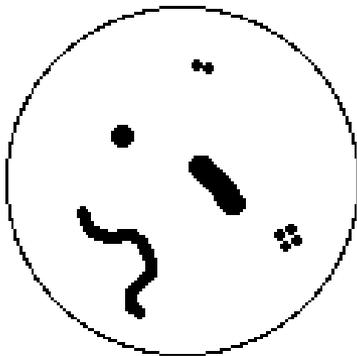


Tipi di microscopio ottico

Microscopio brightfield: quello piu' usato: il campione e' retroilluminato

Microscopio darkfield: il campione e' illuminato lateralmente e viene osservato con uno sfondo nero

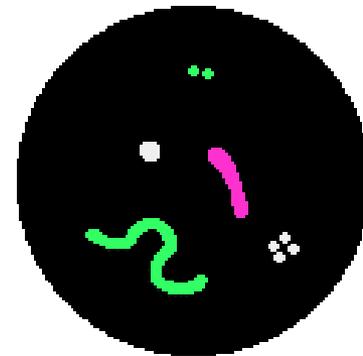
Microscopio a fluorescenza: il campione e' illuminato da una sorgente a raggi ultravioletti e il campione fluoresce naturalmente o fluorescono i coloranti (dye) precedentemente legati al campione.



Brightfield
Microscope



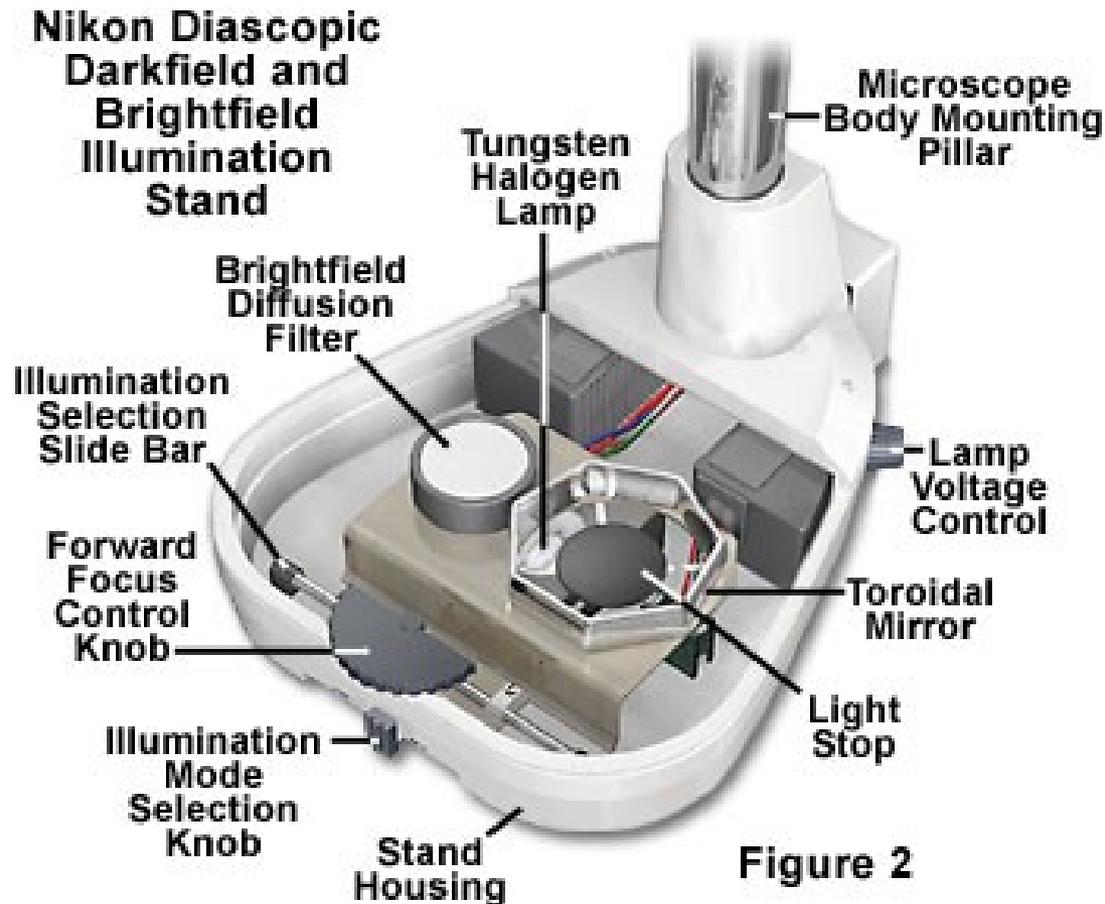
Darkfield
Microscope



Fluorescence
Microscope

Illuminazione Darkfield

Per avere uno schema di illuminazione in brightfield si ha bisogno di uno specchio riflettente e uno schermo per bloccare la luce per formare un cono di illuminazione inverso.



Fiber Optic Ring Light Darkfield Illuminator

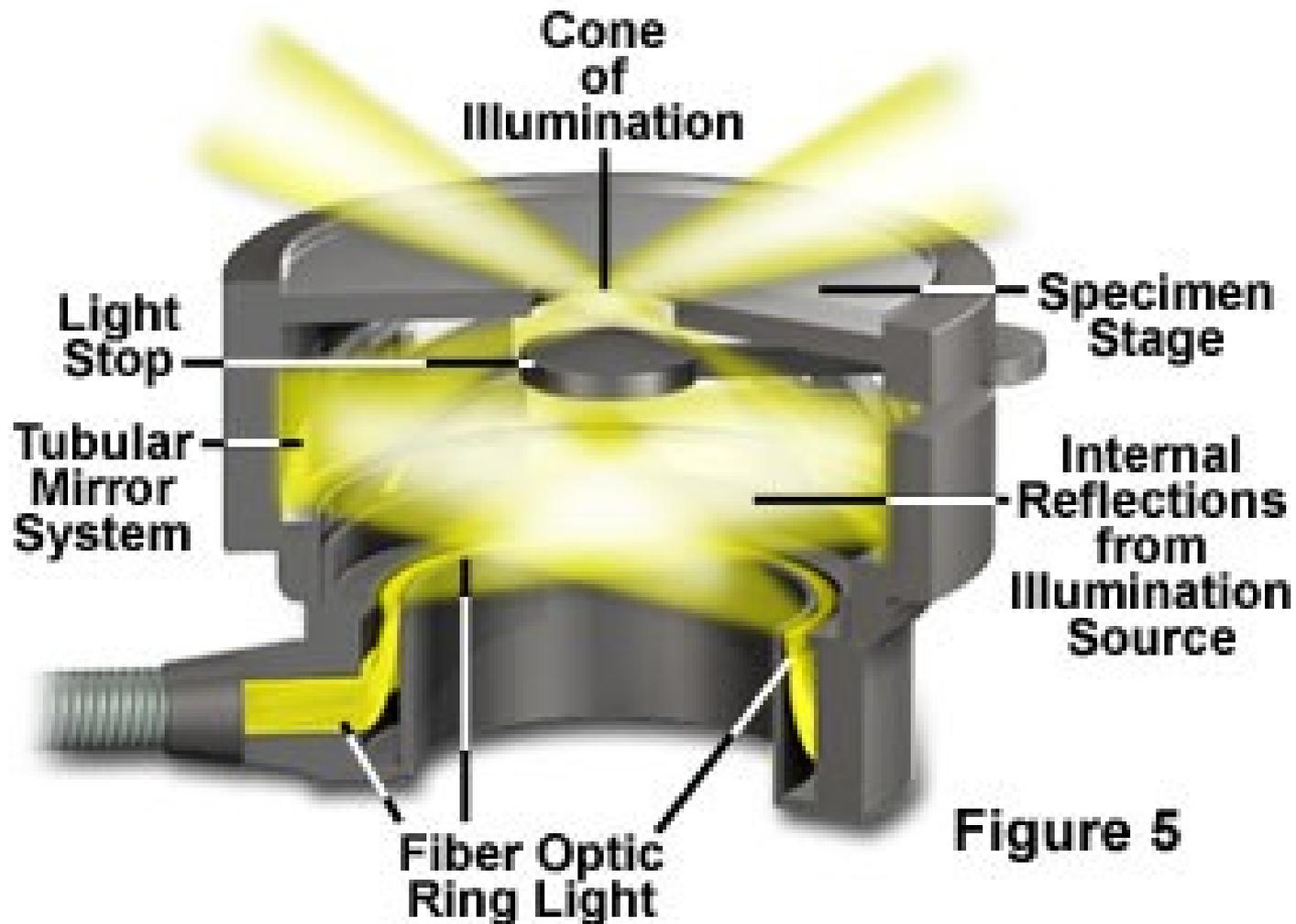


Figure 5

Toroidal and Conventional Darkfield Condensers

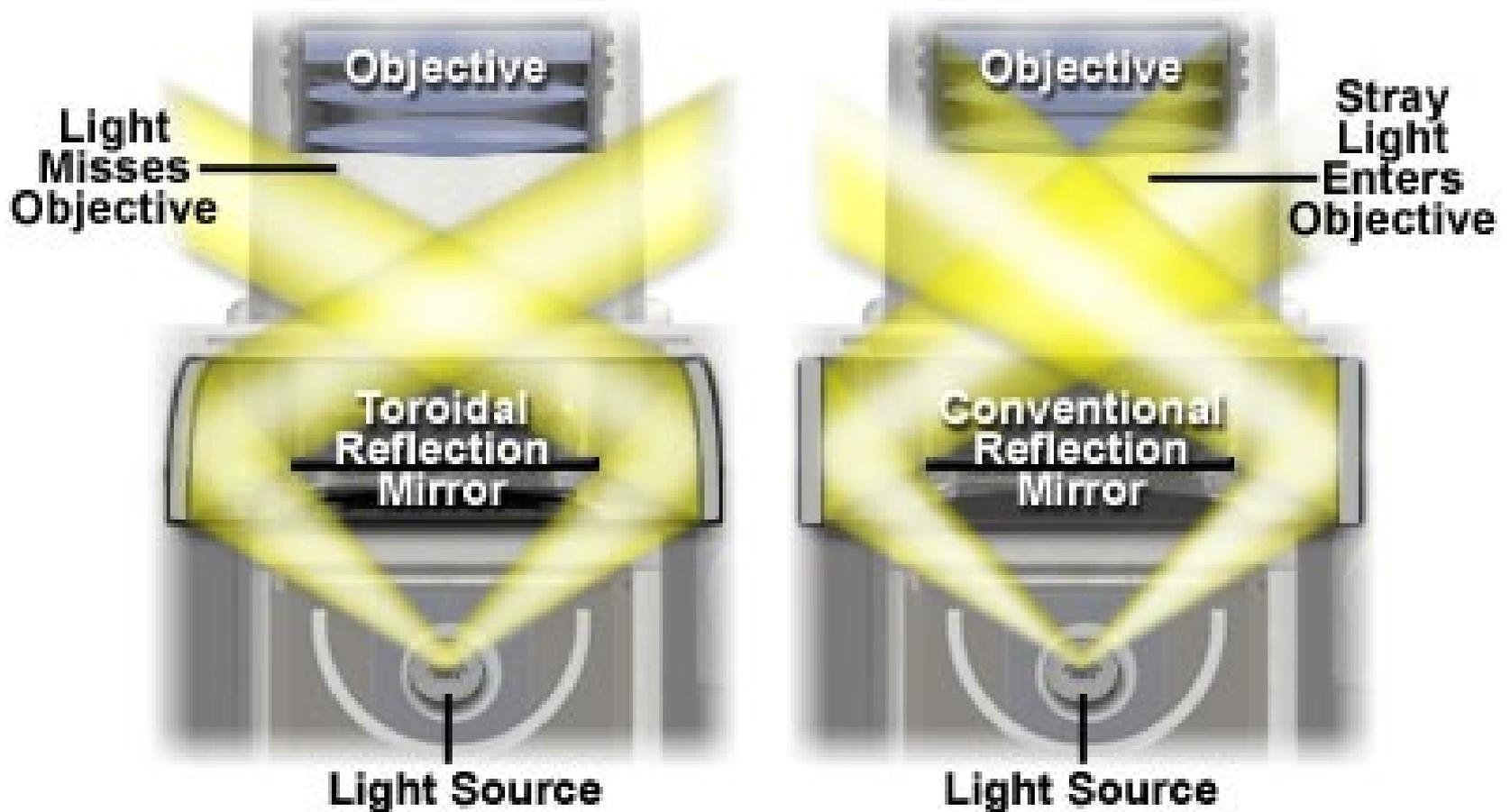
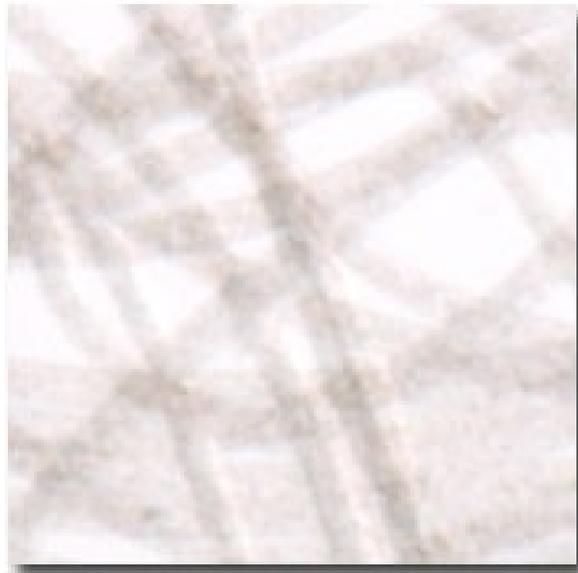
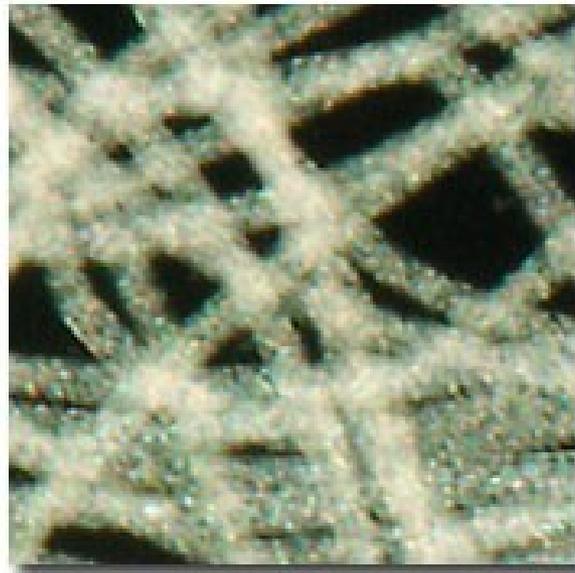


Figure 3

Fibers in Brightfield and Darkfield Illumination



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 4

Brightfield vs Darkfield

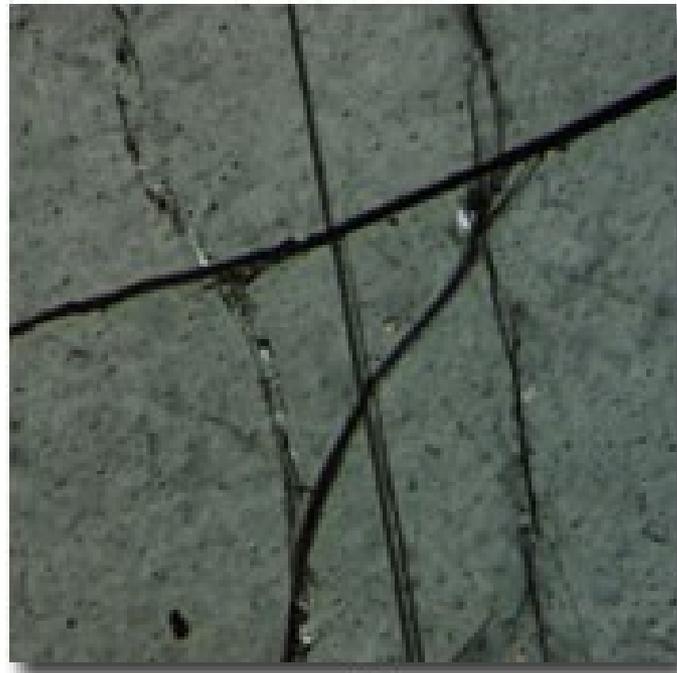


(a) Brightfield



(b) Darkfield

Image Brightness in Polarized Light Microscopy



(a)



(b)

Figure 4

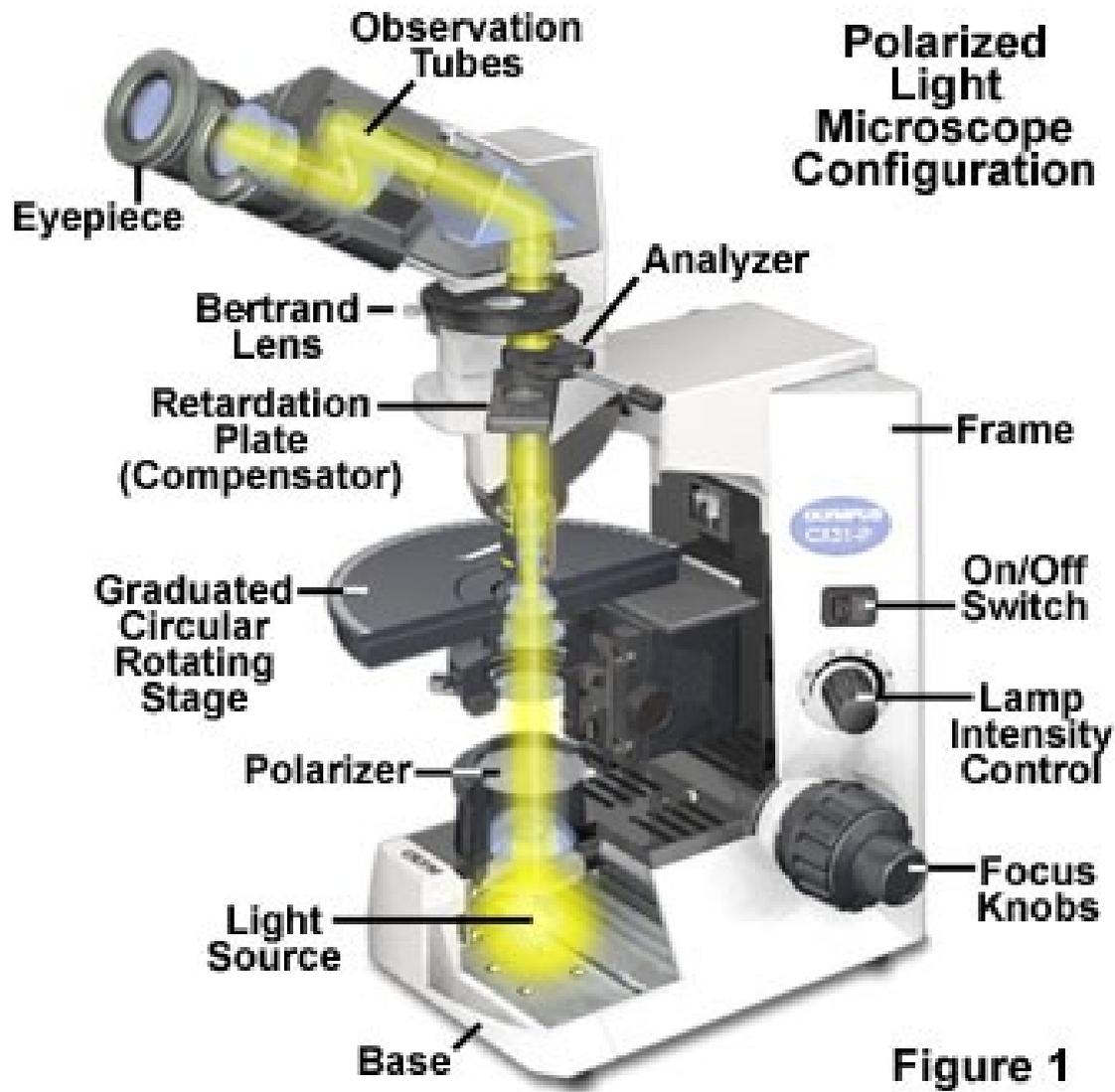
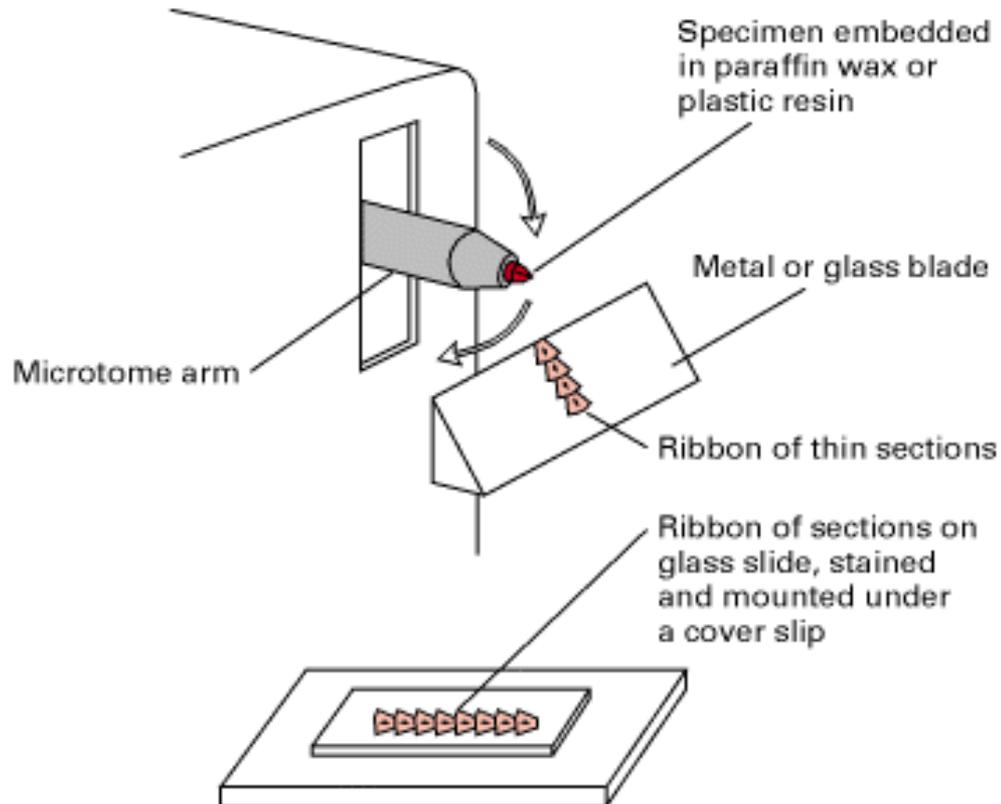


Figure 1

Preparazione dei campioni per microscopio ottico

- I campioni per la microscopia ottica sono normalmente fissati con una soluzione contenente alcool o formaldeide che denatura la maggior parte delle proteine e acidi nucleici. Questo rende le molecole insolubili e stabili.
- I campioni sono poi montati su paraffina o plastica e poi tagliati in strati sottili di uno o due micrometri.



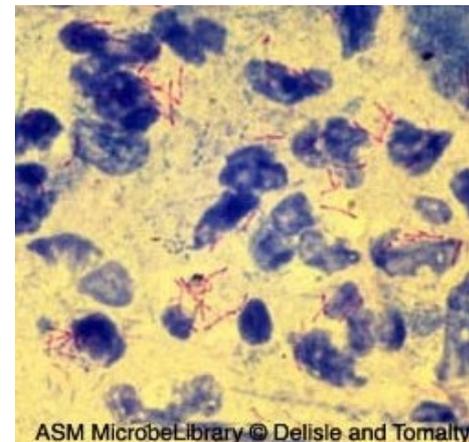
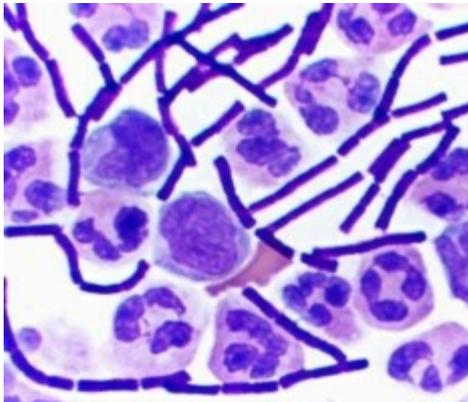
Preparazione dei campioni per microscopio ottico

Spesso pur utilizzando microscopi con risoluzioni adeguate a quello che si vuole individuare non si riesce a distinguerle perchè hanno colori più o meno simili.

La maggior parte dei costituenti cellulari non sono colorati e assorbono più o meno lo stessa intensità di luce (risultano trasparenti).

Per distinguere alcune parti delle cellule queste vengono colorate.

Alcune sostanze, usate come coloranti, si legano alle molecole evidenziandole.



Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è ancora una microscopia ottica.

Si tratta di illuminare il campione con luce ultravioletta in modo da eccitare il campione fluorescente o il colorante fluorescente precedentemente introdotto nel campione.

Principle of Excitation and Emission

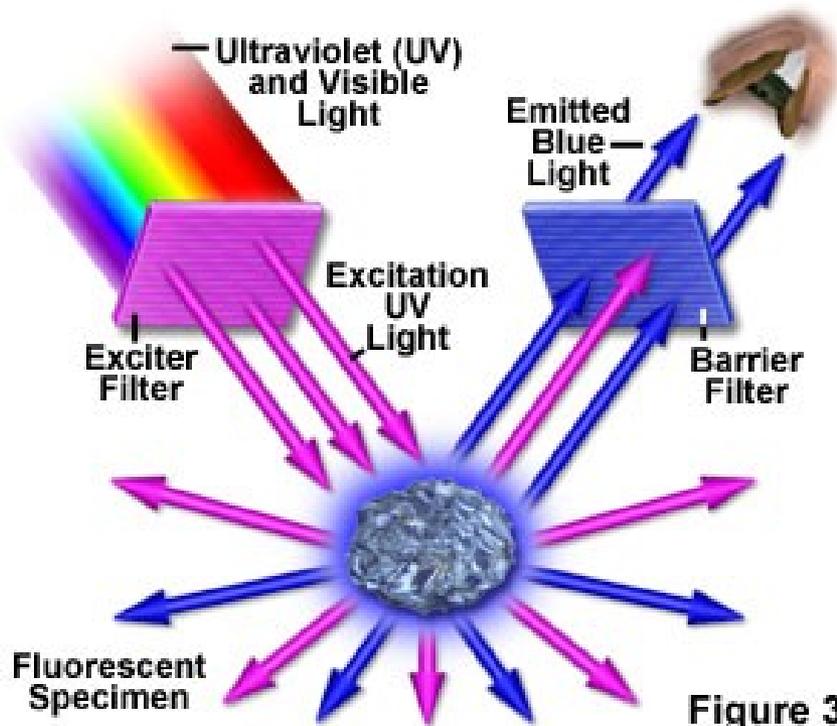


Figure 3

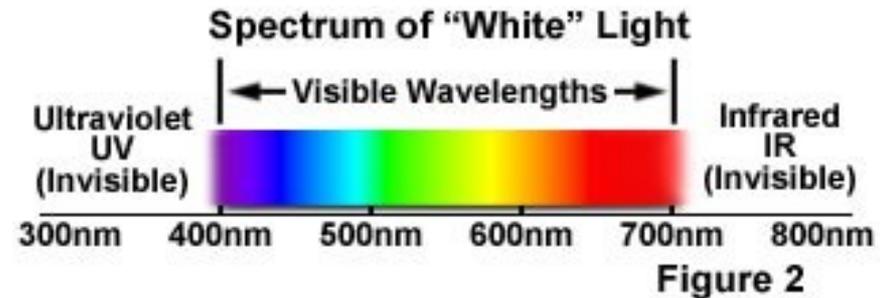
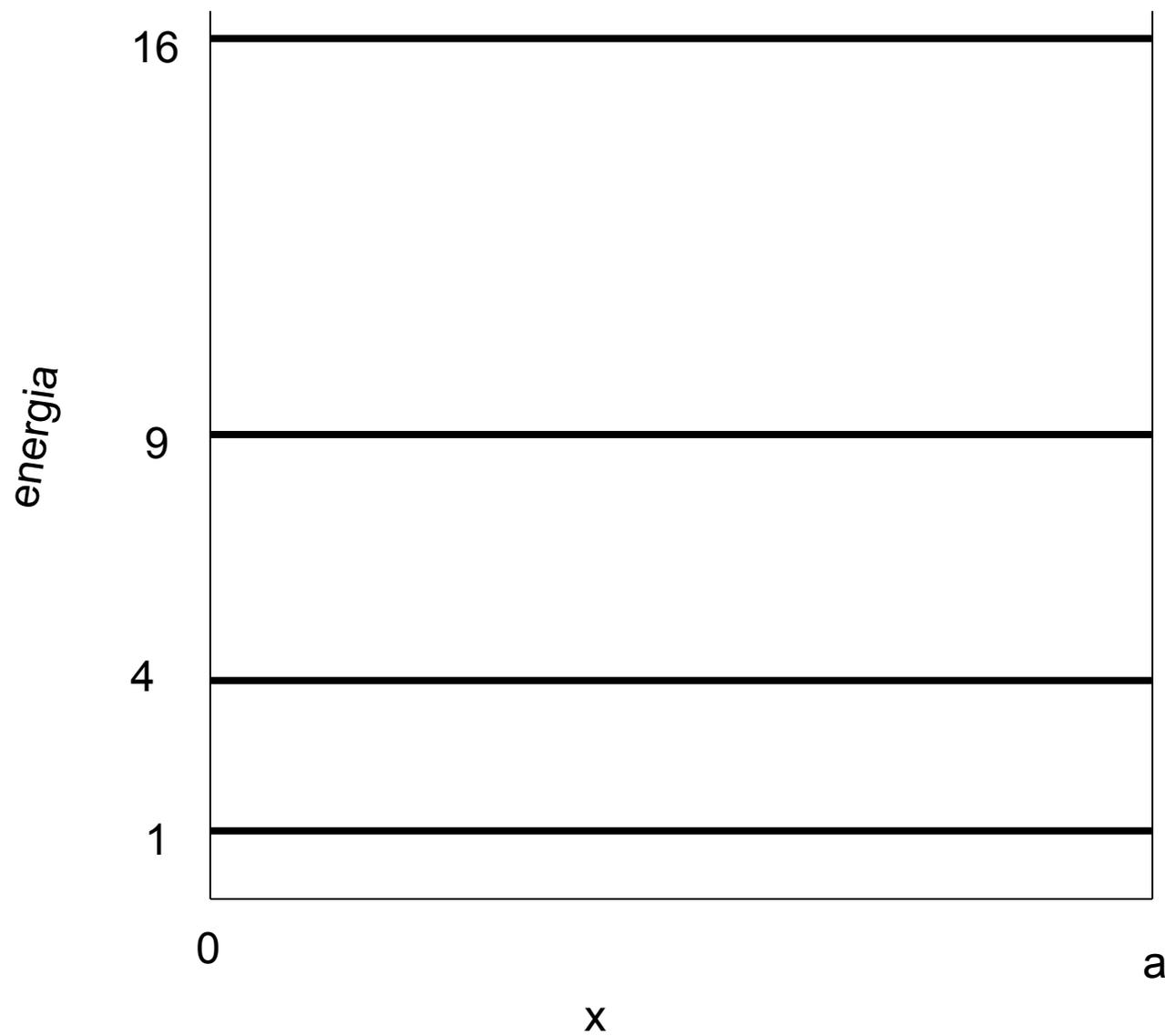


Figure 2

Particella in una scatola



Processi di assorbimento

L'energia disponibile per i processi di assorbimento e' legata alla legge di Planck :

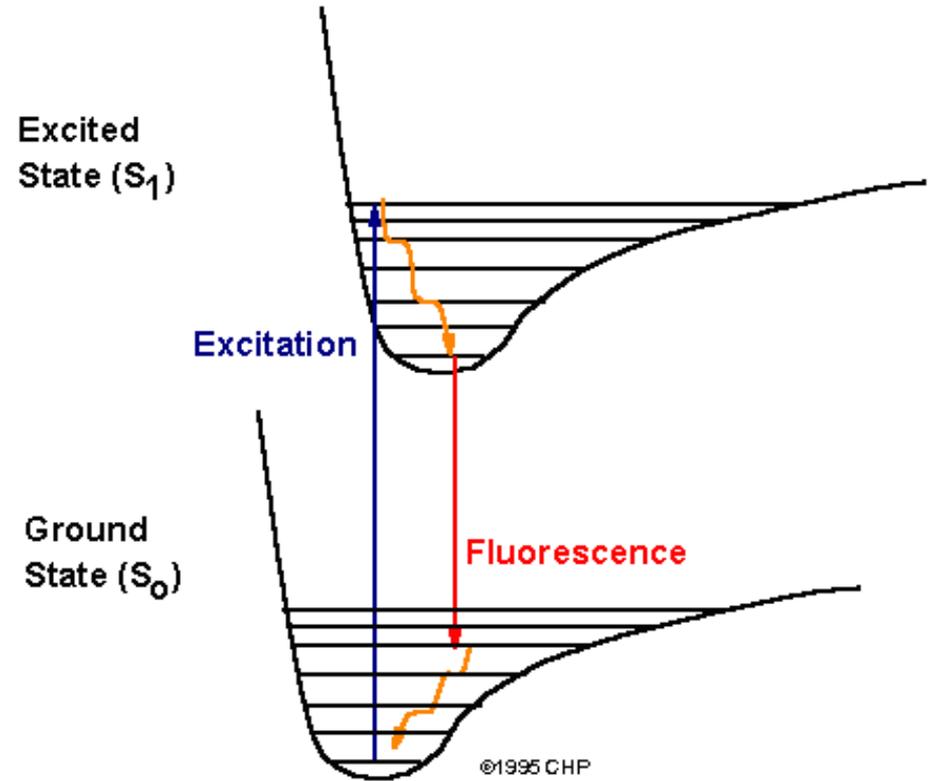
$$E = h\nu$$

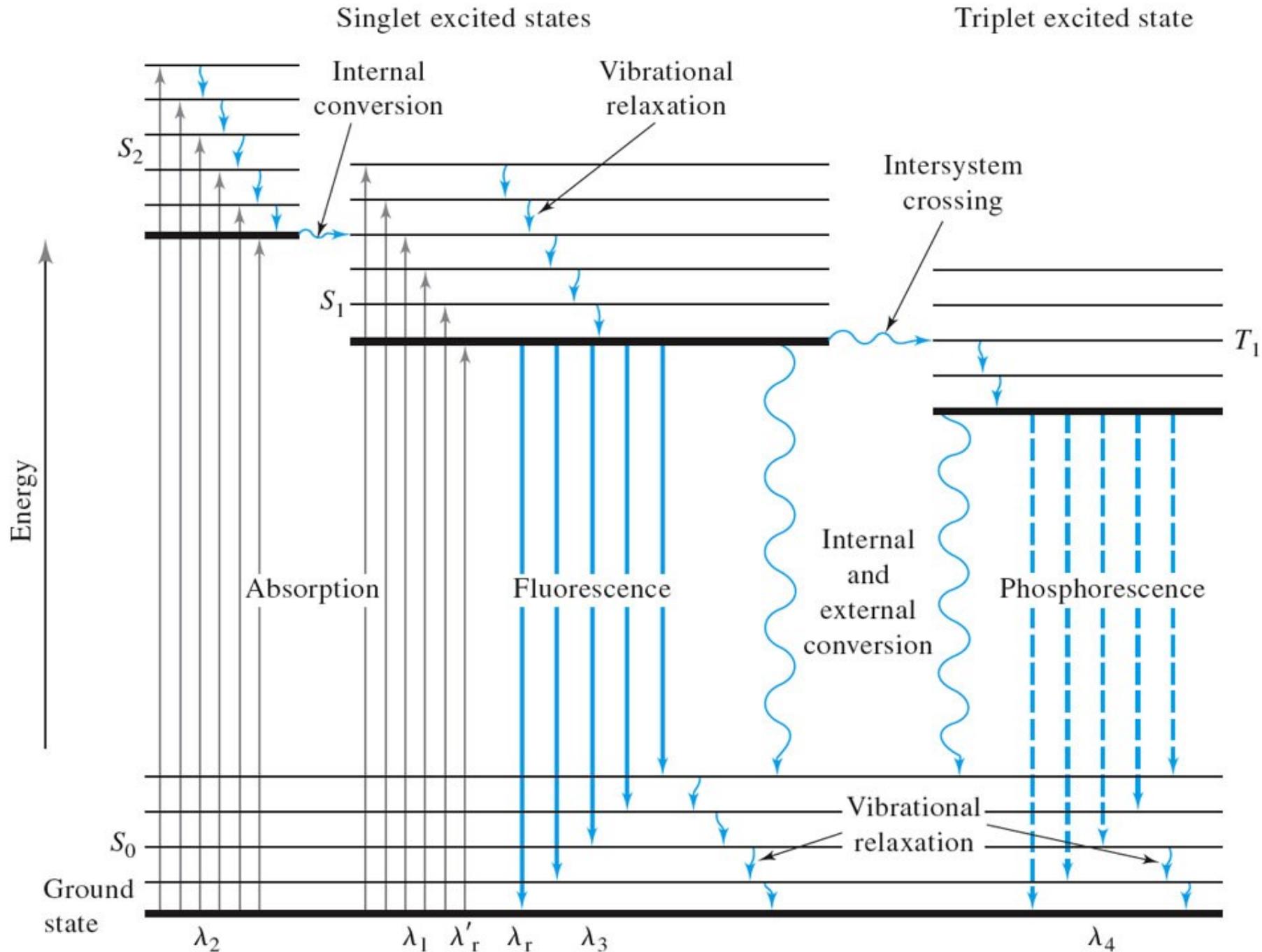
h costante di Planck ($6.67 \cdot 10^{-27}$ erg sec)

I livelli energetici relativi agli atomi e le molecole sono quantizzati.

Fluorescenza

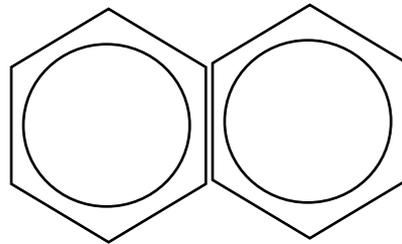
Emissione ottica da molecole che sono state eccitate a livelli energetici più alti da assorbimento di radiazione elettromagnetica.





Fluorescenza

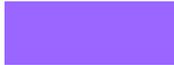
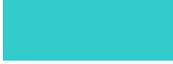
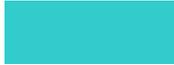
- I **Cromofori** sono componenti di molecole che assorbono la luce e poi la riemettono
- Sono generalmente **anelli aromatici**



Fluorofori per proteine

<i>Probe</i>		<i>Eccitazione</i>		<i>Emissione</i>
FITC	488		525	
PE	488		575	
APC	630		650	
PerCP™	488		680	
Cascade Blue	360		450	
Coumerin-phalloidin	350		450	
Texas Red™	610		630	
Tetramethylrhodamine-amines	550		575	
CY3 (indotrimethinecyanines)	540		575	
CY5 (indopentamethinecyanines)	640		670	

Fluorofori per acidi nucleici

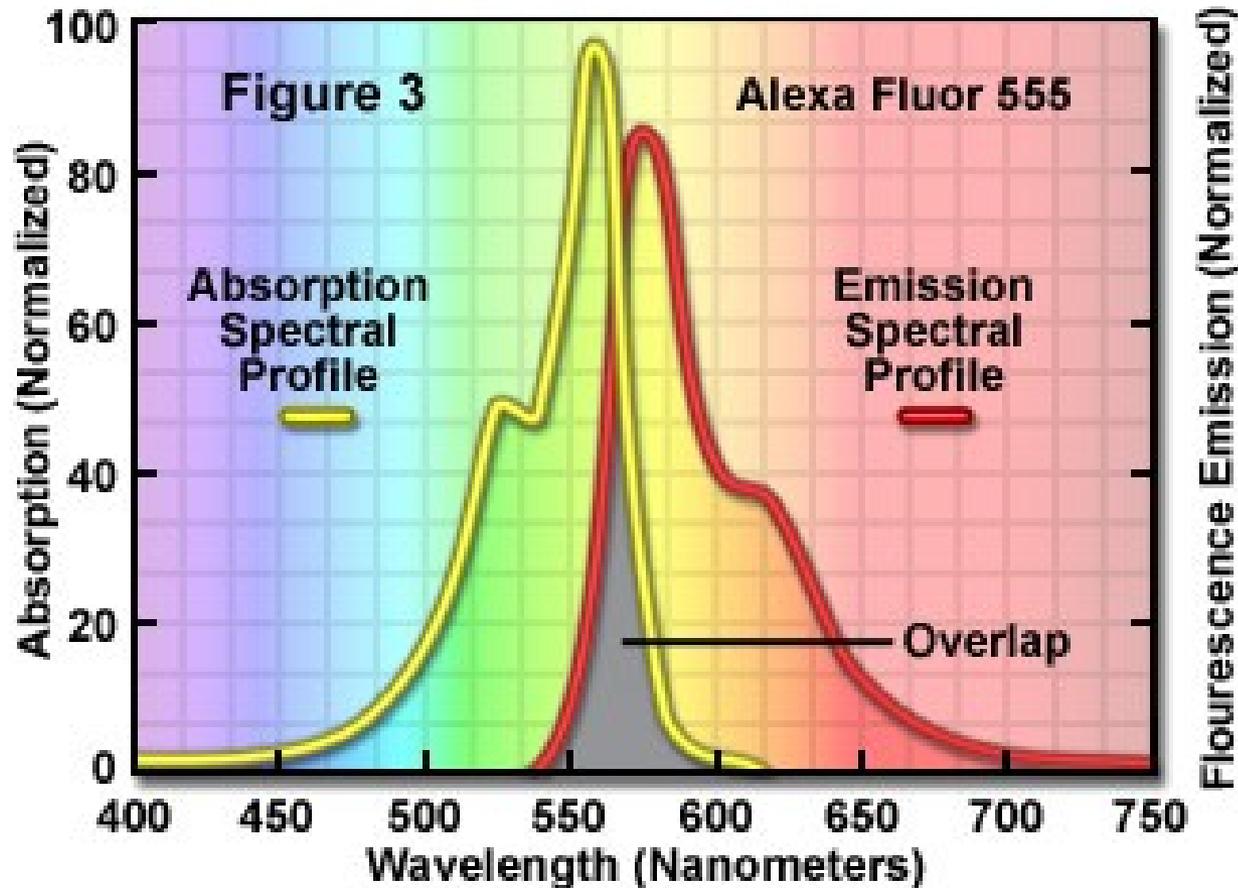
• Hoechst 33342 (AT rich) (uv)	346			460
• DAPI (uv)	359			461
• POPO-1	434			456
• YOYO-1	491			509
• Acridine Orange (RNA)	460			650
• Acridine Orange (DNA)	502			536
• Thiazole Orange (vis)	509			525
• TOTO-1	514			533
• Ethidium Bromide	526			604
• PI (uv/vis)	536			620
• 7-Aminoactinomycin D (7AAD)	555			655

Microscopia a fluorescenza

Vantaggi:

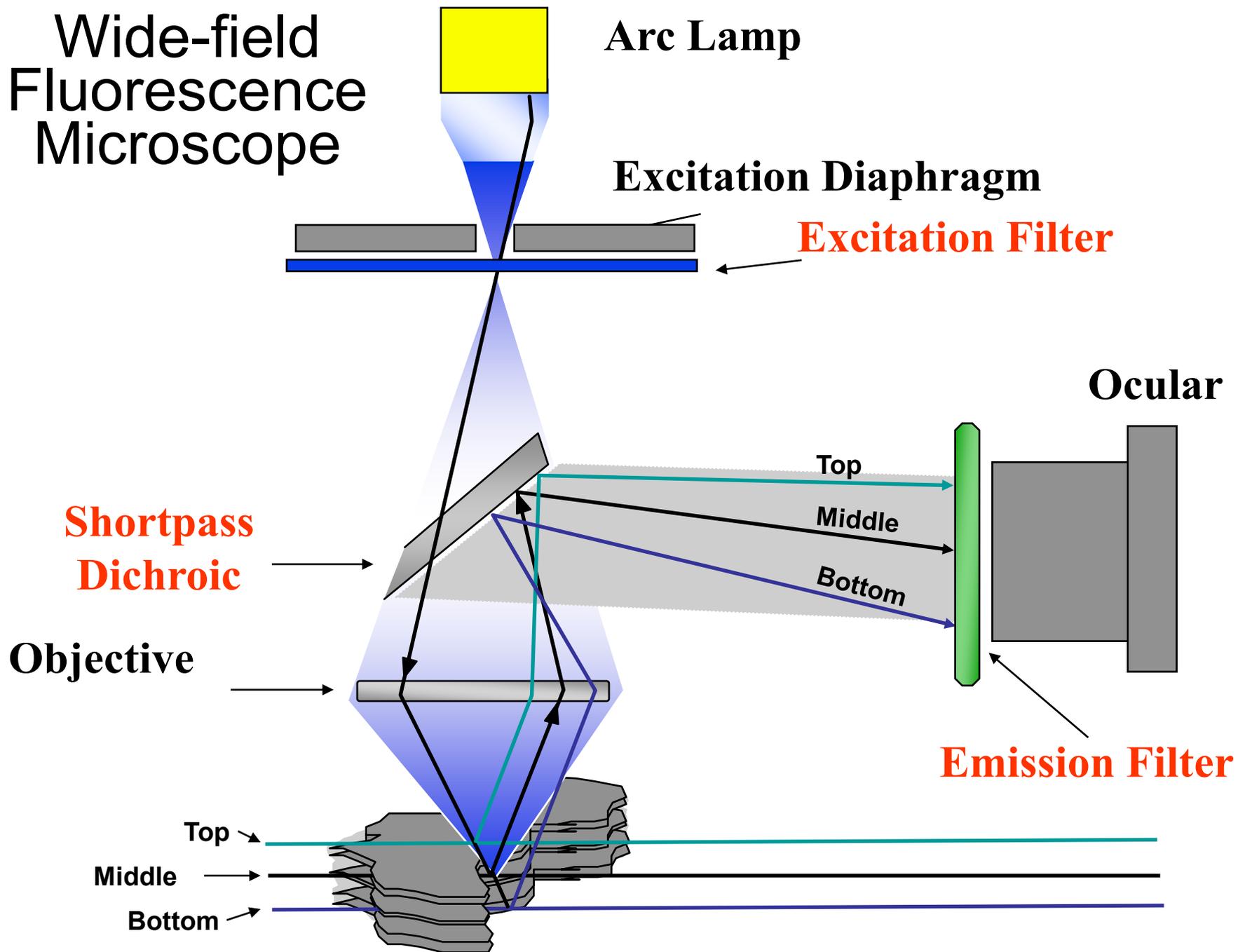
- con l'uso di fluorocromi (materiali fluorescenti) permette di identificare cellule e componenti sub-cellulari distinguendoli facilmente dal resto degli elementi non fluorescenti
- Utilizzando diversi tipi di coloranti (che legano a diverse componenti molecolari) si possono identificare con estrema facilità diversi tipi di molecole.
- La risoluzione è più elevata rispetto ad un microscopio ottico tradizionale

Fluorophore Absorption and Emission Profiles



Stokes shift: la lunghezza d'onda della radiazione emessa è più grande di quella assorbita.

Wide-field Fluorescence Microscope



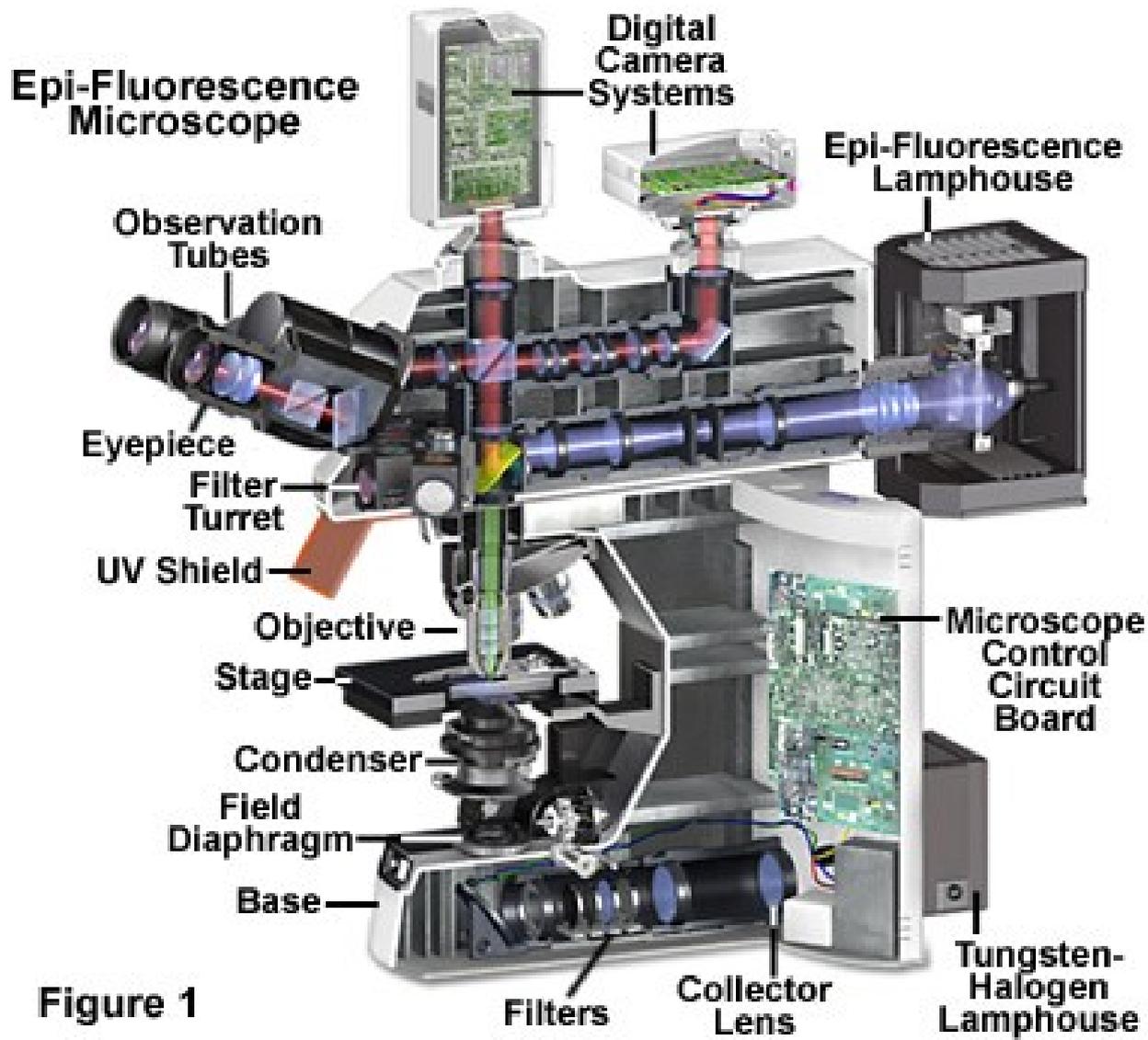
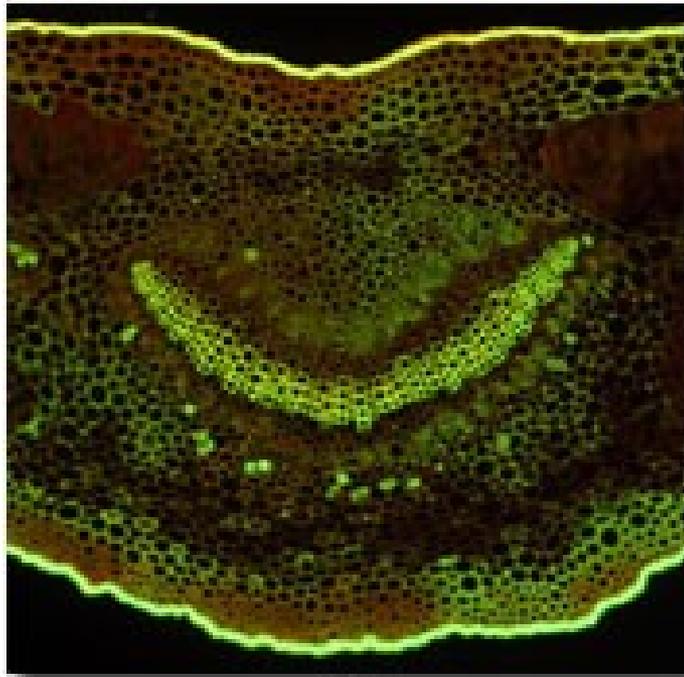
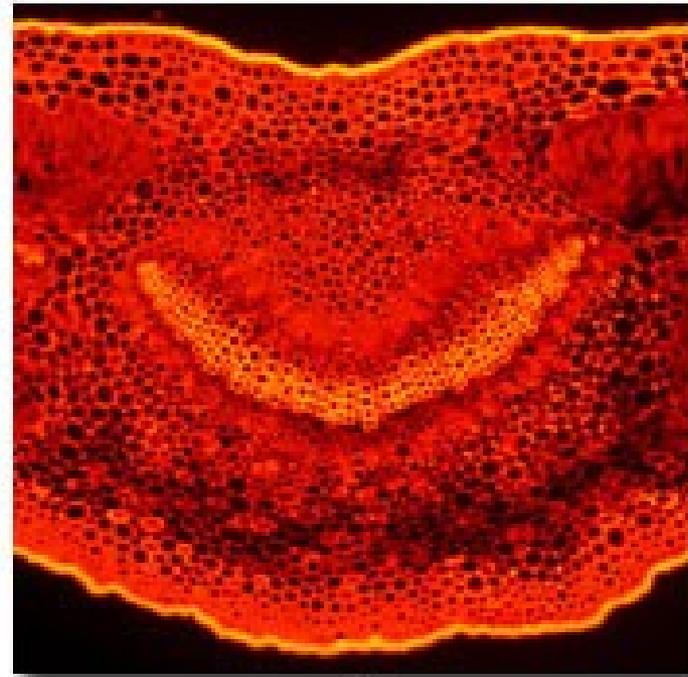


Figure 1

Image Brightness in Fluorescence Microscopy



(a)



(b)

Image Brightness (Fluorescence) $\propto NA^4/M^2$

Immagini digitali di una sezione di una foglia di oleandro con illuminazione episcopica in un stereomicroscopio con illuminatore di fluorescenza.

- a) Campione eccitato con un Endow green fluorescence protein (GFP) filter set con un range di banda passante tra i 450 e 490 nm,
- b) Campione eccitato con un filter set con un range di banda passante tra i 530 e 560 nm

Fading

Photobleaching (quenching): decomposizione irreversibile delle molecole fluorescenti dovuta a reazione con ossigeno molecolare.

Il quenching risulta in una diminuzione dell'intensità di fluorescenza nel tempo.

I meccanismi legati al quenching possono essere diversi, legati a trasferimenti energetici non radiativi, come fenomeni ossidativi o trasferimenti energetici ad altre molecole.

Photobleaching Rates in Multiply Stained Specimens

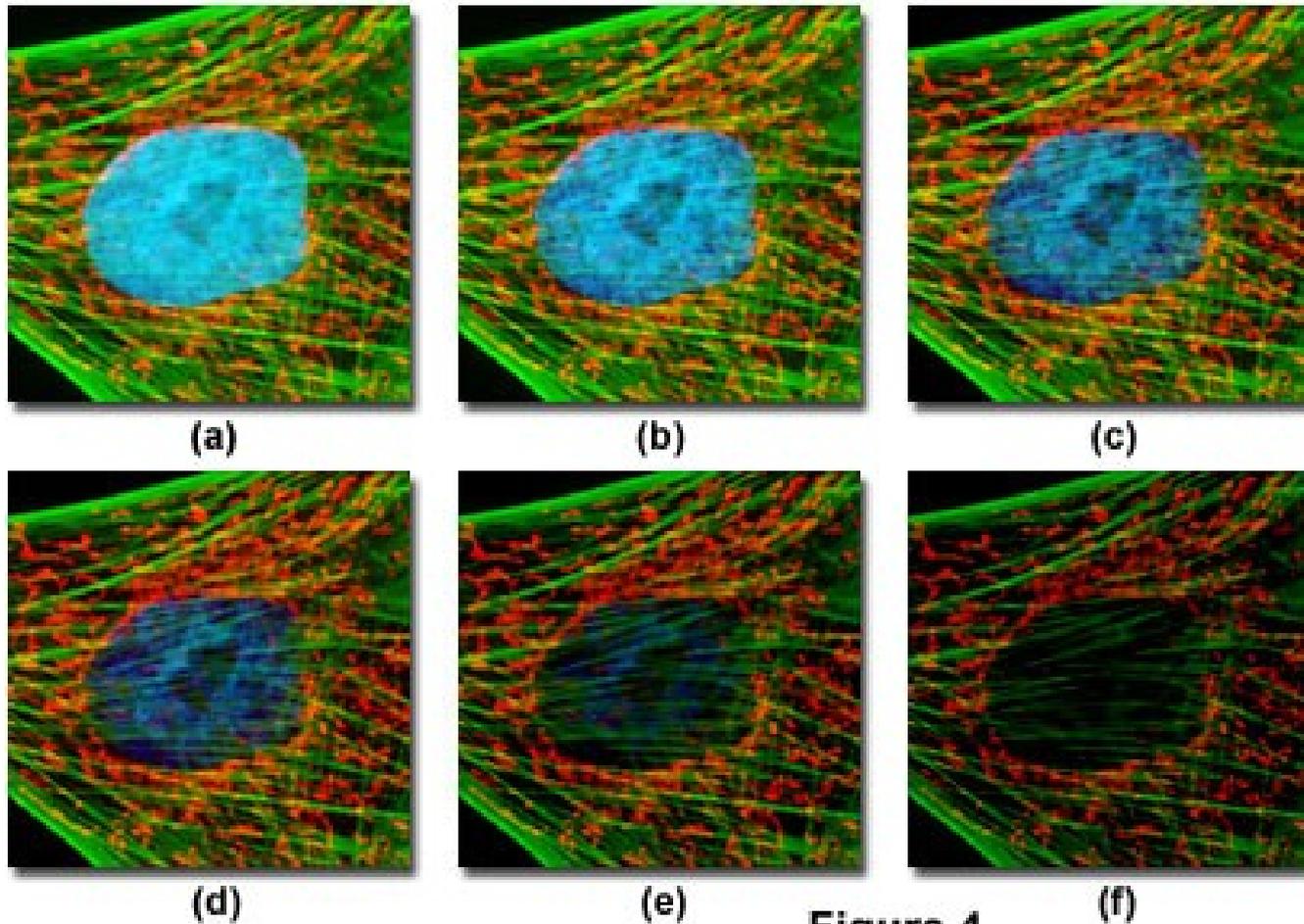


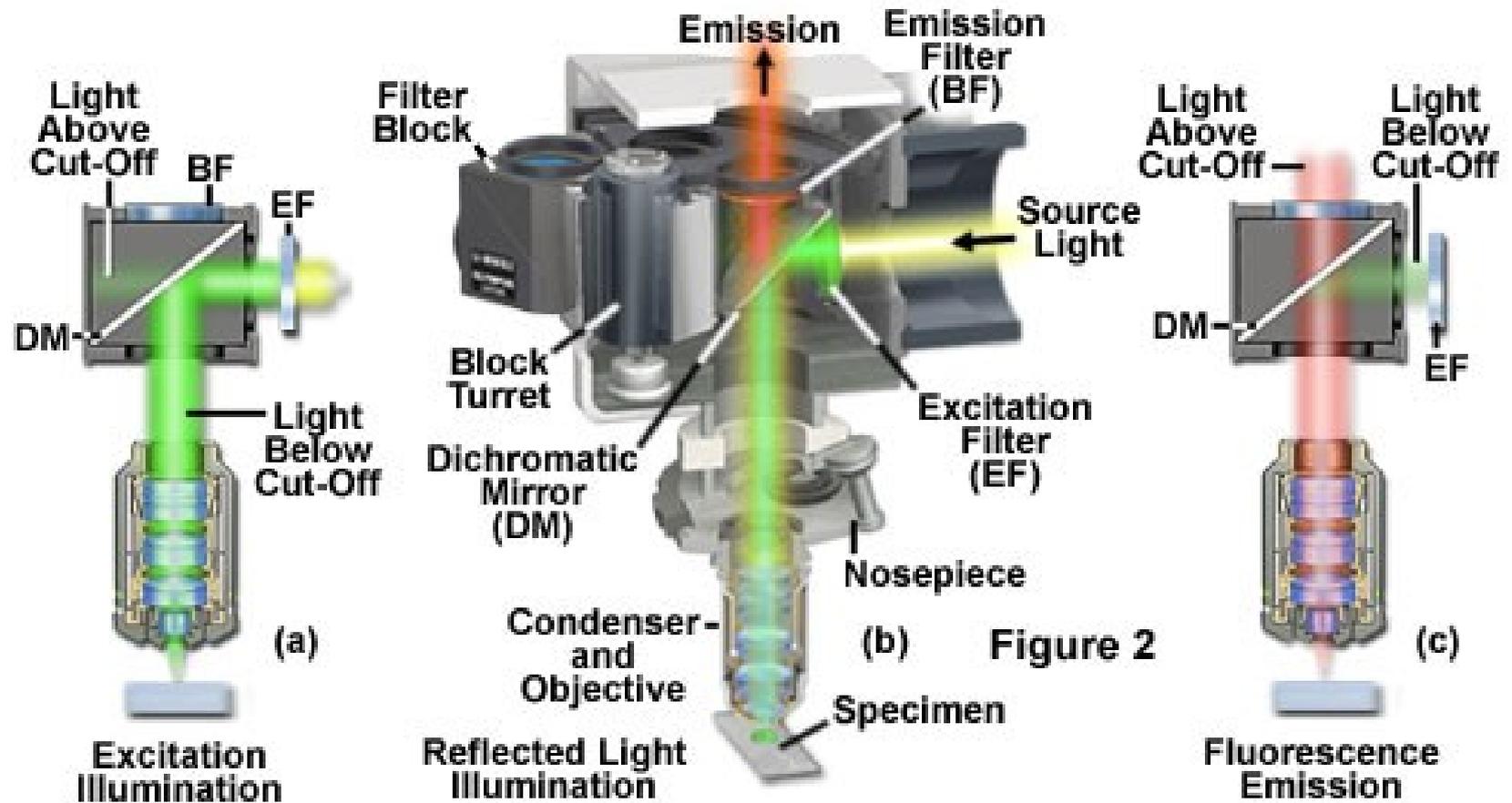
Figure 4

Nucleo: colorato di blu (derivato di bi-benzimidazolo)

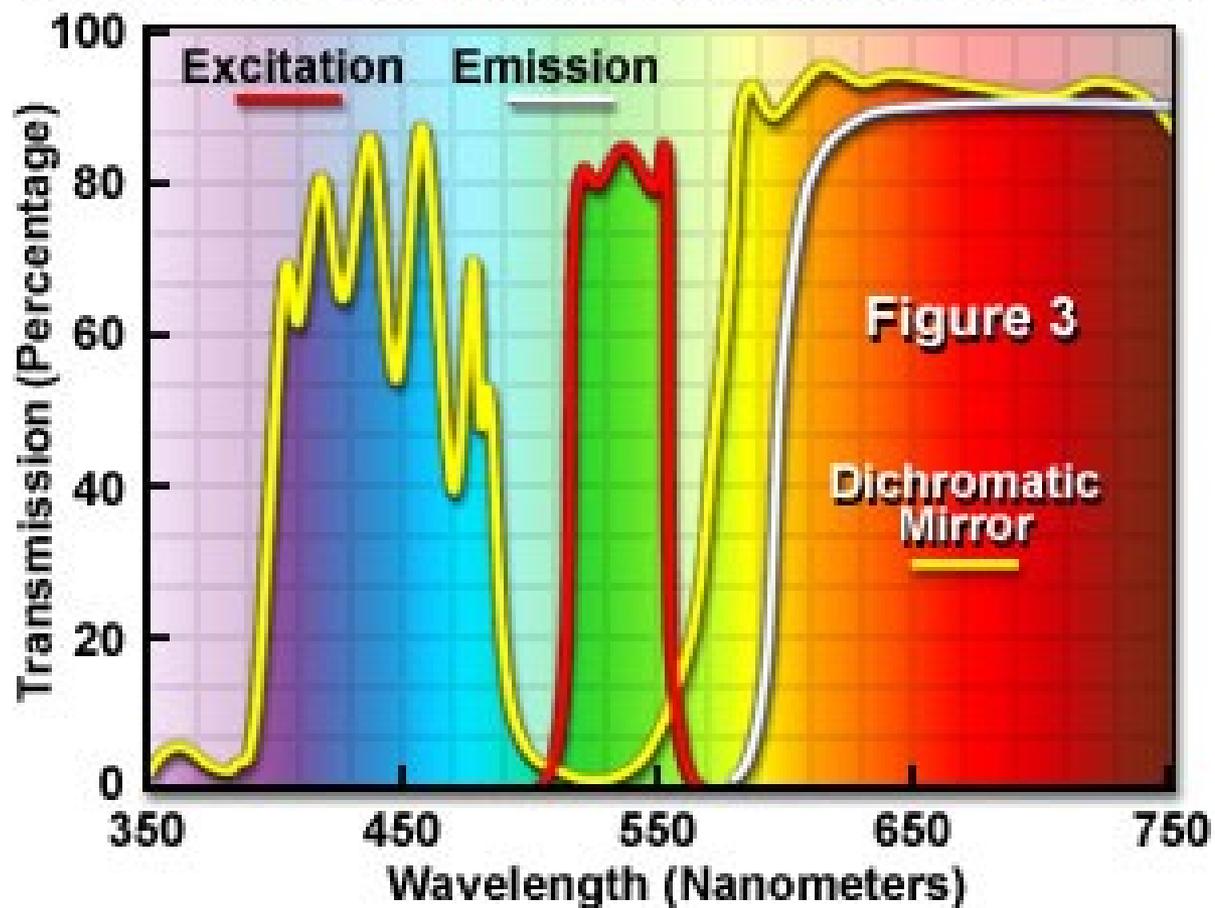
Mitocondri e citoscheletro : colorato di rosso

Falloidina: colorata di verde

Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination



Green Excitation and Red Emission Filter Set



Fluorescence Filter Cube (Block) and Associated Spectra

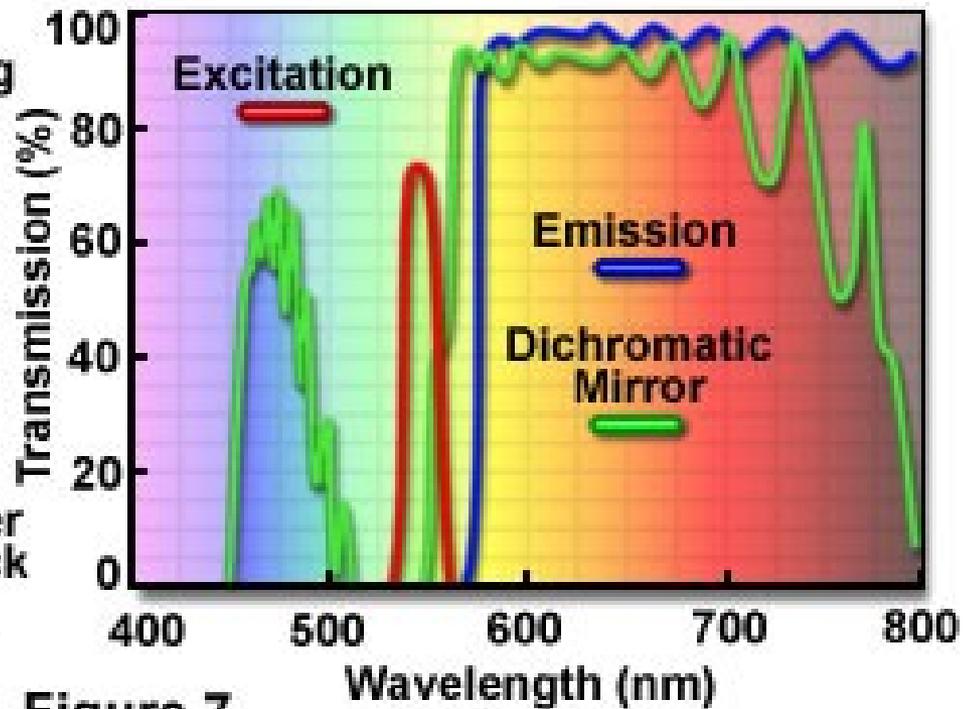
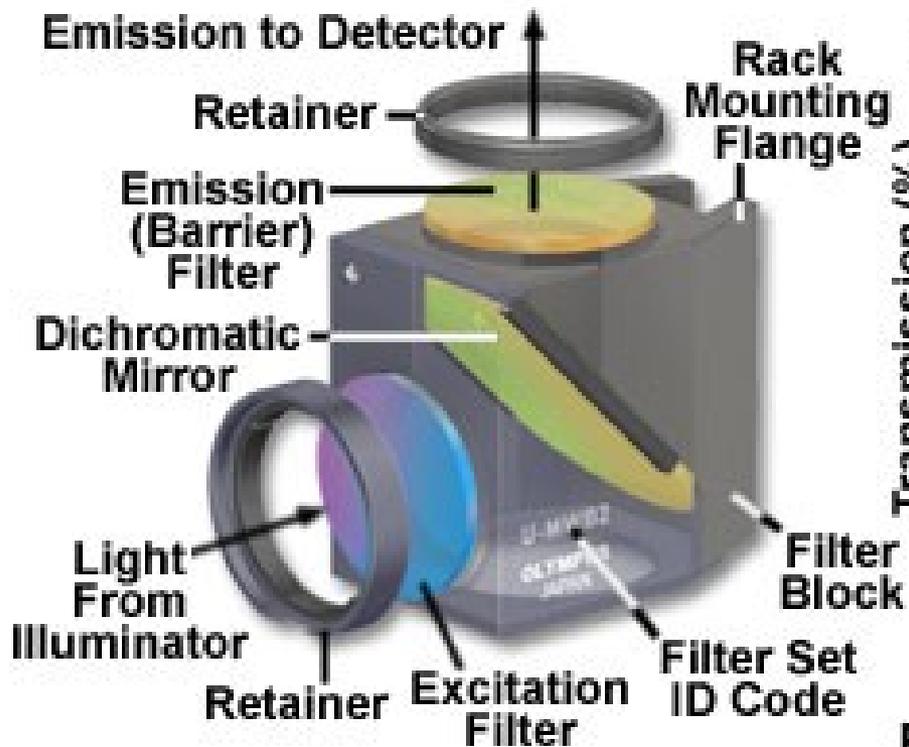
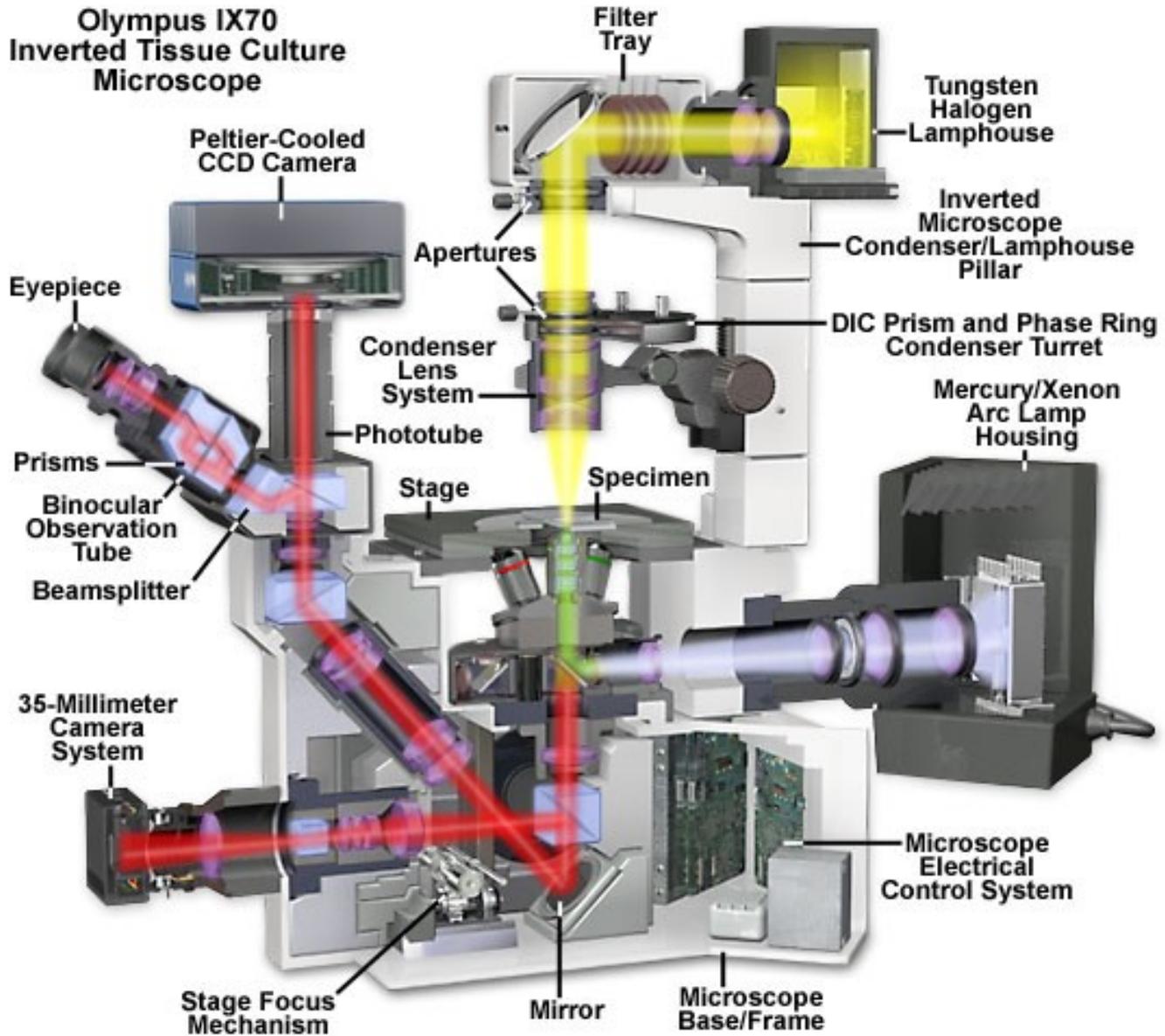


Figure 7

Olympus IX70 Inverted Tissue Culture Microscope



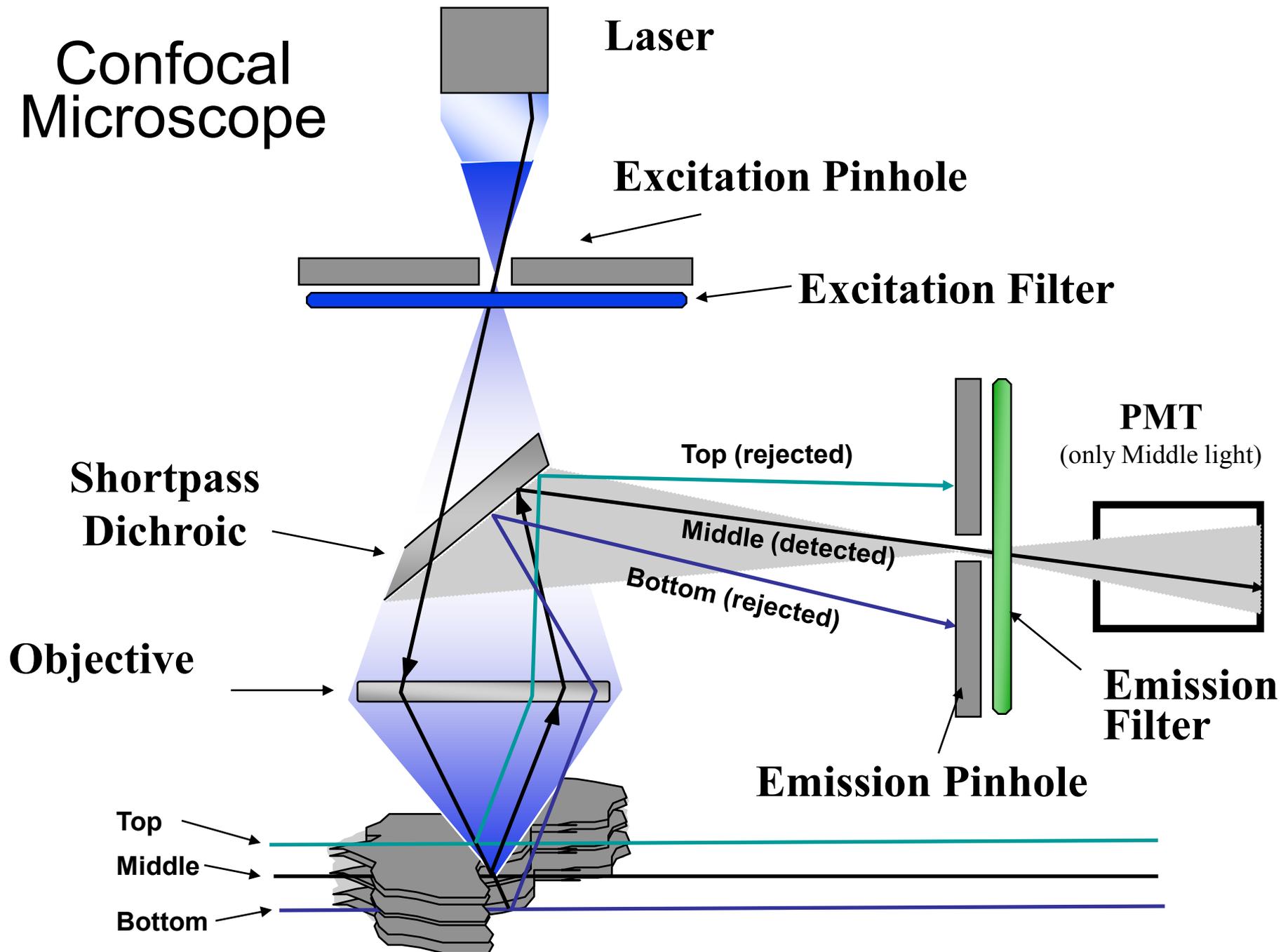
Microscopia confocale

Quando i campioni fluorescenti sono osservati con un microscopio convenzionale, la fluorescenza secondaria delle zone più lontane dal punto di osservazione spesso interferiscono con le parti che sono focalizzate.

Questo problema è tanto più grande nel caso in cui il campione in esame abbia uno spessore di più di 2 μm .

La soluzione a questo problema è la microscopia confocale in cui si registra solo l'immagine che è messa a fuoco eliminando tutto il resto.

Confocal Microscope



Microscopia confocale (LSCM: laser scanning confocal microscope)

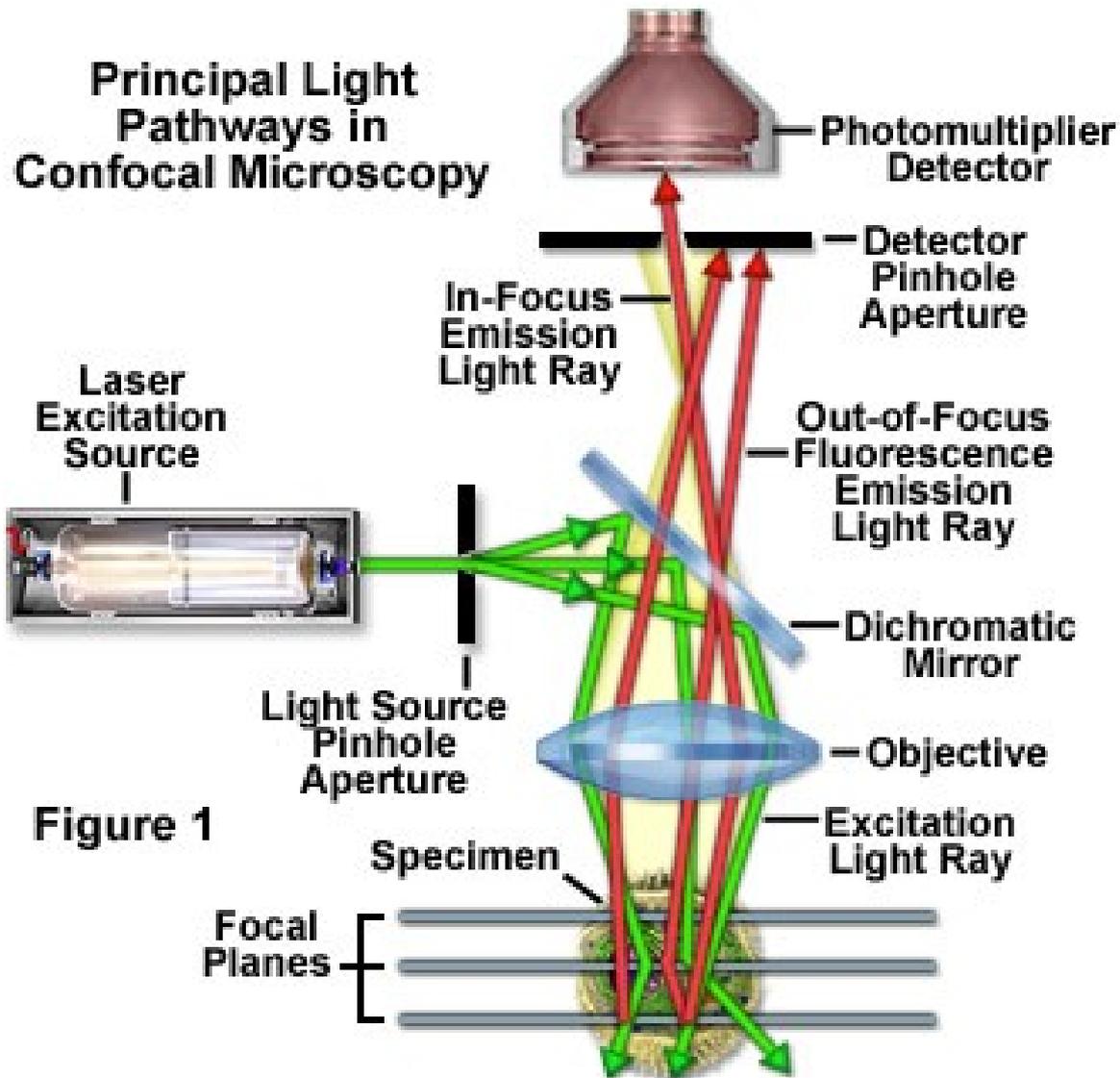


Figure 1

Widefield Versus Point Scanning of Specimens

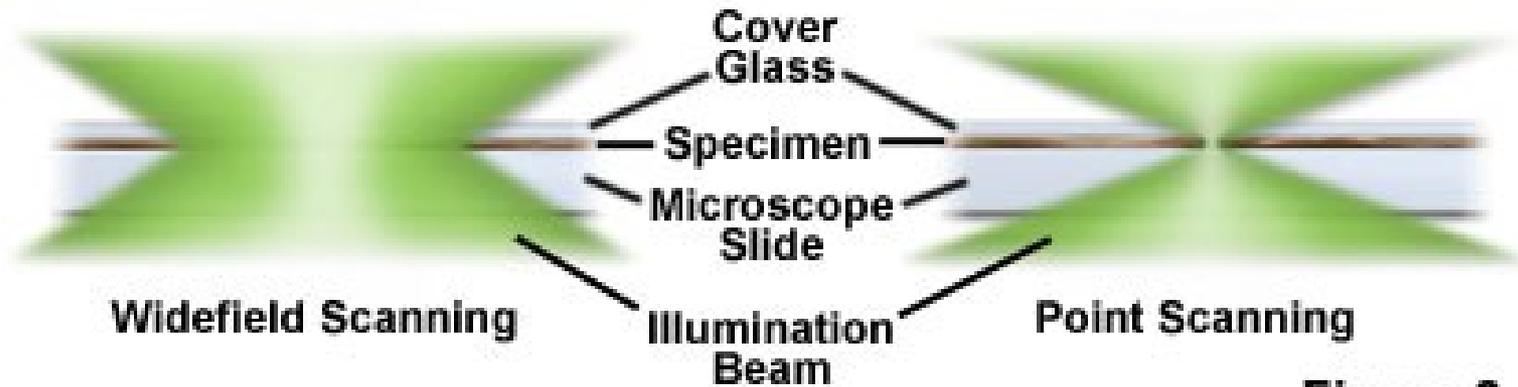


Figure 2

L'immagine viene ricostruita andando a „scannerizzare“ il punto di luce focalizzato lungo tutto il campione.

Nei moderni microscopi confocali l'immagine viene ricostruita da un rivelatore che va ad un computer il quale riprocessa l'immagine.

Vantaggi del microscopio confocale

- Riduzione degli aloni dell'immagine da scattering di luce

- Aumento della risoluzione

- Miglioramento del rapporto segnale/rumore

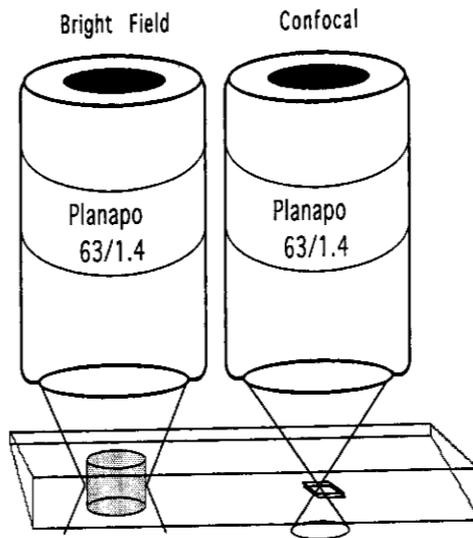
- Facile analisi di campioni spessi

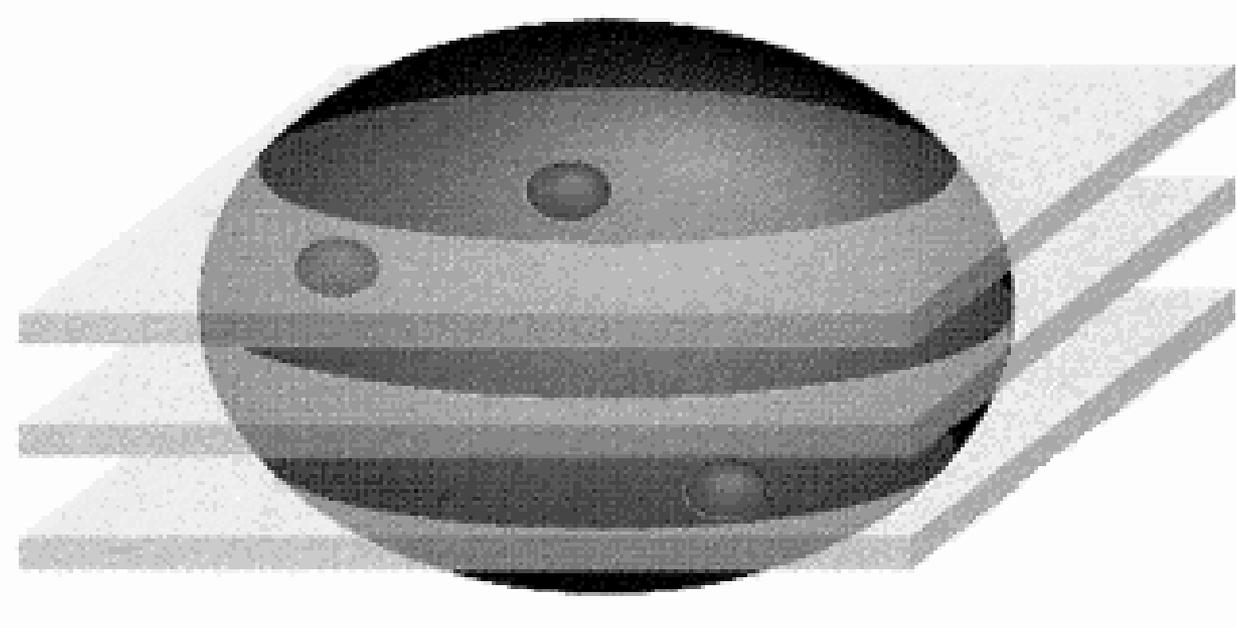
- Z-axis scanning

- Percezione della profondità nelle immagini sezionate in Z

- Possibilità di aggiustamento dell'ingrandimento elettronico

Specimen Space v Sampled Volume in Confocal and Bright Field Microscopes





LSCM Information Flow Schematic Diagram

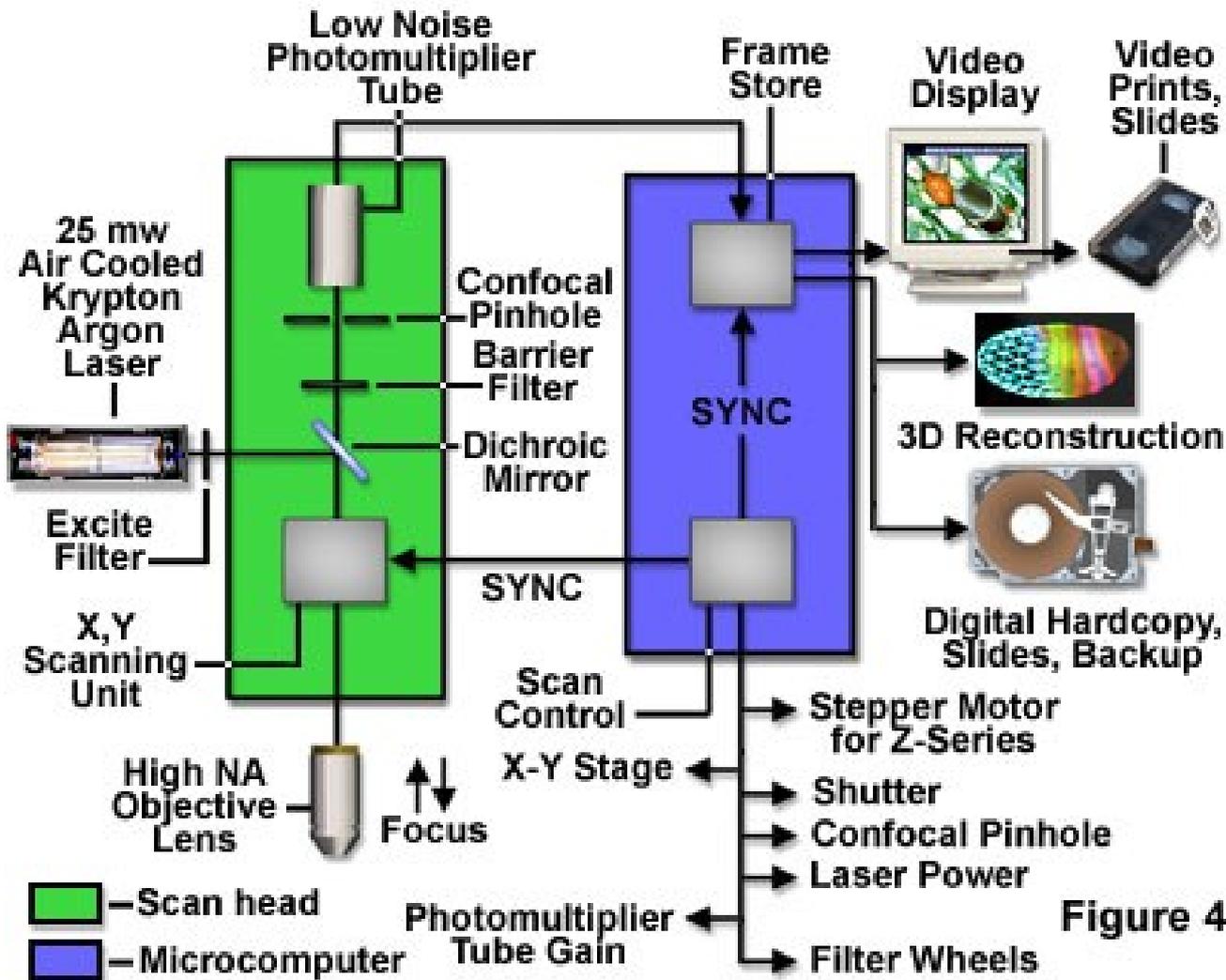
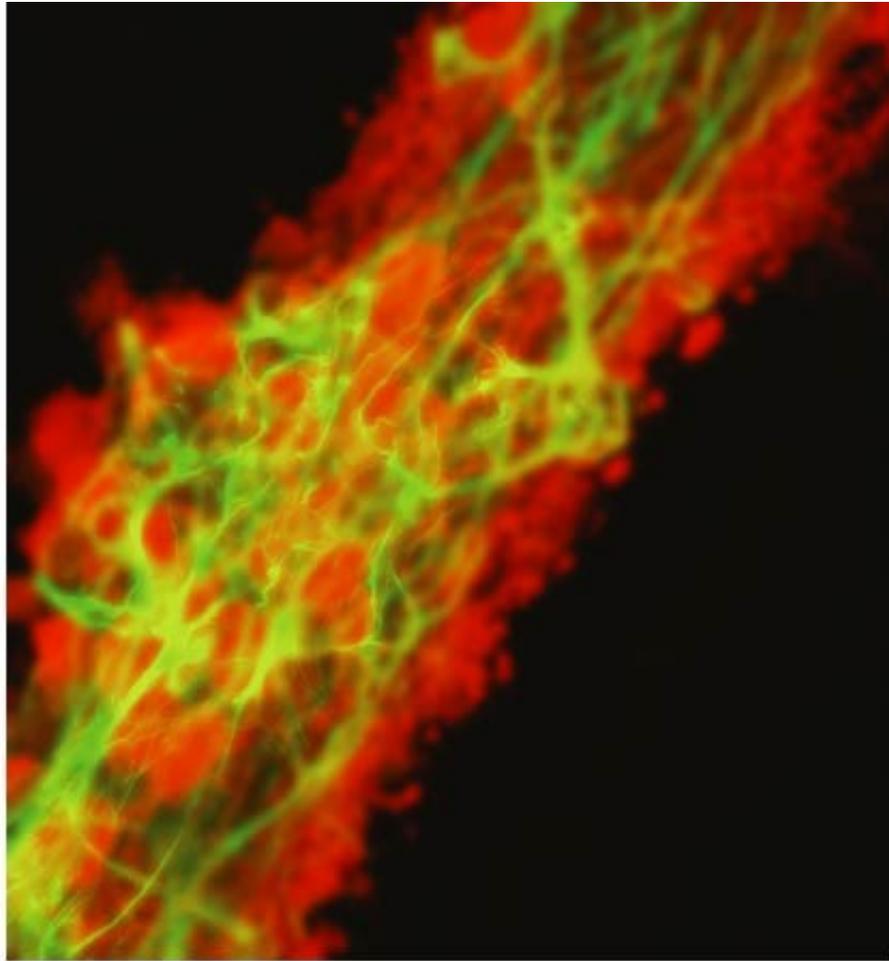
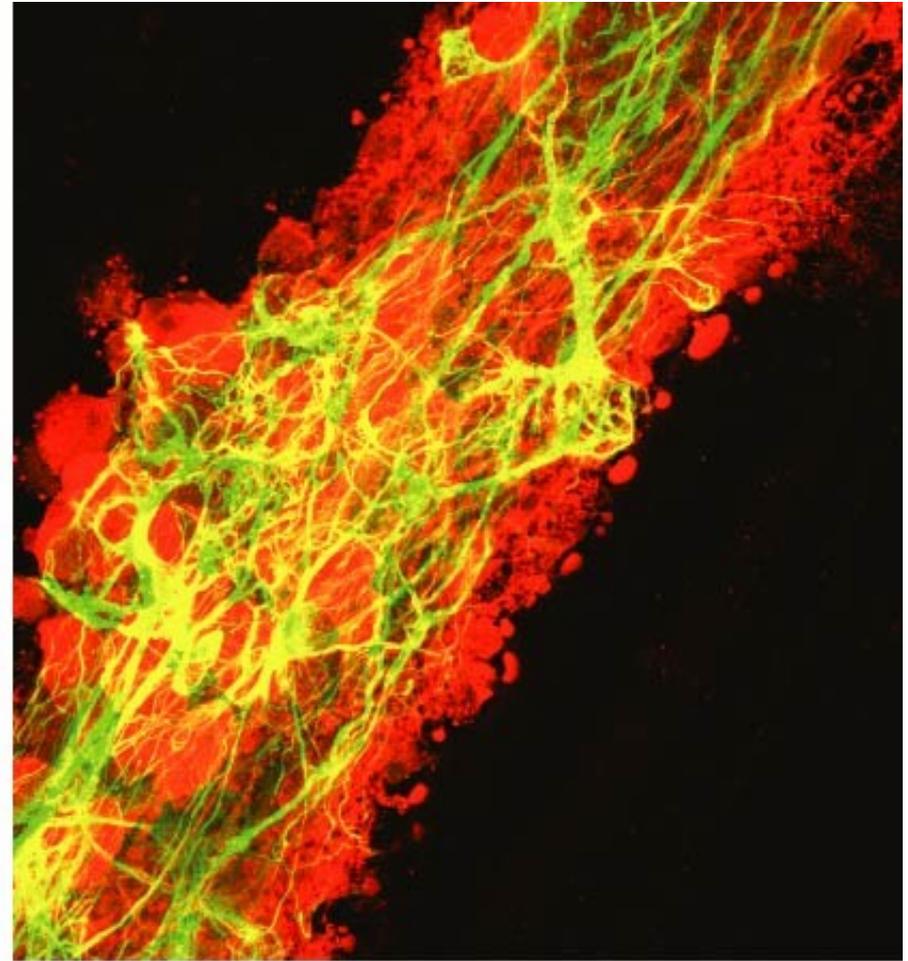


Figure 4

Regular Fluorescence vs Confocal



(a) Traditional fluorescence microscopy

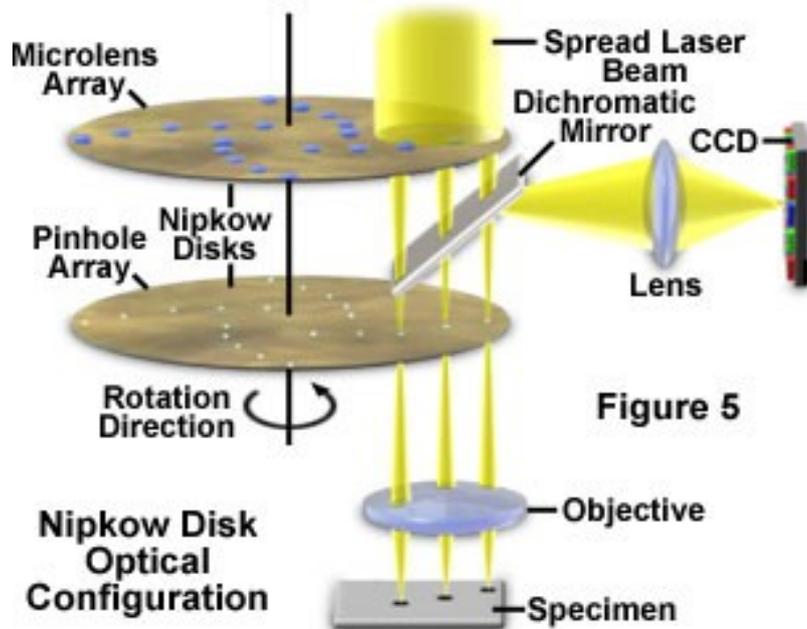


(b) Confocal fluorescence microscopy

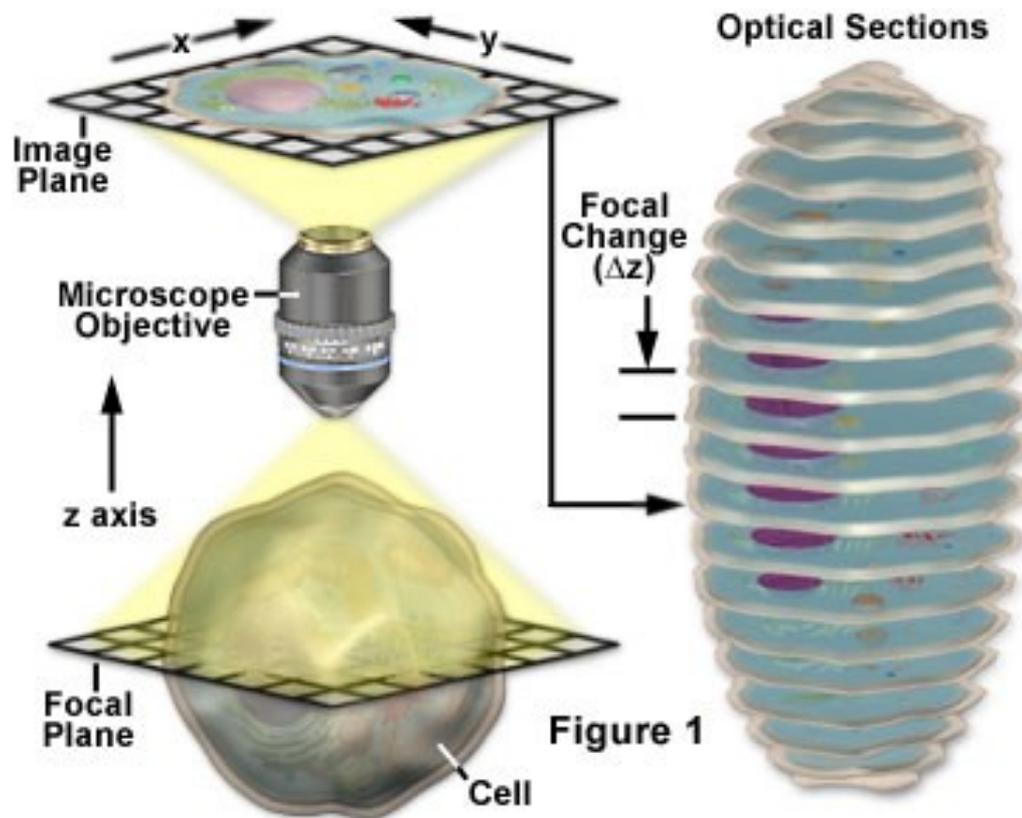
25 μ m

Modi di „scannerizzazione“ del campione

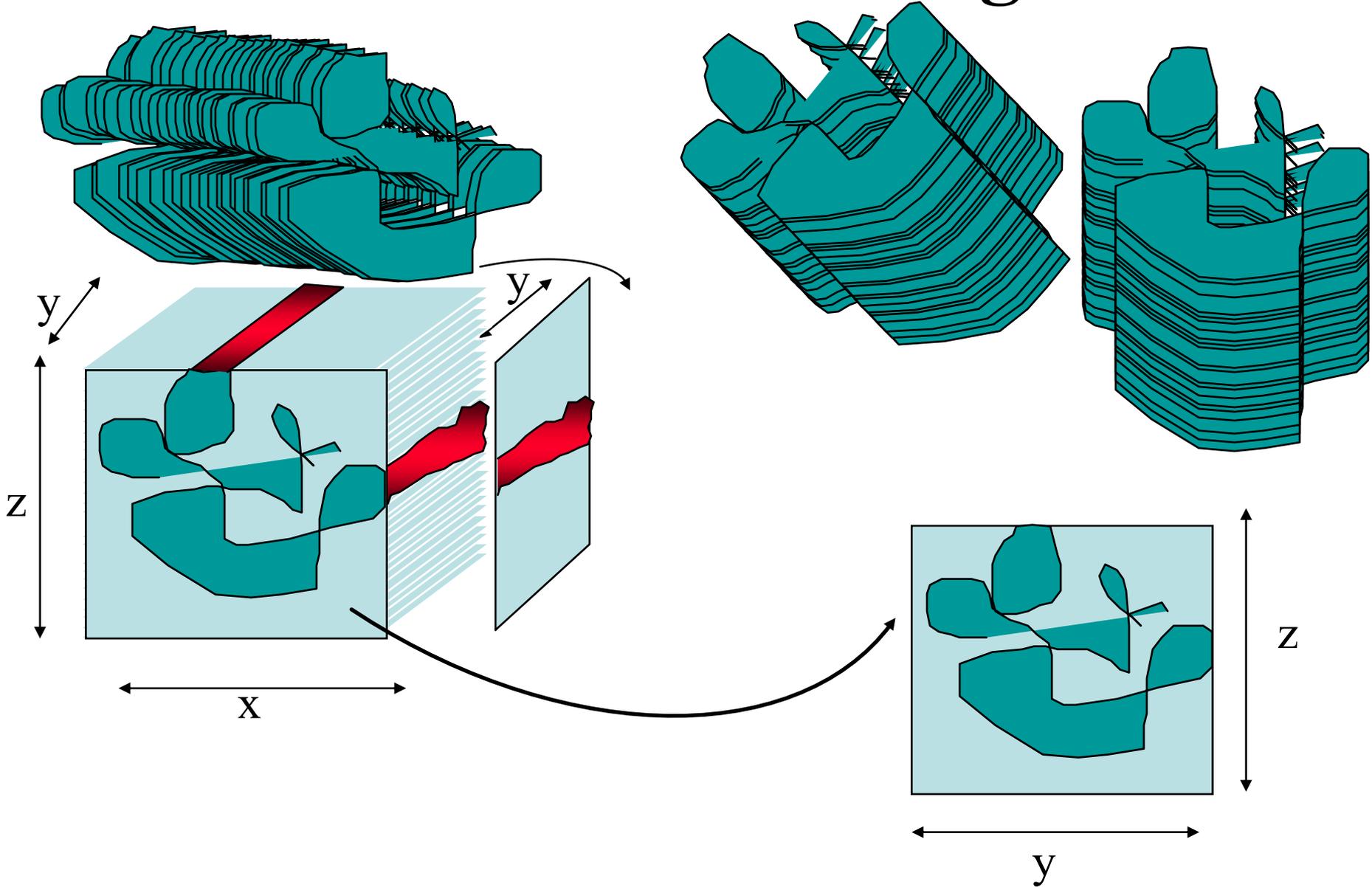
- Il campione può muoversi sotto il fascio: materiali inorganici
- Il campione è fisso e si muove il fascio: materiali organici
- Scannerizzazione a fascio singolo: il fascio viene controllato da un sistema di specchi guidato da computer: un'immagine al secondo
- Scannerizzazione a fascio multiplo: i fasci sono molteplici e la velocità di realizzazione di un'immagine è molto più alta.



Acquisition of Optical Sections for Deconvolution



Ricostruzione dell'immagine 3D





© J.Paul Robinson - Purdue University Cytometry Laboratories

Polline di Pino - Bio-Rad MRC 1024 @ Purdue
University Cytometry Laboratories

Metodi alternativi alla microscopia confocale

- 1. Deconvoluzione:** Trattamento dell'immagine di fluorescenza attraverso metodi matematici di convoluzione
- 2. Multiphoton Imaging:** é un microscopio analogo a LSCM senza la fenditura al rivelatore dato che il laser eccita il fluorocromo solo nel punto di fuoco. (riduce il photobleaching)

Microscopio Confocale Laser (CLSM)

REQUISITI DEL CAMPIONE: tecnologia non invasiva, consentendo l'osservazione del preparato a pressione ambiente, è ideale per lo studio di campioni biologici viventi (es. cellule in coltura) rendendo accessibile lo studio dinamico dei fenomeni vitali. Inoltre, sono osservabili tutti i campioni i cui componenti, strutturali e non, siano stati in qualche modo "colorati" con sostanze o capaci di emettere luce colorata se colpite da un raggio laser (fluorocromi) od in grado di deviare il laser stesso (es. atomi ad alto peso molecolare come oro, argento, platino, cadmio)

INFORMAZIONI OTTENIBILI: relative alla distribuzione, nell'intero volume del campione (sia esso un frammento di tessuto o cellule in coltura) di componenti strutturali e non dello stesso capaci di emettere, da soli od in seguito ad opportune colorazioni, un segnale luminoso quando colpito da un raggio laser.

SISTEMA ILLUMINANTE: una sorgente di luce laser costituita da una miscela di gas tale da generare raggi luminoso nell'intero spettro della luce visibile od ultravioletta.

SISTEMA DI FORMAZIONE DELL'IMMAGINE: l'immagine viene ottenuta sulla superficie di un tubo a raggi catodici, mediante elaborazione elettronica del segnale proveniente dal campione.

LIMITE DI RISOLUZIONE: circa $0,2\mu\text{m}$

Il laser: la sorgente luminosa

Si utilizzano lasers a gas ionizzato e ciascun tipo di laser ha delle linee di emissione per un limitato numero di λ .

Tipi di laser:

ARGON \Rightarrow Blu (488nm) e Verde (514nm)

He-Ne \Rightarrow Verde (543nm) e Rosso (633nm)

KRIPTON \Rightarrow Giallo (568nm) e Rosso (647nm)

ARGON ad alta potenza
ELIO-CADMIO } \Rightarrow Ultravioletto $\lambda < 400\text{nm}$

Necessitano di un sistema di raffreddamento liquido (molto costosi)

Microscopio confocale laser

- ◆ Localizzazione di molecole autofluorescenti o marcate con sonde fluorescenti
- ◆ Visualizzazione di strutture cellulari (es. citoscheletro)
- ◆ Osservazioni sul ciclo cellulare (marcatura del nucleo con opportuni coloranti fluorescenti)
- ◆ Apoptosi (Nelle cellule sane, il colorante si accumula e si aggrega nel mitocondrio, mostrando una chiara fluorescenza rossa, nelle cellule apoptotiche con il potenziale della membrana mitocondriale alterato, il colorante resta nel citoplasma, mostrando fluorescenza verde)

Microscopia confocale: modi di formazione dell'immagine

Triple-Labeled Optical Sections

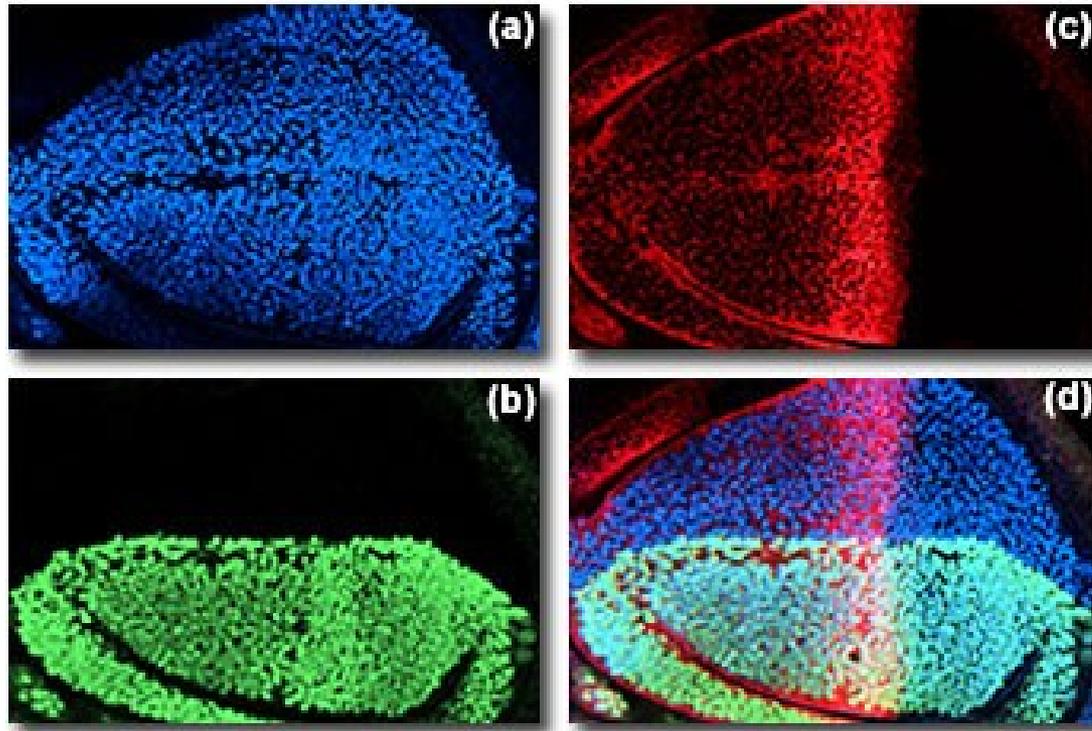


Figure 1

Ala di Drosophila: tre geni legano con tre coloranti diversi:

(a) vestigial (fluorescein - 496 nanometers); (b) apterous (lissamine rhodamine - 572 nanometers); and (c) CiD (cyanine 5 - 649 nanometers)

Microscopia confocale: modi di formazione dell'immagine

Time-Lapse Imaging

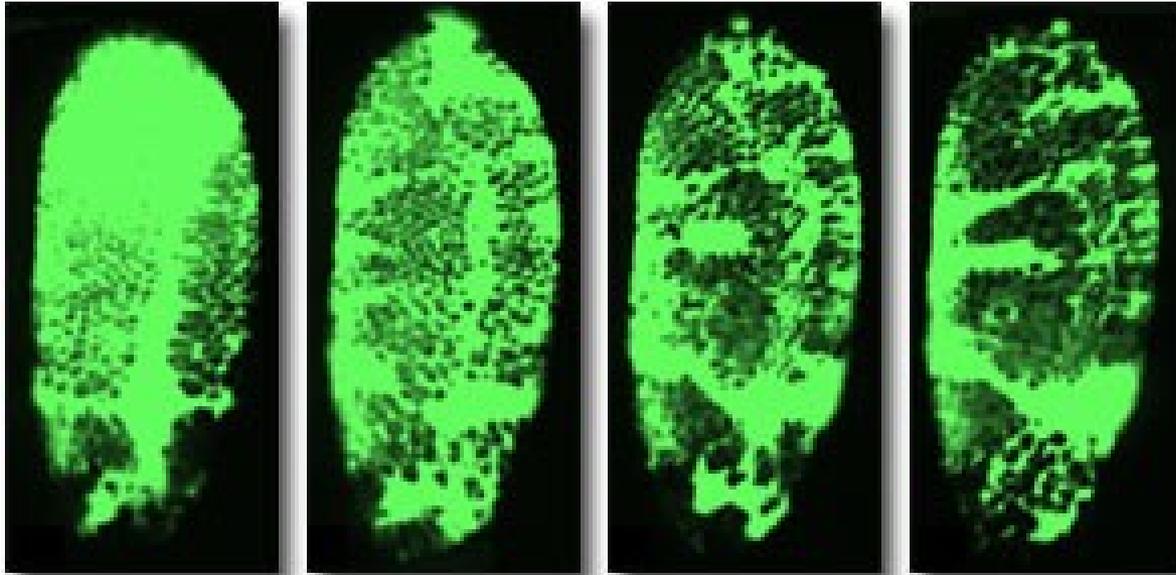


Figure 2

Embrione di *Drosophila* preso in tempi differenti.

Il laser puo' dare luogo a danneggiamenti del materiale cellulare, in particolare dovuto al rilascio di ossigeno nell'eccitazione delle molecole fluorescenti.

Microscopia confocale: modi di formazione dell'immagine

Optical Section Z-Series

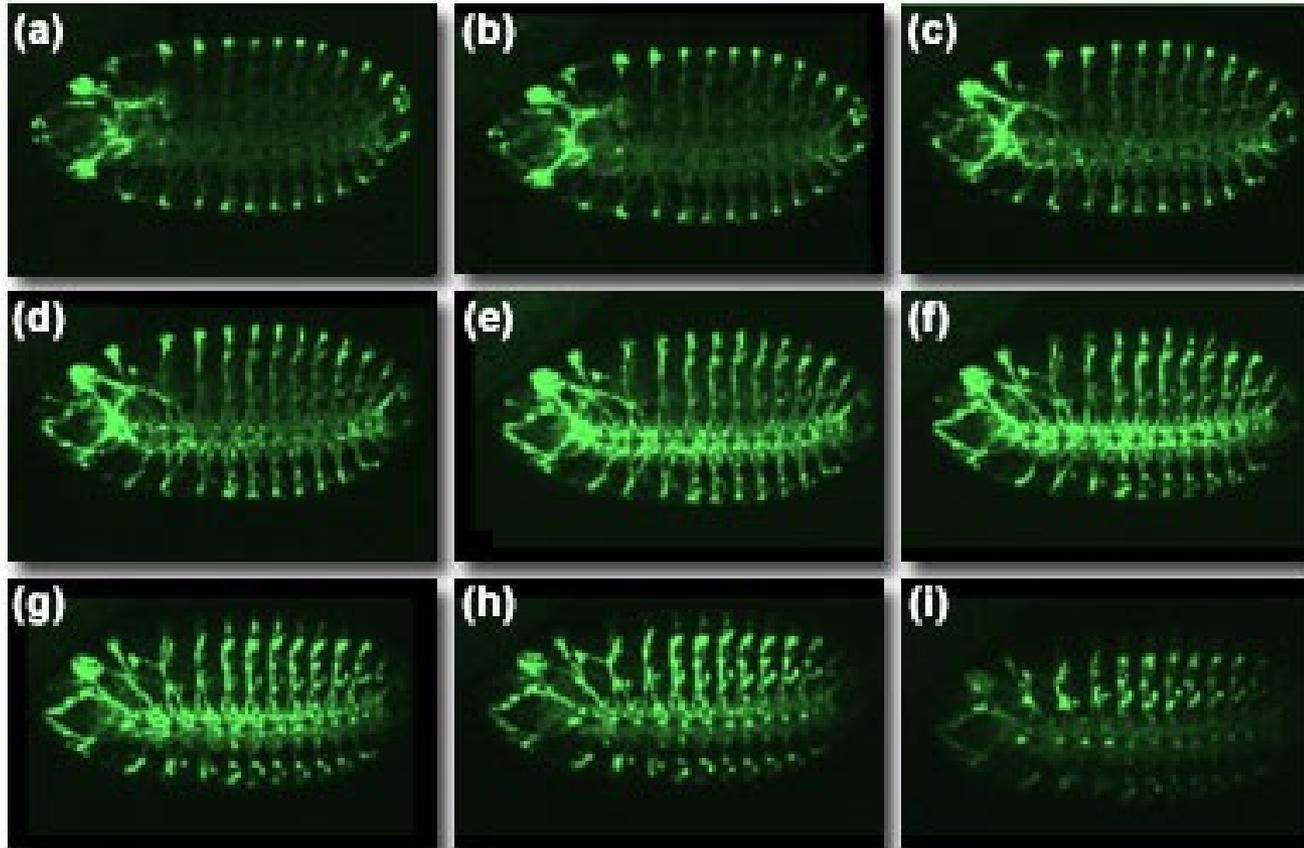


Figure 3

Aumentare la risoluzione dell'immagine

Objective Lens Zooming

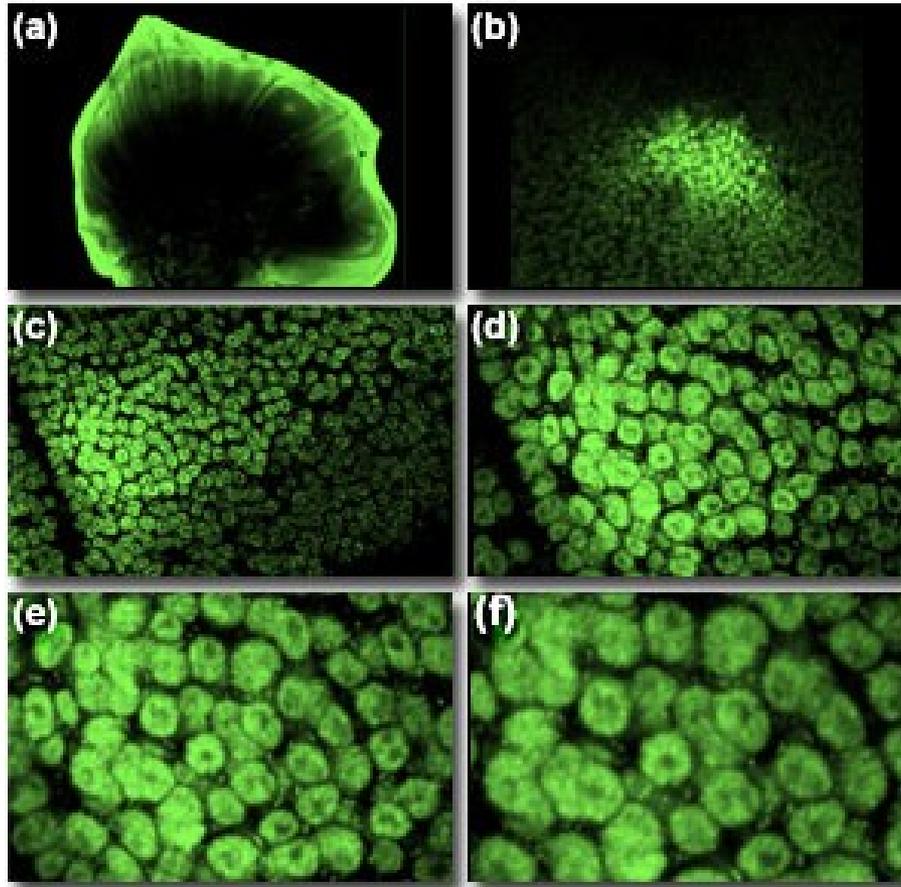


Figure 2

Riducendo l'area del campione analizzata e mantenendo la stessa apertura sul rivelatore (quindi lo stesso numero di dati dell'immagine) la risoluzione aumenta senza cambiare l'obiettivo.