

Το μικροσκόπιο ως αναλυτικό όργανο.

Το μικροσκόπιο δεν μας δίνει
μόνο εικόνες των
παρασκευασμάτων μας.

Η διάκριση των μικροσκοπίων σε κατηγορίες βασίζεται, κατά κύριο λόγο, στην ακτινοβολία που χρησιμοποιούν και η οποία χαρακτηρίζεται από το μήκος κύματός της.

Τι είναι η διακριτική ικανότητα
ενός οπτικού συστήματος;

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{A}$$

d = διακριτική ικανότητα

0.61 = μια σταθερά

λ = το μήκος κύματος της ακτινοβολίας

A = το αριθμητικό άνοιγμα του φακού και εξαρτάται από την ποιότητα κατασκευής του φακού.

Για τα ΟΜ:

όταν το $\lambda = 500\text{nm}$

και το $A = 1,6$

τότε το $d = 190\text{ nm}$ ή $0,19\ \mu\text{m}$

Για τα ΗΜ:

Σύμφωνα με τη θεωρία του De Broglie, το μήκος κύματος λ των ηλεκτρονίων υπολογίζεται από το τύπο:

$$\lambda = 0.1 \frac{150}{V}$$

Όταν $V = 80\text{ kV}$

$d=0.004\text{ nm}$

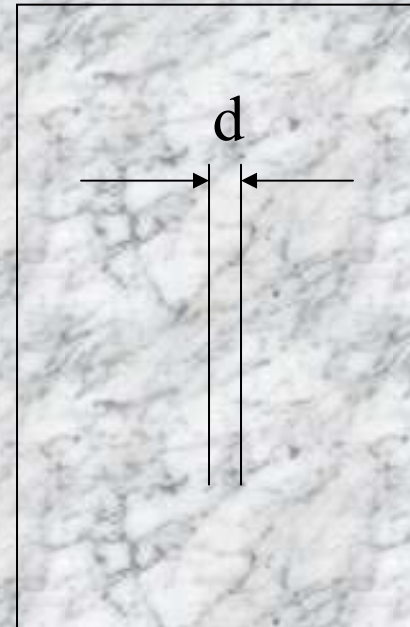
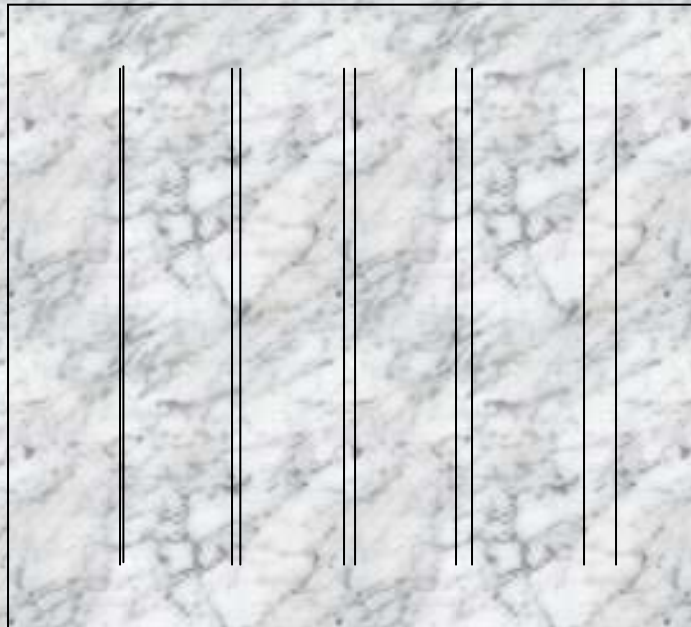
Η πραγματική όμως είναι μόνο 0.15 nm (Σήμερα αυτό έχει επιτευχθεί με ειδικές διατάξεις όπως θα δούμε).

Τι σημαίνει διακριτική ικανότητα d στην πράξη...

του ματιού μας είναι 0.2 mm .

του οπτικού μικροσκοπίου είναι $0.2 \mu\text{m}$

του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου 0.2 nm



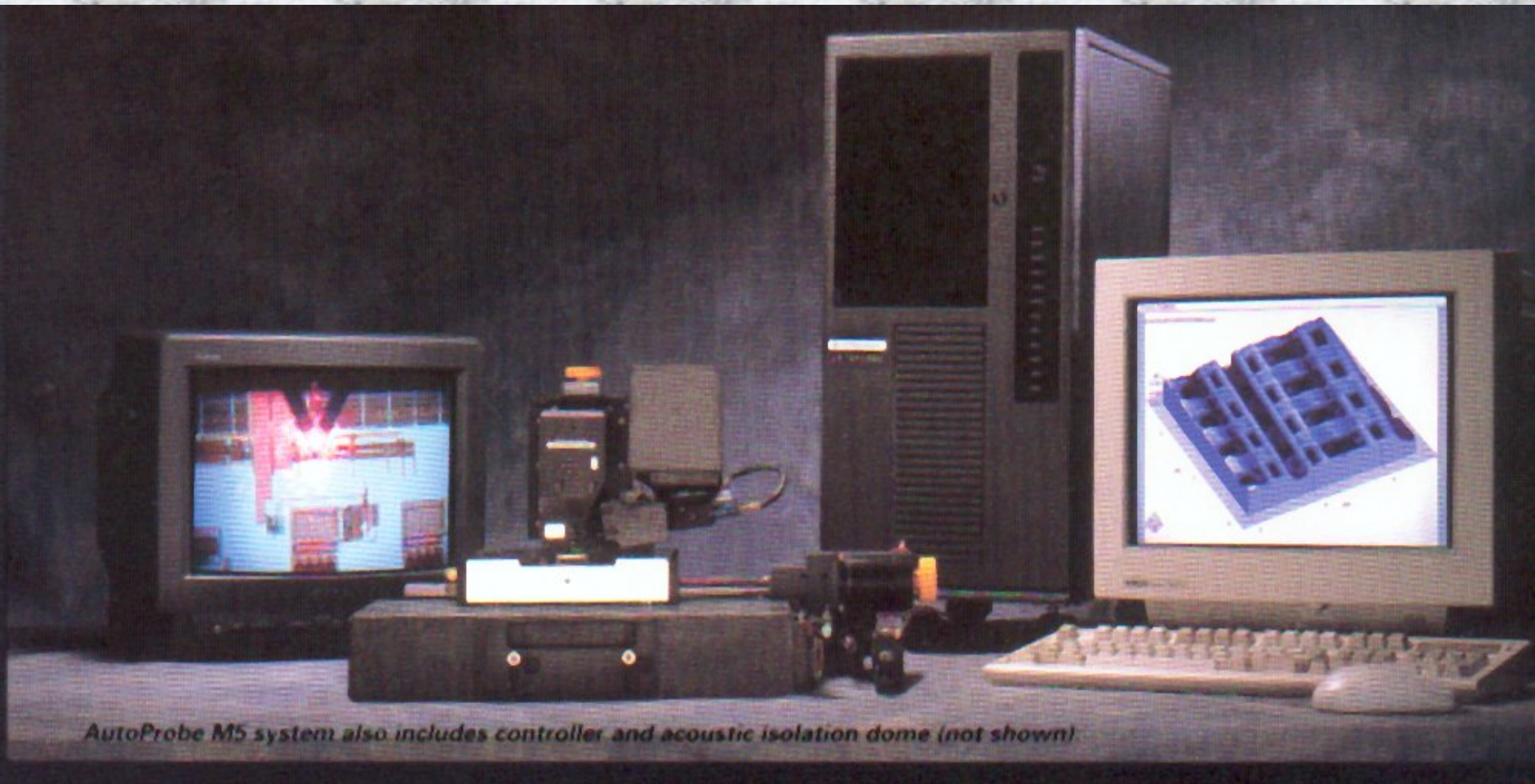
Οι δυο πιο γνωστές κατηγορίες:

- Τα οπτικά μικροσκόπια
- Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια

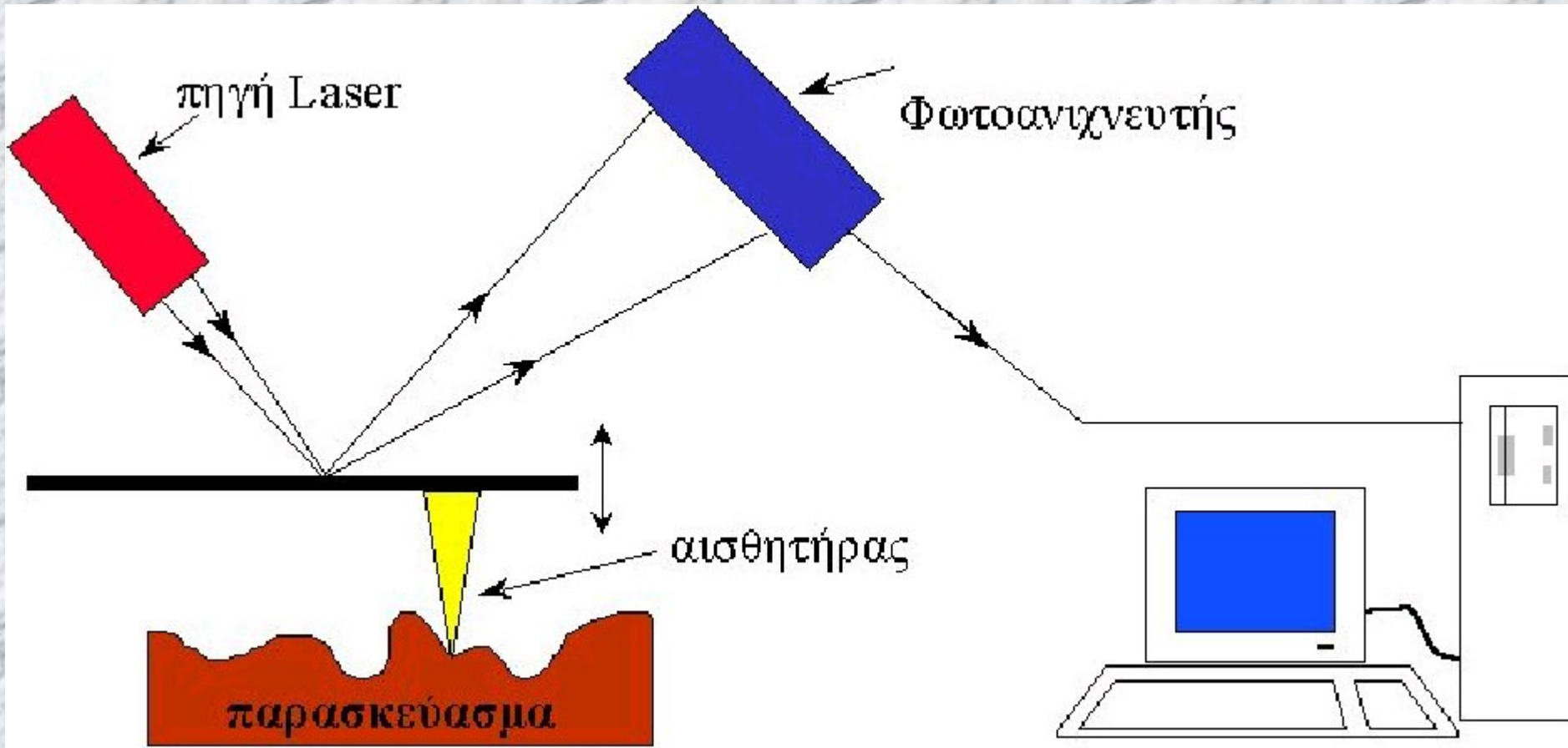
Λιγότερο γνωστά μικροσκόπια

- Μικροσκόπιο ακτίνων Χ
- Μικροσκόπιο σάρωσης αισθητήρα
Scanning Probe Microscope ή Atomic
Force Microscope

Το μικροσκόπιο σάρωσης αισθητήρα Scanning Probe Microscope ή Atomic Force Microscope



Σχηματική παράσταση μικροσκοπίου αισθητήρα



Οι διάφοροι τύποι ΟΜ

- Φωτεινού πεδίου (Bright field).
- Σκοτεινού πεδίου (Dark field).
- Αντίθεσης φάσης (Phase contrast).
- Πολωτικό (Polarized).
- Στερεοσκόπιο
- Μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast, Nomarski).
- Μικροσκόπιο φθορισμού (fluorescence).
- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser (Confocal Laser Scanning Microscope).
- Μικροφασματοφωτομετρικό (Microspectroscopy).
- Φασματοσκοπία συσχετιζόμενου φθορισμού (Fluorescence Correlation Spectroscopy)

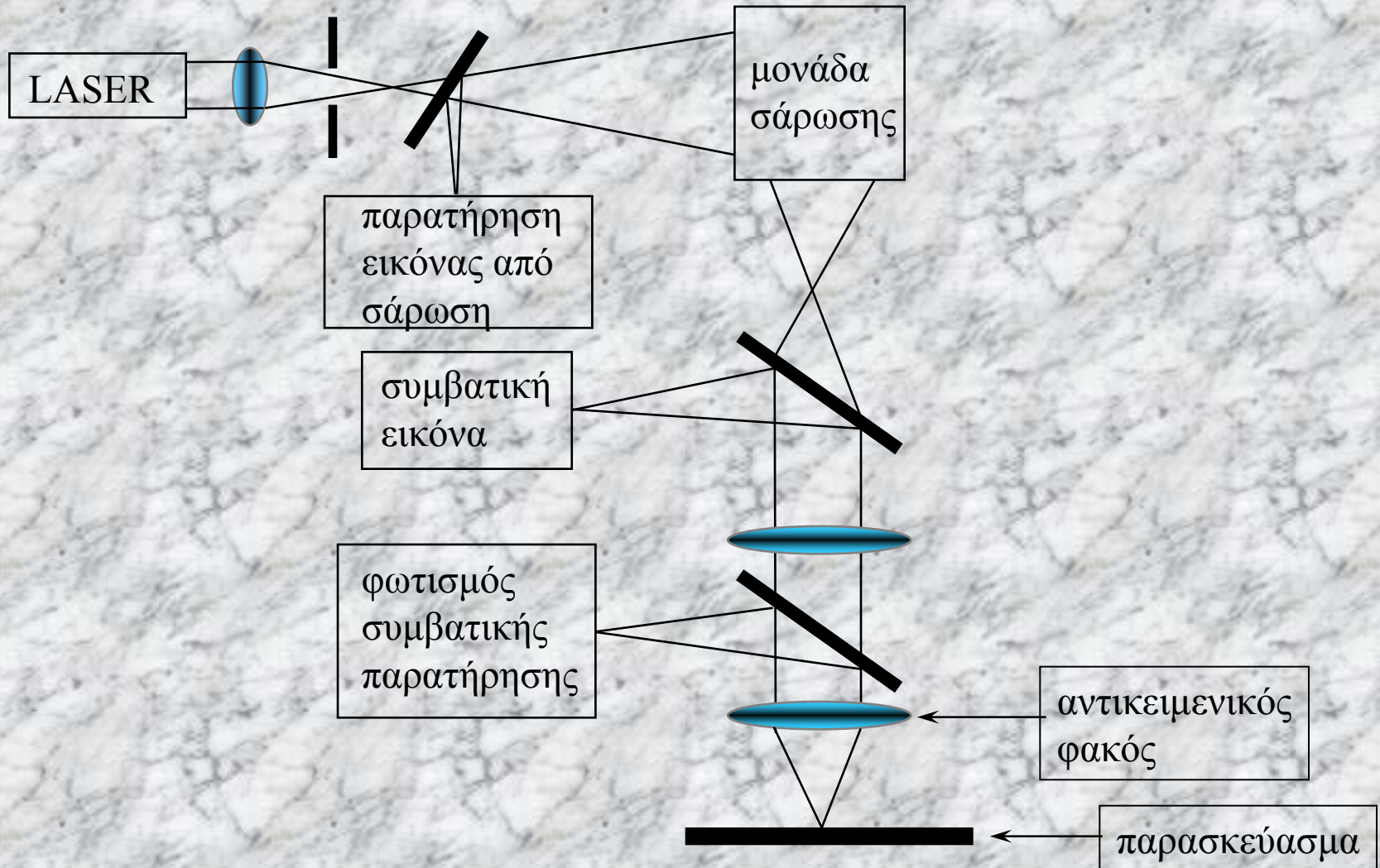
Τα χαρακτηριστικά των ΟΜ

- Φωτεινού πεδίου (Bright field)
 - το πιο γνωστό
- Σκοτεινού πεδίου και Αντίθεσης φάσης –Αντίθεσης διαφορικής συμβολής
 - κυρίως για παρατήρηση ζωντανών αχρωμάτιστων παρασκευασμάτων.
- Πολωτικό (Polarized)
 - κρυσταλλικές δομές.
- Μικροφασματοφωτομετρικό
 - Διαθέτει φασματοφωτόμετρο

Μικροσκόπια φθορισμού

- Κοινό μικροσκόπιο φθορισμού (fluorescence).
 - Διαθέτει πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).
- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser (Confocal Laser Scanning Microscope).
 - Μικροσκόπιο φθορισμού αλλά με την ικανότητα να απαλείφει το «θόρυβο» από τα εκτός εστίασης σημεία του παρασκευάσματος.

Σχηματικά η λειτουργία του συνεστιακού μικροσκοπίου



Αναλυτικές μέθοδοι στο ΟΜ

- Χρώσεις
- Ιστοχημεία
- Ανοσοεντοπισμός
- Μικροφασματοφωτομετρία
- Φασματοσκοπία Raman
- Φασματοσκοπία συσχετιζόμενου φθορισμού (Fluorescence Correlation Spectroscopy)

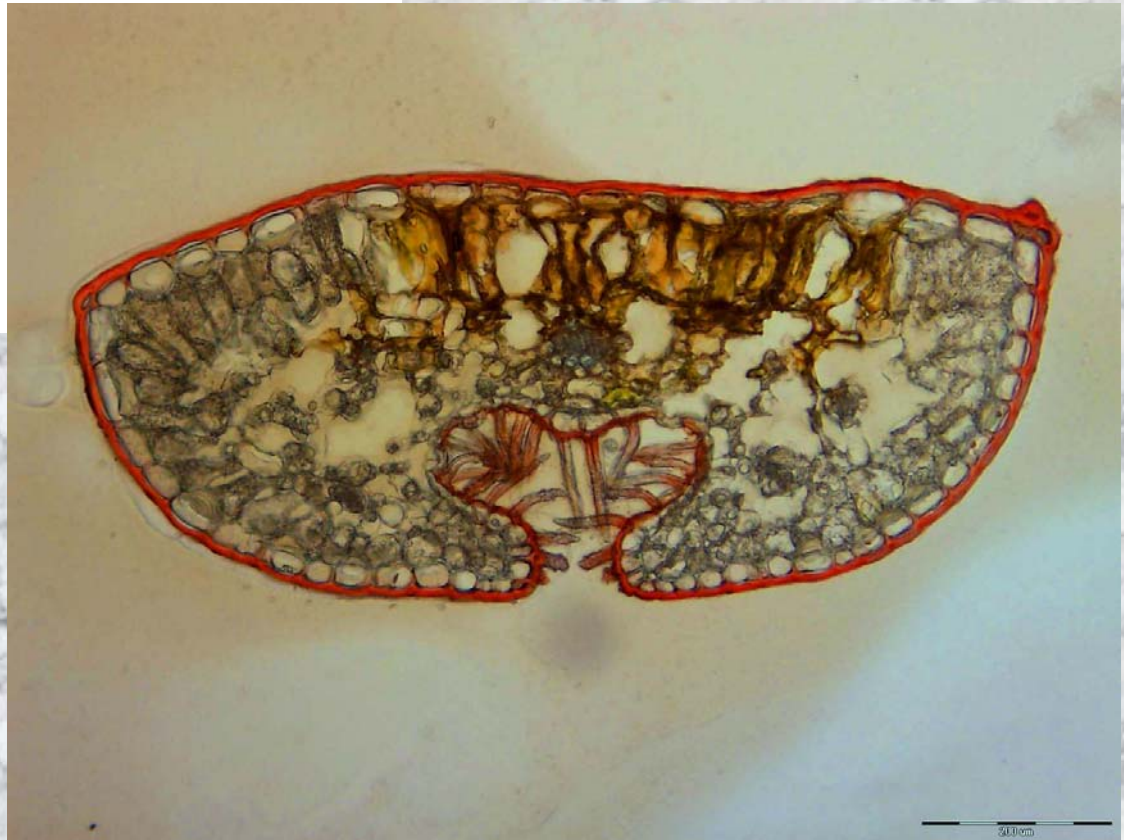
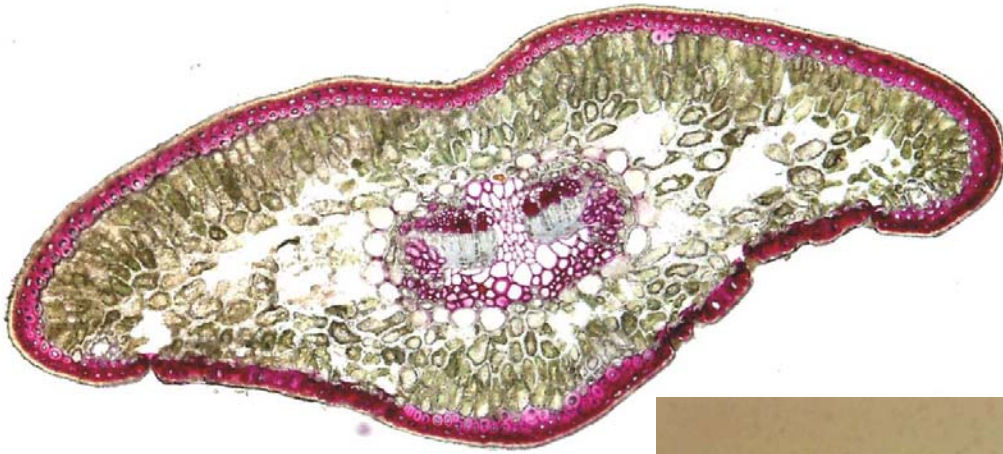
Χρώσεις

- Τις περισσότερες φορές, το τι χρωματίζουν, το γνωρίζουμε εμπειρικά.
- Συνήθως πρόκειται για φυσικής προέλευσης χρωστικές.

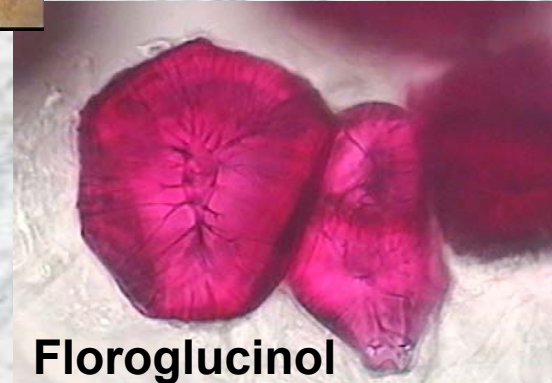
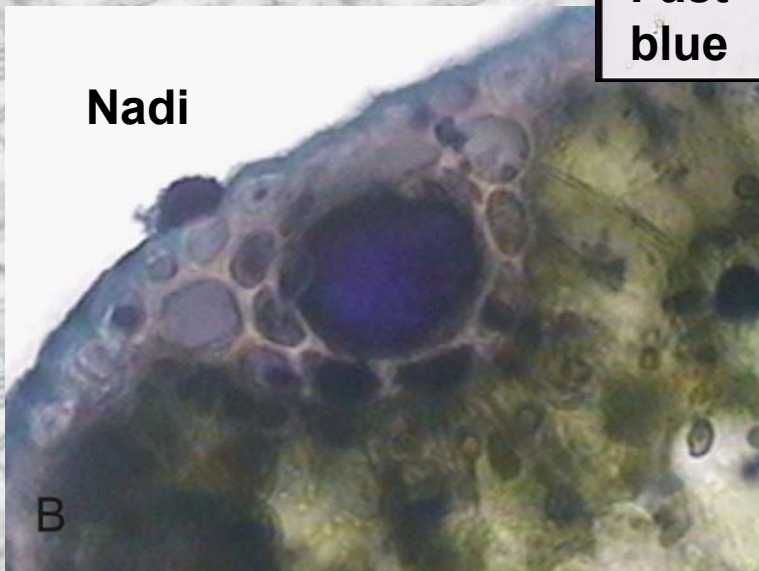
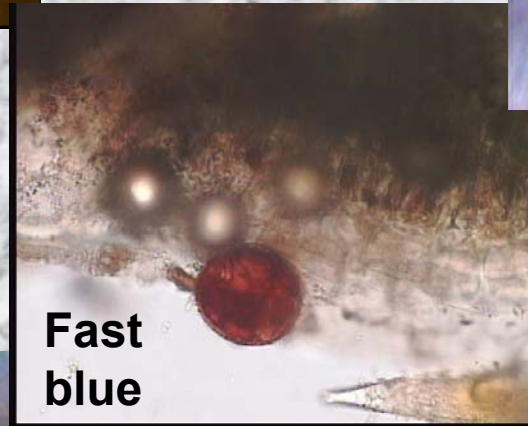
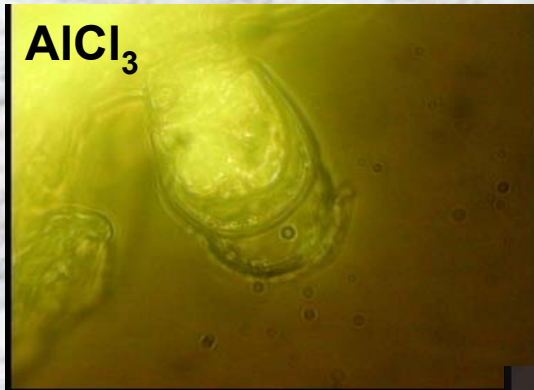
Ιστοχημεία

- Παράγεται χρώμα το οποίο είναι αποτέλεσμα χημικής αντίδρασης μεταξύ του χρησιμοποιούμενου αντιδραστηρίου και της ουσίας που επιθυμούμε να εντοπίσουμε.
- Δεν είναι πάντα ευδιάκριτη η διαφορά μεταξύ κοινών χρωστικών και ιστοχημικών.
- Το αποτέλεσμα πολλές φορές είναι ορατό με το μικροσκόπιο φθορισμού.

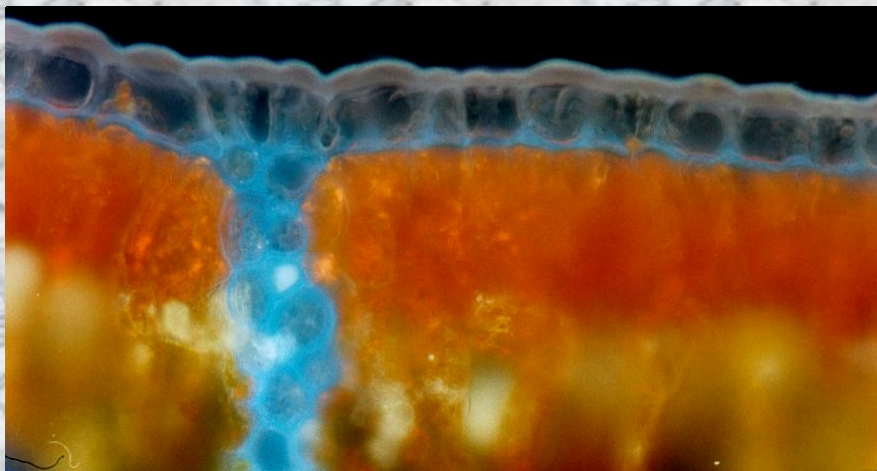
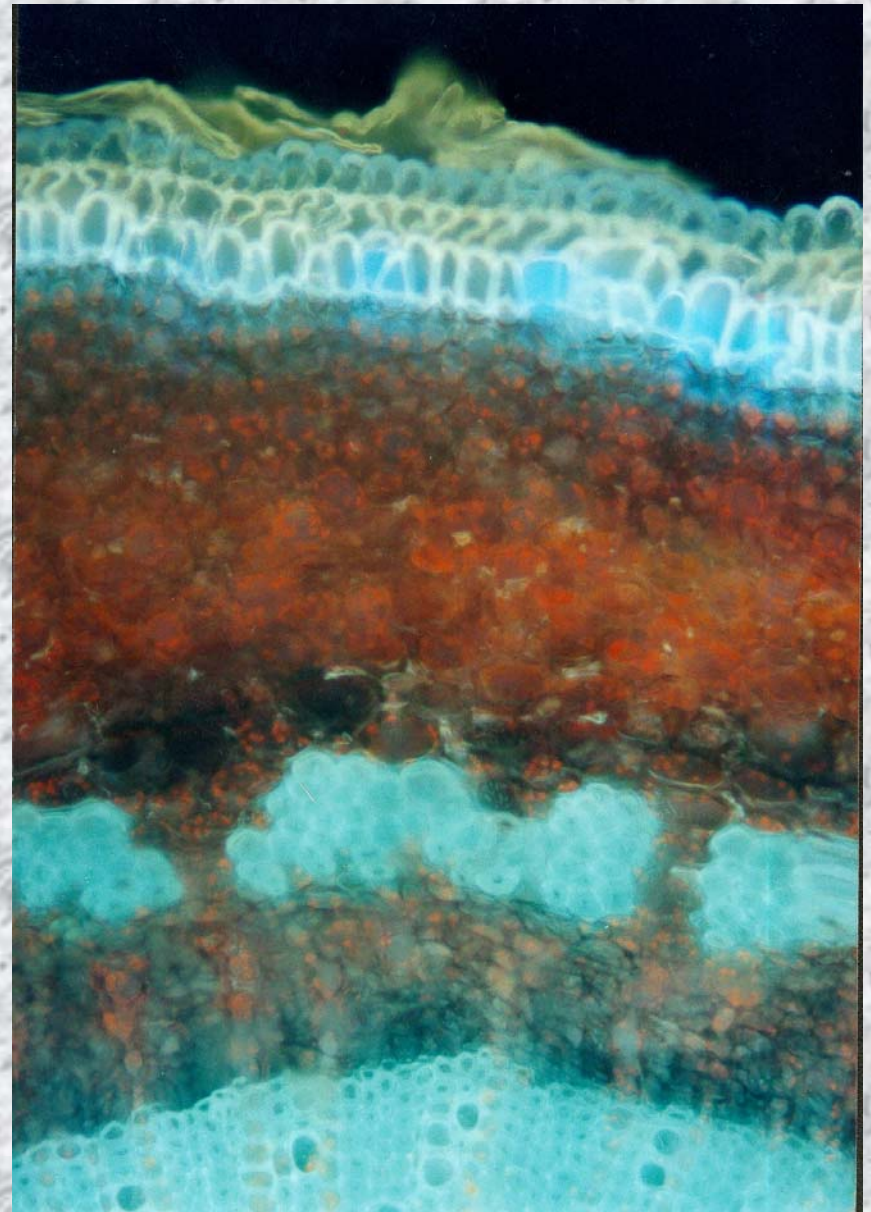
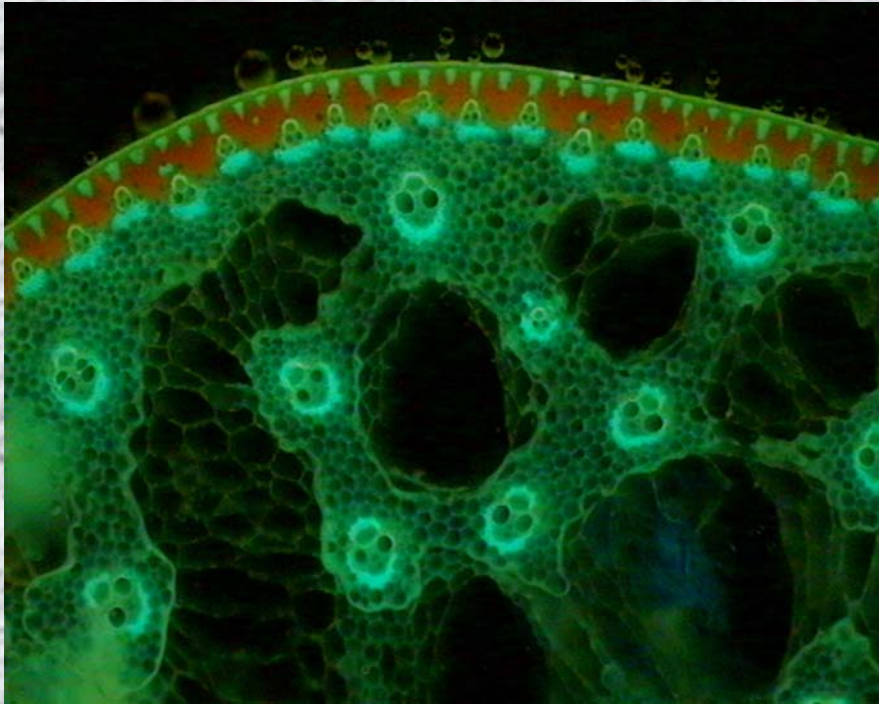
Παραδείγματα ιστοχημείας



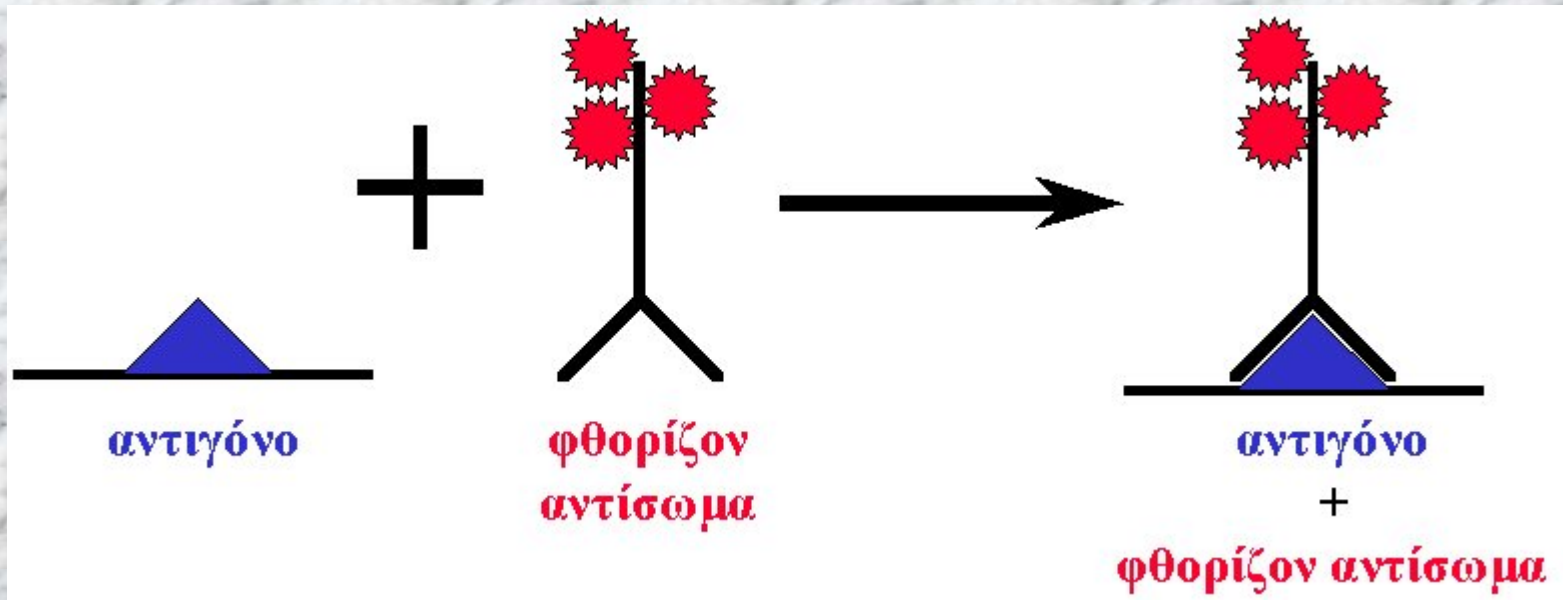
Παραδείγματα
ιστοχημείας



Μικροσκόπιο φθορισμού

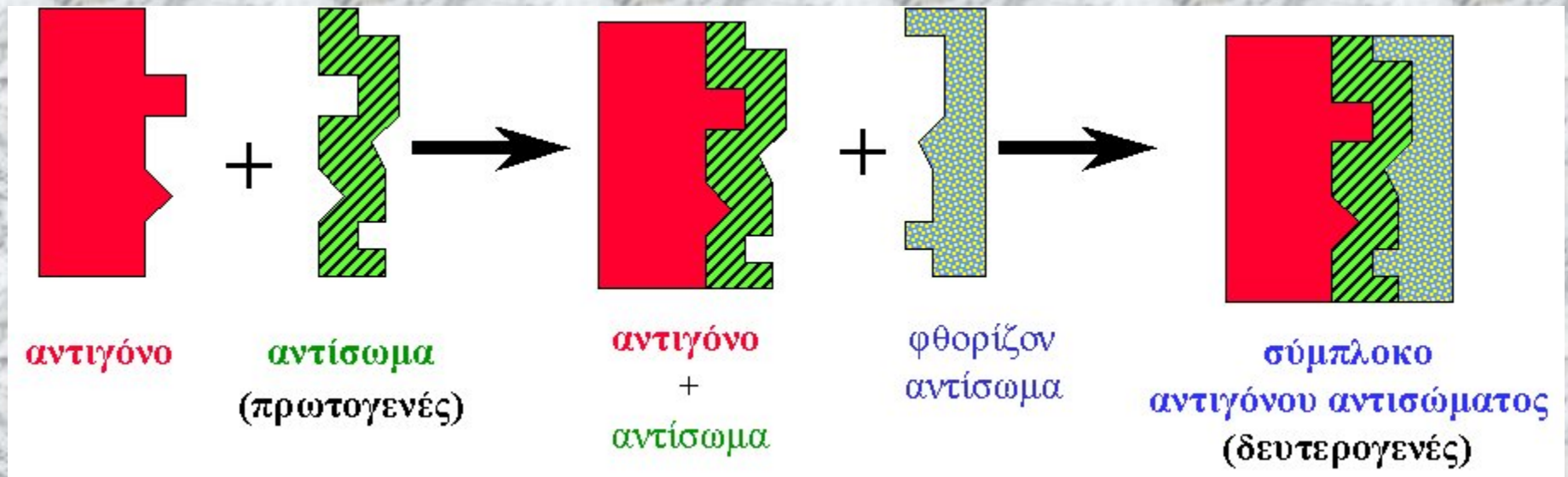


Ανοσοεντοπισμός - ανοσοφθορισμός



Ανοσοφθορισμός μέθοδος sandwich

(Πού να το φανταζόταν ο Λόρδος!!!)



Μικροφασματοφωτομετρία

- Το παρασκεύασμα ή ορισμένη περιοχή του, φωτίζεται με συγκεκριμένο μήκος κύματος ενώ το φασματοφωτόμετρο που βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά, μετράει τις χαρακτηριστικές του φωτός που το διαπερνούν.

Οι δυο τύποι ηλεκτρονικών μικροσκοπίων που έχουν επικρατήσει

- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (ΗΜΔ)
(Transmission Electron Microscope, TEM).
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΗΜΣ)
(Scanning electron microscope, SEM)

Μερικές παραλλαγές των ΗΜ

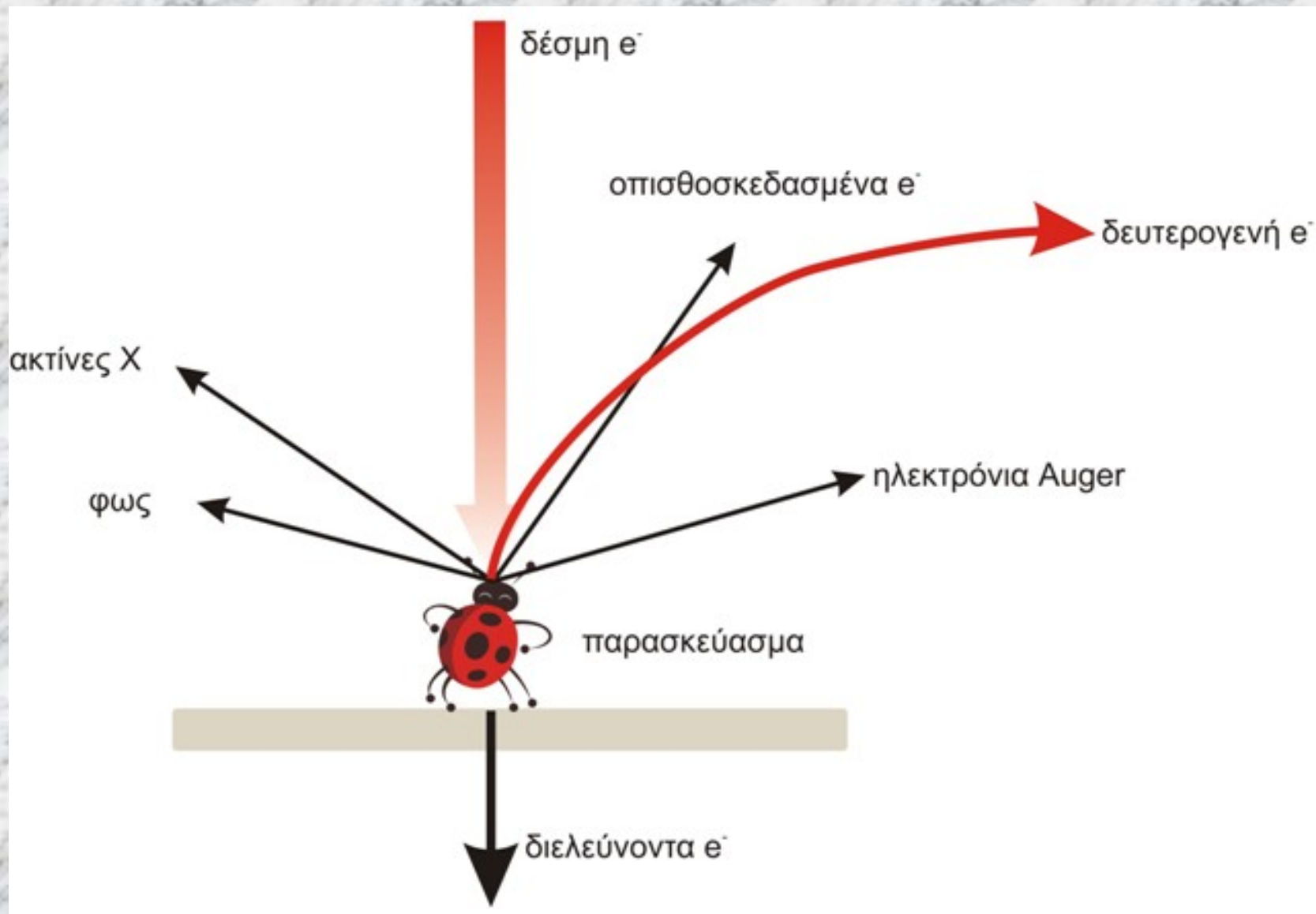
- Μικροσκόπιο σάρωσης μεταβλητού κενού
- Περιβαλλοντικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

Μερικά πιο ειδικά μικροσκόπια

(δύσκολο ακόμα και να μεταφραστούν στα Ελληνικά!)

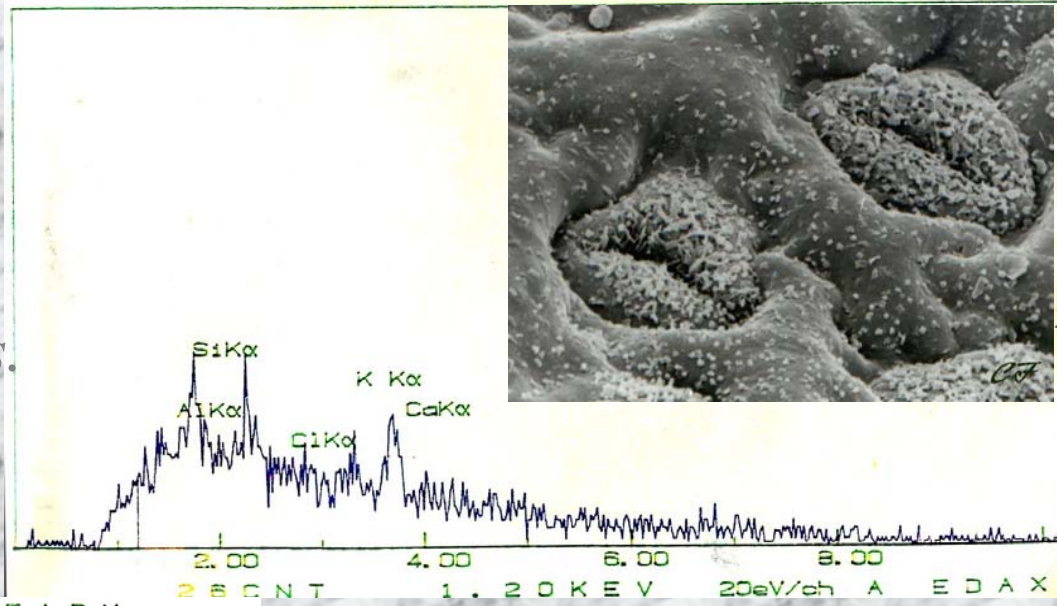
- 3-D Electron Beam (Roughness Analyzing Microscope)
- FIB, Focused Ion Beam, and Dual Beam
- FE SEM - Field Emission Scanning Electron Microscope
- Transmission Electron Aberration-corrected Microscope

Τι συμβαίνει στα ηλεκτρόνια όταν χτυπούν το παρασκεύασμα

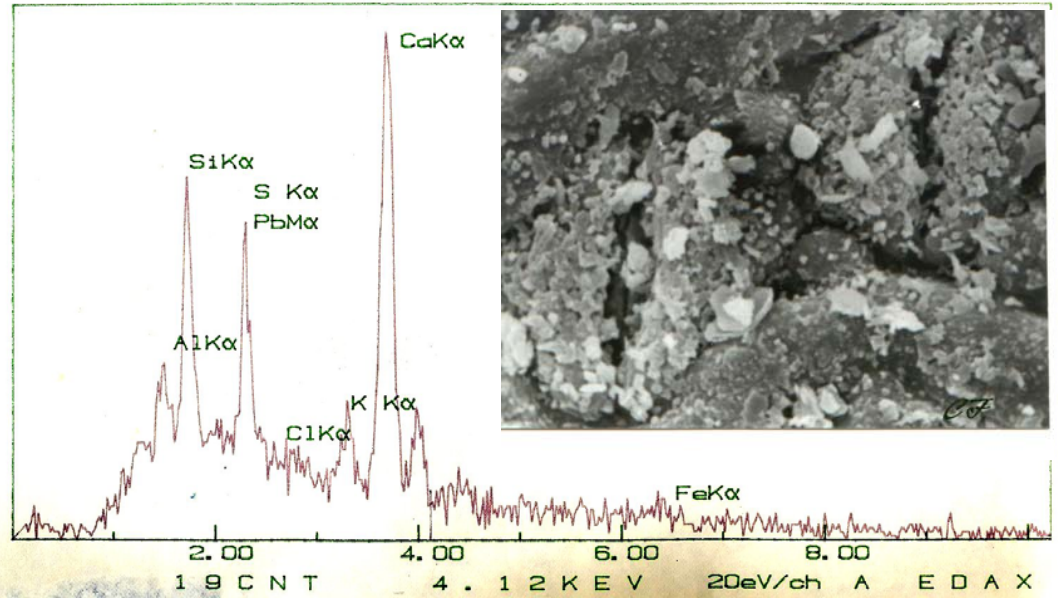


08-JAN-88 17.58.05 EDAX READY
 RATE = 34CPS TIME = 200LSEC
 FS = 200CNT PRST = OFF
 A = L. nobilis clean low

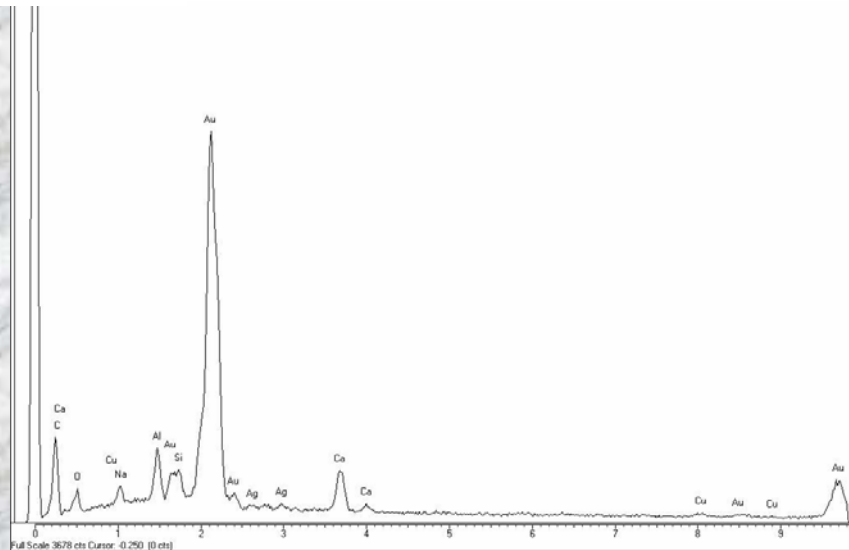
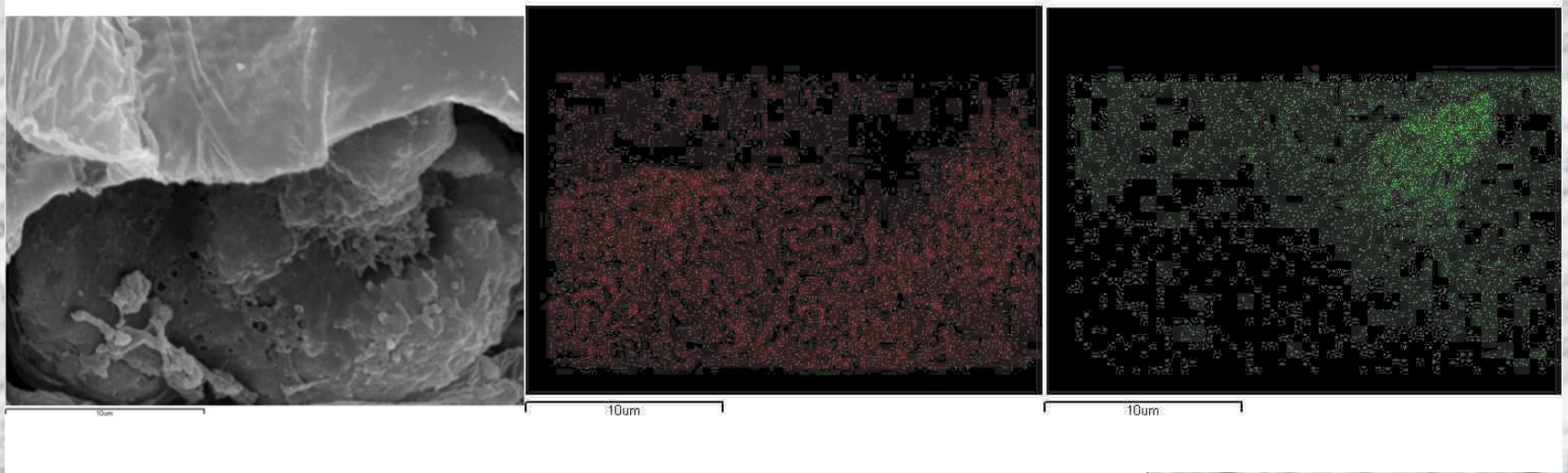
Εφαρμογή της μικροανάλυσης με ακτίνες X στη μελέτη της σωματιδιακής ρύπανσης στα φύλλα του φυτού *Laurus nobilis*.



08-JAN-88 16.16.39 EDAX READY
 RATE = 30CPS TIME = 200LSEC
 FS = 203CNT PRST = OFF
 A = L. nobilis. POL. LOW.



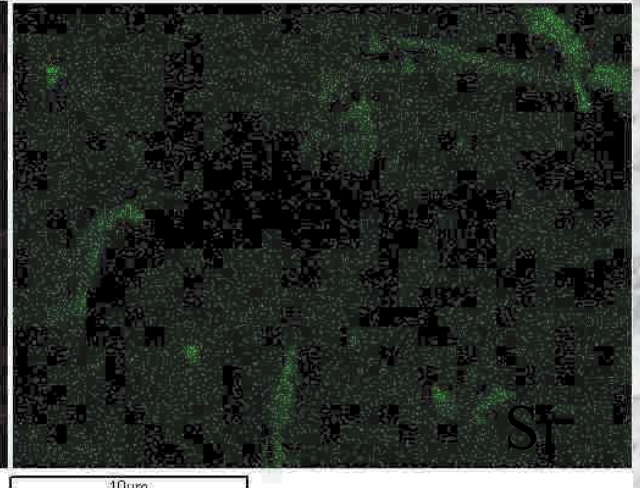
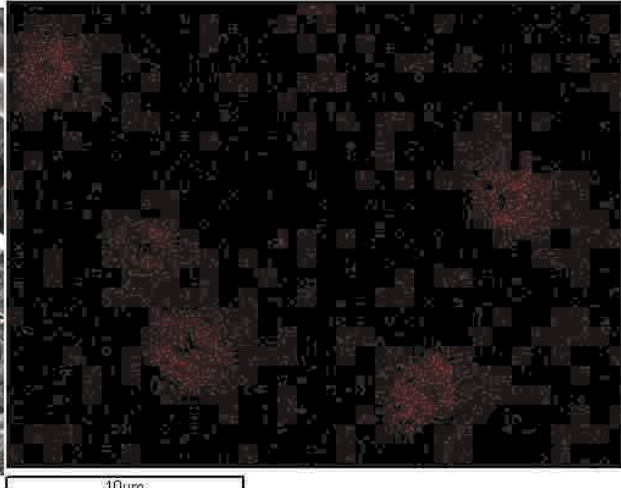
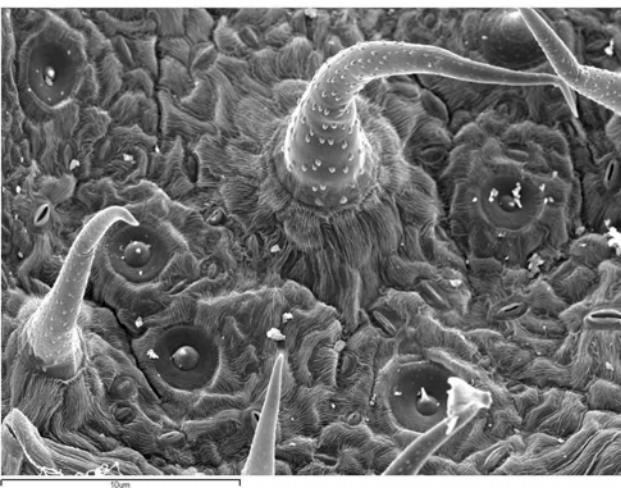
Ιδιοβλάστης σε φύλλο συκιάς. Κόκκινο – Ca, πράσινο - Si



Τρίχες και ιδιοβλάστες στην κάτω επιφάνεια
του φύλλου της συκιάς.

Ιδιοβλάστες – Ca

Τρίχες - Si



Ανάλυση (χημική) με τα ΗΜ

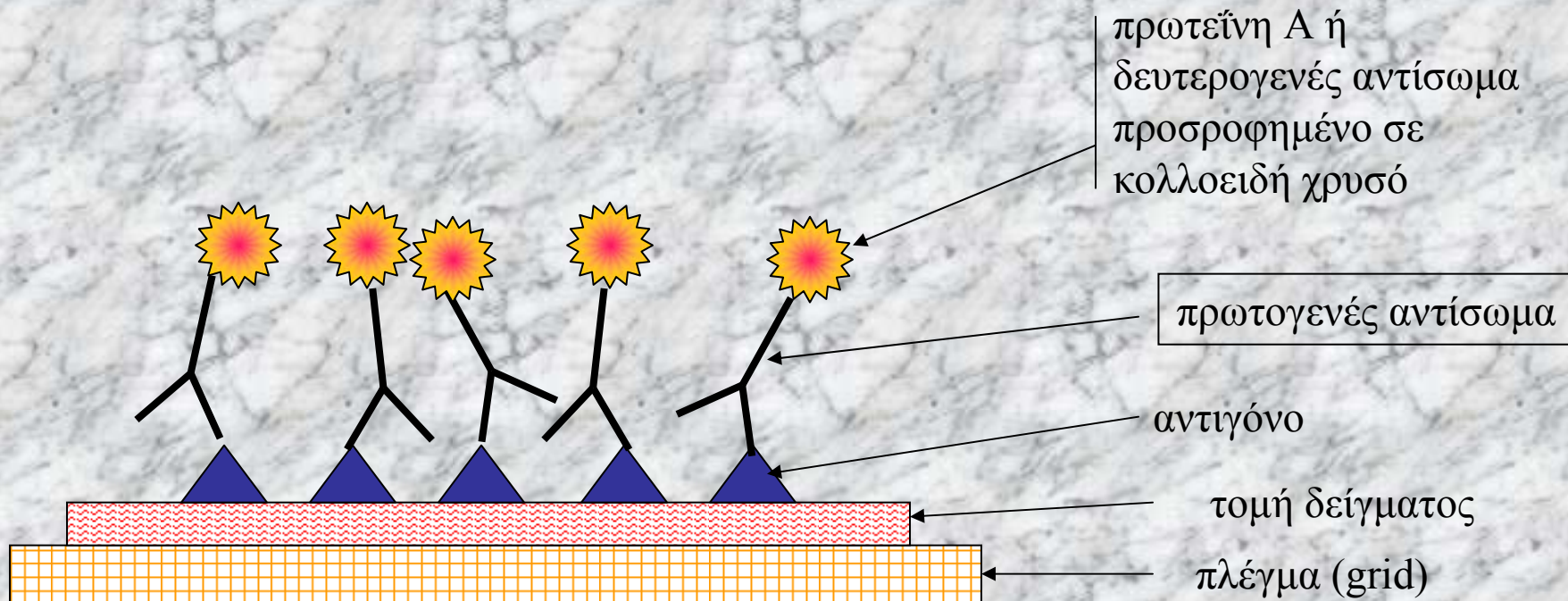
Μικροανάλυση με ακτίνες Χ

- EDX Energy Dispersive X-ray
Microanalysis
- WDX Wavelength Dispersive X-ray
Detectors
- X-Ray Fluorescence (XRF)

Ανοσοσθήμανση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

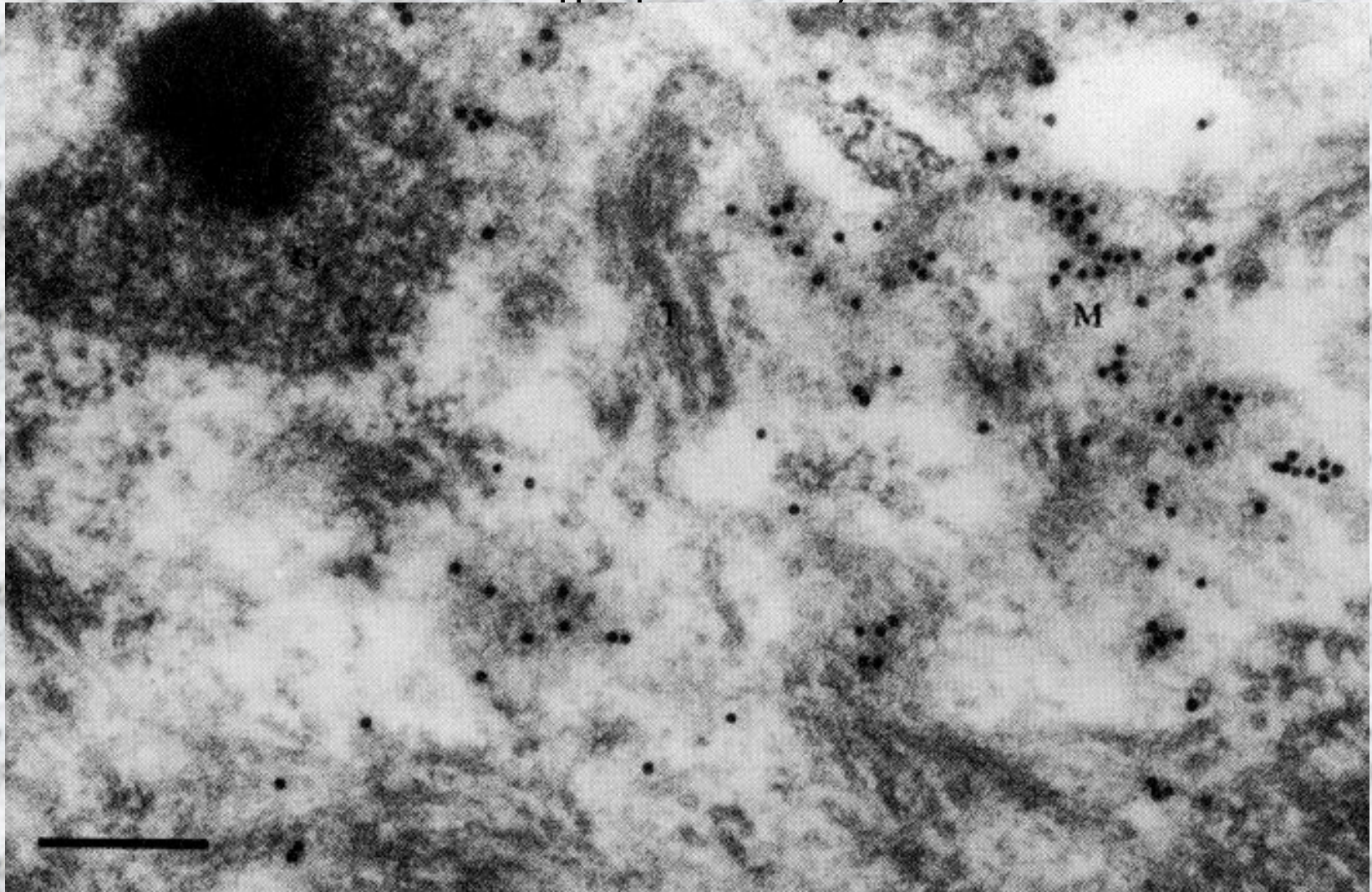
Η πιο συνηθισμένη είναι με το ΗΜΔ, γίνεται όμως και με το ΗΜΣ.

Η απλή ανοσοσθήμανση με κολλοειδή χρυσό

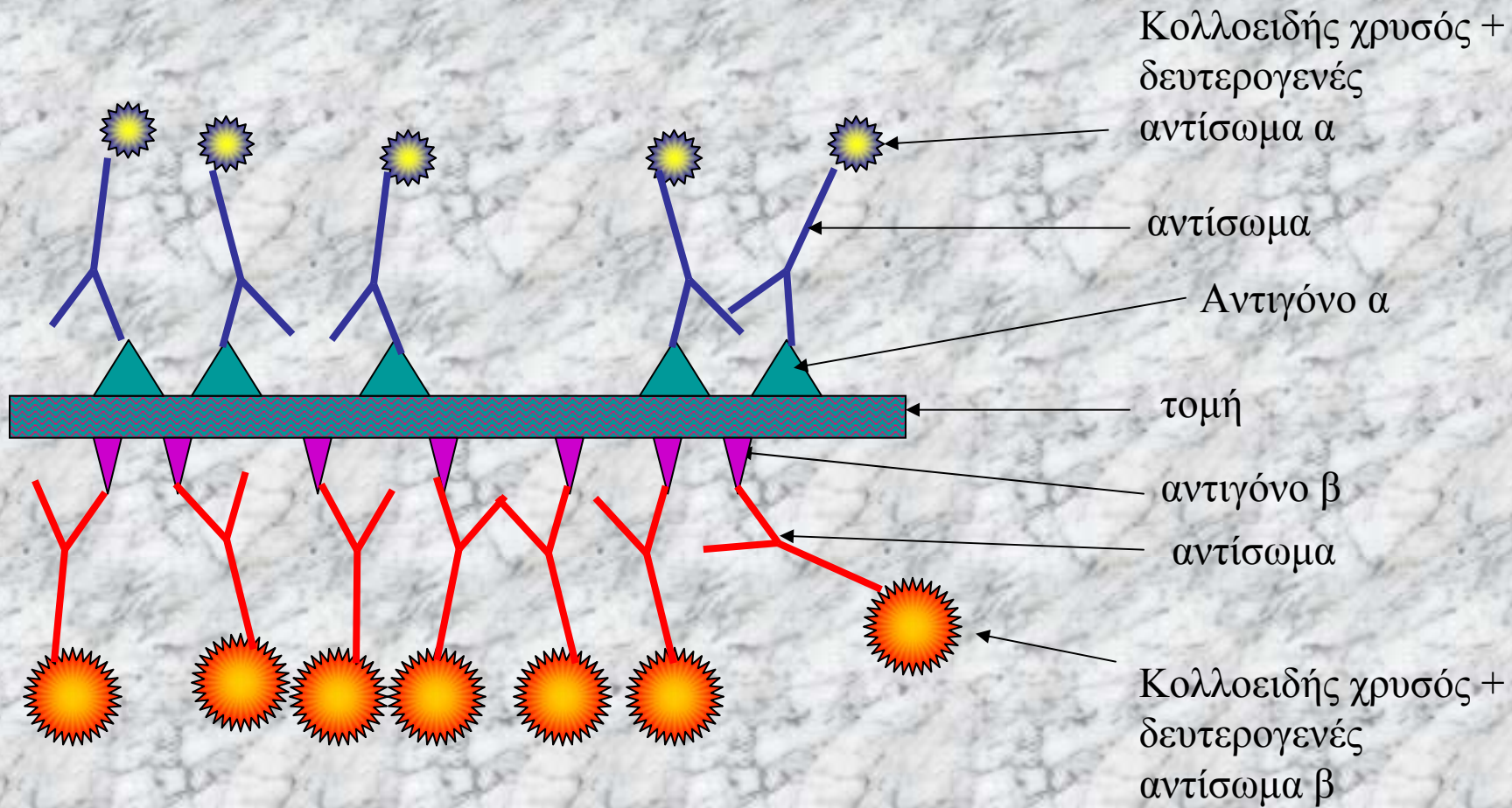


Ανοσοσήμανση πρωτεΐνης ιού σε φυτικά κύτταρα

(ιός PYFV σε κύτταρα δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος
αγριομαϊντανού)



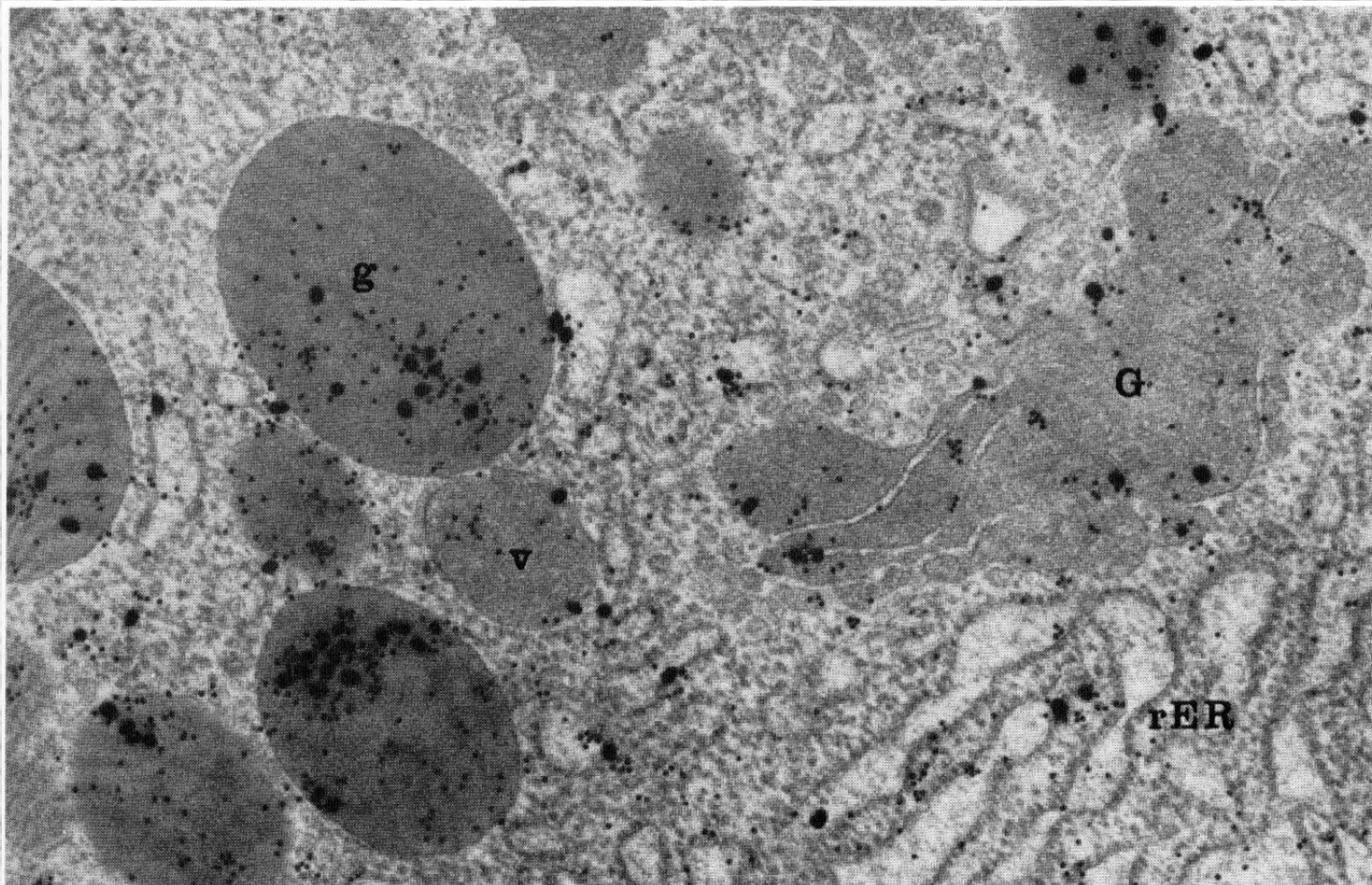
Διπλή ανοσοσήμενση με κολλοειδή χρυσό



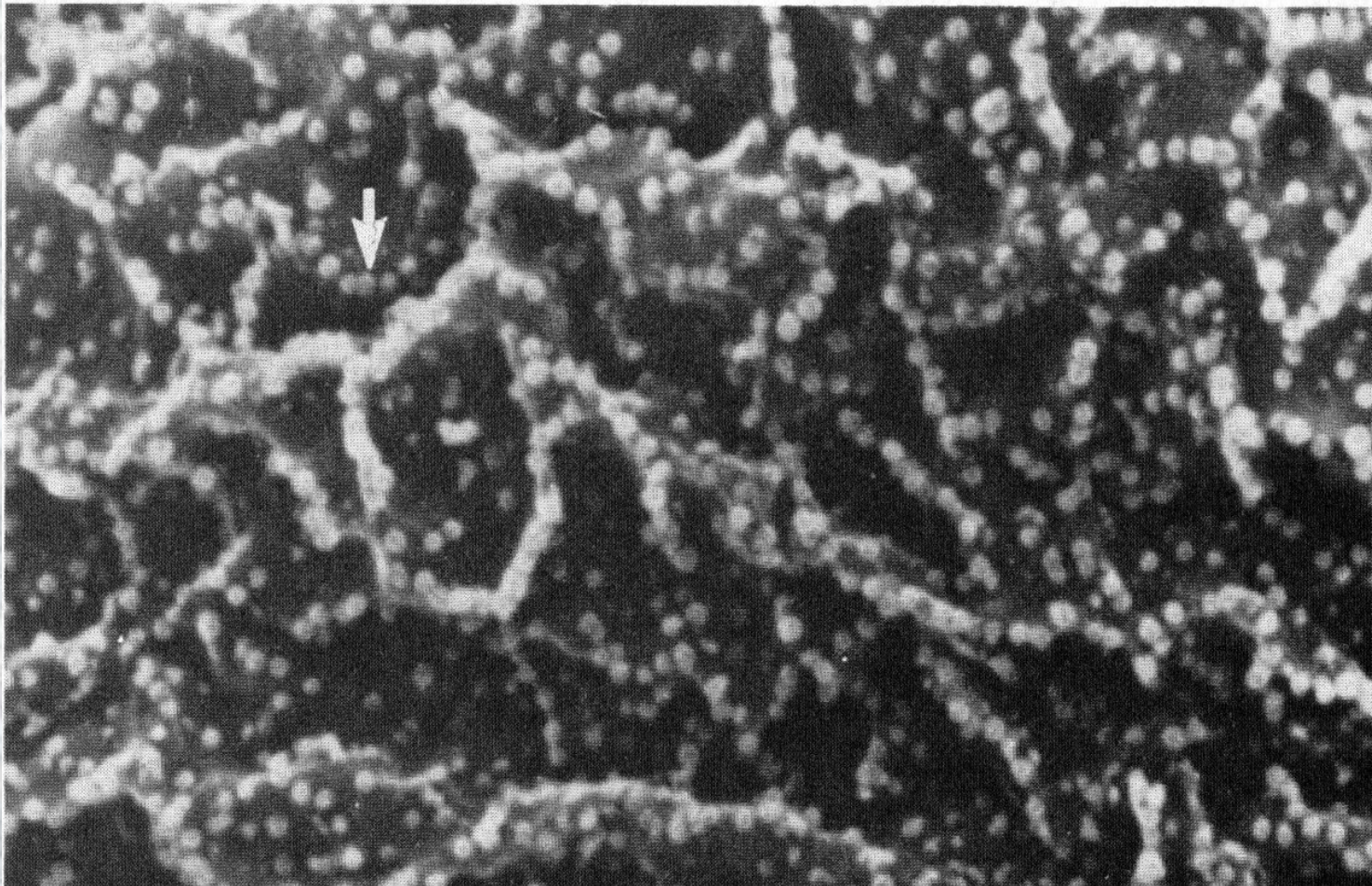
Διπλή ανοσοσήμανση με κολλοειδή χρυσό δυο μεγεθών σε κύτταρα
του παγκρέατος

Μεγάλα σωματίδια – καρβοξυτεπτιδάση A

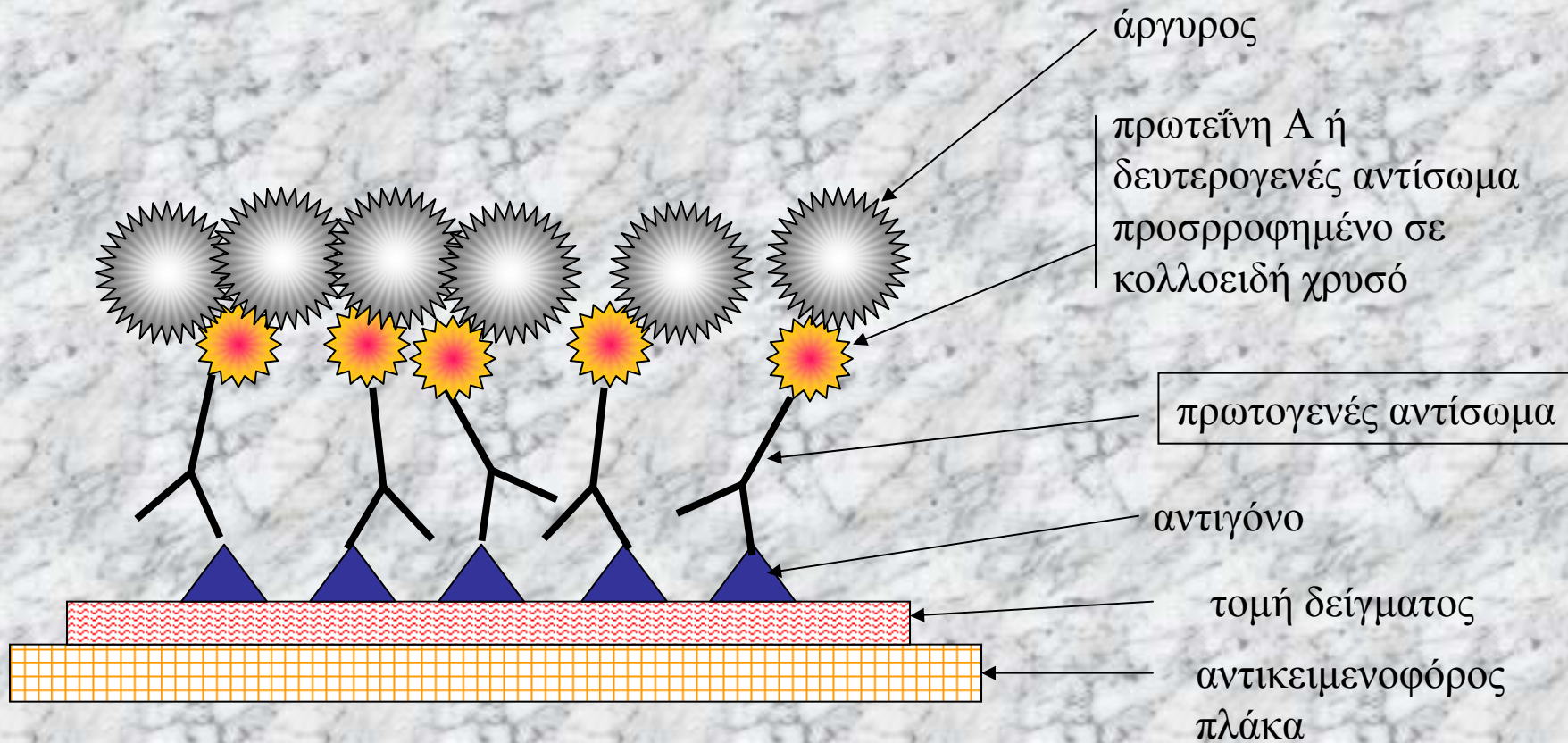
Μικρά σωματίδια – καρβοξυτεπτιδάση B



Ανοσοσήμανση στο ΗΜΣ με κολλοειδή χρυσό ή σφαιρίδια latex προσροφημένα με αντιγόνο.



Στο οπτικό μικροσκόπιο γίνεται ανοσοεντοπισμός με κολλοειδή χρυσό, ο οποίος όμως επειδή είναι άορατος με το οπτικό μικροσκόπιο ακολουθεί ενίσχυση του σήματος με άργυρο.



Εντοπισμός φαινολικών με το σύμπλοκο λακκάσης – κολλοειδούς χρυσού

