

Microscopia e unità di misura

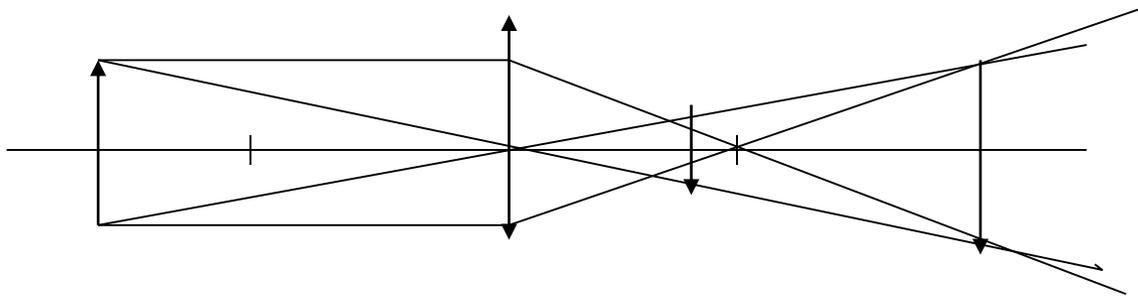
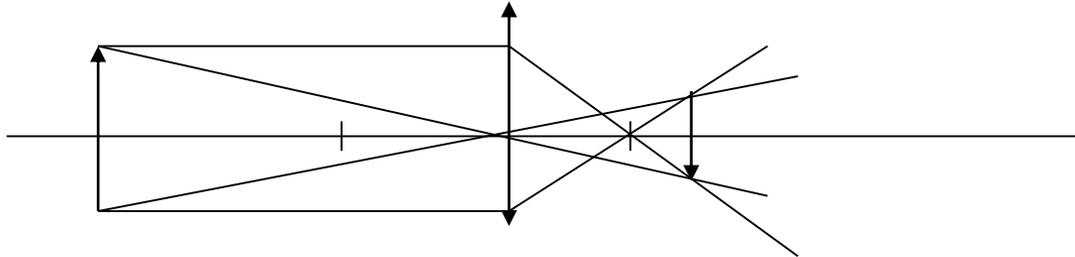
*Prof. Arti Ahluwalia
Research Center "E. Piaggio"
University of Pisa*





II f#

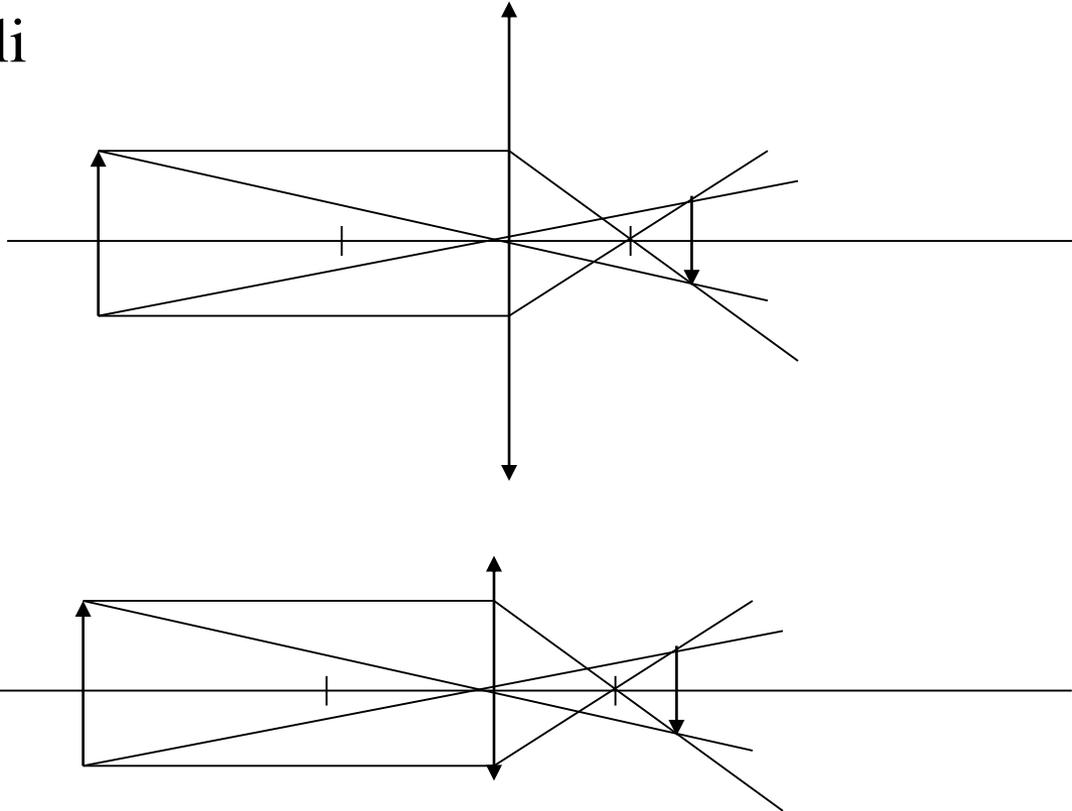
2 lenti con lo stesso diametro ma lunghezza focale diverso



L'immagine è più intensa nel primo, perché la stessa quantità di luce occupa meno spazio



Due lenti con diametro diverso, ma lunghezze focali uguali



Il primo raccoglie più luce



F number= $f/\text{diametro lente}, D$

Più piccolo il $f\#$, maggiore la potenza della lente di raccogliere luce. Però minore la profondità di campo

L'intensità dell'immagine è proporzionale al $1/f\#^2$



Un microscopio è un dispositivo che ci permette di vedere oggetti piccoli con una risoluzione e ingrandimento migliore

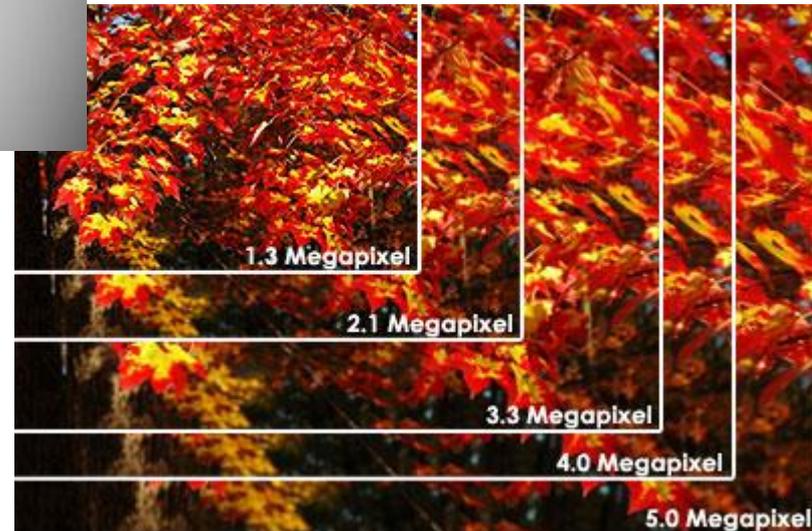
Ingrandimento



Contrasto



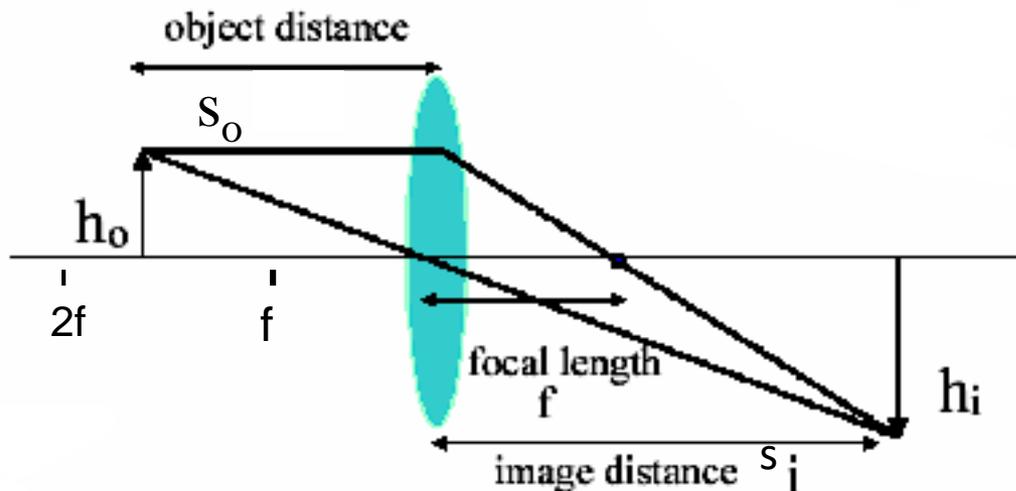
Risoluzione





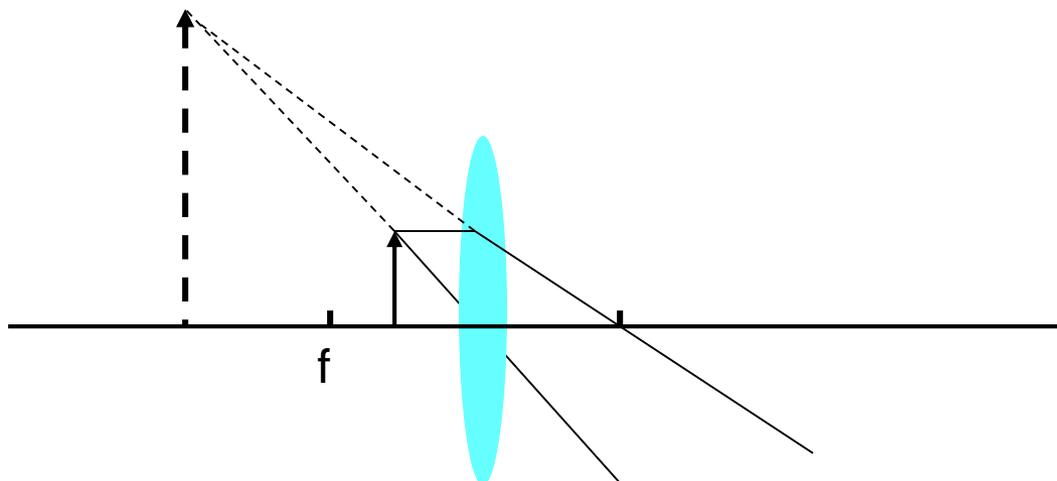
Ingrandimento, $|M| > 1$

Caso 1: $2f > s_o > f$



L'immagine è reale e ingrandito se $2f > s_o > f$

Caso 2: $s_o < f$



Una lente convessa forma un'immagine virtuale e ingrandita se $s_o < f$



Lente di ingrandimento

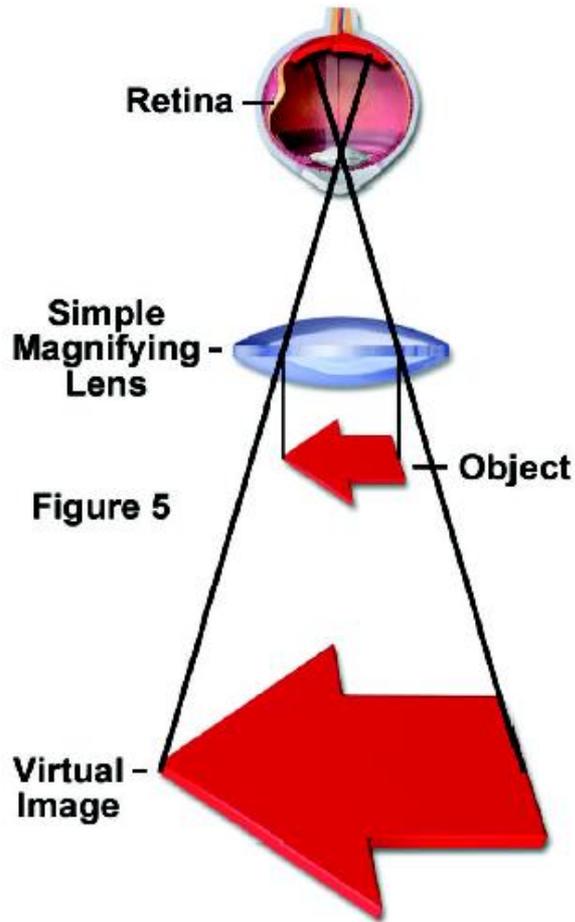
Occhio:

Distanza minima per vedere oggetti con
=punto vicino 's_o' ~ 25 cm

Il cristallino aggiusta la lunghezza focale

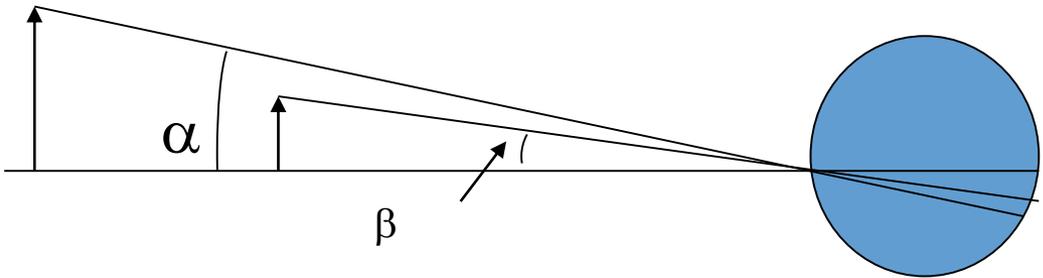
$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = \frac{1}{f}$$

$$M(\text{lineare}) = s_i/s_o$$



**Per lenti e microscopi
l'ingrandimento è sempre quella
angolare :**

**Angolo di accettazione cone
lente/Angolo di accettazione senza
lente esterno**



$$MA = \alpha / \beta$$



Le limitazioni

Ingrandimento limitato

Fissa distanza oggetto

Contrasto limitato

Risoluzione limitato

Immagine virtuale

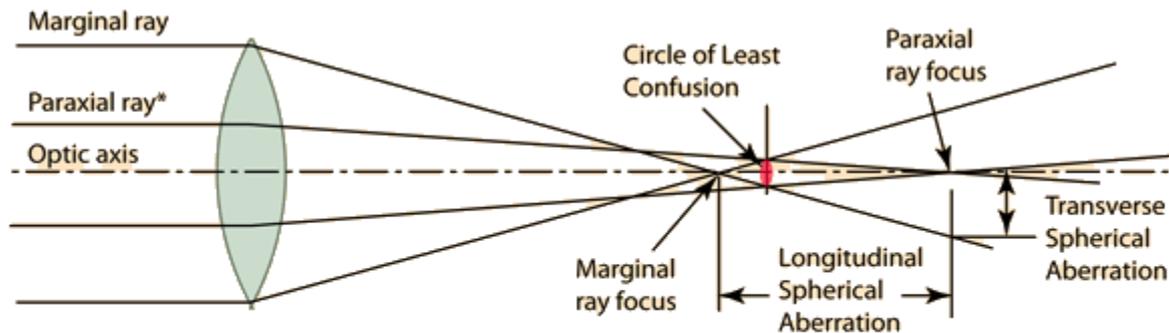
Illuminazione non uniforme

Aberrazioni dovute alla lente



Abberazione sferica

Lente non perfettamente sferico, e non tutti raggi sono parassiali

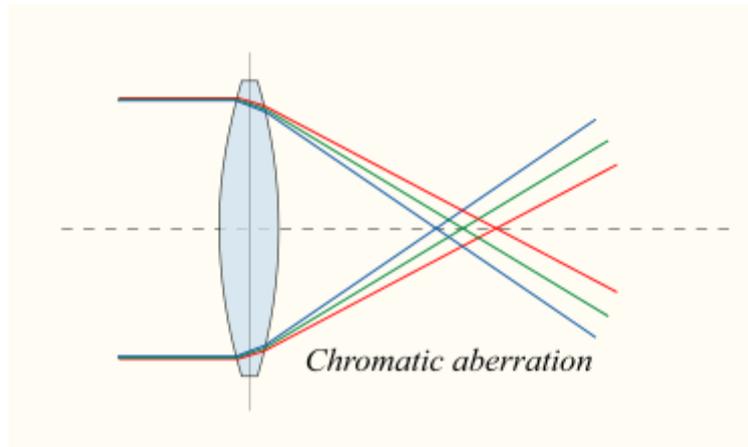


* Paraxial ray means a ray on the optic axis or very close to it, which the ray in the diagram is not. It is drawn further out to illustrate the idea of the circle of confusion.



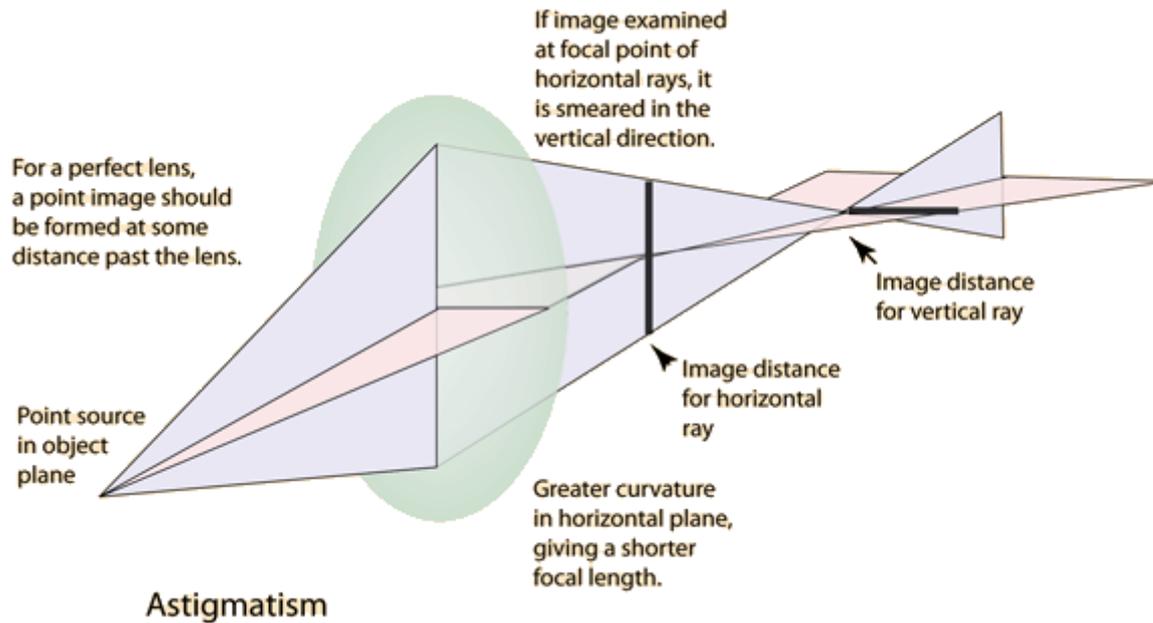
Abberazione cromatica

Dovuto alla dispersione





Astigmatismo



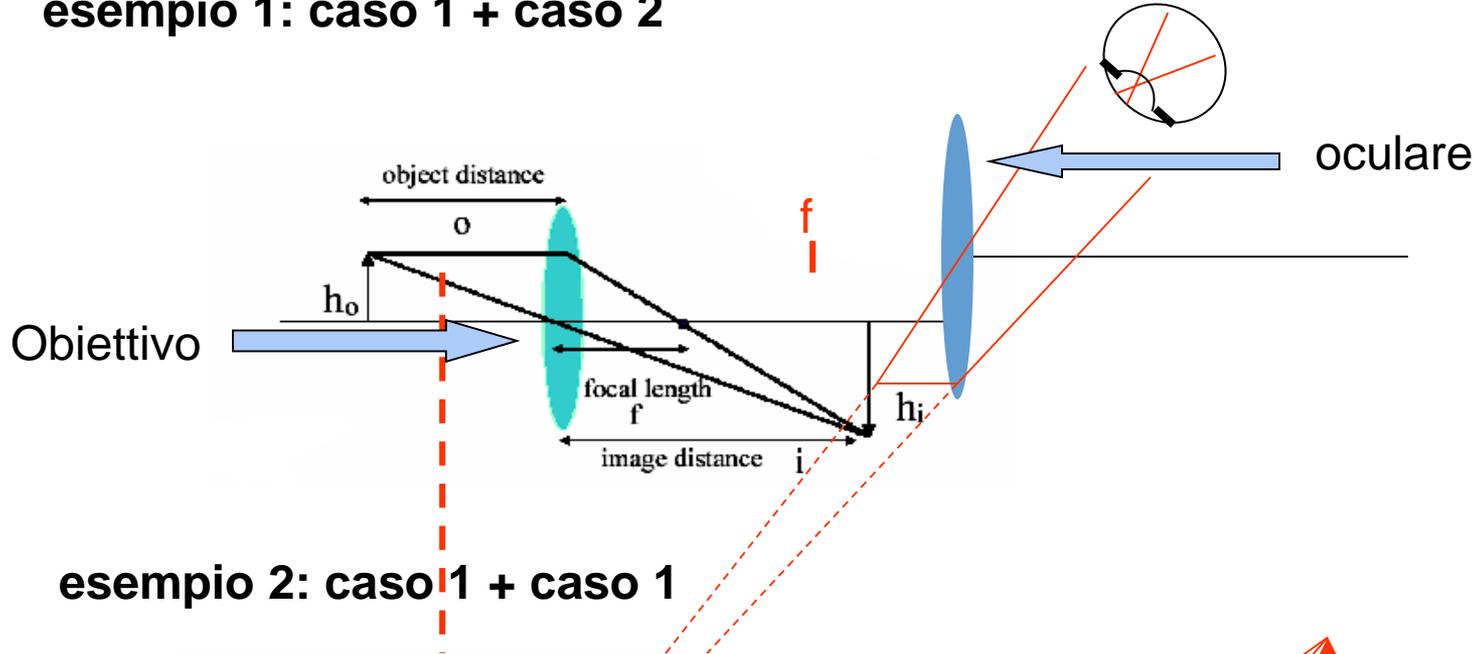
Differente curvatura in piani perpendicolari



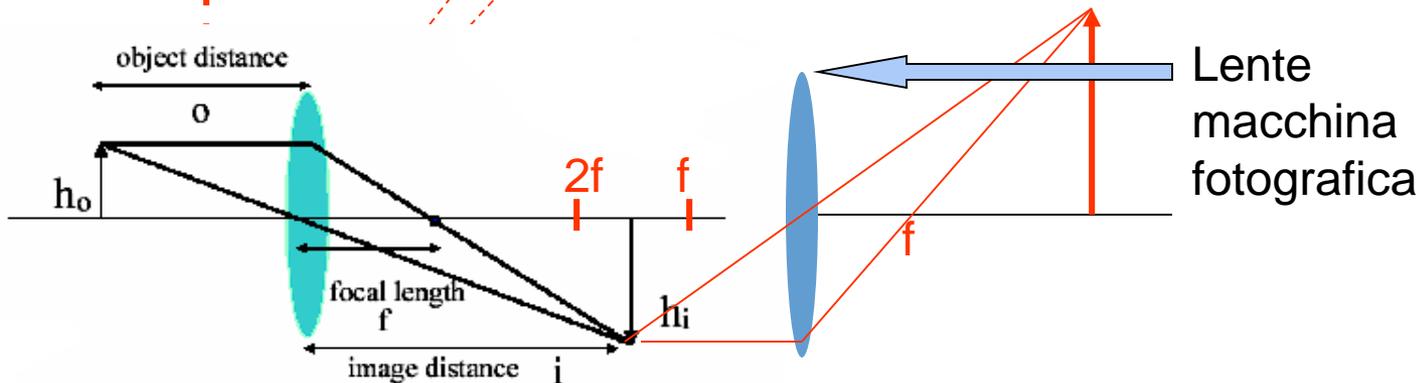
Due lenti combinate possono aumentare ingrandimento

$$M_{\text{net}} = M_o \times M_{e \text{ or } c}$$

esempio 1: caso 1 + caso 2



esempio 2: caso 1 + caso 1



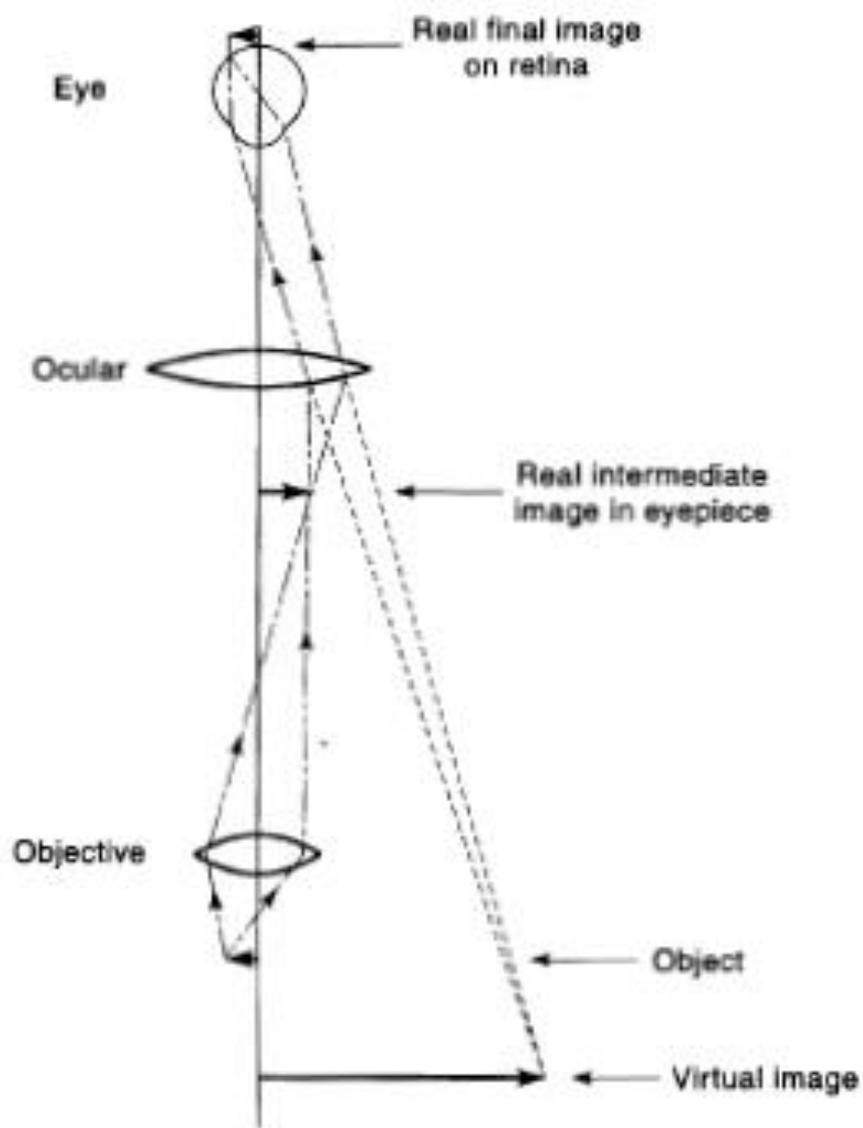
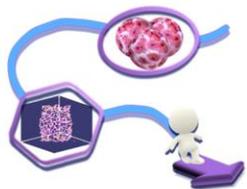


Figure 1-2

Perception of a magnified virtual image of a specimen in the microscope. The objective lens forms a magnified image of the object (called the real intermediate image) in or near the eyepiece; the intermediate image is examined by the eyepiece and eye, which together form a real image on the retina. Because of the perspective, the retina and brain interpret the scene as a magnified virtual image about 25 cm in front of the eye.



Ci sono 2 tipi di microscopio: invertito e diritto

Invertito: gli Obiettivi sono sotto, si usa per cellule in coltura. Di solito si muove gli obiettivi verso l'oggetto

Eretto: si muove lo statino

Apertura: assicura che non entra luce da fonti esterni

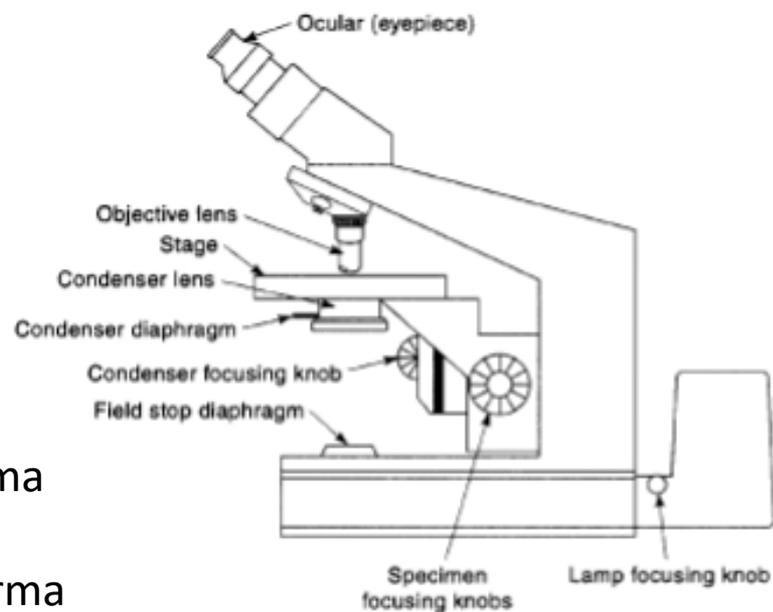
Microscopio composto=due lenti, oculare e obiettivo

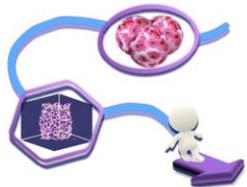
$M_{\text{finale}} = M_{\text{obj}} \times M_{\text{ocu}}$

L'obiettivo raccoglie la luce diffrata dal campione e forma un'immagine reale vicino all'oculare.

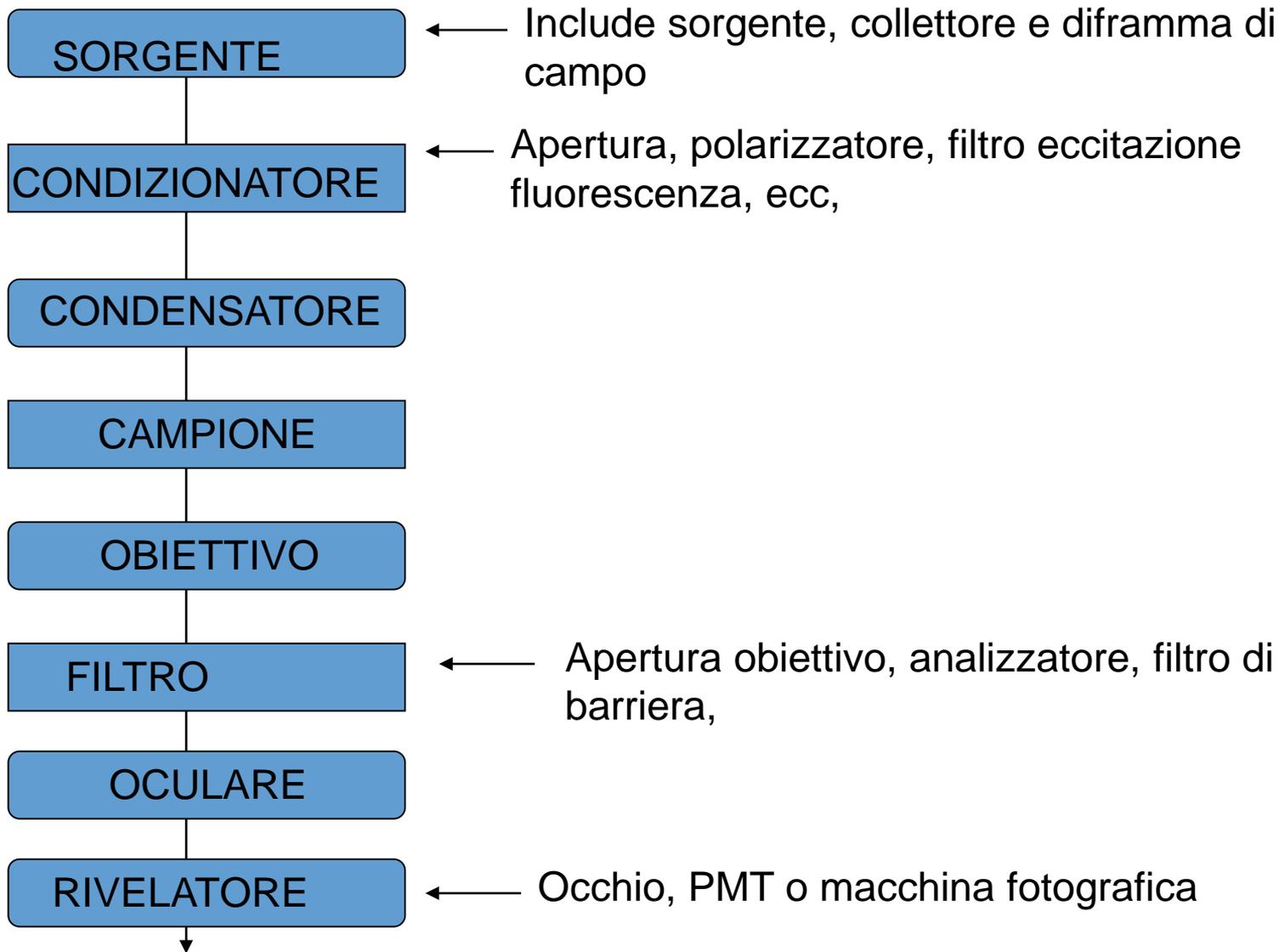
Questa immagine viene poi ingrandita dall'oculare e forma un'immagine reale sulla retina.

La lente condensatore illumina il campione: la luce dalla lampada viene focalizzata su una zona del campione in maniera tale che può essere poi "scattered".



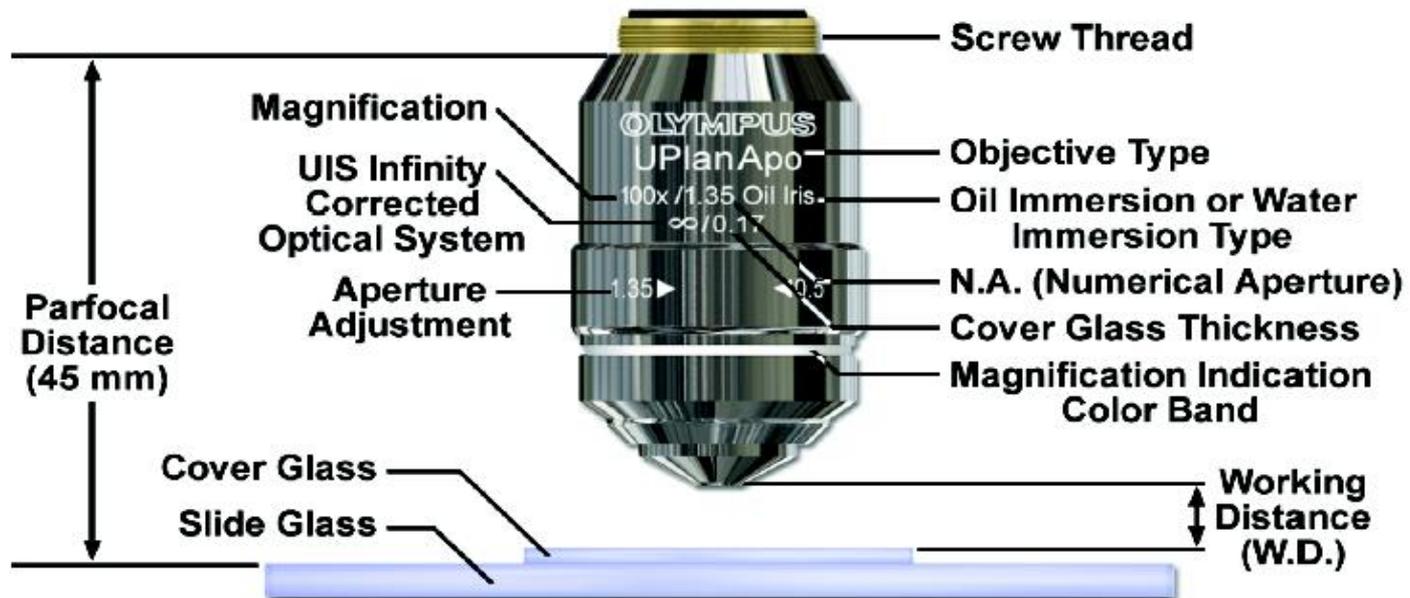


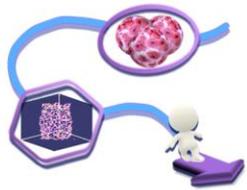
I Pezzi



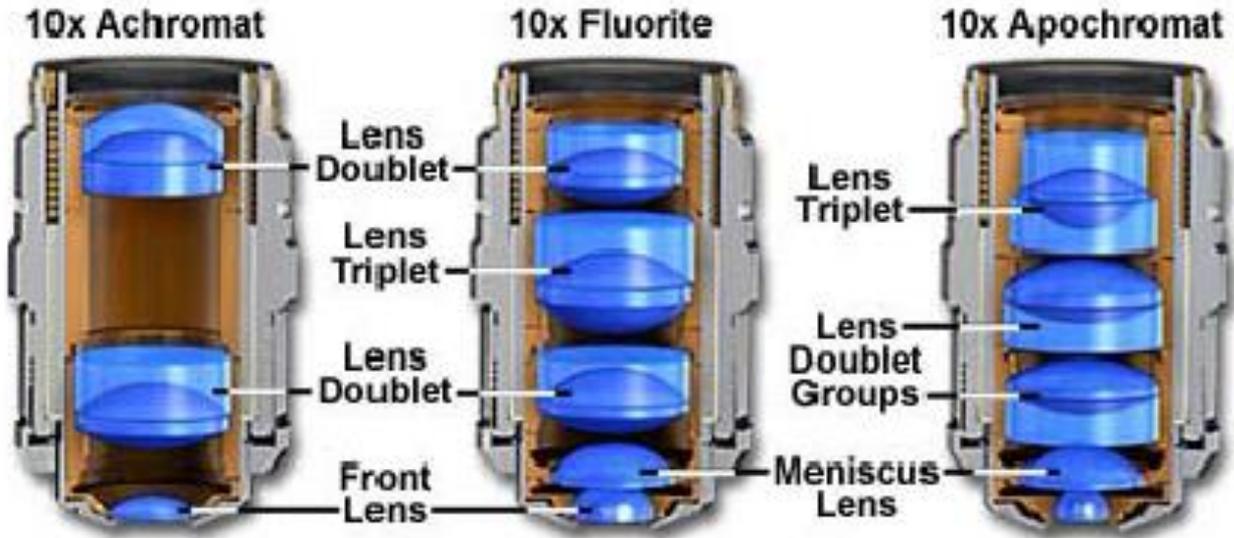


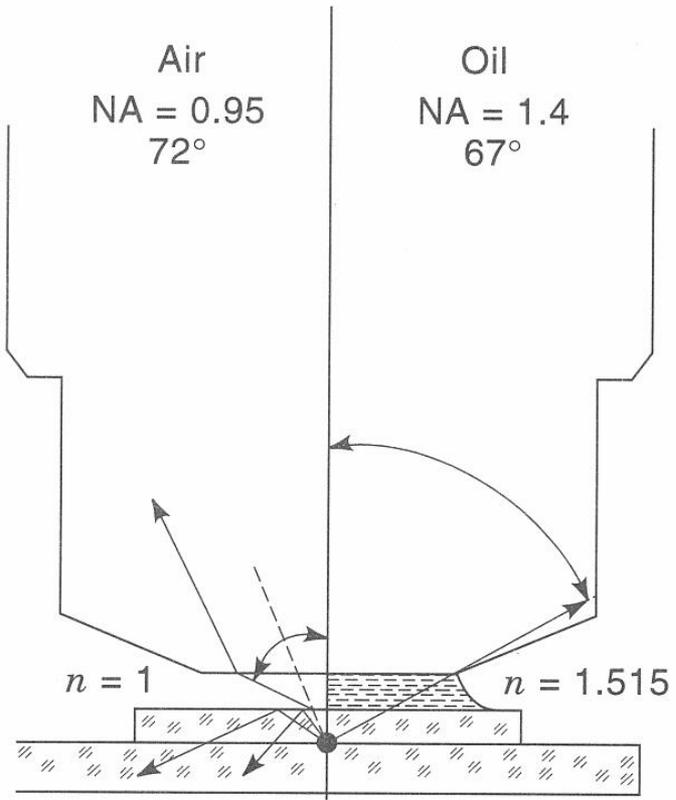
Tipico obiettivo





Common Objective Optical Correction Factors



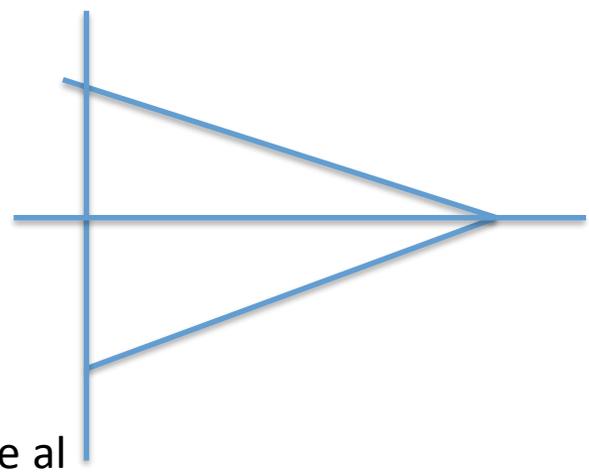


Apertura numerica

$$NA = n \sin \theta$$

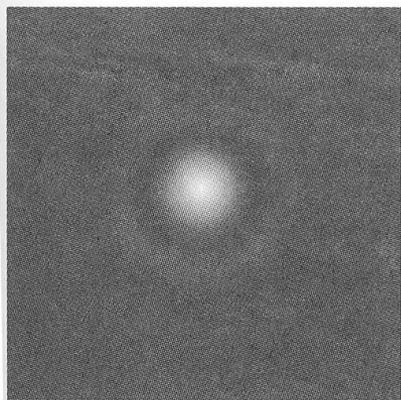
$$2NA = D / f = 1 / f\#$$

θ , Mezzo angolo del cono di luce che viene accettato dalla lente. La figura illustra come immersione ad olio aumenta il NA. Così aumenta la risoluzione.



L'intensità dell'immagine è proporzionale al $1/f\#^2$

Diffrazione: succede quando la luce interagisce con oggetti



(a)

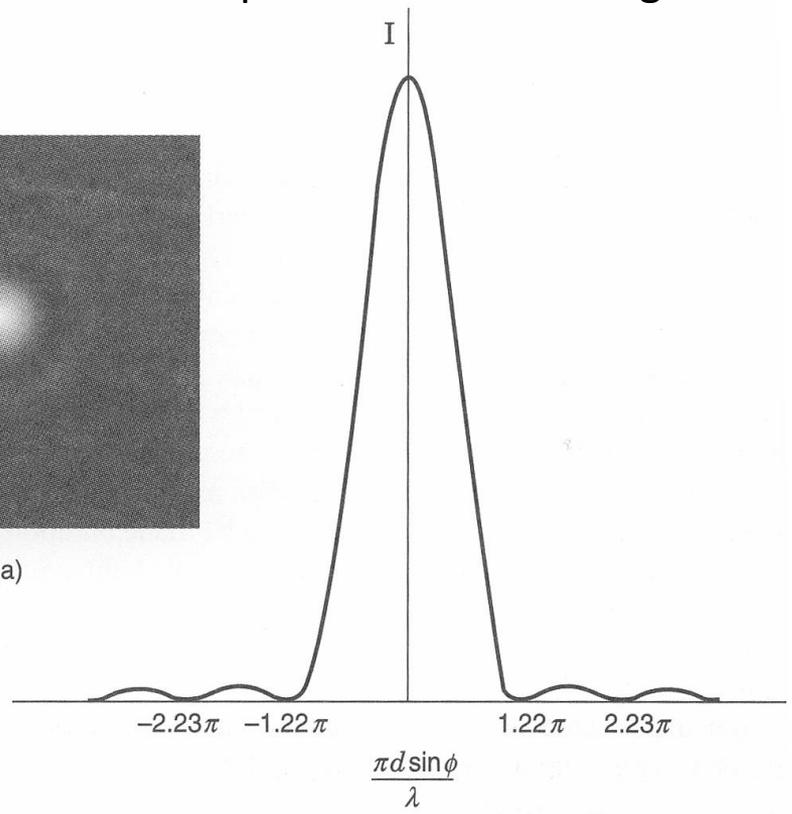


Immagine di un punto di luce visto da una lente. Lo spot centrale contiene 84% della luce e si chiama il disco di AIRY. E causato dal passaggio della luce da un punto attraverso la lente.

Angolo di apertura o f number: f/D , lunghezza focale/diametro lente.

Grandezza del disco

$$(b) d = 1.22 \lambda f / D$$

o

$$d = 1.22 \lambda / 2NA$$

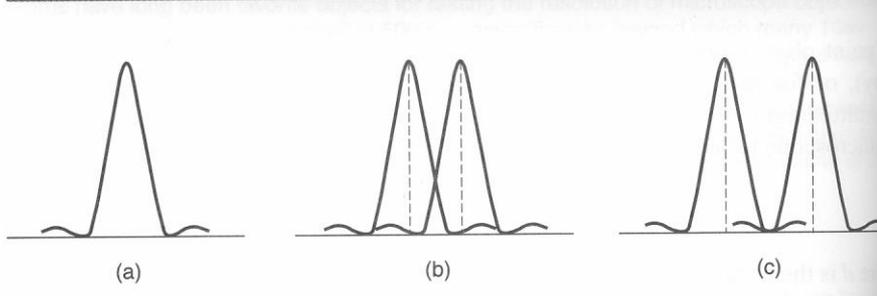
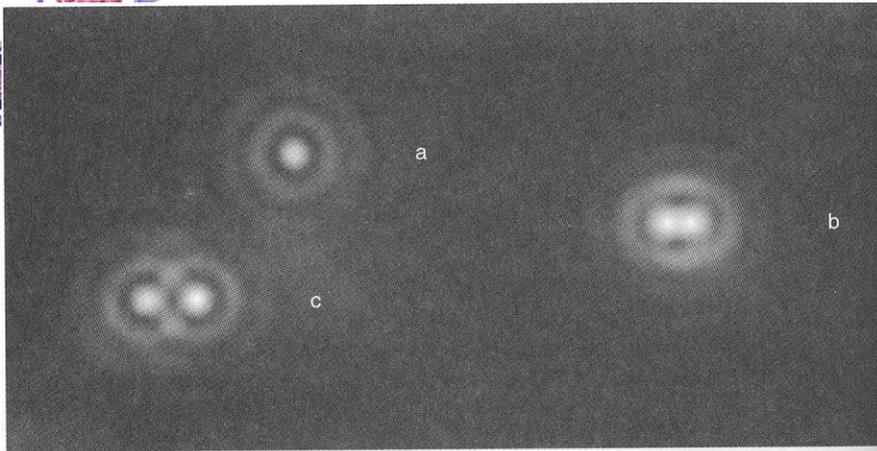
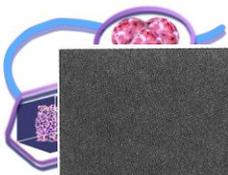
Quindi il disco del Airy e il PSF dipendono dalla lente.



Se il NA del condensatore $e' > NA$ obiettivo, il potere di risoluzione della microscopio è $d = 0.61\lambda / NA$

d è la distanza minima di risoluzione in micron se anche λ è in micron . **Se la NA del condensatore è piu piccolo,** $d = \frac{1.22\lambda}{NA_{cond} + NA_{obj}}$

Quindi, se d deve essere piccolo (cioe buona risoluzione), ci vuole un apertura numerica grande, o un f # piccolo



Si dice che due punti sono risolti quando il disco di Airy dei due punti non si sovrappongono. (criterio di Rayleigh)

Ad esempio, per un obiettivo di NA 1.3, e λ 546 nm, la risoluzione è $0.26 \mu\text{m}$.

Voule dire che particelle piu grande di $0.52 \mu\text{m}$, si vedono appena, e si riesce a distinguere i contorni. Invece particelle minore di $0.52 \mu\text{m}$ sono indistinguibili e sembrano circolari.

2 oggetti che hanno una distanza tra i centri minore del $0.26 \mu\text{m}$ NON possono essere risolti. Ma due oggetti piu piccoli di $0.26 \mu\text{m}$ che sono distanti più di $0.26 \mu\text{m}$, possono essere percepiti come due punti distinti (senza forma).



Airy Disks and Diffraction Pattern Intensity Profiles

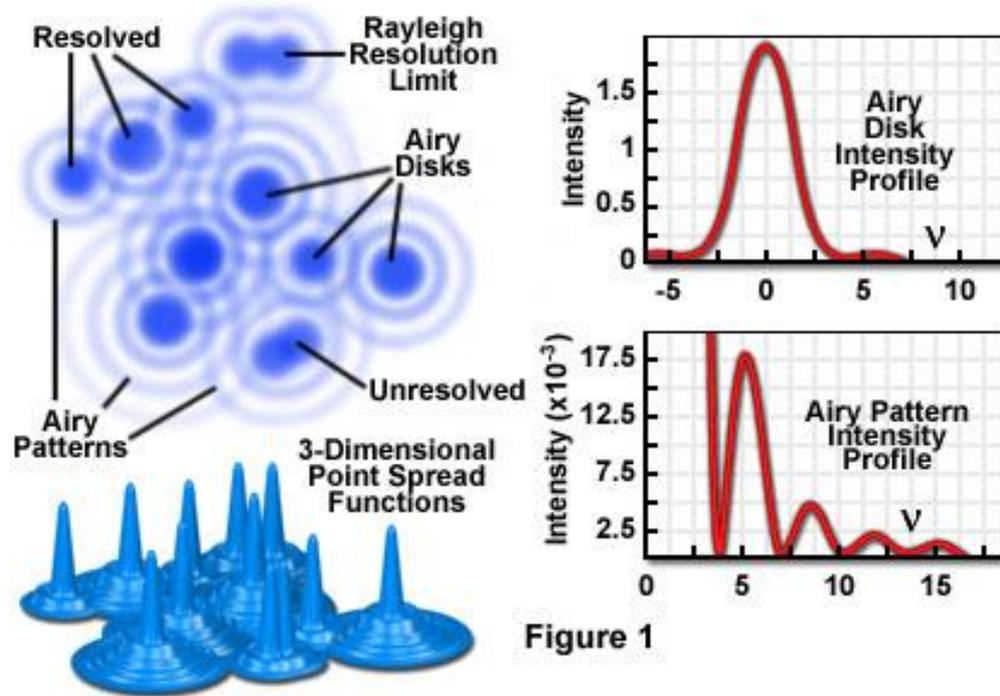
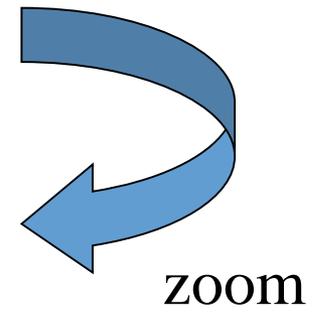


Figure 1





Profondità di campo

è lo spessore della sezione lungo z (parallelo ai raggi) dove oggetti sono in fuoco.

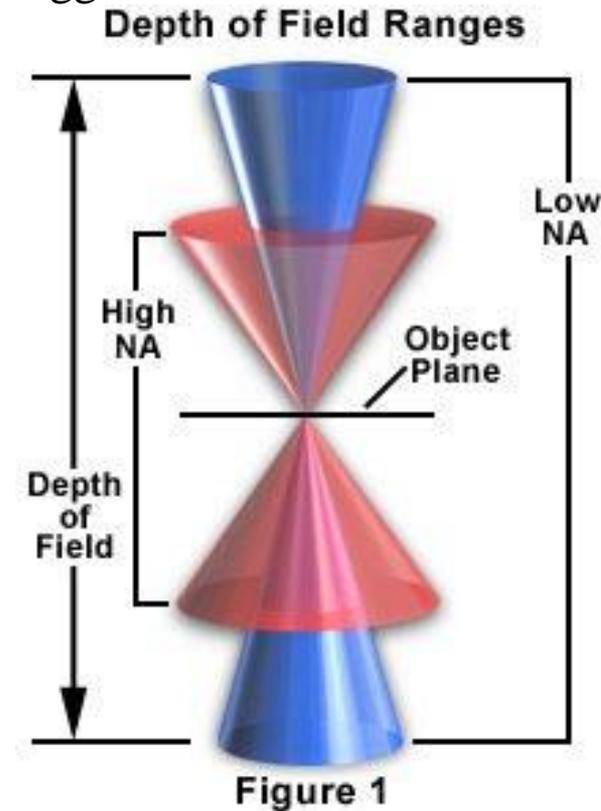


$$Z = n\lambda / NA^2$$

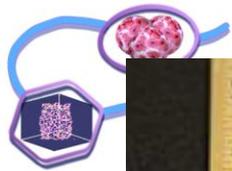
Ricordiamo

$$NA = n \sin \theta$$

$$2NA = D / f = 1 / f \#$$



Pinholecamera ha un profondità di campo pari a ∞



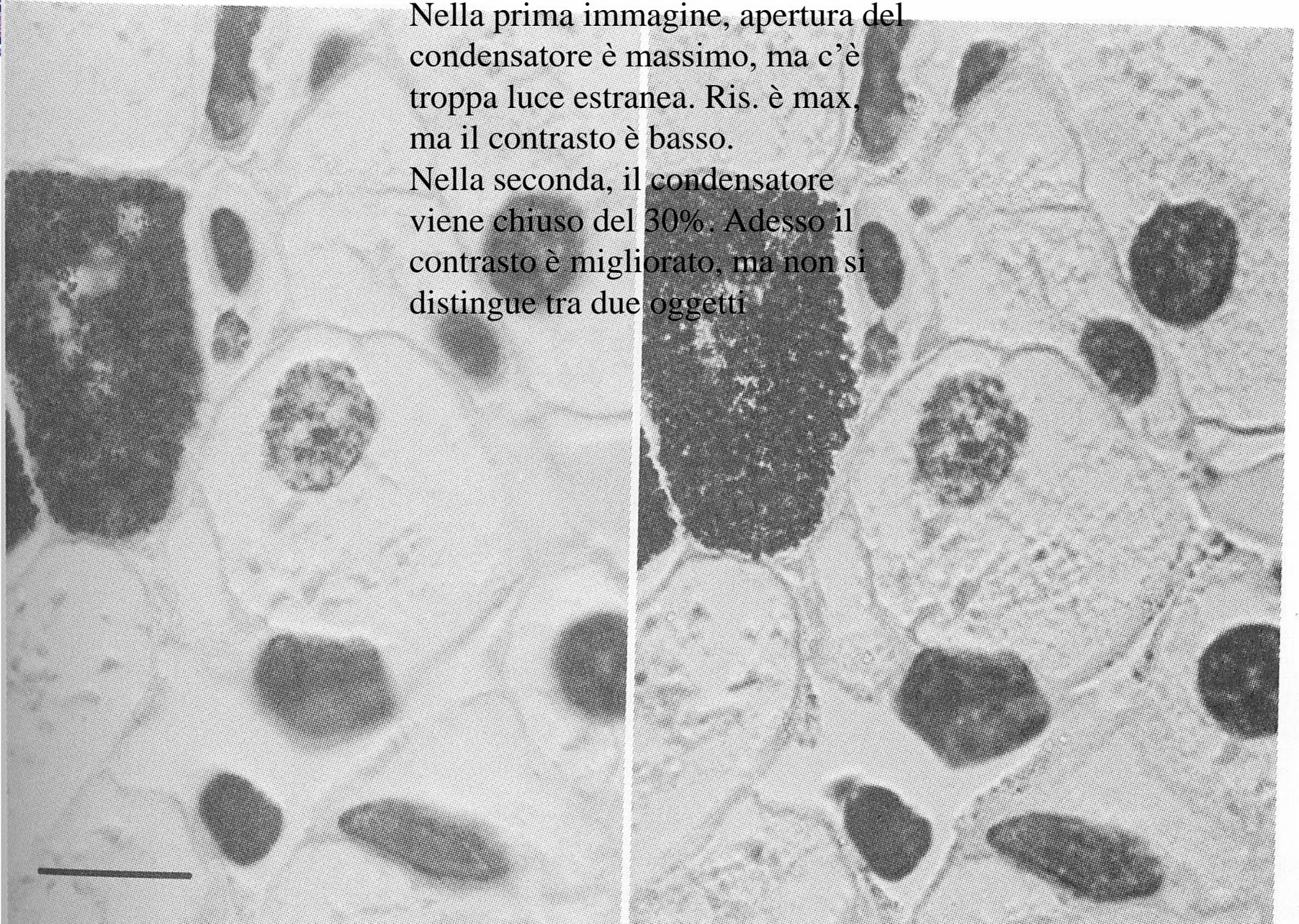
Aumenta la profondita' di campo



Risoluzione e contrasto

Nella prima immagine, apertura del condensatore è massima, ma c'è troppa luce estranea. Ris. è max, ma il contrasto è basso.

Nella seconda, il condensatore viene chiuso del 30%. Adesso il contrasto è migliorato, ma non si distingue tra due oggetti





$I \propto A^2$ Intensità e contrasto

I , intensità flusso energia in Watts/m², A ampiezza o energia

Contrasto:

$$C = \frac{\Delta I}{I_b} = \frac{I_o - I_b}{I_b}$$

In campioni biologici che sono tipicamente trasparenti, $I_o = I_b$, e C tende a 0. Per cui si usano i coloranti.

Risoluzione: Il $d = 0.61\lambda / NA$ è il limite teorico, e le due cose (risoluzione e contrasto) non sono separabili.



Assorbanza

$$I = I_o e^{-z\alpha(\lambda)} \Rightarrow \frac{I_o}{I} = e^{z\alpha(\lambda)}$$

dato che $\log_{10} x = \frac{\ln x}{2.303}$

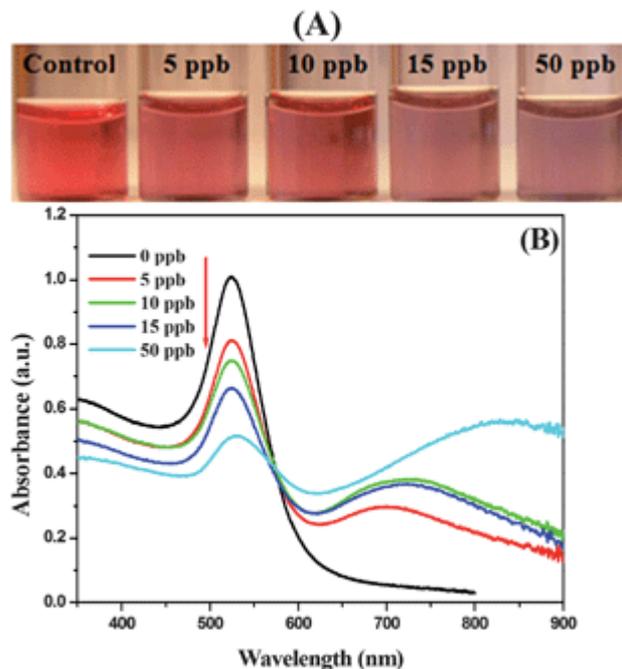
$$\Rightarrow \log_{10} \frac{I_o}{I} = Abs = 2.303z\alpha(\lambda)$$

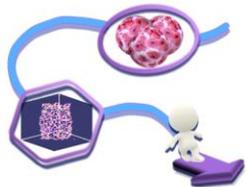
$$\alpha(\lambda) \propto C; \alpha(\lambda) = k(\lambda)C$$

$$Abs = \varepsilon(\lambda)Cz \text{ dove } \varepsilon = 2.303k(\lambda)$$

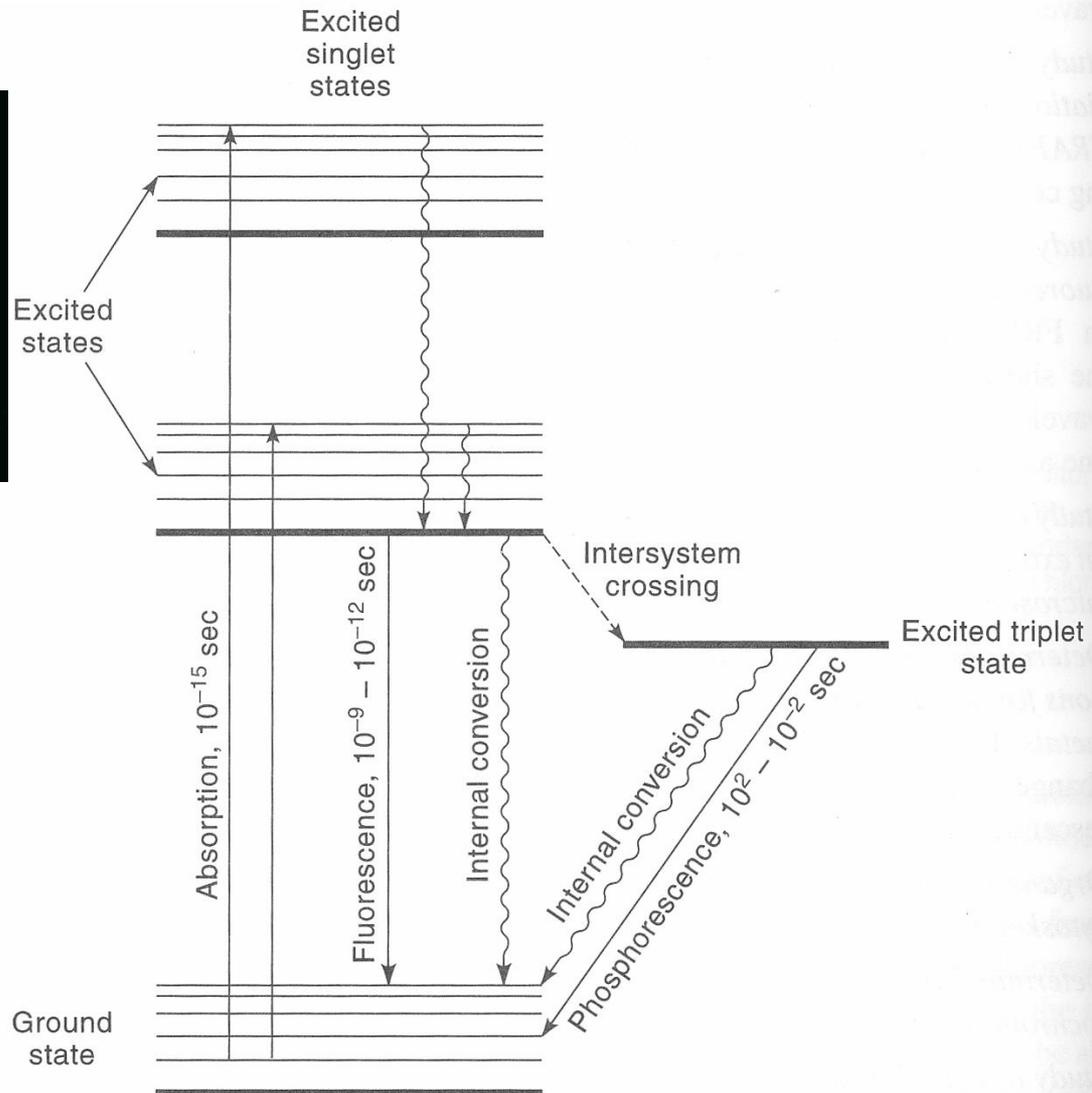
In un liquido, α è proporzionale alla concentrazione (C) delle molecole che assorbono.

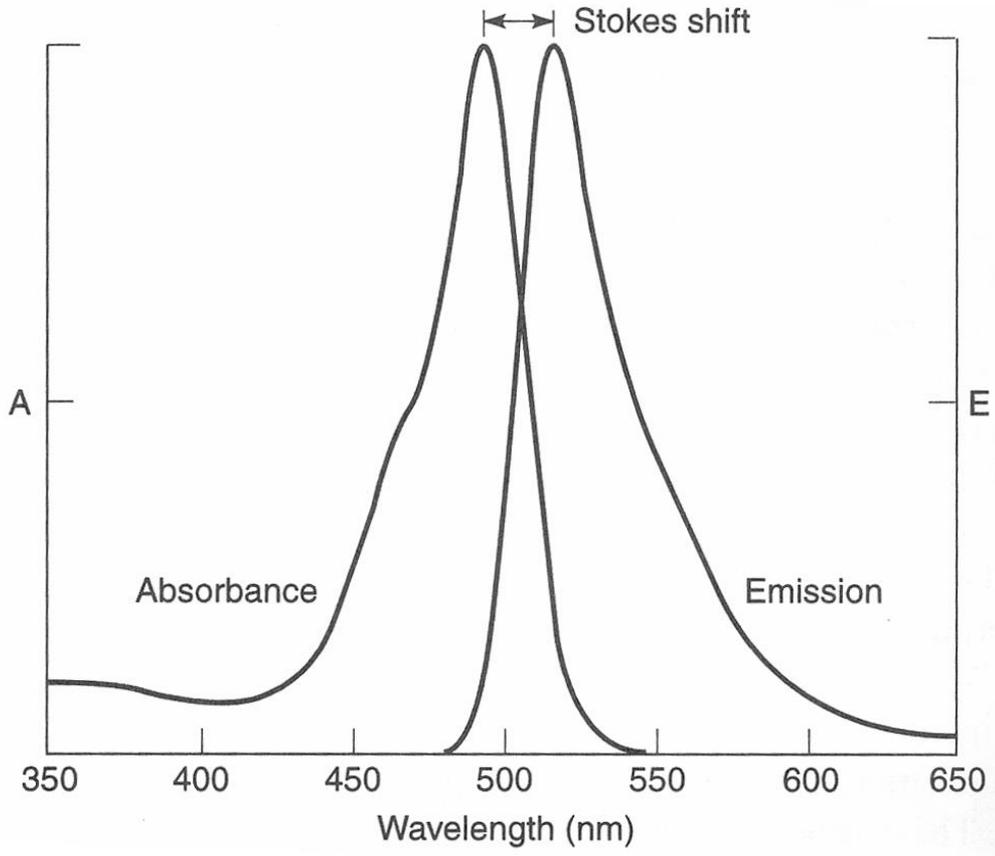
Notare che la α dipende dalla lunghezza d'onda.





Fluorescenza



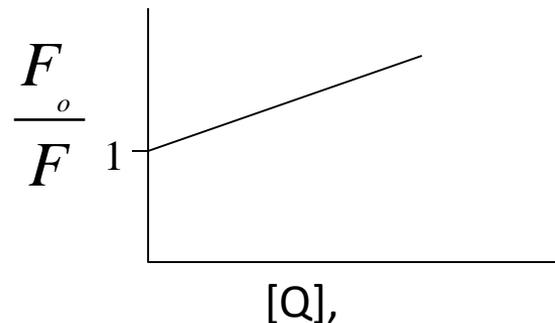




La fluorescenza:

- 1) Stokes shift, luce di eccitazione ha una λ minore di quella emessa
- 2) Sensibilita' ad ambiente
- 3) Alta sensibilita' rispetto ad assorbimento (10-100 nM)
- 4) Effetto filtro interno
- 5) Resa quantistica Φ = fotoni emessi per fluorescenza/fotono assorbiti
- 6) Quenching : F_o = fluorescenza emessa senza Q, il "quenchatore", F = fluorescenza in presenza di [Q], k = una costante cinetica tipica del sistema.

$$\frac{F_o}{F} = 1 + k[Q]$$





$$F(\lambda) = I_o \Phi(\lambda) \varepsilon(\lambda) C l d f(\lambda)$$

Fluorescenza totale emessa a $\lambda = F(\lambda)$

Intensita' incidente = I_o

Resa quantistica = $\Phi(\lambda)$

Coefficiente di estinzione = $\varepsilon(\lambda)$
(:2.303)

Concentrazione = C

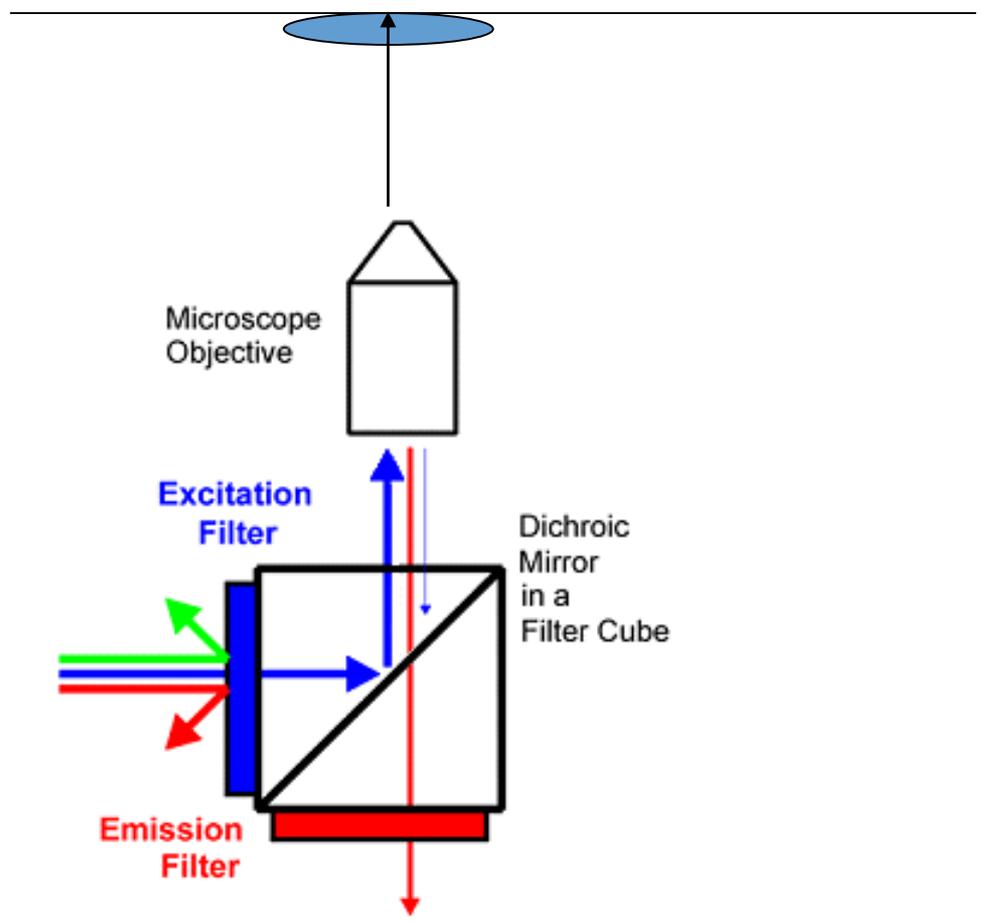
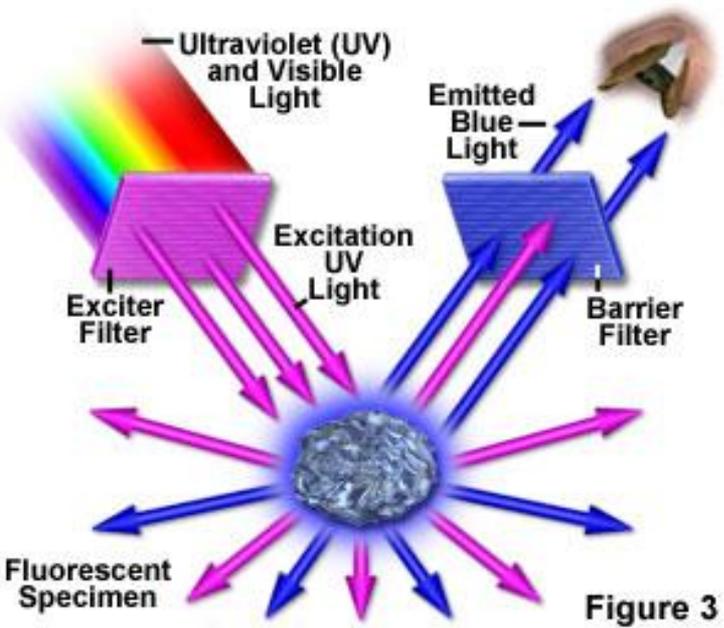
Lunghezza camino = l

Fattore geometrico di raccolta = d

Frazione di luce emessa a $\lambda = f(\lambda)$



Principle of Excitation and Emission

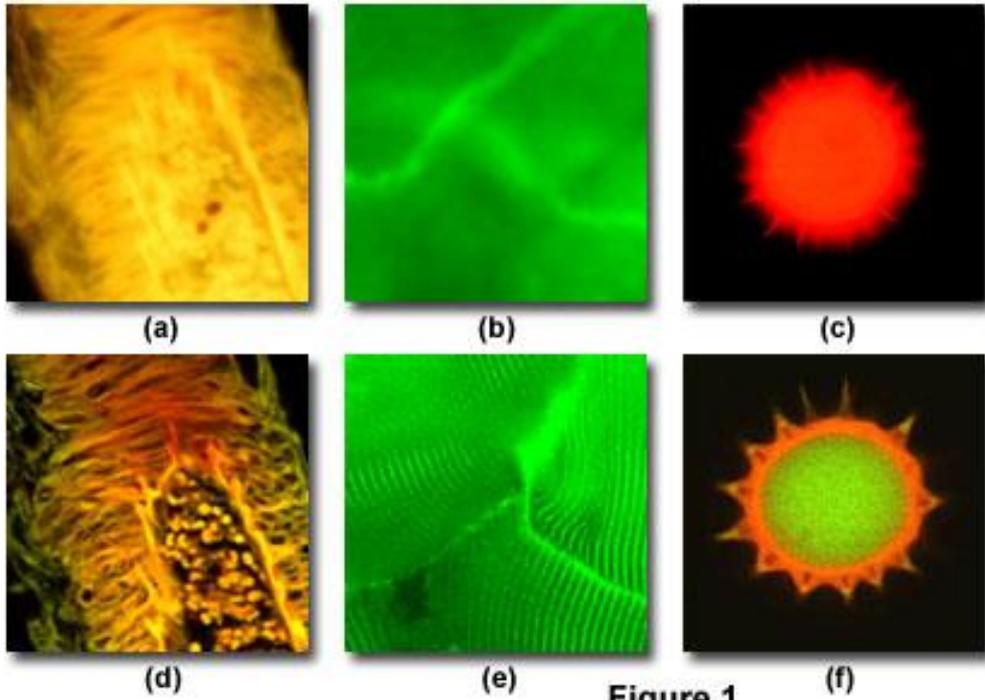




PROBLEMI di MICROSCOPI A FLUORESCENZA: *alto background, fluorescenza emessa isotropica*.

Fluoroforo non legato in maniera specifica, riflessioni, scattering, polvere, imperfezioni ottici. Autofluorescenza, non puo misurare campioni spessi perche la fluorescenza è elevata.

Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy



Phase contrast-quarter wave plate
Widefield
confocale

Figure 1

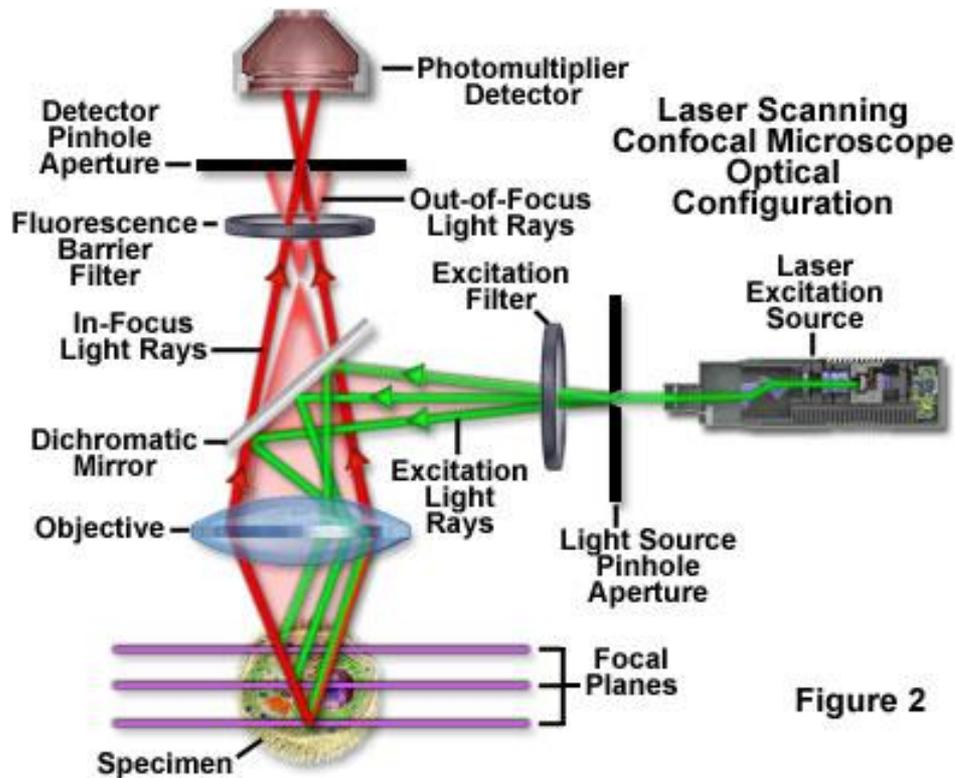


Figure 2

Confocale: Inventato da Minsky in 1957, primi strumenti commerciali 1987. (costosi). Non migliora molto la ris nel x,y,o z ma diminuisce molto il background (quindi aumenta il contrasto), grazie ai due pin hole e l'uso del laser.

Sistemi integrati con laser, e sistema di raster scan



Principio di funzionamento

Luce coerente dal laser attraversa il primo pin hole PH1 (piano confocale coniguato con quello sul campione).

Il secondo PH2 è situtato davanti il detector.

Il laser viene scannato (rasterizzato in x e y) con uno specchio in un piano focale definito.

La F dovuto a punti sotto e spora il piano focale non è confocale con il PH2 e solo una piccola parte passa il PH2.

La grande differenza è che in μ scopia convenzionale, tutto il campione viene bagnato con la luce., mentre in μ scopia confocale, i PH funzionano da filtri spaziali. In questo modo è possibili esaminare campioni con quasi 50 μ m di spessore.

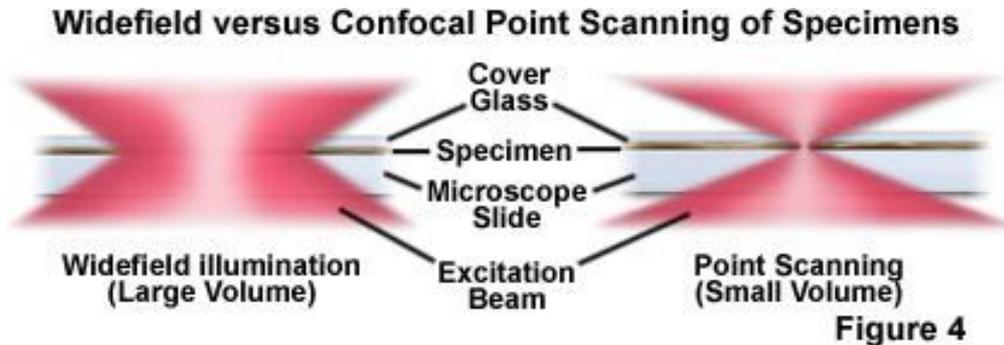
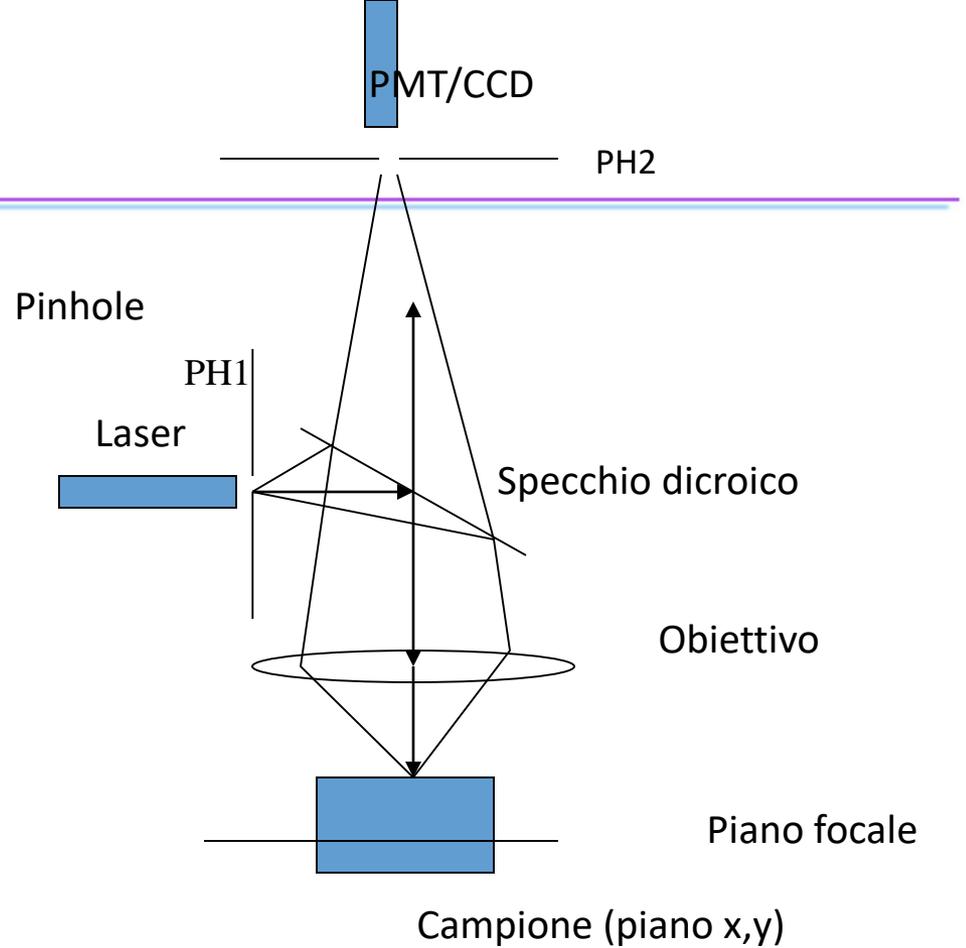


Figure 4



Confocal Microscopy Information Flow Schematic Diagram

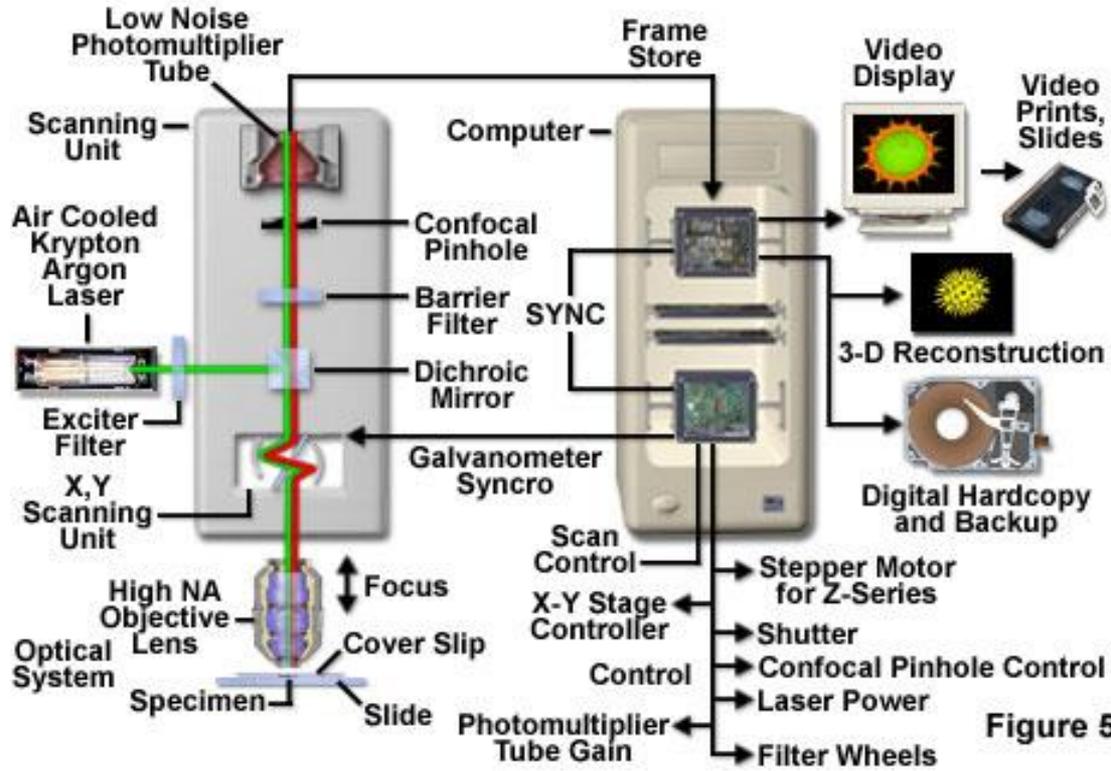
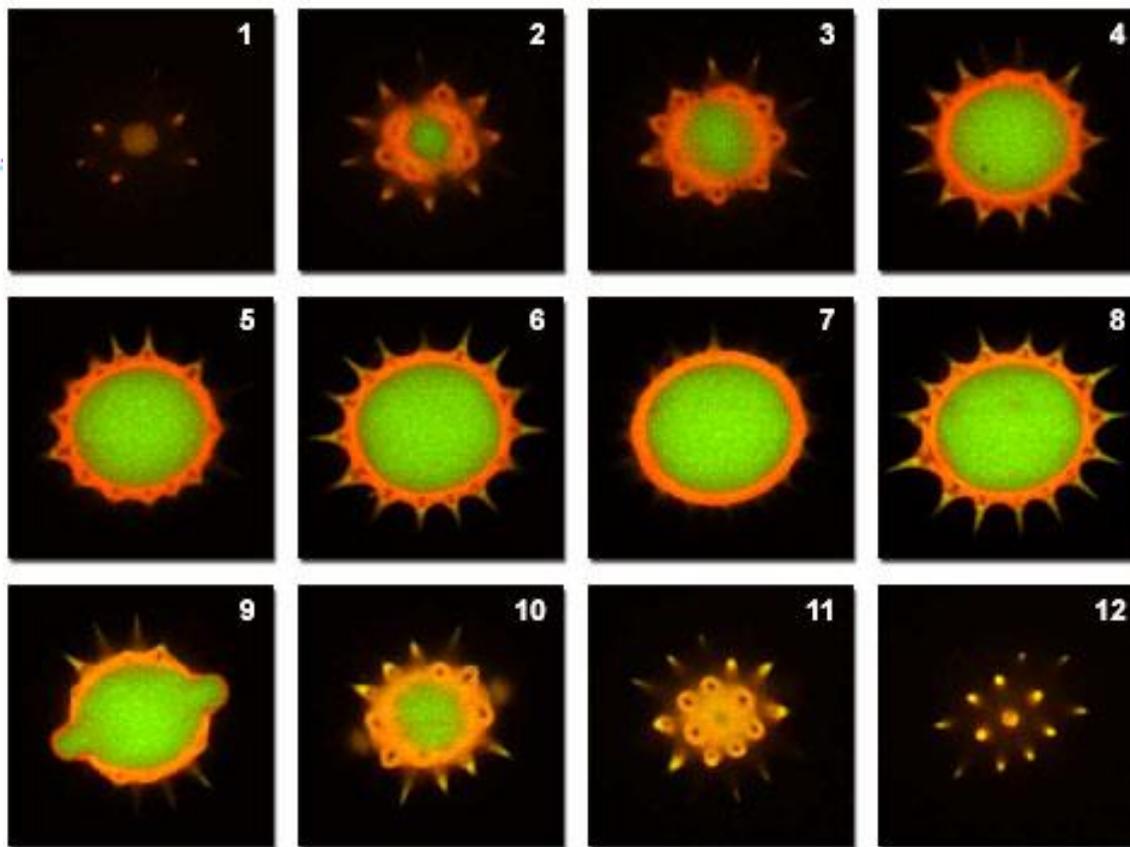


Figure 5

Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



Step z di $0.5 \mu\text{m}$

svantaggi,: costo, laser λ
limitate, non uv , campione
deve essere fluorescente



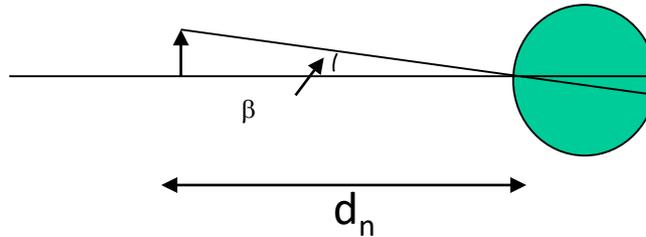
1) mostrare che l'ingrandimento angolare di una lente è pari a:

$$AM = \frac{d_n(1 + DS_i)}{S_i + L}$$

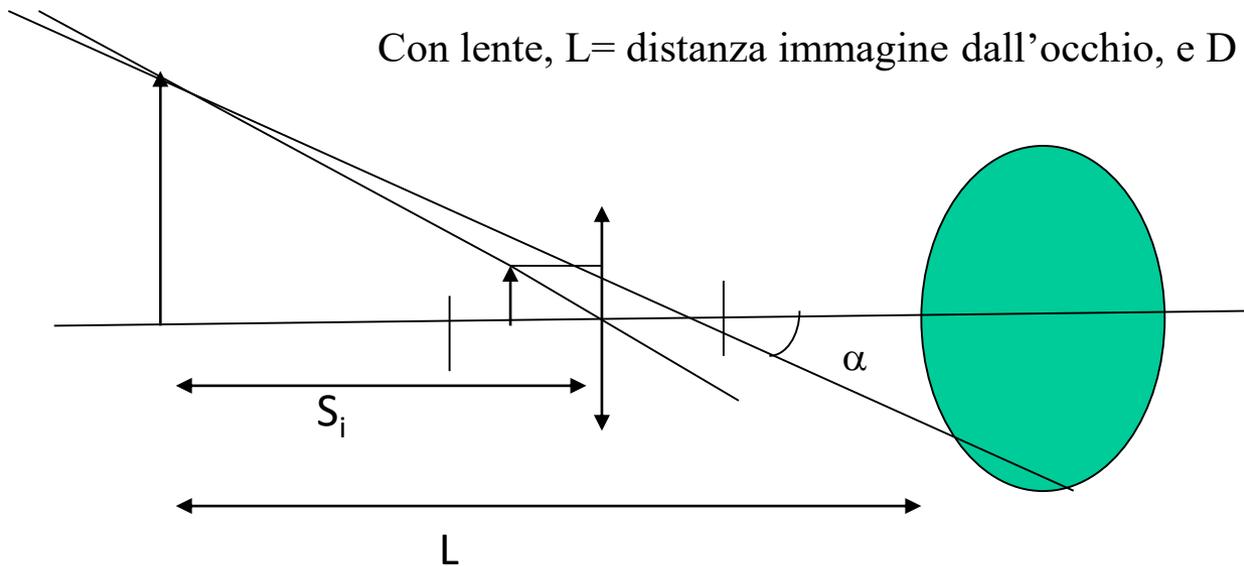
E quindi nel limite, $S_i \rightarrow \infty$

$$AM = D * d_n = D/4$$

Senza lente, $d_n = \text{punto vicino}$

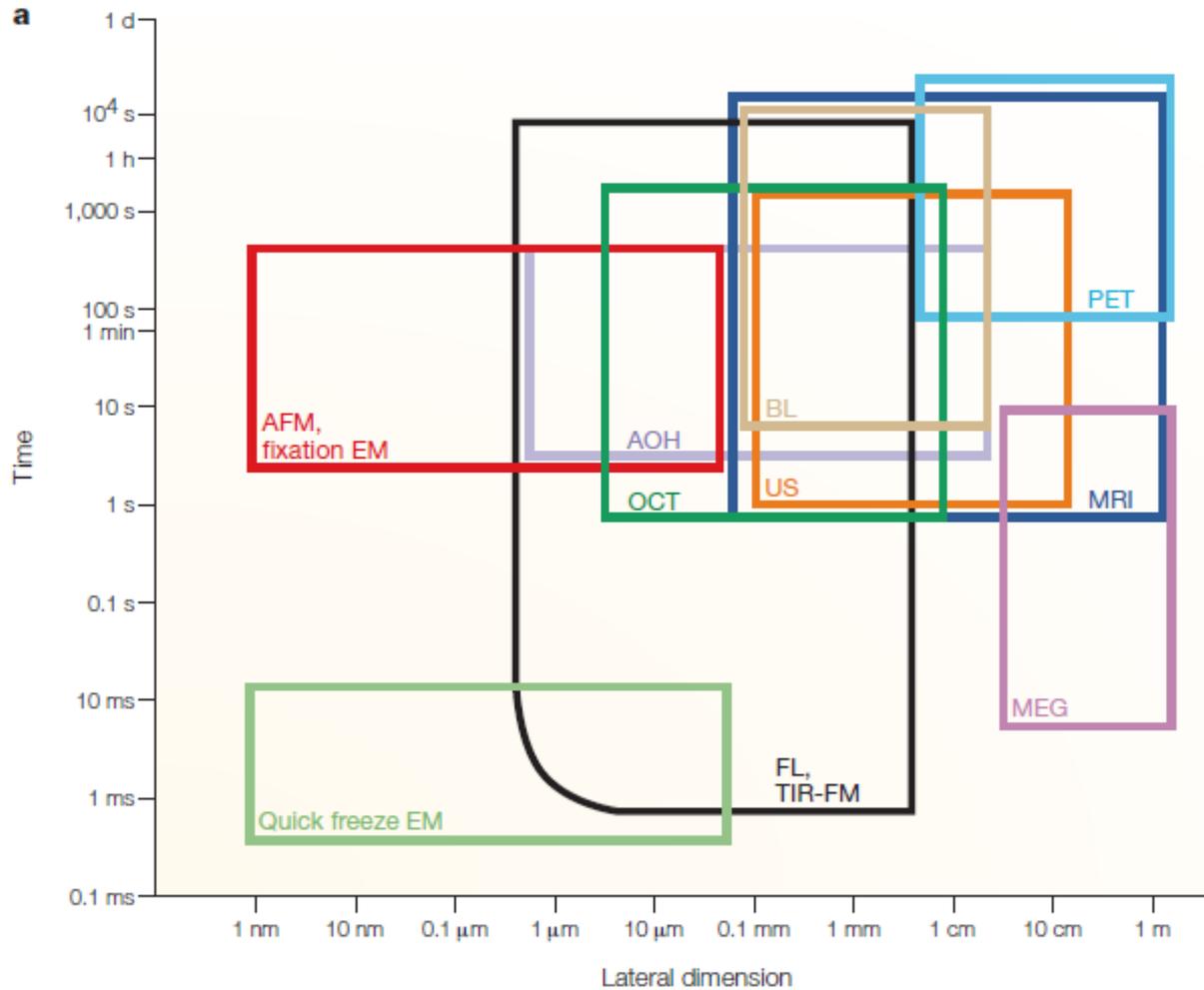


Con lente, $L = \text{distanza immagine dall'occhio}$, e $D = \text{potenza della lente}$



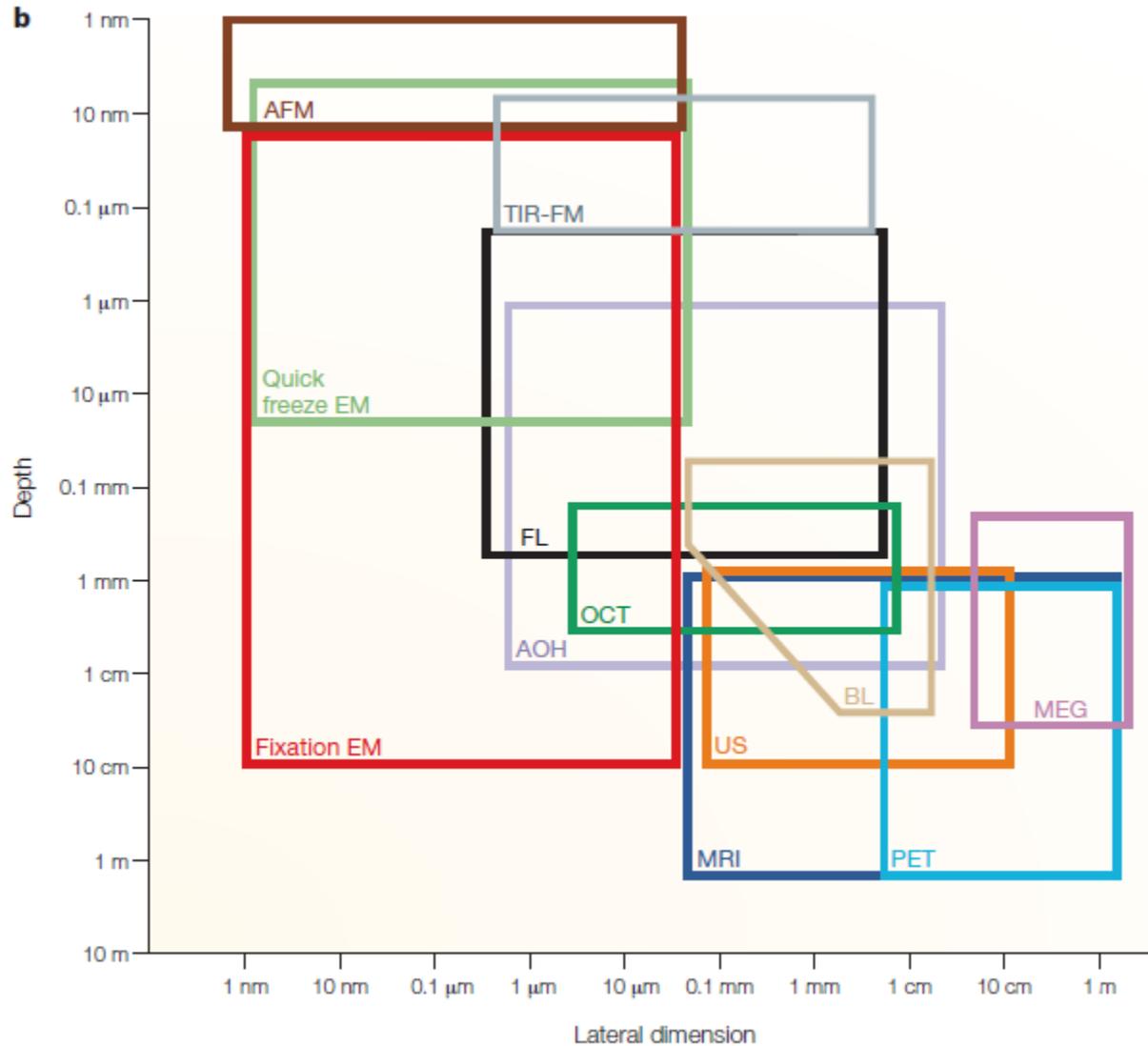


Le sfide di imaging: T, d, xyz, ndt





Da Tsien, 2003 Nature Reviews





Altre tecniche ottiche

STED-stimulated emission depletion

SPR'surface plasmon resonance

Ellisometria

STORM - Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

PALM -Photoactivated Localization Microscopy

FRET- fluorescent resonant energy transfer

Deconvolution Microscopy

OCT -optical coherence tomography

TIRF-total internal reflection fluorescence



Misurare Luce

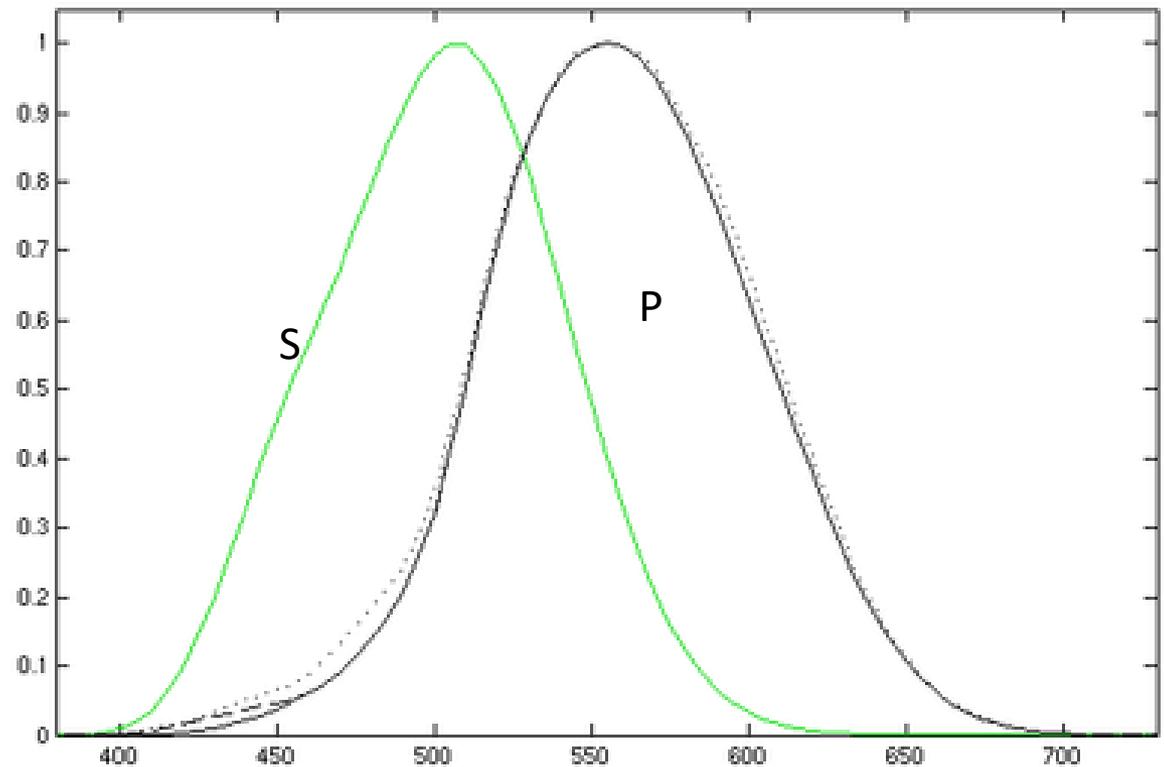
Watts/m² (sun= 1000 W/m²)- INTENSITY

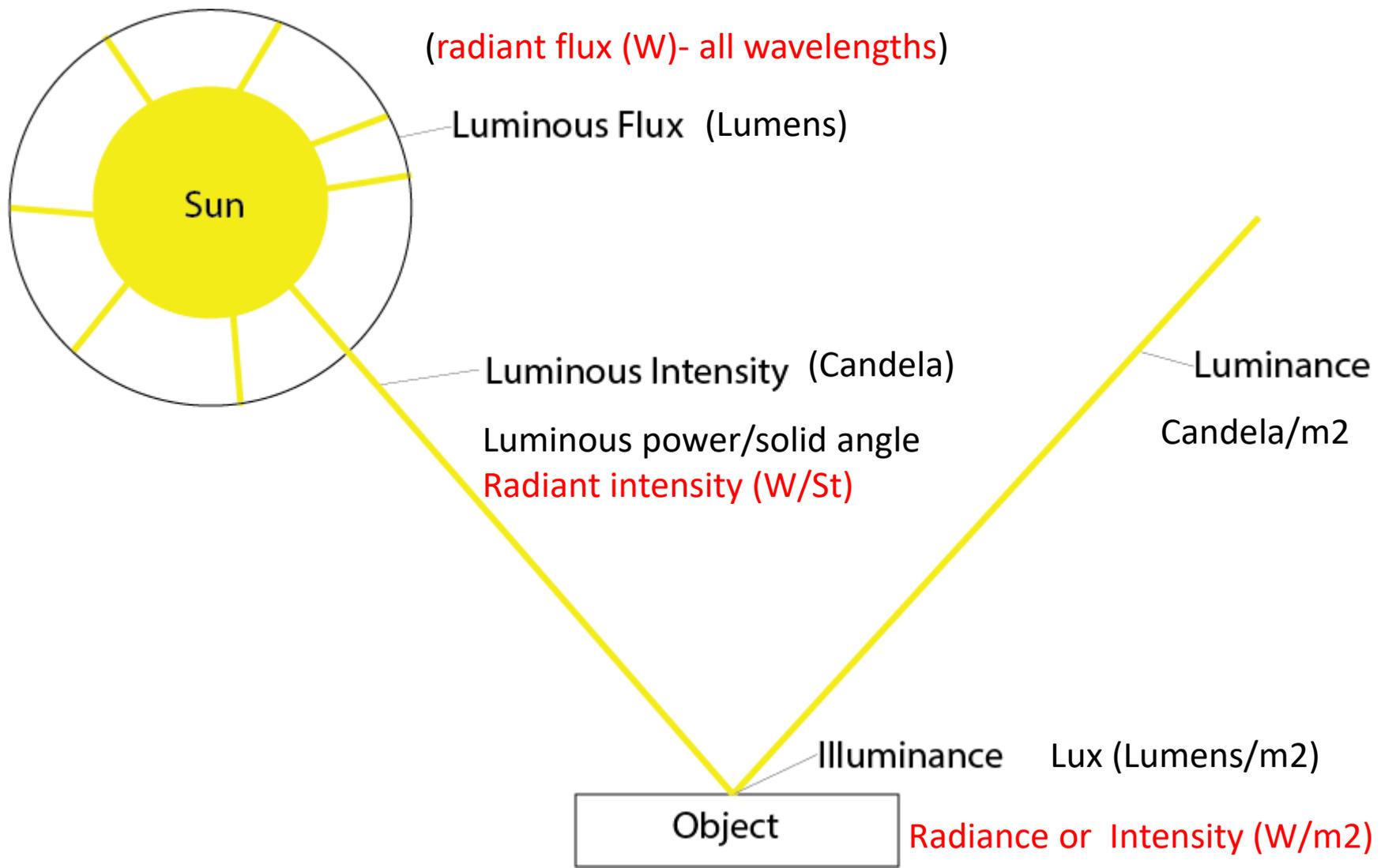
Radiant Flux= Watts

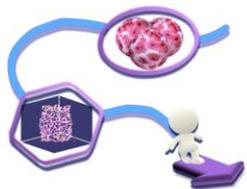
Lux

Candela (SI unit)

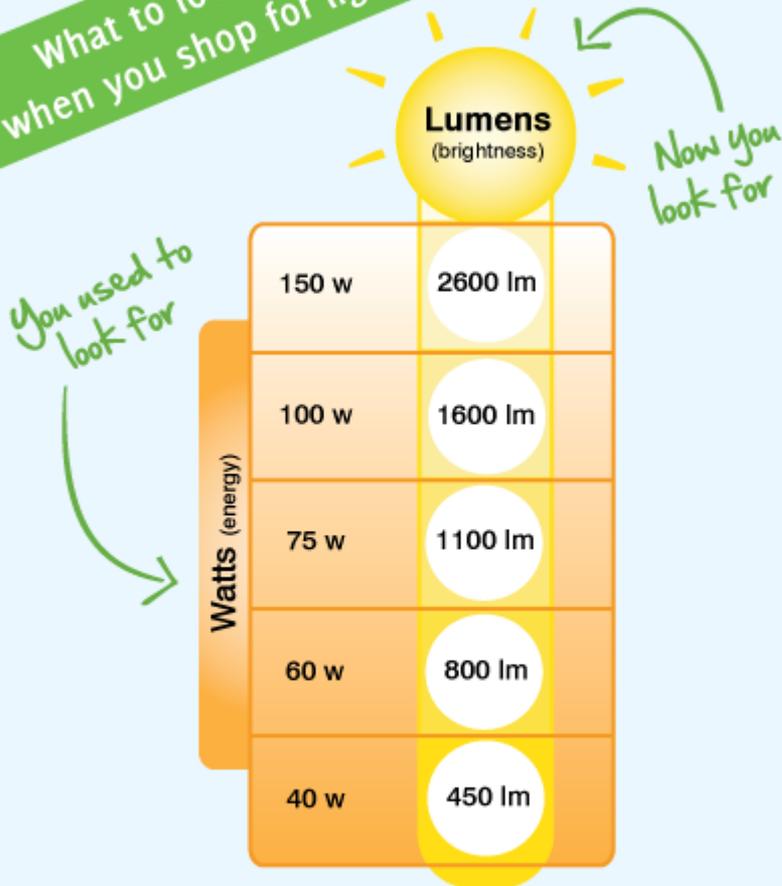
Lumens







What to look for when you shop for light bulbs



Estimates based on typical incandescent bulbs

This chart shows the number of lumens produced by common incandescent bulbs. If you're looking to buy a bulb that will give you the amount of light you used to get from a 60-watt bulb, you'll now look for 800 lumens.



Filtri

si nominano per il passo di lunghezza d'onda

ND. : neutral density filter. Attenuano intensità. . Sono grigi

$OD(\text{densità ottica}) = \log(1/T)$

T= trasmittanza, rapporto intensità trasmessa/intensità incidente.

Per filtri in parallelo, la somma delle T e la T totale.

Filtri colorati: fanno passare : long pass, short pass, band pass

si possono mettere insieme un LP e SP con overlap per fare un BP

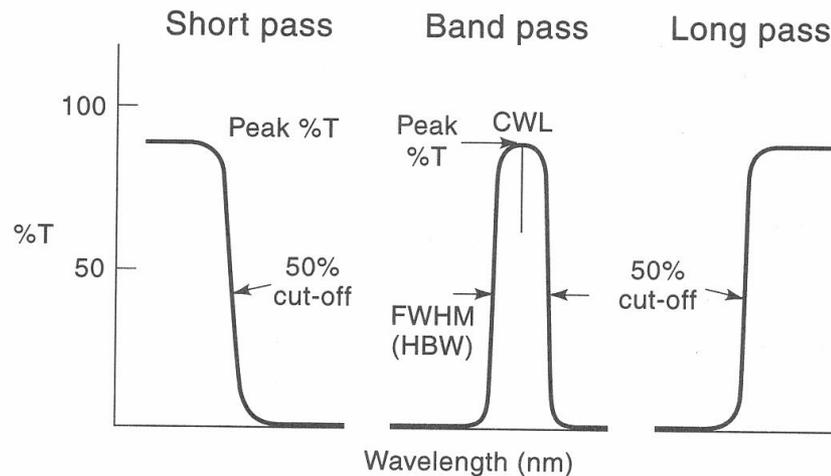


Figure 3-5

Filters for isolating the wavelength of illumination. Short-pass and long-pass filters, sometimes called edge filters, block or transmit wavelengths at specific cut-off wavelengths. Bandpass filters exhibit broadband or shortband transmission centered on a particular band of wavelengths. Filter performance is defined by the central wavelength (CWL) and by the full width at half maximum (FWHM). Another term for FWHM is halfbandwidth (HBW). A bandpass filter can also be created from two overlapping short-pass and long-pass filters.



Lampade per microscopia

ILLUMINATORS, FILTERS, AND THE ISOLATION OF SPECIFIC WAVELENGTHS

Incandescente: W e argon gas, costano poco .
Spettro continuo nel vis e ir, meno uv. Potenza
variabile. Tanta energia spreccata in forma
calore.

Ion arco 10-100 volte piu luminose del
incandescente , costoso, piu difficile da
alineare

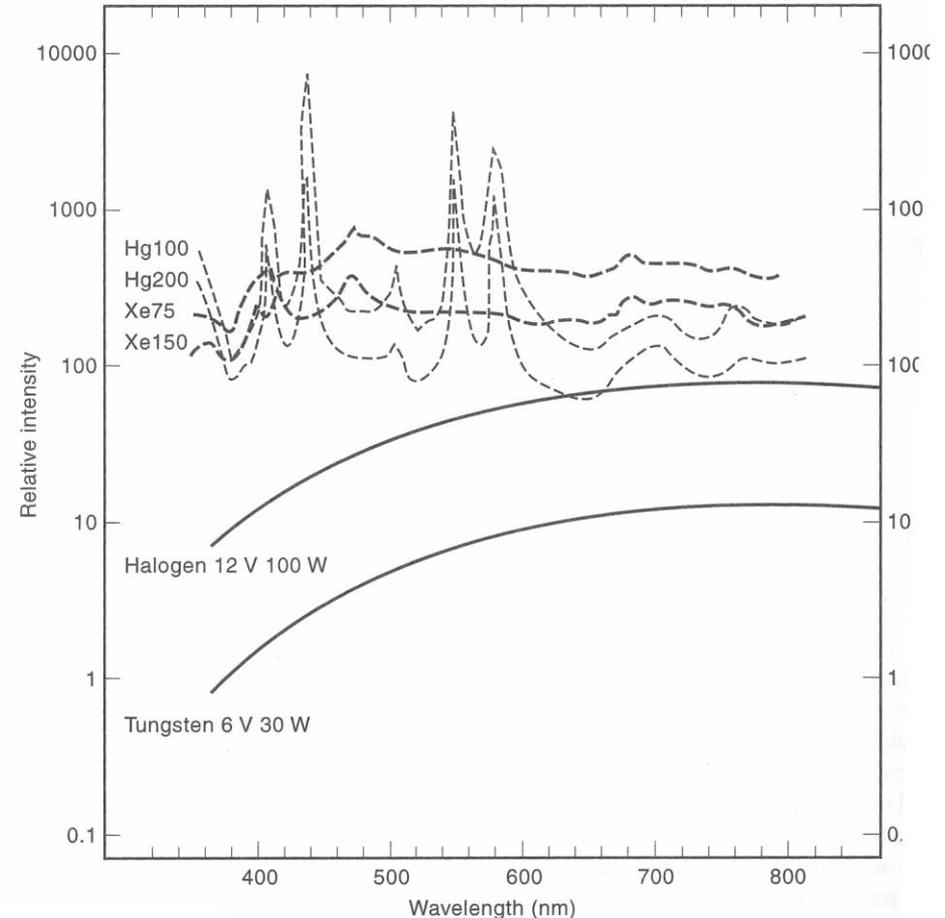
Spettro continuo nel uv, vis e ir. Biosgna
bloccare uv e ir per le cellule (esXe arco:
spettro continuo.)

Per bloccare uv (danno cellulare): filtro di
vetro

Per blocare ir (riscaldamento acqua): acqua, o
filro adatto

Potenza fissa

Hg arco:tante linee di emissione , 254, 366,
405, 435, 546 ecc. 546 verde piu usato per
cellule perche tessuto biologico assorbe meno
nel verde e giallo e piu nel blu





Laser: luce coerente, sia nel dominio del tempo che nello spazio

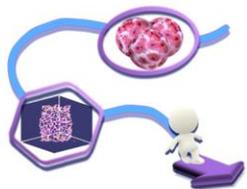
Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

Stimulated emission: Emissione di luce stimolata da un fotone ha la stessa λ , fase e direzione del fotone stesso

Spontaneous Emission: altri tipi di emissione, es. lampada incandescente, la generazione del fotone e' spontanea con una natura random.

Per poter emettere un fotone per emissione stimolata, l'atomo deve essere gia' in uno stato eccitato.

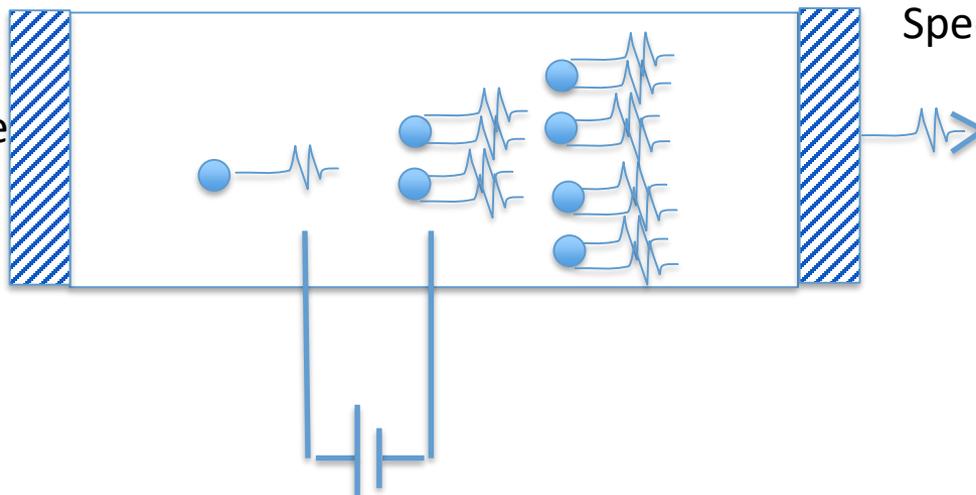
In un laser gli atomi vengono 'pompate' con energia per tenerli in uno stato eccitato (noto come **population inversion**). Serve anche una fonte di fotoni per iniziare la generazione di luce stimolata. Una volta iniziata, la luce continua ad essere generata per effetto amplificazione. Viene contenuta nel tubo del laser grazie a 2 specchi, di cui uno e' 99% riflettente, permettendo l'uscita di luce coerente.



I fotoni continuano a rimbalzare tra gli specchi



Specchio 100% riflettente



Specchio 99% riflettente

Scarica elettrica continua permette di mantenere la popolazione atomica in stato eccitato (Population inversion)

I laser originali erano di rubino, oggi li troviamo di vari tipi (gas, stato solido, liquido ecc) e varie λ .

I laser che si trovano in giro sono di HeNe. $\lambda=632.8$ nm, 1 mW. Se la potenza di un laser e' > di 1 mW non si puo' utilizzare senza occhiali protettivi.