина тубуса микроскопа (она приближенно равна расстоянию между фокусами F_1 и F_2).

Рассматриваемый предмет АВ помещается перед объективом между его фокусом F_1 и двойным фокусным ($2f_1$) расстоянием (обычно вблизи точки F_1), благодаря чему получается увеличенное, действительно и обратное изображение А'В'. За этим изображением помещается окуляр ЕЕ на расстоянии немного меньше его фокусного расстояния f_2 так, чтобы мнимое изображение А"В" глаз, расположенный по другую сторону окуляра (в непосредственной близости от него), видел на расстоянии наилучшего зрения L .

Увеличения объектива и окуляра называются их собственными увеличениями и указываются на оправе линз.

Примечание. В действительности объектив и окуляр представляют собой систему линз, подобранные для устранения недостатков изображения (сферическая и хроматическая aberrация искривленности прямых линий и пр.). Но всякая подобная система стекол теоретически может быть заменена одной линзой, эквивалентной данной системе.

Точное измерение Δ , f_1 и f_2 представляет трудности, поэтому на практике прибегают к непосредственному измерению увеличения. Для определения истинного масштаба изображения используют микроскопы, где вместо обычного окуляра помещают окулярные микрометры.

Если известна цена деления окулярного микрометра, то можно определить величину предмета, рассматриваемого в микроскоп. Под ценой деления окулярного микрометра понимается длина интервала в миллиметрах, рассматриваемого в микроскоп, изображение которого занимает одно деление микрометра. Для определения цены деления микрометра необходимо иметь объективный микрометр (объект-микрометры) – пластинку с эталонными делениями, помещаемую в плоскость предмета. После того, как будет найдено изображение эталонной шкалы, необходимо выделить равный интервал и по эталонной шкале и по шкале окулярного микрометра.

Затем посчитать число делений эталонной шкалы, которое покрывает выбранный интервал, а также число делений шкалы окулярного микрометра, которое покрывает этот же интервал. Зная цену деления эталонной шкалы, определяют цену деления шкалы окулярного микрометра.

Качество получаемого с помощью микроскопа изображения объекта зависит от **предела разрешения** – наименьшего расстояния между двумя точками предмета, которые воспринимаются в микроскопе раздельно. Уменьшить предел разрешения микроскопа можно применяя иммерсионный объектив.

Согласно (1) как будто имеется возможность неограниченного повышения масштаба увеличения в световом микроскопе. Однако рост масштаба увеличения, начиная с некоторого предельного значения, не позволяет получить четкого контрастного изображения, различить наиболее мелкие детали объекта. Это нельзя объяснить геометрической оптикой. Если же рассматривать распространение света как волновой процесс, то существование такого предела легко объяснимо.

Впервые такой волновой подход использовал ученый-оптик Эрнст Аббе, который ввел понятие разрешающей способности линзы.

Разрешающая способность – способность микроскопа давать раздельные изображения мелких деталей рассматриваемого предмета. Эта величина обратна пределу разрешения.

$$Z = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin U} \quad (2)$$

где λ – длина волны света, освещающего предмет; U – апертурный угол объектива, равный половине угла, вершина которого лежит на объекте, а основание опирается на диаметр объектива; n – показатель преломления жидкости в иммерсионном объективе.

Фокусное расстояние (или увеличение) и числовая апертура обычно указаны на объективе. Чем меньше Z , тем больше (лучше) разрешающая способность. Из выражения (2) следует, что имеются только два пути уменьшения разрешаемого расстояния: либо увеличить числовую апертуру, либо уменьшить длину волны используемого света.

В световом микроскопе разрешаемое расстояние обычно не менее 200 мкм, т.к. наименьшая длина волны видимого света составляет примерно $\lambda = 400$ нм и наибольшая числовая апертура достигает примерно 1,4. В действительности оно оказывается еще большим из-за аббераций второго порядка (хроматическая и сферическая абберации, астигматизм, дисторсия и кома). В поисках излучения с меньшей длиной волны необходимо выйти за пределы электромагнитного спектра и вступить в область частиц (электронная микроскопия).

Методические указания к работе

При работе с микроскопом очки следует снять.

Микроскоп и объект-микрометр являются точными, дорогостоящими оптическими приборами. При работе с ними запрещается прикасаться пальцами к поверхности линз, развинчивать оптику, вращать винты грубой и особенно тонкой наводки рывками, с большим усилием.

1. *Определение цены деления окулярной шкалы*

Оптическая система отсчетного микроскопа состоит из объектива, окуляра и *винтового окуляр-микрометра* (ВОМ) М, представляющего собой шкалу, нанесенную на тонкой стеклянной пластинке.

В поле зрения ВОМ видна шкала 0 – 8, относительно которой перемещается перекрестие и связанный с ним двойной визирный штрих. Одно деление этой шкалы соответствует ста делениям (полному обороту) лимба барабанчика.

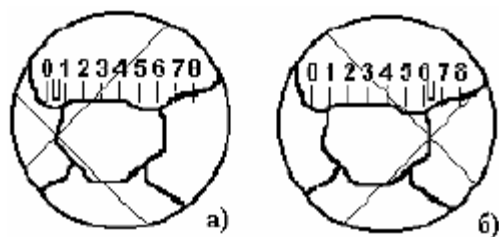


Рис.3. Измерение линейных размеров с помощью окуляр-микрометра

- С помощью винта грубой настройки поднять тубус микроскопа над предметным столиком и укрепить на нем камеру Горяева.
- Путем вращения револьверного устройства микроскопа установить в рабочее положение окуляр с увеличением $\times 8$.
- Настроить освещение микроскопа.
- Для настройки микроскопа по зрению оператора вращая глазную линзу окуляра, получить резкое изображение окулярной шкалы.
- Глядя сбоку, опустить тубус микроскопа максимально вниз, но при этом следить, чтобы объектив не касался объекта.
- Затем, глядя в окуляр, вращением **на себя (!!!)** винта грубой настройки получить четкое изображение линий сетки камеры Горяева. И окончательно подстроить резкость изображения винтом тонкой настройки.
- Вращая предметный столик и наблюдая за изображением в микроскоп, расположить объект так чтобы “горизонтальные” линии сетки камеры Горяева были параллельны окулярной шкале. При необходимости подвинуть саму камеру на столике или повернуть окуляр в тубусе.
- С помощью микрометрических винтов координатного перемещения предметного столика, наблюдая в окуляр, подвести перекрестие окуляра к одному из “вертикальных” штрихов сетки камеры Горяева, образующих левую сторону сетки.
- Записать показания окулярной шкалы и лимба барабана ($n1$), цифра слева от двойного штриха показывает сотни делений барабана;
- Подвести перекрестие окуляра вращением барабанчика к противоположному краю сетки камеры (линии которая образует “правую.” сторону большого квадрата) и снять показания шкалы и лимба ($n2$);
- Найти разность показаний $n = n2 - n1$.
- Определить цену деления шкалы окуляра:

$$S = \frac{0,05 \cdot 4}{n}$$

S – цена деления окулярной шкалы

n – число промежутков окулярной шкалы, соответствующих 4 промежуткам камеры Горяева

$$S_{\times 8} = \frac{0,05 \cdot 4}{n_1}$$

Провести градуировку для окуляра с увеличением $\times 40$

$$S_{\times 40} = \frac{0,05 \cdot 4}{n_2}$$

2. Измерение размеров микрообъектов

а) измерение продольного и поперечного диаметров эритроцита

$$d_1 = S_{\times 40} \cdot n_1$$

$$d_2 = S_{\times 40} \cdot n_2$$

б) измерение внешнего и внутреннего диаметров волоса

$$d_3 = S_{\times 8} \cdot n_3$$

$$d_4 = S_{\times 8} \cdot n_4$$

Содержание отчета

- 1 Название и цель работы.
- 2 Тип и марка микроскопа, обозначения на объективах и окулярах.
- 3 Порядок и результаты определения цены деления окуляр-микрометра.
- 4 Указать цену деления шкалы окуляра, цену деления лимба барабанчика окуляр-микрометра, увеличение и разрешающую способность микроскопа.
5. Рисунок объектов с указанием масштаба.
6. Результаты измерений размеров рассмотренных объектов.

Контрольные вопросы

1. Характеристики микроскопа: увеличение и разрешающая способность.
2. От чего зависит увеличение микроскопа?
3. От чего зависит разрешающая способность микроскопа? Как ее повысить?
4. Какое максимальное увеличение обычно имеет оптический микроскоп?
5. Какие физические эффекты ограничивают фактическое увеличение и разрешение оптического микроскопа?
6. Что такое иммерсионный объектив, иммерсионное масло?
7. Как на практике узнать увеличение микроскопа?
8. Для чего в оптических микроскопах используют фиолетовый светофильтр на подсветке.
9. Порядок работы с микроскопом.
10. Порядок определения цены деления шкалы окуляра и лимба барабанчика окуляр - микрометра.
11. Типы микроскопов.
12. Тёмнопольная микроскопия. Устройство микроскопа. Применение.
13. Люминесцентная микроскопия. Устройство микроскопа. Применение.
14. Фазово-контрастная микроскопия.
15. Почему в люминесцентных микроскопах в качестве источника излучения используют газоразрядные лампы?
16. В чем недостаток таких источников излучения для исследования биологических объектов как газоразрядная, галогенная лампа?
17. Для чего в лабораторной работе используется камера Горяева?
18. Для чего в медицинской практике используют камеру Горяева? Её устройство.
19. Почему камеру Горяева называют "КАМЕРОЙ"? Где там камера?
20. Для чего кровь при исследовании в камере Горяева разводят в 200раз?
21. Что мы увидим под микроскопом, если в камеру Горяева залить неразведенную кровь?
22. Чем разводят кровь?
23. Что такое физиологический раствор?
24. Что такое изотонический, гипотонический, гипертонический раствор?
25. Сколько в крови эритроцитов? Их размер.
26. Сколько в крови лейкоцитов? Их размер.
27. Сколько в крови тромбоцитов? Их размер.
28. Лейкоцитарная формула.
29. Как приготовить мазок крови к исследованию под микроскопом?
30. Зачем производят окраску мазков крови при исследовании?
31. Что будет если поместить эритроциты в воду?
32. Что будет если поместить эритроциты в изотонический, гипотонический, гипертонический раствор?
33. Объяснить явления осмоса. Почему движется вода, а не ионы солей?
34. Что такое гидратированные ионы?
35. Что будет если поместить эритроциты в физиологический раствор?
36. Как изменится концентрация эритроцитов, если к крови добавить физиологический раствор?
37. Как изменятся рассеивающие свойства раствора, если к крови добавить физиологический раствор?
38. Как изменятся рассеивающие свойства раствора, если к крови добавить воду?
39. Как изменится концентрация эритроцитов, если к крови добавить воду?
40. Для чего в гематологических анализаторах производят лизис эритроцитов?

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Методические указания к выполнению лабораторной
работы

Составители: А.А. Аристов

Подписано к печати 30.12.2024 г.

Усл. печ. л. 0,46.

Тираж 20 экз.

Рег. № xxxxxxxx. – Томск: Изд. ТПУ, 2024. – 9 с.