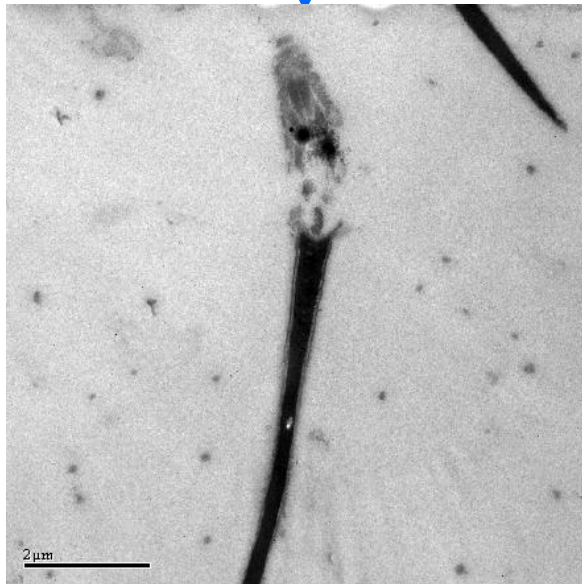


MICROSCOPIA ELETTRONICA

TRASMISSIONE



Specimen : spz vetro actha restti pre/em

Frame D

Indicated Magnification : X12000

Image Notes :

Image Name : Frame

Resolution : 1024 x 1024 pixels

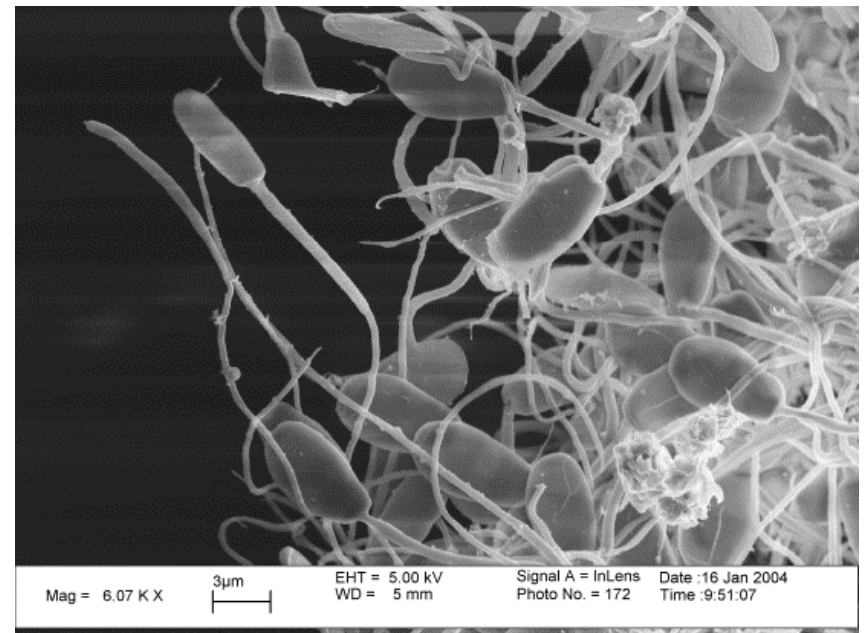
Acquisition Date : 14/07/2003

Acquisition Time : 16.11.59

Exposure Number : 2855

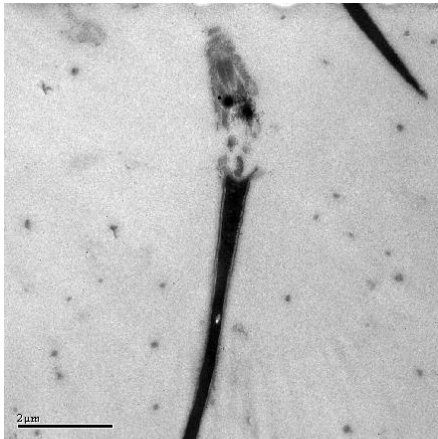
Exposure Time : 0.186449 s

SCANSIONE



Osservazione Microscopica

MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)



Specimen : sp. vero actin. resti pre/am

Frame D

Indicated Magnification : X12000

Image Notes :

Image Name : Frame

Resolution : 1024 x 1024 pixels

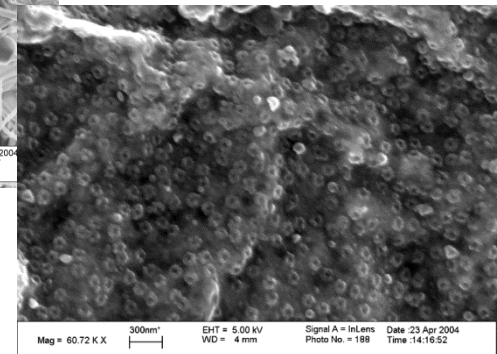
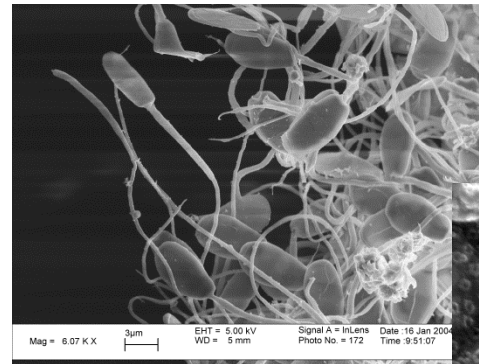
Acquisition Date : 14/07/2003

Exposure Time : 16.11.59

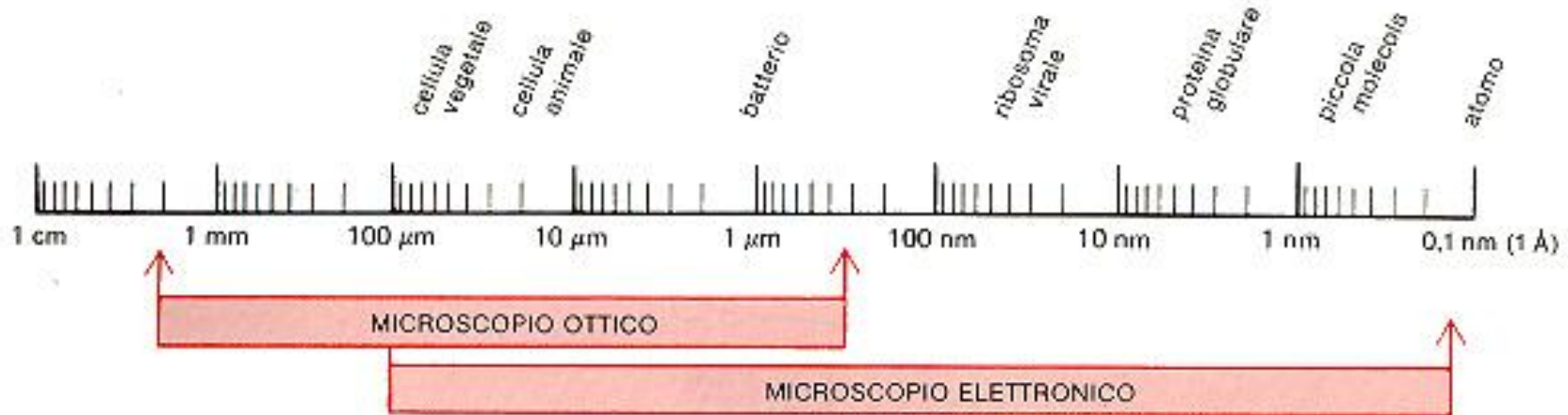
Exposure Number : 2855

Exposure Time : 0.186449 s

MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)



UNITÀ DI MISURA BIOLOGICHE E POTERE DI RISOLUZIONE



Il potere di risoluzione dell'**occhio umano** è **0.2 mm (200 μm)**

Il potere di risoluzione del **microscopio ottico** arriva circa a **0.2 μm (200 nm)**

Il limite di risoluzione del **microscopio elettronico** è **0.2 nm**

TEM

TEM è una tecnica di **microscopia** in base alla quale un fascio di elettroni viene trasmesso attraverso un campione ultra sottile, interagendo con il campione mentre passa.

Un'immagine è formata dall'interazione degli elettroni trasmessi attraverso il campione;

L'immagine viene ingrandita e focalizzata su un dispositivo di imaging, come uno schermo fluorescente rilevato da una telecamera CCD

Richiede la FORMAZIONE SPECIFICA
DELL'OPERATORE

Applicazioni

- I TEM sono in grado di **imaging** ad una risoluzione significativamente più elevata rispetto ai microscopi luminosi.
- per esaminare i **dettagli precisi**.
- applicazione nelle scienze biologiche come la ricerca sul cancro, la virologia, la scienza dei materiali, nonché l'inquinamento, la nanotecnologia e la ricerca sui semiconduttori.

Limitazioni del TEM

- Molti materiali richiedono un'ampia preparazione del campione
- Difficoltà di produrre un campione molto sottile
- Processo relativamente lungo con un bassa produzione di campioni.
- La struttura del campione può cambiare durante il processo di preparazione.
- Il campo visivo ridotto potrebbe non dare risultati conclusivi sull'intero campione.
- Il campione può essere danneggiato dal fascio di elettroni, in particolare nel caso di materiali biologici.

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

PRELIEVO DEI TESSUTI	OCCORRENTE	TEMPO
il campione deve avere dimensioni inferiori al mm³.	Forbici, pinze, bisturi, lame,.	L'operazione va eseguita nel più breve tempo possibile riducendo al minimo i traumi mediante l'uso di lame affilatissime.

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

Per un esame ultrastrutturale dei tessuti è necessario allestire preparati per la **MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)** mediante:

PRELIEVO,

FISSAZIONE,

SEZIONAMENTO,

CONTRASTAZIONE

... OSSERVAZIONE

Differenza Fasi di procedura

Osservazione MO

Prelievo
Fissazione
Lavaggio
Disidratazione
Chiarificazione
Inclusione
Sezionamento
Reidratazione
Colorazione
Disidratazione
Montaggio
Osservazione

Osservazione ME

Prelievo
Fissazione
Lavaggio
Post-Fissazione
Lavaggio
Disidratazione
Solvente di Transizione
Inclusione
Sezionamento
Contrastazione
Osservazione

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

fasi di procedura in ME

Prelievo
Fissazione
Lavaggio
Post-Fissazione
Lavaggio
Disidratazione
Solvente di Transizione
Inclusione
Sezionamento
Contrastazione
Osservazione

PfFA/GLUT/ Tampone cacodilato, pH 7,4

Tampone cacodilato, pH 7,4

Tretossido di Osmio

Tampone cacodilato, pH 7,4

Ossido di propilene-Non chiarificante

Infiltrazione in **RESINA**

METALLI PESANTI

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

*...se il preparato deve essere **INCLUSO** in sostanze includenti per osservazione in ME, dopo il prelievo del tessuto Si deve procedere necessariamente effettuando*

Fissazione



FISSAZIONE CHIMICA

(soluzioni liquide)



- Soluzioni isotoniche
- pH fisiologico (7,4)

Evitare collassamento o
rigonfiamento dei campioni

Scelta dei Fissativi in funzione di:

Natura del tessuto,
Tipo d'indagine

REGOLE GENERALI DI FISSAZIONE

Temperatura

Dimensioni del campione

pH della soluzione fissatrice

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

FISSAZIONE	OCCORRENTE	TEMPO
Lo scopo della fissazione è quello di impedire la degenerazione dei tessuti per autolisi e di mantenere il più possibile inalterato il quadro strutturale dei tessuti.	Paraformaldeide, Glutaraldeide, Tetrossido di Osmio ecc. I fissativi più usati sono: Miscele di PFA + glutaraldeide/Tampone Cacodilato 0,1M, Tetrossido di Osmio	Il tempo di soggiorno dei pezzi nel liquido fissativo varia da pochi min. a 1-3 ore secondo la miscela stessa, il tipo di tessuto e le dimensioni del tessuto.

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

INCLUSIONE	OCCORRENTE	TEMPO
Il suo scopo è quello di rendere il pezzo di consistenza tale da poter essere sezionato allo spessore voluto di 600-900 Å (1 nm = 10 Å)	Disidratazione in Serie di alcoli. <u>Solvente di transizione. Mezzo includente (resina epossidica o acrilica)</u>. Stufa a 50 o 60°C. Contenitori vari.	Disidratazione <u>da alcuni minuti a 1 ora</u> secondo le dimensioni dei pezzi. Tempo tot del processo 2 giorni.

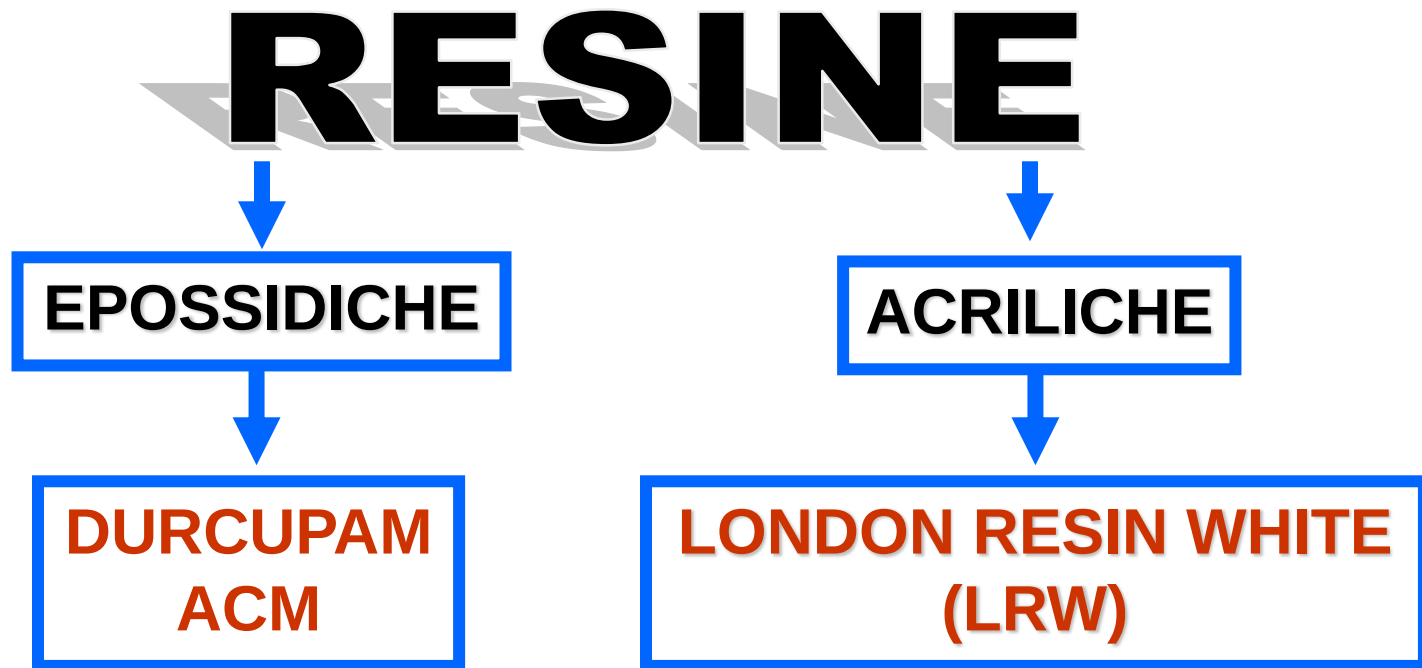
Preparazione dei Campioni Biologici

TEM

- Spessore del campione - meno di 1 mm³
- Fissazione rapida con il minimo danno cellulare: gluteraldeide e tetrossido di osmio
 - La *gluteraldeide* ha gruppi di aldeidi che si legano ai gruppi amminici di proteine, formando complessi insolubili
 - Il *tetrossido di osmio* (OsO₄) si lega alle membrane cellulari contenenti acidi grassi
- Disidratazione - serie alcolica - **solvente di transizione** "come **ossido di propilene**
- Inclusione
 - Resine epossidiche (Epon o araldite, Durcupam)
 - Resine acriliche (London Resin White-LRW)
- Sezione - 0.1 micrometro con **ultramicrotomo** (Ideale - 70-90 nm di spessore)
- Colorazione e Contrastazione: acetato di uranile, citrato di piombo

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

Materiali di inclusione usati per ME



INCLUSIONE per il TEM CON RESINE EPOSSIDICHE (DURCUPAM ACM)

Le fasi dell'inclusione	Osservazione
Fissazione PFA 2%/ Gluta 0,5%/ Tampone cacodilato 0,1M pH 7,4	I tempi sono riferiti a pezzetti di 1mm ³ , a 4°C per 1-3h circa.
Lavaggio in tampone cacodilato 0.1M pH 7.4 a RT° 3 X 10'	Per eliminare l'eccesso di liquido fissativo.
Post-fissazione Tretossido di Osmio 1% in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.4 per 30' a 4°C	Il Tretossido di Osmio è un ottimo fissativo per i lipidi ma poiché provoca la perdita di N ₂ proteico essa viene fatta precedere dalla fissazione aldeidica.
Lavaggio in tampone cacodilato 0.1M pH 7.4 a RT° 3 X 10'	Per eliminare l'eccesso di liquido fissativo.
Disidratare attraverso la serie ascendente degli alcoli (50°, 70°, 90°, 95°, 100°)	Le resine epossidiche , essendo idrofobiche, richiedono una buona disidratazione del tessuto.
Acetato di uranile 0.2% in alcool 100° per 1h.	Contrastazione in blocco del campione.
Lavaggio in alcool 100° 2X5'	Per eliminare l'eccesso di liquido di contrastazione.
Ossido di propilene 3 X 3'	Solvente di transizione del mezzo d'inclusione.
Ossido di propilene + resina 3:1 per 20' Ossido di propilene + resina 1:1 per 20' Ossido di propilene + resina 1:3 ON	Il solvente di transizione viene gradualmente sostituito da soluzioni a concentrazione crescente di resina nel solvente stesso, fino ad arrivare alla sola resina.
Resina pura 2 cambi di 1h ognuno e poi 1 cambio ON quindi in stufa a 60°C 12-36h.	Polimerizzazione della resina con il calore.

INCLUSIONE per il TEM CON RESINE ACRILICHE (LRW)

Fissazione PFA 4%/ Gluta 0,5%/ Tampone cacodilato 0,1M pH 7,4	I tempi sono riferiti a pezzetti di 1mm ³ , a 4°C per 1-3h circa.
Lavaggio in tampone cacodilato 0.1M pH 7.4 a RT° 3 X 10'	Per eliminare l'eccesso di liquido fissativo.
Disidratare attraverso la serie ascendente degli alcoli (50°, 70°)	LRW essendo idrofilica consente di effettuare <u>disidratazioni rapide e parziali</u> .
LRW + alcol 70° 2:1 per 20'	Miscela di transizione del mezzo d'inclusione.
L.R.W. pura 4 X 20'	Infiltrazione del campione con resina pura
Campione in stufa a 50°C per 24h	Polimerizzazione della resina con il calore
oppure	
L.R.W + sostanza catalizzatore (1,5µl/ml) che accelera la fase di polimerizzazione della resina	Questa miscela si deve preparare in un contenitore a sua volta riposto in un thermos con ghiaccio per evitare l'immediata polimerizzazione.
Mettere la resina con catalizzatore in un eppendorf da inclusione a 0°C per 24h	Polimerizzazione della resina con il freddo

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

TAGLIO

Il suo scopo è quello di sezionare il pezzo allo spessore voluto (600-900Å) in modo da poter essere osservato al TEM dopo opportuna contrastazione.

OCCORRENTE

Lama di acciaio. H₂O distillata.
Ultramicrotomo. Lama di vetro. Vaschetta di raccolta delle sezioni. Vetrini porta oggetto. **Retini trattati** o meno con adesivi (Formvar).

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA

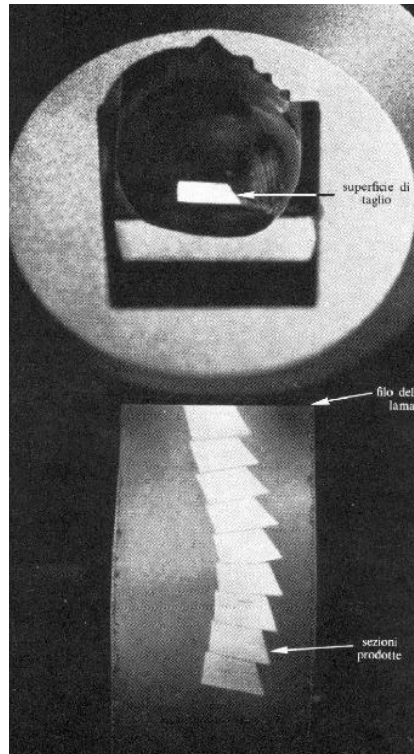
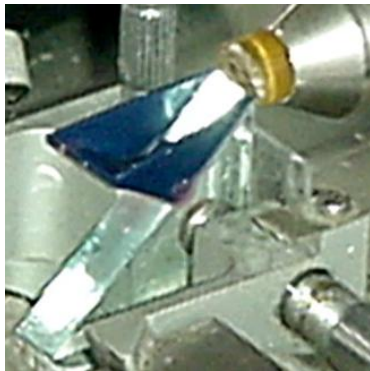
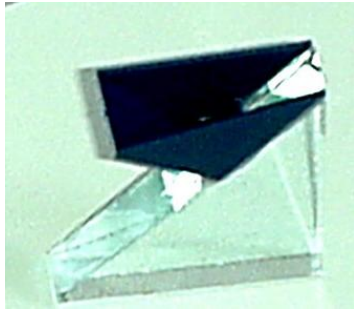
Strumento di Taglio

ULTRAMICROTOMO



Per l'osservazione ultrastrutturale i campioni inclusi in resine epossiche o acriliche dovranno essere sezionati con un **ultramicrotomo** a spessori variabili dai 600 ai 900 Å. Esso è dotato di uno stereomicroscopio per ingrandire opportunamente i preparati da sezionare che sono normalmente assai piccoli.

LA RACCOLTA DELLE SEZIONI



SEMIFINI

Spessore: 1-2 μm

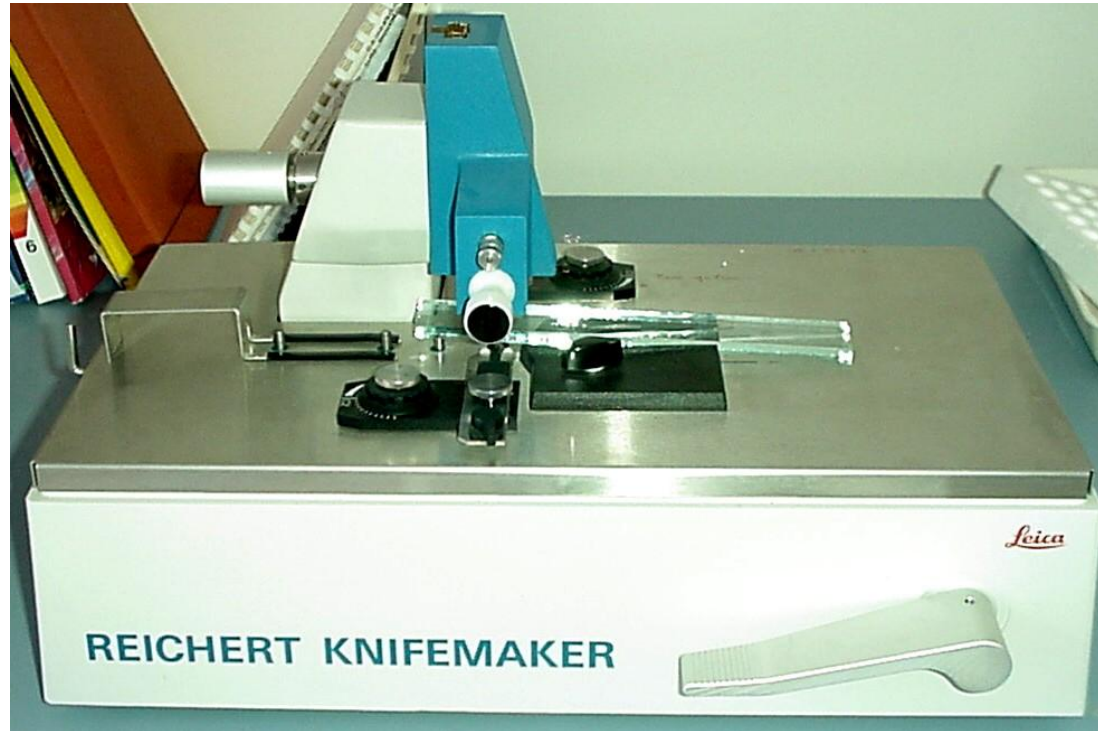
ULTRAFINI

Spessore: 60-90 nm (600-900 Å)

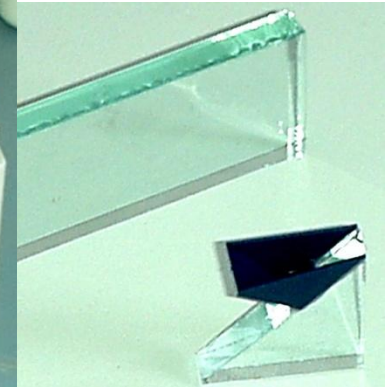
La sezione è ottenuta sfruttando il **filo di una lama di vetro o diamante che seziona il campione contenuto in una dura resina acrilica o epossidica.**

Le sezioni sono raccolte in una vaschetta adesiva o parte integrante della lama di vetro e colma d'acqua. Sul liquido galleggerà la sezione (o un nastro di sezione) dopo essere stata tagliata e prima di essere raccolta su retine metalliche.

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

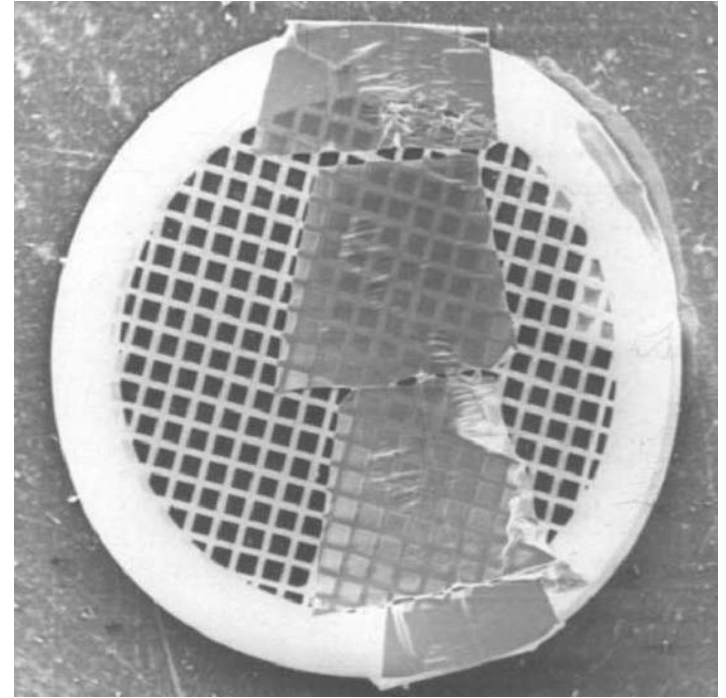
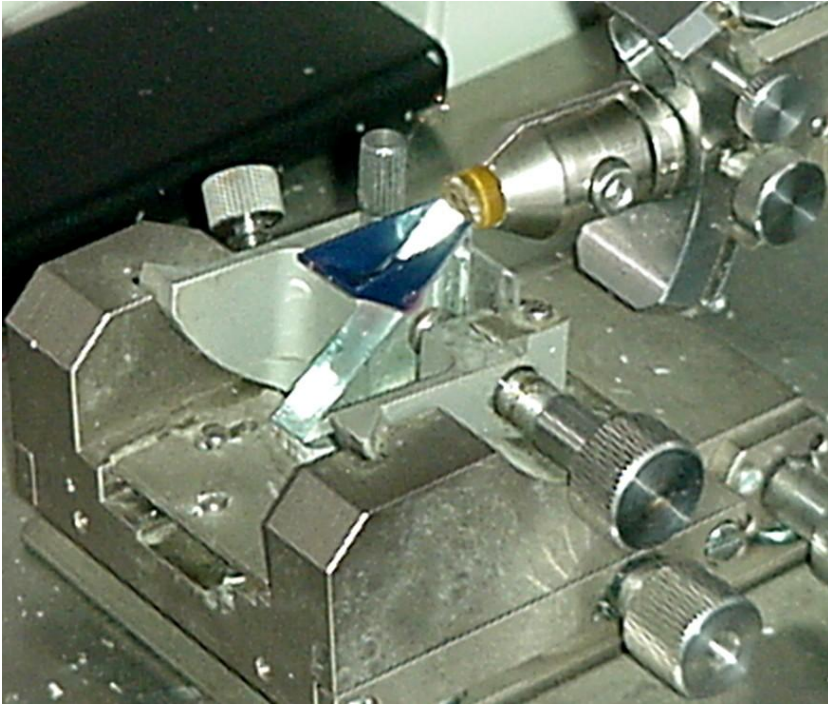


IL KNIFEMAKER



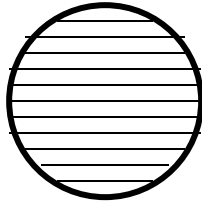
La preparazione delle lame di vetro richiede l'utilizzo del **knifemaker**, un particolare “taglialame” che consente di ottenere lame di vetro.

L'ULTRAMICROTOMO E LE GRIDS (GRIGLIE)

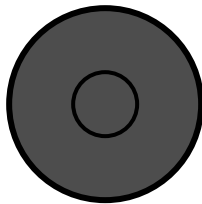
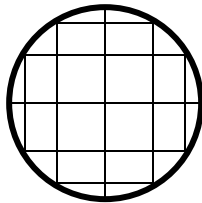


Le sezioni ultrafini di 60-90 nm (600-900 Å) ottenute con gli ultramicrotomi non possono essere maneggiate per la loro estrema fragilità e per le ridotte dimensioni; inoltre non possono essere poste su un supporto di vetro che arresterebbe il fascio elettronico. **Sono adagiate delicatamente su griglie di metallo.**

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA



LE GRIDS



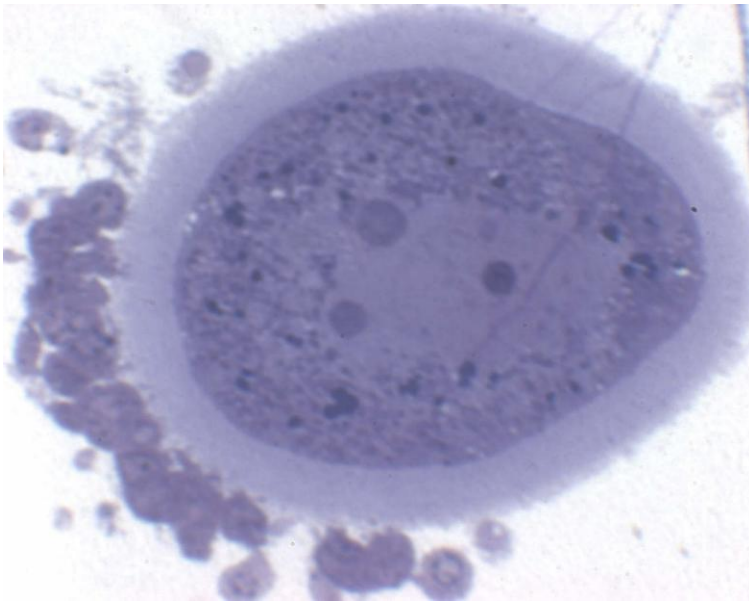
I retini metallic o grids possono essere di rame o, in caso di indagini immunocitochimiche, di nickel o oro. La loro forma e la compattezza delle bar varia a seconda del tipo di osservazione e si misura in mesch.

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA

Colorazione delle semifini



Blue di toluidina



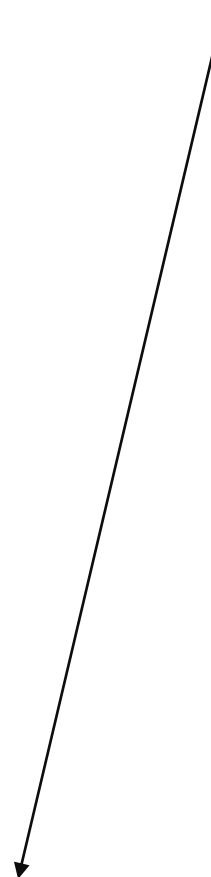
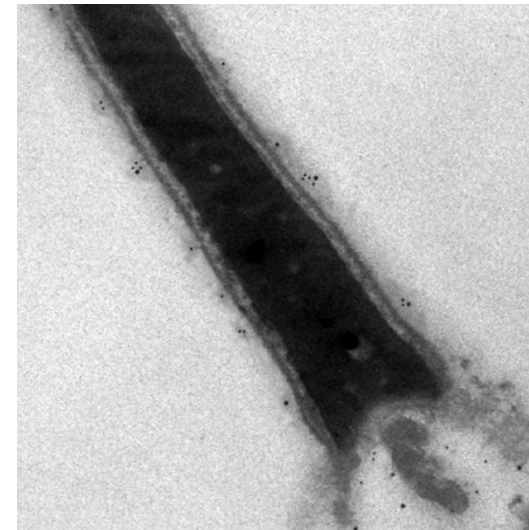
Contrastazione delle ultrafini



Acetato di Uranile

+

Citrato di Piombo



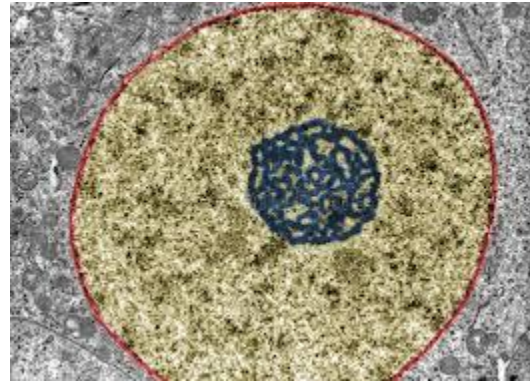
Nb: a causa della pericolosità della sostanza ad oggi si sostituisce con solventi non radioattivi quali il URANIL LESS

IMMAGINI al TEM

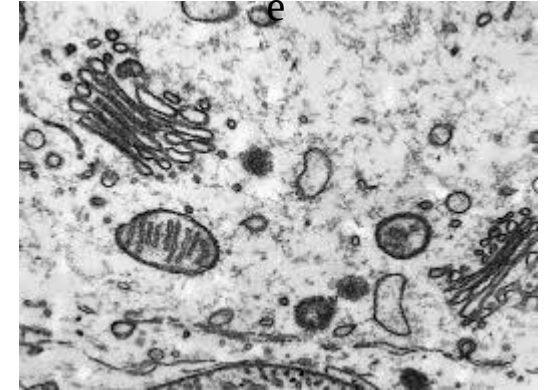
Virus e Mitocondri



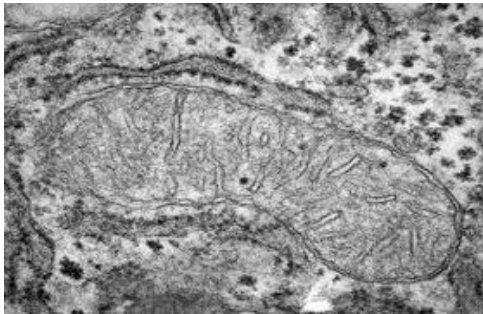
Nucleo con Cromatina condensata



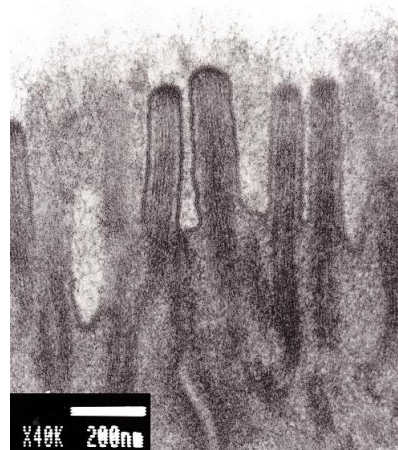
Citoplasma cellulare e Organuli



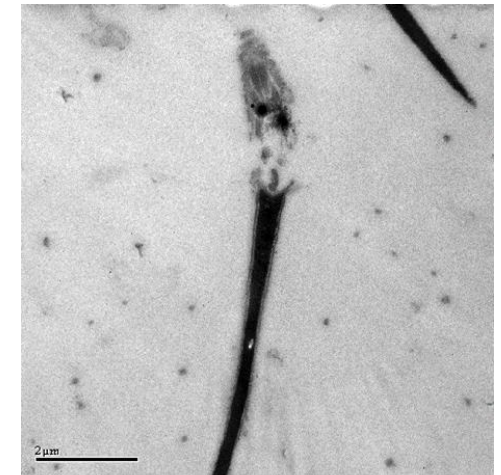
Mitocondrio



Microvilli



Spermatozoo



Specimen : sp/vero actina resti pre/am
Frame D
Indicated Magnification : X12000
Image Notes :

Image Name : Frame
Resolution : 1024 x 1024 pixels
Acquisition Date : 14/07/2003
Acquisition Time : 16.11.59
Exposure Number : 2655
Exposure Time : 0.186449 s

SEM

Un microscopio elettronico che produce immagini di un campione scansionandolo su con un fascio focalizzato di elettroni.

Gli elettroni incidenti interagiscono con gli elettroni nel campione, producendo vari segnali che possono essere rilevati e producendo informazioni sulla topografia e la composizione della superficie del campione

Richiede la FORMAZIONE SPECIFICA DELL'OPERATORE

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

Le fasi di preparazione per il SEM possono essere così schematizzate:

Comuni al TEM



PRELIEVO



FISSAZIONE



DISIDRATAZIONE

Specifiche per il SEM



CRITICAL POINT DRYING (Fase Essiccamento)



MONTAGGIO



RICOPERTURA

Caratteristiche del SEM

Gli elettroni sono usati per creare immagini della superficie del campione – topologia

Risoluzione di oggetti di quasi 1 nm

Ingrandimento fino a 500000 x (250 volte > microcopi a luce trasmessa)

Fornisce viste 3D degli esterni del campione in esame che può essere biologico (cellule, microbi) o di altra natura

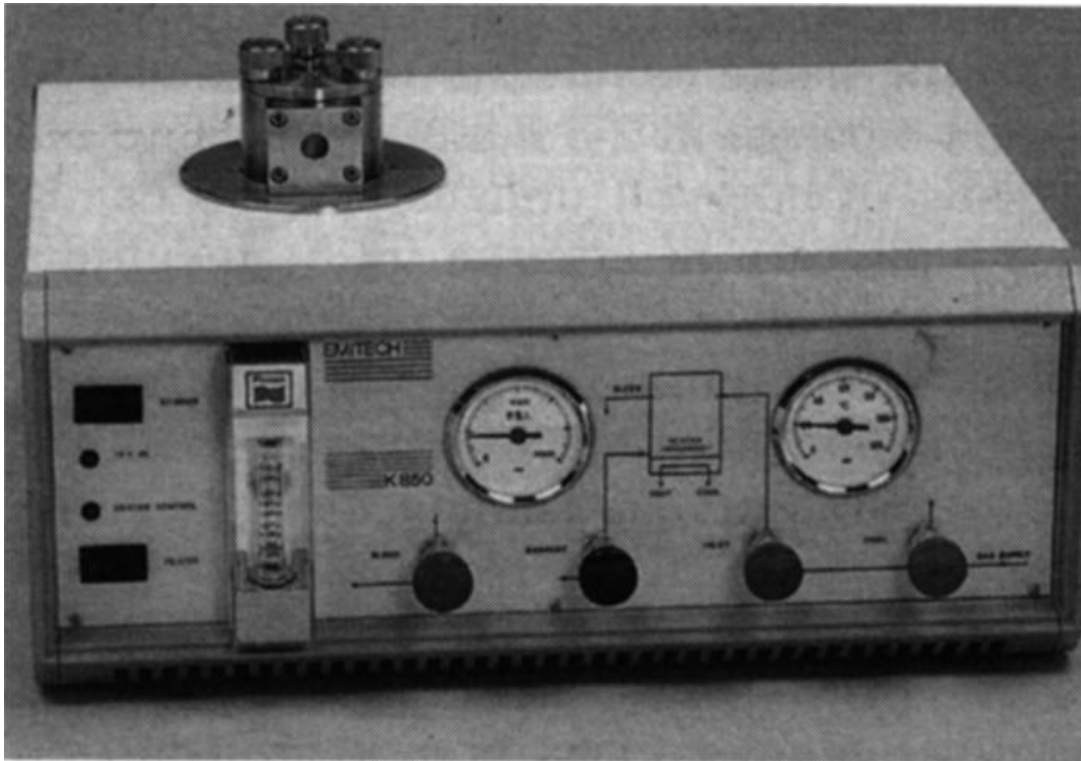
Preparazione dei Campioni Biologici per SEM

- Fissazione chimica con Gluteraldeide, facoltativamente con OsO₄ - per tessuti molli
- Nessuna fissazione necessaria per campioni secchi come ossa, piume, ecc
- Disidratazione mediante sostituzione di acqua nelle cellule con solventi organici come etanolo o acetone, ed essiccazione mediante essiccazione con critical point drying.
- Il campione secco è montato su un supporto o stub
- Rivestimento con materiali conduttivi realizzato con rivestimento a basso vuoto.
- I materiali conduttivi attualmente in uso per il rivestimento dei campioni includono oro, platino, tungsteno e grafite.

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

Le fasi dell'inclusione	Osservazione
Fissazione PFA 1%/ Gluta 0,5%/ Tampone cacodilato 0,1M pH 7,4	I tempi sono riferiti a pezzetti di 1mm ³ , a 4°C per 1-3h circa.
Lavaggio in tampone cacodilato 0.1M pH 7.4 a RT° 3 X 10'	Per eliminare l'eccesso di liquido fissativo.
Post-fissazione Tretossido di Osmio 1% in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.4 per 30' a 4°C	Il Tretossido di Osmio è un ottimo fissativo per i lipidi ma poiché provoca la perdita di N ₂ proteico essa viene fatta precedere dalla fissazione aldeidica.
Lavaggio in tampone cacodilato 0.1M pH 7.4 a RT° 3 X 10'	Per eliminare l'eccesso di liquido fissativo.
Disidratare attraverso la serie ascendente degli alcoli (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 100°)	Il preparato per poter essere osservato al SEM richiede una buona disidratazione del tessuto.
CRITICAL POINT DRYING	SPECIFICO DELLA MICROSCOPIA A SCANSIONE
MONTAGGIO	SPECIFICO DELLA MICROSCOPIA A SCANSIONE
RICOPERTURA	SPECIFICO DELLA MICROSCOPIA A SCANSIONE

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

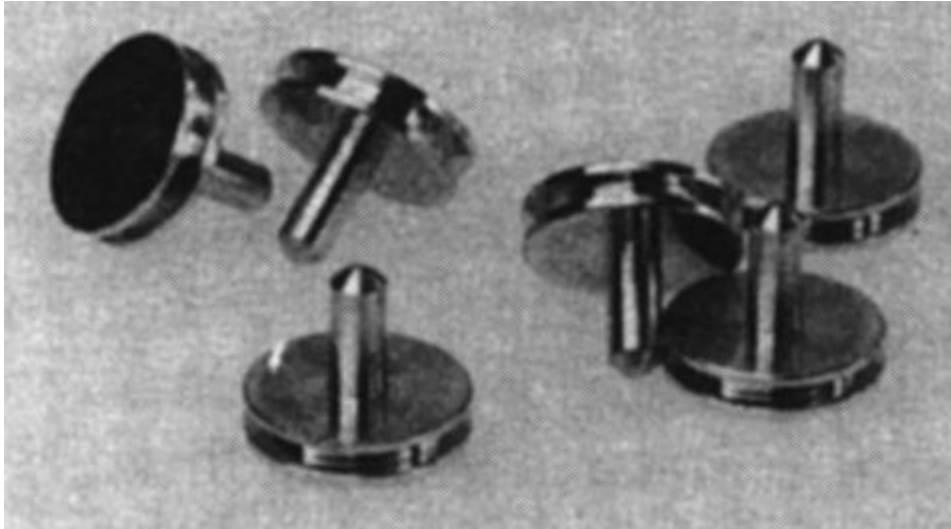


CRITICAL POINT DRYING

Il critical point drying è la metodica maggiormente utilizzata per la fase di **essiccamento** che consiste nell'allontanamento dei fluidi presenti nel campione (generalmente acqua o solventi utilizzati nella disidratazione), **allo scopo di potere successivamente sottoporre il campione ai procedimenti di ricopertura e di osservazione che si eseguono entrambi sottovuoto.**

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

MONTAGGIO



Il montaggio consiste nel fissare il campione sul supporto di osservazione (Stub)

LE FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO per la MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

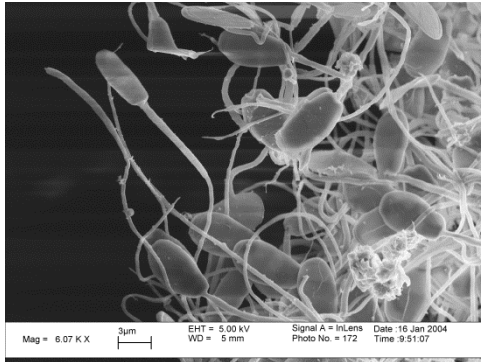


RICOPERTURA

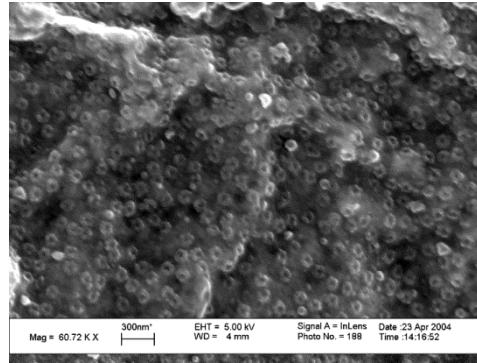
I campioni biologici devono subire **il procedimento di ricopertura metallica**, con **l'impiego di sostanze a elevato peso atomico**, per poter ottenere risultati migliori per quanto riguarda la qualità dell'immagine.

IMMAGINI al SEM

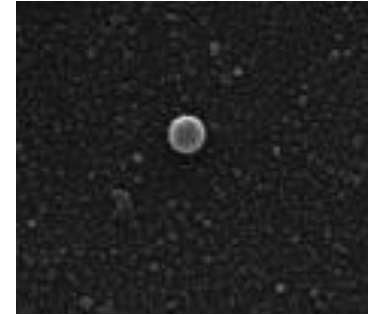
Spermatozoi



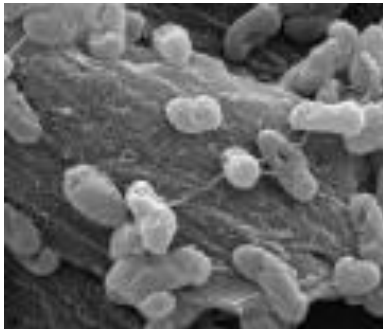
Pori nucleari sulla superficie
membrana nucleare esterna



Esosoma cellulare



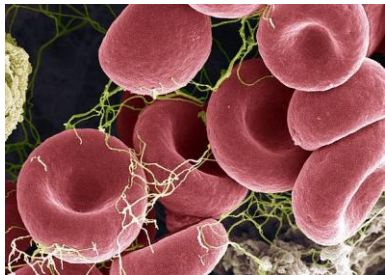
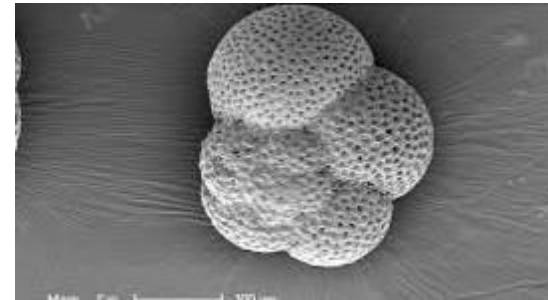
Batteri idrocarburoclasti



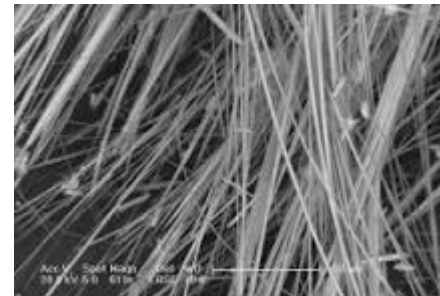
Cromosomi



Foraminifero
(organismo marino a guscio calcareo)



Globuli Rossi (Sangue)



Fibre di amianto