



Μικροσκοπία

Φωτεινού Πεδίου (Brightfield)

Σκοτεινού Πεδίου (Darkfield)

Πολωτική (Polarized)

Αντίθεσης Φάσεως (Phase)

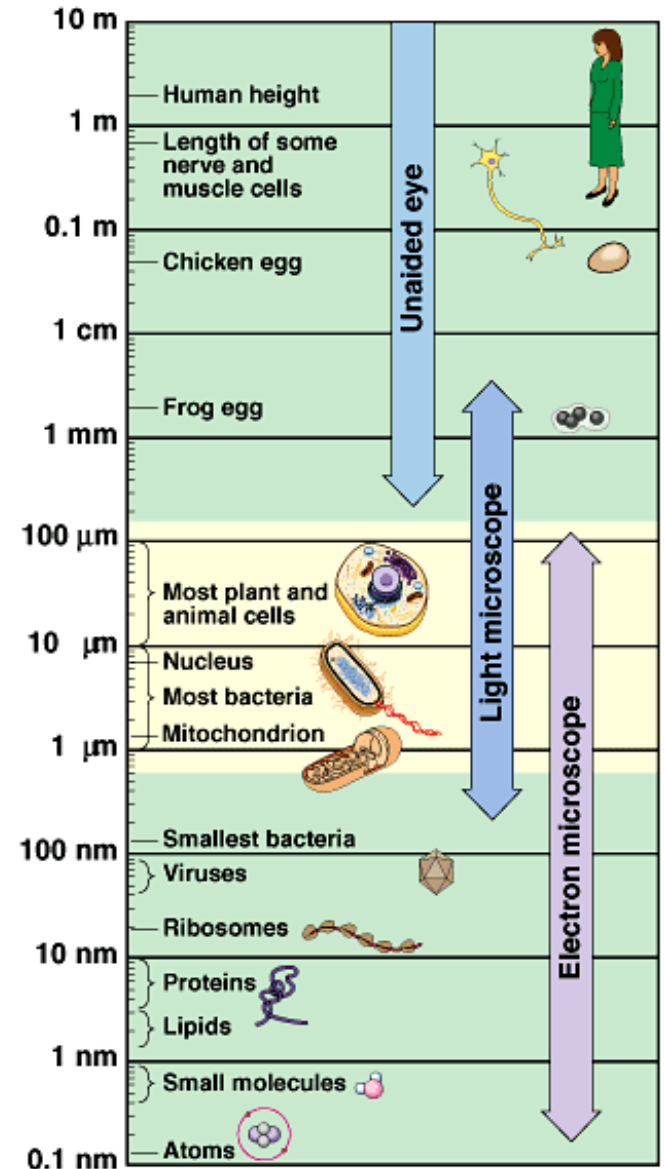
Μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC)

Φθορισμού (Fluorescence)

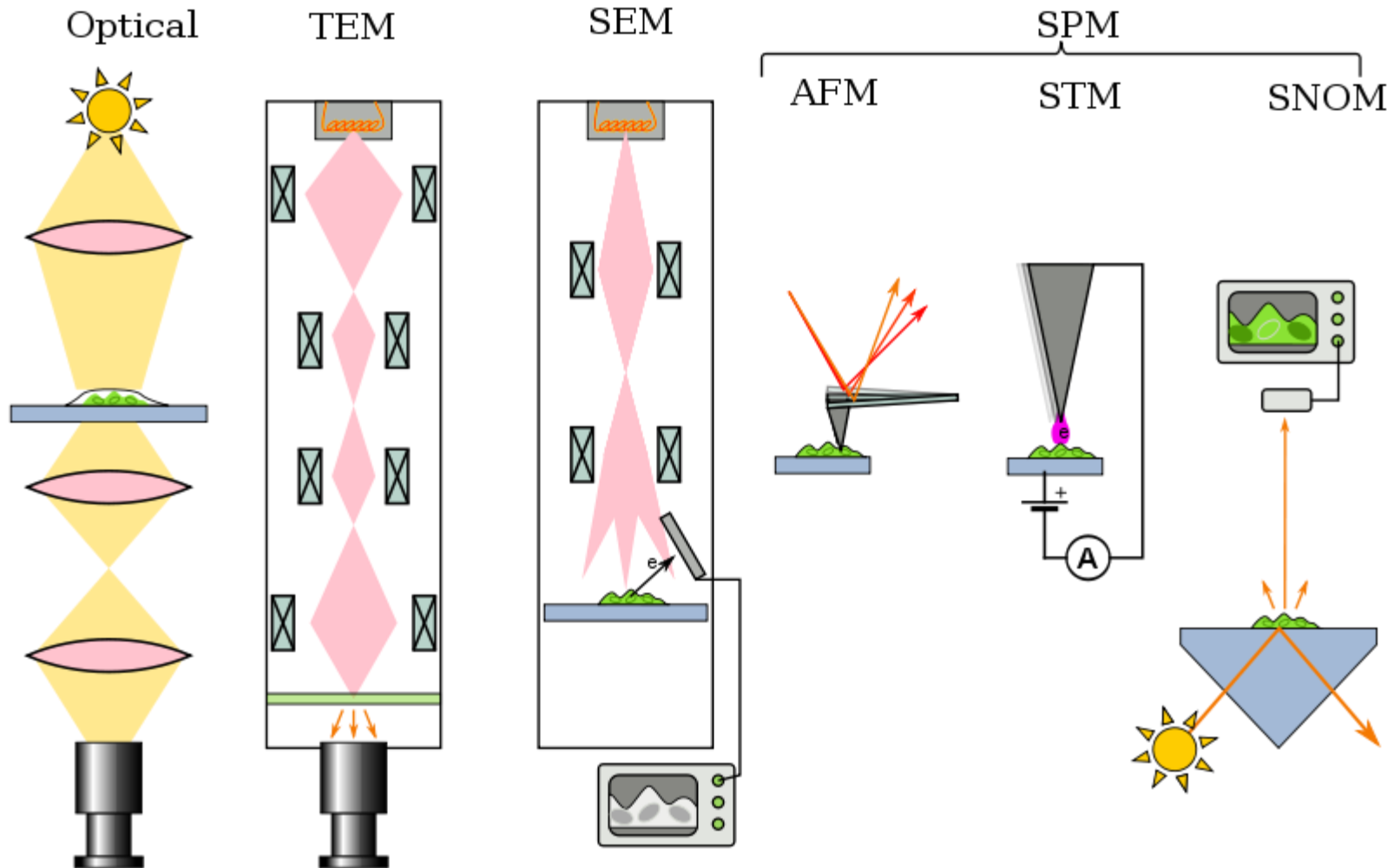
Introduction



- Πώς μπορούμε να "δούμε" τα μικρά πράγματα;
 - Πόσο μικρά είναι τα «πράγματα»;
- Γιατί οπτική μικροσκοπική απεικόνιση;
 - Δυνατότητα πολύ ψηλής ευκρίνειας (σημερινό όριο: ~ 60 nm)
 - Δυνατότητα καθόλου ή ελάχιστης επίδρασης στο δείγμα
 - Μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας εξ ολοκλήρου ενδογενείς πηγές αντίθεσης ή μη-τοξικά εξωγενή χρωμοφóra
 - Μπορεί να προσαρμοστεί στις προδιαγραφές του δείγματος / προβλήματος
- Εφαρμογές:
 - Βασικές μελέτες μοριακή και κυτταρική βιολογία
 - Κατανόηση των διεργασιών κάποιων ασθενειών
 - Έλεγχος της ανάπτυξης και αποτελεσματικότητας φαρμάκων
 - Διάγνωση ασθενειών (καρκίνος, διαβήτης, αθηροσκλήρυνση)
 - Θεραπευτική (Δοσιμετρία, παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία)

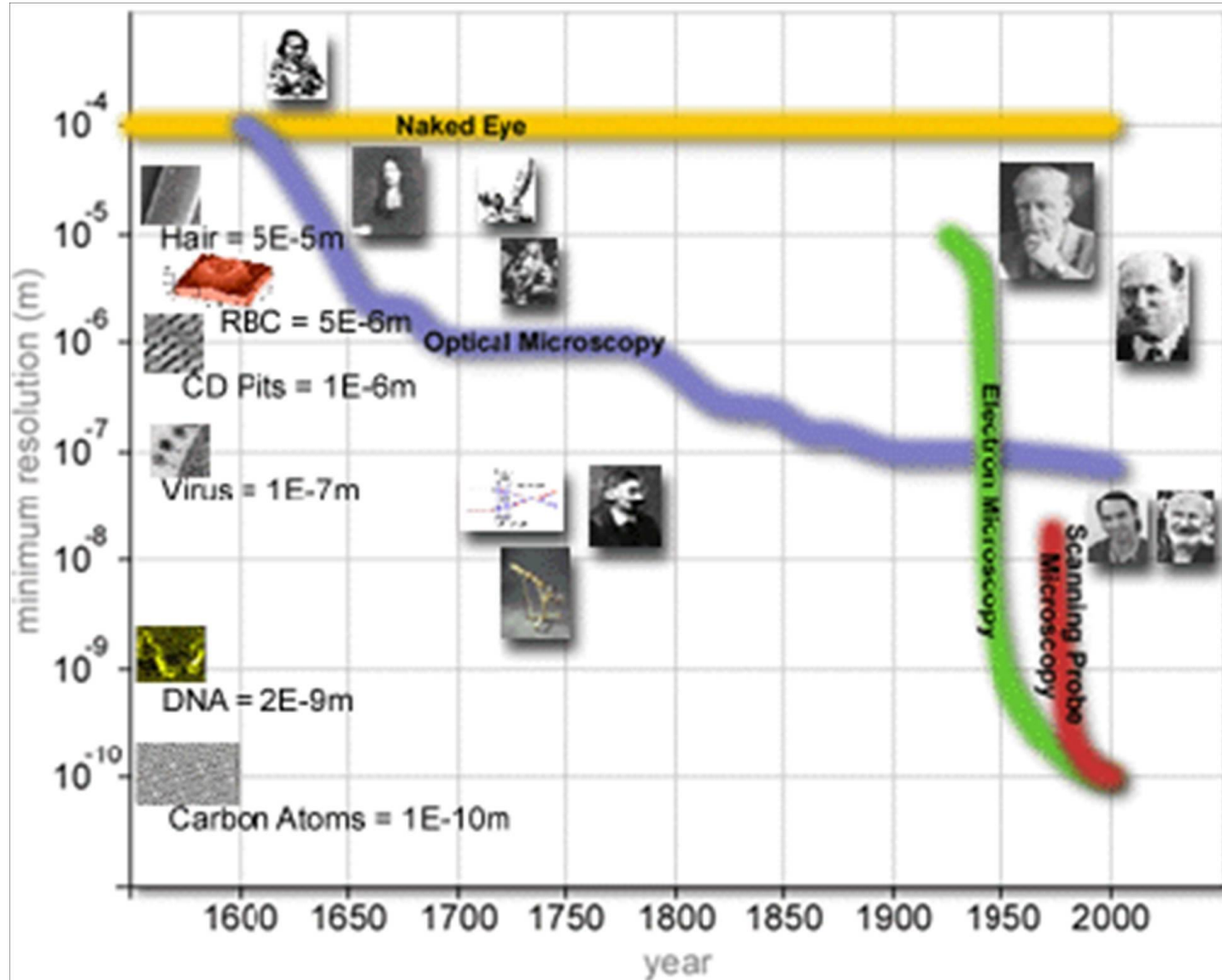


Μικροσκόπια



Microscope: Micro = Gk. “small” + skopien = Gk. “to look at”

Μικροσκόπια



"Microscope" was first coined by members of the first "Accademia dei Lincei" a scientific society which included Galileo

Ιστορία: Η πρώτη περιγραφή μικροοργανισμών

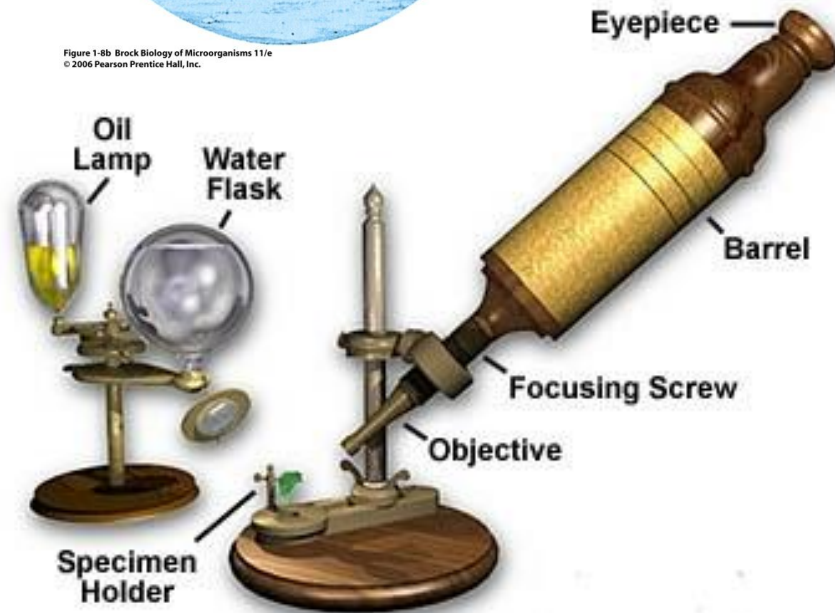


• Robert Hooke

- Παρατήρησε δομές της καρποφορία της μούχλας το 1665 και ήταν ο πρώτος που περιέγραψε μικροοργανισμούς
- Τα σύνθετα μικροσκόπια ήταν ως επί το πλείστον κακής ποιότητας και μπορούσαν να μεγεθύνουν μόνο μέχρι 20-30 φορές
- Χρωματικές Εκτροπές (Chromatic aberrations)
- Chester More Hall,, δικηγόρος, 1730
 - Παρατήρησε ότι το γυαλί flint (πρόσφατα κατασκευασμένο γυαλί) διασκόρπιζε τα χρώματα πολύ περισσότερο από ό, τι γυαλί crown (παλαιότερα κατασκευασμένο γυαλί)
 - Σχεδίασε ένα σύστημα που χρησιμοποίησε ένα κοίλο φακό δίπλα σε ένα κυρτό φακό που μπορούσε να ευθυγραμμίσει ξανά όλα τα χρώματα → ο πρώτος αχρωματικός φακός
- Ο Hooke ισχυρίστηκε ότι ήταν πολύ δύσκολο να χρησιμοποιήσει το σύνθετο μικροσκόπιο – η όραση του ήταν κακή.



Figure 1-8b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

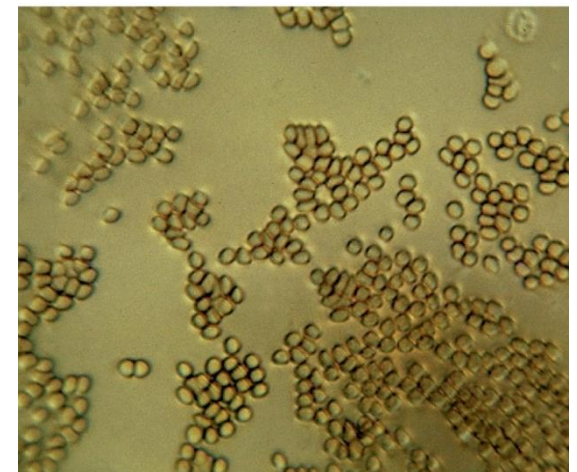
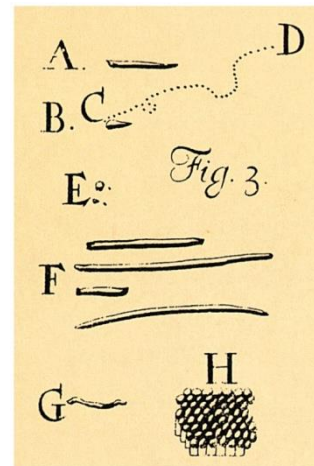
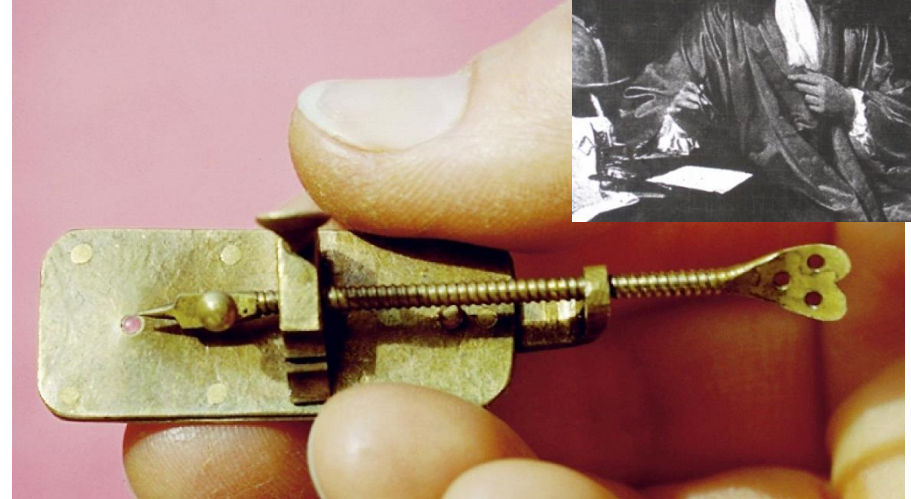


Ιστορία: Η πρώτη περιγραφή μικροοργανισμών



• Antoni van Leeuwenhoek

- Εσφαλμένα αποκαλείται "ο εφευρέτης του μικροσκοπίου"
- Δημιούργησε ένα "απλό" μικροσκόπιο με ένα φακό που μπορούσε να μεγεθύνει σε περίπου 275x
- Δημοσίευσε σχέδια μικροοργανισμών το 1676
- Ο τομέας της μικροβιολογίας δεν ήταν σε θέση να αναπτυχθεί μέχρι που ο Leeuwenhoek κατασκεύασε μικροσκόπια που επέτρεψαν στους επιστήμονες να δουν οργανισμούς πάρα πολύ μικρό για το γυμνό μάτι.



Το Πιο Απλό Μικροσκόπιο

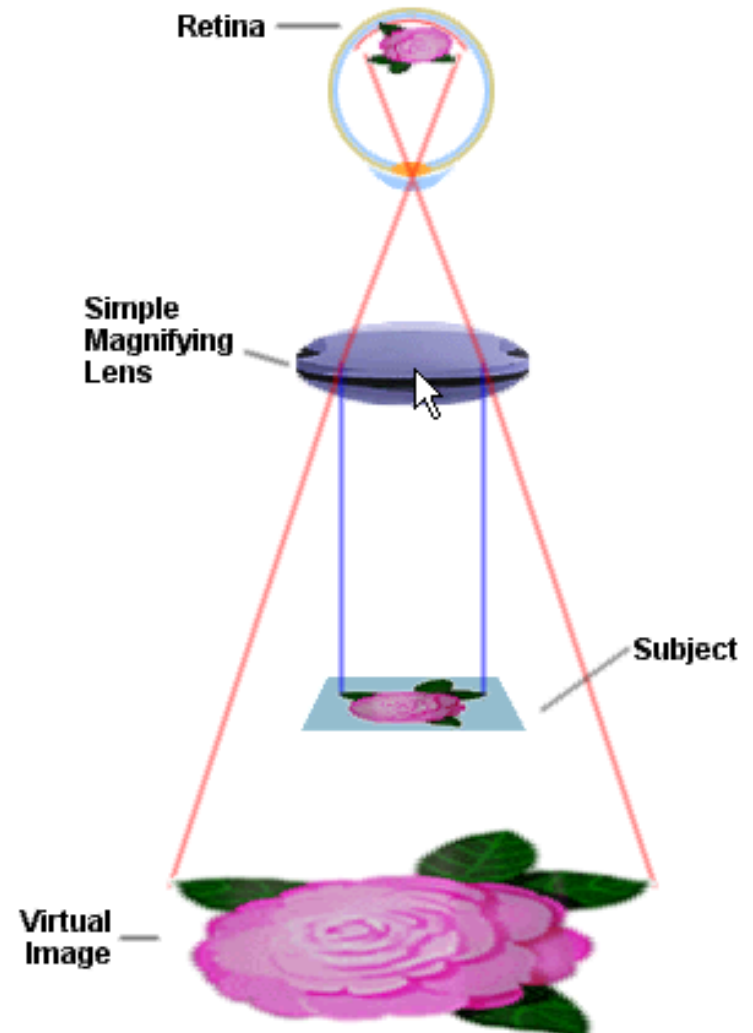
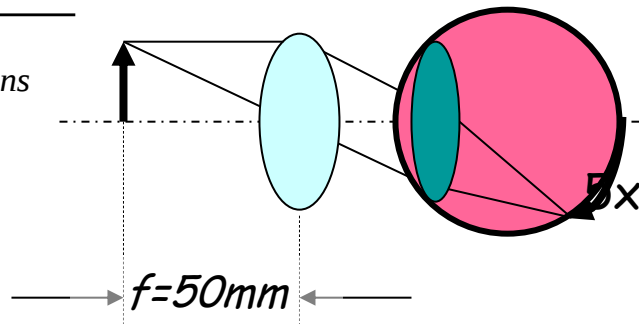


- **Μεγεθυντικός φακός**

- Μεγεθυντικός φακός (με ένα φακό) κάνει το αντικείμενο να φαίνεται μεγαλύτερο.
- Ο εγκέφαλός μας επεξεργάζεται το είδωλο σαν να έρχεται σε ευθεία γραμμή, ώστε η εικόνα εμφανίζεται μεγαλύτερη

Παράδειγμα:

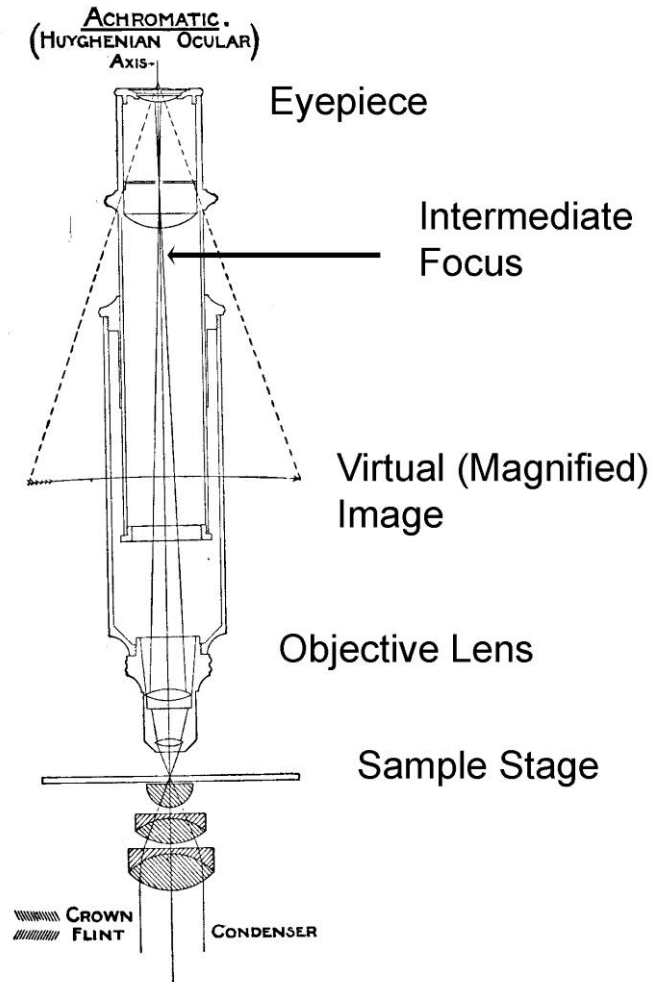
$$M = \frac{250mm}{f_{Lens}}$$



Σύνθετο (Compound) Μικροσκόπιο



- Το σύνθετο μικροσκόπιο χρησιμοποιεί τουλάχιστον δύο φακούς
 - Συγκεντρωτικός (condenser) φακός
 - Παρέχει φωτισμό
 - Αυξάνει την ευκρίνεια
 - Αντικειμενικός (objective) φακός
 - Σχηματίζει ένα ενδιάμεσο είδωλο του δείγματος στο μήκος του σωλήνα
 - Μοντέρνοι Αντικειμενικοί Φακοί
 - Φακοί πολλαπλών στοιχείων
 - Ο αριθμός των φακών σε ένα μοντέρνο μικροσκόπιο μπορεί εύκολα να ξεπεράσει τους 20
 - Προσοφθάλμιος φακός (eyepiece or ocular lens)
 - Δημιουργεί ένα δευτερεύον είδωλο (virtual image) στο μάτι
 - Για φωτοανιχνευτή (κάμερα) πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας φακός προβολής (projection) για να δημιουργήσει πραγματικό (real) είδωλο



Adapted from Spitta, 3rd Edition

Σύνθετο (Compound) Μικροσκόπιο

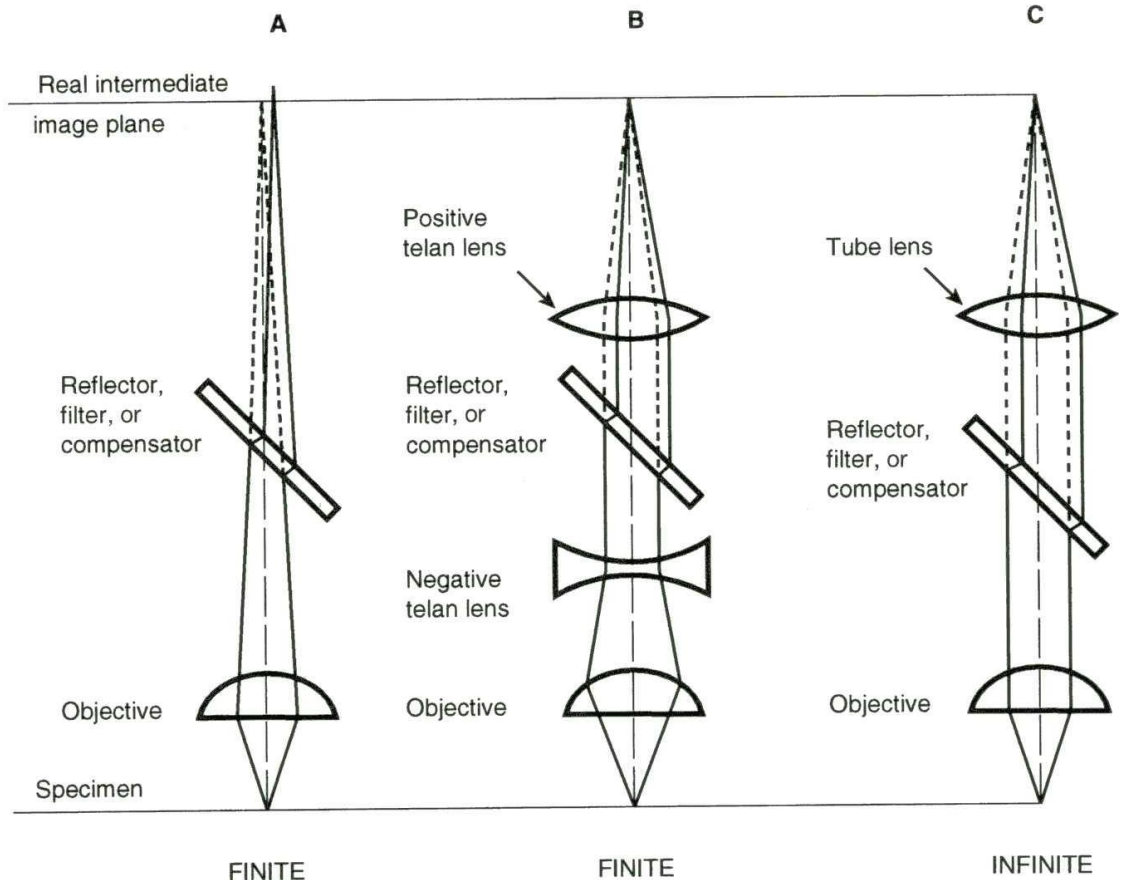


- Οι σημερινοί αντικειμενικοί φακοί είναι, ως επί το πλείστον, εστιασμένοι στο άπειρο (infinity corrected)

- Οι ακτίνες βγαίνουν παράλληλα από τον φακό
- Άπειρο μήκος σωλήνα
- Χρειάζεται επιπρόσθετος φακός στον σωλήνα για να δημιουργήσει το ενδιαμέσο είδωλο

- Προτερήματα

- Οι αντικειμενικοί φακοί είναι πιο απλοί
- Η οπτική διαδρομή είναι παράλληλη διαμέσου όλου του μικροσκοπίου
- Στοιχεία τα οποία εισάγονται στη διαδρομή δεν επηρεάζουν την εστίαση της εικόνας



Benefits of infinity correction.

(A) Insertion of reflector or filter causes lateral and axial shift.

(B) Two telan lenses generate infinity space to eliminate the shift

(C) Objective directly provides infinity space

Σύνθετο (Compound) Μικροσκόπιο



Οπτική Δημιουργία Εικόνας: Βασικές αρχές

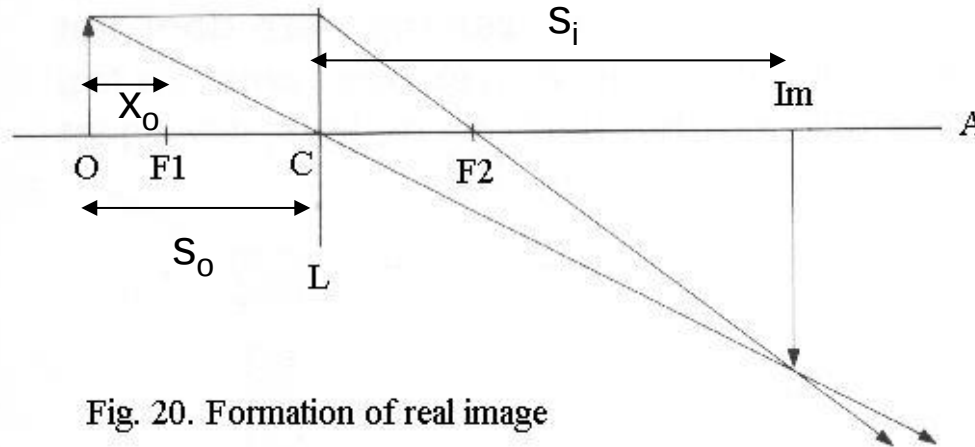


Fig. 20. Formation of real image

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{S_o} + \frac{1}{S_i}$$

F=εστιακή απόσταση (focal length)

S_o =απόσταση του αντικειμένου από τον φακό

S_i =απόσταση του ειδώλου από τον φακό

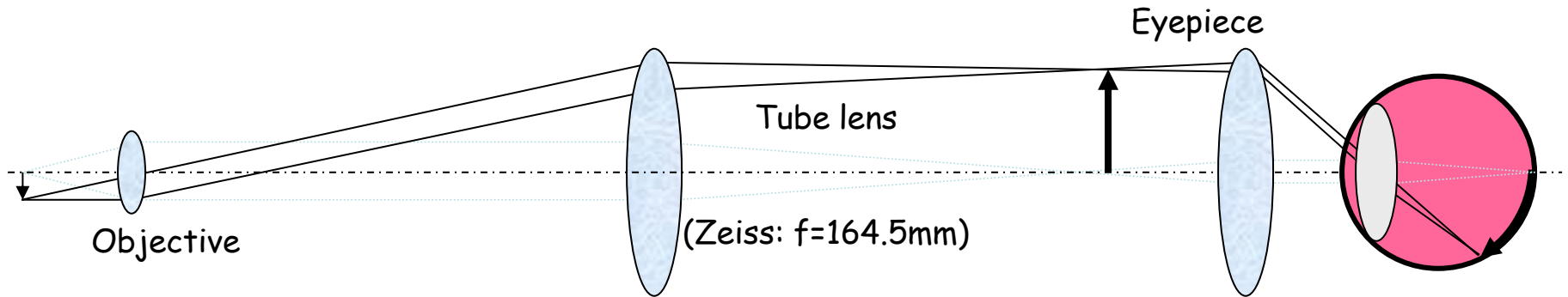
$$M = -\frac{S_i}{S_o} = -\frac{f}{X_0}$$

M=μεγέθυνση (magnification)

X_0 =απόσταση αντικειμένου από την πίσω εστία του φακού
- πρόσημο γιατί η εικόνα είναι αντιστραμμένη (inverted)

$$\frac{f}{S_o - f} = \frac{|y_i|}{y_o} = \frac{f}{S_i - f}$$

Σύνθετο (Compound) Μικροσκόπιο

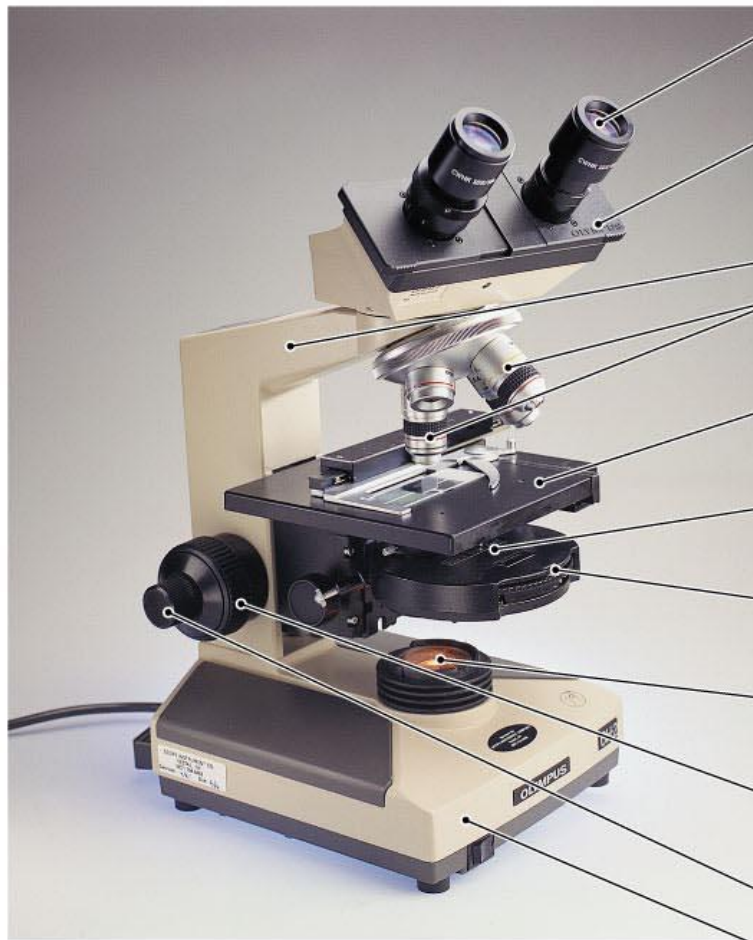


$$M = \frac{250\text{mm}}{f_{\text{Objective}}} \times \frac{f_{\text{Tube}}}{250\text{mm}} \times \frac{250\text{mm}}{f_{\text{Eyepiece}}}$$

$$M = \frac{f_{\text{Tube}}}{f_{\text{Objective}}} \times \frac{250\text{mm}}{f_{\text{Eyepiece}}}$$

$$M_{\text{Compound Microscope}} = M_{\text{Objective}} \times M_{\text{Eyepiece}}$$

Σύνθετο (Compound) Μικροσκόπιο



(a)

Ocular lens
Remagnifies the image formed by the objective lens

Body
Transmits the image from the objective lens to the ocular lens using prisms

Arm

Objective lenses
Primary lenses that magnify the specimen

Stage
Holds the microscope slide in position

Condenser
Focuses light through specimen

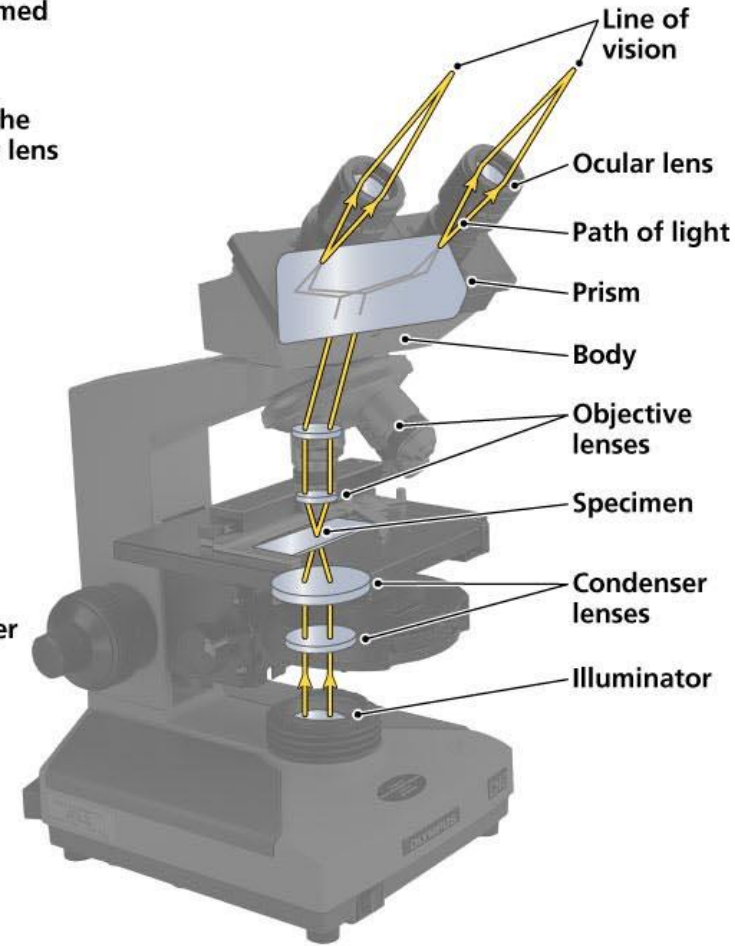
Diaphragm
Controls the amount of light entering the condenser

Illuminator
Light source

Coarse focusing knob
Moves the stage up and down to focus the image

Fine focusing knob

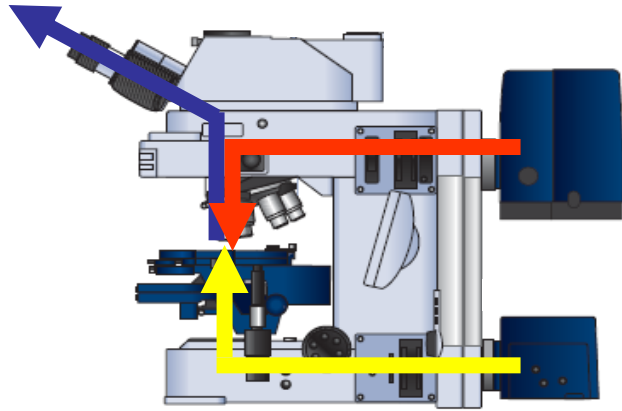
Base



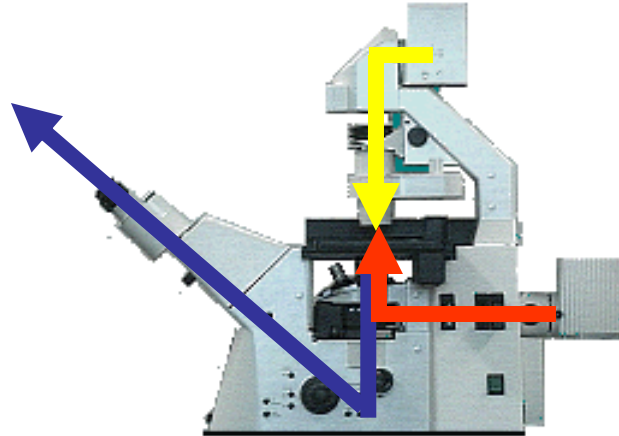
(b)

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Σύνθετο (Compound) Μικροσκόπιο



Όρθιο (Upright)
μικροσκόπιο



Ανεστραμμένο (Inverted)
μικροσκόπιο

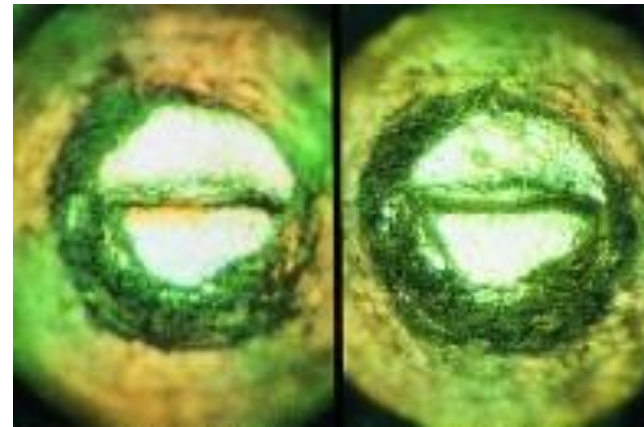


Στέρεο (Stereo)
μικροσκόπιο

Σύνθετο (Compound) Μικροσκόπιο



Σύγκρισης (Comparison)
("CSI") μικροσκόπιο



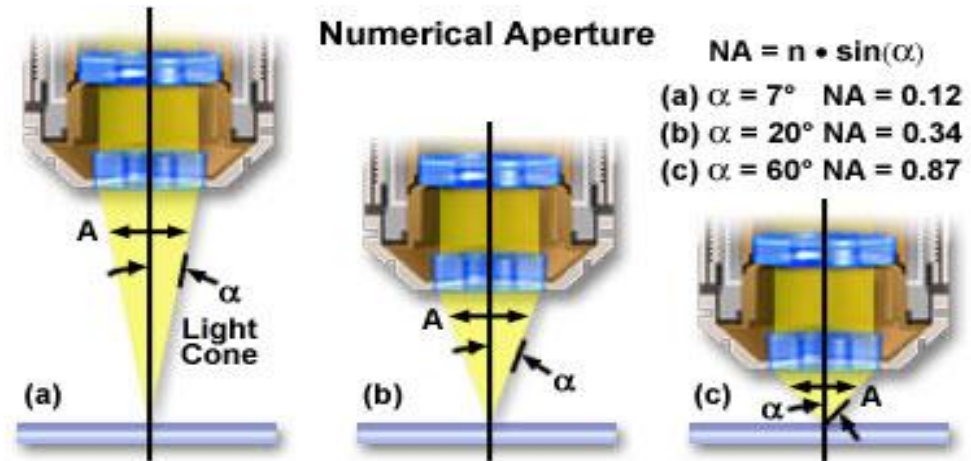
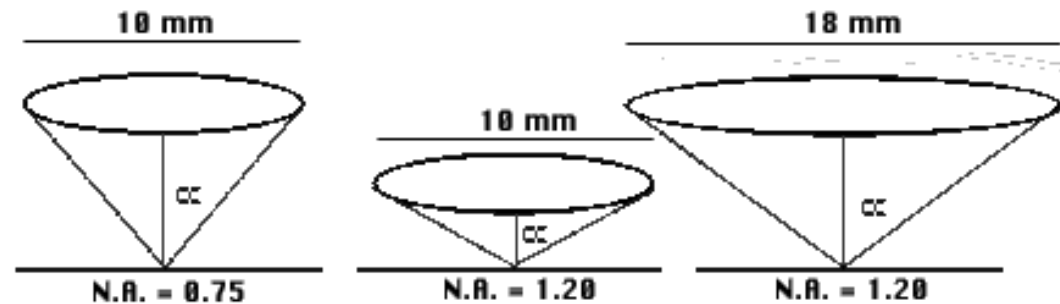
Split-image comparison of firing pin
imprints in coaxial incident light

Οπτική Ευκρίνεια (Optical Resolution)



- **Αριθμητικό Άνοιγμα (Numerical aperture - NA) ενός φακού**

- Η ικανότητα να συλλέγει φως και να διακρίνει λεπτομέρειες του δείγματος σε σταθερή απόσταση
- $NA = n \cdot \sin \alpha$
 - n = δείκτης διάθλασης του μέσου
 - α = μισή γωνία του κώνου συλλογής φωτός
- Για συγκεκριμένο NA και διάμετρο $\rightarrow$ όσο η μεγέθυνση αυξάνεται, η απόσταση εργασίας (working distance), δηλ. η απόσταση από τη μύτη του αντικειμενικού φακού μέχρι το δείγμα, μειώνεται



Οπτική Ευκρίνεια (Optical Resolution)

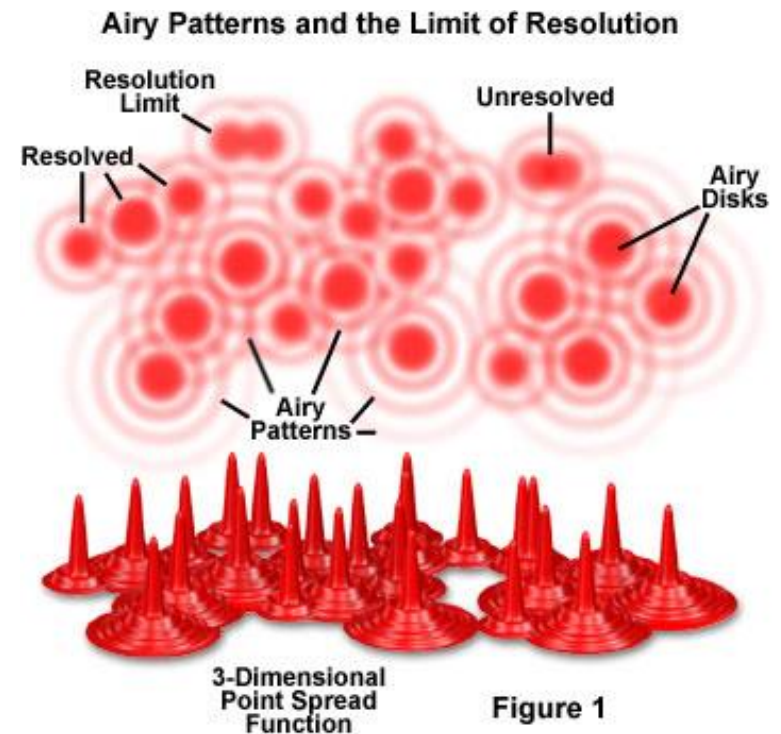
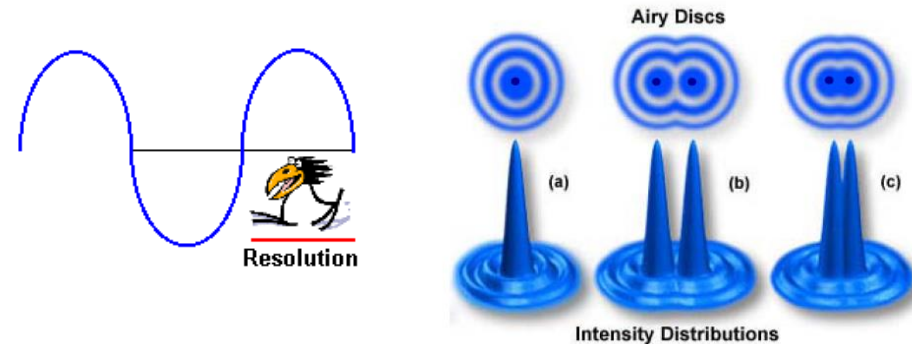


- **Ευκρίνεια ενός οπτικού μικροσκοπίου**

- Η μικρότερη απόσταση μεταξύ δύο σημείων του δείγματος τα οποία διακρίνονται ως ξεχωριστά σημεία από τον παρατηρητή ή την κάμερα.

- **Ευκρίνεια ενός ιδανικού οπτικού συστήματος**

- Θεωρητικά $d = \lambda/2$
- Περιορίζεται από τη περίθλαση (diffraction) → δημιουργία έντασης δίσκου Airy όταν το φως εστιάζεται σε ένα σημείο

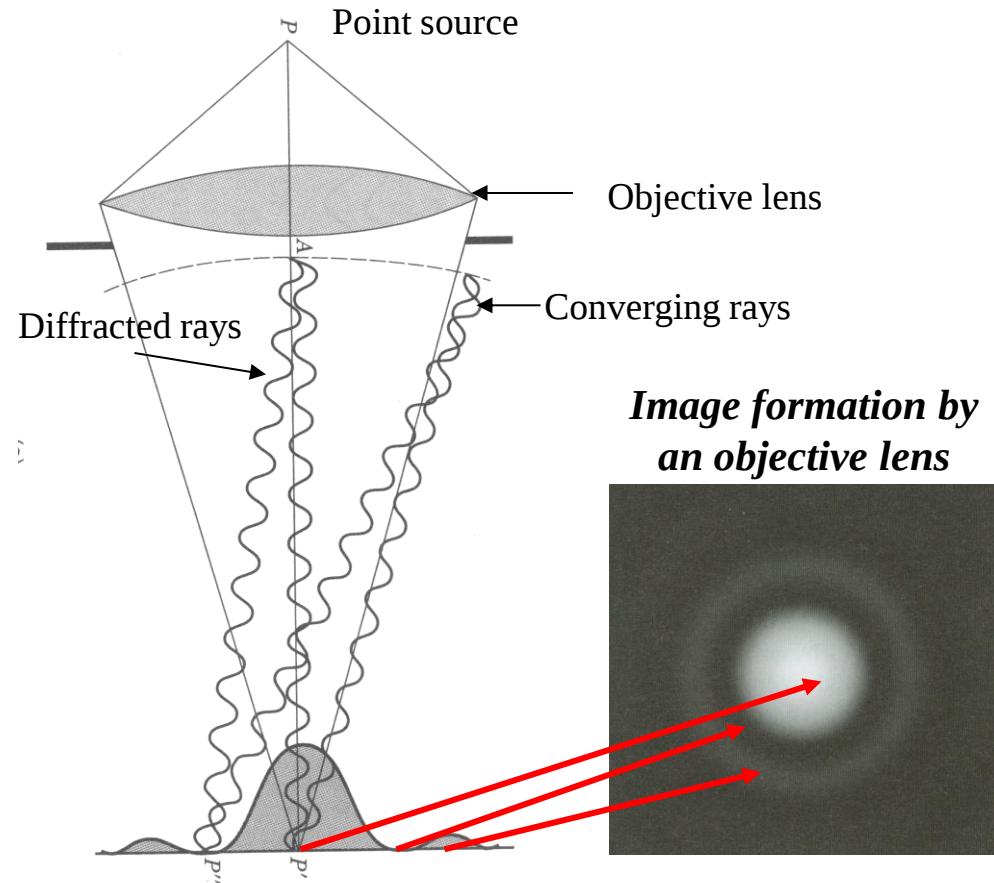


Οπτική Ευκρίνεια (Optical Resolution)



- **Συνάρτηση Διασποράς Σημείου (Point Spread Function – PSF)**

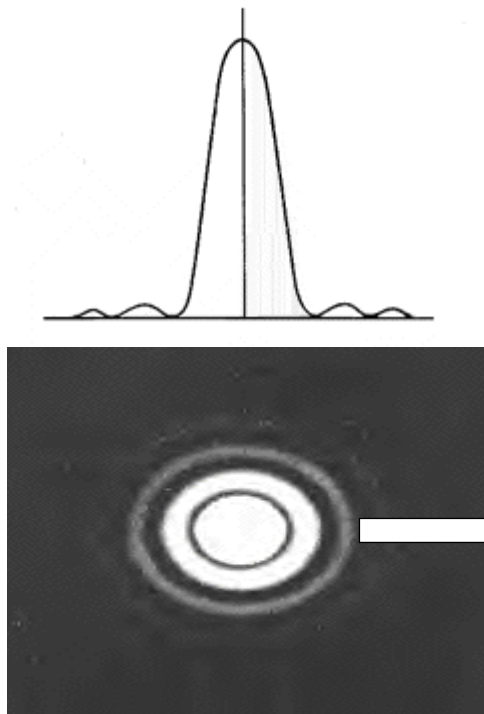
- Συμβολή των περιθλώμενων ακτινών
 - Ενισχυτική (constructive) ή καταστρεπτική (destructive) → δακτύλιοι συμβολής
- Η μαθηματική περιγραφή του φαινομένου είναι η PSF
- Η δομή της περίθλασης μιας σημειακής πηγής φωτός
 - Κεντρικός κύκλος και περιφερικοί δακτύλιοι
 - Η απόσταση από το κέντρο μέχρι το πρώτο ελάχιστο εξαρτάτε από το αριθμητικό (NA) άνοιγμα του φακού



Οπτική Ευκρίνεια (Optical Resolution)

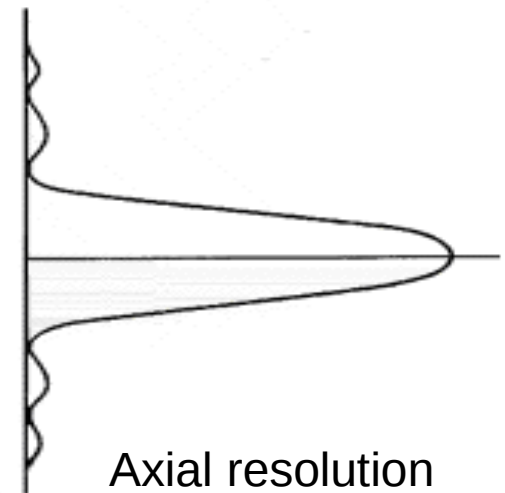
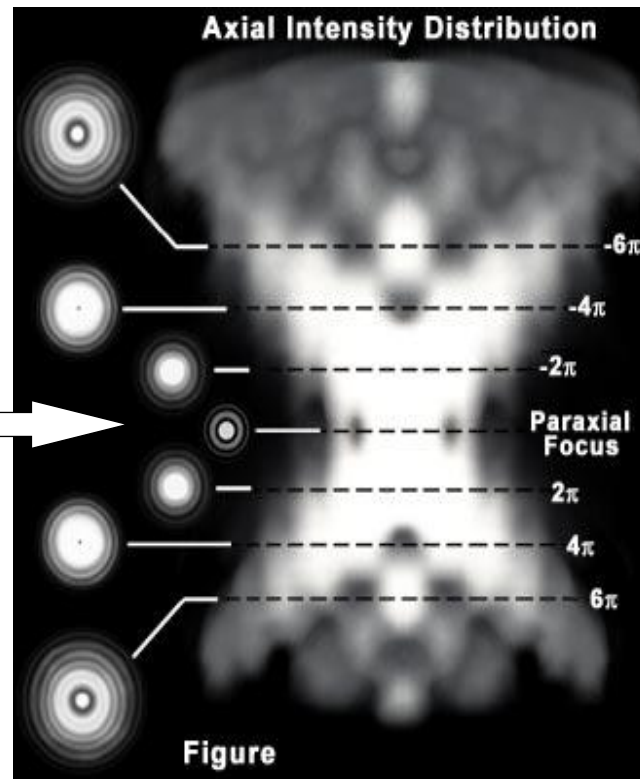


- Δίσκος Airy σε 2D και 3D



Lateral resolution

$$d_{lat} = 1.22 \frac{\lambda}{NA}$$



$$d_{ax} = 4 \frac{\lambda n}{(NA)^2}$$

Οπτική Ευκρίνεια (Optical Resolution)



- **Ευκρίνεια**

- Μικρότερο μήκος κύματος και μεγαλύτερο NA → καλύτερη ευκρίνεια
- Για συνήθη οπτική μικροσκοπία η ελάχιστη ευκρίνεια στο όριο της περίθλασης (diffraction limited) είναι της τάξης των 200 nm

- **Πως βελτιώνεται;**

- Μεγαλύτερο NA (φακοί, υγρό κατάδυσης (immersion fluid))
- Μικρότερο λ

- **Χρήση συγκεντρωτικού (condenser) φακού**

- $D = 1.22 \lambda / (NA_{obj} + NA_{cond.})$
- Για 1.3 NA αντικειμενικό και συγκεντρωτικό, το D μειώνεται στα ~250 nm

- **Παραδείγματα**

- 10 x, 0.3 NA
- 60 x, 1.3 N.A.

$$d_{lat} = 1.22 \frac{\lambda}{NA_{obj} + NA_{cond}} \quad d_{ax} = 4 \frac{\lambda n}{(NA_{obj} + NA_{cond})^2}$$

**10 x, 0.3 NA objective at 530 nm light ,
10x Eyepiece**

$$M = M_{obj} M_{eyep} = 10 \times 10 = 100$$

$$d_{lat} = 1.22 \frac{530nm}{0.3+0.3} = 1.08 \mu m$$

$$d_{ax} = 4 \frac{530nm}{(0.3+0.3)^2} = 5.89 \mu m$$

**60 x, 1.3 N.A. objective at 530 nm light,
10x Eyepiece**

$$M = M_{obj} M_{eyep} = 60 \times 10 = 600$$

$$d_{lat} = 1.22 \frac{530nm}{1.3+1.3} = 248.7nm$$

$$d_{ax} = 4 \frac{530nm}{(1.3+1.3)^2} = 313.6nm$$

Χαρακτηριστικά Αντικειμενικού Φακού



60x Plan Apochromat Objective



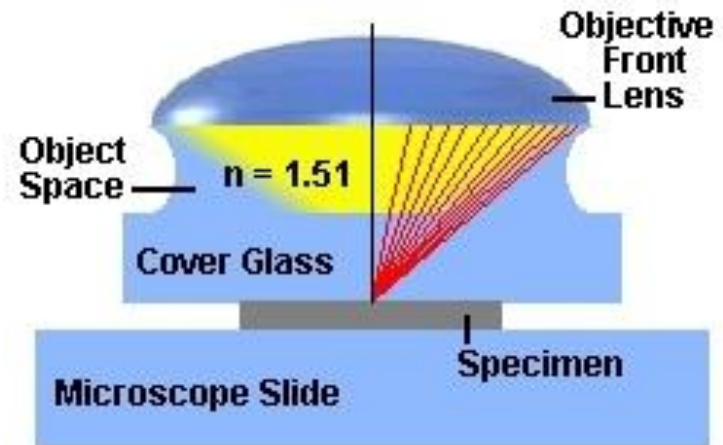
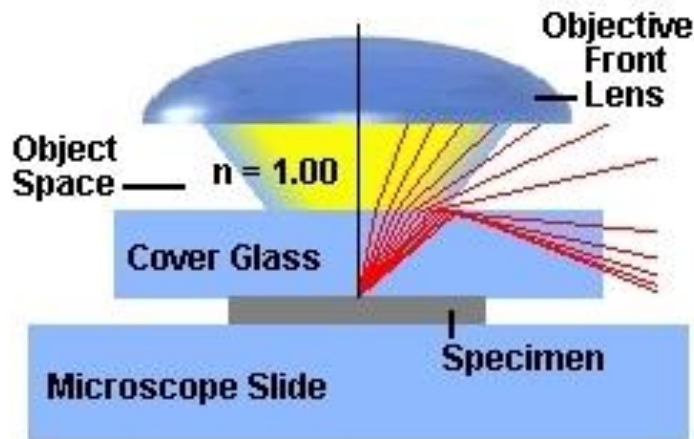
Figure 1

Χαρακτηριστικά Αντικειμενικού Φακού



- **Ελαιοκατάδυση (oil immersion)**

- Απαραίτητη για μεγάλα NA



Images reproduced from: <http://micro.magnet.fsu.edu/>
Please go to this site and do the tutorials

Χαρακτηριστικά Αντικειμενικού Φακού



• Σφάλματα(Aberrations)

- Σφαιρικά Σφάλματα (Spherical aberration)
 - Τα πιο σοβαρά
 - Υγρό κατάδυσης (Immersion fluid)
- Καμπυλότητα Πεδίου (Field curvature)
- Χρωματικό Σφάλμα (Chromatic aberration)
- Αστιγματισμός (Astigmatism), Κόμη (coma)
- <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/opticalaberrations.html>

Achromats	Most common Lowest price Poorly corrected, bad for demanding applications.
Fluorites or Semi Plan Apochromats	Mid-grade lenses, better correction, flat field.
Plan Apochromats	Best grade, most expensive (>\$3,000 for some) , very well corrected.

Κύριες Διαδρομές Φωτός

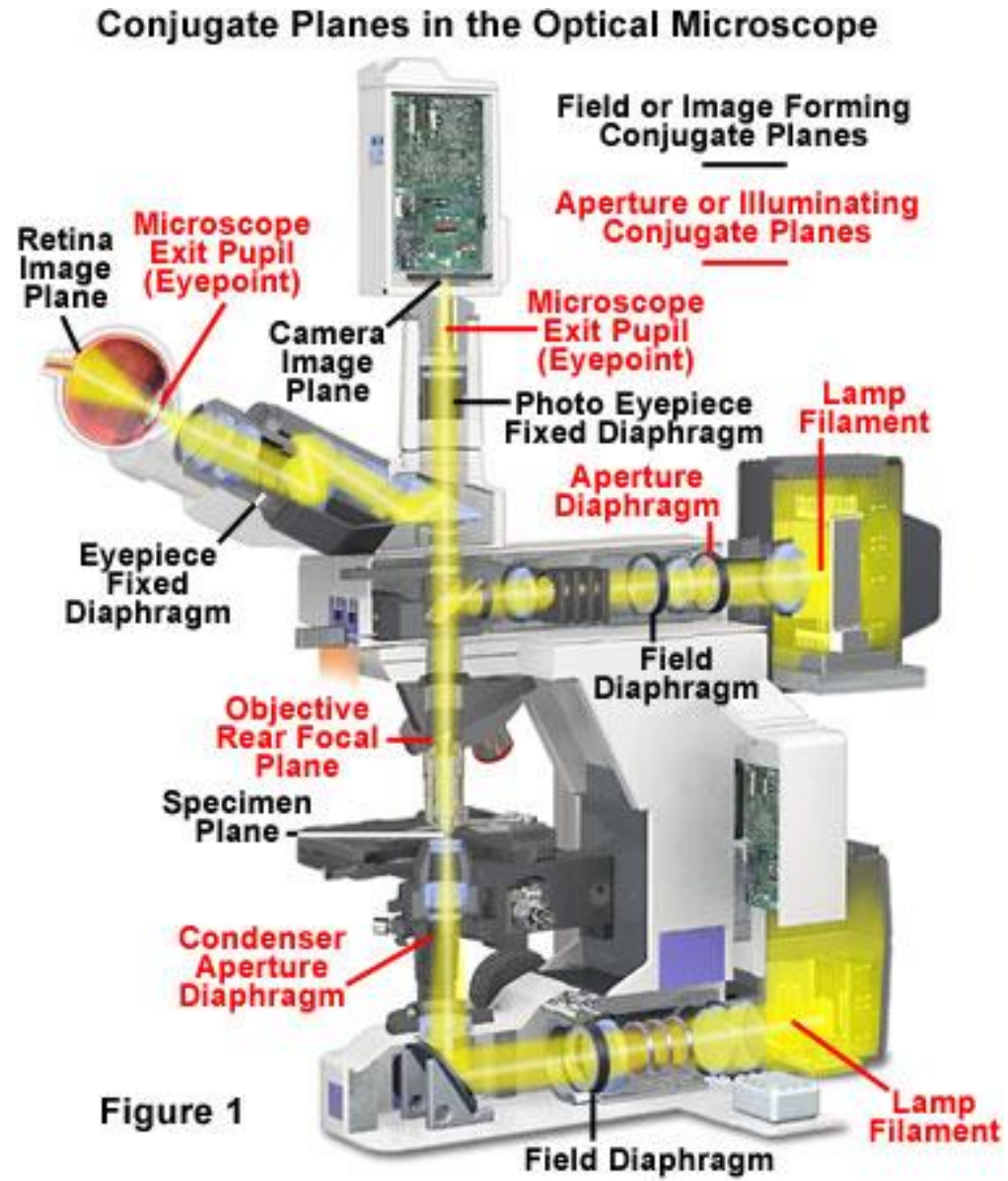


- **Φωτισμού (Illumination)**

- Κύριος Στόχος:
ομοιόμορφος φωτισμός
του δείγματος

- **Απεικόνισης (Imaging)**

- Κύριος Στόχος:
δημιουργία ειδώλου του
δείγματος με ελάχιστη
παραμόρφωση
(distortion), μεγάλη
αποδοτικότητα στη
συλλογή φωτός και ψηλή
ευκρίνεια

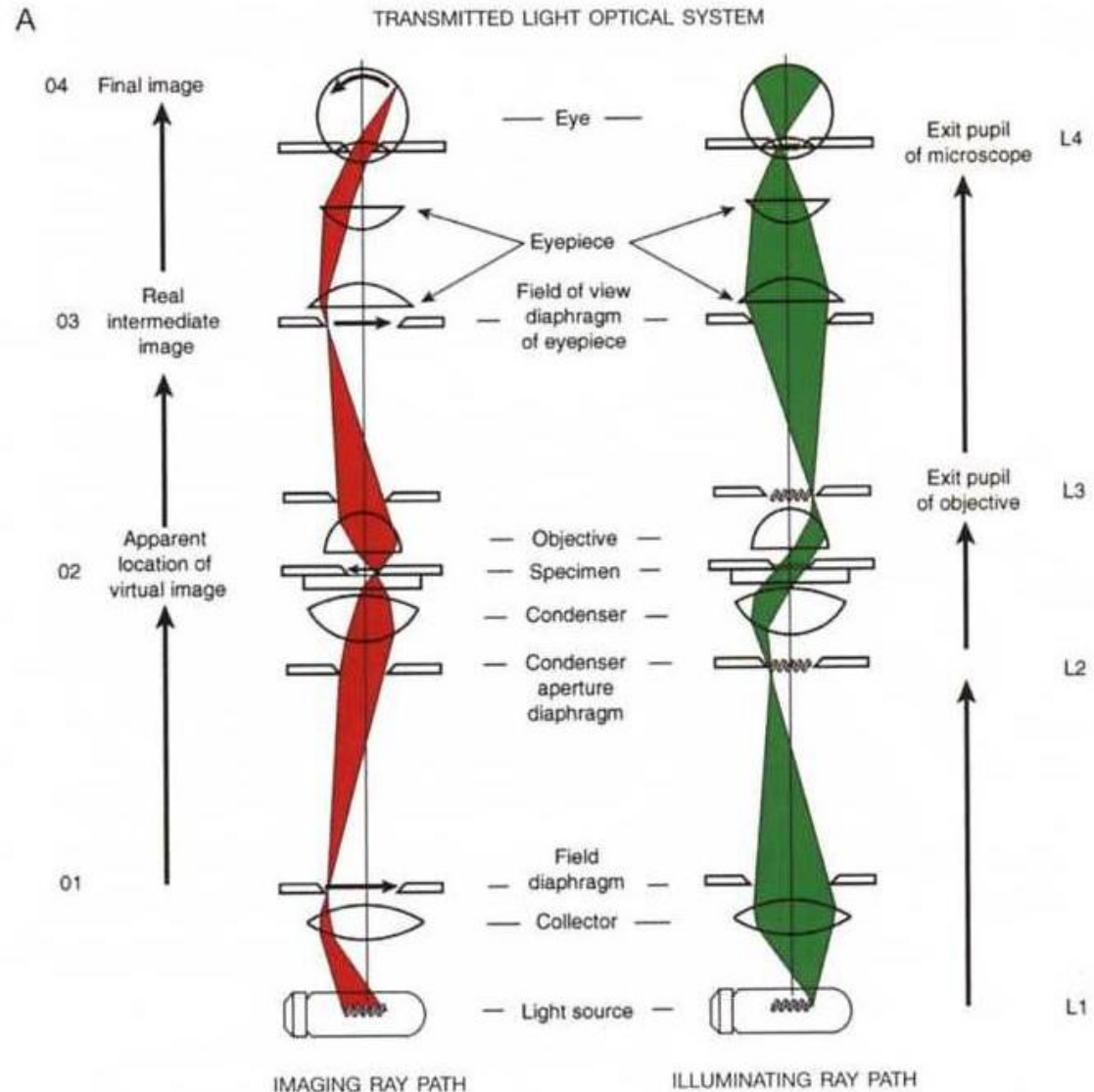


Κύριες Διαδρομές Φωτός



• Φωτισμός Köhler

- Δημιουργεί ένα ομοιόμορφα φωτισμένο πεδίο ενώ φωτίζει το δείγμα με ένα ευρύ κώνο φωτός
- Δημιουργούνται δύο συζυγή επίπεδα εικόνας (conjugate image planes)
 - Το ένα περιέχει το είδωλο του δείγματος
 - Το άλλο περιέχει το νήμα της πηγής φωτός

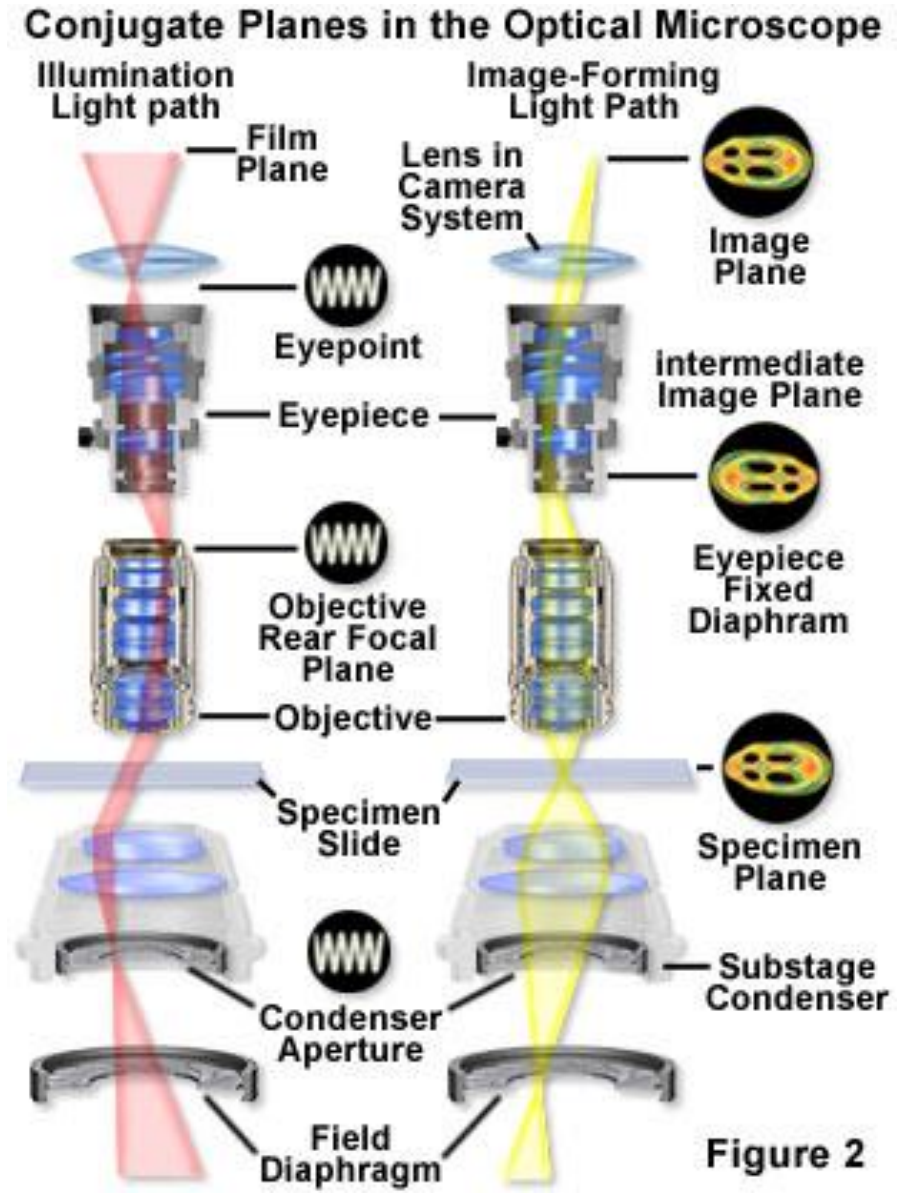


Κύριες Διαδρομές Φωτός



- **Διαπερατός Φωτισμός ή Διαφανοσκόπηση (Transillumination)**

- **Διάφραγμα Συγκεντρωτικού (Condenser aperture):** Επηρεάζει το NA του συγκεντρωτικού φακού → ευκρίνεια
- **Διάφραγμα Πεδίου (Field diaphragm):** Επηρεάζει το μέγεθος του πεδίου που φωτίζεται στο εστιακό επίπεδο



Κύριες Διαδρομές Φωτός



- Προσπίπτον Φωτισμός (Epi-illumination)

- Διάφραγμα Ανοίγματος (Aperture diaphragm): Επηρεάζει το NA του αντικειμενικού φακού στο φωτισμό → ευκρίνεια
- Διάφραγμα Πεδίου (Field diaphragm): Επηρεάζει το μέγεθος του πεδίου που φωτίζεται στο εστιακό επίπεδο

Conjugate Planes in the Incident Light Optical System

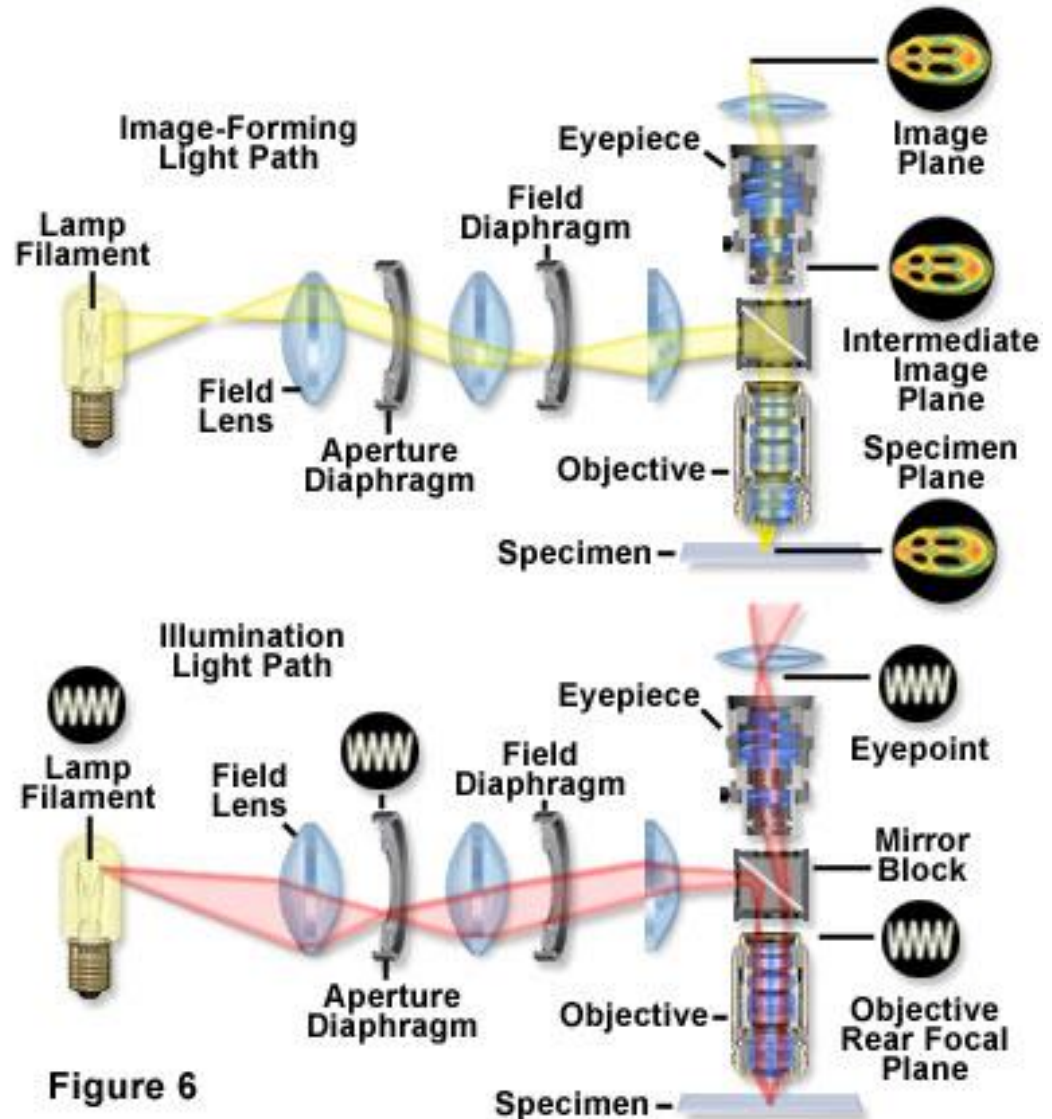


Figure 6

0 Units

50 Units

100 Units

50 50 50
ANTI-ΘESH

$$C = \frac{\text{Brightness of Specimen} - \text{Brightness of Background}}{\max(\text{Brightness of Specimen}, \text{Brightness of Background})}$$

$$50 - 0 / 50 = 1$$

$$50 - 50 / 50 = 0$$

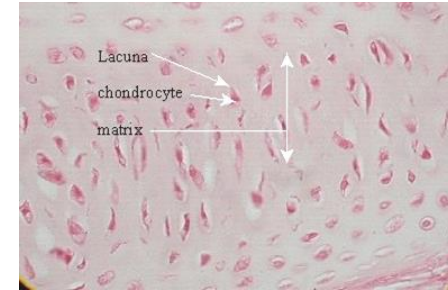
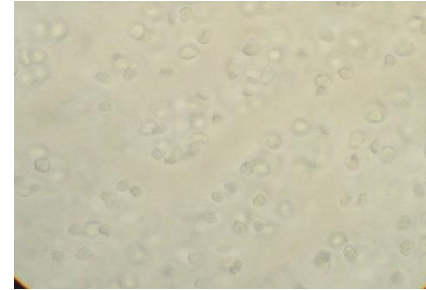
$$50 - 100 / 100 = -0.50$$

Αντίθεση



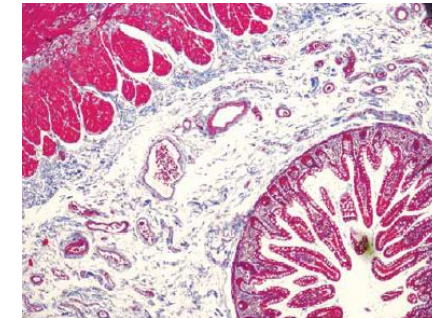
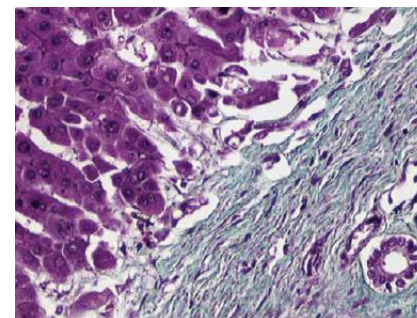
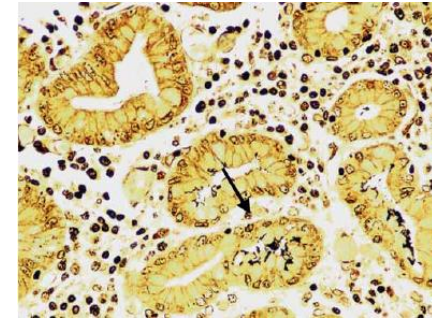
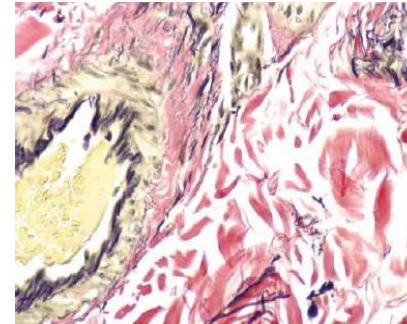
- **Ικανότητα να ξεχωρίζουν τα αντικείμενα από το φόντο**

- Χαρακτηριστικά του δείγματος που προκαλούν
 - Αλλαγές στη φωτεινότητα (brightness)
 - Αλλαγές στο χρώμα
- Προέρχονται από
 - Απορρόφηση, ανάκλαση, σκέδαση, περίθλαση
 - Χωρικές μεταβολές του δείκτη διάθλαση
 - Διπλή Διάθλαση (Birefringence)
 - Φθορισμός και άλλα σχετικά οπτικά φαινόμενα



- **Μπορεί να βελτιωθεί με χρωστικές (stains)**

- Το δείγμα πρέπει να θυσιαστεί → μονιμοποίηση (fixation), τομή (sectioning) και χρώση (staining)
- Διάφορες χρωστικές → χρωματίζουν διαφορετικά κύτταρα/κυτταρικές δομές με διαφορετικό χρώμα
- Ανοσοιστοχημεία (Immunohistochemistry) → χρώση με βοήθεια αντισωμάτων





- Η αντίθεση μπορεί να βελτιωθεί με διάφορες τεχνικές φωτισμού/απεικόνισης

- Φωτεινού Πεδίου (Brightfield)
- Σκοτεινού Πεδίου (Darkfield)
- Πολωτική (Polarized)
- Αντίθεσης Φάσεως (Phase Contrast)
- Αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC)
- Φθορισμού (Fluorescence)



Μικροσκοπία Φωτεινού Πεδίου (Brightfield)



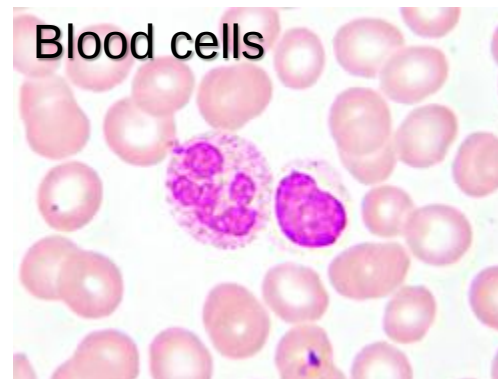
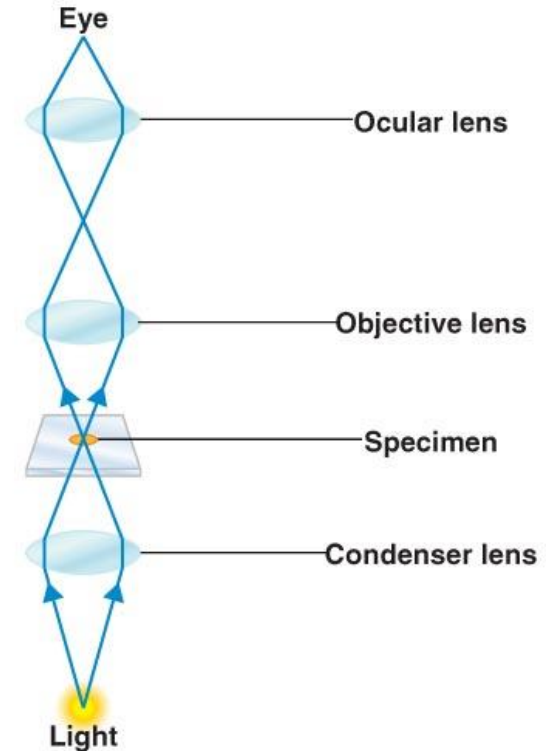
- **Ο πιο απλός τύπος μικροσκοπίας**

- Φωτισμός παντού στο δείγμα κάνοντας το πεδίο φωτεινό
- Τα δείγματα απορροφούν ή διαθλούν το φως εκτός πεδίου → σκοτεινά ή χρωματιστά αντικείμενα σε φωτεινό φόντο

- **Η αντίθεση προέρχεται κυρίως από απορρόφηση**

- Τα βιολογικά δείγματα δεν απορροφούν πολύ εκ του φυσικού τους
 - Χρήση χρωστικών που απαιτεί μονιμοποίηση, δη. Τα κύτταρα δεν είναι πια ζωντανά

- **Συνηθισμένη χρήση στην ιστοπαθολογία και αιματολογία και βασικές επιστήμες όπου δεν είναι ζωτικής σημασίας τα κύτταρα να είναι ζωντανά**



Blood cells



Tissue histology

Μικροσκοπία Σκοτεινού Πεδίου (Darkfield)

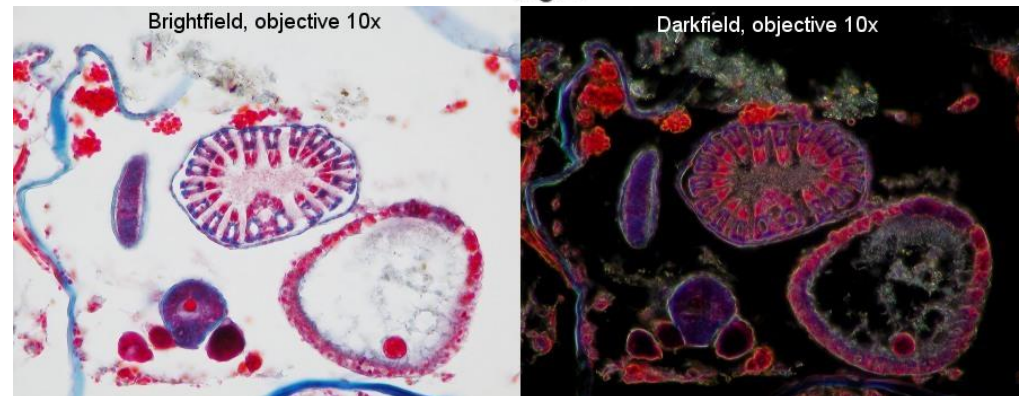
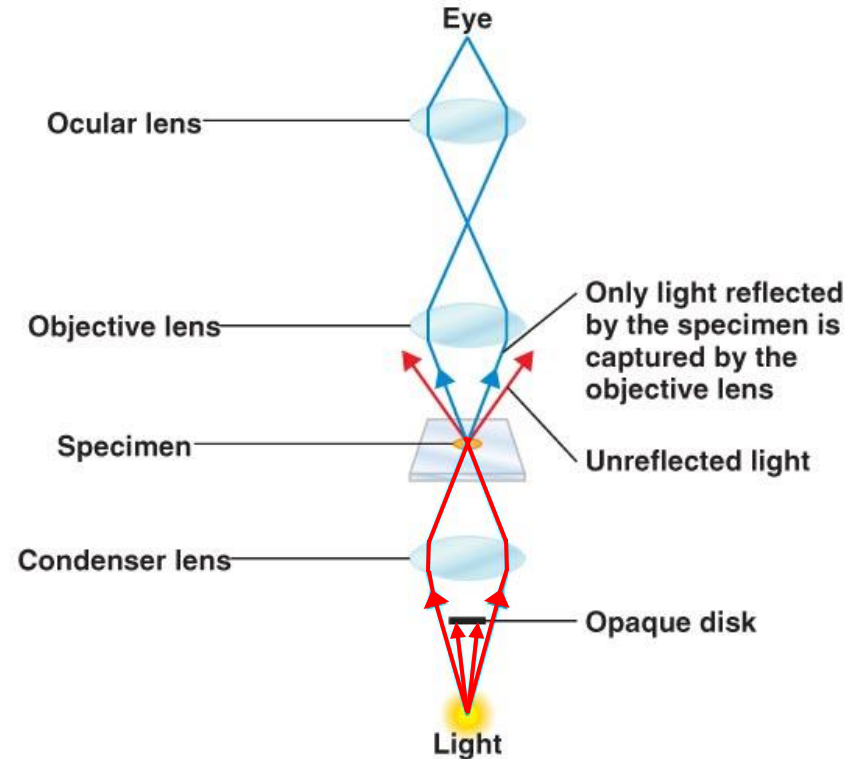


- Σε φωτισμό σκοτεινού πεδίου

- Φως έξω από το πεδίο δεν φτάνει στον αντικειμενικό φακό → το πεδίο είναι σκοτεινό
- Το φως που περνά από το δείγμα αλλάζει κατεύθυνση και φτάνει στον αντικειμενικό φακό
- Το δείγμα είναι φωτεινό σε σκοτεινό φόντο → πιο ευδιάκριτο

- Χρήσιμη για διερεύνηση

- Ζωντανών μικρο-οργανισμών
- Μικρο-οργανισμών στους οποίους δεν μπορούν να εφαρμοστούν συνήθεις χρώσεις
 - *Treponema pallidum*, που προκαλεί σύφιλη



Μικροσκοπία Πολωμένου Φωτός (Polarized)

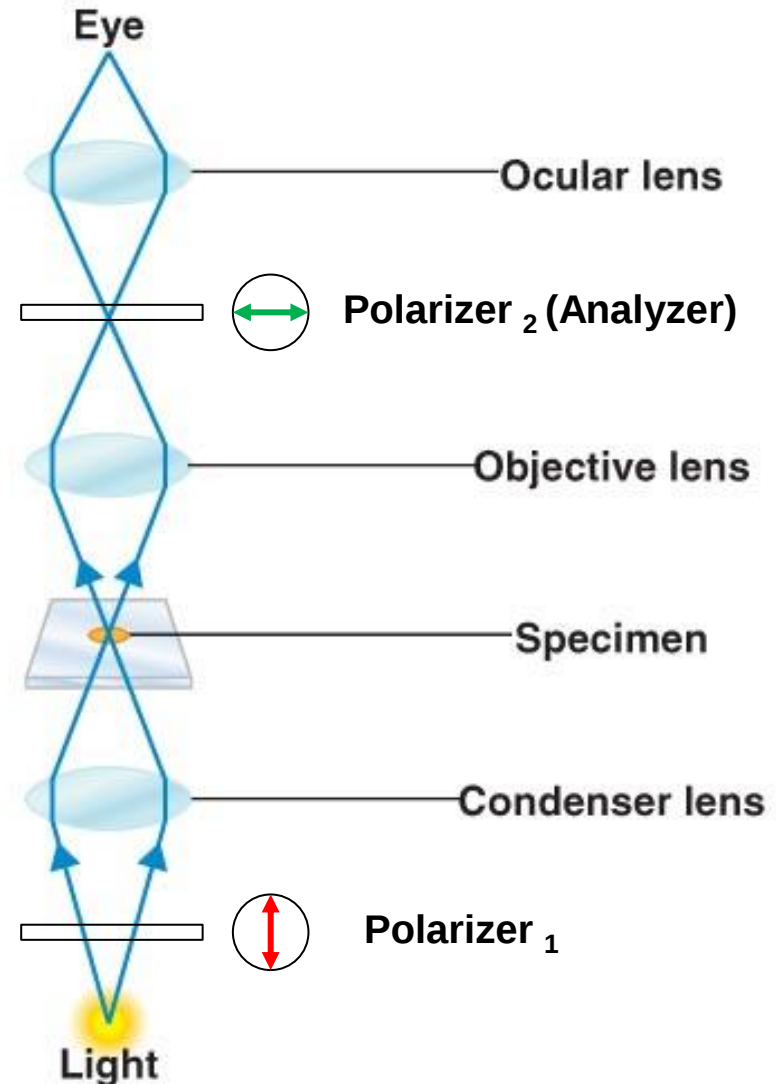


- Το δείγμα τοποθετείται ανάμεσα σε 2 πολωτές (polarizers)

- Όταν οι πολωτές είναι κάθετοι, μόνο τα δείγματα που περιστρέφουν την πόλωση θα φτάσουν στον ανιχνευτή
- Είναι ορατό μόνο το φως το οποίο προέρχεται από υλικά διπλής διάθλασης (birefringent) ή από τις άκρες του δείγματος ("edge birefringence")
- Μοιάζει λίγο με την Σκοτεινού Πεδίου (Darkfield)
- Πλάκα κύματος (Wave plate) προσθέτει χρώμα

- Εξαρτάται από τον προσανατολισμό (orientation)

- Γραμμική πόλωση



Μικροσκοπία Πολωμένου Φωτός (Polarized)

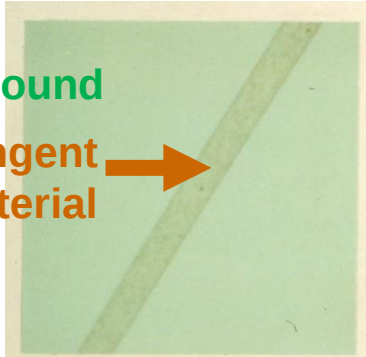


Background

Birefringent
Material



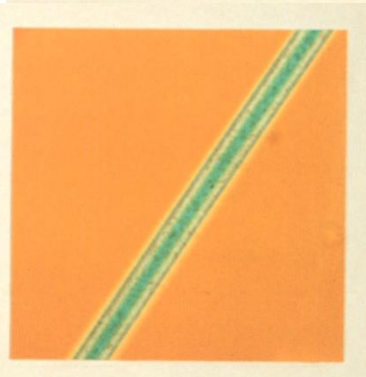
Brightfield



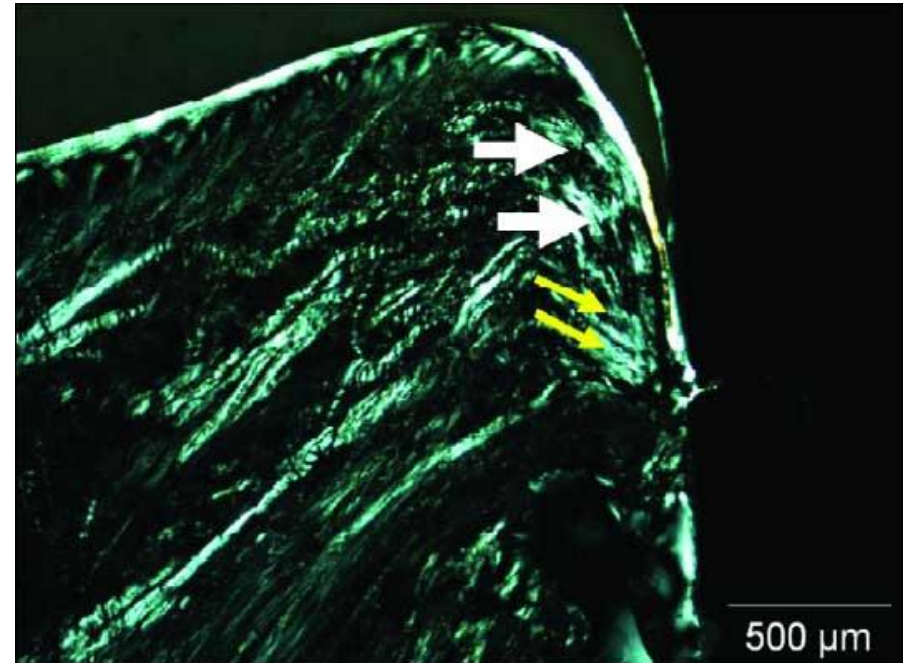
Polarized Light



Pol + Red I



Color of sample
and background
modified by
wave plate

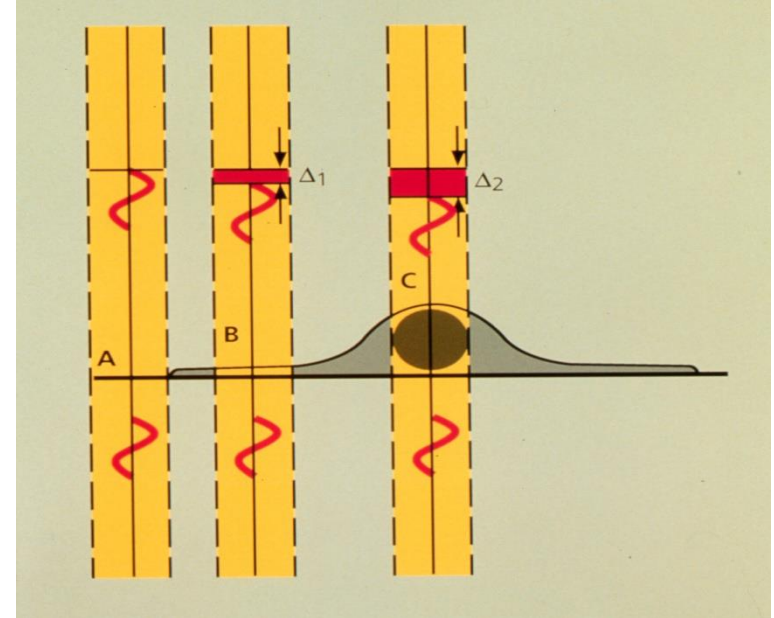


Photomicrography under polarized microscopy.
Parallel collagen fibers between the implant
surface (white arrows). Oblique fibers in
direction to bone crest (yellow arrows). Bar -
500μm

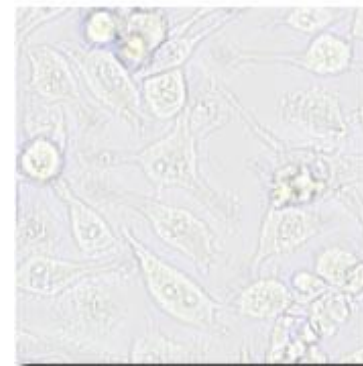
Μικροσκοπία Αντίθεσης Φάσης (Phase Contrast)



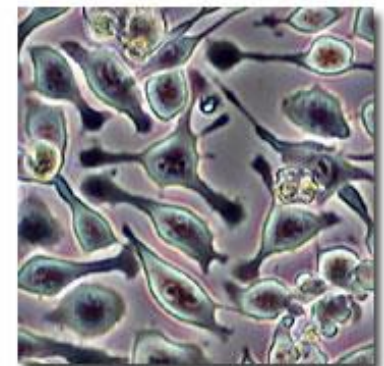
- Η πρώτη μέθοδος μικροσκοπίας η οποία επέτρεψε την απεικόνιση ζωντανών κυττάρων σε δράση
 - Βραβείο Νόμπελ Φυσικής απονεμήθηκε στον κ. Frits Zernike το 1953 για την ανακάλυψη της
 - Βελτιώνει την αντίθεση σε διαφανή και άχρωμα αντικείμενα που επηρεάζουν την οπτική διαδρομή του φωτός
 - Εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το φως που διέρχεται από το δείγμα ταξιδεύει πιο αργά από τις άλλες ακτίνες φωτός, δηλαδή η φάση μετατοπίζεται



Living Cells in Brightfield and Phase Contrast



(a)



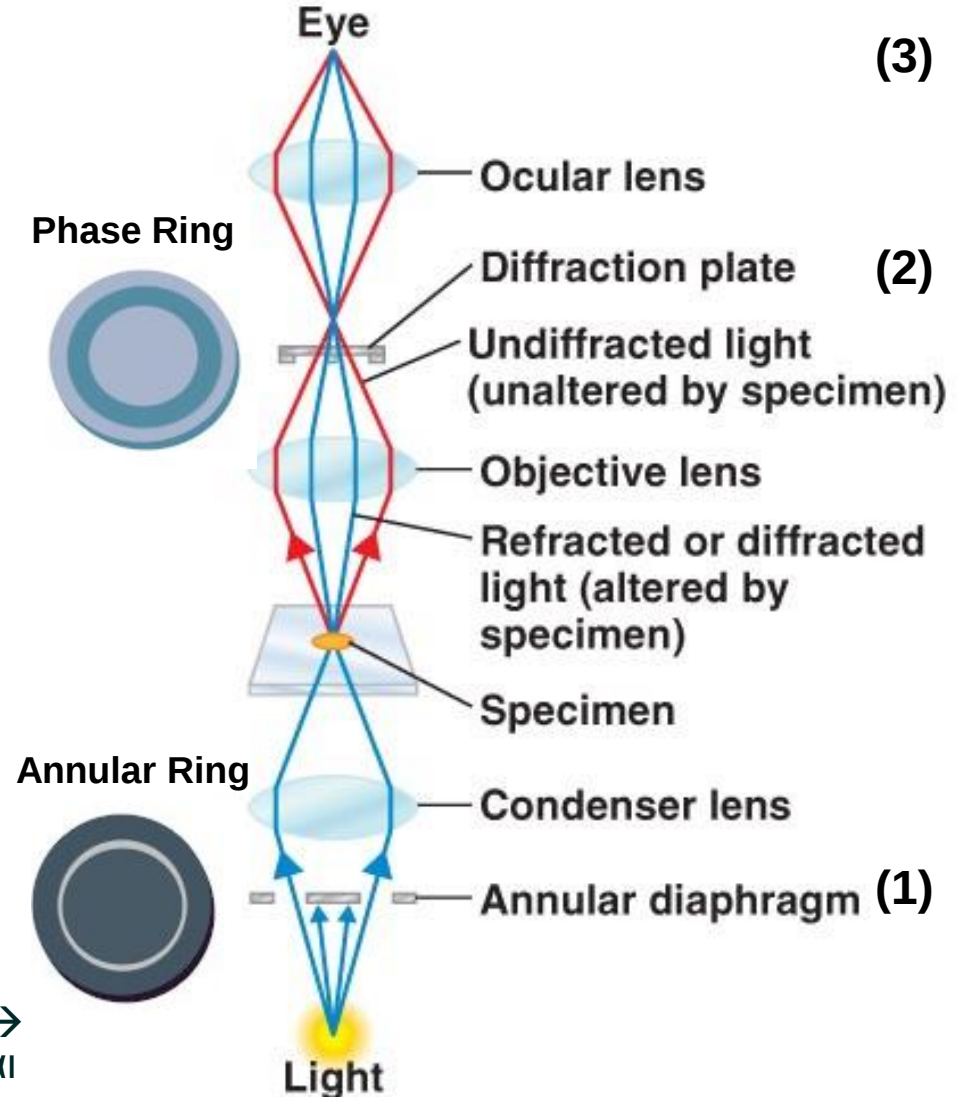
(b)

Figure 2

Μικροσκοπία Αντίθεσης Φάσης (Phase Contrast)



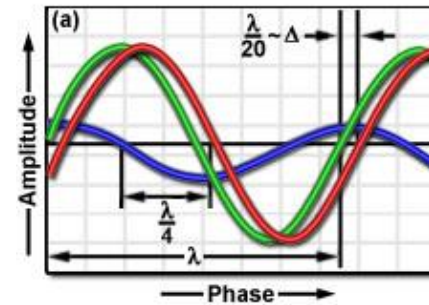
- Φωτισμός από συγκεντρωτικό (condenser) δακτύλιο φάσης (phase Ring) (“0” Τάξης) (1)
 - Συνδυάζεται με τον αντικειμενικό δακτύλιο φάσης
- Αντικειμενικός Δακτύλιος Φάσης (2)
 - α) εξασθενεί τις μη-περιθλώμενες ακτίνες 0ης Τάξης (κόκκινες)
 - β) μετατοπίζει τη φάση $\frac{1}{4} \lambda$ μπροστά
- Ακτίνες επηρεαζόμενες από το δείγμα (μπλε)
 - Δεν περνούν μέσα από τον αντικειμενικό δακτύλιο φάσης
 - $> \frac{1}{4} \lambda$ καθυστέρηση
- Οι περιθλώμενες και μη-περιθλώμενες ακτίνες εστιάζονται στην ενδιάμεση εικόνα (3)
 - Συμβολή μεταξύ τους
 - $\frac{1}{4} + \frac{1}{4} = \frac{1}{2} \lambda$ μεταβολή
 - Καταστρεπτική (destructive) συμβολή $\rightarrow$ οι λεπτομέρειες του δείγματος φαίνονται σκοτεινές



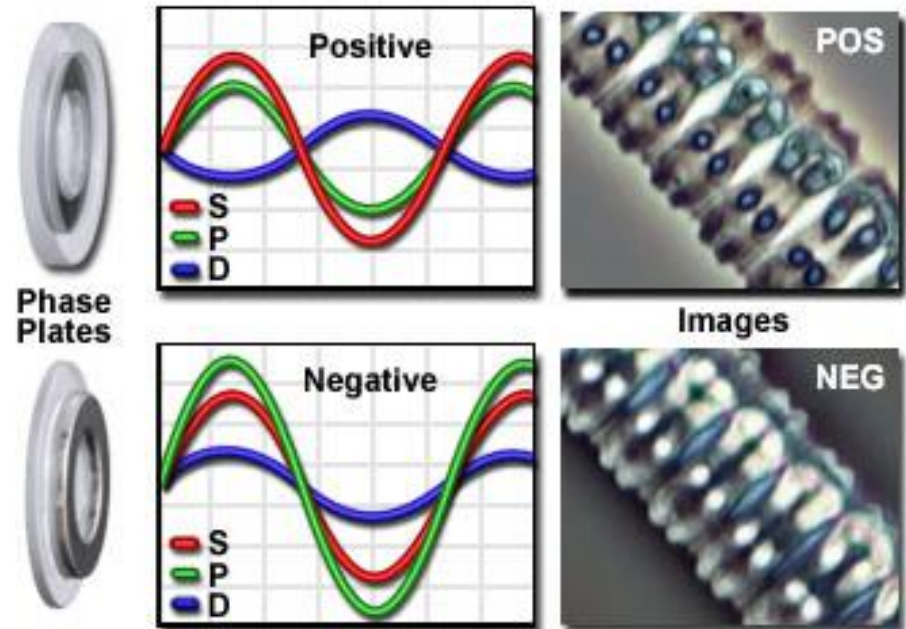
Μικροσκοπία Αντίθεσης Φάσης (Phase Contrast)



- **S (κόκκινο)** το φώς που περνά από το μέσον γύρω από το δείγμα
- **D (μπλε)** το φώς που αλληλεπιδρά με το δείγμα
- Η συμβολή S και D συνήθως δίνει **P (πράσινο)**
 - Αυτό που συνήθως μετρούμε
- Το P έχει διαφορά φάσης ως προς το S
 - Τα μάτια μας δεν μπορούν να δουν διαφορά φάσης
- Αυτό που ουσιαστικά κάνει η μικροσκοπία αντίθεσης φάσης είναι να μετατρέψει τη διαφορά φάσης σε διαφορά έντασης την οποία μπορούμε να μετρήσουμε



↓ Phase plate

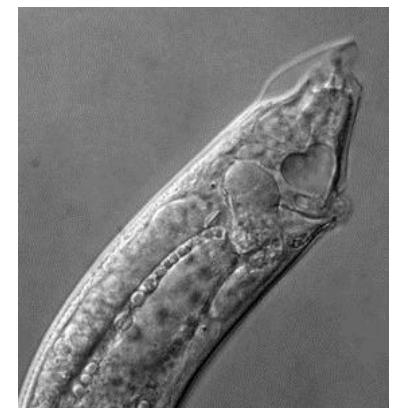
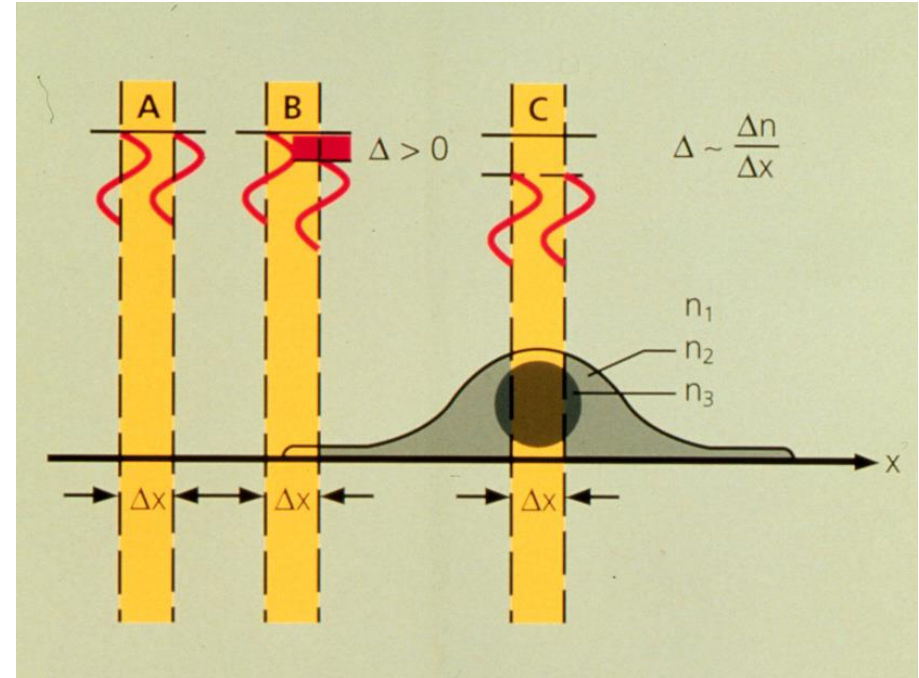


Μικροσκοπία αντίθεσης διαφορετικής συμβολής

Differential Interference Contrast (DIC)



- Μετατρέπει τις ΔΙΑΦΟΡΕΣ φάσης διαμέσου του δείγματος σε διαφορές έντασης του φωτός
 - Φαίνονται σαν 3d
 - Μπορεί να γίνει και έγχρωμη με κάποιες μετατροπές
 - Ευαίσθητη στην κατεύθυνση του δείγματος → οι μικρές λεπτομέρειες πρέπει να είναι κάθετες στο πρίσμα DIC
- Ζώντα δείγματα, χωρίς χρωστικές ουσίες
- Μεγάλη αντίθεση και ψηλή ευκρίνεια
 - Δεν έχει κάποιους από τους περιορισμούς της μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης
 - Χρησιμοποιεί όλο το NA του φακού

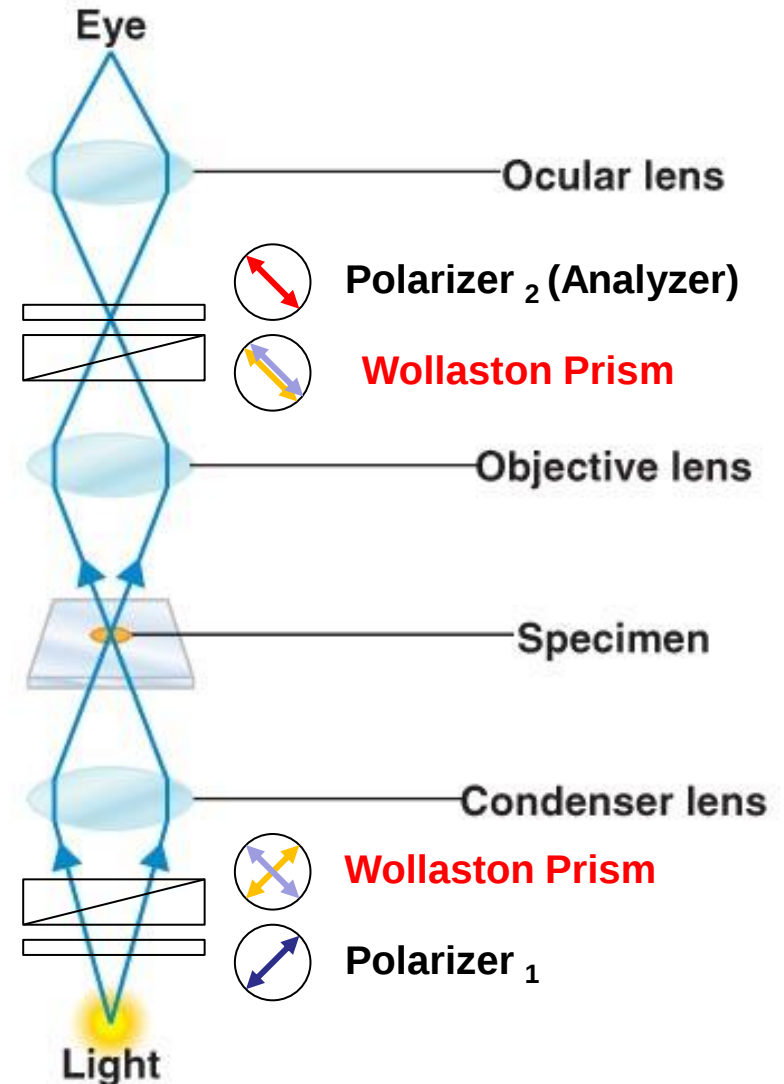
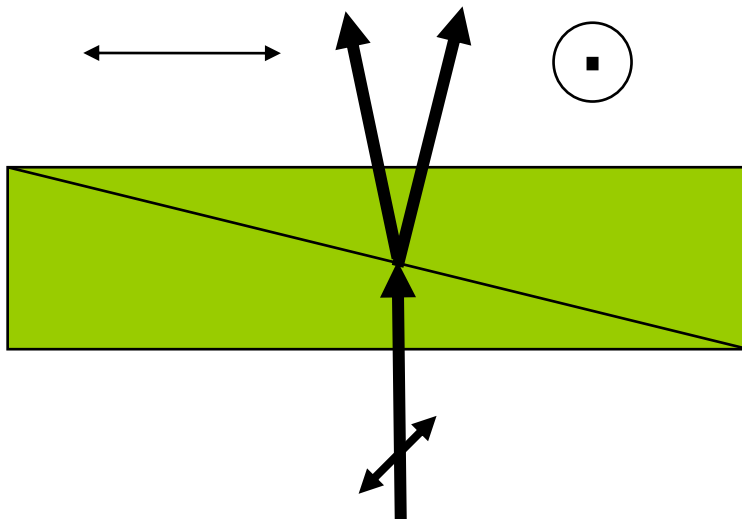


Μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής Differential Interference Contrast (DIC)



- Πρίσμα “Nomarski-modified Wollaston”

- Μια πολωμένη ακτίνα με γωνία 45° ως προς το πρίσμα, διαχωρίζεται σε τακτική (ordinary) και έκτακτη (extraordinary) ακτίνα



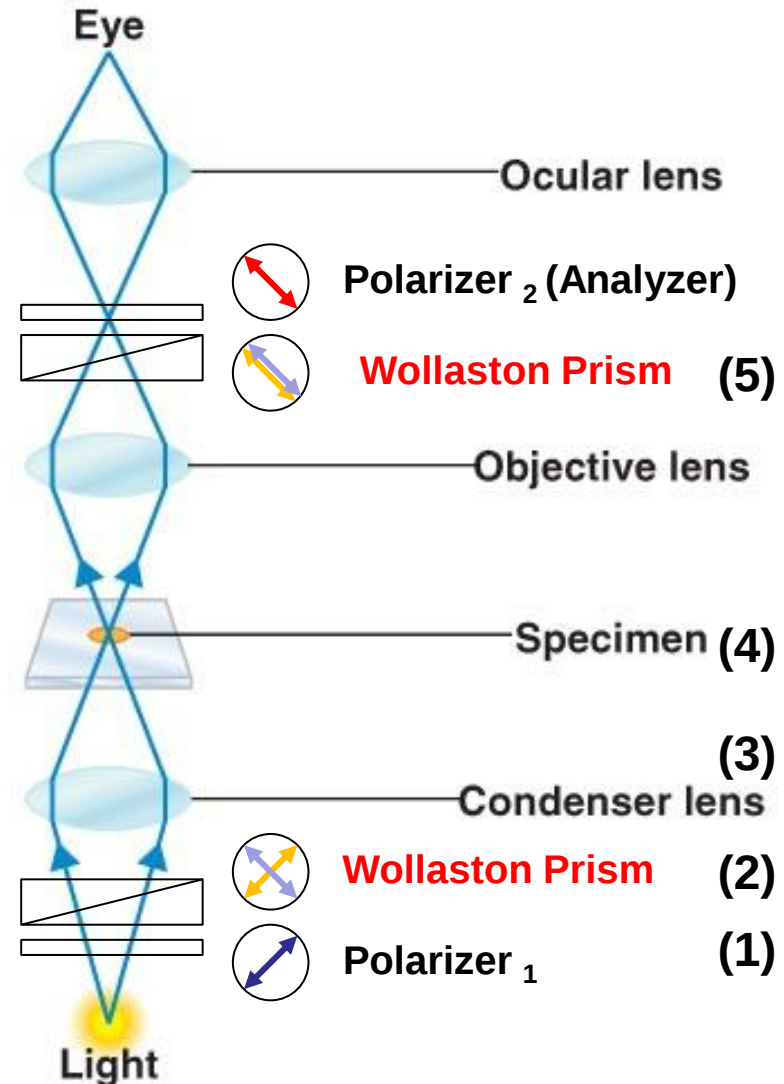
Μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής

Differential Interference Contrast (DIC)

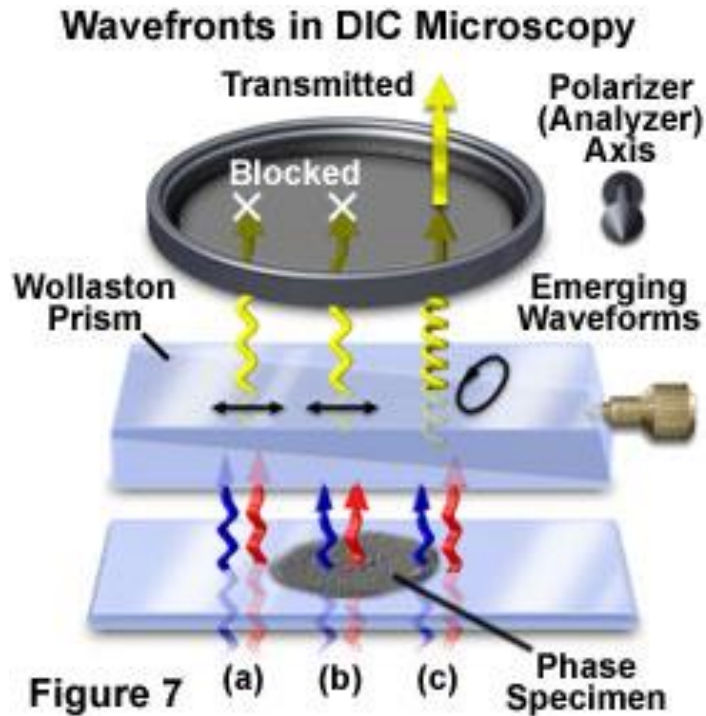


• Διαδρομή του φωτός

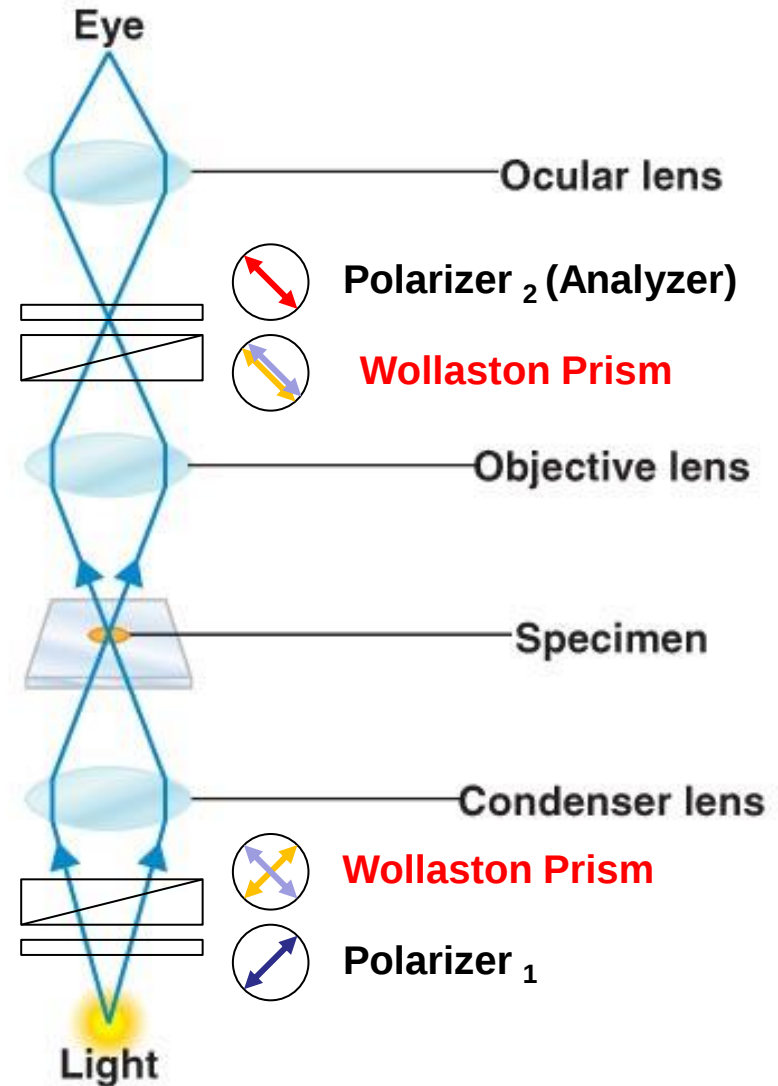
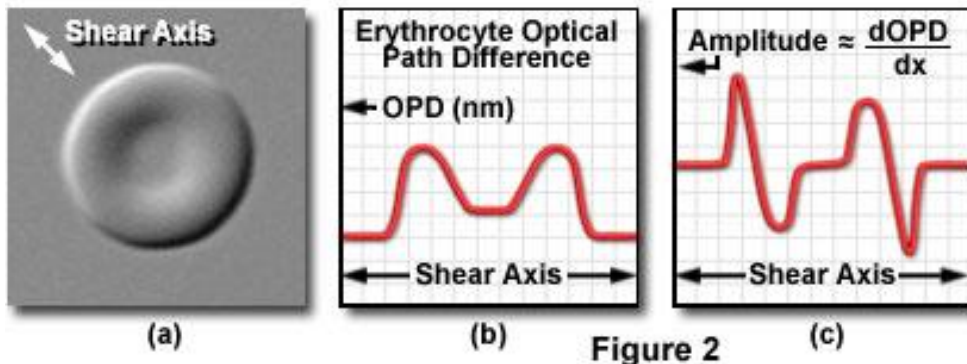
1. Μη-πολωμένο φως $\rightarrow$ πολώνεται σε 45° .
2. Πρώτο Πρίσμα $\rightarrow$ διαχωρίζεται σε 2 πολωμένες κάθετες (90°) ακτίνες
3. Συγκεντρωτικός Φακός $\rightarrow$ Εστιάζει σε απόσταση $\sim 0.2 \mu\text{m}$ διαφορά μεταξύ τους (περίπου η ευκρίνεια του μικροσκοπίου)
4. Περνούν από παρακείμενες περιοχές του δείγματος $\rightarrow$ διαφορετικά μήκη διαδρομής όπου οι περιοχές διαφέρουν ως προς δείκτη διάθλασης ή πάχος $\rightarrow$ διαφορά στη σχετική τους φάση
 - Πολλά ζεύγη ακτινών $\rightarrow$ ολόκληρη η εικόνα και στις 0° και στις 90° πόλωση
 - Σαν δύο εικόνες μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου με μια μικρή απόκλιση η μια από την άλλη
5. Δεύτερο Πρίσμα $\rightarrow$ οι ακτίνες ανασυνδιάζονται σε πόλωση $135^\circ \rightarrow$ συμβολή (interference) $\rightarrow$ ενισχυτική ή καταστροφική συμβολή ανάλογα με τη διαφορά φάσης (και διαδρομής)
 - Μπορεί να ρυθμιστεί ώστε η διαφορά φάσης 0 να είναι καταστροφική



Μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής Differential Interference Contrast (DIC)



Specimen Optical Path Difference and DIC Amplitude Profile



Μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής

Differential Interference Contrast (DIC) (DIC)



The 3T3 cell line is an important fibroblast culture, widely utilized in laboratory research, which was established from disaggregated tissue of an albino Swiss mouse. The fact that 3T3 cells could apparently grow indefinitely, while being unable to instigate tumor growth, helped scientists delineate for the first time the differences between cell mortality and a cell's ability to undergo oncogenic transformation.

<http://www.microscopyu.com/moviegallery/livecellimaging/3t3/index.html>

Σύγκριση Phase-Contrast και DIC



Phase-Contrast

- Βασίζεται στις κυματικές ιδιότητες του φωτός
- Μια δέσμη από ακτίνες απευθείας και μια ανακλώμενη
- Μπορεί να απεικονίσει την εσωτερική δομή ζώντων μικρο-οργανισμών
- Εικόνες σε κλίμακα του γκρίζου

DIC

- Βασίζεται σε διαφορές δείκτη διάθλασης και πάχους
- Χρησιμοποιεί 2 δέσμες ακτινών
- Ψηλότερη ευκρίνεια
- Εικόνες με έντονα χρώματα
- Η εικόνα μοιάζει σχεδόν 3d

Μικροσκοπία Φθορισμού



- **Προτερήματα Φθορισμού**

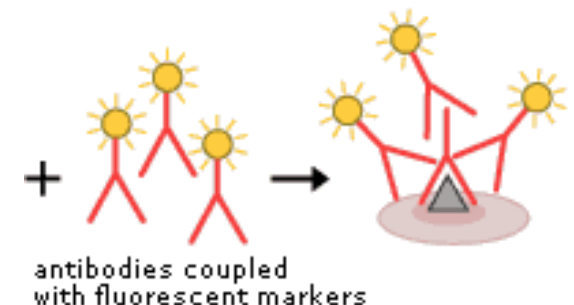
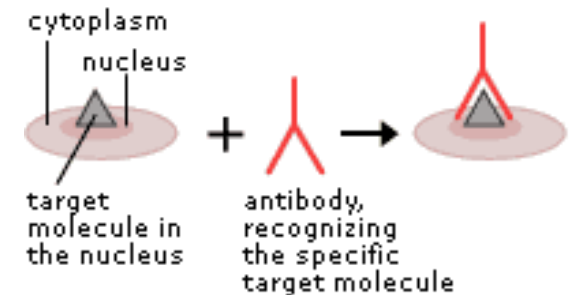
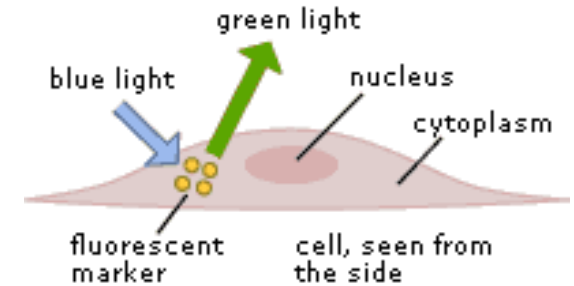
- Πολύ ευαίσθητη μέθοδος
- Απλή εφαρμογή
- Εξαιρετικά εξελιγμένοι δείκτες φθορισμού (φθοροφόρα)

- **Φθοροφόρα (Fluorophores)**

- Φθορίζουσες χρωστικές ουσίες που συσσωρεύονται σε διάφορα μέρη του κυτταρικά ή είναι ευαίσθητες στο pH, διαφορές ιόντων, κλπ
- Αντισώματα με φθορίζουσα σήμανση (fluorescently tagged) που προσδένονται σε συγκεκριμένα κυτταρικά χαρακτηριστικά
- Φθορίζουσες πρωτεΐνες που εκφράζονται ενδογενώς
 - Πραγματικά ενδογενείς
 - NADH/FAD: ένζυμα που εμπλέκονται στη παραγωγή ATP
 - Δομικές Πρωτεΐνες: collagen/elastin
 - Αμινοξέα: tryptophan/tyrosine
 - Μετά από γονιδιακή τροποποίηση
 - Οικογένεια της Green fluorescent protein

- **Μέθοδοι**

- Όλες οι μέθοδοι φθορισμού μπορούν να εφαρμοστούν (FLIM, FRAP, FRET, TIRF, etc)

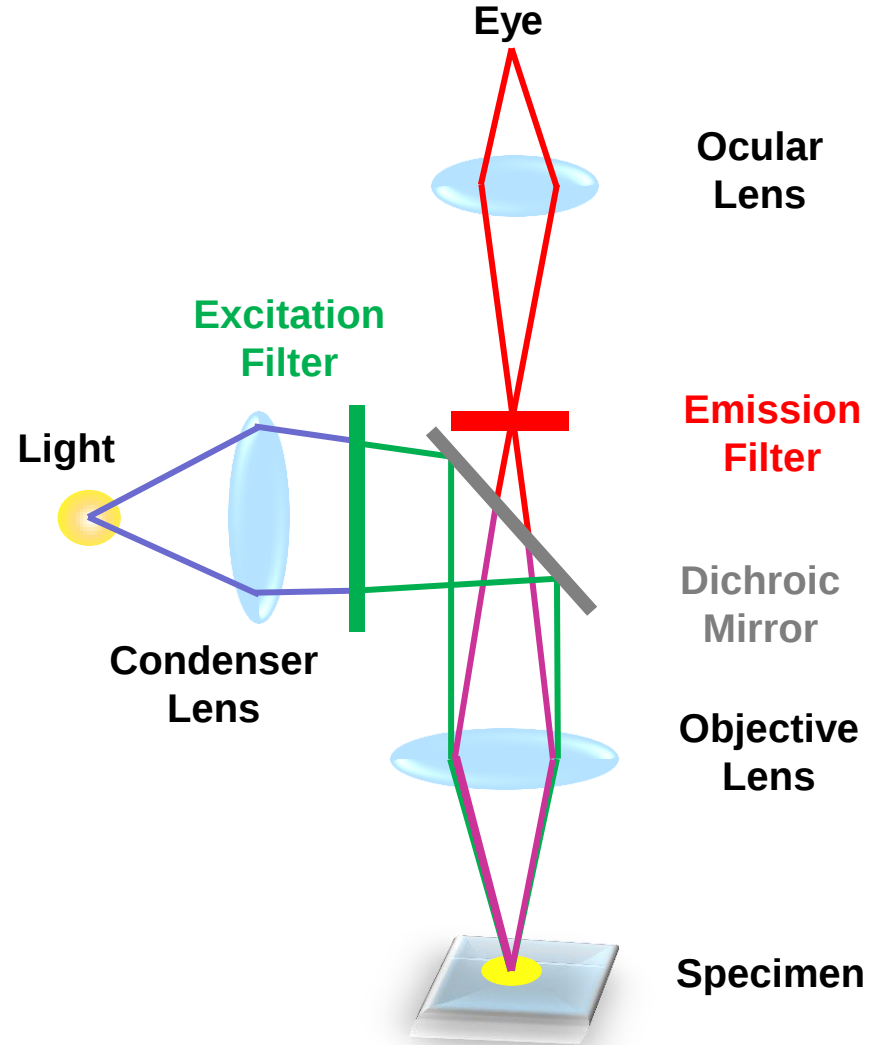


Μικροσκοπία Φθορισμού



• Διαδρομή του φωτός

- Φως από την πηγή μέσω του συγκεντρωτικού φακού περνά από ένα φίλτρο διέγερσης (excitation filter) → στενή ζώνη διέγερσης
- Διχροϊκό κάτοπτρο κατευθύνει το φως διέγερσης στο δείγμα
- Ανάκλαση, σκέδαση και φθορισμός από το δείγμα
- Το διχροϊκό κάτοπτρο αφήνει να περάσει μόνο ο φθορισμός
- Φίλτρο Εκπομπής (Emission Filter) → ζώνη εκπομπής



Μικροσκοπία Φθορισμού

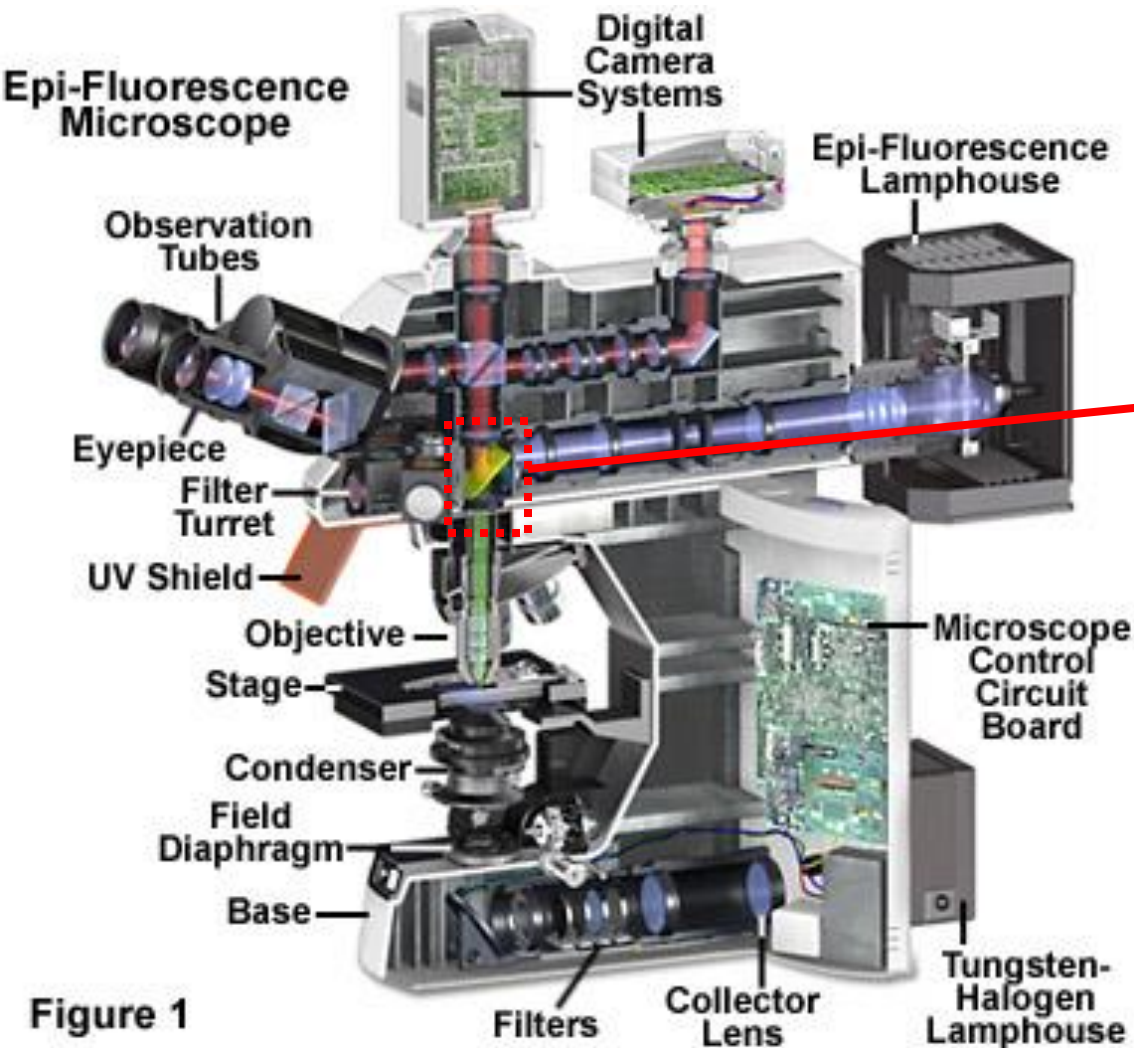


Figure 1

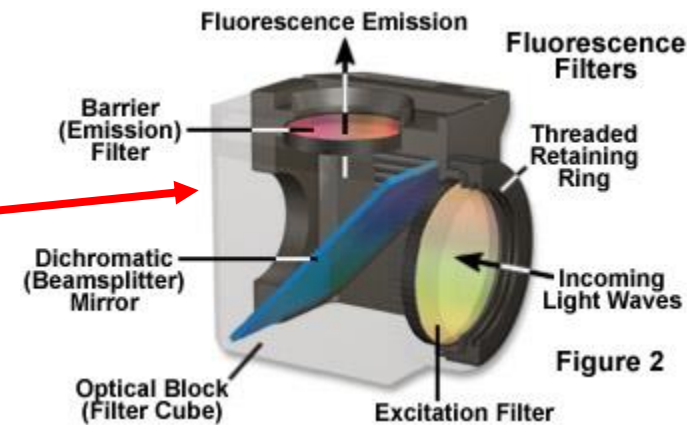


Figure 2

Dichroic filter: reflects excitation and transmits fluorescence

Μικροσκοπία Φθορισμού

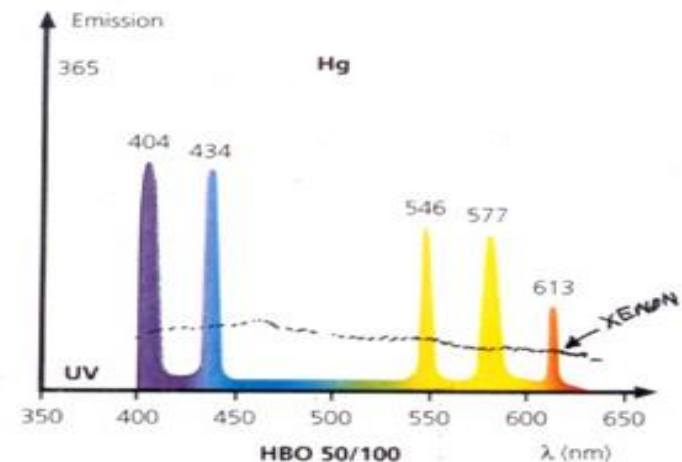
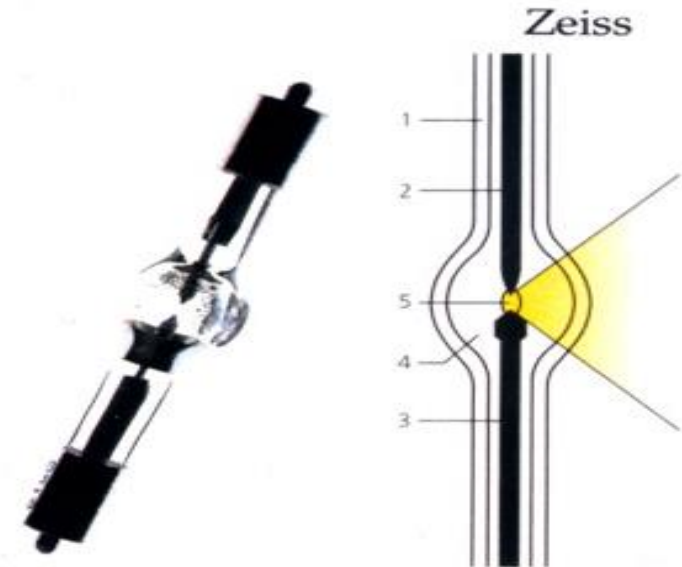


- Συνήθως δεν χρησιμοποιούνται πηγές λείζερ

- Λυχνίες Τόξου (Arc lamps)
Mercury και Xenon

- Ευθυγράμμιση της πηγής φωτός

- Το μικροσκόπιο φθορισμού προσπίπτοντος ακτινοβολίας (epi-fluorescence) μοιάζει με μικροσκόπιο ανακλώμενου φωτός
 - Το τόξο της λυχνίας απεικονίζεται στο πίσω εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού
 - Ιδανικά πρέπει μόλις να γεμίζει το πίσω άνοιγμα (Koehler illumination)



Μικροσκοπία Φθορισμού

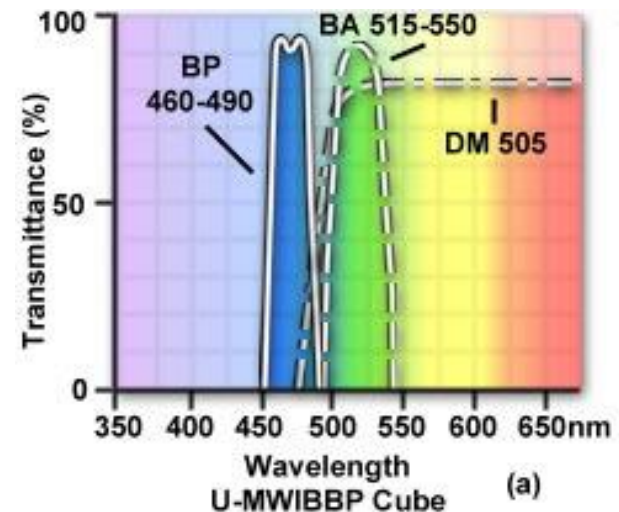
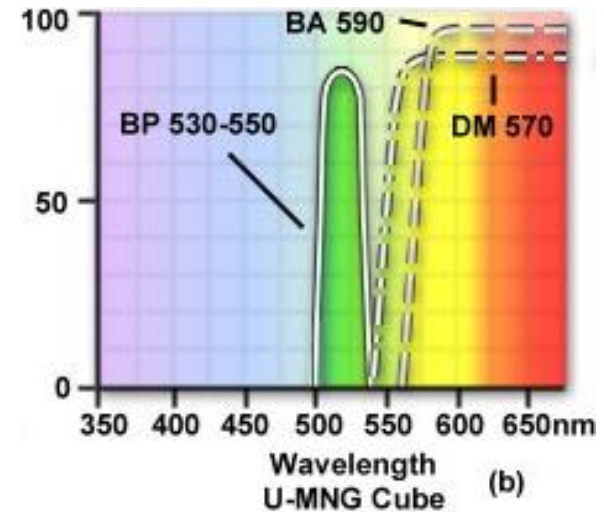


- **Διχροϊκό Κάτοπτρο**

- Ανακλά τη ζώνη διέγερση
- Αφήνει να περάσει η ζώνη εκπομπής
- Χρειάζεται απότομη αποκοπή (cut-off)

- **Επιλογή Φίλτρων**

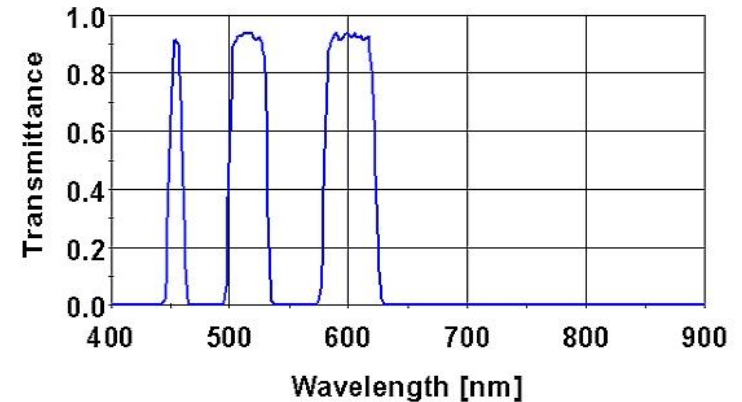
- **Ευρυζωνικά Φίλτρα** → πιο έντονη διέγερση, λιγότερη αντίθεση (μπορεί να διεγείρει περισσότερο αυτοφθορισμό)
- **Φίλτρα Στενής Ζώνης** → λιγότερο σήμα, καλύτερη αντίθεση
- Σημείωση: Το μάτι ανταποκρίνεται στην αντίθεση αλλά οι ανιχνευτές στο σήμα





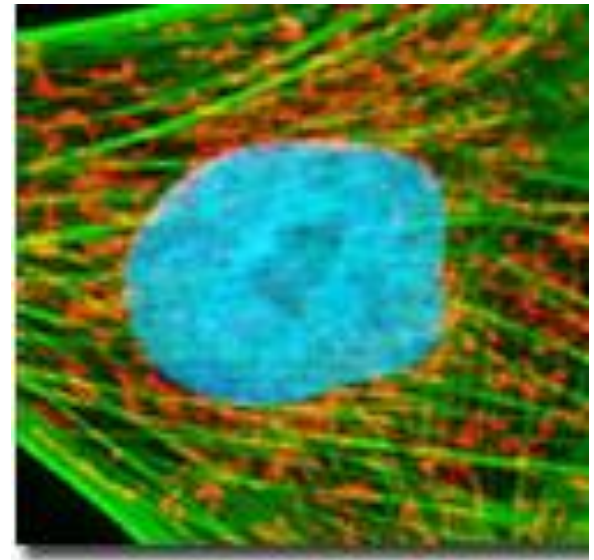
- **Multi-band Imaging**

- Image (simultaneously or sequentially) the same sample at different excitation emission wavelengths
- Look at different cell components



- **Example**

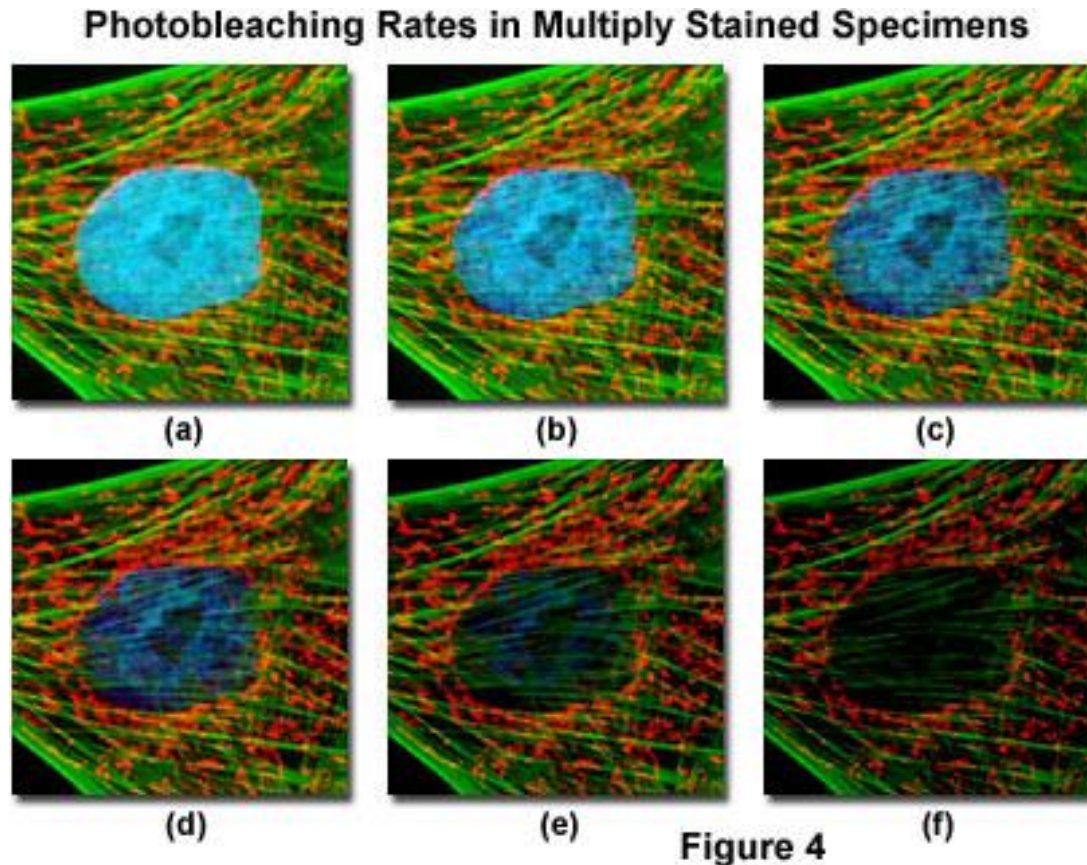
- Cell nucleus stained with blue Hoechst dye
- Mitochondria stained with Mitotracker red
- Actin cytoskeleton stained with phalloidin derivative conjugated to Alexa 488 (green)





- **Photobleaching**

- Often limits the number of exposures or the exposure time



Photobleaching is the irreversible photochemical destruction of the fluorescent chromophores



- **Autofluorescence**

- Autofluorescence can be present in the images
- Image at narrow band or use NIR excitation to minimize this effect (NIR exogenous fluorophores)



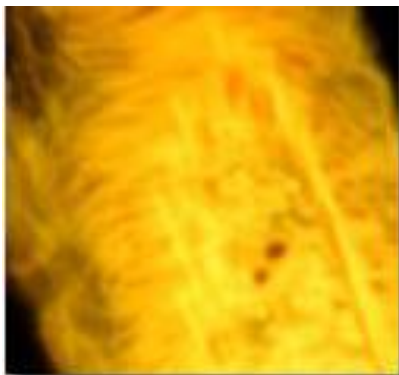
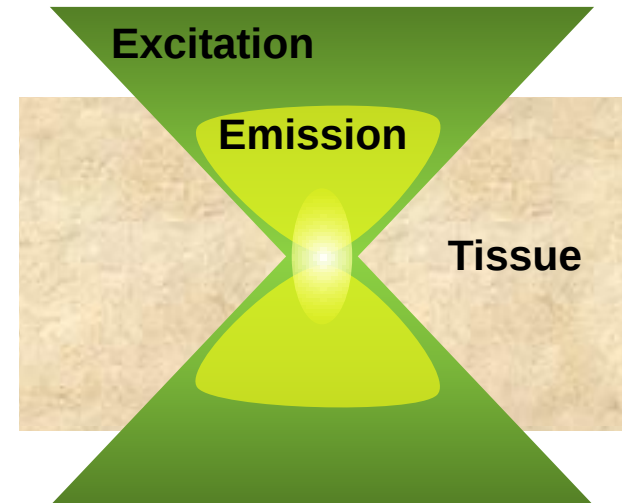
Endogenous Fluorophores

- amino acids
- structural proteins
- enzymes and co-enzymes
- vitamins
- lipids
- porphyrins

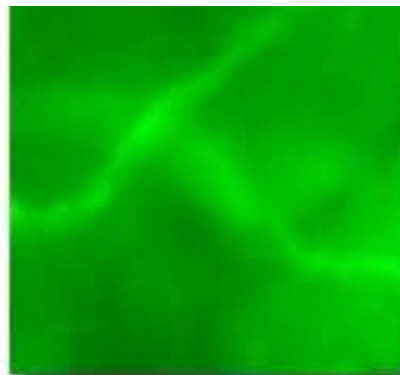


- **Resolution is limited in thick specimens**

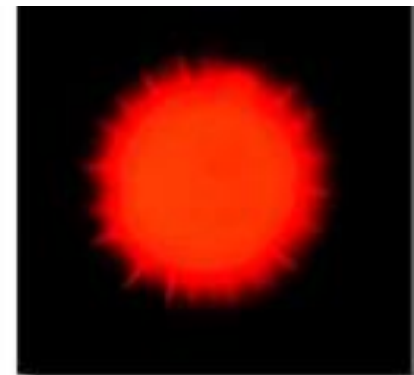
- Detection of out-of-focus fluorescence
- The excitation beam illuminates uniformly a wide field of the sample.
- If the sample is thick, fluorescence will be excited within the focal plane, but also within planes above and below the focus.
- Some of this fluorescence will be imaged onto the detector and will result in a defocused-looking image



Human medulla



Rabbit Muscle Fibers



Pollen Grain



- **Reject out-of-focus light → Optical “sectioning” (next lecture)**
 - Create 3d images
 - Confocal Microscopy, Two Photon Microscopy, SIM

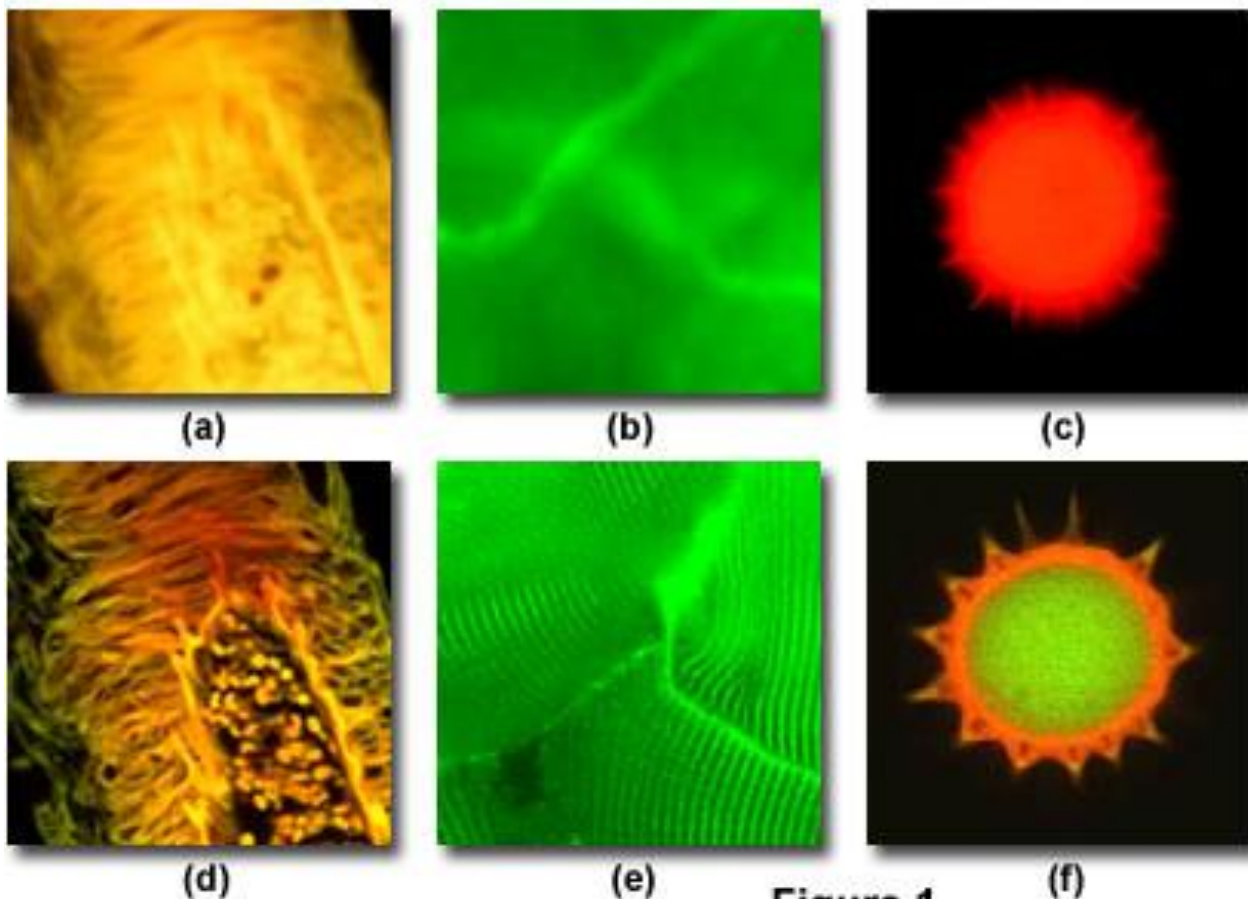


Figure 1

Περιορισμοί Μικροσκοπίας Φθορισμού



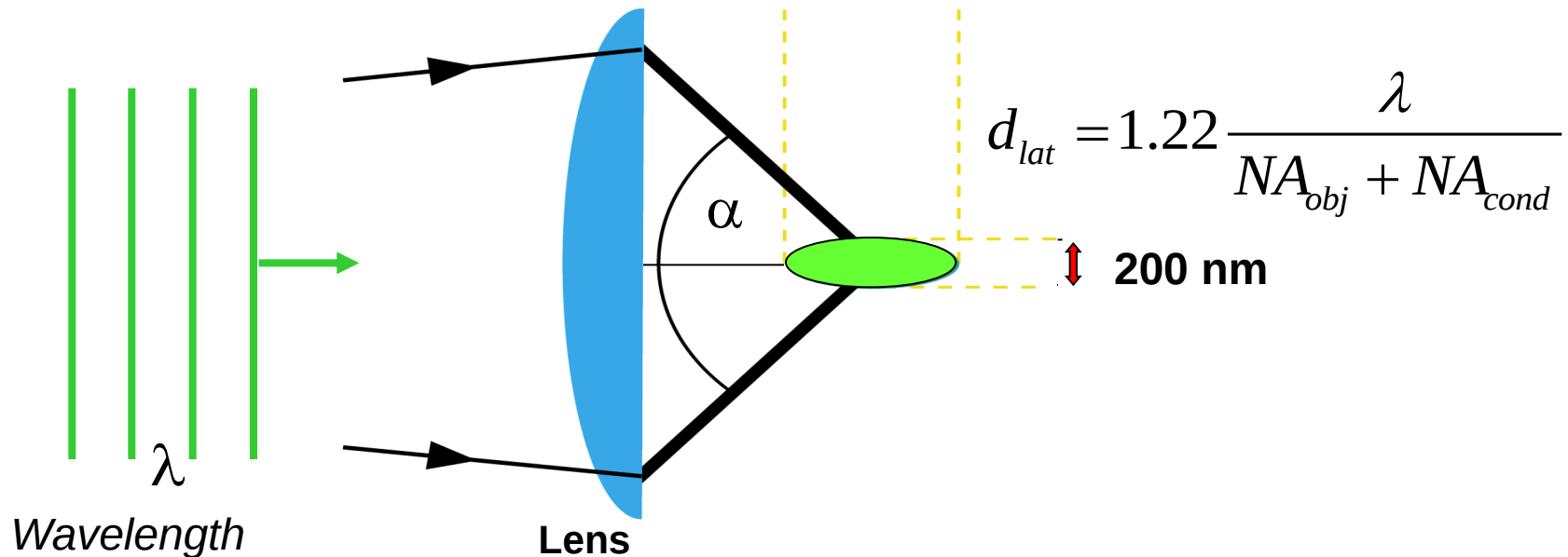
- **Resolution is limited by Abbe's law**

- Resolution limit (~ 200 nm)
- Can you break it?



$$d_{ax} = 4 \frac{\lambda n}{\left(NA_{obj} + NA_{cond} \right)^2}$$

500 nm

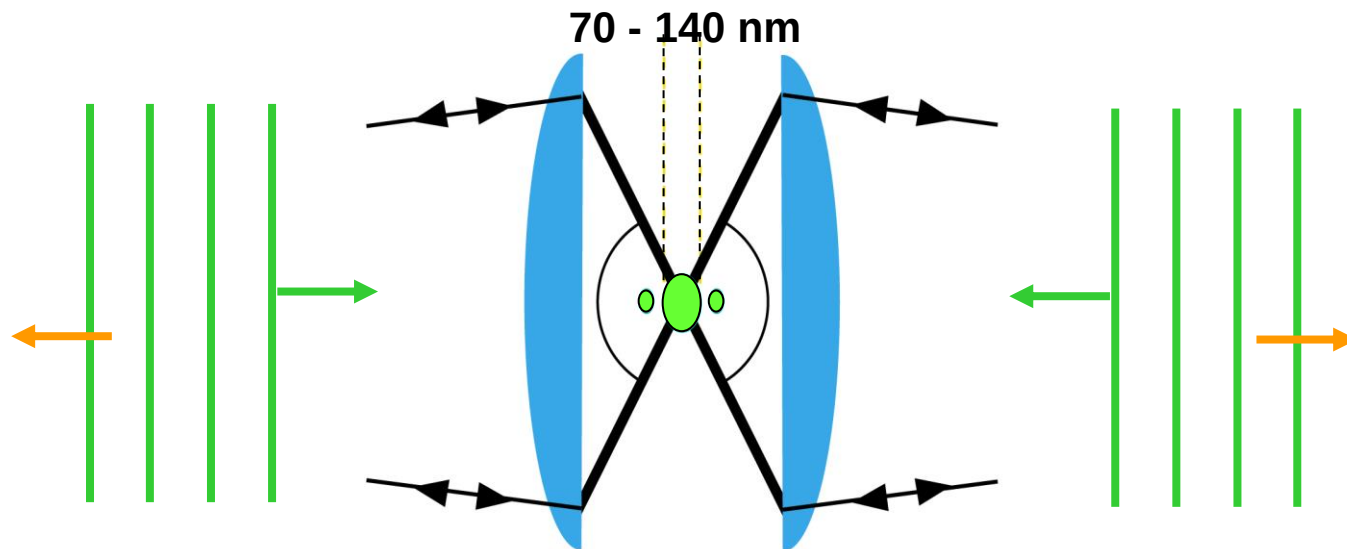


Μικροσκοπία 4π (4Pi)



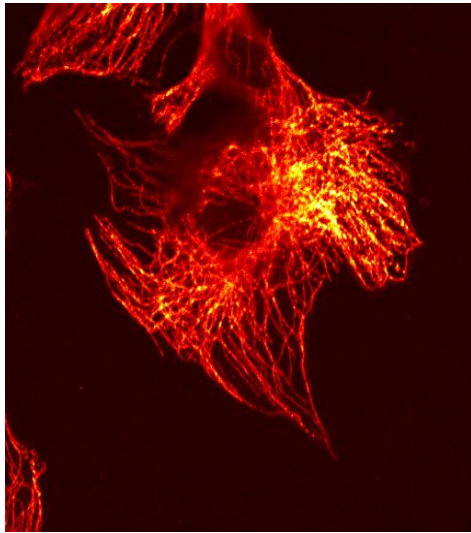
• Basic Principles

- Image from two directions → approaching 4pi solid angle
- Coherent illumination and/or fluorescence detection
- Interference results in smaller spot size

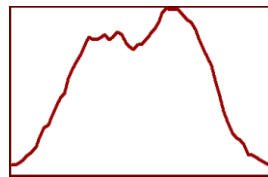


$$\vec{E}^{4Pi}(r, z, \varphi) = \vec{E}_1(r, z, \varphi) + \vec{E}_2(r, -z, \varphi)$$

Μικροσκοπία 4π (4Pi)



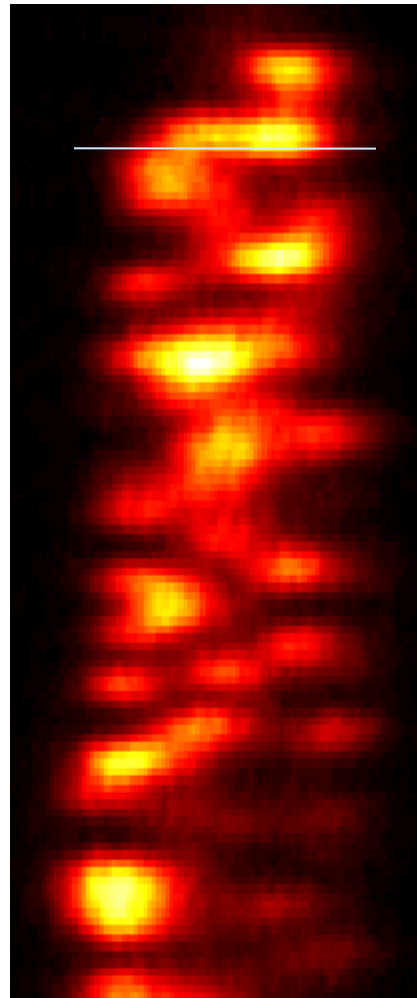
Microtubules, mouse fibroblast
Immunofluor, Oregon Green



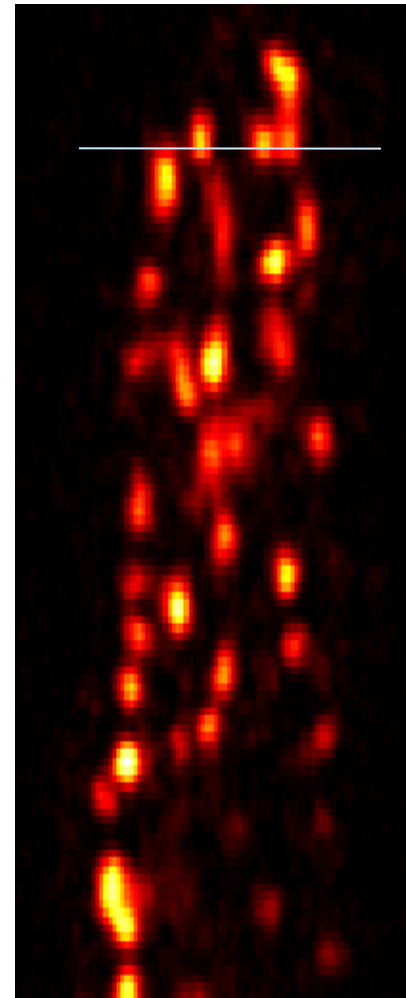
2 μm

X

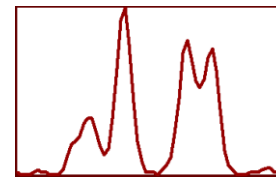
Z



Confocal



4Pi

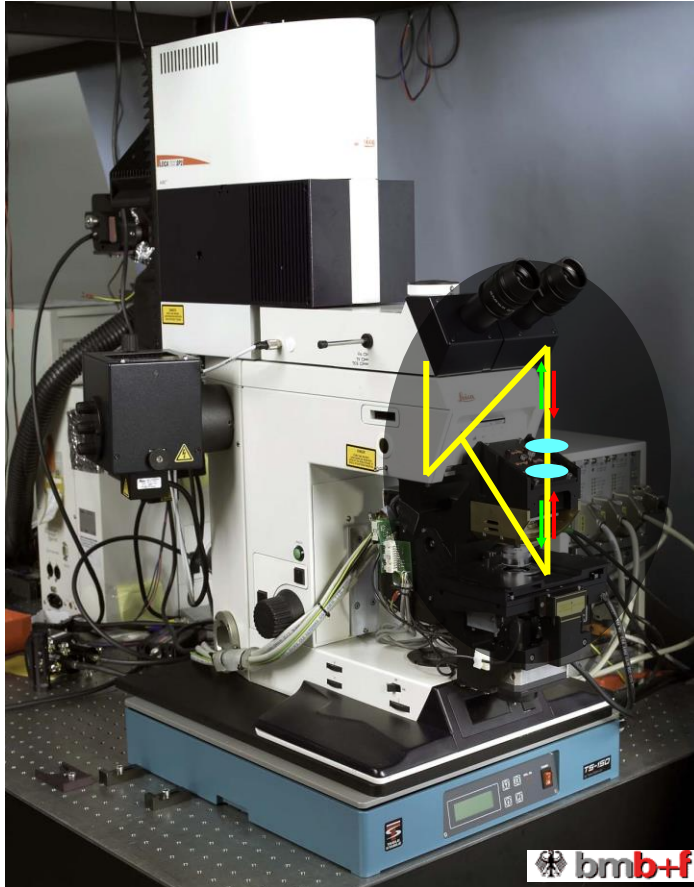


2 μm

Μικροσκοπία 4π (4Pi)



- Commercial 4Pi-microscope



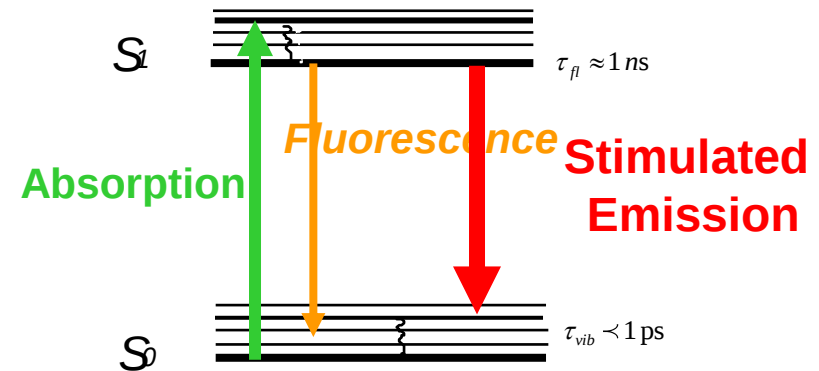
Z- resol < 90 nm (Live cells /aqueous cond.)



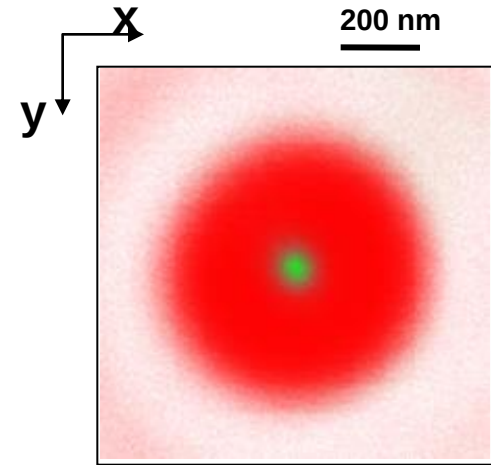
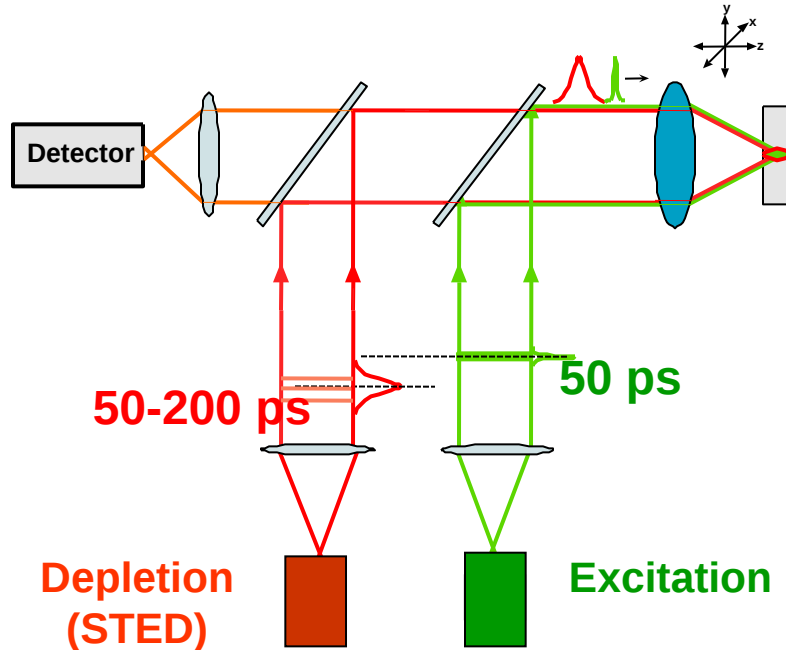
Μικροσκοπία Αποδιέγερσης με Εξαναγκασμένη Εκπομπή Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy



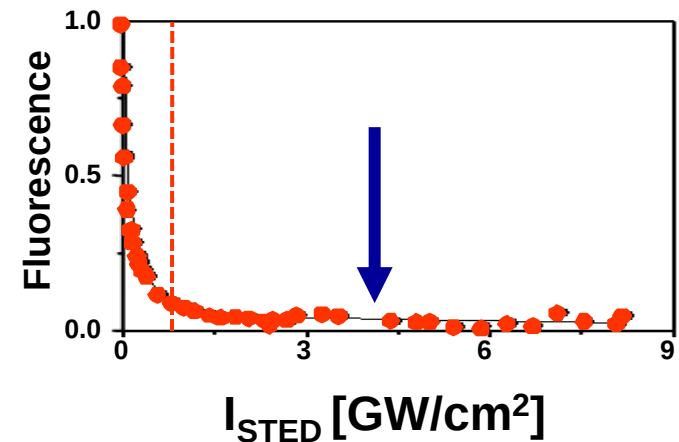
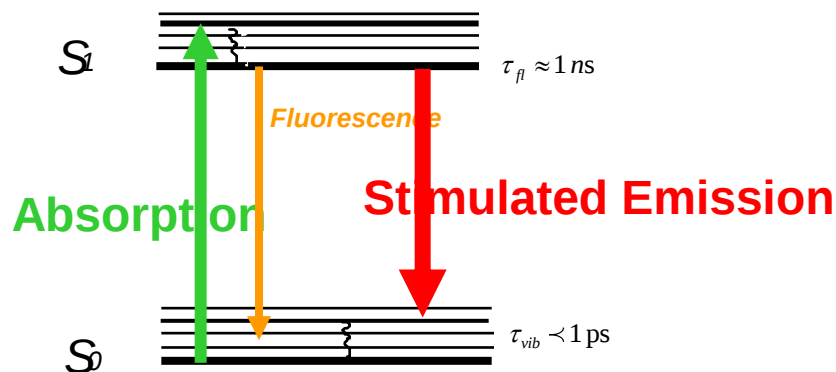
- 1st physical concept to break the diffraction barrier in far-field fluorescence microscopy
- **Basic Principles**
 - Stimulate the fluorescent dye
 - Cause stimulated emission to de-excite part of the excitation focal volume (doughnut shape)
 - Measure fluorescence from the remaining excited volume



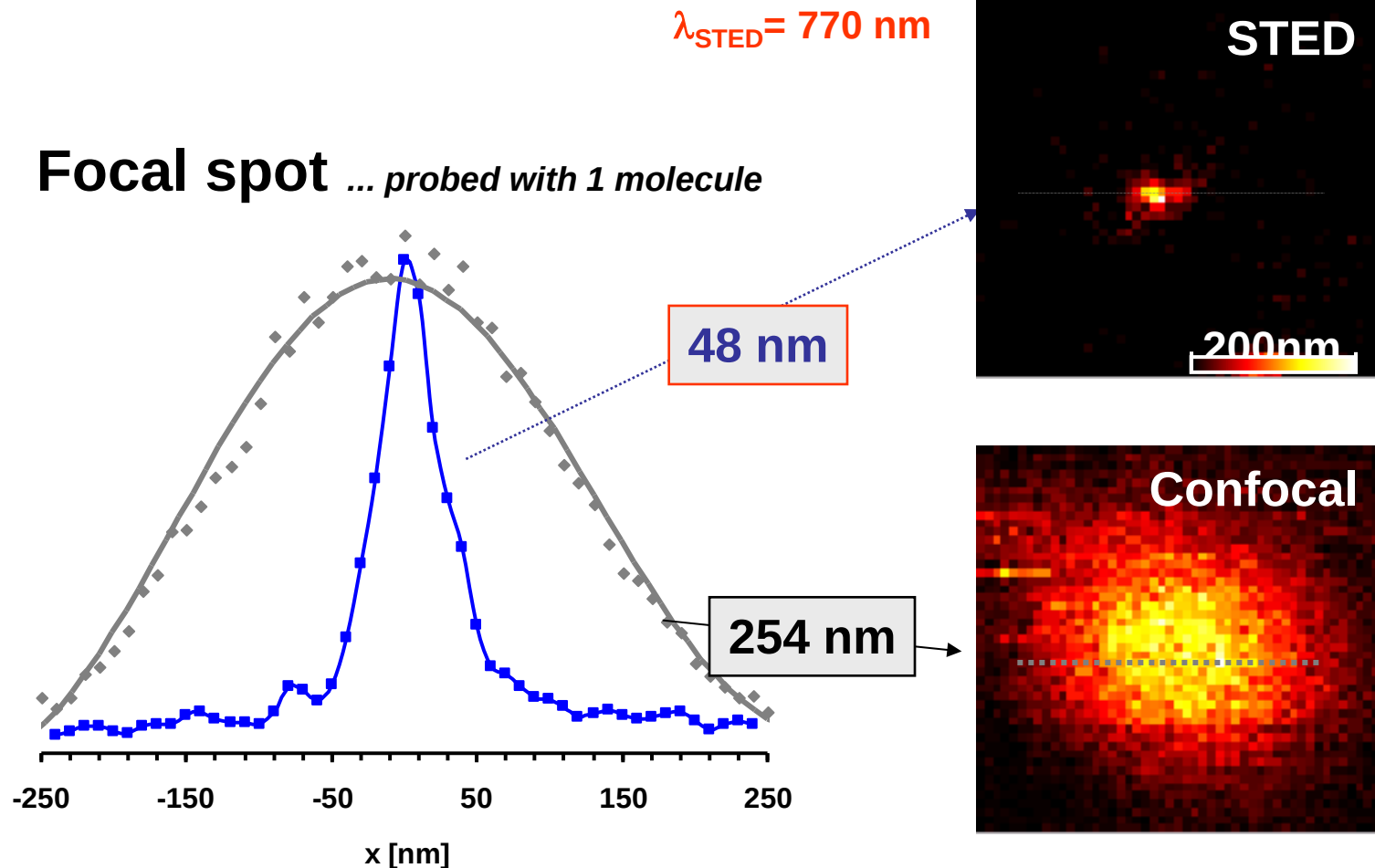
Μικροσκοπία Αποδιέγερσης με Εξαναγκασμένη Εκπομπή Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy



The stronger the STED beam the narrower the fluorescent spot!



Μικροσκοπία Αποδιέγερσης με Εξαναγκασμένη Εκπομπή Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy

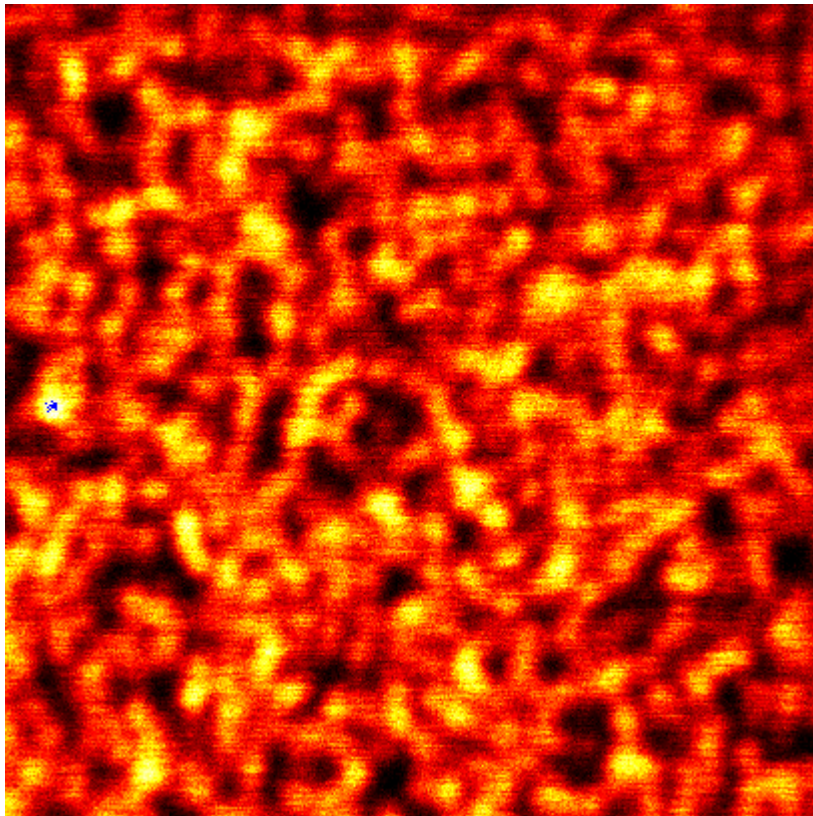


Μικροσκοπία Αποδιέγερσης με Εξαναγκασμένη Εκπομπή Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy



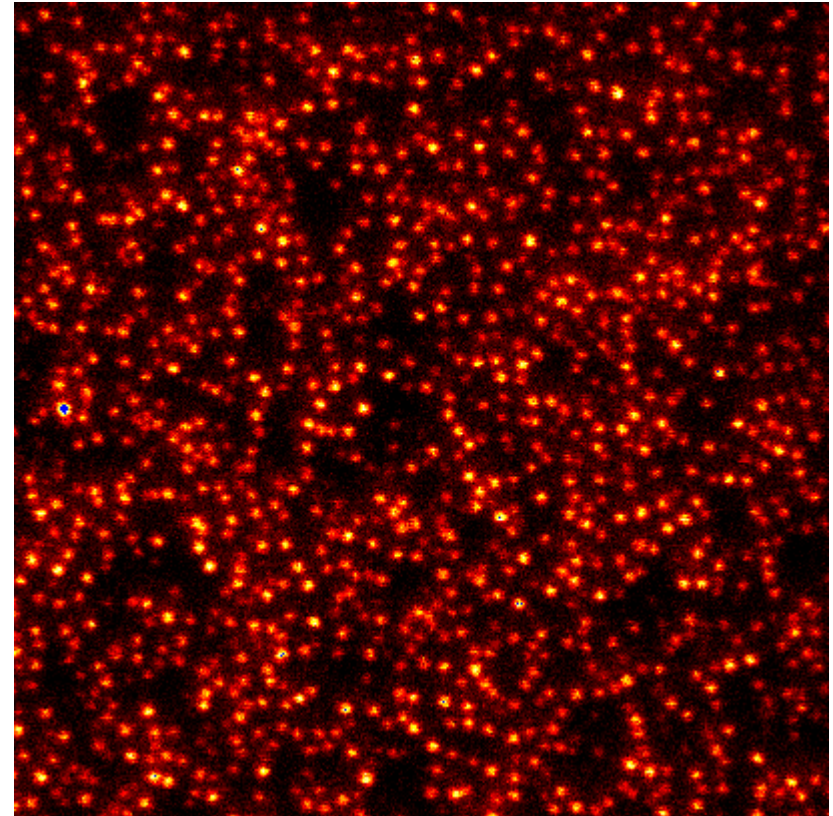
Imaging 40 nm fluorescence beads:

Confocal



10 counts/0,3ms 204

STED

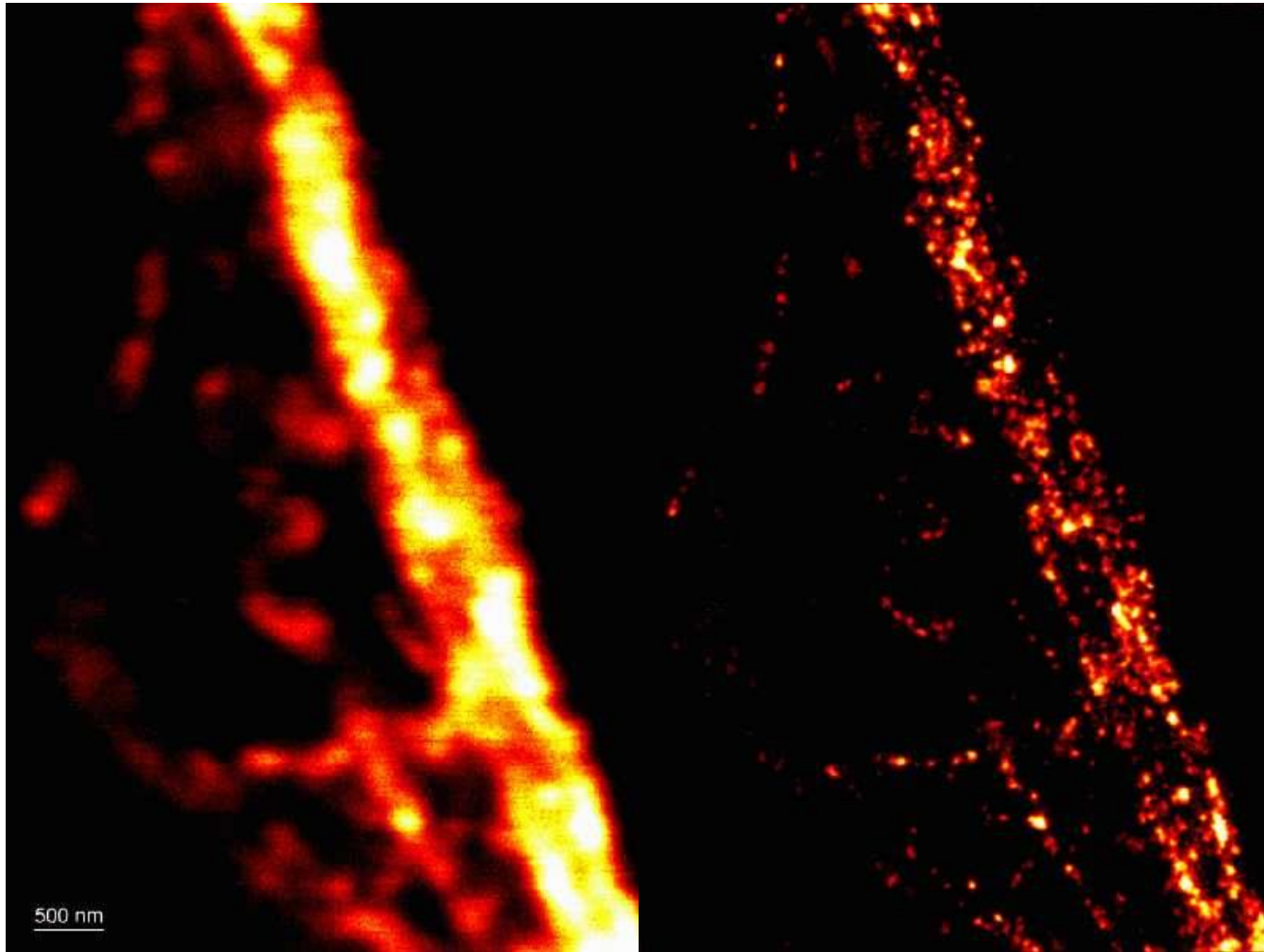


5 counts/0,3ms 89

Μικροσκοπία Αποδιέγερσης με Εξαναγκασμένη Εκπομπή Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy



Confocal



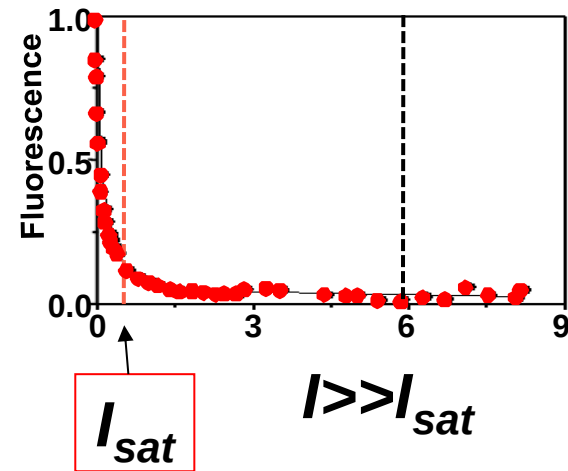
STED

Heavy subunit of neurofilaments in neuroblastoma

Μικροσκοπία Αποδιέγερσης με Εξαναγκασμένη Εκπομπή Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy



- Resolution is not limited by the wavelength of light!
 - Resolution just depends on the level of fluorescence depletion.
- Resolution at the molecular scale is possible with visible light and regular lenses!
- Resolution follows a new law; a modification of Abbe's law

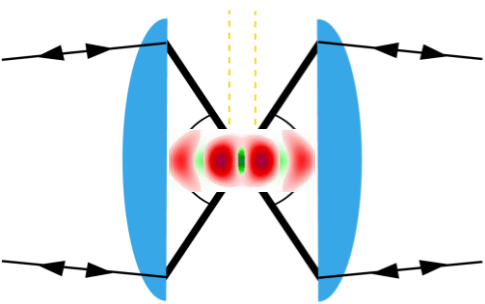


$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_{sat}}}$$

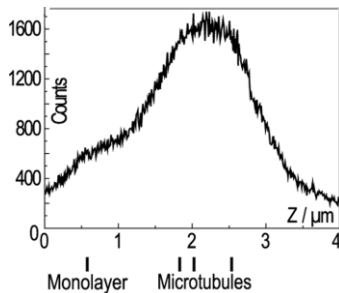
Συνδυασμός: Μικροσκοπία STED-4Pi



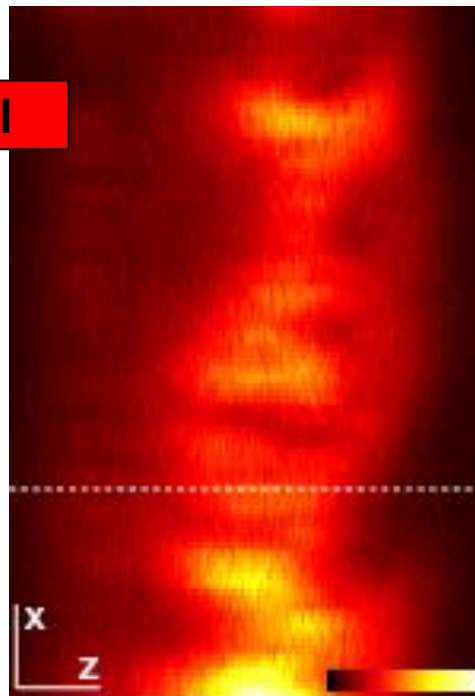
8



confocal

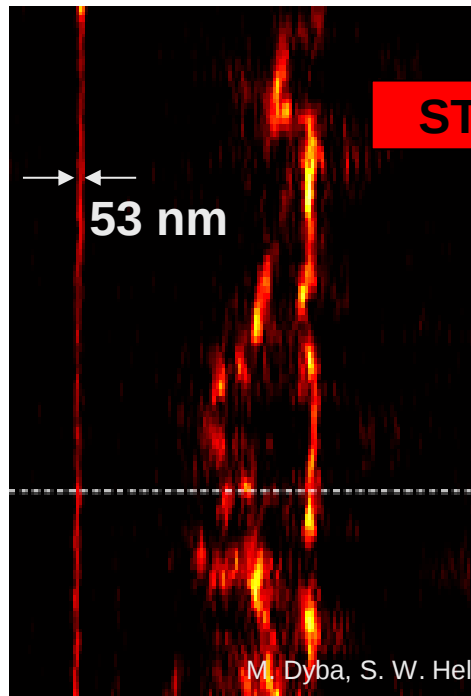


↓ Monolayer

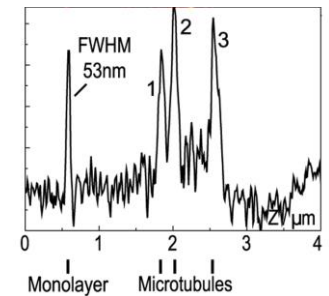


↓ Monolayer

STED-4Pi



53 nm



Fluorescently tagged microtubuli
with an axial resolution of 50-70 nm

Μικροσκοπία RESOLFT



- **Reversible Saturable (Switchable) Linear Fluorescence Transition (RESOLFT) microscopy is the generalized principle of STED microscopy**
- **Same concept as STED but dyes are made to “dark state” by other mechanisms:**
 - switch to triplet state
 - switch to ground state
 - use reversibly photoswitchable dyes
- **Advantages:**
 - less powerful lasers need to be used (100 W/cm^2)
 - this leads to many more dyes and even fluorescent proteins being used

