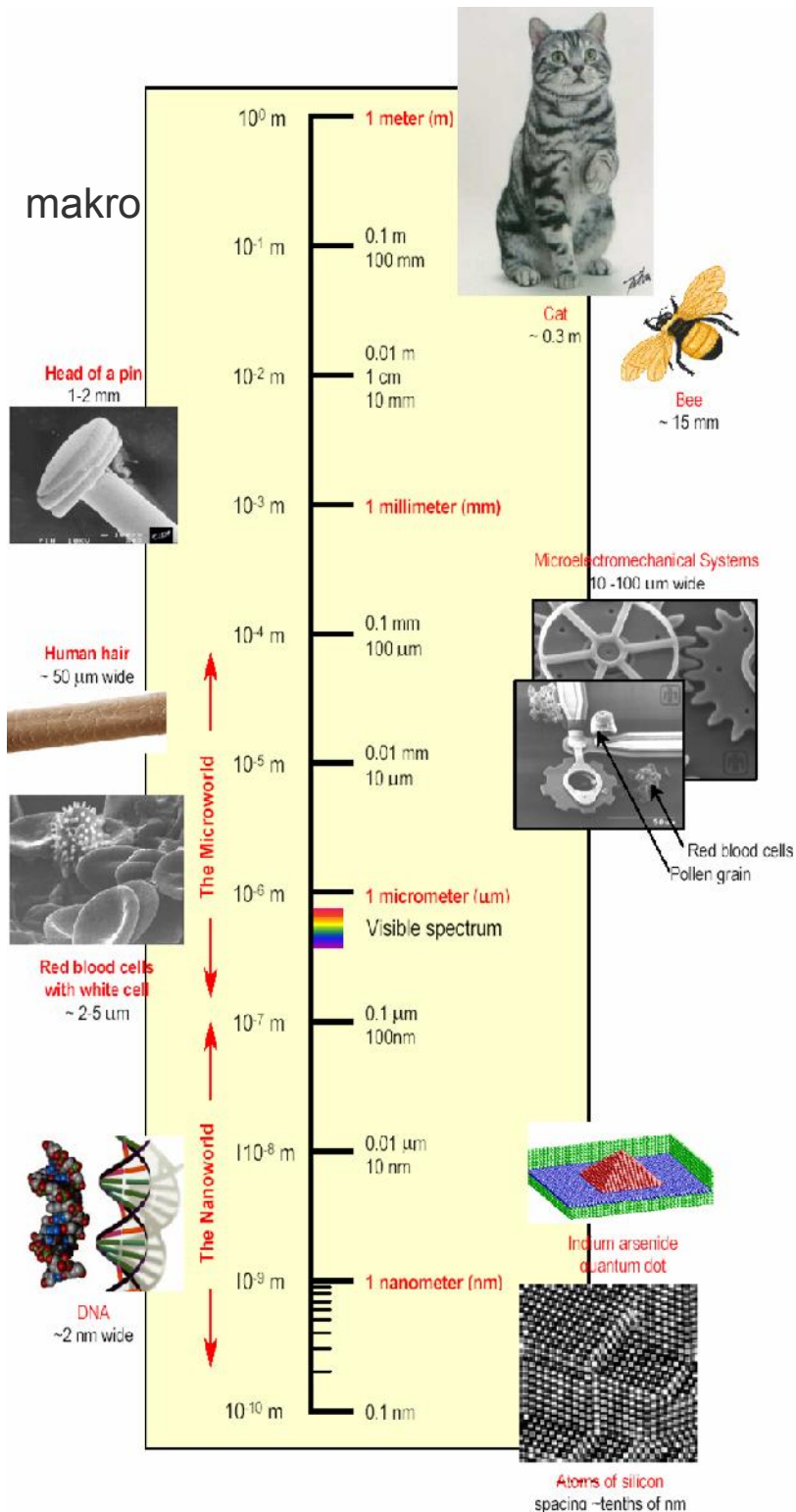


A biológiai anyag vizsgálatának mikroszkópi módszerei

Kis Petik Katalin

Semmelweis Egyetem

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



szem
(CT, MRI,
UH, PET,
...)

Hiszem, ha látom!

fénymikroszkópok

további
trükkös
fényt
használó
módszerek

elektron-
mikrosz-
kópok

pásztázó
módszerek
(AFM, STM,...)

A nano és mikro tartomány méretei

érdekes,
de nehezen látható

• elektronmikroszkóp
2nm

1 = 2 nm

25 nm

RIBOSOME

6.0 nm

CELL MEMBRANE

WATER MOLECULE
0.4 nm

2.4 nm

DNA

6.4 nm

HEMOGLOBIN

AMINO ACID
0.8 nm

molekulák

fénymikroszkóp



1 = 200 nm

200nm

RIBOSOME
25 nm

500 nm

1500 nm

MITOCHONDRION

500 nm

1500 nm

ESCHERICHIA COLI

Flagellum
15 nm diameter
10 000 nm long

CHLOROPLAST
2000 nm

5500 nm

sejtek, szövetek

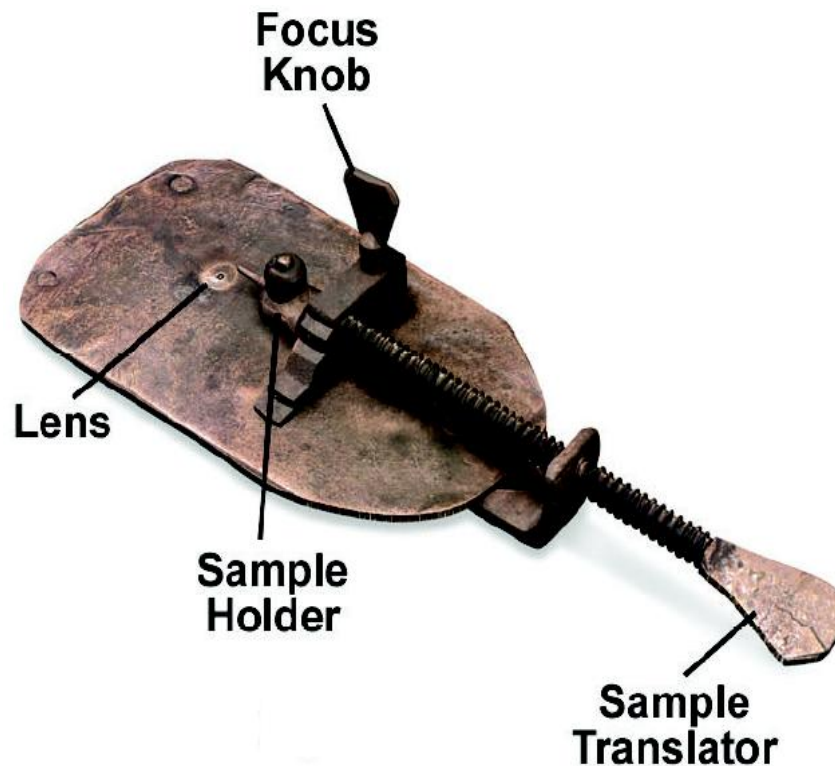
A fénymikroszkóp

- egyszerű: nagyító, lupe
- összetett: objektív és okulár
 - speciális kontraszt:
 - sötétlátótér
 - fáziskontraszt
 - polarizáció
 - fluoreszcencia
 - differenciál interferencia kontraszt
 - modern: optikai “szeletelő” (konfokális, multifoton)
 - még újabb: szuperfelbontás

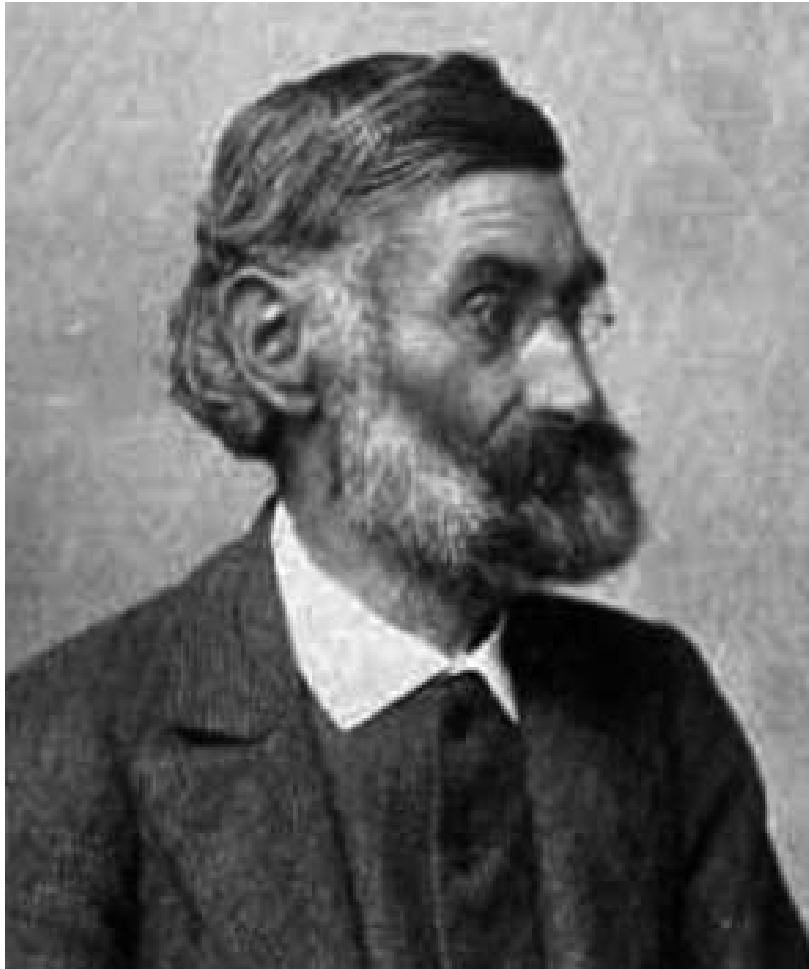
Antoni van Leeuwenhoek (Thonis Philipszoon) 1632-1723 1674-ben egyszerű mikroszkópot készít



mikróbákat figyelt meg



Ernst Karl Abbe (1840-1905)



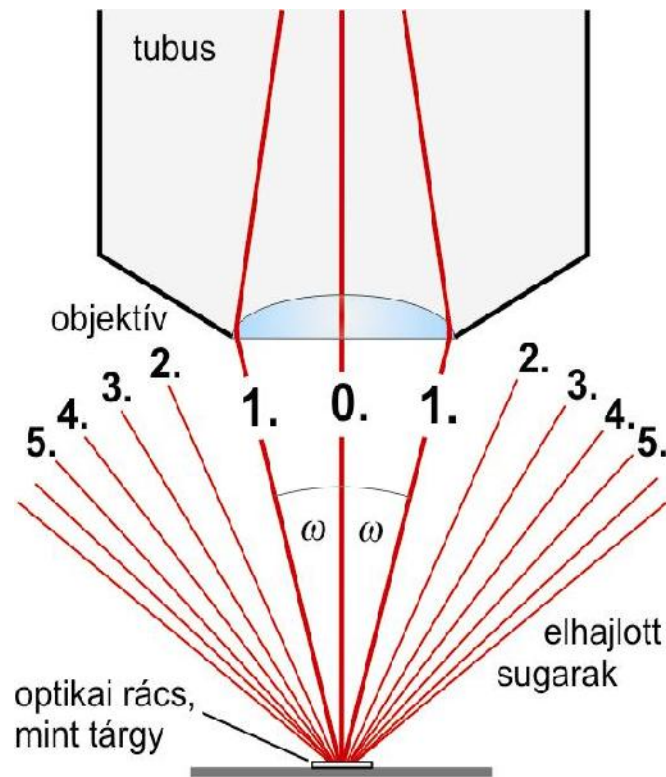
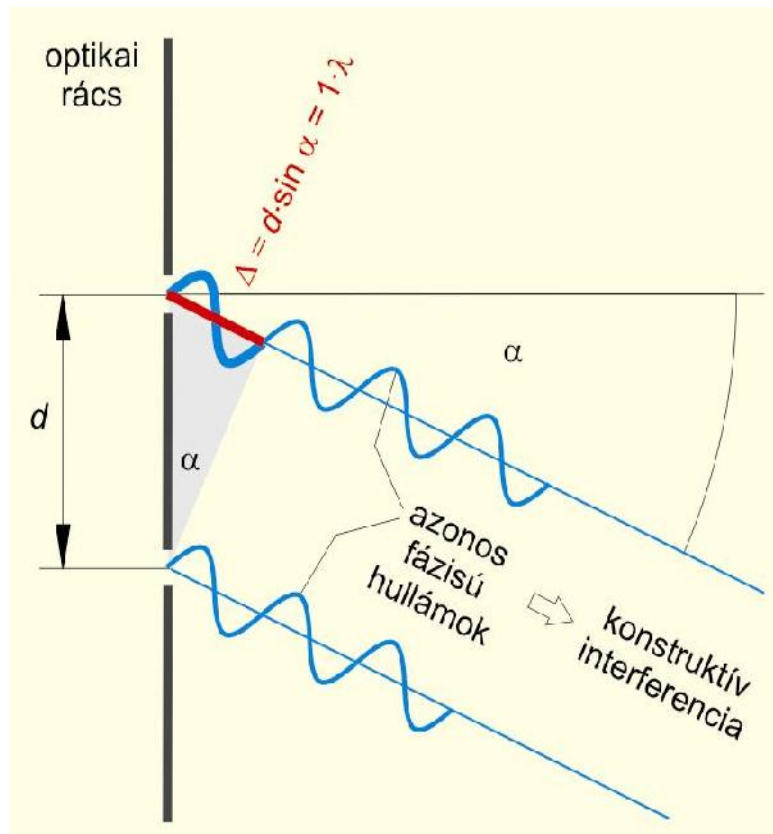
Fizikus és társadalomreformer is volt.

Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

a felbontóképesség fizikai határa

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

A fény hullámtermészetének hatása a képre



$$d \cdot \sin \alpha = k \cdot \lambda$$

Abbe elv

A mikroszkópban akkor és csak akkor tudunk feloldani két tárgypontot, ha a diffraktálódott fényhullámból a főmaximumon kívül legalább az első rendben elhajlott fény is részt vesz a képalkotásban.

$$\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin\omega)$$

Airy korongok
point spread function

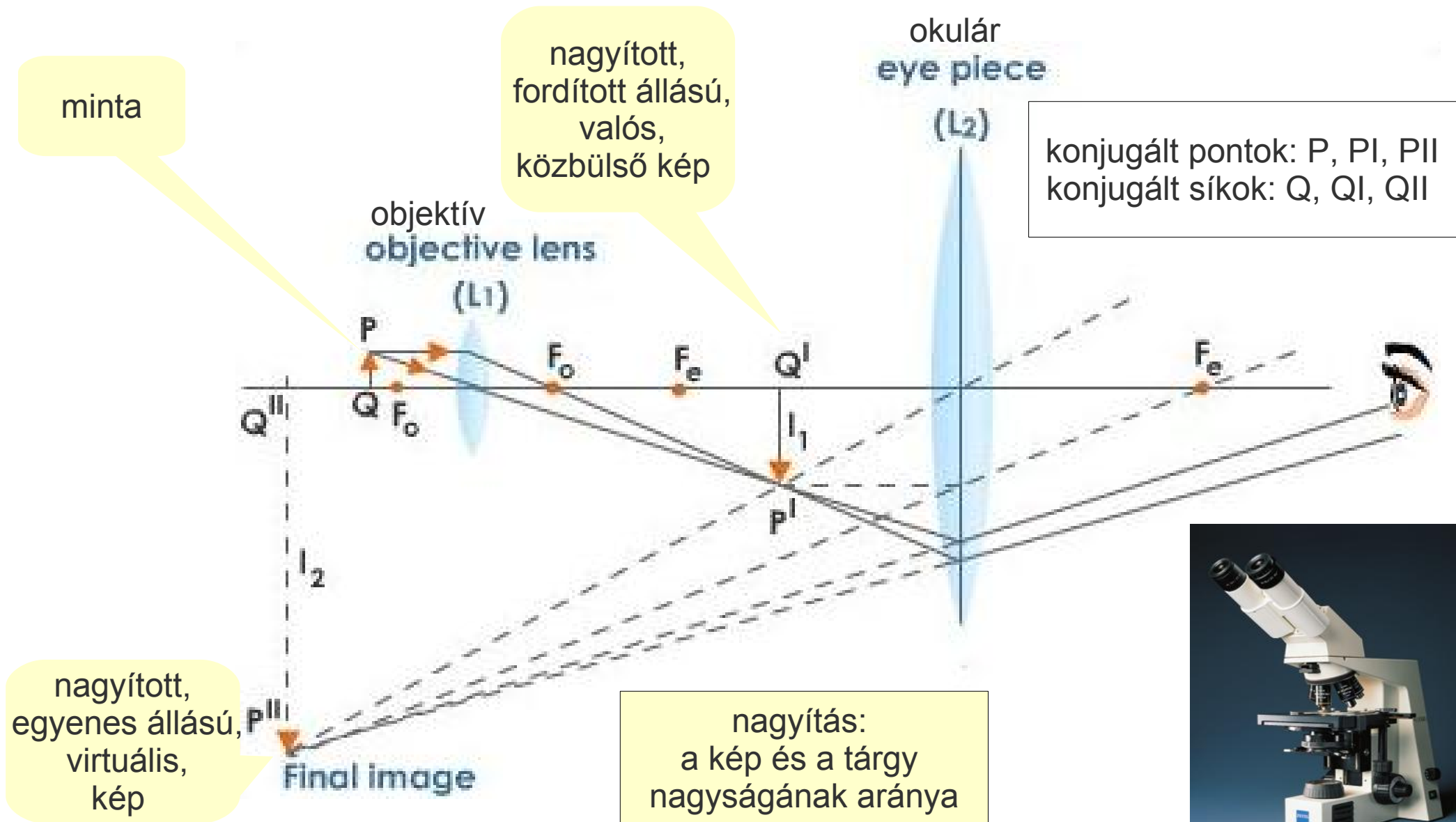


Hallgatólagos feltevések:

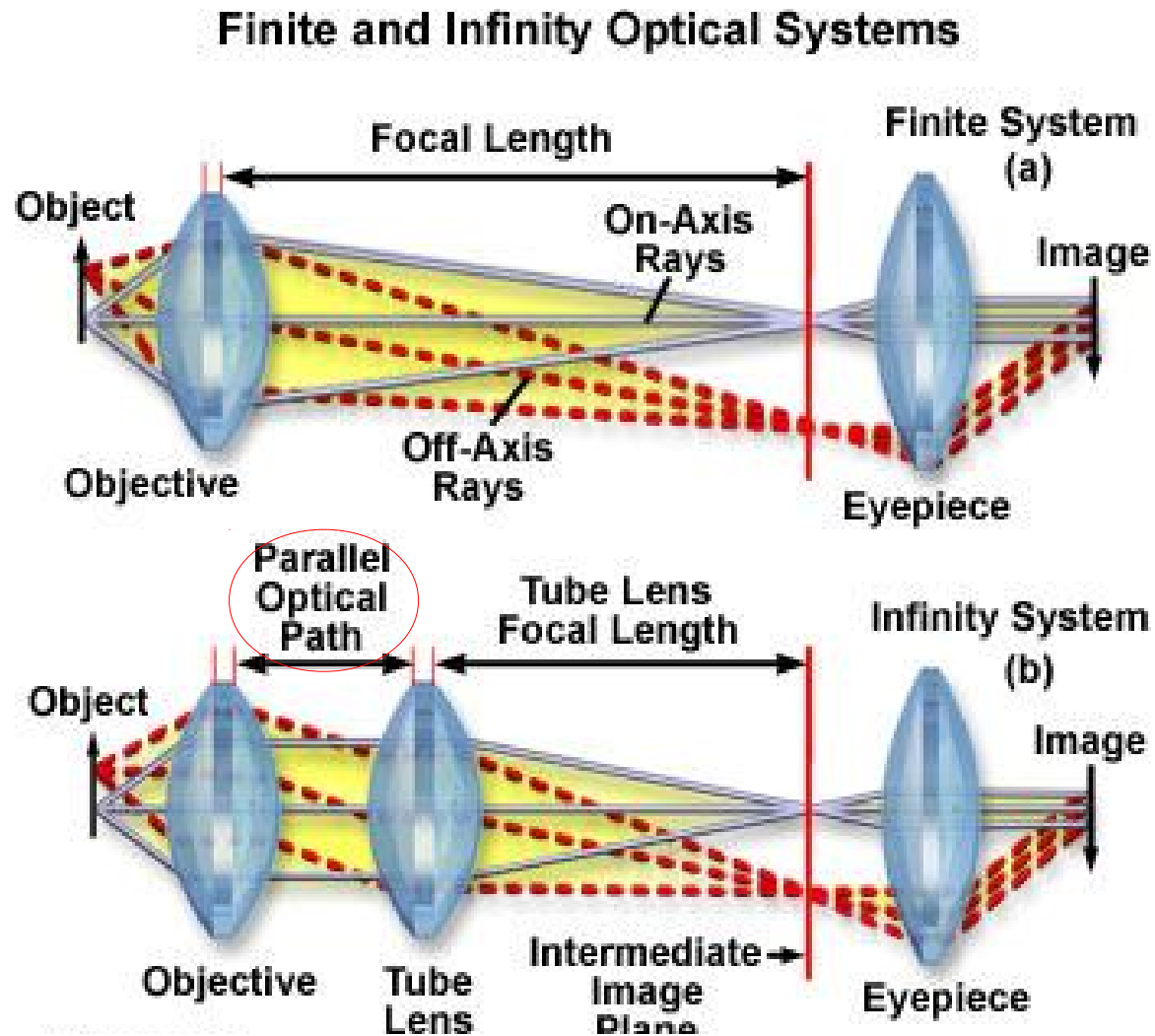
a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet;

a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képpontokat (foltokat) ad.

Összetett mikroszkóp optikai útja



“Végtelenre korrigált” optika



Köhler megvilágítás

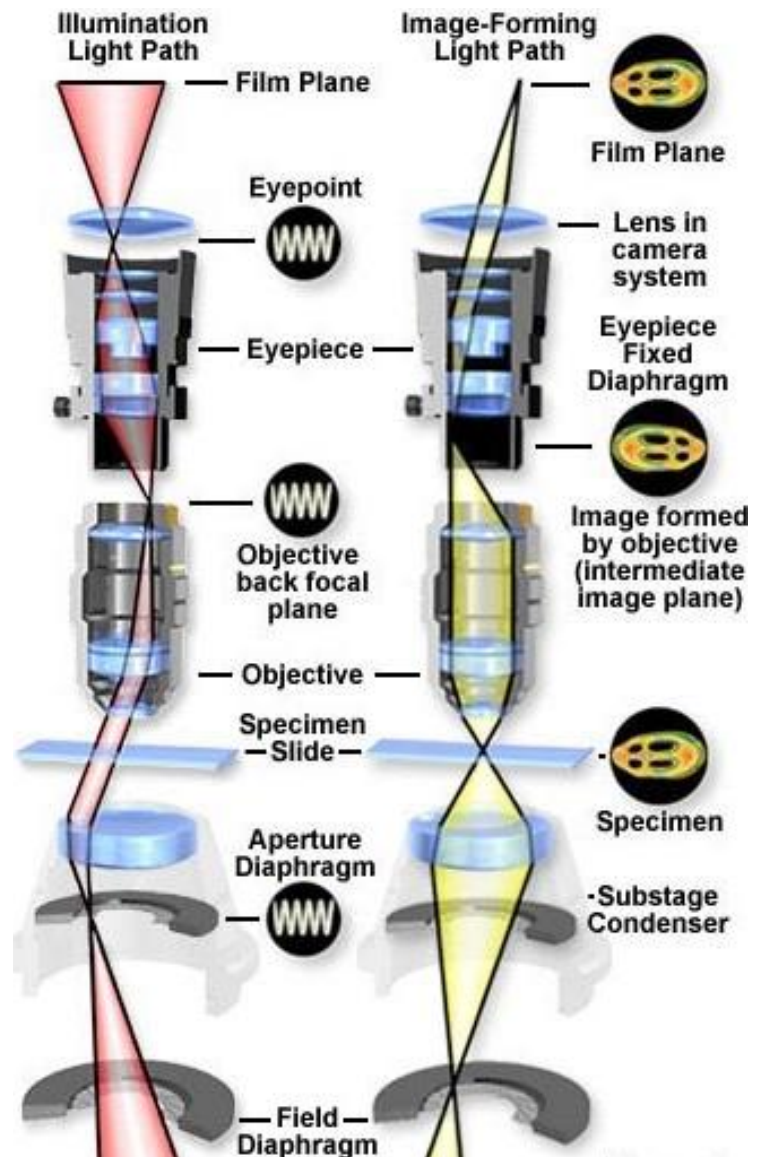


August Köhler
(1866-1948)

kondenzor apertúra:
a kondenzor numerikus apertúrája

mezőapertúra:
a megvilágított terület nagysága

megvilágító és képalkotó sugarak

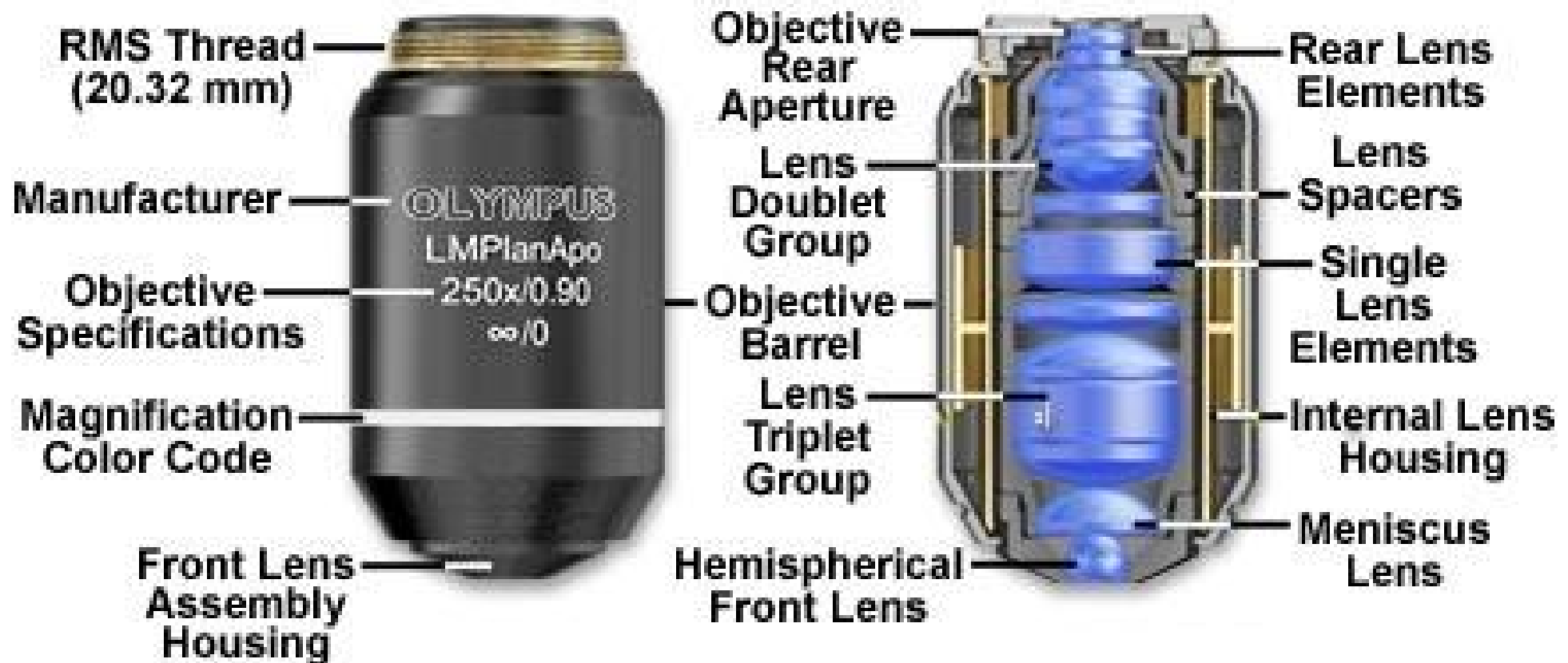


Mikroszkóp objektív lencsék



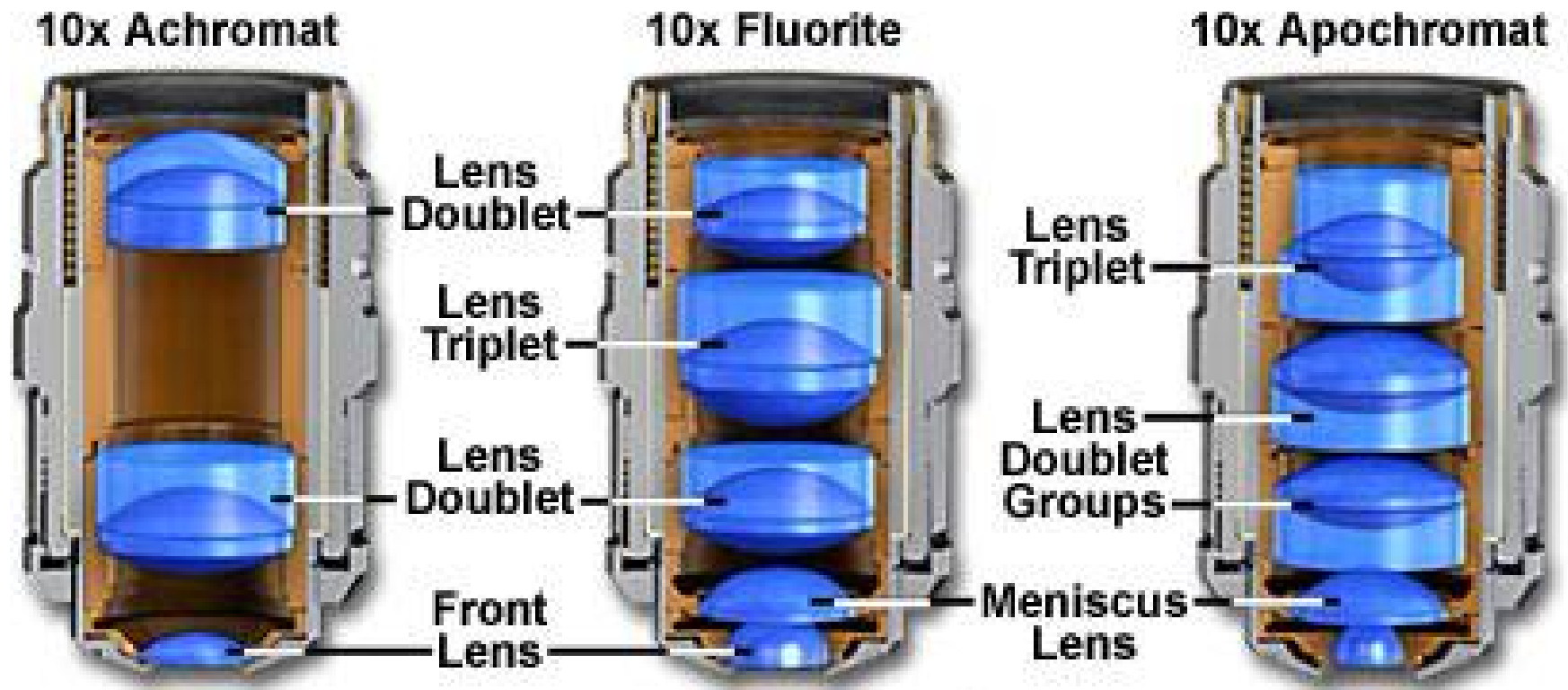
Mikroszkóp objektívek felépítése

LWD Plan Infinity-Corrected Apochromat Objective



Színkorrekció

Common Objective Optical Correction Factors

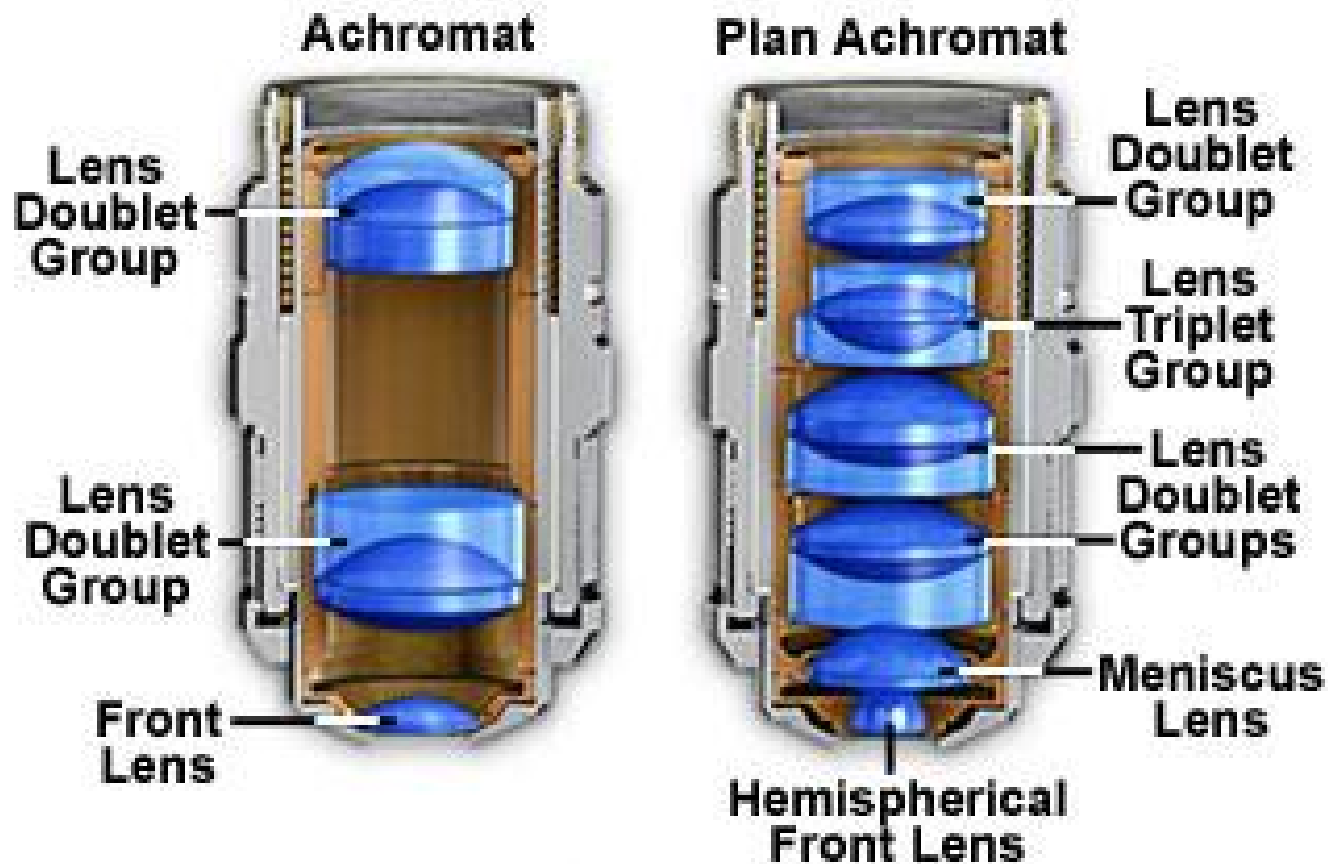


Korrekcio:

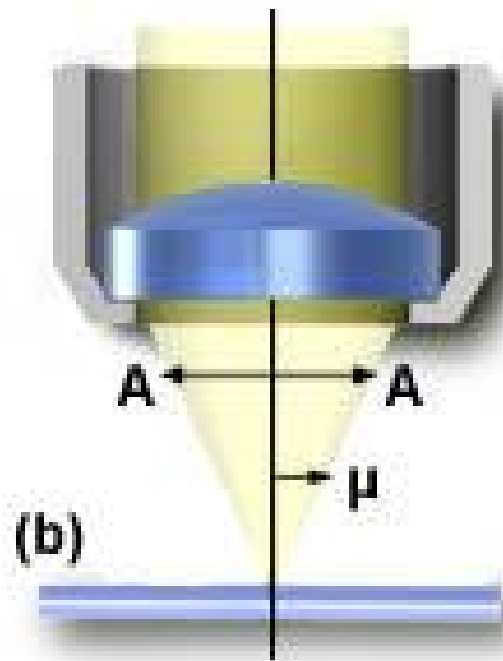
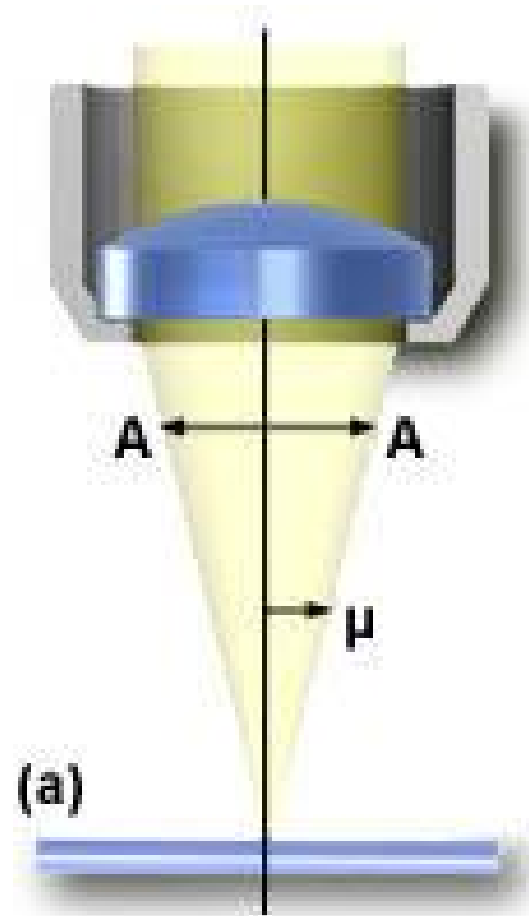
szferikus aberracio	1 színre	2-3 színre	3-4 színre
kromatikus aberracio	2 színre	2-3 színre	4-5 színre
látómező görbület	nincs	nincs	igen

Plánkorrekció

Objective Correction for Field Curvature

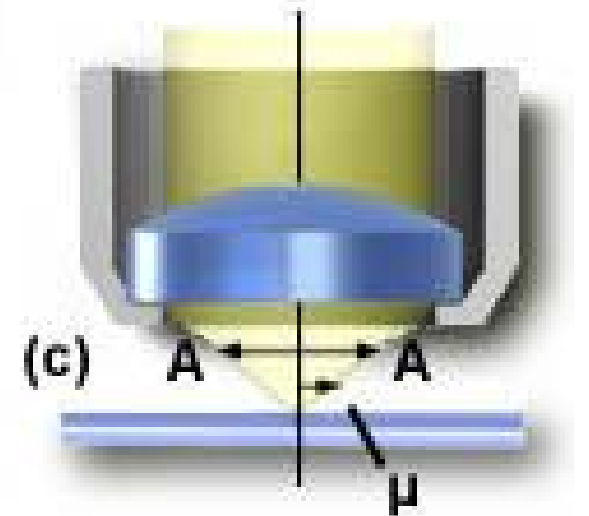


Numerikus apertura

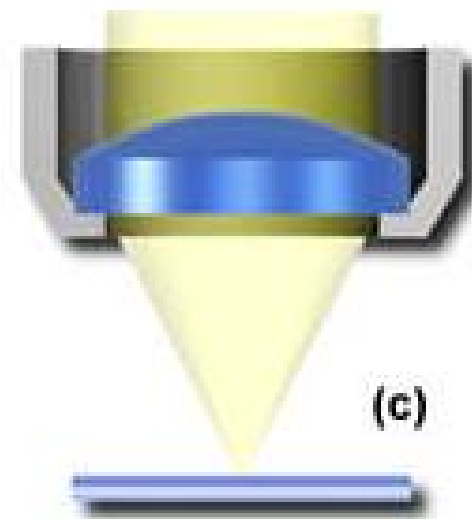
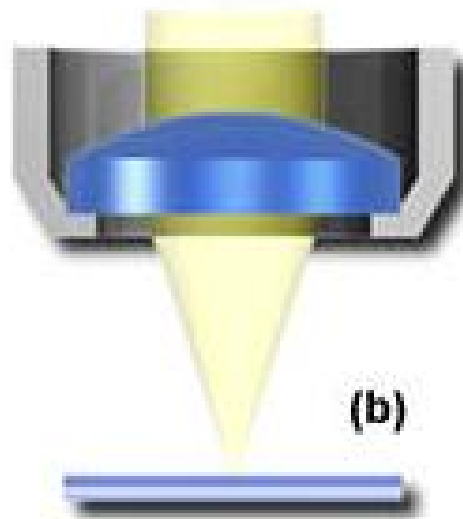
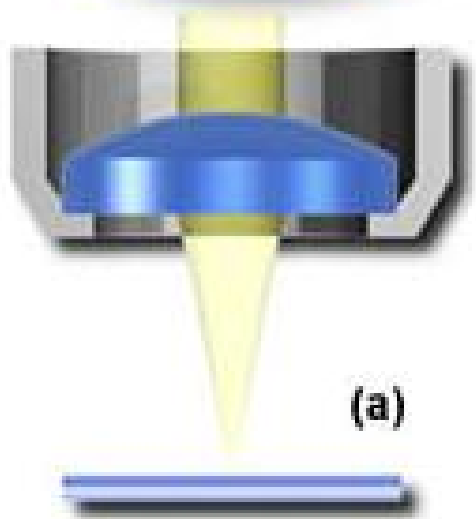
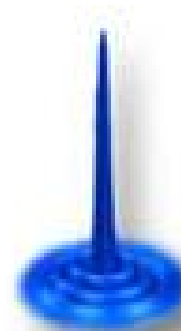


$$NA = (n)\sin(\mu)$$

(a) $\mu = 7^\circ$ $NA = 0.12$
(b) $\mu = 20^\circ$ $NA = 0.34$
(c) $\mu = 60^\circ$ $NA = 0.87$

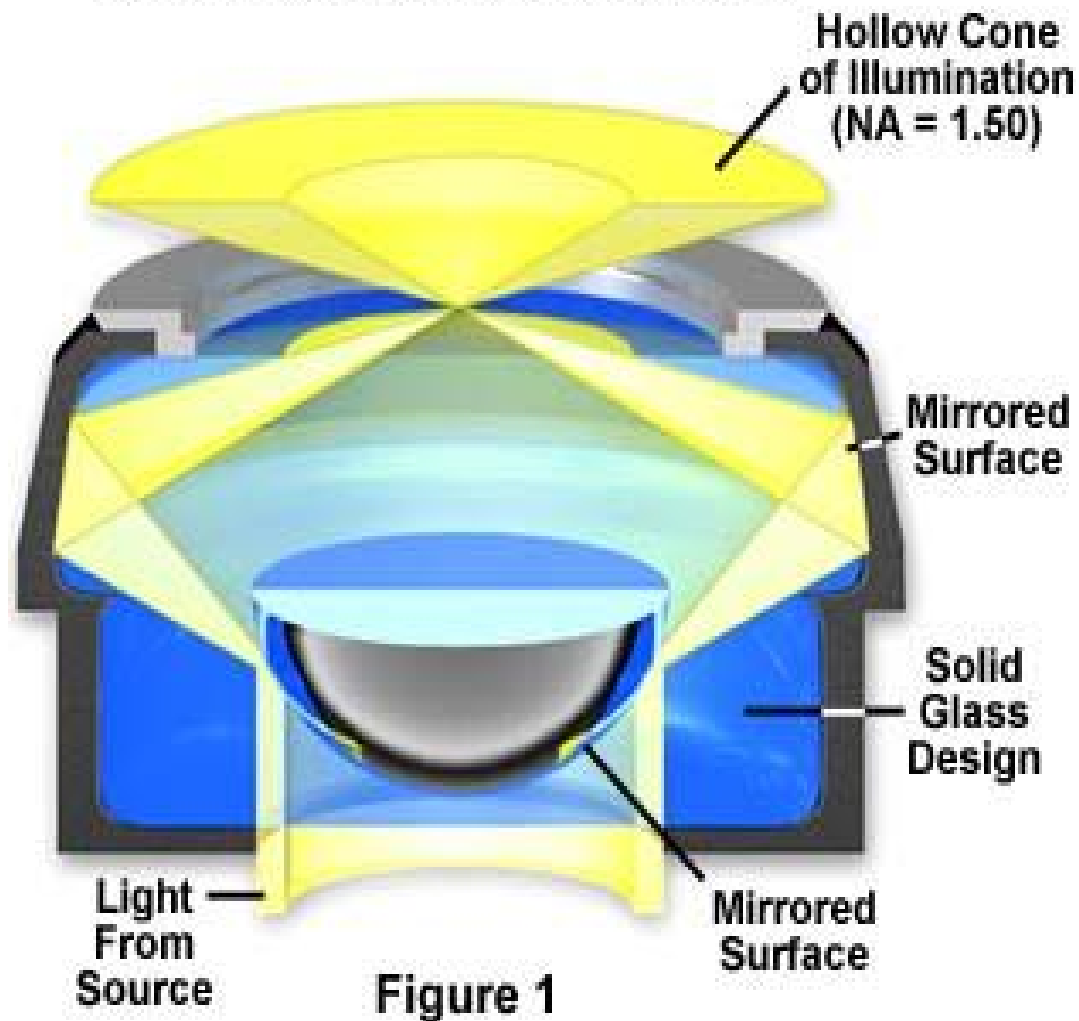


A numerikus apertura hatása a PSF-re



Sötétlátótér

Spot Ring Bicentric Condenser



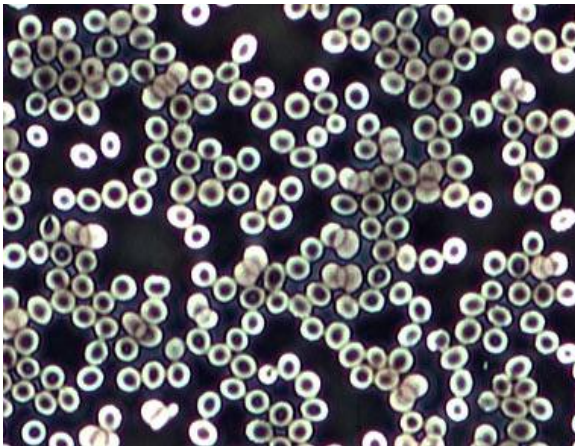
© 1998-2012 by Michael W. Davidson and The Florida State University.

Fáziskontraszt

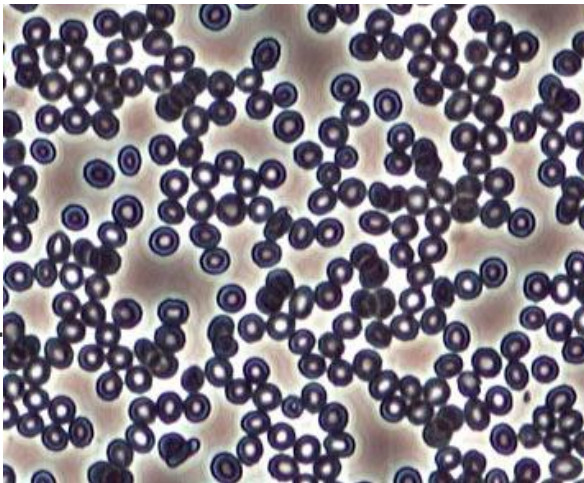
Zernike a fáziskülönbséget láthatóvá tette

humán vvt

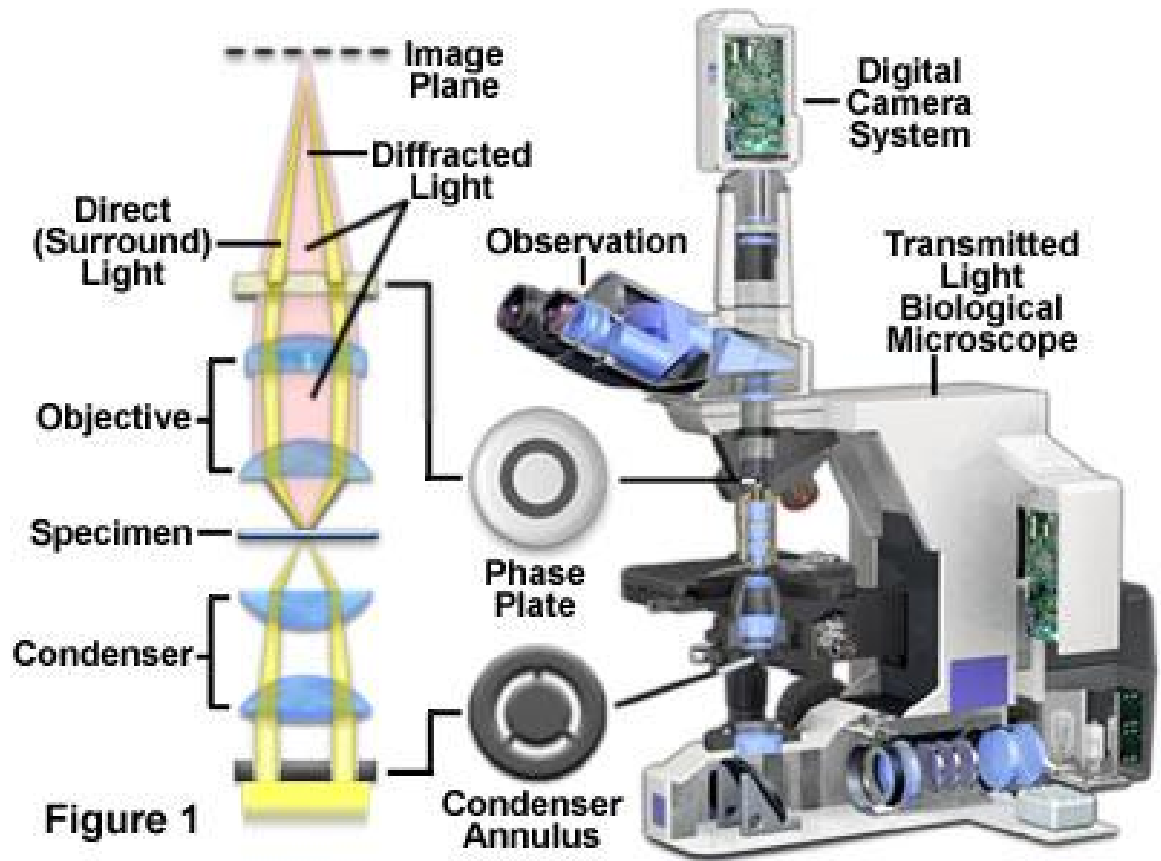
negatív



pozitív



Phase Contrast Microscope Configuration



Polarizációs mikroszkóp

az optikai anizotrópiát teszi láthatóvá

Polarized Light Microscope Configuration

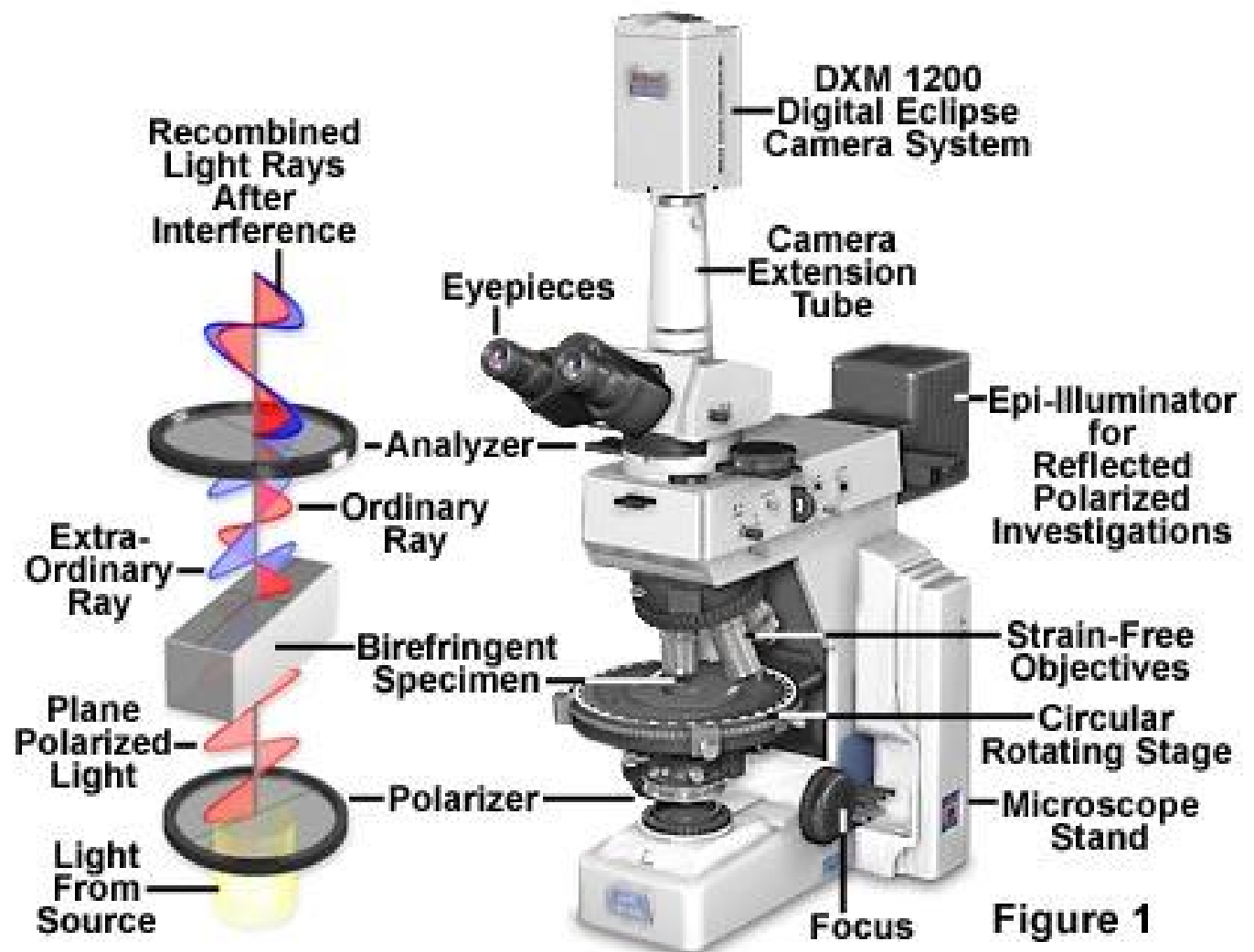
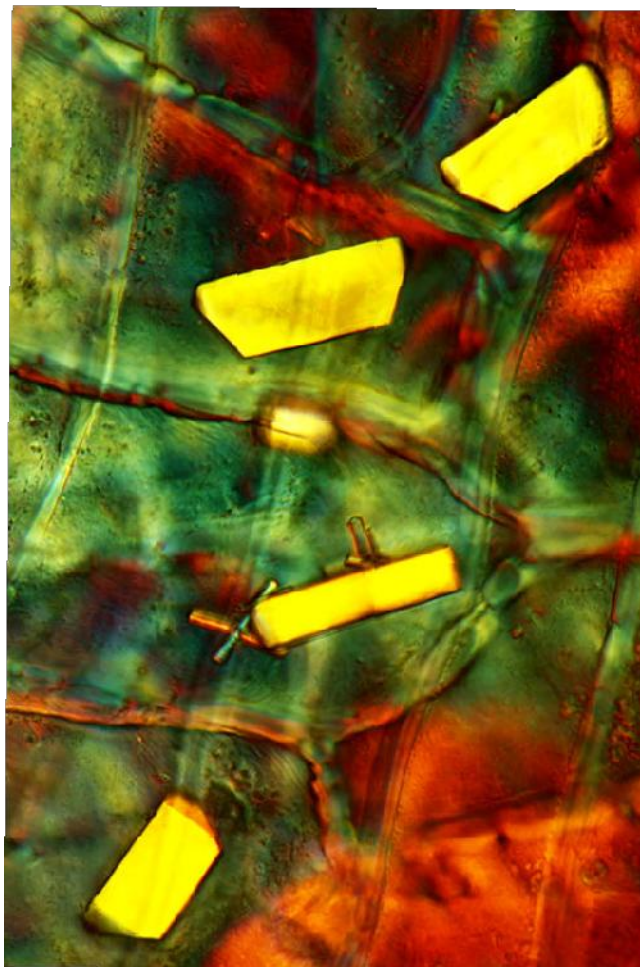


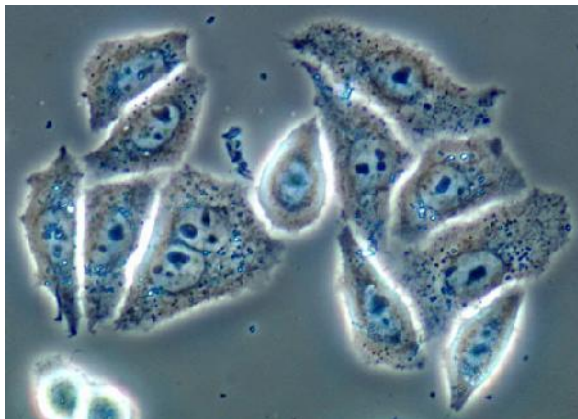
Figure 1

Differential Interference Contrast (DIC)

polarizáció és fáziskontraszt kombinációja

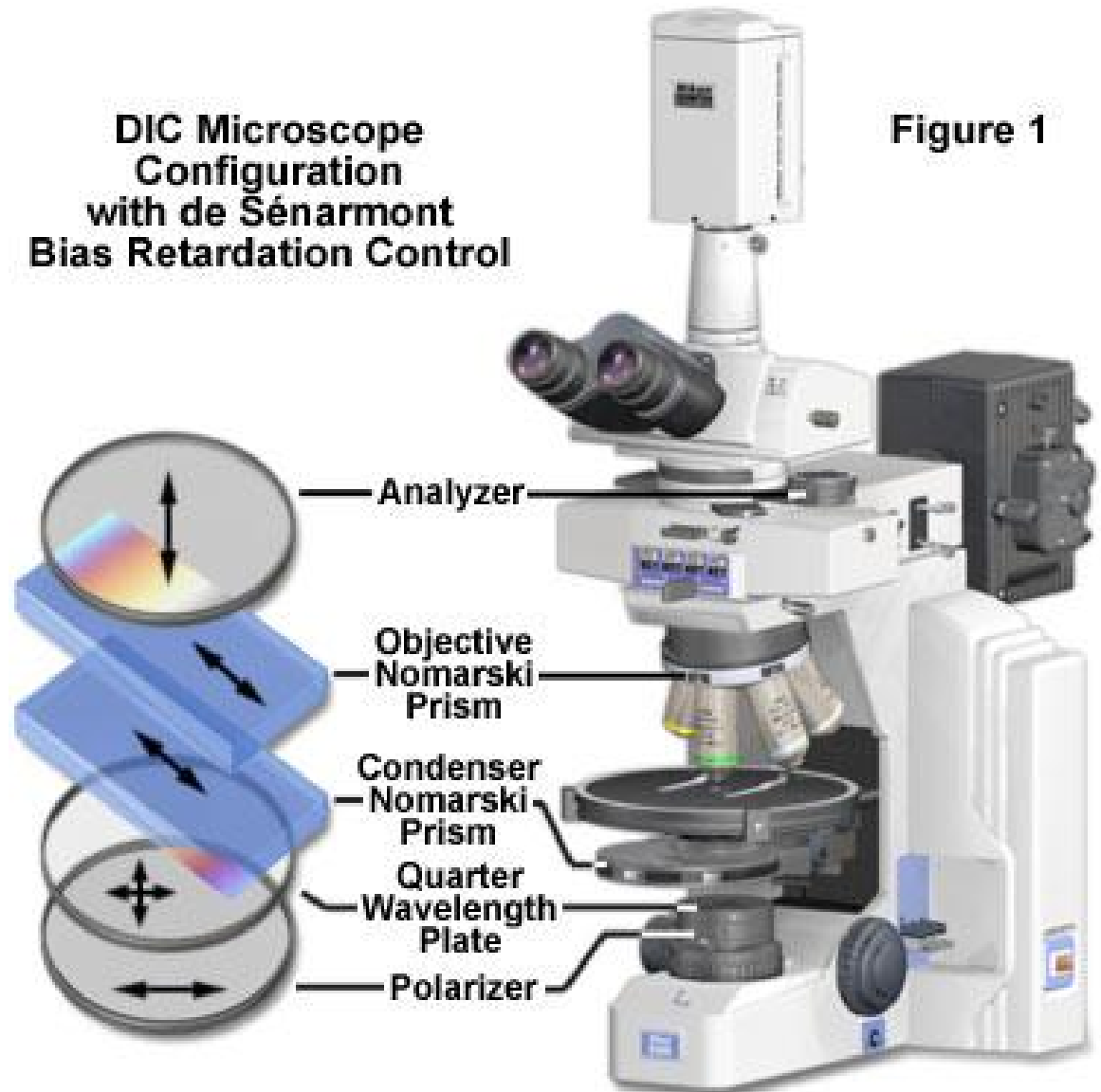


fáziskontraszt:



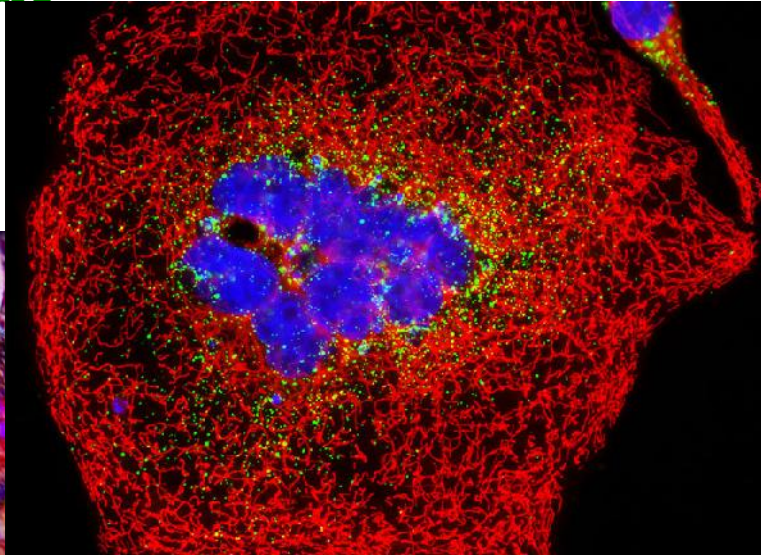
**DIC Microscope
Configuration
with de Sénarmont
Bias Retardation Control**

Figure 1

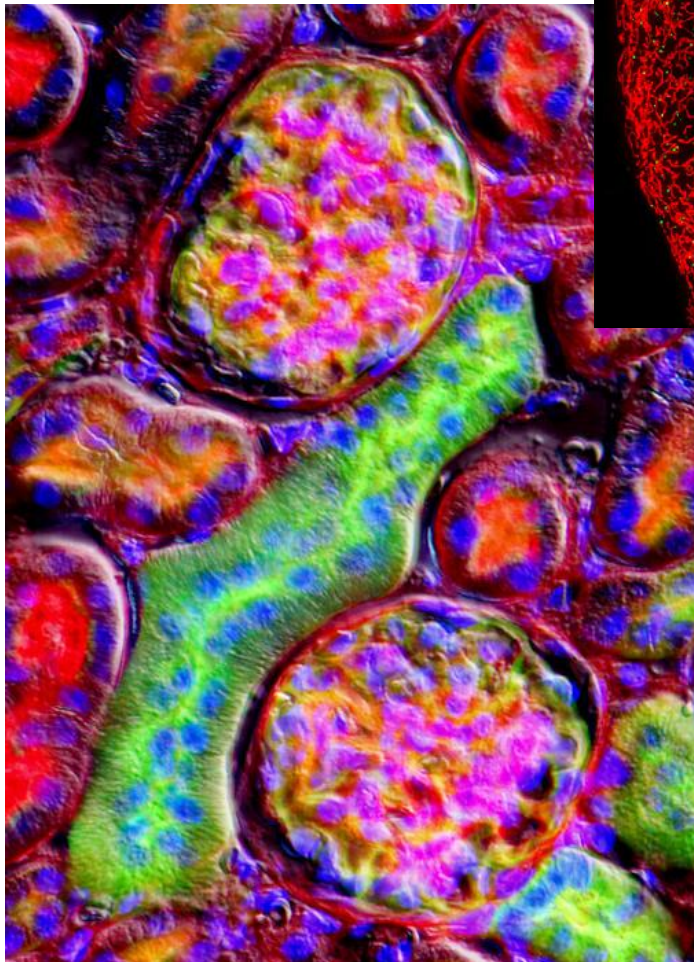


Fluoreszcencia mikroszkóp

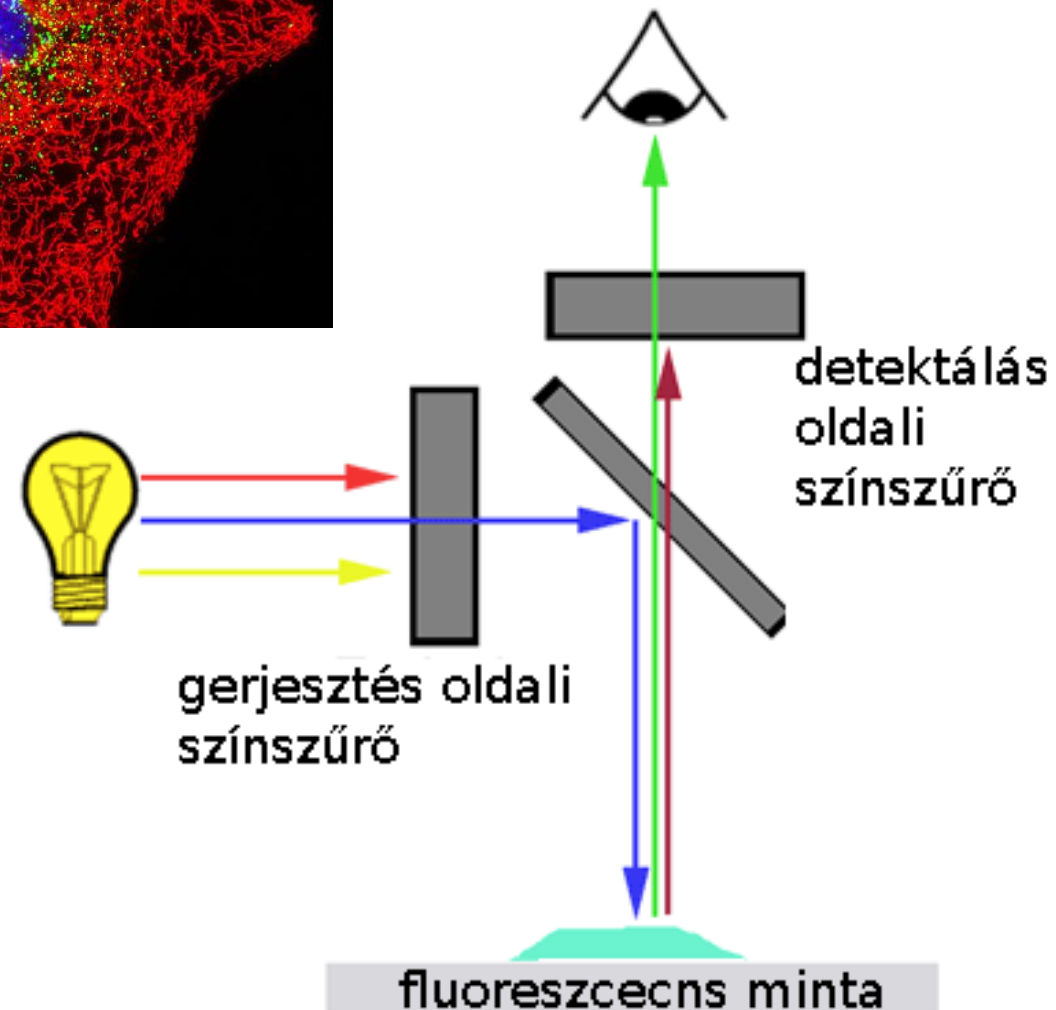
HeLasejtek: peroxiszómák
EGFP, mitokondrium,
magok: Hoechst



molekuláris kifestőkönyv



egér veseszövet



Az ideális fluorofor (festék)

- kicsi
- hidrofil
- megfelelő helyen nyel el és emittál
- nagy Stokes eltolódás
- specifikus kötődés (biotin/avidin, His-tag/Ni, antitest/antigén NH_2 , SH)
- fényes (abszorpció*fluoreszcencia hatásfok)
- nem, vagy lassan ég ki
- nem csinál fotokémiai reakciókat
- nem pislog

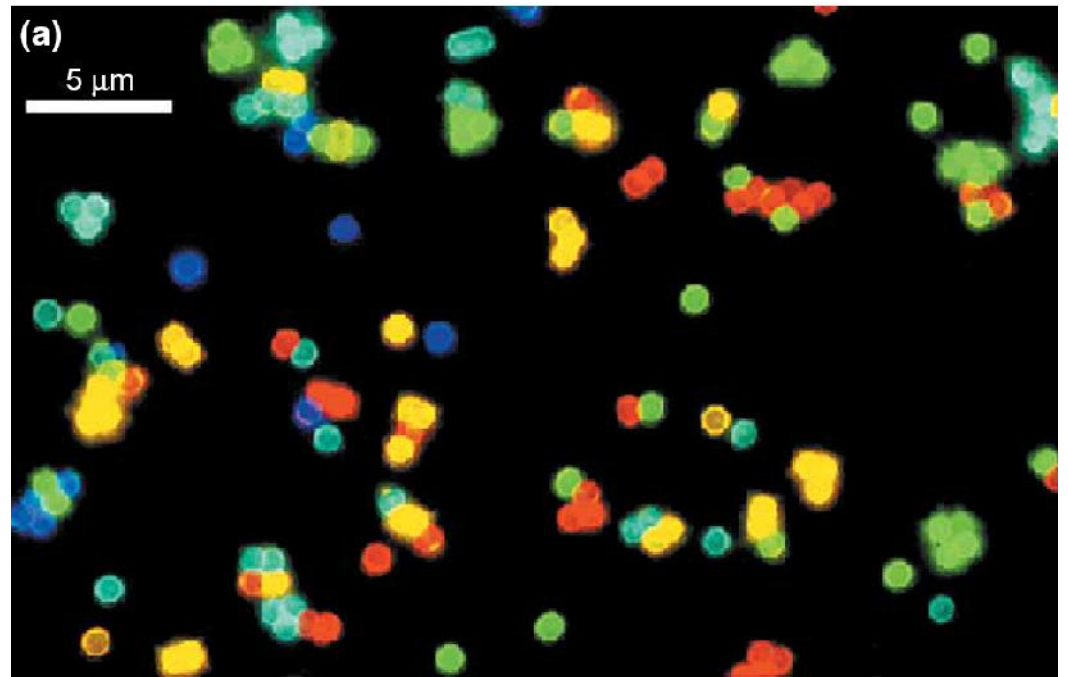


Fluoreszcens kvantumpöttyök

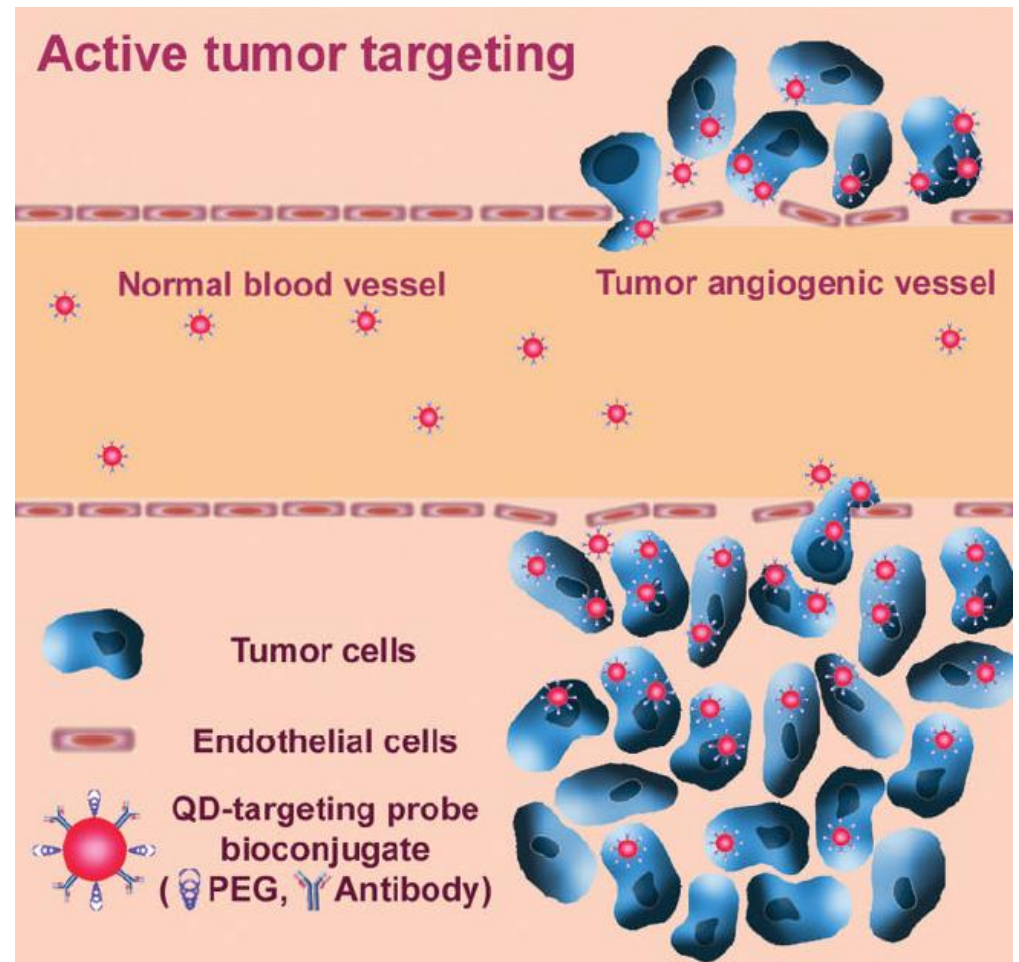
(a) CdSe-ből ZnS borítással készült kvantumpöttyök fluoreszcenciamikroszkópos képe

A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emittált fluoreszcencia színét.

(b) tíz eltérő méretű, ezeért elérő színben fluoreszkáló CdSe/ZnS kvantumpötty



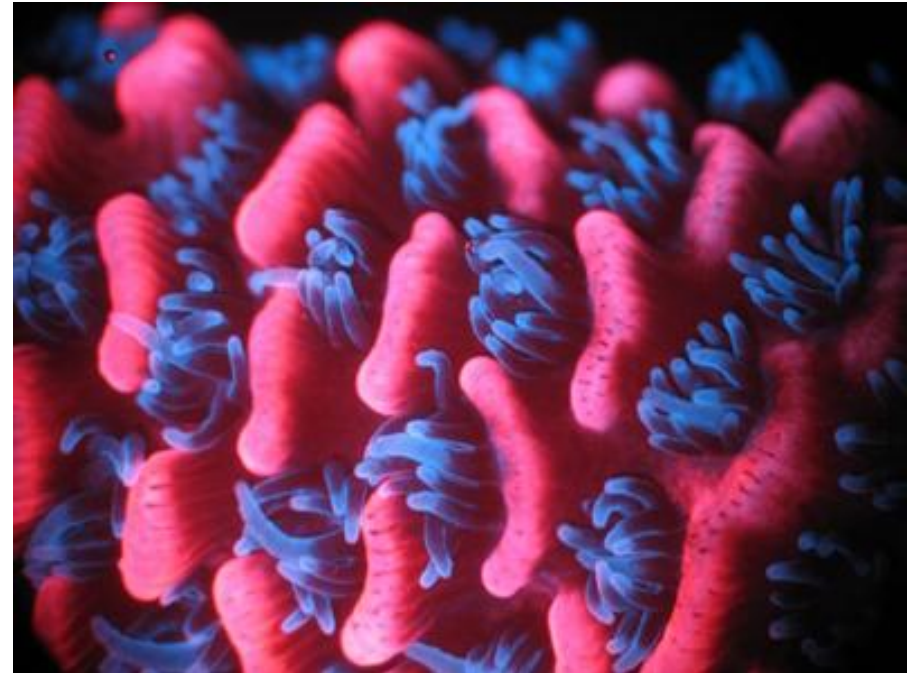
Fluoreszcens kvantumpöttyökkel jelölt rákos daganatok



Fluoreszcens fehérjék



Aequorea victoria
(meduza)



Acropora millepora
(korall)

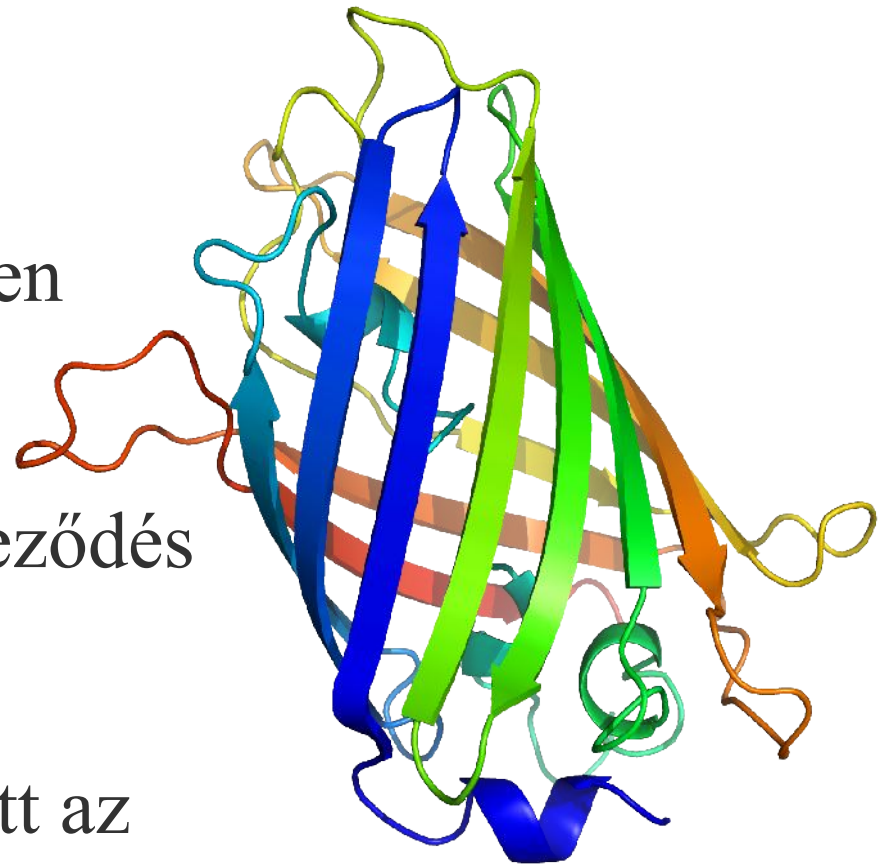
GFP (Green Fluorescent Protein)

2008. évi kémiai Nobel díj

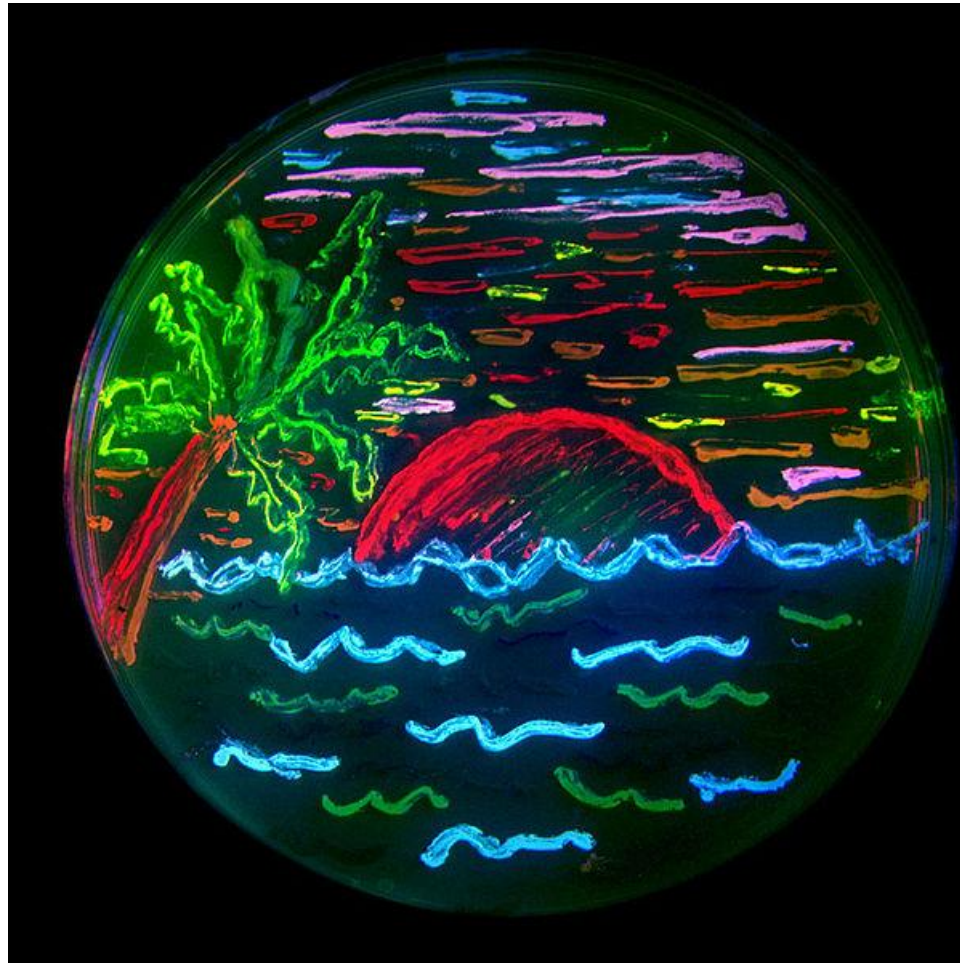
Osamu Shimomura – a '60 as években izolálta és elkezdte tanulmányozni

Martin Chalfie – 1994-ben génkifejeződés indikátoraként használta

Roger Y. Tsien – 1995-ben előállított az első javított változatot



A fluoreszcens fehérjék sokfélesége



A kép teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal van festve.

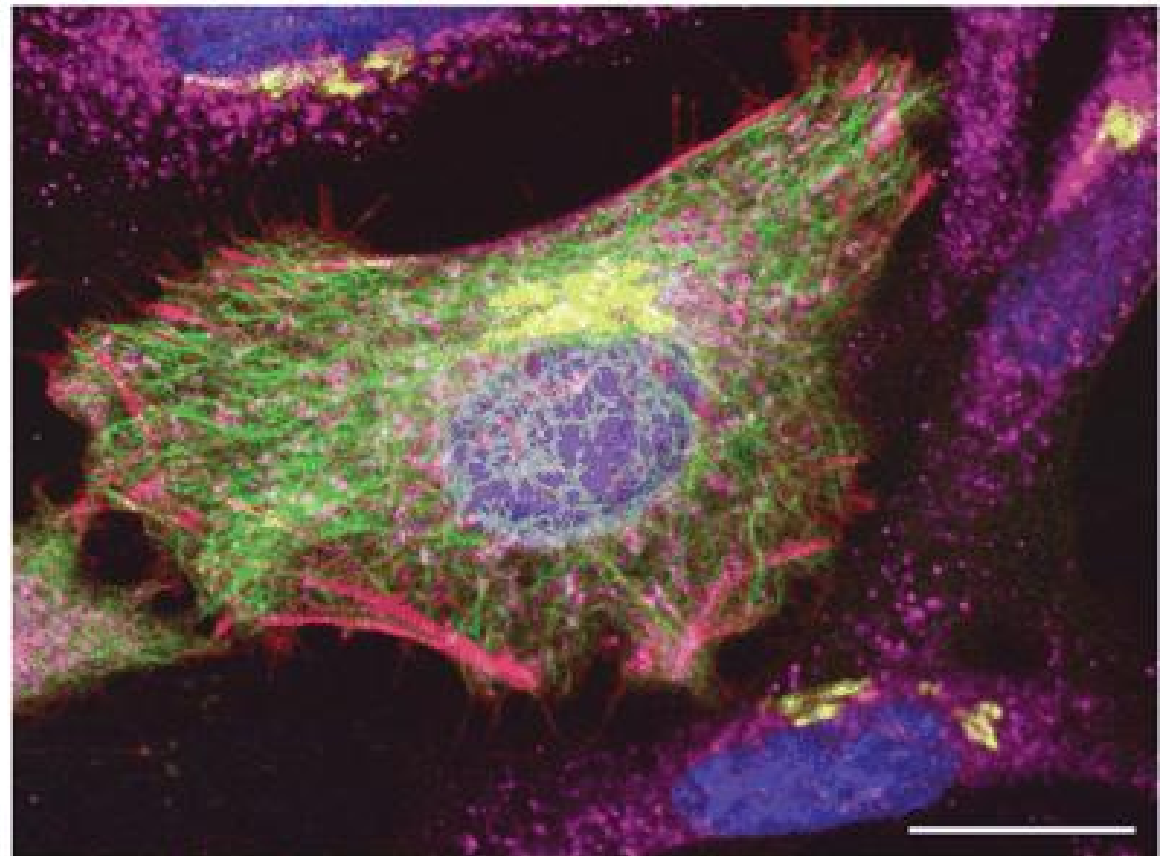
Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása

Excitation (nm): 800 (2 photon)	488	432	568	637	
Emission (nm): 410-490	500-530	555-565	580-620	>660	
Fluorophore:	Hoechst	GFP	QD565	ReAsH	Cy5
Targeting:	direct affinity	genetic	immuno	genetic	immuno
Target:	DNA	α -tubulin	glantin	β -actin	Cytochrome c
Structure:	nuclei	microtubules	golgi	stress fibers	mitochondria



Öt különböző módszerrel
megfestett HeLa sejtek.

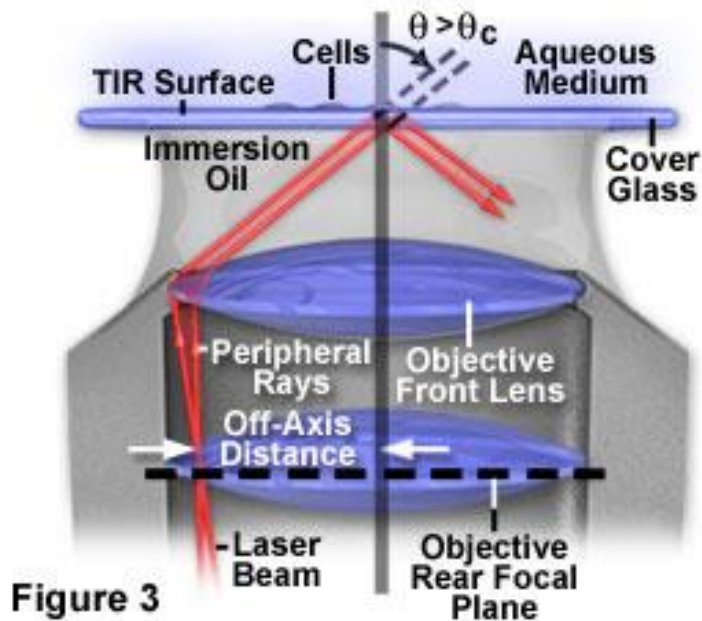
A vonal 20 μ m hosszú.



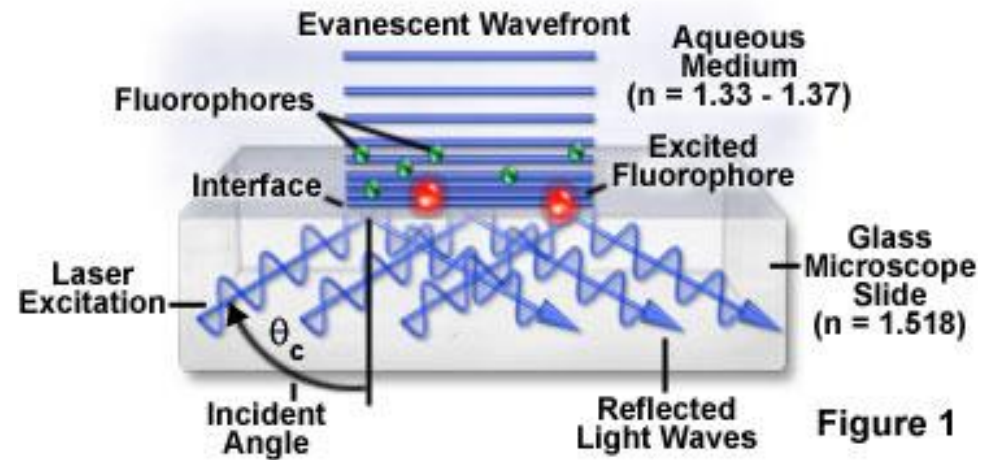
TIRF

csak egy vékony szelet, a minta alja látható

High Numerical Aperture Objective TIRFM



Total Internal Reflection Fluorescence



Cell Focal Adhesions in Widefield and TIR Fluorescence

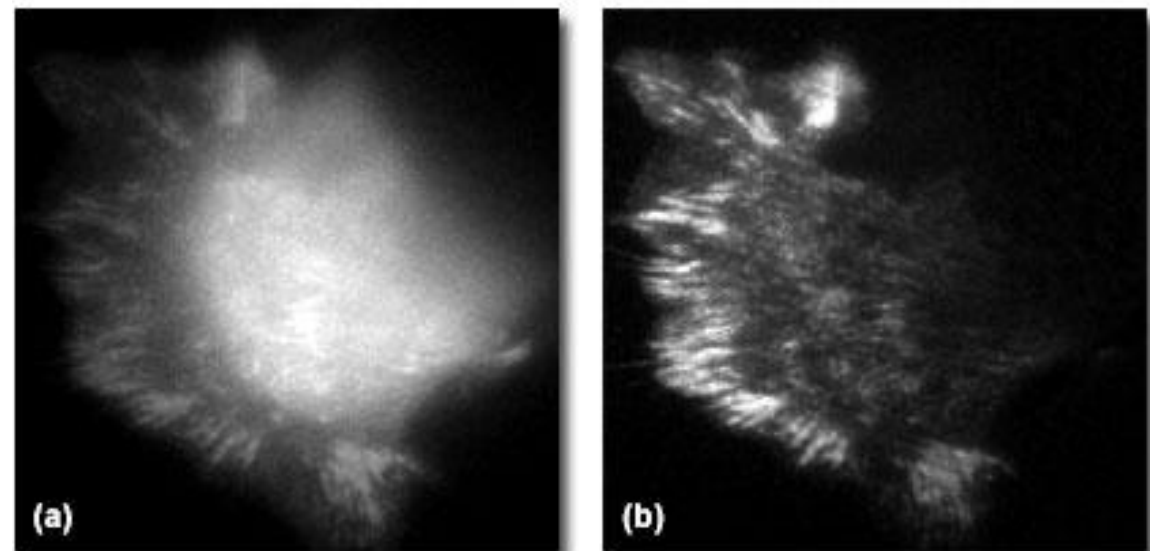
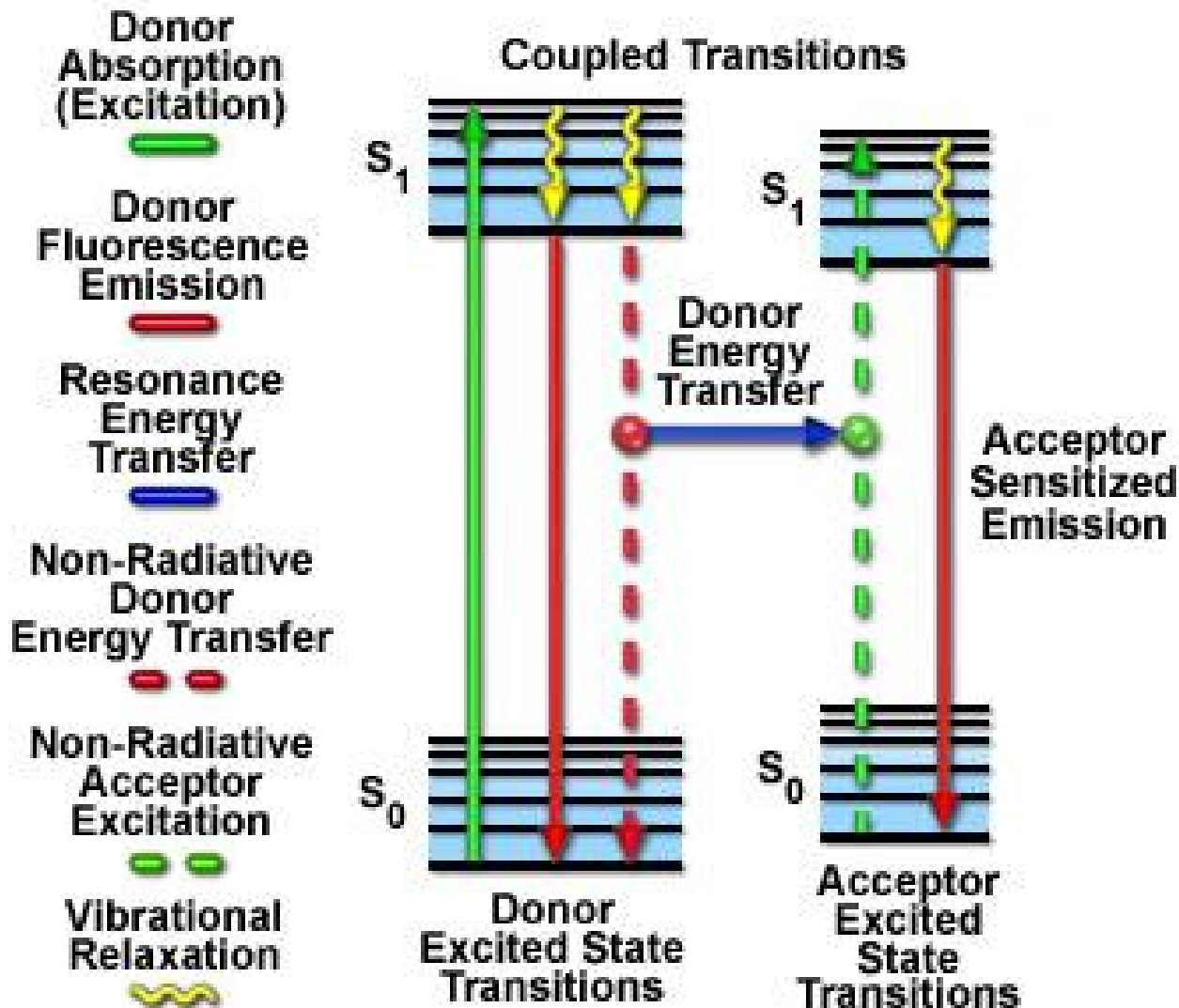


Figure 5

FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram

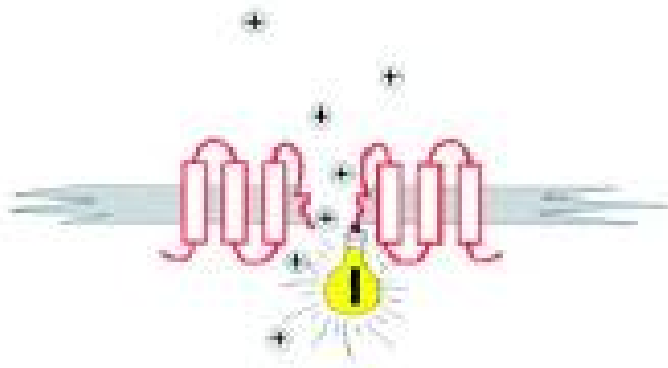


Az energiatranszfer hatásfoka:

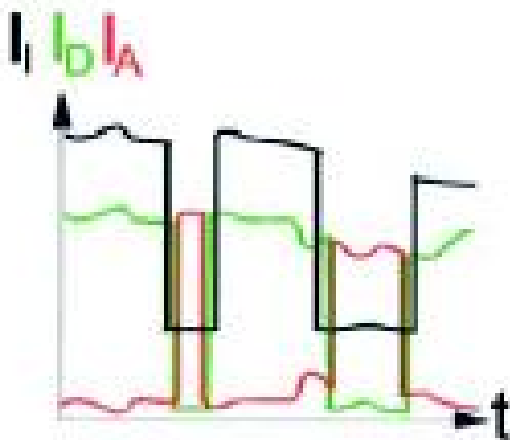
$$K_T = (1/\tau_D) \cdot [R_0/r]^6$$

Ahol τ_D és R_0 a festékpárra jellemző állandók, r a festékek közötti távolság.

Fluoreszcens indikátorok



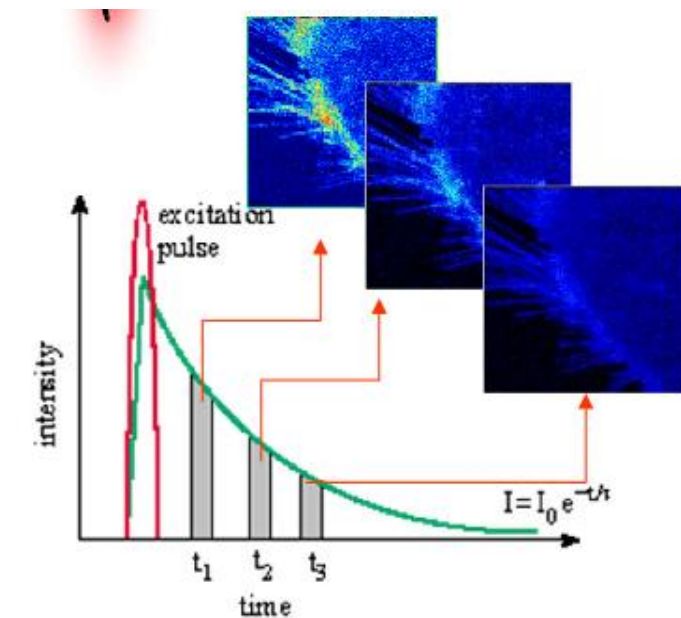
Ioncsatorna működése
a helyi ionkoncentrá-
ció mérése alapján



Ionkoncentráció és
konformációs változá-
sok együttes mérése

FLIM- fluoreszcencia élettartam kép

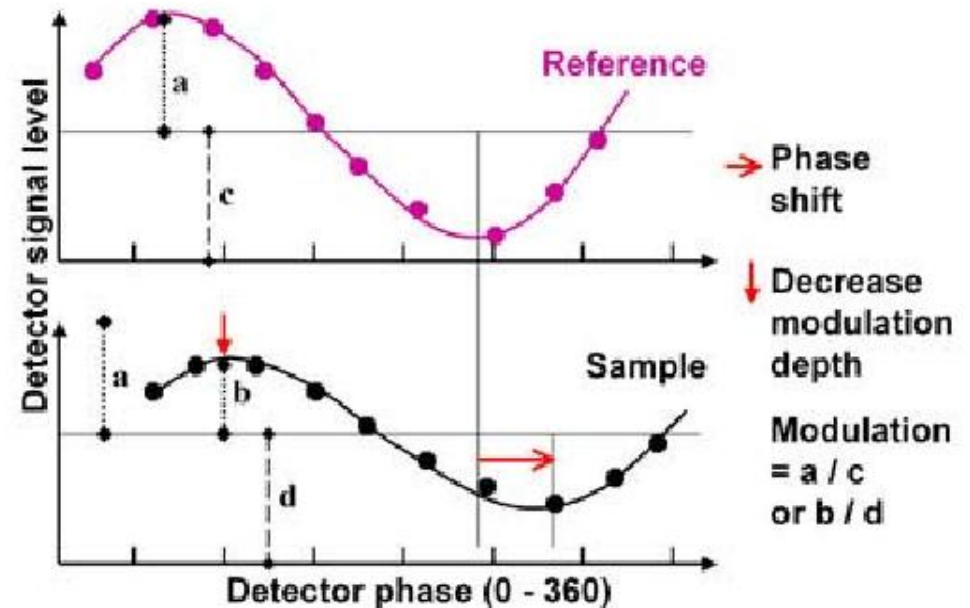
idő alapú mérés



A sample is flashed many times by a short duration laser source

The histogram of the time intervals between the excitation flash, and 1st emitted photon is measured

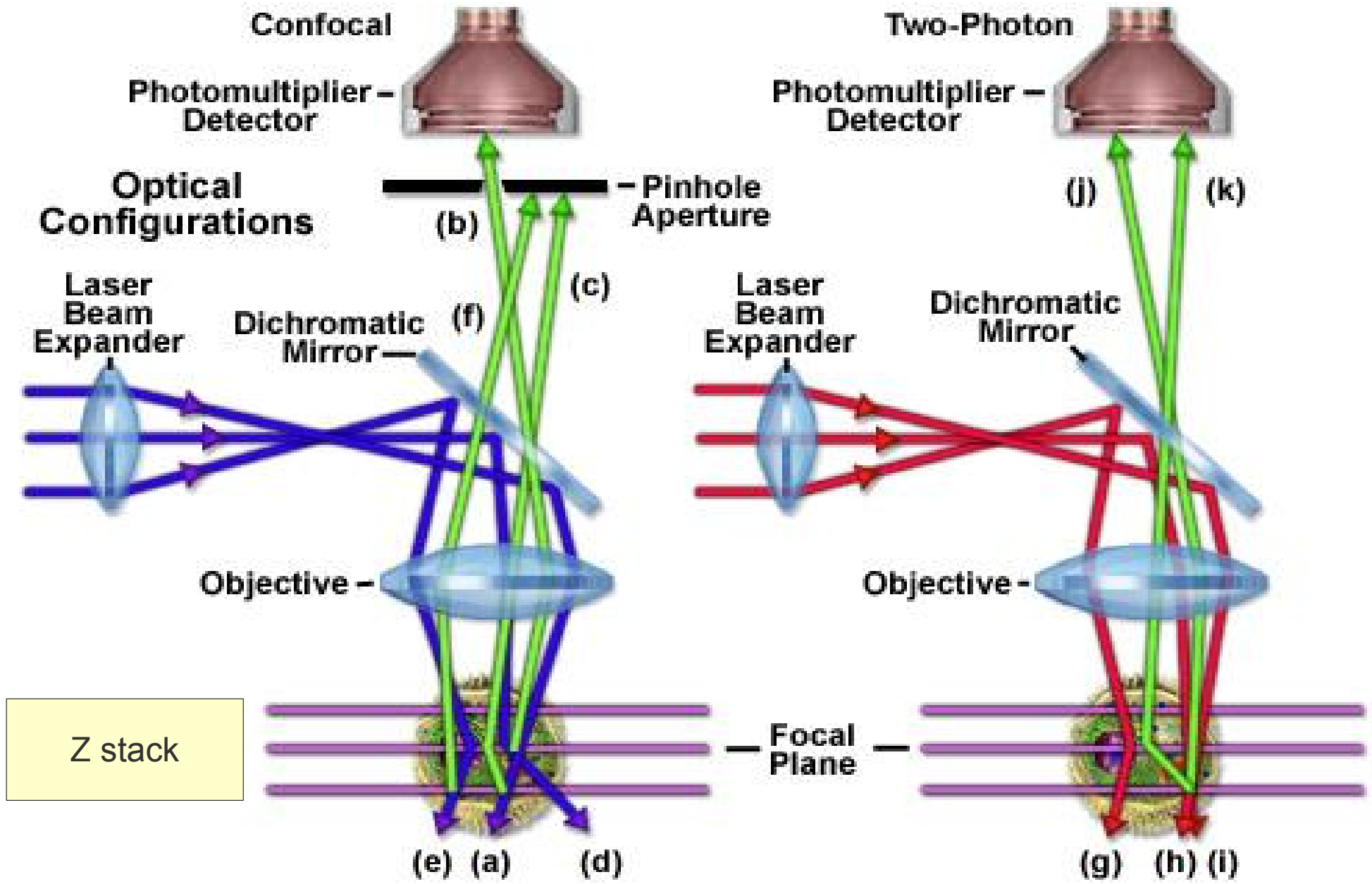
frekvencia alapú mérés



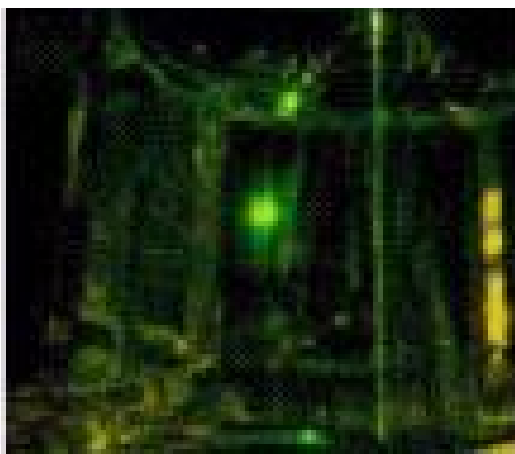
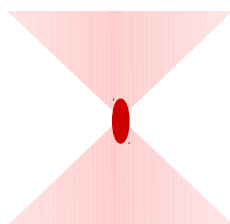
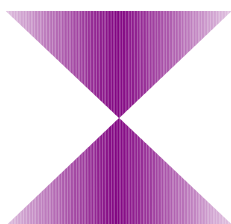
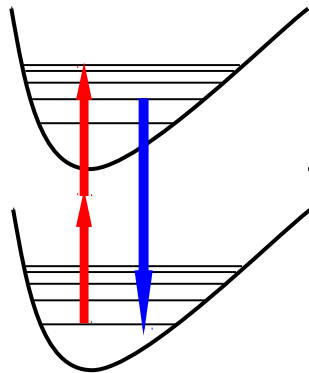
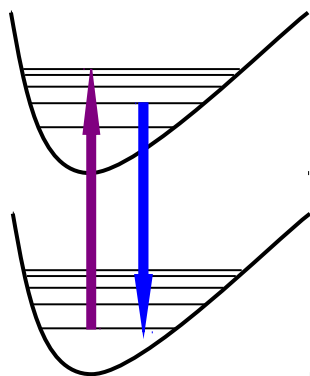
A sample is excited by a modulated light source

The fluorescence emission has the same frequency but is modulated and phase-shifted from the excitation source

Konfokális és multifoton mikroszkóp



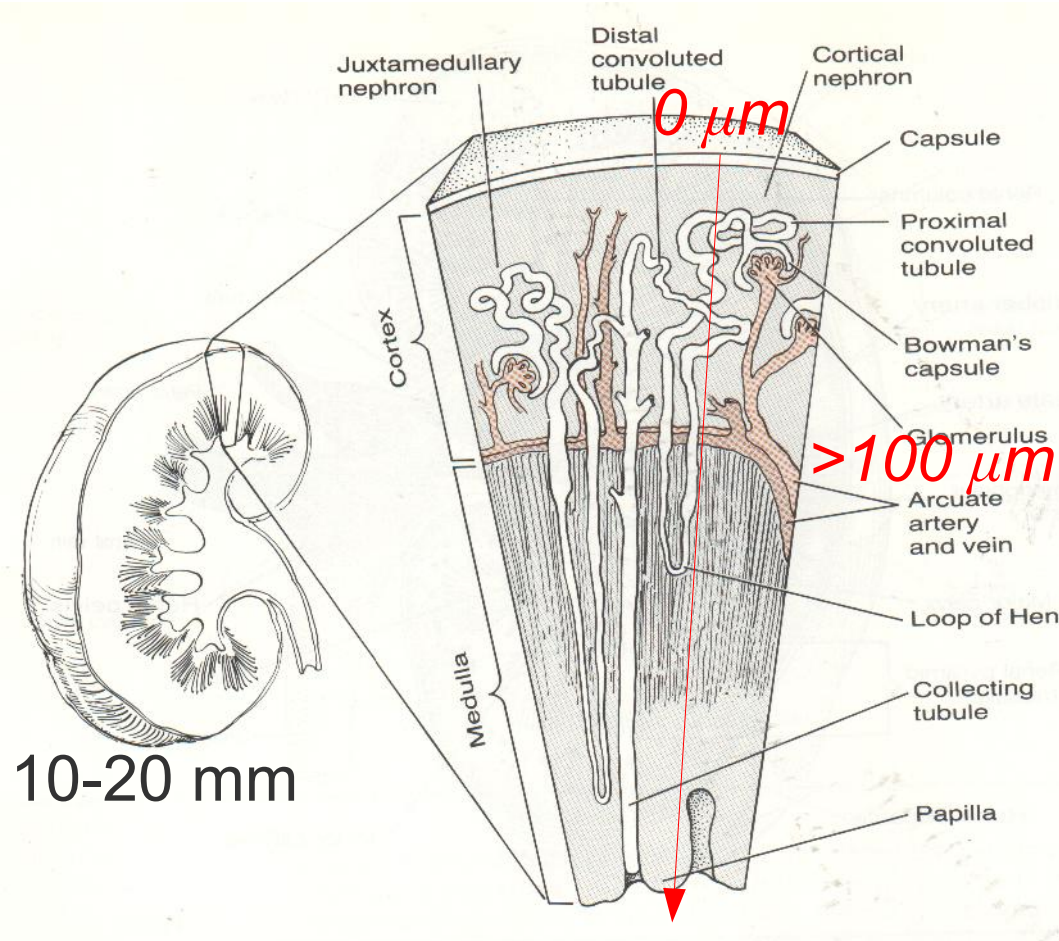
Egyfotonos és kétfotonos gerjesztés



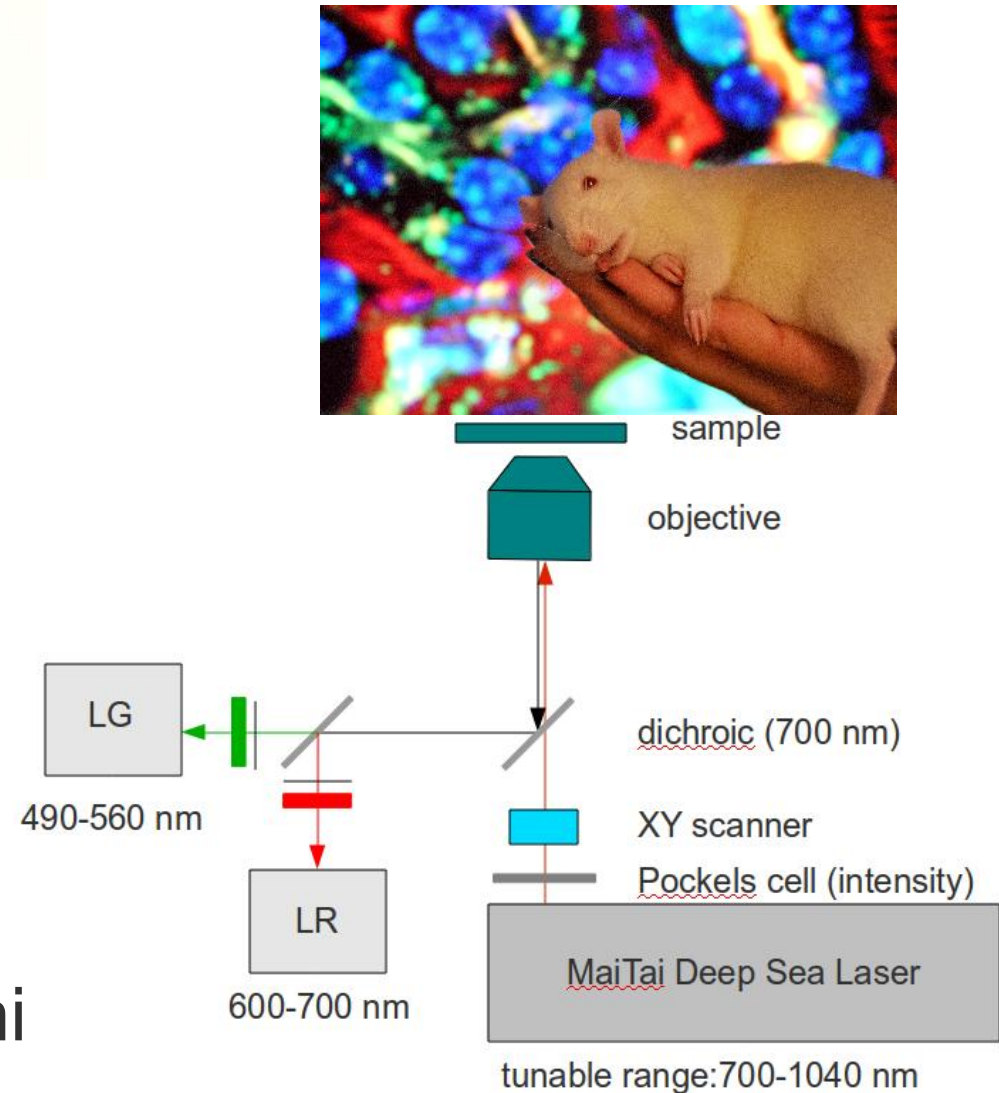
Miért jobb a kétfoton gerjesztés?

- csak a fókuszbán gerjeszt (femtoliternyi!)
- kevésbé szóródik a hosszabb hullámhosszú gerjesztés (szövetbe bejut)
- beépített szelekció, optikai szeletelés, 3D rekonstrukció
- a szórt fluoreszcencia fényt is össze lehet gyűjteni (csak a fókuszból származhat)
- kevésbé ég a minta
- autofluoreszcencia (festék nélkül is látszik)
- UV helyett láthatóban gerjeszt
- szimultán gerjesztés

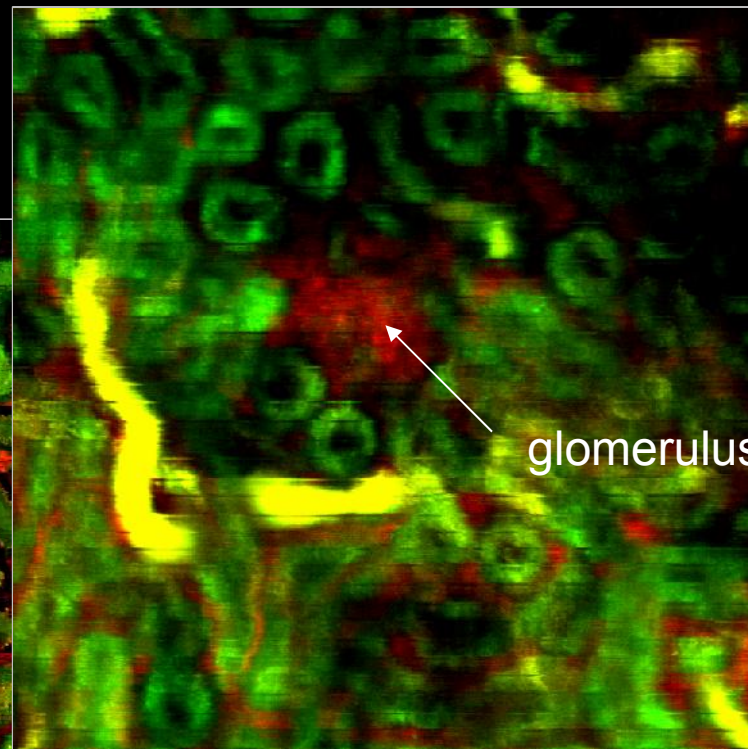
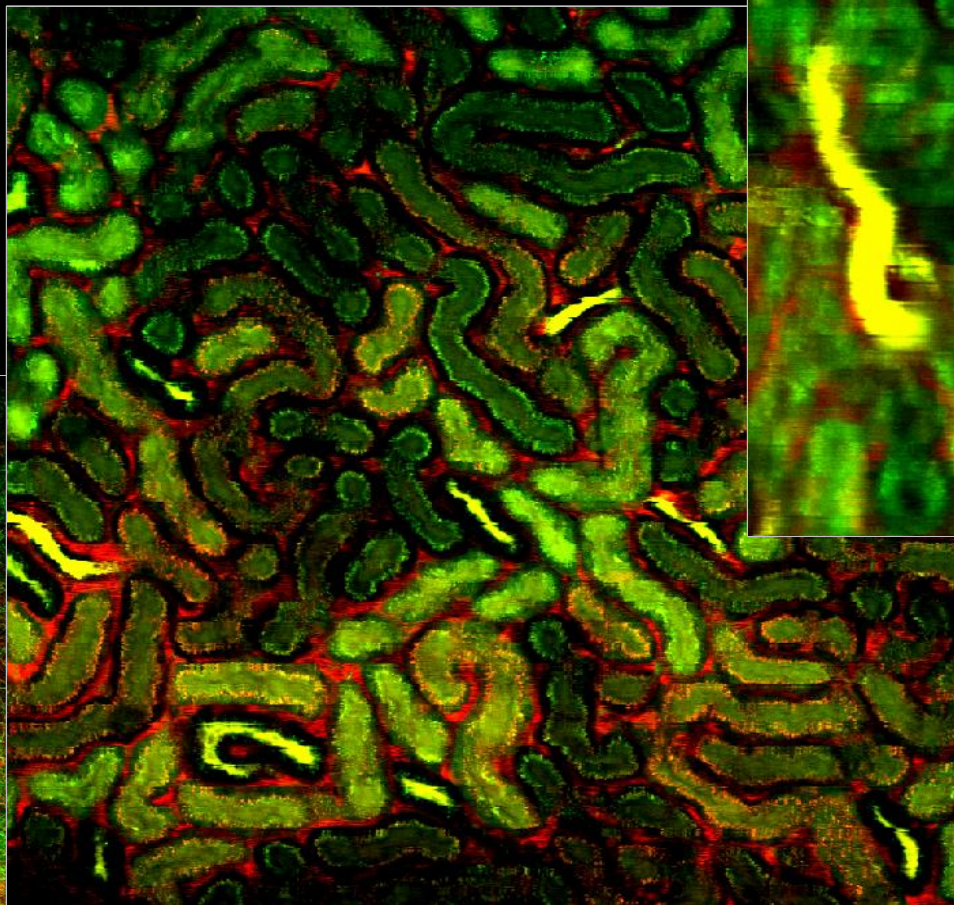
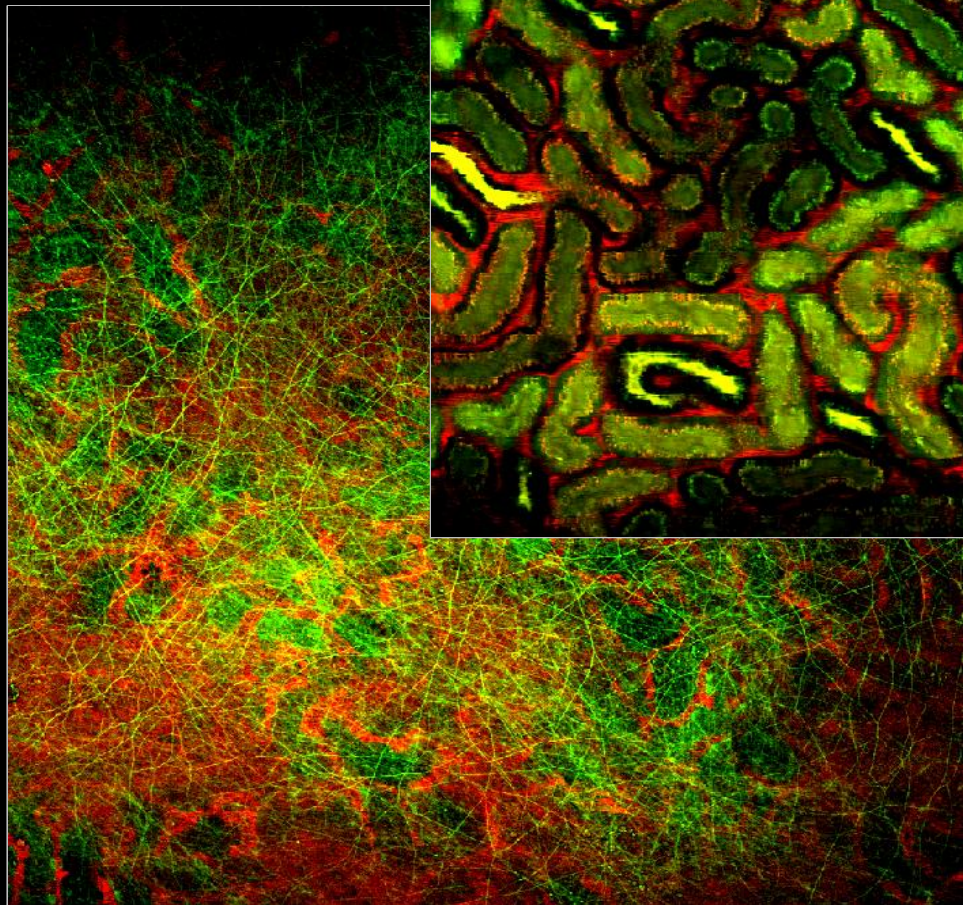
Élő vesébe látunk!



funkciót lehet tanulmányozni
IN VIVO



- **GREEN:** autofluorescence from NADH
- **RED:** 70 kDa rhodamin dextrane (blood vessels)
- **YELLOW:** Lucifer Yellow (extracellular area)
- **BLUE:** Hoechst (nuclei)



glomerulus

80 μm deep

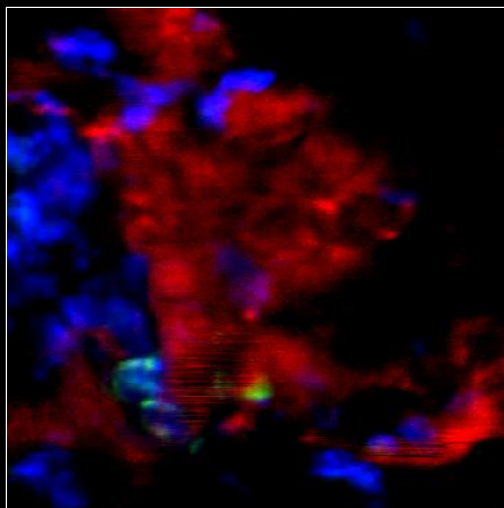
20 μm deep

0 μm deep, the capsule

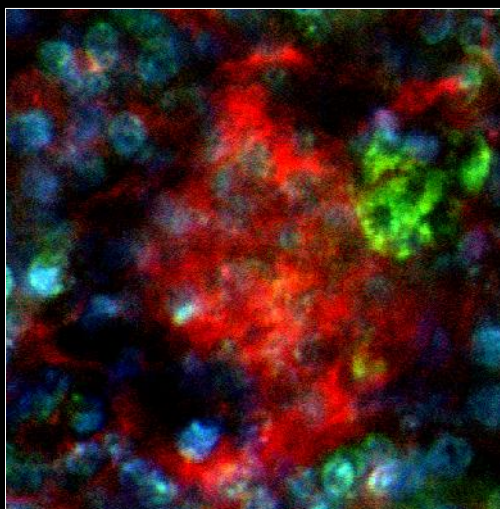
Renin termelődés a vesében immunoszuppresszáns kezelést követően multifoton mikroszkópia

glomerulus + JGA

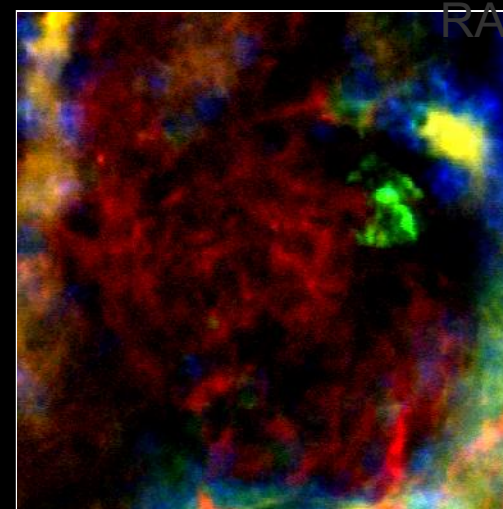
kontroll



Tac kezelt

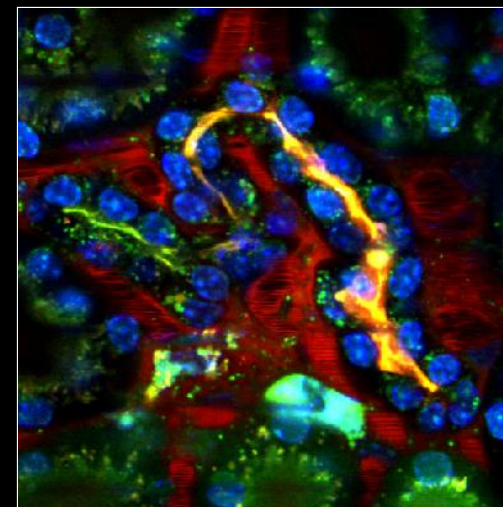
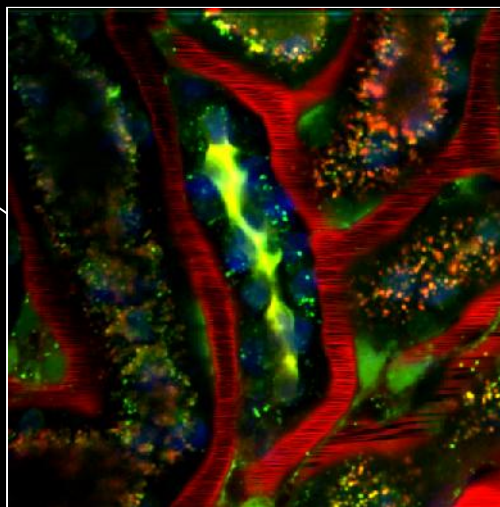
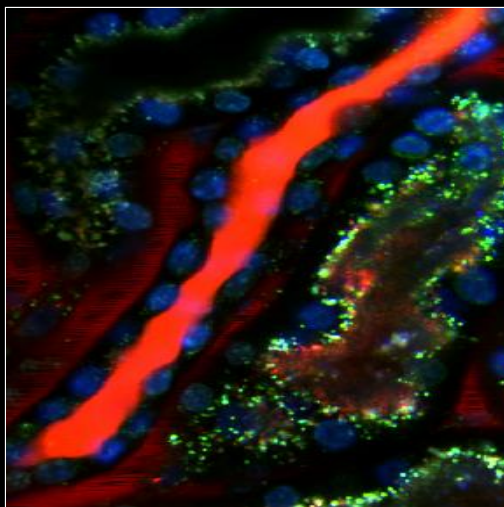


CyA kezelt

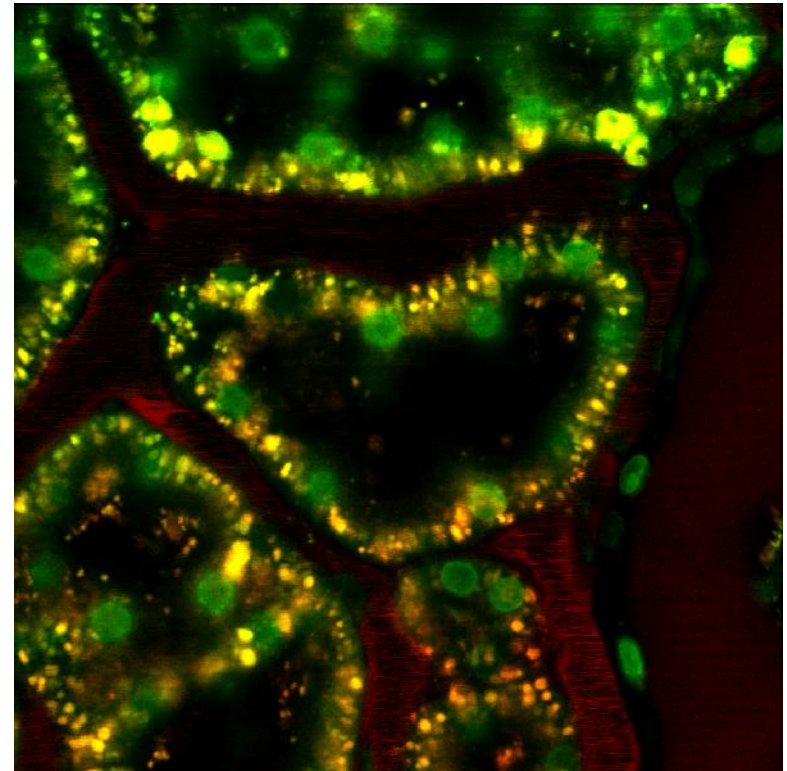
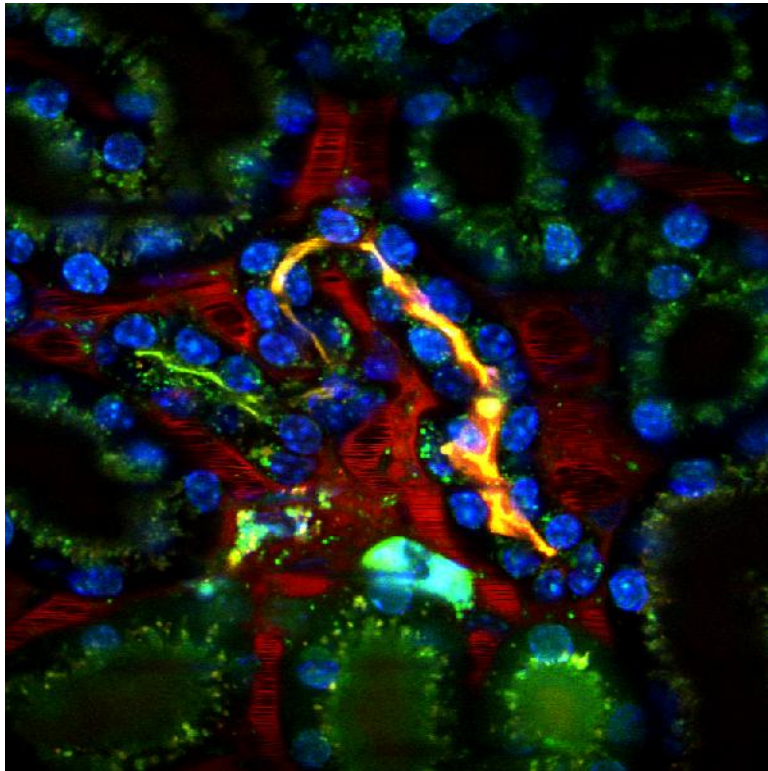


RAS gátlók

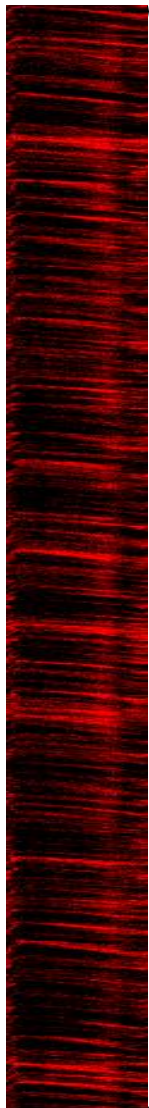
gyűjtőcsatorna



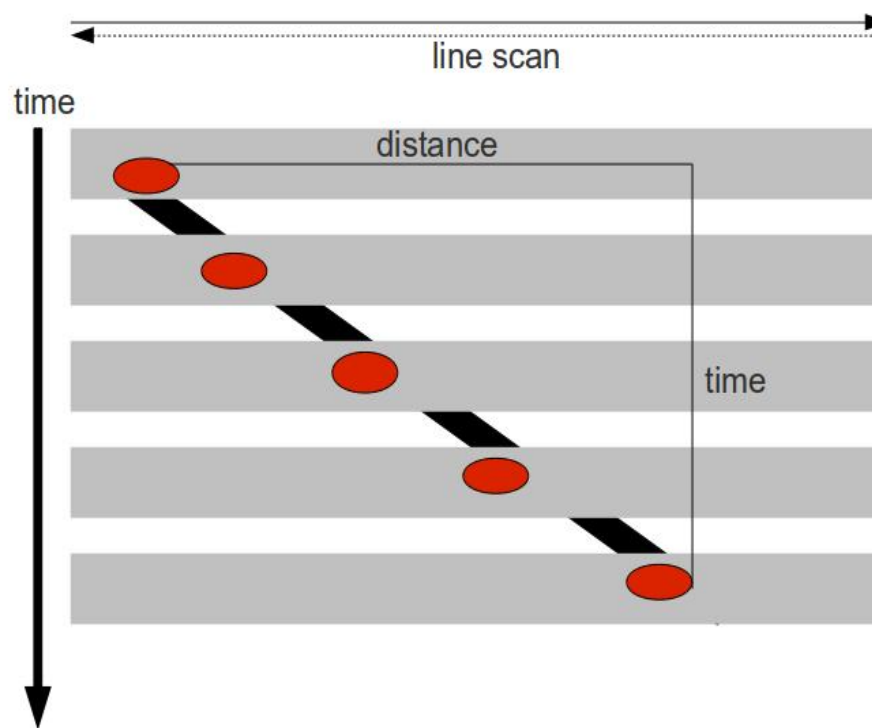
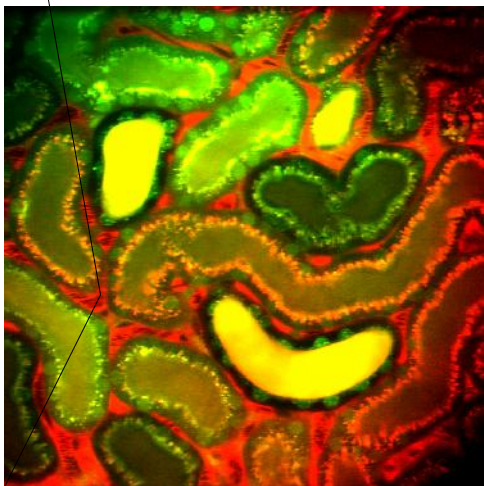
A festékek eloszlása



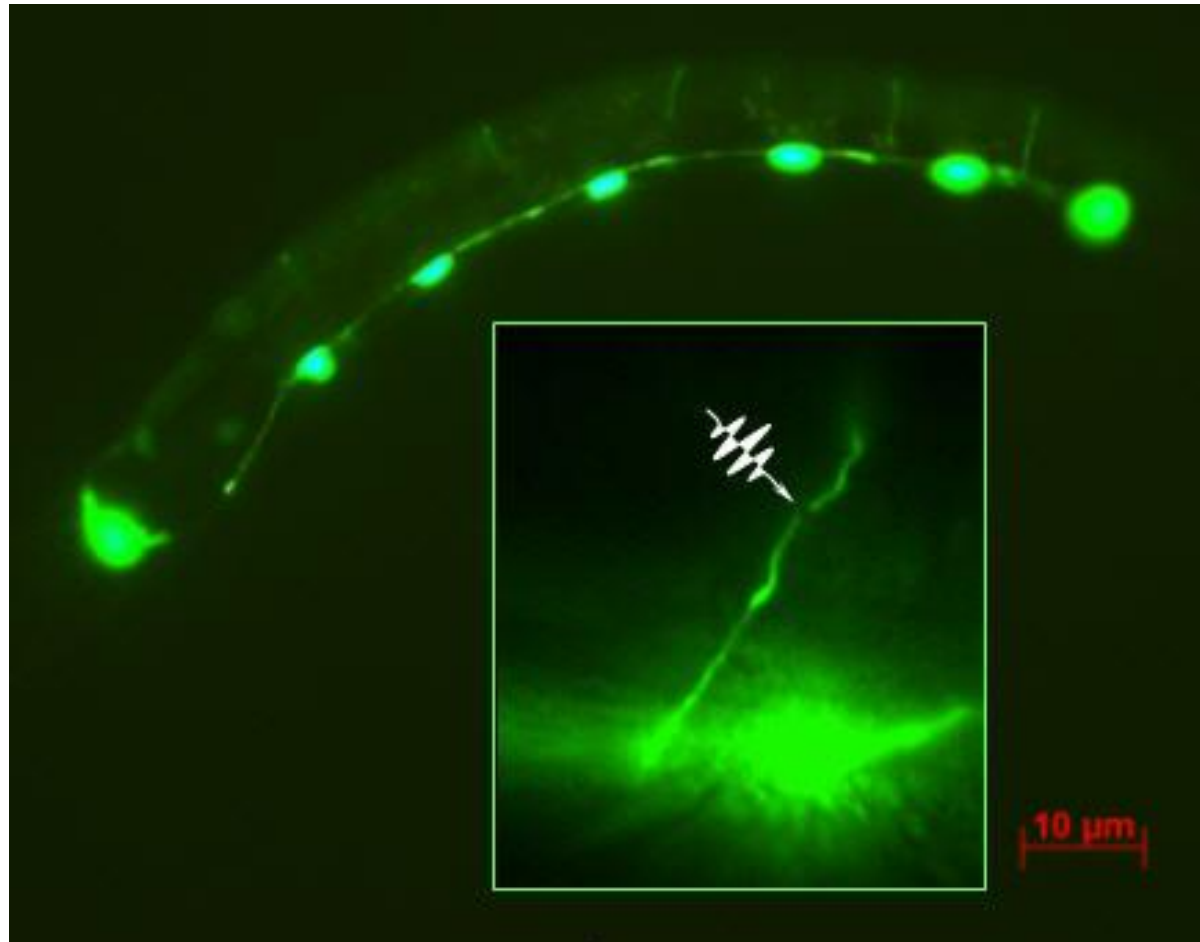
Véráramlás sebességének mérése



line scan
1 ms/line, 0.05 μm /pixel
 $V \sim 1\text{-}2\text{ mm/s}$,
diameter: 7-11 μm

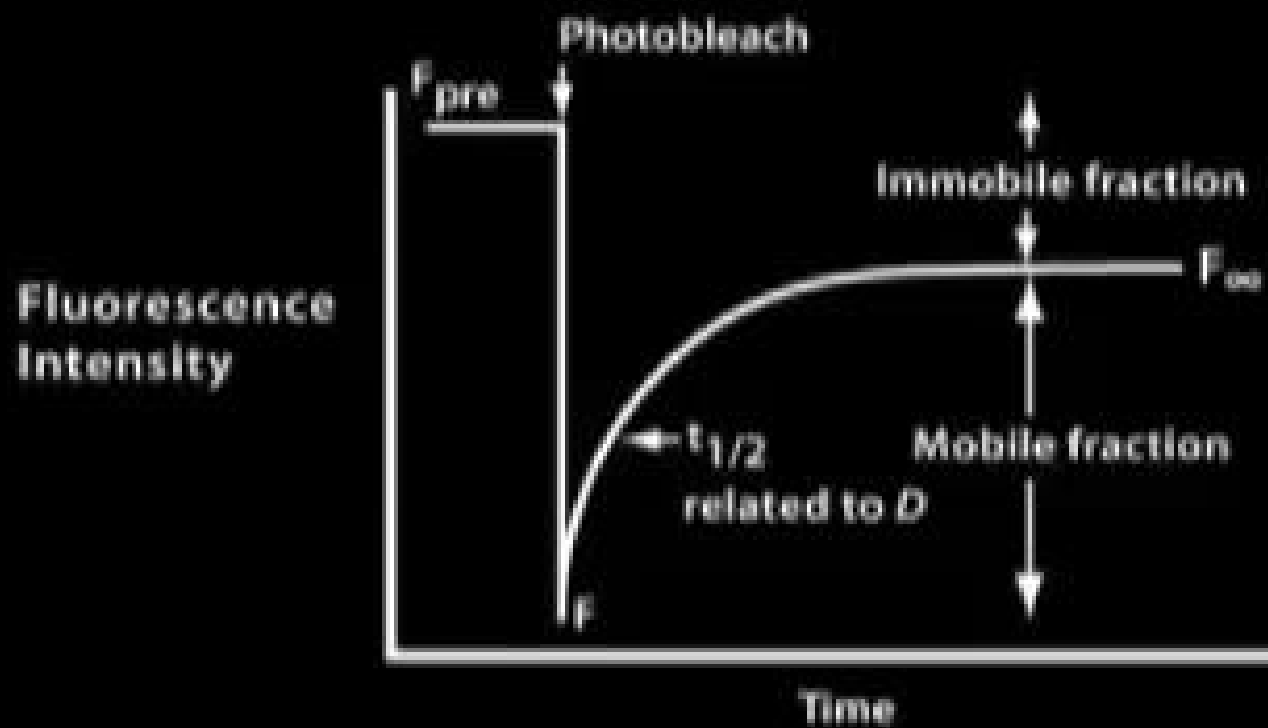


Élőlények fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



Caenorhabditis elegans 302 neuronja közül egyetlen idegsejt axonjának átvágása

FRAP

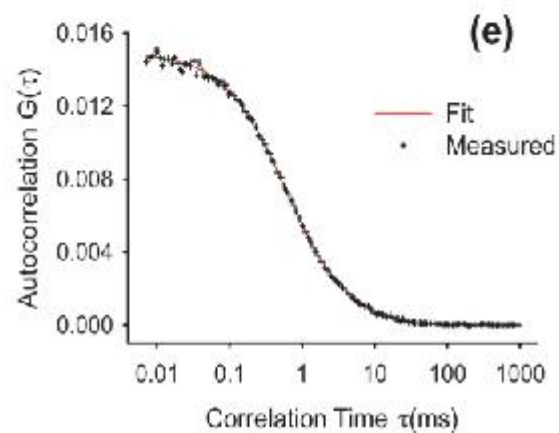
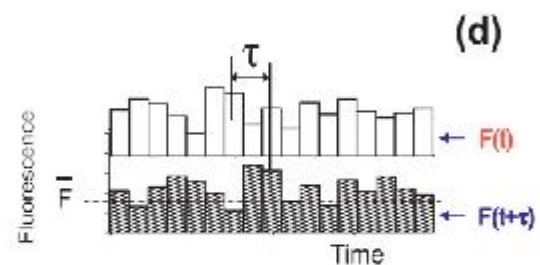
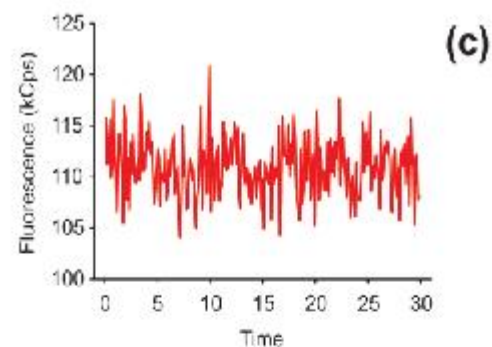
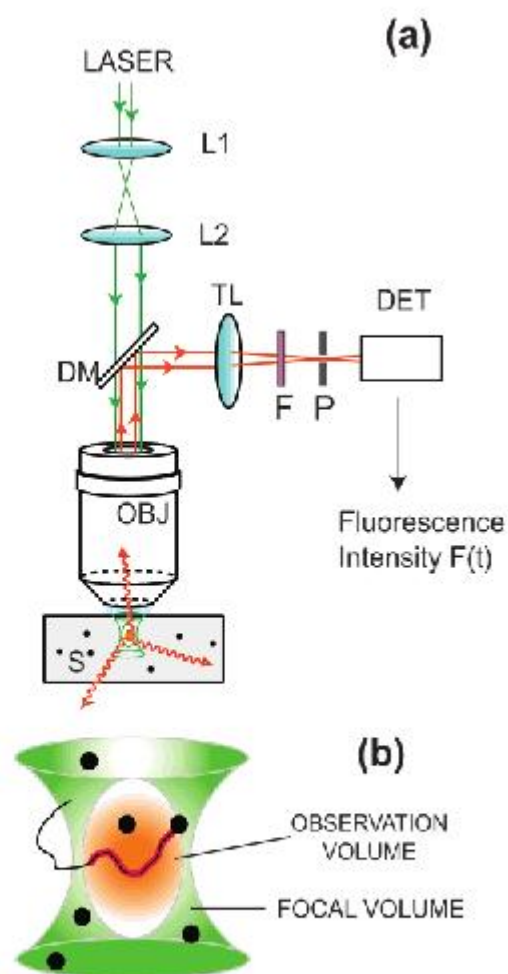


Korrelációs módszerek

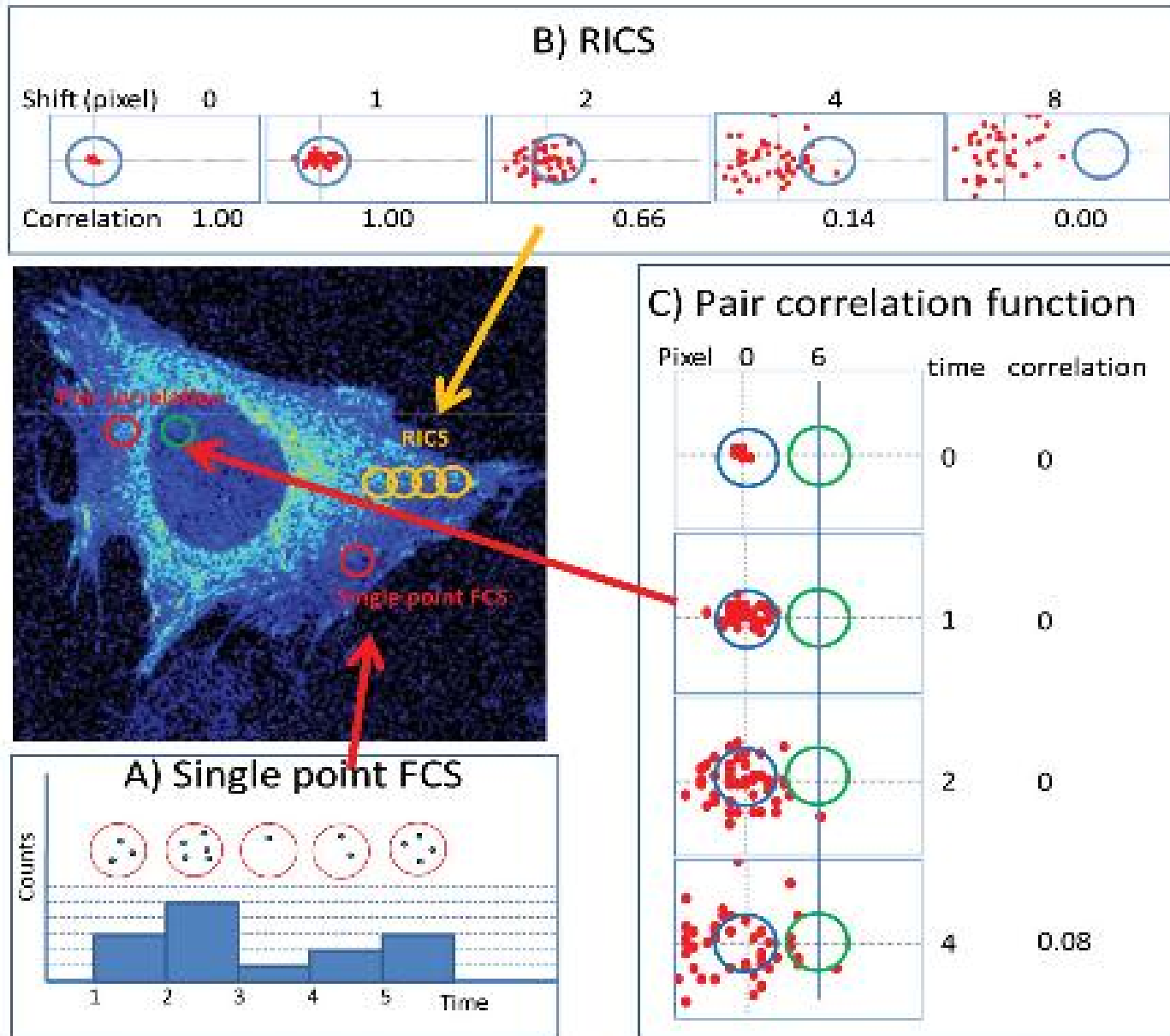
FCS

diffúziós állandó

fényesség-aggregáció

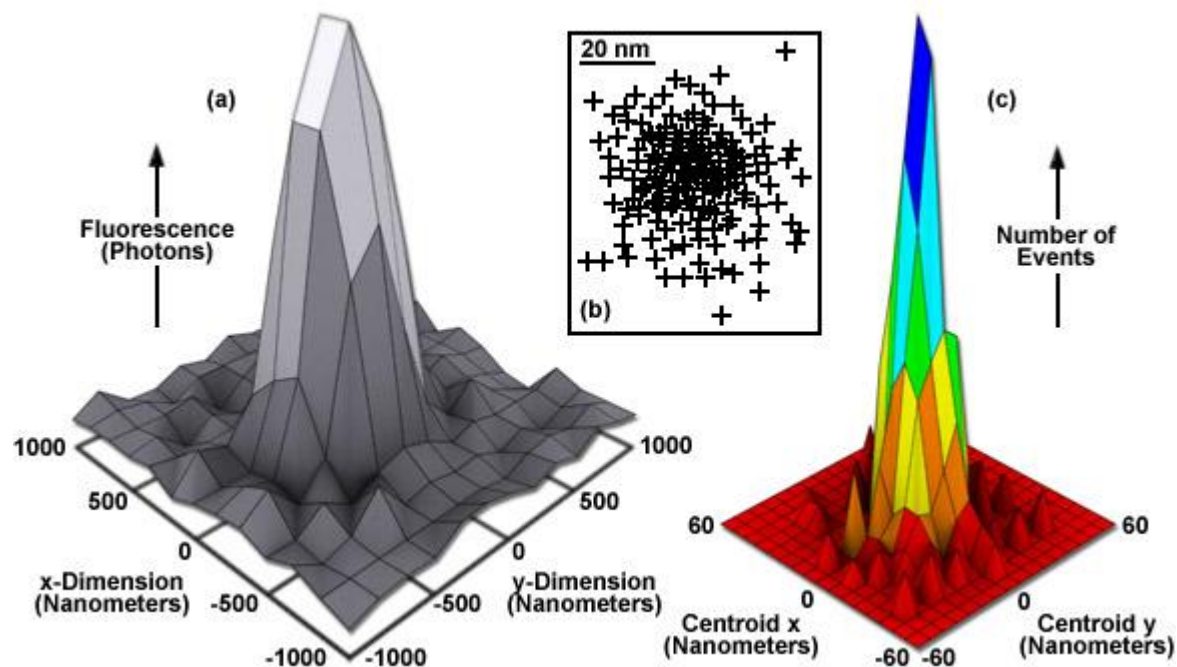


Raszter képben is van információ



vonal mentén,
kör mentén is
lehet
szkennelni

Szuperrezolúció (nanoszkóp)



LOKALIZÁCIÓ
akár nm
pontosan!

Single-Molecule Superresolution Microscopy for Precise Localization

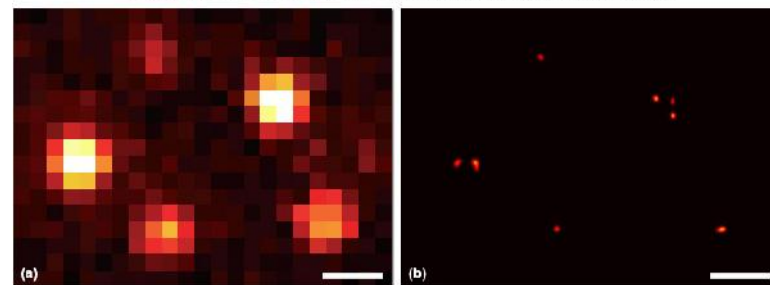


Figure 1

Basic Principle of STORM Superresolution Imaging

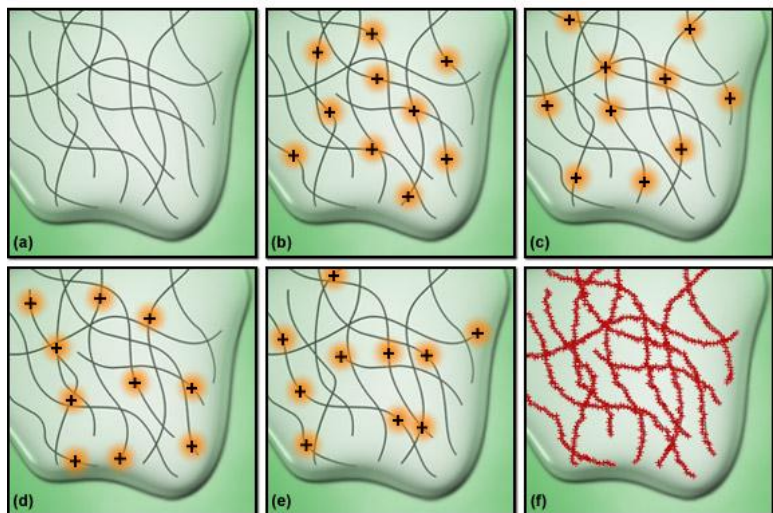


Figure 1

STORM-stochastic optical reconstruction microscopy
véletlenszerűen megvilágított szubpopuláció

PALM-Photoactivated localization microscopy
fotoaktivált szubpopuláció, mérés, inaktiválás ciklusok

STORM, PALM

STED (stimulated emission depletion)

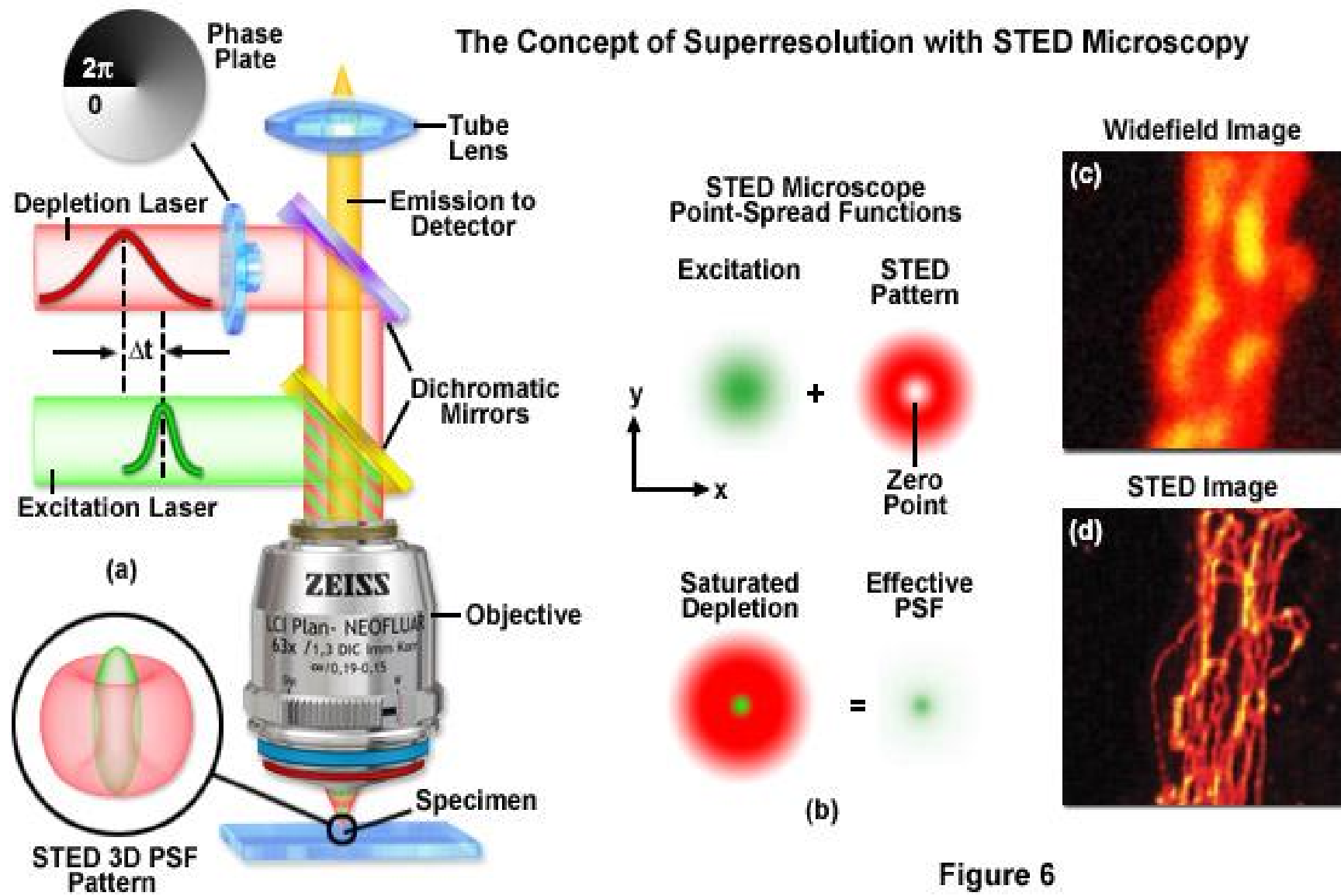


Figure 6

Irodalomjegyzék

- ZEISS zeiss-campus.magnet.fsu.edu/
- NIKON www.microscopyu.com/
- OLYMPUS www.olympusmicro.com/primer/
- LEICA www.leica-microsystems.com/science-lab/
- Invitrogen www.probes.com

- SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet biofiz.sote.hu/