

OINARRIAK ETA INSTRUMENTAZIOA MIKROSKOPIAN

Begiak mugatuta daude, izan ere, soilik argi ikuskorren espektruan dauden egiturak edo erreakzioak ikusi ditzazkete. Beraz, espektro horretatik kanpo daudenak begi hutsez ikustea ezinezkoa da. Gainera, gure begiek bereizmen mugatua dute, 1mm baino txikiagoak diren egiturak ikustea ezinezkoa baitzaigu. Hori dela eta, gure bereizmenetik kanpo dauden egiturak ikusi ahal izateko gailu bereziak erabili behar ditugu: mikroskopioak.

- Bereizmena objektu bi, bi bezala ikus genitzakeen banapen-distantziarik laburrena da (minimoa). Bi puntu bi puntu bezala ikusteko ahalmena da.
 - Bi objektuen arteko distantzia zenbat eta txikiagoa izan biak bereiztea zailagoa da; eta distantzia zenbat eta handiagoa izan, bi objektu bezala ikusteko bereizmena handiagoa da.

Mikroskopioen bidez ez dira egiturak handiagotzen, egitura horiek banatzeko bereizmena handitzen da, hau da, lagina gerturatzeko dute (behatzailearen eta objektuaren arteko distantzia "murrizten" dute, ikuspuntu lekua aldatzen dute). Egiturak ikusteko distantzia hori zenbat eta gehiago handitu, mikroskopioaren bereizmena handiagoa izango da.

1. BEREIZMENA

Mikroskopio batek eskaintzen duen bereizmena ondorengo faktoreen menpekoa da, hauek dira bereizmena muga dezaketen faktoreak:

1. Objektuaren eta argi-uhinaren elkarrekintzak.
2. Objektutik objektibora doan argi difraktatuaren anplitudea.
 - Eskuratzeko argi kopuruaren menpe.
3. Lente mota eta kalitatea.

1.1 OBJETUAREN ETA ARGIAREN ARTEKO ELKARREKINTZAK

Objektuaren eta argiaren arteko elkarrekintzen ondorioari difrakzioa deritzo eta honen ondorioz, objektua ikuskor bihurtzen da.

- Difracción: Fenómeno por el cual se produce una desviación de los rayos luminosos cuando pasan por un cuerpo opaco o por una abertura de diámetro menor o igual que la longitud de onda.

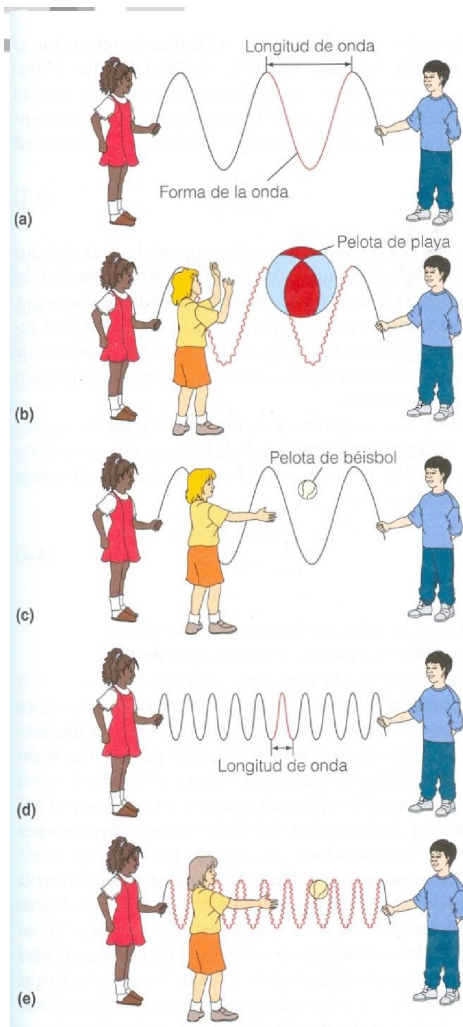
Aipatu beharra dago argiak uhin eta partikula modura jokatzeko ahalmena duela eta argi ikuskorra hainbat uhin luzeerratan banatzen dela. Hala, argiak uhin luzera zehatz batean bibratzen badu, uhin luzera horrekiko handiak diren objektuak difraktatuko ditu, hau da,

argiaren argi-uhinek objektuarekin elkarrekintzak izango dituzte objektua uhin luzera baino handiago bada. Beraz, uhin luzera horrekiko txikiak diren objektuekin ez da interakziorik egongo (argia ez dutelako difraktatuko) eta objektuak detektaezinak (bereiztezinak) izango dira. Hori dela eta, objektu txikiek argia difraktatu ditzaten argi-uhinen uhin luzera txikitu beharko da maiztasuna handituz.

- Soilik uhin-luzerarekiko handiak diren objektuak difraktatuko dituzte argi-uhinak.

Uhin luzera baino handiagoak diren egiturak honekin interakzionatuko dute.

Handia bada objektua sokan jo eta bibrazioa sortuko da. Bibrazioak aldaketa eragingo du eta interakzioa sortuko da. Nahikoa handia da interakzioa bat sortzeko. Baina pilota txiki bat pasatzen bada sokarekin interakzionatzeko aukerak askoz txikiagoak dira. Posiblea da interakziorik ez egotea. Beraz, uhin luzerarekiko oso txikia bada ez da interakziorik egongo eta ez da aldaketa detektatuko. Tennis pilota detektatzeko uhin luzera txikiagoa behar da (maiztasun handiagoa). Arazoa da gure begiak uhin luzera zehatz batean ikusten dutela, horrekiko txikiak diren partikulak ezin dira ikusi, ondorioz hor dago muga fisikoa.



Uhin luzera txikiagoa bereizmena handitu eta handiagoa bereizmena txikitu.

Gure begiek uhin luzera zehatz bateko argia difraktatzen duten objektuak ikus ditzakete soilik. Hortaz, gure ikusmena mugatuta dago eta tamaina jakin bat baino txikiagoak diren objektuak ikusteazina dira gisa-begiarentzat. Uhin luzera handitzean bereizmena txikitu egiten da eta aldiz, uhin luzera txikiagotzean bereizmena handitzen da. Ondorioz, argia bereizmenaren mugatzailea da.

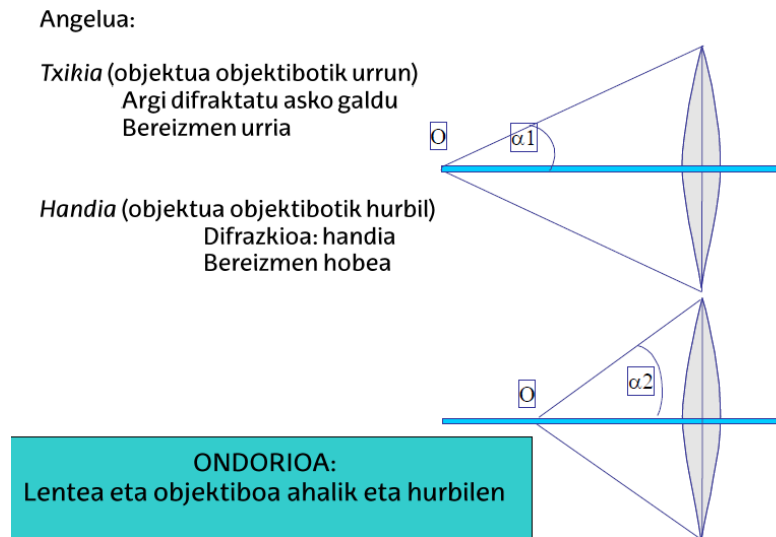
1.2 ESKURATUTAKO ARGIA KOPURUA

Lagineko elementuak bereizteko unean argiaren anplitudeak edo jasotako argi kopuruak ere garrantzi handia du.

Irudi onak lortzeko ezinbestekoa da laginak ahalik eta argi gehien eskuratzea. Iturritik ateratzen den argi guztia eskuratuz gero,

bereizmen optimoa izango da baina, bidean galtzen bada, ikusgarritasuna mugatu egiten da. Beraz, objektiboa urrun badago bereizmen txikiagoa lortuko dugu argia galdu egiten delako, hori dela eta, lentea eta objektiboa ahalik eta hurbilen egotea komeni da.

Objetuaren eta objektiboaren arteko angelua aztertuz bereizmena aztertu dezakegu:



1.3 ERABILITAKO LENTEAK

Normalean argi mikroskopio baten bitartez lortzen dugun bereizmen minimoa ABBe-ren formularen bitartez determinatuta dago. Abbe-ren ekuazioak lentearen erresoluzioa, uhin luzearearen, irekidura angelua eta errefrakzio indizearen arabera dela adierazten du.

- r erresoluzioa (bereizmena) izanik, hau da, bi puntuen artean dagoen distantzia minimoa.
 - Errefrakzio indizea (n): airearen errefrakzio indizea batekoa da.
 - Irekidura angelua: α
- $$r = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$
- Mikroskopiotik datorren argi guztia eskuratuz gero eta lenteak perfektuak badira 240 nm-koa da bereiz daitekeen distantzia. Minimoa gutxi gora behera 240nm da.
 - Definizioz, erresoluzioa bi punturen artean dagoen distantzia minimoa da.
 - Beraz, bi objektu 240nm baino distantzia gutxiagora badaude ezin dira bereizi aipatutako kasurako.

Zenbait mikroskopioetan immertsio olio erabiltzen da, honen errefrakzio indizea 1,5 izanik, erresoluzio maila txikitzen delako. Olioaren errefrakzio indizea airearena baino handiagoa denez, distantzia minimoa 160nm-ra jaisten da. Beraz, erresoluzioa handituz distantzia txikiagora dauden elementuak bereizi ahal dira, bereizmena hobetuko da.

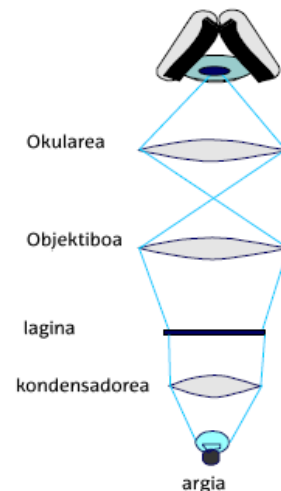
2. TEKNIKA EZBERDINEN FUNTZIONAMENDUA

Mikroskopioan lagina ikusteko homogeneouski eta intentsitate kontrolatu batean argiztatu behar da.

- Kondentsadoreak argia laginera enfokatzen du (argia laginaren gainean fokatzen du) ahal den homogeneousitasun handienarekin. Kondentsadorea irekiz, argiaren kantitatea murrizten da λ handiko izpiak (α angelu handiko izpiak) ezabatzen baititu. Aldiz, kondentsadorea itxiz, irekidura txikiarekin, kontraste altua eta distira baxua lortzen da.

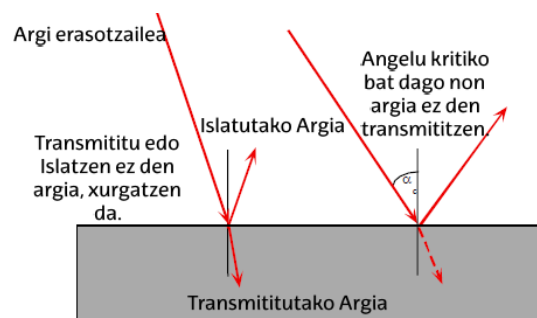
Batzuetan argiztapen bereziak erabiltzen dira. Hauen argi luzera txikiagoa da eta beraz objektu txikiagoekin interakziona dezake (bereizmen gehiago). Gainera, distira handiko argiak erabiltzen dira eta kaltegarriak izan ahal dira begiak erretzen direlako.

- Adibideak: karbonozko arkua (ez-egonkor), merkuriozko lanpara (oso arriskutsua da eztanda egin dezakeelako), xenonezko lanpara (monokromatikoa)...



Laginera jaurtitzen den argi erasotzaileak bide ezberdinak har ditzake:

- Lagina zeharka dezake (transmititutako argia).
- Errebotatu dezake (islatutako argia).
- Xurgatu daiteke (transmititu edo islatzen ez den argia, xurgatutako argia).



Hala ere, argi erasotzailea oso inklinatuta badoa ez da izpirik transmititzen. Angelu kritiko deitzen zaio puntu horri. Iluminazio sistemaren arabera:

2.1 EREMU ARGIA

Argia laginera heltzen denean, argiaren zati bat islatu egiten da, beste bat xurgatu eta beste bat berriz transmititu egiten da (lagina zeharkatuz). Teknikaren arabera, islatutako edo xurgatutako argiarekin lan egiten da. Mikroskopia konbentzionaletan transmititutako argiak (lagina zeharkatzen duen argiak) eskaintzen digu informazioa (laginean zehar nahikoa argi pasatzen baldin bada). Lagina nahiko fina izanez gero, ebakia tindatuta egon arren, argiak lagina zeharka dezake eta lagina ikusgarri egiten du. Bestela, lagina oso potoloa baldin bada argiak ez du zeharkatzen eta ez da ezer ikusiko. Lagina ikusteko teknika horiek eremu argiko mikroskopia osatzen dute.

- Ebaki arruntak aztertzeke erabiltzen da, tindaturiko edo pigmentudun laginak aztertzeke.
 - Adb: Nerbioak zilar nitrato proteinekiko afinitatea aurkezten du.

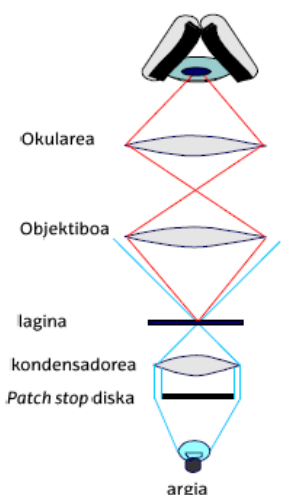
2.2 EREMU ILUNA

Teknika hau ez da hain erabilia baina argiztapen modu hau hainbat mikroskopiaok bertan dakarte. Objektuan zehar eta inguruan doan argia blokeatzen du eta soilik ertzetako izpiek jotzen dute lagina eta objektuetatik igorritako argia soilik helduz begietara. Beraz, laginean zehar transmititutako argia galtzen da eta soilik dispertsatutako argia heltzen da.

Patch stop izeneko diskak lanparatik irteten den argiaren parterik handiena blokeatzen du. Beraz, printzipioz ez da ia ezer ikusten, baina kondentsadoreak modu oso zeharkako batean jotzen duen argia laginean fokatzen du.

Mikroskopia teknika honetan, irudia lortzeko dispertsatutako fotoiak erabiltzen dira eta argia laginaren gainean enfokatzen da. Normalean argi intentsitate altua erabiltzen da eta fondo beltza ikusten da. Oso baliagarria da tindatu gabeko laginak ikusteko eta laginaren berezko pigmentuek azaleratutako kolorea ikusteko.

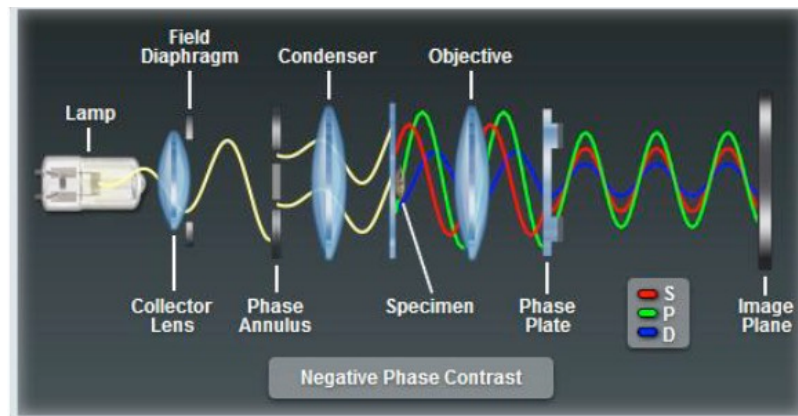
- Aplikazioak: esekidura zelularrak (legamiak, bakteriak, protistoak), ura (protistoak), oso gutxi tindaturiko laginak, kultiboak (mugikortasuna aztertzeke).



2.3 FASE KONTRASTEA

Hazkuntza zelularrak ikusteko erabiltzen den teknikarik ohikoena da fase kontrastea. Argiak lagina zeharkatzean fotoiek uhin luzera berdina eduki beharko lukete baina lagina homogeneoa ez denez (osagai bakoitzak errefrakzio indize bat du) gune dentsuok interakzio gehiago dute argiarekin uhinak atzerapen bat jasatea eraginez. Ondorioz, fase desoreka bat egoten da egitura ez dentsotik pasatutako argiak ez duelako atzerapenik jasaten. Modu honetan, dentsitate desberdineko egiturak identifikatu ahal dira.

Teknika honen bidez, argia filtro berezi batean zehar pasarazten da, argi uhin guztien ertzak eta haranak fase berean egotea lortuz, baina euren luzera aldatu gabe. Ondorioz, argiztapen homogeneoagoa lortzen da. Horren ondoren, argiaren uhin bakoitzak lagina zeharkatzean ibilbide desberdina izango du, eta beraz, alineatutako argiak, lagina zeharkatzean topatzen duten erresistentziaren edo intzidentzien arabera, fase desberdina eskuratuko du berriro. Argi hori, azkenean, objetibora sartzen da eta azken filtro batean berriro berrantolatzen da alineazioa lortuz eta uhinaren intentsitatearen arabera irudia eskainiz. Zonalde ilunagoa ageri da uhinak erresistentzia handia topatu badu, eta zonalde argiagoa erresistentziarik aurkitu ez badu (gauza gutziago zeharkatu).



Mikroskopia mota hau normalean tindatu gabeko laginak ikusteko erabiltzen da.

2.4 DIC TEKNIKA (Differential interference contrast)

Fase kontrastean erabiltzen den filtroei filtro gehiago gehituz laginaren irudi hobeak eskuratzen dira. Teknika hau ere hazkuntza zelularrak ikusteko oso erabilia da baita ere.

3. MIKROSKOPIA MOTA DESBERDINAK

3.1 ALDERANTZIZKO MIKROSKOPIA

Alderantzizko mikroskopioak duen berezitasun nagusia argia luginaren behekaldeetik etorri beharrean, goialdeetik datorrela da.

Sistema honetan enfokearen sakonera oso mugatua da eta goiko zonaldea enfokatzen da soilik. Beraz, zonalde oso mugatu bat fokatuta dago. Gainera, mikroskopio honek bereizmena mugatzen duten kondentsadore bereziak ditu; baina bereizmena galtzen duen arren, zelula osoa enfokatuta ikusi ahal da eta zelulan osoan gertatzen dena aldi berean ikustea ahalbidetuz.



- Ezin da immertsio olio erabili.

Hala ere, alderantzizko mikroskopioek fase kontrastearen oinarrituriko argiztapena erabiltzen dute, enfoke plano edo sakonera hobe izatea eragiten duena. Hala, lagina (gure kasuan zelula, 15-20 μm) bere osotasunean aldi berean enfokatuta ikustea lortzen da. Gainera, mikroskopio hauen bidez zelulak hil gabe horiek behatzea posible da eta beraz, euren behaketa dinamikoa egin daiteke, kultiboak manipulatzeko gaitasuna handituz.

Laburbilduz, mikroskopio honekin eremu sakonerari buruzko informazio hobe lortzen da baina bereizmena jaisten da.

Mikroskopia mota honen desabantaila nagusia bereizmenaren galera da baina beste abantaila batzuk ditu: eremu-sakonera hobe, kultiboak eta manipulazioa.

3.2 FLUORESZENTZIAZKO MIKROSKOPIA

Fluoreszentziako mikroskopioak erabiltzen dituen argiaren uhin luzerak eremu argiko mikroskopio optikoak erabiltzen dituenak baino baxuagoak dira, beraz, lor daitekeen bereizmena handiagoa da. Mikroskopio horren bidez argia filtro berezi batetik pasaratzen da eta luginera gehituriko markatzaile fluoreszente berezi bat kitzikatzen

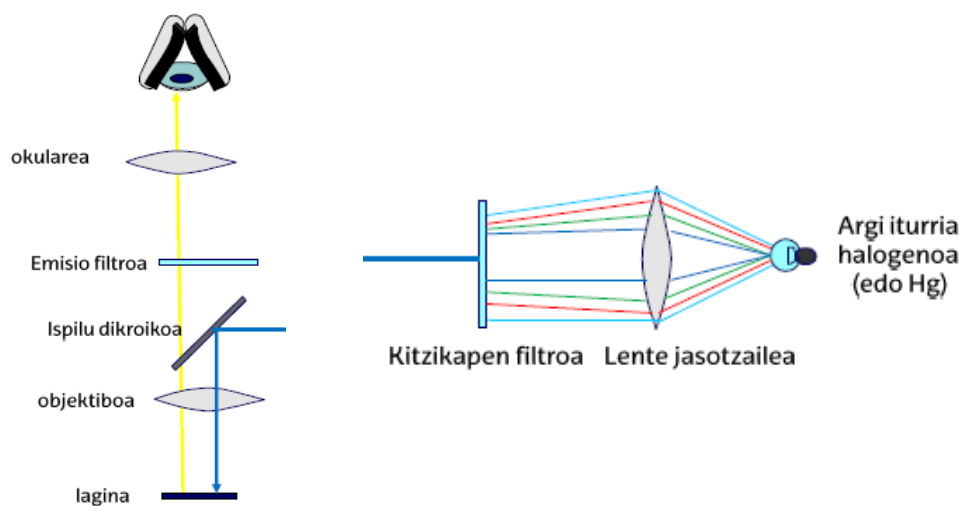
duen uhin luzera pasatzen uzten da soilik. Beraz, teknika hori erabiltzeko, beharrezkoa da erabilitako fluorokromoek zein luzeratan emititzen duen uhina jakitea, bestelako luzera guztiak blokeatzeko.

- Molekula fluoreszenteek uhin luzera betko argia xurgatu eta beste uhin luzera bateko uhina igortzen dute.
- Argi iturria berezia da lanpara halogenatuak erabiltzen baitira. Hori dela eta kitzikapena kontrolatuta dagoela esan dezakegu. Argi halogenatu hau lehen filtro batetik igaroarazten da filtroak uhin luzera konkretu bat soilik pasatzen uzteko.

Horren ondoren, argiak objektiboa gurutzatu eta bigarren filtro bat igarotzen du, soilik markatzaile hori aktibatzen duten uhin luzera pasarazten uzten duena.

Hala ere, kontuan hartu behar da hainbat egiturek berezko fluoreszentzia dutela, eta beraz, posiblea dela bi seinalek elkar gainezarri eta irudi okerragoa azaleratzea. Askotan, prozesua behin baino gehiagotan egiten da fluorokromo ezberdinak erabiliz, eta ondoren irudiak fusionatzen dira ordenadorez, zelulako egitura ezberdinen informazio osoa lortzeko.

Besteak beste, halako mikroskopia mota hau oso erabilgarria da zitoeskeletoa behatzeko.



Epi-fluoreszentzian argi erasotzailea fluoreszentea da. Argi erasotzaile hau objektiboan zehar zuzenean laginaren gainetik pasatzen da eta objektibo berdina erabiliz laginak igorritako argia ikus daiteke.

3.3 MIKROSKOPIA KONFOKALA

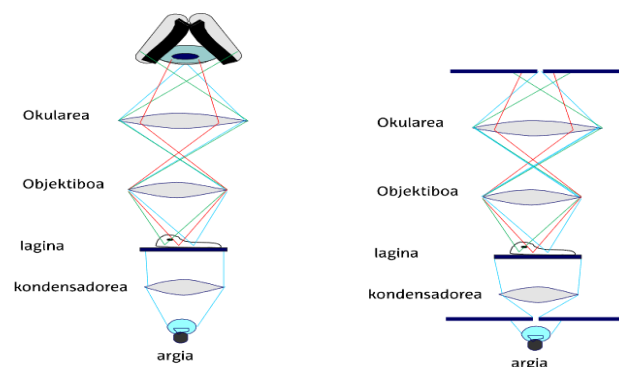
Ebaki gabeko lagin biologikoak eta sakonera handiko egiturak eta hauen detaileak ikusteko erabiltzen da. Normalean egitura handiak ikusteko aproposa da ebaki gabeko lagin biologikoen ikusoegi bereziak ematen dituelako (lagin lodi baten "azpiko" zatiak ikusi ditzazkegu).

Fluoreszentziako mikroskopioa erabiltzen bada, laginak lodiak direnez, hainbat fluoreszentzia molekula egongo dira eta argi fluorezenteak molekula guztiekin interakzionatuko du, molekula bakoitzak bere uhina emititzea eraginez. Denek aldi berean interakzionatzen dutenez argiarekin aldi berean emititzen dute uhina, ondorioz, intentsitate ezberdinak gainezarri egiten dira eta fokatze gune ugari agertzen dira. Beste hitz batzuetan esanda, emititzen den fluoreszentziaren seinalea jasotzen denez, enfokatuta dudan planoaren fluoreszentzia eta goitik eta behetik dauden planoen fluoreszentzia, kasu gehienetan irudiak ez dira guztiz definituak.

- Fluoreszentzia guztia ikustean milaka enfoke plano desberdin egongo dira.
 - Zenbat eta lagin lodiagoa eduki hainbat eta enfoke plano gehiago egongo dira.
- Zerbait fokatzear hori intentsitate maximoarekin ikusiko da. Hala ere, besteen eragina ere ikusiko da gainezarri egingo delako.

Hori guztia ekiditeko, lagin lodiak aztertzeke mikroskopia konfokala erabiltzen da. Kasu honetan, okularraren alboan, zulo berezi bat dago pinhole izenekoa. Zulo hau lagin guztitik interesekoa enfokatzeko erabiltzen da, gainontzeko guneen argia blokeatuz. Zuloa mugitzen joango da eta intereseko planoak enfokatuko dira, azkenean plano guztiak elkartuz irudi birtual bat eraikitzeke. Horregatik, oso erabilgarria da egitura handiak aztertzeke.

- Pinhole-a zenbat eta handiagoa izan, mikroskopiaren bereizmena handiago izango da.



Mikroskopia honen abantaila nagusia sakonera handiagoko egiturekin lan egin daitekeela da.

- DAPI fluoreszentzia erabiltzen da nukleoak ikusteko, DNArekin lotzeko ahalmena duen molekula baita. Mikroskopia normal batean soilik uhin luzera bat pasatzen da eta beste guztiak blokeatzen dira, guk fluoreszentea zein den jakinik beharrezkoak diren filtroak jartzen ditugulako. Kasu honetan ez da emititutako fluoreszentzia gainezartzeko arazorik egongo lagina oso txikia denez, bi nukleo bata bestearen gainean egoteko probabilitatea oso txikia izango delako. Hala ere, lagina oso lodia bada mikroskopia konfokala erabiliko da.

3.4 MIKROSKOPIO ELEKTRONIKOA

Argi iturri gisa elektroiak erabiltzen dira fotoien ordeztu eta hauen uhin-luzera fotoiena baino txikiagoa denez, bereizmena (erresoluzioa) handiagoa da, zehazki, 1nm-takoa. Beraz, teorikoki egiturak 200 mila aldiz handiagoak ikusi ahal dira.

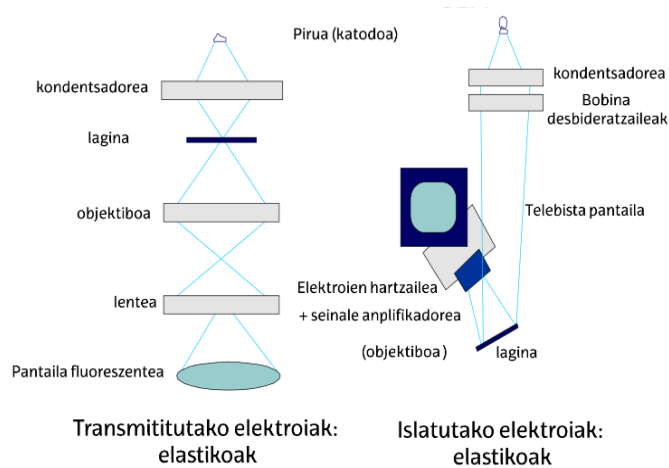
- Fotoien uhin luzera 0,03nm-takoa da.

Bi mikroskopia elektroniko daude, Transmisio mikroskopia elektronikoa (TEM) eta ekorkuntzezko mikroskopia elektronikoa (SEM).

- Transmisio mikroskopia elektronikoan metalezko xafla bat berotuz elektroiak askatzea lortzen da. Elektroiek kondentsadorea zeharkatzen dute eta ebaki fineko laginaren gainetik igarotzen dira hau zeharkatuz eta fosforozko pantaila baten aurka txokatuz (pantaila fluoreszentea). Xafla honek oxidazioa eta beste hainbat aldaketa jasango ditu eta hortik irudi bat lortuko dugu, honi detektorea deritzo. Elektroiek zeharkatutako guneak argiak izango dira eta ez gurutzatutakoek aldiz ilunak.
 - Mikroskopia barruan ezin da airerik egon, airea balego elektroiak airearen partikulekin talka egin eta ezin izango zutelako laginera heldu.
- Ekorkuntzezko mikroskopia elektronikoaren kasuan funtzionamendua berdina da baina elektroiek laginaren gainazalarekin egingo dute talka eta erresoluzioa handiago da. Mikroskopia honen bidez laginaren gainazalari buruzko informazioa lortzen da. Elektroiak piru edo alambre berezi batek askatzen ditu berotzen denean. Askatutako elektroiek kondentsadorea zeharkatu eta laginaren gainean joko dute. Elektroiek laginean jotzean errebotatu dezakete edo honen aurka joatean lagineko elektroiak askatzea eragin. Beraz, elektroiek

ez dute lagina zeharkatzen. Errebotatutako elektroien hurrek pantaila batek jasoko du eta irudia sortuko da.

- Bestetik, gainazalarekin talka egiten duten elektroien artean, badira X izpiak osatzen dituztenak. Askatzen den elektroia intentsitate batekin aterako da eta atomo bakoitzaren elektroiek energia maila bat dutenez, laginaren konposizio atomikoa ezagutu daiteke, horri, X izpien analisisa deitzen zaio.



Gaur egun, mikroskopia sistema berriak atera dira ehunak eta zelulak modu desberdinean aztertzeko gai direnak. Adibidez, indar atomikoko mikroskopia dugu gehienbat azalerak aztertzea ahalbidetzen diguna. Honen berezitasuna da laginaren tanta bat izanda irudia lortu dezakegula.

- Supererresoluzioa: nukleoaren kromosoma bakoitzaren posizioa ikusi daiteke.

Aipaturiko mikroskopia horiez gain, badaude beste hainbat ere: ekorkuntzezko mikroskopia konfokala, mikroskopia akustikoa, dekonboluzio digitalezko mikroskopia, Stem, mikroskopia krioelektronikoa...