

Metodi per l'analisi morfo-funzionale delle cellule – Prof. Marisa Levi

Parte II

Microscopio a fluorescenza

La fluorescenza è il fenomeno per cui certe sostanze, eccitate da luce di opportuna lunghezza d'onda, tornando allo stato fondamentale emettono luce di lunghezza d'onda maggiore. L'emissione avviene entro 10^{-8} - 10^{-9} sec.

Nelle cellule possono essere già presenti sostanze fluorescenti (ad esempio clorofilla, lignina); oppure si possono utilizzare coloranti fluorescenti (FLUOROCROMI), che si legano a determinate sostanze. Ogni sostanza fluorescente ha un suo spettro di assorbimento od eccitazione (intensità della fluorescenza emessa in funzione della λ di eccitazione) e un suo spettro di emissione (intensità della fluorescenza emessa in funzione della λ di emissione).

A differenza di quanto avviene nel microscopio a trasmissione, nel quale l'immagine dell'oggetto dipende da un assorbimento della luce incidente, nel caso della fluorescenza è l'oggetto stesso che è fonte di luce. E' necessario però uno strumento in grado di separare la luce che illumina il preparato da quella emessa per fluorescenza.

In genere si utilizzano dei microscopi detti ad **epifluorescenza**, in quanto la sorgente luminosa si trova al di sopra del preparato e la luce di eccitazione arriva al preparato attraverso l'obiettivo. La sorgente luminosa è generalmente una lampada ad arco, costituita da un bulbo di quarzo contenente due elettrodi immersi in un gas (es. xenon, vapori di mercurio, ecc.), che viene ionizzato dalla scarica elettrica e brucia emettendo luce di diversa lunghezza d'onda. Le lampade allo xenon hanno scarsa emissione nell'UV, mentre quelle a vapori di mercurio hanno massimi di emissione proprio nell'UV.

Tra la sorgente luminosa, l'obiettivo e l'oculare è inserito un blocchetto costituito da tre filtri:

- il filtro di eccitazione, posto sul cammino della luce che proviene dalla sorgente luminosa, seleziona le lunghezze d'onda di eccitazione;
- la lamina dicroica, posta ad angolo di 45° rispetto a questo filtro, devia la luce di eccitazione nell'obiettivo (una lamina dicroica fa da specchio per le lunghezze d'onda inferiori ad un certo valore, e si lascia passare dalla luce di lunghezza d'onda superiore: perciò la lamina dicroica riflette la luce di eccitazione, deviandola nell'obiettivo, e quindi sul preparato, ma si lascia passare dalla luce fluorescente emessa dall'oggetto, che ha lunghezza d'onda maggiore);
- il filtro di sbarramento seleziona ulteriormente la luce che, emessa dall'oggetto e raccolta dall'obiettivo, ha attraversato la lamina dicroica per arrivare all'oculare.

In questo modo, all'oculare arriva solo la luce emessa per fluorescenza, e l'oggetto appare luminoso, con luce colorata su fondo nero.

La combinazione di filtri è intercambiabile, e viene scelta in relazione alle caratteristiche dei fluorocromi che si vogliono osservare.

Per esempio il DAPI è un fluorocromo specifico per il DNA, che assorbe luce UV ed emette nel blu. Una combinazione di filtri adatta per osservare la fluorescenza del DAPI è così composta: un filtro di eccitazione che lasci passare solo luce a 360-370 nm, lamina dicroica 395 nm, filtro di sbarramento 420 nm. Le zone contenenti DNA appariranno azzurre in campo nero.

Il FITC (fluoresceina isotiocianato) è un fluorocromo che si lega alle proteine; assorbe luce blu e emette luce verde. Una combinazione di filtri adatta per osservare la fluorescenza del FITC è così composta: un filtro di eccitazione che lasci passare luce a 450-490 nm, lamina dicroica 515 nm, filtro di sbarramento 520 nm. Se il filtro di sbarramento lascia passare tutta la luce al di sopra di una certa lunghezza d'onda (filtro "long pass"), si potrà vedere anche fluorescenza non dovuta allo specifico fluorocromo. Per questo esistono filtri "band pass" che si lasciano attraversare solo da luce in un intervallo di lunghezze d'onda: per esempio, un filtro di sbarramento per il FITC BP 535-550 lascia passare solo luce verde, ed è quindi molto specifico.

Microscopio confocale

Il microscopio confocale permette di osservare preparati anche di un certo spessore, facendone delle "sezioni ottiche" (senza bisogno di includere e tagliare il materiale), che vengono poi ricostruite tridimensionalmente mediante un software.

La luce di un laser viene focalizzata su un punto molto piccolo del preparato, e il raggio viene mosso in modo da fare punto per punto la scansione di quel piano focale. La luce emessa

passa attraverso un piccolo diaframma (pinhole) e arriva al rivelatore; la luce emessa al di sopra e al di sotto del piano focale esaminato non riesce a passare attraverso il diaframma, e quindi non giunge al rivelatore. Si ha perciò, per ciascun piano focale, un'immagine molto nitida. Inoltre il preparato non viene illuminato tutto contemporaneamente, per cui i problemi legati al decadimento della fluorescenza sono molto ridotti.

La scansione può essere fatta per più piani focali, e si può ricostruire l'immagine tridimensionale del preparato.

Microscopio elettronico

Come abbiamo visto precedentemente, il limite di risoluzione di uno strumento ottico è proporzionale alla lunghezza d'onda della luce incidente. Utilizzando radiazioni elettromagnetiche di lunghezza d'onda molto piccola si può quindi aumentare molto il potere di risoluzione dello strumento.

Il microscopio elettronico sfrutta un fascio di elettroni, la cui lunghezza d'onda è molto piccola (per esempio, se la differenza di potenziale che genera il fascio è di 100kV, λ è uguale a 0.004 nm), perciò il limite di risoluzione è molto piccolo (dell'ordine di 0.2-2 nm). Gli ingrandimenti possibili sono anche 1.000.000x.

Gli elettroni devono essere emessi sotto vuoto per evitare urti con l'aria: questo significa che il materiale deve essere disidratato e non sono osservabili cellule vive.

Inoltre, poiché gli elettroni hanno un basso potere di penetrazione, per il microscopio elettronico bisogna utilizzare sezioni ultrasottili (50-100 nm); sezioni più spesse (1 μ m) possono essere osservate con microscopi ad alto voltaggio (500-3000 kV), che generano fasci di elettroni con potere di penetrazione maggiore. Le sezioni vengono appoggiate su una griglia di metallo (retino).

Gli elettroni, emessi dal catodo, vengono accelerati dall'anodo e vengono fatti passare attraverso un foro, in modo che si forma un raggio sottile. Le "lenti" sono dei magneti.

Gli elettroni che attraversano il preparato colpiscono uno schermo fluorescente, eccitandolo e dando una zona luminosa (chiaro); dove gli elettroni vengono assorbiti o deviati dal preparato lo schermo resta scuro. Per aumentare il contrasto si utilizza una "colorazione" con metalli pesanti (osmio, acetato di uranile, acetato di piombo), che sono opachi agli elettroni: dove il metallo pesante si è legato il preparato appare scuro.

Il materiale da osservare al microscopio elettronico può essere preparato anche in altri modi:

Ombreggiatura: il preparato viene colpito con vapori di platino provenienti da una parte; i vapori si depositano sulla superficie del preparato da una parte, mentre dall'altra resta una zona più chiara.

Replica: il campione viene ombreggiato con vapori di metallo pesante, e poi ricoperto con una pellicola di carbonio dall'alto; il campione viene quindi digerito e resta la pellicola, che è una "replica" della superficie del preparato.

Colorazione negativa: il preparato, adagiato sul retino, viene colorato con una soluzione concentrata di sali di metallo pesante, e quindi essiccato; il metallo pesante precipita intorno alla struttura, dando un contorno scuro intorno alla struttura trasparente agli elettroni, che appare quindi in negativo.

Criodecappaggio: il materiale viene congelato in azoto liquido in presenza di un crioprotettore e quindi colpito con una lama: questo provoca l'esposizione di superfici di frattura, che vengono poi ombreggiate. Nel caso delle membrane la frattura separa i due foglietti fosfolipidici, ed è quindi possibile mettere in evidenza particelle intramembrana.

Microscopio elettronico a scansione

Quello descritto sopra è un microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) utilizza un fascio di elettroni che si sposta sulla superficie del campione (ne fa quindi una scansione), eventualmente metallizzata. La superficie emette degli elettroni secondari, che vengono raccolti da un rivelatore. Dalle zone più esposte molti elettroni secondari raggiungeranno il rivelatore, eccitandolo e dando luce; dalle zone incavate pochi elettroni arriveranno al rivelatore, dando zone di buio. Ne deriva un'immagine tridimensionale della superficie del campione. Il campione può essere anche abbastanza grande e non è necessario fare sezioni sottili.