

Principali tipi di microscopi

1. Microscopio in campo chiaro
2. Microscopio in campo oscuro
3. Microscopio in contrasto di fase
4. Microscopio ad interferenza
5. Microscopio a contrasto di fase interferenziale (di Nomarski)
6. Microscopio a fluorescenza
7. Microscopio a luce polarizzata

Microscopio ottico in campo chiaro



E' lo strumento più in uso per lo studio dei preparati fissati nei quali sarà possibile ottenere un aumento di contrasto sfruttando specifiche colorazioni. E' dotato di un dispositivo di illuminazione rappresentato da una lampada a basso voltaggio.

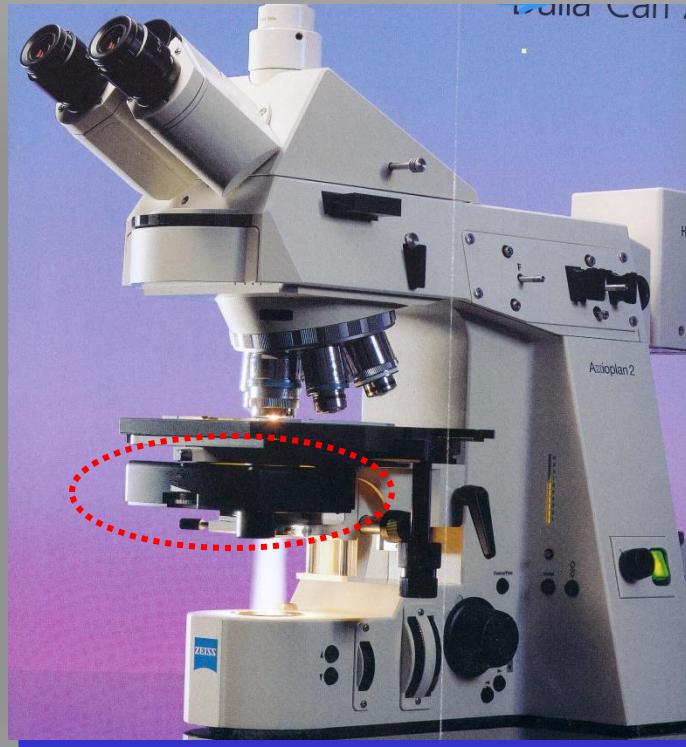
Microscopio ottico in campo chiaro



Cellule epiteliali della mucosa buccale
preparate "a fresco" e non colorate.

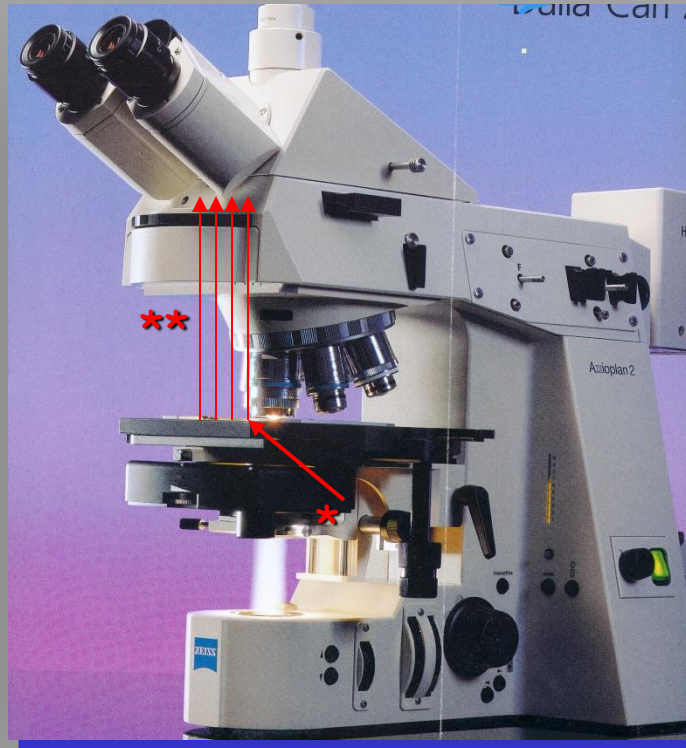
Il microscopio in campo chiaro non consente lo studio di materiale biologico "a fresco" poiché fornisce solo un debole contrasto.

Microscopio ottico in campo oscuro



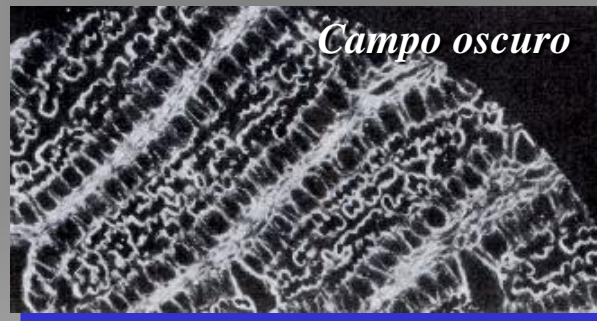
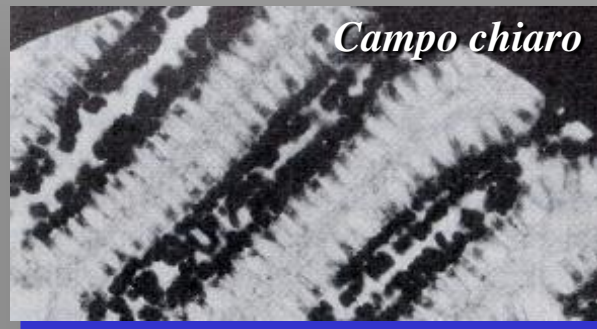
Nel microscopio in campo oscuro si sostituisce il normale condensatore in campo chiaro con un condensatore (paraboloide) che deflette il fascio di luce in modo tale che attraversi l'oggetto con forte obliquità proseguendo in massima parte fuori dal sistema ottico.

Microscopio ottico in campo oscuro



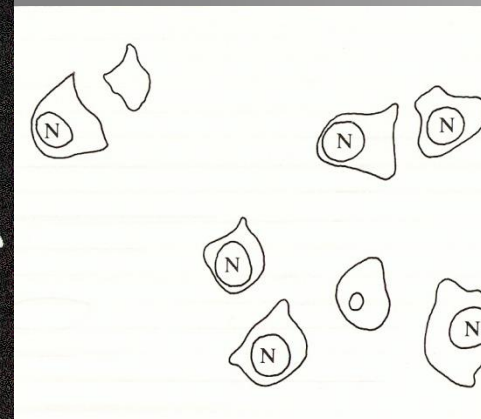
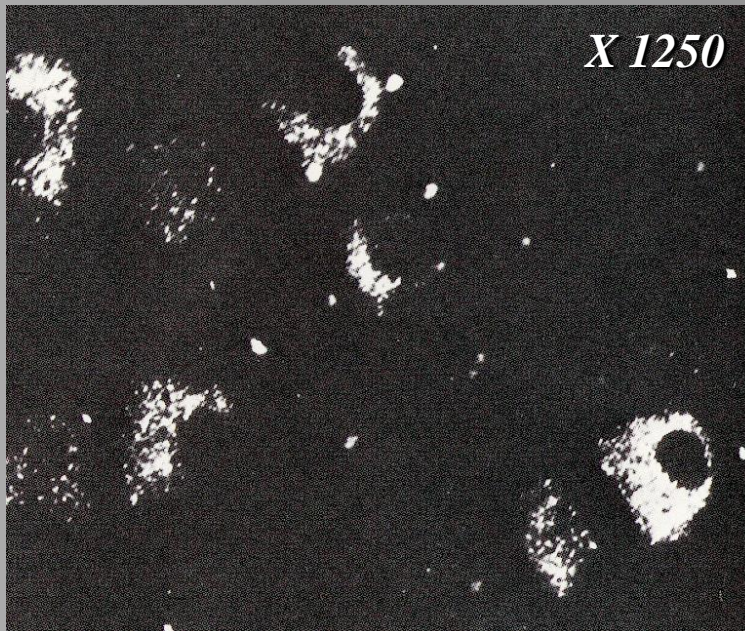
Sul fondo scuro così ottenuto è possibile riconoscere come immagini luminose quelle strutture che, colpite dal fascio obliquo * e avendolo in parte difratto, divengono punti di partenza di raggi ** diretti attraverso il sistema ottico.

Microscopio ottico in campo oscuro



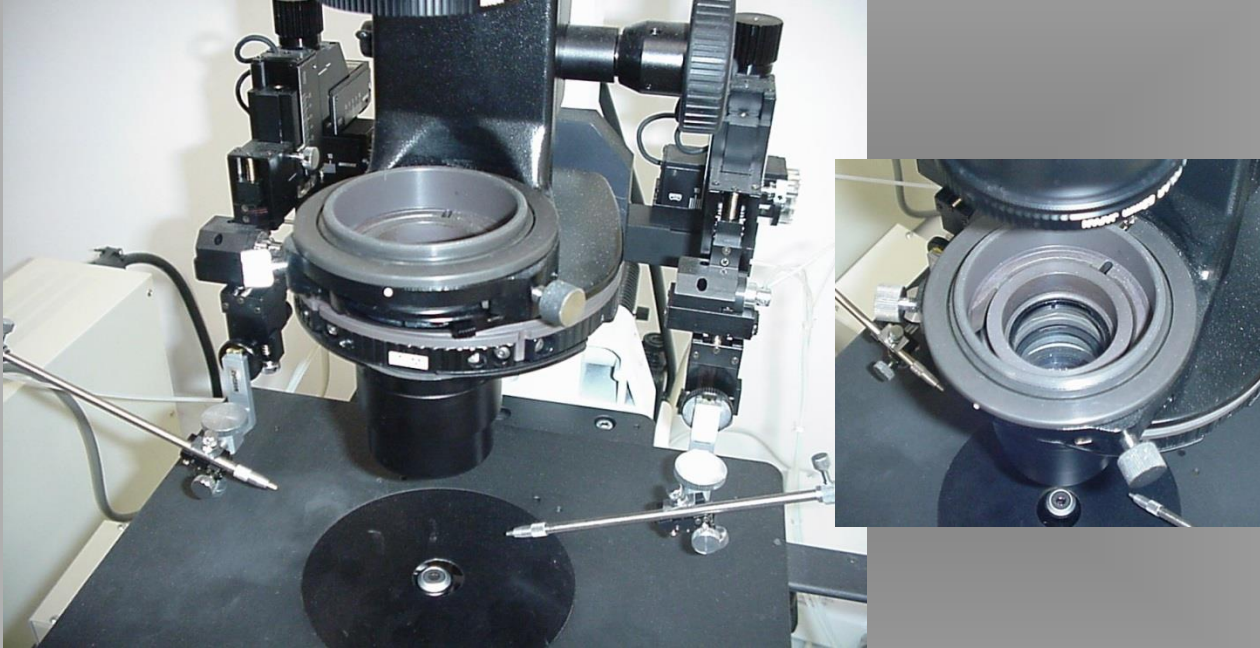
Nel microscopio in campo oscuro si possono riconoscere particelle le cui dimensioni sono inferiori al potere di risoluzione dell'obiettivo. Non è possibile definire il loro colore la forma e le dimensioni.

Microscopio ottico in campo oscuro



Micrografia in campo oscuro di alcuni neuroni nel cui citoplasma sono accumulati granuli rifrangenti di perossidasi assunti dalle cellule. In alcune cellule i granuli, particolarmente abbondanti, delineano la forma del corpo cellulare.

Microscopio ottico in contrasto di fase



Presenta due dispositivi:

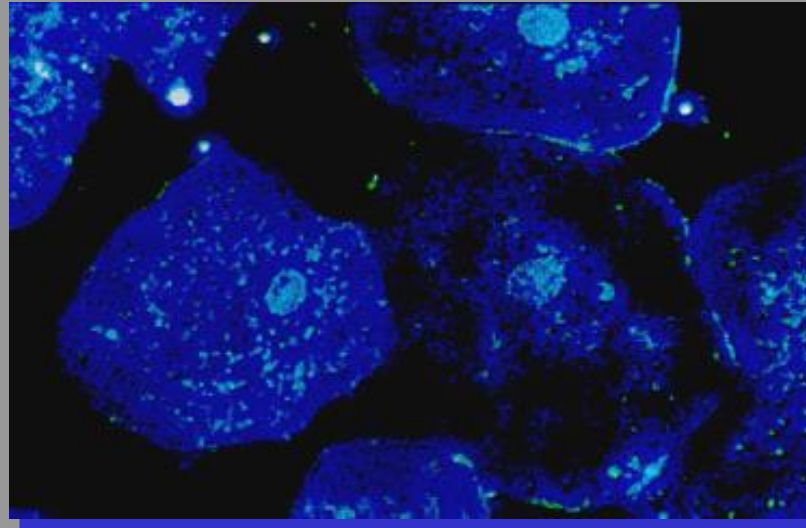
- 1) un diaframma di fase anulare applicato al condensatore
- 2) un anello di fase applicato nel piano focale posteriore dell'obiettivo

Microscopio ottico in contrasto di fase



E' lo strumento di elezione per lo studio di cellule e tessuti viventi di spessore inferiore a 5 micron;

Microscopio ottico in contrasto di fase



Consente di ottenere una accentuazione del basso contrasto offerto dal materiale biologico che è molto idratato.

Microscopio ottico in contrasto di fase



Miocardiocita di embrione di quaglia

Nu = nucleo

Mit = mitocondri

Microscopio ottico in contrasto di fase interferenziale di Nomarski

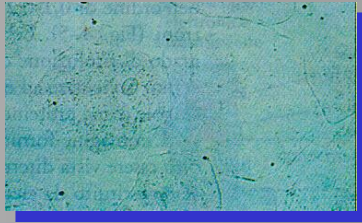


E' fondato sui principi del microscopio a contrasto di fase.

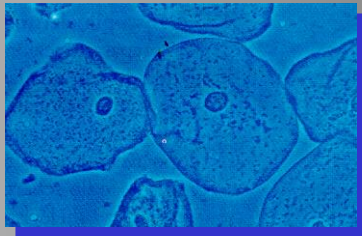
Questa microscopia può essere considerata una via di mezzo fra il microscopio ottico in campo chiaro e quello a contrasto di fase. Permette lo studio di oggetti trasparenti non colorati in cui appaiono gli aspetti tridimensionali dei preparati.

Consente di osservare i diversi piani di un oggetto relativamente spesso fornendo immagini con caratteristico rilievo.

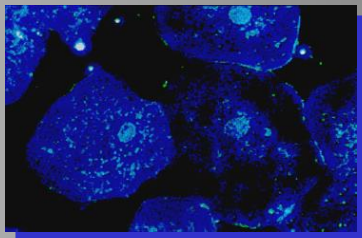
Microscopio ottico in contrasto di fase interferenziale di Nomarski



Campo chiaro



Campo oscuro



Contrasto di fase



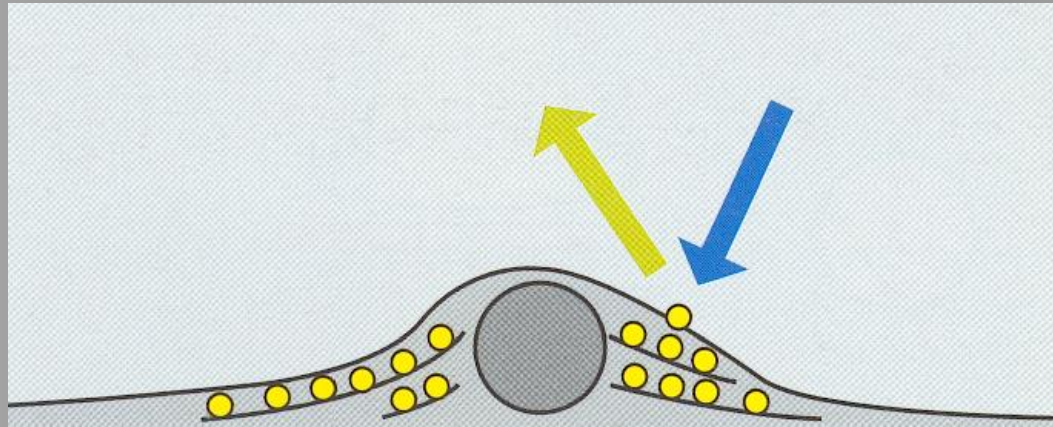
Interferenza di Nomarski

Microscopio ottico a fluorescenza



È uno strumento di largo impiego per studiare strutture dotate di fluorescenza primaria o secondaria.

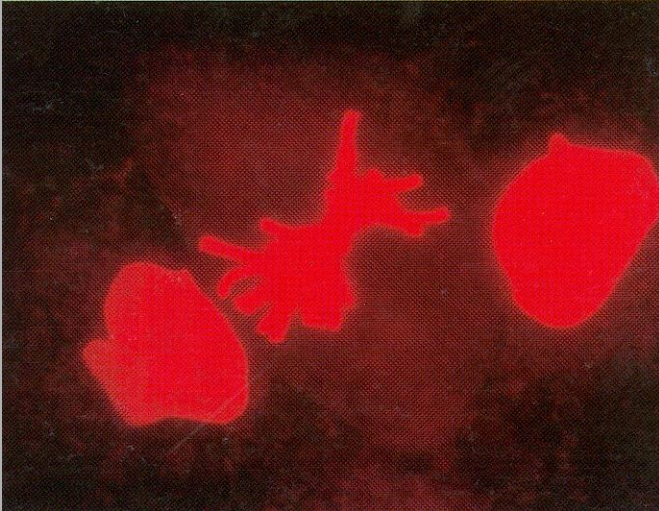
Fluorescenza



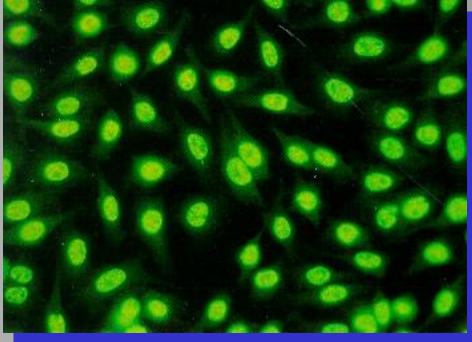
La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di assorbire la luce ad una certa lunghezza d'onda (se eccitate da un fascio di luce blu o nella banda dell'UV) e di rilasciarla ad una maggiore lunghezza d'onda nello spettro del visibile.

Fluorescenza

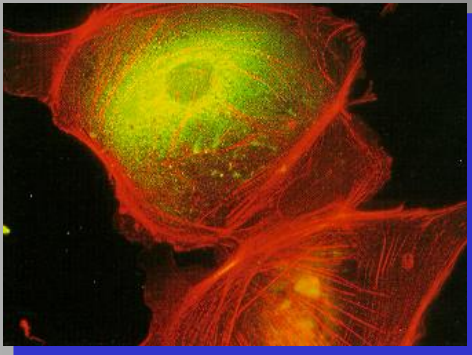
La fluorescenza si dice **primaria** nel caso di sostanze naturalmente fluorescenti (ad esempio la cellulosa); è detta **secondaria** quando la fluorescenza è indotta da fluorocromi legati al campione in esame.



Fluorescenza

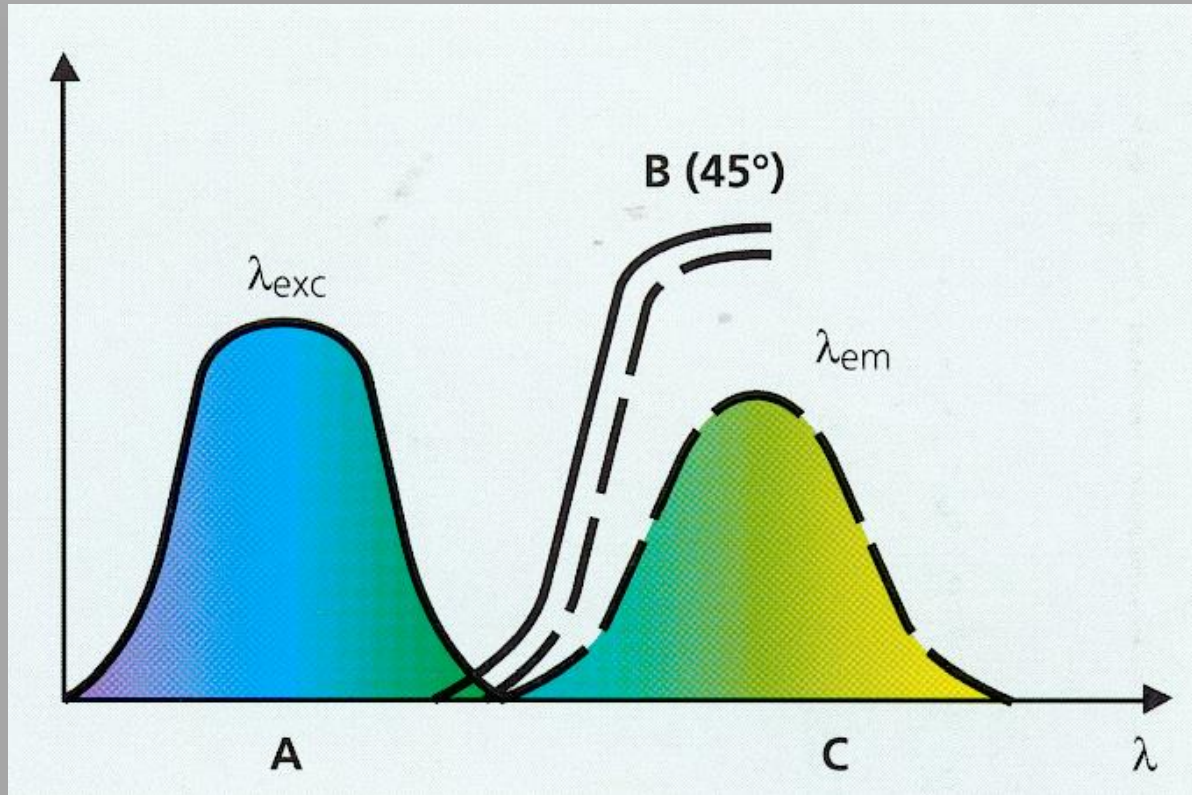


La **fluorescenza primaria o intrinseca** è tipica di alcuni inclusi cellulari quali le lipofuscine



La **fluorescenza secondaria** è dovuta alla capacità di alcune strutture cellulari di legare e far rilevare specifici coloranti fluorescenti: **i fluorocromi**.

Fluorescenza



A : picco di eccitazione

B : beam splitter

C : picco di emissione

Ogni cromogeno possiede un sua specifica lunghezza d'onda lambda sia di eccitazioine che di emissione; è utile conoscerle per sfruttarne le caratteristiche che ne consentono un largo impiego in biologia.

Fluorescenza



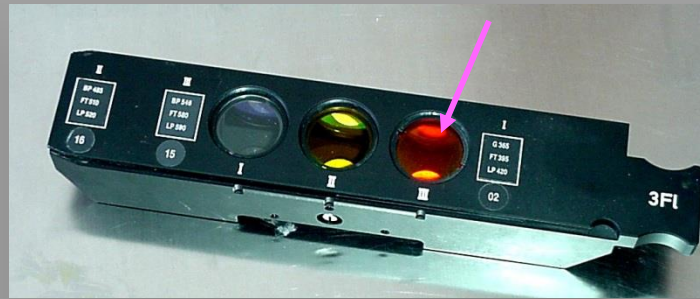
- 1) L'emissione del fascio di luce da parte della lampada a vapori di mercurio deve avere lunghezza d'onda strettamente dipendente dal tipo di cromogeno così da eccitarlo.
- 2) Il filtro di eccitazione fa passare radiazioni a ristretta lunghezza d'onda (in verde) Nel caso del FITC la lunghezza d'onda è compresa fra 450 e 490 nm.
- 3) 4) Tali radiazioni penetrano nell'obiettivo e riflesse dallo specchio dicroico eccitano il fluorocromo
- 5) 6) Le radiazioni emesse dal fluorocromo (rosso) passano sia il filtro dicroico sia il filtro di sbarramento. Il filtro di sbarramento (o di arresto) seleziona lunghezze d'onda di emissione tipiche del cromogeno. Nel caso del FITC comprese nello spettro del giallo-verde fra 520 e 560 nm.

Microscopio ottico a fluorescenza



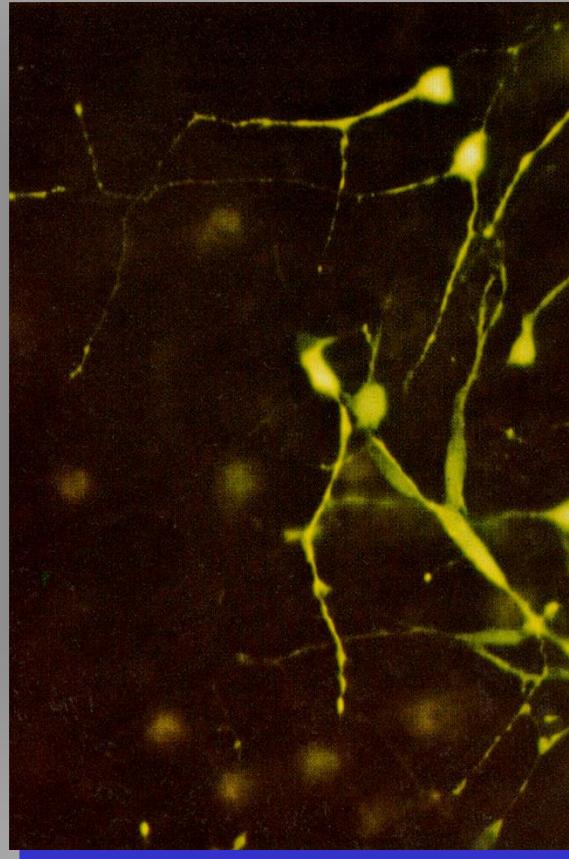
Nel microscopio a fluorescenza la sorgente è rappresentata da una lampada che emette radiazioni UV.

Microscopio ottico a fluorescenza: filtri di eccitazione e di arresto



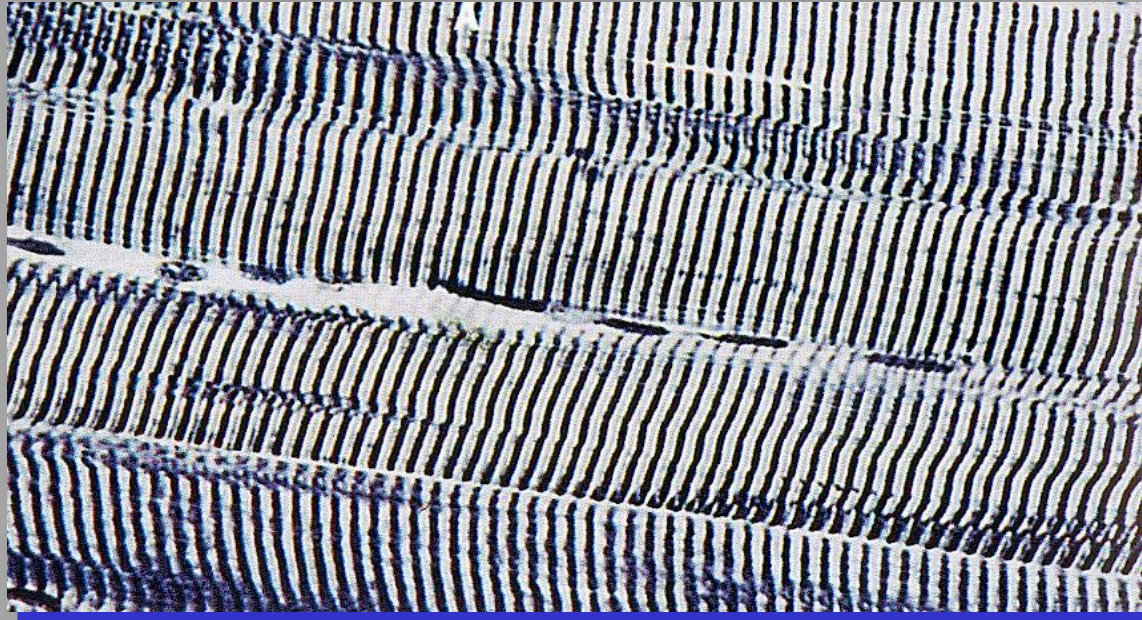
Usando specifici **filtri di eccitazione** è possibile sfruttare fra le radiazioni solo quelle adatte ad eccitare lo specifico cromogeno. Al di sopra dell'obiettivo sono posti i **filtri di arresto** della luce eccitatrice che permettono il passaggio delle sole radiazioni emesse dal preparato. Il cromogeno del preparato apparirà in colore diverso su un fondo scuro rappresentato dalle parti non fluorescenti dell'oggetto.

Microscopio ottico a fluorescenza



Il preparato apparirà in colore diverso su un fondo scuro rappresentato dalle parti non fluorescenti dell'oggetto.

Microscopio ottico a luce polarizzata



E' lo strumento per lo studio di strutture cristalline caratterizzate da molecole regolarmente orientate. Nel microscopio è posto un **polarizzatore** fra la luce ed il preparato ed un **analizzatore** fra il preparato e l'obiettivo. Questi due strumenti trasformano la luce ordinaria in luce polarizzata su un solo piano di propagazione.