

LP 02. Principiile microscopiei optice. Tipuri speciale de microscopie optica. Microscopul electronic. Principii. Interpretarea imaginilor de ME.

Un rol important in studiul tesuturilor si celulelor il are microscopia. Microscopul optic este acel tip de microscop care utilizeaza lumina vizibila si un sistem de lentile pentru a mari imaginea. Microscopul optic este cel mai vechi si mai simplu tip de microscop și pot fi folosite in medicina pentru analize sau pentru cercetare in diferite discipline: microbiologie, hematologie, dermatologie, stomatologie, etc.

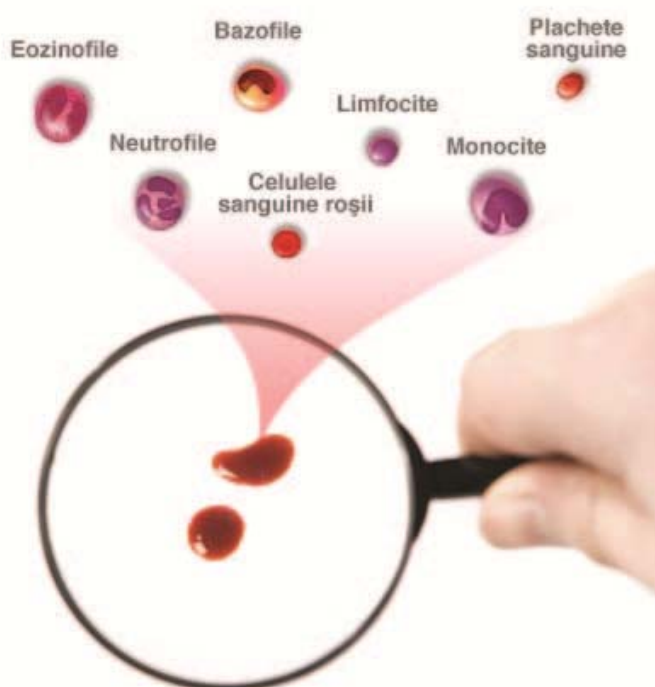


Fig. 1 Tipuri de celule existente in sange

COMPONENTELE MICROSCOPULUI OPTIC

Microscopul optic binocular, cel mai utilizat tip de microscop optic, este alcatuit din sistemul mecanic, sistemul optic si sistemul de iluminare.

1. Sistemul mecanic cuprinde:

- 🔦 Talpa (piciorul) – la nivelul ei se gaseste sursa de lumina si diafragma; are rol in stabilitatea microscopului;
- 🔦 Coloana (manerul)

☛ Platina (masuta) – are rol in sustinerea preparatului, fixat cu ajutorul a doua piese metalice numite valeti sau cavaleri. Platina poate fi deplasata anterior-posterior, latero-lateral cu ajutorul unui dispozitiv numit car mobil. In centru prezinta o deschidere care permite razelor luminoase emise de sursa sa ajunga la preparat.

☛ Tubul microscopului – poarta ocularele

☛ Revolverul – este alcatuit din doua calote metalice suprapuse, cea superioara este fixa, iar cea inferioara poarta obiectivele.

☛ Dispozitivul de reglare a imaginii – alcatuit din viza macrometrica (macroviza) cu rol in prinderea imaginii de ansamblu si in ridicarea si coborarea coloanei microscopului; viza micrometrica (microviza) cu rol in clarificarea imaginii.

2. Sistemul optic cuprinde:

☛ Obiectivele – alcatuite dintr-un sistem de lentile, din care numai cea frontala (inferioara) serveste la formarea imaginii, celalalte lentile ale obiectivului avand rolul de a corecta greselile optice ale lentilei frontale. Distanța dintre lentila frontala si preparat se numeste distanta frontala. Diferenta esentiala intre obiectivele microscopului este data de puterea de marire a fiecaruia. Obiectivele sunt de doua tipuri:

☛ obiective uscate – au puterea de marire de 6X, 10X, 20X, 40X

☛ obiective cu imersie – au puterea de marire de 60X, 90X, 100X. Sunt denumite astfel deoarece intre lentila frontala si preparat se afla un lichid (ulei de cedru, ulei de parafina) care are un indice de refractie apropiat de cel al sticlei, eliminandu-se astfel refractia.

☛ Ocularele – se afla in partea superioara a tubului microscopului. Ocularul este alcatuit din doua lentile plan-convexe, orientate cu fata plana in sus. Puterea de marire a ocularelor este de 7X, 10X.

Puterea de marire a microscopului optic este data de produsul dintre puterea de marire a ocularului si cea a obiectivului folosit.

☛ Sistemul de iluminare – situat in talpa microscopului. Cuprinde un bec de 6 sau 12 V, o oglinda plana, diafragma si condensatorul.



Fig. 2 Microscopul optic

PUTEREA DE REZOLUȚIE

Cu ajutorul microscopului optic pot fi vizualizate entitati distincte, aflate la o distanta de $0,2\mu\text{m}$. Limita fundamentala a tuturor microscopelor este aceea ca un anumit tip de radiatie nu poate oferi detalii structurale mai mici decat lungimea sa de unda. Limita rezolutiei microscopelor optice este determinata de lungimea de unda a luminii vizibile, intre 400nm (violet) si 700nm (rosu). Astfel, bacteriile si mitocondriile (care au o dimensiune de aprox. 500nm) sunt cele mai mici structuri a caror forma poate fi distinsa clar cu ajutorul microscopului optic. Figura 3 reda marimea structurilor celulare si subcelulare si intervalul dimensiunilor vizualizate cu fiecare tip de microscop.

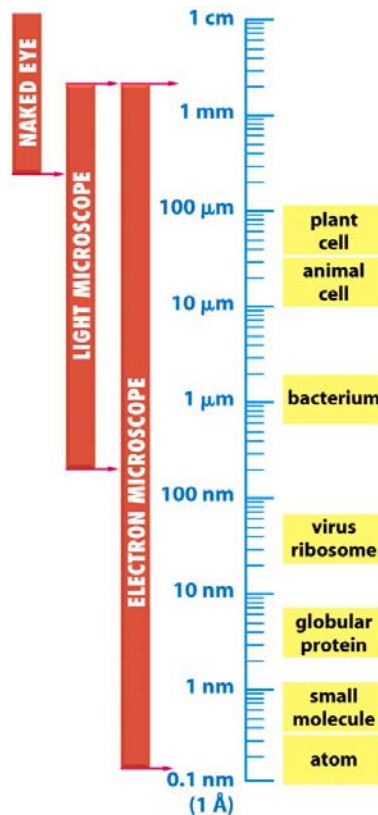


Figure 9-2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fig. 3. Dimensiunile celulelor și componentelor celulelor redată pe o scară logaritmică, indicând intervalele obiectelor care pot fi vizualizate de către ochi, microscop optic și microscop electronic.

Rezoluția unui sistem optic reprezintă distanța minimă la care pot fi percepute separat două entități distincte. Puterea de rezoluție depinde atât de lungimea de undă a luminii utilizate, cât și de apertura numerică a sistemului de lentile utilizat. Apertura numerică este o măsură a deschiderii “pupilei” microscopului.

Legea lui Abbe:

$$d_0 = 0,6\lambda / n \sin \alpha$$

d_0 = rezoluția ($d_{0\text{ochi}} = 100\mu\text{m}$, $d_{0\text{microscop optic}} = 0,2\mu\text{m}$, $d_{0\text{microscop electronic}} = 1-2\text{\AA}$)

λ = lungimea de undă a luminii

n = indice de refracție ($n_{\text{aer}} = 1$, $n_{\text{sticla}} = 1,52$, $n_{\text{ulei de imersie}} = 1,52$)

α = unghiul de apertură

$n \sin \alpha = NA = \text{apertură numerică}$

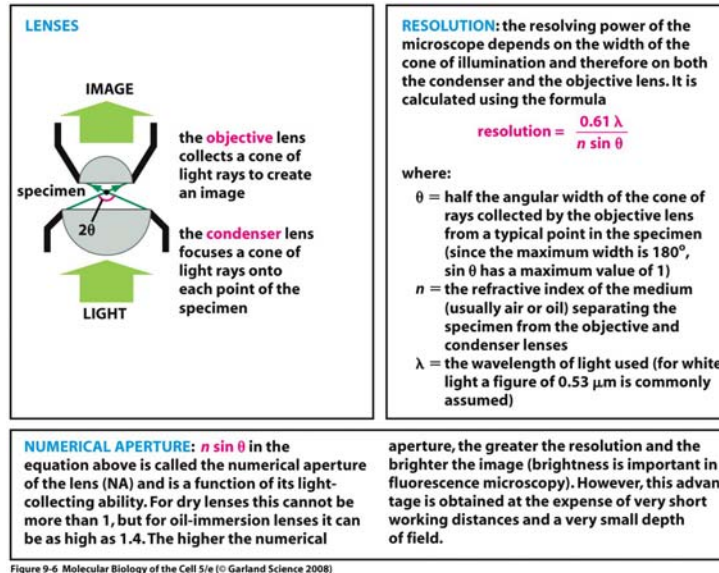


Fig.4. Legea lui Abbe.

PRINDEREA IMAGINII LA MO

Se aduce obiectivul de 4X in axul optic;

Se ridica obiectivul la punctul maxim cu ajutorul macrovizei;

Se fixeaza preparatul microscopic pe platina cu ajutorul valetilor;

Se ridica condensatorul la punctul maxim;

Se aduce in axul optic o portiune de tesut cu ajutorul carului mobil;

Se coboara condensatorul;

Se regleaza distanta pupilara privind in microscop;

Se coboara obiectivul pana la punctul minim cu ajutorul macrovizei;

Se ridica obiectivul pana in momentul prinderii imaginii;

Se clarifica imaginea cu ajutorul microvizei;

Se aduce in centrul campului microscopic portiunea de tesut care prezinta interes, dupa care, prin rotirea revolverului de deplaseaza, pe rand, obiectivele cu putere de marire mai mare in axul optic;

Examinarea cu imersie presupune punerea unei picaturi de ulei pe suprafata preparatului microscopic si aducerea in axul optic a obiectivului cu imersie, dupa care se clarifica imaginea;

Dupa terminarea examinarii, obiectivul de 4X se aduce in axul microscopului, se inlatura preparatul microscopic, se coboara condensatorul.

VARIANTE DE MICROSCOPIE (MO, MF, ME); VARIANTE DE ME (transmisie, scanare)

Microscopul optic

Acesta este cel mai comun tip de microscop. Puterea de marire variaza intre 10 si 1000 de ori dar poate merge pana la 1500x sau 2000x.

In cazul acestui tip de microscop, pentru a obtine o imagine marita, lumina are un traseu unic care trece printr-o serie de lentile – in linie – fiecare lentila marind imaginea deja marita de lentila care a precedat-o. Pe scurt: un singur traseu al luminii si mai multe lentile.

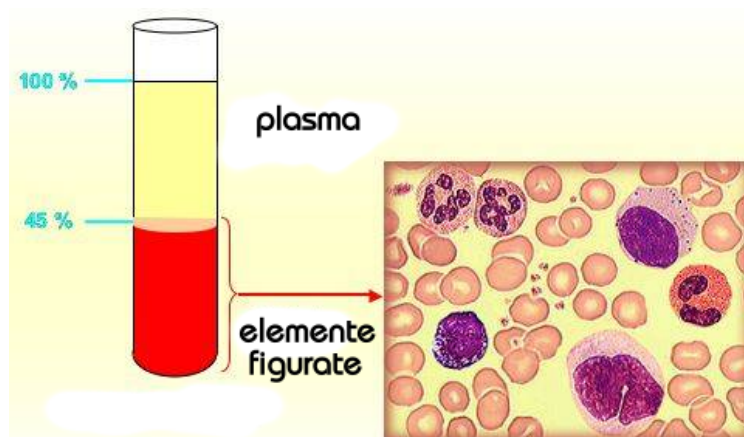


Fig. 5 Frotiu de sange periferic

Procesare si analizarea imaginilor cu ajutorul tehnicilor digitale

Procesarea imaginilor a avut un impact major asupra tehnicilor de microscopie optica. Utilizarea sistemelor electronice a permis depasirea a doua limitari majore ale ochiului uman: imposibilitatea de a vedea clar in lumina obscura si imposibilitatea de a percepe diferente mici ale intensitatii luminii atunci cand fundalul este luminos. Pentru a creste abilitatea de a observa celulele in conditii de iluminare slaba, o camera CCD (charge-coupled device) poate fi atasata

microscopului. Asemenea camere sunt deosebit de importante pentru a vizualiza molecule fluorescente in celule vii.

Deoarece imaginile preluate de camerele CCD sunt in forma electronica, ele pot fi cu usurinta procesate pentru a se obtine o cantitate foarte mare de informatii.

Microscopia cu fluorescenta

Moleculele fluorescente absorb lumina cu o anumita lungime de unda si emit lumina cu o lungime de unda mai mare decat cea absorbita. Daca un astfel de component este iluminat cu o lumina pe care o absoarbe, si apoi este vizualizat utilizand un filtru care permite doar trecerea luminii emise, aceasta lumina va straluci pe un camp intunecat. Deoarece campul este intunecat, chiar si o cantitate infima de lumina emisa va fi detectata.

Colorantii fluorescenti utilizati pentru a colora celulele sunt vizualizati cu ajutorul microscopului cu fluorescenta. Acest microscop este similar cu un microscop optic obisnuit, cu exceptia faptului ca lumina, emisa de o sursa foarte puternica, este trecuta prin doua seturi de filtre - unul pentru a filtra lumina inainte ca aceasta sa ajunga la specimen, celalalt pentru a filtra lumina emisa de specimen. Primul filtru permite doar trecerea luminii cu lungimea de unda care excita colorantul utilizat, iar cel de-al doilea blocheaza lumina, permitand trecerea doar a luminii cu lungime de unda corespunzatoare celei emise de colorant (Fig. 5).

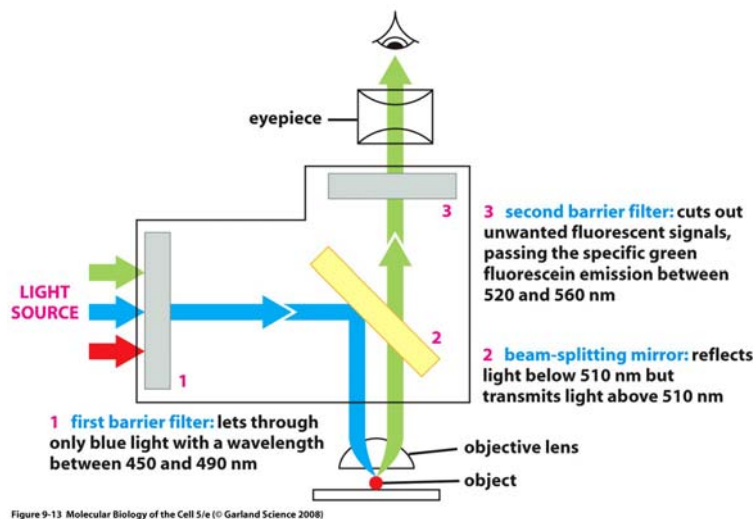


Fig. 6 Sistemul optic al microscopului cu fluorescenta

Microscopia cu fluorescanta este utilizata pentru a detecta proteine specifice sau alte molecule din celule sau tesuturi. O tehnica foarte utilizata presupune atasarea unui colorant fluorescent unui anticorp, care se va lega foarte specific de macromoleculele impotriva carora a fost produs. Doi coloranti fluorescenti sunt frecvent utilizati pentru acest scop: fluoresceina, care emite o lumina verde intensa atunci cand este stimulata cu lumina albastru deschis, si rodamina, care emite o lumina rosie atunci cand este stimulata cu lumina galben-verzuie. Prin atasarea fluoresceinei la un anticorp si a rodaminei la alt anticorp, distributia diferitelor molecule poate fi urmarita in aceeasi celula; cele doua molecule sunt vizualizate separat, prin schimbarea seturilor de filtre, fiecare specific pentru fiecare colorant. In figura 6 se observa utilizarea a trei tipuri de coloranti, in acelasi mod descris mai sus, pentru a distinge diferite tipuri de molecule in aceeasi celula.

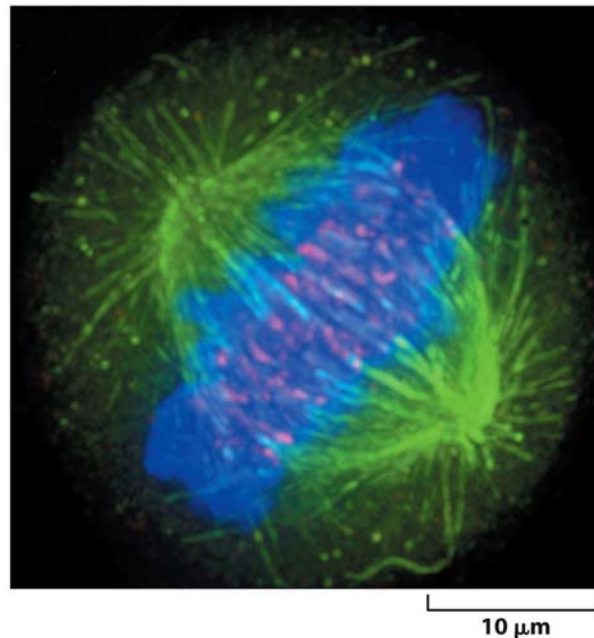


Figure 9-15 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fig. 7. Microscopie fluorescanta cu utilizarea a trei coloranti diferiti

Microscopia Electronica

Principial, microscopia electronica (ME) este identica cu cea optica, dar diferenta majora consta in natura sursei de iluminare a preparatului, ME foloseste pentru iluminarea preparatului un fascicul de electroni in loc de radiatii fotonice (lunina), iar in loc de lentile optice, foloseste lentile electromagnetice.

Microscopul electronic este un tip de microscop care utilizeaza electroni pentru a ilumina un preparat si a crea o imagine marita. Spre deosebire de microscopul optice, microscopul electronic are o rezolutie mult mai mare (pana la 1\AA) si o putere de marire de pana la $2.000.000\times$.

Aplicatii: Cu ajutorul microscopului electronic se pot obtine informatii despre conformatia moleculelor proteice, transportul la nivelul membranelor celulare, configuratia acizilor nucleici, structura virusurilor etc.

Principiul de functionare se bazeaza pe folosirea unui fascicul de electroni generati de un tun electronic. Electronii sunt supusi unor tensiuni de accelerare, fiind focalizati la trecerea lor prin campuri electromagnetice pentru a forma imaginea.

Microscopia electronica de transmisie (TEM)

Utilizeaza un fascicul de electroni care traverseaza preparatul, iar prin intermediul sistemului de formare a imaginii se obtine pe ecranul fluorescent imaginea preparatului examinat. Elementele unui microscop tip TEM sunt urmatoarele: sistemul electrono-optic (coloana microscopului), sistemul electronic și consola de comandă și respectiv, sistemul de vid (Figura 8).

TEM utilizeaza un fascicul de electroni care trece prin preparat. Electronii sunt emisi de un catod din tungsten incalzit pana la incandescenta. Intre acesta si anod se genereaza o diferenta de potential (tensiune de accelerare) de $50.000-100.000\text{ V}$. Aceasta tensiune de accelerare determina formarea unui fascicul de electroni care se propaga dinspre catod spre anod si de aici in sistemul electrono-optic al microscopului. O serie de lentile electromagnetice condensor focalizeaza electronii pe preparat. Lentilele electromagnetice obiectiv si proiector focalizeaza in continuare electronii care au trecut prin preparat, asigurand formarea imaginii pe un ecran fluorescent.

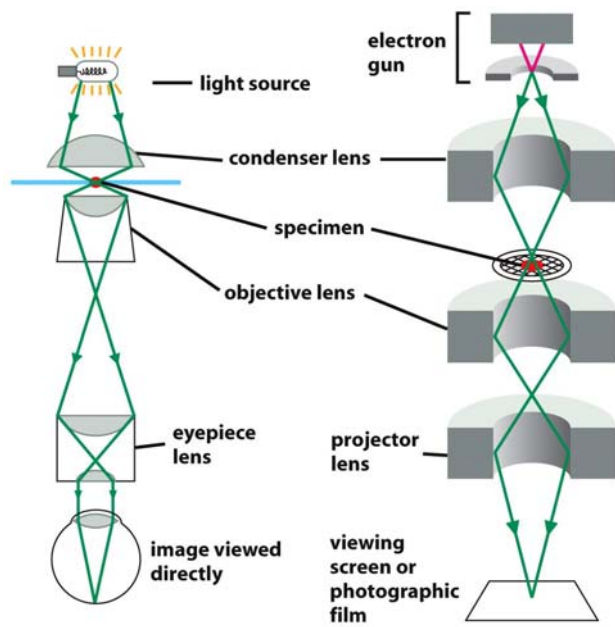


Figure 9-42 part 1 of 2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



Figure 9-42 part 2 of 2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 8. Principalele componente ale microscopului optic obisnuit si ale TEM

Microscopia electronica de baleiaj (Scanning Electron Microscopy - SEM)

Observarea sectiunilor prin TEM permite doar aprecierea bidimensiionala a structurii unei celule.

Un microscop electronic de baleiaj (SEM) poate produce direct o imagine tridimensională a structurii suprafeței unui specimen. În timp ce TEM utilizează electronii care au trecut prin specimen pentru a produce o imagine, SEM utilizează electronii care sunt emisi de la suprafața specimenului. Specimenul care urmează să fie examinat este fixat, uscat și acoperit cu un strat subțire dintr-un metal greu. (Figura 9, 10). Microscopul de tip SEM folosește un fascicul de electroni care parcurge fiecare punct al replicii suprafeței preparatului (scanează). Moleculele bombardate cu astfel de electroni produc reflectia acestora, sau emit electronii secundari, care sunt

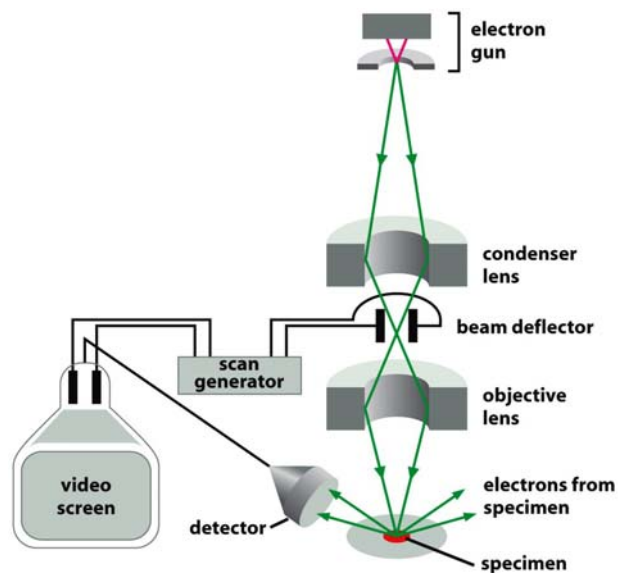


Figure 9-49 part 1 of 2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

apoi captati de un detector de scintilatie si formeaza un semnal pe un tub catodic (ecran video).

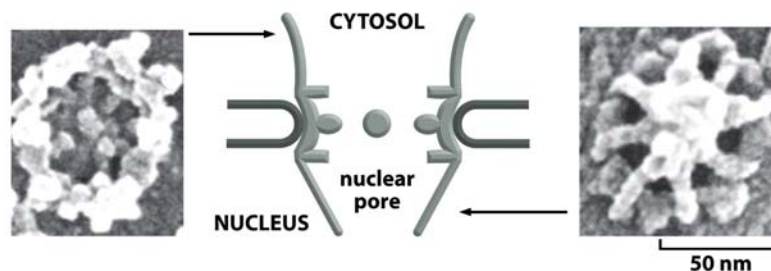


Figure 9-51 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 9. Microscopul electronic de baleiaj

Figura 10. Porul nuclear vizualizat cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj

Pregătirea probelor pentru analiză

Pentru a obține maximum de informații furnizate de un preparat, acesta trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- Celulele să-și pastreze caracteristicile cât mai aproape de aspectul "in-vivo" (procesul se numește 'fixare')
- Preparatul să fie transparent pentru a permite trecerea fasciculului luminos/ de electroni
- Preparatul să fie expus într-un strat cât mai subțire astfel încât să fie prezent un singur strat de celule
- Preparatul să fie colorat corespunzător pentru a permite identificarea diferitelor elemente componente.

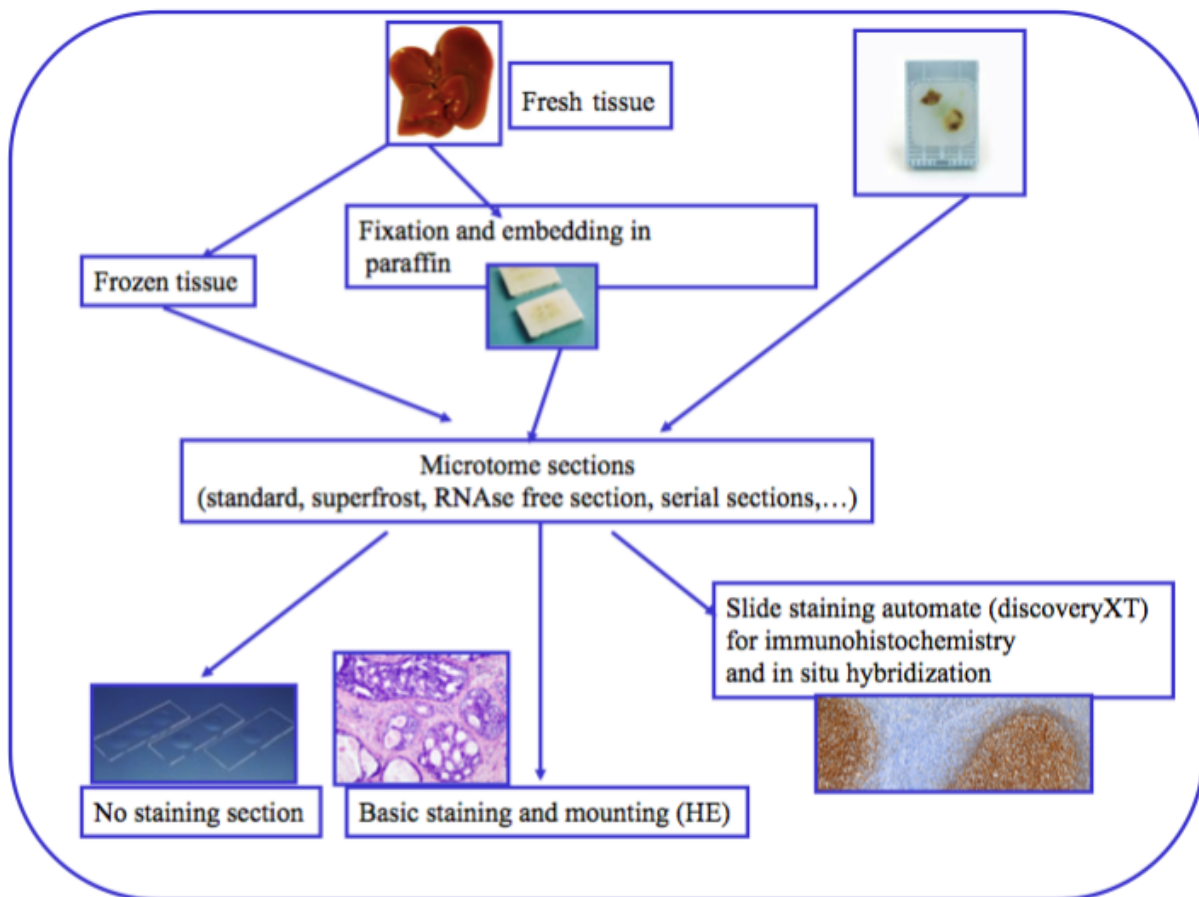


Fig. 11 pregătirea probelor pentru evaluarea microscopica

Intrebari

Enumeratie componentele MO.

Definiti legea lui Abbe.

Enumerati tipuri de microscopie si prezentati principiul de functionare.

Enumerate diferentele intre MO si ME.