

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского**

**И.В. Балалаева**

**Е.А. Сергеева**

**А.Р. Катичев**

**ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ  
СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ОБЪЕКТОВ**

**Часть 1. ШИРОКОПОЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ**

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией биологического факультета для студентов ННГУ, обучающихся по специальности 020207 «Биофизика» и направлению 020200.68 «Биология»

Нижегород  
2012

УДК 577.3

ББК 28.071

Б20

Б20 Балалаева И.В., Сергеева Е.А., Катичев А.Р. Оптическая микроскопия в исследовании структуры и функций биологических объектов. Часть 1. Широкопольная оптическая микроскопия: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 58 с.

Рецензент: д.ф.-м.н., **В.А. Каменский**

В настоящем пособии представлены теоретические сведения об устройстве и принципе работы оптического микроскопа, методах повышения контраста в оптической микроскопии, дано описание практических работ практикума по широкопольной оптической микроскопии.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов старших курсов биологического факультета ННГУ, обучающихся по специальности 020207 «Биофизика» и направлению 020200.68 «Биология». Пособие также представляет интерес для студентов других естественнонаучных и медицинских специальностей при изучении методов исследования микроструктуры биологических объектов.

Ответственный за выпуск:

председатель методической комиссии биологического факультета ННГУ  
д.п.н., профессор И.М. Швец

УДК 577.3

ББК 28.071

© **И.В. Балалаева, Е.А. Сергеева, А.Р. Катичев, 2012**  
© **Нижегородский государственный университет  
им. Н.И. Лобачевского, 2012**

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП РАБОТЫ ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСКОПА.....	6
1.1. Орган зрения человека. Угол зрения.....	6
1.2. Микроскоп .....	7
1.3. Способы освещения препарата.....	9
1.4. Разрешающая способность и увеличение микроскопа.....	10
2. МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ КОНТРАСТА В ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ .....	14
2.1. Метод темного поля.....	14
2.2. Фазовый контраст .....	15
2.3. Поляризационный контраст .....	16
2.4. Флуоресцентная микроскопия .....	17
3. ПРАКТИКУМ ПО ШИРОКОПОЛЬНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ.....	20
3.1. Устройство микроскопа Axiovert 200. Настройка освещения по Келеру. Получение изображений.....	20
3.2. Метод фазового контраста в микроскопии эукариотических клеток в культуре <i>in vitro</i> .....	31
3.3. Поляризационный контраст в исследовании коллагенсодержащих структур.....	36
3.4. Флуоресцентная микроскопия клеток. Применение красителей, специфичных к нуклеиновым кислотам.....	40
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....	50
ЛИТЕРАТУРА.....	51
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Погрешности изображения и их коррекция.....	52
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Классификация и маркировка объективов.....	55
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Особенности работы на микроскопе, оснащенном цифровой камерой.....	57

## ВВЕДЕНИЕ

Световая микроскопия является одним из основных инструментов для исследователей, работающих в самых разных областях биологии: от микробиологии и цитологии до биохимии и биофизики. Со времени создания первых микроскопов в XII веке их конструкция и качество получаемых изображений значительно усовершенствовались, и в настоящее время широкопольный оптический микроскоп представляет собой технически довольно сложное устройство, обеспечивающее визуализацию деталей биологических объектов субмикронного размера. Такие масштабы представляют собой абсолютный предел для световых методов наблюдения, поскольку видимый свет – это электромагнитные волны, имеющие длины волн в спектральном диапазоне 380 – 700 нм. Свет с длинами волн вблизи левого края этого диапазона воспринимается человеческим глазом как излучение фиолетово-синего цвета, интервал длин волн 500-550 нм соответствуют зеленому цвету, а правый край видимого спектра соответствует излучению оранжево-красного диапазона.

Способность *разрешать* объекты малого размера – основная задача микроскопии. В случае оптического микроскопа она решается за счет использования системы оптических линз, размещенных на пути света от препарата к глазу исследователя и увеличивающих угол, под которым глаз наблюдает биологический объект. Это равносильно увеличению объекта и дает возможность рассмотреть более мелкие детали. Возможности световой микроскопии ограничены дифракцией света, вследствие которой минимальное разрешение приблизительно равно половине длины волны света, используемого для получения изображения. Достижение максимально возможного на практике разрешения обеспечивается за счет организации направленного освещения препарата, использования широкоапертурных объективов, применения специальных иммерсионных сред.

Многие биологические объекты, в том числе большинство бактериальных клеток и клеток животных, неокрашенные срезы тканей, очень слабо взаимодействуют со светом, что делает их мало контрастными для наблюдения по методу классической микроскопии светлого поля. Для работы с подобными объектами разработаны специальные методы контрастирования. Визуализация объектов, сильно рассеивающих свет, возможна по методу темного поля. В случае очень тонких объектов, например, клеток животных и человека в культуре, как поглощение, так и рассеяние ими света очень мало. Одним из наиболее распространенных методов для визуализации таких объектов является метод фазового контраста. Как и метод темного поля, метод фазового контраста не требует окраски препарата и может использоваться в тех случаях, когда необходимо минимизировать влияние на жизнеспособность и функциональную активность объекта исследования. Метод поляризационного контраста основан

на способности некоторых биологических объектов изменять свойства падающего поляризованного света. Наряду с наблюдением неокрашенных препаратов в поляризационной микроскопии используются специализированные красители, существенно увеличивающие информативность метода

Наиболее богатым по своим возможностям можно назвать подход, основанный на применении флуоресцентных красителей. Флуоресцентная микроскопия способна визуализировать даже малые нетоксичные концентрации флуорофора, связавшегося с объектом, что позволяет проводить прижизненную окраску и наблюдение биологических объектов. Кроме простого контрастирования микроскопических структур флуоресцентные красители дают возможность проводить анализ функциональных особенностей объекта, дифференцировку биологических объектов по морфофункциональному состоянию, количественную оценку физико-химических параметров вне- и внутриклеточной среды.

# 1. УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП РАБОТЫ ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСКОПА

## 1.1. Орган зрения человека. Угол зрения

Несмотря на стремительное развитие техники, орган зрения человека долгое время будет оставаться самой совершенной системой получения и обработки информации. В процессе эволюции этот орган прошел путь от нескольких светочувствительных клеток на поверхности тела животного до сложной системы, приспособляющейся к условиям наблюдения. Человеческий глаз имеет в среднем около 130 миллионов светочувствительных палочек, регистрирующих яркость, и 7 миллионов колбочек, различающих цвета. Благодаря способности зрачка изменять свой размер (максимальная площадь зрачка в 20 раз больше минимальной), существует возможность регулировать количество света, попадающего на сетчатку, и тем самым подстраиваться под освещенность наблюдаемых объектов. Сжатие или растяжение хрусталика позволяет фокусировать глаз на приближенных или удаленных предметах.

Оптическая система глаза проецирует изображение наблюдаемого объекта на сетчатку. Предположим, что на нашем объекте есть две яркие близко расположенные точки. При каком условии мы можем увидеть эти точки как отдельные объекты? Если расстояние между их изображениями на сетчатке глаза больше, чем поперечные размеры светочувствительных клеток (порядка 4 мкм), скорее всего свет от каждой из них попадет на свою клетку, и мы увидим две точки. Если же они окажутся слишком близкими, свет попадет на одну клетку, и для нас они будут казаться одной яркой точкой.

Таким образом, как и любой другой измерительный инструмент, наш глаз имеет конечную разрешающую способность. Определяющее значение будет иметь наблюдаемый *угловой размер* (то есть угол между двумя лучами, идущими от крайних точек предмета в зрачок). Крупный предмет на большом расстоянии и мелкий предмет, расположенный близко, могут иметь одинаковые угловые размеры, при этом размеры их проекций на сетчатку глаза будут одинаковы (рис. 1).

Минимальный угловое расстояние между двумя линиями, которые глаз еще способен различить, равно примерно одной угловой минуте. Под таким углом видны линии, расположенные друг от друга на расстоянии около 0,1 мм и удаленные от глаза на 25 см (расстояние наилучшего зрения). Для двух точек минимальный угол зрения в несколько раз больше. Различить детали предмета, расположенные на меньшем угловом расстоянии, глаз не способен.

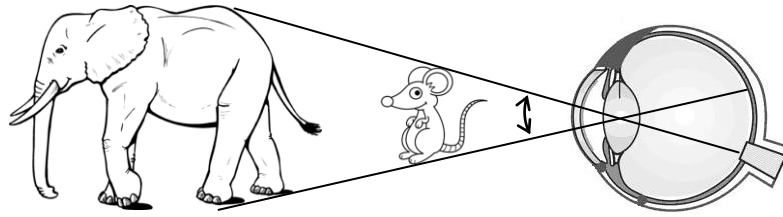


Рис. 1. Иллюстрация принципа, согласно которому крупный предмет на большом расстоянии и мелкий предмет, расположенный близко, могут иметь одинаковые угловые размеры

## 1.2. Микроскоп

Чтобы разглядеть предметы, поперечник которых составляет величину меньше долей миллиметра, используют оптические линзы. Собирающая линза, помещенная между предметом и глазом наблюдателя так, чтобы предмет оказался чуть ближе фокуса линзы, создает увеличенное мнимое изображение предмета. На этом принципе основана работа лупы (рис. 2а). Для характеристики собирающей силы линз используют понятие *увеличения*, под которым подразумевают отношение углового размера объекта, наблюдаемого через линзу, к угловому размеру объекта, помещенного на расстояние наилучшего зрения (рис. 2б). Кратность увеличения линзы или системы линз обозначается « $M\times$ », где  $M$  – увеличение.

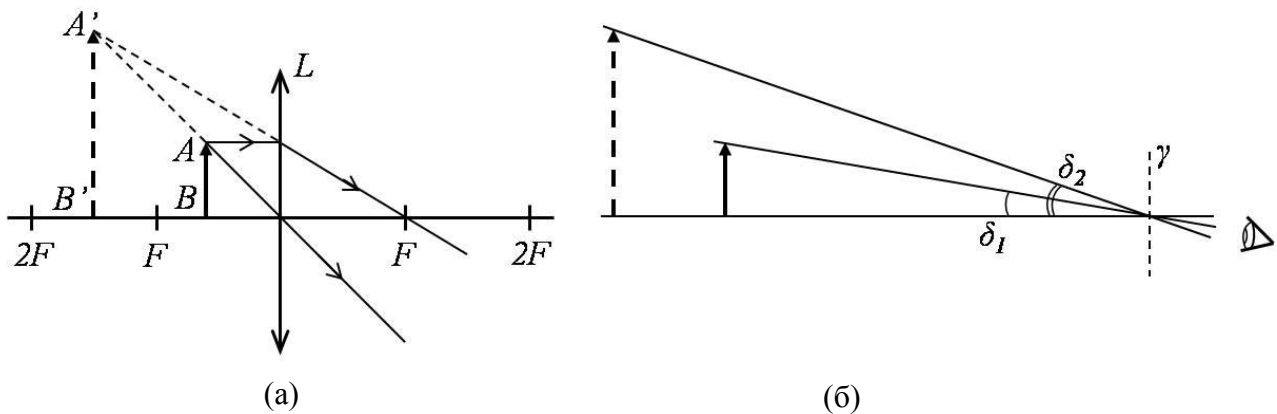


Рис. 2. а) Ход лучей в лупе.  $L$  – собирающая линза,  $AB$  – предмет,  $A'B'$  – мнимое изображение предмета,  $F$  – фокус линзы. б) Увеличение углового размера предмета, наблюдаемого с помощью лупы.  $\delta_1$  –угловой размер предмета.  $\delta_2$  – угловой размер мнимого изображения предмета,  $\gamma$  – плоскость зрачка глаза

Для получения небольшого увеличения (порядка 10х) достаточно одной собирающей линзы или «лупы». Введя последовательно несколько линз, кратность увеличения можно поднять до сотен или даже тысяч раз, что используется в микроскопах.

Микроскоп представляет оптическую систему, состоящую из 2-х и более ступеней увеличения. В двухлинзовом микроскопе (рис. 3) *объектив* строит увеличенное перевернутое изображение  $A'$  в промежуточной плоскости, а *окуляр* увеличивает промежуточное изображение так же, как и лупа. Линзы, как правило, подобраны таким образом, чтобы мнимое изображение  $A''$  объекта располагалось в плоскости предметного столика микроскопа.

Общее увеличение = увеличение объектива · увеличение окуляра.

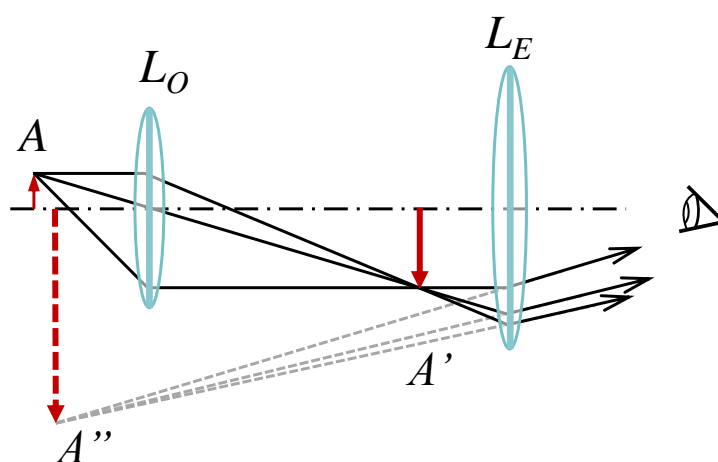


Рис. 3. Ход лучей в двухлинзовом микроскопе.  $L_O$  – объектив,  $L_E$  – окуляр,  $A$  – предмет,  $A'$  – промежуточное действительное изображение,  $A''$  – мнимое изображение, наблюдаемое через окуляр

Расстояние между объективом и окуляром должно быть строго фиксировано. Иногда возникает необходимость в оптическую систему микроскопа внести дополнительные элементы, такие как светофильтры, светоделительные пластины и т.п. Их добавление приводит к «расстройке» оптической системы и появлению искажений изображения. В этом случае для минимизации искажений используют трехлинзовую схему (рис. 4). Благодаря третьей *тубусной* линзе  $L_T$  в оптическом тракте микроскопа появляется участок  $d$ , на котором лучи от любой выбранной точки объекта будут идти параллельно друг другу. Внесение в эту область плоскопараллельной пластинки фильтра не приведет к расфокусировке микроскопа в целом. Кроме того, в данной схеме нет необходимости выдерживать строго заданное расстояние между объективом и тубусной линзой, поэтому фокусировка микроскопа производится перемещением только объектива, а не всей оптической системы целиком. В трехлинзовых микроскопах используют специальные объективы, скорректированные на бесконечность.



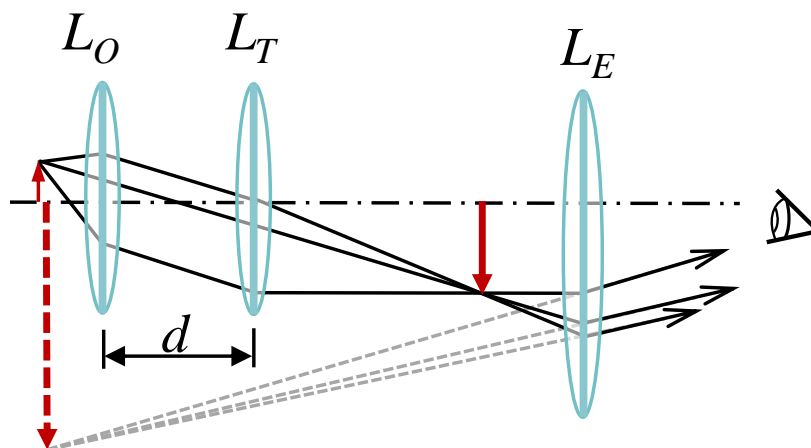


Рис. 4. Ход лучей в трехлинзовом микроскопе.  $L_O$  – объектив,  $L_E$  – окуляр,  $L_T$  – тубусная линза,  $d$  – участок параллельного распространения лучей от точки объекта

Необходимо отметить, что в современных микроскопах в действительности объектив представляет собой сложный комплекс оптических элементов, обеспечивающих коррекцию оптических aberrаций изображения, возникающих при использовании единичной объективной линзы (см. Приложение 1).

### 1.3. Способы освещения препаратов

Для получения изображения высокого качества препарат на предметном столике должен быть правильно освещен. В качестве источников освещения в микроскопе могут быть использованы вольфрамово-галогенные лампы накаливания, ртутные или ксеноновые дуговые лампы, светодиоды (в специальных случаях – лазеры с различной длиной волны). Свет, создаваемый нелазерными источниками, является ненаправленным, и освещение препарата непосредственно источником будет недостаточным из-за потери части светового потока. Для повышения освещенности препарата в устройство микроскопа был введен конденсор – короткофокусная линза или система линз, которая направляет на предмет лучи от источника света. Конденсор собирает в том числе и такие лучи, которые в его отсутствие проходят мимо предмета; в результате такого «сгущения» светового потока резко возрастает освещенность предмета.

Наиболее простая схема освещения, в которой изображение источника с помощью конденсора непосредственно проецируется в плоскость препарата, обладает, однако, существенным недостатком. В ней изображение источника фактически накладывается на изображение препарата, из-за чего равномерность освещения зависит от свойств источника. Преодолеть этот недостаток позволяет специальная схема освещения, предложенная в конце XIX века Августом Кёлером (рис. 5), которая в настоящее время признана классической.

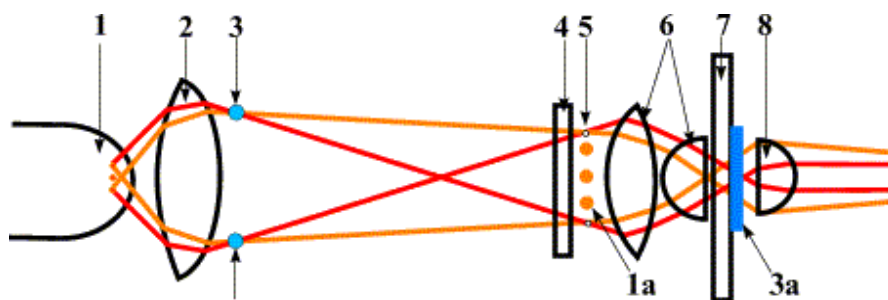


Рис. 5. Принцип освещения по Кёлеру. 1 – источник света, 1а – изображение источника света, 2 – коллектор, 3 – полевая диафрагма осветителя, 3а – изображение полевой диафрагмы, 4 – светофильтр, 5 – апертурная диафрагма, 6 – конденсор, 7 – препарат, 8 – объектив микроскопа

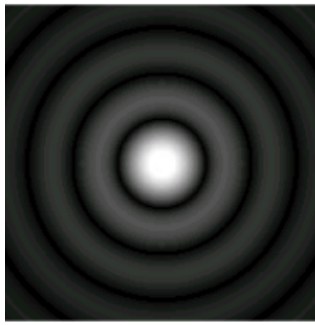
В схеме освещения по Кёлеру между собственно источником освещения и препаратом введены дополнительные оптические элементы. Изображение источника проецируется в отверстие *апертурной диафрагмы* конденсора, благодаря чему в плоскости образца создается равномерное поле освещения. Изменяя размер апертурной диафрагмы можно менять максимальный угол конуса освещения (эффективную *числовую апертуру* конденсора  $NA_{cond}$ , влияющую на разрешающую способность микроскопа), а с помощью *полевой диафрагмы* – регулировать площадь освещенной области.

#### 1.4. Разрешающая способность и увеличение микроскопа

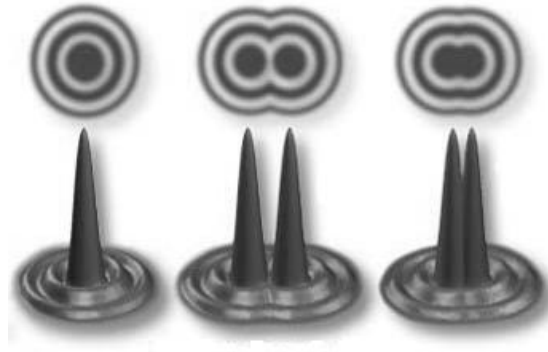
Когда размеры объектов и их структур, наблюдаемых под световым микроскопом, соизмеримы с длиной волны видимого света, формирование изображения в микроскопе необходимо рассматривать с точки зрения волновой природы света.

Согласно классической теории дифракции, луч света от малого источника, проходя через оптическую систему микроскопа, формирует изображение, состоящее из ряда светлых и темных концентрических полос вокруг яркой центральной точки, — так называемую дифракционную картину.

Центральное светлое пятно дифракционной картины – «максимум нулевого порядка» – обычно наиболее яркое, а его размер зависит от соотношения между размером объекта и длиной волны света, а также от параметров оптической системы. В результате для точечного яркого объекта отображаемое оптической системой микроскопа изображение представляет собой размытое пятно, окруженное дифракционными кольцами (Рис. 6а). Центральное пятно картины получило название *диска Эйри*, в честь ученого (Джорджа Бидделя Эйри), первым предложившего теоретическое описание такого феномена.



(a)



(a)

Рис. 6. а) Дифракционная картина, возникающая при наблюдении точечного объекта в микроскоп. Центральное пятно картины – диск Эйри. б) Дифракционные картины и распределения интенсивностей от двух точечных источников, расположенных на разных расстояниях.

Радиус диска Эйри, согласно дифракционной теории, разработанной Эрнстом Аббе, может быть выражен следующим образом:

$$r = \frac{1,22\lambda_0}{NA_{obj} + NA_{cond}}, \quad (1)$$

где  $\lambda_0$  – длина волны, а  $NA_{obj}$  и  $NA_{cond}$  числовая апертура объектива и конденсора соответственно. В случае если апертура конденсора равна апертуре объектива для просветного микроскопа, либо при работе с микроскопом отраженного света, выражение для радиуса диска Эйри принимает вид:

$$r = \frac{0,61\lambda_0}{NA_{obj}}. \quad (2)$$

Если в плоскости наблюдения рядом расположены два точечных источника света, их дифракционные картины накладываются друг на друга (рис. 6б). Говорят, что точечные объекты могут быть *разрешены*, если расстояние между ними больше радиуса  $r$  одного диска Эйри – так называемый критерий Рэля. Объекты, расположенные на меньшем расстоянии, воспринимаются как один объект. Таким образом, поперечное разрешение для просветного микроскопа описывается формулой (1), а для микроскопа отраженного света – формулой (2).

*Числовая апертура* объектива определяет величину пространственного угла, из которого объектив способен собирать свет. Согласно определению:

$$NA_{obj} = n \sin \theta, \quad (3)$$

где  $n$  – коэффициент преломления среды, расположенной между объективом и покровным стеклом образца, а  $\theta$  – половина максимального угла раскрытия конуса света, под которым в объектив может войти свет.

При работе в воздушной среде ( $n=1$ ) практический предел значения числовой апертуры составляет 0,95, что соответствует полному углу раскрытия  $2\cdot\theta$  в  $144^\circ$ . Стоит отметить, что объективы с большим углом раскрытия обладают относительно небольшим полем зрения и малым *рабочим расстоянием*, т. е. расстоянием между передним краем объектива и точкой фокуса (рис. 7). Это не всегда удобно при проведении исследований, поэтому выбор оптимального объектива для конкретного применения может зависеть не только от разрешающей способности.

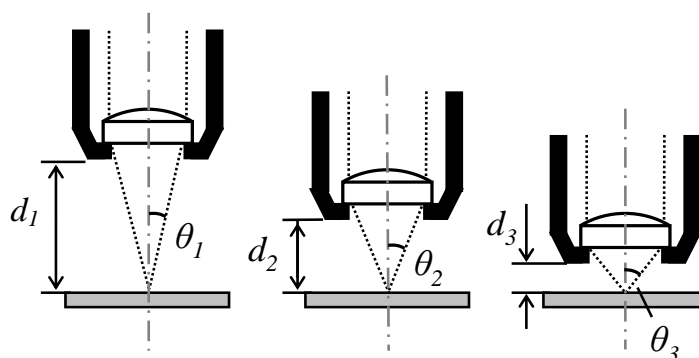


Рис. 7. Объективы с различным значением числовой апертуры.  
 $\theta$  - половина максимального угла раскрытия объектива,  $\theta_1 < \theta_2 < \theta_3$ ;  
 $d$  – рабочее расстояние,  $d_1 > d_2 > d_3$

Для дальнейшего повышения числовой апертуры необходимо между объективом и образцом поместить иммерсионную среду с показателем преломления  $n > 1$ . В роли такой среды наиболее часто используют обычную воду ( $n=1,33$ ) или специальное иммерсионное масло ( $n=1,51$ ). Максимально достижимая числовая апертура таких объективов  $NA_{obj}=1,4$ .

Длина волны используемого при работе света также вносит существенный вклад в максимально достижимое разрешение микроскопа. При переходе от ультрафиолета (360 нм) до дальней красной области длин волн (680-700 нм) разрешение снижается почти в два раза при прочих равных условиях.

Разрешающая способность современных микроскопов, в зависимости от увеличения объектива, его числовой апертуры и наличия или отсутствия иммерсионной среды, варьируется от единиц до десятых долей микрометра (табл. 1.1)

**Характеристики некоторых объективов Carl Zeiss для длины волны  
 $\lambda=0,55\text{мкм}$**

Увеличение	Рабочая среда	$NA_{obj}$	Рабочее расстояние, мм	Поперечное разрешение, мкм
10×	воздух ( $n=1$ )	0,30	5,6	1,10
40×	воздух ( $n=1$ )	0,6	1,8	0,56
40×	вода ( $n=1,33$ )	1,20	0,23	0,28
40×	масло ( $n=1,51$ )	1,30	0,2	0,26
63×	масло ( $n=1,51$ )	1,40	0,18	0,24
100×	масло ( $n=1,51$ )	1,40	0,18	0,24

Увеличение окуляров составляет от 5× до 20×, наиболее распространены окуляры с увеличением 10×. Зная минимальное разрешение для человеческого глаза (0,1 мм) на расстоянии наилучшего зрения (25 см) и используя критерий Рэля, можно показать, что для окуляров с заданным увеличением  $M_e$  существует оптимальное (с точки зрения детализации изображения) соотношение между увеличением объектива  $M_o$  и его числовой апертурой  $NA_{obj}$ . Оно определяется из условия  $r \cdot M_o \cdot M_e \leq 0,1$  мм, и для окуляров с  $M_e = 10$  и длины волны 550 нм можно приблизительно получить  $M_o/NA_{obj} \leq 30$ . При строгом равенстве предельно разрешаемые объективом элементы объекта будут наблюдаться на пределе восприятия глаза. При несоблюдении этого неравенства, например, большем увеличении при той же числовой апертуре, изображение будет казаться размытым из-за дифракционных эффектов (явление пустого увеличения). Например, для приведенных в таблице 1.1 объективов 10× с  $NA_{obj}=0,1$  и 40× с  $NA_{obj}=1,3$  соотношение  $M_o/NA_{obj}$  близко к оптимальному. В то же время для объектива 40×, имеющего  $NA_{obj}=0,6$ , увеличение явно избыточно, что при наблюдении в окуляры приведет к эффекту пустого увеличения.

## 2. МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ КОНТРАСТА В ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Контраст – различимость предмета наблюдения от окружающего его фона. Детали изображения должны различаться яркостью или цветностью, чтобы человеческий глаз смог отличить их друг от друга. В микроскопии проходящего света контраст образца, как правило, обеспечивается разным уровнем поглощения света частями препарата. Однако значительная часть препаратов, например, бактерии или живые клеточные культуры, почти не поглощают света и в светлом поле почти не видны. Классическим методом контрастирования (т.е. повышения контраста) является окрашивание, когда в образец вводятся дополнительные вещества, связывающиеся с препаратом и обладающие сильным поглощением в некоторой области видимого диапазона. Существуют, однако, и другие эффективные методы контрастирования, с помощью которых различные оптические эффекты в препарате, не видимые для глаза, преобразуются в изменения яркости, распознаваемые глазом.

### 2.1. Метод темного поля

Метод исследования в темном поле впервые был предложен австрийскими учеными Р. Зигмонди и Р. Зидентопфом в 1903 году и подходит для рассеивающих свет объектов.

В основе метода лежит освещение препарата полым конусом света, внутренняя апертура которого превосходит числовую апертуру применяемого объектива. Поскольку ни один прямой луч от осветителя в объектив попасть не может, при отсутствии объекта поле зрения микроскопа будет темным. Объект, помещенный на предметный столик, будет рассеивать свет во все стороны, в том числе и в сторону объектива, благодаря чему на темном фоне будет видно контрастное изображение объекта.

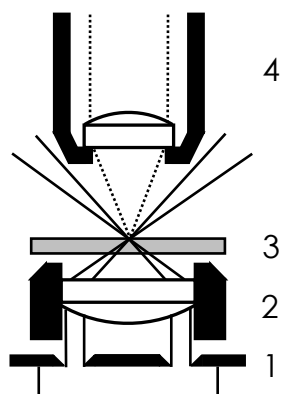


Рис. 8. Освещение препарата в методе темного поля. 1 – кольцевая диафрагма, 2 – конденсор, 3 – предметное стекло, 4 – объектив

В микроскопе проходящего света тип освещения создается посредством кольцевой диафрагмы в конденсоре (рис. 8). В случае, когда в исследованиях используется объектив с высокой числовой апертурой, есть вероятность, что часть света все же будет попадать объектив. По этой причине используются специализированные объективы, имеющие встроенную внутреннюю ирисовую диафрагму,

которая позволяет уменьшать эффективное значение  $NA_{obj}$  до величины, достаточной для наблюдения в темном поле.

## 2.2. Фазовый контраст

Метод предложен в 1934 году голландцем Ф. Цернике, получившим за его изобретение Нобелевскую премию в области физики в 1953 году. Фазовый контраст представляет собой идеальный метод для тонких неокрашенных объектов, например, клеток на стекле, которые имеют высоту в области ядра 5-10 мкм, на периферии менее 1 мкм и почти не обладают поглощением в видимой области спектра. Такие объекты не распознаются глазом в светлом или темном поле.

Тем не менее, у таких объектов имеются незначительные различия в показателе преломления клеток и окружающего их водного раствора, а также в пределах клеток, в частности, между цитоплазмой и ядром. Световые волны от осветителя, распространяющиеся через части объекта с различными показателями преломления, движутся с разными скоростями, вследствие чего колебания волн оказываются сдвинутыми по фазе. Не воспринимаемые непосредственно глазом, эти фазовые изменения с помощью специального оптического устройства преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т.е. в изменения яркости, которые уже различимы глазом. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным.

Для реализации данного метода в конденсор микроскопа, по аналогии с методом темного поля, ставят кольцевую диафрагму 1 (рис. 9). Необходим также специальный объектив (4), в котором есть фазовая пластинка (5) с полупрозрачным кольцом. Функции этого кольца – ослабить прямой свет, прошедший через препарат не рассеявшись, и придать этому свету дополнительное опережение по фазе на  $\pi/2$ . Свет, хотя бы немного отклоненный в препарате, проходит фазовую пластинку, минуя полупрозрачное

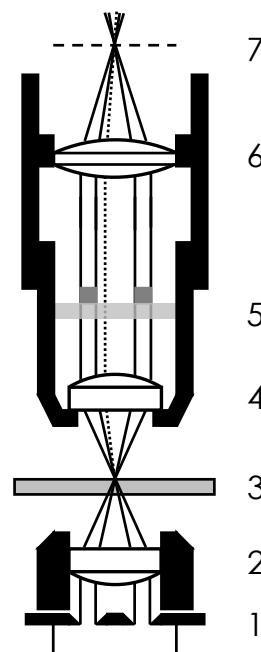


Рис. 9. Метод фазового контраста.  
1 – кольцевая диафрагма, 2 – конденсор, 3 – предметное стекло, 4 – объектив, 5 – фазовая пластинка, 6 – тубусная линза, 7 – плоскость промежуточного изображения. Окуляр и источник света не показаны

кольцо. Кроме того, вследствие взаимодействия с препаратом отклоненный свет имеет небольшое запаздывание по фазе.

Лучи объединяются тубусной линзой (6) в промежуточное изображение (7), которое увеличивается и наблюдается через окуляр, а яркость той или иной точки изображения будет определяться соотношением фаз прямого и рассеянного света. Для плоских тонких клеток на стекле рассеянный свет приобретает запаздывание на величину порядка  $\pi/2$ , поэтому итоговая разность фаз будет составлять величину порядка  $\pi$ , т.е. прошедший через препарат прямой и рассеянный свет будут находиться в противофазе. Клетка и ее органеллы будут казаться темными на более светлом фоне.

В вышеприведенном случае, когда изображение клеток темнее фона, говорят о «положительном» фазовом контрасте. Подбором фазовой пластинки в объективе можно добиться «отрицательного» фазового контраста, когда оптически более плотные части клетки будут светлее фона, однако такой вариант в настоящее время на практике не используется.

Стоит отметить, что побочным эффектом применения метода фазового контраста являются световые ореолы, возникающие на границе структур. Этот эффект (гало-эффект) может привести, в особенности на толстых пробах, к невозможности интерпретации изображения, так как световые ореолы многократно накладываются друг на друга. По этой причине фазовый контраст рекомендуется только для очень тонких образцов, как правило, не толще 10 мкм.

### **2.3. Поляризационный контраст**

В этом методе используется линейно поляризованный свет, т.е. световые волны, у которых вектор электрического поля колеблется вдоль фиксированного направления. Для получения такого света используются поляризационные фильтры, выделяющие из световых волн с произвольной ориентацией вектора электрического поля (естественного света) волны с заданным направлением вектора.

Помещенные друг за другом на пути следования естественного света, два фильтра будут пропускать свет в том случае, если направления поляризации фильтров совпадают. При повороте одного фильтра относительно другого интенсивность проходящего света будет плавно уменьшаться вплоть до минимальной, когда направления поляризации окажутся под углом  $90^\circ$ .

Некоторые объекты способны поворачивать направление колебаний проходящего поляризованного света, что используется в методе поляризационного контраста. К таким объектам относятся



двулучепреломляющие материалы, показатель преломления которых зависит от направления колебаний падающего света. Это характерно в первую очередь для кристаллических минералов, а также для полимеров, в том числе биологического происхождения (волокна коллагена).

Впервые микроскоп для наблюдения объектов в поляризованном свете был создан английским оптиком Г. Сорби в 1850 году. Основным отличием от обычного микроскопа является наличие двух поляризационных фильтров. Первый фильтр (называемый обычно *поляризатором*) устанавливается перед конденсором, благодаря чему объект на предметном столике освещается поляризованным светом. За объективом располагается второй фильтр (*анализатор*), плоскость поляризации которого повернута на  $90^\circ$  относительно первого. Если на столике микроскопа нет препарата, то изображение остается совершенно темным. Препарат, способный поворачивать плоскость поляризации проходящего света, будет виден в микроскоп, т.к. «повернутый» образцом свет частично пропускается анализатором.

## 2.4. Флуоресцентная микроскопия

Флуоресценция – способность ряда веществ после поглощения света с одной длиной волны излучать свет с другой, как правило, большей длиной волны. Флуоресцентная микроскопия – разновидность оптической микроскопии, использующая данное явление для изучения свойств органических и неорганических препаратов. Необходимым условием для наблюдения препарата с помощью флуоресцентного микроскопа является присутствие в образце молекул, обладающих флуоресцентными свойствами.

Устройство флуоресцентного микроскопа (рис. 10а) отличается от обычного микроскопа наличием дополнительных фильтров. Свет от белого источника (1) проходит через *фильтр возбуждающего излучения* (2), после которого в спектре излучения остаются только те компоненты, которые необходимы для эффективного возбуждения флуоресценции. При поглощении этого излучения флуорофор (т.е. часть молекулы, придающая ей флуоресцентные свойства) начинает испускать фотоны с большей длиной волны. Излучение флуоресценции, а также рассеянное излучение возбуждения, собираются объективом (5), после чего последнее отсеивается *эмиссионным фильтром* (7). Через окуляр (8) наблюдаются только флуоресцирующие области препарата.

В схеме микроскопа отраженного света (рис. 10б) для введения излучения в оптический тракт используется *дихроичное зеркало* (6). Такое зеркало отражает определенную часть спектра падающего света, в данном случае – возбуждающее излучение, и полностью пропускает сигнал флуоресценции.

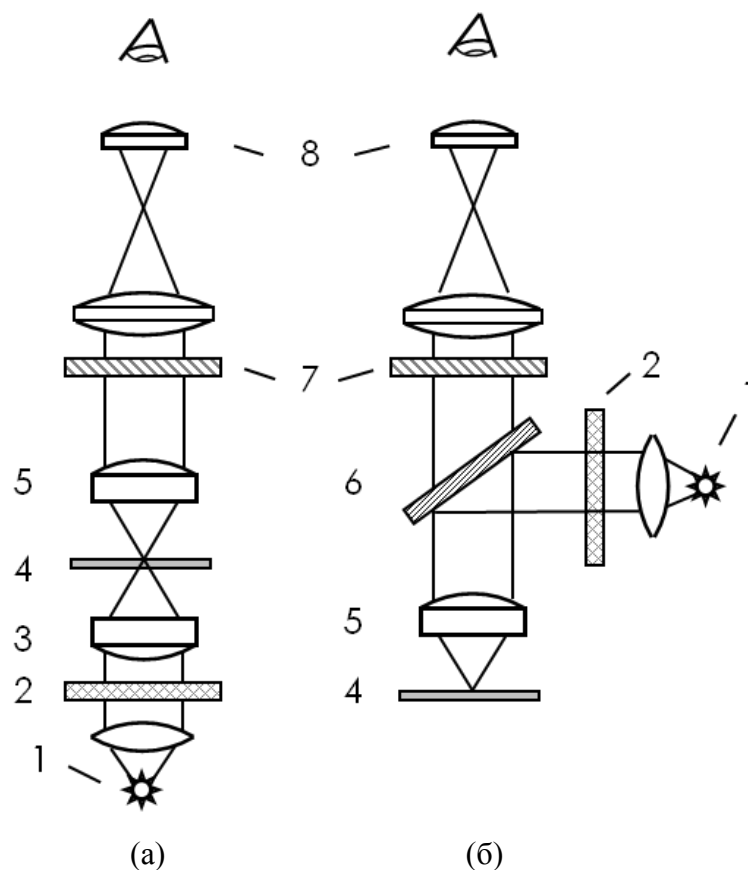


Рис. 10. Схема просветного (а) и отражательного (б) флуоресцентных микроскопов. 1 – источник света, 2 – фильтр возбуждающего излучения, 3 – конденсор, 4 – предметное стекло с образцом, 5 – объектив, 6 – дихроичное зеркало, 7 – эмиссионный фильтр, 8 – окуляр

С применением флуоресцентной микроскопии клетки и ткани могут быть визуализированы как за счет флуоресценции собственных химических соединений (автофлуоресценции), так и за счет применения специальных красителей: флуоресцентных меток или флуоресцентных зондов. Основными биологическими флуорофорами, обеспечивающими явление *автофлуоресценции* в видимой области спектра, являются пиридиновые нуклеотиды (например, НАДН), флавиновые (рибофлавин, ФАД, ФМН) и порфириновые (протопорфирин IX и т.п.) соединения, пигменты растений (каротиноиды, антоцианы, хлорофиллы) а также ряд других соединений ароматической и гетероциклической природы.

Во многих случаях исследования проводят с помощью искусственных флуорофоров различных классов. С данной целью применяются красители (аурамин, корифосфин и т.п.), пигменты и их производные (фикоцианины, порфирины), некоторые алкалоиды (берберин) и др. Такие соединения

используются в качестве *флуоресцентных меток*, которые специфически связываются с определенными биологическими молекулами препарата. По свечению меток делается вывод о наличии и расположении в образце маркированных структур и молекул.

В отличие от флуоресцентных меток, назначение *флуоресцентных зондов* несколько иное – их характеристики свечения существенно зависят от окружения и играют роль индикаторов состояния среды. Так, существуют флуоресцентные зонды, позволяющие определять концентрации ионов (например,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  и др.), электрический потенциал на мембране, наличие свободно-радикальных состояний и другие параметры.

### **3. ПРАКТИКУМ ПО ШИРОКОПОЛЬНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ**

#### **3.1. Устройство микроскопа Axiovert 200. Настройка освещения по Келеру. Получение изображений**

Изучение устройства и работы микроскопа проводится на примере инвертированного микроскопа Axiovert 200 (производство Carl Zeiss, Германия), снабженного цифровой камерой AxioCam MRc (рис. 11).

Данный микроскоп относится к группе *инвертированных*, т.е., в отличие от прямых, освещение препарата производится сверху, а объективы расположены под предметным столиком и подводятся к препарату снизу. Такое расположение объективов очень удобно при работе с флаконами для клеточных культур, закрытыми крышками планшетов, чашками Петри. Наличие крышки и слоя культуральной жидкости над рассматриваемыми клетками не позволяет подвести объектив сверху, в то время как снизу клетки от наблюдателя отделены лишь тонким слоем прозрачного пластика или стекла. При рассматривании на инвертированном микроскопе стандартных фиксированных препаратов на предметном стекле они размещаются на столике микроскопа в «перевернутом» виде, покровным стеклом вниз.

Питание микроскопа осуществляется от сети переменного тока. Кнопка включения электропитания микроскопа находится справа сзади на станине микроскопа (1).

При работе в проходящем свете освещение препарата производится с помощью галогеновой лампы с регулируемым напряжением (2) и конденсора (3). Устройство последнего позволяет дополнительно устанавливать оптические фильтры с различными свойствами (4) или диафрагмы, в том числе кольцевые диафрагмы для работы по методу фазового контраста (5). Здесь же расположены устройства регулировки полевой и апертурной диафрагм (6, 7), установки вертикального положения конденсора (8). Включить/выключить освещение можно с помощью кнопки справа (9), а изменить напряжение, подаваемое на лампу, и, как следствие, яркость и спектральный состав излучаемого ею света, можно с помощью регулятора на передней стороне станины внизу (10).

Предметный столик микроскопа (11) снабжен управляющей ручкой, позволяющей перемещать закрепленный в держателе (12) препарат в двух перпендикулярных направлениях (13). При необходимости держатель может быть снят, в таком случае перемещение препарата производится вручную.

Под предметным столиком находится вращающаяся турель с объективами (14), закрытый блок с фильтровыми наборами (15), дополнительный слайдер для установки фильтров (16).

Фокусировка производится с помощью настроечных макро- и микровинта (17, 18), расположенных как справа, так и слева на станине микроскопа.

Окуляры микроскопа (19) расположены на тубусе (20), позволяющем регулировать расстояние между ними в соответствии с межглазным расстоянием наблюдателя. Кроме того, каждый объектив снабжен регулировочным кольцом для подстройки в случае диоптрийных различий между глазами (21).

Кроме работы в проходящем свете, микроскоп позволяет работать в режиме наблюдения флуоресценции. На задней стороне станины микроскопа закреплен осветитель с ртутной лампой (22). Свет от неё также фокусируется, проходит через соответствующую полевую и апертурную диафрагмы, блок фильтров (23) и через объектив подается на образец. Флуоресценция образца собирается объективом. Ртутная лампа снабжена отдельным блоком питания. В отличие от галогеновой, ртутная лампа требует прогрева для выхода в рабочий режим и в дальнейшем не выключается до окончания работы. Для подачи её света на препарат открывается заслонка, управляющая кнопка которой расположена рядом с кнопкой включения/выключения галогеновой лампы (24).

Для удобства пользователя информация об используемом в данный момент объективе, включенной галогеновой и/или подаче освещения ртутной лампы, напряжении на галогеновой лампе отображается на жидкокристаллическом дисплее, расположенном над конденсором (25).

Для сохранения полученного изображения к микроскопу подсоединена цифровая камера (26). На станине микроскопа предусмотрено крепление камеры в нескольких различных позициях, в зависимости от удобства пользователя. Соединение камеры AxioCam MRc с компьютером позволяет управлять камерой с помощью компьютерной программы AxioVision.

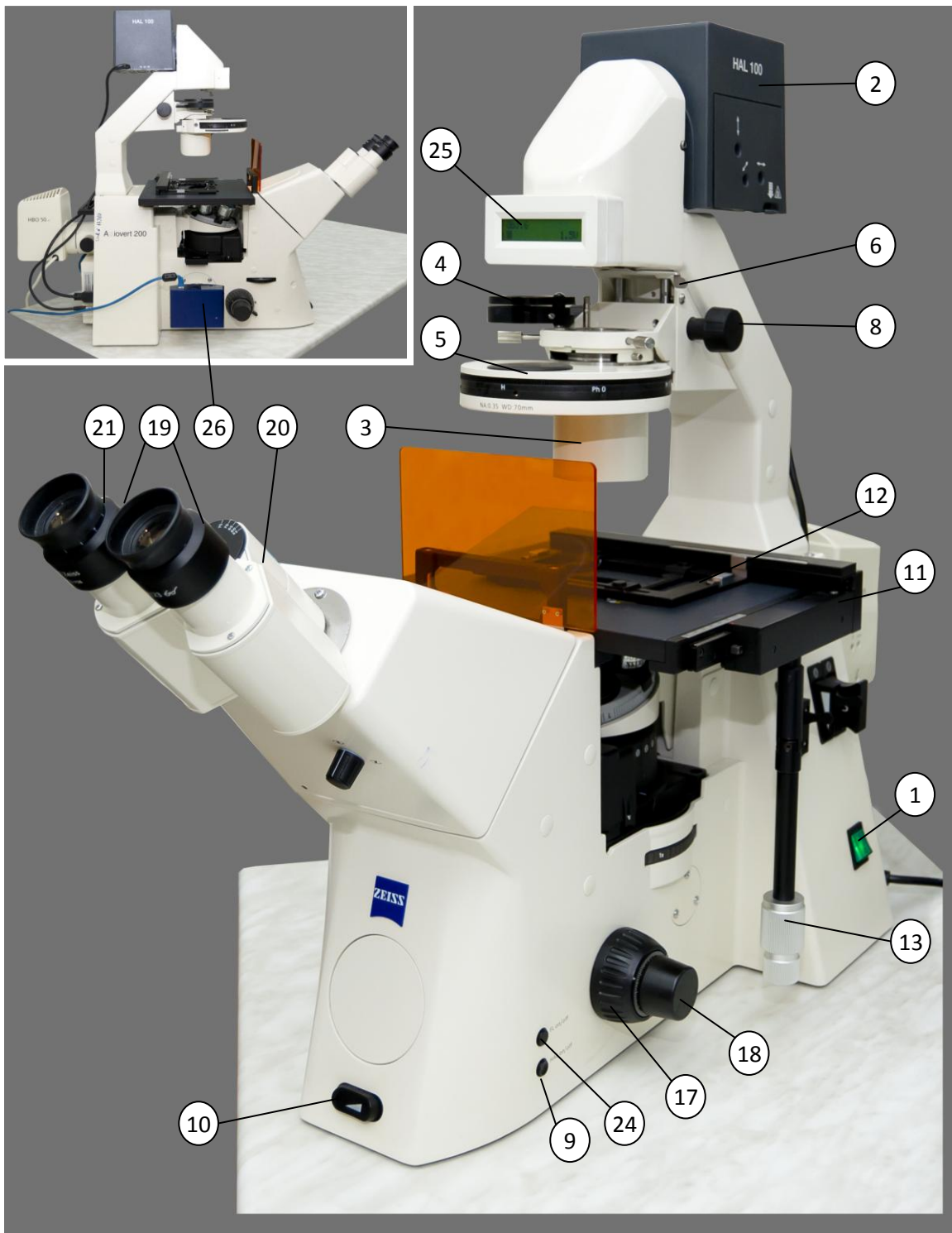


Рис. 11. Внешний вид микроскопа Axiovert 200  
(обозначения см. в тексте и на стр. 23)

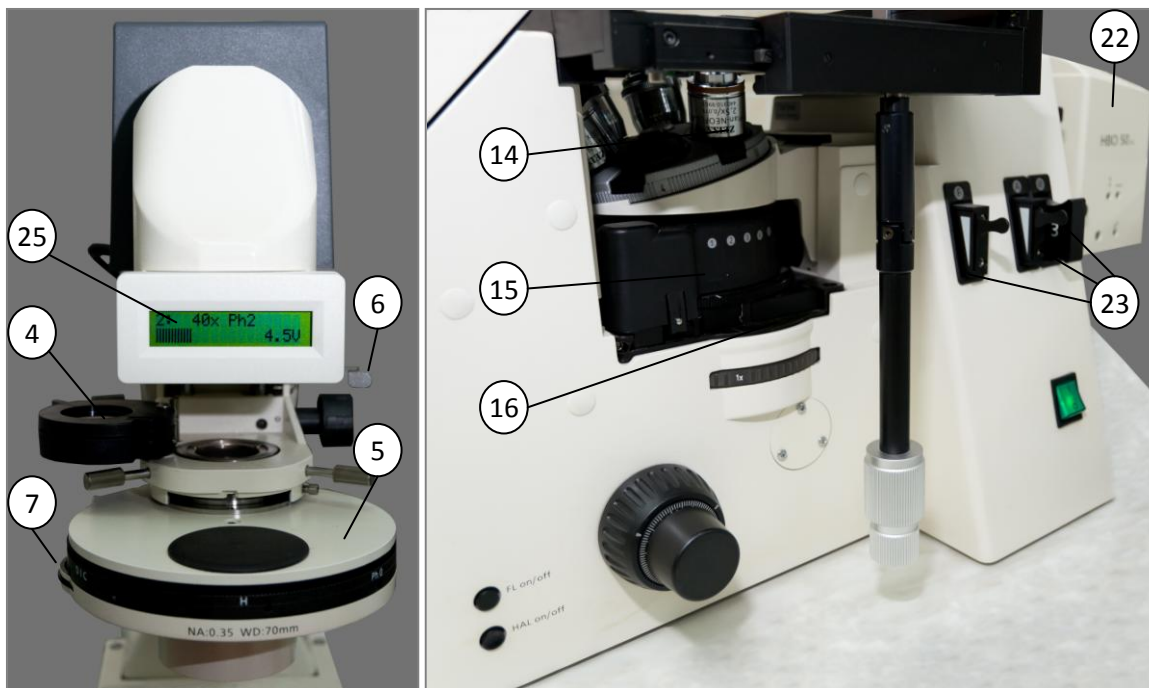


Рис. 11. Продолжение. Внешний вид микроскопа Axiovert 200.

- 1 – кнопка включения электропитания;
- 2 – осветитель с галогеновой лампой;
- 3 – конденсор;
- 4 – оптические фильтры;
- 5 – блок сменных диафрагм;
- 6 – устройство регулировки полевой диафрагмы;
- 7 – устройство регулировки апертурной диафрагмы;
- 8 – винт регулировки вертикального положения конденсора;
- 9 – кнопка включения/выключения галогеновой лампы;
- 10 – регулятор напряжения, подаваемого на галогеновую лампу;
- 11 – предметный столик микроскопа;
- 12 – держатель препаратов;
- 13 – управляющая ручка препаратоводителя;
- 14 – вращающаяся турель с объективами;
- 15 – блок с фильтровыми наборами;
- 16 – слайдер для установки дополнительных фильтров
- 17 – винт грубой настройки фокуса (макрровинт);
- 18 – винт точной настройки фокуса (микровинт);
- 19 – окуляры;
- 20 – тубус с регулировкой расположения окуляров;
- 21 – регулировочное кольцо;
- 22 – осветитель с ртутной лампой;
- 23 – полевая и апертурная диафрагмы, блок фильтров для работы в отраженном излучении;
- 24 – кнопка управления заслонкой ртутной лампы;
- 25 – жидкокристаллический дисплей;
- 26 – цифровая камера

## Экспериментальная часть

*Оборудование и материалы:* инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200, оснащенный цифровой камерой AxioCam MRc, подключенной к компьютеру; готовые гистологические препараты, окрашенные гематоксилином-эозином; полоска белой бумаги.

- Включить микроскоп. При этом на жидкокристаллическом дисплее микроскопа отобразятся текущие настройки.

### Настройка микроскопа

- Убедиться, что конденсор микроскопа находится в положении “Н” – метод светлого поля.

- Убрать дополнительные фильтры над барабаном конденсора.

- Выставить в рабочее положение объектив 10×.

- Включить источник освещения и проверить, виден ли свет, для этого поместить полоску белой бумаги под полевой диафрагмой над барабаном конденсора.

- Открыть полевую диафрагму до упора, при этом световое пятно на бумаге достигнет максимального размера.

- Разместить полоску бумаги на предметном столике микроскопа. Полностью открыть апертурную диафрагму конденсора. Световое пятно на бумаге станет максимально ярким.

- Наблюдая свет в окуляры, установить интенсивность освещения на таком уровне, чтобы освещение воспринималось приятным. После этого установить на перемычке бинокулярного тубуса подходящее межзрачковое расстояние. При этом изображение светлого круга в окулярах не должно двоиться при наблюдении без напряжения. Для окуляров с возможностью диоптрийной подстройки установить “0”. Окуляры фирмы Carl Zeiss предназначены для работы в очках, поэтому пользователи, носящие очки, могут не снимать их.

- Убрать с предметного столика полоску бумаги и установить препарат покровным стеклом вниз.

- Глядя в окуляры, с помощью настроенного макровинта добиться максимальной резкости изображения.



### Установка освещения по Кёлеру

- Уменьшить полевую диафрагму почти до минимума.

• С помощью приводного винта конденсора добиться видимого в окулярах резкого изображения полевой диафрагмы (многоугольник) или, по крайней мере, её фрагмента.

• Открыть полевую диафрагму так, чтобы изображение занимало почти всё поле зрения.

• С помощью центрирующих винтов на конденсоре добиться строго центрального положения диафрагмы.

• Открыть полевую диафрагму так, чтобы её край слегка вышел за пределы поля зрения.

- Вынуть окуляр из держателя.

• Если смотреть непосредственно в держатель, можно наблюдать апертурную диафрагму. Расстояние между глазами и держателем объектива должно составлять 10-20 см. Закрывая и открывая апертурную диафрагму конденсора добиться четкого изображения апертурной диафрагмы.

• Установить диаметр апертурной диафрагмы так, чтобы осветить от  $2/3$  (66%) до  $4/5$  (80%) диаметра зрачка. Открытие апертурной диафрагмы позволяет получить больше света, а её закрытие – повышает контраст изображения. С другой стороны, апертурная диафрагма не должна быть слишком сильно закрыта, так как это может привести к потере разрешения отдельных фрагментов изображения.

- Вставить окуляр в держатель.

• При смене объектива подстроить полевую и апертурную диафрагму. Повторно окуляр из держателя не вынимать, подбирая оптимальное соотношение освещенности и контраста в зависимости от требуемого качества изображения.

• При получении изображений раскрытие полевой и апертурной диафрагм не меняется, освещенность препарата изменяется с помощью регулировки напряжения на лампе.

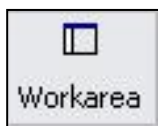
### Получение и сохранение изображения

Особенности работы на микроскопе, оснащённом цифровой камерой, рассмотрены в Приложении 3.

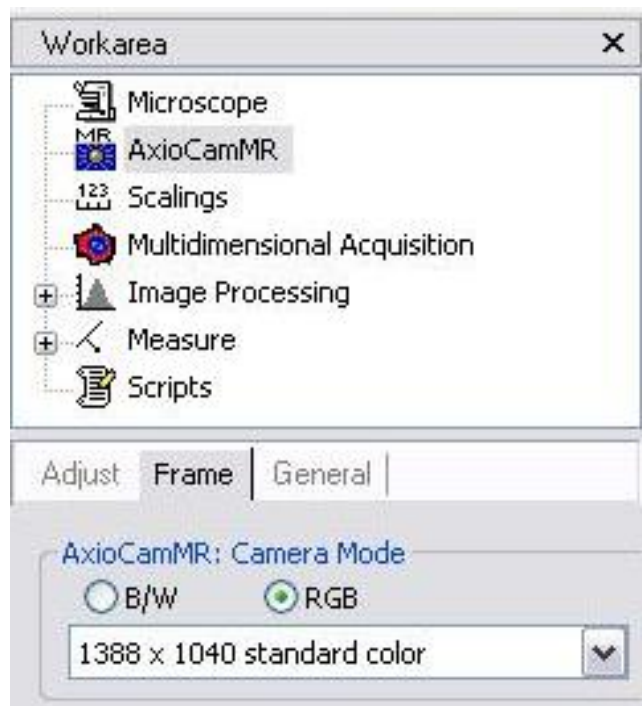
- Включить компьютер.

- Запустить программу AxioVision, ярлык которой расположен на рабочем столе.

- Запустить панель «Рабочая область» в меню View/Windows/Workarea или нажатием кнопки Workarea на верхней рабочей панели.



- Выбрать пункт меню AxioCamMR, при этом в нижней части панели отобразятся настройки камеры. В закладке Frame установить режим RGB, выбрать разрешение и количество цветов (1388 x 1040 standard color). Переключиться на закладку Adjust.



- Запустить окно отображения в разделе меню Acquisition/Live или нажатием кнопки Live на рабочей панели программы. В открывшемся окне будет отображаться установленный на предметном столике препарат в режиме



реального времени.

- В нижней части окна Live расположено всплывающее меню, позволяющее выбрать один из трех вариантов частоты обновления кадра: Slow (медленный), Medium (средний) и Fast (быстрый). Для наиболее четкого отображения неподвижного образца необходимо выбрать режим Slow, при работе с подвижными образцами рекомендуется увеличить скорость обновления кадра.

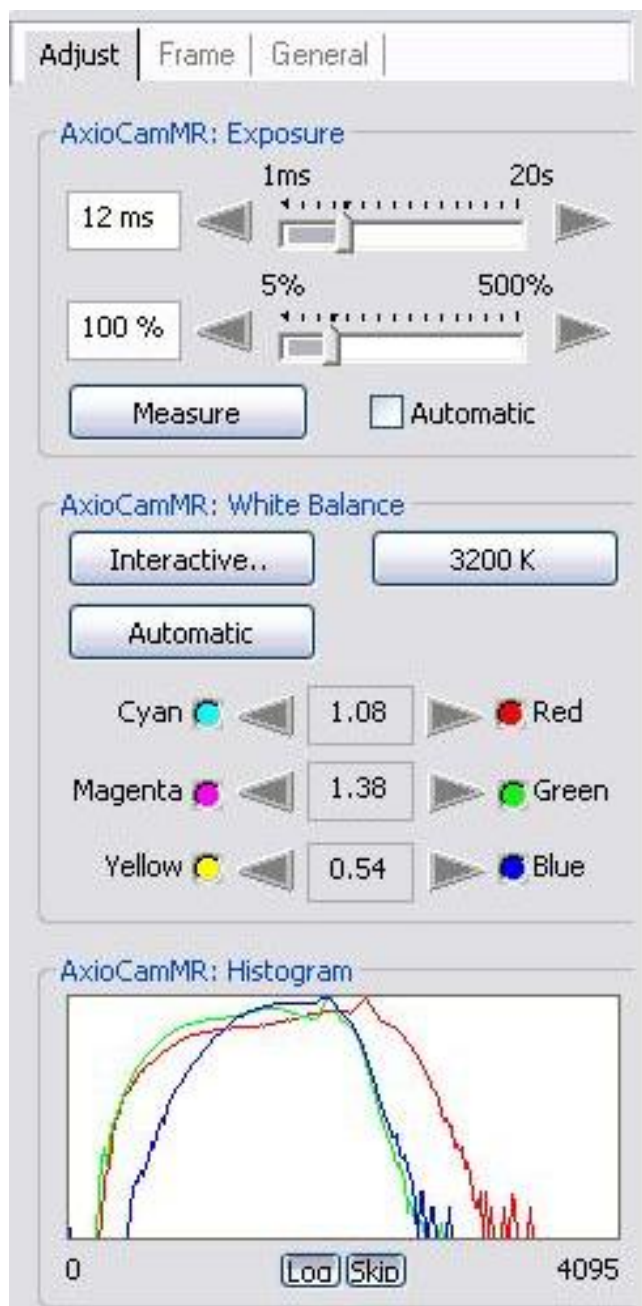


- На закладке Adjust Рабочей области расположена шкала для настройки экспозиции камеры в диапазоне от 1 мс до 20с. Кнопка Measure позволяет

программе задать автоматическую экспозицию. С помощью указанной кнопки и ручной установки экспозиции подобрать режим, при котором изображение препарата в окне Live достаточно освещено и не засвечено.

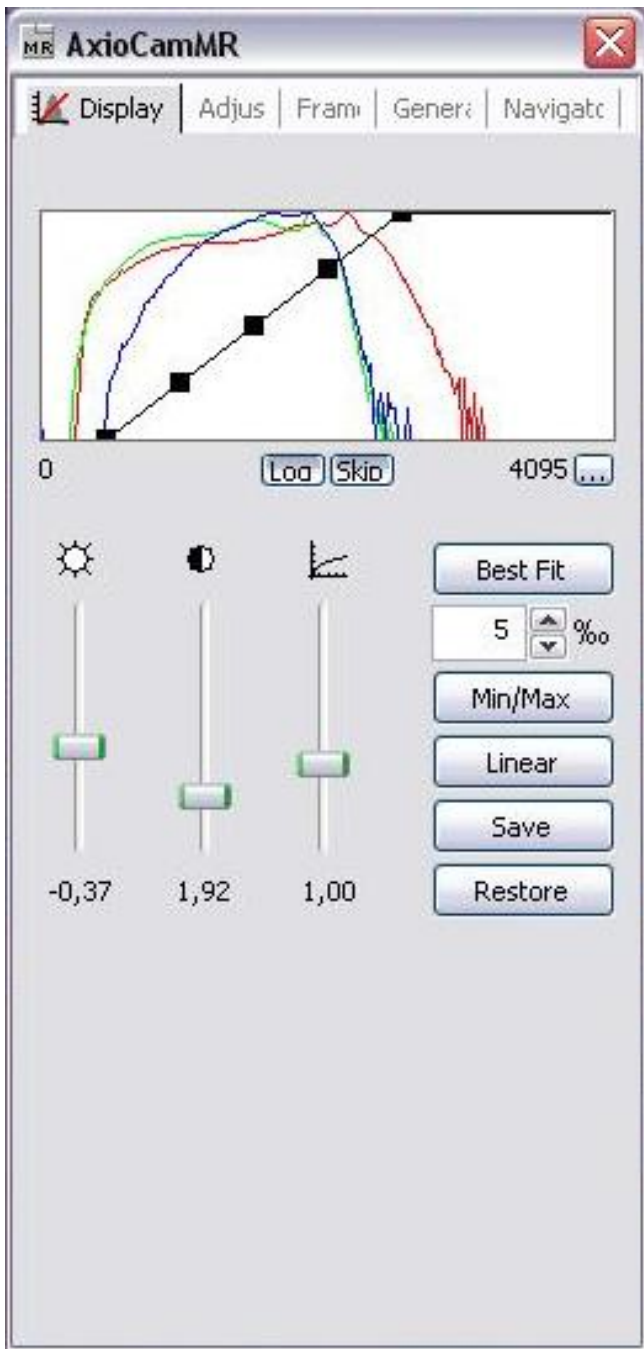
- Разместить препарат на столике так, чтобы в окне отображалась интересующая область. С помощью регулировочных макро- и микровинта добиться максимальной резкости изображения на экране.

- На закладке Adjust Рабочей области также расположены элементы управления цветовым балансом изображения. При нажатии кнопки Interactive курсор мыши принимает вид пипетки; если данной пипеткой щелкнуть (левая кнопка мыши) на участке изображения, соотношение цветов на нем принимается за нейтральный серый, а все изображение подстраивается соответствующим образом. Кнопка Automatic позволяет программе задать автоматические настройки. Кнопка 3200 K задает базовые настройки белого, оптимизированные для температуры галогеновой лампы 3200 К (при регулировке напряжения на лампе такой режим работы специально отображается на дисплее микроскопа). Кроме этого, настройки могут быть изменены вручную для каждого цвета с автоматическим пересчетом весовых коэффициентов для двух оставшихся. С помощью описанных инструментов добиться отображения цветов препарата в окне Live, близкого к цветам, наблюдаемым в объектив.



- В нижней части окна Live справа от меню выбора частоты обновления кадра расположена кнопка, открывающая окно настройки изображения.





Закладка Display позволяет изменить динамический диапазон отображения сигнала, в том числе выбрать следующие режимы: Linear – отображение всего потенциального диапазона сигнала с камеры, Min/Max – отображение только детектируемого сигнала от минимального до максимального, Best Fit – отображение детектируемого сигнала за вычетом крайних значений, порог задается дополнительно в промилле. Режимы Min/Max и Best Fit позволяют существенно увеличить контраст получаемого изображения. Яркость, контраст и кривизна кривой отображения уровня сигнала могут регулироваться вручную. При работе для получения оптимального контраста установить режим отображения Best Fit с порогом 5 ‰.

- Повторив при необходимости несколько раз настройку экспозиции, цветового баланса и динамического диапазона отображения, добиться в окне Live четкого, контрастного изображения.

- Для захвата изображения нажать кнопку Snap в нижней части окна Live, аналогичную кнопку на

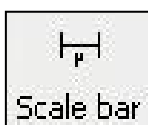
верхней рабочей панели, или выбрать в меню Acquisition/Snap.



Полученное изображение отобразится в основном окне программы. При захвате нескольких кадров они будут отображены в отдельных закладках с названием в формате SNAP-111111-0001\*. Значок \* свидетельствует о том, что соответствующий захваченный кадр не сохранен в виде отдельного файла.

- Выбрать пункт меню Scalings на Рабочей области. Выберите в отобразившемся меню Available scalings объектив, с помощью которого получено изображение. Последовательно нажмите кнопки Активировать (Activate) и Применить к изображению (Apply to image).

- В меню Annotations / Scale bar активируйте масштабную линейку и мышью укажите её расположение и длину на изображении. Также активировать масштабную линейку можно нажатием кнопки Scale bar на верхней рабочей панели.

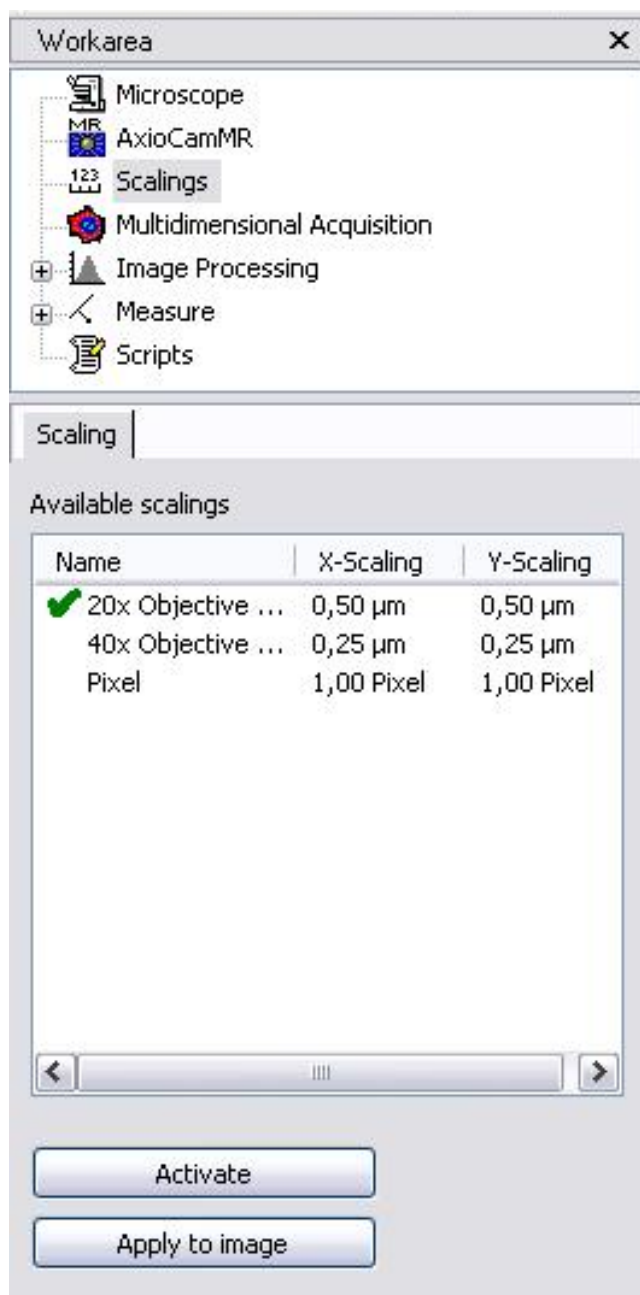


В меню, открываемом щелчком правой кнопки мыши на нанесенной на изображение масштабной линейке, выберите пункт Properties. На закладке Attributes задайте цвет и толщину линии, формат используемого шрифта.

- Сохраните изображение на жестком диске управляющего компьютера, открыв пункт меню File/Save или Save as, или использовав аналогичные кнопки верхней рабочей панели. Изображение может быть сохранено как в собственном формате программы AxioVision (\*.zvi), так и в стандартных форматах сохранения файлов рисунков.

- Другие возможности программы AxioVision описаны в Справке (раздел меню Help).

Для завершения работы необходимо закрыть окно программы AxioVision, выключить компьютер и выключить питание микроскопа.



### **Задание 1**

• Определить характеристики объективов, которыми оборудован микроскоп, согласно их маркировке (см. Приложение 2). Рассчитать поперечное разрешение при работе в проходящем и отраженном свете для зеленого света (550 нм). Заполнить таблицу 3.1.

• Сделать выводы.

**Таблица 3.1**

**Характеристика объективов**

Объектив	Увеличение	Рабочая среда	Числовая апертура $NA_{obj}$	Поперечное разрешение, мкм	
				Проходящий свет	Отраженный свет

### **Задание 2**

- Включить и настроить микроскоп для работы в проходящем свете.
- Настроить освещение по Кёлеру для объектива с увеличением 10×.

### **Задание 3**

• Получить изображения готового гистологического препарата с окраской гематоксилином-эозином в проходящем свете с использованием объективов с увеличением 10×, 20× и 40×. При переходе на каждый новый объектив необходимо подстроить полевую и апертурную диафрагму в соответствии с принципами освещения по Кёлеру.

• На каждом изображении выставить масштабную линейку, позволяющую оценить размеры объектов.

• Сохранить изображения в виде файлов в формате \*.jpg.

### **3.2. Метод фазового контраста в микроскопии эукариотических клеток в культуре *in vitro***

Многие микроскопические объекты, в частности, большинство клеток бактерий, одноклеточных организмов, тонкие срезы тканей и т.п., почти не поглощают свет в видимой области спектра и поэтому с трудом различимы при использовании микроскопии светлого поля. Рассеяние света такими объектами также зачастую незначительно, что затрудняет работу и методом темного поля. В тех случаях, когда необходимо сохранить жизнеспособность и функциональную активность клеток образца, нежелательно использовать экзогенные красители, в том числе витальные, или прижизненные, которые могут повлиять на результаты дальнейшего исследования.

Одним из наиболее простых и при этом эффективных методов, позволяющих визуализировать неокрашенные слабо рассеивающие биологические объекты, является метод фазового контраста (подробнее принцип метода описан в разделе 2.2). Данный метод наиболее эффективен при исследовании очень тонких объектов, например, однослойных культур эукариотических клеток. Ведение клеточной культуры требует контроля состояния клеток (как минимум по морфологическим признакам), оценки количества клеток в культуральном сосуде, плотности и т.п. По мере роста культуры осуществляются пассажи – пересев клеток в новые культуральные сосуды, при этом знание количества клеток необходимо для правильного расчета разведения суспензии. Микроскопия по методу фазового контраста позволяет как качественно, так и количественно исследовать клетки в культуре *in vitro* без использования красителей.

Для реализации метода фазового контраста микроскоп должен быть оборудован одной или несколькими специальными кольцевыми диафрагмами в конденсоре и объективами, предназначенными для работы по данному методу.

В используемом в работе микроскопе кольцевые диафрагмы конденсора расположены во вращающемся блоке (рис. 11). Путем поворота блока можно выставить одну из трех диафрагм, маркированных как “Ph 0”, “Ph 1” и “Ph 2”. Указанные диафрагмы различаются по диаметру кольца и, как следствие, по размеру формируемого светового конуса.

Объективы, предназначенные для работы по методу фазового контраста, также отмечены маркировкой с указанием “Ph 0”, “Ph 1” или “Ph 2” (см. Приложение 2). Поскольку для данного метода необходимо строгое соответствие диаметра светового конуса и параметров фазовой пластинки внутри объектива, при работе необходимо строгое соответствие характеристик выбранного объектива и выставленной кольцевой диафрагмы.

## Экспериментальная часть

**Оборудование и материалы:** инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200, оснащенный цифровой камерой AxioCam MRc, подключенной к компьютеру; 12-луночный планшет с культивируемыми клетками яичника китайского хомячка СНО (24-часовая культура, разная плотность посадки), автоматические дозаторы переменного объема на 20-200 мкл и 1-5 мл со сменными одноразовыми наконечниками, полипропиленовые пробирки объемом 15 мл с крышками, двухсеточная камера Горяева, раствор для снятия клеток с подложки (трипсин-версен), фосфатный буфер (PBS), емкость для сбора отработанных реактивов и использованных наконечников.

Задачи выполняются на заранее подготовленном лаборантом 12-луночном планшете (рис. 12). За 24 часа до начала занятия лаборант рассеивает в лунки планшета клетки линии СНО в концентрациях  $10^4$ ,  $3 \cdot 10^4$ ,  $6 \cdot 10^4$ ,  $10^5$  клеток на лунку, каждая концентрация в 3-х повторностях.



Рис. 12. 12-луночный планшет для культивирования клеток

### Перенос клеток из планшета в пробирку

- С использованием автоматического дозатора отобрать из лунки планшета культуральную среду.
- Промыть лунку 2 мл PBS.
- Залить лунку раствором для снятия (200 мкл), обеспечивающим диссоциацию клеток со дна лунок. Клетки линии СНО в нормальных условиях роста находятся на дне лунки в прикрепленном состоянии.



- После инкубации в течение 15-20 минут добавить 2 мл PBS, дозатором расpipетировать содержимое лунки для диссоциации клеточного слоя и тщательно собрать суспензию в пробирку.

- Дважды промыть лунку PBS (по 2 мл) для количественного сбора клеток в ту же пробирку.

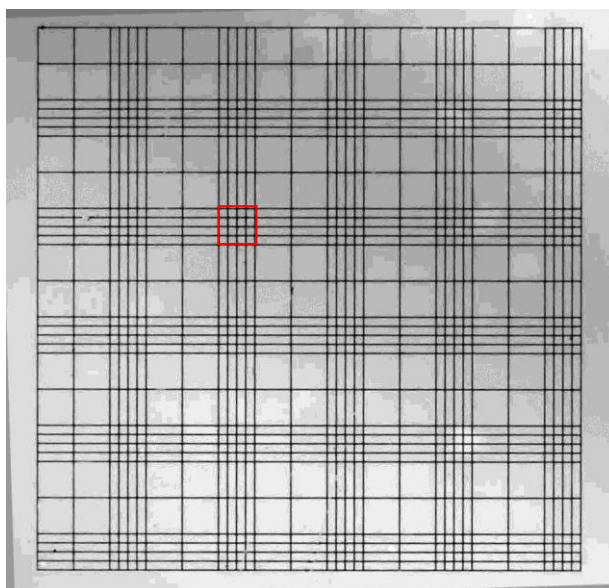
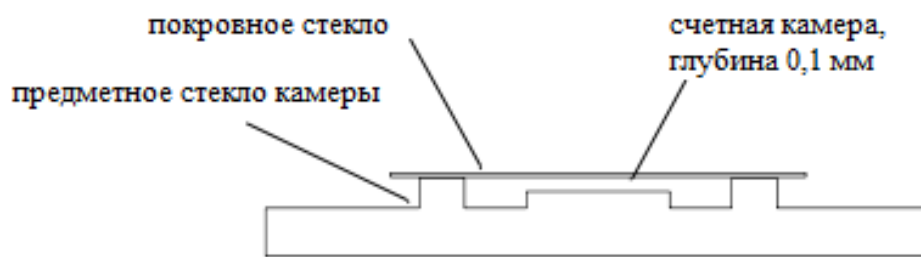


Рис. 13. Двухсеточная камера Горяева. а) внешний вид камеры и схема камеры (вид сбоку), иллюстрирующая расположение счетной камеры; б) сетка счетной камеры, границы одного из больших квадратов выделены цветом

Для подсчета количества клеток используется двухсеточная камера Горяева (рис. 13). Камера представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка. Глубина камеры (0,1 мм) и площадь больших и малых квадратов сетки (1/25 и 1/400 мм<sup>2</sup>, соответственно) указаны на предметном стекле. Объем жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки Горяева, составляет 0,004 мкл.

### Процедура подсчета количества клеток

- Перед началом работы необходимо подготовить камеру. Для этого покровное стекло необходимо поместить на камеру, плотно прижать пальцем и притереть его круговыми движениями до появления интерференционных радужных полос. Только при соблюдении этого условия покровное стекло хорошо удерживается на камере при её наклоне, а глубина и рабочий объем счетной камеры соответствуют указанным в паспорте.

- Тщательно распипетировать суспензию клеток в пробирке и 30 мкл суспензии с помощью дозатора перенести в счетную камеру.

- Поместить камеру на предметный столик микроскопа. Настроить режим фазового контраста, сфокусировавшись на линиях одной из двух сеток, нанесенных на дно счетной камеры.

- Подсчет клеток начинают через 2-3 минуты после заполнения, чтобы клетки осели и находились в одной плоскости.

- Подсчитать количество клеток в 20 больших квадратах. При подсчете учитывать все клетки, лежащие в квадрате, а также пересекающие верхнюю и правую сторону квадрата.

- Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычислить по формуле:

$$M=(a \cdot 10^3)/(h \cdot S) \cdot n,$$

где M – количество клеток в 1 мл суспензии,

a – среднее количество клеток в квадрате сетки,

h – высота камеры,

S – площадь квадрата сетки, мм<sup>2</sup>, при подсчете в больших квадратах S=1/25 мм<sup>2</sup>,

10<sup>3</sup> – коэффициент перевода [см<sup>3</sup>] в [мм<sup>3</sup>],

n – коэффициент разведения суспензии.

- Для определения количества клеток в лунке планшета рассчитать общее количество клеток в пробирке с суспензией.

- Рассчитать плотность клеточной культуры. Площадь лунки 12-луночного планшета составляет  $3 \text{ см}^2$ .

### *Задание 1*

- Настроить микроскоп для работы в проходящем свете по методу фазового контраста, установив соответствующие друг другу объектив и фазовое кольцо в конденсоре.

- Получить изображения клеток в лунках планшета с использованием объектива с увеличением  $20\times$ . Описать морфологию клеток, их размер, общую заселенность лунок в зависимости от исходного количества внесенных клеток.

- С использованием камеры Горяева определить количество клеток в каждой лунке планшета.

- Рассчитать среднее количество клеток в 24-часовой культуре в лунке для каждого варианта посева (данные представить как среднее арифметическое и стандартное отклонение).

- Рассчитать среднюю плотность клеточной культуры для каждого варианта посева, построить график зависимости плотности от исходного количества внесенных в лунку клеток, указать средние значения и стандартные отклонения. Сделать вывод.

### 3.3. Поляризационный контраст в исследовании коллагеносодержащих структур

Применение поляризационного контраста при исследовании биологических объектов позволяет получить информацию об оптической, а следовательно и структурной, анизотропии объекта. В тканях человека и животных наиболее распространенным компонентом, проявляющим анизотропные свойства, является коллаген – фибриллярный белок, составляющий основу внеклеточного матрикса большинства тканей организма.

Молекулы коллагена имеют длину около 300 нм и ширину 1,5 нм, при этом они обладают свойством спонтанно агрегировать с последовательным образованием всё более сложных структур: микрофибрилл, фибрилл, волокон (рис. 14). Волокна коллагена в составе тканей укладываются в высокоупорядоченные пучки, ориентированные в соответствии с испытываемой органом механической нагрузкой.

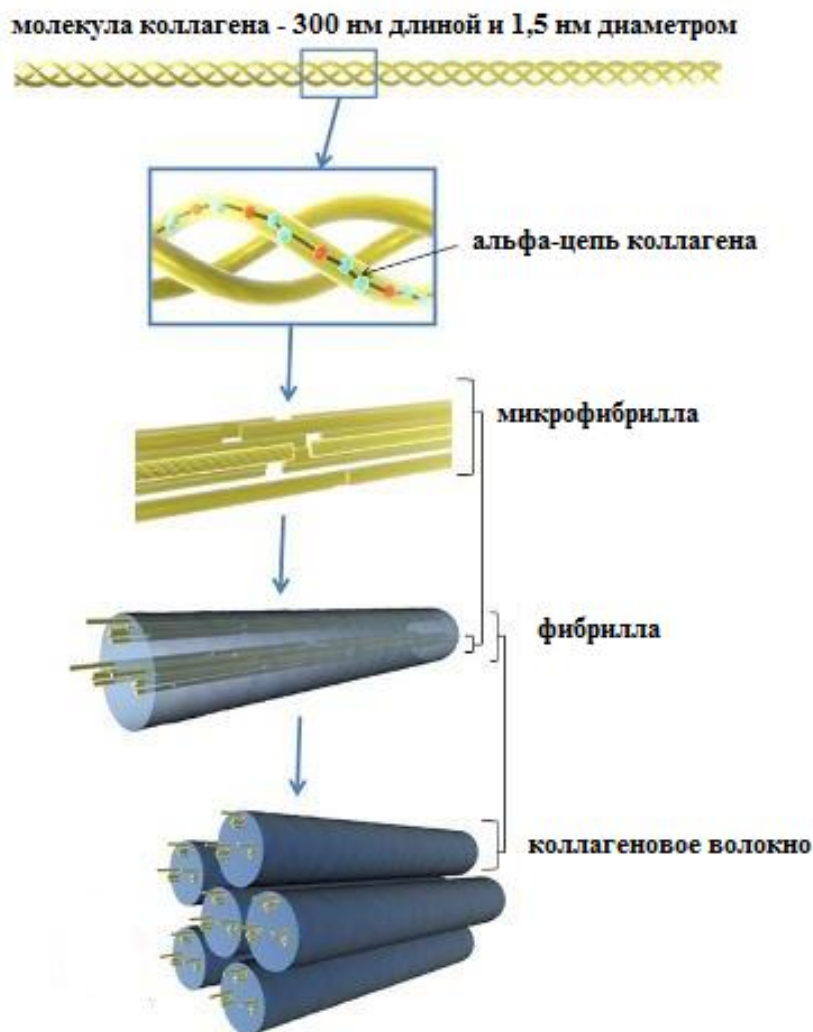


Рис. 14. Схема образования коллагенового волокна

Сильная анизотропия коллагеновых волокон и их пучков определяет наличие у коллагенсодержащих тканей свойства двулучепреломления - показатель преломления таких тканей зависит от направления колебаний падающего свет. Поляризованный свет, взаимодействующий с двулучепреломляющим объектом, меняет направление поляризации.

В организме человека присутствует более 40 генов коллагена, кодирующих различающиеся по составу белки, образующие исходные альфа-цепи. В зависимости от вида ткани молекулы коллагена представляют собой различные комбинации из этих типов цепей. Исколлагены принято называть типами. Отдельные типы коллагенов существенно различаются как по химизму, так и по структурным свойствам (толщина и длина фибрилл и волокон, упорядоченность волокон, наличие и характер поперечных связей между молекулами и т.п.). Различные ткани характеризуются преимущественным образованием того или иного типа коллагена, однако при развитии патологических процессов и последующей репарации может наблюдаться замена одного типа коллагена другим, сопровождающаяся и изменением оптических свойств. В частности, в соединительной ткани наиболее распространенным является высокоупорядоченный коллаген I типа. При развитии патологических процессов он может замещаться на слабо организованный коллаген III типа.

Волокна коллагена могут быть визуализированы с применением поляризационного контраста и без дополнительного окрашивания, однако использование специальных красителей позволяет существенно увеличить информативность метода. К таким специализированным красителям относится *пикросириус красный* (ПСК) (рис. 15).

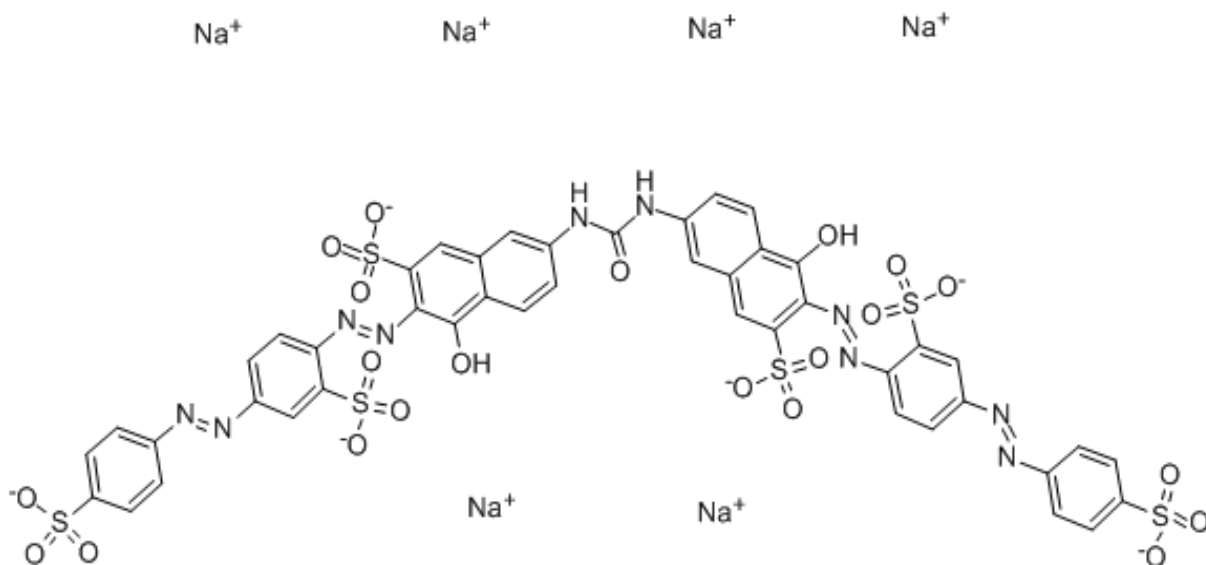


Рис. 15. Химическая формула красителя пикросириуса красного

Являясь сильным кислым красителем, ПСК реагирует через свои сульфидные группы с группами оснований, присутствующими в молекуле коллагена. Молекулы красителя встраиваются в коллаген на уровне его третичной структуры и придают красную окраску большинству тканей при наблюдении в проходящем белом свете. При этом длинные молекулы красителя располагаются параллельно молекулам коллагена, усиливая его двулучепреломляющие свойства. При наблюдении методом поляризационной микроскопии в скрещенных поляризаторах окрашенный ПСК организованный коллаген проявляется как яркие области. Спектр света при этом будет зависеть от типа коллагена. Его цвет будет темно-зеленым для тонких волокон (коллаген III типа, диаметр волокон 0,8 мкм) и желтовато-оранжевым для толстых волокон (коллаген I типа, диаметр волокон 1.6-2.4 мкм).

Для реализации метода поляризационного контраста микроскоп должен быть оборудован комплектом поляризационных фильтров. Один из фильтров устанавливается в конденсоре на пути светового потока от осветителя (рис. 11). Поляризационный фильтр в конденсоре снабжен устройством, позволяющим изменять угол поворота поляризатора. Второй поляризационный фильтр, часто называемый анализатором, вмонтирован в слайдер для установки дополнительных фильтров под турелью с объективами и вращающимся блоком фильтровых наборов.

## **Экспериментальная часть**

***Оборудование и материалы:** инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200, оснащенный цифровой камерой AxioCam MRc, подключенной к компьютеру; готовые гистологические препараты различных тканей человека, окрашенные пикросирусом красным.*

- Настроить микроскоп для работы в проходящем свете.
- Установить препарат на предметном столике микроскопа в препаратодержателе.
- Установить поляризатор в конденсоре. Для этого повернуть его до упора в соответствующее положение.
- Установить ручку, позволяющую изменять угол поворота поляризатора, в положение 0°.
- Выдвинуть на одну позицию слайдер с фильтрами, расположенный под блоком с фильтровыми наборами. При этом второй поляризатор окажется непосредственно под рабочим объективом.

- Увеличить напряжение на галогеновой лампе так, чтобы стали видны области, содержащие волокна соединительной ткани. Фон препарата должен оставаться черным. Случайный сдвиг/поворот поляризационного фильтра в держателе может привести к тому, что при описанных условиях фон препарата (за пределами объекта) останется светлым или не полностью черным. В этом случае необходимо добиться черного фона путем вращения ручки, изменяющей угол поворота поляризатора.

### **Задание 1**

- Получить изображение готового гистологического препарата с окраской пикросириусом красным в проходящем свете с увеличением 20х. На изображении выставить масштабную линейку, позволяющую оценить размеры объектов

- Получить изображение того же самого поля зрения методом поляризационного контраста.

- Сделать выводы о локализации коллагена в образце (эпителий, соединительная, мышечная ткань), его распространенности, пространственной организации и предположительной структуре (тип I, III).

### 3.4. Флуоресцентная микроскопия клеток. Применение красителей, специфичных к нуклеиновым кислотам

Одним из высокоинформативных подходов в исследовании биологических объектов, использующих специальные красители, является флуоресцентная микроскопия. С помощью *флуоресцентных меток* могут быть помечены целые клетки, субклеточные структуры, элементы межклеточного матрикса и т.д. Использование меток, конъюгированных с антителами или другими белками молекулами доставки, позволяет визуализировать локализацию определенных макромолекул как в единичных клетках, так и в образцах ткани (методы *in situ*). Информация, получаемая с использованием флуоресцентных красителей, гораздо шире, чем простое контрастирование образцов. Использование специальных техник окрашивания позволяет проводить функциональные тесты, определять физиологическое состояние клеток, оценивать особенности метаболизма ткани, экспрессии генов. *Флуоресцентные зонды*, характеристики свечения которых существенно зависят от окружения, применяются в качестве индикаторов состояния среды.

Устройство флуоресцентного микроскопа сложнее обычного микроскопа проходящего света (подробно описано в п. 2.4.). В используемом в работе микроскопе наборы фильтров и дихроичных зеркал для флуоресцентной микроскопии расположены в фильтровом блоке, расположенном под турелью с объективами (рис. 11).



Рис. 16. Фильтровый блок микроскопа Axiovert 200. Крышка блока снята, справа показан единичный фильтровый кубик



Возбуждение и последующая корректная регистрация флуоресценции объекта требует согласованного набора возбуждающего фильтра, дихроичного светоделителя и эмиссионного фильтра. Эти оптические элементы объединены вместе в фильтровом кубике, или фильтровом наборе. Фильтровые кубики вставляются в позиции поворотного блока, позволяющего при работе выставить на пути оптического излучения тот кубик, который необходим для решения конкретной исследовательской задачи (рис. 16).

Существует большое разнообразие фильтровых наборов/кубиков, каждый из которых позволяет работать с флуорофорами строго определенных оптических свойств. Выбор правильного фильтрового набора в соответствии со свойствами визуализируемого вещества является необходимым условием получения адекватных изображений.

Для выбора соответствующего поставленной задаче кубика необходимо знать его свойства, представляемые, как правило, в виде спектров пропускания всех входящих в набор элементов. Пример характеристики фильтрового набора, представляемой производителем, приведен на рисунке 17.

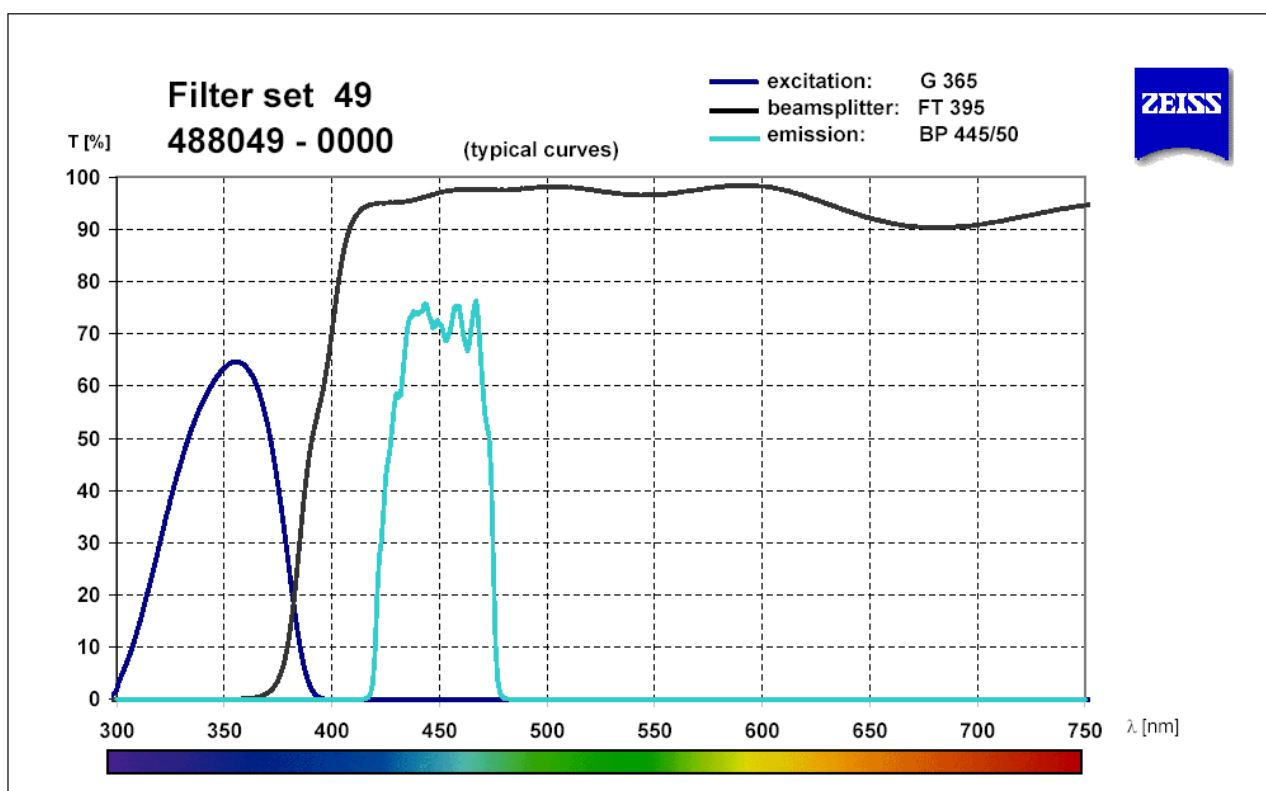


Рис. 17. Характеристика оптических свойств фильтрового набора на примере набора 49 производства Carl Zeiss

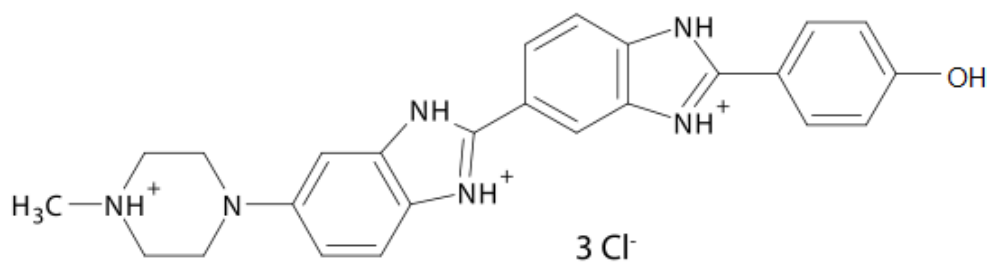
Спектр пропускания возбуждающего фильтра (excitation) должен обеспечивать выделение той области спектра, которая соответствует спектру возбуждения флуоресценции используемого флуорофора. Спектр эмиссионного фильтра (emission) определяет регистрируемое излучение флуоресценции. Свойства дихроичного светоделителя (beamsplitter) должны обеспечивать, с одной стороны, отражение возбуждающего излучения в сторону препарата (в этой области спектра пропускание светоделителя минимально и он ведет себя как зеркало), и, с другой стороны, пропускание флуоресцентного излучения (в этой области пропускание светоделителя максимально).

Свойства фильтров и светоделителя также могут быть выражены с помощью введенных обозначений, так в приведенном примере G 365 означает, что пропускание данного фильтра характеризуется гауссовой зависимостью с максимумом при 365 нм. ВР 445/50 соответствует полосе пропускания (от англ. band pass) с центральной длиной волны 445 нм и шириной полосы пропускания 50 нм. FT 395 – светоделитель (от нем. farb teiler) с малым пропусканием до 395 нм и большим пропусканием на длинах волн более 395 нм.

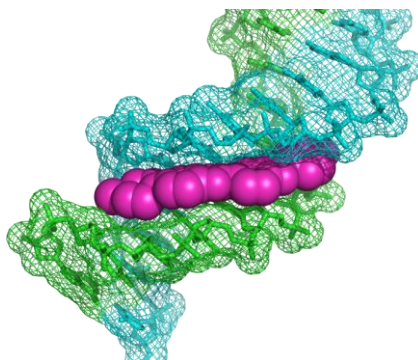
Особенности работы по методу флуоресцентной микроскопии могут быть рассмотрены на примере красителей, специфически связывающихся с нуклеиновыми кислотами.

*Hoechst 33258* является одним из самых распространенных красителей, избирательно связывающихся с ДНК. Это позволяет использовать его для контрастирования ядер про- и эукариотических клеток как в культуре, так и в образцах тканей, а также для контроля возможного бактериального или микроплазменного заражения при ведении клеточных культур. По своему химизму *Hoechst 33258* является производным бис-бензимидазола (фенол-4-[5-(4-метил-1-пиперазинил)][2,5'-бис-1Н-бензимидазол]-2'-ил]-, тригидрохлорид) (рис. 18).

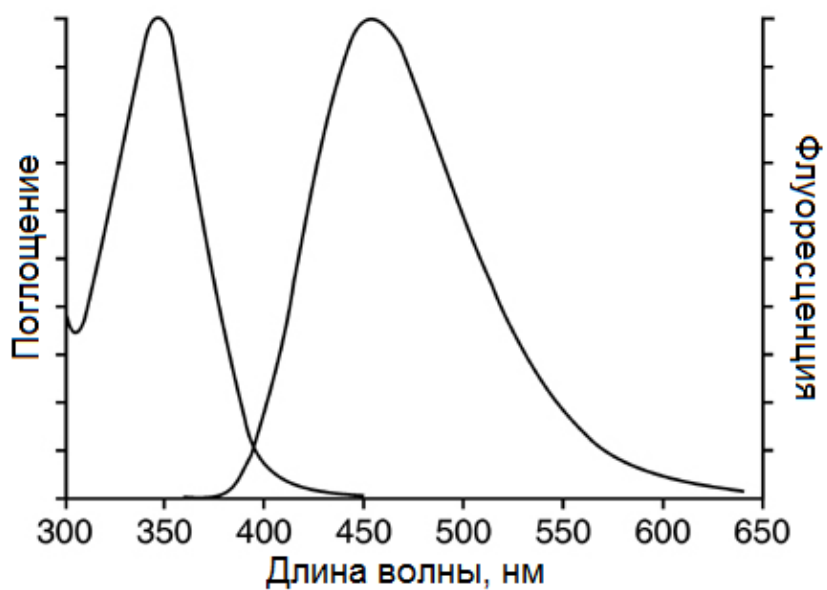
Механизм действия *Hoechst 33258* заключается в остаточном свободном проникновении молекул данного красителя через мембраны клеток и встраивании их вдоль малой бороздки двойной спирали ДНК. Связанные с ДНК молекулы красителя демонстрируют сильную флуоресценцию в синей области спектра при освещении УФ-светом (рис. 18), при этом в случае связывания с А-Т парами оснований флуоресценция существенно выше, чем в случае Г-Ц пар.



(a)



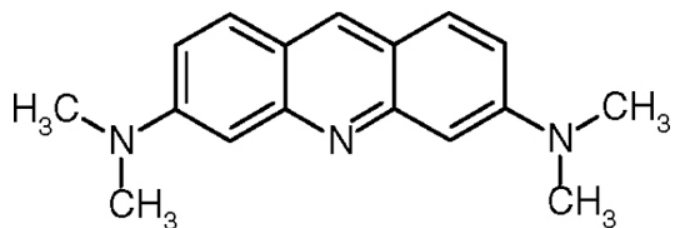
(б)



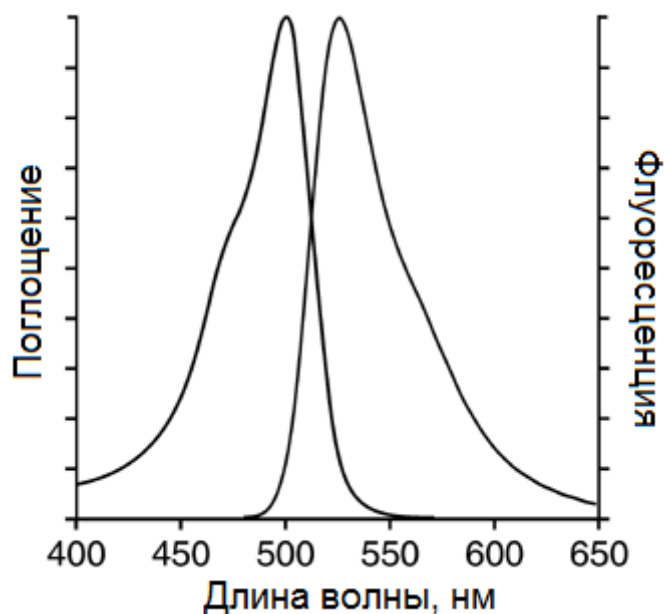
(в)

Рис. 18. Химическая формула красителя Hoechst 33258 (а), схема связывания молекулы красителя в малой бороздке двойной спирали ДНК (б) и спектры поглощения и флуоресценции связанного красителя (в)

Другим широко известным красителем, взаимодействующим с нуклеиновыми кислотами, является *акридиновый оранжевый* (3,6-акридиндиамин-N,N,N',N'-тетраметил) (рис. 19), катионный краситель, взаимодействующий как с ДНК так и с РНК по механизму интеркаляции (встраивания между азотистыми основаниями) или электростатического взаимодействия.



(а)



(б)

Рис. 19. Химическая формула красителя акридиновый оранжевый (а) и спектры поглощения и флуоресценции комплекса красителя с двухцепочечной ДНК (б)

Акридиновый оранжевый является *метахроматичным* красителем – при обработке акридиновым оранжевым препаратов возникает красная и зеленая флуоресценция различных клеточных структур. Это обусловлено существованием двух форм красителя с разными спектрами поглощения и флуоресценции. Для комплексов мономеров красителя с двухспиральной нуклеиновой кислотой (ДНК, двухспиральная РНК некоторых вирусов и

двухспиральные участки клеточной РНК) характерна зеленая флуоресценция (530 нм при возбуждении на 500 нм), в то время как комплексы димеров красителя с односпиральными нуклеиновыми кислотами (РНК, односпиральные ДНК некоторых вирусов и бактериофагов, деполимеризованная ДНК) флуоресцируют в красной области спектра (650 нм при возбуждении на 460 нм). На метакроматичности акридинового оранжевого основаны методы определения соотношения в клетке разных форм нуклеиновых кислот.

*Пропидиум йодид* (фенантридин-3,8-диамино-5-[3-(диэтилметиламмоний) пропил]-6-фенил-дийодид) – интеркалирующий краситель, связывающийся преимущественно с ДНК (рис. 20). В меньшей степени связывание наблюдается и с РНК.

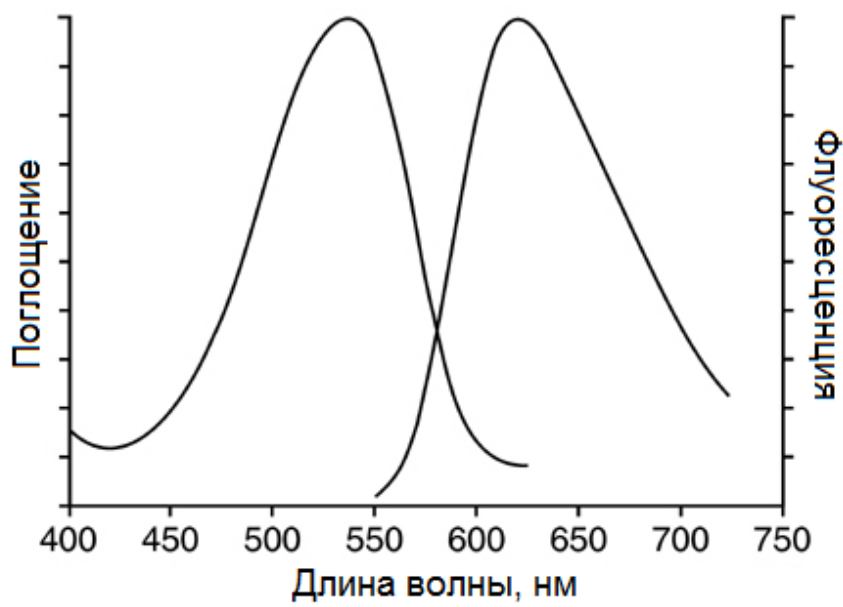
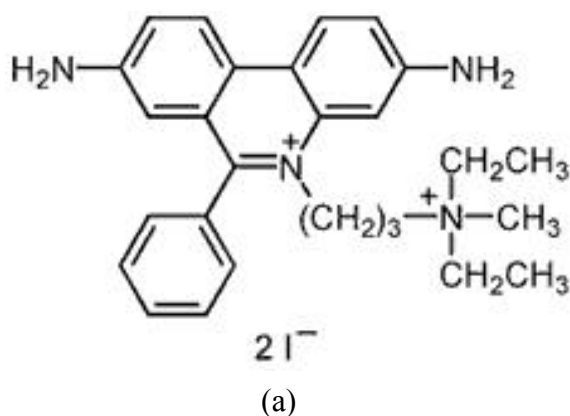


Рис. 20. Химическая формула пропидиум йодида (а) и спектры поглощения и флуоресценции красителя, связанного с ДНК (б)

Одно из наиболее распространенных применений пропидиума йодида связано с оценкой жизнеспособности клеток в культуре. В отличие от описанных выше красителей, пропидиум йодид не проникает через неповрежденную мембрану живых клеток. Поэтому внесение его в среду приводит к окрашиванию только мертвых клеток и клеток, находящихся на поздних стадиях апоптоза. При освещении зеленым светом краситель, связанный с ДНК, флуоресцирует в красной области спектра.

## Экспериментальная часть

**Оборудование и материалы:** инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200, оснащенный цифровой камерой AxioCam MRc, подключенной к компьютеру; 12-луночный планшет с культивируемыми клетками яичника китайского хомячка СНО (24-часовая культура, часть лунок обработана цитотоксическим агентом); автоматические дозаторы переменного объема на 20-200 мкл и 1-5 мл со сменными одноразовыми наконечниками; полипропиленовые пробирки объемом 15 мл с крышками; стоковый раствор красителя Hoechst 33258 (1 мг/мл); стоковый раствор акридинового оранжевого (5 мг/мл); стоковый раствор пропидиум йодида (2 мг/мл); среда для культивирования клеток; фосфатный буфер (PBS); емкость для сбора отработанных реактивов и использованных наконечников.

### Процедура окраски клеток красителями Hoechst 33258 и акридиновый оранжевый

Использование соединений с разными спектральными свойствами позволяет проводить одновременную окраску клеток разными красителями, получать изображения одного и того же поля зрения при разных настройках оптической системы микроскопа и объединять/сравнивать получаемую при этом информацию.

- Рассчитать разведения для приготовления однократных (рабочих) и двукратных растворов красителей из исходных стоковых растворов (рабочие растворы – 50 нг/мл для Hoechst 33258 и 5 мкг/мл для акридинового оранжевого).

- Приготовить двукратные растворы красителей на основе стандартной среды для культивирования клеток с учетом необходимого для работы итогового объема.

- Приготовить раствор для окраски клеток, смешав растворы красителей в соотношении 1×1.

- Отобрать среду из окрашиваемой лунки и залить лунку 2 мл раствора для окраски. Оставить клетки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на 20-30 минут.

- По окончании инкубации отобрать из лунки раствор для окрашивания, дважды промыть PBS.

### Процедура окраски клеток пропидиум йодидом

Особенностью работы с данным красителем является необходимость строгого соблюдения времени инкубации (в противном случае при излишне длительной экспозиции краситель оказывает негативное воздействие на жизнеспособность клеток и проникает в исходно живые клетки, что сказывается на результатах эксперимента) и наблюдение результатов окрашивания без отмывки от среды с красителем.

- Рассчитать разведение для приготовления однократного рабочего раствора красителя (2 мкг/мл) из исходного стокового раствора.

- Приготовить рабочий раствор красителя на основе стандартной среды для культивирования клеток с учетом необходимого для работы итогового объема.

- Отобрать среду из окрашиваемой лунки и залить лунку 2 мл раствора для окраски. Оставить клетки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на 15 минут. Инкубация с пропидиумом йодидом должна проводиться в темноте.

- По окончании инкубации как можно быстрее провести микроскопическое исследование и проанализировать результаты.

### Процедура получения флуоресцентных изображений

- Перед началом работы включить блок питания ртутной лампы. Время выхода лампы в рабочий режим составляет не менее 10 минут.

- Настроить микроскоп для работы в проходящем свете по методу фазового контраста, установить планшет, настроиться на исследуемой лунке, добившись четкого изображения клеток.

- Выключить галогеновую лампу соответствующей кнопкой справа на станине микроскопа (рис. 11).

- Перевести поворотную часть блока с фильтрами, находящегося под турелью объективов, в положение, соответствующее необходимому для работы фильтровому набору/кубику (рис. 11).

- Убрать заслонку ртутной лампы нажатием соответствующей кнопки справа на станине микроскопа (рис. 11).

- Настроить экспозицию, обеспечивающую адекватную визуализацию объекта. Поскольку регистрация флуоресценции, как правило, требует существенно больших экспозиций камеры по сравнению с режимом работы в проходящем свете, оптимальным является использование опции Measure на закладке Adjust Рабочей области с последующей ручной подстройкой.

- Отрегулировать четкость изображения с помощью микровинта.

При работе по методу флуоресцентной микроскопии необходимо помнить о том, что большинство используемых красителей очень быстро выгорают под действием света. Качество (уровень сигнала, контрастность) изображения зависят от скорости работы исследователя. По-возможности, осуществляйте все настройки микроскопа при закрытой заслонке ртутной лампы и включайте её непосредственно перед наблюдением объекта и фиксацией изображения, а после получения кадра сразу закрывайте заслонку.

### *Задание 1*

- Настроить микроскоп для работы в проходящем свете по методу фазового контраста. Получить изображения клеток в лунках планшета с использованием объектива с увеличением 20×.

- Проанализировав паспорта фильтровых наборов и спектры поглощения и флуоресценции используемых в работе химических соединений, подобрать подходящий фильтровый набор для Hoechst 333258 и акридинового оранжевого. С помощью лаборанта уточнить позиции необходимых фильтровых наборов в блоке микроскопа.

- Провести процедуру окраски клеток красителями Hoechst 33258 и акридиновый оранжевый в нескольких лунках планшета.

- Получить изображения клеток в лунках планшета по методу флуоресцентной микроскопии с увеличением 40×. Для визуализации использовать выбранные фильтровые наборы. На одном и том же поле зрения получить изображения: в проходящем свете, в режиме регистрации флуоресценции Hoechst 333258, в режиме регистрации флуоресценции комплексов акридинового оранжевого с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами, в режиме регистрации флуоресценции комплексов акридинового оранжевого с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами.

- Сравнив полученные изображения, сделать вывод об информативности метода, локализации в клетках ДНК, одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот.



## *Задание 2*

- Проанализировав паспорта фильтровых наборов и спектры поглощения и флуоресценции пропидиум йодида, подобрать подходящий фильтровый набор для его визуализации. С помощью лаборанта уточнить позицию необходимого фильтрового набора в блоке микроскопа.

- Провести процедуру окраски клеток пропидиум йодидом в лунках планшета (по 3 лунки), обработанных и необработанных цитотоксическим агентом.

- Получить изображения клеток в лунках планшета по методу флуоресцентной микроскопии с увеличением 20×. На одном и том же поле зрения получить изображения: в проходящем свете, в режиме регистрации флуоресценции пропидиум йодида, связанного с ДНК.

- Получить пары изображений для 10 полей зрения в каждом варианте (наличие/отсутствие обработки цитотоксическим агентом). Рассчитать средние доли живых и мертвых клеток для анализируемых вариантов, стандартное отклонение. Провести сравнение и сделать вывод о влиянии цитотоксического агента, используя статистический критерий для сравнения долей.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Принцип работы оптического микроскопа.
2. Принципиальные схемы двухлинзового и трехлинзового микроскопов.
3. Принципы освещения по Кёлеру.
4. Дифракционное ограничение разрешения оптического микроскопа.
5. Разрешение микроскопа при работе в проходящем и отраженном свете. Пути увеличения разрешения.
6. Принцип метода темного поля. Техническая реализация.
7. Принцип метода фазового контраста, требования к объекту исследования. Особенности устройства конденсора и объективов.
8. Поляризационная микроскопия: принцип метода, особенности оборудования микроскопа, исследуемые объекты.
9. Эндогенные и экзогенные флуорофоры. Флуоресцентные метки и зонды.
10. Принципиальная схема флуоресцентного микроскопа. Фильтры, светоделители. Паспорт фильтрового набора.
11. Специфичные красители для нуклеиновых кислот. Механизмы действия, получаемая информация.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Капитца Х.Г. Первые шаги в микроскопии. – Германия, Йена: Изд-во Карл Цейс, 1997. – 44 с.
2. Вегерхофф Р., Вайдлих О., Кассенс М. Основы световой микроскопии и формирования изображения. – Германия, Вайнхайм: Изд-во GIT VERLAG GmbH & Co.KG, 2005. – 52 с.
3. Бутиков Е.И. Оптика. – М.: Высшая школа, 1986. – 512 стр.
4. Световая микроскопия в биологии. Методы: Пер. с англ. / ред. А. Лейси. – М.: Мир, 1992. – 464 с.
5. Davidson M.W., Abramowitz M. Optical microscopy [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Graphics & Web Programming Team in collaboration with Optical Microscopy at the National High Magnetic Field Laboratory, 1999. – Режим доступа: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/pdfs/microscopy.pdf>, свободный.
6. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. - Пушкино: Электронное издательство «Аналитическая микроскопия», 2002. – Режим доступа: [http://labx.narod.ru/BOOKS\\_FILES\\_PDF/luminescent\\_analysis\\_cells.pdf](http://labx.narod.ru/BOOKS_FILES_PDF/luminescent_analysis_cells.pdf), свободный
7. Handbook of Biological Confocal Microscopy / ed. J.B. Pawley/ – New York: Springer Science + Business Media, LLC, 2006. – 985 p..
8. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии. – Санкт-Петербург: Изд-во Политехнического университета, 2007. – 77 стр.

Теоретические сведения о принципах работы и устройстве оптических микроскопов, информация о технических характеристиках, примеры получаемых изображений приводятся на сайтах крупнейших производителей микроскопической техники.

9. [http://microscopy.zeiss.com/microscopy/en\\_de/home.html](http://microscopy.zeiss.com/microscopy/en_de/home.html)
10. <http://www.olympusmicro.com/>
11. <http://www.microscopyu.com>

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Погрешности изображения и их коррекция

Изображение, получаемое с помощью отдельной линзы, не является совершенным - оно обладает рядом дефектов, возникающих вследствие взаимодействия света со стеклом линзы и ухудшающим качество получаемого изображения. Все aberrации можно разделить на хроматические и геометрические (или монохроматические). Среди геометрических aberrаций наибольшее значение имеют сферическая aberrация и кривизна поля изображения.

*Хроматическая aberrация* связана с различием показателей преломления материала линзы для света с разной длиной волны. При прохождении белого света через линзу составляющие его компоненты преломляются по-разному (рис. П1-1), что, в конечном итоге, приводит к появлению цветных ореолов вокруг наблюдаемой точки объекта. Для коррекции хроматической aberrации в настоящее время вместо единичных линз используются дублеты из линз, изготовленных из стекол с разными свойствами.

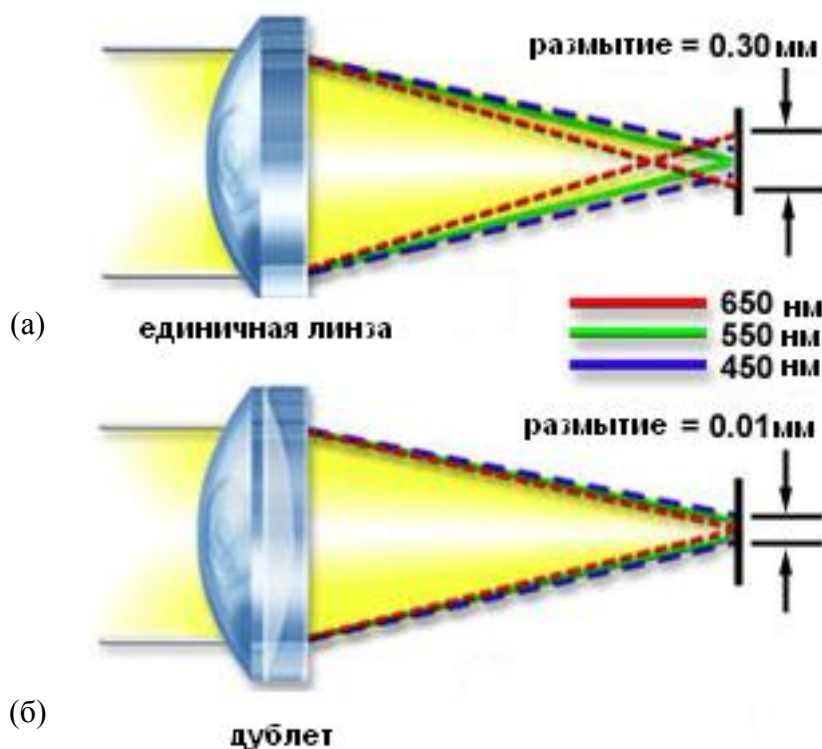


Рис. П1-1. Возникновение хроматической aberrации на единичной линзе (а) и её коррекция с помощью дублета линз (б)

*Сферическая aberrация* связана с тем, что лучи проходящие через периферическую часть линзы преломляются сильнее, чем приосевые лучи и

лучи, проходящие через центр линзы. В результате периферические лучи фокусируются в другой фокальной точке вдоль оптической оси (рис. П1-2). Результатом сферической aberrации становится сильное размытие изображения.

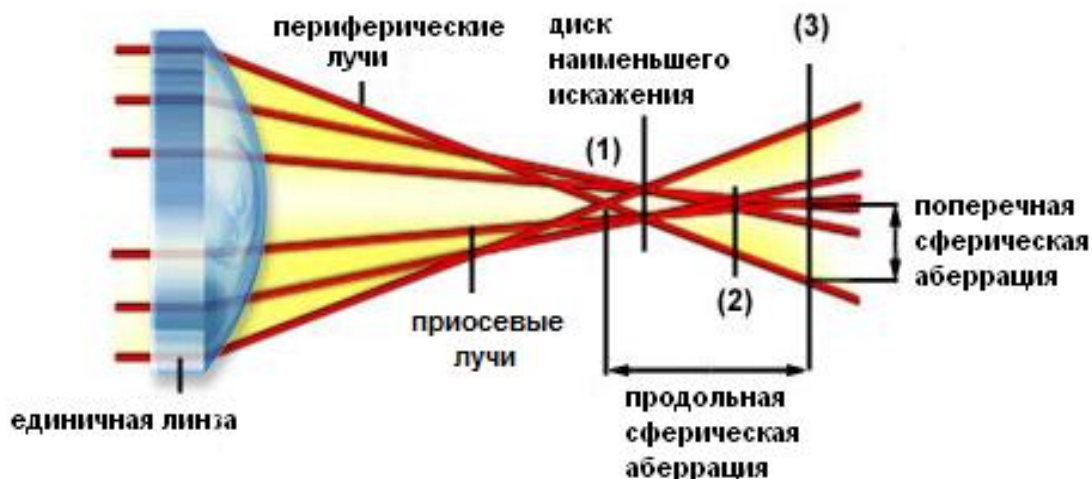


Рис. П1-2. Возникновение продольной и поперечной сферической aberrации. (1), (2), (3) – фокальные плоскости для лучей, прошедших через разные участки линзы

Сферическая aberrация устраняется путем подбора комбинации линз с различной кривизной поверхности. Для большинства современных объективов характерно исправление сферической aberrации. Тем не менее, при работе с объективами с большими числовыми апертурами и большими увеличениями она может существенно снизить качество изображения. Адекватная коррекция сферической aberrации возможна только для стандартных условий: установленной толщины покровного стекла на препарате и соответствующей объективу иммерсионной среды. Устройство некоторых воздушных высокоапертурных объективов включает специальную линзу с настраиваемым положением, что обеспечивает подстройку объектива для работы с покровными стеклами разной толщины (см. Приложение 2). Только выполнение такой корректировки обеспечит получение качественных изображений без сферических aberrаций.

*Кривизна поля изображения* выражается в невозможности одновременно сфокусировать центральный и периферический участки поля зрения. Это связано с тем, что единичная линза фокусирует изображение точек плоского объекта не на плоскости, а на сферической поверхности, кривизна которой зависит от радиуса линзы (рис. П1-3).

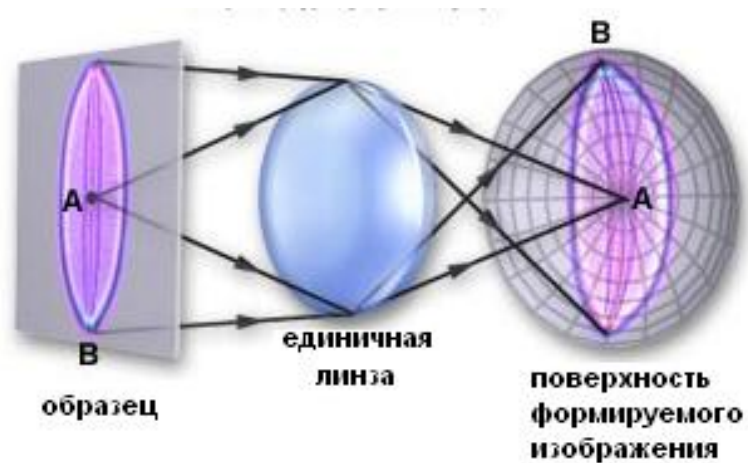


Рис. П1-3. Кривизна поля изображения, получаемого при использовании единичной линзы

Следствием кривизны поля изображения является невозможность сфокусироваться одновременно на центральной и периферических частях объекта. Коррекция кривизны поля изображения также производится за счет использования дополнительных оптических элементов в составе современных объективов микроскопов.

## Классификация и маркировка объективов

Различные объективы отличаются по степени коррекции аберраций. Для большинства современных объективов характерно исправление *сферической аберрации*. *Кривизна поля изображения* в наибольшей степени скомпенсирована для *план-объективов (Plan)*, дающих максимально плоское изображение. По степени скомпенсированности *хроматической аберрации* объективы подразделяются на *монохроматы (Monochromat* – для одной длины волны или узкой полосы спектра), *ахроматы (Achromat* – основная и две дополнительных длин волны) и *апохроматы (Apochromat* – основная и три дополнительных длины волны).

Кроме степени коррекции световых аберраций, объективы могут классифицироваться на объективы проходящего и отраженного света. Объективы проходящего света рассчитаны на постоянное применение покровных стекол (0,17 мм). Объективы отраженного света – с приставкой «*Eri*» - имеют просветляющее покрытие для предотвращения бликов.

Предназначенные для работы с флуоресценцией объективы изготавливаются с применением специальных стекол с очень высоким коэффициентом пропускания в ближней ультрафиолетовой области. В название таких объективов включается слово «*Fluar*».

На каждом объективе нанесена маркировка, указывающая класс объектива, увеличение, числовую апертуру и тип иммерсионной среды, типы используемых контрастов (например, фазовый контраст), возможность корректировки с учетом толщины покровного стекла, тип оптики (оптика «на бесконечность») и другая необходимая информация. Пример такой маркировки приведен на рисунке П2-1.

В приведенном примере: объектив Achromplan с высоко скомпенсированной кривизной поля (*-plan*) и компенсацией хроматической аберрации для трех длин волн (*Achro-*), увеличением 50×, числовой апертурой 0,90, предназначенный для работы с масляной иммерсией ( $n=1,52$ ) и оптикой «на бесконечность». Данный объектив может работать с покровными стеклами разной толщины, но не имеет дополнительной корректировки. Кроме этого, он не подходит для работы по методу фазового контраста или темного поля, не имеет специальных покрытий для работы в отраженном свете и ограниченно пропускает свет ближней УФ-области.

Маркировка объективов разных производителей может различаться. Производители объективов предоставляют подробную информацию о них на сайтах или в информационных буклетах.



Рис. П2-1. Маркировка объективов производства Carl Zeiss



### Особенности работы на микроскопе, оснащённом цифровой камерой

Многие современные микроскопы оснащены цифровой камерой для фиксации изображений, получаемых с помощью микроскопа. При работе таких камер исходное оптическое изображение делится с помощью светочувствительной матрицы на отдельные пиксели (*цифровая дискретизация*), размер которых определяет *пространственное разрешение* цифрового изображения. Кроме этого, сигнал, получаемый от каждого пикселя преобразуется в значения яркости (*квантизация пикселей*). Квантизация пикселей зависит от динамического диапазона преобразующей системы и определяет количество уровней серого и диапазон значений цвета (в случае цветного изображения) и, таким образом, обуславливает *цветовое разрешение*.

Чтобы предотвратить потерю информации, цифровое пространственное разрешение должно равняться оптическому, т.е. разрешающей способности микроскопа, или превышать его. В оптимальном случае цифровое пространственное разрешение составляет 2-3 пикселя на предельно разрешаемый объективом элемент образца (критерий Найквиста). Достаточно легко рассчитать, какое разрешение камеры необходимо для оптимальной передачи деталей изображения, полученного с помощью того или иного объектива. Согласно критерию Найквиста:

$$R \cdot M = 2 \cdot \text{размер пикселя},$$

где  $R$  – разрешение объектива,  $M$  – оптическое увеличение (рассчитывается путем умножения значения увеличения объектива на значение увеличения адаптера камеры), 2 – количество пикселей камеры на элемент образца.

Для показанного на рисунке П-4 объектива числовая апертура составляет 0,9. Для зеленого света (550 нм) при работе в отраженном свете:

$$R = 0,61 \cdot \lambda / NA_{\text{obj}} = 0,373 \text{ мкм}.$$

Предположим, что увеличение адаптера камеры составляет  $1\times$ , тогда для указанного объектива  $M = 50\times$ . Размер изображения минимального разрешенного объективом элемента образца на матрице камеры составит:

$$R \cdot M = 0,373 \cdot 50 = 18,65 \text{ мкм}.$$

С учетом критерия Найквиста этот размер должен соответствовать двум-трем пикселям камеры, т.е. размер пикселя камеры не должен превышать 9,3 мкм. Информацию о размере пикселей камеры можно получить на сайте производителя или в сопровождающей технической документации. Для примера, размер пикселя камеры AxioCam MRc составляет  $6,45 \text{ мкм} \times 6,45 \text{ мкм}$ .

