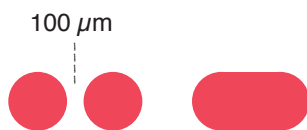


I microscopi: un occhio sul mondo cellulare

I microscopi, il cui nome deriva dal greco *mikron*, ovvero 'piccolo', e *scopéin* che significa 'guardare', sono strumenti che permettono di vedere cose molto piccole e distinguerne anche i particolari. L'occhio umano non è in grado di distinguere oggetti o strutture che hanno una distanza tra loro inferiore a 0,1 mm o 100 micrometri (μm), ovvero ha un potere di risoluzione di 0,1 mm, intendendosi per **risoluzione** la distanza minima tra due punti che consente di distinguerli come separati, in modo tale che a una distanza minore due punti vengono percepiti come se fossero uno solo.

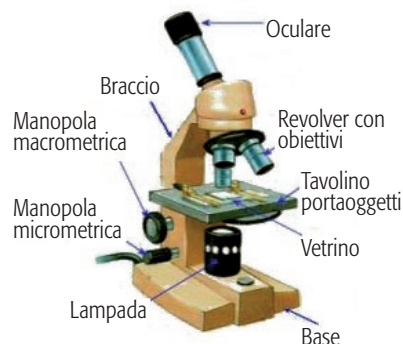


L'introduzione del microscopio ha migliorato di 500 volte il potere risolutivo dell'occhio umano, consentendo l'osservazione di strutture che sono 3-10 volte al di sotto del nostro limite di risoluzione. Quasi tutti gli organismi unicellulari procarioti ed eucarioti e gran parte delle cellule degli organismi pluricellulari hanno infatti un diametro di poche decine di micron (micrometri) e sono perciò invisibili a occhio nudo. L'osservazione di questo mondo invisibile può essere effettuata attraverso molti tipi di microscopi, ognuno con determinate caratteristiche e con caratteristici poteri risolutivi, ma in questa trattazione verranno presi in considerazione solo tre tipologie di microscopi, ovvero quelli che hanno per primi permesso di osservare e conoscere il mondo cellulare: il microscopio ottico, il microscopio elettronico a scansione e il microscopio elettronico a trasmissione.

Microscopio ottico

La struttura generale del microscopio ottico si compone di una solida **parte meccanica** detta **stativo** (costituita dal braccio e dal basamento) che conferisce stabilità al sistema e ne rappresenta il corpo principale, il quale supporta i meccanismi per il movimento del carrellino portaoggetti e la messa a fuoco (**parte ottica**) del campione da osservare e nel quale è anche alloggiato il sistema di illuminazione.

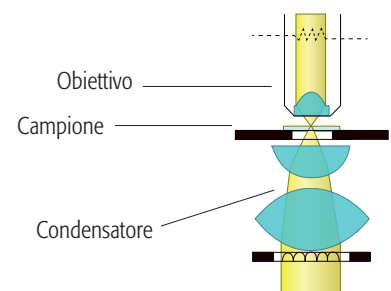
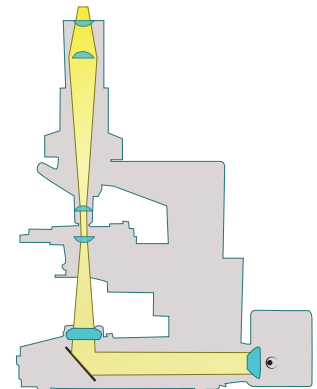
Il microscopio ottico ha un potere risolutivo massimo di 200 nm ($0,2 \mu\text{m}$) ed è quello più comunemente utilizzato. Il suo funzionamento si basa su un sistema di lenti atto a focalizzare la luce visibile del sistema di illuminazione nell'occhio.



La **parte ottica** è costituita da due lenti disposte in serie lungo il cammino della luce, in modo che l'immagine possa essere ingrandita due volte. Nella base del microscopio vi è la sorgente luminosa, costituita da una lampada. La luce che viene emessa da questa lampada segue un percorso prestabilito che la fa passare attraverso varie lenti (condensatore, obiettivo e oculare) per arrivare infine al nostro occhio.

La componente ottica del microscopio si compone anche di un **diaframma** attraverso il quale è possibile regolare l'ampiezza del fascio di luce che arriva al condensatore contribuendo

a migliorare la qualità dell'immagine. Il **condensatore** è posto sotto il tavolino portaoggetti mobile e focalizza sul campione la luce che arriva dalla sorgente attraverso due lenti.



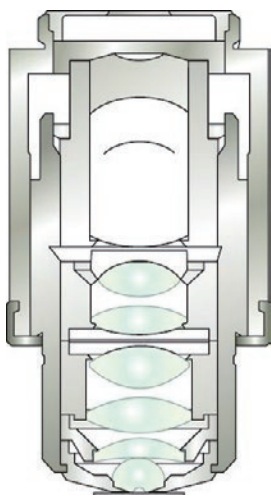
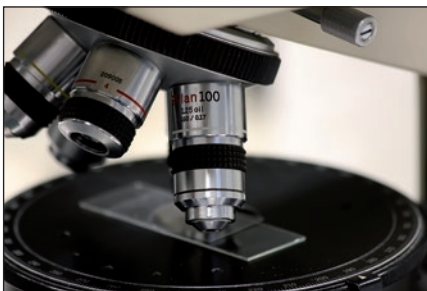
I microscopi: un occhio sul mondo cellulare

Tavolino portaoggetti

Il tavolino portaoggetti è il supporto che sostiene il preparato, il quale viene fissato tramite un sistema a molla oppure con due morsetti. È una struttura in grado di essere mossa, perché raccordata al sostegno tramite manopole che consentono al tavolino di essere spostato in alto o in basso con una manopola, chiamata vite macrometrica e di regolare la messa a fuoco del campione con movimenti più "fini" consentiti dalla vite micrometrica. Il carrello traslatore è l'apparato che consente lo spostamento del preparato per la ricerca dei dettagli, muovendolo lungo i piani X e Y (ossia avanti e indietro e a destra o a sinistra).

Il tavolino portaoggetti è inoltre dotato di un'apertura attraverso cui passa la luce proveniente dalla sorgente luminosa.

L'immagine viene ingrandita poi attraverso una serie di **obiettivi** posti su una torretta girevole a revolver, in grado di ruotare. La torretta girevole a revolver alloggia di solito tre o quattro obiettivi (ma può arrivare a portarne fino a sei), ciascuno con un diverso fattore di ingrandimento (4×; 10×; 40×; 100×). Ogni obiettivo, attraverso un sistema di lenti convergenti, permette l'ingrandimento del campione.



Schema di un obiettivo, che evidenzia il sistema di lenti

Gli obiettivi... danno i numeri!

Sulla struttura esterna di ciascun obiettivo sono riportati diversi 'dati numerici' che forniscono all'utilizzatore varie informazioni. Vediamoli in dettaglio:

40x/0.65 N.A.

- 40 indica il numero di ingrandimenti che è possibile ottenere con questo particolare obiettivo, in altre parole l'immagine viene ingrandita 40 volte;
- 0.65 è l'apertura numerica (N.A.); maggiore è il suo valore e maggiore è il potere di risoluzione dell'obiettivo

160/0.16

- 160 indica la distanza in millimetri che deve intercorrere tra questo obiettivo e l'oculare, ossia la lunghezza del tubo porta-oculare;
- 0.16 rappresenta invece lo spessore massimo (in millimetri) che il vetrino coprioggetto deve avere con questo obiettivo

La **lente oculare** è quella lente che trasmette l'immagine sul piano dell'occhio dell'osservatore portando un ulteriore ingrandimento. L'oculare, inserito nel tubo porta-oculare, è formato da due lenti che permettono ingrandimenti compresi tra 3× e 20×, ciò significa che aumentano le dimensioni reali dell'oggetto dalle 3 alle 20 volte. Come gli obiettivi, anche gli oculari sono intercambiabili mediante semplice sfilamento e sostituzione diretta dal tubo del microscopio.

Il potere d'ingrandimento di cui l'oculare è dotato viene riportato inciso sulla montatura. Per ottenere l'ingrandimento totale dell'immagine è necessario moltiplicare questo valore per l'ingrandimento dell'obiettivo.

Esempio: 10× (oculare) e 4× (obiettivo) = 40× (ingrandimento complessivo).



I microscopi: un occhio sul mondo cellulare

L'oculare riceve la luce proveniente dall'immagine già ingrandita del campione e la proietta sul piano dell'occhio dell'osservatore ingrandendo ancora l'immagine.

Il microscopio ottico utilizza luce visibile e non è possibile ingrandire l'immagine all'infinito, perché la possibilità di ingrandire dipende dalla lunghezza d'onda della luce. Minore è la lunghezza d'onda e maggiore sarà la risoluzione. Le lunghezze d'onda della luce visibile sono comprese tra 380 e 760 nm, e il microscopio ottico è in grado di ingrandire fino a un massimo di 1500 volte (ingrandimento 1500x), con un limite di risoluzione teorica di circa 0,2 μm . Con questo strumento è possibile inoltre osservare preparati opportunamente colorati per mettere in evidenza le differenze e le caratteristiche delle strutture da studiare.

I vetrini

Il campione da analizzare con l'ausilio del microscopio viene allestito posizionandolo sul vetrino portaoggetti, un piccola lastra di vetro di forma rettangolare, le cui dimensioni sono standard. Successivamente il campione viene coperto con il vetrino coprioggetti, che può essere di plastica o di vetro, di forma quadrata e il cui lato misura generalmente 2 cm. Le funzioni svolte dal vetrino coprioggetti sono di stabilizzare e proteggere il campione che si andrà a osservare, inoltre permette di evitare contaminazioni da contatto con l'obiettivo o con agenti esterni (polvere).



Microscopi elettronici



Il microscopio elettronico presenta molte differenze rispetto al microscopio ottico. Fu inventato nel 1931 dal fisico Ernst Ruska e dall'ingegnere Max Knoll: sul loro prototipo si basano ancora i moderni microscopi elettronici.

La prima e sostanziale differenza tra il microscopio ottico e il microscopio elettronico è che quest'ultimo utilizza un fascio di elettroni al posto della luce visibile. Tale fascio di elettroni ha una lunghezza d'onda molto più corta di quella dei fotoni (cioè della luce), questo comporta una risoluzione e un ingrandimento delle immagini molto maggiore (si può arrivare a più di un milione di ingrandimenti).

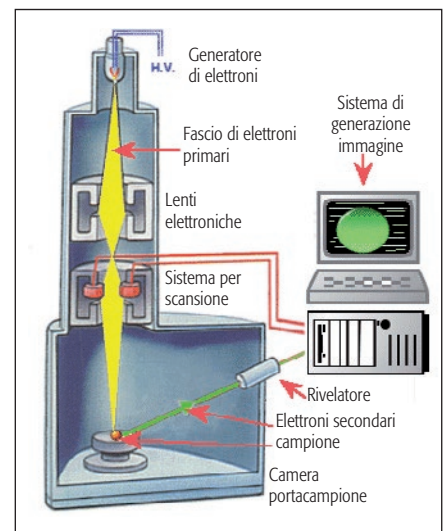
In questo tipo di microscopio anche le lenti sono caratteristiche, esse infatti sono magnetiche. Una caratteristica per permettere la deviazione del fascio di elettroni, soggetti al campo magnetico, e di conseguenza l'ingrandimento delle immagini che sono solo ed esclusivamente in bianco e nero. Le strutture da osservare sono più meno evidenziate non dai coloranti utilizzati nella preparazione dei campioni, bensì dalla loro diversa permeabilità al passaggio degli elettroni.

Essendo la carica elettrica diffusa nel campione in maniera non omogenea, le zone caratterizzate da una netta presenza di cariche elettriche presenteranno una resistenza maggiore al fascio di elettroni e quindi risulteranno più elettrondense. In altre parole que-

sto significa che le aree del campione che si fanno attraversare dagli elettroni appaiono più chiare, mentre le aree che disperdono gli elettroni si presenteranno opache.

La struttura di un microscopio elettronico si compone di una sorgente elettronica, rappresentata da un filamento incandescente che emette elettroni, e da un apparato che permette l'accelerazione degli elettroni che vengono emessi. L'accelerazione del fascio di elettroni passa attraverso un condensatore, che può essere elettrostatico o magnetico, andando a incidere sul campione. Il fascio è quindi 'raccolto' su un obiettivo, anch'esso elettrostatico o magnetico, e diretto verso un oculare attraverso il quale va a incidere su una lastra fotografica o uno schermo fluorescente creando l'immagine. Un sistema di pompe assicura che tutto questo processo avvenga nel vuoto.

Si distinguono due tipi di microscopi elettronici: a scansione o SEM (Scansion Electron Microscope) e a trasmissione o TEM (Transmission Electron Microscope). Nel microscopio elettronico a scansione, SEM, gli elettroni non passano attraverso il campione, bensì lo colpiscono e vengono riflessi sulla superficie.



I microscopi: un occhio sul mondo cellulare

Il campione emette quindi un fascio di elettroni secondari che converge su una sonda che passa sul campione, scansionandolo nell'arco di pochi secondi. La sonda rileva quindi il fascio di elettroni che poi viene convertito in impulsi elettrici.

L'immagine che si viene a creare è tridimensionale e dovuta alla dispersione degli elettroni sul campione, del quale saranno evidenziate in chiaro creste e protuberanze, mentre solchi e depressioni appariranno scuri.

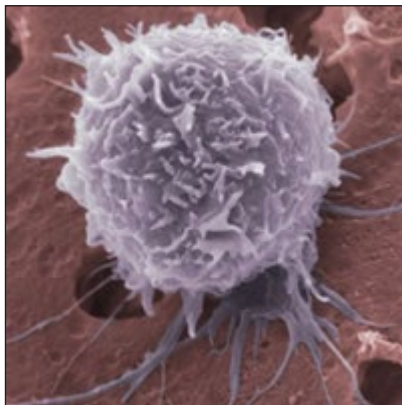
Il microscopio elettronico a trasmissione, TEM, è simile al microscopio a scansione in quanto anch'esso

possiede un generatore di elettroni, lenti condensatrici e un sistema che mantiene il vuoto, ma le immagini che produce sono differenti poiché, al contrario del SEM che è utile per lo studio delle superfici, fornisce informazioni sull'intera struttura del campione.

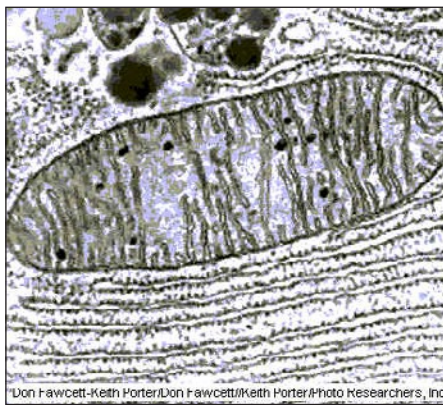
Il fascio di elettroni origina da un filamento riscaldato sito nella colonna sotto vuoto e viene accelerato verso il condensatore. Il fascio di elettroni passa quindi nel condensatore formato da lenti elettromagnetiche e attraversa una sottile sezione del campione. L'esiguo spessore del

campione permette a qualche elettrone incidente di attraversarlo. Questo passaggio attraverso il campione comporta che alcuni elettroni vengano assorbiti e altri invece vengano deviati in modo irregolare.

Il fascio di elettroni che ha attraversato il campione viene diretto e concentrato su una lente e in seguito proiettato su uno schermo in forma ingrandita, mostrando delle aree scure causate da una deviazione irregolare degli elettroni. Queste deviazioni sono provocate da alterazioni dell'angolo di incidenza degli elettroni sul campione.



Una suggestiva immagine tridimensionale di una cellula staminale al microscopio elettronico a scansione (SEM).



Un mitocondrio osservato al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).