

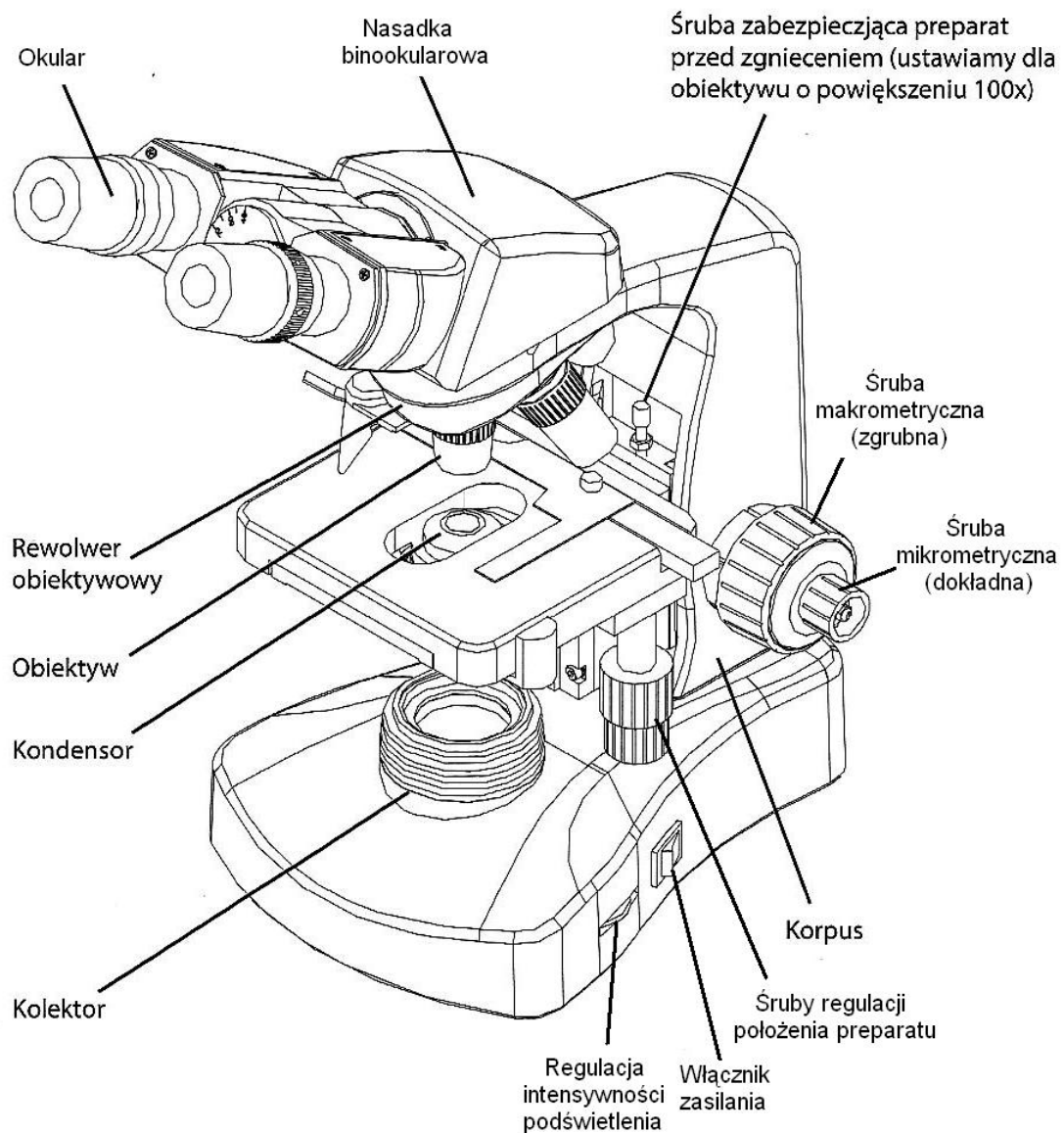
Mikroskopia optyczna

Zagadnienia teoretyczne:

- światło jako fala elektromagnetyczna,
- współczynnik załamania światła względny i bezwzględny
- prawo odbicia i załamania światła,
- soczewki i powstawanie obrazów w soczewkach
- zasada działania mikroskopu i powstawanie obrazu w mikroskopie
- budowa krwi ludzkiej
- rozkład normalny (Gausa), odchylenie standardowe, średnia i mediana

Zestaw do wykonania ćwiczenia zawiera:

- Mikroskop dwuokularowy Delta Optical Genetic Pro z wbudowaną kamerą USB
- Zestaw obiektywów i okularów o różnym powiększeniu
- Skala wzorcowa mikrometryczna
- Komputer PC z zainstalowanym oprogramowaniem Scope Image
- Zestaw preparatów do badań



Rys.1 Budowa mikroskopu

UWAGA! Wszelkie manipulacje śrubą makro- i mikrometryczną mikroskopu powinny być prowadzone bardzo ostrożnie. W szczególności należy uważać aby przy zbliżaniu stolika z preparatem do obiektywu nie zniszczyć szkiełka preparatu.

Zadanie 1. Badanie rozkładu wielkości komórek krwi

1. Przygotować mikroskop do pracy: włączyć zasilanie mikroskopu, włączyć komputer i uruchomić program Scope Image.
2. Na stoliku mikroskopu umieścić wymaz krwi ryby (preparat nr. 40).
3. Wykorzystując obiektyw o powiększeniu 10x znaleźć obraz komórek krwi. W tym celu, ustawić obiektyw w odległości ok. 4cm od preparatu a następnie wykorzystując śrubę makrometryczną należy ostrożnie zbliżać stolik z preparatem do obiektywu mikroskopu aż do pojawienia się zarysu obrazu w okularze i na monitorze komputera. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
4. Nie zmieniając ustawień śruby makro- i mikrometrycznej ostrożnie obrócić rewolwer tak aby nad stolikiem znalazł się obiektyw o powiększeniu 20x. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
5. Nie zmieniając ustawień śruby makro- i mikrometrycznej bardzo ostrożnie obrócić rewolwer tak aby nad stolikiem znalazł się obiektyw o powiększeniu 40x. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
6. W celu znalezienia obrazu przy użyciu obiektywu 60x należy:
 - obniżyć stolik,
 - przekręcając rewolwerem ustawić obiektyw 60x
 - za pomocą śruby makrometrycznej ustawić preparat w odległości ok. 2mm od obiektywu
 - za pomocą śruby mikrometrycznej powoli przybliżać preparat do obiektywu aż do pojawienia się obrazu w okularze. Należy jednocześnie kontrolować odległość preparatu od obiektywu aby uniknąć zniszczenia preparatu.

UWAGA: czynności w tym podpunkcie należy wykonywać bardzo powoli i z najwyższą ostrożnością, najlepiej w obecności prowadzącego zajęcia.

6. Po ustawieniu ostrego obrazu należy wykalibrować obraz z kamery mikroskopu. W tym celu. Używając przycisku kalibracja  w programie Scope Image zaimportować plik kalibracji o nazwie 60x lub 40x (lub inny stosownie do aktualnie używanego obiektywu). Na ekranie pokażą się podziałki: pionowa i pozioma.
7. Wykorzystując narzędzie „line”  dokonać pomiaru osi długiej komórki krwi.
8. Podobnie jak w punkcie 7 dokonać pomiaru osi długiej ok. N = 200 różnych komórek. Wyniki pomiarów w mikrometrach (z dokładnością do jednego miejsca po przecinku) zamieścić w kolumnie arkusza Excel.
9. Sporządzić tabelę odzwierciedlającą rozkład wielkości komórek (tab.1). W tym celu
 - posortować wyniki pomiarów od wartości najmniejszej do największej
 - podzielić pomiary na grupy co 1 μm
 - zliczyć ilość komórek n_i należących do każdej grupy
 - dokonać normowania rozkładu czyli obliczyć prawdopodobieństwo tego, że losowo wybrana komórka należy do konkretnego przedziału:

$$P(x_i) = \frac{n_i}{N},$$

gdzie: x_i – wartość odpowiadająca środkowi przedziału

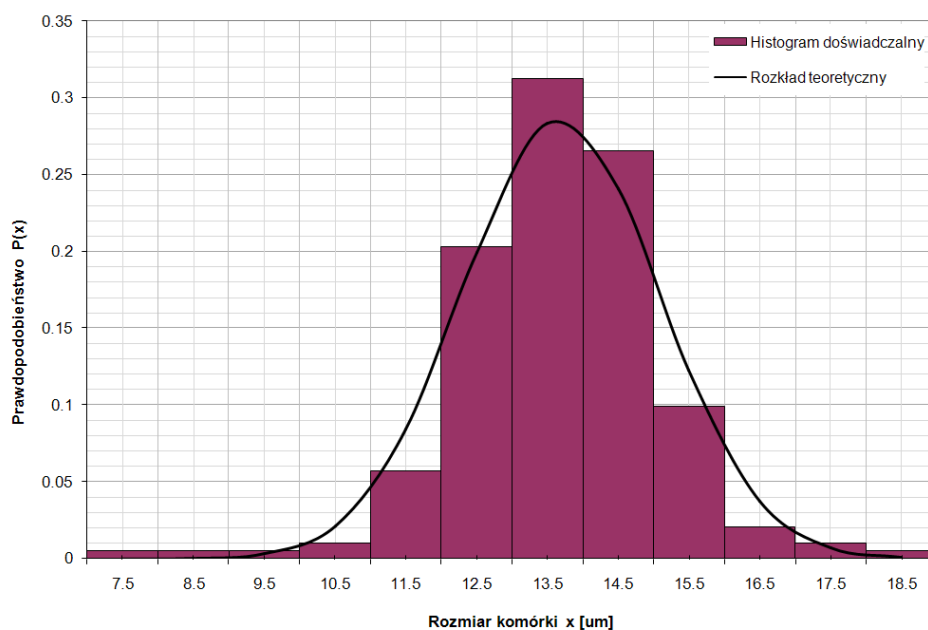
n_i – liczebność przedziału

N – liczba wszystkich pomiarów np. N=200

Tabela 1

L.p.	Przedział wielkości [μm]	Położenie środka przedziału x_i [μm]	Liczebność przedziału n_i	Prawdopodobieństwo $P(x_i)$
1	6-7	6,5		
2	7-8	7,5		
3	8-9	8,5		
....				

10. Na podstawie danych z tabeli 1 sporządzić histogram przedstawiający rozkład prawdopodobieństwa występowania komórek o rozmiarach zawierających się w poszczególnych grupach $P(x)$. Przykładowy histogram ilustruje rys.2.



Rys.2 Rozkład wielkości komórek krwi (wykres przykładowy)

11. Dla uzyskanego rozkładu obliczyć:

- średnią wielkość komórki $\bar{X}$
- odchylenie standardowe σ
- medianę rozkładu m
- teoretyczną wartość funkcji rozkładu Gaussa

$$G(x_i) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x_i - \bar{x})^2}{2\sigma^2}}$$

Wyniki obliczeń zapisać w tabeli przygotowanej według poniższego wzoru:

Tabela 2.

L.p.	Położenie środka przedziału x_i [μm]	Prawdopodobieństwo $P(x_i)$	Średnia wielkość komórki $\bar{X}$ [μm]	Odchylenie standardowe σ [μm]	Mediana m [μm]	Wartość funkcji Gaussa $G(x_i)$
1	6,5					
2	7,5					
3	8,5					
....						

12. Na tle histogramu doświadczalnego (na podstawie wyników z tabeli 2) wyrysować kształt teoretycznej funkcji rozkładu $G(x_i)$.
13. Wyciągnąć wnioski odnośnie dopasowania rozkładu teoretycznego do histogramu doświadczalnego.

Zadanie 2. Obserwacja komórek krwi ludzkiej i pomiar ich średniego rozmiaru

1. Przygotować mikroskop do pracy: włączyć zasilanie mikroskopu, włączyć komputer i uruchomić program Scope Image.
2. Na stoliku mikroskopu umieścić preparat krwi człowieka.
3. Wykorzystując obiektyw o powiększeniu 10x znaleźć obraz komórek krwi. W tym celu, wykorzystując śrubę makrometryczną należy ostrożnie zbliżać stolik z preparatem do obiektywu mikroskopu aż do pojawienia się zarysu obrazu w okularze i na monitorze komputera. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
4. Nie zmieniając ustawień śruby makro- i mikrometrycznej ostrożnie obrócić rewolwer tak aby nad stolikiem znalazł się obiektyw o powiększeniu 20x. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
5. Nie zmieniając ustawień śruby makro- i mikrometrycznej bardzo ostrożnie obrócić rewolwer tak aby nad stolikiem znalazł się obiektyw o powiększeniu 40x. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
6. W celu znalezienia obrazu przy użyciu obiektywu 60x należy:
 - obniżyć stolik,
 - przekręcając rewolwerem ustawić obiektyw 60x
 - za pomocą śruby makrometrycznej ustawić preparat w odległości ok. 2mm od obiektywu
 - za pomocą śruby mikrometrycznej powoli przybliżać preparat do obiektywu aż do pojawienia się obrazu w okularze. Należy jednocześnie kontrolować odległość preparatu od obiektywu aby uniknąć zniszczenia preparatu.

UWAGA: czynności w tym podpunkcie należy wykonywać bardzo powoli i z najwyższą ostrożnością, najlepiej w obecności prowadzącego zajęcia.

7. Analogicznie jak w punktach 6-7 Zadania 1 dokonać pomiaru średnicy ok. 50 komórek krwi człowieka.
8. Obliczyć wartość średnią rozmiaru komórki krwi oraz odchylenie standardowe. Wyniki zapisać w tabeli:

Tabela 3.

L.p.	Średnica komórki [μm]	Średnia wartość średnicy [μm]	Odchylenie standardowe
1			
2			
...			
50			

9. Porównać średni rozmiar komórki krwi ludzkiej z komórką krwi ryby.

Zadanie 3. Obserwacja obrazu włosa ludzkiego i pomiar jego średnicy

1. Przygotować mikroskop do pracy: włączyć zasilanie mikroskopu, włączyć komputer i uruchomić program Scope Image.
2. Na stoliku mikroskopu na szkiełku mikroskopowym umieścić włos.

3. Wykorzystując obiektyw o powiększeniu 10x znaleźć obraz włosa. W tym celu, wykorzystując śrubę makrometryczną należy ostrożnie zbliżać stolik z preparatem do obiektywu mikroskopu aż do pojawienia się zarysu obrazu w okularze i na monitorze komputera. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
4. Nie zmieniając ustawień śruby makro- i mikrometrycznej ostrożnie obrócić rewolwer tak aby nad stolikiem znalazł się obiektyw o powiększeniu 20x. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
5. Nie zmieniając ustawień śruby makro- i mikrometrycznej bardzo ostrożnie obrócić rewolwer tak aby nad stolikiem znalazł się obiektyw o powiększeniu 40x. Ostrość obrazu wyregulować śrubą mikrometryczną.
6. Używając przycisku kalibracja  w programie Scope Image zaimportować plik kalibracji o nazwie 40x. Na ekranie pojawią się podziałki: pionowa i pozioma.
7. Wykorzystując narzędzie „line”  dokonać pomiaru średnicy włosa.
8. Podobnie jak w punkcie 7 dokonać pomiaru średnicy włosa w 10 różnych miejscach. Aby przesunąć się w inny obszar włosa używamy śrub regulacji położenia stolika.
9. Obliczyć średnią grubość badanego włosa oraz odchylenie standardowe pomiarów.
10. Przygotować tabelę według poniższego wzoru

Tabela 4.

L.p.	Średnica włosa [μm]	Średnia wartość średnicy [μm]	Odchylenie standardowe
1			
2			
3			
....			

11. Wykorzystując obiektyw 40x znaleźć i obserwować obraz cebulki włosa.

Zadanie 4. Obserwacja wybranych preparatów biologicznych

W niniejszym zadaniu należy wybrać 10 preparatów biologicznych i dokonać ich obserwacji wykorzystując obiektywy o różnych powiększeniach. Obserwacje należy rozpoczynać wykorzystując obiektyw 10x następnie 20x itd. (analogicznie jak w zadaniach 1-3) aż do uzyskania optymalnego powiększenia. W celu poprawy jakości uzyskanego na monitorze komputera obrazu wytestować ustawienia poszczególnych narzędzi obrazu w programie Scope Image. Uzyskany optymalny obraz zapisać na dysku twardym komputera.