

# Mikroskop optyczny i fluorescencyjny

1

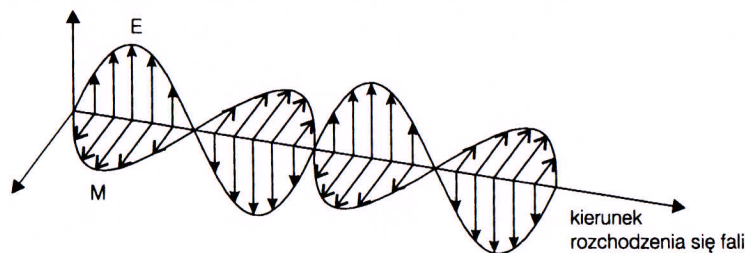
## Podstawy optyki

### 1.1. Właściwości falowe światła

Światło jest niosącą energię falą, złożoną z pól: elektrycznego i magnetycznego. Fale świetlne stanowią niewielki fragment widma promieniowania elektromagnetycznego w przedziale częstotliwości między  $4,3 \cdot 10^{14}$  a  $7 \cdot 10^{14}$  drgań na sekundę. Największą częstotliwość rejestrowaną przez oko ludzkie ma światło fioletowe, natomiast najmniejszą czerwone. Długości fal odpowiadające temu zakresowi barw zawierają się w przedziale 400–750 nm. Fale świetlne rozchodzą się w próżni ze stałą prędkością  $c$ , równą  $3 \cdot 10^8$  m/s. Wektory drgań natężenia pola elektrycznego – E, leżą w płaszczyźnie prostopadłej względem płaszczyzny wyznaczonej przez wektory natężenia pola magnetycznego – M (ryc. 1). Wektory drgań E i M mają kierunki prostopadłe do kierunku wektora prędkości rozchodzenia się fali, a zatem fala świetlna jest falą poprzeczną.

Pole magnetyczne nie działa na oko ludzkie, w związku z tym można w uproszczeniu traktować światło jako wektor drgań natężenia pola elektrycznego. Dlatego dalsze rozważania będą dotyczyły tylko składowej elektrycznej fali elektromagnetycznej.

Powstawanie światła jest związane z przeskokami elektronów w atomie z wyższego poziomu energetycznego na niższy. Przeskokowi elektronu na niższy poziom ener-



Ryc. 1. Wzajemnie prostopadle ułożenie wektorów drgań natężenia pola elektrycznego (E) i magnetycznego (M) fali elektromagnetycznej. Wektory mają kierunek prostopadły do kierunku rozchodzenia się fali

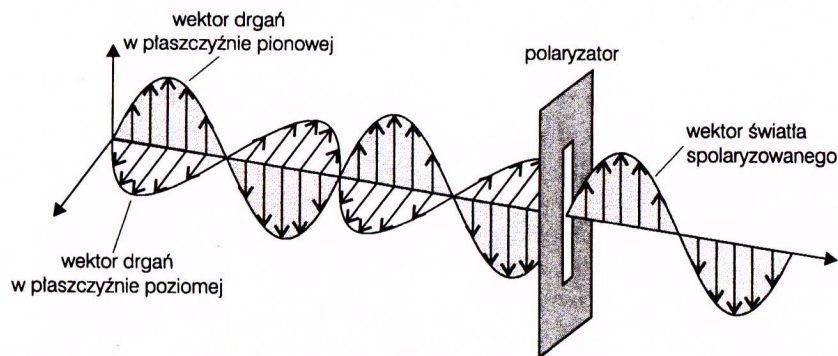
tyczny towarzyszy emisja impulsu fali elektromagnetycznej, zwanego fotonem. Foton, czyli kwant światła, stanowi porcję promieniowania elektromagnetycznego, którego energia jest proporcjonalna do częstotliwości promieniowania ( $E \sim \nu$ , ponieważ  $E = h\nu$ ,  $E$  – energia kwantu światła,  $h$  – stała Plancka,  $\nu$  – częstotliwość fali świetlnej).

Na obecnym poziomie wiedzy uważa się, że światło ma naturę dwoistą: falową i korpuskularną (kwantową). W niektórych zjawiskach ujawnia swą naturę falową (dyfrakcja, interferencja, dyspersja, polaryzacja, załamanie i odbicie światła), natomiast w innych korpuskularną (zewnętrzny efekt fotoelektryczny).

## 1.2. Polaryzacja światła

Wektory drgań natężenia pola elektrycznego ( $E$ ) i magnetycznego ( $M$ ) fal świetlnych leżą w różnych płaszczyznach, ale pozostają stale pod kątem prostym względem siebie oraz względem kierunku rozchodzenia się fal. Liczba możliwych płaszczyzn drgań jest nieograniczona. Jeżeli żaden kierunek drgań nie jest wyróżniony, to fala jest niespolaryzowana. Jednak fale świetlne są falami poprzecznymi i jako takie mogą zostać spolaryzowane. Jeśli wektory drgań  $E$  leżą tylko w jednej płaszczyźnie (i towarzyszą im wektory drgań  $M$  wtedy także w jednej płaszczyźnie, prostopadłej do płaszczyzny wektorów drgań  $E$ ), to fala taka jest spolaryzowana liniowo (ryc. 2). Za płaszczyznę polaryzacji przyjmuje się płaszczyznę wektora drgań  $E$ .

Polaryzację światła można uzyskać, przepuszczając fale świetlne przez polaryzator. Po przejściu przez polaryzator następuje uporządkowanie kierunków wektorów drgań  $E$  i zachodzą one już tylko w jednej płaszczyźnie.



Ryc. 2. Polaryzacja światła. W świetle niespolaryzowanym liczba możliwych płaszczyzn wektora drgań pola elektrycznego jest nieograniczona (dla uproszczenia przedstawiono tylko dwie płaszczyzny drgań wektorów natężenia pola elektrycznego: poziomą i pionową). Po przejściu przez polaryzator drgania zachodzą tylko w jednej płaszczyźnie – tu pionowej

## 1.3. Rozszczepienie światła

Rozszczepienie światła, czyli dyspersja, następuje podczas przechodzenia światła złożonego przez ośrodki materialne (ośrodki przezroczyste). Przykładem światła złożonego jest światło białe, które przechodząc z jednego ośrodka do drugiego, o innym współczyn-

niku za  
tylko w  
się z je  
częstotl  
świetlne  
im mniej  
nicę pr  
nika zał  
nej) pr  
załamar  
czerwor

Wsp  
a) dla d  
nia ( $\beta$ ) i  
prędkoś  
ta prost

Stał  
załaman

Pod  
nego mi

białego j  
ka poszc

takiej, n  
światła n

się z wie  
czyną ab

gować, s  
kach zał

usunięci  
jącej i dr

leżać się  
uzyskać

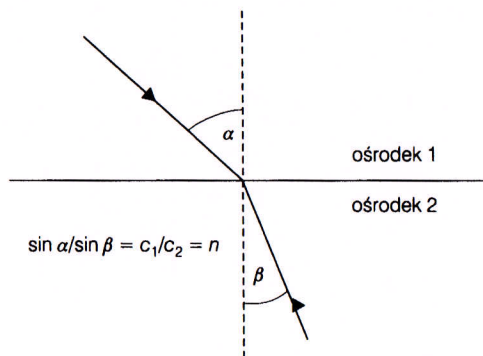
Ryc. 3. W  
większy od  
w ośrodku  
w ośrodku d

niku załamania, ulega rozszczepieniu na barwy składowe. Dzieje się tak dlatego, że tylko w próżni fale o różnych długościach (którym odpowiadają różne barwy) poruszają się z jednakową prędkością  $c$  (w próżni prędkość rozchodzenia się fali nie zależy od jej częstotliwości). Natomiast w ośrodkach materialnych prędkość rozchodzenia się fali świetlnej zależy od jej długości (a tym samym od częstotliwości) w ten sposób, że im mniejsza jest długość fali tym wolniej porusza się ona w ośrodku materialnym. Różnicę prędkości fali świetlnej w ośrodku i próżni wyraża się za pomocą współczynnika załamania  $n$ . Współczynnik ten zależy od barwy światła (czyli od długości fali świetlnej) przechodzącego przez ośrodek: wraz ze wzrostem długości fali współczynnik załamania maleje. Ciała bezbarwne najsilniej załamują światło fioletowe, a najslabiej – czerwone.

Współczynnik załamania ( $n$ ) jest zdefiniowany przez prawo załamania, które mówi: a) dla danych dwóch ośrodków stosunek sinusa kąta padania ( $\alpha$ ) do sinusa kąta załamania ( $\beta$ ) równa się stosunkowi prędkości rozchodzenia się fali w ośrodku pierwszym do prędkości rozchodzenia się fali w ośrodku drugim; b) kąt padania, kąt załamania i prosta prostopadła do powierzchni granicznej leżą w jednej płaszczyźnie (ryc. 3).

Stała wartość  $n$  dla danych dwóch ośrodków i danego rodzaju fali to współczynnik załamania ośrodka drugiego względem pierwszego.

Podczas przechodzenia światła przez soczewki, wchodzące w skład układu optycznego mikroskopu, również zachodzi zjawisko rozszczepienia światła. Wiązka światła białego padająca na soczewkę obiektywu rozszczepia się na barwy podstawowe. Ogniska poszczególnych barw znajdują się w nieco innym miejscu osi optycznej. W soczewce takiej, na przykład, ognisko promieni czerwonych nie pokrywa się z ogniskiem dla światła niebieskiego. Obraz, który powstaje po przejściu światła przez soczewkę składa się z wielu obrazów barwnych, które się ze sobą nie pokrywają. To zjawisko jest przyczyną aberracji chromatycznej. W obiektywach mikroskopowych można tę wadę skorygować, stosując układ soczewek wypukłych i wklęsłych o odpowiednich współczynnikach załamania światła i wykonanych z odpowiednich materiałów. Najprostszy sposób usunięcia aberracji chromatycznej to zastosowanie dwóch soczewek, pierwszej skupiającej i drugiej rozpraszającej. Dzięki temu ogniska poszczególnych barw powinny znaleźć się w tym samym miejscu. W praktyce korekcję aberracji chromatycznej można uzyskać tylko dla niektórych barw. W obiektywach achromatycznych korekcja odnosi



Ryc. 3. W przypadku załamania fal kąt padania  $\alpha$  jest większy od kąta załamania  $\beta$ , jeżeli prędkość fali  $c_1$  w ośrodku pierwszym (1) jest większa od prędkości  $c_2$  w ośrodku drugim (2)

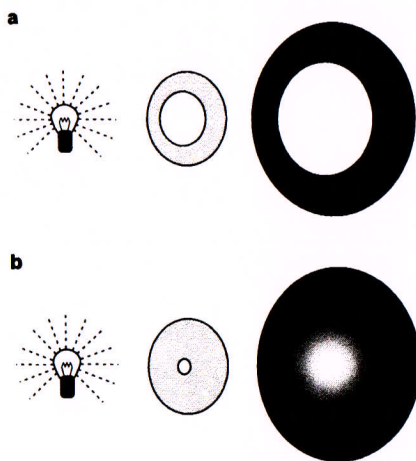
się do światła niebieskiego i czerwonego. Lepszymi parametrami charakteryzują się obiektywy apochromatyczne, w których korekcja odnosi się do trzech barw: żółtej, czerwonej i niebieskiej.

## 1.4. Dyfrakcja i interferencja

Falowa natura światła ujawnia się podczas przechodzenia światła przez niewielkie szczeliny, otwory lub jeśli światło natrafia na przeszkodę. Gdy światło pada na przeszkodę, część fali zostaje pochłonięta lub odbita, natomiast część przechodzi przez otwór w przeszkodzie (ryc. 4). Jeśli otwór jest odpowiednio duży w porównaniu z długością fali, to przechodzące promienie świetlne w zasadzie rozchodzą się prostoliniowo. W tym przypadku na ekranie powstaje cień, a granica między jasną i ciemną częścią obrazu jest wyraźnie widoczna (ryc. 4a). Kiedy promienie świetlne przechodzą przez wąską szczelinę (szerokość szczeliny jest tego samego rzędu wielkości co długość fali), uginają się i wiązka światła się rozszerza. Wskutek tego ostra granica między jasnym i ciemnym obszarem obrazu ulega rozmyciu (ryc. 4b). Światło rozprzestrzenia się dając jasne koło, które łagodnie przechodzi w obszar ciemny. W ten sposób światło ulega ugięciu. Stopień ugięcia zależy od długości fali padającego światła w stosunku do rozmiarów przeszkody.

**Ugięcie fal** świetlnych nie jest zjawiskiem pożądanym, gdy chcemy oglądać małe obiekty w mikroskopie. Jeśli obiekt jest znacząco większy od długości fali, ugięcie jest stosunkowo słabe. Natomiast gdy wielkości obiektów są rzędu długości fali padającego na nie światła, wtedy rozróżnienie szczegółów ich budowy staje się trudniejsze z powodu rozmywania się ich brzegów. Jeżeli zaś obiekty są mniejsze od długości fali padającego światła, to nie można w obiekcie dostrzec żadnych szczegółów.

**Interferencja fal** świetlnych (nakładanie się fal o tej samej częstotliwości) powoduje ich sumowanie. W wyniku tego następuje wzmocnienie fal w pewnych punktach przestrzeni (ryc. 5a) oraz osłabienie, bądź wygaszenie, w innych (ryc. 5b).



**Ryc. 4.** Ugięcie światła podczas przechodzenia przez otwór: duży (a) i mały (b) w porównaniu z długością fali światła. W pierwszym przypadku powstaje wyraźny cień z niewielkim rozmyciem na brzegach. W drugim przypadku ugięcie światła jest wyraźnie widoczne, brzegi powstającego cienia są bardziej rozmyte (Hewitt, 2003; zmienione)

Energia mian. Jeśli d (ryc. 5a). W albo maleje. światlne, do fazach i jedr o dwukrotni ści fali (fazy że mają jedr jest tylko czę Interferc źródeł promi

**Ryc. 5.** Interferencje o pół długości dochodzą do punk się w tym samym

teryzują się  
żółtej, czer-

z niewielkie  
nda na prze-  
chodzi przez  
porównaniu  
się prostoli-  
nną i ciemną  
przechodzą  
ci co długość  
a między jas-  
estrzenia się  
osób światło  
stosunku do

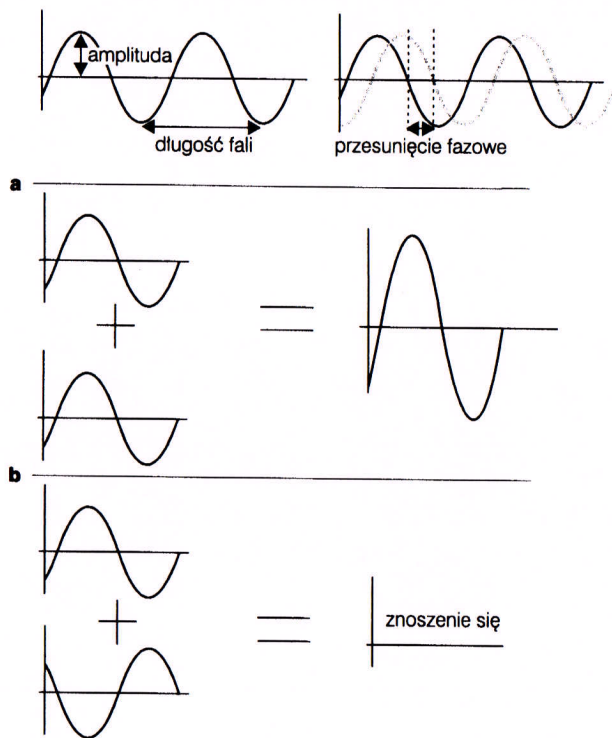
glądać małe  
, ugięcie jest  
i padającego  
trudniejsze  
długości fali

wości) powo-  
ch punktach

przez otwór: duży  
tła. W pierwszym  
zmyciem na brze-  
rażnie widoczne,  
ie (Hewitt, 2003;

Energia elektryczna fali świetlnej w ustalonym punkcie rośnie i maleje na prze-  
mian. Jeśli drgania dwóch fal przebiegają zgodnie, mówimy, że fale są zgodne w fazie  
(ryc. 5a). W tej sytuacji w każdym punkcie energia elektryczna fal jednocześnie rośnie  
albo maleje. Gdy w ustalonym punkcie przestrzeni pojawią się jednocześnie dwie fale  
świetlne, dodają się na zasadzie superpozycji. Dodawanie się dwóch fal o zgodnych  
fazach i jednakowej amplitudzie daje falę wypadkową o tej samej częstotliwości, ale  
o dwukrotnie większej amplitudzie (ryc. 5a). Jeżeli zaś fale są przesunięte o pół długo-  
ści fali (fazy przeciwne), to następuje ich całkowite znoszenie (oczywiście jeśli założyc,  
że mają jednakową amplitudę; ryc. 5b). W przypadku innego przesunięcia znoszenie  
jest tylko częściowe.

Interferować mogą tylko fale spójne (koherentne), tzn. pochodzące z identycznych  
źródeł promieniowania, a więc o drganiach mających ten sam lub podobny kierunek.



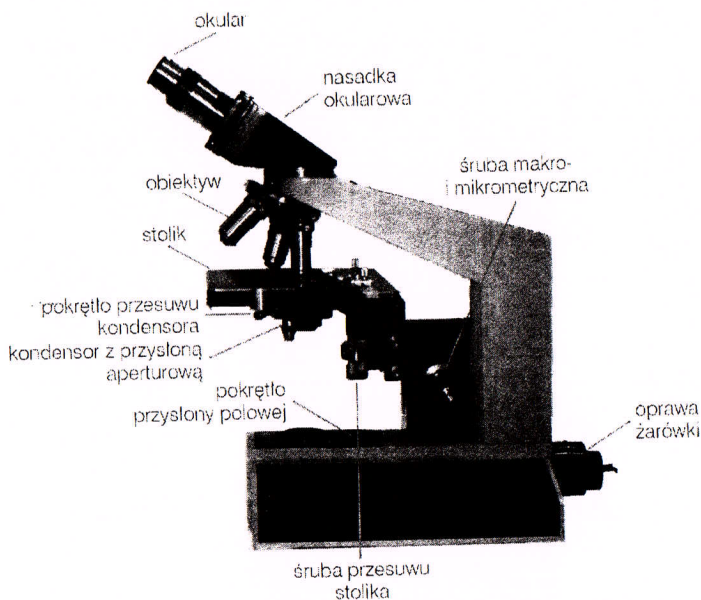
Ryc. 5. Interferencja fal. Skrajne przypadki sumowania fal o zgodnych fazach (a) i fazach przesuniętych względem siebie o pół długości fali (b). O falach zgodnych w fazie mówimy wtedy, gdy grzbiety (lub doliny) dwóch lub więcej fal dochodzą do punktu ekstremalnego w tym samym czasie. Fale mają fazy przeciwne, gdy grzbiety jednej fali spotykają się w tym samym czasie z dolinami drugiej fali

# 2

## Podstawy mikroskopii

### 2.1. Budowa mikroskopu świetlnego

W każdym mikroskopie świetlnym możemy wyróżnić części mechaniczne oraz optyczne. Znajomość budowy mikroskopu świetlnego (ryc. 6) oraz znajomość biegu promieni świetlnych w mikroskopie (ryc. 7) jest konieczna do prawidłowego posługiwania się mikroskopem i wykorzystywania w maksymalnym stopniu jego możliwości.



Ryc. 6. Podstawowe części mechaniczne i optyczne mikroskopu świetlnego (PZO, typ Biolar)

### 2.2. Podstaw

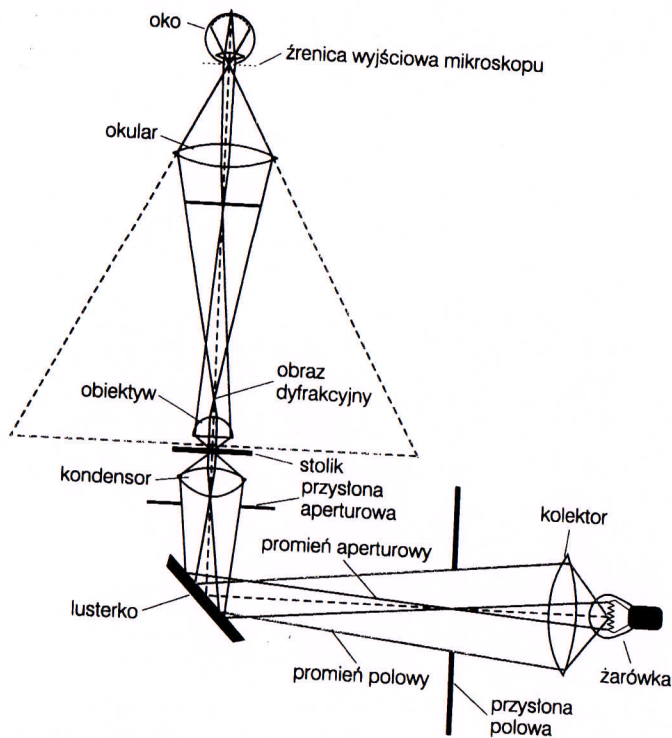
#### Apertura numer

Apertura numer  
a skrajnym prom  
tywu (ryc. 8). Ką  
tym między prej  
zależy zdolność i

#### Zdolność rozdziel

Zdolność rozdziel  
które dostrzegają

$d$  – zdolność rozdziel  
 $A$  – apertura numeryczna  
Najmniejsza odległość, którą można oddzielić w mikroskopie, który oświetla



Ryc. 7. Schemat biegu fal świetlnych w mikroskopie świetlnym (Kędzia, 1980; zmienione)

## 2.2. Podstawowe pojęcia i wzory

### Apertura numeryczna obiektywu

Apertura numeryczna obiektywu to kąt zawarty między osią optyczną obiektywu a skrajnym promieniem świetlnym, który jeszcze wpada do soczewki czołowej obiektywu (ryc. 8). Kąt ten zależy od współczynnika załamania światła w środowisku zawartym między preparatem a soczewką czołową obiektywu. Od apertury numerycznej zależy zdolność rozdzielcza mikroskopu oraz jasność obrazu mikroskopowego.

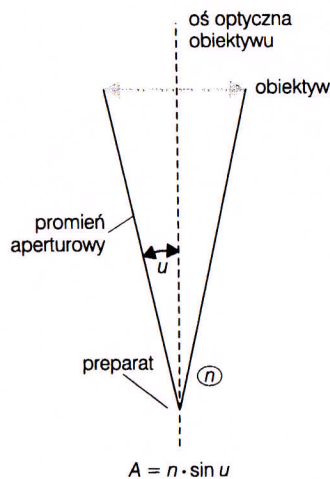
### Zdolność rozdzielcza mikroskopu

Zdolność rozdzielcza mikroskopu to najmniejsza odległość między dwoma punktami, które dostrzegane są jeszcze oddzielnie; wyraża się wzorem:

$$d = \frac{2A}{\lambda} = \frac{2n \sin u}{\lambda}$$

$d$  – zdolność rozdzielcza mikroskopu,  $\lambda$  – długość fali światła użytego do obserwacji,  $A$  – apertura numeryczna obiektywu.

Najmniejsza odległość dwóch punktów, które możemy jeszcze dostrzec jako oddzielne w mikroskopie, musi mieć wymiar równy co najmniej długości fali światła, którym oświetlamy preparat. W świetle widzialnym granica ta wynosi  $0,5 \mu\text{m}$ .



Ryc. 8. Graficzne przedstawienie apertury numerycznej obiektywu.  $A$  – apertura numeryczna obiektywu,  $n$  – współczynnik załamania światła między preparatem a obiektywem,  $u$  – kąt aperturowy, czyli kąt między osią optyczną obiektywu a skrajnym promieniem wpadającym do soczewki czołowej obiektywu

### Powiększenie mikroskopu

Powiększenie mikroskopu to iloczyn powiększeń okularu i obiektywu oraz ewentualnie powiększeń pośrednich układów optycznych (np. czasami powiększenie daje nasadka okularowa; wówczas wartość jej powiększenia jest podana w obszarze między okularami).

$$P = P_{ob} P_{ok} \approx \frac{0,25l}{f_{ob} f_{ok}}$$

$P$  – powiększenie mikroskopu,  $P_{ob}$  – powiększenie obiektywu,  $P_{ok}$  – powiększenie okularu,  $f_{ob}$  – ogniskowa obiektywu,  $f_{ok}$  – ogniskowa okularu,  $l$  – długość optyczna tubusu w metrach

### 2.3. Zasady pracy z mikroskopem

Ustawienie oświetlenia według zasady Köhlera umożliwia oświetlenie preparatu spójną i równoległą wiązką światła padającą prostopadłe na preparat. Ponadto ustawienie to eliminuje światło rozproszone i ugięte na niejednorodnościach preparatu poza polem widzenia.

#### Ustawianie oświetlenia według zasady Köhlera

- Włączyć zasilanie mikroskopu.
- Znaleźć ostry obraz preparatu (korzystając ze śrub makro- i mikrometrycznej oraz obiektywu powiększającego 10× lub 20×), czyli wyznaczyć płaszczyznę preparatu.
- Odwzorować obraz przysłony polowej w płaszczyźnie preparatu.

Do odwzorowania obrazu przysłony polowej w płaszczyźnie preparatu (płaszczyzna preparatu to takie położenie stolika mikroskopowego wraz z preparatem w osi optycznej mikro-

skoj  
zmn  
(ryc  
albc  
obra  
nej  
odw  
przy  
posł

ostr  
uzn  
łowe  
otwi  
spos  
pow

• Odwz

Obraz  
odwz

a

Obraz  
na tle c

c

Ryc. 9. Niev  
zują obraz t

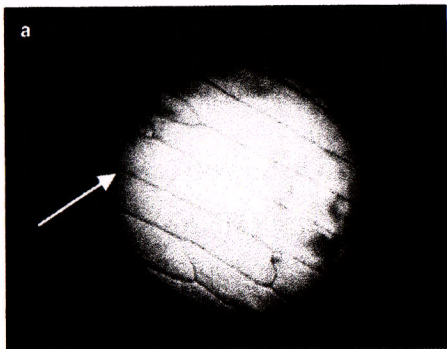


skopu, w którym obraz preparatu jest ostro odwzorowany, czyli dobrze widoczny) należy zmniejszyć średnicę tej przysłony tak, aby w obrazie mikroskopowym było widać jej brzegi (ryc. 9). Pokrętko pozwalające zmniejszyć średnicę przysłony polowej znajduje się albo z tyłu, albo z przodu podstawy mikroskopu zależnie od jego konstrukcji (patrz ryc. 6). Jeżeli brzegi obrazu przysłony polowej nie są ostre (ryc. 9a), to należy przesunąć kondensor w osi optycznej mikroskopu (górze–dół) w takie położenie, w którym obraz przysłony polowej jest ostro odwzorowany na tle ostro odwzorowanego obrazu preparatu (ryc. 9c). Ponadto obraz przysłony polowej powinien znajdować się w środku pola widzenia, co można uzyskać, posługując się śrubami do centrowania kondensora (patrz ryc. 6).

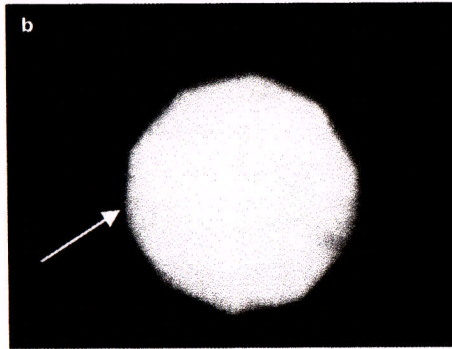
**Uwaga:** Należy cały czas kontrolować odwzorowanie preparatu – musi być widoczny ostry obraz preparatu i równocześnie ostry obraz przysłony polowej – jeśli tak jest, to można uznać, że odwzorowanie obrazu przysłony polowej w płaszczyźnie preparatu jest prawidłowe. Po właściwym odwzorowaniu obrazu przysłony polowej w płaszczyźnie preparatu, otwieramy ją tak, aby pole widzenia mikroskopu było całe oświetlone (eliminujemy w ten sposób ewentualną aberrację chromatyczną, która może pojawić się w obrazie mikroskopowym).

- Odwzorować obraz źródła światła w płaszczyźnie przysłony aperturowej kondensora.

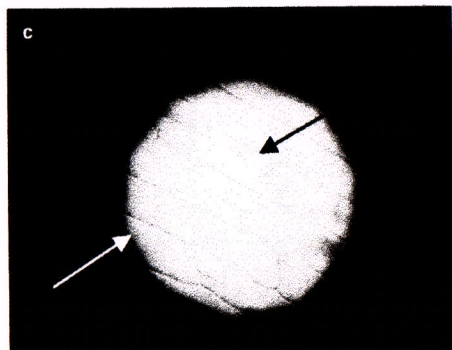
Obraz przysłony polowej odwzorowanej nieprawidłowo



Obraz przysłony polowej odwzorowany prawidłowo, ale nieprawidłowo odwzorowany obraz preparatu



Obraz przysłony polowej odwzorowany prawidłowo na tle ostro odwzorowanego obrazu preparatu



**Ryc. 9.** Niewłaściwe i właściwe odwzorowanie obrazu przysłony polowej w płaszczyźnie preparatu (białe strzałki wskazują obraz brzegów przysłony; strzałka czerwona wskazuje ostro odwzorowany obraz preparatu)

Aby odwzorować ostry obraz źródła światła (czyli ostry obraz włókien żarówki), należy zamknąć przysłonę aperturową kondensora, a następnie przesunąć oświetlacz tak (przesuwamy oświetlacz wzdłuż osi podstawy mikroskopu, patrz ryc. 6), że na zamkniętej przysłonie aperturowej (oglądanej pod stolikiem mikroskopowym) widoczny jest ostry obraz włókien żarówki. Po wykonaniu tej czynności można otworzyć przysłonę aperturową kondensora lub pozostawić zamkniętą. Decyzja zależy od tego, jak bardzo skontrastowany ma być obraz mikroskopowy. Należy bowiem pamiętać, że rozwarłość przysłony aperturowej kondensora wpływa na kontrast obrazu mikroskopowego – im bardziej zamknięta, tym kontrast większy.

W mikroskopach nowego typu źródło światła jest ustawione fabrycznie w optymalnej pozycji i nie wymaga dodatkowej regulacji.

**Uwaga:** W mikroskopie intensywność oświetlenia preparatu, a tym samym jasność obrazu mikroskopowego regulujemy potencjometrem znajdującym się przy zasilaczu (zależnie od konstrukcji mikroskopu zasilacz może być odrębną częścią wyposażenia mikroskopu albo może znajdować się w podstawie mikroskopu). **Nie należy** zmniejszać intensywności oświetlenia, przesuwając kondensator w osi optycznej mikroskopu! Prowadzi to bowiem do rozregulowania ustawionego wcześniej oświetlenia według zasady Köhlera.

W mikroskopach fluorescencyjnych należy kontrolować odwzorowanie źródła światła, szczególnie po zmianie żarówki (trwałość żarówek, wyrażona w godzinach, jest podana przez producenta). Niestety, nie można podać jednej zasady postępowania w tym przypadku, ponieważ kolejne czynności zależą od konstrukcji mikroskopu i w związku z tym należy postępować zgodnie z instrukcją użytkownika danego typu mikroskopu.

Przedstawiona procedura ustawiania oświetlenia według zasady Köhlera odnosi się do mikroskopu takiego typu, jaki przedstawia rycina 6. Niemniej jednak w każdym innym typie mikroskopu obowiązują te same zasady optyki.

### Opis skrótów umieszczonych na poszczególnych częściach mikroskopu

Aby prawidłowo wykorzystywać możliwości techniczne mikroskopu i jego układów optycznych, należy wiedzieć, co oznaczają symbole lub cyfry umieszczone na różnych elementach danego mikroskopu. Szczególnie odnosi się to do właściwości okularów i obiektywów, ponieważ tylko wtedy, gdy zostaną zestawione w odpowiedni sposób, uzyskać można w mikroskopie **powiększenie użyteczne**, czyli takie powiększenie, które jest konieczne i wystarczające do dobrego widzenia wszystkich szczegółów preparatu. Właściwy obraz mikroskopowy niekoniecznie uzyskuje się wtedy, gdy zestawimy ze sobą maksymalnie powiększający okular i obiektyw. Zazwyczaj uzyskuje się wówczas **powiększenie puste**, czyli powiększenie, w którym szczegóły obrazu są zamazane i nieostre.

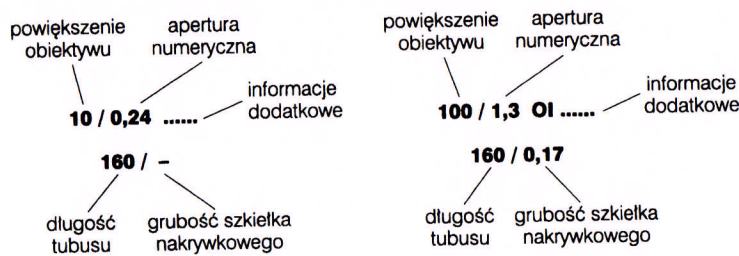
#### *Kondensator*

Na oprawie kondensora w pobliżu jego soczewki czołowej umieszczona jest cyfra określająca wartość jego apertury numerycznej. Jeśli kondensator jest immersyjny, to również ta informacja jest na nim umieszczona, na przykład w postaci skrótu **OI**, który oznacza immersję olejową.

## Obiektyw

Pierwszą liczbą wygrawerowaną na obiektywie jest jego powiększenie (ryc. 10). Następnie podana jest wartość apertury numerycznej obiektywu. Wartość ta jest tym większa, im większe jest powiększenie obiektywu. Na podstawie wartości apertury numerycznej obiektywu ( $A$ ) można ocenić, czy powiększenie mikroskopu jest właściwie dobrane, aby uzyskać powiększenie użyteczne ( $\Gamma_u$ ). Mianowicie powiększenie użyteczne mikroskopu powinno zawierać się w przedziale  $500A \leq \Gamma_u \leq 1000A$ . Stosowanie powiększeń mikroskopu poza tymi granicami nie poprawia jakości obrazu mikroskopowego, gdyż nie zwiększa zdolności rozdzielczej mikroskopu. Oznacza to, że nie można zobaczyć większej ilości szczegółów preparatu mikroskopowego, natomiast pogorszeniu ulega jakość obrazu: maleje przedmiotowe pole widzenia, zmniejsza się kontrast i ostrość obrazu drobnych szczegółów.

Prócz tego na obiektywie może być wygrawerowana informacja mówiąca o tym, do jakiej techniki mikroskopowej przystosowany jest obiektyw (miejsce wykropkowane na ryc. 10). Skrót **Ph** oznacza obecność płytki fazowej w obiektywie, a więc możliwość pracy w technice kontrastu fazowego. Na polskich obiektywach produkowanych przez PZO (Polskie Zakłady Optyczne) można znaleźć nieco inne skróty: **PhA** (kontrast fazowy anoptralny), **PhS** (kontrast fazowy sadzowy), **PhZ** (kontrast fazowy zmienny). Skrót **PI** oznacza, że w obiektywie znajduje się pryzmat Wollastona. Takiego obiektywu można użyć do techniki polaryzacyjno-interferencyjnej. Kolejna informacja to długość tubusu (podana w milimetrach), do której dopasowany jest obiektyw. Jeśli zamontujemy dany obiektyw do mikroskopu o innej długości tubusu niż podana na obiektywie, spowoduje to niemożliwość uzyskania ostrego obrazu mikroskopowego. Następna informacja umieszczona na obiektywach to grubość szkiełka nakrywkowego, do której zostały dopasowane parametry konstrukcyjne danego obiektywu. Jeśli na obiektywie wygrawerowano znak „-” oznacza to, że obiektyw może pracować z dowolnie grubym szkiełkiem nakrywkowym. Jeśli jest wygrawerowana wartość 0,17 (mm), to użycie grubszego szkiełka nakrywkowego spowoduje pogorszenie jakości odwzorowania obrazu mikroskopowego. Szkiełka mikroskopowe dostępne w handlu mają grubość 0,1–0,3 mm. Znane są dokładne wyliczenia odchyień od podanej na obiektywie grubości szkiełka nakrywkowego dla obiektywów o różnych aperturach (np. w podręczniku Pluty *Mikroskopia optyczna*), przy których odwzorowanie obrazu jest jeszcze poprawne. Dodatkowo niektóre obiektywy wyposażone są w pierścień moletowany (ząbkowany), którym można korygować położenie jednej z soczewek obiektywu, aby optymalnie dostosować obiektyw do rzeczywistej grubości szkiełka nakrywkowego.



Ryc. 10. Objasnienia informacji umieszczonych na obiektywach

**Wskazówka praktyczna:** Jeśli obraz mikroskopowy oglądany pod obiektywem – innym niż powiększający  $10\times$  – jest nieostry, a analizowany preparat jest trwały, to (zanim uznamy, że mikroskop uległ uszkodzeniu) należy przede wszystkim sprawdzić, czy preparat jest zwrócony w stronę obiektywu szkiełkiem nakrywkowym, czy podstawowym. W większości przypadków nieostry obraz preparatu widziany w mikroskopie wynika z tego, że preparat jest zwrócony do obiektywu szkiełkiem podstawowym. Dlaczego tak się dzieje? Otóż obserwacje mikroskopowe rozpoczyna się od użycia obiektywu powiększającego  $10\times$ , dla którego nie ma znaczenia grubość szkiełka nakrywkowego. W związku z tym nawet nieprawidłowe ułożenie preparatu szkiełkiem nakrywkowym do dołu nie wpływa na ostrość widzenia preparatu. Natomiast dla każdego innego obiektywu ( $20\times$ ,  $40\times$ ,  $60\times$ ,  $100\times$ ) prawidłowe ułożenie preparatu ma zasadnicze znaczenie, gdyż obiektywy te mają większą aperturę numeryczną i wymagają cienkiego szkiełka nakrywkowego. Jeśli więc nie sprawdziliśmy, jak jest położony preparat na stoliku mikroskopowym (szkiełkiem podstawowym czy nakrywkowym w stronę obiektywu), to należy to uczynić. Zwykle okazuje się, że nieostry obraz jest spowodowany takim niedopatrzaniem.

Na obiektywie wygrawerowane są również informacje, czy obiektyw wymaga immersji i jakiego rodzaju. Jeśli na obiektywie wygrawerowany jest skrót **OI**, oznacza immersję olejową, skrót **WI** – immersję wodną. Należy pamiętać, że we współczesnych mikroskopach nie tylko obiektywy powiększające  $100\times$  wymagają immersji. Coraz częściej obiektywy powiększające  $40\times$  czy  $20\times$  również jej wymagają.

**Immersja** polega na tym, że przestrzeń zawartą między soczewką czołową obiektywu a preparatem wypełniamy cieczą immersyjną, tzn. o dużym współczynniku załamania światła (większym od 1). Na przykład  $n$  wody wynosi 1,33, zaś olejku immersyjnego 1,55. Zastosowanie immersji powoduje zwiększenie zdolności rozdzielczej mikroskopu. Poza tym, jeśli stosujemy immersję, to do obiektywu wchodzi szersze wiązki światła i dzięki temu uzyskujemy lepszą jasność obrazu. Dzieje się tak dlatego, że immersja zwiększa aperturę numeryczną obiektywu, a jasność obrazu w danym powiększeniu jest proporcjonalna do kwadratu apertury.

W związku ze stosowaniem immersji pojawia się problem usuwania cieczy immersyjnej z soczewki czołowej obiektywu. Niektórzy użytkownicy mikroskopów zalecają alkohol etylowy, inni benzen, jeszcze inni mieszaninę alkoholu i eteru (stosunek objętościowy 1:1) czy benzynę apteczną. Aby usuwanie olejku immersyjnego było bezpieczne dla obiektywu, należy zastosować ciecz zalecaną przez producenta. Obiektywy są zbiorem soczewek sklejonych ze sobą. Kleje mogą być różne i tylko producent wie, jaki został użyty. Jeśli soczewki są sklezione balsamem kanadyjskim, to używanie ksyłenu do usuwania olejku immersyjnego doprowadzi z czasem do rozklejenia soczewek.

#### *Okular i nasadka okularowa*

Na okularze i coraz częściej również na nasadce okularowej można znaleźć informacje o ich powiększeniach.

## 2.4. Mikroskopia stereoskopowa

Stereoskopia jest cechą widzenia dwuocznego, dzięki której odbieramy trójwymiarowość i głębię naszego otoczenia (ryc. 11). Widzenie stereoskopowe wynika stąd, że jedno oko widzi przedmioty z nieco innej pozycji i pod nieco innym kątem niż drugie.

wym – innym  
im uznamy, że  
jest zwrócony  
ci przypadków  
st zwrócony do  
mikroskopowe  
czenia grubość  
atu szkiełkiem  
st dla każdego  
adnicze znacze-  
kiego szkiełka  
ku mikroskopo-  
eży to uczynić.  
n.

wymaga im-  
OI, oznacza  
współczesnych  
i. Coraz częś-

zołową obiek-  
współczynniku  
olejku immer-  
i rozdzielczej  
modzą szersze  
ę tak dlatego,  
azu w danym

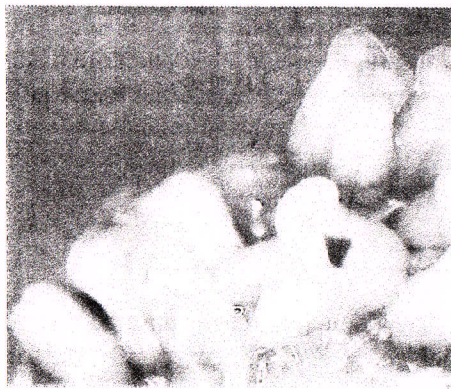
czy immersyjnej  
ają alkohol ety-  
ościowy 1:1) czy  
dla obiektywu,  
oczek sklejo-  
leśli soczewki są  
i immersyjnego

żyć informacje

y trójwymiaro-  
ynika stąd, że  
em niż drugie.

Szczegółowe wyjaśnienie widzenia stereoskopowego można znaleźć w podręczniku Pluty *Mikroskopia optyczna*.

O stereoskopii można przekonać się w następujący sposób: wyciągnąć przed siebie palec i umieścić go na tle krawędzi stołu, następnie popatrzeć na palec tylko prawym okiem – okaże się, że palec widzimy na tle krawędzi stołu na lewo od miejsca, w którym widzimy go dwojgiem oczu; jeśli następnie popatrzymy tylko lewym okiem, to okaże się, że palec widzimy przesunięty w prawo od tego miejsca.



Ryc. 11. Trójwymiarowość i głębia obrazu zarodków somatycznych *Arabidopsis thaliana* obserwowanych w mikroskopie stereoskopowym

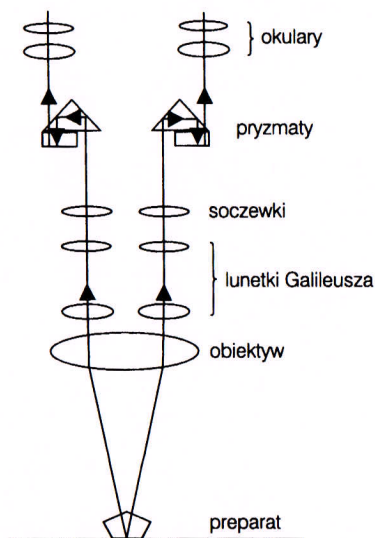
Analiza preparatów, w której istotna jest obserwacja trójwymiarowości obiektu i jego grubości, nie jest możliwa bez mikroskopu stereoskopowego. Pozwala on widzieć przestrzennie dzięki temu, że składa się (w najprostszym rozwiązaniu technicznym – mikroskopie Greenougha) z dwóch prostych mikroskopów pochylonych względem siebie pod odpowiednim kątem. W mikroskopie stereoskopowym występuje układ optyczny złożony z obiektywu i okularów. Ponieważ w urządzeniu tym musi powstać obraz prosty, rzeczywisty i powiększony (w mikroskopie świetlnym powstaje obraz odwrócony, pozorny i powiększony), obrazy pośrednie tworzone przez parę obiektywów w ich płaszczyznach obrazowych muszą być proste. Uzyskuje się to za pośrednictwem układu pryzmatów (ryc. 12).

Obecnie najczęściej stosowanym rozwiązaniem technicznym w mikroskopach stereoskopowych jest budowa, na którą składa się obiektyw czołowy i lunetki Galileusza (ryc. 12).

Mikroskopy stereoskopowe ze względu na dużą odległość roboczą między obiektywem a obiektem umożliwiają manipulacje i mikromanipulacje (za pomocą mikromanipulatorów) analizowanym materiałem. Możliwe jest oglądanie stosunkowo dużych i grubych (nawet kilkucentymetrowych) obiektów.

### Widzenie stereoskopowe

W przypadku pracy z mikroskopem lub stereomikroskopem niezwykle ważne jest takie przygotowanie mikroskopu do pracy, aby zachować możliwość stereoskopowego widzenia preparatu (na przykład: w źle przygotowanym stereomikroskopie obraz obserwowanej muchy będzie płaski). Często zdarza się, że pracujący z mikroskopem wykorzystuje



Ryc. 12. Schemat biegu promieni świetlnych w mikroskopie stereoskopowym z jednym obiektywem i lunetkami Galileusza (Pluta, 1982; zmieni-  
nionie)

tylko jeden z okularów nasadki dwuocnej, ponieważ patrząc przez oba okulary, widzi nakładające się obrazy, a próba dostosowania rozstawu okularów nasadki mikroskopowej w dalszym ciągu nie pozwala na uzyskanie jednego obrazu. Tak dzieje się wtedy, gdy nasze oczy (nawet bez stwierdzanych przez okulistę przyczyn) nie widzą jednakowo ostro. Zjawisko to występuje u bardzo wielu osób i trzeba tylko wiedzieć, jak ten problem rozwiązać. Otóż najpierw należy znaleźć ostry obraz preparatu. Następnie dokładnie ustawić ostrość preparatu dla jednego oka za pomocą śruby mikrometrycznej mikroskopu. Należy to wykonać następująco: patrzeć w prawy okular prawym okiem (lewe oko może być zamknięte) i za pomocą śruby mikrometrycznej mikroskopu ustawić maksymalnie ostry obraz preparatu dla prawego oka. Następnie patrząc w lewy okular lewym okiem ustawić ostrość preparatu dla lewego oka za pomocą śruby mikrometrycznej okularu. Jeśli te dwie czynności zostaną wykonane poprawnie, to wystarczy dopasować rozstaw nasadki okularowej do rozstawu oczu.

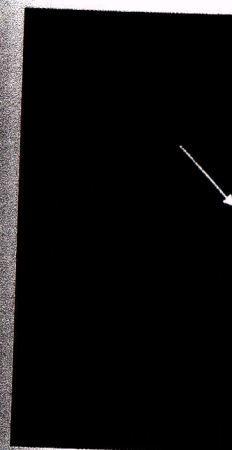
Osoby, które do tej pory wykorzystywały tylko jeden z okularów mikroskopowych mają trudności z uzyskaniem pojedynczego obrazu preparatu, nawet jeśli dobrze wykonały opisane czynności. Problem wynika z braku umiejętności dopasowania rozstawu nasadki do rozstawu oczu, głównie dlatego, że nie mając wprawy w pracy z mikroskopem niektóre osoby zbyt zbliżają oczy do okularów. Osobom takim można jednak pomóc. Stojąc przodem do nich i widząc ich źrenice oraz światło wychodzące z okularów mikroskopu należy tak dopasować rozstaw nasadki okularowej, aby światło padało na źrenice obserwatora.

## 2.5. Mikroskopia ciemnego pola

Technika ciemnego pola polega na tym, że do obiektywu dochodzą tylko promienie ugięte i rozproszone na preparacie. Natomiast te promienie, które wyjdą z kondensora i przejdą przez preparat bez ugięcia i rozproszenia, nie wchodzi do obiektywu. Konsek-

wencją tego jest obiekty, których dzielczej mikros paracie stają się sażyć mikroskop płytkę między ż miotowej (ryc. 1 Technikę cie takich jak zawiesz nież wykorzystyw tów, albo jakich (ryc. 14).

Ryc. 13. Zasada mikro: (http://www.ruf.rice.edu/ - zmienione)



# 4

## Mikroskopia fluorescencyjna

Mikroskopia fluorescencyjna opiera się na regule Stokesa mówiącej, że pasmo fluorescencji jest przesunięte względem światła wzbudzającego w kierunku większych długości fal.

### 4.1. Podstawowe terminy

Luminescencja (jarzenie, zimne świecenie) to promieniowanie, którego energia powstaje kosztem innych rodzajów energii niż energia cieplna. Promieniowanie to jest wysyłane podczas przejścia atomów lub cząsteczek ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. Zależnie od rodzaju energii wzbudzającej wyróżnia się:

- fotoluminescencję (fluorescencja, fosforescencja),
- chemiluminescencję,
- elektroluminescencję,
- tryboluminescencję (wzbudzaną energią mechaniczną).

W badaniach biologicznych wykorzystuje się zjawisko fluorescencji (luminescencja typu fotoluminescencji), które polega na emitowaniu światła o określonej długości fali pod wpływem (i tylko w trakcie trwania) absorpcji promieniowania pochodzącego z obcego źródła.

Fluorescencja jest świeceniem krótkotrwałym, a czas jej trwania zawiera się w przedziale  $10^{-10}$ – $10^{-6}$  s. Dlatego też jej gaśnięcie obserwowane gołym okiem wydaje się równoczesne z przerwaniem wzbudzenia. Fluorescencja jest wynikiem zmian energii wewnątrz atomów lub cząsteczek danej substancji.

Fosforescencja różni się od fluorescencji „bezwładnością”. Oznacza to, że emisja światła fosforescencyjnego zaczyna się dopiero po pewnym czasie od wzbudzenia i może trwać nawet przez kilka dni. Fosforescencja jest wynikiem zmian energii między

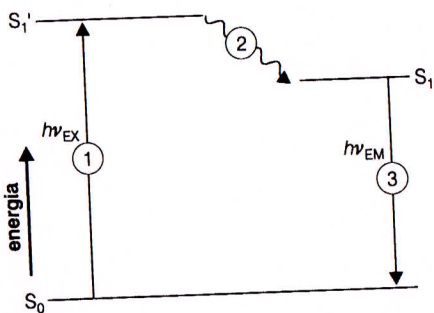
cząsteczkami danej substancji. Przykładem fosforescencji są tarcze zegarków świecących w ciemności lub lepkie roztwory i niektóre ciała stałe, jak na przykład siarczki ziem alkalicznych.

Luminoforem nazywamy substancję, która emituje światło wzbudzone przez działającą na nią energię świetlną. Niektóre luminofony można stosować jako znaczniki preparatów biologicznych i nazywamy je wtedy fluorochromami. Fluorochromy, podobnie jak barwniki histologiczne, mogą odznaczać się swoistością, co pozwala identyfikować coraz więcej substancji występujących w komórkach.

### Powstawanie fluorescencji

Foton o energii  $h\nu_{EX}$  jest dostarczany przez zewnętrzne źródło energii, którym w mikroskopie fluorescencyjnym jest odpowiednie źródło światła. Energia fotonu jest absorbowana przez elektrony fluorochromu (dla przejrzystości opisu w dalszej części będzie używane słowo fluorochrom, ale wszystkie opisane zjawiska odnoszą się także do innych substancji, które mają zdolność do fluorescencji, w tym do autofluorescencji) i powoduje ich przejście na wyższy poziom energetyczny. Proces ten określimy mianem wzbudzenia (ryc. 27 etap 1). Stan wzbudzenia fluorochromu jest bardzo nietrwały (1–10 nanosekund). W tym czasie cząsteczki fluorochromu ulegają zmianom konformacyjnym, jak również mogą wchodzić w interakcje z otaczającymi je cząsteczkami. Wskutek tego procesu energia  $S_1'$ , którą elektron cząsteczki fluorochromu uzyskuje na skutek wzbudzenia, ulega częściowemu rozproszeniu, a elektron przechodzi do stanu  $S_1$  czyli singletowego stanu wzbudzenia elektronu (ryc. 27 etap 2; odpowiadający temu stanowi poziom energetyczny – to poziom singletowy). Oznacza to, że elektron przechodząc ze stanu podstawowego do wzbudzonego nie zmienia swojego spinu na przeciwny i suma spinów elektronu wzbudzonego i jego partnera w stanie podstawowym pozostaje równa zero. Drugą konsekwencją jest to, że nie wszystkie elektrony cząsteczek fluorochromu początkowo wzbudzone na skutek absorpcji fotonu, powracają do stanu podstawowego emitując światło (fluorescencję).

Spin charakteryzuje moment pędu elektronu obracającego się wokół własnej osi i może przybierać jedną z dwóch wartości ( $+1/2$ ) lub ( $-1/2$ ).



Ryc. 27. Powstawanie stanu wzbudzonego fluorochromu przez absorpcję energii fotonu  $h\nu_{EX}$  (etap 1) oraz emisja fluorescencji o energii  $h\nu_{EM}$  (etap 3). Dalszy opis w tekście

Emisja

Stan w miarę rochro nego energii przez światła tym dl nego (

4.2. fluo

Podsta

• Źró

W

wych i

nych l

mają r

cencji

mają c

podcz

światła

rtęcio

obudc

nowe

ale do

cyanal

• Filt

Z

skopu

nego.

przed

• Filt

M

bnal d

• Filt

Ic

częśc

dla w

W

parat



## Emisja fluorescencji

Stan wzbudzenia elektronu jest bardzo nietrwały. Elektron szybko pozbywa się nadmiaru energii. Foton o energii  $h\nu_{EM}$  (ryc. 27 etap 3) jest emitowany, kiedy elektron fluorochromu (lub substancji zdolnej do autofluorescencji), powraca ze stanu wzbudzonego (singletowego) do stanu podstawowego. Na skutek częściowego rozproszenia energii w czasie trwania elektronu w stanie wzbudzenia, energia fotonu emitowanego przez elektron powracający do stanu podstawowego jest mniejsza. W związku z tym fala światła emitowanego jest dłuższa niż fala światła wzbudzającego (im mniejsza energia tym dłuższa fala). Różnica w energii czy długości fali fotonu wzbudzającego i emisyjnego ( $h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$ ) jest określana jako reguła Stokesa.

## 4.2. Budowa i zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego

Podstawowymi elementami mikroskopu fluorescencyjnego są (ryc. 28):

- Źródło światła

W mikroskopach fluorescencyjnych używa się wysokociśnieniowych lamp rtęciowych i ksenonowych, lamp halogenowych oraz światła laserowego. Każda z wymienionych lamp ma inną charakterystykę spektralną. Wysokociśnieniowe lampy rtęciowe mają nieciągłe widmo promieniowania i można je wykorzystać do wzbudzania fluorescencji światłem nadfioletowym, fioletowoniebieskim oraz zielonym. Lampy ksenonowe mają ciągłe widmo emisji świetlnej, które zawiera mało nadfioletu, ale dużo bliskiej podczerwieni. Tego typu lampy są wykorzystywane do wzbudzania fluorescencji światłem niebieskim. Jeżeli mikroskop jest wyposażony w wysokociśnieniową lampę rtęciową, należy pamiętać o zachowaniu zasad bezpieczeństwa. Nie wolno otwierać obudowy lampy w czasie jej pracy lub gdy nie jest jeszcze wychłodzona. Lampy halogenowe to lampy żarowe i ich widmo jest ciągłe. Widmo takiej lampy ma mało nadfioletu, ale dobrze się sprawdza we wzbudzaniu fluorochromu FITC (*ang.* fluorescein isothiocyanate, izotiocyanian fluoresceiny). Światło laserowe omówiono w rozdziale 7.1.

- Filtry ciepłne

Znajdują się między źródłem światła a kolejnym elementem optycznym mikroskopu. Ich funkcja polega na pochłanianiu promieniowania czerwonego i podczerwonego. Dzięki temu zarówno układ optyczny, inne filtry, jak i preparat są zabezpieczone przed przegrzewaniem w trakcie pracy mikroskopu.

- Filtry wzbudzające

Mają za zadanie przepuszczać tylko fale świetlne takiej długości, jaka jest potrzebna do wzbudzenia fluorescencji w badanym preparacie.

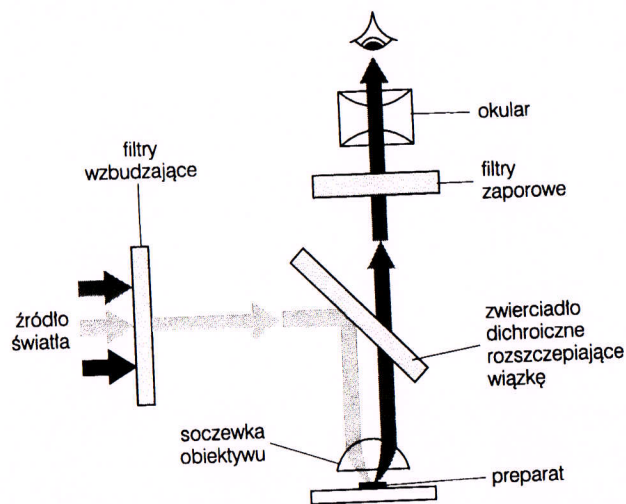
- Filtry zaporowe

Ich zadanie to odcinanie światła wzbudzającego od fluorescencyjnego. Bardzo często światło wzbudzające to promieniowanie UV (nadfioletowe), które jest szkodliwe dla wzroku obserwatora.

W mikroskopach fluorescencyjnych można prowadzić obserwacje oświetlając preparat od dołu przez kondensator (oświetlenie typu dia) lub od góry przez obiektyw

(oświetlenie typu epi). Można również korzystać z obu typów oświetlenia jednocześnie. Z punktu widzenia powstawania obrazu mikroskopowego nie ma tu żadnej różnicy, gdyż światło docierające do preparatu ma za zadanie tylko wzbudzenie fluorescencji i jako takie nie bierze udziału w powstawaniu obrazu preparatu. Obraz preparatu powstaje tylko z udziałem światła fluorescencyjnego, a długość fali tego światła jest zawsze większa od długości fali światła wzbudzającego fluorescencję. Dlatego też mikroskop fluorescencyjny musi mieć źródło światła bogate w krótkofalowe promieniowanie świetlne: nadfioletowe, fioletowoniebieskie i zielone.

Zwyczajne szkło optyczne bardzo mocno pochłania nadfiolet. Wobec tego fluorescencja w UV wymaga optyki kwarcowej, przepuszczalnej dla UV, na całej drodze światła wzbudzającego, tj. od źródła światła aż do szkiełka podstawowego włącznie. Fluorescencja wzbudzona przez UV jest światłem widzialnym, dlatego wszystkie elementy optyczne znajdujące się na jej drodze, od szkiełka nakrywkowego do okularu, nie muszą być wykonane ze szkła kwarcowego.

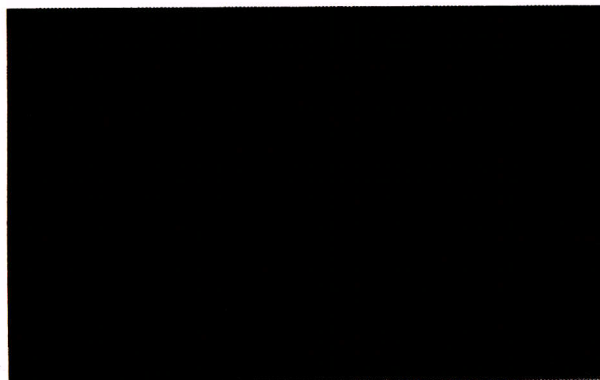


Ryc. 28. Schemat biegu promieni świetlnych w mikroskopie fluorescencyjnym z oświetleniem preparatu przez obiektyw (oświetlenie typu epi) (Alberts i in., 2005; zmienione)

### 4.3. Autofluorescencja

Niektóre składniki komórki oświetlone światłem o określonej długości fali mogą emitować światło widzialne. Zjawisko to nazywamy autofluorescencją lub fluorescencją pierwotną. W komórce roślinnej bardzo często występuje autofluorescencja różnych substancji, na przykład chlorofilu (ryc. 29) czy składników ścian komórkowych, takich jak lignina.

Autofluorescencja z jednej strony jest niezwykle przydatna w analizie struktury komórek, ale z drugiej (szczególnie wtedy, gdy używamy fluorochromów) może być kłopotliwa. Dlatego czasami należy użyć wygaszaczy. W celu wygaszenia autofluorescencji ścian komórkowych należy przeprowadzić reakcję PAS lub zastosować błękit toluidyny (rozdz. 7.4.1). Jeśli materiał był utrwalony w aldehydach, to będzie wykazywał silną



Ryc. 29. Przekrój poprzeczny przez młodą lodygę wierzby. Czerwona autofluorescencja chlorofilu w chloroplastach. Skala 20  $\mu\text{m}$

autofluorescencję, ponieważ aldehydy łączą się z białkami i aminami. Poza tym utrwala-  
cze aldehydowe mogą niespecyficznie wiązać różne fluorochromy. W tych przypadkach  
również trzeba zastosować odpowiednie procedury, które usuną autofluorescencję.

Barwa autofluorescencji danej substancji może się zmieniać zależnie od pH środo-  
wiska lub zastosowanej długości światła wzbudzającego. Na przykład autofluorescencja  
ligniny pod wpływem światła wzbudzającego 330–380 nm ma barwę niebieską, zaś pod  
wpływem światła o długości 488 nm – zieloną.

#### 4.4. Fluorochromy i białka zielonej fluorescencji

Fluorochromy to substancje wykazujące zjawisko fluorescencji. Wykorzystanie fluoro-  
chromów oraz mikroskopii fluorescencyjnej i laserowej stało się obecnie rutynową  
techniką w badaniach budowy i funkcji komórki. Najczęściej używane w badaniach  
komórki roślinnej fluorochromy oraz ich charakterystykę podano w tabeli 1.

Omawiając metody fluorescencyjne w badaniach komórki roślinnej, trzeba wspom-  
nieć o wykorzystaniu białka zielonej fluorescencji (GFP, *ang.* green fluorescent pro-  
tein). Białko to zostało wyizolowane z meduzy *Aequorea victoria*. We wnętrzu tego  
białka znajdują się trzy aminokwasy (Ser-Tyr-Gly), tworzące fluorofor. Aminokwasy te  
ulegają cyklizacji i dehydratacji, co prowadzi do powstania fluoryzującego układu  
sprzężonych wiązań podwójnych. W warunkach naturalnych (omawiane procesy  
zachodzą w małych narządach świetlnych znajdujących się na brzegu parasola meduzy)  
GFP znajduje się w bliskim sąsiedztwie innego białka – akworyny. Akworyna po stymu-  
lowaniu jonami wapnia wykazuje luminescencję w zakresie światła niebieskiego.  
Światło emitowane przez akworynę może być absorbowane przez GFP i konwertowane  
na światło zielone. Wykazano, że *in vivo* oba białka znajdują się na tyle blisko, że  
dochodzi do rezonansowo-bezpromienistego transferu energii (zjawisko FRET; *ang.*  
fluorescence resonance energy transfer).

Zalety GFP:

- jest niezwykle stabilne (denaturacji ulega dopiero w temp. 90°C i wytrzymuje zmiany pH od 4 do 12);
- może być syntezywane w komórkach organizmu będącego celem badania;

- ma małą cytotoksyczność;
- nie wymaga kofaktorów, białek towarzyszących i ATP;
- sprawdza się jako gen reporterowy, służący do badania aktywności promotorów i wydajności transfekcji komórek;
- można tworzyć białka fuzyjne złożone z GFP i wybranego białka, co pozwala zlokalizować analizowane białko oraz śledzić jego losy pod wpływem różnych czynników.

GFP zmodyfikowano genetycznie, co rozszerzyło jego wykorzystanie. Przeprowadzono mutację, która zwiększyła wydajność fluorescencji, a powstałe białko określa się mianem EGFP (*ang.* enhanced green fluorescent protein). Wprowadzono również mutacje powodujące zmiany w długości światła emitowanego przez GFP. Dysponujemy obecnie GFP świecącymi na niebiesko (BFP), cyjanowo (CFP), żółto (YFP) i czerwono (RFP). Tak zmodyfikowane GFP pozwalają równocześnie śledzić losy i wzajemne oddziaływania kilku różnych substancji występujących w komórce.

Tabela 1. Przykłady fluorochromów i ich charakterystyka

Fluorochrom	Zastosowanie	Maksimum absorpcji (nm)	Maksimum emisji (nm)	Barwa fluorescencyjna
Oranż akrydyny do DNA	selektywny, niespecyficzny fluorochrom do DNA	502	525	zielona
Oranż akrydyny do RNA	selektywny, niespecyficzny fluorochrom do RNA	460	650	czerwona
Oranż akrydyny	kutyna i lignina	510–560	580	żółta
DAPI	tworzy fluorescencyjne kompleksy z sekwencjami bogatymi w pary AT w dwuniciowym DNA; zwłaszcza do utrwalonych komórek	344	449	niebieska
Hoechst 33342	zasada działania podobna do DAPI, można stosować do komórek nieutralnych	340	450	niebieska
Fluoresceina i jej pochodne (w tym FITC)	określanie pH w komórkach, test żywotności komórek, analiza transportu symplastowego	485	527	zielona
Rodamina 123	specyficzna dla mitochondriów, ponieważ jest kationowym barwnikiem akumulowanym przez ujemnie naładowane kompartmenty komórkowe	485	530	czerwona
Alexa Fluor 405	można koniugować z różnymi białkami	401	421	niebieska
Alexa Fluor 488	można koniugować z faloidyną i analizować cytoskielet aktynowy lub z innymi białkami	495	519	zielona
Alexa Fluor 647	można koniugować z różnymi białkami	650	668	czerwona
Texas red (TR)	służy do wykrywania różnych struktur lub procesów komórkowych ze względu na możliwość koniugacji, na przykład z białkami	595	615	pomarańczowa
DiOC	retikulum endoplazmatyczne	483	600	pomarańczowa
Błękit aniliny	wykrywanie kalozy	330–380	420	niebieska
Kalkofluor	wykrywanie celulozy	365–410	420	niebieska