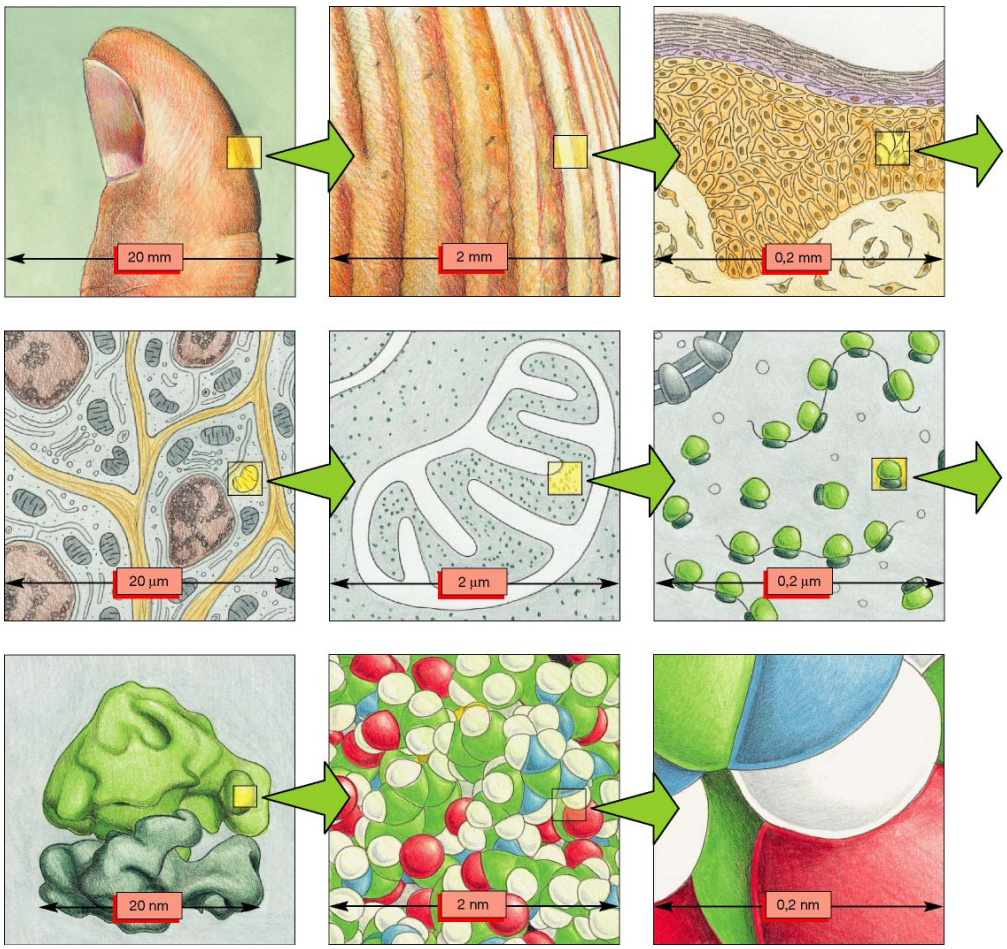
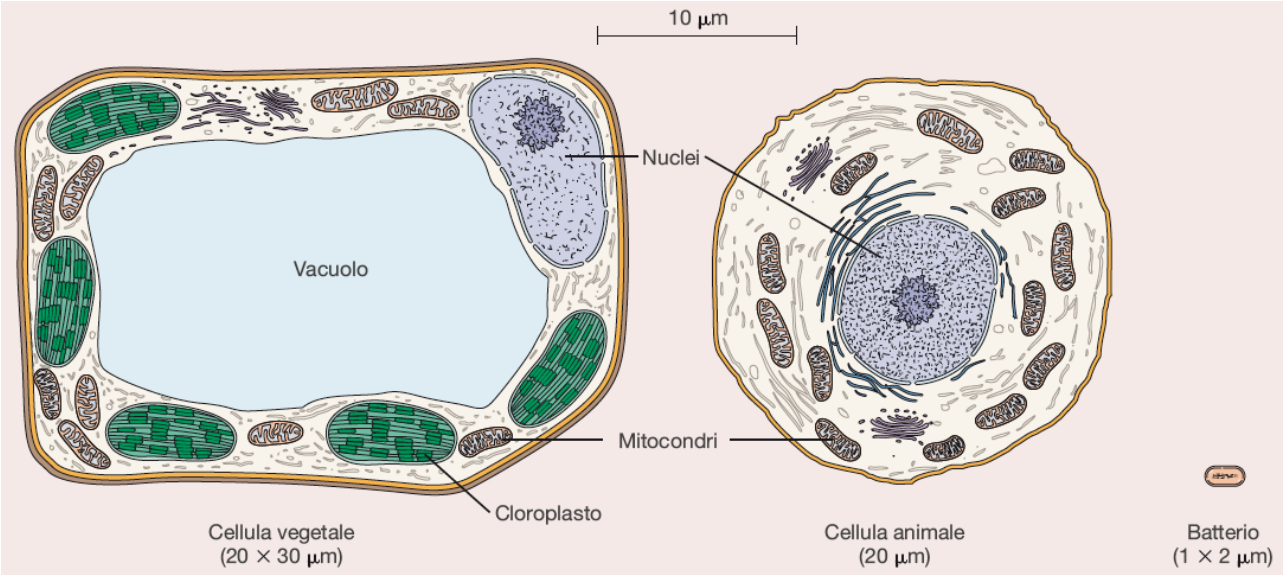

BIOLOGIA CELLULARE
2005
2000
1975
1950
1925
1900
1875
1850
1825
1600
Microscopia che utilizza la fluorescenza con trasferimento di energia (FRET) per studiare le interazioni molecolari
Viene utilizzata la spettrometria di massa per lo studio dei proteomi
Il genoma umano è stato sequenziato
La proteina fluorescente verde viene utilizzata per l'individuazione delle proteine funzionali nelle cellule viventi
Allen e Inoué ottimizzano la risoluzione video con il microscopio a contrasto
Vengono sviluppati i metodi per il sequenziamento del DNA
Berg, Boyer e Cohen mettono a punto le tecniche di clonaggio del DNA
Palade, Sjøstrand e Porter sviluppano le tecniche per la microscopia elettronica
Avery, MacLeod e McCarty dimostrano che il DNA è l'agente della trasformazione genica
Krebs descrive il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA)
Svedberg sviluppa l'ultracentrifuga
Embden e Meyerhof descrivono la glicolisi
I Buchner dimostrano la fermentazione usando estratti cellulari
Pasteur dimostra che l'esistenza degli organismi viventi dipende da specifici processi
Wöhler sintetizza l'urea in laboratorio
BIOCHIMICA
Viene descritto l'apparato del Golgi
Invenzione del microtomo
Sviluppo delle tecniche di colorazione
Virchow sostiene che ogni cellula deriva da un'altra cellula
Schleiden e Schwann formulano la teoria cellulare
Brown descrive i nuclei
Uso di quantum dots per migliorare la visualizzazione della fluorescenza
Sistema di due ibridi di lievito per analizzare le interazioni tra due proteine
Viene sviluppata la bioinformatica per l'analisi dei dati in sequenza
La microscopia stereoelettronica viene usata per ottenere immagini tridimensionali
Viene clonata la pecora Dolly
Vengono prodotti i primi animali transgenici
Heuser, Reese e i loro colleghi sviluppano tecniche basate sulla incisione profonda (*deep-etching technique*)
Viene decifrato il codice genetico
Kornberg scopre la DNA polimerasi
Watson e Crick propongono la struttura a doppia elica per il DNA
Hershey e Chase dimostrano che il DNA è il materiale genetico
Claude isola per la prima volta frazioni molecolari
Invenzione del microscopio elettronico
Levene postula che il DNA abbia una struttura tetranucleotidica ripetuta
Morgan e i suoi collaboratori sviluppano la genetica di *Drosophila*
Feulgen mette a punto una colorazione per il DNA
Viene formulata la teoria cromosomica dell'ereditarietà
Le leggi di Mendel vengono riscoperte da Correns, von Tschermak e de Vries
Roux e Weissman: sostengono che sono i cromosomi a portare l'informazione genetica
Flemming identifica i cromosomi
Miescher scopre il DNA
Mendel formula le sue leggi fondamentali della genetica
Kölliker descrive i mitocondri nelle cellule muscolari
GENETICA
Van Leeuwenhoek migliora le lenti ottiche
Hooke descrive le "cellule"
CITOLOGIA


20 mm
2 mm
0,2 mm
20 µm
2 µm
0,2 µm
20 nm
2 nm
0,2 nm


10 μm
Nuclei
Vacuolo
Mitocondri
Cloroplasto
Cellula vegetale
(20 × 30 μm)
Cellula animale
(20 μm)
Batterio
(1 × 2 μm)

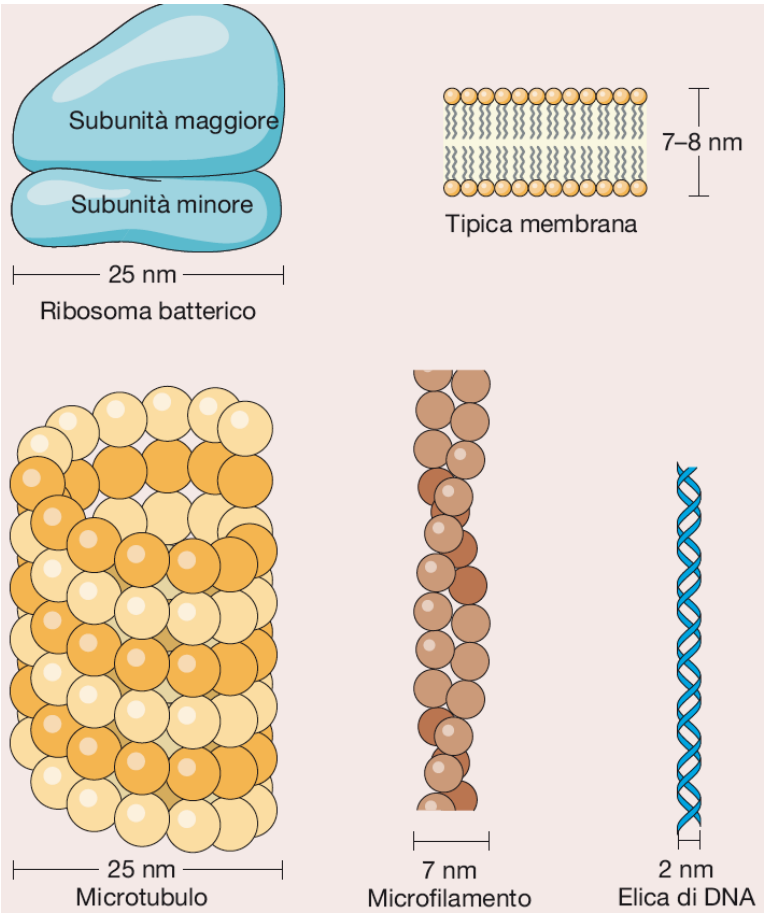
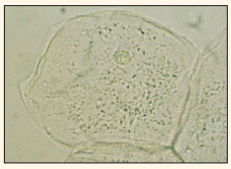
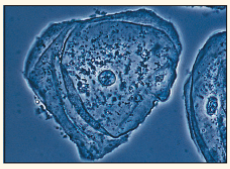
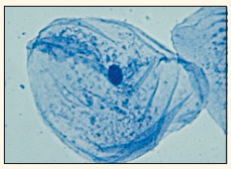
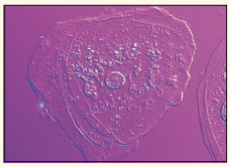
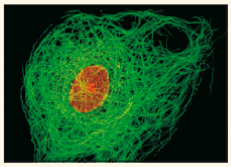
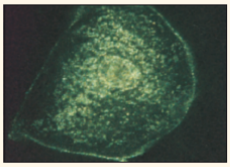
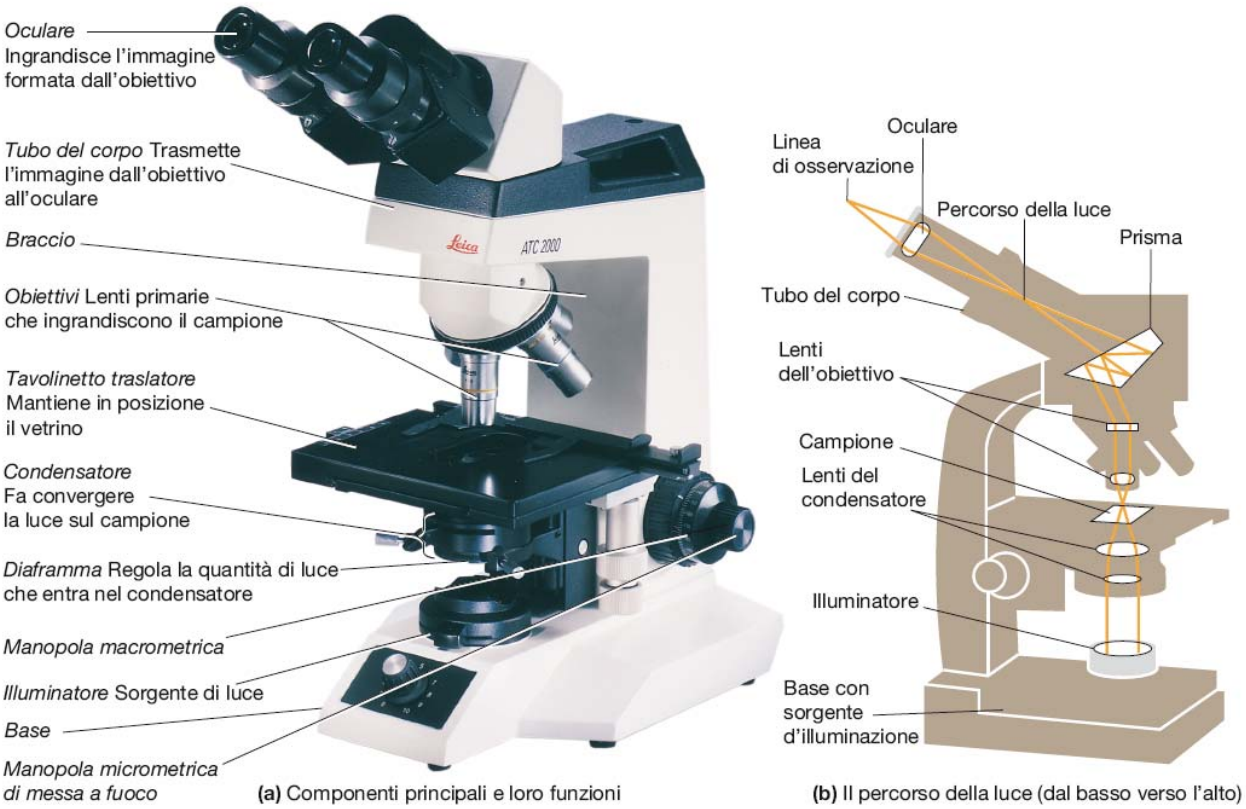

Subunità maggiore
Subunità minore
25 nm
Ribosoma batterico
7–8 nm
Tipica membrana
25 nm
Microtubulo
7 nm
Microfilamento
2 nm
Elica di DNA

TABELLA 1.1 Diversi tipi di microscopia ottica: un confronto

Tipo di microscopia	Fotografie al microscopio ottico di cellule dell'epitelio facciale umano		Tipo di microscopia
In campo luminoso (campione non colorato): la luce passa direttamente attraverso il campione; a meno che la cellula non sia pigmentata naturalmente o colorata artificialmente, l'immagine presenta uno scarso contrasto.			**Contrasto di fase:** intensifica il contrasto nelle cellule non colorate amplificando le differenze dell'indice di rifrazione all'interno del campione; particolarmente utile per l'osservazione di cellule viventi non pigmentate.
In campo luminoso (campione colorato): la colorazione con varie sostanze intensifica il contrasto, ma quasi tutte le procedure di colorazione richiedono che le cellule siano fissate (preservate).			**Contrasto interferenziale:** utilizza anche modifiche ottiche per esasperare le differenze dell'indice di rifrazione.
A fluorescenza: Mostra la localizzazione di specifiche molecole all'interno della cellula. Le sostanze fluorescenti assorbono le radiazioni ultraviolette ed emettono luce visibile. Le molecole fluorescenti possono essere presenti naturalmente nel campione, ma più spesso si generano marcando le molecole di interesse con coloranti o anticorpi fluorescenti.		 50 μm	**Confocale:** utilizza laser e sistemi ottici particolari per focalizzare il fascio di illuminazione su un unico piano all'interno del campione. Si ottengono soltanto le immagini delle regioni all'interno di un ristretto intervallo di profondità rispetto al piano focalizzato. Le regioni al di sopra e al di sotto del piano selezionato appaiono scure.

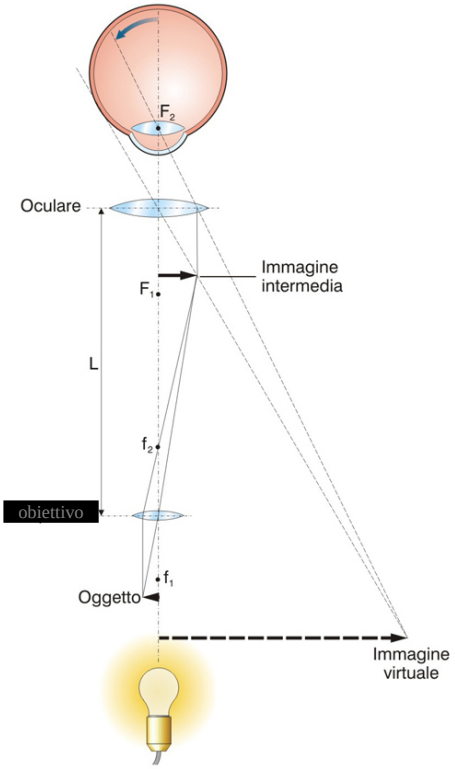
Fonte: Campbell e Reece, *Biology*, 6th ed. (San Francisco: Benjamin Cummings, 2002), pag. 110.

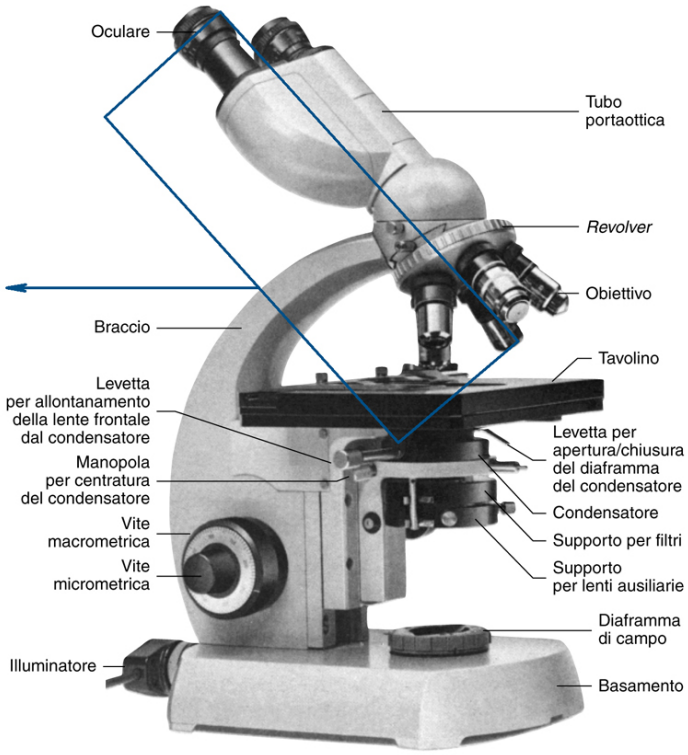


(a) Componenti principali e loro funzioni

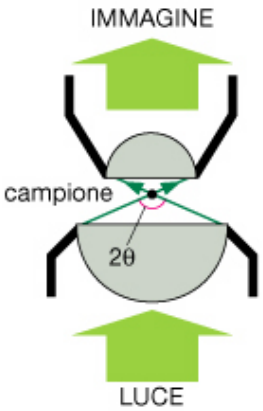
(b) Il percorso della luce (dal basso verso l'alto)

Formazione immagine





LENTI



l'obiettivo raccoglie un cono di raggi luminosi per creare un'immagine

il condensatore mette a fuoco un cono di raggi luminosi su ciascun punto del campione

RISOLUZIONE: il potere di risoluzione del microscopio dipende dalla larghezza del cono di illuminazione e perciò sia dal condensatore che dall'obiettivo. Si calcola usando la formula

$$\text{risoluzione} = \frac{0{,}61\ \lambda}{n \text{ sen } \theta}$$

in cui:

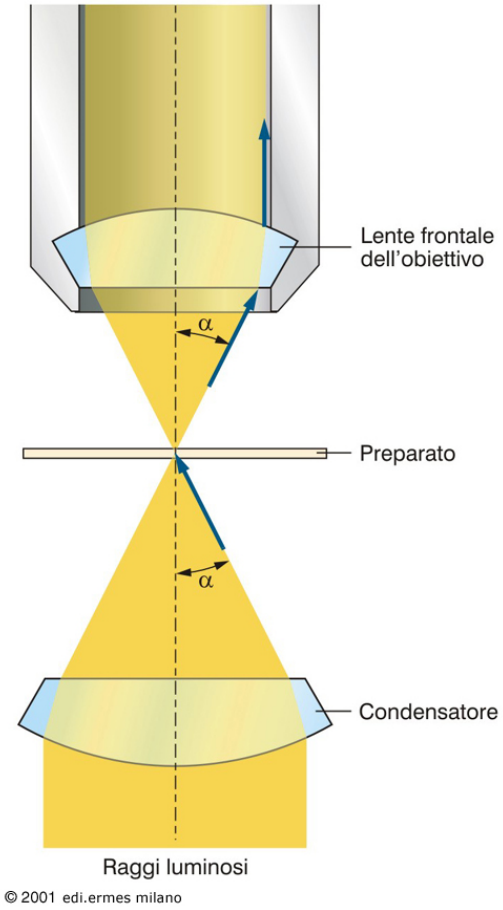
θ = metà della larghezza angolare del cono di raggi raccolti dall'obiettivo da un punto tipico del campione (poiché la larghezza massima è 180°, sen θ ha un valore massimo di 1)

n = l'indice di rifrazione del mezzo (in genere aria o olio) che separa il campione dall'obiettivo e dal condensatore

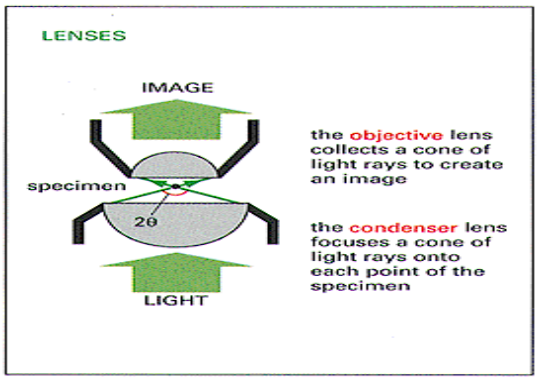
λ = la lunghezza d'onda della luce usata (per la luce bianca si assume comunemente un valore di 0,53 μm)

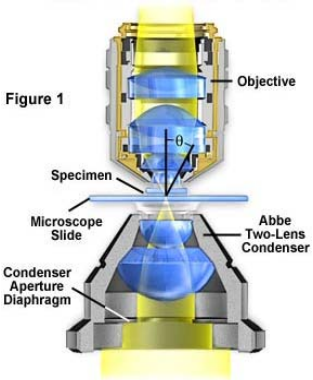
APERTURA NUMERICA: *n* sen θ
nell'equazione riportata sopra si chiama apertura numerica della lente (NA) ed è una funzione della sua capacità di raccogliere luce. Per lenti a aria non può essere superiore a 1, ma per lenti a immersione in olio può raggiungere 1,4.

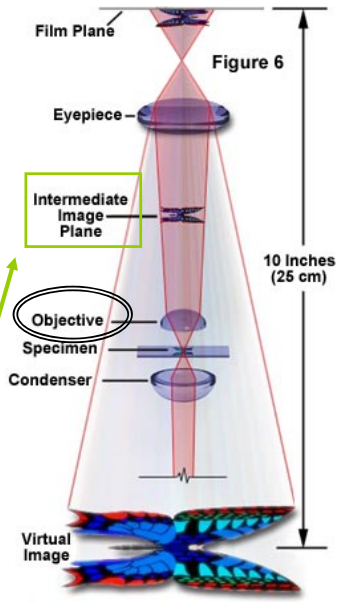
Più alta è l'apertura numerica, maggiore è la risoluzione e più brillante è l'immagine (la brillantezza è importante nella microscopia a fluorescenza). Tuttavia, questo vantaggio si ottiene a spese di distanze di lavoro molto corte e con una profondità di campo molto piccola.



Objective Lens







1- Light from either an external or internal source is first passed through the **substage condenser**, which forms a well-defined light cone that is concentrated onto the object (**specimen**).

2- Light passes through the specimen and into the objective which then projects a **real, inverted, and magnified image of the specimen** to a fixed plane within the microscope that is termed the **intermediate** image plane (Fig 6).

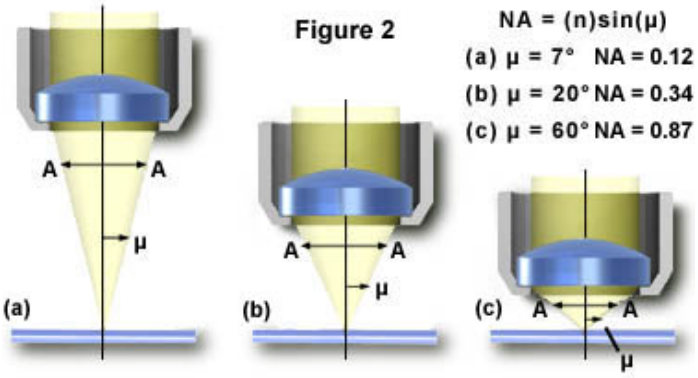
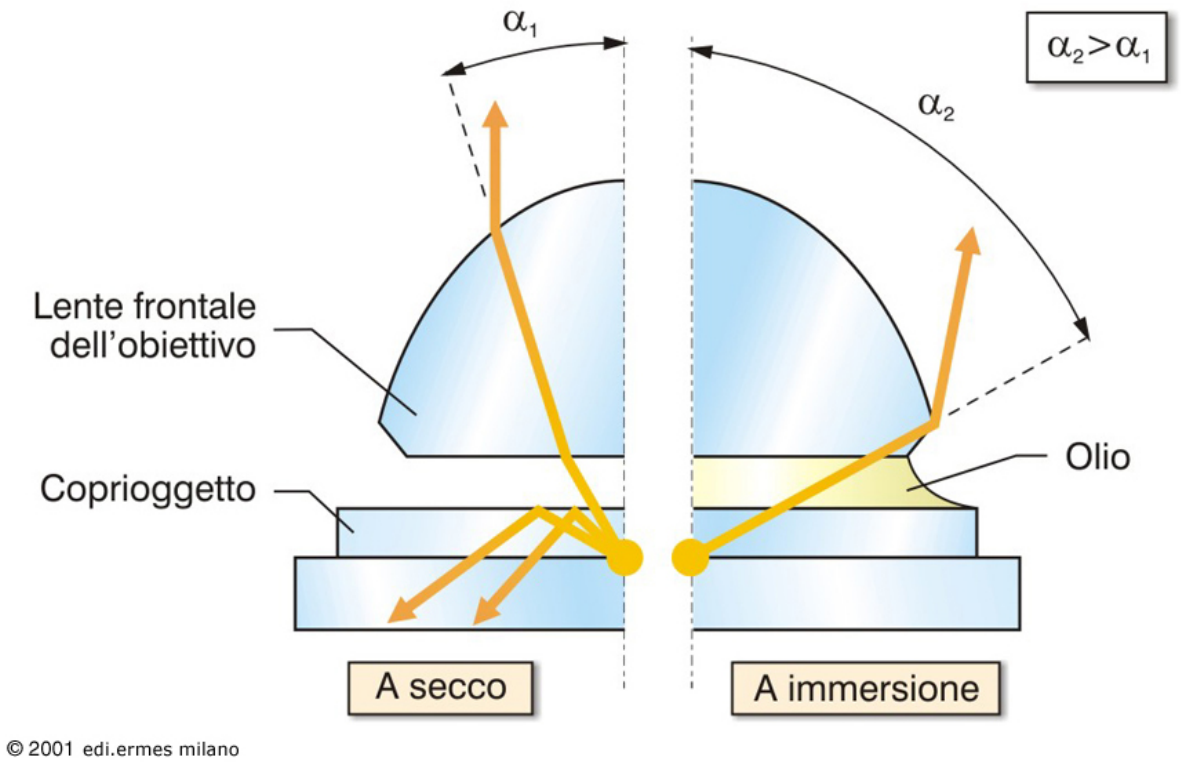


Fig 2 illustrates a series of light cones derived from objectives of varying focal length and numerical aperture. As the light cones change, the angle μ increases from 7° in Fig 2(a) to 60° in Fig 2(c), with a resulting increase in the NA from 0.12 to 0.87, nearing the limit when air is the imaging medium.

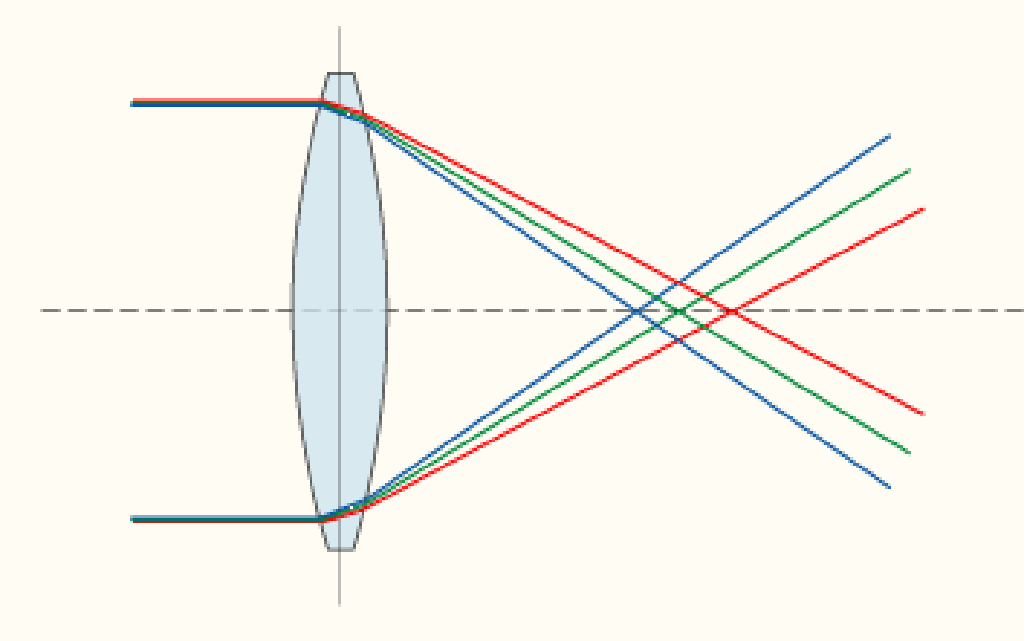
Objective Numerical Apertures

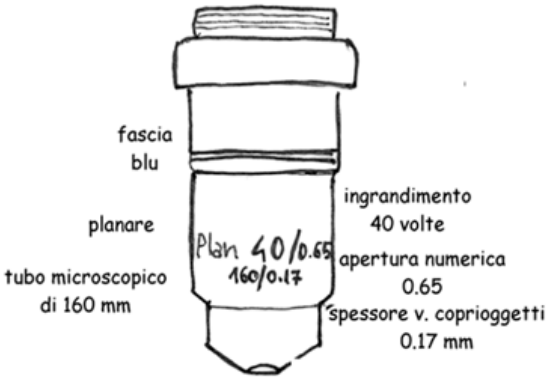
Magnification	Plan Achromat (NA)	Plan Fluorite (NA)	Plan Apochromat (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	n/a	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (oil)	n/a	1.30	1.00
60x	0.75	0.85	0.95
60x (oil)	n/a	n/a	1.40
100x (oil)	1.25	1.30	1.40
150x	n/a	n/a	0.90

The NA of an objective is also dependent upon the amount of correction for optical aberration



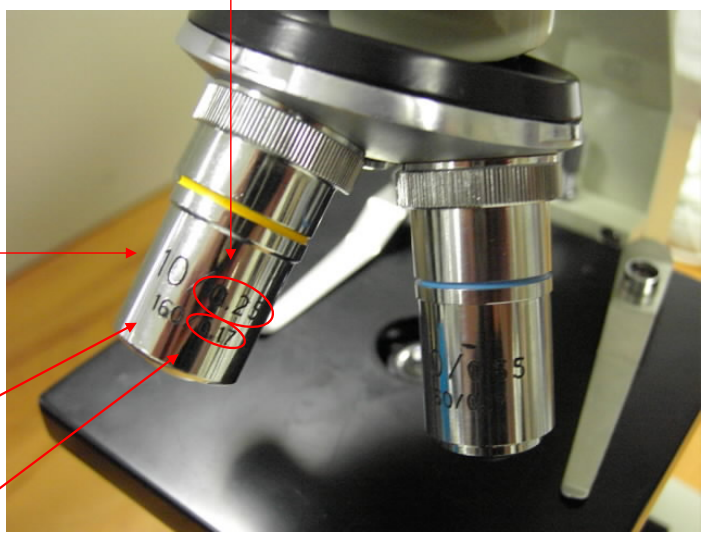
Aberrazione cromatica





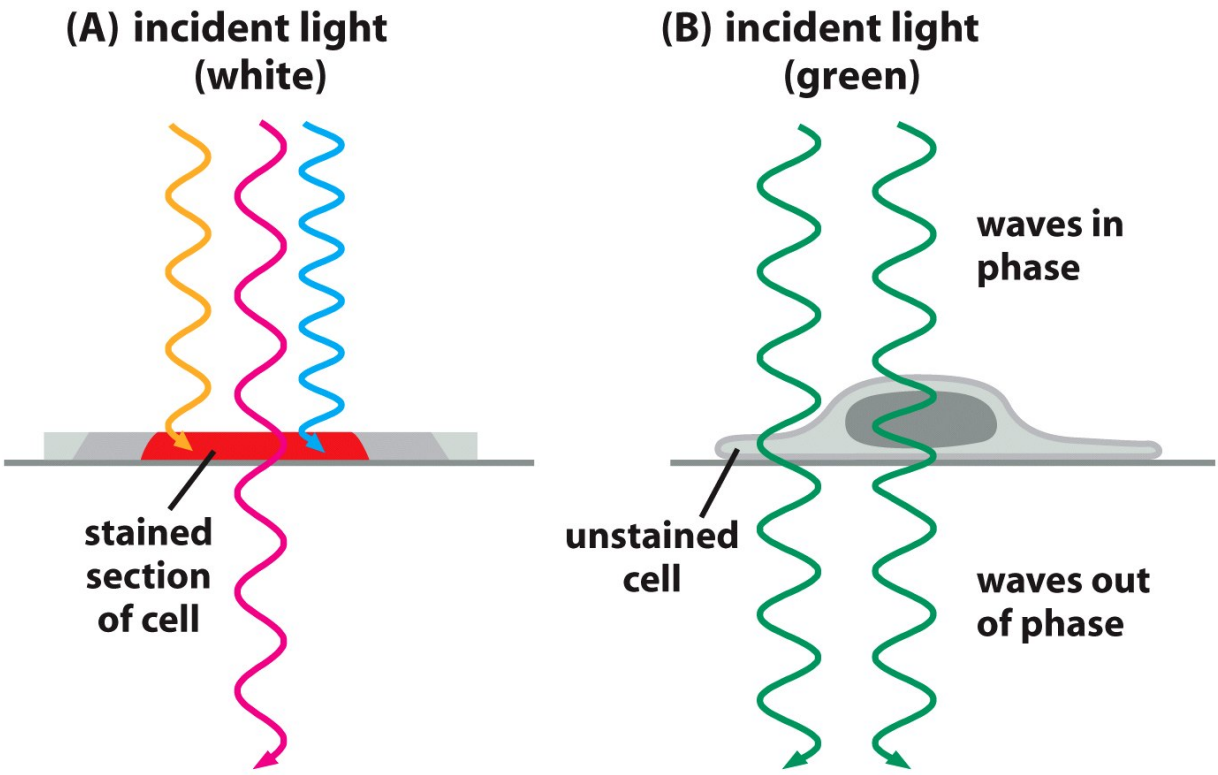
Apertura Numerica
(determina il potere di risoluzione dell'obiettivo)

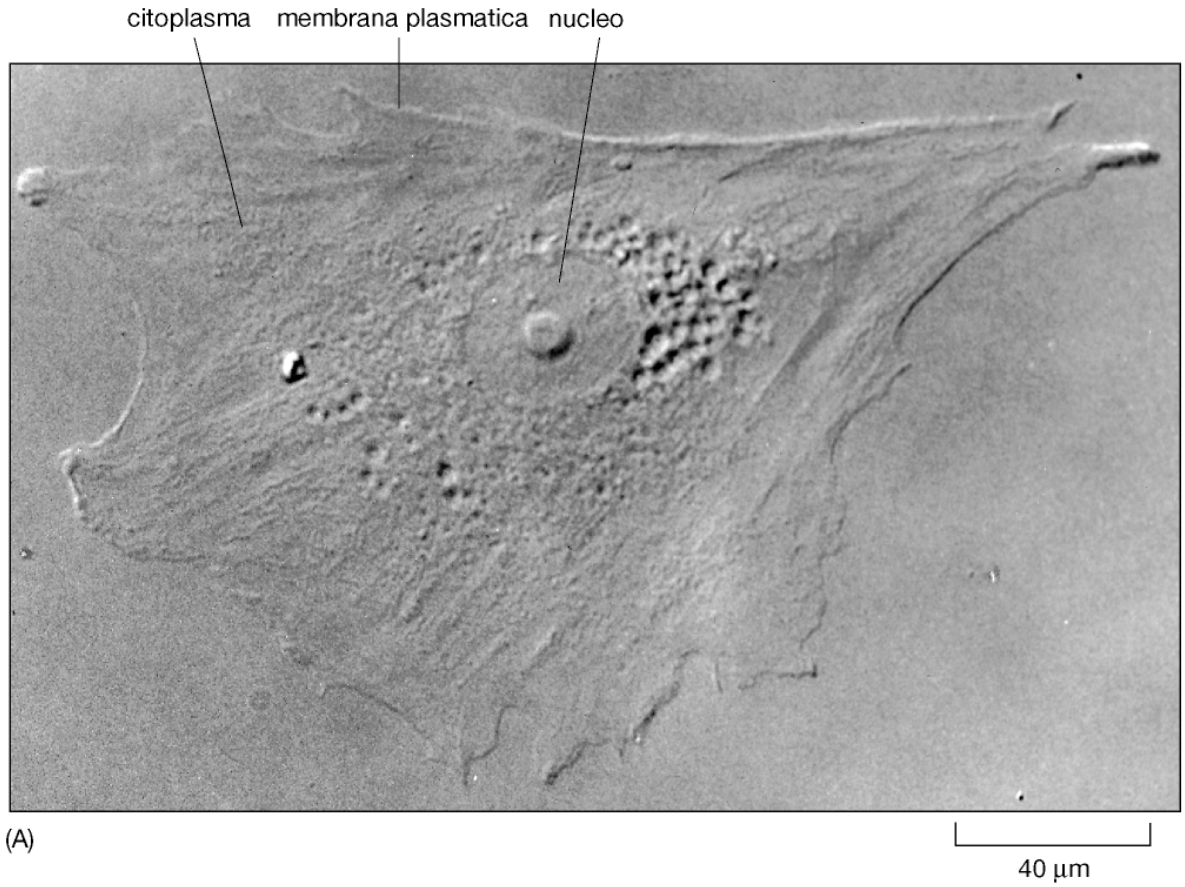
Rapporto dell'ingrandimento



Obiettivo adatto ad un tubo oculare lungo 160 mm

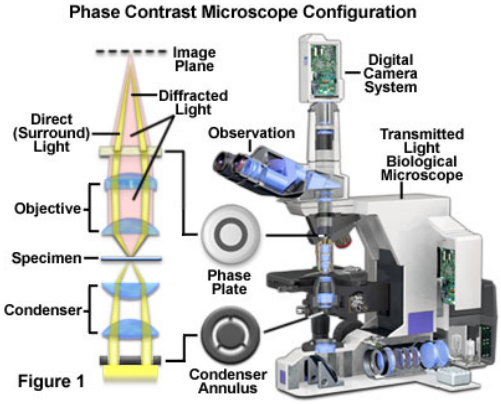
Spessore max del vetrino coprioggetto da usare


(A) incident light
(white)
stained
section
of cell
(B) incident light
(green)
waves in
phase
unstained
cell
waves out
of phase


citoplasma
membrana plasmatica
nucleo
(A)
40 µm

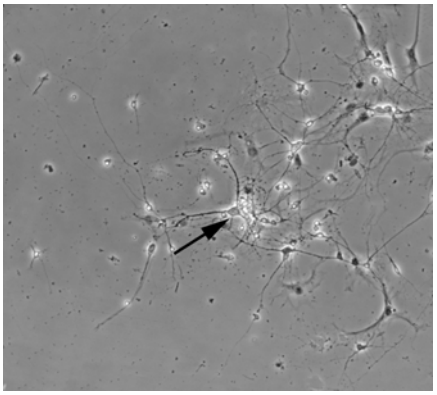
Phase contrast

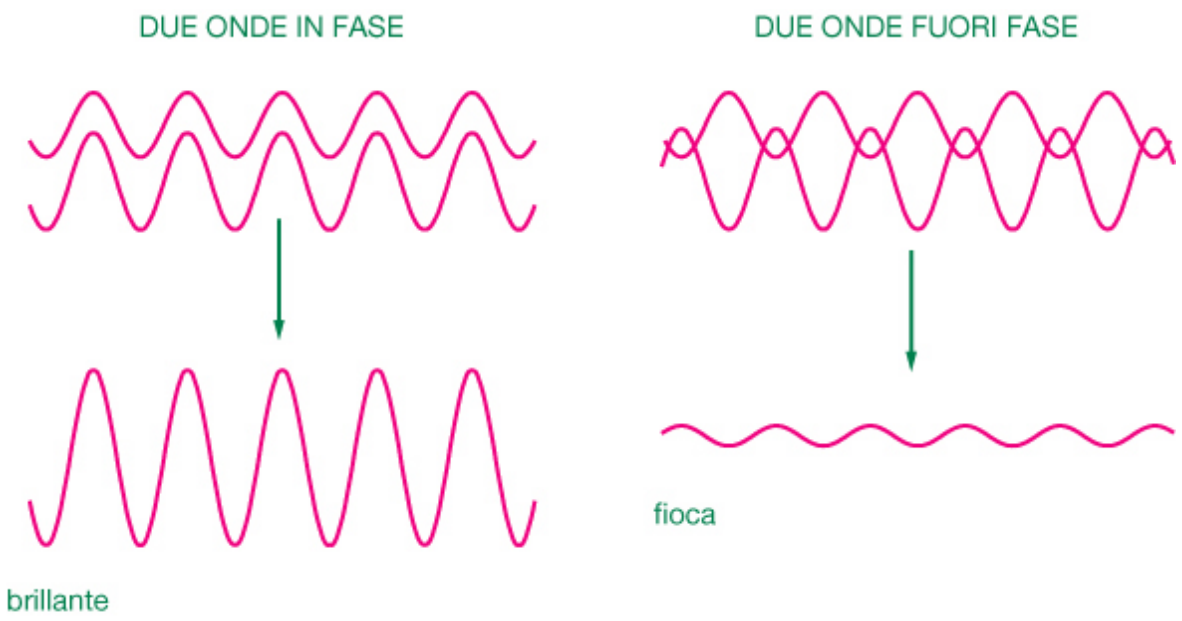
Fritz Zernike developed Phase Contrast
in the 1930s and received the Nobel prize in 1953
for the invention.



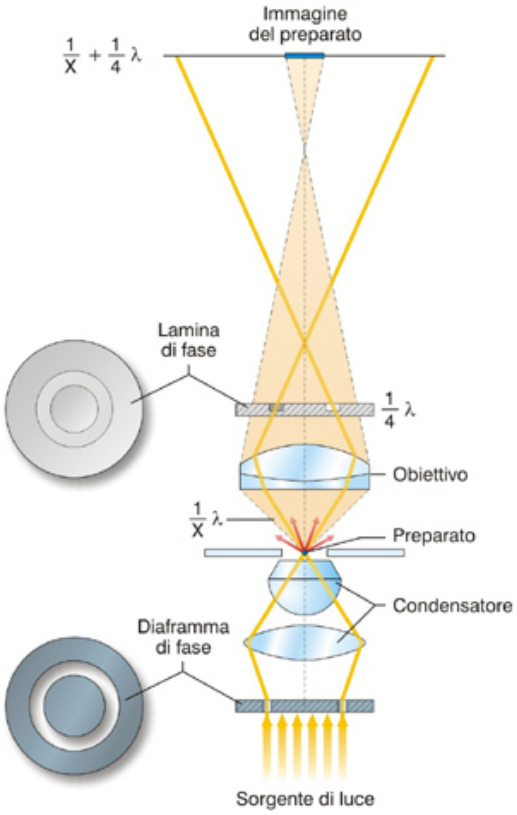
Is a contrast-enhancing optical technique that can be utilized to produce high-contrast images of transparent specimens such as living cells, microorganisms, thin tissue slices, and sub-cellular particles (such as nuclei and other organelles).

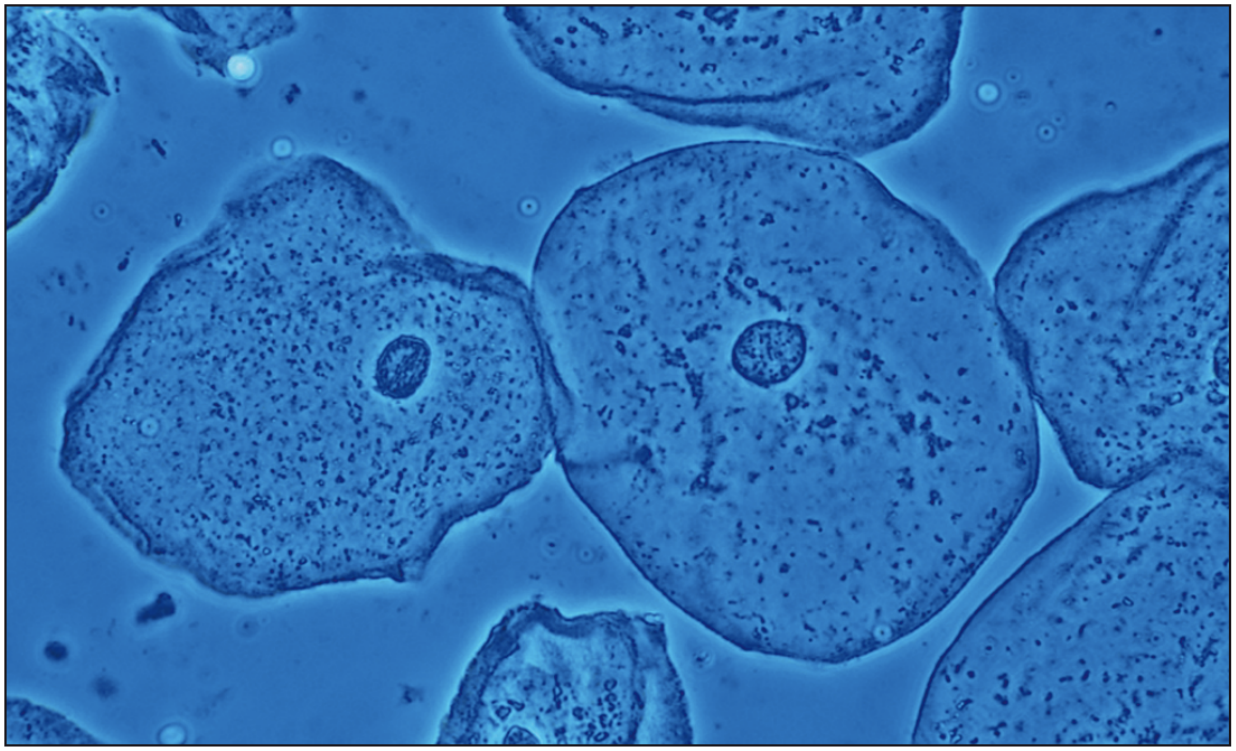
One of the major advantages of phase contrast microscopy is that living cells can be examined in their natural state without being killed, fixed, and stained.
As a result, the dynamics of ongoing biological processes in live cells can be observed and recorded in high contrast with sharp clarity of minute specimen detail.





Microscopio a contrasto di fase

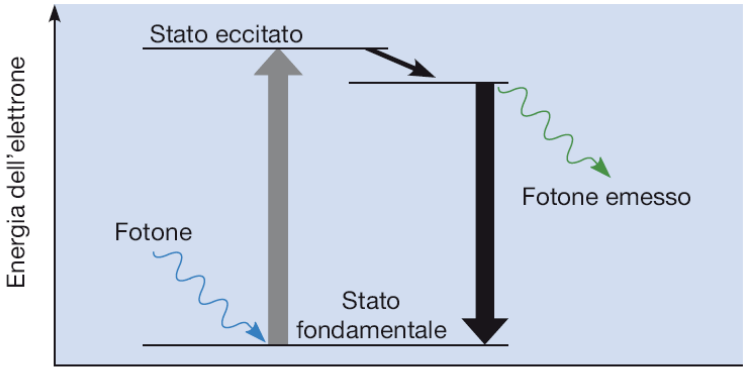




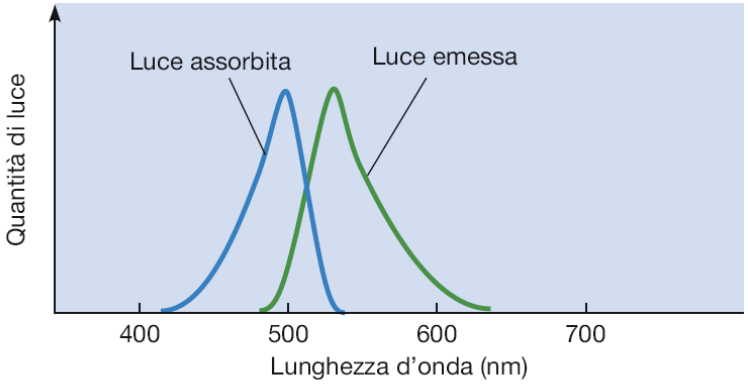
50 μm

Microscopio rovesciato

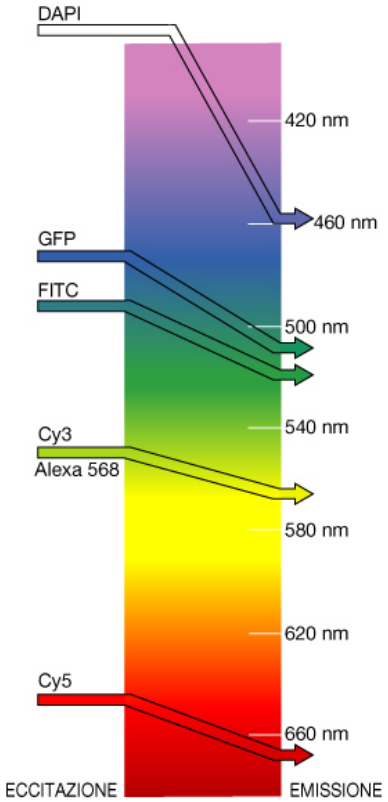
Fluorescenza



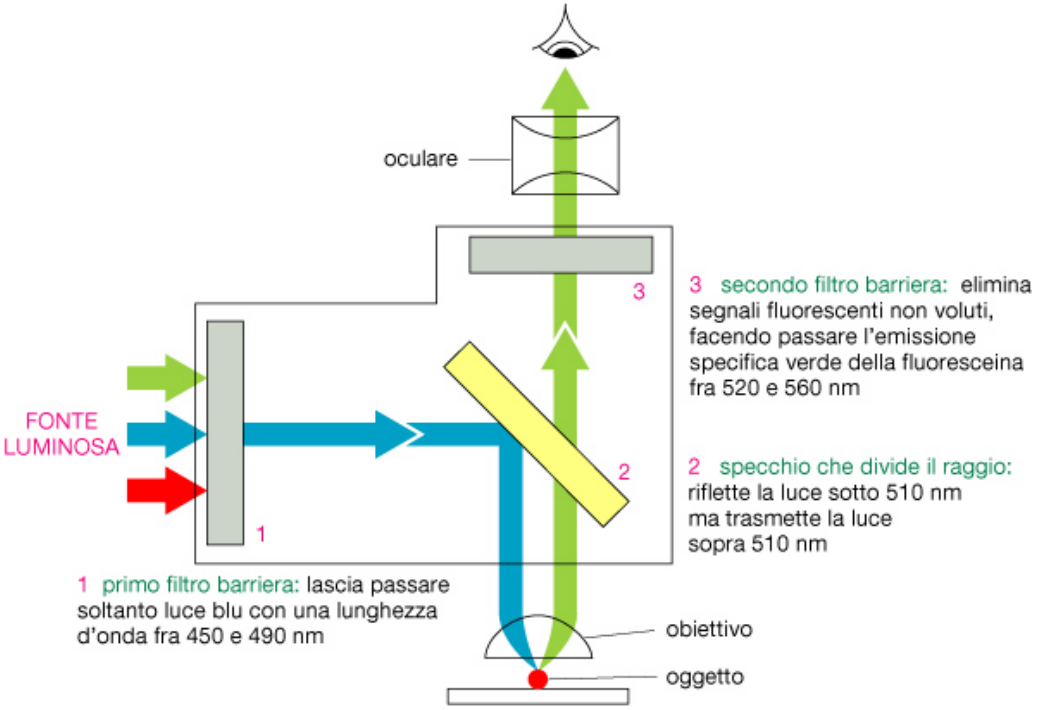
(a) Grafico dell'energia

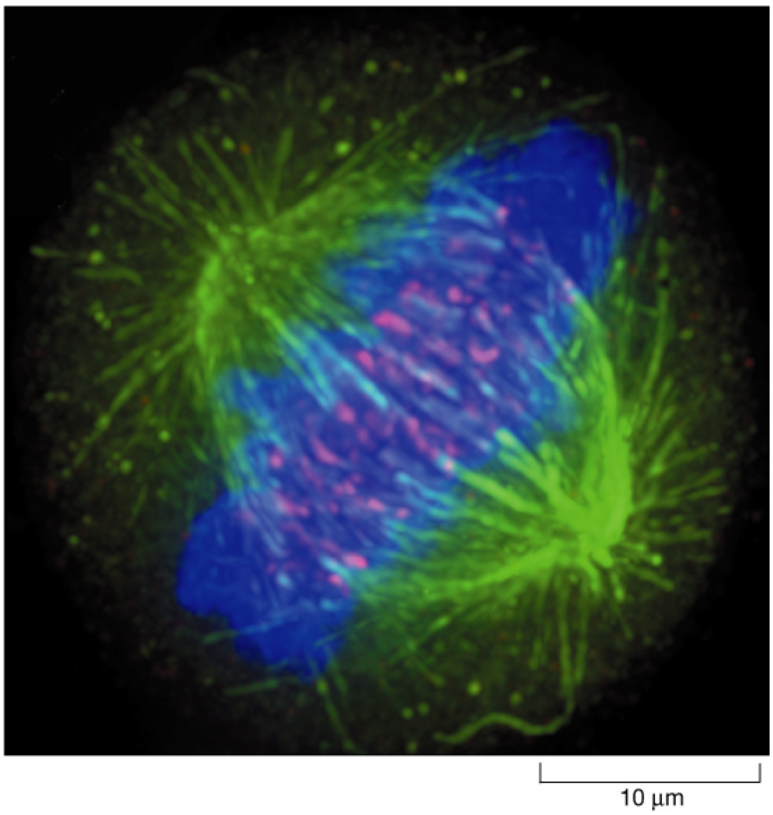


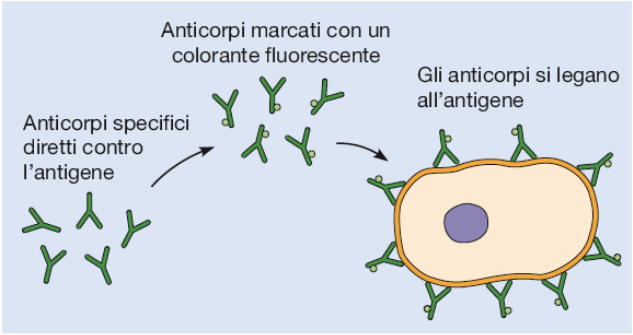
(b) Spettri di assorbimento e di emissione



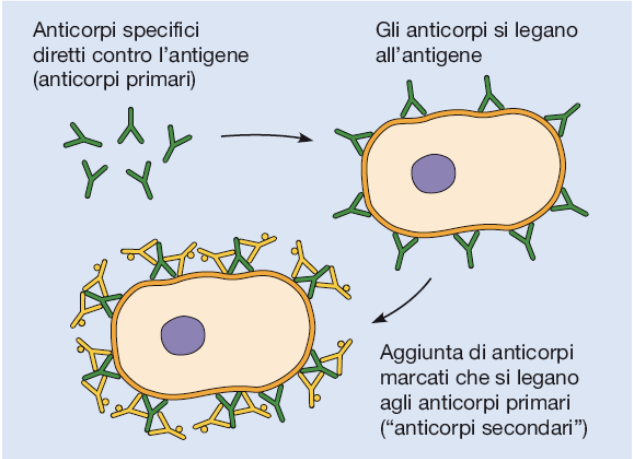
Microscopio a fluorescenza



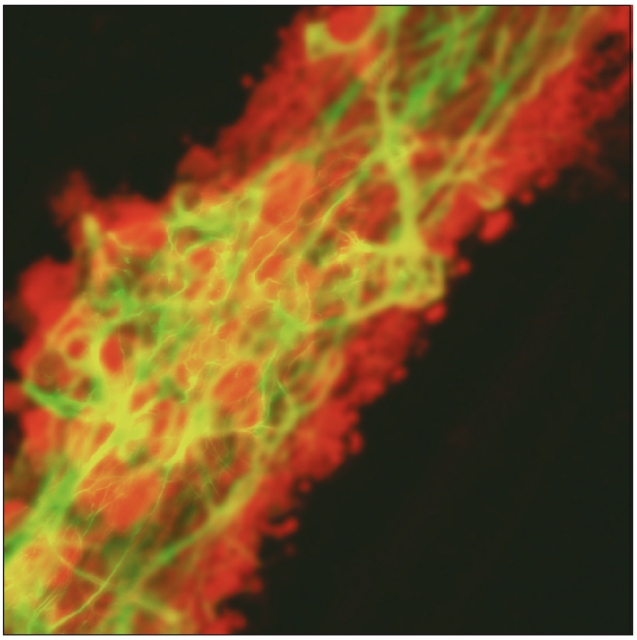




(a) Immunofluorescenza

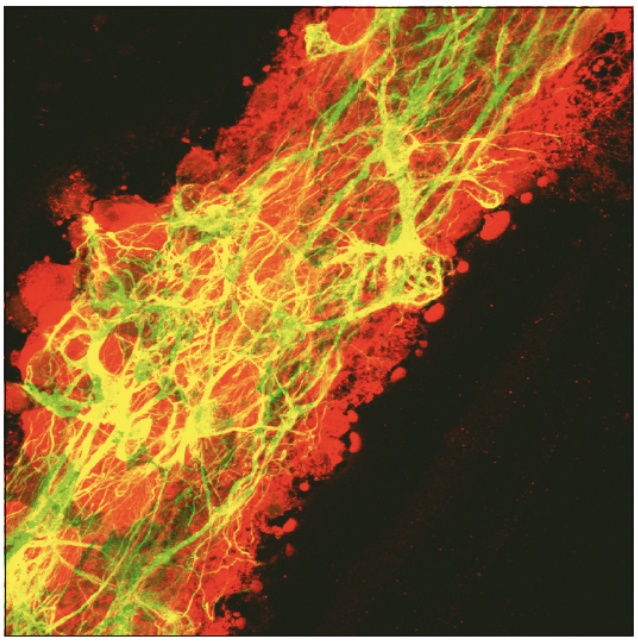


(b) Immunofluorescenza indiretta



(a) Microscopia a fluorescenza tradizionale

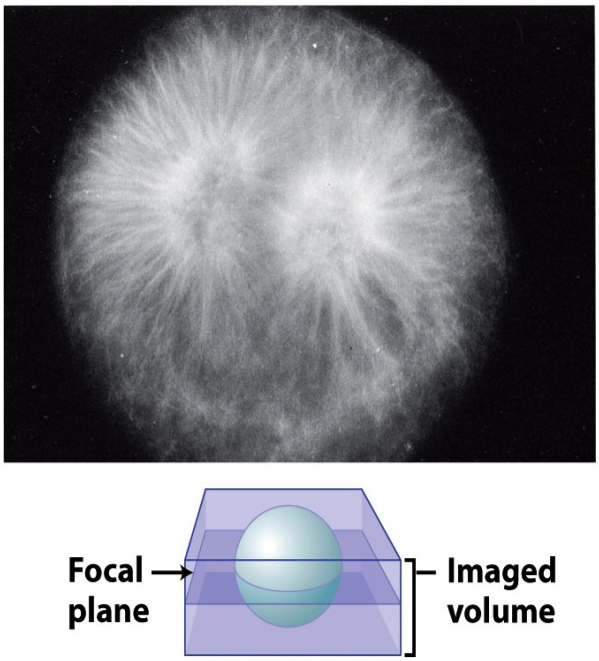
25 μm



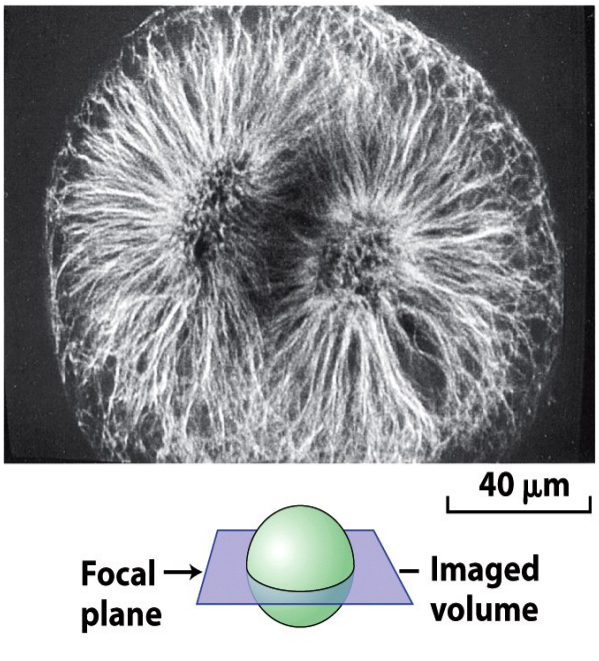
(b) Microscopia a fluorescenza confocale

25 μm

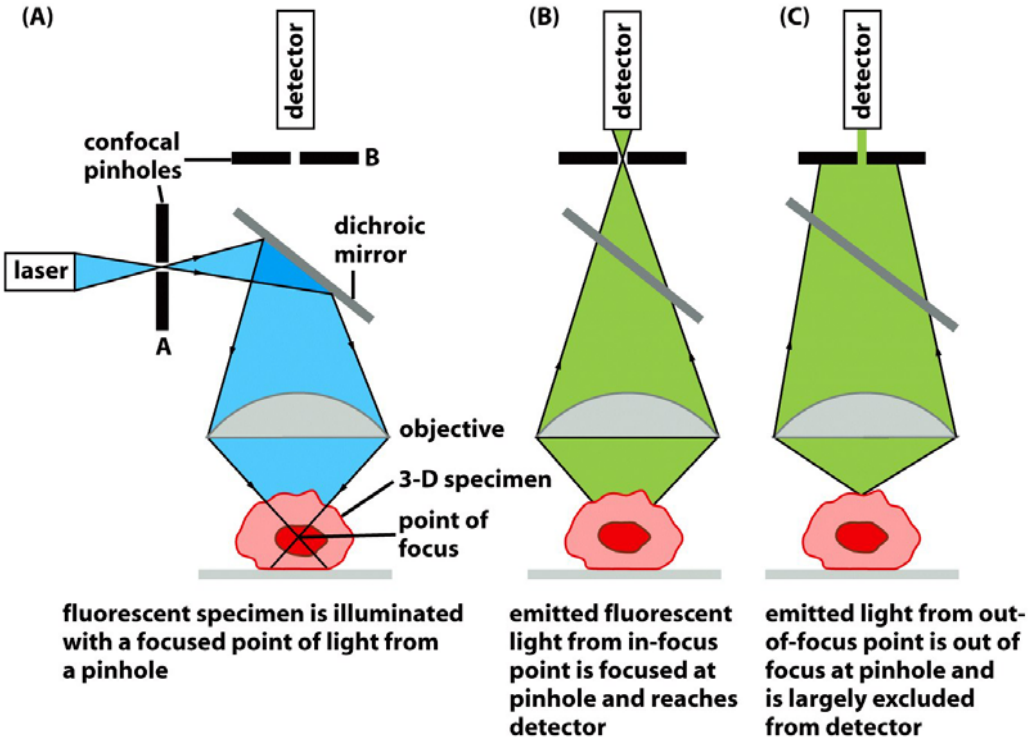
(a) Conventional fluorescence microscopy

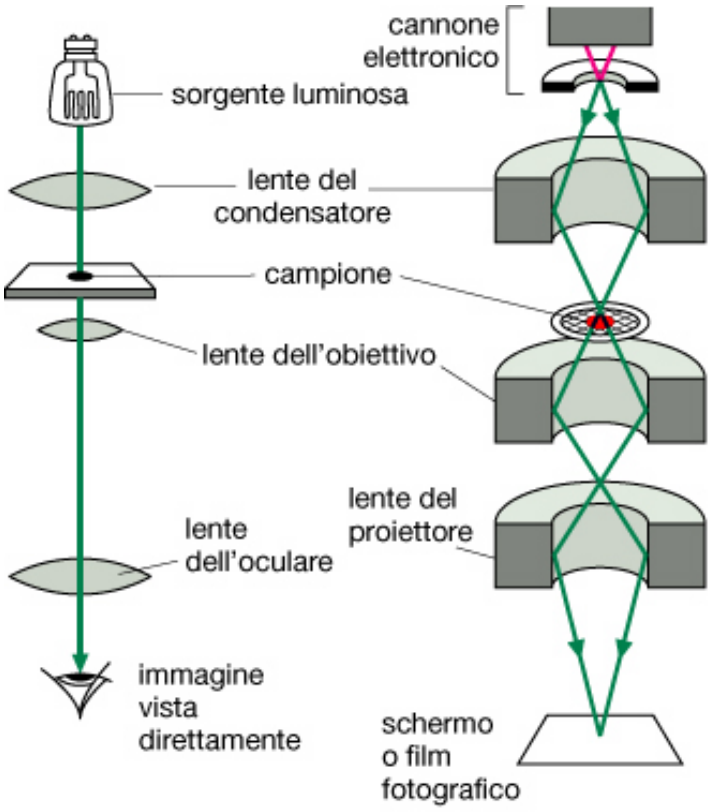


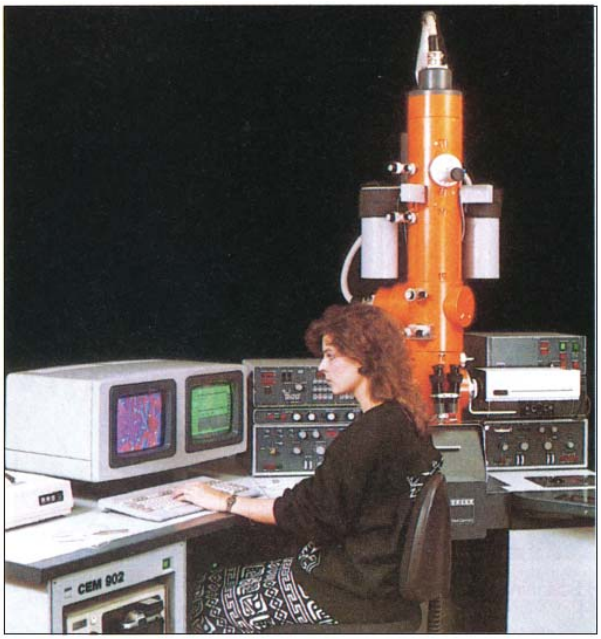
(b) Confocal fluorescence microscopy



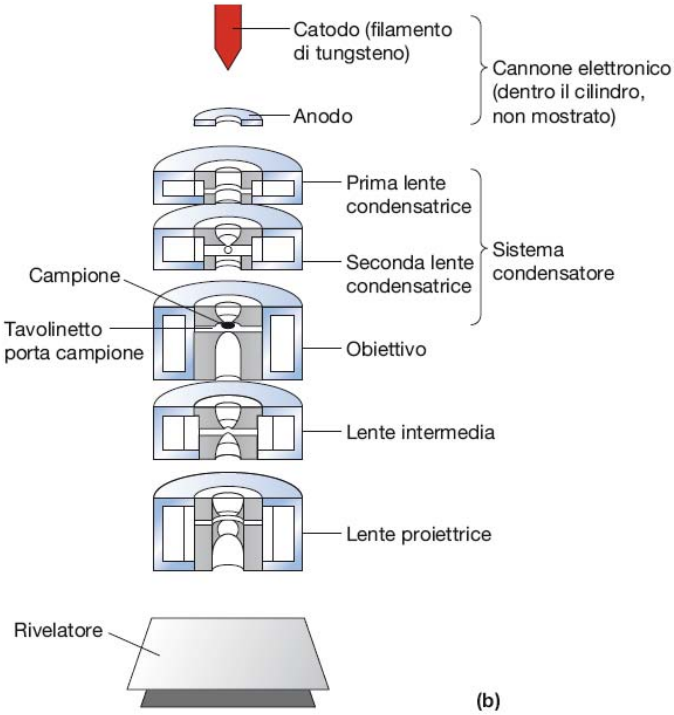
Microscopio confocale



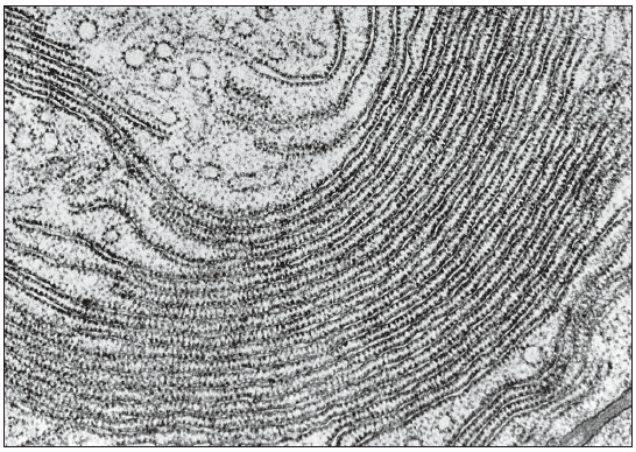




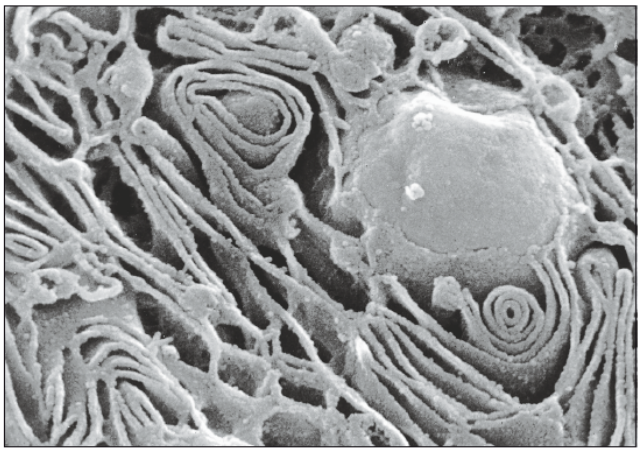
(a)



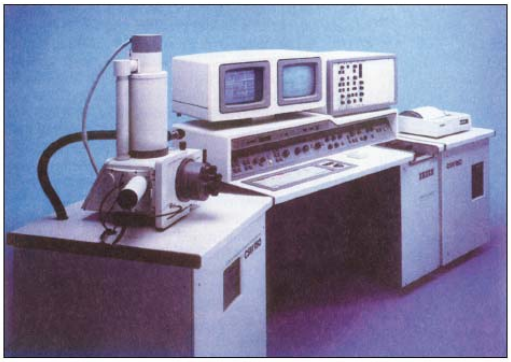
(b)



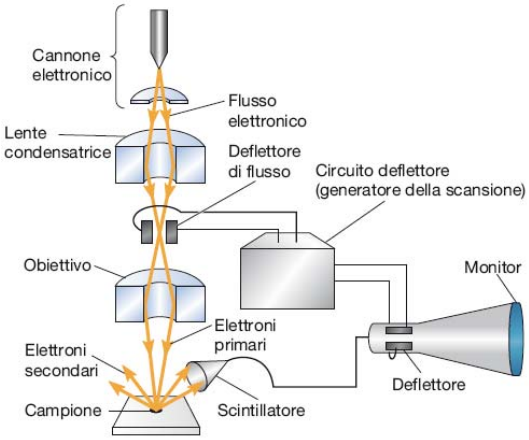
(a) Micrografia elettronica a trasmissione 0,5 μm



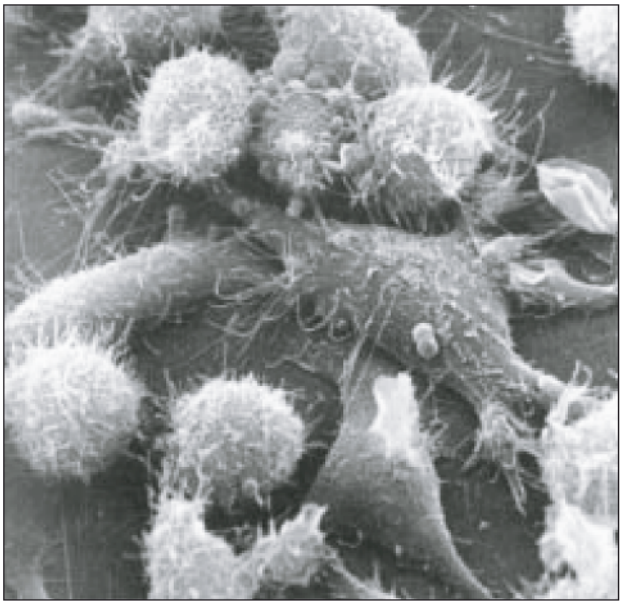
(b) Micrografia elettronica a scansione 1 μm



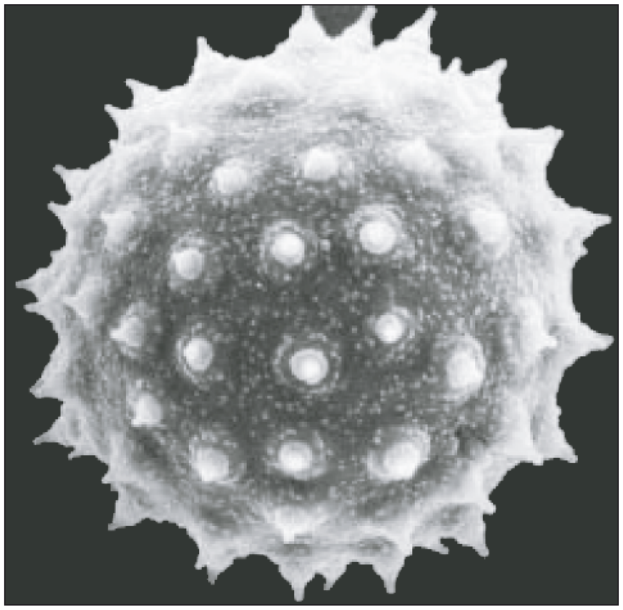
(a)



(b)



(a) Cellule umane di neuroblastoma 50 μm



(b) Granulo di polline 10 μm

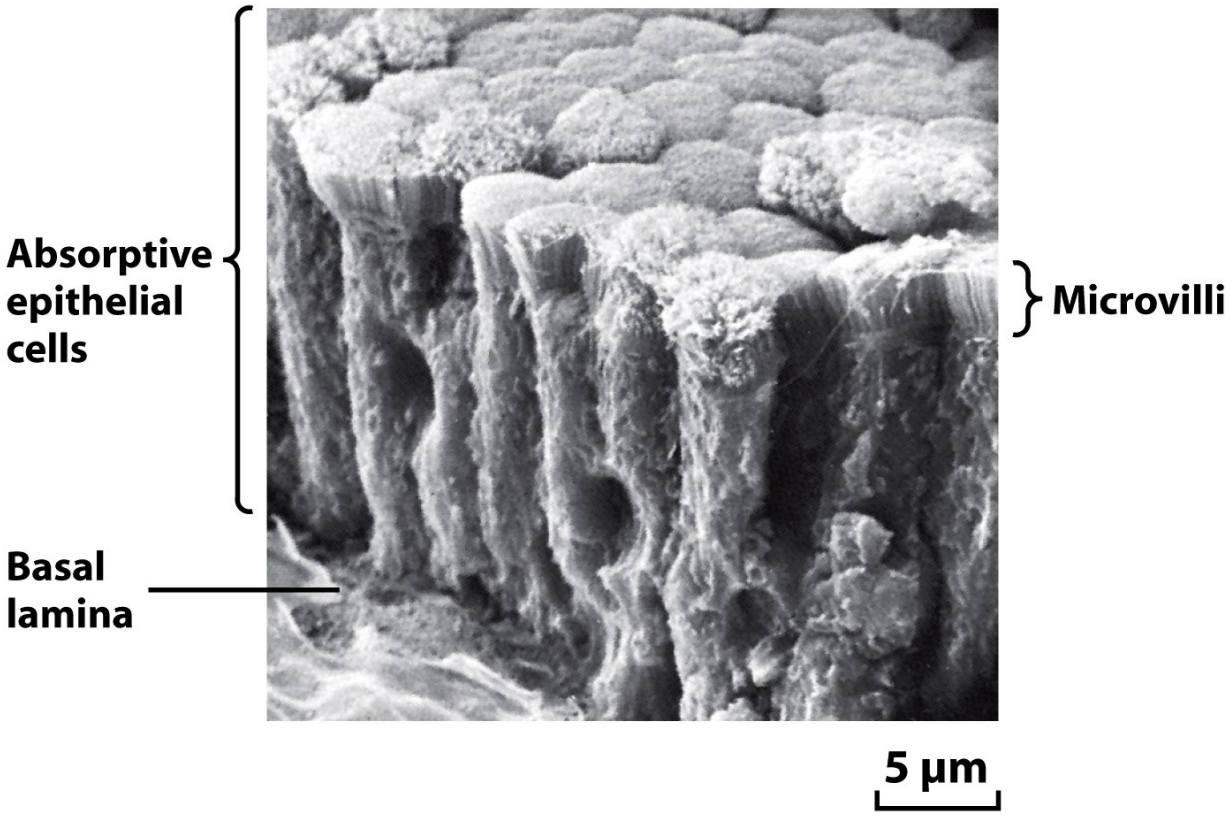


Figure 9-24
Molecular Cell Biology, Sixth Edition