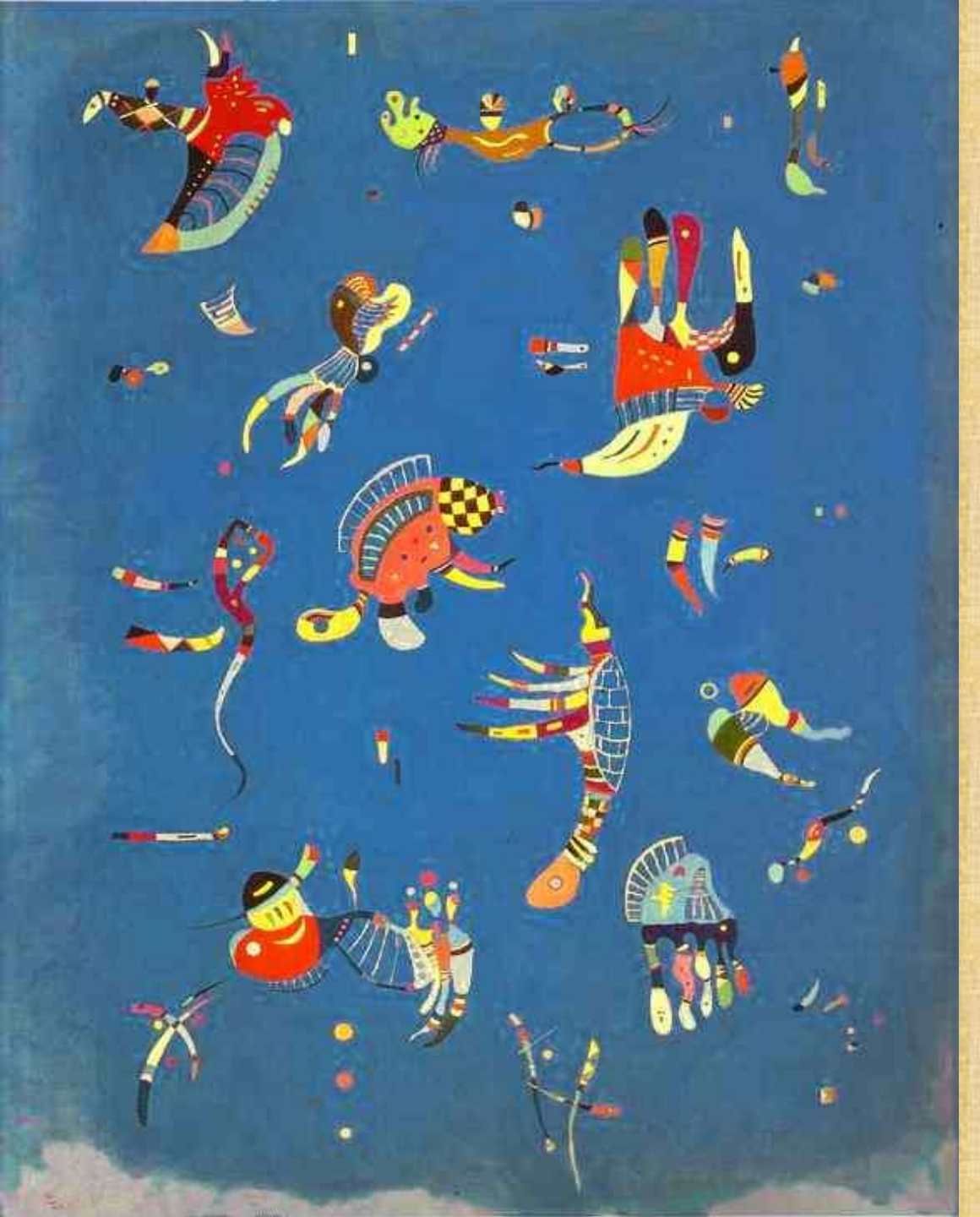


Alla ricerca dell'invisibile

Wassilij Kandinskij
Blue de ciel (1940)

Umberto Fascio, Biologo
Corso UTE - 20 Aprile 2021

Storia della microscopia

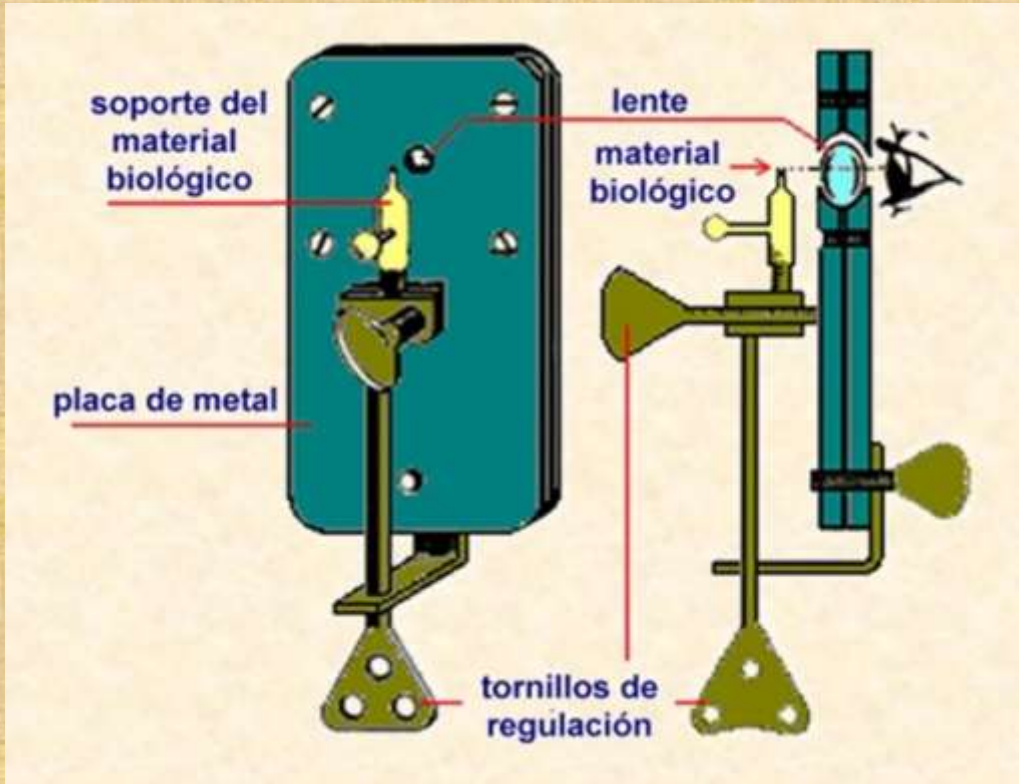
Galileo Galilei (1564-1642)

Il Saggiatore(Roma 1623)

…….telescopio accomodato per vedere gli oggetti vicinissimi……

Occhiolino

Antoni van Leeuwenhoek
(1632-1723)

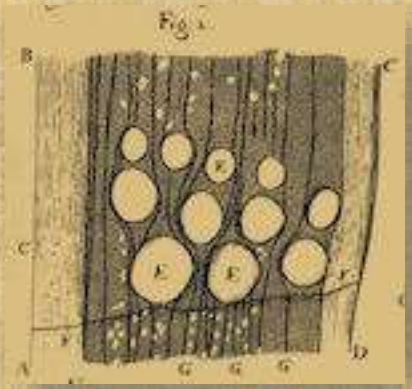


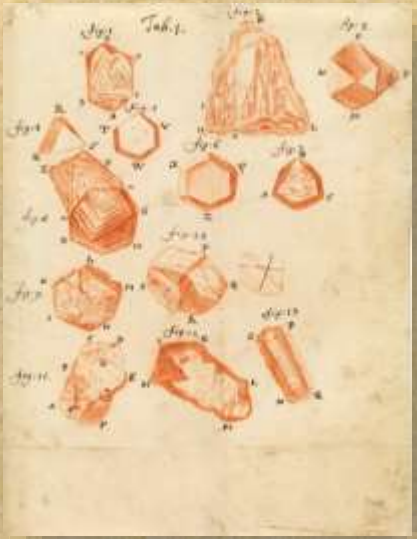
Antoni van Leeuwenhoek
(1632-1723)

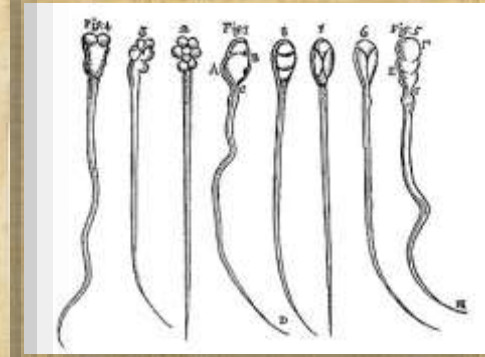
Protozoi e altri organismi unicellulari come può averli visti van Leeuwenhoek

Antoni van Leeuwenhoek
(1632-1723)

" They were incredibly small, nay so small in my sight, that I judged that even if 100 of these very animals lay stretched out one against another, they could not reach to the length of a grain of coarse sand."







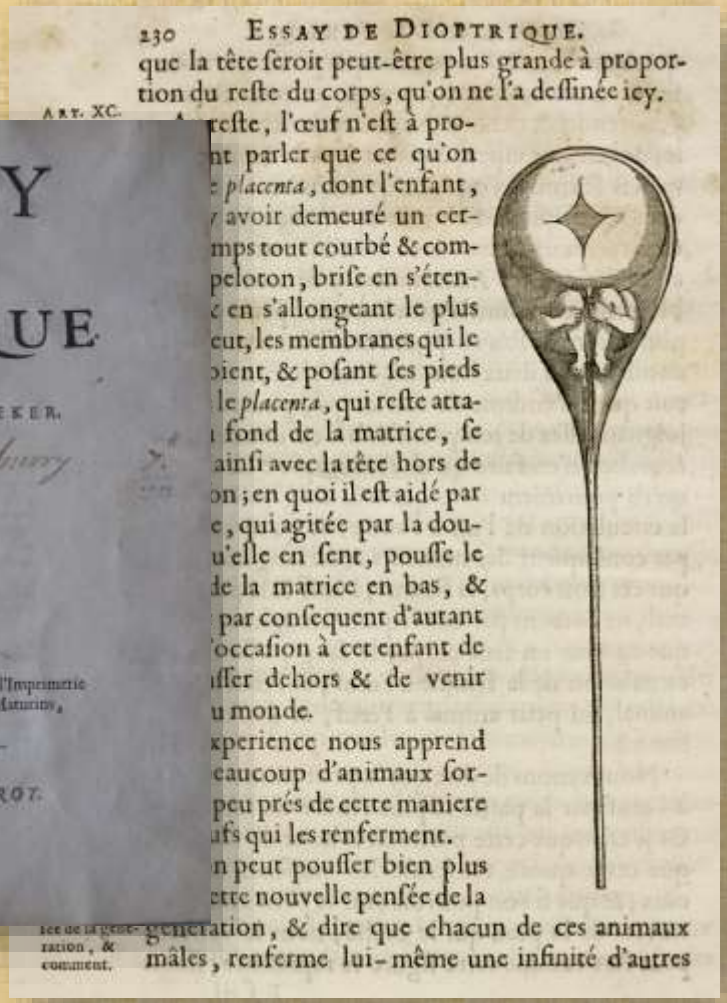
Nicolas Hartsoeker (1656-1725)

ESSAY
DE
DIOPTRIQUE.

Par NICOLAS HARTSOEKER.

A PARIS,
Chez JEAN ANISSON Directeur de l'Imprimerie Royale, ruë Saint Jacques, vis-à-vis les Maturins, à la Fleur-de-Lys de Florence.

M. DC. XCIV.
AVEC PRIVILEGE DU ROY.



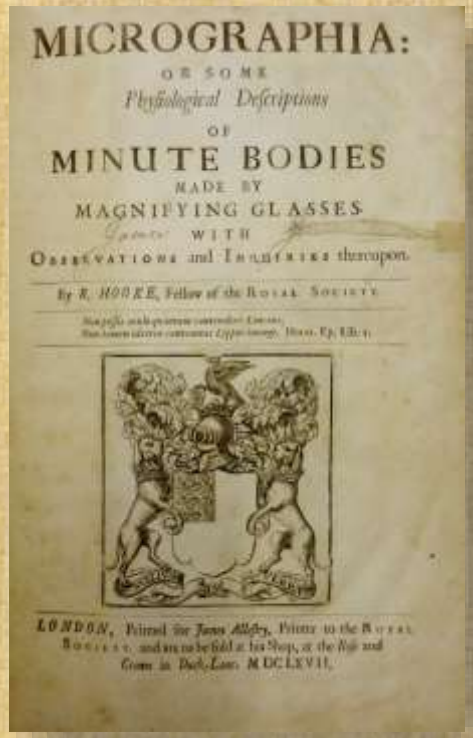
230 ESSAY DE DIOPTRIQUE.

que la tête seroit peut-être plus grande à proportion du reste du corps, qu'on ne l'a dessinée icy.

ART. XC. reste, l'œuf n'est à pro-
nt parler que ce qu'on
placenta, dont l'enfant,
avoir demeuré un cer-
mps tout courbé & com-
peloton, brise en s'éten-
en s'allongeant le plus
eut, les membranes qui le
oient, & posant ses pieds
le placenta, qui reste atta-
fond de la matrice, se
ainsi avec la tête hors de
on; en quoi il est aidé par
e, qui agitée par la dou-
u'elle en sent, pousse le
de la matrice en bas, &
par consequent d'autant
occasion à cet enfant de
isser dehors & de venir
u monde.
xperience nous apprend
eaucoup d'animaux sor-
peu prés de cette maniere
ufs qui les renferment.
n peut pousser bien plus
ette nouvelle pensée de la
ration, & dire que chacun de ces animaux
mâles, renferme lui-même une infinité d'autres

ice de la génération, & comment.

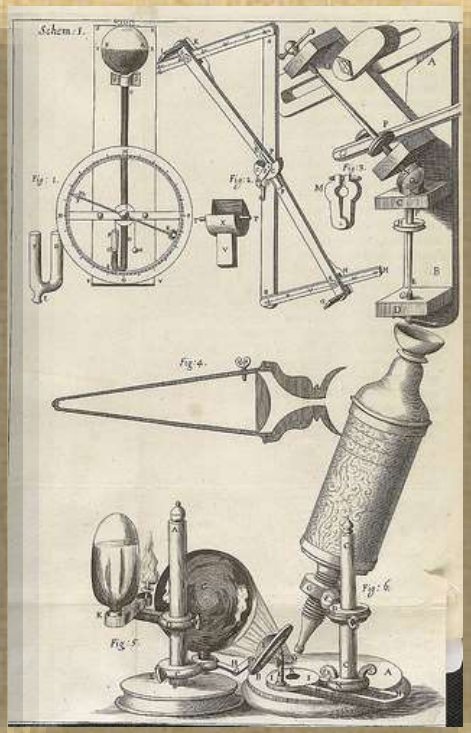
Robert Hooke (1635-1702)

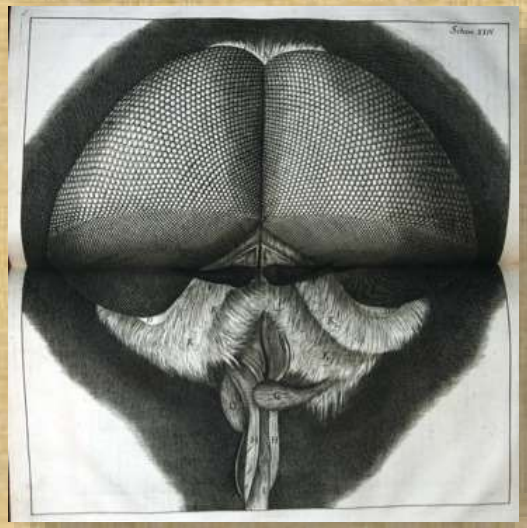


MICROGRAPHIA:
OR SOME
Physiological Descriptions
OF
MINUTE BODIES
MADE BY
MAGNIFYING GLASSES
WITH
OBSERVATIONS and INQUIRIES thereupon.

By R. HOOKE, Fellow of the ROYAL SOCIETY.

LONDON, Printed for *James Allestry*, Printer to the ROYAL SOCIETY, and are to be sold at his Shop, at the *Rose* and *Crown* in *Duck-Lane*. MDCLXVII.





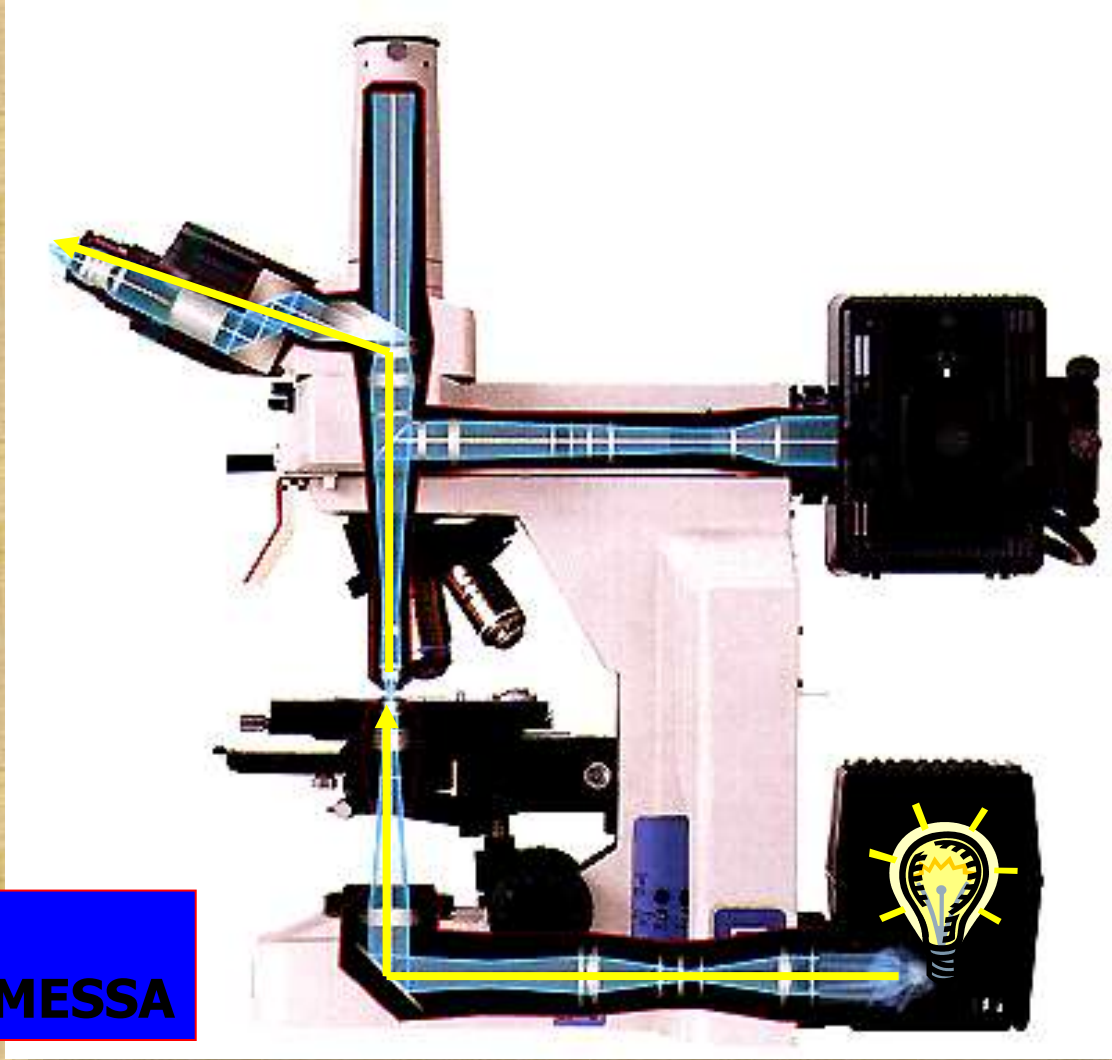
Schem. XI.
Fig. 1.
Fig. 2.
Nodus

[illegible]

[illegible]

[illegible]

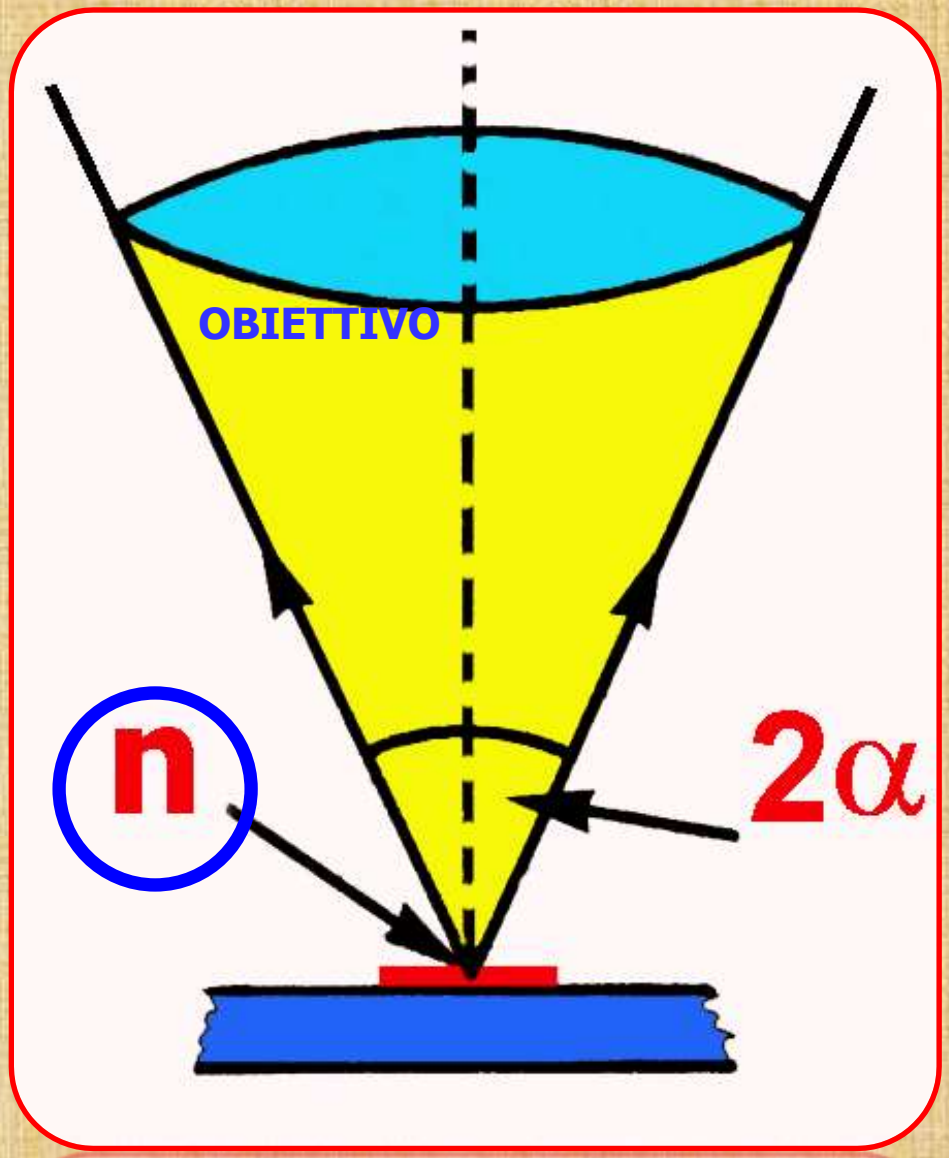
I SISTEMI DI ILLUMINAZIONE



LUCE TRASMESSA

Il fascio luminoso che parte dal campione diretto all'obiettivo, è un cono di luce di ampiezza 2a.

Tale ampiezza dipende dall' indice di rifrazione n di ciò che sta tra campione e obiettivo.

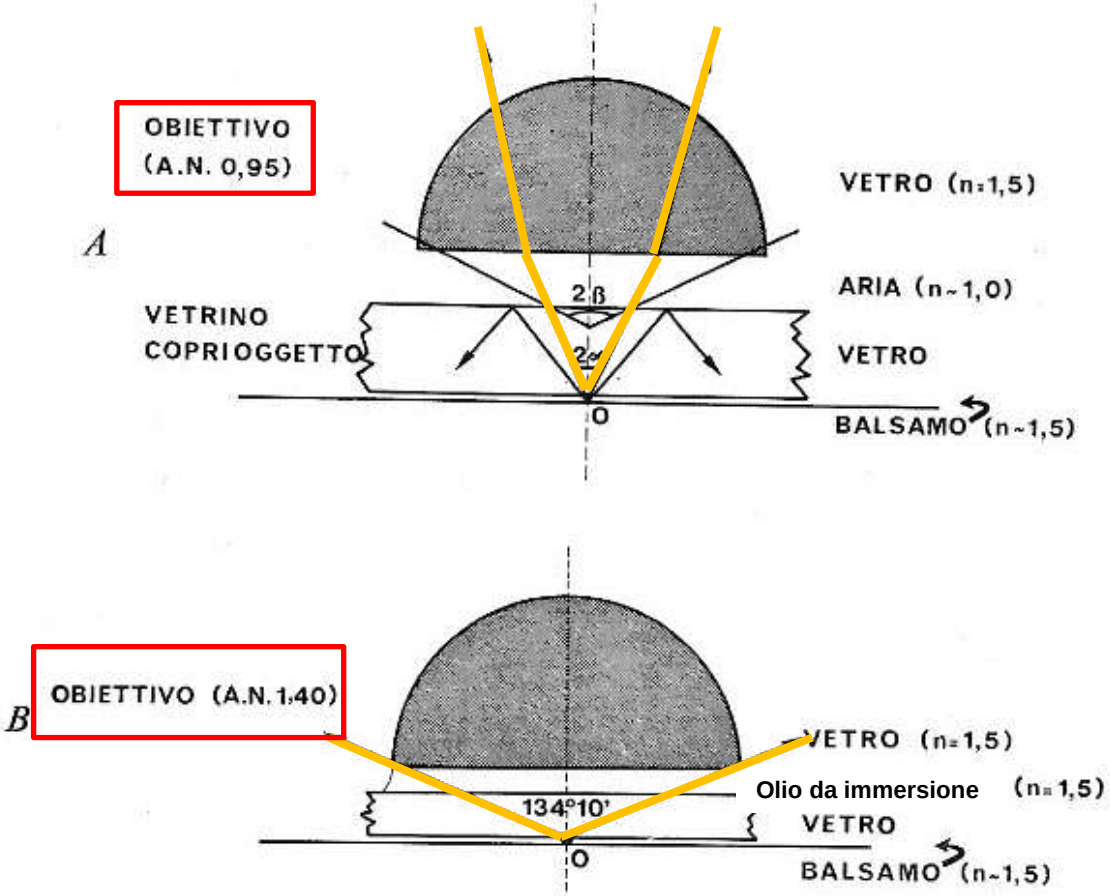


Ernst Abbe (1840 - 1905)

A.N. = n sen α

Questa espressione indica la massima ampiezza del cono di luce che entra nell' obiettivo. Si può notare come l' A.N. sia direttamente proporzionale all'indice di rifrazione n del mezzo posto tra campione e lente dell'obiettivo.

PL APO
x/0.85 CORR
0.11
0.17
0.23


OBIETTIVO
(A.N. 0,95)
A
VETRO (n=1,5)
ARIA (n~1,0)
2β
VETRINO
COPRIOGGETTO
2α
VETRO
O
BALSAMO (n~1,5)
B
OBIETTIVO (A.N. 1,40)
VETRO (n=1,5)
Olio da immersione (n=1,5)
134°10'
VETRO
O
BALSAMO (n~1,5)

Ernst Abbe
(1840-1905)

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin\alpha}$$

RISOLUZIONE

Il potere di risoluzione di un sistema ottico consiste nella capacità di rilevare due punti dell'oggetto che stiamo osservando come due punti distinti tra loro.

OCCHIO UMANO:0,1 mm
MICROSCOPIO OTTICO:0,2 µm

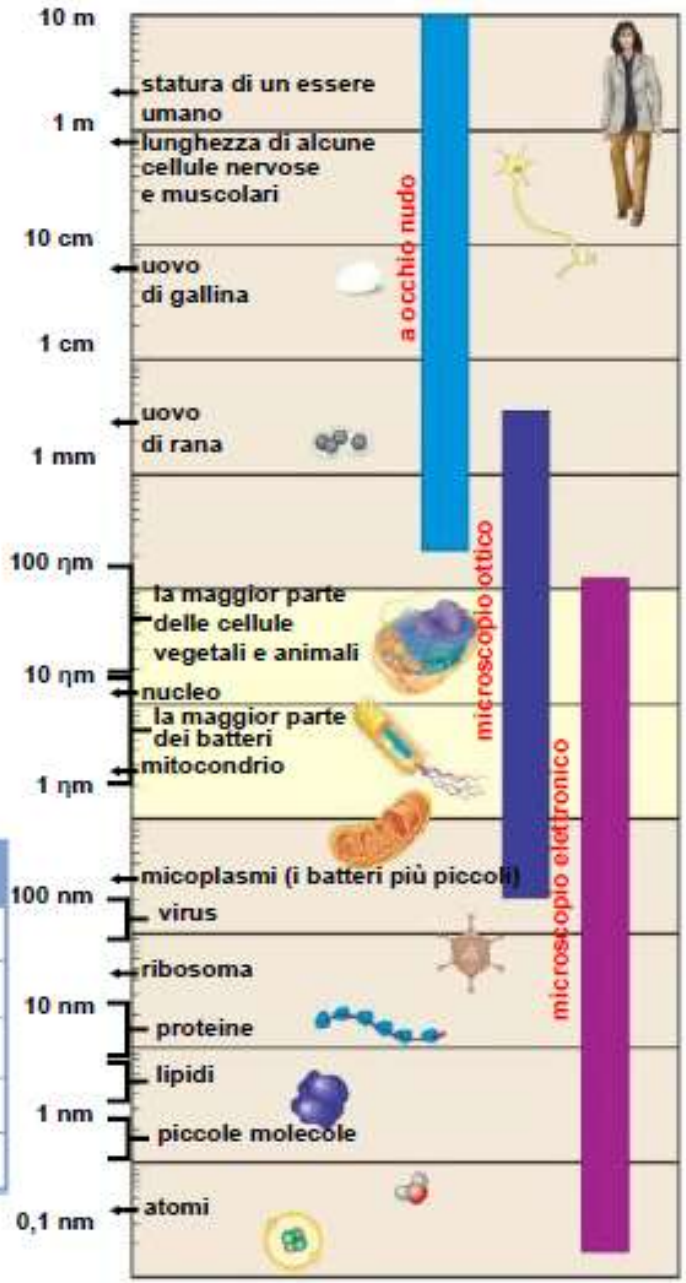
1 mm = 1000 µm

$$d = \frac{\lambda}{2n\sin\alpha}$$

Le dimensioni nel mondo cellulare.

Partendo da 10 m (in cima alla scala) ogni tacca sulla sinistra indica una riduzione delle dimensioni di dieci volte.

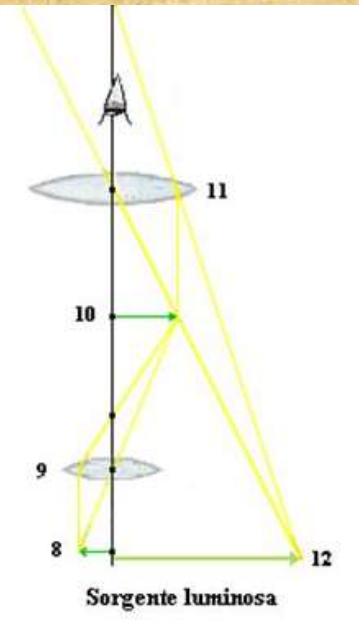
Le unità di misura di lunghezza più usate in biologia
1 metro (m) = 100 cm = 1000 mm
1 centimetro (cm) = 10^{-2} m
1 millimetro = 10^{-3} m
1 micrometro (μm) = 10^{-6} m = 10^{-3} mm
1 nanometro (nm) = 10^{-9} m = 10^{-3} μm



Microscopio ottico

– Il **microscopio ottico** (**LM**, dall'inglese *Light Microscope*) è uno strumento in cui l'oggetto da esaminare viene posizionato su un vetrino trasparente in modo che sia attraversato dalla luce visibile (**microscopio ottico a luce trasmessa**) o semplicemente posizionato sul tavolinetto e opportumamente illuminato (**stereomicroscopio o microscopio ottico a luce riflessa**)

– La luce attraversa due serie di lenti (chiamate **obiettivo** e **oculare**) e viene deviata in modo da formare, una volta raggiunto l'occhio dell'esaminatore, un'immagine ingrandita



Schema microscopio ottico

1. oculari
2. obiettivo
3. tavolino porta oggetti
4. vite micrometrica
5. vite macrometrica
6. condensatore con diaframma
7. vite regolatrice del tavolino
8. oggetto da osservare
9. lente obiettivo
10. immagine reale
11. lente oculare
12. immagine virtuale

Allestimento preparati a fresco

- Porre su un vetrino portaoggetti una goccia d'acqua.
- Coprire la goccia con un vetrino coprioggetti ed osservare al microscopio.

Protozoi presenti nella goccia d'acqua

Vorticella campanula Linneo

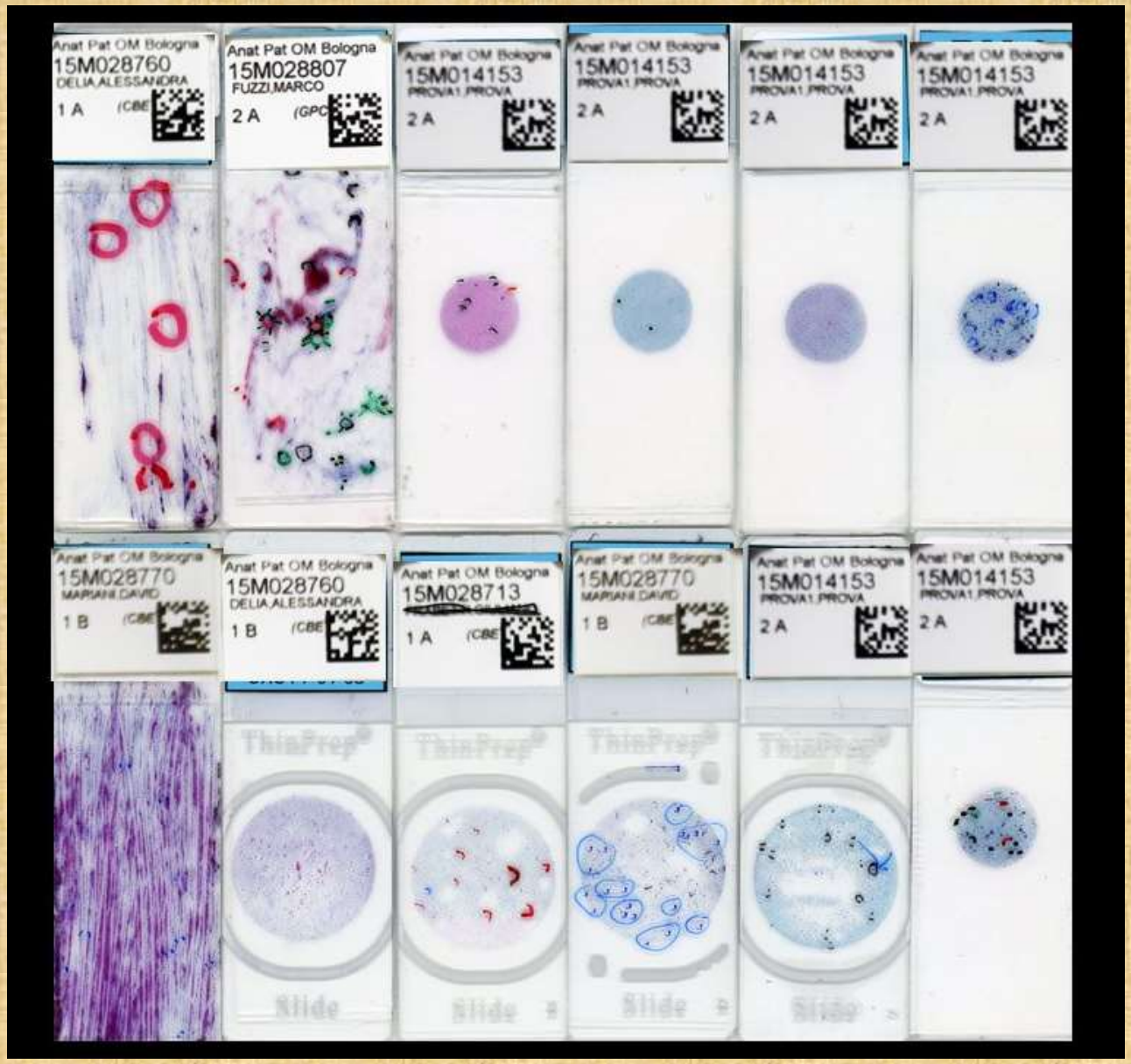
Euglena viridis Ehrenberg

Riprese Roberto Cighetti

Daphnia magna Straus

Cellule vegetali con i cloroplasti (sede della clorofilla): Elodea canadensis Michaux

Preparazione dei vetrini per le osservazioni al microscopio di preparati (esempio tessuti o parti di organismi)



Allestimento di preparati istologici

RACCOLTA DEL MATERIALE

FISSAZIONE

DISIDRATAZIONE

INCLUSIONE

TAGLIO

COLORAZIONE

MONTAGGIO

DISIDRATAZIONE

PRELIEVO

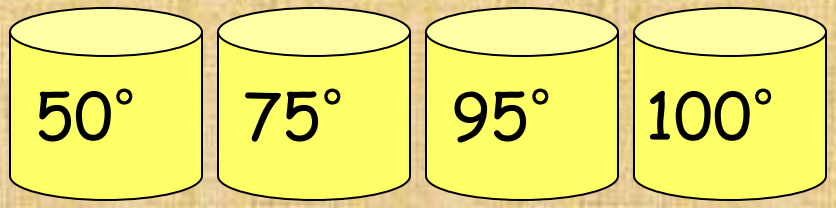
FISSAZIONE

Uccisione rapida del tessuto

Inattivazione enzimi autolisanti

Stabilità strutturale del protoplasma

DISIDRATAZIONE



Scala ascendente di alcool

INCLUSIONE (in paraffina)

Passaggio dei pezzi
nel solvente del mezzo
di inclusione (Xilene)

Soggiorno dei pezzi
nella paraffina
fusa in stufa a 60°C

Inclusione tramite
solidificazione
della paraffina

TAGLIO

Microtomo rotativo

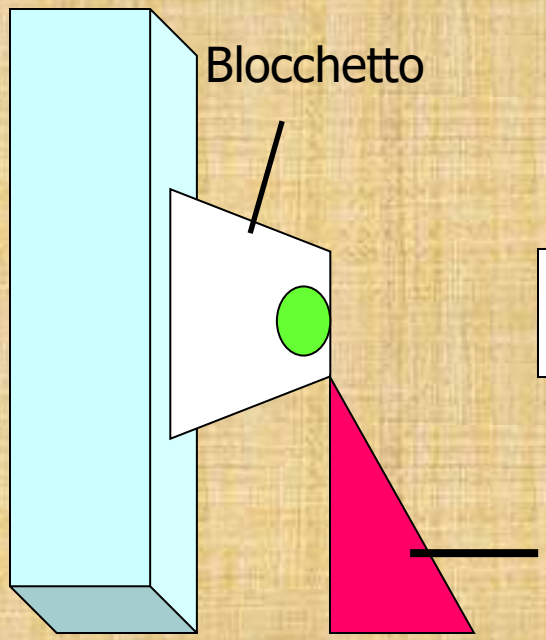
porta preparato

lama

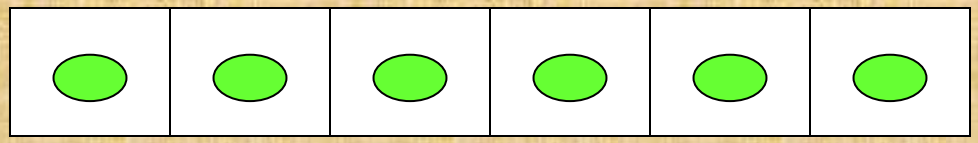
spostamento e taglio

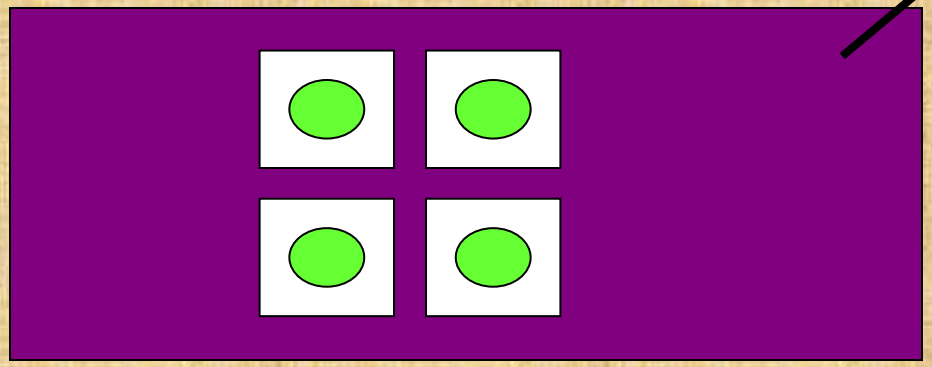
Regolatore dello spessore della sezione

Preparazione del vetrino



Fettine (spessore ca. 5-10 µm)





Preparato senza colorazione: trasparente.

La luce lo attraversa senza mostrarne i dettagli

COLORAZIONE dei PREPARATI

La tecnica più comune è:

1. ***Ematossilina eosina (EE)** = l'*ematossilina* basica si lega a molecole acide conferendo colore blu violaceo; utilizzato per il nucleo e i ribosomi (ricchi di DNA E RNA), il RER, la matrice cartilaginea. L'*eosina* acida colora le sostanze basiche in **rosso** o rosa; utilizzata per il citoplasma (ricco di proteine basiche) e per le fibre collagene.

COLORAZIONE

Colorazione di contrasto

Ematossilina - Eosina

Colorante basico

Colorante acido

Fissazione
Inclusione in paraffina
Sezioni 5-10 µm sui vetrini

Sparaffinatura
- Xilolo I
- Xilolo II

Idratazione
- Alcool assoluto I
- Alcool assoluto II
- Alcool 95°
- Alcool 90°
- Alcool 70°
- Acqua distillata

Ematossilina

Differenziamento in acqua

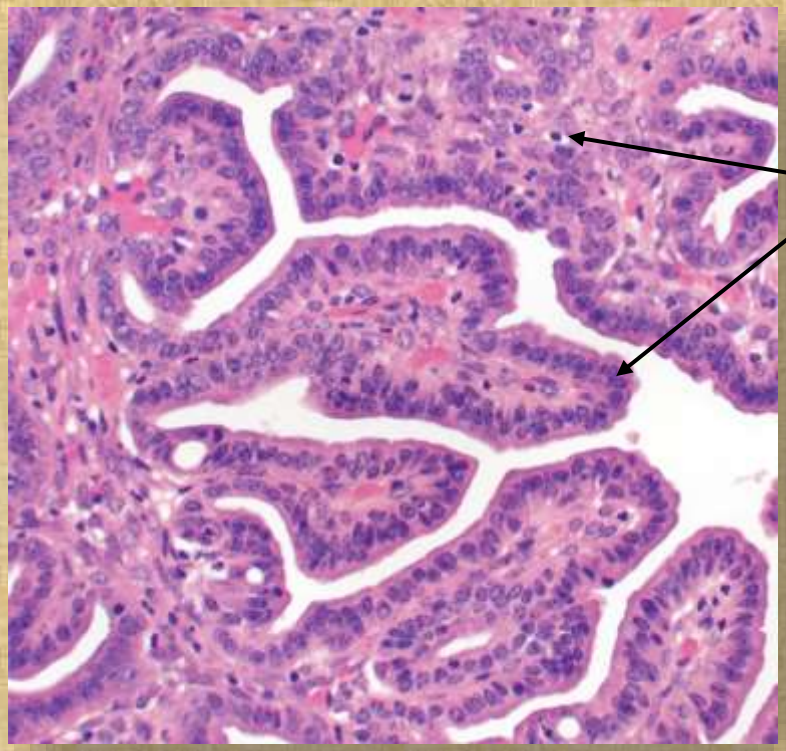
Disidratazione
- Acqua distillata
- Alcool 70°
- Alcool 90°

Eosina alcolica

Disidratazione
- Alcool 90°
- Alcool 95°
- Alcool assoluto I
- Alcool assoluto II

Montaggio
- Xilolo I
- Xilolo II
- Montare i coprioggetto

Esempi di tessuti colorati con E&E



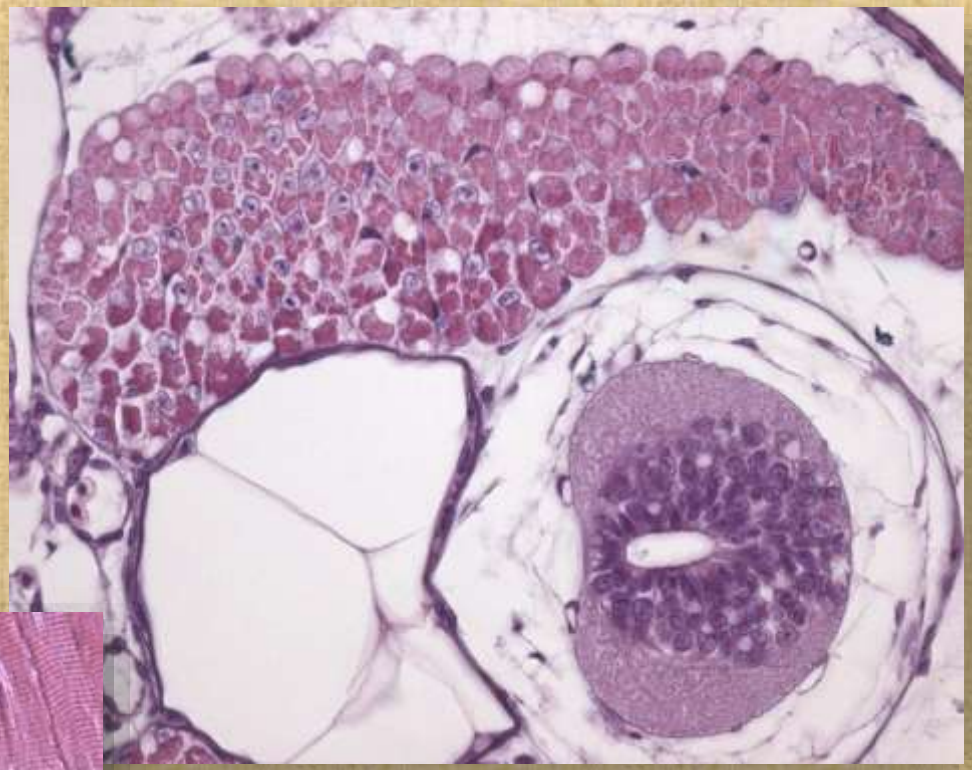
Nuclei
(blu)

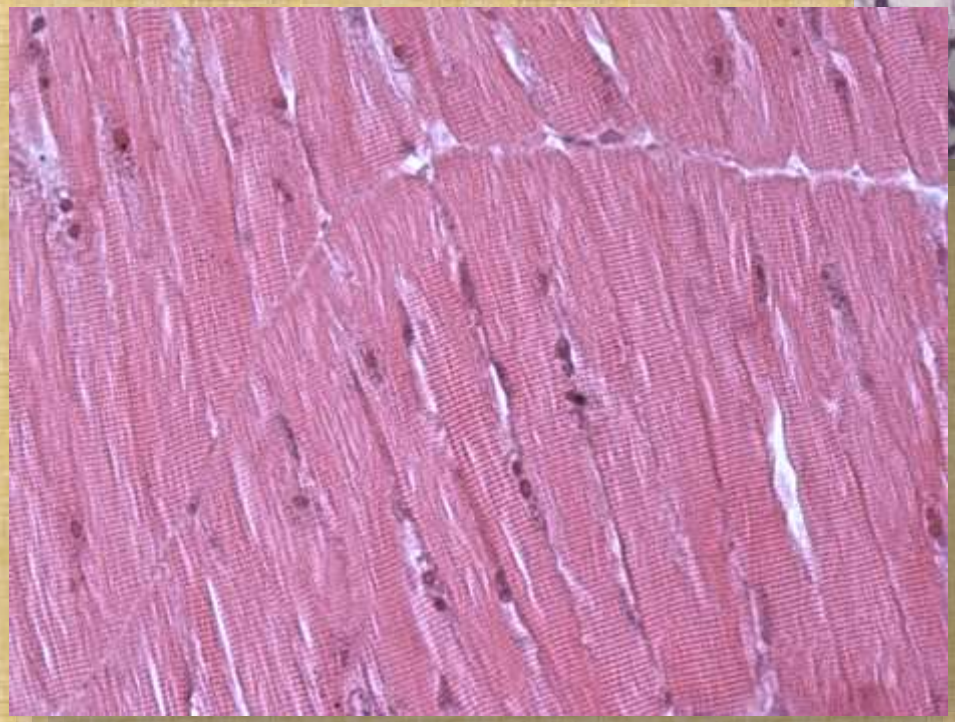
Piccolo ingrandimento

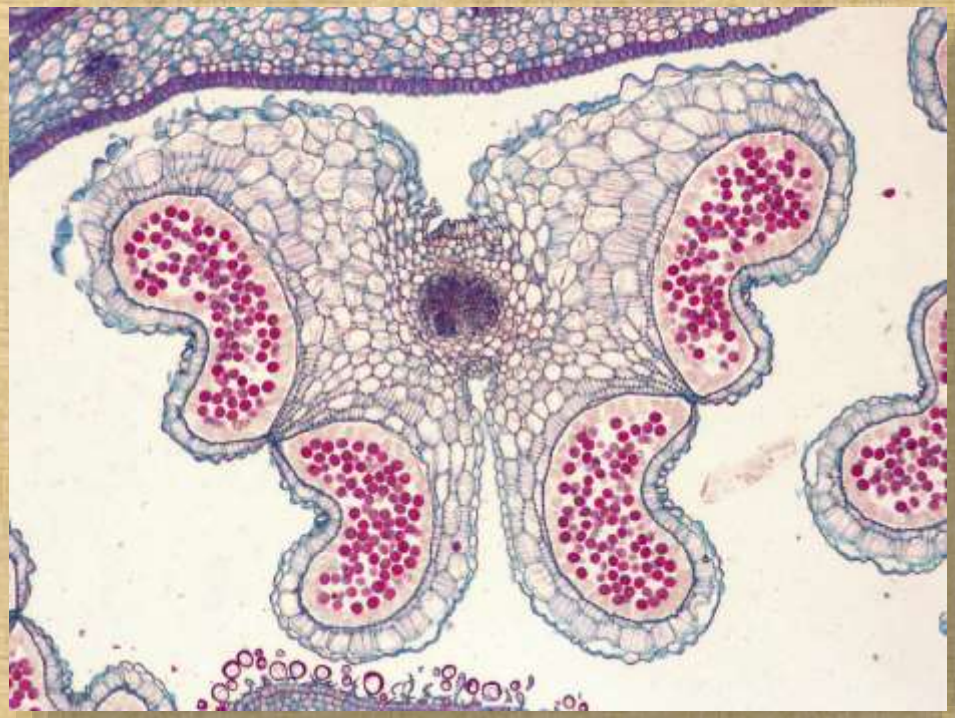
Nuclei
(blu)

Citoplasma
(rosa-rosso)

Grande ingrandimento







Germoglio di viola ciocca

Seme del caffè – chicco di caffè
(sezione trasversale)

$R = \lambda / 2n \text{ sen } a$

Il **limite di risoluzione** è inversamente proporzionale all' apertura numerica A.N. e all'indice di rifrazione del mezzo interposto, mentre è direttamente proporzionale alla lunghezza d'onda della luce.

La scoperta che gli elettroni hanno una radiazione di bassissima lunghezza d'onda ha suggerito la possibilità di usare fasci di elettroni per ottenere poteri risolutivi assai elevati.

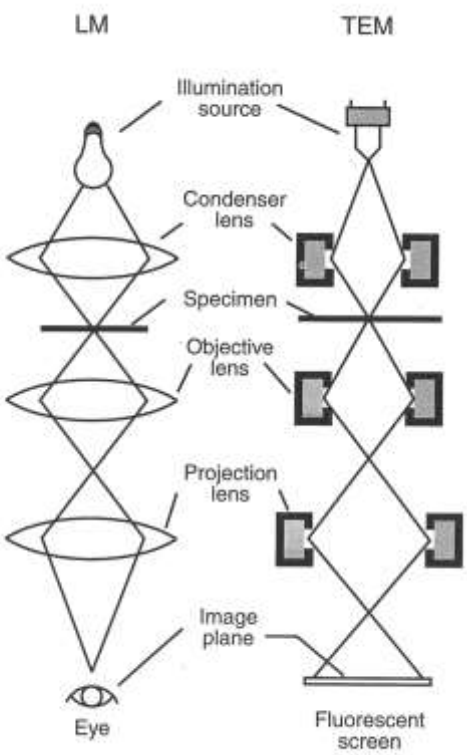


FIGURE 6.19 Comparison of light microscope (LM) to transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopes. *(Redrawn with modifications from Postek, et al., 1980. Scanning Electron Microscopy: A Student's Handbook. Ladd Research Industries, Inc. Burlington, VT.)*

La lunghezza d'onda degli elettroni va da 0.1 a 0.005 Å (1 angström = 10^{-10} metri) in modo da risultare alcune decine di migliaia di volte più piccola della luce visibile.

Il TEM fornisce fino a 150.000 – 200.000 ingrandimenti, con un potere risolutivo dell'ordine del milionesimo di millimetro (millimicron).

Microscopia elettronica a trasmissione TEM

Prelievo

I campioni di tessuto devono essere lavati in tampone fisiologico e tagliati in frammenti molto piccoli (1mm diametro).

Fissazione

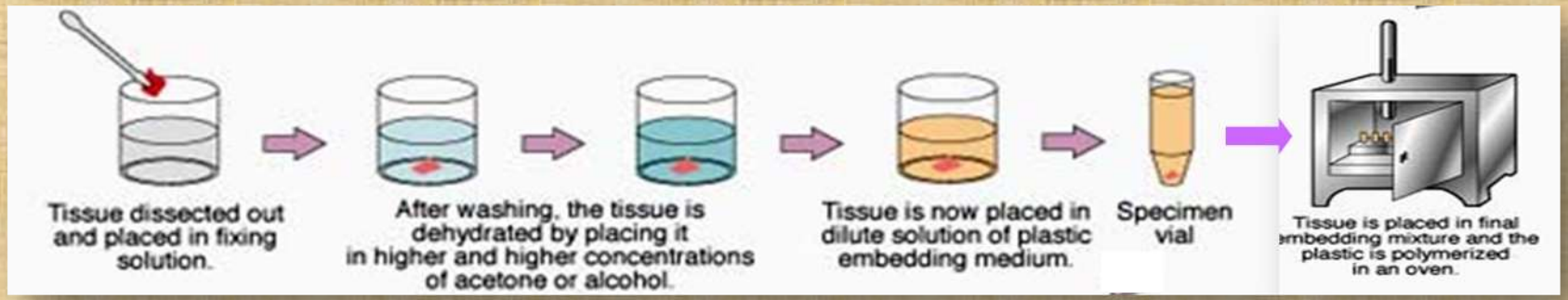
La fissazione è doppia: *glutaraldeide*, quindi lavaggi in soluzione fisiologica, e poi *tetrossido di osmio* (OsO_4).

Disidratazione

Effettuata in *etanolo*, ed è simile alla microscopia ottica

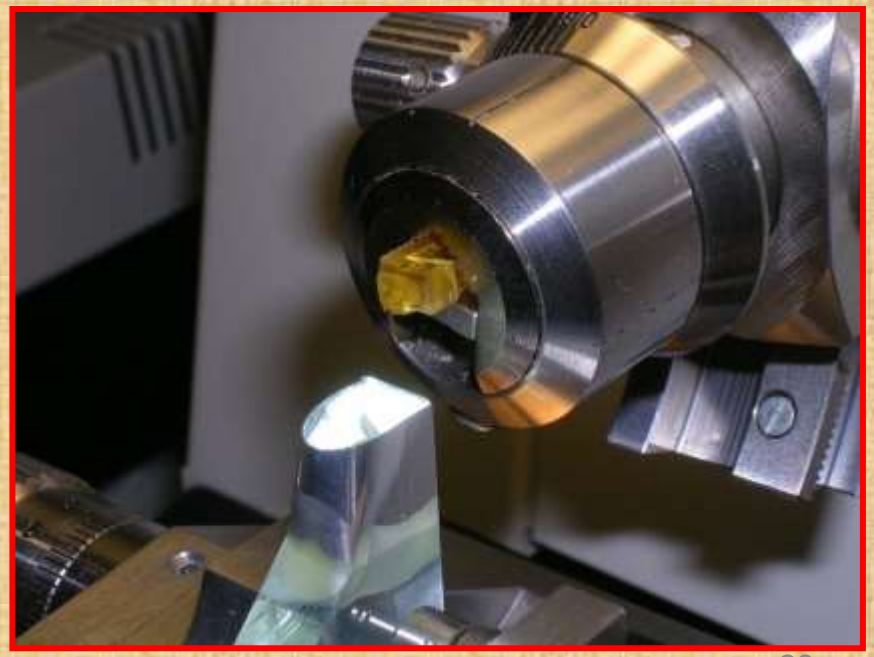
Inclusione

Si utilizzano resine liquide che solidificano a temperature di circa 70°C e divengono molto dure. L'inclusione viene effettuata in piccoli contenitori cilindrici.



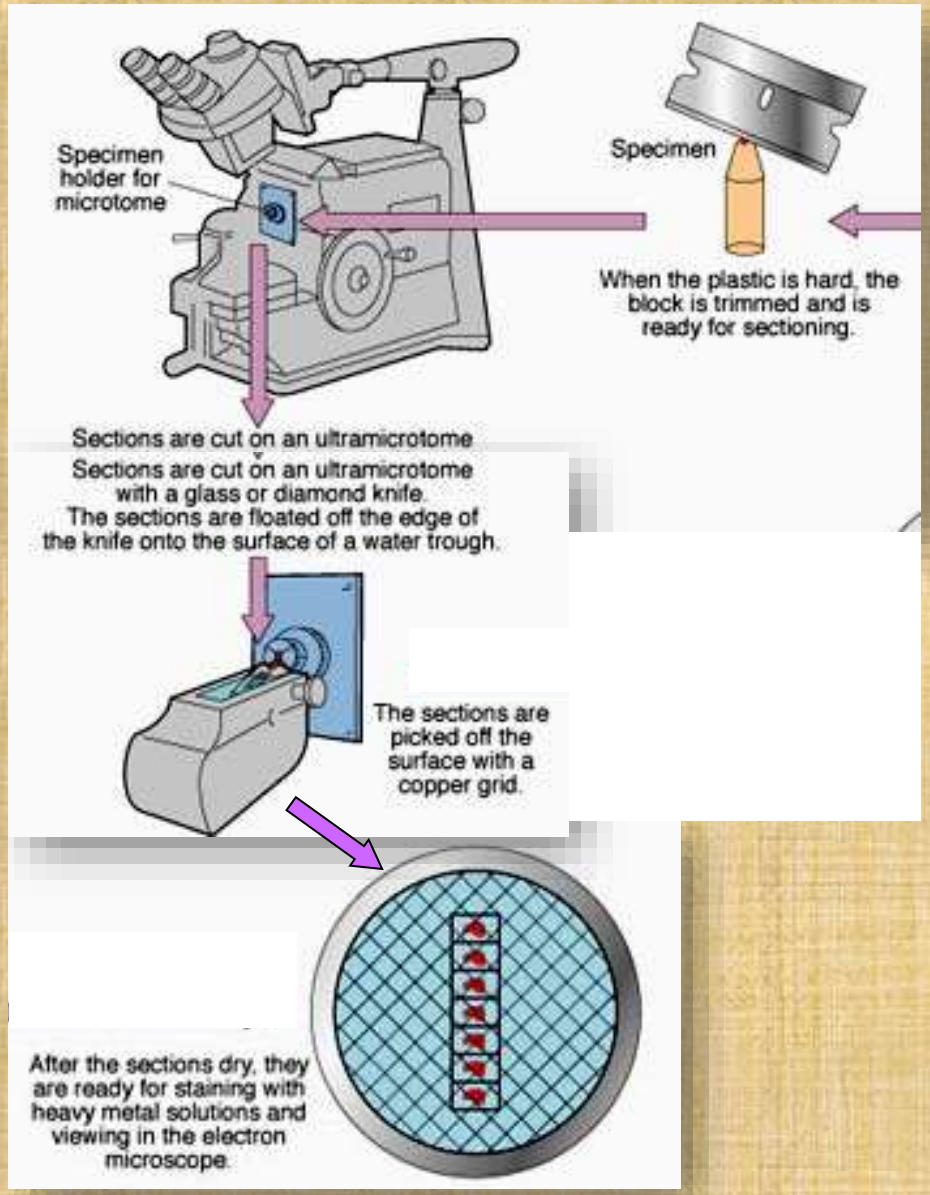
Sezionamento

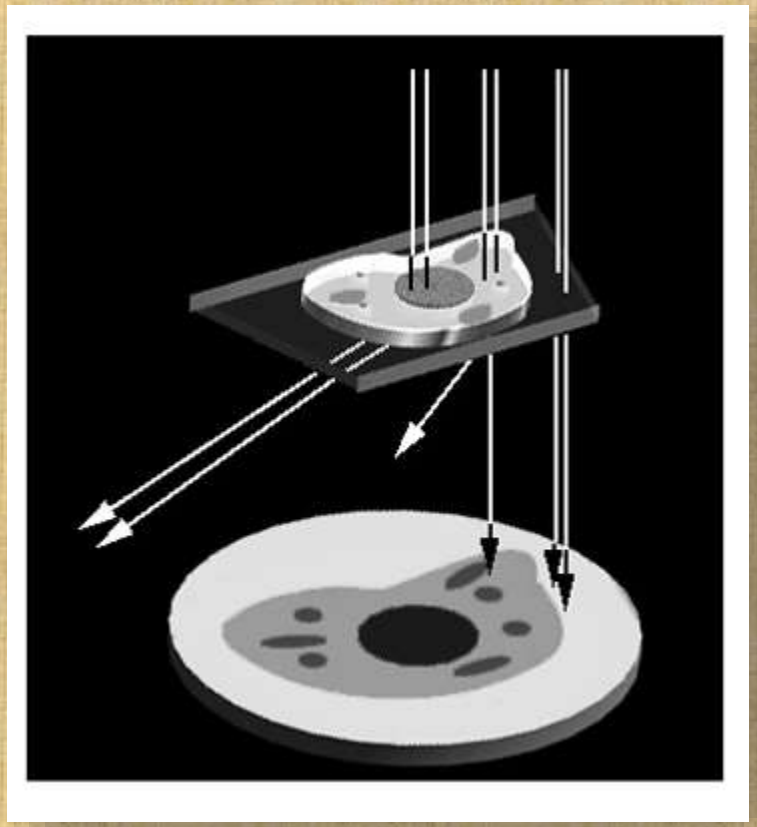
Il taglio delle sezioni avviene all'*ultramicrotomo*, un microtomo particolare dotato di binoculare per l'osservazione. Il funzionamento di base è simile a quello del microtomo. La lama, di *diamante*, è collegata ad un contenitore contenente acqua distillata nel quale cadrà il nastrino delle sezioni (dette sezioni *ultrafini*, 50-70 nanometri di spessore), che verrà poi raccolto NON su vetrini ma su particolari griglie di forma circolare (*retini*) di 0,5 cm di diametro.

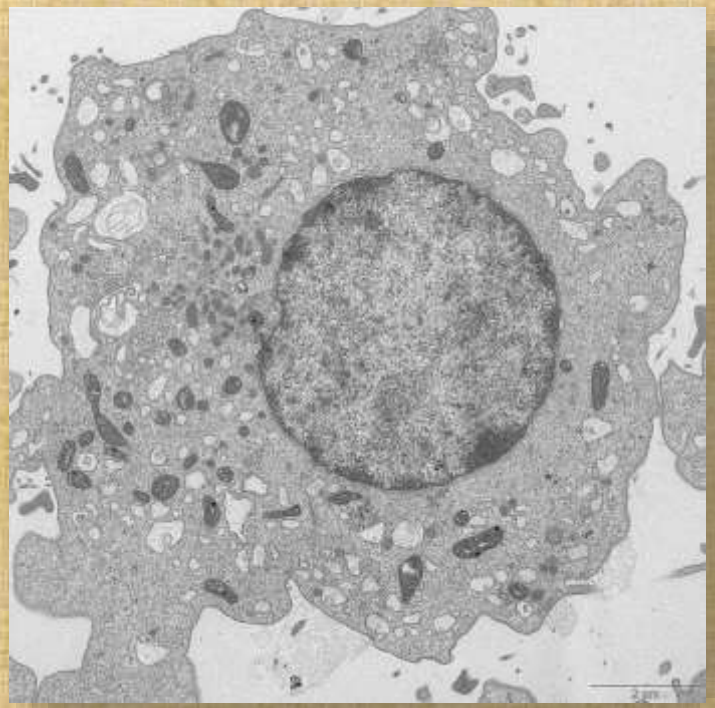


Colorazione (contrastazione)

Il materiale biologico risulta estremamente poco contrastato all'osservazione, in quanto gli elettroni lo attraversano molto facilmente. Questo problema viene ovviato rendendo le strutture *opache agli elettroni,* arricchendole con atomi di *metalli pesanti*, che hanno la capacità di deviare o assorbire gli elettroni del fascio che li colpiscono. La formazione dell'immagine nel microscopio elettronico a trasmissione è legata alle differenti capacità di assorbire e deviare gli elettroni di differenti strutture della cellula. I metalli più utilizzati sono l'uranio (come *acetato di uranile*) ed il piombo (come *citrato di piombo*). Una volta asciutti, i retini sono lavati abbondantemente con acqua distillata, per eliminare l'eccesso di colorante, e, una volta asciugati all'aria, possono essere subito osservati al microscopio elettronico a trasmissione.


Specimen holder for microtome
Specimen
When the plastic is hard, the block is trimmed and is ready for sectioning.
Sections are cut on an ultramicrotome
Sections are cut on an ultramicrotome with a glass or diamond knife. The sections are floated off the edge of the knife onto the surface of a water trough.
The sections are picked off the surface with a copper grid.
After the sections dry, they are ready for staining with heavy metal solutions and viewing in the electron microscope.





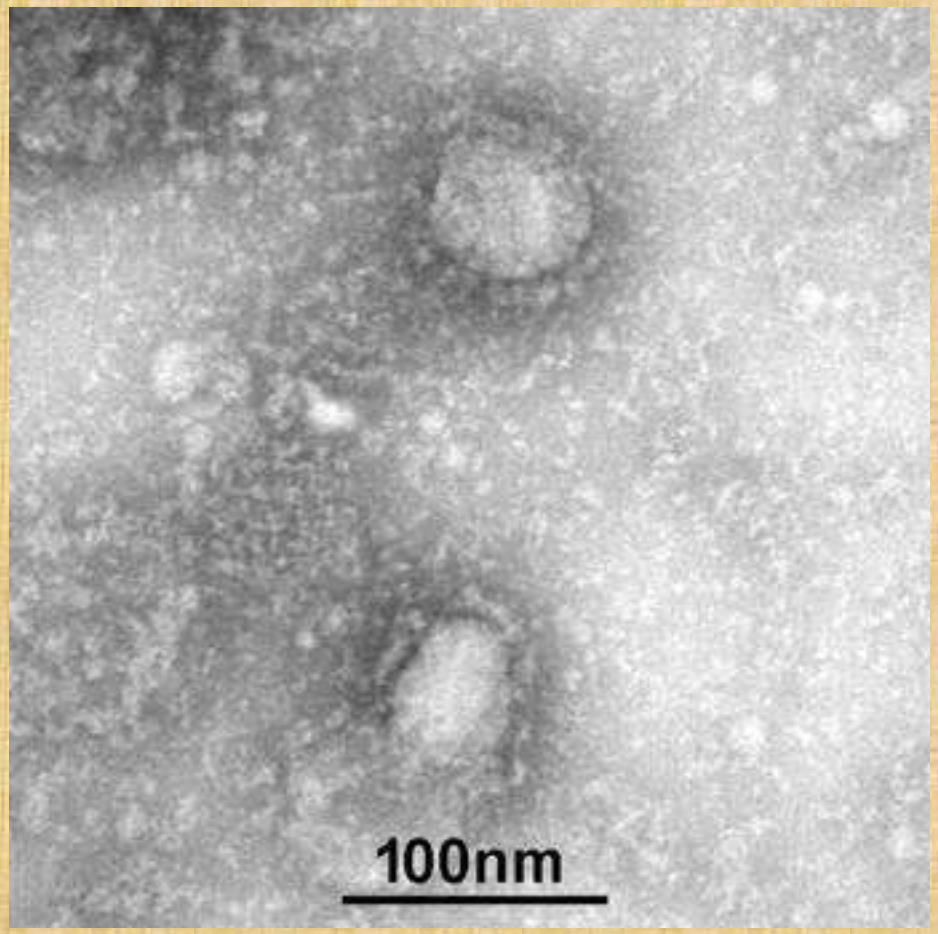
Cellula a basso ingrandimento

Vescicole del Golgi

Mitocondri

Organelli della cellula a forte ingrandimento

COVID-19 (SARS-CoV-2) al microscopio elettronico



MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE, SEM

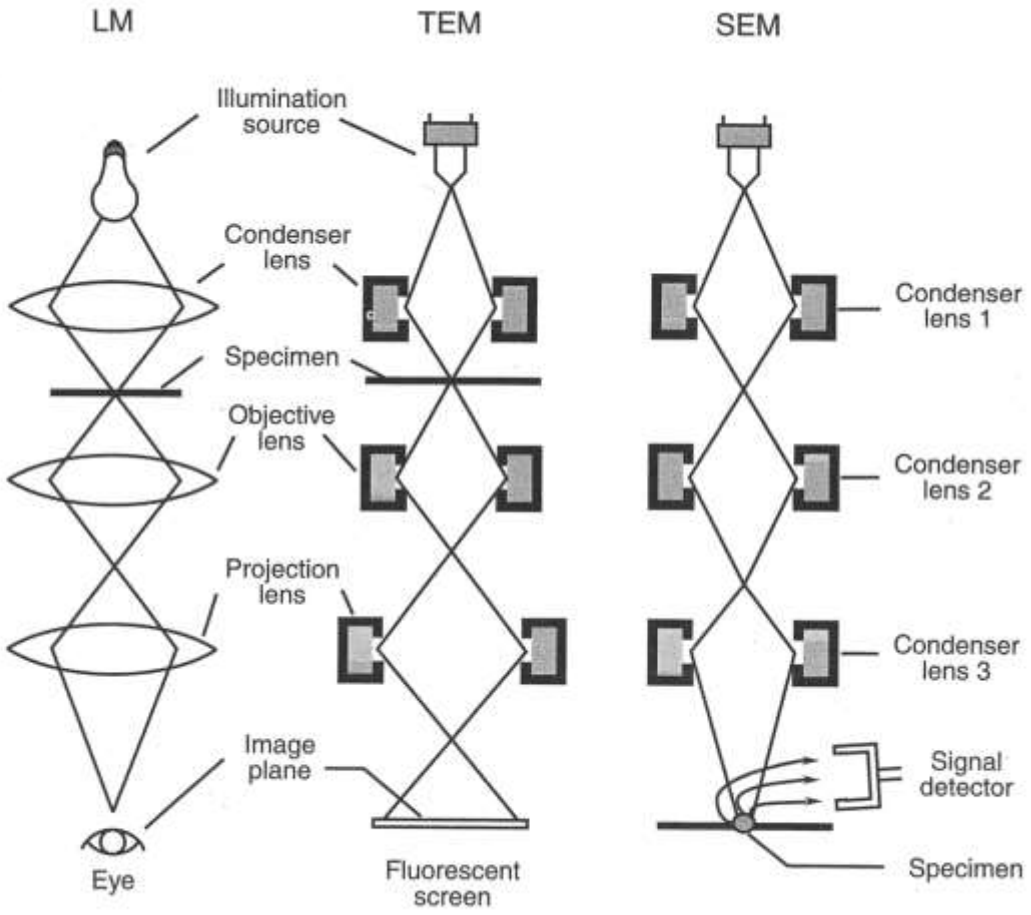
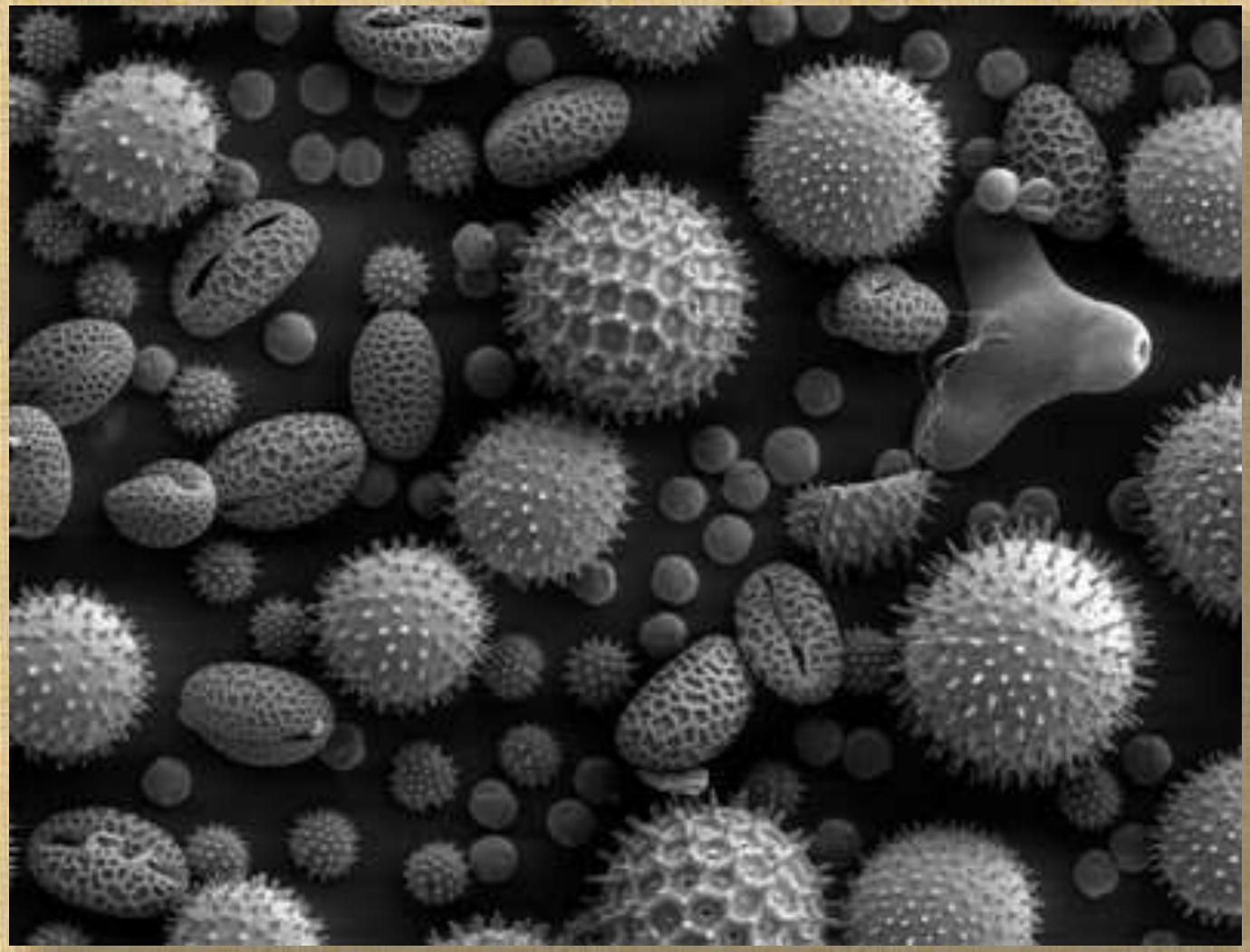


FIGURE 6.19 Comparison of light microscope (LM) to transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopes. *(Redrawn with modifications from Postek, et al., 1980. Scanning Electron Microscopy: A Student's Handbook. Ladd Research Industries, Inc. Burlington, VT.)*

Il microscopio elettronico a scansione, indicato con la sigla SEM (Scanning Electron Microscope), fornisce informazioni sull'aspetto, sulla natura e sulle proprietà di superfici e degli strati sottostanti di campioni solitamente solidi, con risoluzione media di 2¸5 nanometri (riferita al segnale "generato" dagli elettroni secondari).

Granuli di polline



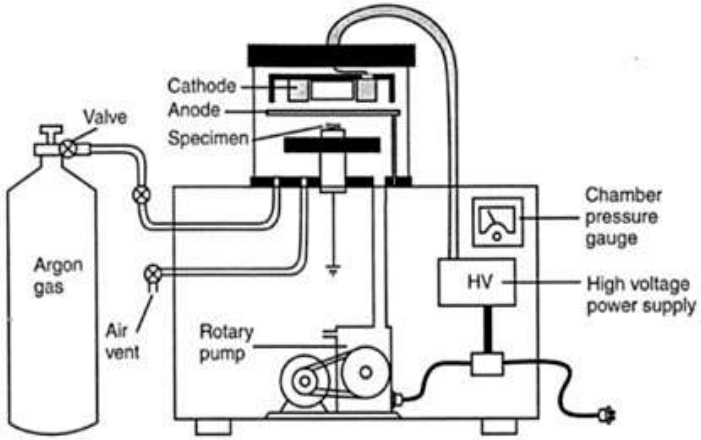
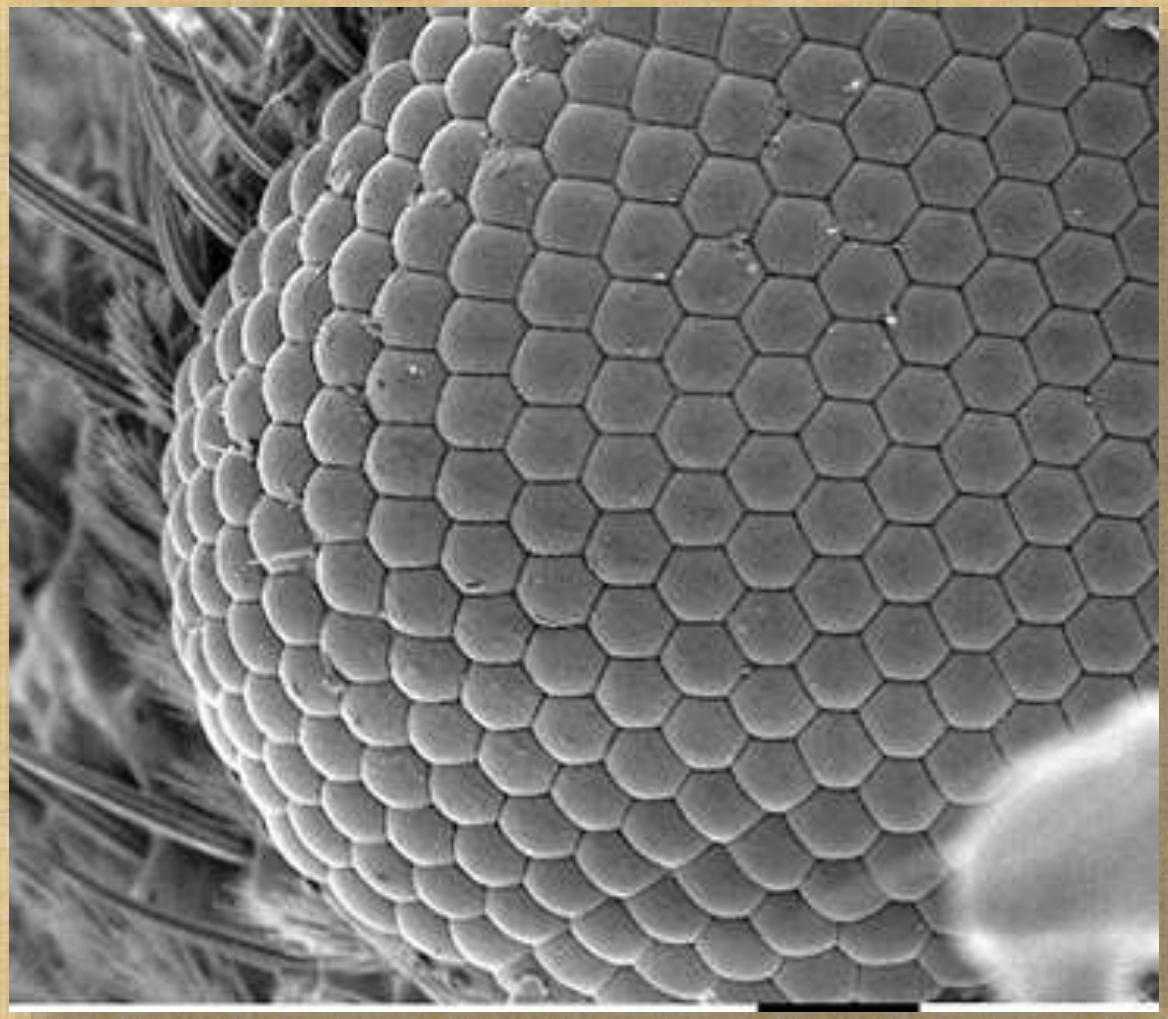
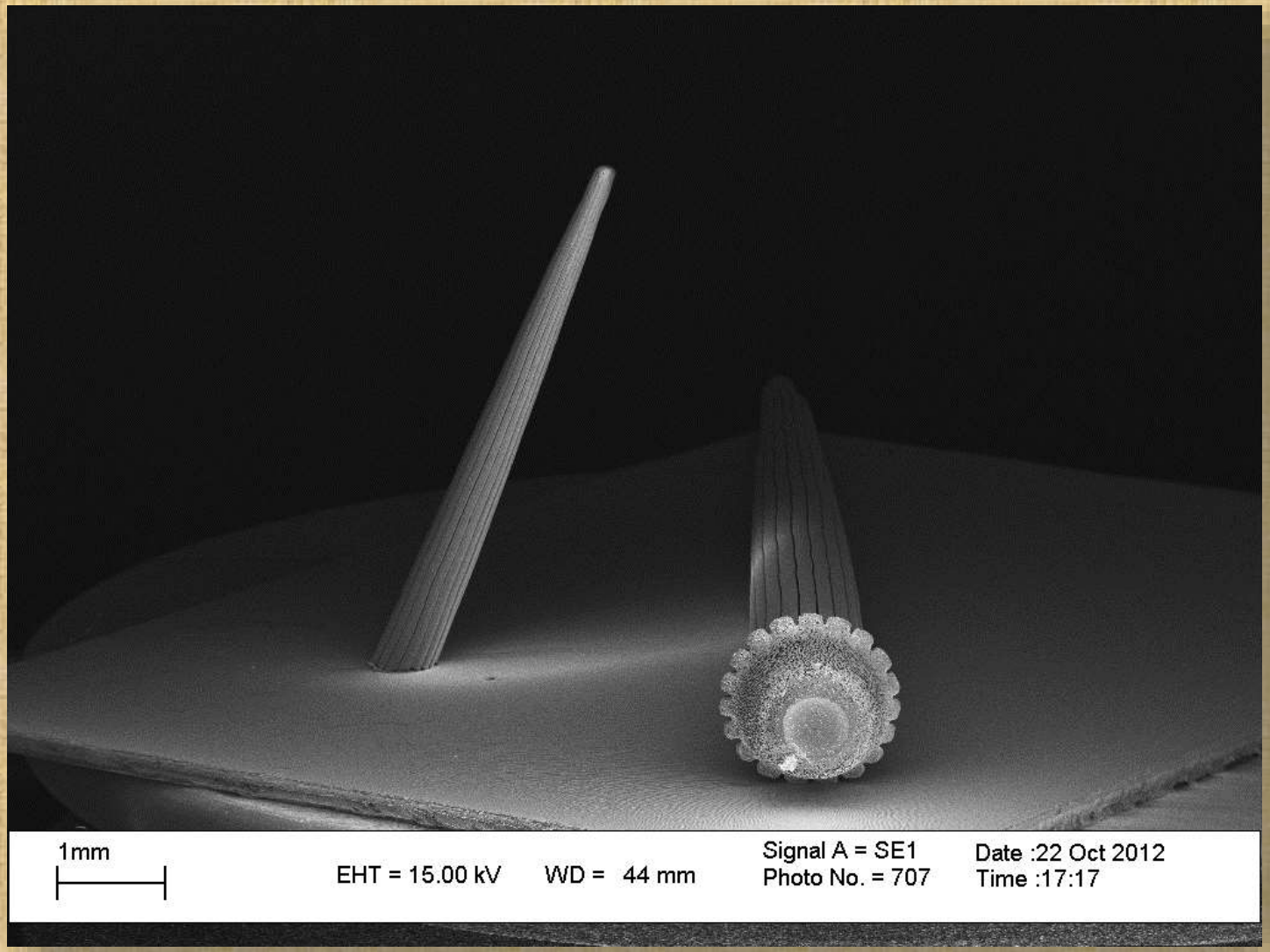


FIGURE 3.15 Diagram of parts of a commonly used sputter coater. A rotary pump is used to evacuate the specimen chamber to remove atmospheric gases and to permit the introduction of argon gas into the chamber. The application of a high voltage to the target causes the ionization of the argon into Ar^+ molecules that strike the cathode (target) and eject metal atoms that then coat the specimen.
(Redrawn from Postek et al. 1980.)

Occhio di mosca



setola


1mm
EHT = 15.00 kV
WD = 44 mm
Signal A = SE1
Photo No. = 707
Date :22 Oct 2012
Time :17:17

Rotifero: animaletto abitatore dello strato acquoso nei muschi

Rivista di microscopia

File Modifica Visualizza Cronologia Segnalibri Strumenti Aiuto

Webmail dell'Università de... | Nikon MicroscopyU

www.microscopyu.com

Più visitati | Come iniziare | Ultime notizie | Fotografia nell'Enciclo...

INSTRUMENTS | NIKON EU | NIKONUSA | NIKON.COM

Nikon

MICROSCOPYU

THE SOURCE FOR MICROSCOPY EDUCATION

HOME | TUTORIALS | GALLERIES | MICROSCOPY BASICS | SMALL WORLD | MUSEUM | DOWNLOADS | CONTACT

Featured Sections

- Live-Cell Imaging
- Fluorescence Microscopy
- Optical Systems
- Phase Contrast
- DIC Microscopy
- Confocal Microscopy
- Superresolution Microscopy
- Stereomicroscopy
- Polarized Light Microscopy
- Cell Motility Video Gallery
- Swept Field Video Gallery
- FRET Pair Combinations
- Featured Microscopists
- Microscopy Literature

CFI60 OPTICS

Microscopy Digital Imaging

LATEST REVIEW ARTICLES

- Live-Cell Imaging Applications | Videos | Images
- Introduction to Fluorescent Proteins | PDF
- Spectral Imaging and Linear Unmixing | Java
- Fundamentals of FRET Microscopy | Flash
- TIRF: Introduction and Applications
- Principles of Multiphoton Microscopy
- Microscope Focus Drift | Flash

OPTICAL MICROSCOPY TUTORIALS

- Basic Concepts in Optical Microscopy | Java

SMALL WORLD COMPETITION

Presented by Nikon

SMALL WORLD 2015

Celebrating 41 years of excellence in photography through the microscope, The Nikon International Small World Competition is dedicated to furthering creativity and excellence in photomicrography. Combining microscopy and photography, a photomicrographer is able to capture an image of the world that the naked eye cannot see. Take a moment to browse the Small World galleries and have a look at our past winners.

Search MicroscopyU

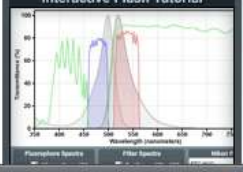
Enter Search Terms...

SEARCH

Small World Competition

- Enter the 2016 Contests
- 2016 Small World
  - Competition Rules
  - Competition Prizes
- 2016 Small World In Motion
  - Competition Rules
  - Competition Prizes
- Small World Gallery
- 2015 Tour Schedule

Interactive Flash Tutorial



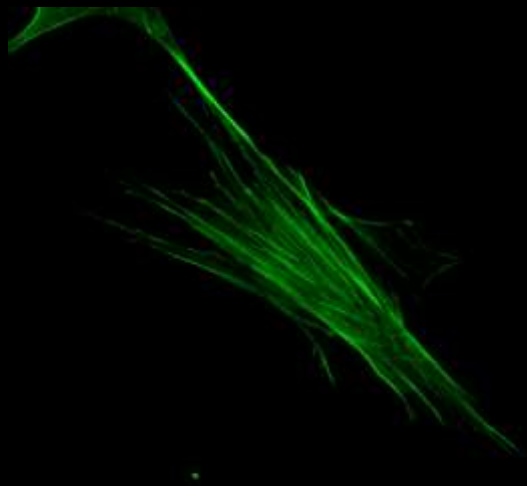
Nikon MicroscopyU... | Computer | biologia vegetale 01... | Microsoft PowerPoi... | IT | 22.58

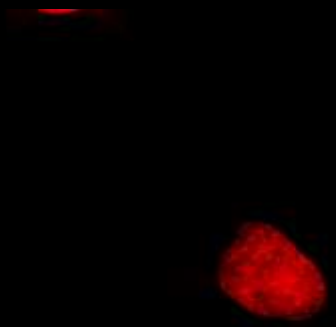
Table of Fluorochromes

Probe	Ex (nm)	Em (nm)	MW	Notes
Reactive and conjugated probes				
Hydroxycoumarin	325	386	331	Succinimidyl ester
Aminocoumarin	350	445	330	Succinimidyl ester
Methoxycoumarin	360	410	317	Succinimidyl ester
Cascade Blue	(375);401	423	596	Hydrazide
Lucifer yellow	425	528		
NBD	466	539	294	NBD-X
R-Phycoerythrin (PE)	480;565	578	240 k	
PE-Cy5 conjugates	480;565;650	670		*aka* Cychrome, R670, Tri-Color, Quantum Red
PE-Cy7 conjugates	480;565;743	767		
Red 613	480;565	613		PE-Texas Red
PerCP	490	675		Peridinin chlorphyll protein
TruRed	490,675	695		PerCP-Cy5.5 conjugate
FluorX	494	520	587	(GE Healthcare)
Fluorescein	495	519	389	FITC; pH sensitive
BODIPY-FL	503	512		
TRITC	547	572	444	TRITC
X-Rhodamine	570	576	548	XRITC
Lissamine Rhodamine B	570	590		
Texas Red	589	615	625	Sulfonyl chloride
Allophycocyanin (APC)	650	660	104 k	
APC-Cy7 conjugates	650;755	767		PharRed
Alexa Fluor dyes [antibody conjugates] *(Molecular Probes)*				
Alexa Fluor 350	343	442	410	
Alexa Fluor 405	401	421	1028	
Alexa Fluor 430	434	540	702	
Alexa Fluor 488	499	519	643	QY 0.92
Alexa Fluor 500	503	525	700	
Alexa Fluor 514	517	542	714	
Alexa Fluor 532	530	555	724	QY 0.61
Alexa Fluor 546	561	572	1079	QY 0.79
Alexa Fluor 555	553	568	1250	QY 0.1

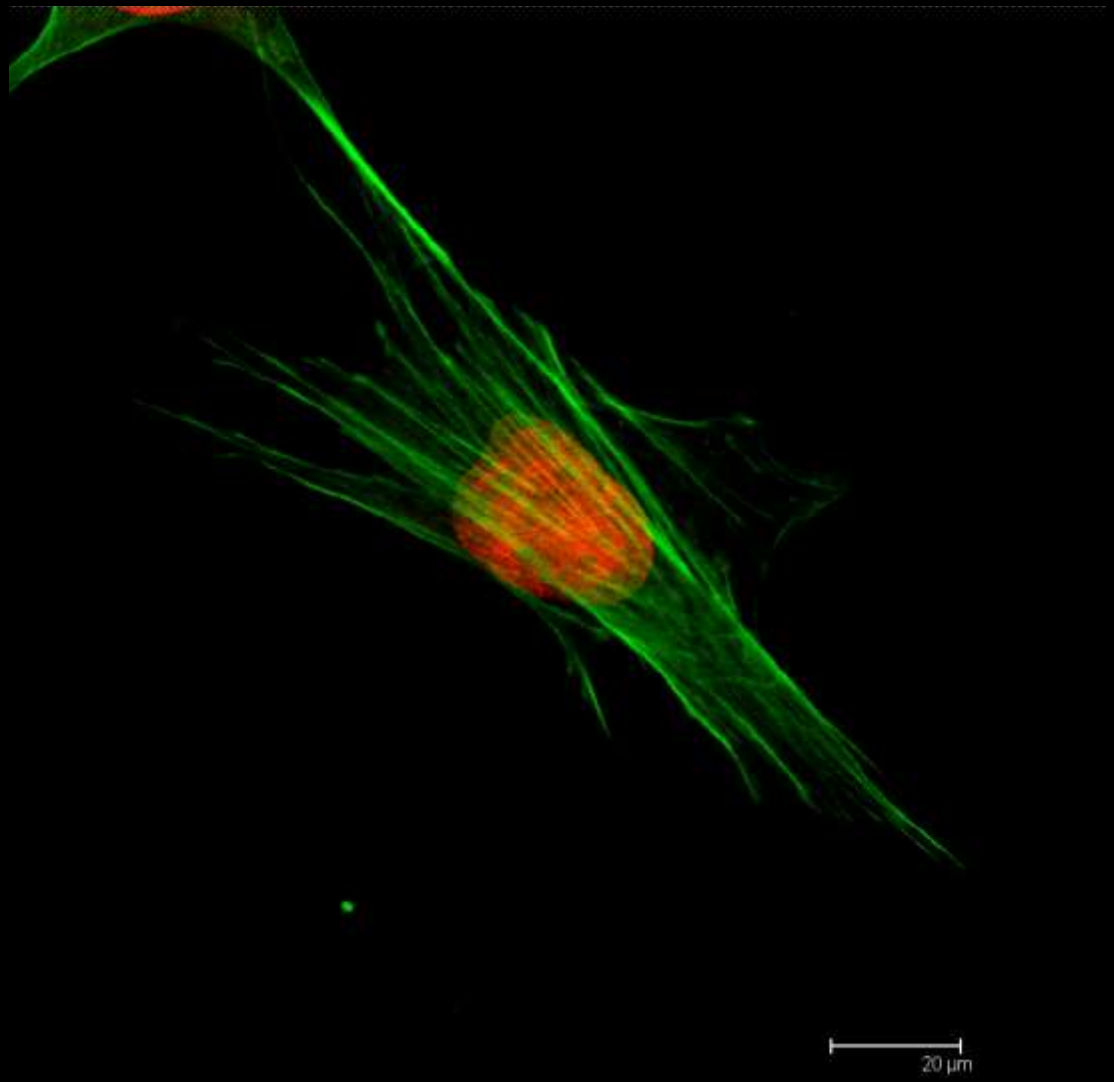
Microscopia che utilizza la fluorescenza di alcune molecole: i fluorocromi. Ciascuno di essi assorbe e rilascia luce a diversa lunghezza d'onda nello spettro del visibile (= colori diversi)

LEICA

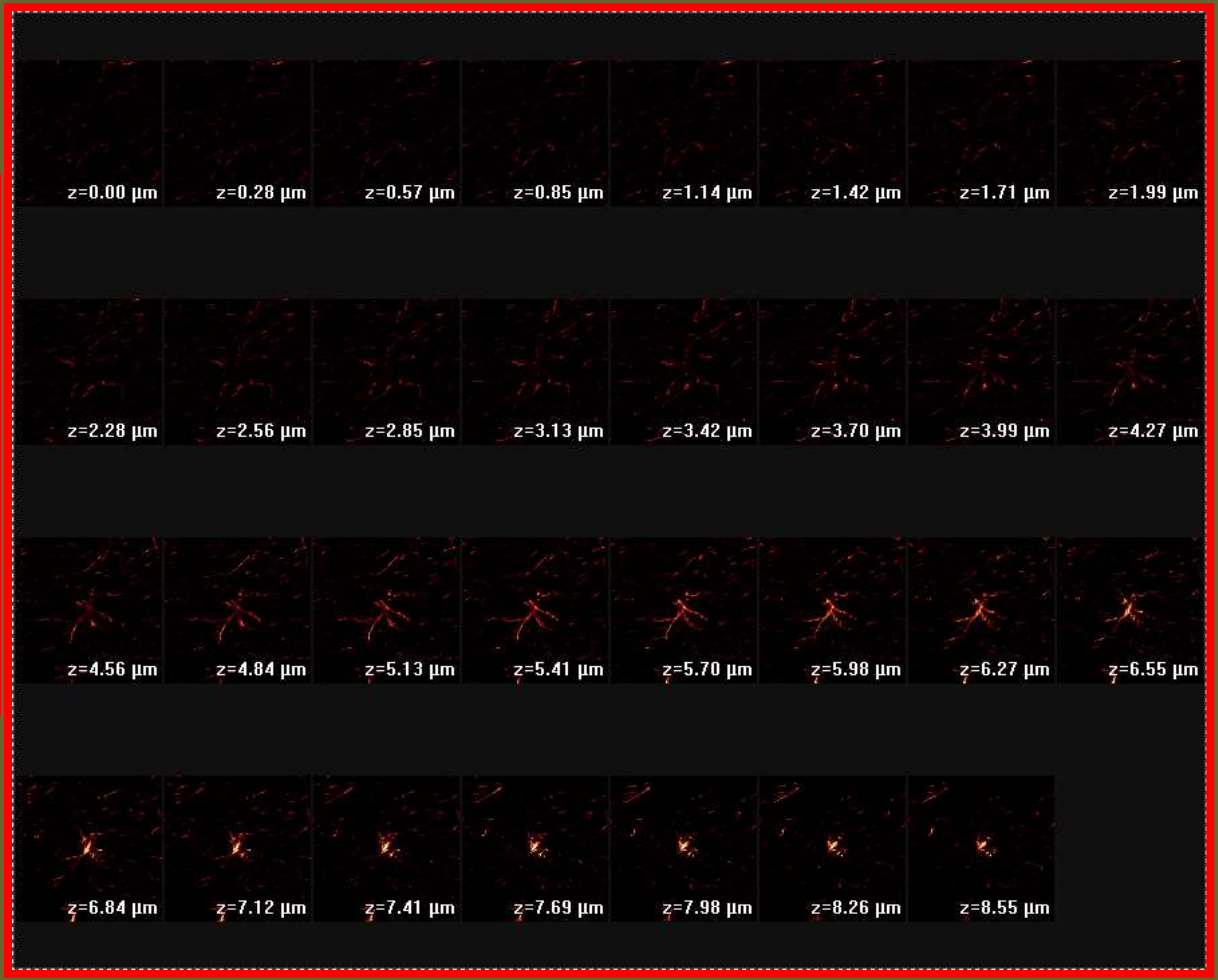




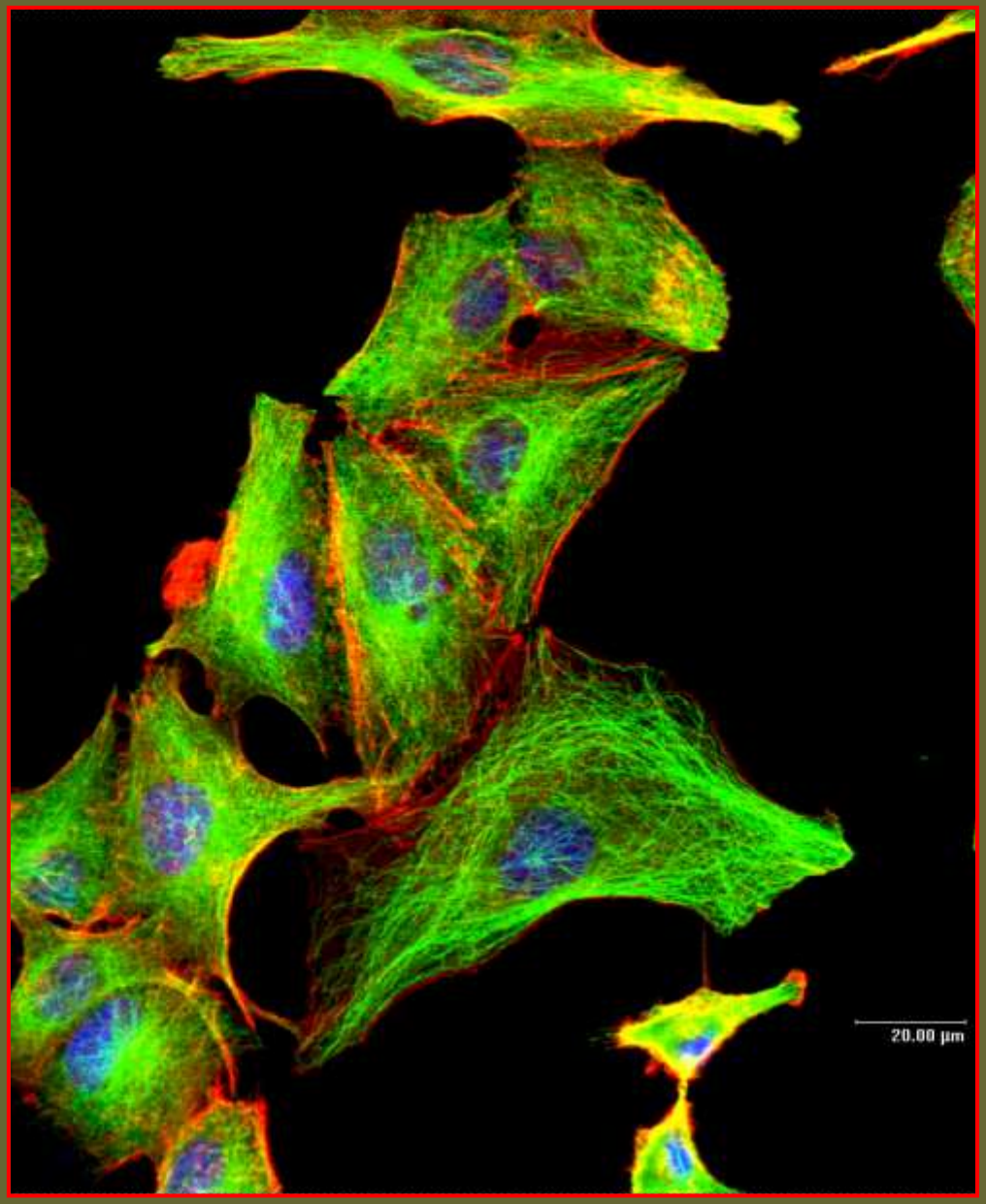
LEICA


20 µm

Il microscopio confocale a scansione laser sposta il tavolino porta-oggetto lungo l'asse ottico (Z) con movimenti micrometrici prestabiliti dopo ogni scansione, il confocale può raccogliere immagini dai diversi piani in successione.



Non solo
T-shirt

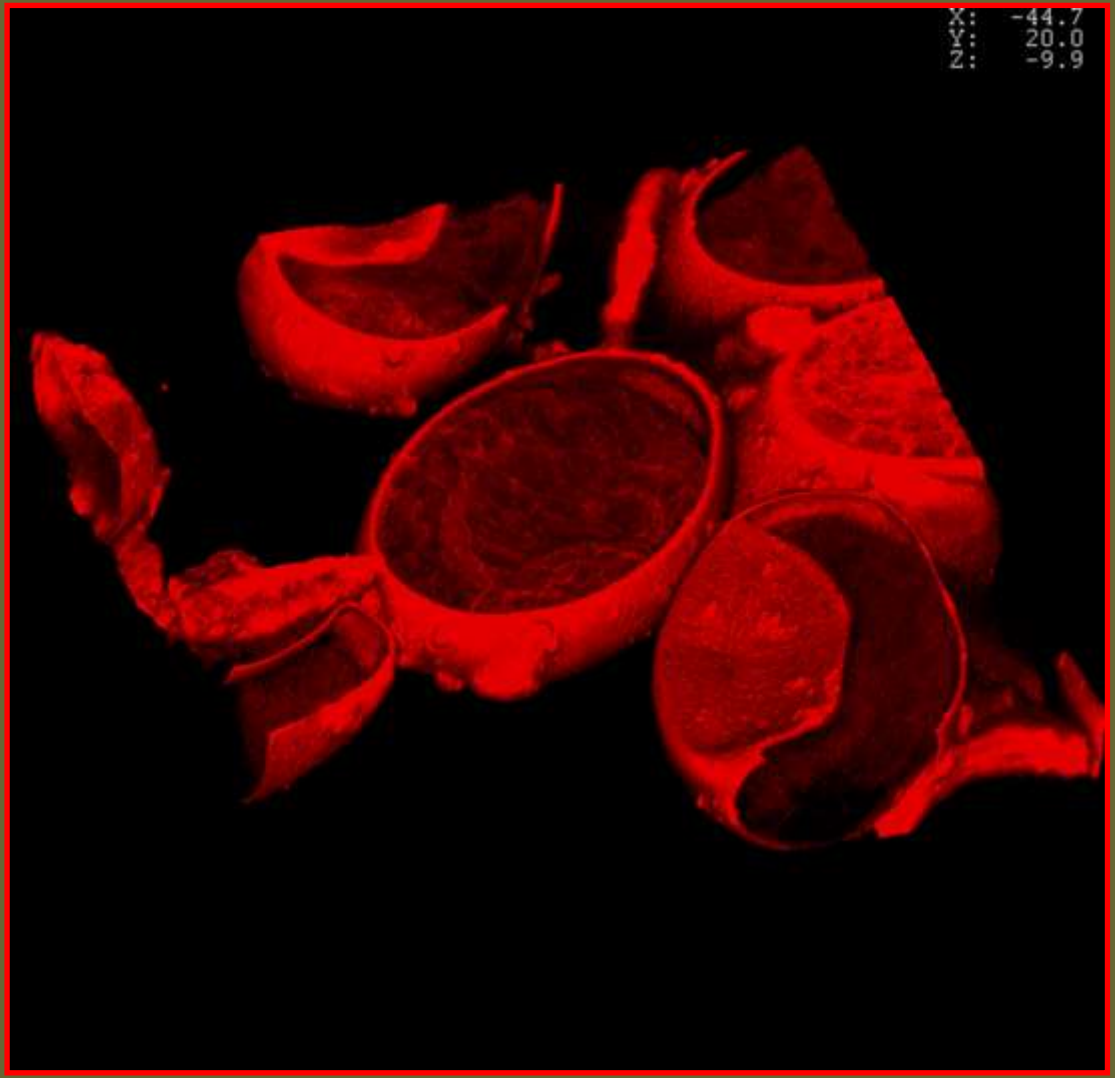


Cellule endoteliali

FITC = Tubulina

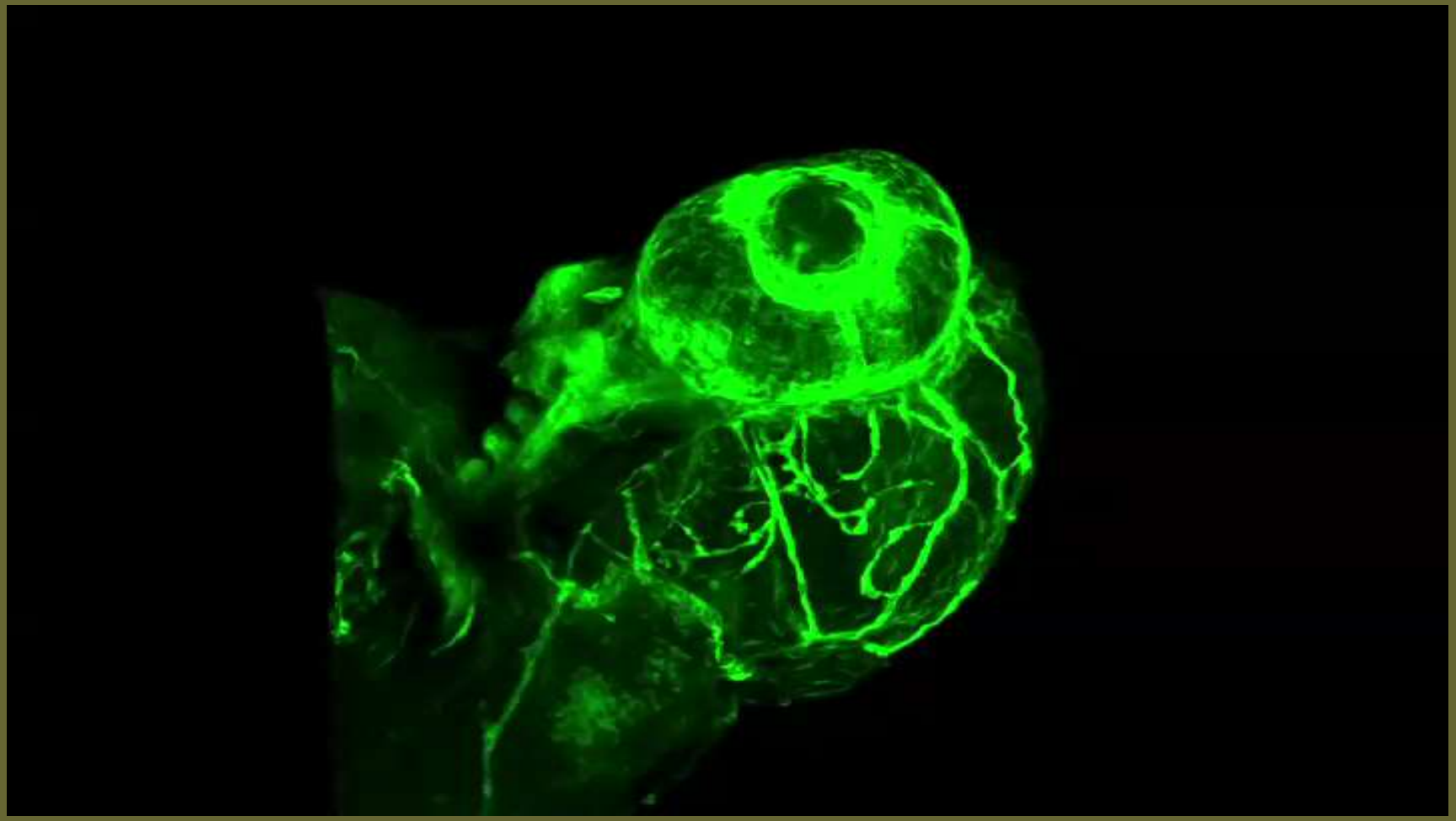
TRITC = Actina

DAPI = DNA

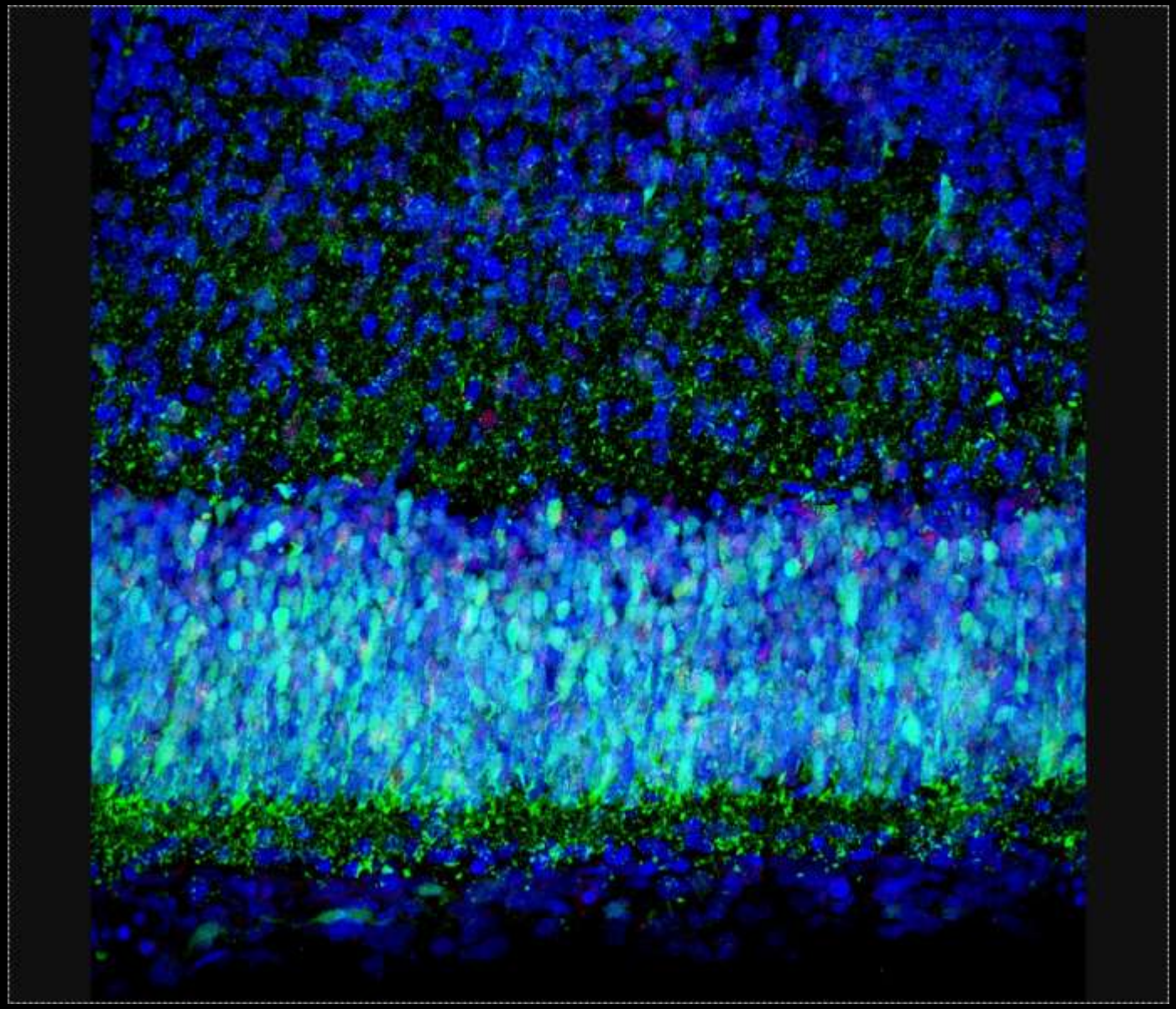


Ricostruzione 3D di uova di rotiferi acquisite al microscopio confocale

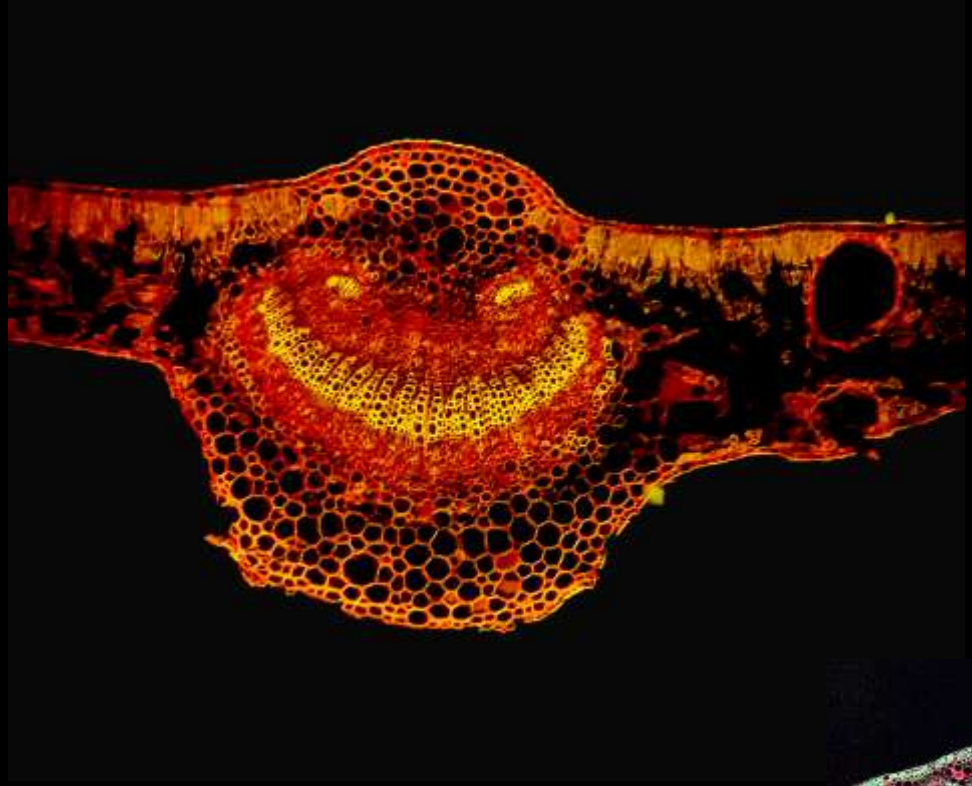
Il diametro dell'uovo misura circa 60/70 micrometri



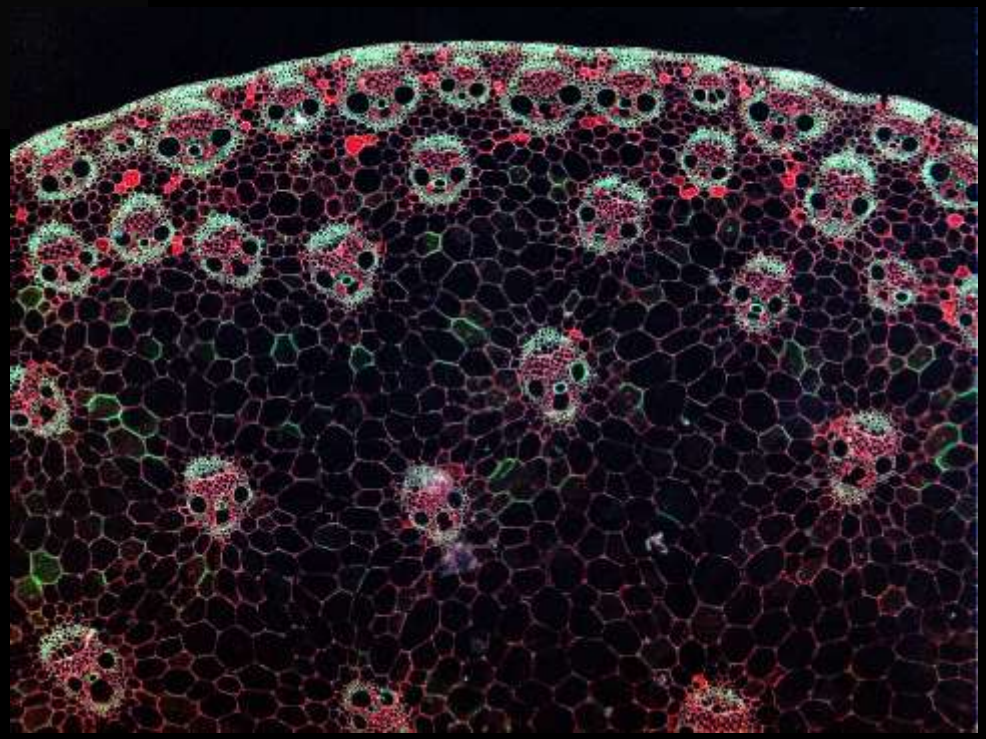
Embrione di *Danio rerio* HAMILTON
(Zebrafish)



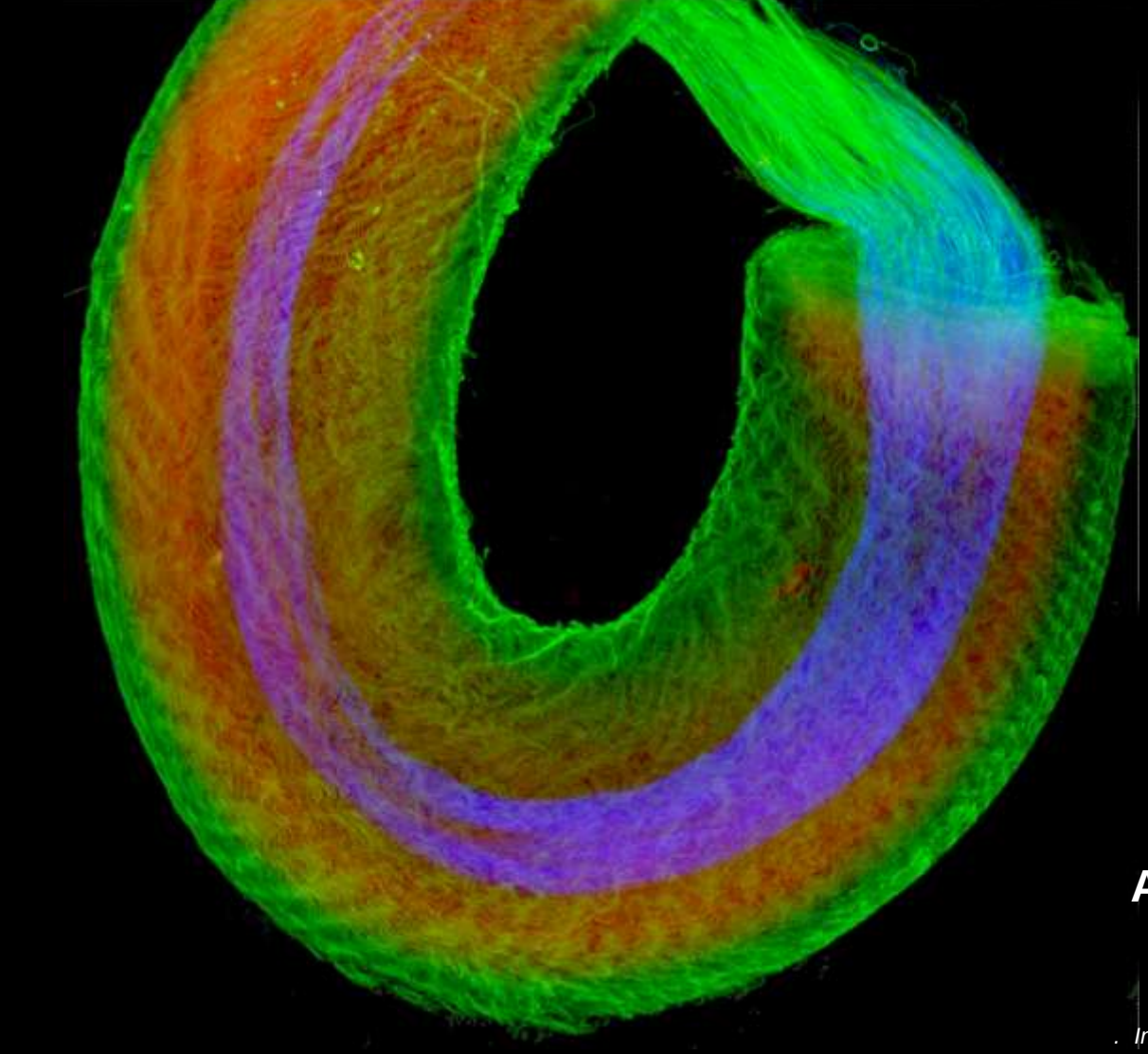
Sezione trasversale di cervello di mammifero



Foglia di Eucalipto

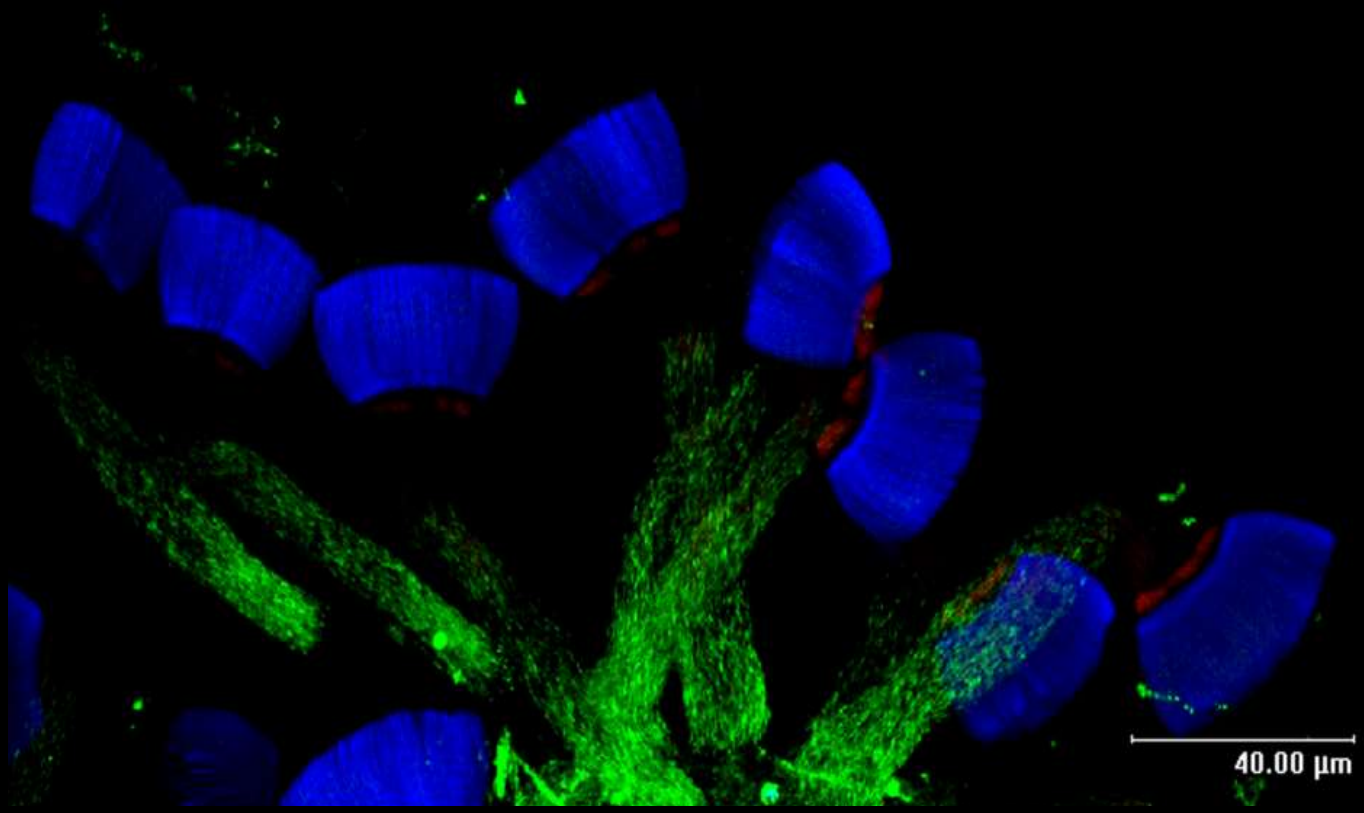


Fusto di monocotiledone



Aggregati di spermatozoi di *Tubifex tubifex*

. In particolare, possiamo qui notare in violetto-blu il materiale genetico, la tubulina in verde, l'actina in rosso.



Aggregati di spermatozoi di *Riftia pachyptila*

L'immagine ritrae un aggregato di spermatozoi: si possono distinguere in blu le teste con i nuclei allungati, al cui interno è presente il materiale genetico, in verde le code.

"Le fotografie non devono essere solo belle, ma anche utili alla Scienza, alla Ricerca, all'Industria. Per questo sono belle, più di quelle che utili non sono"

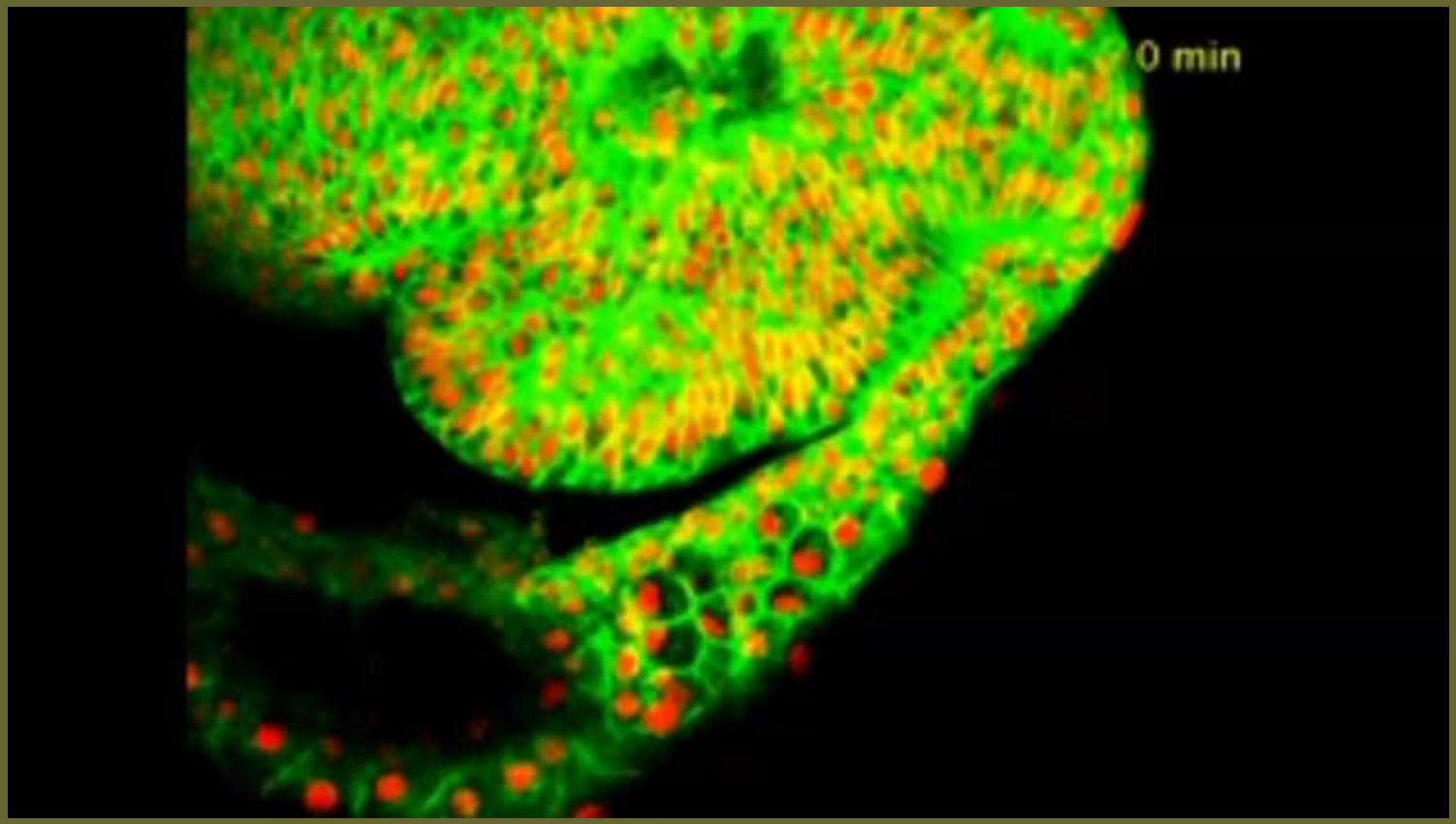
Enrico Giovenzana (1944-2014)

Alberto Diaspro
Quello che gli occhi non vedono
Il microscopio: storia di un pezzo di vetro e dell'arcobaleno
MICROSCOPI
HOEPLI

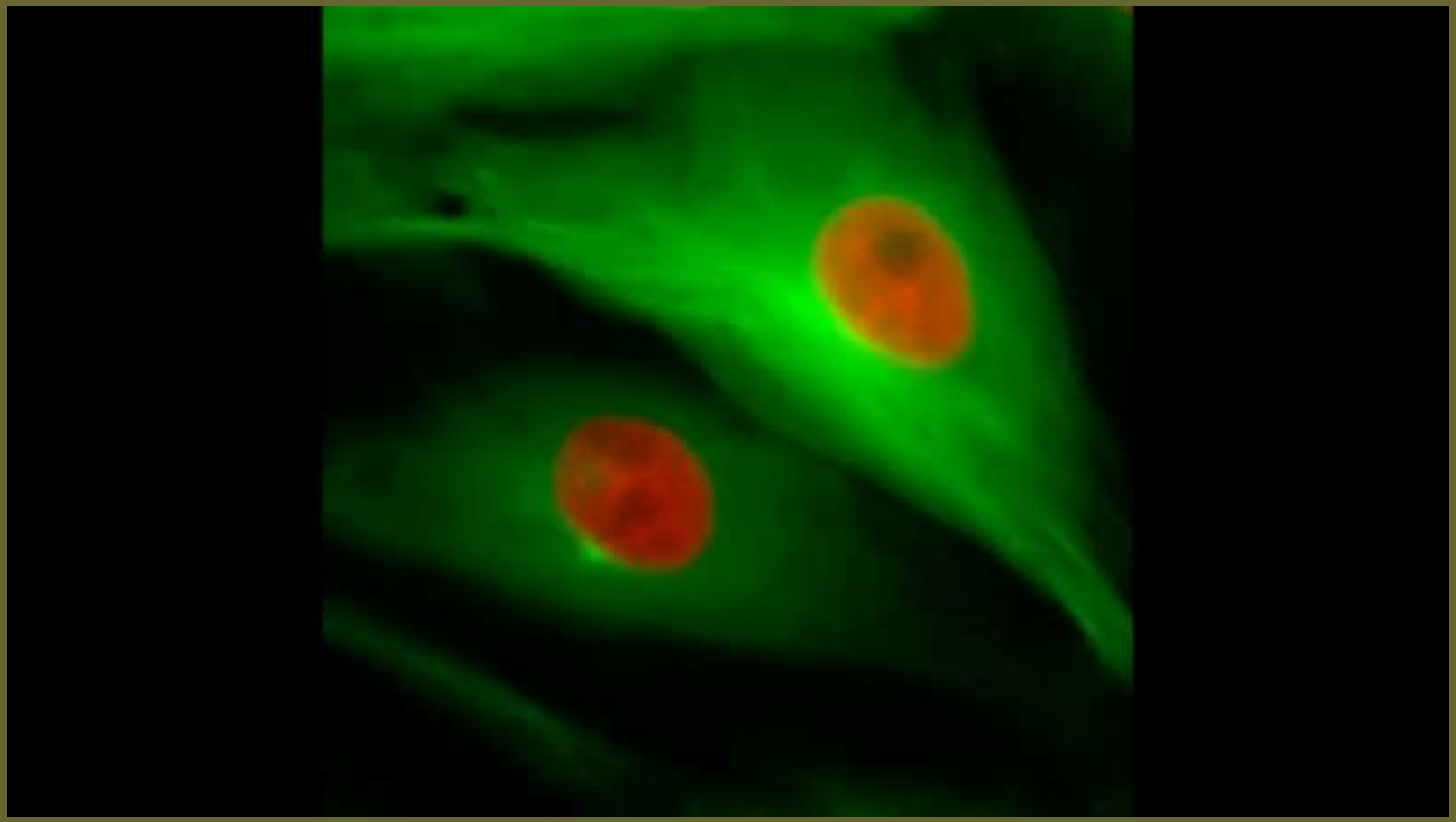
CRISTINA MUCCIOLI
L'ESTETICA DEL VERO
Le idee e le immagini della verità nella storia dell'arte
FILOSOFIA ESTETICA

Carlo Soave
Fiorenza De Bernardi Umberto Fascio
Grandi cambiamenti
Evoluzione tra competizione e cooperazione
MICROSCOPI
HOEPLI

https://meet.google.com/cny-wjpk-bnc



Morfogenesi dell'occhio di Danio rerio Hamilton



Cellule epiteliali di fegato di maiale