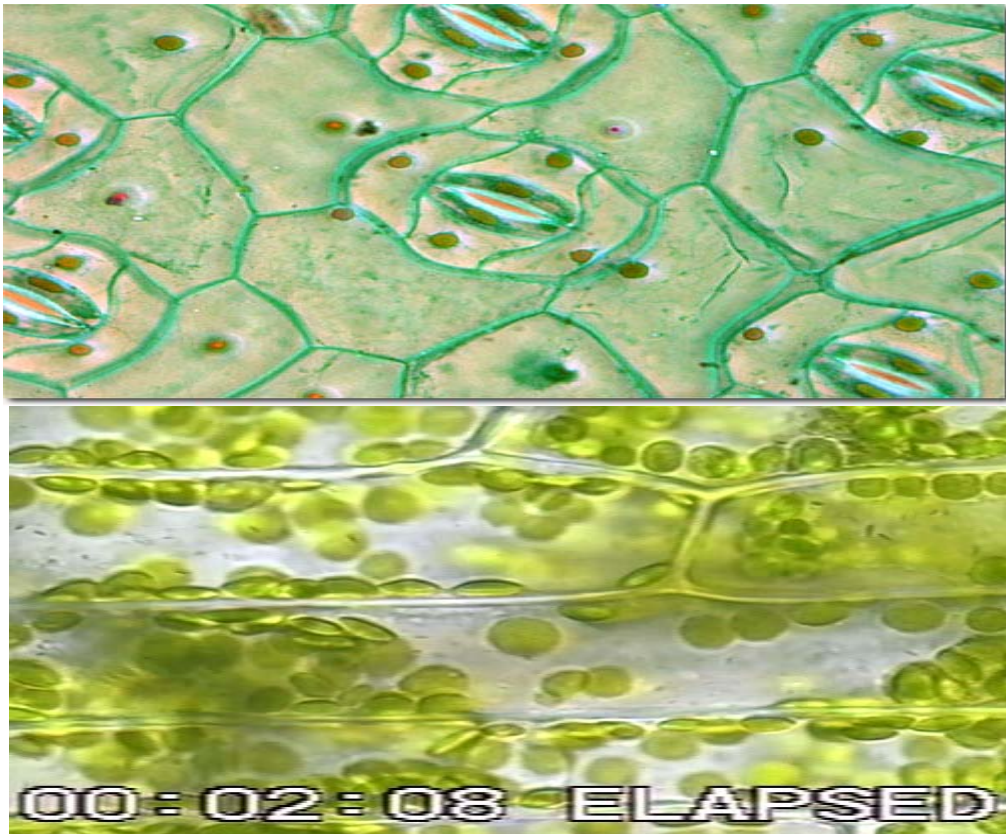


Α.Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΘΟΚΟΜΙΟΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ

***ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΜΕ
ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ***



ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΛΑΜΟΥ ΑΝΔΡΕΑΣ

ΕΙΣΗΓΗΣΗ ΠΑΝΕΛΛΑ ΑΝΘΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
2. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΩΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΟΠΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΩΝ.	9
3. ΟΠΤΙΚΑ (ΦΩΤΟΝΙΚΑ) ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ.	12
3.1. Κοινό σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο διελεύσεως.	14
3.2. Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου (dark field).	17
3.3. Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (phase contrast).	19
3.4. Πολωτικό μικροσκόπιο (polarised).	21
3.5. Μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast, Nomarski)	22
3.6. Μικροσκόπιο φθορισμού (fluorescent).	22
3.7. Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser. (Confocal Laser Scanning Microscope).	27
3.8. Ανεστραμμένα μικροσκόπια (διαφόρων τύπων, inverted).	29
3.9. Στερεοσκόπιο (οπτικό).	31
3.10. Βιντεομικροσκόπιο. (Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο).	32
3.11. Μικροσκόπια αντίκες.	33
3.12. Συντήρηση οπτικών μικροσκοπίων	34
4. ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ.	35
4.1. Ολόκληρα παρασκευάσματα - Διαφανοποίηση (whole mounts - clearing).	35
4.2. Σύνθλιψη (squash preparation).	36
4.3. Αποδιοργάνωση. (Maceration).	36
4.4. Κόψιμο τομών.	37
4.5. Τομές με το χέρι.	37
4.6. Τομές με ψυκτικό μικροτόμο και κρυοστάτη.	38
4.7. Με μικροτόμο παραφίνης.	39
5. ΧΡΩΣΕΙΣ.	40
5.1. Αρνητική χρώση.	40
5.2. Χρώση vital.	40
5.3. Χρώση τομών.	40
6. Μέτρηση μεγέθους αντικειμένων με το Οπτικό Μικροσκόπιο.	42
6.1. Προσδιορισμός μεγέθους με σύγκριση με κάποιο γνωστό μέγεθος ενσωματωμένο στο μικροσκόπιο.	43

6.2. Μέτρηση αντικειμένων με μικρομετρική κλίμακα τράπεζας μικροσκοπίου.	43
6.3. Μικροσκόπια για μέτρηση.	43
6.4. Οι δέκα εντολές στην οπτική μικροσκοπία.	45
7. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.	48
7.1 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Transmission Electron Microscope).	48
7.2. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ.	51
7.2α. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο ΗΜΔ.	51
7.2β. Τα πλέγματα (grids).	53
7.2γ. Αρνητική χρώση (Negative staining).	53
7.2δ. Σκίαση (Shadowing)	54
7.2ε. Αυτοραδιογραφία (Autoradiography)	55
7.3. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ, Scanning Electron Microscope, SEM).	56
7.4. Προετοιμασία παρασκευασμάτων για το ΗΜΣ.	58
7.5. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης -Σάρωσης (STEM).	60
8. Ακουστικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Acoustic Microscope).	60
9. Μικροσκόπιο Μαλακών Ακτινών Χ (Soft X-Ray Microscopy, SXRМ).	61
10. Μικροσκόπιο Σάρωσης Αισθητήρα (Scanning Probe Microscope, SPM).	62
11. Η ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.	64
11.1. Νουκλεϊνικά οξέα.	65
11.2. Υβριδισμός in situ με το οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.	66
11.3. ΒΑΚΤΗΡΙΑ.	67
11.4. ΜΥΚΗΤΕΣ.	68
11.5. ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΑ.	
11.6. ΟΙ ΙΟΙ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.	
12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή έχει σα σκοπό την ενημέρωση σχετικά με τη χρήση των διαφόρων τύπων μικροσκοπίων και μικροσκοπικών μεθόδων όπως αυτά έχουν διαμορφωθεί με τη πάροδο του χρόνου έτσι ώστε να είναι κατανοητό πότε μπορεί να χρησιμοποιήσει ο κάθε τύπος μικροσκοπίου αλλά και πώς θα μπορέσει να χρησιμοποιήσει στο μέγιστο των δυνατοτήτων του. Είναι γεγονός ότι ελάχιστοι είναι οι γεωπονικοί κλάδοι που δε χρησιμοποιούν κάποια στιγμή μικροσκόπια, είτε για έρευνα είτε για κάποιας μορφής διάγνωση ή έλεγχο γεωργικών προϊόντων.

Όπως θα σας γίνει σύντομα αντιληπτό, από αυτή την μελέτη, η μικροσκοπία σήμερα δεν είναι απλά το να δούμε κάτι μεγεθυσμένο πολλές φορές, όπως γινόταν μέχρι πριν από μερικά χρόνια. Τα σύγχρονα μικροσκόπια σε συνδυασμό με τη πρόοδο στην ηλεκτρονική, μικροηλεκτρονική και πληροφορική, έχουν ανοίξει εντελώς νέους ορίζοντες.

Μερικοί τομείς που σχετίζονται με τη Γεωργία ή τα Γεωργικά προϊόντα και δεν είναι πολύ γνωστά είναι για παράδειγμα η γρήγορη διάγνωση ιώσεων σε φυτά και ζώα, ο ποιοτικός έλεγχος γεωργικών προϊόντων όπως κρεατοσκευασμάτων, γαλακτοκομικών (τυριά, βούτυρα κλπ.), ζωικών και φυτικών ινών ή ακόμα και η ανίχνευση σε ιστούς, σκευάσματα ή γεωργικά προϊόντα, διαφόρων χημικών στοιχείων με μικροανάλυση με ακτίνες Χ. Σύγχρονες μέθοδοι μας δίνουν τη δυνατότητα της παρακολούθησης ακόμα και μεγαλομορίων μέσα σε ζωντανά κύτταρα με το Οπτικό Μικροσκόπιο. Στο μοριακό επίπεδο είναι δυνατή η παρατήρηση νουκλεϊνικών οξέων (DNA και RNA), πρωτεϊνών ή ακόμα και γονιδίων με τα σύγχρονα μικροσκόπια. Αυτοί είναι μερικοί από τους τομείς στους οποίους θα αναφερθούμε.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γνωστό, ότι όσο πιο αξιόπιστες είναι οι απαντήσεις στα επιστημονικά ερωτήματα που απασχολούν την ανθρώπινη νόηση , τόσο περισσότεροι και πιο συμπληρωματικοί είναι οι δρόμοι που ακολουθούνται για τη επίλυση τους.

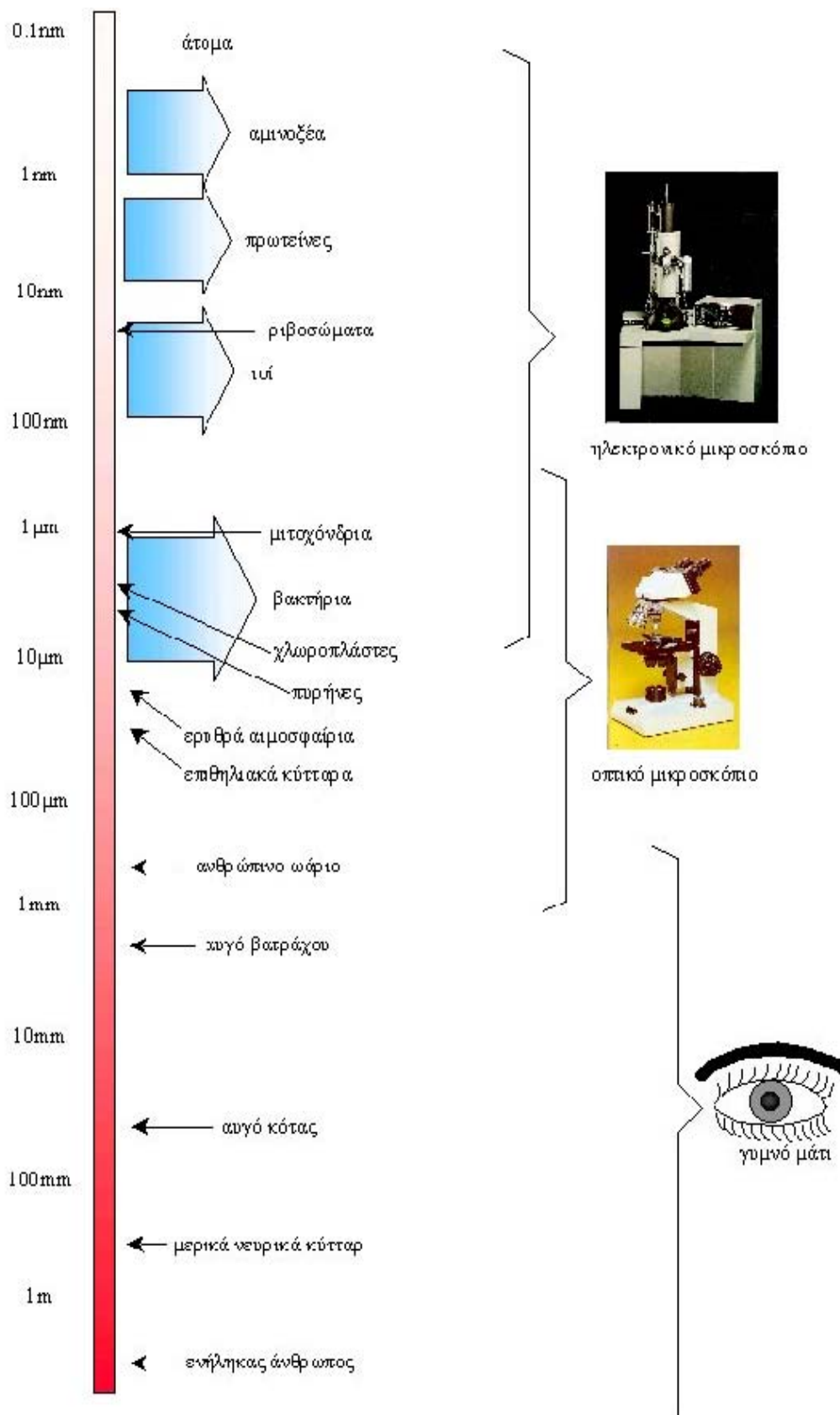
Στις μέρες μας οι μεθοδολογίες πειραματικής προσέγγισης των βιολογικών προβλημάτων είναι πραγματικά πολυάριθμες και από απόψεως ποικιλίας καλύπτουν ένα ευρύτατο φάσμα τεχνικών. Παραδοσιακά και χάριν ευκολίας συνεχίζουν να διακρίνονται σε μακροσκοπικές ,σε μικροσκοπικές και σε βιοχημικές και είναι αυταπόδεικτο, ότι αν μας έλειπε μία οποιαδήποτε από τις πιο πάνω κατηγορίες μεθοδολογιών οι γνώσεις μας σήμερα θα ήταν περισσότερο ελλιπείς και αποσπασματικές

Ειδικότερα για τις μικροσκοπικές μεθοδολογίες, οι οποίες περιλαμβάνουν κάθε τεχνική που μπορεί να δημιουργήσει εικόνα του πειραματικού υλικού με διακριτική ικανότητα υψηλότερη από αυτήν του ανθρώπινου ματιού, η πιο πάνω διαπίστωση αποκτάει μεγαλύτερη σημασία. Από τον 17 αιώνα , που μπήκε επίσημα στην Βιολογία το πρώτο οπτικό μικροσκόπιο, μέχρι το σήμερα των πολυδύναμων οπτικών και ηλεκτρονικών μικροσκοπιών, αυτό δεν περιλαμβάνει μόνο τον βαθμό κατανόησης του ορατού βιολογικού κόσμου, άλλα και την ανακάλυψη ενός πολυπληθέστερου και εξίσου εντυπωσιακού αόρατου κόσμου των μικροοργανισμών.

Αν επιχειρούσαμε να αξιολογήσουμε τη συμβολή της μικροσκοπίας στην πρόοδο των βιολογικών επιστήμων, θα μπορούσαμε ενδεικτικά να ανατρέξουμε σε όσα έχουν γίνει κτήμα μας και αφορούν, τη μορφολογία κάθε είδους οργανισμών, την υποκυτταρική δομή και οργάνωση, τη δόμη μεμονωμένων βιολογικών μακρομορίων, τον υποκυτταρικό εντοπισμό χημικών στοιχείων και μορίων, τη σύνδεση υποκυτταρικής δομής και λειτουργίας και την δυναμική παρακολούθηση κυτταρικών λειτουργιών, για να διαπιστώσουμε ότι δύσκολα θα βρούμε τομέα βιολογικών επιστημών που να μην αξιοποιεί κάποια μορφή μικροσκοπίας.

Η μικροσκοπία θεμελιώνεται στη *ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ* , ή οποία μελετά τα δομικά στοιχεία των οργανισμών στη μακροσκοπική, μικροσκοπική και υπομικροσκοπική τους διάσταση, που αντίστοιχα διακρίνονται με γυμνό μάτι, με το οπτικό μικροσκόπιο, με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και άλλες μικροκυματικές ακτινοβολίες. Η σχηματική παράσταση που βλέπουμε στην εικόνα απεικονίζει σε λογαριθμική κλίμακα την ακολουθία των βιολογικών μεγεθών σε συσχετισμό με τα αντίστοιχα μέσα παρατηρήσεως.

Από τα δεδομένα της εικόνας καταγράφονται διάφορα βιολογικά αντικείμενα σε αντιπαραβολή με τα όρια της διακριτικής ικανότητας των μέσων παρατηρήσεως.



Εικόνα 1.1 Λογαριθμική κλίμακα των βιολογικών δομών σε αντιστοιχία με τη διακριτική ικανότητα των μέσων παρατήρησης.

Εδώ και αρκετά χρόνια οι περισσότεροι επιστήμονες έχουν αποδεχτεί την κατάταξη των έμβιων όντων σε πέντε Βασίλεια, αυτά είναι:

- Monera (Μονήρη = βακτήρια και κυανοφύκη),
- Protocista ή Protista (τα πρώτιστα, είναι απλοί ευκαρυωτικοί οργανισμοί που δεν περιλαμβάνονται στις άλλες ομάδες),
- Fungi (Μύκητες),
- Plantae (Φυτά) και
- Animalia (Ζώα).

Οι ιοί εξετάζονται, σε μια ιδιόμορφη κατηγορία όντων καθώς επίσης τα Viroids, και τα Prions, που είναι ακόμα πιο απλές μορφές ζωής και από τους ιούς. Τα μυκοπλάσματα, που αποτελούν ενδιάμεση μορφή ζωής ανάμεσα στους ιούς και τα βακτήρια, κατατάσσονται στα τελευταία.

Μια πιο προσεκτική μελέτη της υπομικροσκοπικής και μοριακής δομής, καθώς και η μελέτη των διαφόρων μεταβολικών μηχανισμών όπως π.χ. η πρωτεϊνοσύνθεση, η αντιγραφή και ο διπλασιασμός του DNA, ή δομών όπως τα ριβοσώματα, τα μαστίγια κλπ. μας δείχνουν την ομοιομορφία και κοινή προέλευση των οργανισμών. Οι διαφορές που παρατηρούνται στη δομή, μορφή και λειτουργία των οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, έχουν προκύψει από τις διαφορετικές φυσιολογικές ανάγκες των οργανισμών αυτών (π.χ. αυτότροφοι -ετερότροφοι οργανισμοί) ή τη διαφορετική αντιμετώπιση κοινών προβλημάτων όπως για παράδειγμα η κίνηση, η ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης, η άμυνα, η εύρεση τροφής κλπ. Οι διαφορές αυτές πολλές φορές φτάνουν μέχρι και το υπομικροσκοπικό και μοριακό επίπεδο.

Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι τα κοινά οργανίδια και δομές που έχουν τα φυτικά και τα ζωικά κύτταρα (π.χ. μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, Golgi κλπ.) είναι πολύ παρόμοια μορφολογικά και λειτουργικά και στις δυο κατηγορίες κυττάρων.

Η πιο σημαντική διαφορά ανάμεσα στα φυτά και τα ζώα και που από αυτήν απορρέουν και οι περισσότερες μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές, είναι ο τρόπος θρέψης τους. Σε γενικές γραμμές τα φυτά είναι κατά κανόνα αυτότροφα και τα ζώα ετερότροφα. Αυτό με λίγα λόγια σημαίνει ότι τα φυτά μπορούν να συνθέσουν μόνα τους οργανικές ενώσεις από απλές ανόργανες, όπως το CO₂ το νερό και τα ανόργανα άλατα και με πηγή ενέργειας κυρίως το ηλιακό φως, ενώ τα ζώα δεν έχουν αυτήν την ικανότητα και τρέφονται καταναλώνοντας έτοιμες οργανικές ουσίες που βρίσκονται στο σώμα άλλων ζώων ή φυτών ή παράγονται από αυτά. Λόγω αυτής της διαφοράς οι δυο κατηγορίες οργανισμών έχουν εντελώς διαφορετικούς μηχανισμούς για να βρίσκουν την τροφή τους αλλά και να προστατεύονται από τους διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Τα μεν φυτά μπορούν

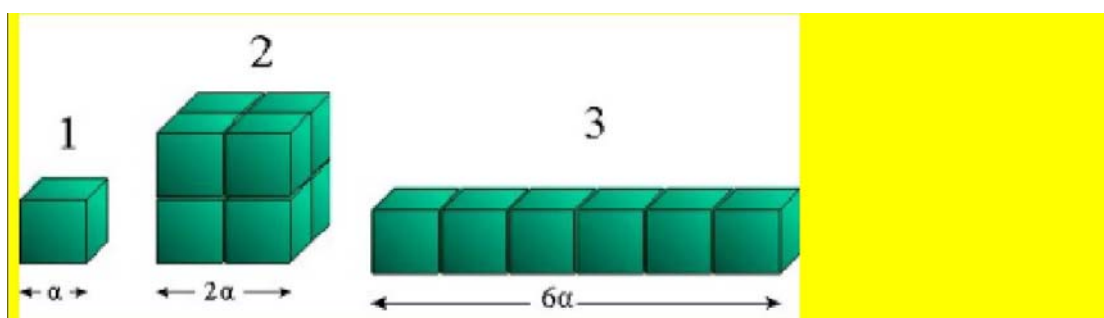
να παίρνουν όλα τα συστατικά που χρειάζονται για τη διαβίωση και ανάπτυξή τους από το άμεσο περιβάλλον τους χωρίς να χρειάζεται να μετακινηθούν (εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων) τα δε ζώα πρέπει να μπορούν να κινηθούν για να φτάσουν στη τροφή τους είτε αυτή είναι κάποιο φυτό (φυτοφάγα ζώα) είτε είναι κάποιο άλλο ζώο (σαρκοφάγα ζώα). Έτσι τα φυτά έχουν προσαρμοστεί να αντιμετωπίζουν τα προβλήματα της στατικής ζωής με κυριότερα τη θρέψη, την οικονομία νερού και τη στήριξη. Τα ζώα θα πρέπει να κινηθούν στο περιβάλλον τους για να εξασφαλίσουν τη τροφή τους, το νερό την προστασία τους κλπ. Εξαιρεση αποτελούν ορισμένες ακίνητες, αποκλειστικά υδρόβιες μορφές, όπου κινείται το υγρό μέσον που τα περιβάλλει, όπως είναι για παράδειγμα οι θαλάσσιες ανεμώνες.

Τα περισσότερα κύτταρα έχουν μικροσκοπικό μέγεθος ενώ από κύτταρο σε κύτταρο μπορεί να υπάρχει μεγάλη διαφορά μεγέθους. Υπάρχουν για παράδειγμα βακτήρια που είναι ορατά μόνο με ένα καλό οπτικό μικροσκόπιο ενώ κάποια εξειδικευμένα ζωικά κύτταρα είναι αρκετά μεγάλα για να είναι ορατά με γυμνό μάτι. Για παράδειγμα το ανθρώπινο ωάριο έχει περίπου το μέγεθος της τελείας στο τέλος αυτής της πρότασης. Τα μεγαλύτερα κύτταρα είναι τα αυγά των πουλιών, δεν μπορούν όμως να θεωρηθούν σαν τυπικά κύτταρα επειδή σχεδόν ολόκληρη η μάζα τους αποτελείται από αποταμιευτικές ουσίες που δεν αποτελούν μέρος των λειτουργικών δομών των κυττάρων.

Το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων σχετίζονται με τη λειτουργία τους. Κάποια κύτταρα όπως η αμοιβάδα και τα λευκά αιμοσφαίρια μπορούν να αλλάζουν το σχήμα τους κατά τη μετακίνησή τους. Τα σπερματοζωάρια έχουν μακριές ουρές που μοιάζουν με μαστίγια, και χρησιμεύουν για τη μετακίνησή τους ενώ τα νευρικά κύτταρα διαθέτουν μακριές προεξοχές που τους επιτρέπουν να μεταδίδουν μηνύματα σε μεγάλες αποστάσεις μέσα στο σώμα. Κάποιες τέτοιες προεκβολές νευρικών κυττάρων του ανθρώπινου σώματος μπορεί να φτάνουν το 1m μήκος. Κάποια άλλα κύτταρα, όπως είναι τα επιθηλιακά, μπορεί να έχουν σχήμα παραλληλεπίπεδου και να είναι τοποθετημένα το ένα δίπλα στο άλλο όπως τα τούβλα ενός κτιρίου.

Γιατί όμως τα κύτταρα να είναι τόσο μικρά; Αν σκεφτούμε πόσες διεργασίες πρέπει να κάνει ένα κύτταρο για να επιζήσει και να αναπτυχθεί, αυτό μπορεί να μας βοηθήσει να δώσουμε την απάντηση. Ένα κύτταρο πρέπει να προσλάβει τροφή και άλλα συστατικά μέσω της κυτταρικής του μεμβράνης. Μόλις αυτά τα συστατικά εισέλθουν στο κύτταρο, πρέπει να μετακινηθούν στη σωστή τοποθεσία μέσα στο κύτταρο όπου και θα μετατραπούν σε κάποιες άλλες ουσίες. Οι ουσίες αυτές, με τη σειρά τους, πρέπει να μετακινηθούν μέσα στο κύτταρο για να χρησιμοποιηθούν. Επιπλέον, ορισμένα συστατικά που παράγει ένα κύτταρο, είτε πρέπει να απομακρυνθούν από αυτό πριν τη συσσώρευσή τους σε τοξικό επίπεδο, εφ' όσον αυτά είναι άχρηστα υποπροϊόντα κάποιων μεταβολικών αντιδράσεων, είτε να εκκριθούν από αυτό εφ' όσον πρόκειται για χρήσιμα προϊόντα (π.χ. πεπτικά ένζυμα, ορμόνες

κλπ.). Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, τα κύτταρα πρέπει ακόμα να εκκρίνουν συστατικά που θα χρησιμοποιηθούν από άλλα κύτταρα. Επειδή όμως τα κύτταρα είναι τόσο μικρά, οι αποστάσεις που πρέπει να διατρέξουν τα διάφορα μόρια είναι σχετικά μικρές, πράγμα που επιταχύνει πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Επιπλέον, αφού όλα τα συστατικά πρέπει να περάσουν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, όσο πιο μεγάλη επιφάνεια μεμβρανών διαθέτει το κύτταρο τόσο πιο γρήγορα τα διάφορα μόρια θα περάσουν μέσα από τη μεμβράνη. Αυτό σημαίνει ότι το μέγεθος κάθε κυττάρου έχει κάποιους περιορισμούς. Πολλές φορές το μέγεθος αυξάνεται μόνο ως προς τις δυο διαστάσεις ενώ η τρίτη διατηρείται πάντα περιορισμένη, όπως συμβαίνει στους νευρώνες στα ζώα και στα κολλεγχυματικά κύτταρα στα ανώτερα φυτά.



Εικόνα 1. Η σχέση S/V ελαττώνεται όσο αυξάνεται η πλευρά a .

Αν υποθέσουμε ότι ένα κύτταρο έχει σχήμα κύβου (Εικόνα 1), με πλευρά (a), όταν η πλευρά του γίνει ($2a$) η επιφάνειά του γίνεται $4a^2$ και ο όγκος του $8a^3$ με συνέπεια ο λόγος επιφάνειας / όγκο (S/V) να ελαττώνεται όσο αυξάνεται η πλευρά του κύβου. Η ελάττωση αυτή της επιφάνειας σε σχέση με τον όγκο βάζει ένα ανώτατο όριο στο μέγεθος του κυττάρου. Πάνω από αυτό το μέγεθος, με το ρυθμό με τον οποίο συνήθως μετακινούνται τα μόρια μέσα στο κύτταρο, δεν είναι δυνατόν να καλυφθούν οι ανάγκες του κυττάρου. Αυτό όμως δεν συμβαίνει στην περίπτωση (3), όπου το κύτταρο αυξάνεται μόνο ως προς τη μια του διάσταση.

Δομές όπως τα χρωμοσώματα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο κλπ. είναι κοινά στη πλειοψηφία των κυττάρων, παρ' όλα αυτά το σχήμα, η μορφή και τα συστατικά των κυττάρων εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Τα δομικά χαρακτηριστικά ενός κυττάρου είναι στενά συνδεδεμένα με τις λειτουργίες του.

2. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΩΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΟΠΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΩΝ.

Είναι αναπόφευκτο να μη γίνει μια σύντομη ιστορική αναδρομή σχετικά με τις διάφορες ανακαλύψεις που συμβάλλανε στην εξέλιξη των μικροσκοπίων. Το πότε κατασκευάστηκε ο πρώτος φακός και χρησιμοποιήθηκε σαν μεγεθυντική συσκευή είναι ένα μυστήριο. Φαίνεται όμως ότι δεν είναι τόσο παλιά εφεύρεση όπως αρχικά πιστεύαμε. Παρακάτω αναφέρονται μερικά ιστορικά δεδομένα που προέρχονται από διάφορα γραπτά κείμενα και μας δίνουν την εικόνα για το πώς διαμορφώθηκε, με την πάροδο των αιώνων, η οπτική θεωρία που έκανε δυνατή την κατασκευή των μικροσκοπίων.

- Ο περίφημος "Φακός Lanyard", ανακαλύφθηκε από τον Lanyard στο Nimrod (στον τάφο του Nimrod, στη Μεσοποταμία) και χρονολογείται από το 721 -705 π.Χ. Για πολλά χρόνια είχε θεωρηθεί σαν το πρώτο παράδειγμα επιπεδόκυρτου φακού. Σήμερα όμως πιστεύεται ότι αυτό το κομμάτι από γυαλί, ήταν μόνο για διακόσμηση και ότι οι φακοί είναι πιο πρόσφατα κατασκευάσματα.
- Τον 2ο π.Χ. αιώνα ο Κλαύδιος Πτολεμαίος περιγράφει ότι ένα κομμάτι ξύλο, φαίνεται λυγισμένο μέσα στο νερό και υπολόγισε με ακρίβεια 1/2 βαθμού τις γωνίες που σχηματίζονται ενώ υπολόγισε και το δείκτη διαθλάσεως του νερού.
- Τον 1ο π.Χ. αιώνα ο Σενέκας περιέγραψε ότι μια γυάλινη σφαίρα γεμάτη με νερό μεγεθύνει τα αντικείμενα. Συγκεκριμένα γράφει: "Γράμματα, όσο μικρά και δυσδιάκριτα και αν είναι, φαίνονται μεγεθυμένα και καθαρά μέσα από μια γυάλινη σφαίρα γεμάτη με νερό".
- 962 -1038 μ.Χ. Ο Άραβας Alhazen έγραψε την πρώτη του εργασία "Opticae Thesaurus" όπου όχι μόνο αναπτύσσει τις αρχές της Οπτικής, αλλά περιγράφει την ανατομία του ανθρώπινου ματιού και πώς ο φακός του ματιού εστιάζει μια εικόνα στον αμφιβληστροειδή χιτώνα.
- Το 1267 μ.Χ. ο Roger Bacon στο έργο του "Perspectiva" αναφέρει ότι μικρά αντικείμενα μπορούν να παρατηρηθούν μεγεθυμένα μέσα από ένα τμήμα γυάλινης σφαίρας.

Οι κινέζοι φορούσαν πολύχρωμα γυαλιά πριν από εκατοντάδες χρόνια αλλά απ' ότι φαίνεται, ήταν μόνο για κοσμητικούς λόγους. Η παλαιότερη αναφορά που γίνεται σχετικά με τη χρήση φακών για διευκόλυνση της όρασης είναι από τον Pliny the Elder, ότι το 23-79 μ.Χ ο Νέρωνας παρακολουθούσε τις μάχες των μονομάχων κοιτάζοντας μέσα από ένα σμαράγδι το οποίο είναι κοίλο και συγκεντρώνει τις φωτεινές ακτίνες. Η επόμενη όμως αναφορά για τη χρήση γυαλιών γίνεται δώδεκα αιώνες αργότερα περίπου το 1280 -1285 όταν

στην Φλωρεντία της Ιταλίας άρχισαν να διαδίδονται τα γυαλιά χωρίς όμως να γίνει ποτέ γνωστό ποιος ήταν και αν ήταν ένας ο εφευρέτης τους.

Η κατασκευή του μικροσκοπίου ήταν πια θέμα χρόνου. Πολλοί ήταν εκείνοι που ανεξάρτητα από άλλους, πειραματίστηκαν με τον συνδυασμό φακών. Ο Leeuwenhoek από πολλούς αναφέρεται ως ο εφευρέτης του μικροσκοπίου το 1670, κάτι όμως που φαίνεται να μην αληθεύει αφού ο Zacharias Jansen κατασκεύαζε μικροσκόπια και φαίνεται ότι το ίδιο έκανε και ο πατέρας του πριν το 1595. Άλλοι πάλι θέλουν τον Γαλιλαίο ως τον εφευρέτη του μικροσκοπίου γύρω στο 1600, χωρίς πάλι να υπάρχουν συγκεκριμένες αποδείξεις.

Από τα λίγα στοιχεία που έχουμε και από τα λιγοστά μικροσκόπια που έχουν βρεθεί σε συλλογές και μουσεία φαίνεται ότι το σύνθετο μικροσκόπιο αναπτύχθηκε κατά το τέλος του 15ου και κατά τον 16ο αιώνα. Τους επόμενους αιώνες έγιναν πολλές βελτιώσεις στα οπτικά και μηχανικά μέρη των μικροσκοπίων. Τον 19ο αιώνα έγιναν πολλές βελτιώσεις που αφορούσαν την διόρθωση των χρωματικών και σφαιρικών σφαλμάτων των φακών.

Ο παρακάτω πίνακας δίνει μερικές από τις πιο πρόσφατες βελτιώσεις του οπτικού μικροσκοπίου και τις σημαντικότερες παρατηρήσεις που έγιναν με το μικροσκόπιο:

Πρώτη φορά.
1941 ⁰ Coons χρησιμοποίησε αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές για να εντοπίσει κυτταρικά αντιγόνα.
1952 Ο Nomarski σχεδίασε και πατεντάρισε το σύστημα αντίθεσης διαφορικής συμβολής για το οπτικό μικροσκόπιο που ακόμα έχει το όνομά του.
1981 Οι Allen και Inoue εφάρμοσαν την αύξηση της αντίθεσης μικροσκοπικών εικόνων με τεχνικές video.
Τα γεγονότα που παίζανε σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων είναι τα παρακάτω:
1897 Ο Thompson εξαγγέλλει την ύπαρξη αρνητικά φορτισμένων σωματιδίων που αργότερα ονομάστηκαν ηλεκτρόνια.
1924 Ο De Broglie πρότεινε ότι ένα κινούμενο ηλεκτρόνιο έχει κυματικές ιδιότητες.
1926 Ο Busch εστίασε δέσμης ηλεκτρονίων με μαγνητικούς φακούς.
1931 Οι Knoll και Ruska κατασκεύασαν το πρώτο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.
1934 Ο Martin παίρνει την πρώτη βιολογική ηλεκτρονιογραφία από τη ρίζα του φυτού <i>Neotius nidus avis</i> .
1935 Ο Knoll έδειξε ότι είναι εφικτή η κατασκευή ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως, το οποίο όμως κατασκευάστηκε τρία χρόνια αργότερα από τον Von Ardenne.
1939 Οι Von Borries και Von Ruska κατασκεύασαν το πρώτο εμπορεύσιμο

ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Siemens) με διακριτικό όριο 10 nm.
1940 Οι Vance και Hillier πρόσθεσαν σταθεροποιητή της υψηλής τάσης σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου RCA με διακριτικό όριο 10 nm.
1941 Βελτίωση διακριτικού ορίου στα 2.2 nm. Από την εταιρεία Siemens.
1944 Ο Von Ardenne βελτίωσε το διακριτικό όριο στα 1.5 nm.
1946 Ο Hillier βελτίωσε το διακριτικό όριο στο 1.0 nm.
1952 Οι Palade, Porter και Sjöstrand ανέπτυξαν μεθόδους μονιμοποίησης και κοπής λεπτών τομών που επέτρεψαν την παρατήρηση πολλών ενδοκυτταρικών δομών.
1953 Οι Porter και Blum κατασκεύασαν το πρώτο υπερμικροτόμο που έγινε γενικά αποδεκτός για την αξιοπιστία του.
1956 Οι Glauert και Luft χρησιμοποίησαν εποξικές ρητίνες σα μέσο έγκλισης (Araldite και EPON αντίστοιχα).
1957 Οι Moor και Muhlethaler ανέπτυξαν την τεχνική της ψυκτοεξάχνωσης (freeze etching) που αρχικά χρησιμοποίησε ο Steere.
1960 Οι Depouy και συνεργάτες ανέπτυξαν το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υπέρ-υψηλής τάσης, 106 Volts.
1965 Βγαίνει στο εμπόριο το πρώτο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης από την Cambridge Instruments (σημερινή LEO).
1969 Οι Boyde και Wood χρησιμοποιούν για πρώτη φορά το ΗΜΣ για την παρατήρηση βιολογικών παρασκευασμάτων.
1965-70 Κατασκευή ηλεκτρονικών μικροσκοπίων με διακριτικό όριο 0.3-0.6 nm από την εταιρεία Philips.
1970-80 Κατασκευή ηλεκτρονικών μικροσκοπίων με διακριτικό όριο 0.2-0.3 nm από τις εταιρείες Philips, Jeol, Hitachi και Zeiss.
1980-90 Κατασκευή ηλεκτρονικών μικροσκοπίων με διακριτικό όριο 0.15nm που όμως έχουν πολλούς αυτοματισμούς και είναι εύκολα στη χρήση τους.

1990-99 Το διακριτικό όριο παραμένει στα 0.15 nm ενώ τα μικροσκόπια γίνονται ακόμα πιο αυτόματα και πιο εύκολα στη χρήση τους με τον συνδυασμό τους με ηλεκτρονικούς υπολογιστές, συστήματα μικροανάλυσης και συστήματα παρατήρησης παγωμένων παρασκευασμάτων (κρυοτεχνικές, φυσική μονιμοποίηση), τηλεχειρισμός του μικροσκοπίου μέσω τηλεφωνικού δικτύου, τηλεδιάγνωση βλαβών του μικροσκοπίου κλπ .

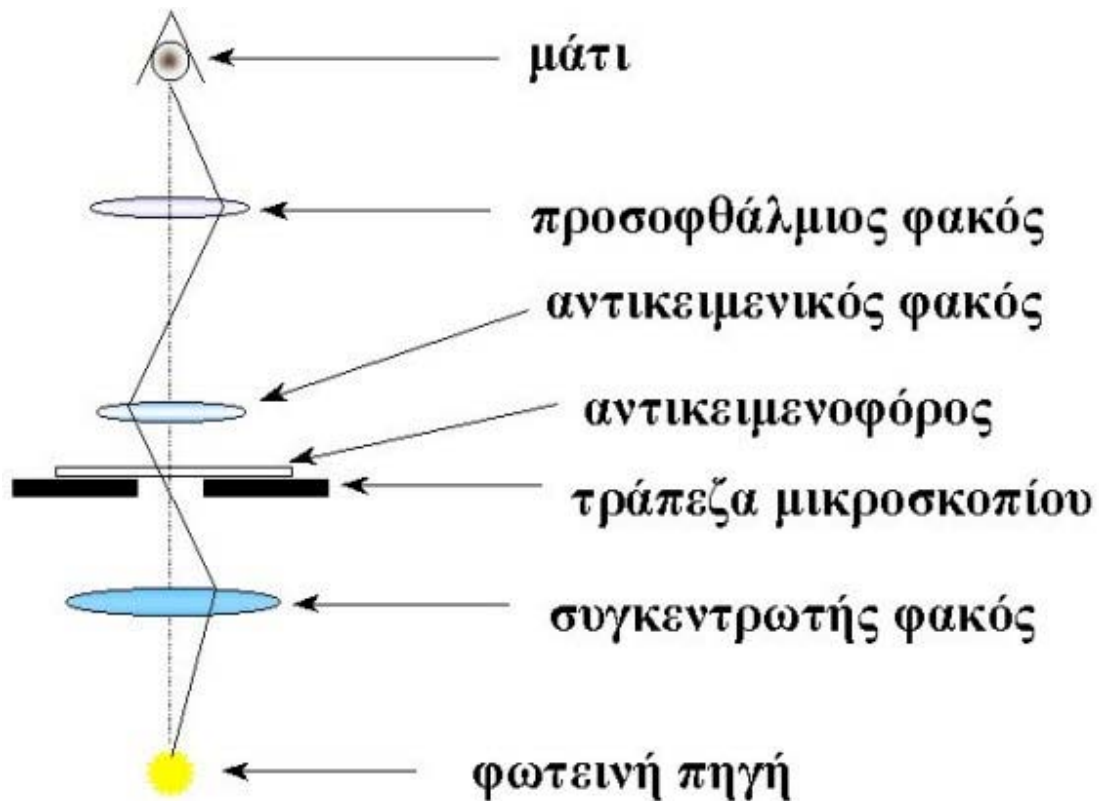
3. ΟΠΤΙΚΑ (ΦΩΤΟΝΙΚΑ) ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ.

Ως Οπτικά ή Φωτονικά αναφέρονται τα μικροσκόπια εκείνα που χρησιμοποιούν σαν ακτινοβολία το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που είναι ορατό, δηλαδή από 380 - 760 nm. Ανάλογα με τη διάταξη των φακών και τον τρόπο παρατήρησης τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται σε μικροσκόπια φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσεως, κλπ που αναφέρονται στη συνέχεια.



Εικόνα 3.1 Οπτικό μικροσκόπιο

Η μεγέθυνση ενός οπτικού μικροσκοπίου δίνεται από το τύπο $M=m_1 \cdot m_2$ όπου m_1 και m_2 είναι οι εγκάρσιες μεγεθύνσεις των δυο φακών, δηλαδή του προσοφθάλμιου και του αντικειμενικού. Επομένως θα μπορούσαμε να πούμε ότι βάζοντας δυνατότερους φακούς θα ήταν δυνατό να πετύχουμε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις. Πράγματι μ' αυτό το σκεπτικό θα βλέπαμε το παρασκευάσμα μας μεγαλύτερο χωρίς όμως να έχουμε πιο μεγάλη ευκρίνεια της εικόνας ("άδεια μεγέθυνση"), όπως ακριβώς συμβαίνει όταν μεγεθύνουμε πολύ μια φωτογραφία έτσι που να φαίνονται οι κόκκοι του film. Υπάρχει μ' άλλα λόγια μια μέγιστη χρήσιμη μεγέθυνση που είναι συνάρτηση της διακριτικής ικανότητας του οργάνου που ορίζεται σαν η ικανότητά του να διακρίνει δυο σημειακές φωτεινές πηγές που βρίσκονται πολύ κοντά η μια με την άλλη.



Εικόνα 3.2 Διάγραμμα των φακών και πορείας των φωτεινών ακτίνων στο οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

Η διακριτική ικανότητα (d) ενός οπτικού συστήματος δίνεται από το τύπο:

$$d=0,61 \lambda / (n \sin \alpha) \quad [1]$$

όπου d είναι η διακριτική ικανότητα, 0.61 ένας σταθερός αριθμός, λ το μήκος κύματος του φωτός (ή της ακτινοβολίας) που χρησιμοποιούμε, n ο δείκτης διάθλασης του μέσου μεταξύ παρασκευάσματος και φακού και α το μισό της γωνίας του φωτεινού κώνου που δέχεται ο φακός.

Η συνάρτηση [2] λέγεται και αριθμητικό άνοιγμα (A) του φακού και εξαρτάται αποκλειστικά από τη κατασκευή του φακού.

$$A=n \sin \alpha \quad [2]$$

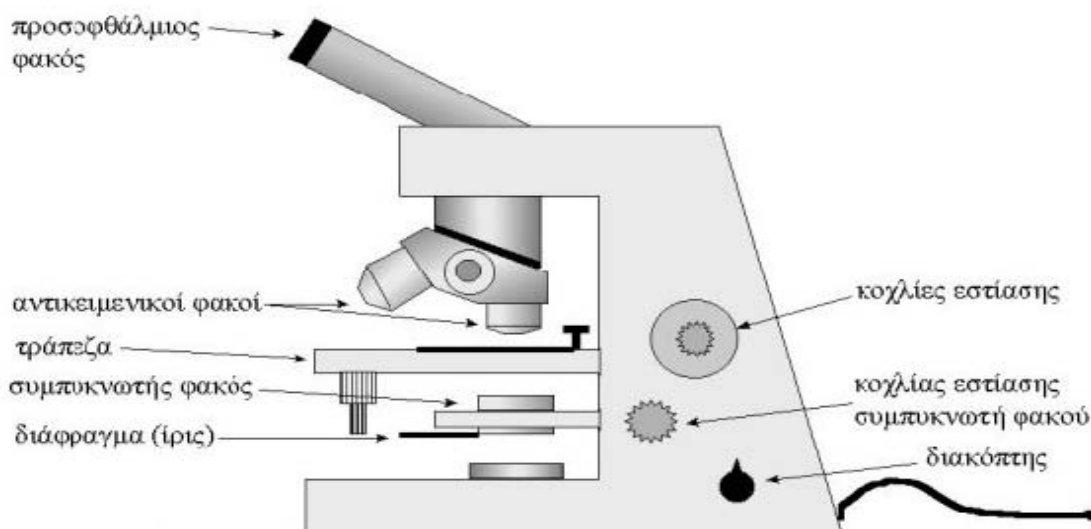
Εφ' όσον λοιπόν το φως που χρησιμοποιούν τα οπτικά μικροσκόπια συνήθως έχει ένα μέσο μήκος κύματος $\lambda=500 \text{ nm}$ και το αριθμητικό άνοιγμα (A) ενός πολύ καλού φακού είναι 1.6, τότε η διακριτική ικανότητα του οπτικού μικροσκοπίου δε μπορεί να ξεπεράσει τα $d=200 \text{ nm}=0.2 \mu\text{m}$ και η "χρήσιμη μεγέθυνση" περίπου τη τιμή 1600X. Ένας πρόχειρος, πρακτικός τρόπος υπολογισμού της "χρήσιμης μεγέθυνσης" που μπορεί να μας δώσει ένας αντικειμενικός φακός, δίνεται από το τύπο $\chi.μ.=1000 \cdot A$. Ο τύπος λοιπόν [1] μας λέει πως για να καλυτερέψουμε τη διακριτική ικανότητα θα πρέπει να μικρύνουμε το λ και να αυξήσουμε το A . Επειδή όμως οι οπτικοί (γυάλινοι) φακοί, από πλευράς ποιότητας κατασκευής, είναι σχεδόν τέλειοι, το A δε μπορεί να αυξηθεί άλλο. Έτσι μας μένει μόνο το μήκος κύματος του φωτός (ή

της ακτινοβολίας) το οποίο όμως όταν μικρύνει πολύ γίνεται αόρατο! Κατά καιρούς γίνανε διάφορες προσπάθειες βελτίωσης της διακριτικής ικανότητας του μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας ακτινοβολίες με μήκος κύματος μικρότερο εκείνου του ορατού φωτός με αποτέλεσμα τη κατασκευή διαφόρων τύπων μικροσκοπίων όπως το υπεριώδες μικροσκόπιο, το μικροσκόπιο ακτίνων Χ και άλλων μεταξύ των οποίων και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στις διάφορες παραλλαγές του.

Στη πράξη τα μικροσκόπια που συναντάμε συνήθως σ' ένα εργαστήριο έχουν φακούς που στη καλύτερη περίπτωση έχουν αριθμητικό άνοιγμα $A = 1.4$. Οι φακοί με μεγαλύτερο αριθμητικό άνοιγμα ($A = 1.6$) έχουν δυο μεγάλα μειονεκτήματα, τη πολύ υψηλή τιμή αγοράς αλλά και το πολύ μικρό βάθος εστίασης, κάτι που τους κάνει ιδιαίτερα δύσχρηστους.

3.1. Κοινό σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο διελεύσεως.

Η πρόοδος της ηλεκτρονικής και των μικροϋπολογιστών δεν άφησε ανέπαφη και τη μικροσκοπία. Τα σύγχρονα οπτικά μικροσκόπια διαθέτουν πλήθος αυτοματισμών και άλλων μηχανισμών που κάνουν τα μικροσκόπια πιο εύκολα στη χρήση ακόμα και από άτομα χωρίς ειδικές γνώσεις. Η χρήση όμως αυτών των μικροσκοπίων περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην έρευνα και τη διάγνωση στην ιατρική λόγω μεγάλου κόστους αγοράς και συντήρησης. Έτσι θεωρείτε σκόπιμη μια σύντομη περιγραφή των τμημάτων ενός απλού μικροσκοπίου που θα χρησιμοποιηθεί για πολλά ακόμα χρόνια.



Εικόνα 3.1.1 Τα τμήματα ενός σύγχρονου οπτικού μικροσκοπίου.

Τα τμήματα ενός σύγχρονου οπτικού μικροσκοπίου:

1. Προσοφθάλμιος φακός, τοποθετημένος στο πάνω μέρος του σωλήνα. Υπάρχουν τέσσερις τύποι: Huygens, Ramsden, Kellner και αντισταθμιστικοί (compensating). Οι τελευταίοι είναι και οι πιο

σύγχρονοι και επιτρέπουν την παρατήρηση χωρίς το μάτι να είναι σε επαφή με φακό. Ο χαραγμένος αριθμός π.χ. 10X δείχνει τη μεγέθυνση του φακού που αν τον πολλαπλασιάσουμε με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού μας δίνει τη τελική μεγέθυνση του μικροσκοπίου. Σε όλους σχεδόν τους προσοφθάλμιους φακούς υπάρχει δυνατότητα τοποθέτησης κλίμακας μέτρησης μέσα στο φακό αφού τον ξεβιδώσουμε. Ο σωλήνας στην κορυφή του οποίου βρίσκεται ο προσοφθάλμιος φακός (κατακόρυφος στα παλιότερα μικροσκόπια και υπό γωνία στα πιο σύγχρονα), μπορεί να είναι μονός, στα μονοφθάλμια μικροσκόπια και διπλός στα διοφθάλμια για πιο άνετη (όχι στερεοσκοπική) παρατήρηση. Ο σωλήνας συνήθως μπορεί να αφαιρεθεί για να τοποθετηθεί σωλήνας άλλου τύπου π.χ. σωλήνας με υποδοχή για φωτογραφική μηχανή video camera κλπ, ή να περιστραφεί για χρήση του μικροσκοπίου από εμπρός ή από πίσω.

2. Περιστρεφόμενη κεφαλή με τους αντικειμενικούς φακούς. Συνήθως έχει θέσεις για 3 - 6 φακούς. Σε ορισμένα ερευνητικά μικροσκόπια η περιστρεφόμενη κεφαλή μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα και να αντικατασταθεί με άλλη που έχει διαφορετικό συνδυασμό φακών. Έτσι σχετικά εύκολα μπορεί το μικροσκόπιο να μετατραπεί σε αντίθεσης φάσης, φθορισμού κλπ. Οι αντικειμενικοί φακοί είναι τα πιο σημαντικά εξαρτήματα του συστήματος σχηματισμού εικόνας του μικροσκοπίου γιατί από αυτούς εξαρτάται η τελική διακριτική ικανότητα και η αρχική μεγέθυνση. Οι φακοί αυτοί έχουν κατασκευαστεί έτσι που οι εικόνες να μην έχουν σφαιρικά ή χρωματικά σφάλματα, να μην έχουν αστιγματισμό. Ο φακοί αυτοί έχουν χαραγμένες στο σώμα τους διάφορες ενδείξεις π.χ. Plan 40/0.65 160/0.17, που σημαίνει φακός επίπεδος μεγέθυνσης 40X, αριθμητικό άνοιγμα 0.65, για χρήση σε μικροσκόπιο με σωλήνα μήκους 160 mm, και με καλυπτρίδα πάχους 0.17+0.01 mm. Η ένδειξη d=0 σημαίνει ότι ο φακός είναι σχεδιασμένος για να χρησιμοποιείται χωρίς καλυπτρίδα. Επειδή οι διάφοροι κατασκευαστές μικροσκοπίων μπορεί να χρησιμοποιούν διαφορετικούς συμβολισμούς θα πρέπει πάντα να διαβάζουμε τις οδηγίες χρήσης του συγκεκριμένου οργάνου. Το χρώμα των γραμμάτων και συμβόλων που είναι χαραγμένα πάνω στον αντικειμενικό φακό επίσης είναι ενδεικτικά του οπτικού τύπου του φακού π.χ. κόκκινα γράμματα συμβολίζουν φακό για πολωμένο φως ενώ πράσινα γράμματα συμβολίζουν φακό αντίθεσης φάσης. Πολλές φορές ο τύπος του φακού και η μεγέθυνσή του συμβολίζονται και με χρωματιστά δαχτυλίδια χαραγμένα πάνω τους.

Άλλα σύμβολα που μπορεί να είναι χαραγμένα πάνω στους αντικειμενικούς φακούς:

- PH: φακός για διάταξη αντίθεσης φάσης, ο αριθμός που συνήθως ακολουθεί π.χ. PH2 σημαίνει ότι ο φακός αυτός πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε συνεργασία με το διάφραγμα νούμερο 2 του συμπυκνωτή φακού.
- PLAN: σημαίνει ότι ο φακός είναι επίπεδος, δηλαδή όλα τα σημεία του οπτικού πεδίου εστιάζουν στο ίδιο επίπεδο, αντίθετα

σε φακούς χωρίς αυτή την ένδειξη όταν το κέντρο του οπτικού πεδίου είναι εστιασμένο τα σημεία στην περιφέρεια δεν είναι εστιασμένα. Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται τέτοιοι φακοί όταν πρόκειται να γίνει φωτογράφιση του παρασκευάσματος.

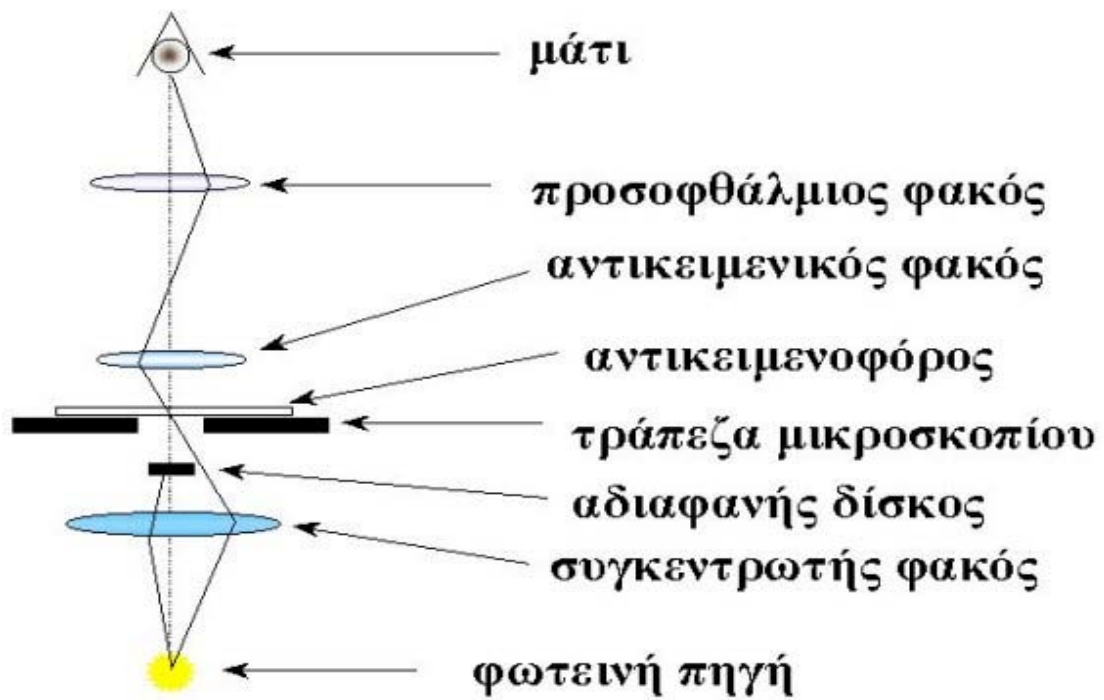
- APO: σημαίνει ότι ο φακός είναι αποχρωματικός, δηλαδή τα χρωματικά σφάλματα του φακού έχουν ελαχιστοποιηθεί για τρία τουλάχιστον μήκη κύματος (450, 550 και 650 nm) ενώ τα σφαιρικά σφάλματα έχουν ελαχιστοποιηθεί για μήκος κύματος περίπου 550 nm.
 - Achromat: λίγο κατώτερης ποιότητας από τους φακούς APO γιατί τα χρωματικά σφάλματα είναι ελαχιστοποιημένα για δυο μόνο μήκη κύματος (περίπου 500 και 600 nm) ενώ η διόρθωση για σφαιρικά σφάλματα είναι η ίδια με εκείνη των φακών APO.
 - POL: σημαίνει ότι ο φακός είναι για πολωτικό μικροσκόπιο.
 - Semi-apochromat: φακοί ποιότητας ενδιάμεσης μεταξύ του APO και του Achromat.
 - Fluorite, Neofluor: σημαίνει ότι το γυαλί από το οποίο είναι κατασκευασμένος ο φακός δεν απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και δεν φθορίζει. Αυτοί οι φακοί είναι κατάλληλοι για μικροσκοπία φθορισμού ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και με κοινό φωτισμό.
3. Η τράπεζα του μικροσκοπίου που μπορεί να είναι τετράγωνη σταθερή ή στρογγυλή περιστρεφόμενη (για πολωτικά μικροσκόπια) και με σύστημα μικρομετρικών κοχλιών για τη μετακίνηση του παρασκευάσματος. Το υλικό κατασκευής της τράπεζας είναι συνήθως κάποιο μέταλλο ενώ σε κάποια σύγχρονα καλά μικροσκόπια μπορεί να είναι από κεραμικό που είναι ανθεκτικό σε διάφορες διαβρωτικές ουσίες. Σε ορισμένα μικροσκόπια υπάρχει μηχανισμός αυτόματης μετακίνησης της αντικειμενοφόρου πλάκας με δυνατότητα συστηματικής σάρωσής της ή και ακόμα με τη δυνατότητα εναλλαγής αντικειμενοφόρων πλακών. Τα συστήματα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε αυτοματοποιημένες αιματολογικές και κυτταρολογικές εξετάσεις και βιοψίες.
 4. Μοχλός ρύθμισης της ίριδας (διαφράγματος). Η ίριδα περιορίζει τον φωτεινό κώνο που φωτίζει το παρασκεύασμα έτσι που αυτό να δέχεται τις ακτίνες που δεν προέρχονται από διάθλαση. Η ίριδα δεν πρέπει ποτέ να χρησιμοποιείται για την αύξηση ή ελάττωση της φωτεινής έντασης. Η ρύθμισή της είναι πολύ σημαντική κυρίως όταν πρόκειται να φωτογραφίσουμε το παρασκεύασμα. Ο τρόπος ρύθμισης διαφέρει από κατασκευαστή σε κατασκευαστή και θα πρέπει πάντα να συμβουλευόμαστε τις οδηγίες χρήσης του οργάνου.
 5. Συγκεντρωτής (ή συμπυκνωτής) φακός. Σκοπός του εξαρτήματος αυτού είναι η εστίαση της φωτεινής πηγής στο επίπεδο του παρασκευάσματος. Η κακή ρύθμιση του συμπυκνωτή έχει σαν αποτέλεσμα τον κατά πολύ περιορισμό της διακριτικής ικανότητας του οργάνου. Για συνεχή παρατήρηση σε χαμηλή μεγέθυνση (π.χ. 4X ή 10X) ο φακός αυτός μπορεί να αφαιρεθεί.

6. Κουμπί εστίασης (μεγάλο εξωτερικό για αδρή και μικρό στο κέντρο για λεπτή εστίαση). Σε πολλά μικροσκόπια υπάρχουν ξεχωριστά αυτοί οι δυο κοχλίες. Η κλίμακα που είναι χαραγμένη στο μικρομετρικό κοχλία εστίασης μας δείχνει την κατακόρυφη μετακίνηση του αντικειμενικού φακού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του ύψους (βάθους) ενός παρασκευάσματος.
7. Βάση μικροσκοπίου με (συνήθως) ενσωματωμένο σύστημα φωτισμού. Στα περισσότερα μικροσκόπια σήμερα υπάρχει ρεοστάτης για τη ρύθμιση της έντασης του φωτός. Προσοχή όμως γιατί αλλάζοντας τη φωτεινή ένταση με αυτόν τον τρόπο αλλάζουν και τα μήκη κύματος που απαρτίζουν το φώς. Αυτό δεν επηρεάζει την απλή παρατήρηση ή την ασπρόμαυρη φωτογράφιση, επηρεάζει όμως σημαντικά την έγχρωμη φωτογράφιση. Στην τελευταία περίπτωση χρησιμοποιούμε τον φωτισμό στη μέγιστη ένταση και για τον περιορισμό της φωτεινής έντασης χρησιμοποιούμε ουδέτερα φίλτρα.

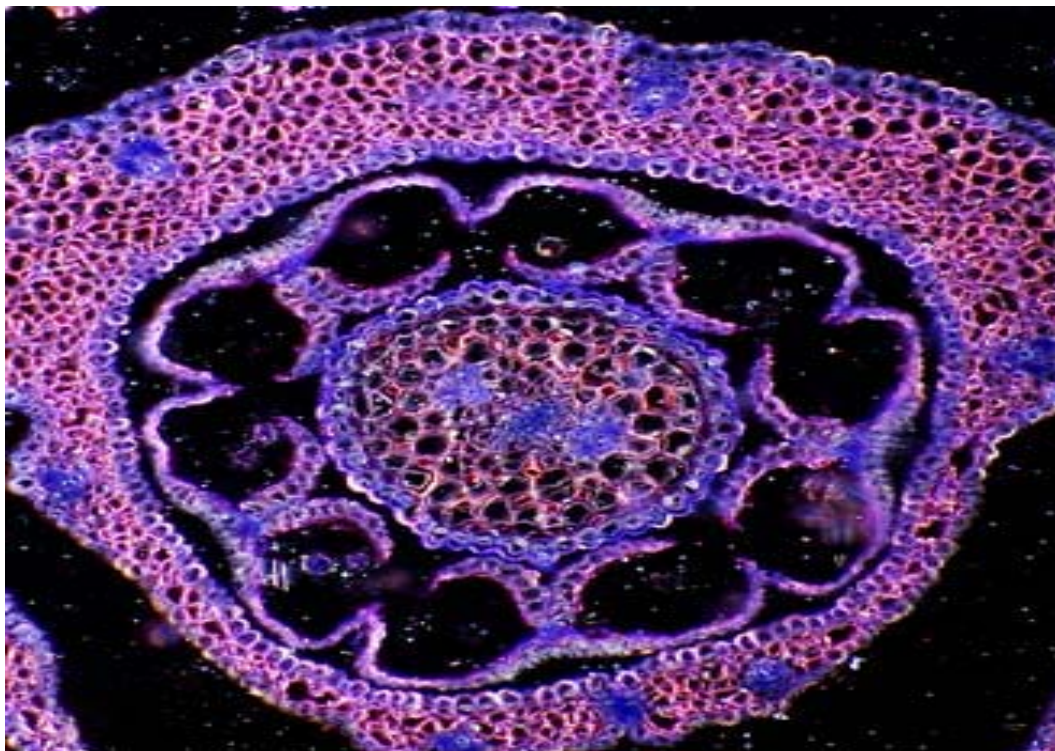
Επειδή κάθε μικροσκόπιο έχει και κάποιες ιδιαιτερότητες συνιστάται πάντοτε να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες χρήσης που συνοδεύουν το όργανο, για καλύτερα αποτελέσματα και κυρίως όταν θέλουμε να φωτογραφίσουμε το παρασκεύασμα, αλλά και για τη προστασία του μικροσκοπίου από τυχόν κακούς χειρισμούς.

3.2. Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου (dark field).

Αυτό το μικροσκόπιο είναι ίδιο με το φωτεινού πεδίου με μόνη διαφορά ότι στο συγκεντρωτή φακό υπάρχει ένας αδιαφανής δίσκος που σκεπάζει το κέντρο του φακού με αποτέλεσμα το παρασκεύασμα να φωτίζεται μόνο από πολύ πλάγιες ακτίνες που δεν εισέρχονται στον αντικειμενικό φακό παρά μόνο αν υποστούν διάθλαση μέσα στο παρασκεύασμα. Έτσι η εικόνα που παρατηρούμε είναι φωτεινό αντικείμενο (από διάθλαση των ακτινών μέσα στο παρασκεύασμα) σε σκοτεινό πεδίο. Η πορεία των ακτινών φαίνεται στην Εικόνα. Αυτό το είδος μικροσκοπίου συνιστάται για τη παρατήρηση μονοκύτταρων οργανισμών που θέλουμε να τους παρατηρήσουμε ζωντανούς ή/και αχρωμάτιστους. Σήμερα τα μικροσκόπια αυτά έχουν επισκιαστεί από τα μικροσκόπια αντίθεσης φάσης



Εικόνα 3.2.1 Διάγραμμα της διάταξης των φακών και της πορείας των φωτεινών ακτίνων στο μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

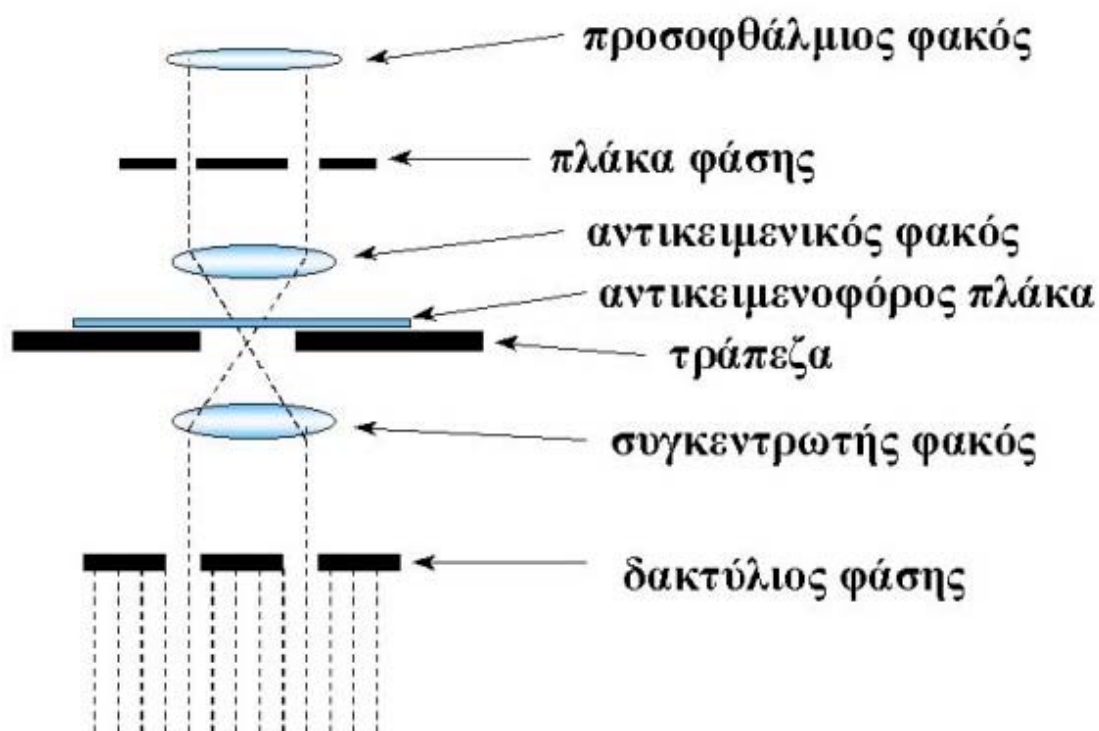


Εικόνα 3.2.2 Ρίζα του φυτού ztarazculum

3.3. Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (phase contrast).

Η πορεία των φωτεινών ακτινών σ' ένα μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης φαίνεται στην Εικόνα. Εδώ το παρασκεύασμα φωτίζεται από ένα κενό φωτεινό κώνο. Αυτός ο φωτεινός κώνος παράγεται από το δακτύλιο φάσης που βρίσκεται στο επίπεδο της ίριδας του συγκεντρωτή φακού και ο οποίος είναι ορατός μέσα από τον αντικειμενικό φακό όταν ο δακτύλιος είναι σωστά ρυθμισμένος. Αν στο επίπεδο της εστιακής απόστασης του αντικειμενικού φακού τοποθετηθεί η πλάκα φάσης, που καθυστερεί τις ακτίνες κατά $1/4$ του μήκους κύματος σε σχέση με τις απ' ευθείας φωτεινές ακτίνες, τότε σχηματίζεται μια εικόνα από την αντίθεση που παράγεται από τη συμβολή των δυο φωτεινών ακτίνων. Η ρύθμιση του δακτυλίου και της πλάκας φάσης για κάθε αντικειμενικό φακό είναι απαραίτητο να γίνεται με πολύ σχολαστικότητα για να έχουμε καλή εικόνα αλλιώς η εικόνα είναι ένας απαράδεκτος συνδυασμός σκοτεινού πεδίου και αντίθεσης φάσης. Θετική λέμε την αντίθεση που το αντικείμενο φαίνεται φωτεινό σε σκοτεινό πεδίο ενώ το αντίθετο, που είναι και το πιο συνηθισμένο, το λέμε αρνητική αντίθεση.

Για σωστή παρατήρηση το παρασκεύασμα πρέπει να τοποθετηθεί για παρατήρηση σε μέσο με δείκτη διάθλασης όσο γίνεται πιο διαφορετικό από εκείνο του παρασκευάσματος. Αν ο δείκτης διάθλασης είναι ο ίδιος το παρασκεύασμα δε θα φαίνεται καθόλου!



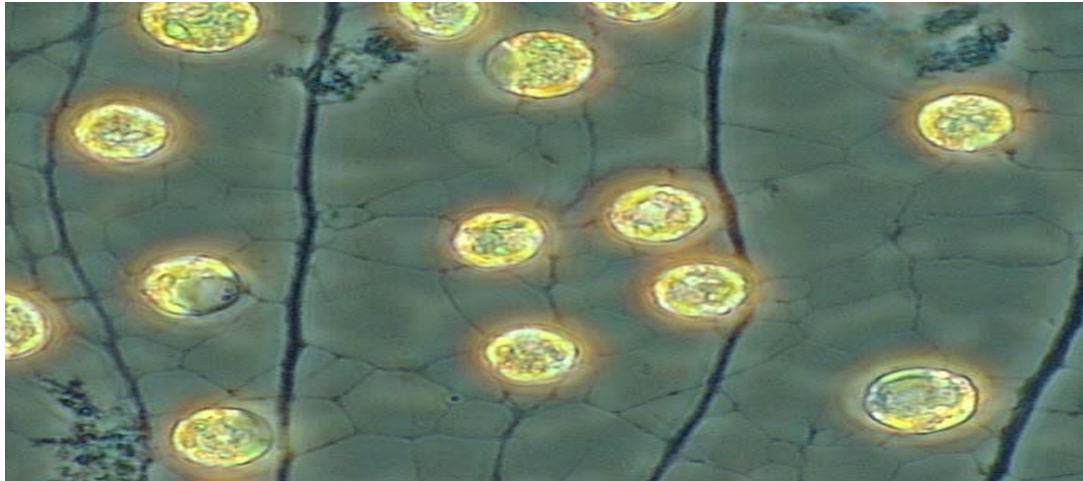
Εικόνα 3.3.1 Διάγραμμα των φωτεινών ακτινών στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.

Αυτός ο τύπος μικροσκοπίας είναι πολύ χρήσιμος κυρίως για τη παρατήρηση μονοκύτταρων οργανισμών, μικροοργανισμών, φυκών, μυκήτων, κυτταροκαλλιιεργειών, κλπ. που θέλουμε να τα παρατηρήσουμε ζωντανά. Δε συνιστάται για τη παρατήρηση μονιμοποιημένων και χρωματισμένων τομών ιστών, εκτός από ορισμένες περιπτώσεις όπως είναι η συστηματική ταξινόμηση γυρεοκόκκων

Οι αντικειμενικοί φακοί αυτών των μικροσκοπίων έχουν χαραγμένα τα χαρακτηριστικά π.χ. Ph 2 ή Ph 3 που σημαίνει ότι ο φακός είναι για μικροσκοπία αντίθεσης φάσης με αντίστοιχο δαχτυλίδι συγκεντρωτή No 2 ή No 3.



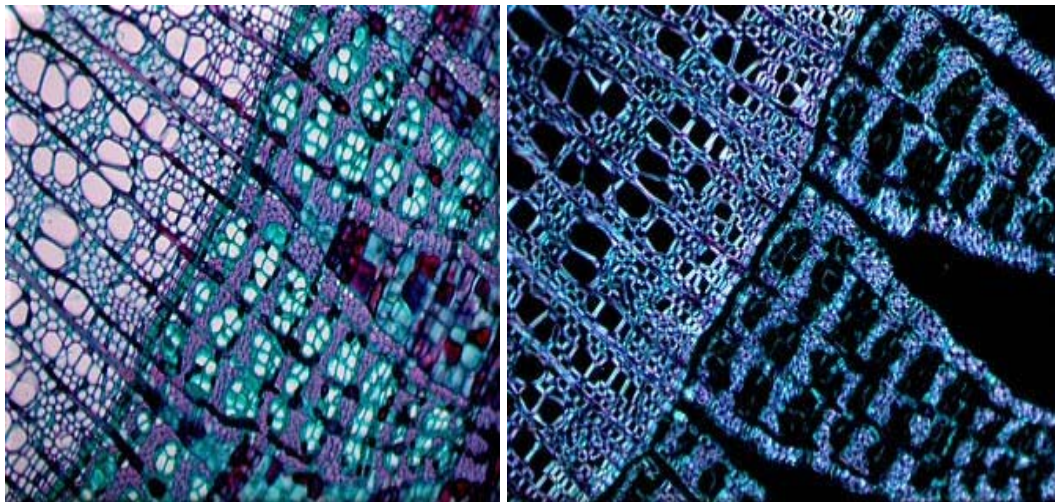
Εικόνα 3.3.2. Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (phase contrast).



Εικόνα 3.3.3 Παρατήρηση μονοκύτταρων χλωροφυκών με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.

3.4. Πολωτικό μικροσκόπιο (polarised).

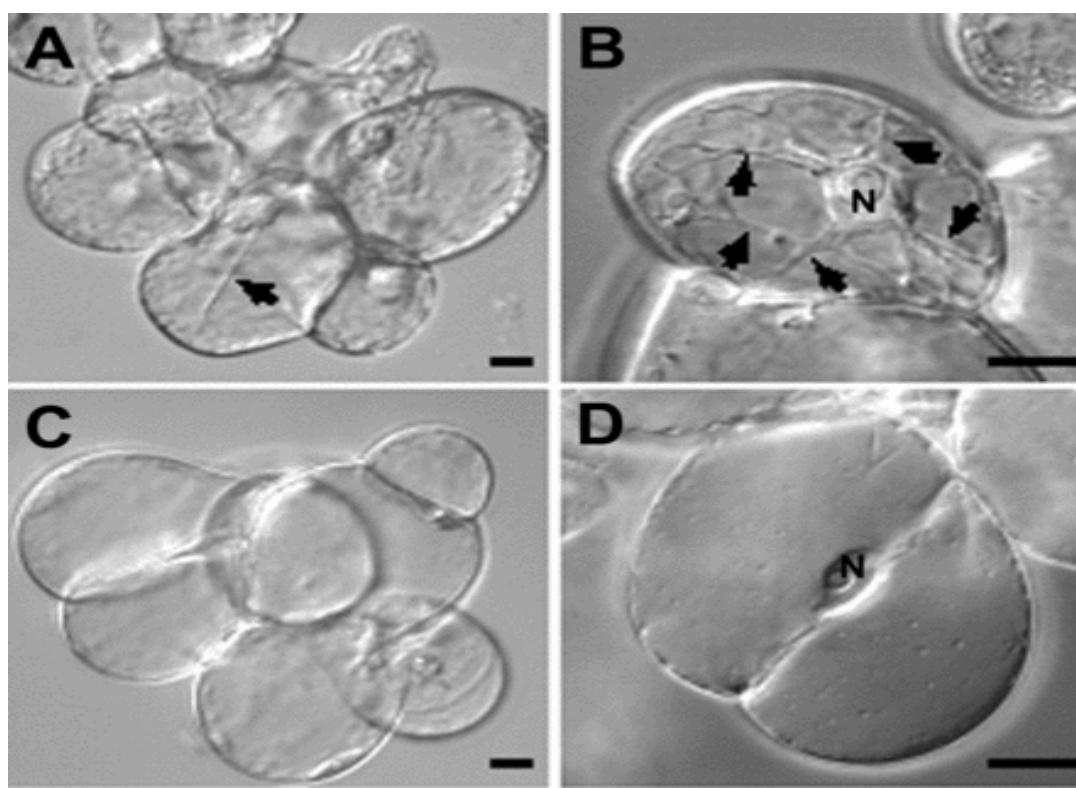
Είναι ένα απλό μικροσκόπιο στο οποίο όμως το παρασκεύασμα φωτίζεται με πολωμένο φως. Το αποτέλεσμα είναι να μπορούμε να παρατηρήσουμε παρασκευάσματα που έχουν διαφορετική διαπερατότητα στο πολωμένο φως λόγω φαινομένων οπτικής ανισοτροπίας. Τα μικροσκόπια αυτά είναι χρήσιμα κυρίως για τη παρατήρηση τροφίμων, ορυκτών και γενικά παρασκευασμάτων που μας ενδιαφέρει η κρυσταλλική τους δομή. Χαρακτηριστικό των μικροσκοπίων αυτών είναι η κυκλική τράπεζα που μπορεί να περιστραφεί κατά 360° ενώ οι φακοί τους έχουν χαραγμένη τη λέξη "POL".



Εικόνα 3.4.1 Παρατήρηση με πολωτικό μικροσκόπιο, αγγείων ξύλου σε εγκάρσια τομή βλαστού τυπικού δικότυλου φυτού

3.5. Μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast, Nomarski).

Το είδος αυτής της μικροσκοπίας βρίσκει περιορισμένες εφαρμογές συνήθως στη παρατήρηση κυτταρικών οργανιδίων χωρίς χρώση και οι εικόνες που βλέπουμε έχουν μια χαρακτηριστική ανάγλυφη εμφάνιση σε τόνους του γκρι. Είναι ένα είδος διαφορικής συμβολής χρησιμοποιώντας ειδικά πολωτικά πρίσματα τοποθετημένα σύμφωνα με τη σχεδίαση Nomarski. Αυτό το μικροσκόπιο αποτελεί εξέλιξη του μικροσκοπίου συμβολής ή συμβολομετρίας που η μόνη χρήση του ήταν η μέτρηση του όγκου κυττάρων και κυτταρικών οργανιδίων.



Εικόνα 3.5.1 Παρατήρηση της αύξησης των κυττάρων Aradabiosis, με μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής.

3.6. Μικροσκόπιο φθορισμού (fluorescent).

Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως όταν αυτά διεγείρονται από κάποια ακτινοβολία. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως με τη παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας.

Μικροσκοπία φθορισμού είναι η μελέτη ουσιών που μπορούν να διεγερθούν και να φθορίσουν. Αν και είναι αρκετές δεκαετίες από τότε που

πρωτοχρησιμοποιήθηκαν αυτά τα μικροσκόπια, τα τελευταία χρόνια η χρήση τους έχει δώσει μια νέα ώθηση στις επιστήμες που τα χρησιμοποιούν.

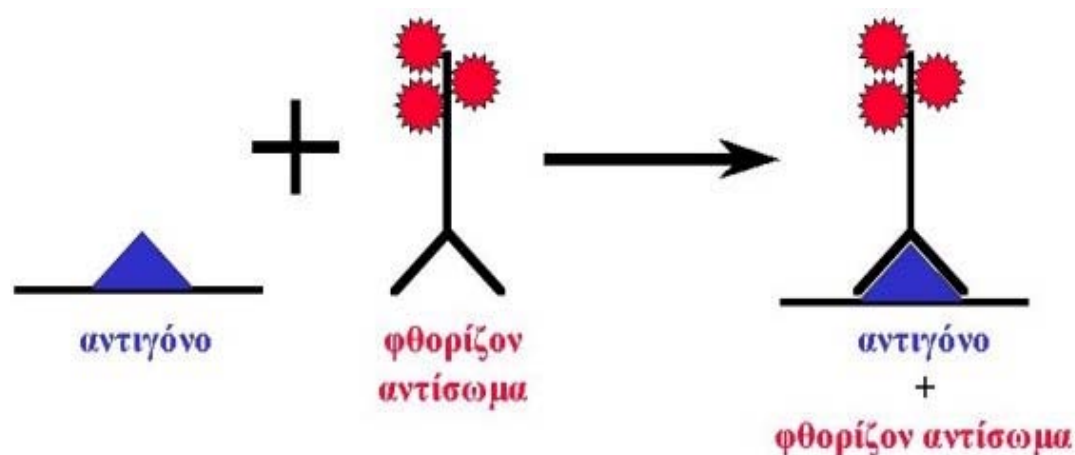
Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που παράγεται (φθορισμός) είναι μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας (νόμος του Stokes). Επομένως μια φθορίζουσα ουσία μπορεί να διεγερθεί με μια ακτινοβολία της περιοχής του υπεριώδους που είναι αόρατη και να παραχθεί μια ακτινοβολία που να είναι ορατή.

Το φαινόμενο αυτό χρησιμοποιείται στη μικροσκοπία φθορισμού για τη παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους είτε γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών, "χρωστικών", που φθορίζουν.

Υπάρχουν στη φύση ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν όπως είναι η χλωροφύλλη, μερικά έλαια και κηροί. Αυτές οι ουσίες λέμε ότι εμφανίζουν "πρωτογενή φθορισμό" ή "αυτοφθορισμό". Οι περισσότερες όμως ουσίες ή κυτταρικές δομές που μας ενδιαφέρουν επιστημονικά δεν εμφανίζουν "πρωτογενή φθορισμό". Έτσι αυτά τα παρασκευάσματα θα πρέπει να χρωματισθούν για να μας δώσουν "χρήσιμο" φθορισμό. Στόχος μας είναι ο φθορισμός ορισμένων μόνο περιοχών, ουσιών ή οργανιδίων των παρασκευασμάτων.

Ο εξειδικευμένος αυτός φθορισμός μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθοριοχρωμάτων. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται όπως ακριβώς και οι συνηθισμένες ιστολογικές χρωστικές. Ο φθορισμός που παρατηρείται στα παρασκευάσματα που έχουν χρωσθεί με φθοριοχρώματα αναφέρεται σαν "δευτερογενής φθορισμός".

Όταν το φθοριόχρωμα έχει συνδεθεί με κάποιο αντίσωμα που στη συνέχεια συνδέεται με το αντιγόνο και έτσι κάνει το τελευταίο ορατό, τότε η τεχνική αναφέρεται σαν ανοσοφθορισμός (Εικόνα). Η τεχνική αυτή, αν και όχι τόσο νέα, επινοήθηκε το 1950 από τους Coons και Kaplan, τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις βιοϊατρικές επιστήμες κυρίως για διαγνωστικούς σκοπούς, λόγω της δημιουργίας καθαρών και μονοκλωνικών αντισωμάτων.



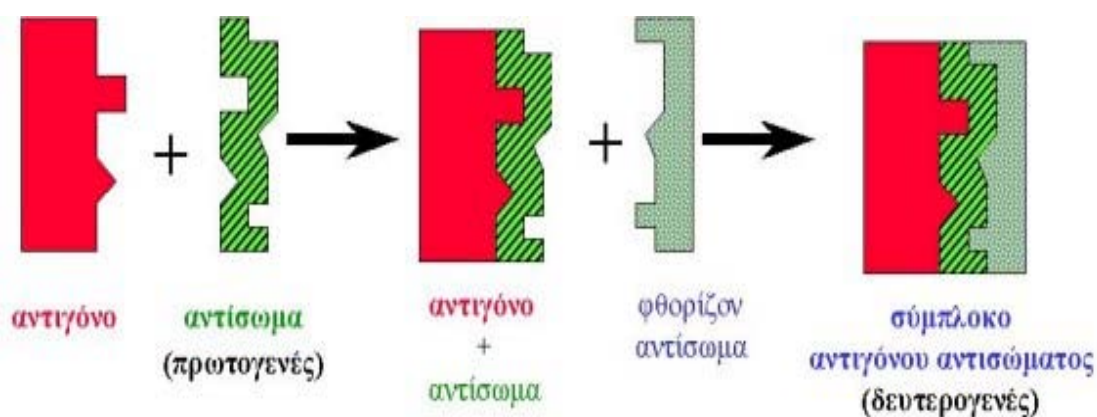
Εικόνα 3.6.1 Σύνδεση αντιγόνου με φθορίζον αντίσωμα.

Μια παραλλαγή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού είναι και η τεχνική sandwich όπου το φθοριόχρωμα είναι ήδη συνδεδεμένο με ένα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο στη συνέχεια προσκολλάται στο σύμπλοκο αντιγόνο / πρωτογενές αντίσωμα. (Εικόνα).

Από πλευράς κατασκευής το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα κοινό μικροσκόπιο στο οποίο όμως το παρασκεύασμα μπορεί να φωτίζεται εκτός από το κλασσικό τρόπο και με υπεριώδη ακτινοβολία. Οι φακοί των μικροσκοπίων αυτών είναι ειδικής κατασκευής, από γυαλί που δεν εμφανίζει "αυτοφθορισμό", και έχουν χαραγμένη πάνω τους τη λέξη Fluor ή Ultrafluor, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και για παρατήρηση σε διάταξη φωτεινού πεδίου.

Ανάλογα με την τοποθέτηση της πηγής υπεριώδους φωτός τα μικροσκόπια φθορισμού διακρίνονται σε δυο τύπους:

- α. Το μικροσκόπιο φθορισμού διελεύσεως (transmitted light fluorescence) που είναι και το παλαιότερο, και
- β. το μικροσκόπιο φθορισμού προσπίπτοντος ακτινοβολίας (epi-fluorescence).



Εικόνα 3.6.2 Σύνδεση αντιγόνου με το αντίσωμα και στη συνέχεια με φθορίζων αντίσωμα.

Από τους δυο τύπους, αυτός που έχει επικρατήσει είναι ο δεύτερος για τους πιο κάτω λόγους:

α. Ο αντικειμενικός φακός λειτουργεί και σαν συμπυκνωτής φακός με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται ρύθμιση. Η πορεία των φωτεινών ακτίνων σε αυτόν το τύπο μικροσκοπίου φαίνεται στην εικόνα.

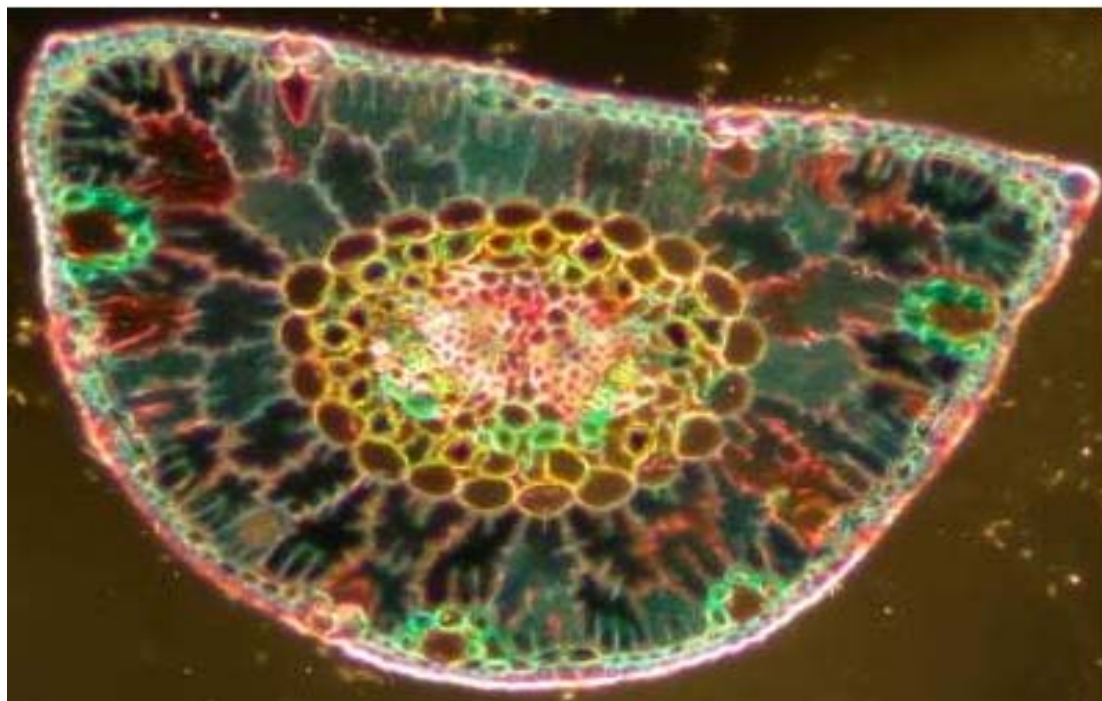
β. Στο μικροσκόπιο φθορισμού διελεύσεως ο φθορισμός παράγεται στα χαμηλότερα τμήματα του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα κατά τη διέλευση της ακτινοβολίας μέσα από το παρασκεύασμα αυτή να διαχέεται. Έτσι με αυτό το μικροσκόπιο μπορούμε να παρατηρήσουμε παρασκευάσματα με μικρό μόνο σχετικά πάχος. Αντίθετα στο μικροσκόπιο προσπίπτοντος ακτινοβολίας επειδή και ο φωτισμός και η παρατήρηση γίνονται από την ίδια

πλευρά του παρασκευάσματος η εικόνα από φθορισμό είναι πολύ πιο φωτεινή, με λιγότερο θόρυβο και κατά συνέπεια καλύτερης ποιότητας.

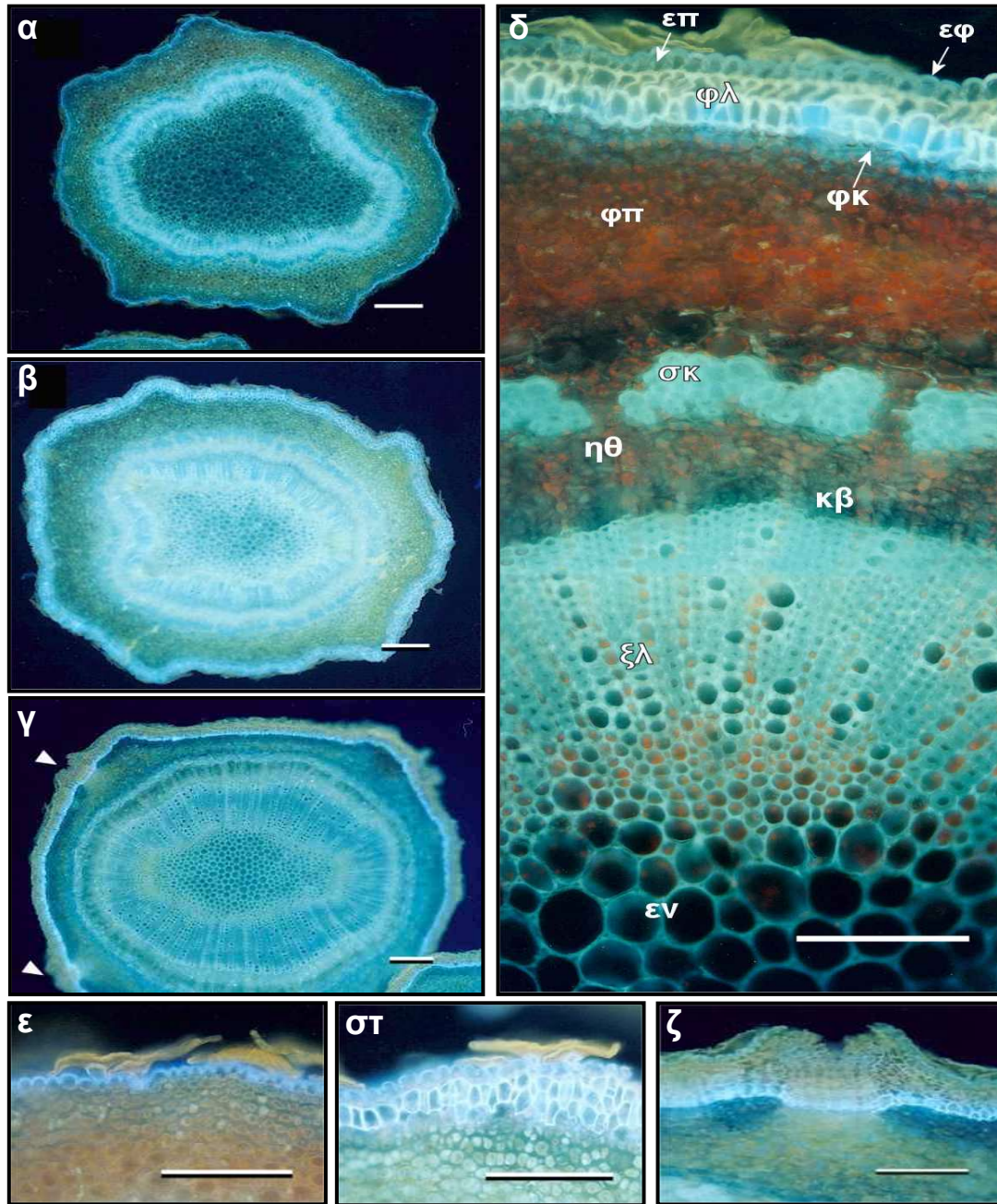
γ. Στο μικροσκόπιο φθορισμού προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η προσπίπτουσα ακτινοβολία και η ακτινοβολία από φθορισμό δεν συγχέονται. Η πρώτη οδεύει μέσα από το παρασκεύασμα προς τα κάτω και χάνεται, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζει την εικόνα από φθορισμό.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της παρατήρησης ή διάγνωσης με μικροσκόπιο φθορισμού είναι:

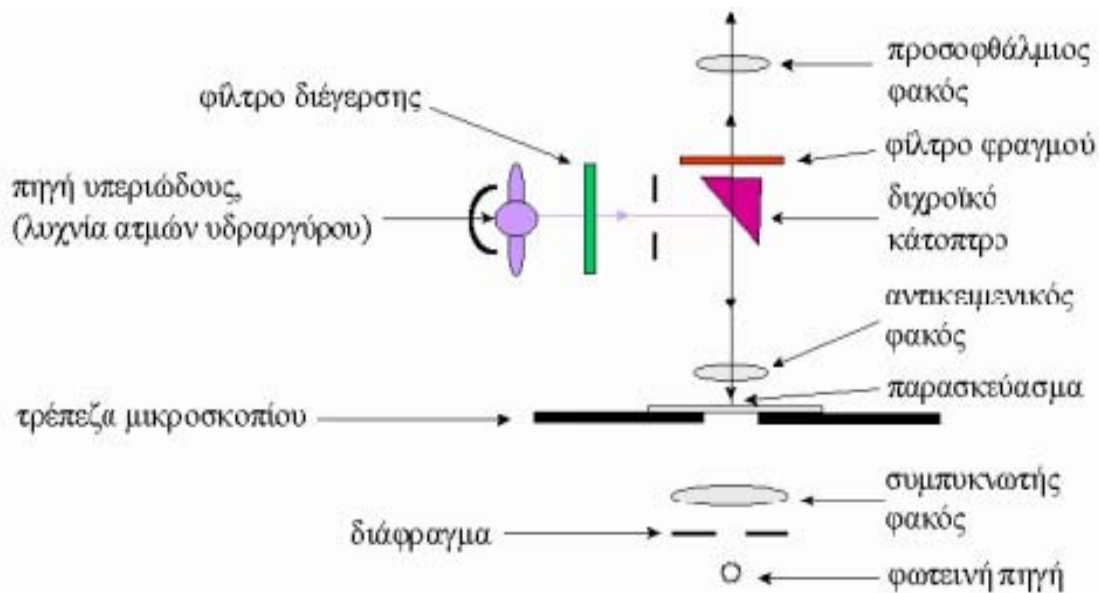
- Ευαισθησία. Απαιτείται πολύ μικρή συγκέντρωση του φθοριοχρώματος (διαλύσεις 1/10.000 -1/100.000) με αποτέλεσμα τη προστασία του παρασκευάσματος από τεχνητές αλλοιώσεις (artefacts), κάτι ιδιαίτερα σημαντικό σε ανοσοβιολογικές τεχνικές όπου οι διάφορες χημικές ουσίες μπορεί να επηρεάσουν την αντιγονικότητα του αντιορού.
- Εξειδίκευση. Οι σύγχρονες μέθοδοι προετοιμασίας παρασκευασμάτων, τα νέα φθοριοχρώματα και τα φίλτρα δίνουν ένα μεγάλο βαθμό εξειδίκευσης με αποτέλεσμα η τεχνική να είναι πολύ αξιόπιστη.
- Ταχύτητα και ευκολία. Τα παρασκευάσματα μπορούν να παρατηρηθούν χωρίς σχεδόν καμία προετοιμασία.
- Οι ίδιες τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν σε όλους τους κλάδους της βιοϊατρικής όπως είναι η ιολογία, μυκητολογία, κυτταρολογία, ανοσοβιολογία, παρασιτολογία κλπ.
- Αξιοπιστία Η μέθοδος είναι πολύ αξιόπιστη λόγω της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης των φθοριοχρωμάτων με αποτέλεσμα την ελάττωση των λανθασμένων διαγνώσεων ακόμα και από προσωπικό που δεν έχει μεγάλη εμπειρία.



Εικόνα 3.6.3 Παρατήρηση εγκάρσιας τομής φύλλου του φυτού *Pinus silvestris*



Εικόνα 3.6.4 Εγκάρσιες τομές νωπών παρασκευασμάτων με το Μικροσκόπιο.Φθορισμού. (χωρίς χρώση), βλαστών ελιάς εκτιμώμενης ηλικίας λίγων εβδομάδων (α & ε) έως ενός περίπου έτους (γ, δ, ζ). Τα χρώματα οφείλονται σε αυτοφθορισμό. εφ=εφυμενίδα, επ=επιδερμίδα, φλ=φέλλωμα, φκ=φελλοκάμβιο, φπ=φωτοσυνθετικό παρέγχυμα, σκ=σκληρεΐδες, ηθ=ηθμός, κβ=κάμβιο, ξλ=ξυλώδης ιστός, εν=εντεριώνη. Οι κεφαλές βελών δείχνουν φακίδια. Η κλίμακα έχει μήκος: 250μm για τις α, β & γ και 200 μm για τις δ, ε, στ & ζ.



Εικόνα 3.6.5 Διάταξη φωτεινών ακτίνων μικροσκοπίου με υπεριώδη φωτισμό.

3.7. Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser. (Confocal Laser Scanning Microscope).

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης αν και βρίσκεται σε πολύ γρήγορη εξέλιξη τα τελευταία χρόνια, η αρχή της λειτουργίας της πρωτοπεριγράφηκε από τον Minsky το 1961. Αντίθετα με το κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, που μπορεί να είναι μικρότερο από 10 μm, στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτή φακού. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αρχικά το παρασκευάσμα παρατηρείται με φως ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδες και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα Laser αργού (με πιο χρήσιμα μέγιστα στα 488 και 514 nm που συμπίπτουν με το μήκος κύματος που διεγείρει στο μέγιστο τη φλουορεσκίνη και τη ροδαμίνη) ή ηλίου-νέου (με μέγιστο στα 633 nm για άλλα φθοριοχρώματα) ή και με τα δυο συγχρόνως. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές (real time), αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου και φυσικά μπορούν να αποθηκευθούν σε σκληρό δίσκο ή να τυπωθούν απ' ευθείας με video printer (hard copy) ή να φωτογραφηθούν με συμβατικούς τρόπους

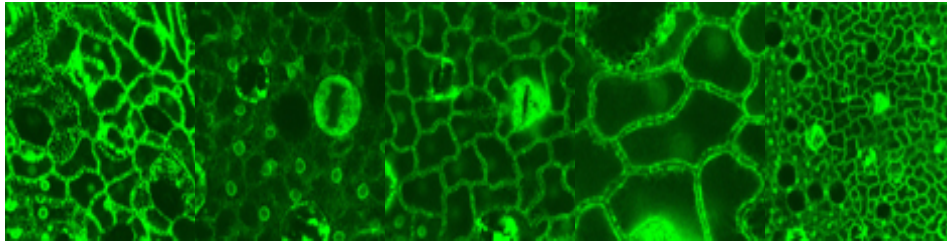


Εικόνα 3.7.1 Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι δύο:

1. βελτίωση της διακριτικής ικανότητας μέχρι του σημείου να πλησιάζει εκείνη του ΗΜΣ, και
2. και πιο σημαντικό, ελαττώνονται σημαντικά τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση (contrast) του παρασκευάσματος. Αυτό το δεύτερο χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z (βάθος) με αποτέλεσμα να παίρνουμε καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα (software) που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας. Κάποια από τα προγράμματα αυτά μπορούν ακόμα και να περιστρέψουν το παρασκεύασμα στο χώρο.

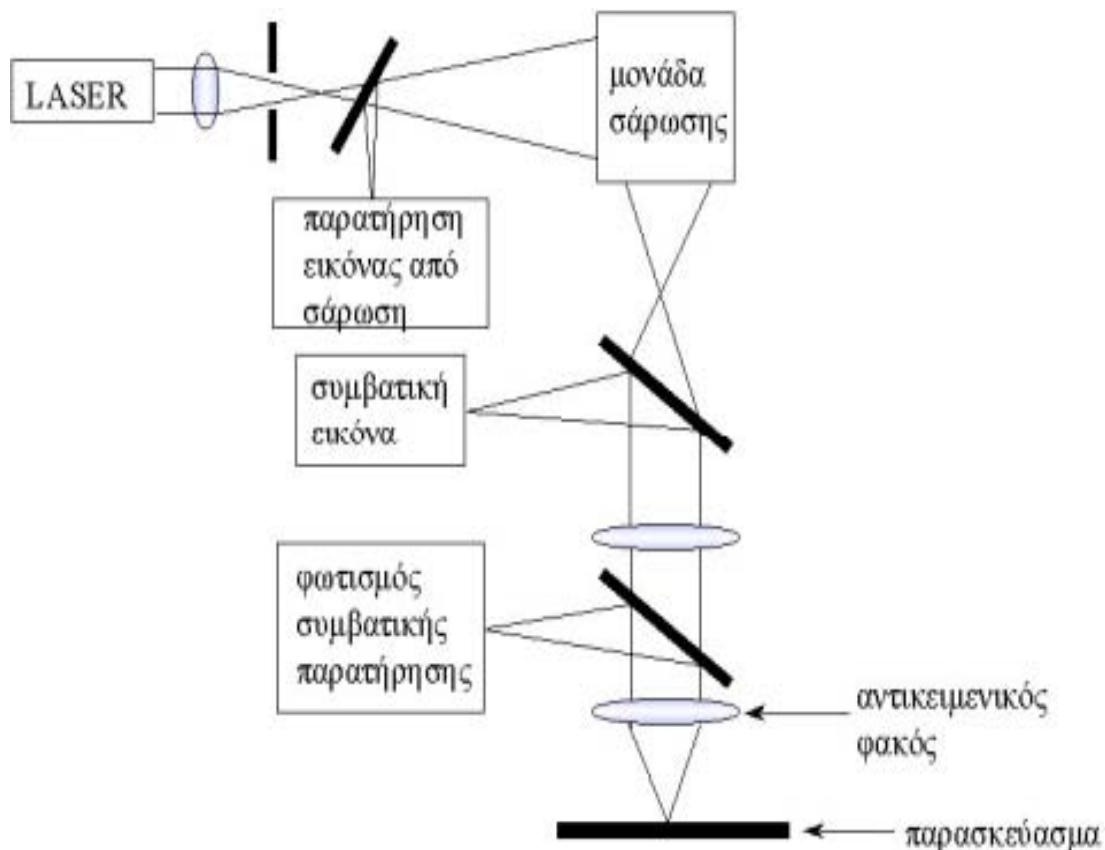
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αυτού του τύπου η μικροσκοπία σε συνδυασμό με το φθορισμό. Είναι γνωστό ότι είναι αδύνατον να παρατηρηθούν φθορίζοντα παρασκευάσματα πάχους μεγαλύτερου των 10 μm λόγω του δυνατού θορύβου από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος. Η συνεστιακή μικροσκοπία μπορεί να μας δώσει τρισδιάστατες καλά εστιασμένες εικόνες που συγκρίνονται με εκείνες του ΗΜΣ αλλά που να μας δείχνουν συγχρόνως και τη κατανομή των φθοριοχρωμάτων. Λόγω των πολλών εφαρμογών σχεδόν σε όλους τους τομείς, σχεδόν όλοι οι μεγάλοι κατασκευαστές μικροσκοπίων έχουν ήδη κατασκευάσει τέτοια μικροσκόπια τα οποία και βελτιώνονται συνεχώς.



Εικόνα 3.7.2 Παρατήρηση με συνεστιακό μικροσκόπιο, κυττάρων φύλλου μετά το μετασχηματισμό τους με GFP.

3.8. Ανεστραμμένα μικροσκόπια (διαφόρων τύπων, inverted).

Εκτός από τη κλασική διάταξη, με το φωτισμό από το κάτω μέρος της τράπεζας και την παρατήρηση να γίνεται από πάνω, υπάρχουν και μικροσκόπια σχεδόν όλων των τύπων με την αντίθετη διάταξη δηλαδή το παρασκεύασμα να φωτίζεται από επάνω και να παρατηρείται από κάτω. Αυτή η διάταξη διευκολύνει πολλές φορές τη παρατήρηση κυττάρων μέσα σε καλλιέργειες (μέσα σε τρυβλία Petri, φιάλες καλλιέργειας κλπ.).



Εικόνα 3.8.1 Σχηματική παράσταση της λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η βασική σχεδίαση ενός οπτικού μικροσκοπίου είναι η ίδια για όλα τα οπτικά μικροσκόπια που περιγράφηκαν. Έτσι είναι δυνατόν σε ένα όργανο να υπάρχουν όλοι οι τύποι μικροσκοπίας που αναφέρονται πιο πάνω. Η μετατροπή από τον ένα τύπο στον άλλο είναι συνήθως πολύ εύκολη και γίνεται με την αντικατάσταση ορισμένων φακών.



Εικόνα 3.8.2 Παρατήρηση πρωτοπλαστών με ανεστραμμένο μικροσκόπιο

3.9. Στερεοσκόπιο (οπτικό).

Το όργανο αυτό βρίσκει εφαρμογές εκεί που χρειαζόμαστε να παρατηρήσουμε σε μεγέθυνση την εξωτερική μορφολογία ενός αντικείμενου, ιστού κλπ όταν χρησιμοποιείται προσπίπτων ή πλάγιος φωτισμός οργανισμού, ή και την εσωτερική μορφολογία διαφανών ή διαφανοποιημένων παρασκευασμάτων όταν αυτά φωτίζονται από κάτω. Με αυτό το όργανο πετυχαίνουμε στερεοσκοπική τμήμα του δείγματος από διαφορετική γωνία. Τα στερεοσκόπια είτε έχουν αντικειμενικούς φακούς σταθερής εστιακής απόστασης (μεγέθυνσης) είτε μεταβαλλόμενης (zoom). Συνήθως τα όργανα αυτά μπορούν να μεγεθύνουν μέχρι περίπου 80X γιατί μεγαλύτερες μεγεθύνσεις έχουν πολύ μικρό βάθος εστίασης και επομένως οι εικόνες δε μπορούν πλέον να θεωρηθούν στερεοσκοπικές. Το παρασκεύασμα συνήθως δε χρειάζεται καμία προετοιμασία και μπορεί να παρατηρηθεί αρκεί να μπορεί να τοποθετηθεί στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου.



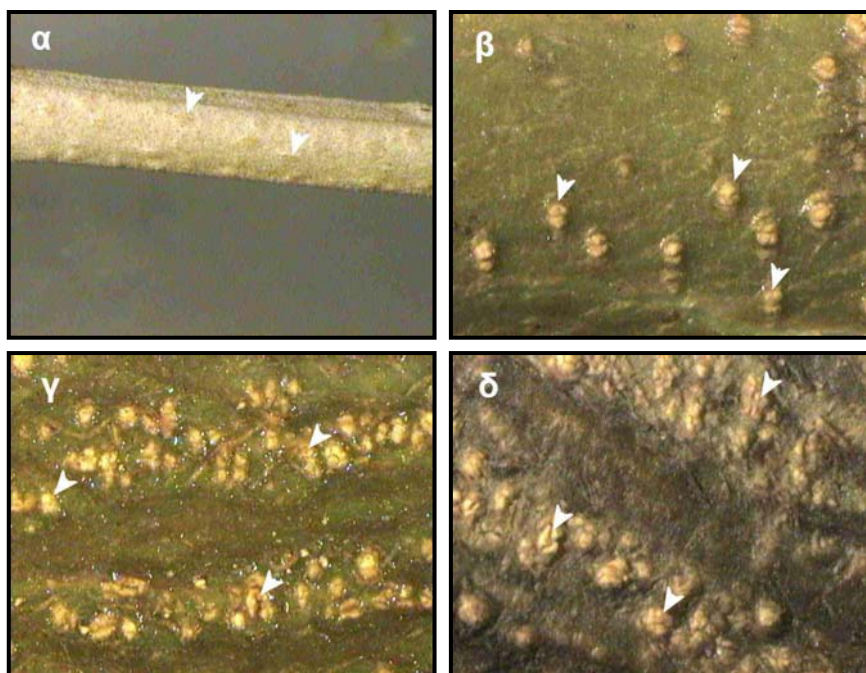
Εικόνα3.9.1 Ένα σύγχρονο οπτικό στερεοσκόπιο.

Στα στερεοσκόπια ο φωτισμός του παρασκευάσματος μπορεί να γίνει και από πάνω και από κάτω. Τα πιο σύγχρονα στερεοσκόπια διαθέτουν και σύστημα φωτισμού με υπεριώδη ακτινοβολία για μετατροπή τους σε μικροσκόπια φθορισμού.

Τα στερεοσκόπια έχουν πολλές εφαρμογές στη γεωπονία όπως είναι η μελέτη και προσδιορισμό εντόμων, μικρών καρπών, ασθενειών σε φυτά, πλαγκτονικών οργανισμών κλπ.

Για καλύτερη παρατήρηση συνιστάται η χρήση ισχυρής φωτεινής

πηγής με λαμπτήρα αλογόνου και οπτικές ίνες.



Εικόνα 3.9.2 Φωτογραφίες στερεοσκοπίου της επιφάνειας βλαστών εκτιμώμενης ηλικίας: (α) δέκα εβδομάδων, (β) δύο ετών, (γ) δέκα ετών και (δ) είκοσι περίπου ετών. Είναι εμφανής η εντεινόμενη παρουσία των φακιδίων (βέλη) με την αύξηση της ηλικίας των βλαστών έως και την ηλικία των δέκα ετών. Στην επιφάνεια των βλαστών ηλικίας δέκα και είκοσι περίπου ετών, διακρίνονται κατά τόπους περιοχές με ασθενές πράσινο χρώμα λόγω των υποκείμενων χλωροφυλλούχων ιστών.

3.10. Βιντεομικροσκόπιο. (Ηλεκτρονικό Στερεοσκόπιο).

Τα όργανα αυτά είναι σχετικά νέα στην αγορά και ακόμα όχι πολύ διαδεδομένα. Έχουν εξελιχτεί από τα διάφορα ενδοσκόπια που χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετά χρόνια στην Ιατρική, είτε για διαγνωστικούς σκοπούς είτε για τη πραγματοποίηση εγχειρήσεων. Η λειτουργία τους στηρίζεται στη τεχνολογία των οπτικών ινών και των video cameras υψηλής ανάλυσης που δουλεύουν και με πολύ χαμηλό φωτισμό. Τα πλεονεκτήματά τους είναι πολλά σε σύγκριση με το κλασικό οπτικό στερεοσκόπιο. Μερικά από αυτά είναι: η μεγέθυνση που μπορεί να είναι συνεχής, και κυμαίνεται από 1X -1000X, το βάθος εστίασης που είναι τουλάχιστο δέκα φορές μεγαλύτερο εκείνου του οπτικού στερεοσκοπίου, λειτουργούν με χαμηλό φωτισμό, η κεφαλή του οργάνου μπορεί να μετακινηθεί προς όλες τις κατευθύνσεις. Οι εικόνες στη συνέχεια μπορούν βέβαια να αποθηκευθούν σε μαγνητικό δίσκο ηλεκτρονικού υπολογιστή για περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση

εικόνας.

Λόγω της αρκετά μεγάλης μεγέθυνσης, αλλά και καλής διακριτικής ικανότητας που έχουν αυτά τα όργανα πολλές φορές μπορούν να υποκαταστήσουν το ΗΜΣ δεδομένου ότι αυτό σπάνια χρησιμοποιείται για τη παρατήρηση βιολογικών παρασκευασμάτων σε μεγεθύνσεις μεγαλύτερες της τάξης 1000X.

3.11. Μικροσκόπια αντίκες.

Σε όλα σχεδόν τα εργαστήρια θα βρούμε και κάποια μικροσκόπια που θα μπορούσαμε να τα χαρακτηρίσουμε αντίκες. Τα περισσότερα από αυτά είναι πραγματικά τεχνολογικά επιτεύγματα για την εποχή τους και εφ' όσον έχουν συντηρηθεί και ρυθμιστεί σωστά μπορούν να μας δώσουν εικόνες εφάμιλλες μ' εκείνες των συγχρόνων μικροσκοπίων. Τα μικροσκόπια όμως αυτά για να ρυθμιστούν σωστά πρέπει να γνωρίζουμε ορισμένα χαρακτηριστικά τους. Τα παλιά μικροσκόπια δεν έχουν ενσωματωμένο φωτιστικό σύστημα παρά ένα κάτοπτρο στη βάση του μικροσκοπίου. Το κάτοπτρο αυτό έχει δυο πλευρές μια επίπεδη και μια κοίλη. Η επίπεδη πλευρά είναι αυτή που χρησιμοποιείται συνήθως είτε με τεχνητό είτε με φυσικό φωτισμό. Όταν χρησιμοποιείται φυσικός φωτισμός, το κάτοπτρο πρέπει να στρέφεται προς ένα φωτεινό σημείο του ουρανού ή φωτεινό σύννεφο, όχι όμως απ' ευθείας στον ήλιο. Το κοίλο κάτοπτρο χρησιμοποιείται σπάνια και όταν γίνεται παρατήρηση μόνο σε χαμηλή μεγέθυνση και χωρίς τον συμπυκνωτή φακό. Οι προσοφθάλμιοι φακοί στα παλιά μικροσκόπια είναι συνήθως οι τύπου Huyghens ενώ στα πιο καινούργια χαρακτηρίζονται σαν αντισταθμιστικοί (compensating) και είχαν παλιότερα χαραγμένο το γράμμα K ή C δίπλα στον αριθμό που υποδηλώνει τη μεγέθυνση του φακού. Έτσι ενώ στους σύγχρονους προσοφθάλμιους φακούς για να γίνει σωστά η παρατήρηση το μάτι μας πρέπει να βρίσκεται σε μια απόσταση περίπου 2 cm από το φακό (αλλιώς βλέπουμε μέσα τις βλεφαρίδες μας), στα παλιότερα μικροσκόπια το μάτι μας πρέπει να είναι σχεδόν σε επαφή με τον προσοφθάλμιο φακό.

Οι αντικειμενικοί φακοί στα παλιά μικροσκόπια δεν κάνουν διόρθωση χρωματικών σφαλμάτων και δεν είναι επίπεδοι. Επίσης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε συνδυασμός προσοφθάλμιου με αντικειμενικό φακό, αλλά οι φακοί πάνε σε ζευγάρια π.χ. προσοφθάλμιος X7 με αντικειμενικό X10, ή X10 με X40 και X15 με X90.

3.12. Συντήρηση οπτικών μικροσκοπίων.

Ακολουθείστε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Όσο ακριβό και αν είναι ένα μικροσκόπιο η απόδοσή του θα είναι πολύ κακή αν δεν συντηρηθεί σωστά. Τα μηχανικά μέρη των σημερινών οπτικών μικροσκοπίων έχουν μόνιμη λίπανση και πολύ πιθανό να μη χρειαστούν ποτέ να συντηρηθούν. Τα οπτικά μέρη είναι συνήθως αυτά που δημιουργούν προβλήματα. Μερικοί απλοί κανόνες που πρέπει να τηρούνται είναι οι πιο κάτω:

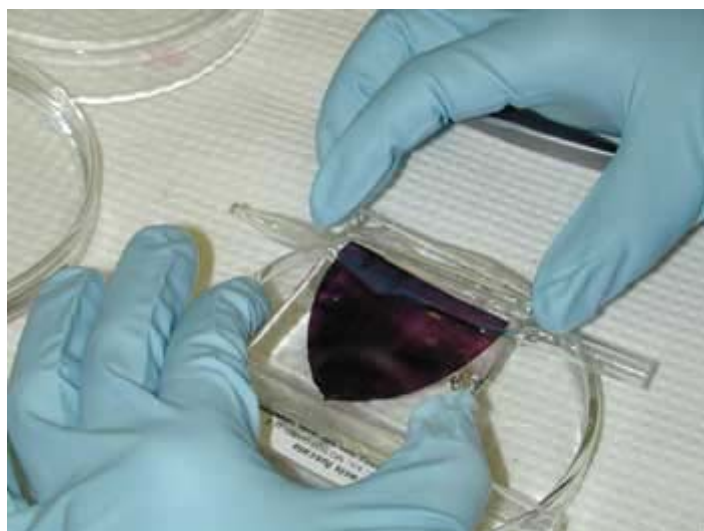
1. Το μικροσκόπιο πρέπει πάντα να σκεπάζεται όταν δεν χρησιμοποιείται.
2. Το μικροσκόπιο θα πρέπει πάντα να τοποθετείται σε στερεό πάγκο εργασίας, σε χώρο που δεν υπάρχει πολύ σκόνη ενώ ο χώρος θα πρέπει να μπορεί να συσκοτίζεται για ορισμένες χρήσεις του μικροσκοπίου.
3. Οι φακοί του μικροσκοπίου πρέπει να καθαρίζονται τακτικά με ειδικό χαρτί καθαρισμού φακών (π.χ. Watmann Lens Tissue). Ειδικότερα όταν χρησιμοποιείται λάδι κατάδυσης, ο καταδυτικός φακός πρέπει να καθαριστεί πριν κλείσουμε το μικροσκόπιο
4. Μην ανοίγετε ποτέ τους φακούς. Είναι σχεδόν αδύνατον ένας φακός να έχει λερωθεί μέσα. Αυτό ισχύει κυρίως για τους αντικειμενικούς φακούς που αποτελούνται από μια σειρά φακών που είναι τοποθετημένοι σε μια σειρά που δεν είναι καθόλου τυχαία!
5. Αν το μικροσκόπιο έχει ποτενσιόμετρο για τη ρύθμιση της έντασης του φωτισμού, όταν απλά κάνετε μια παρατήρηση μην έχετε την ένταση στο μέγιστο. Έτσι παρατείνεται κατά πολύ η ζωή της λάμπας, σε πολλά μικροσκόπια οι λάμπες είναι πολύ ακριβές και δυσεύρετες. Η λάμπα όμως πρέπει να είναι στο μέγιστο (ή σε κάποια σχετική ένδειξη χαραγμένη στο ποτενσιόμετρο) όταν πρόκειται να γίνει φωτογράφιση με έγχρωμο film. Το έγχρωμο film πρέπει να έχει την ένδειξη "τεχνητού φωτισμού" (Tungsten) για να έχουμε καλή απόδοση των χρωμάτων. Έχετε πάντα μια ανταλλακτική λάμπα πρόχειρη.
6. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή όταν το παρασκεύασμα περιέχει καυστικές ή όξινες ουσίες (π.χ. χρώση φλωρογλυκίνης με HCl) που μπορούν πολύ γρήγορα να διαβρώσουν τα μεταλλικά μέρη του μικροσκοπίου αλλά και να καταστρέψουν τις διορθωτικές επιστρώσεις των φακών.

4. ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ.

4.1. Ολόκληρα παρασκευάσματα - Διαφανοποίηση (whole mounts - clearing).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για ορισμένα παρασκευάσματα, συνήθως ολόκληρα φυτικά ή ζωικά όργανα, που δεν χρειάζεται να παρατηρηθούν σε μεγάλες μεγεθύνσεις με το οπτικό μικροσκόπιο. Ενυδατωμένοι οργανισμοί, όργανα ή ιστοί όπως έντομα, νηματώδεις, υδρόβιοι οργανισμοί και καλλιέργειες διατηρούνται συνήθως σε υγρό μέσον. Σήμερα, όπου είναι δυνατόν, τα παρασκευάσματα εγκλίνονται σε εποξική ρητίνη που είναι διαφανής και έχει μεγάλη μηχανική αντοχή.

Η διαδικασία της διαφανοποίησης αποσκοπεί στην αφαίρεση πρωτεϊνικών συστατικών με υδρόλυση και εμπότιση των δομών με υγρά που έχουν κάποιο ειδικό δείκτη διάθλασης. Διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και μερικές άλλες ουσίες που προκαλούν διαφανοποίηση είναι η φαινόλη, ξυλόλη, τολουόλη, τερπινόλη, ευγενόλη (γαρυφαλέλαιο) και τερπεντίνη (φυσικό νέφτι). Οι διαφανοποιητικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι εμπειρικά μίγματα στα οποία βυθίζονται τα παρασκευάσματα για χρονικά διαστήματα που προσδιορίζονται και αυτά εμπειρικά.



Εικόνα 4.1.1 Παρασκεύασμα από φυτικό ιστό.

4.2. Σύνθλιψη (squash preparation).

Τεχνική με την οποία μπορούμε να παρατηρήσουμε μεμονωμένα κύτταρα κάποιου ιστού ή κυτταρικά συστατικά όταν δεν μας ενδιαφέρει ή διατήρηση της δομής του ιστού ή του κυττάρου απ' όπου προέρχονται. Η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τη παρατήρηση των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια μιτωτικών ή μειωτικών διαιρέσεων.

Αν το παρασκεύασμα αποτελείται από μεμονωμένα κύτταρα, όπως στη περίπτωση μιας κυτταροκαλλιέργειας, αυτά απλά συνθλίβονται ανάμεσα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και την καλυπτρίδα ή ανάμεσα σε δυο αντικειμενοφόρους. Με αυτό το τρόπο απελευθερώνονται τα κυτταρικά συστατικά. Στη περίπτωση κομματιού ιστού συνήθως γίνεται πρώτα επεξεργασία του για να χαλαρώσουν οι δεσμοί μεταξύ των κυττάρων για να μπορούν να διαχωριστούν πιο εύκολα (θέρμανση με αραιό οξύ ή επώαση με κατάλληλο ένζυμο ή EDTA) και ακολουθεί η σύνθλιψη.

4.3. Αποδιοργάνωση. (Maceration).

Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη όταν το παρασκεύασμα είναι σκληρό και αδιαφανές για να παρατηρηθεί με το οπτικό μικροσκόπιο ή όταν θέλουμε να παρατηρήσουμε μεμονωμένα κύτταρα. Η τεχνική αυτή βρίσκει πολλές εφαρμογές στη μελέτη φυτικών ιστών. Όταν πρόκειται για φύλλα αυτά πρέπει πρώτα να εμβαπτιστούν σε 95% αιθανόλη για να απομακρυνθεί η χλωροφύλλη. Για πιο σκληρά παρασκευάσματα όπως είναι το ξύλο παίρνουμε λεπτά ξέσματα. Η διαδικασία της αποδιοργάνωσης συνήθως διαρκεί 12 - 24 ώρες ή και περισσότερο ή μέχρι να είναι ορατή η αποδιοργάνωση του ιστού. Ο ιστός στη συνέχεια πλένεται με νερό για 2 ώρες πριν να γίνει χρώση. Η αποδιοργάνωση μπορεί να γίνει είτε με ενζυμικές μεθόδους είτε με τη χρήση ισχυρών όξινων ή αλκαλικών διαλυμάτων.

Κεκορεσμένο διάλυμα βορικού οξέος (σε θαλασσινό νερό όταν πρόκειται για θαλάσσιους οργανισμούς) με δυο σταγόνες Lugol (1% ιώδιο σε 2% ιωδιούχο κάλιο) ανά 25 ml, για 2-3 ημέρες. 33% KOH για την απομόνωση γραμμωτών ή λείων μυϊκών ινών.

Μαλακοί φυτικοί ιστοί μπορούν να αποδιοργανωθούν με 25% 2M HCl σε 95% αιθανόλη. Πιο σκληροί, λιγνινοποιημένοι, ιστοί όπως είναι το ξύλο μπορούν να αποδιοργανωθούν με διάλυμα Schulze (0.5% νιτρικό κάλιο σε πυκνό νιτρικό οξύ).

Οι ιστοί αυτοί στη συνέχεια πρέπει να μονιμοποιηθούν. Εάν χρησιμοποιηθεί το διάλυμα Jeffrey (10% νιτρικό οξύ και 10% χρωμικό οξύ σε ίσα μέρη) γίνεται μονιμοποίηση παράλληλα με την αποδιοργάνωση του παρασκευάσματος.

4.4. Κόψιμο τομών.

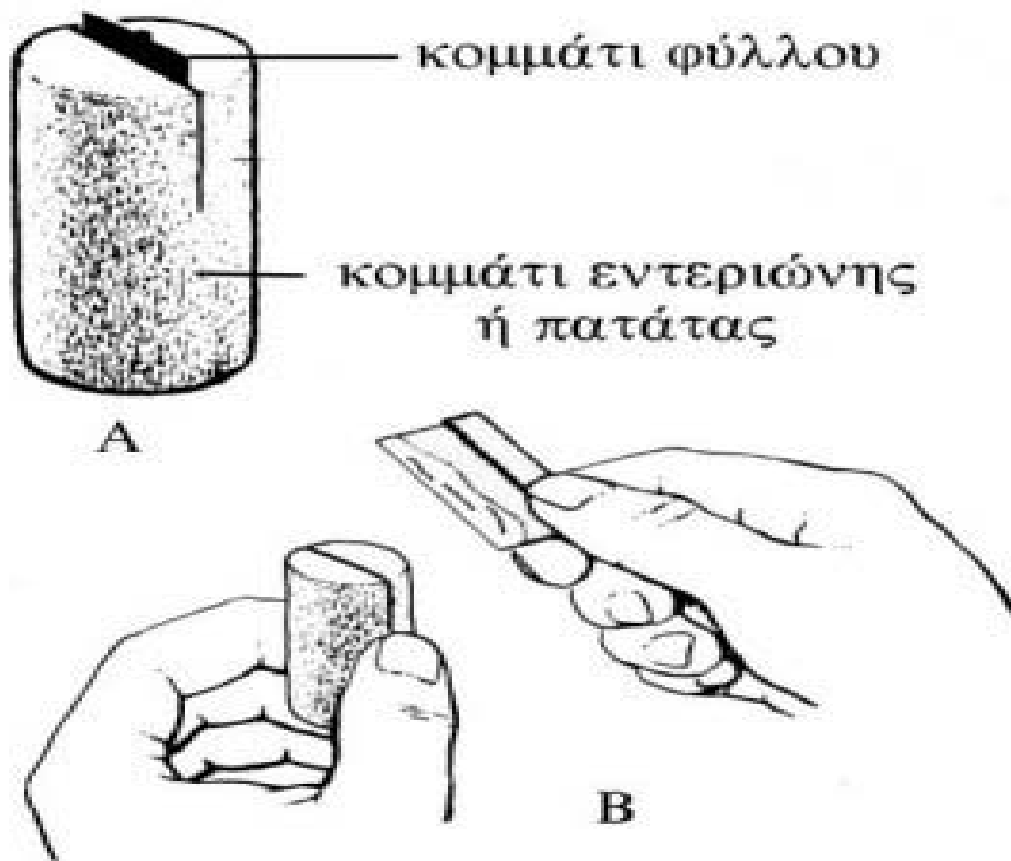
Τομές από ένα ιστό μπορούν να κοπούν με διάφορους τρόπους ανάλογα με το τι θέλουμε να παρατηρήσουμε, τη φύση του παρασκευάσματος και τα μέσα που διαθέτουμε. Ένα πρόχειρο παρασκεύασμα, κυρίως φυτικής προέλευσης, μπορεί να κοπεί με το χέρι με ένα καλό κοινό ξυραφάκι. Για καλύτερα αποτελέσματα και ανάλογα με τη φύση του παρασκευάσματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι μικροτόμων όπως ο μικροτόμος χειρός, ο παλινδρομικός μικροτόμος (Cambridge rocking microtome), ο περιστροφικός μικροτόμος (rotary microtome), ο ολισθαίνων μικροτόμος ή μικροτόμος ξύλου (base-sledge ή sliding microtome), ο ψυκτικός μικροτόμος (freezing microtome) και ο κρυοστάτης (cryostat). Ανάλογα με τη μέθοδο κοπής που εφαρμόζεται, το παρασκεύασμα και τον τύπο του μικροτόμου τα μαχαίρια που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι κοινές λεπίδες ξυρίσματος, ειδικά μαχαίρια μικροτόμου, γυάλινα μαχαίρια ή ακόμα και μαχαίρια κατασκευασμένα από διαμάντι για ειδικές περιπτώσεις.

Ένας γενικός κανόνας που πρέπει πάντοτε να ακολουθείται, για να έχουμε καλά αποτελέσματα, είναι η χρησιμοποίηση καινούργιου μαχαιριού ή ξυραφιού), όταν πρόκειται για μαχαίρια μιας χρήσης, ή καλά και σωστά ακονισμένου μαχαιριού όταν πρόκειται για μαχαίρια πολλών χρήσεων.

4.5. Τομές με το χέρι.

Με λίγη εξάσκηση και ακολουθώντας μερικές απλές οδηγίες μπορούμε να κόψουμε αρκετά ικανοποιητικές τομές, μέχρι και 10 μm πάχους με το χέρι, χωρίς καμιά άλλη επεξεργασία. Προϋπόθεση όμως είναι ο ιστός αυτός να είναι αρκετά σκληρός για να μπορούμε να τον κρατάμε όταν τον κόβουμε χωρίς αυτός να λυγίζει. Έτσι η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σχεδόν αποκλειστικά σε φυτικούς ιστούς τους οποίους πολλές φορές χρειάζεται να τοποθετήσουμε μέσα σε κάποιο άλλο πιο στερεό υλικό όπως είναι η

εντεριώνη, ο κόνδυλος της πατάτα και το διογκωμένο πολυστυρένιο (φελιζόλ), για να διευκολυνθεί το κόψιμο των τομών (όπως π.χ. για λεπτά φύλλα, Εικόνα).



Εικόνα 4.5.1 Πώς μπορούμε να κόψουμε τομές με το χέρι από ένα μαλακό φυτικό ιστό.

Για να πάρουμε καλές τομές με το χέρι, για παράδειγμα από ένα βλαστό, κρατάμε το βλαστό ανάμεσα στον αντίχειρα και το δείκτη. Χρησιμοποιώντας πάντα καινούργιο ξυραφάκι κόβουμε με γρήγορες και "συρτές" κινήσεις πολλές τομές ενώ διατηρούμε το ξυραφάκι και το βλαστό συνεχώς υγρά. Κάθε φορά που κόβουμε μια τομή στρέφουμε το βλαστό κατά μια μικρή γωνία. Οι τομές τοποθετούνται σε ύαλο ωρολογίου ή τρυβλίο Petri σε νερό. Στη συνέχεια οι τομές μπορούν να χρωσθούν, να επιλεγούν οι καλύτερες και να τοποθετηθούν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για παρατήρηση.

Για τη διευκόλυνση του κοψίματος των τομών με το χέρι υπάρχουν και μικροτόμοι χειρός στους οποίους ο ιστός, νωπός ή εγκλεισμένος σε παραφίνη στηρίζεται σε ειδικό υποδοχέα. Οι τομές κόβονται με ειδικό ξυράφι ενώ η προώθηση του παρασκευάσματος γίνεται με μικρομετρικό κοχλία.

4.6. Τομές με ψυκτικό μικροτόμο και κρυστάτη.

Ο ψυκτικός μικροτόμος είναι μια συσκευή που έχει τη δυνατότητα να παγώνει γρήγορα το παρασκεύασμα και έτσι να επιτρέπει το κόψιμο λεπτών τομών ενώ αυτό διατηρείται παγωμένο. Το πάγωμα, που επιτυγχάνεται με υγρό διοξείδιο του άνθρακα, συντελεί στη σκλήρυνση του παρασκευάσματος και συγχρόνως και στη μονιμοποίησή του (φυσική μονιμοποίηση). Τα

πλεονεκτήματα του ψυκτικού μικροτόμου είναι η ταχύτητα προετοιμασίας και κοψίματος τομών, σε σύγκριση με το μικροτόμο παραφίνης, αλλά και στο ότι, λόγω της φυσικής μονιμοποίησης, δεν γίνεται απομάκρυνση συστατικών από το παρασκεύασμα ενώ δεν χάνεται η δραστηριότητα των ενζύμων πράγμα που κάνει τη μέθοδο πολύ χρήσιμη κυρίως όταν πρόκειται να γίνουν ιστοχημικές ή ανοσοβιολογικές μελέτες. Για την αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα του ιστού συνήθως προστίθεται κάποια αντιπηκτική ουσία όπως είναι η γλυκερίνη. Η μέθοδος αυτή διαδίδεται όλο και περισσότερο και στο ΗΜΔ, όπου υπέρλεπτες παγωμένες τομές μπορούν να παρατηρηθούν χωρίς καμιά άλλη επεξεργασία.

Ο κρυστάτης είναι μια πιο εξελιγμένη μορφή ψυκτικού μικροτόμου όπου όλος ο χώρος επεξεργασίας του ιστού βρίσκεται σε χαμηλή θερμοκρασία και όχι μόνο το παρασκεύασμα, όπως συμβαίνει με τον απλό ψυκτικό μικροτόμο. Η χαμηλή θερμοκρασία επιτυγχάνεται με ψυκτικό μηχανήμα και όχι με υγρό διοξείδιο του άνθρακα.

4.7. Με μικροτόμο παραφίνης.

Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η εμπότιση του ιστού με λιωμένη παραφίνη, που στη συνέχεια στερεοποιείται. Έτσι ο ιστός μπορεί να κοπεί σε λεπτές τομές με το μικροτόμο. Σήμερα χρησιμοποιείται συνήθως μίγμα παραφίνης -πλαστικού ή και άλλων πλαστικών ή ακρυλικών ουσιών που δίνουν καλύτερα αποτελέσματα από τη καθαρή

παραφίνη και κυκλοφορούν με διάφορα εμπορικά ονόματα όπως PARAPLAST, HISTOPLAST, κ.ά.

5. ΧΡΩΣΕΙΣ.

5.1. Αρνητική χρώση.

Με αυτήν την τεχνική χρωματίζεται (τουλάχιστο θεωρητικά) μόνο το φόντο και όχι το ίδιο το παρασκεύασμα και χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την παρατήρηση βακτηρίων στην περίπτωση που μας ενδιαφέρει μόνο το σχήμα (κόκκοι, βάκιλοι ή σπειρίλια). Η τεχνική είναι απλή και γρήγορη αλλά στο επίπεδο του οπτικού μικροσκοπίου δεν έχει πολλές εφαρμογές. Σ' αυτήν την τεχνική το παρασκεύασμα τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο πλάκα με μορφή επιχρίσματος το οποίο στη συνέχεια αφήνεται να στεγνώσει. Η χρωστική τοποθετείται στο παρασκεύασμα και είτε αφήνεται να στεγνώσει είτε πρώτα ξεπλένεται, στεγνώνεται και μετά παρατηρείται.

5.2. Χρώση vital.

Με τον όρο vital εννοούμε χρωστικές που δεν σκοτώνουν ή καταστρέφουν το κύτταρο (οργανισμό) το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί ζωντανό. Οι χρωστικές αυτές είναι πολύ χρήσιμες για τη παρατήρηση ζωντανών μικροοργανισμών ενώ σήμερα αποκτούν ιδιαίτερη σημασία για τη μελέτη κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες. Η μέθοδος αυτή αποκτάει ιδιαίτερη σημασία όταν οι χρωστικές αυτές είναι και φθορίζουσες που μπορούν να συνδεθούν με αντισώματα δίνοντας έτσι τη δυνατότητα παρακολούθησης ακόμα και ειδικών βιοχημικών αντιδράσεων σε ζωντανά κύτταρα.

5.3. Χρώση τομών.

Υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός μεθόδων και τεχνικών χρώσεως τομών που έχουν κοπεί με μικροτόμο παραφίνης, ψυκτικό μικροτόμο ή με το χέρι. Γενικά οι τομές τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες, γίνεται αποπαραφίνωση ή αφυδάτωση, ανάλογα με την περίπτωση, και στη συνέχεια χρώση και κάλυψη με την καλυπτρίδα.

Στο αντίστοιχο Κεφάλαιο αναφέρονται μερικές συνηθισμένες τεχνικές χρώσης φυτικής και ζωικής προέλευσης παρασκευασμάτων.

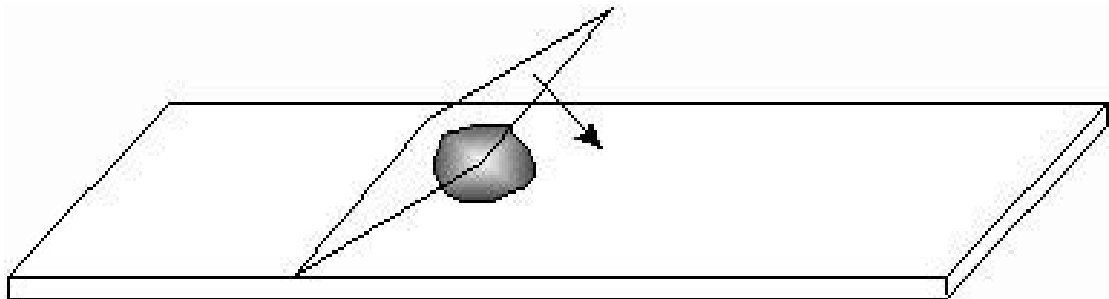
Έγκλειση τομών. Για να παρατηρηθεί το παρασκεύασμα χρειάζεται συνήθως να καλυφθεί με την καλυπτρίδα. Αν το παρασκεύασμα είναι πρόχειρο η τομή τοποθετείται σε σταγόνα νερού ή 50% γλυκερίνης σε νερό πάνω στην οποία τοποθετείται η καλυπτρίδα. Ημιμόνιμα παρασκευάσματα μπορούν να παρασκευαστούν όταν οι τομές τοποθετηθούν σε μια λιωμένη σταγόνα από το ακόλουθο μίγμα:

ζελατίνη	10 g
γλυκερίνη	70 ml
φαινόλη	0.25 g
αποστ. νερό	60 ml

Τρόπος παρασκευής: Η ζελατίνη μουσκέυεται σε νερό για 2 h, κατόπιν προστίθενται τα υπόλοιπα συστατικά και το διάλυμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο με συνεχή ανάδευση μέχρι να γίνει ομοιόμορφο. Φυλάγεται στο ψυγείο για πολλά χρόνια).

Μόνιμα παρασκευάσματα παρασκευάζονται με έγκλειση των τομών, αφού αυτά αφυδατωθούν, σε βάλαμο του Καναδά ή συνθετικά υλικά όπως το DPX που έχουν δείκτη διάθλασης παρόμοιο μ' εκείνο του γυαλιού και στερεοποιούνται σε χρονικό διάστημα μερικών ωρών.

Ένα συνηθισμένο πρόβλημα κατά την έγκλιση είναι ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα. Αυτό είναι δυνατόν να το αποφύγουμε όταν τοποθετήσουμε πρώτα τη μια ακμή της καλυπτρίδας στη σταγόνα του μέσου έγκλεισης υπό γωνία περίπου 45^ο έτσι που η ακμή να διαβραχεί, και στη συνέχεια την αφήσουμε να πέσει απαλά επάνω στο παρασκεύασμα όπως δείχνει η Εικόνα.



Εικόνα 5.3.1 Πως τοποθετείται η καλυπτρίδα για να μην παγιδευτούν φυσαλίδες στο παρασκεύασμα.

6. Μέτρηση μεγέθους αντικειμένων με το Οπτικό Μικροσκόπιο.

Η μέτρηση είναι μια σημαντική πληροφορία κατά την περιγραφή ενός αντικειμένου. Συνήθως είναι δυνατόν να περιγράψουμε με ακρίβεια ένα αντικείμενο αναφέροντας μερικά χαρακτηριστικά του όπως το σχήμα το χρώμα το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένο κλπ. Η κατάσταση αρχίζει να περιπλέκεται όταν προστεθεί ένα επίθετο ενδεικτικό του μεγέθους όπως μεγάλο, μικρό, λεπτό, παχύ κλπ. Έτσι είναι προφανές ότι το μέγεθος πρέπει να προσδιορίζεται με αντικειμενικά κριτήρια και αυτός είναι και ο λόγος που υπεισέρχεται ο παράγοντας μέτρηση.

Το μικροσκόπιο, αν και κατά κύριο λόγο είναι όργανο για την παρατήρηση αντικειμένων που δεν είναι ευδιάκριτα με γυμνό μάτι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν όργανο μέτρησης και ανάλυσης. Σε πολλές περιπτώσεις αυτή η μέτρηση μπορεί να είναι σημαντική για τον ποιοτικό έλεγχο ενός προϊόντος. Η διαφορά μεγέθους δυο μορφολογικά όμοιων αντικειμένων μπορεί να είναι καθοριστική για την ταυτοποίησή τους.

Υπάρχουν δυο διαφορετικά είδη μετρήσεων που μπορούν να γίνουν με το οπτικό μικροσκόπιο:

1. Οι γεωμετρικές μετρήσεις όπως είναι το μήκος, το πλάτος, το ύψους, η επιφάνειας, κλπ. και
2. Οι οπτικές μετρήσεις όπως είναι ο δείκτης διαθλάσεως, η απορρόφηση, η διαπερατότητα κλπ.

Εδώ θα μας απασχολήσουν μόνο οι γεωμετρικές μετρήσεις.

Όλες οι μετρήσεις μήκους βασίζονται σε μια σύγκριση του αντικειμένου με ένα άλλο γνωστών διαστάσεων ή με μια γνωστή κλίμακα. Στο μικροσκόπιο για να γίνει μια μέτρηση μήκους το αντικείμενο συγκρίνεται με μια κλίμακα, με μόνη τη διαφορά ότι η κλίμακα δεν μπορεί πάντοτε να τοποθετηθεί ανάμεσα στα σημεία που θέλουμε να μετρήσουμε, όπως γίνεται όταν θέλουμε να μετρήσουμε τις διαστάσεις ενός τραπέζιου. Εκτός από τις μετρήσεις που γίνονται με τη χρήση κλίμακας, υπάρχουν και μέθοδοι που χρησιμοποιούν επεξεργασία και ανάλυση εικόνας. Οι μέθοδοι αυτές αν και δίνουν εξαιρετική ακρίβεια δεν θα περιγραφούν εδώ γιατί διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων κατασκευαστών.

6.1. Προσδιορισμός μεγέθους με σύγκριση με κάποιο γνωστό μέγεθος ενσωματωμένο στο μικροσκόπιο.

Ο υπολογισμός του μεγέθους ενός αντικειμένου μπορεί να γίνει με τη σύγκρισή του με ένα άλλο γνωστού μεγέθους που προστίθεται στο παρασκεύασμα. Αυτή η μέθοδος είναι συνηθισμένη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Είναι όμως δυνατόν να χρησιμοποιηθούν χαρακτηριστικά του ίδιου του μικροσκοπίου με τα οποία γίνεται σύγκριση. Για ένα δεδομένο αντικειμενικό φακό η διάμετρος του οπτικού πεδίου είναι πάντοτε σταθερή (εφ' όσον βέβαια δεν αλλάζουν άλλα χαρακτηριστικά του μικροσκοπίου όπως το μήκος του οπτικού σωλήνα). Ο προσδιορισμός της διαμέτρου του οπτικού πεδίου μπορεί να γίνει με την παρατήρηση μιας κλίμακας ή ακόμα και ενός διαφανούς χάρακα, για τις χαμηλές μεγεθύνσεις τουλάχιστον. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να υπολογίσουμε τη διάμετρο του οπτικού πεδίου για κάθε συνδυασμό φακών.

6.2. Μέτρηση αντικειμένων με μικρομετρική κλίμακα τράπεζας μικροσκοπίου.

Τα περισσότερα εργαστηριακά και ερευνητικά μικροσκόπια είναι σήμερα εφοδιασμένα με μικρομετρικούς κοχλίες με βερνιέρο για την εύκολη και ακριβή μετακίνηση της αντικειμενοφόρου πλάκας επάνω στη τράπεζα του μικροσκοπίου ως προς δύο κάθετες διευθύνσεις x και y . Οι ίδιοι μικρομετρικοί κοχλίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση αντικειμένων μετρώντας πόσο μετακινήθηκε το αντικείμενο σε σχέση με κάποιο σταθερό σημείο του οπτικού πεδίου όπως είναι ένα σημείο της περιφέρειας του οπτικού πεδίου ή ακόμα και ένας κόκκος σκόνης στο φακό. Η ακρίβεια της μέτρησης με αυτό το τρόπο είναι προφανώς εκείνη της ακρίβειας της μικρομετρικής κλίμακας που συνήθως είναι της τάξης του 0.1 mm. Για να επιτευχθεί αυτή η ακρίβεια πρέπει ο παρατηρητής να βλέπει το παρασκεύασμα πάντα με τα μάτια του στην ίδια απόσταση από τον προσοφθάλμιο φακό ενώ και η γωνία παρατήρησης να είναι η ίδια. Οι μετρήσεις πρέπει ακόμα να γίνονται με μετακίνηση του μικρομετρικού κοχλία προς την ίδια πάντα κατεύθυνση έτσι ώστε το διάκενο (τζόγος) του κοχλία να μην επηρεάζει τη μέτρηση. Με αυτό το τρόπο είναι δύσκολο να μετρηθούν αντικείμενα μικρότερα από 0.15 - 0.20 mm σε μήκος.

6.3. Μικροσκόπια για μέτρηση.

Τα μικροσκόπια αυτά είναι ειδικά κατασκευασμένα για τη μέτρηση του μήκους αντικειμένων. Στην παλαιότερή τους μορφή η μέτρηση γινόταν μηχανικά με τη μικρότερη οριζόντια μετακίνηση του σώματος του μικροσκοπίου σε σχέση με τη τράπεζα που είναι σταθερή. Στα σύγχρονα

μικροσκόπια μέτρησης υπάρχει ψηφιακή ένδειξη (X - Y) της μετακίνησης της τράπεζας του μικροσκοπίου.

Αυτό μπορεί να γίνει με τη χρήση μικρομετρικής κλίμακας του προσοφθάλμιου φακού. Αυτή είναι μια κλίμακα χαραγμένη σε ένα κυκλικό γυαλί που τοποθετείται μέσα στο προσοφθάλμιο φακό (Εικόνα) και σε τέτοια θέση που ο παρατηρητής να μπορεί να παρατηρεί συγχρόνως τη κλίμακα και το παρασκευάσμα. Η κλίμακα αυτή προφανώς για να χρησιμοποιηθεί πρέπει πρώτα να βαθμονομηθεί (καλιμπραριστεί). Αυτό μπορεί να γίνει με τη χρήση μιας αντικειμενοφόρου πλάκας που έχει χαραγμένη επάνω της μια κλίμακα. Συνήθως αυτή η μικρομετρική κλίμακα έχει γραμμές χαραγμένες ανά 1.0 mm,

0.1 mm και 0.01 mm. Παρατηρώντας συγχρόνως τις δυο κλίμακες με το μικροσκόπιο μπορούμε να βαθμολογήσουμε το μικροσκόπιο για τους διάφορους αντικειμενικούς φακούς που διαθέτει. Για να το κάνουμε αυτό μετακινούμε τη κλίμακα της τράπεζας έτσι που μια από τις γραμμές της να συμπίπτει με μια από τις γραμμές της κλίμακας του προσοφθάλμιου φακού. Μετράμε τον αριθμό των γραμμών της κλίμακας του προσοφθάλμιου που είναι ανάμεσα σε δυο γραμμές της κλίμακας της τράπεζας του μικροσκοπίου. Αν η απόσταση ανάμεσα σε δυο γραμμές της κλίμακας της τράπεζας είναι, για παράδειγμα, 100 μm και μετρήσουμε x γραμμές της κλίμακας του προσοφθάλμιου ανάμεσα σ' αυτές τις γραμμές τότε κάθε υποδιαίρεση του προσοφθάλμιου είναι $100/x \mu\text{m}$. Ανάλογα με τη μέτρηση που θέλουμε να κάνουμε υπάρχουν και διαφορετικές κλίμακες που έχουν χαραγμένες γωνίες, ομόκεντρους κύκλους, αλληλοκάθετες κλίμακες κ.ά.



Κλίμακα προσοφθάλμιου



Αντικειμενοφόρος με κλίμακα

Εικόνα 6.3.1 Κλίμακες που τοποθετούνται στο μικροσκόπιο για μέτρηση.

Τα είδη των παρασκευασμάτων που θα χρειαστεί να παρατηρήσει ένας Γεωπόνος μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες Βιολογικά (ή Βιολογικής προέλευσης) και μη Βιολογικά (ορυκτά, μέταλλα, πλαστικά). Εδώ θα ασχοληθούμε περισσότερο με τα Βιολογικά ή Βιολογικής προέλευσης παρασκευάσματα ενώ θα γίνει και μια σύντομη περιγραφή μικροσκοπικών μεθόδων για τη παρατήρηση μη βιολογικών παρασκευασμάτων.

6.4. Οι δέκα εντολές στην οπτική μικροσκοπία.

Είναι πολύ συνηθισμένο, στις μέρες μας να βλέπουμε σε περιοδικά βιβλία και εγκυκλοπαίδειες φωτογραφίες τραβηγμένες με ένα κοινό μικροσκόπιο και να είναι κακής ποιότητας. Το περίεργο είναι ότι πολλές από αυτές είναι τραβηγμένες με υπερσύγχρονα αυτόματα μικροσκόπια. Όπως όμως ένα καλό και ακριβό αυτοκίνητο δε διορθώνει τα λάθη του οδηγού έτσι και ένα καλό μικροσκόπιο για να δείξει τις δυνατότητές του πρέπει να ακολουθηθούν μερικοί απλοί κανόνες.

1. Το προς παρατήρηση αντικείμενο πρέπει να είναι καθαρό, ειδικά η καλυπτρίδα δεν πρέπει να έχει υπολείμματα ή γραμμές από λάδι κατάδυσης. Εξέταση της καλυπτρίδας με φως που αντανακλάται επάνω της θα μας δείξει τέτοιους ρύπους που επιδρούν σημαντικά στη ποιότητα της εικόνας. Στα σύγχρονα ερευνητικά μικροσκόπια υπάρχουν πολύπλοκα συστήματα φωτισμού και συμπυκνωτών φακών που ενισχύουν αυτού του είδους τα σφάλματα.
2. Η καθαρότητα του αντικειμενικού φακού είναι συχνά πιο σημαντική από την ποιότητά του. Ένα μικρό ίχνος λαδιού σ' ένα στεγνό επίπεδο - αποχρωματικό αντικειμενικό φακό, μειώνει την ικανότητά του σ' εκείνη ενός καθαρού αχρωματικού. Το ίδιο συμβαίνει και μ' ένα αρρυθμιστο συμπυκνωτή φακό.
3. Οι αντικειμενικοί φακοί έχουν διάφορα αριθμητικά ανοίγματα που σχετίζονται με την εστιακή τους απόσταση και το βαθμό διόρθωσης που κάνουν στα οπτικά σφάλματα (σφαιρικά ή χρωματικά). Έχουν καλύτερη απόδοση όταν το διάφραγμα του συμπυκνωτή φακού, είναι λίγο μικρότερο από τη διάμετρο του φωτεινού κώνου που μπορεί να δεχτεί ο αντικειμενικός φακός. Αυτή η ρύθμιση γίνεται με την ίριδα του συμπυκνωτή φακού. Αυτό στη πράξη απλά μπορεί να γίνει αν βγάλουμε το προσοφθάλμιο φακό και κοιτάζοντας μέσα στο σωλήνα, κλείσουμε την ίριδα έτσι που να σκεπαστεί περίπου το $1/3$ - $1/4$ της διαμέτρου του φωτεινού δίσκου που βλέπουμε μέσα στο σωλήνα. Αυτή η τεχνική θα δώσει καλό αποτέλεσμα σε ένα χρωματισμένο παρασκεύασμα με σχετικά καλή αντίθεση. Όταν η ίριδα είναι πολύ ανοιχτή μειώνεται η αντίθεση. Μικρότερη ίριδα προκαλεί διάθλαση και περίθλαση του φωτός με αποτέλεσμα την αύξηση μεν της αντίθεσης αλλά τη χειροτέρευση της διακριτικής ικανότητας και παραμόρφωση της εικόνας. Αυτό όμως πολλές φορές είναι αναπόφευκτο όταν θέλουμε να παρατηρήσουμε παρασκευάσματα αχρωμάτιστα που από τη φύση τους έχουν χαμηλή αντίθεση όπως π.χ. αχρωμάτιστα ζωικά κύτταρα.
4. Ένα σωστά ρυθμισμένο σύστημα φωτισμού Kohler εξασφαλίζει καλή αντίθεση επειδή φωτίζεται μόνο η περιοχή του παρασκευάσματος που παρατηρούμε και έτσι δεν υπάρχουν "αδέσποτες" φωτεινές ακτίνες. Αυτό το σύστημα φωτισμού δίνει καλύτερη εικόνα όσον αφορά την αντίθεση, δεν υπάρχει όμως διαφορά στη διακριτική ικανότητα συγκρινόμενο με το απλό σύστημα φωτισμού όπου εστιάζεται η σημειακή πηγή.
5. Τα σύγχρονα μικροσκόπια διαθέτουν ισχυρά φωτιστικά συστήματα χαμηλής τάσης. Η ένταση του φωτός που παρατηρούμε μέσα στο

μικροσκόπιο πρέπει να συγκρίνεται με εκείνη του φωτός ημέρας. Χαμηλή φωτεινή ένταση δε δείχνει όλες τις λεπτομέρειες του παρασκευάσματος ενώ πολύ δυνατή ένταση πρέπει να αποφεύγεται για προφανείς λόγους. Μείωση της φωτεινότητας ελαττώνοντας τη τάση του ρεύματος έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοκρασίας του νήματος της λάμπας και τη παραγωγή ερυθρής και υπέρυθρης ακτινοβολίας. Αυτό κυρίως επηρεάζει τη φωτογράφιση (όταν το film είναι έγχρωμο), αλλά και τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου αφού αυτή είναι συνάρτηση του μήκους κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται. Για τους λόγους αυτούς για τη μείωση του φωτισμού συνιστάται η χρήση ουδέτερων (γκρι) φίλτρων και ποτέ το κλείσιμο της ίριδας.

6. Ακόμα και σε μια πολύ "ζεστή" λάμπα αλογόνου 12 V 100 W η ενέργεια που μετατρέπεται σε φως είναι ελάχιστη. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης ακτινοβολίας είναι με τη μορφή θερμότητας όπως η υπέρυθρη, ενώ και στο ορατό φάσμα κυριαρχεί το κόκκινο. Επομένως παρατήρηση ή φωτογράφιση με "κοινό" φωτισμό σημαίνει κυρίως "κόκκινες εικόνες". Αυτό μπορεί να διορθωθεί με τη χρήση φίλτρων συμβολής χρώματος κίτρινου-πράσινου με μέγιστη διαπερατότητα γύρω στα 550 nm. Αυτά τα φίλτρα ενισχύουν την αντίθεση με τις περισσότερες χρωστικές "ρουτίνας" και πολύ καλύτερα από τα συνηθισμένα μπλε φίλτρα φωτός ημέρας που αφαιρούν ένα σημαντικό μέρος του φωτός από τη μέση του φάσματος. Άλλος τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι η χρησιμοποίηση film τεχνητού φωτισμού (films που έχουν την ένδειξη "tungsten" γραμμένη στη συσκευασία).
7. Επιλογή αντικειμενικού φακού. Ούτε ο μέγιστος βαθμός διόρθωσης αλλά ούτε η μεγαλύτερη δυνατή διακριτική ικανότητα είναι πάντα αυτό που ζητάμε. Συχνά οι φακοί μ' αυτά τα προσόντα έχουν πολύ μικρή απόσταση εργασίας. Ένας φακός με χαρακτηριστικά 100X και α.α.=1.3 ελαιοκαταδυτικός, για να αποδώσει σωστά χρειάζεται τομές πάχους το πολύ 6 μm ενώ το βάθος εστίασης του είναι λιγότερο από 1 μm που σημαίνει ότι τα τμήματα του παρασκευάσματος εκτός εστίασης μειώνουν αισθητά τις δυνατότητες του φακού. Στην ίδια όμως τελική μεγέθυνση και με καλύτερα αποτελέσματα μπορούμε να φτάσουμε με λιγότερο ισχυρό φακό με χαμηλότερο α.α. (που σημαίνει μεγαλύτερο βάθος εστίασης) και μεγεθύνοντας λίγο περισσότερο τη φωτογραφία. Οι περισσότεροι κατασκευαστές μικροσκοπίων σήμερα παράγουν φακούς ελαιοκαταδυτικούς αντικειμενικούς zoom X50-63 (με α.α. 1.10-1.25) που προτιμούνται από τους παραδοσιακούς X100 με α.α. 1.3, εκτός αν παρατηρούμε λεπτά επιχρίσματα ή πλαστικές τομές πάχους λεπτότερες του 1 μm. Αυτοί οι X50-63 επισκιάζουν κατά πολύ τους κλασσικούς ξερούς φακούς αντίστοιχης μεγέθυνσης επειδή δεν επηρεάζονται από τα σφάλματα που προκαλούνται από τις "αδέσποτες" φωτεινές ακτίνες.
8. Οι σύγχρονοι προσοφθάλμιοι φακοί προσφέρουν πιο άνετη παρατήρηση ακόμα και σ' εκείνους που φοράνε γυαλιά επειδή το μάτι εστιάζει πιο μακριά από το φακό και έχει μεγαλύτερο οπτικό πεδίο από εκείνο των φακών Huygens ή Ramsden.
9. Η ενδιάμεση εικόνα που περιέχει όλες τις λεπτομέρειες που έχουν παραχθεί από τον αντικειμενικό φακό εστιάζεται και μεγεθύνεται από τον προσοφθάλμιο έτσι που να φαίνεται καλά από το ανθρώπινο μάτι. Για άνετη παρατήρηση, ο προσοφθάλμιος σε σχέση με το μάτι πρέπει να

ρυθμίζεται έτσι που το είδωλο να φαίνεται ότι βρίσκεται σε μια απόσταση 2-4 m.

10. Μια μικροφωτογραφία δε μπορεί ποτέ να βελτιώσει την εικόνα που φαίνεται με το μάτι (εκτός από ειδικές περιπτώσεις πολύ χαμηλού φωτισμού). Από την άλλη πλευρά μικροφωτογραφίες που απογοητεύουν, συχνά είναι αποτέλεσμα υποτίμησης των ικανοτήτων του ανθρώπινου συστήματος μάτι -εγκέφαλος που έχει την ικανότητα να αντισταθμίζει τον ανομοιόμορφο φωτισμό ή τη σφαιρικότητα της εικόνας. Αυτές όμως οι ατέλειες εμφανίζονται στη φωτογραφία και εδώ η μόνη λύση είναι καλής ποιότητας αντικειμενικοί φακοί με καλές διορθωτικές ικανότητες.

7. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.

Ο όρος Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο αν και λανθασμένος έχει επικρατήσει στην Ελληνική ορολογία. Πιο σωστά θα έπρεπε να ονομάζεται Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο επειδή η ακτινοβολία που χρησιμοποιεί είναι επιταχυνμένα ηλεκτρόνια. Η λέξη ηλεκτρονικό, όπως έχει επικρατήσει στην Ελληνική γλώσσα, σημαίνει απλά ότι είναι μια ηλεκτρονική συσκευή όπως και ένα ραδιόφωνο. Ο αντίστοιχος Αγγλικός όρος που έχει επικρατήσει είναι Electron Microscope και όχι Electronic όπως λάθος πολλοί το αναφέρουν.

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

$$\lambda = 0.1 \text{ (150/V)}$$

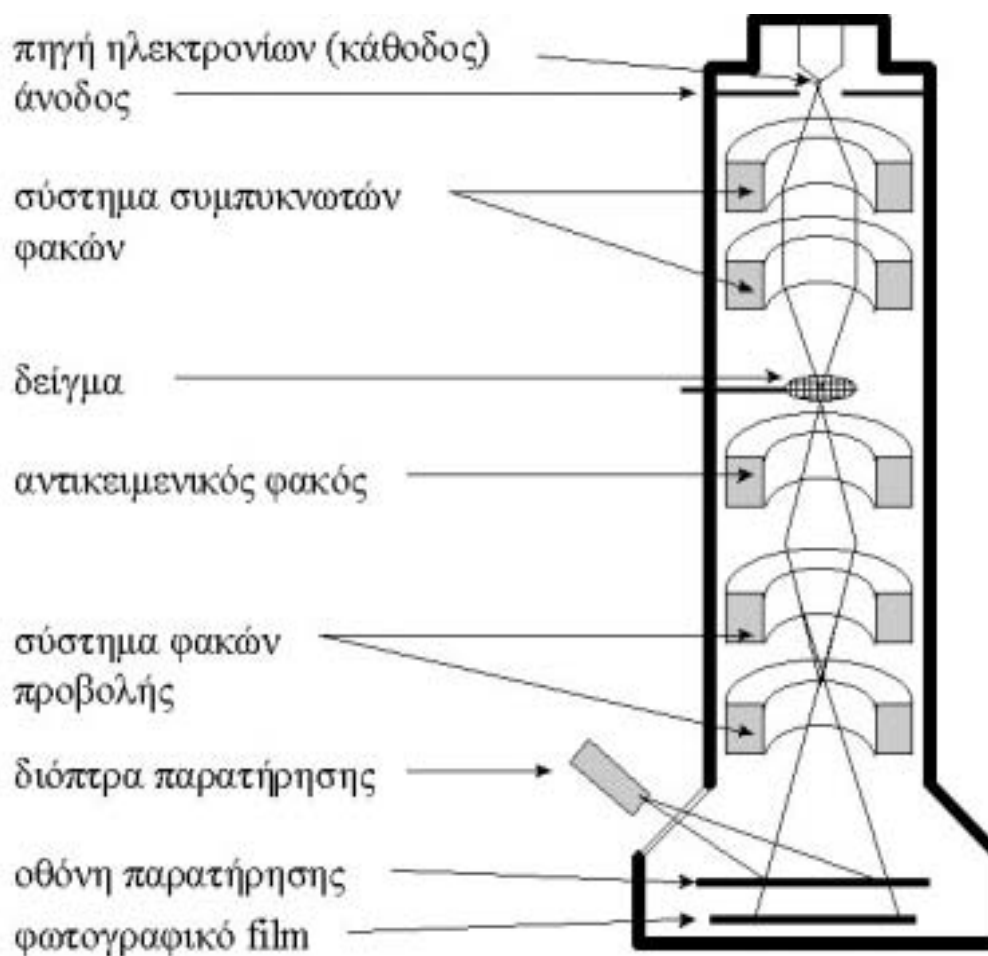
όπου V είναι η τάση επιτάχυνσης των σωματιδίων σε Volts. Έτσι για μια τάση επιτάχυνσης 80 kV, που είναι μια συνηθισμένη τάση λειτουργίας ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (ΗΜΔ), το μήκος κύματος λ γίνεται μόνο $\lambda = 0.004$ nm, η διακριτική όμως ικανότητα δε μικραίνει τόσο όσο θα περιμέναμε γιατί το αριθμητικό άνοιγμα (A) των ηλεκτρομαγνητικών φακών είναι σχετικά χαμηλό επειδή η κατασκευή τους είναι πολύ "κακή" σε σχέση με εκείνη των γυάλινων φακών. Έτσι η πραγματική διακριτική ικανότητα ενός ΗΜΔ είναι σήμερα μόνο (!) περίπου 0.15 nm που είναι όμως αρκετή για τη παρατήρηση του βιολογικού κόσμου.

7.1 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Transmission Electron Microscope).

Εδώ δίνεται μόνο μια σύντομη απλοποιημένη περιγραφή της κατασκευής και λειτουργίας του κλασσικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Περισσότερες πληροφορίες όσοι ενδιαφέρονται μπορούν να βρουν στα σχετικά κεφάλαια ειδικών βιβλίων (όπως του Glauert, 1974).

Στο ΗΜΔ (Εικόνα) η φωτεινή πηγή έχει αντικατασταθεί με μια πηγή ηλεκτρονίων που δεν είναι τίποτα άλλο από ένα νήμα βολφραμίου (ή ακίδα LaB6) στα πιο σύγχρονα μικροσκόπια) που πυρακτώνεται και έτσι εκπέμπει ηλεκτρόνια όταν περάσει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα. Ανάμεσα σ' αυτό το νήμα, που είναι η κάθοδος, και την άνοδο, εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV) που επιταχύνει τα ηλεκτρόνια των οποίων η πορεία ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς στους οποίους αλλάζοντας την ένταση του ρεύματος που τους διαπερνάει μπορούμε να μεταβάλλουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου τους (δηλαδή την εστιακή τους απόσταση) και επομένως να εστιάσουμε τη δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα (συγκεντρωτής φακός, condenser lens), ή να εστιάσουμε την εικόνα στην οθόνη (αντικειμενικός φακός, objective lens), ή να μεταβάλλουμε τη μεγέθυνση (φακοί περίθλασης, ενδιάμεσοι και προβολής,

diffraction, intermediate και projector lenses αντίστοιχα). Η εικόνα σχηματίζεται πάνω σε μια οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία που διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της αφού διαπεράσουν το παρασκευάσμα. Τα σημεία του παρασκευάσματος που δεν είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια μας δίνουν σκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιόφιλες, ηλεκτρονικά πυκνές, electron dense) ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονικά διαφανή, electron lucent) μας δίνουν φωτεινές περιοχές. Αυτή η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται με την εκλεκτική "χρώση" του παρασκευάσματος, όπως θα δούμε πιο κάτω.



Εικόνα 7.1.1 Σχηματική παράσταση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.

Φυσικά αυτές τις εικόνες εκτός του ότι μπορούμε να τις παρατηρήσουμε απ' ευθείας στην οθόνη του μικροσκοπίου, ή σε ένα βοηθητικό monitor, μπορούμε και να τις φωτογραφίσουμε με τις ειδικές φωτογραφικές μηχανές που είναι πάντα ενσωματωμένες στα μικροσκόπια. Τα πιο σύγχρονα μικροσκόπια διαθέτουν συσσωματωμένα (on board) ή είναι συνδεδεμένα με μικροϋπολογιστή και έτσι μπορεί να γίνει αποθήκευση της εικόνας με ψηφιοποίηση, μέθοδος που δίνει την ευχέρεια περαιτέρω ανάλυσης και επεξεργασίας της. Τέλος επειδή τα ηλεκτρόνια δε μπορούν να

ταξιδέψουν στον αέρα, το όλο σύστημα, πηγή ηλεκτρονίων, φακοί, παρασκευάσμα, οθόνη και σύστημα φωτογράφισης πρέπει να βρίσκονται σε υψηλό κενό της τάξης των 10⁻⁴ Torr τουλάχιστο. Ο τρόπος που δουλεύει το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μας βάζει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που μπορούμε να παρατηρήσουμε. Έτσι ένα δείγμα για να είναι δυνατό να το παρατηρήσουμε με το κλασσικό ΗΜΔ και με τις κλασσικές μεθόδους θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

- α. να αντέχει σε υψηλό κενό,**
- β. να είναι σταθερό στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων,**
- γ. να είναι αρκετά λεπτό για να μπορούν να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια, και**
- δ. να επιτρέπει διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων.**

Αυτές οι ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα παρασκευάσμα, μας περιορίζουν στο να μπορούμε να εξετάσουμε μόνο δείγματα μονιμοποιημένα (νεκρά), αφυδατωμένα, κομμένα σε πολύ λεπτές τομές (πάχος 50-100nm) και "χρωματισμένα" με "χρωστικές" που περιέχουν βαριά μέταλλα, όπως για παράδειγμα είναι ο μόλυβδος και το ουράνιο. Επόμενο είναι ύστερα απ' όλη αυτή τη ταλαιπωρία που έχει υποστεί το δείγμα να παρουσιάζει και τεχνητές αλλοιώσεις (artefacts). Η εφαρμογή όμως νέων τεχνικών (π.χ. φυσική μονιμοποίηση κλπ, όπως θα δούμε πιο κάτω), η κατασκευή μηχανημάτων σύγχρονης τεχνολογίας και η παραγωγή νέων και πιο καθαρών χημικών έχουν ουσιαστικά εξαλείψει τα artefacts και έχουν βελτιώσει σημαντικά την εικόνα που παρατηρούμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ενδεικτικά, εδώ αναφέρονται μερικές χρονολογίες κατά τις οποίες παρατηρήθηκαν τα παρακάτω οργανίδια ή κυτταρικές δομές:

- 1947 η λεπτή δομή των μιτοχονδρίων
- 1948 τα μικροϊνίδια κυτταρίνης
- 1953 η έλικα του DNA και η λεπτή δομή των χλωροπλαστών
- 1954 το πλασμαλείμα, οι αμυλοπλάστες, τα ριβοσωμάτια, η πυρηνική μεμβράνη και τα χρωμοσώματα.
- 1957 το ενδοπλασματικό δίκτυο και οι πλασμοδέσμες.

Έτσι βλέπουμε ότι κατά τις δεκαετίες του '40 και του '50 ανακαλύφθηκαν σχεδόν όλα τα γνωστά μας κυτταρικά οργανίδια και δομές και αυτό οφείλεται στη παράλληλη παραγωγή νέων υλικών και μηχανημάτων όπως οι εποξικές ρητίνες, τα μεθακρυλικά και οι υπερμικροτόμοι. Σήμερα μπορεί να μη γίνονται νέες ανακαλύψεις οργανιδίων με το ΗΜ αλλά οι καινούργιες τεχνικές και υλικά μας επιτρέπουν να συνδέσουμε τη δομή με τη λειτουργία, όπως θα δούμε πιο κάτω, με αποτέλεσμα τη καλύτερη κατανόηση των διαφόρων λειτουργιών όχι μόνο στο επίπεδο κυττάρου αλλά ακόμα και στο μοριακό επίπεδο. Τέλος οι εφαρμογές του ΗΜΔ δε περιορίζονται μόνο στη βιολογική έρευνα αλλά και σε άλλες επιστήμες όπως η ορυκτολογία, επιστήμες υλικών καθώς επίσης και στον έλεγχο υλικών και τροφίμων στις βιομηχανίες και τη διάγνωση στην Ιατρική.

7.2. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ.

7.2α. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο ΗΜΔ.

Στη προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκαν τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα δείγμα για να παρατηρηθεί με το ΗΜΔ. Για να αποκτήσει το δείγμα αυτά τα χαρακτηριστικά πρέπει να υποστεί την επεξεργασία που αναφέρεται σε γενικές γραμμές παρακάτω. Η επεξεργασία δειγμάτων που αναφέρεται εδώ είναι πολύ γενικευμένη, δεν αποτελεί δηλαδή πρωτόκολλο, και είναι για την επεξεργασία κομματιών ιστού ή κυττάρων καθώς επίσης και οργανιδίων που μπορούμε να τα πάρουμε σε μορφή ιζήματος.

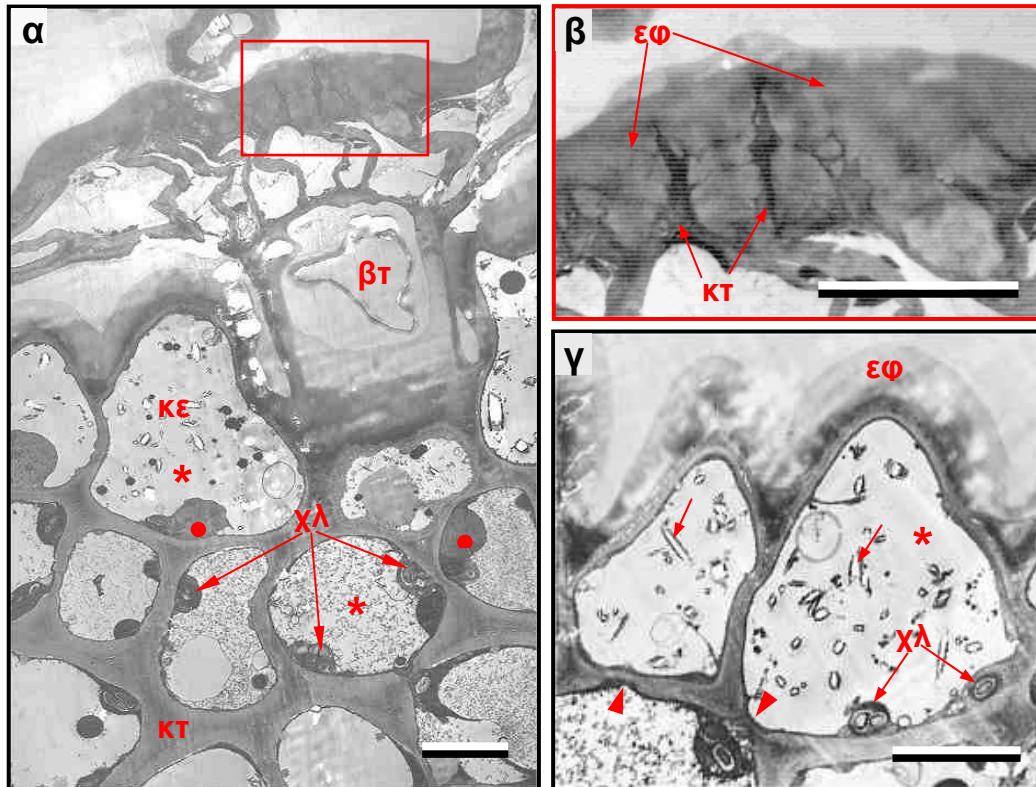
α. Μονιμοποίηση (στερέωση, καθήλωση, προσήλωση, fixation). Έχει σα σκοπό την ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου και μπορεί να επιτευχθεί με χημικούς και φυσικούς τρόπους. Οι χημικοί τρόποι περιλαμβάνουν επεξεργασία του δείγματος με ουσίες όπως οι αλδεΐδες (φορμαλδεΐδη HCHO , παραφορμαλδεΐδη, γλουταρική αλδεΐδη $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ και μίγματά τους) ή άλλες ουσίες όπως η ακρολεΐνη $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$, το τετροξειδίο του οσμίου OsO_4 , το υπερμαγγανικό κάλιο KMnO_4 , κ.ά. διαλυμένα σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα (φωσφορικά, κακοδυλικό νάτριο, veronal acetate, PIPES κλπ.) των οποίων η συγκέντρωση και το pH πρέπει να είναι ρυθμισμένα με μεγάλη ακρίβεια. Οι φυσικοί τρόποι μονιμοποίησης χρησιμοποιούν γρήγορη ψύξη του δείγματος, συνήθως με υγρό N_2 ή Freon σε θερμοκρασία υγρού N_2 , όπως ψυκτοξήρανση (freeze-drying), ψυκτοαντικατάσταση (freeze-substitution), ψυκτοεμαχισμό (freeze-fracture) ψυκτοεξάχνωση (freeze-etching). Αυτές οι μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες γιατί ελαχιστοποιούν τη δημιουργία τεχνητών αλλοιώσεων (artefacts), αποφεύγεται η απομάκρυνση ουσιών από τους ιστούς ή τα κύτταρα, κάτι πολύ συνηθισμένο με τις κλασσικές μεθόδους και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε περιπτώσεις όπου χρειάζεται να διατηρηθεί η δραστηριότητα ουσιών όπως τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA, RNA) ή οι πρωτεΐνες (ένζυμα).

β. Αφυδάτωση. Σ' αυτό το στάδιο γίνεται αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη ή ακετόνη και στη συνέχεια με τον ενδιάμεσο διαλύτη 1,2εποξυπροπάνιο (προπυλενοξειδίο) που είναι διαλύτης των εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο.

γ. Εμπότιση -έγκλειση. Για να μπορέσει να κοπεί ένα βιολογικό παρασκεύασμα σε λεπτές τομές θα πρέπει το μέσο αφυδάτωσης ν' αντικατασταθεί με το μέσο έγκλεισης που πριν πολυμεριστεί είναι υγρό και στερεοποιείται με πολυμερισμό όταν εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 70°C) ή υπεριώδη ακτινοβολία. Τα μέσα έγκλεισης είναι συνήθως εποξικές ρητίνες με διάφορα ονόματα όπως Araldite, Spurr, LR-White κ.ά.

δ. Τμήση τομών. Τα δείγματα κατόπιν κόβονται σε πολύ λεπτές τομές, πάχους 50-100 nm, με τον υπερμικροτόμο, και τοποθετούνται πάνω σε ειδικά πλέγματα (grids) που τοποθετούνται στο ΗΜΔ.

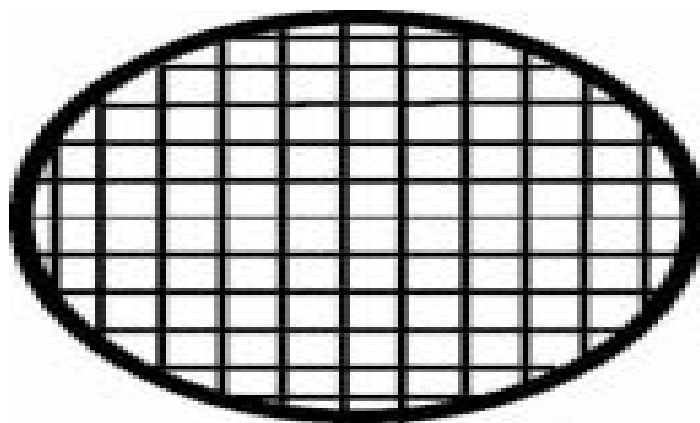
ε. Χρώση. Συνήθως τα βιολογικά δείγματα είναι τελείως διαπερατά από τα ηλεκτρόνια γιατί τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται είναι συνήθως C, H, O και N που είναι πολύ ελαφριά για να σκεδάσουν τα επιταχυνμένα ηλεκτρόνια και να δώσουν την απαιτούμενη αντίθεση (contrast). Γι' αυτό το λόγο χρειάζεται να τα "χρωματίσουμε" με χημικές ουσίες που δεσμεύονται εκλεκτικά από τα διάφορα συστατικά του κυττάρου με αποτέλεσμα τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων και το σχηματισμό της εικόνας. Οι πιο συνηθισμένες χρωστικές για τη χρώση τομών είναι το οξικό ουρανύλιο, ο κιτρικός μόλυβδος και το υπερμαγγανικό κάλιο.



Εικόνα 7.2α.1 Εγκάρσιες τομές της περιοχής της επιδερμίδας πολύ νεαρών βλαστών ελιάς, ηλικίας πέντε περίπου εβδομάδων, όπως φαίνονται με το Η.Μ.Δ. (α) μικροφωτογραφία της περιοχής της επιδερμίδας και των εξώτατων κυττάρων του κολλεγχυματικού ιστού εσωτερικά αυτής, (β) λεπτομέρεια της προηγούμενης στην οποία διακρίνεται το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα του ασπιδίου τρίχας και το στρώμα εφυμενίδας που το καλύπτει, (γ) λεπτομέρεια επιδερμικών κυττάρων. εφ=εφυμενίδα, κε=κύτταρο επιδερμίδας, χλ=χλωροπλάστες, κτ=κυτταρικό τοίχωμα, βτ=βάση τρίχας, ●: πυρήνας, *: χυμοτόπιο. Οι κεφαλές βελών δείχνουν βοθρία ενώ τα βέλη δείχνουν κρυστάλλους. Η κλίμακα έχει μήκος 5 μm.

7.2β. Τα πλέγματα (grids).

Αυτά είναι ειδικά κατασκευασμένα πλέγματα (Εικόνα) που υποκαθιστούν τις αντίστοιχες αντικειμενοφόρους πλάκες του οπτικού μικροσκοπίου. Αυτά είναι μικρά πολύ λεπτά), διαμέτρου 3 mm κατασκευασμένα συνήθως από χαλκό ή άλλα μέταλλα όπως ο χρυσός ή πλατίνα και το νικέλιο όταν ο χαλκός αντιδρά χημικά με τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται ή ακόμα και από άνθρακα όταν στο παρασκεύασμα πρόκειται να γίνει μικροανάλυση με ακτίνες Χ. Πολλές φορές για να σταθούν οι τομές επάνω στο πλέγμα τοποθετείται μια πολύ λεπτή μεμβράνη πλαστική ή από άνθρακα ή και τα δύο. Τα πλέγματα υπέχουν στο εμπόριο με διαφορετικά μεγέθη ανοιγμάτων που μπορεί να έχουν σχήμα τετράγωνο, ορθογώνιο παραλληλόγραμμο ή και εξαγωνικό. Τα μεγέθη συνήθως αναφέρονται σαν G75, G150, G300 κλπ. Και σημαίνουν 75, 150 ή 300 ανοίγματα ανά τρέχουσα ίντσα.



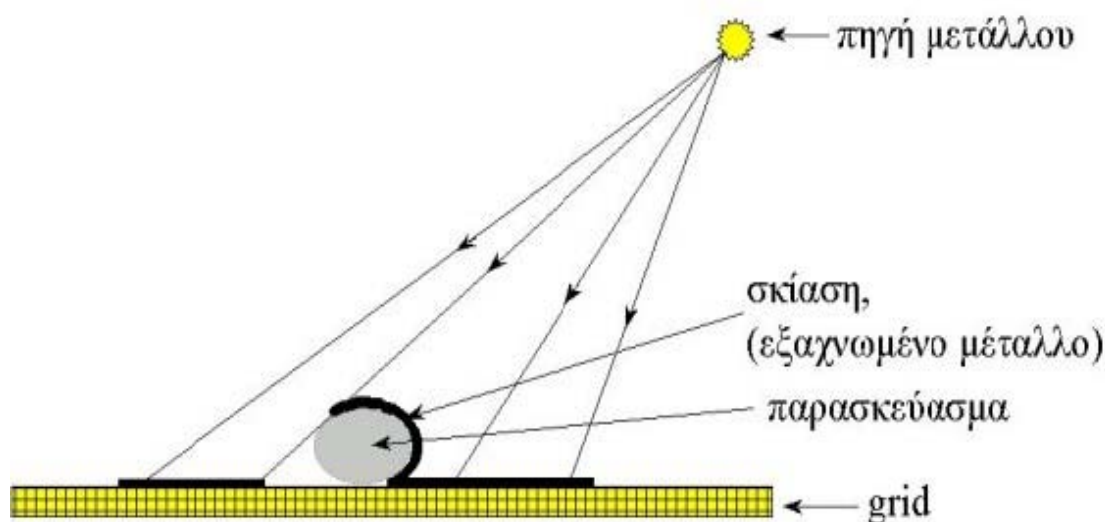
Εικόνα 7.2β.1 Πλέγμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

7.2γ. Αρνητική χρώση (Negative staining).

Ορισμένες κατηγορίες κυττάρων, μικροοργανισμών ή μεγαλομορίων των οποίων δε μας ενδιαφέρει άμεσα η εσωτερική τους δομή (βακτηρίδια, ιοί, πρωτεϊνικά μόρια, νουκλεϊνικά οξέα κλπ.) μπορούν να παρατηρηθούν με το ΗΜΔ με αρνητική χρώση. Με αυτή τη μέθοδο συνήθως το παρασκεύασμα δε χρειάζεται να μονιμοποιηθεί παρά μόνο να τοποθετηθεί και απλωθεί πάνω στα πλέγματα (grids) που είναι καλυμμένα με μια πολύ λεπτή μεμβράνη, από πλαστικό ή άνθρακα. Στη συνέχεια γίνεται η χρώση με ένα διάλυμα που περιέχει ένα βαρύ μέταλλο όπως για παράδειγμα το φωσφοβολφραμικό οξύ (ΡΤΑ), το μολυβδαινικό αμμώνιο, το οξικό ουρανύλιο, η βολφραμική μεθυλαμίνη, το μυρμηκικό ουρανύλιο ή συνδυασμούς τους. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή και γρήγορη και ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση ιώσεων φυτών και ζώων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό και με άλλες ιστοχημικές ή ανοσοβιολογικές μεθόδους.

7.2δ. Σκίαση (Shadowing).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη παρατήρηση δειγμάτων όπως και της προηγούμενης παραγράφου ή σε συνδυασμό με τη ψυκτοεξάχνωση. Και στις δυο περιπτώσεις το δείγμα βομβαρδίζεται μ' ένα βαρύ μέταλλο (συνήθως Pt) υπό γνωστή γωνία με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σκιές πάνω στο δείγμα και οι οποίες σχετίζονται με τη τοπογραφία του παρασκευάσματος. Αυτή η μέθοδος είναι και η πρώτη που χρησιμοποιήθηκε για τη παρατήρηση βιολογικών παρασκευασμάτων (ιών). Σήμερα η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται πολύ σπάνια και μόνο σε ειδικές περιπτώσεις λόγω του ότι είναι δύσκολη χρονοβόρα και απαιτεί μεγάλη εμπειρία. Η διαδικασία της σκίασης γίνεται σε κενό αέρος σε ειδικές συσκευές, γνωστές σαν εξαχνωτές, όπου το παρασκεύασμα τοποθετείται σε γνωστή απόσταση και γωνία από το υπό εξάχνωση μέταλλο (Εικόνα). Το μέταλλο κατόπιν θερμαίνεται με βολταϊκό τόξο σε τέτοια θερμοκρασία που επιτυγχάνεται η εξάχνωσή του.



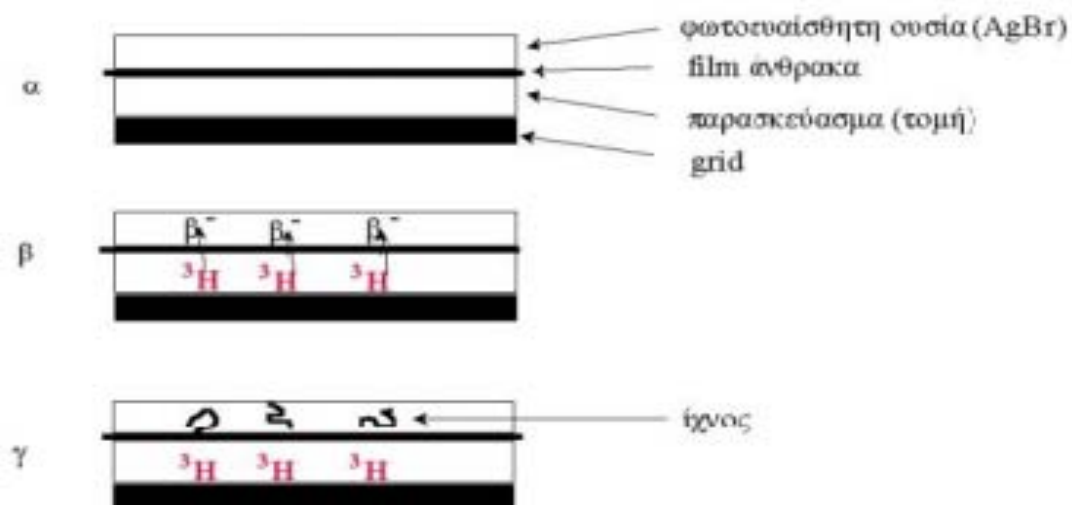
Εικόνα 7.2δ.1 Σχηματική παράσταση της διαδικασίας της σκίαση παρασκευάσματος με μέταλλο.

7.2ε. Αυτοραδιογραφία (Autoradiography).

Η αυτοραδιογραφία είναι μια μέθοδος για τον εντοπισμό ραδιενεργών ατόμων σ' ένα παρασκευάσμα. Η μέθοδος αυτή αρχικά αναπτύχθηκε για το οπτικό μικροσκόπιο και μετά επεκτάθηκε και στο ΗΜΔ ενώ η ίδια μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με τις μεθόδους της χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης όταν θέλουμε να εντοπίσουμε κάποιες σημασμένες με ραδιενεργά ισότοπα ουσίες. Η μέθοδος συνοψίζεται στην Εικόνα

Οι ιστοί είτε επωάζονται σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας (in vitro), είτε τους γίνεται ένεση in vivo με υλικά που περιέχουν ραδιενεργά ισότοπα που ενσωματώνονται στα κύτταρα. Οι ιστοί κατόπιν μονιμοποιούνται, εμποτίζονται και κόβονται σε ημίλεπτες τομές πάχους περίπου 1-2 μm για το οπτικό μικροσκόπιο) ή υπέρλεπτες (πάχους περίπου 50-100 nm για το ΗΜΔ). Η ανίχνευση των ραδιοϊσοτόπων γίνεται με τη τοποθέτηση πάνω στη τομή ενός φωτογραφικού film ή γαλακτώματος. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα τα ραδιενεργά ισότοπα του δείγματος εκπέμπουν ακτινοβολίες που προσβάλλουν τους κρυστάλλους βρωμιούχου αργύρου του φωτογραφικού film ή του γαλακτώματος και οι οποίοι στο τέλος του χρόνου έκθεσης ανάγονται από τα υγρά εμφάνιση σε μεταλλικό άργυρο.

Οι κρύσταλλοι που δεν έχουν προσβληθεί από ραδιενεργό ακτινοβολία φεύγουν με τη στερέωση. Οι περιοχές του δείγματος που έχουν δεσμεύσει ραδιενεργά ισότοπα φαίνονται στις τομές σαν πολύ ηλεκτρονικά πυκνές κηλίδες. Ακολουθεί η συνηθισμένη χρώση του παρασκευάσματος και παρατήρηση. Τα πιο συνηθισμένα ισότοπα που χρησιμοποιούνται στη βιολογική έρευνα είναι το τρίτιο (^3H), ο άνθρακας (^{14}C), ο φωσφόρος (^{32}P), το ασβέστιο (^{45}Ca), το θείο (^{35}S) και άλλα ανάλογα με τη περίπτωση. Τα παρασκευάσματα παραμένουν σ' αυτή τη κατάσταση για χρονικά διαστήματα μερικών ημερών, εβδομάδων ή και μηνών την ένωση που θέλουμε να παρακολουθήσουμε.

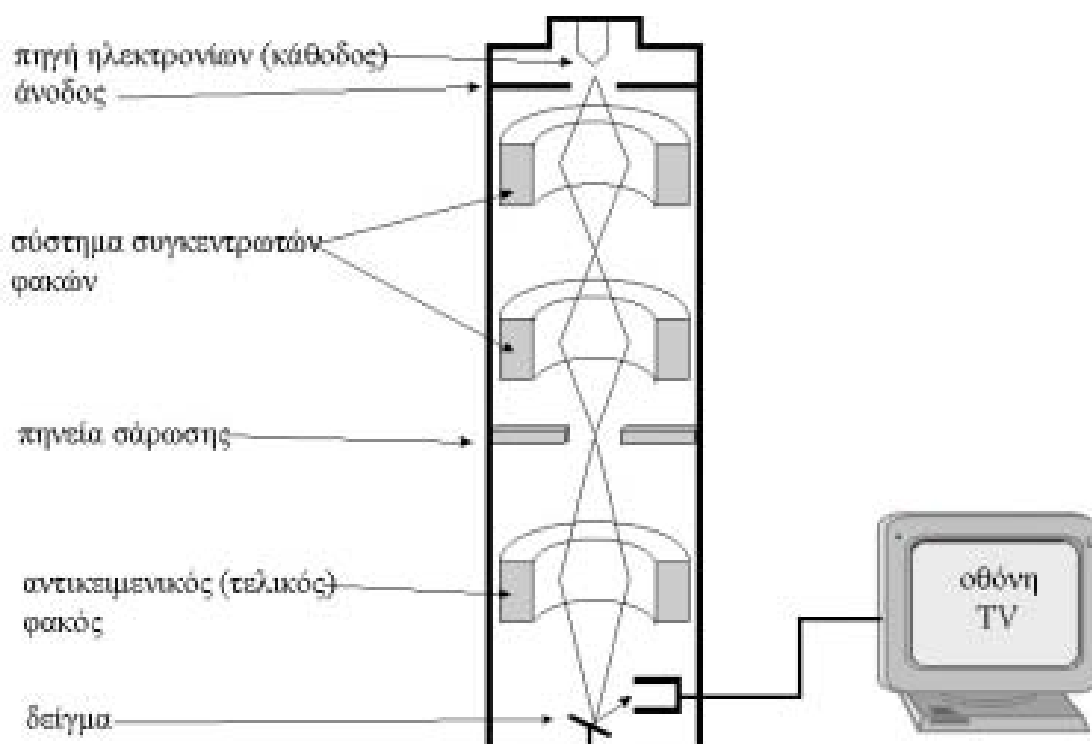


Εικόνα 7.2ε.1 Σχηματική παράσταση των σταδίων της αυτοραδιογραφίας.

Η αυτοραδιογραφία μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα επίπεδα, π.χ. για τη μελέτη της κατανομής ενός ραδιοϊσοτόπου σ' ένα ολόκληρο οργανισμό (πολλές φορές για τη διάγνωση ασθενειών) ή και σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους όπως η ηλεκτροφόρηση και η χρωματογραφία όπως ήδη αναφέρθηκε. Στη περίπτωση αυτή το ηλεκτρονιογράφημα, το χρωματογράφημα ή η ηλεκτροφόρηση έρχονται σ' επαφή με μια φωτογραφική πλάκα για ένα χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια η φωτογραφική πλάκα εμφανίζεται και στερεώνεται, όπως και ένα κοινό φωτογραφικό film.

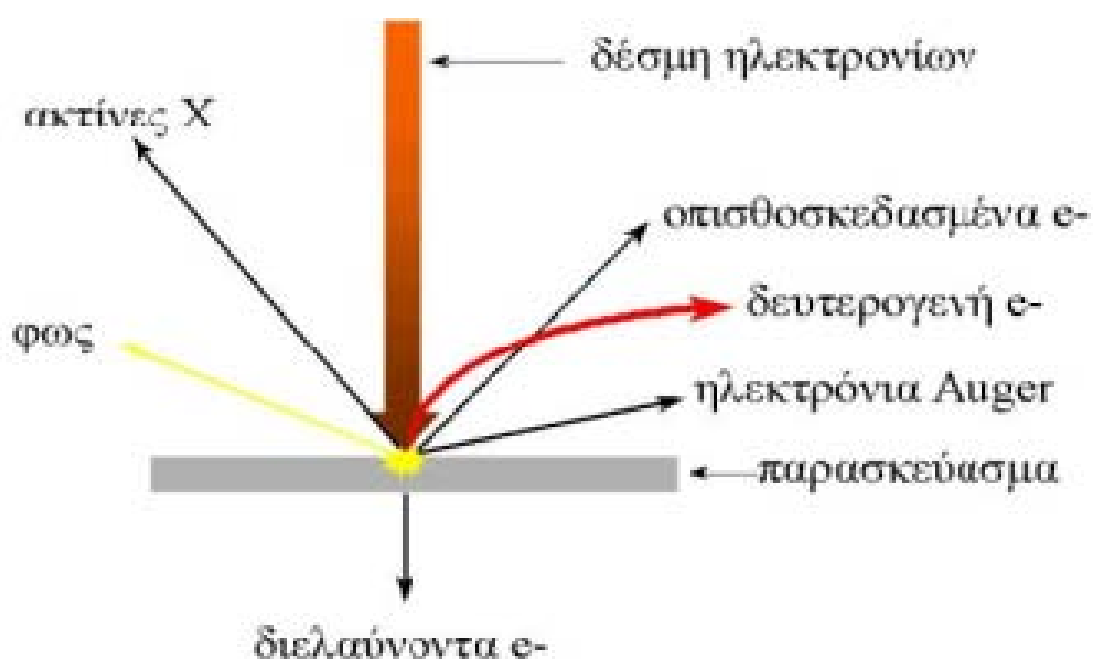
7.3. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ, Scanning Electron Microscope, SEM).

Το ΗΜΣ παράγει καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες με μεγάλη λεπτομέρεια. Ένα σύγχρονο ΗΜΣ έχει διακριτική ικανότητα που φτάνει τα 3 nm. Το ΗΜΣ χρησιμοποιεί, όπως και το ΗΜΔ, μια δέσμη ηλεκτρονίων που εδώ όμως αντί να διαπερνούν το παρασκεύασμα, σαρώνουν την επιφάνειά του (όπως σαρώνουν τα μάτια μας τη σελίδα ενός βιβλίου όταν διαβάζουμε) με πολύ μεγάλη ταχύτητα. Η δέσμη των ηλεκτρονίων παράγεται και εδώ από ένα νήμα, και ένα σύστημα ανόδου καθόδου όπου εφαρμόζεται υψηλή τάση, συνήθως της τάξης των 15-40 kV, για την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων Εικόνα.



Εικόνα 7.3.1 Σχηματική παράσταση των διαφόρων τμημάτων ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Η δέσμη των ηλεκτρονίων αφού εστιαστεί από σύστημα συγκεντρωτών φακών βομβαρδίζει το παρασκεύασμα με αποτέλεσμα κάποια από τα ηλεκτρόνια να το διαπερνούν, κάποια να σκεδάζονται ή να άγονται ενώ συγχρόνως να προκαλείται η παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων, ακτινών X και ηλεκτρονίων Auger, όπως δείχνει η Εικόνα. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, που προέρχονται από την επιφάνεια του παρασκευάσματος έχουν μικρή σχετικά ενέργεια που σχετίζεται με τη τοπογραφία του. Αυτά τα δευτερογενή ηλεκτρόνια συλλέγονται και στέλνονται σαν ένα ηλεκτρονικό σήμα μέσω ενός ενισχυτή εικόνας σ' ένα καθοδικό σωλήνα (CRT) όπου γίνεται και η παρατήρηση ή και η φωτογράφιση του δείγματος. Τα υπόλοιπα ηλεκτρόνια ή ακτινοβολίες που παράγονται μπορούν να μας δώσουν άλλες πληροφορίες σχετικές με την υφή και σύσταση του παρασκευάσματος.



Εικόνα 7.3.2 Οι διάφοροι τρόποι αλληλεπίδρασης παρασκευάσματος και δέσμης επιταχυνμένων ηλεκτρονίων, όπως συμβαίνει και στο ΗΜΣ.

Όλα τα σύγχρονα ΗΜΣ, όπως και τα ΗΜΔ, διαθέτουν on board μικροϋπολογιστή για την επεξεργασία και αποθήκευση της εικόνας αλλά πολλές φορές και για τη λειτουργία του οργάνου που μπορεί να γίνεται με ποντίκι (mouse) και menu στην οθόνη του μικροϋπολογιστή που μπορεί συγχρόνως να είναι και η οθόνη του μικροσκοπίου.

7.4. Προετοιμασία παρασκευασμάτων για το ΗΜΣ.

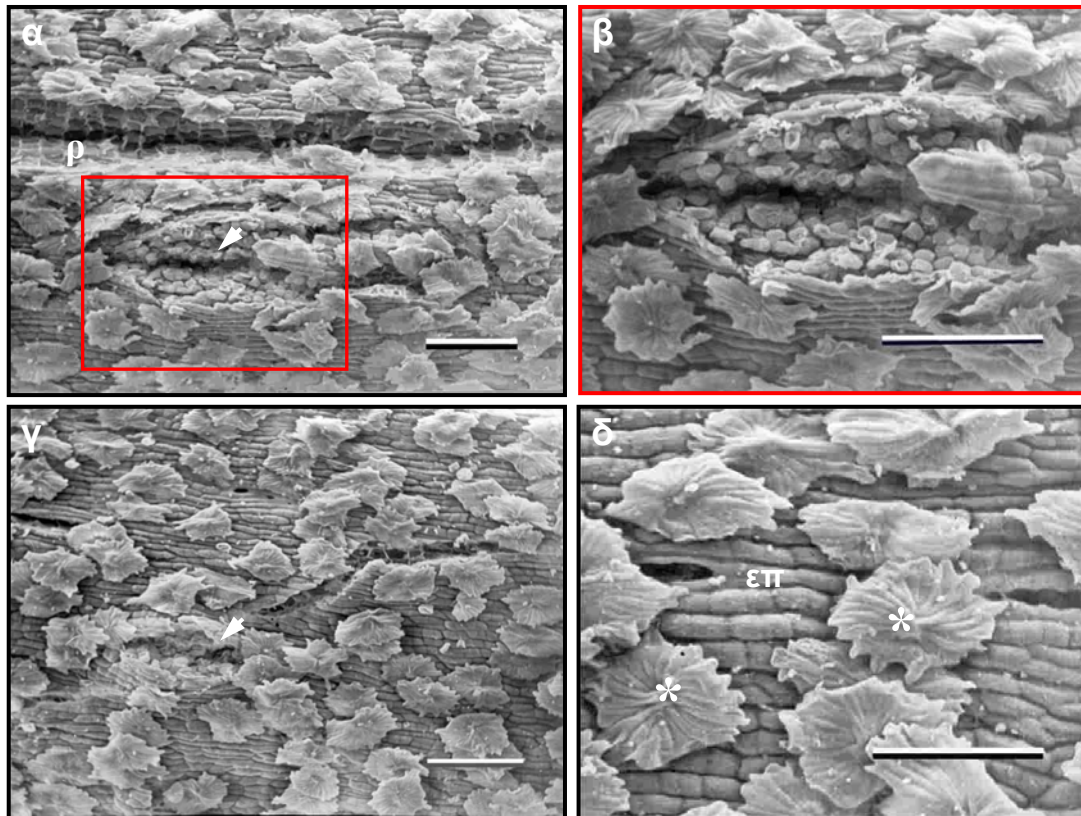
Ένα παρασκεύασμα για να παρατηρηθεί με το κλασσικό ΗΜΣ θα πρέπει να έχει ορισμένες ιδιότητες που είναι:

- α. να αντέχει στο υψηλό κενό,
- β. να αντέχει στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, και
- γ. να είναι αγώγιμο.

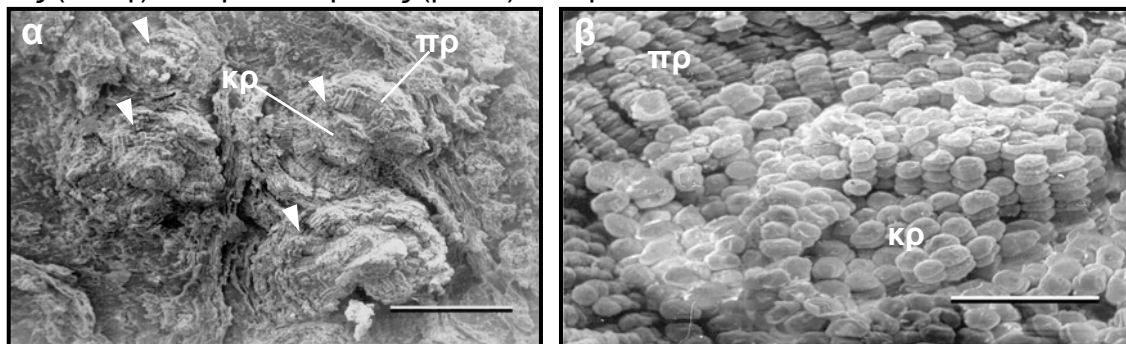
Έχοντας αυτές τις ιδιότητες υπ' όψη μπορούμε να κρίνουμε τι επεξεργασία χρειάζεται κάποιο παρασκεύασμα ανάλογα με την υφή του. Πιο κάτω αναφέρονται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα μεθόδων προετοιμασίας παρασκευασμάτων.

1. Μέταλλα: δεν απαιτείται καμιά απολύτως προετοιμασία, μπορούν να παρατηρηθούν απ' ευθείας αφού πρώτα επικολληθούν στις ειδικές αλουμινένιες βάσεις (stubs) με ειδική αγώγιμη κόλλα όπως είναι ο κολλοειδής άργυρος (silver dug) ή ο κολλοειδής άνθρακας.
2. Ορυκτά: επικόλληση σε stubs και επικάλυψη με λεπτό στρώμα μετάλλου, που γίνεται είτε με εξάχνωση μετάλλου σε υψηλό κενό, είτε με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού, για να γίνουν αγώγιμα.
3. Βιολογικά παρασκευάσματα ξερά, π.χ. γυρεόκοκκοι, φυτικά σπέρματα, ξύλο, δόντια κλπ. ακολουθείται η ίδια προετοιμασία όπως και για τα ορυκτά.
4. Βιολογικά παρασκευάσματα νωπά. Ο κλασσικός τρόπος προετοιμασίας περιλαμβάνει χημική μονιμοποίηση, συνήθως με γλουταρική αλδε(δη και καμιά φορά και OsO_4 , σε ευαίσθητα παρασκευάσματα, ακολουθεί αφυδάτωση με αλκοόλη ή ακετόνη, ξήρανση σε συσκευή κρίσιμου σημείου (critical point dryer) και στη συνέχεια όπως και στο (2). Η μέθοδος της χημικής μονιμοποίησης τείνει σιγά σιγά να καταργηθεί και αντικατασταθεί με τη φυσική μονιμοποίηση όπου το παρασκεύασμα παγώνεται πολύ γρήγορα και παρατηρείται παγωμένο αφού γίνει μόνο επικάλυψη με μέταλλο. Η φυσική μονιμοποίηση (κρυοτεχνική) απαιτεί ειδικές συσκευές για το πάγωμα και την επικάλυψη και ακόμα ειδικό υποδοχέα που προσαρμόζεται στο μικροσκόπιο για τη διατήρηση του παρασκευάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της παρατήρησης. Λόγω του πολύ γρήγορου παγώματος τα παρασκευάσματα υφίστανται και τις λιγότερες δυνατές τεχνητές αλλοιώσεις (artefacts).

Με τη μέθοδο της φυσικής μονιμοποίησης, μπορεί να γίνει παρατήρηση σχεδόν οποιουδήποτε παρασκευάσματος όπως είναι διάφορα τρόφιμα, γαλακτώματα, σε υγρή ή στερεή κατάσταση.



Εικόνα 7.4.1 Μικροφωτογραφίες της επιφάνειας βλαστών ελιάς ηλικίας ενός περίπου έτους, όπως φαίνονται στο Η.Μ.Σ. (α & γ) Επιδερμίδα, ασπιδοειδείς τρίχες, ένα φακίδιο υπό διαφοροποίηση (κεφαλή βέλους) και ρωγμές, (β) αποτελεί λεπτομέρεια της (α) στην οποία φαίνεται νεαρό, πρόσφατα διαφοροποιημένο φακίδιο και τα άτακτα διευθετημένα κύτταρα φελλού στο εσωτερικό του, (δ) λεπτομέρεια της επιδερμίδας και των τριχών. *=ασπιδοειδείς τρίχες, επ=επιδερμίδα, ρ= ρωγμές. Η κλίμακα έχει μήκος για τις (α & γ) 300 μm και για τις (β & δ) 150 μm.



Εικόνα 7.4.2 Μικροφωτογραφίες της επιφάνειας βλαστών ελιάς ηλικίας δεκαπέντε περίπου ετών, όπως εμφανίζονται στο Η.Μ.Σ. (α) Διακρίνονται φακίδια διαφόρων μεγεθών (κεφαλές βελών) και ρυτιδώματα. (β) Ώριμο φακίδιο στο οποίο διακρίνεται η χαρακτηριστική τοποθέτηση των κυττάρων του φελλού στο εσωτερικό του. Είναι εμφανές ότι τα κύτταρα βρίσκονται τοποθετημένα σε στήλες (το ένα πάνω στο άλλο) δημιουργώντας ένα δίκτυο μεσοκυττάρων χώρων στο κέντρο του φακιδίου. κρ=κέντρο φακιδίου, πρ=περιφέρεια φακιδίου. Η κλίμακα έχει μήκος 300 μm για την (α) και 100 μm για την (β).

7.5. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης - Σάρωσης (STEM).

Είναι κατά βάση ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης εφοδιασμένο όμως και με ένα συλλέκτη δευτερογενών ηλεκτρονίων έτσι που να μπορούμε συγχρόνως με την τομή ενός παρασκευάσματος να παρατηρούμε και την επιφάνεια της τομής. Η χρήση του μικροσκοπίου αυτού είναι σχετικά περιορισμένη γιατί στα περισσότερα εργαστήρια προτιμάται η χρησιμοποίηση δυο ξεχωριστών οργάνων.

8. Ακουστικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Acoustic Microscope).

Οι υπέρηχοι χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά κατά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο για τον εντοπισμό υποβρύχιων. Από τότε οι υπέρηχοι έχουν χρησιμοποιηθεί πολύ σε δυο κυρίως τομείς, στη ιατρική (υπερηχογράφημα) και για το μη καταστροφικό έλεγχο διαφόρων υλικών. Στο σχηματισμό εικόνας στην ιατρική οι υπέρηχοι χρησιμοποιούνται γιατί έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τους ιστούς του σώματος ενώ μπορούν να διασπαρθούν από ιστούς διαφορετικής πυκνότητας ή ελαστικότητας. Η αντανακλώμενη ηχώ συλλέγεται και είναι αυτή που σχηματίζει την εικόνα. Ο μη καταστροφικός έλεγχος (non-destructive testing, n.d.t.) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο κραμάτων κεραμικών και άλλων υλικών για των εντοπισμό ατελειών και ρωγμών. Οι πληροφορίες που μας δίνει σήμερα ένα τέτοιο μικροσκόπιο από βιολογικά παρασκευάσματα είναι πολύ περιορισμένες και γι' αυτό το λόγο το μικροσκόπιο αυτό δεν είναι καθόλου διαδεδομένο στις βιολογικές -ιατρικές επιστήμες.

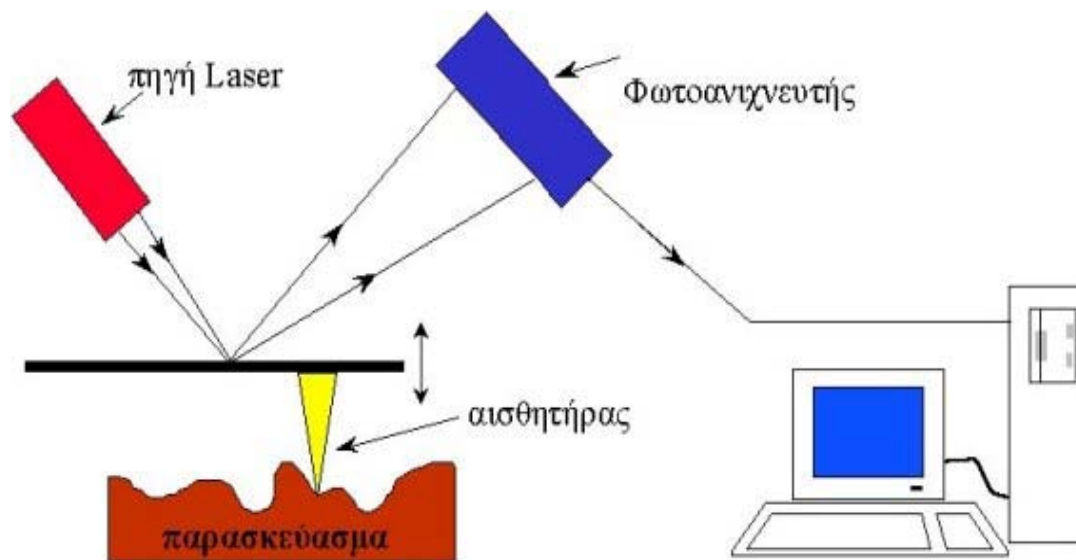
9.Μικροσκόπιο Μαλακών Ακτινών Χ (Soft X-Ray Microscopy, SXRM).

Από τότε σχεδόν που ανακαλύφθηκαν οι ακτίνες Χ ήταν γνωστό ότι το μήκος κύματός τους είναι πολύ μικρό σε σχέση με εκείνο του ορατού φωτός ή ακόμα και των επιταχυνμένων ηλεκτρονίων. Έτσι θεωρητικά ένα μικροσκόπιο ακτινών Χ θα έπρεπε να δίνει πολύ καλύτερη διακριτική ικανότητα από εκείνη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στο παρελθόν έχουν γίνει πολλές προσπάθειες κατασκευής ενός τέτοιου μικροσκοπίου ακτινών Χ αλλά το μεγαλύτερο πρόβλημα ήταν πάντα η εστίασή τους. Τη τελευταία δεκαετία, με την εξέλιξη της τεχνολογίας της μικροηλεκτρονικής, το μικροσκόπιο ακτινών Χ έγινε πραγματικότητα. Το πλεονέκτημά του σε σχέση με το οπτικό μικροσκόπιο είναι η δυνατότητα παρατήρησης παρασκευασμάτων μέχρι 1 μm πάχους, τα οποία δεν έχουν υποστεί καμιά επεξεργασία και με μια διακριτική ικανότητα συγκρίσιμη με εκείνη του ΗΜΣ. Τα μικροσκόπια αυτά χρησιμοποιούν μαλακές ακτίνες Χ μήκους κύματος 1-10 nm, ενώ για τα βιολογικά παρασκευάσματα χρησιμοποιείται η περιοχή του φάσματος 4.4-2.3 nm (0.28-0.53 keV) γνωστή και σαν "παράθυρο νερού". Ο σχηματισμός εικόνας με το μικροσκόπιο μαλακών ακτινών Χ γίνεται σήμερα χωρίς αυτές να χρειάζεται να εστιαστούν, με τη τοποθέτηση του παρασκευάσματος σε επαφή με ένα λεπτό κρύσταλλο πυριτίου επικαλυμμένο με μια ουσία ευαίσθητη στις ακτίνες Χ, όπως το πολυμερές polymethyl-methacrylate (PMMA) που δρα σαν το υλικό αποτύπωσης της εικόνας. Οι ακτίνες Χ κάνουν το υλικό αυτό ευδιάλυτο σε ορισμένους διαλύτες -εμφανιστές. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός ανάγλυφου χάρτη του παρασκευάσματος που έχει σχηματιστεί από τη διαφορετική διαπερατότητα στις ακτίνες Χ του παρασκευάσματος. Στη συνέχεια το παρασκεύασμα μεγεθύνεται με ένα άλλο μικροσκόπιο που αρχικά ήταν το ΗΜΣ ενώ σήμερα χρησιμοποιείται το Σαρωτικό Μικροσκόπιο Αισθητήρα που περιγράφεται στη συνέχεια. Το είδος αυτού της μικροσκοπίας ονομάζεται Μικροσκοπία μαλακών ακτινών Χ επαφής (Soft x-ray Contact Microscopy, SXCM).

Οι επιπλέον πληροφορίες που μας δίνουν σήμερα αυτά τα μικροσκόπια, σε σχέση με τα κλασικά οπτικά ή ηλεκτρονικά, είναι πολύ περιορισμένες και γι' αυτό και δεν είναι καθόλου διαδεδομένα στις βιολογικές -ιατρικές επιστήμες.

10. Μικροσκόπιο Σάρωσης Αισθητήρα (Scanning Probe Microscope, SPM).

Αυτό το μικροσκόπιο αποτελεί μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις των τελευταίων δεκαετιών στο τομέα των αναλυτικών οργάνων. Το SPM επιτρέπει τη παρατήρηση μικροσκοπικών χαρακτηριστικών που είναι αδύνατο να παρατηρηθούν, με τα σημερινά δεδομένα, με οποιοδήποτε άλλο τρόπο. Σε σύγκριση με τα κλασσικά μικροσκόπια, που χρησιμοποιούν δέσμη ηλεκτρονίων ή φωτονίων για τη δημιουργία μεγεθυνμένων εικόνων, το SPM χρησιμοποιεί ένα μηχανικό αισθητήρα (probe) που αγγίζει και "αισθάνεται" το παρασκεύασμα και δημιουργεί την εικόνα. Το συγκεκριμένο είδος μικροσκοπίας ξεχωρίζει από τους μέχρι σήμερα γνωστούς επειδή έχει εξαιρετικά μεγάλη διακριτική ικανότητα, τρισδιάστατη εικόνα και λειτουργεί κάτω από δυσμενείς, για τα άλλα μικροσκόπια συνθήκες.



Εικόνα 10.1 Δείχνει διαγραμματικά το τρόπο λειτουργίας ενός τέτοιου μικροσκοπίου.

Τα SPMs έχουν την ικανότητα να μεγεθύνουν επιφανειακά χαρακτηριστικά σε μεγεθύνσεις που φτάνουν την 108 X. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να παρατηρηθούν μεμονωμένα άτομα και μόρια στα οποία μπορούν να γίνουν και σχετικές μετρήσεις. Ενώ τα κλασσικά μικροσκόπια μπορούν να μετρήσουν αποστάσεις ως προς τις δυο διαστάσεις, συνήθως εκείνες που είναι κάθετες προς τον άξονα εστίασης της ακτινοβολίας του οργάνου, το SPM μπορεί να μετρήσει και τη τρίτη διάσταση.

Τα προς παρατήρηση παρασκευάσματα μπορούν να βρίσκονται σε κενό αέρα, σε ατμοσφαιρική πίεση ή ακόμα και βυθισμένα μέσα σε κάποιο υγρό. Έτσι το όργανο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη παρατήρηση παρασκευασμάτων που έχουν υποστεί μια ελάχιστη προετοιμασία ενώ είναι πάρα πολύ απλά στη χρήση τους, δε χρειάζονται ειδική εγκατάσταση και

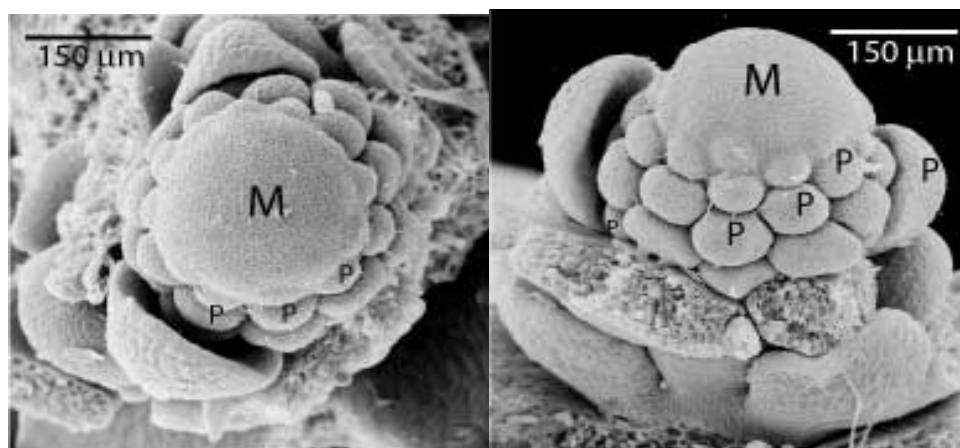
μπορούν να τοποθετηθούν πάνω σ' ένα γραφείο.

Με τον όρο Σαρωτικό Μικροσκόπιο Αισθητήρα εννοούμε μια οικογένεια μικροσκοπίων που διαφέρουν μόνο ως προς τον αισθητήρα που διαθέτουν. Δυο από τους πιο κοινούς είναι:

Το Μικροσκόπιο Φαινομένου Σήραγγας (Scanning Tunnelling Microscope). Σε αυτό το μικροσκόπιο η εικόνα επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της μετακίνησης μιας αιχμηρής μεταλλικής ακίδας που σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος ως προς τους άξονες X Y, ενώ η απόσταση ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια διατηρείται σταθερή. Η μετάφραση της μετακίνησης αυτής σε εικόνα γίνεται μέσω πιεζοηλεκτρικών κεραμικών στα οποία είναι στηριγμένη η ακίδα. Η απόσταση μεταξύ του αισθητήρα και του παρασκευάσματος διατηρείται σταθερή με ένα ηλεκτρικό ρεύμα φαινομένου σήραγγας. Η διακριτική ικανότητα τέτοιων μικροσκοπίων που διατίθενται σήμερα στο εμπόριο φτάνει το 1.0 nm ως προς το βάθος του δείγματος και τα 10 nm ως προς τους οριζόντιους άξονες.

Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscope) στις διάφορες παραλλαγές του. Αυτό είναι σχεδόν ίδιο με το Μικροσκόπιο φαινομένου σήραγγας, με μόνη διαφορά τον αισθητήρα ο οποίος αγγίζει το παρασκεύασμα ή διατηρείται σε μικρή και σταθερή απόσταση από αυτό. Η μετακίνηση αυτή του αισθητήρα μέσω μοχλών στην επιφάνεια των οποίων αντανακλάται δέσμη ακτινών Laser μεταφράζεται σε εικόνα. Αυτός ο τύπος μικροσκοπίων βρίσκει πολλές εφαρμογές στη παρατήρηση μη αγώγιμων παρασκευασμάτων όπως οι οργανικές ενώσεις (μεγαλομόρια, πρωτεΐνες, DNA κλπ).

Μια ένδειξη της σημασίας που έχει δοθεί σε αυτά τα μικροσκόπια είναι και το ότι μέσα στα δέκα χρόνια από τη δημιουργία τους έχουν αποσπάσει δυο βραβεία Nobel. Παρόλα αυτά όμως οι ερευνητές των Βιοϊατρικών επιστημών δεν βρίσκουν πολλές σημαντικές εφαρμογές που να δικαιολογούν το κόστος αγοράς ενός τέτοιου μικροσκοπίου.



Εικόνα 10.2 Παρατήρηση μεριστώματος του φυτού *Anagallis ravena* ,με μικροσκόπιο Σάρωσης Αισθητήρα.

11. Η ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.

Οι γνώσεις που έχουμε σήμερα σχετικά με τη βιολογία του κυττάρου στηρίζονται στην συνεργασία μικροσκοπικής και χημικής ανάλυσης. Το Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όσο πάει χρησιμοποιείται και περισσότερο και με μεγαλύτερη εμπιστοσύνη στη Μοριακή Βιολογία, σαν ένα εργαλείο για την ανάλυση της μοριακής δομής, αλληλοεπιδράσεις και διεργασίες σε συνεργασία πάντα με βιοχημικές και βιοφυσικές μεθόδους. Οι περισσότερες μέθοδοι που έχουν επινοηθεί τα τελευταία τριάντα και πλέον χρόνια, έχουν απλοποιηθεί έτσι που η υπομικροσκοπική ανάλυση να είναι προσιτή στον κάθε ερευνητή που θέλει να έχει και μια οπτική εικόνα των μορίων που μελετάει.

Οι τεχνικές μικροσκοπίας που χρησιμοποιούν κόψιμο τομών είναι φανερό ότι δεν προσφέρονται για την παρατήρηση μεγαλομορίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για τον απλό λόγο ότι ένα μεγαλομόριο έχει μια συγκεκριμένη στερεοδομή στο χώρο που είναι αδύνατο να συμπεριληφθεί σε μια σχεδόν μονοδιάστατη λεπτή τομή. Μπορούν βέβαια να εντοπιστούν μεγαλομόρια μέσα σε λεπτές τομές με μεθόδους όπως η αυτοραδιογραφία και η ανοσοβιολογική σήμανση με κολλοειδή χρυσό ή με άλλες πιο περιορισμένης χρήσης ιστοχημικές μεθόδους.

Για να παρατηρηθούν κάποια μεγαλομόρια με το ΗΜΔ αυτά θα πρέπει:

- να καθαριστούν με τρόπο που να μη καταστραφεί η δομή τους.
- να απλωθούν στο πλέγμα του μικροσκοπίου (grid) με τέτοιο τρόπο που να μην εμφανίζουν αναδιπλώσεις. Προφανώς, με τα σημερινά δεδομένα, η στερεοδομή ενός μεγαλομορίου δε μπορεί να γίνει ορατή με το ΗΜΔ (αυτό είναι δυνατό να γίνει με άλλες μεθόδους όπως η περίθλαση ακτίνων Χ, που μπορεί να γίνει σχεδόν με όλα τα ΗΜΔ ή να γίνει σε ξεχωριστή συσκευή).
- "χρώση" του μορίου, που μπορεί να γίνει με αρνητική χρώση, ή με σκίαση με την εξάχνωση κάποιου βαρέως μέταλλου. Το μόριο ή ένα μόνο τμήμα του, μπορούν ακόμα να εντοπιστούν, με ανοσοβιολογικές μεθόδους ή αυτοραδιογραφία.

11.1. Νουκλεϊνικά οξέα.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει αποδειχτεί ότι είναι ένα ισχυρό εργαλείο στη μελέτη των νουκλεϊνικών οξέων. Έχει την ικανότητα να μας δίνει ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα που αφορούν το μέγεθος και τη δομή τόσο των φυσικών όσο και των πειραματικών μορίων DNA και RNA. Αυτά τα μόρια όταν βρίσκονται σε ένα διάλυμα αποτελούνται από τρισδιάστατες τυχαία διπλωμένες αλυσίδες. Για να γίνουν αυτά ορατά με το ΗΜΔ πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε δισδιάστατα μη συσσωματωμένα και απλωμένα μόρια. Η μέθοδος που έχει επικρατήσει είναι εκείνη που πρωτοπεριγράφηκε από τους Kleineschmidt και Zahn (1959). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένα διάλυμα νουκλεϊνικού οξέος και μιας βασικής πρωτεΐνης για να σχηματιστεί μια μονοστοιβάδα ανάμεσα σε νερό και αέρα. Το σύμπλοκο που προκύπτει προσροφάται στη μεμβράνη του πλέγματος του ΗΜ. Στη συνέχεια το παρασκεύασμα σκιάζεται μ' ένα βαρύ μέταλλο. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι αν κάποια πρωτεΐνη είναι ήδη φυσικά συνδεδεμένη με το νουκλεϊνικό οξύ δε μπορεί να παρατηρηθεί λόγω της πρόσθετης πρωτεΐνης. Σήμερα υπάρχουν αρκετές μέθοδοι που ξεπερνούν αυτό το πρόβλημα ενώ συγχρόνως μπορούν να κάνουν ορατά και άλλα φαινόμενα και πειραματικά αποτελέσματα που σχετίζονται με τη μοριακή βιολογία και τη μηχανική γενετική. Έτσι είναι δυνατή η παρατήρηση και ο διαχωρισμός ssDNA (μονόκλωνου DNA, single stranded DNA) που βρίσκεται in vivo σε μερικούς ιούς, από dsDNA (δίκλωνο DNA, double stranded DNA). Είναι δυνατόν ακόμα να υπολογιστεί και το MB με την πρόσθεση κατάλληλων ds και ssDNA μορίων.

Εκτός από το μέγεθος και το σχήμα ενός μορίου DNA ή RNA, το ΗΜΔ μπορεί να μας δώσει και άλλες πληροφορίες σχετικές με αυτά τα μόρια όπως είναι η σειρά των βάσεων τους. Για τέτοιου είδους παρατηρήσεις χρησιμοποιούνται τεχνικές μετουσίωσης (denaturation) και υβριδισμού (hybridisation). Με τις τεχνικές αυτές τα μόρια αυτά μπορούν να μετουσιωθούν πλήρως και να ξαναζευγαρωθούν (reannealed) είτε με τον εαυτό τους (για να φανούν επαναλαμβανόμενες ακολουθίες βάσεων), είτε με άλλα μόρια DNA (αναγνωρίζοντας έτσι κοινές ή μη κοινές ακολουθίες βάσεων) ή με μόρια RNA (για τη χαρτογράφηση μεταγγραφομένων ακολουθιών). Μερικές από αυτές τις τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη μελέτη δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA double stranded RNA).

Ένας άλλος τομέας της Μοριακής Βιολογίας που το ΗΜΔ προσφέρει ανεκτίμητες πληροφορίες είναι η δυνατότητα της απ' ευθείας παρατήρησης πρωτεϊνών συνδεδεμένων σε συγκεκριμένες ακολουθίες νουκλεοτιδίων που επιτρέπει τη γρήγορη χαρτογράφηση νουκλεϊνικών οξέων αλλά με μικρή διακριτική ικανότητα.

Με το ΗΜΔ είναι δυνατή η παρατήρηση παρασκευασμάτων απλωμένης χρωματίνης στο μοριακό επίπεδο που αποκαλύπτει την οργάνωση της ενεργοποιημένης (μεταγγραφομένης) και μη ενεργοποιημένης χρωματίνης. Η χρωματίνη αυτή μπορεί να προέρχεται από μια ποικιλία οργανισμών ή κυττάρων όπως είναι οι ιοί, ερυθροκύτταρα, σπερματοζωάρια,

φυτικά κύτταρα κλπ.

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατή ακόμα και η παρατήρηση ενεργοποιημένων γονιδίων όπως για παράδειγμα στη περίπτωση ωκυττάρων αμφιβίων που περιέχουν έναν γιγάντιο πυρήνα και μέσα σε αυτόν εκατοντάδες εκτοχρωμοσωμικούς πυρηνίσκους. Η ενεργός περιοχή του γονιδίου φαίνεται να αποτελείται από ένα κεντρικό άξονα από DNA (ινίδιο δεοξυριβονουκλεοπρωτεΐνης), καλυμμένο σε όλο το μήκος του από σωματίδια πολυμεράσης του RNA που έχουν χαρακτηριστική λεπτή δομή.

11.2. Υβριδισμός in situ με το οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Μια πολυσυζητημένη τεχνική της Μοριακής Βιολογίας είναι και ο υβριδισμός in situ για το μικροσκόπιο. Η τεχνική αυτή αποτελεί ένα πολύ ισχυρό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων γιατί δίνει τη δυνατότητα του εντοπισμού συγκεκριμένων ακολουθιών βάσεων (DNA ή RNA) στο κυτταρόπλασμα, τα οργανίδια, χρωμοσώματα ή πυρήνες βιολογικών παρασκευασμάτων. Ο υβριδισμός in situ διαφέρει από την ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων με τις τεχνικές Northern και Southern hybridisation στο ότι το σήμα του υβριδισμού εντοπίζεται in situ (εκεί δηλαδή που γίνεται) και όχι σε μια στερεή μεμβράνη.

Η ικανότητα του προσδιορισμού νουκλεϊνικών οξέων in situ μας δίνει τη δυνατότητα για:

1. τη δημιουργία φυσικών χρωμοσωμικών χαρτών,
2. την ανάλυση χρωμοσωμικής δομής και αποκλίσεων,
3. τη μελέτη της δομής, λειτουργίας και εξέλιξης χρωμοσωμάτων και γονιδιωμάτων,
4. τον προσδιορισμό της χωροταξικής και διαχρονικής έκφρασης των γονιδίων,
5. την ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός ιών, ακολουθίες ιών και βακτηρίων σε ιστούς,
6. τον προσδιορισμό του φύλου (προγεννητικός έλεγχος), εντοπισμός ακολουθιών μετατροπής και ογκογόνων γονιδίων (oncogenes), και
7. την ανάλυση νευροδιαβιβαστικών μηνυμάτων.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται σήμερα ως μέθοδος ρουτίνας στην ιατρική έρευνα και διάγνωση αλλά και στη βελτίωση των φυτών. Η κατανόηση της τεχνικής απαιτεί συγκεκριμένες γνώσεις μοριακής βιολογίας, γενετικής, ανοσοχημείας και ιστοχημείας και γι' αυτό ξεφεύγει από το σκοπό αυτού του βιβλίου. Περισσότερες θεωρητικές και τεχνικές λεπτομέρειες της τεχνικής μπορούν να βρεθούν σε ειδικά βιβλία όπως των Leitch et al. 1994. Το μόνο που μπορεί να αναφερθεί εδώ είναι ότι η παρατήρηση του αποτελέσματος της τεχνικής μπορεί να γίνει με διάφορους τύπου μικροσκοπίων ανάλογα με τον τρόπο σήμανσης. Τα ραδιενεργά ισότοπα παρατηρούνται με

αυτοραδιογραφία, τα φθορίζοντα αντισώματα με μικροσκόπιο φθορισμού, ο κολλοειδής χρυσός με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κλπ. ενώ τα διάφορα υλικά μπορεί κανείς σήμερα να τα προμηθευτεί έτοιμα σε kits με εγγυημένη σύνθεση και επομένως μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχίας της τεχνικής.

11.3. ΒΑΚΤΗΡΙΑ.

Τα βακτήρια λόγω του μεγέθους τους μπορούν να παρατηρηθούν με το οπτικό μικροσκόπιο με το οποίο μπορούμε να παρατηρήσουμε το σχήμα και να προσδιορίσουμε το μέγεθός τους. Για να γίνει όμως παρατήρηση της λεπτής δομής των βακτηρίων είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί το ΗΜΔ. Με αυτό μπορούμε να παρατηρήσουμε βακτηριακές δομές και οργανίδια όπως το κυτταρικό τοίχωμα, τα μαστίγια, το μεσόσωμα κλπ. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, ανάλογα με το τι θέλουμε να παρατηρήσουμε, μπορούν να παρατηρηθούν και με το ΗΜΔ και με το ΗΜΣ. Προφανώς με το ΗΜΔ θα παρατηρήσουμε την εσωτερική δομή και με το ΗΜΣ το εξωτερικό τους σχήμα ενώ δομές όπως τα μαστίγια, για να γίνουν ορατά πολλές φορές χρειάζονται ειδική επεξεργασία όπως η σκίαση με μέταλλο όπως είναι το βολφράμιο ενώ για την παρατήρηση μεμβρανών θα χρειαστεί επεξεργασία που περιλαμβάνει μονιμοποίηση, έγκλιση και κόψιμο τομών. Λόγω του μικρού τους μεγέθους και για να διευκολυνθεί η διαδικασία επεξεργασίας των μικροοργανισμών όταν είναι απαραίτητη η παρατήρηση λεπτών τομών με το ΗΜΔ, αυτή μπορεί να γίνει με δυο τρόπους:

- μετά από κάθε επέμβαση το δείγμα φυγοκεντρίται και το ίζημα, το οποίο αποτελούν οι μικροοργανισμοί, ξαναδιαλύεται στο επόμενο χημικό, και
- πριν ή μετά την αρχική μονιμοποίηση οι μικροοργανισμοί εγκλείονται σε 1% άγαρ που στερεοποιείται, κόβεται σε κομματάκια και η επεξεργασία συνεχίζεται όπως και στη περίπτωση των ιστών.

Ένας πρόχειρος αλλά τις περισσότερες φορές αρκετά ικανοποιητικός τρόπος παρατήρησης βακτηρίων με το ΗΜΔ είναι με τη μέθοδο της αρνητικής χρώσης, όπως ακριβώς γίνεται και με τους ιούς. Για να γίνει μια τέτοια παρατήρηση τα βακτήρια πρέπει να είναι σε μορφή εναιωρήματος απαλλαγμένου όμως από τυχόν άλλα συστατικά όπως π.χ. συστατικά του θρεπτικού υλικού, καθώς επίσης θα πρέπει να δοκιμαστούν διαφορετικές διαλύσεις έτσι που η διασπορά των μικροοργανισμών στο grid να είναι τέτοια που τα βακτήρια να μην αλληλεπικαλύπτονται και η παρατήρηση στο μικροσκόπιο να είναι εύκολη.

Για παρατήρηση των βακτηρίων στο ΗΜΣ, συνήθως δεν απαιτείται ιδιαίτερη επεξεργασία. Τις περισσότερες φορές αρκεί η τοποθέτηση των βακτηρίων με μορφή επιχρίσματος σε στρογγυλές καλυπτρίδες τις οποίες στη συνέχεια στεγνώνουμε στον αέρα επικαλύπτουμε με μέταλλο και παρατηρούμε.

Αν είναι απαραίτητο οι μικροοργανισμοί μπορούν αρχικά να μονιμοποιηθούν με τα συνηθισμένα μονιμοποιητικά όπως είναι η γλουταρική αλδε(δη. Προϋπόθεση για μια καλή εικόνα είναι πάντοτε ο προηγούμενος καθαρισμός της καλλιέργειας από τυχόν υπολείμματα του θρεπτικού υλικού.

Αυτό επιτυγχάνεται με εκπλύσεις με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκεντρίσεις. Όταν τα βακτήρια έχουν αναπτυχθεί σε στερεό θρεπτικό υλικό, τότε κομμάτια του θρεπτικού υλικού που περιέχουν επάνω τους τις αποικίες μπορούν να κοπούν και να γίνει επεξεργασία τους όπως ακριβώς γίνεται και σε κομμάτια ιστού.

Σε γενικές γραμμές κάθε είδος παρασκευάσματος έχει και τις δικές του ιδιομορφίες και σχεδόν πάντοτε χρειάζεται κάποιος πειραματισμός για να βρεθεί η πιο κατάλληλη μέθοδος. Η πείρα και η γνώση πολλών μεθόδων είναι απαραίτητη για την επίλυση τέτοιου είδους προβλημάτων.

11.4. ΜΥΚΗΤΕΣ.

Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το είδος του μύκητα. Για παράδειγμα στις ζύμες η προετοιμασία του δείγματος είναι παρόμοια με εκείνη των βακτηρίων. Για άλλους μύκητες με υφές η επεξεργασία είναι παρόμοια με εκείνη που εφαρμόζεται για τους ιστούς. Σε περιπτώσεις μυκήτων που έχουν αναπτυχθεί πάνω στο ξενιστή τους, η επεξεργασία περιορίζεται στη μονιμοποίηση και έγκλιση του ξενιστή. Η χημική μονιμοποίηση των μυκήτων πολλές φορές παρουσιάζει δυσκολίες λόγω πιθανόν της παρουσίας χιτίνης στα κυτταρικά τους τοιχώματα, έτσι συνήθως δε χρησιμοποιείται γλουταρική αλδε(δη ως μονιμοποιητικό υλικό αλλά υπερμαγγανικό κάλιο, το οποίο όμως μονιμοποιεί ουσιαστικά μόνο τις μεμβράνες δίνοντας έτσι μια χαρακτηριστική εικόνα με μόνο τις μεμβράνες έντονα χρωματισμένες.

Για το ΗΜΔ η μέθοδος που θα ακολουθηθεί ακολουθεί την ίδια λογική με εκείνη που αναφέρεται για τα βακτήρια. Και εδώ πάλι πρέπει να τονιστεί ότι η καλύτερη μονιμοποίηση για το ΗΜΔ και ΗΜΣ είναι η φυσική μονιμοποίηση δηλαδή το πάγωμα (κρυοτεχνική).

Και στην περίπτωση των μυκήτων μελέτη της βιβλιογραφίας και πειραματισμός θα μας δώσουν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

11.5. ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΑ.

Τα μυκοπλάσματα είναι μια κατηγορία μικροοργανισμών που παρασιτούν σε φυτικά και ζωικά κύτταρα. Μοιάζουν με τους ιούς, αλλά έχουν και κάποια βασικά χαρακτηριστικά που συναντάμε στα κύτταρα. Το μέγεθός τους είναι περίπου το ίδιο με εκείνο των ιών. Δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα και γι' αυτό το σχήμα τους δεν είναι συγκεκριμένο. Για το πολλαπλασιασμό τους δε χρειάζονται το μηχανισμό του κυττάρου ξενιστή ενώ μπορούν να αναπτυχθούν και έξω από τα κύτταρα και ακόμα και σε τεχνητές καλλιέργειες. Σήμερα είναι γνωστό ότι αρκετές ασθένειες του ανθρώπου, όπως η άτυπη

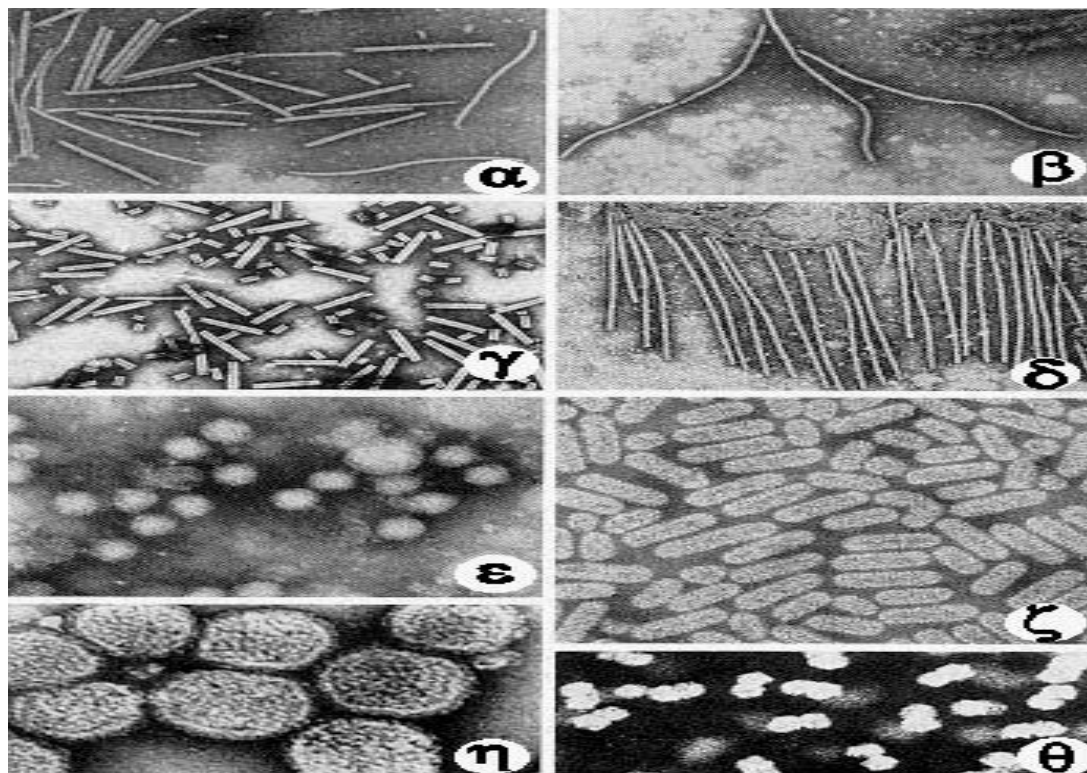
πνευμονία, η αρθρίτιδα και κάποιοι νόσοι της ουροδόχου κύστης, οφείλονται σε μυκοπλάσματα. Επειδή οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι αρκετά μικροί (περίπου 0.3 μm σε διάμετρο) και συνήθως ζουν παρασιτικά η παρατήρησή τους είναι δυνατή με το ΗΜΔ σε τομές του ξενιστή που παρασκευάζονται με τις κλασσικές μεθόδους.

11.6. ΟΙ ΙΟΙ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.

Ο ιοί που προσβάλουν τα φυτά, κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με το σχήμα τους:

Οι μολυσμένοι φυτικοί ιστοί μπορούν να κοπούν σε υπέρλεπτες τομές και να παρατηρηθούν με το ΗΜΔ. Αυτές οι μελέτες απεδείχθησαν πολύ αποτελεσματικές γιατί αποκάλυψαν τους ιούς *in situ* καθώς επίσης και τις υποκυτταρικές αποκλείσεις αλλά και τις σχέσεις μεταξύ σωματιδίων του ιού και κυτταρικών οργανιδίων και δομών.

Με τις διάφορες τεχνικές που αναφέρονται στο Β μέρος του βιβλίου έχει βρεθεί ότι στα φυτά, σωματίδια του ιού μπορούν να βρεθούν στους περισσότερους ιστούς του ξενιστή ενώ πολλές φορές η παρουσία των σωματιδίων περιορίζεται σε ορισμένους μόνο ιστούς, όπως συμβαίνει με τους *luteoviruses* που βρίσκονται μόνο στα κύτταρα του ηθμού. Οι μικροσκοπικές αυτές μελέτες βοηθούν επίσης στον εντοπισμό των ιών στον φορέα τους, που στα φυτά είναι συνήθως κάποιο έντομο ή κάποιος νηματώδης.



Εικόνα 11.6.1 Τα σωματίδια διαφόρων ιών φυτών όπως παρατηρούνται με το ΗΜΔ με αρνητική χρώση.

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΑ

- Κ. ΦΑΣΣΕΑ, 1999. ΛΕΠΤΗ ΔΟΜΗ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑ.
- ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΣ, Β. 2000. ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.
- Ι. ΤΣΕΚΟΣ - Ε. ΚΟΥΚΟΛΗ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson J.D. (1989). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York.

- Anderson, T.F. and Stanley, W.M. (1941). A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum. J. Biol. Chem. 139,339-344.
- Birrel, G.B. et al.(1985). Immunoelectron microscopy: The electron optical analog of immunofluorescence microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 82:109-113. Cell Biology.
- Bracegirdle, B. (1995). Scientific Photomacrography. Royal Microscopical Society. Microscopy Handbooks 31. aIOS SCIENTIFIC PUBLISHERS, Oxford.
- Bracegirdle, B. and S. Bradbury (1995). Modern Photomicrography. Royal Microscopical Society. Microscopy Handbooks 33. aIOS SCIENTIFIC PUBLISHERS, Oxford.
- Bradbury, S. and P. J. Evennett. (1996). Contrast Techniques in Light Microscopy. Royal Microscopical Society. Microscopy Handbooks 34. aIOS SCIENTIFIC PUBLISHERS, Oxford.
- Bradbury, S., P.J. Evennett, H. Hasselmann and H. Piller (Nomenclature Committee of the RMS). (1989). Dictionary of Light Microscopy. Oxford University Press. Royal Microscopical Society.
- Chescoe, D. & P.J. Goodhew (1984). The operation of the transmission electron microscope. Oxford University Press. Royal Microscopical Society.
- Danilatos, G.D. & R. Postle (1982). The environmental Scanning Electron Microscope. Microscopy E:1-16.
- Darnell, J., H. Harvey and D. Baltimore .1990. Molecular Cell Biology. W.H. Freeman and Co. N. York.
- European Microscopy and Analysis. May 1990, Issue 5. RGC Publication.
- Sommerville, J. and Scheer, U., Editors (1987). Electron microscopy in molecular biology. IRL PRESS. Oxford.