

DIFFUSIONE DEL MATERIALE DIDATTICO

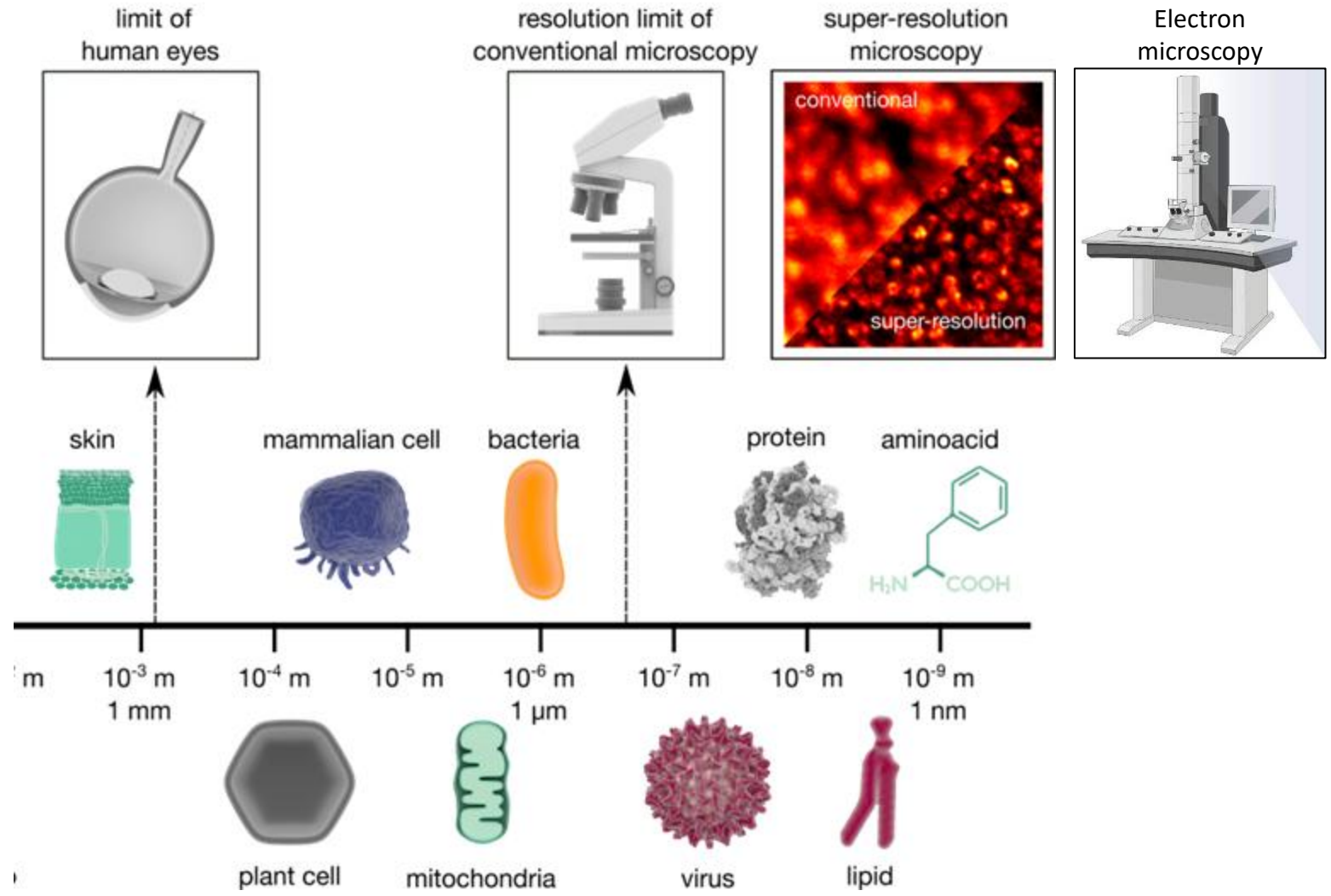
Queste immagini sono fornite agli studenti che hanno frequentato il corso di “Biologia cellulare” tenuto dalla Prof.ssa Giovanna Pontarin nel Corso di Laurea triennale in Biotecnologie dell’Università di Padova nell’anno accademico 2024-2025.

Nel rispetto dei diritti di proprietà, non ne è consentito l’uso per altri scopi o la diffusione su Internet o ad altre persone.

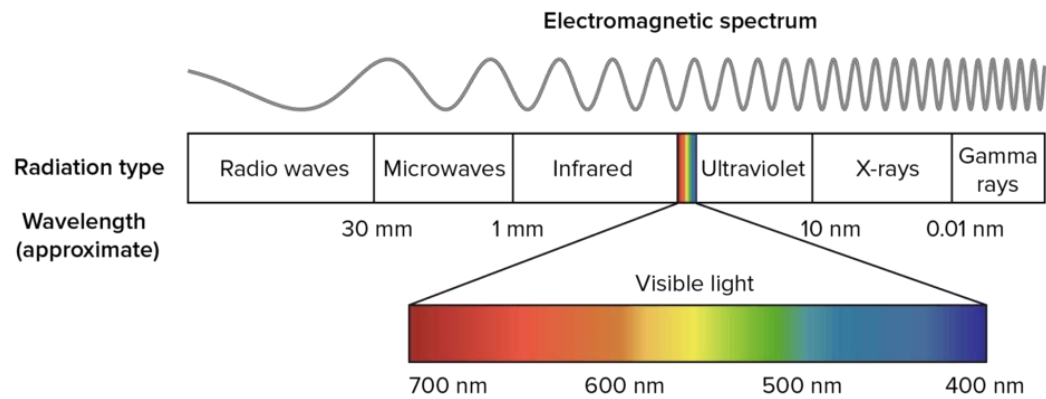
E’ inoltre vietata la diffusione di video, foto, registrazioni, dispense delle lezioni e del materiale delle esercitazioni.

IL MICROSCOPIO

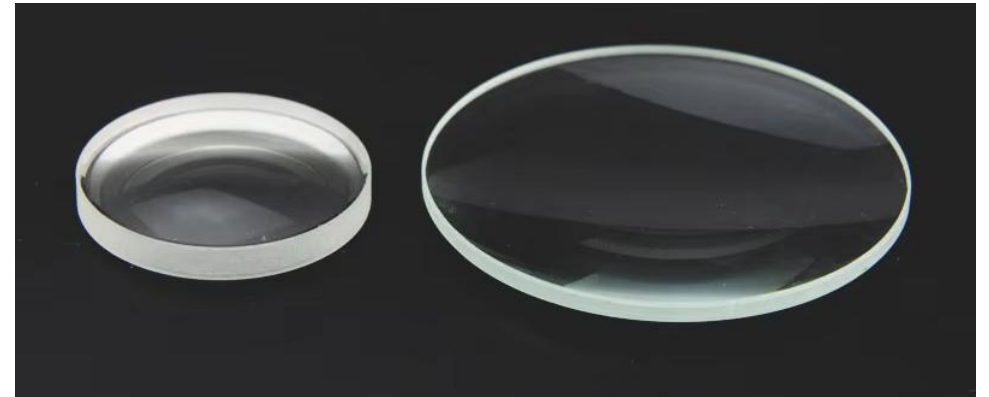




Componenti di base di un microscopio



+



Sorgente di luce

Lenti

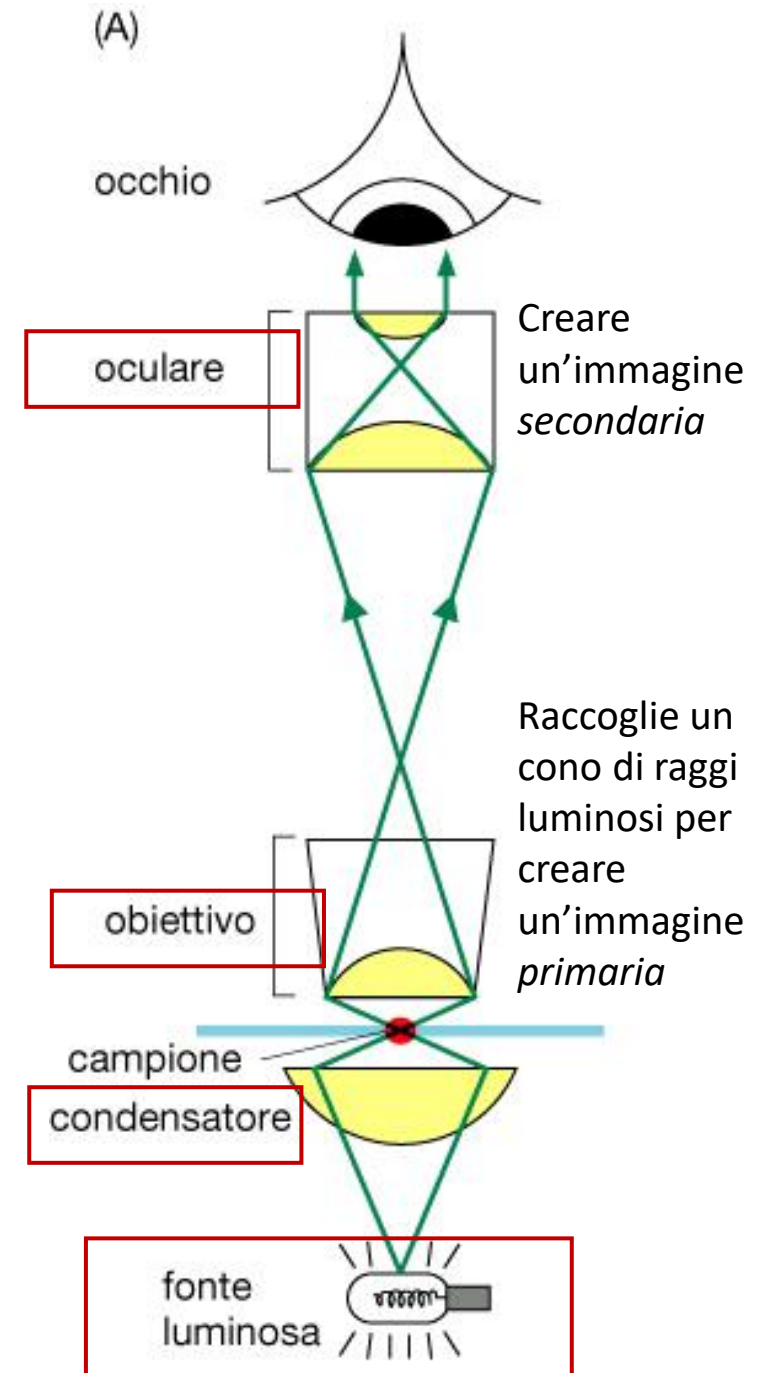
Componenti di base di un microscopio ottico

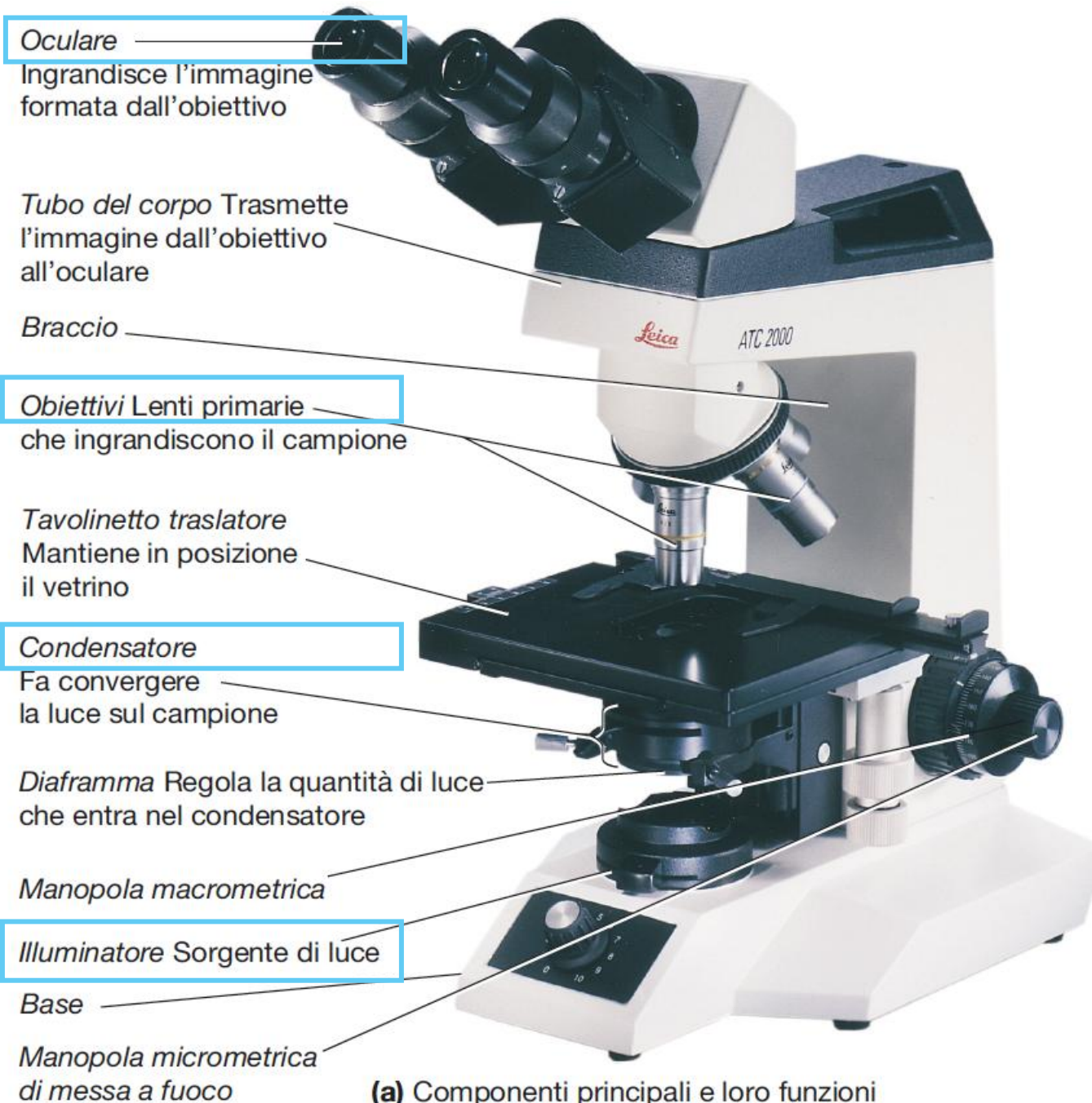
L'**oculare** ingrandisce l'immagine proveniente dall'obiettivo.

L'**obiettivo** raccoglie la luce dal campione e forma l'immagine primaria.

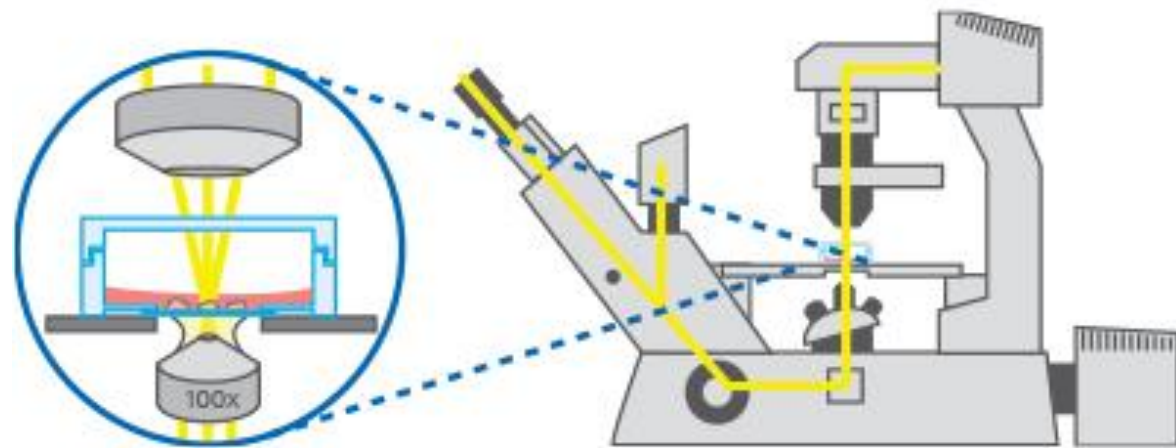
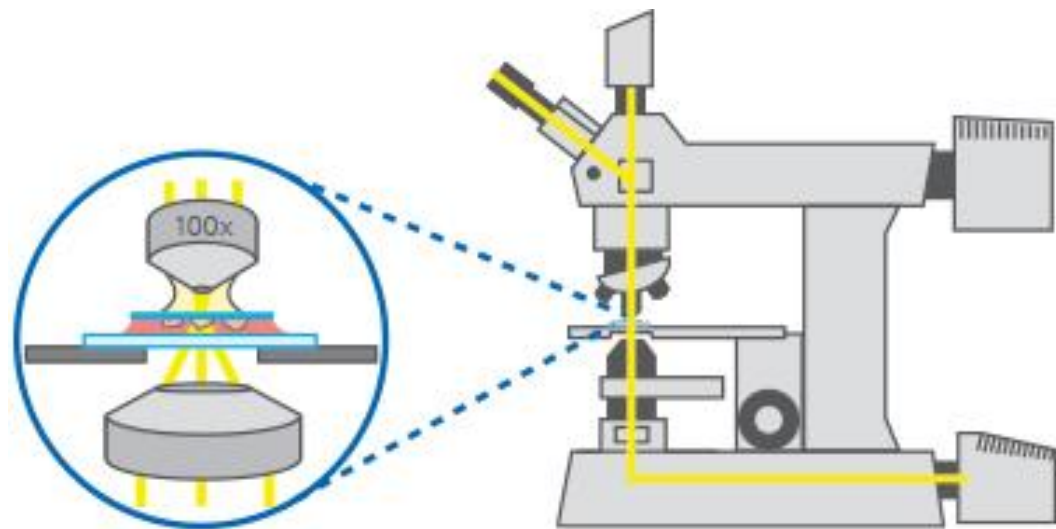
Il **condensatore** raccoglie la luce e la concentra sul campione.

E' fondamentale che il **campione** sia preparato in maniera tale da far passare la luce!!!





(a) Componenti principali e loro funzioni



Microscopio è progettato per 3 funzioni essenziali

✓ Ingrandimento

✓ Contrasto

✓ Risoluzione

✓ Ingrandimento

Il microscopio ingrandisce in due step:
2 lenti, l'obiettivo e l'oculare, lavorano insieme per produrre l'ingrandimento finale dell'immagine:

$$M_{\text{finale}} = M_{\text{obj}} \times M_{\text{oc}}$$

		Objective			
		4x	10x	40x	100x
Eyepiece	5x	20x	50x	200x	500x
	10x	40x	100x	400x	1000x

} Final magnification

✓ Contrasto

Campo chiaro



Contrasto di fase

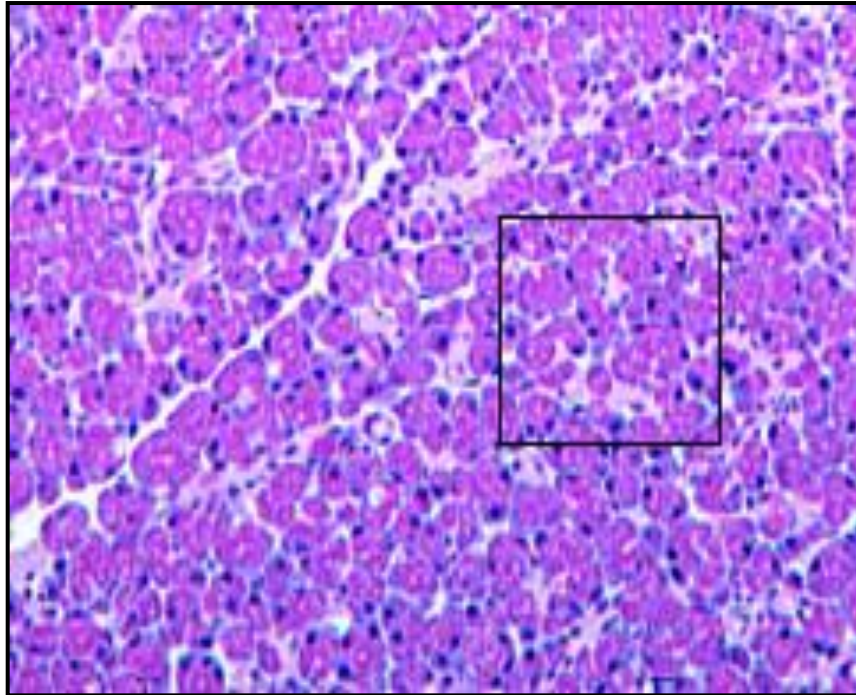


(C)

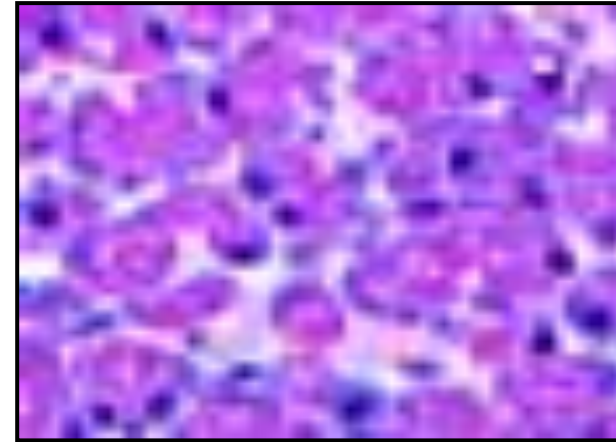


✓ Risoluzione

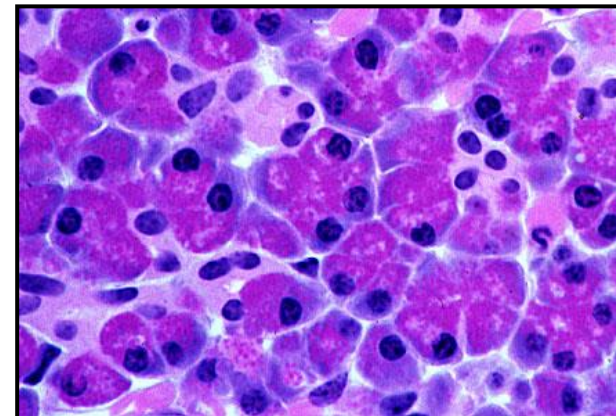
Obiettivo 4x
Oculare 5x



Obiettivo 10x
Oculare 5x



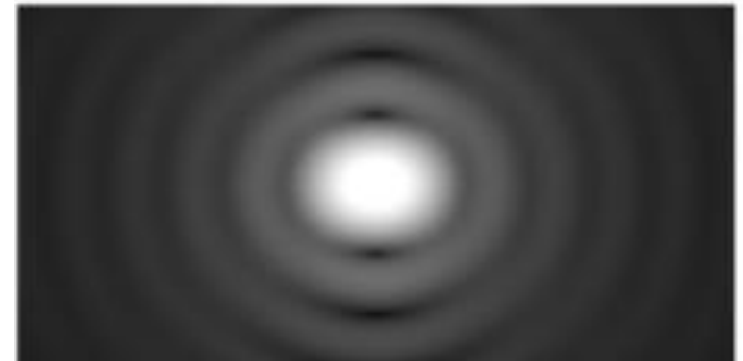
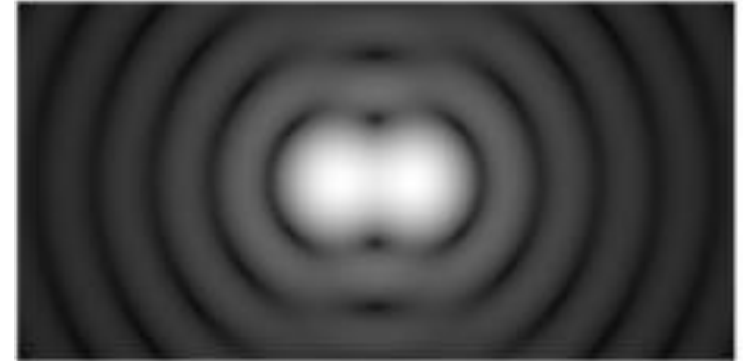
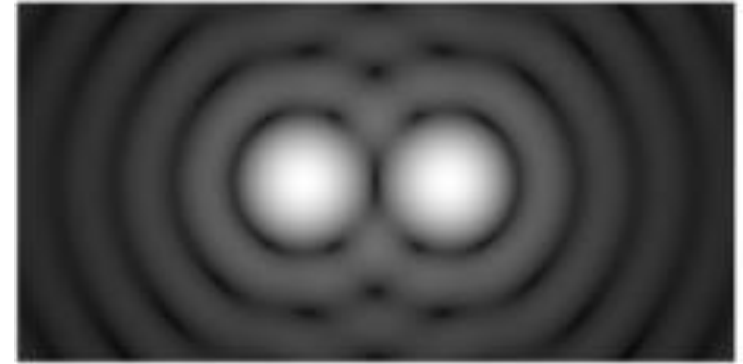
Ingrandimento
a vuoto



Ingrandimento
+
risoluzione

✓ Risoluzione

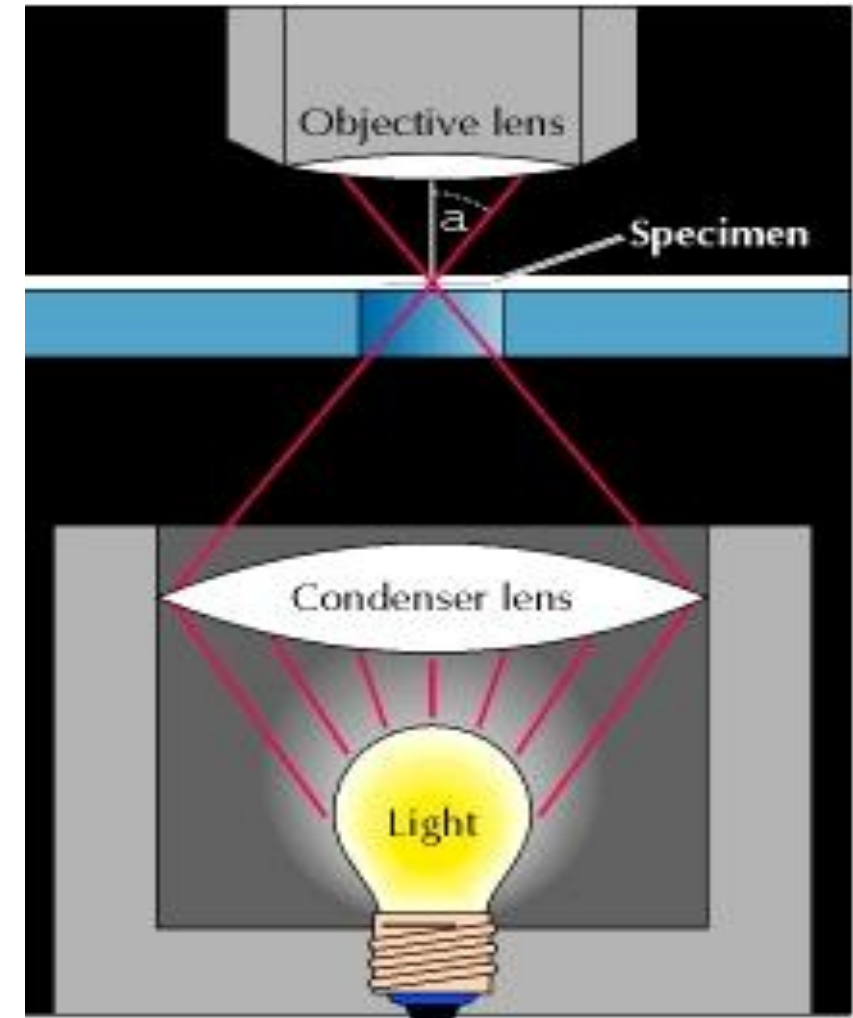
Risoluzione rappresenta la capacità di distinguere oggetti adiacenti come separati l'uno dall'altro.



In un microscopio ottico il limite di risoluzione massimo è di 0.2 -0.3 μm

Il limite di risoluzione del microscopio dipende:

- Dalla capacità della lente dell'obiettivo di raccogliere la luce
- Dal mezzo tra il campione e l'obiettivo
- Dalle caratteristiche della luce (lunghezza d'onda)

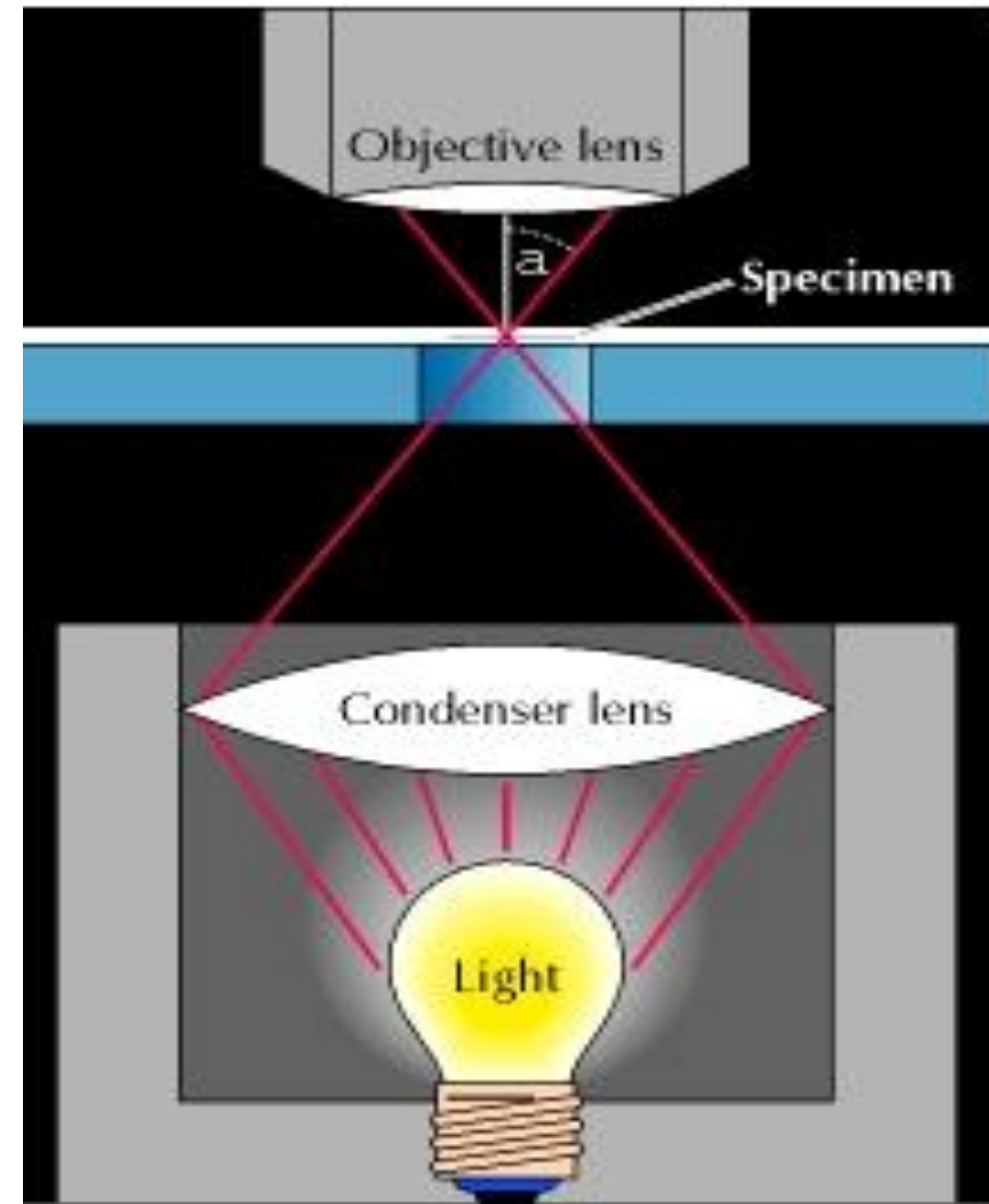


$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{\eta \sin \alpha}$$

$NA = \eta \sin \alpha$ (Apertura Numerica)

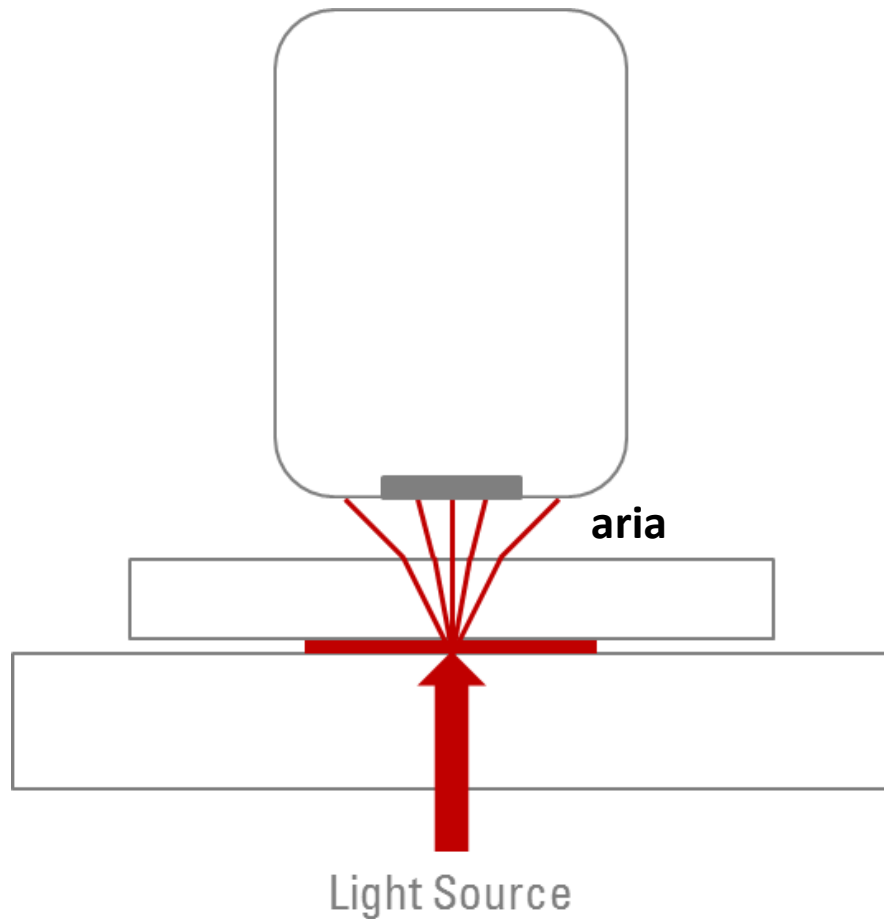
α = semiangolo del cono di luce che entra nell'obiettivo

η = indice di rifrazione del mezzo presente tra il campione e le lenti dell'obiettivo
in aria = 1; in olio = 1.4

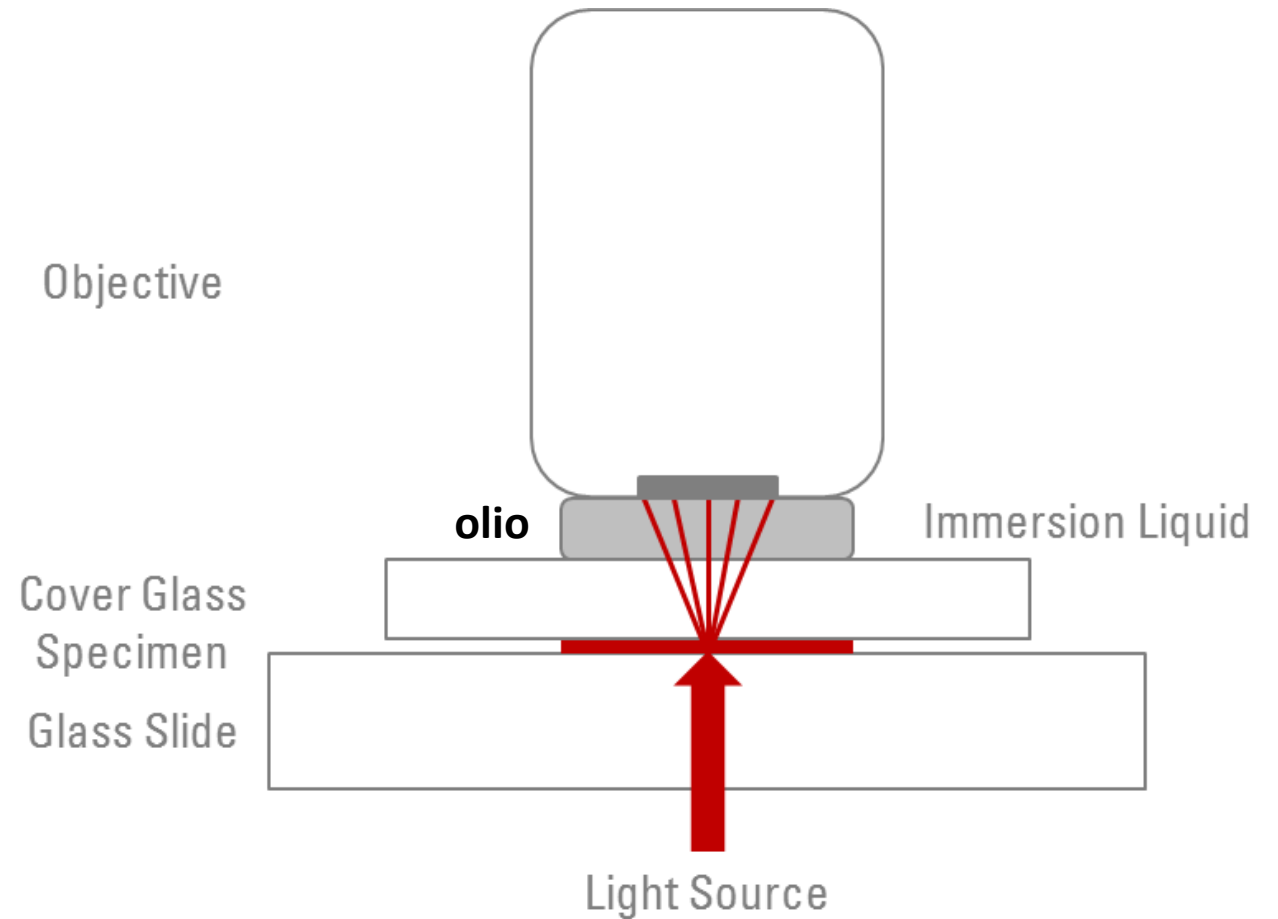


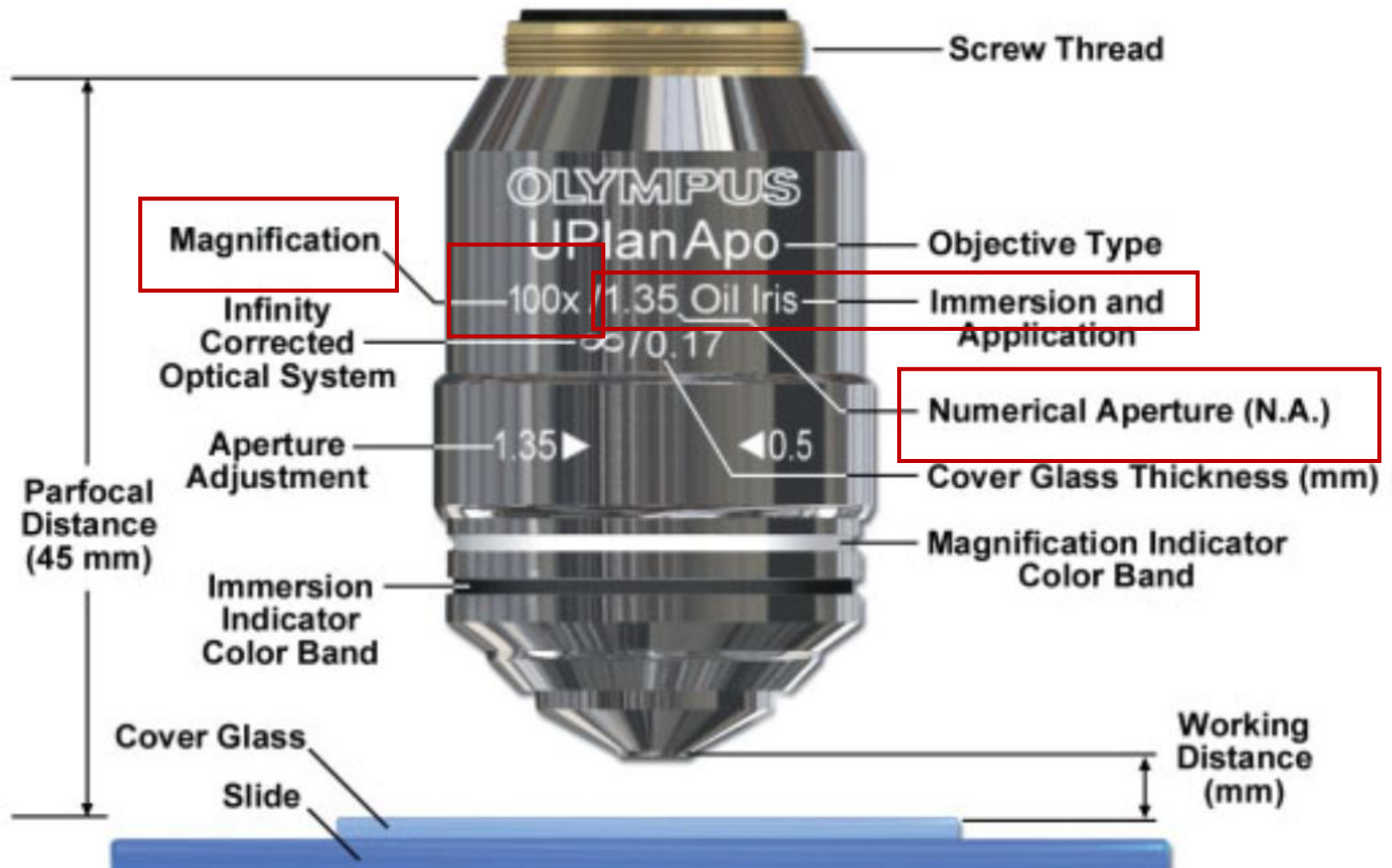
La caratteristica del mezzo (indice di rifrazione) in cui si svolge l'osservazione tra campione e obiettivo influenza la risoluzione.

$$= 0.61 \times 0.5 \text{ mm} / 1 = \mathbf{0.3 \text{ mm (aria)}}$$

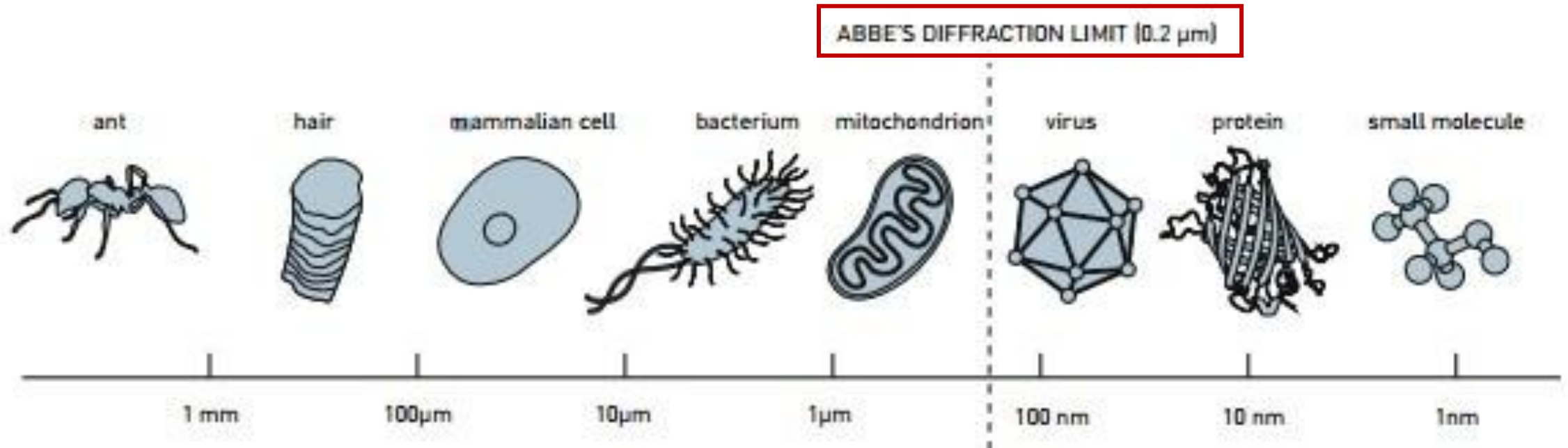


$$= 0.61 \times 0.5 \text{ mm} / 1.4 = \mathbf{0.2 \text{ mm (olio)}}$$





Limite di risoluzione



occhio umano 200 μm

microscopio ottico: 0.2 μm

microscopio elettronico: 0.2-2 nm

Microscopio elettronico

Il primo prototipo di microscopio elettronico fu costruito intorno al 1930 da **Ernst Ruska**, premio Nobel per la fisica nel 1986.

Gli elettroni, che presentano una lunghezza d'onda estremamente breve, possono essere utilizzati come “fonte di luce” in microscopi che raggiungono un potere di risoluzione straordinariamente elevato.

Il microscopio elettronico basa sugli stessi principi del microscopio ottico.

TEM = transmission electron microscopy

SEM = scanning electron microscopy



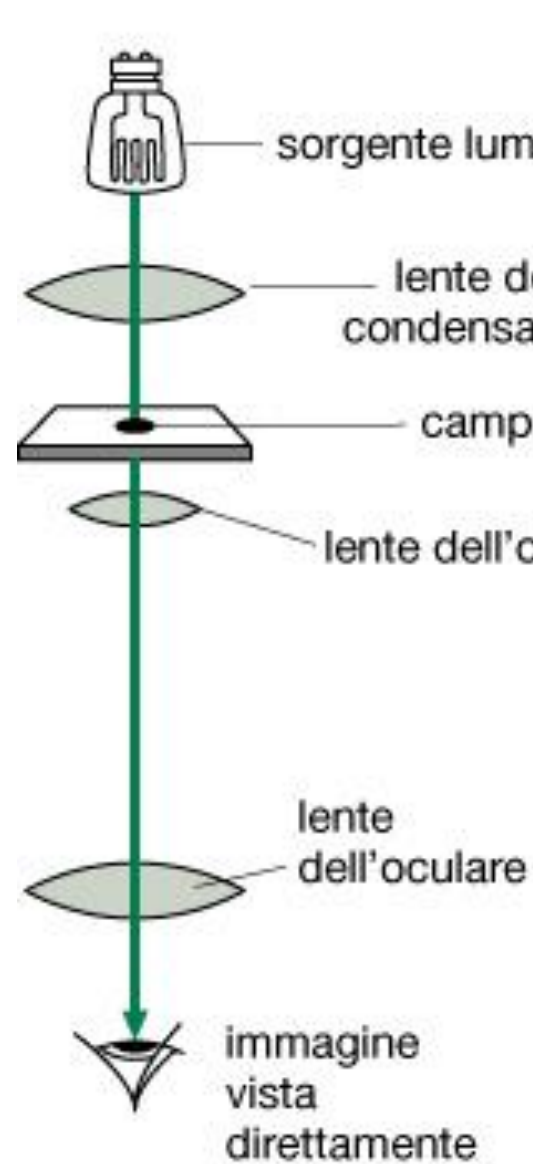
$$\text{Potere di Risoluzione} = \frac{0,61 \times \lambda}{\eta \sin \alpha}$$

Gli elettroni, che presentano una lunghezza d'onda estremamente breve, possono essere utilizzati come “fonte di luce” in microscopi che raggiungono un potere di risoluzione straordinariamente elevato.

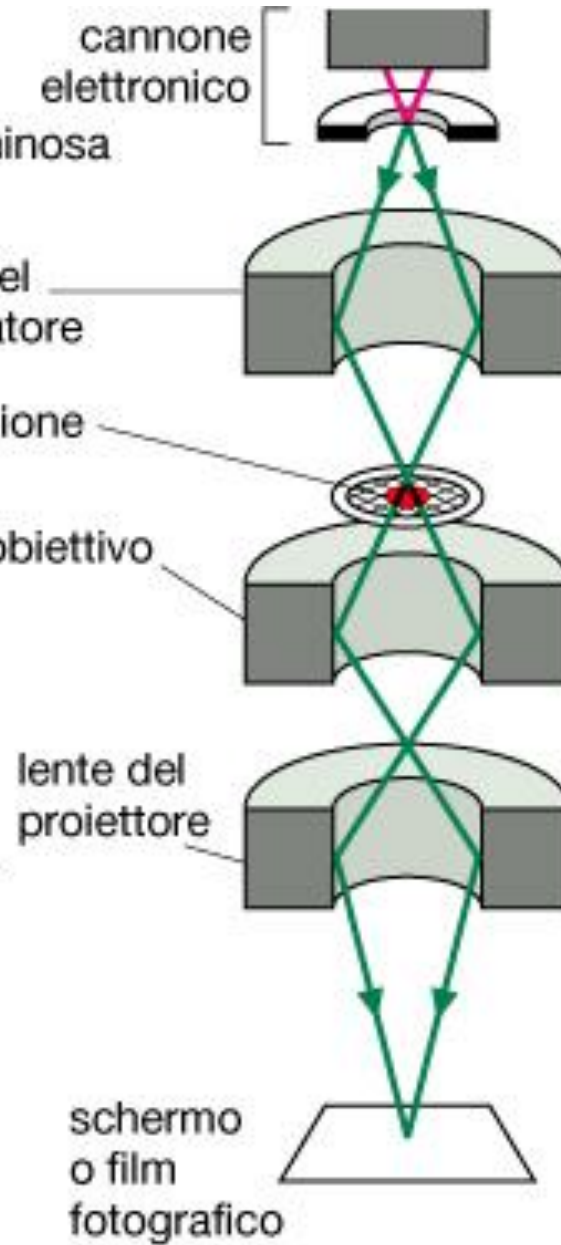
0,02 nm (teorico)
0,1 nm (pratico)
2 nm per i campioni biologici

Ingrandimenti superiori di 100-1000 volte
rispetto al microscopio ottico

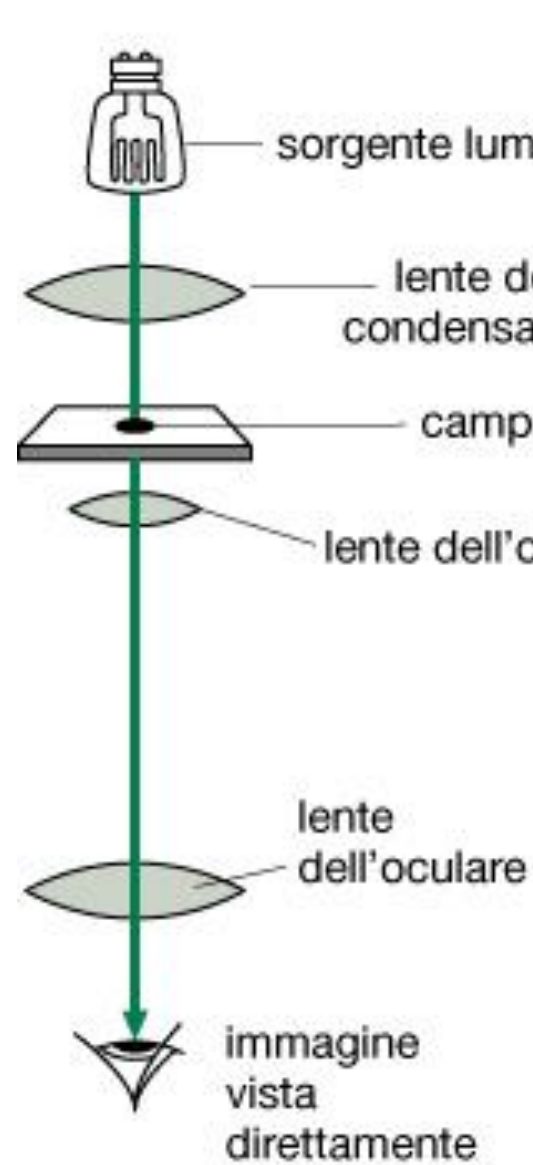
Microscopio **ottico**



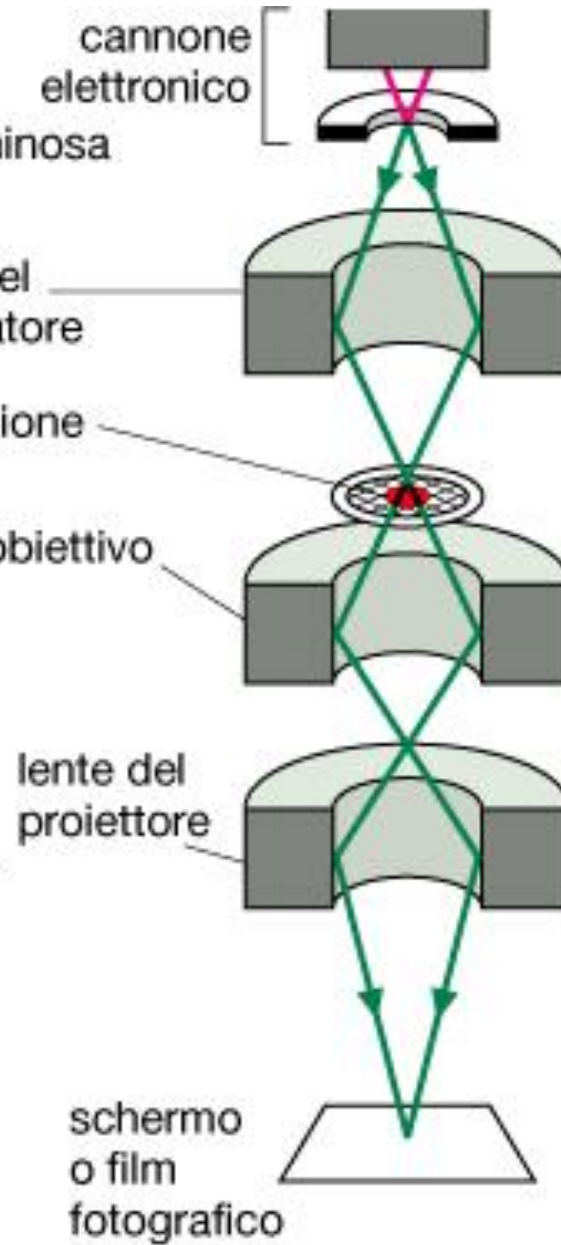
Microscopio **E**lettronico a **T**rasmissione (**TEM**)



Microscopio **ottico**



Microscopio **Elettronico a Trasmissione (TEM)**



Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

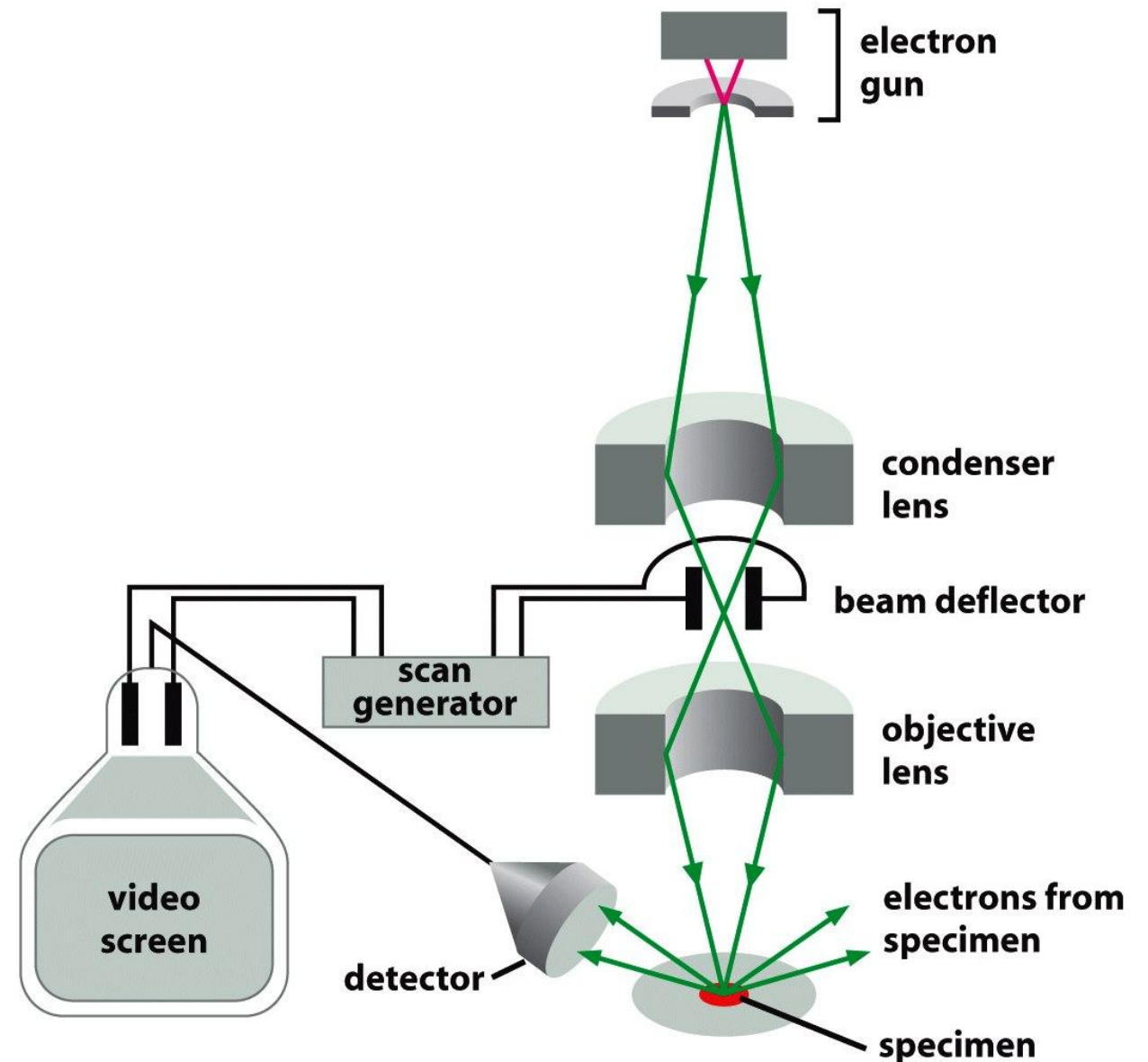
E' principalmente impiegato per lo studio della superficie dei campioni in esame.

Il campione viene fissato e rivestito da uno strato metallico.

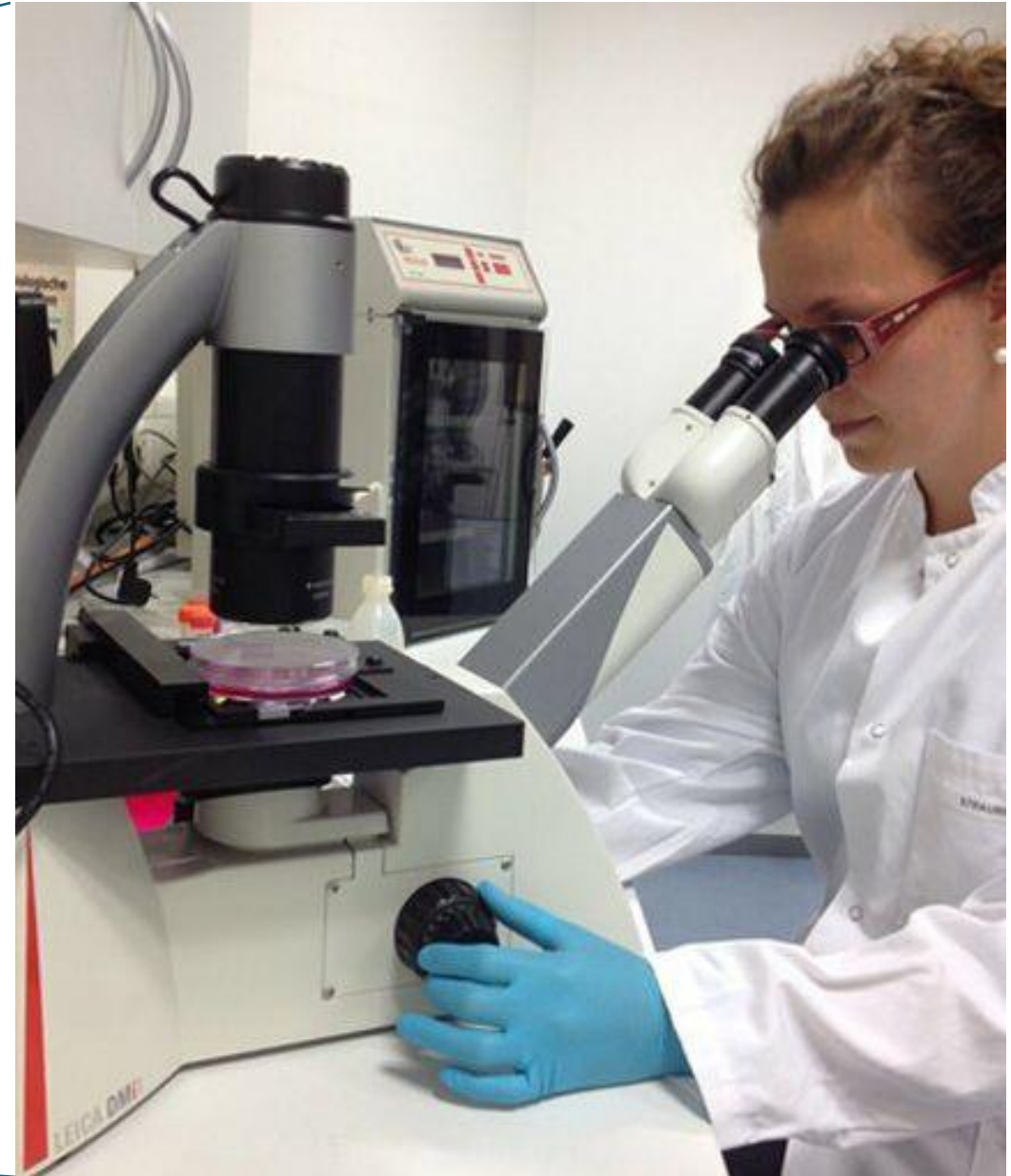
Gli elettroni vengono proiettati sulla superficie del campione da *deflettori di flusso*.

Le molecole del campione eccitate a livelli superiori di energia ed emettono *elettroni secondari*.

Questi vengono visualizzati su uno schermo, ricostruendo una rappresentazione tridimensionale dell'oggetto.

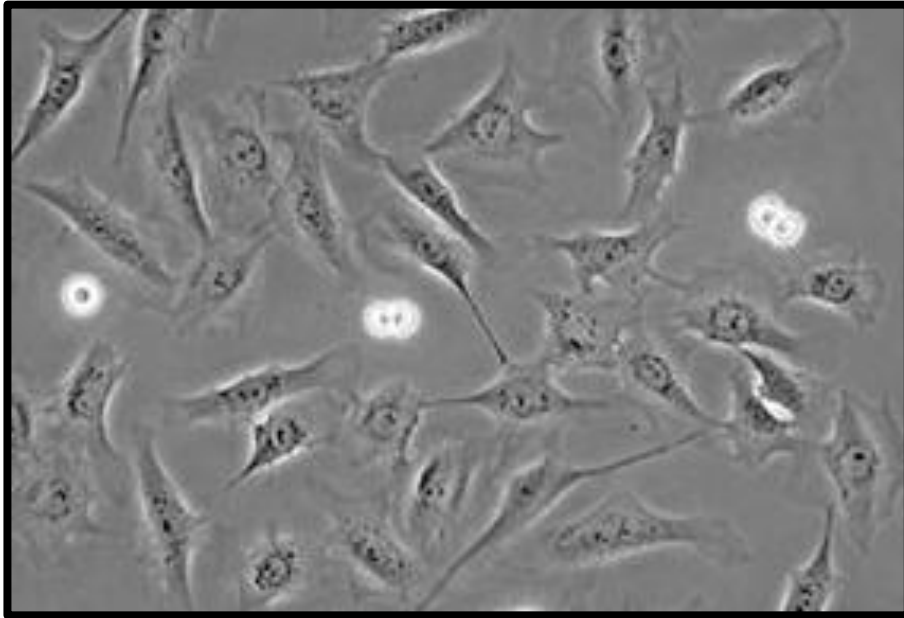


Quale tipo di immagini si ottengono osservando le cellule al microscopio?

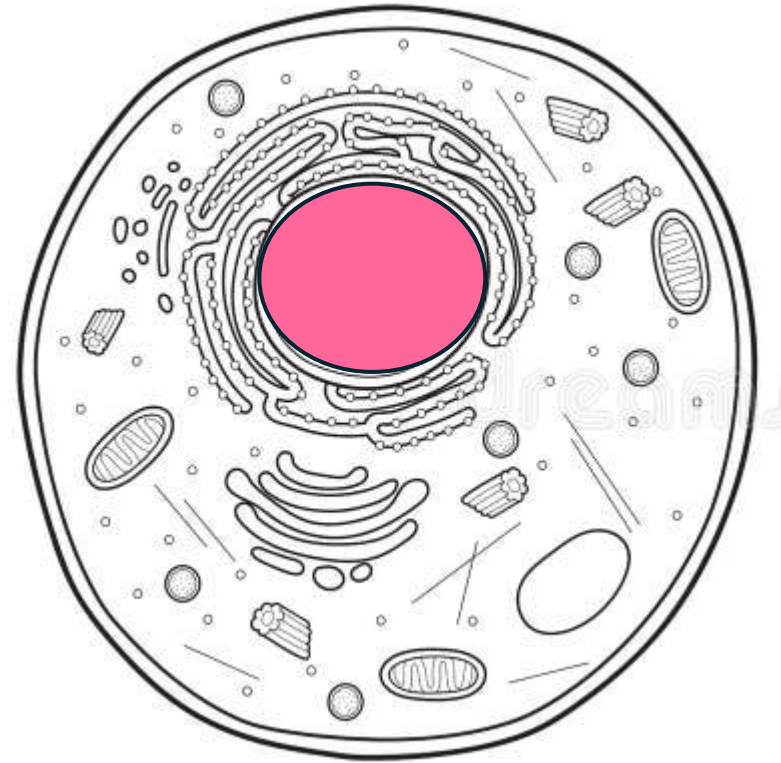


Microscopio a campo chiaro

Cellula di mammifero ~10-50 μm

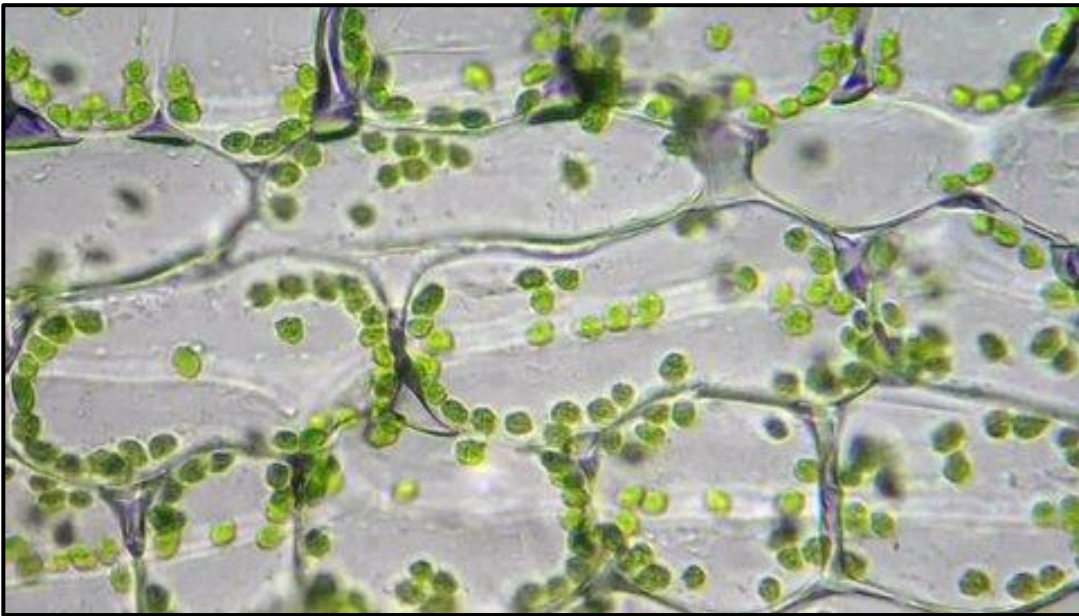


Caratteristiche visibili:
nucleo, granulazioni, cellule in divisione

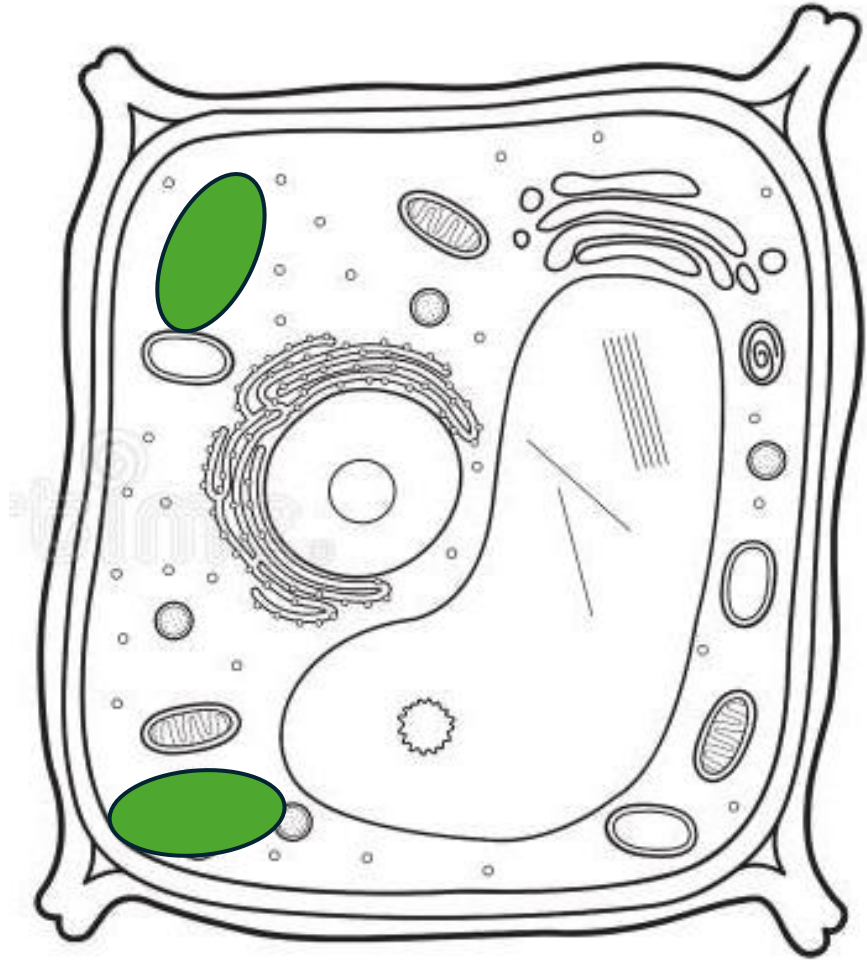


Microscopio a campo chiaro

Cellula vegetale ~10-100 μm



Caratteristiche visibili:
cloroplasti, parete cellulare

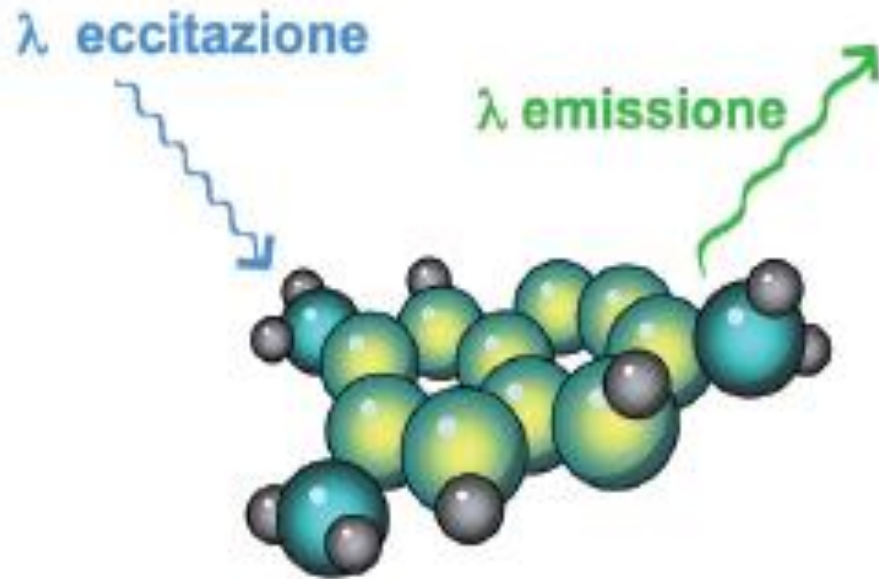


I campioni biologici possono essere colorati:

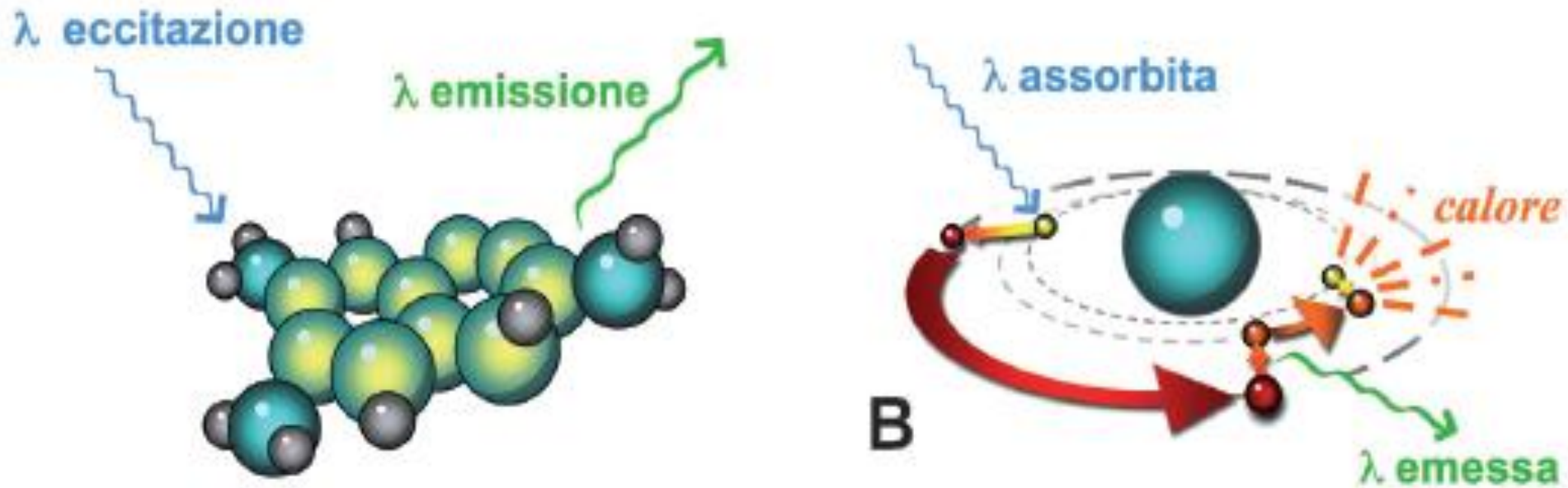
✓ con coloranti istologici

✓ con coloranti fluorescenti

La **fluorescenza** è la proprietà che hanno alcune molecole di assorbire la luce a una particolare lunghezza d'onda e di riemetterla ad una lunghezza d'onda più lunga.

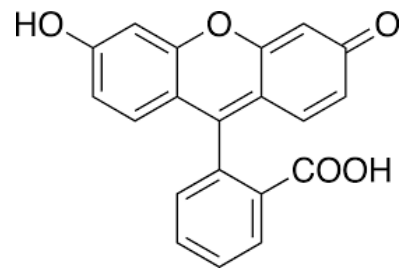


La **fluorescenza** è la proprietà che hanno alcune molecole di assorbire la luce a una particolare lunghezza d'onda e di riemetterla ad una lunghezza d'onda più lunga.

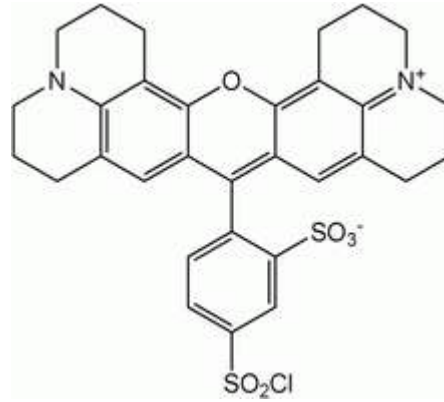


L'assorbimento e l'emissione di fluorescenza avvengono quasi simultaneamente.

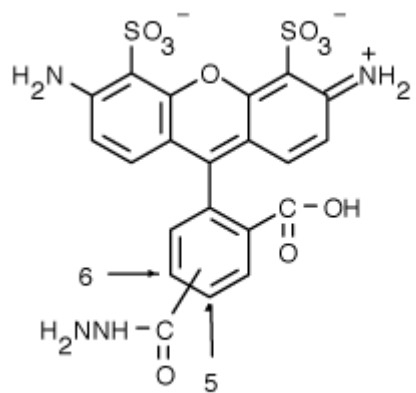
FITC



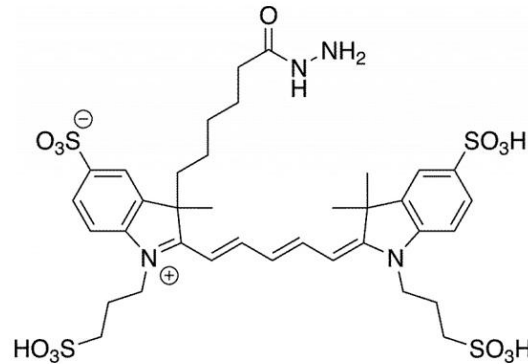
Texas Red



Alexa 488



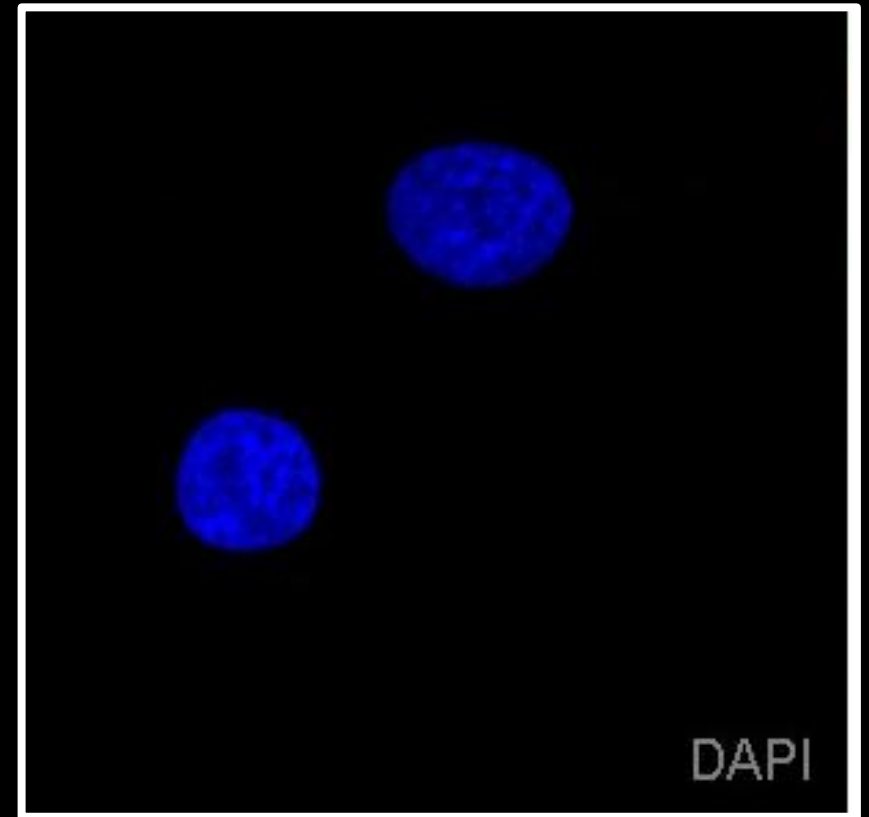
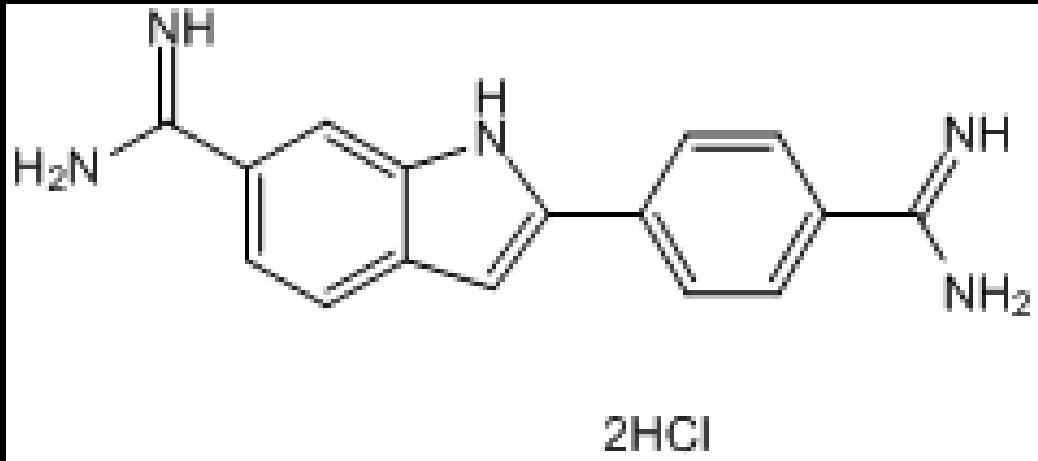
Alexa 647



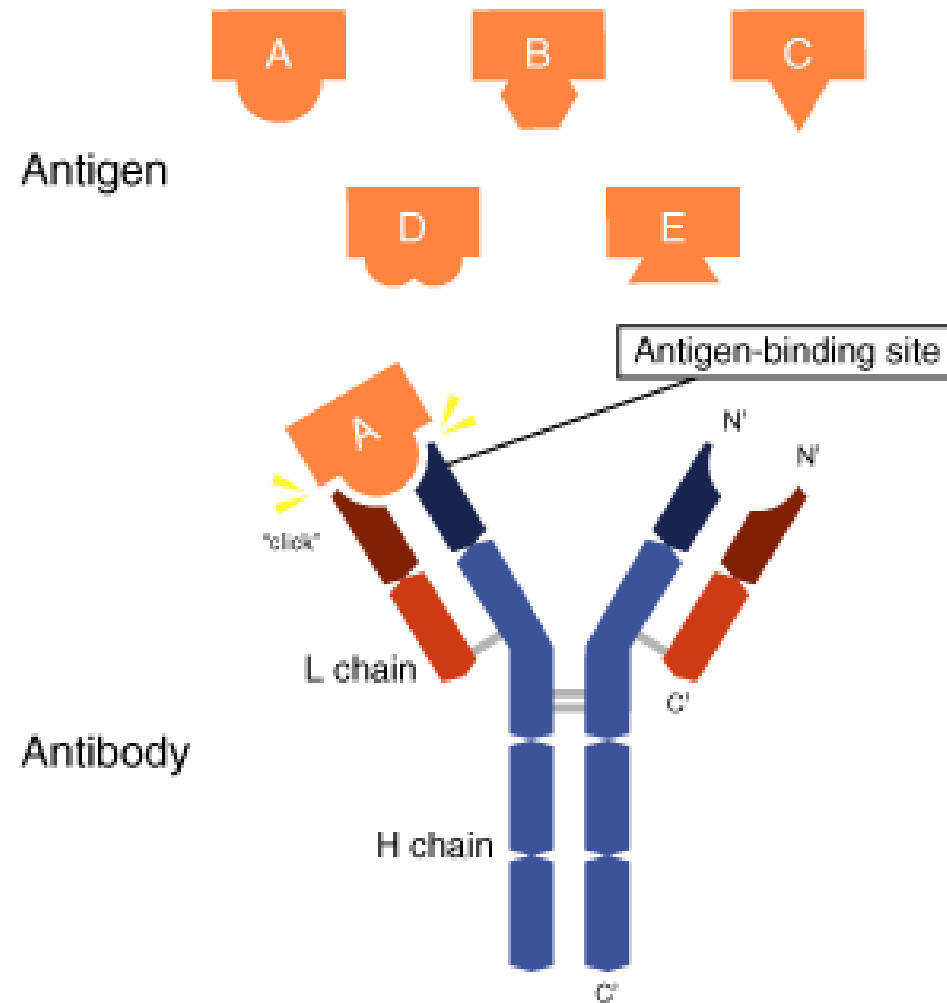
Fluorocromo	Max eccitazione	Max emissione
A FITC	495	519
Alexa 488	499	520
Oregon Green	513	533
PI	538	603
TRITC	552	578
Alexa 568	577	603
Texas Red	595	613
Cy5	648	665
Alexa 660	663	691
B Clorofilla a	430	670
Clorofilla b	460	650
C CFP	430	474
GFP	494	510
YFP	520	535
DsRed	553	585

I fluorofori possono essere coniugati ad altre molecole.

Il DAPI è colorante fluorescente che si lega al DNA delle cellule.



Gli anticorpi sono in grado di riconoscere e legare molto selettivamente proteine specifiche.



Gli anticorpi possono essere coniugati a fluorofori per l'identificazione delle proteine al microscopio (*immunofluorescenza*).

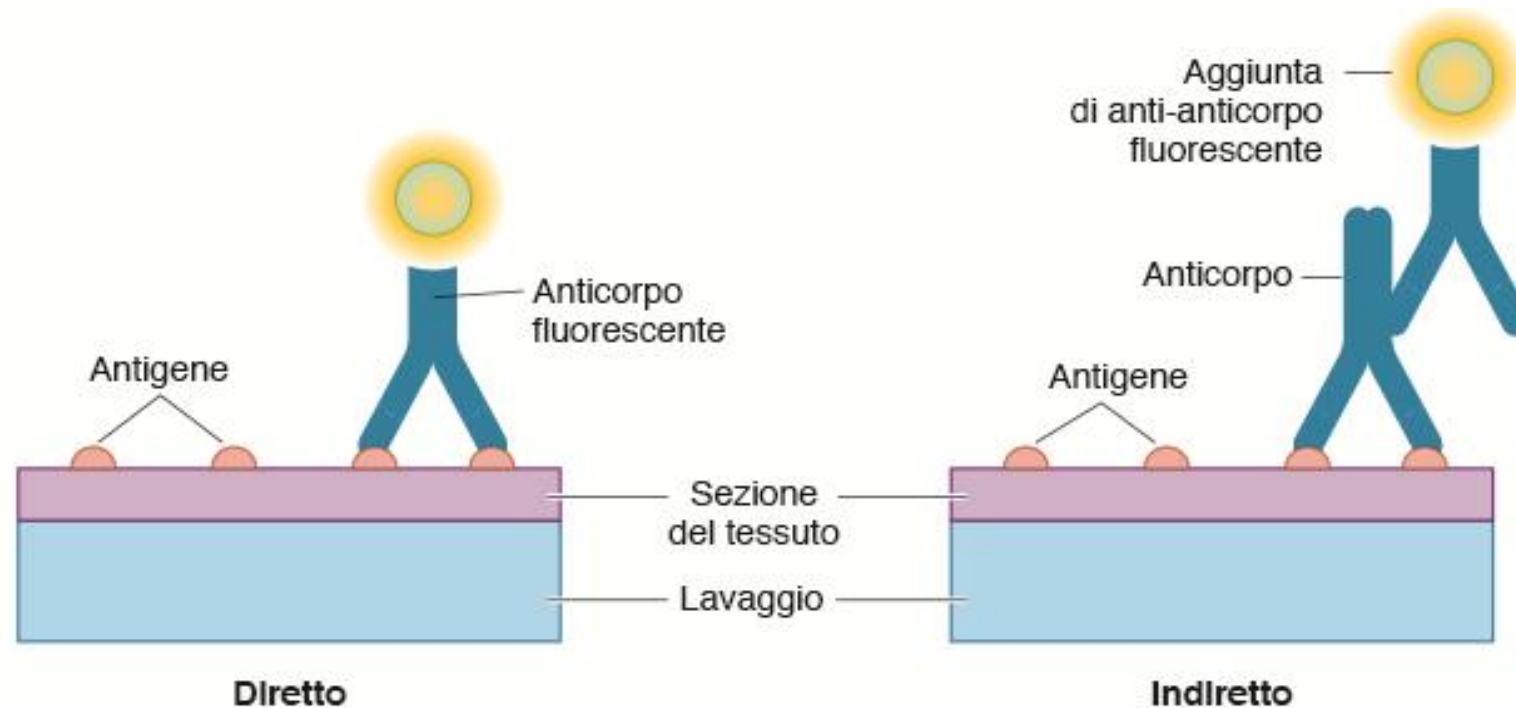
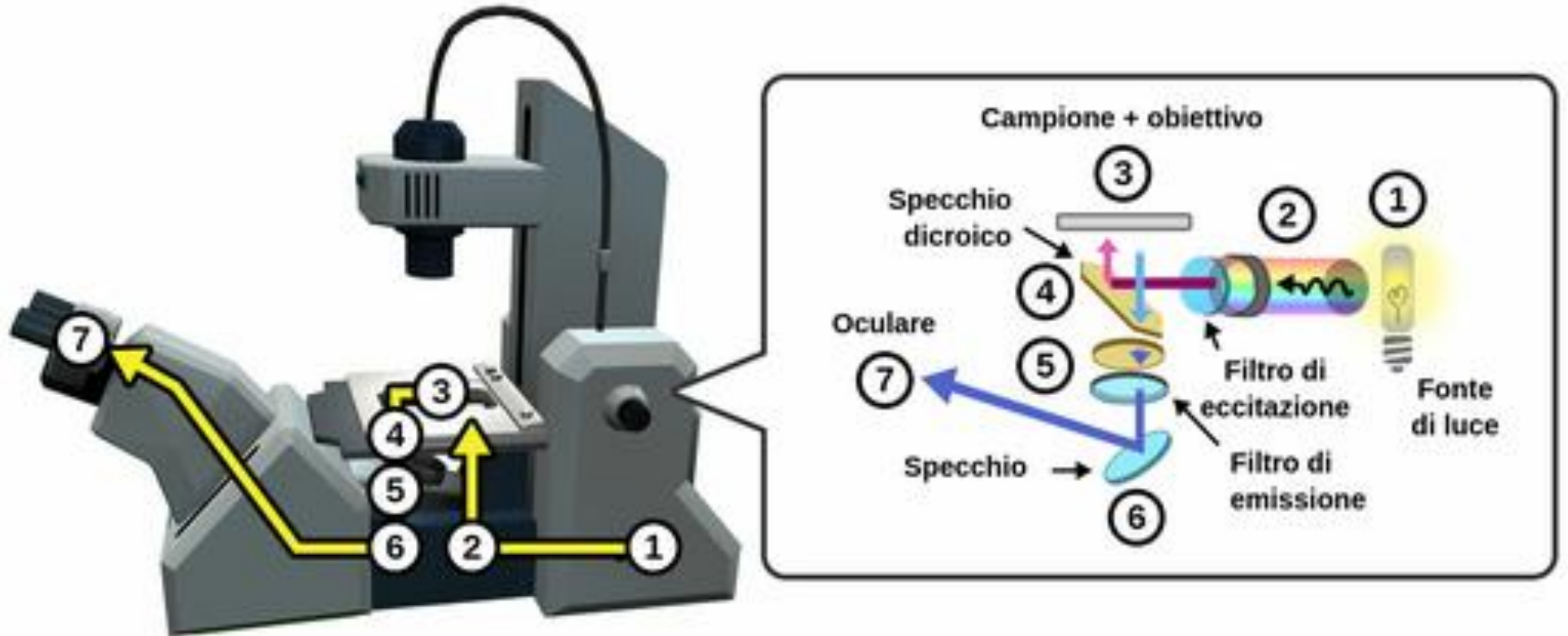
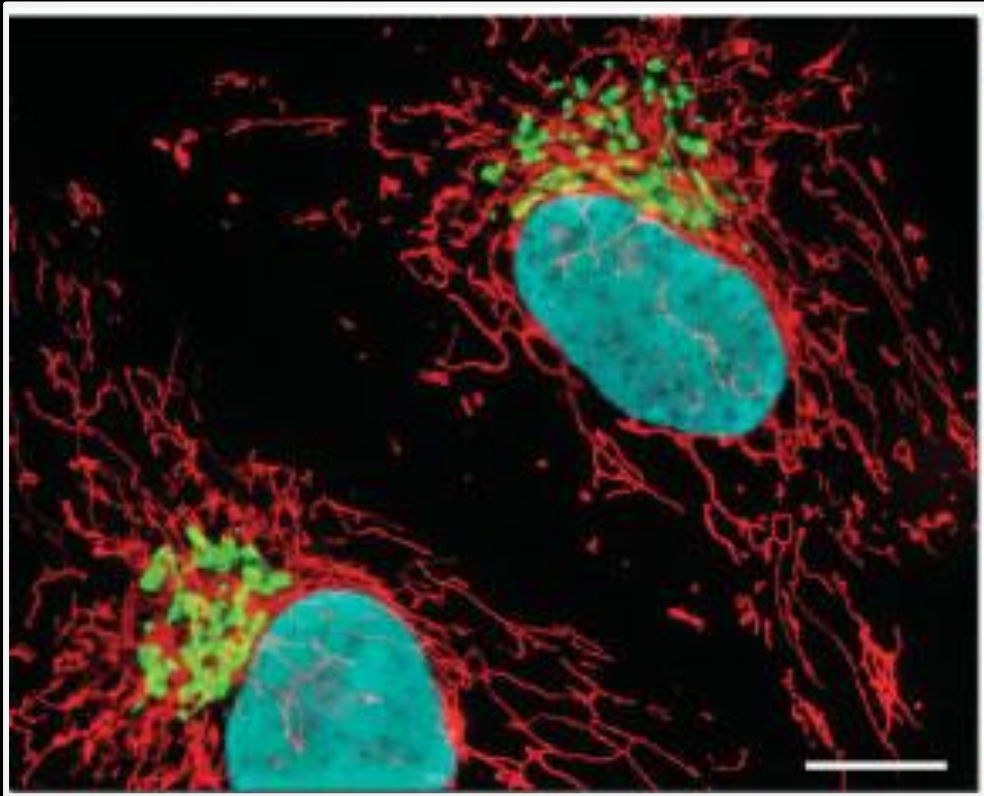


Figura 2.31 ▲ Metodo immunoistochimico diretto ed indiretto. A sinistra, un anticorpo diretto contro un antigene è stato marcato con un colorante fluorescente ed osservato al microscopio a fluorescenza. La fluorescenza è osservabile solo dove si è localizzato l'anticorpo. A destra, anticorpi fluorescenti vengono preparati contro un anticorpo che a sua volta va ad interagire con un particolare antigene. Se si osserva al microscopio a fluorescenza, la zona fluorescente rappresenta il punto di localizzazione dell'anticorpo.

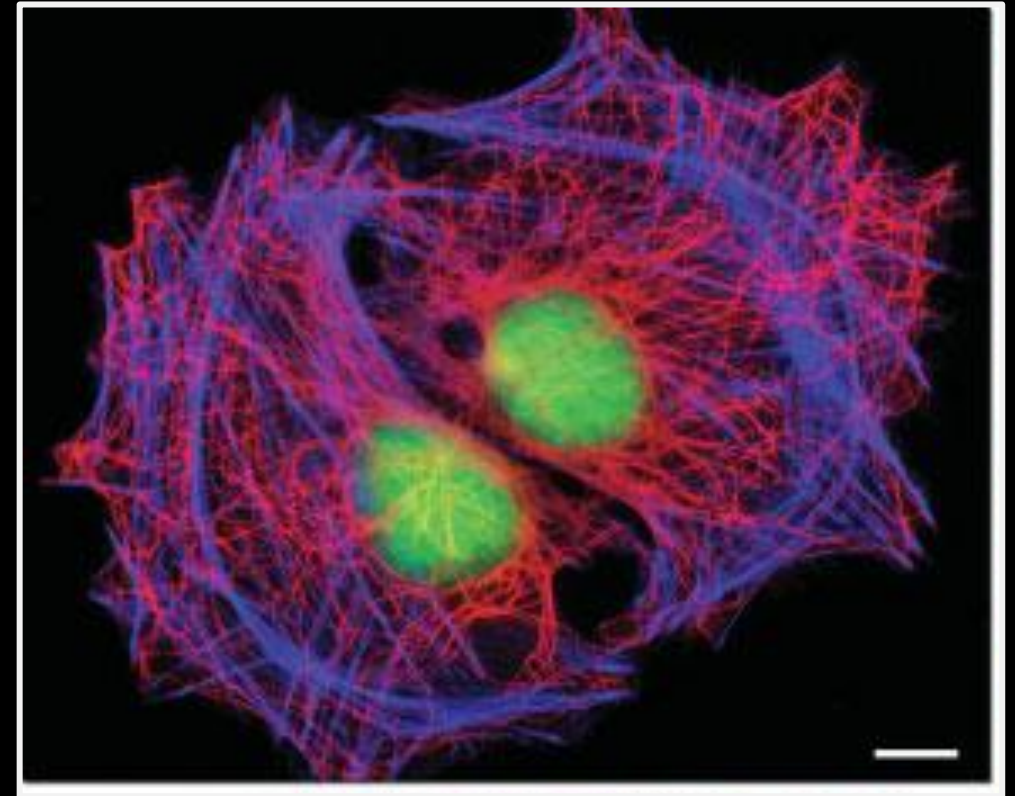
I campioni biologici colorati con molecole fluorescenti vengono osservati in un microscopio ottico a fluorescenza, che contiene dei componenti aggiuntivi per selezionare le lunghezze d'onda opportune per i coloranti fluorescenti utilizzati.



L'immunofluorescenza consente di visualizzare contemporaneamente proteine diverse nella stessa cellula.



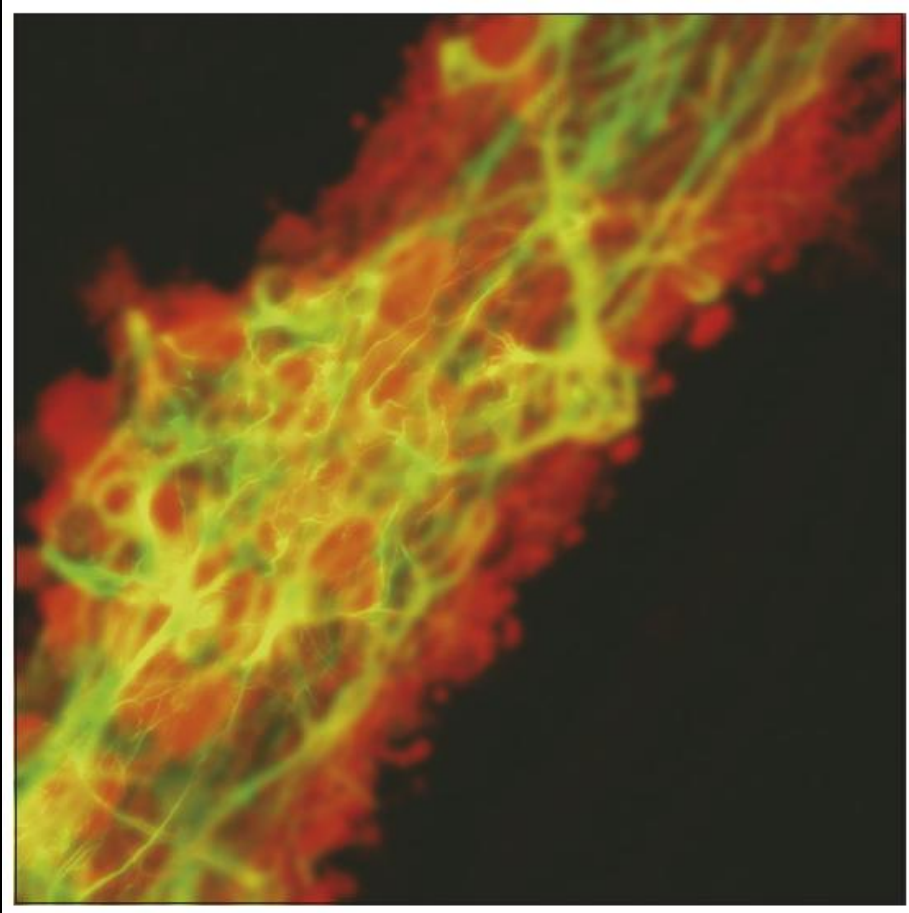
Nucleo = azzurro
Mitocondri = rosso
Apparato di Golgi = verde



Nucleo = verde
Microtubuli = blu
Filamenti di actina = rosso

Il **CLSM** (***Confocal Laser Scanning Microscope***) è un microscopio a fluorescenza che permette di focalizzare un laser sul preparato e di raccogliere la luce proveniente solo da un piano focale, aumentando notevolmente la qualità (dettaglio e contrasto) dell'immagine.

Epifluorescent microscope



Confocal laser scanning microscope

