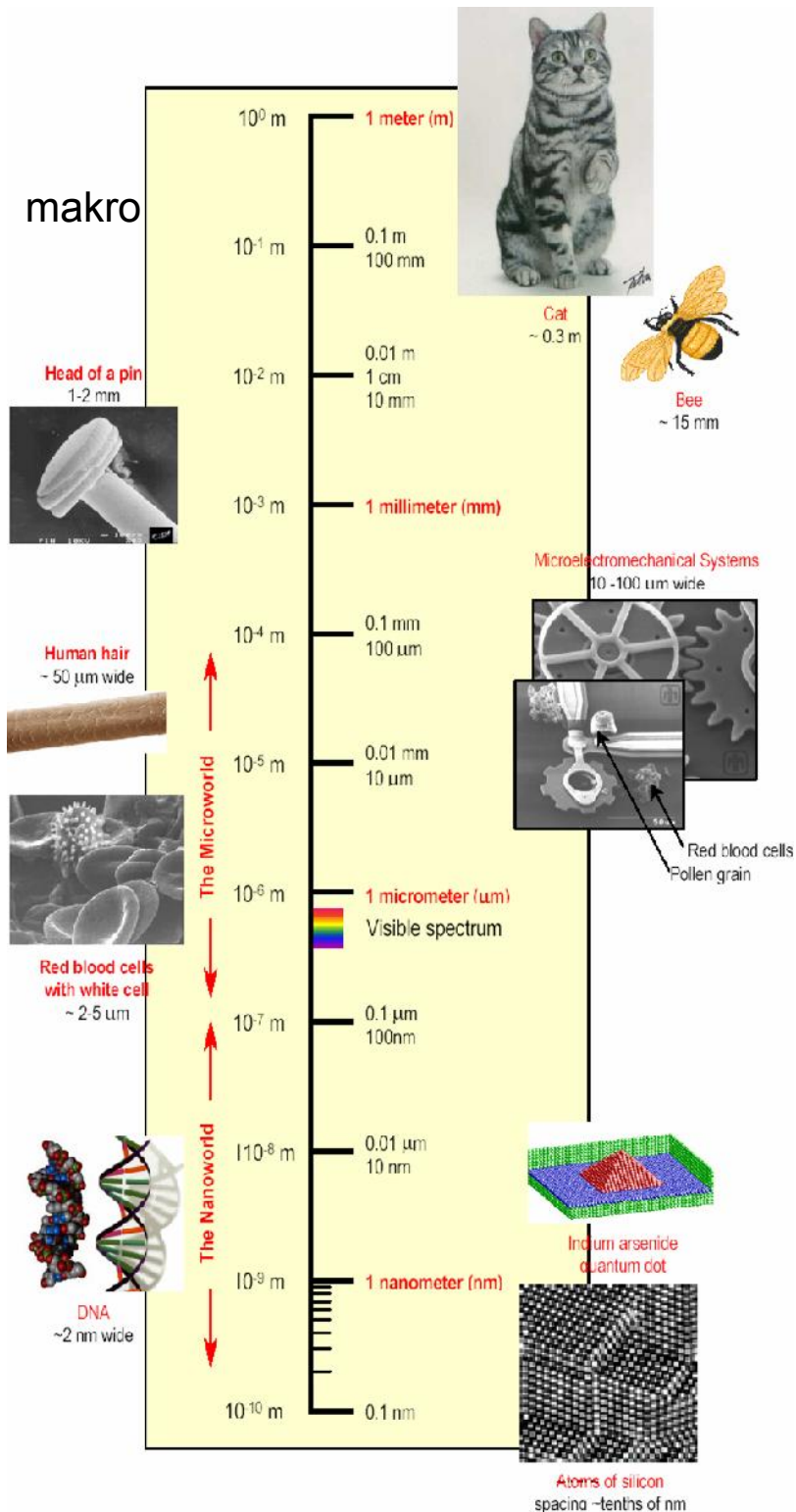


Kis Petik Katalin

Semmelweis Egyetem

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

2012.április 23



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

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

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

5500 nm

CHLOROPLAST
2000 nm

sejtek, szövetek

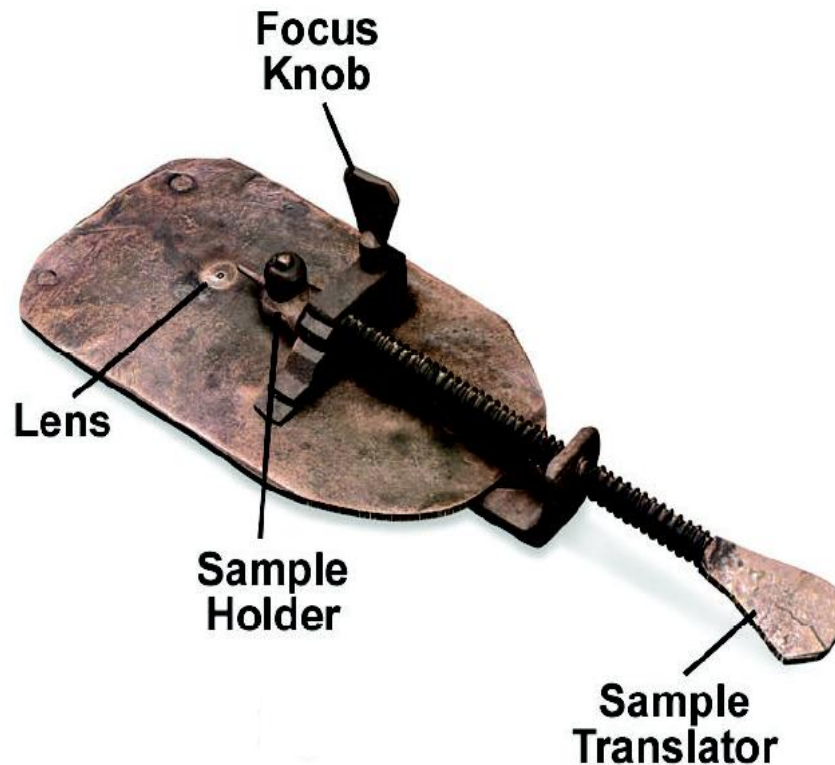
A fénymikroszkóp

- egyszerű: nagyító, lupe
- összetett: objektív és okulár
 - speciális kontraszt:
 - sötétlátótér, fáziskontraszt, polarizáció, fluoreszcencia, DIC, ...
 - modern: optikai “szeletelő” (konfokális, multifoton)
 - egyedi molekulák
 - még újabb: szuperfelbontás (STORM, PALM, STED)

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

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

Abbe elv

A mikroszkópban akkor és csak akkor tudunk feloldani két tárgyponthoz, 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

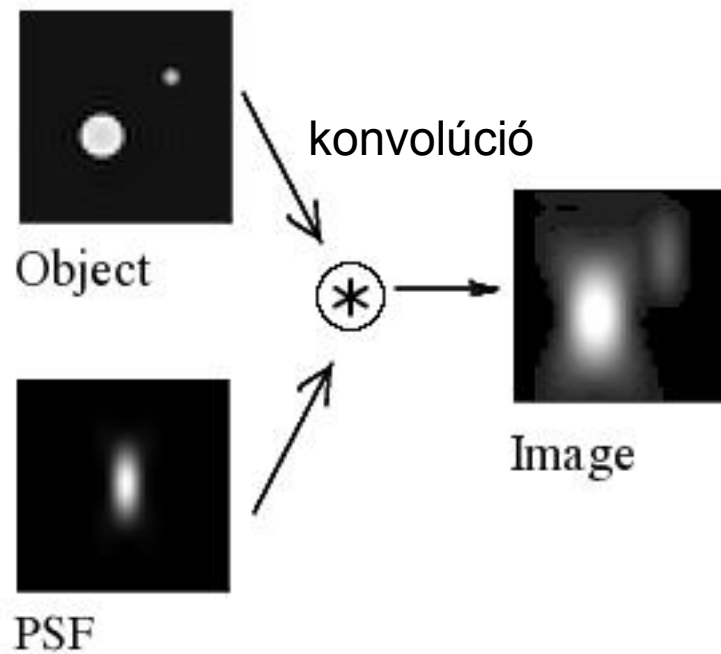


Hallgatólagos feltevések:

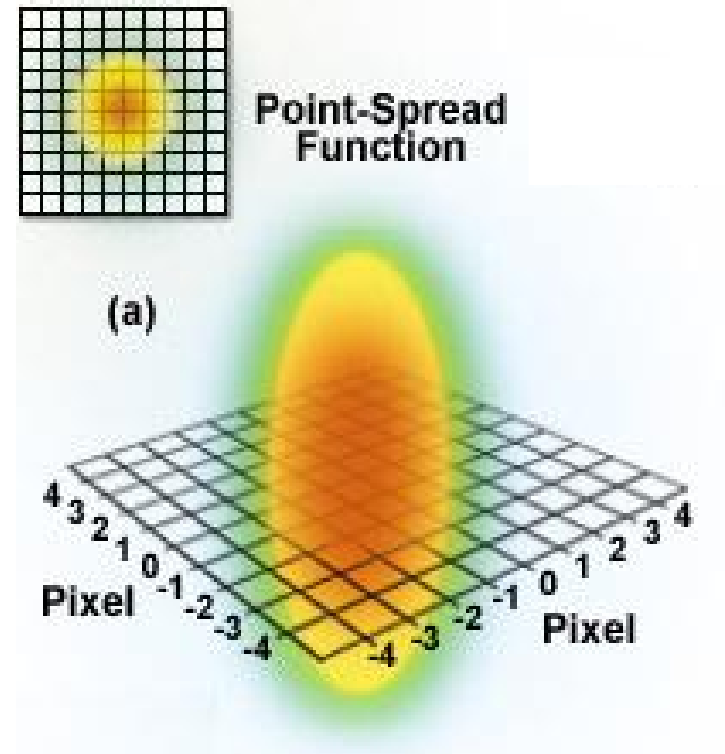
a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet;

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

PSF: point spread function

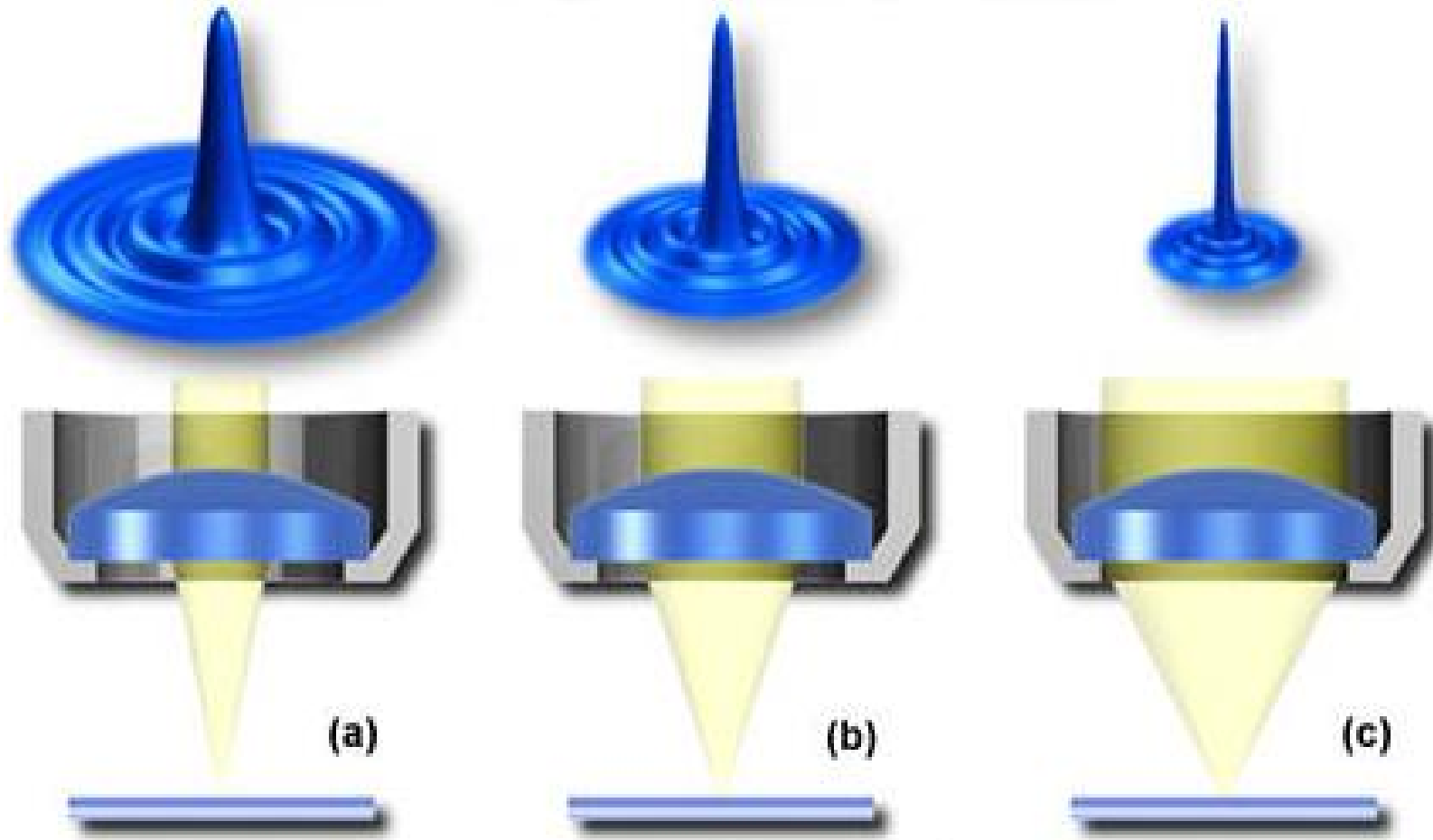


a mikroszkóp átviteli függvénye



$$F(x, y, z, x_s, y_s, z_s) = \frac{I_0}{\left(1 + \frac{(z - z_s)^2 \lambda^2}{\pi^2 w_0^2}\right)^2} \times \exp\left[-\frac{4((x - x_s)^2 + (y - y_s)^2)}{w_0^2}\right]$$

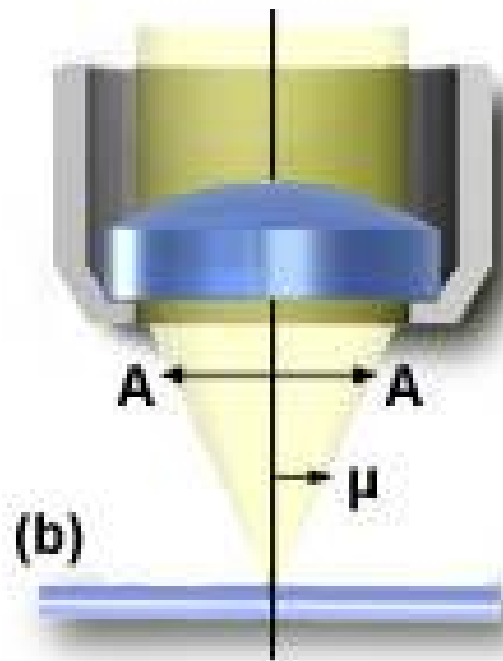
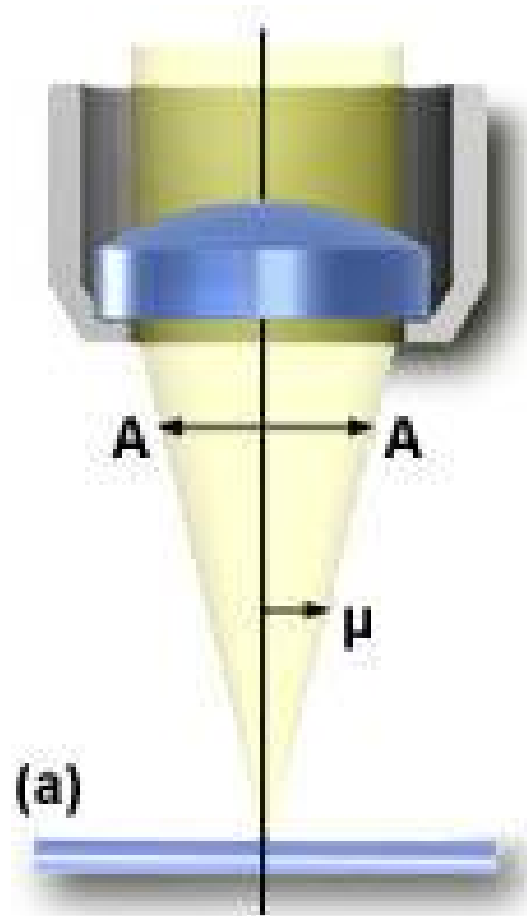
Numerikus apertúra



Mikroszkóp objektív lencsék

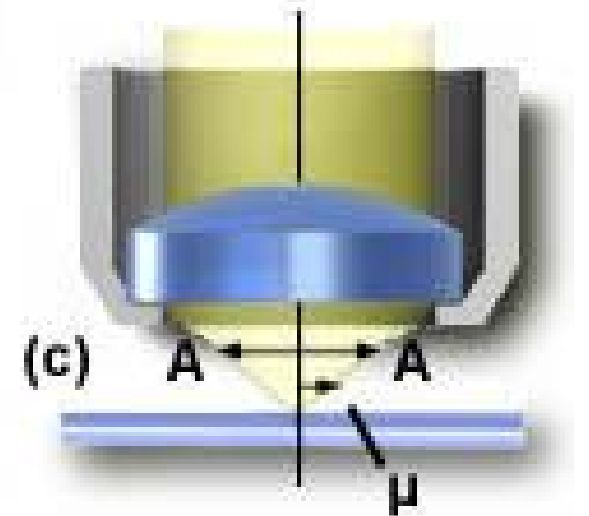


Numerikus apertura



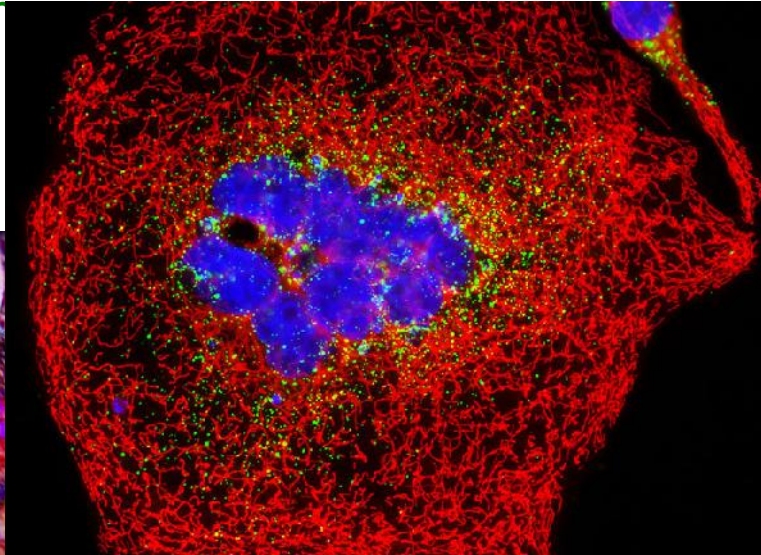
$$NA = (n)\sin(\mu)$$

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

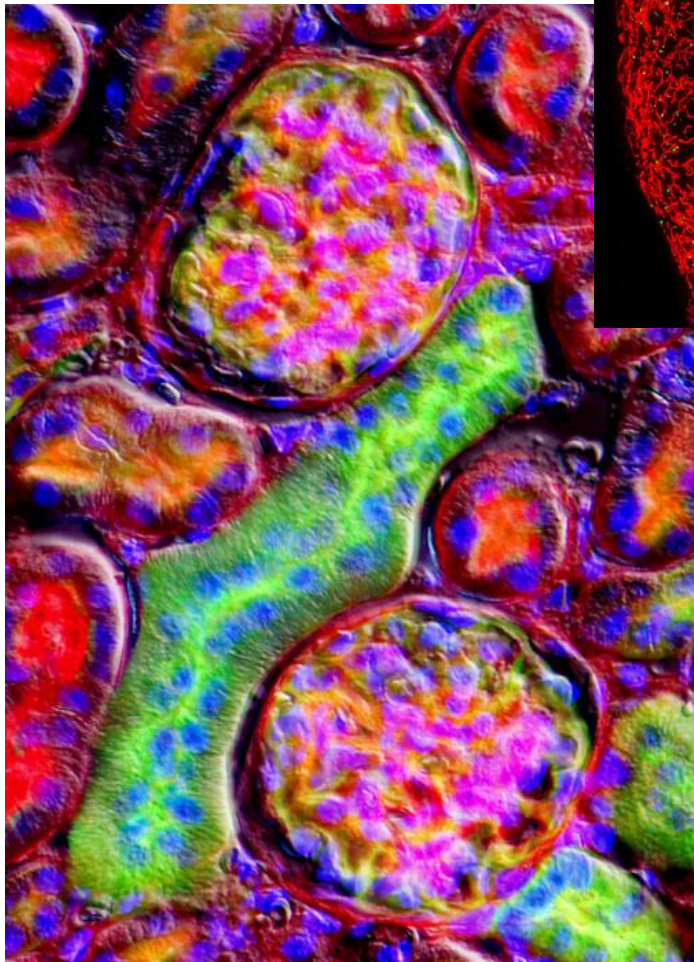


Fluoreszcencia mikroszkóp

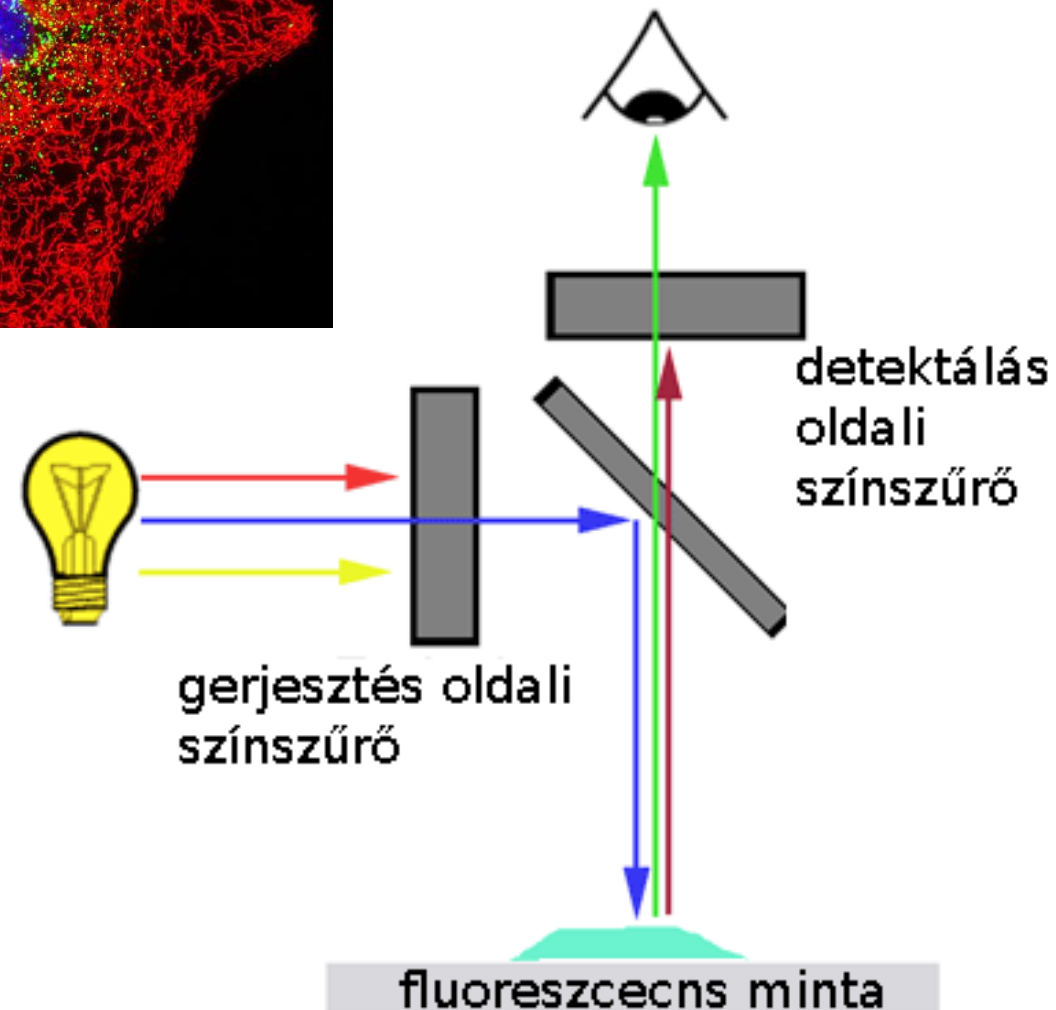
HeLasejtek: peroxiszóm
EGFP, mitokondrium,
magok: Hoechst



molekuláris kifestőkönyv



egér veseszövet



Az ideális fluorofor (festék)

- kicsi
- hidrofíl
- 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

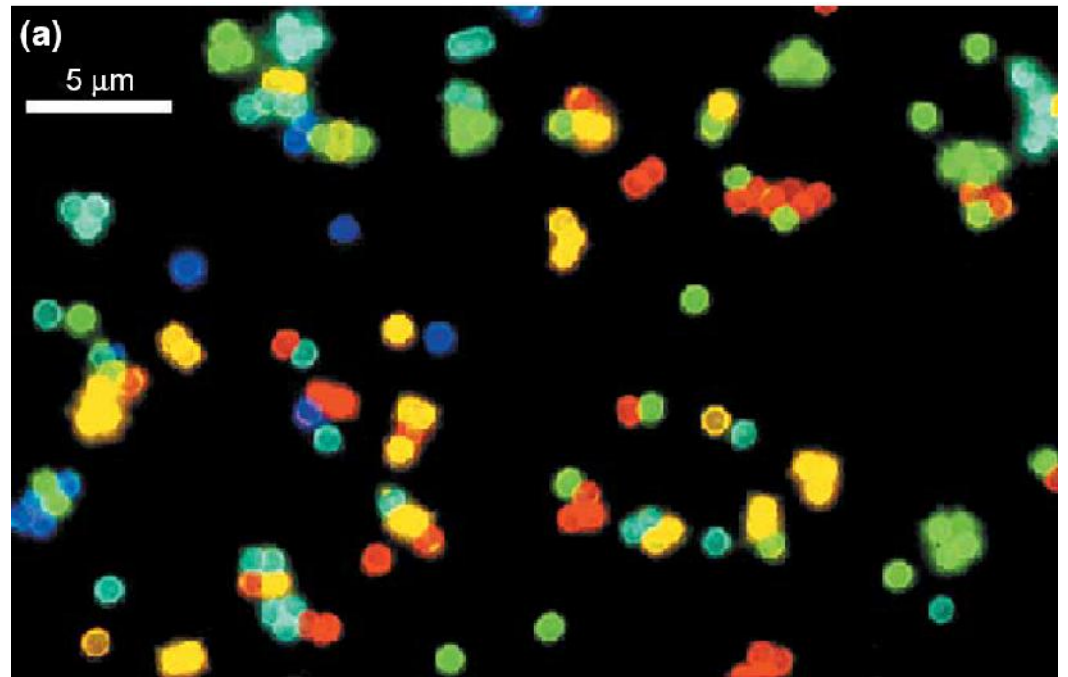


Fluoreszcens kvantumpöttyök

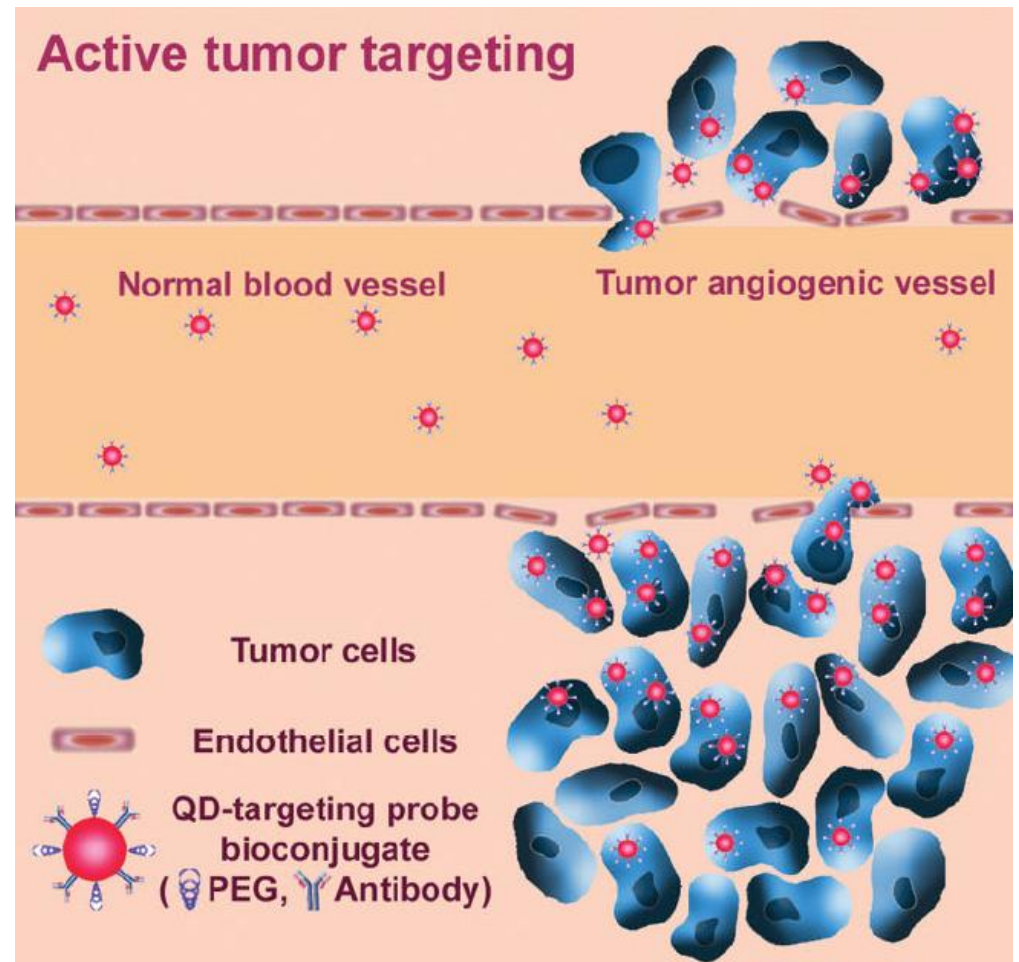
(a) CdSe-ből ZnS borítással készült kvantumpöttyök fluoreszcenciamikroszkópos képe

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)

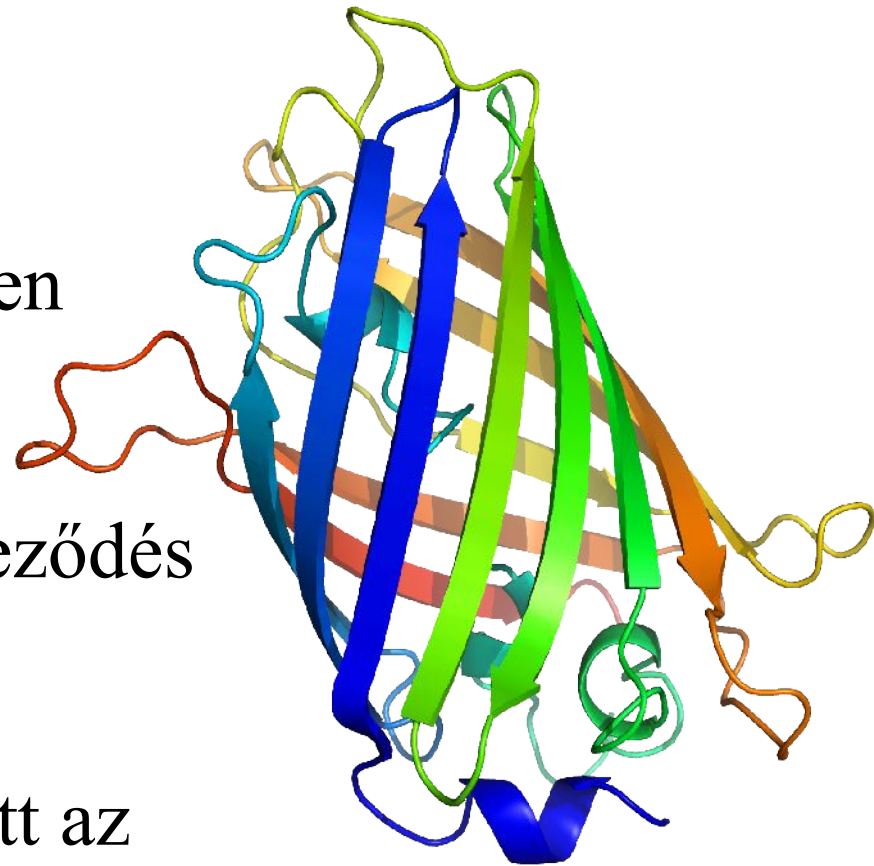
GFP (Green Fluorescent Protein)

2008. évi kémiai Nobel díj

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

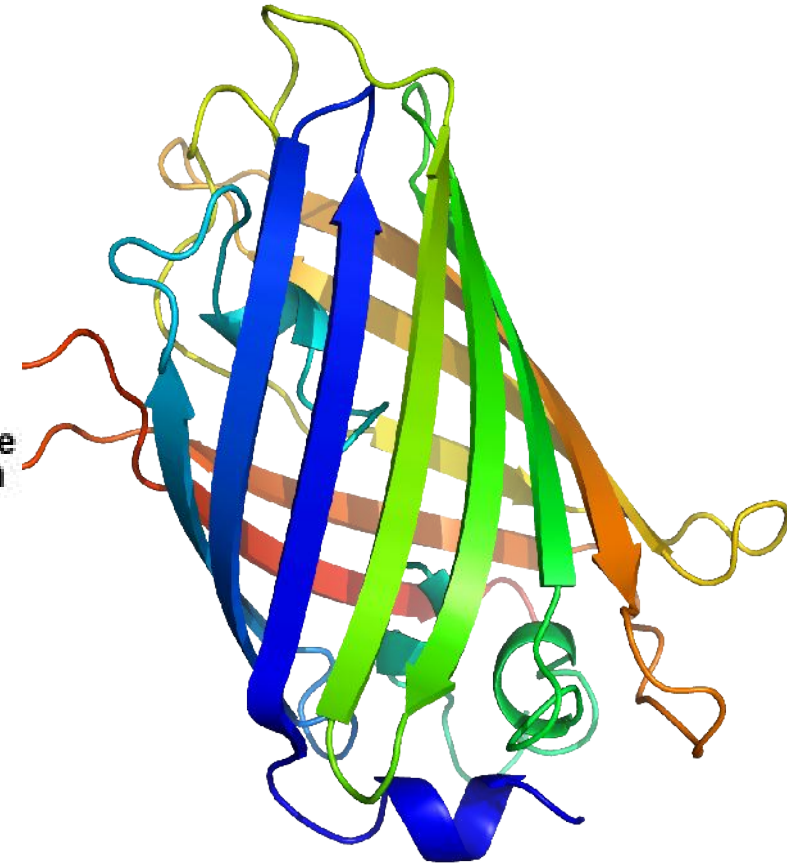
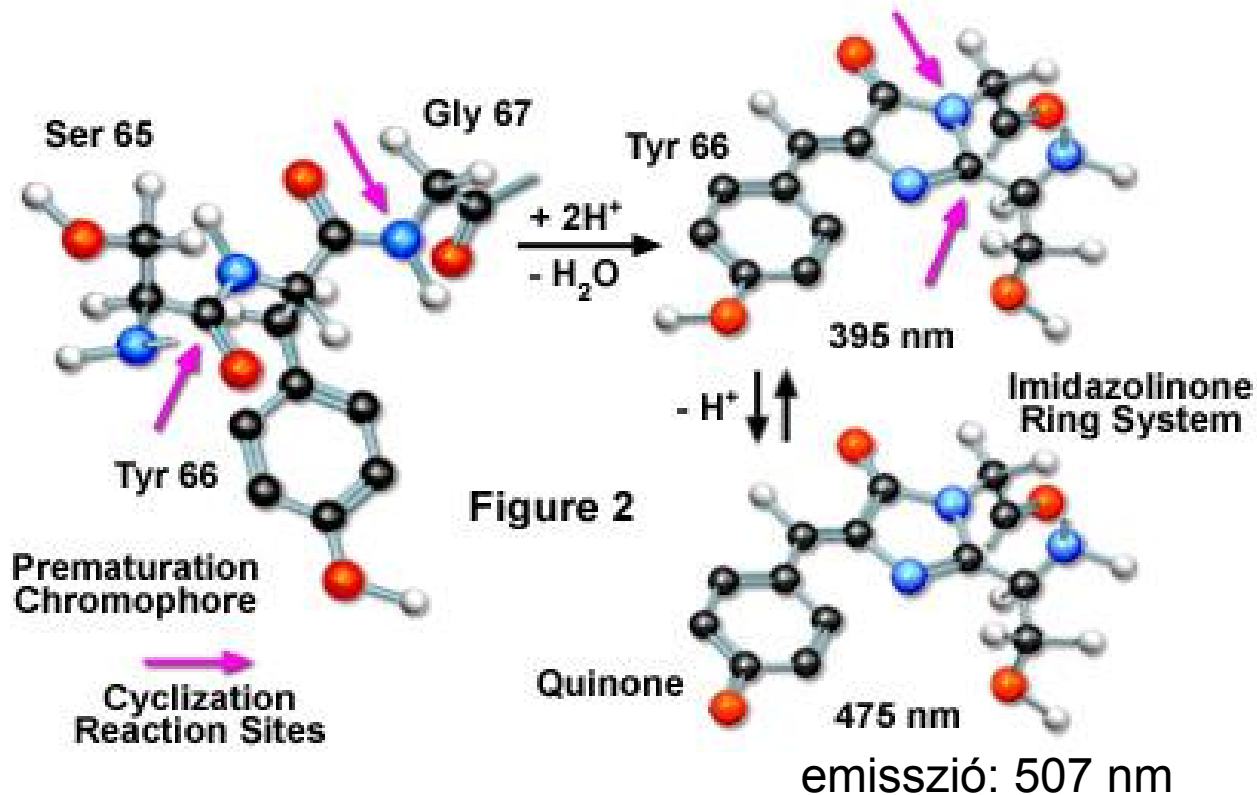
Martin Chalfie – 1994-ben génkifejeződés indikátoraként használta

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



GFP (Green Fluorescent Protein)

Green Fluorescent Protein Fluorophore Maturation



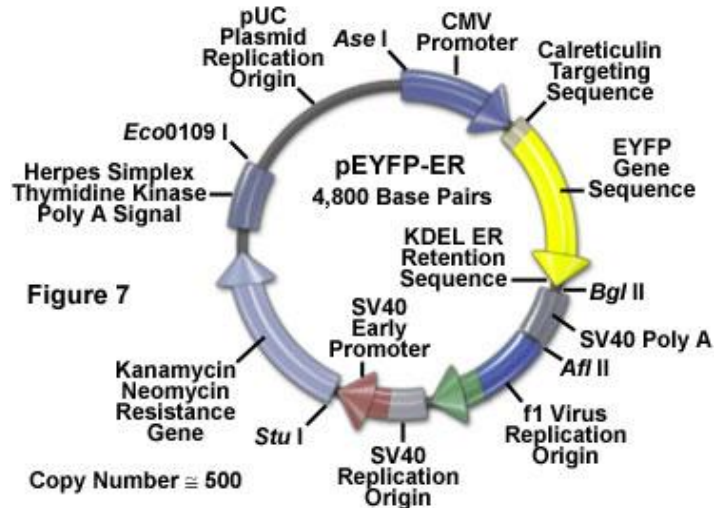
EGFP: a S65T pontmutáció a nem UV közeli 488 nm-es gerjesztést eredményezte

viszont pH érzékeny...

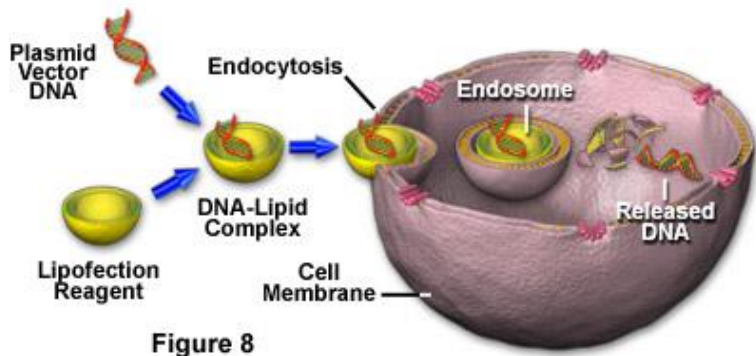
EYFP: a RTG diffrakciós szerkezetből látszik, hogy a Thr203 közel van a kromofórhoz, Trp-ra cserélve sárga lesz

GFP (Green Fluorescent Protein)

EYFP Endoplasmic Reticulum Localization Vector



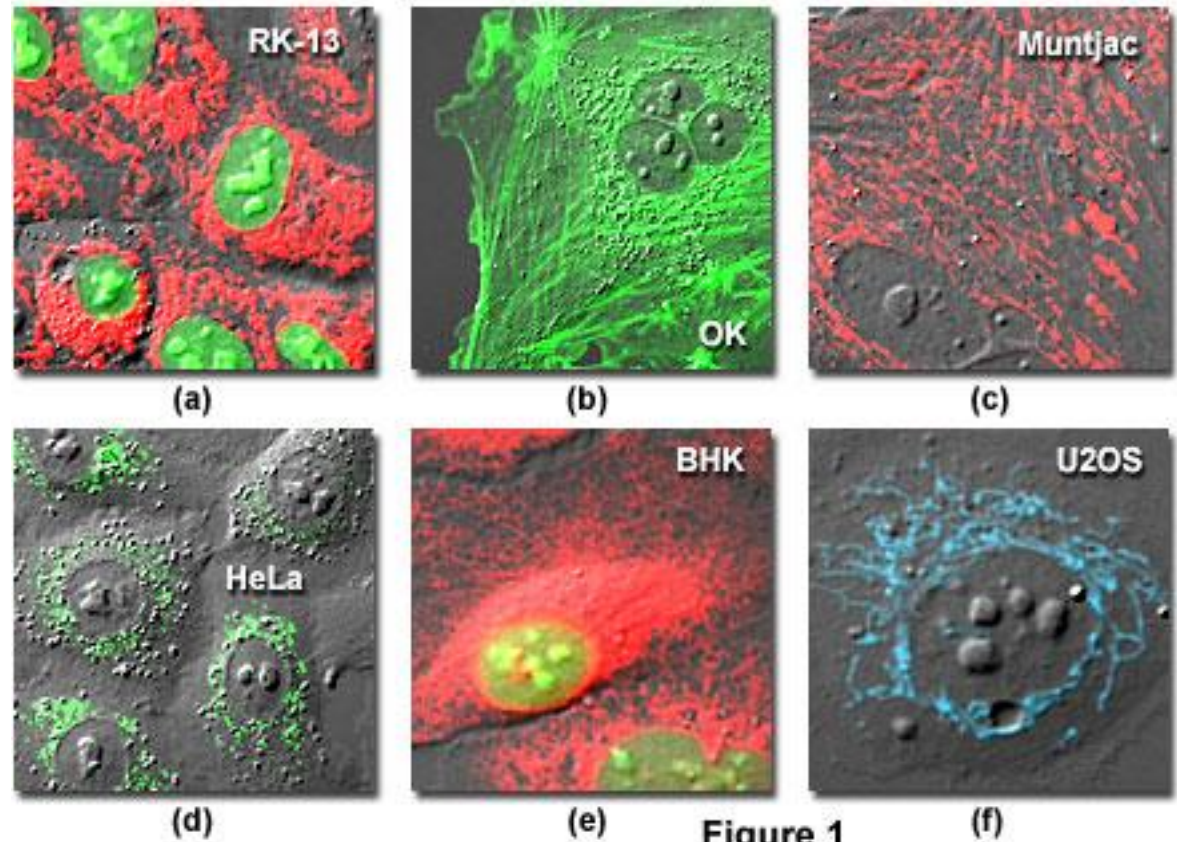
Lipid-Mediated Transfection in Mammalian Cells



génkifejeződés sejtekben

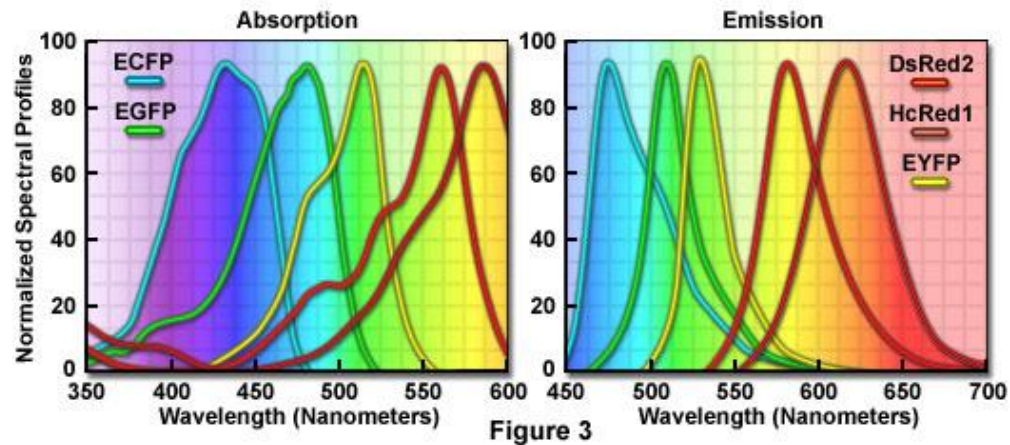
egyes sejtalkotókra specifikus jelölés

Live-Cell Imaging with Fluorescent Proteins and DIC

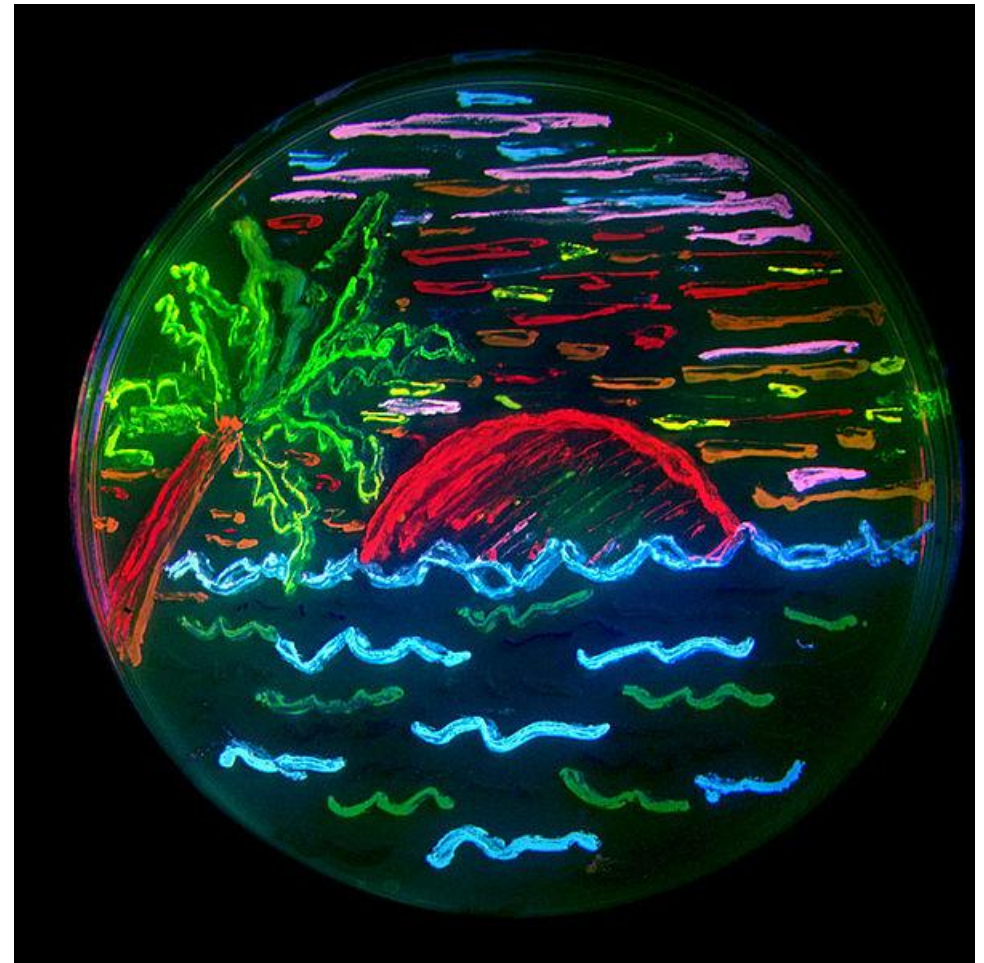
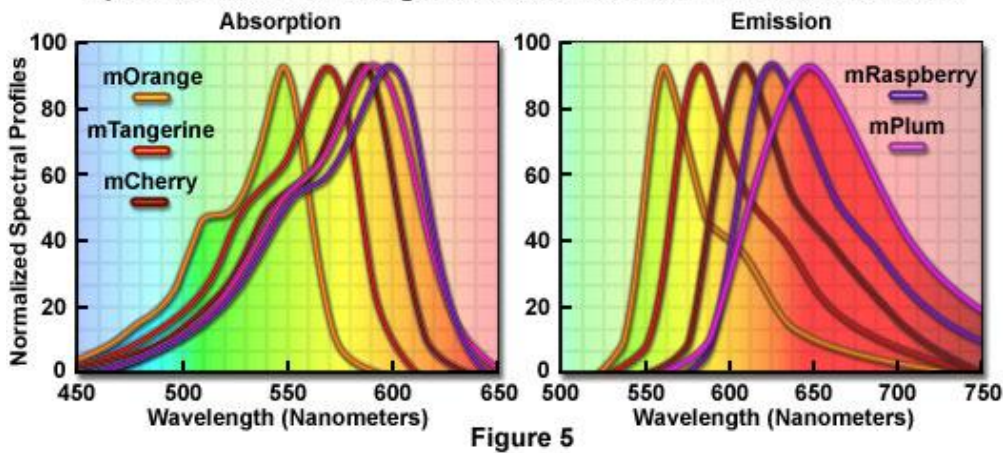


A fluoreszcens fehérjék sokfélesége

Spectral Profiles of Common Fluorescent Proteins



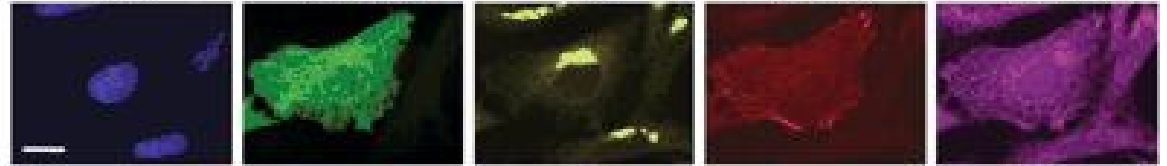
Spectral Profiles of Orange and Red Monomeric Fluorescent Proteins



A kép teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal van festve.

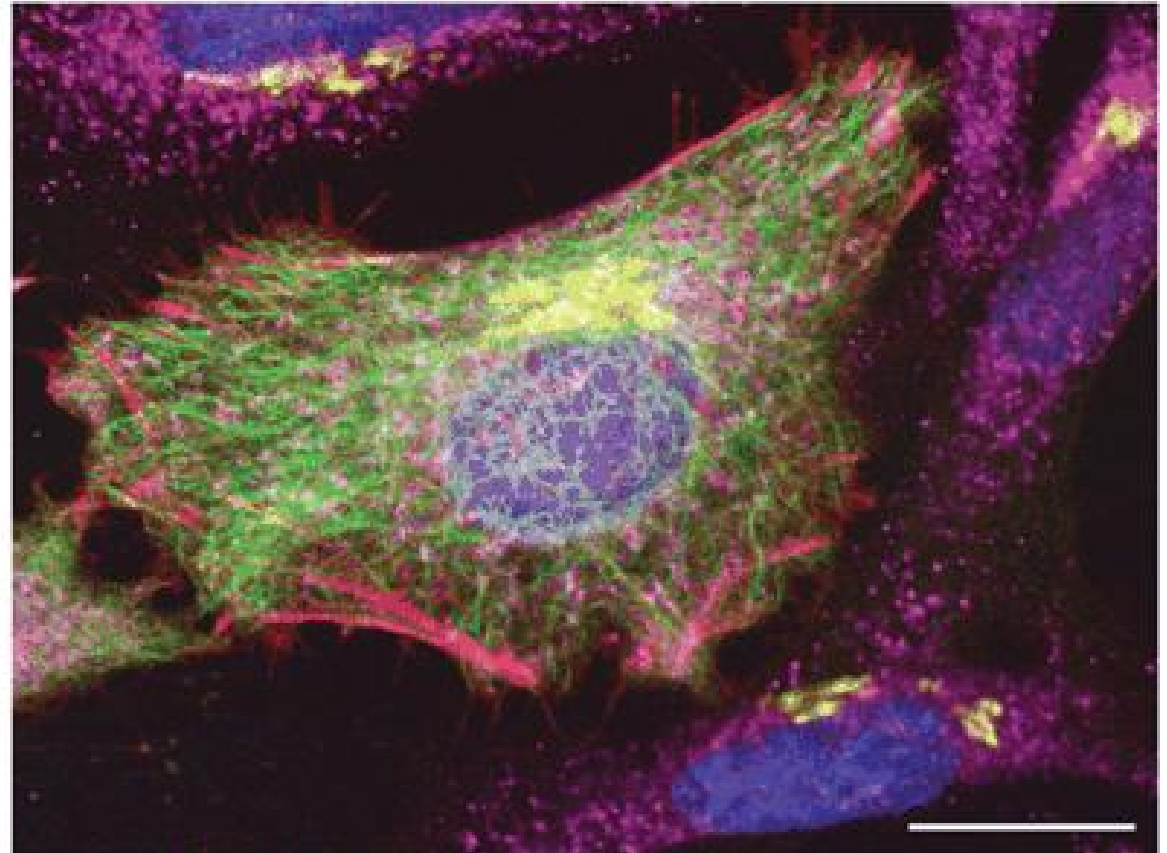
Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása

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 μm hosszú.



Fluoreszcenciát használó módszerek

- egyedi molekulák: pl. TIRF
- lézeres szkennelő: optikai “szeletelő”
 - konfokális mikroszkóp
 - multifoton mikroszkóp
- még újabb: szuperfelbontás
 - lokalizáció STORM, PALM
 - PSF-alakítás STED
 - letapogatás: NSOM

TIRF

csak egy vékony szelet, a minta alja látható

High Numerical Aperture Objective TIRFM

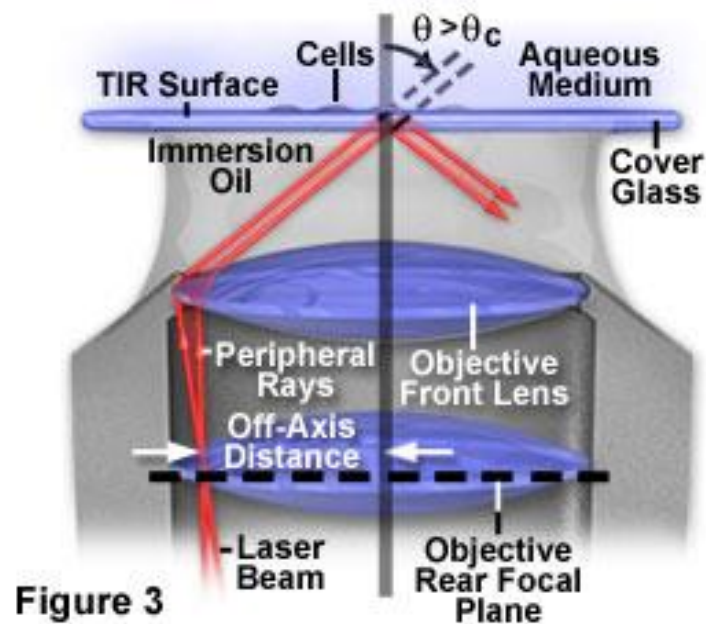


Figure 3

Total Internal Reflection Fluorescence

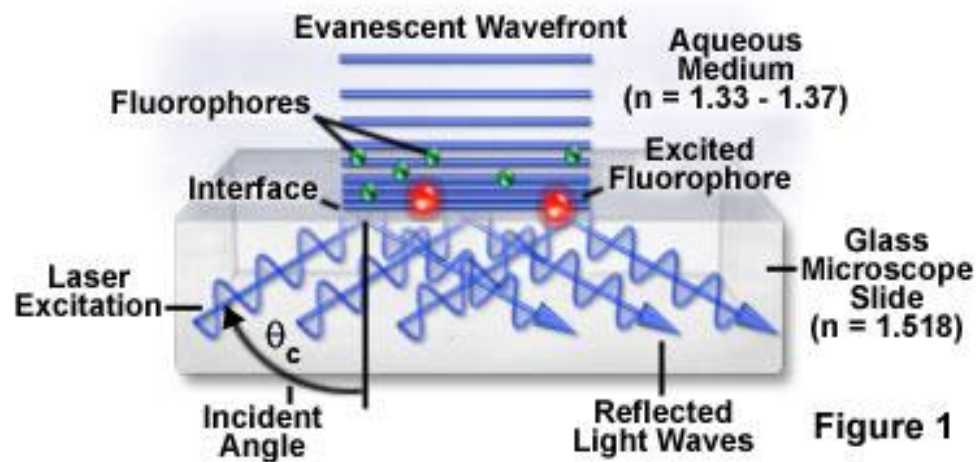


Figure 1

Cell Focal Adhesions in Widefield and TIR Fluorescence

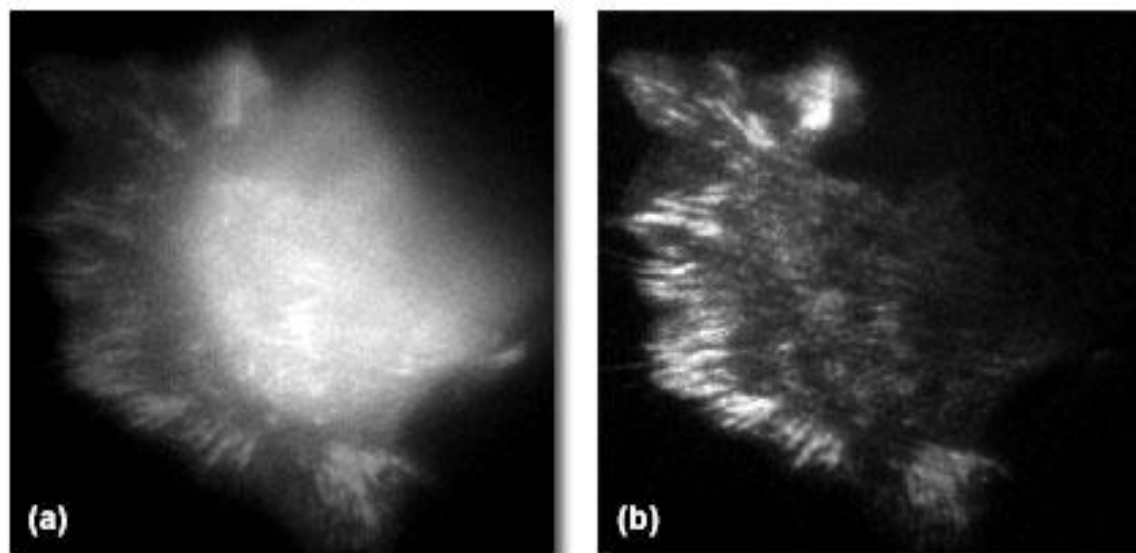
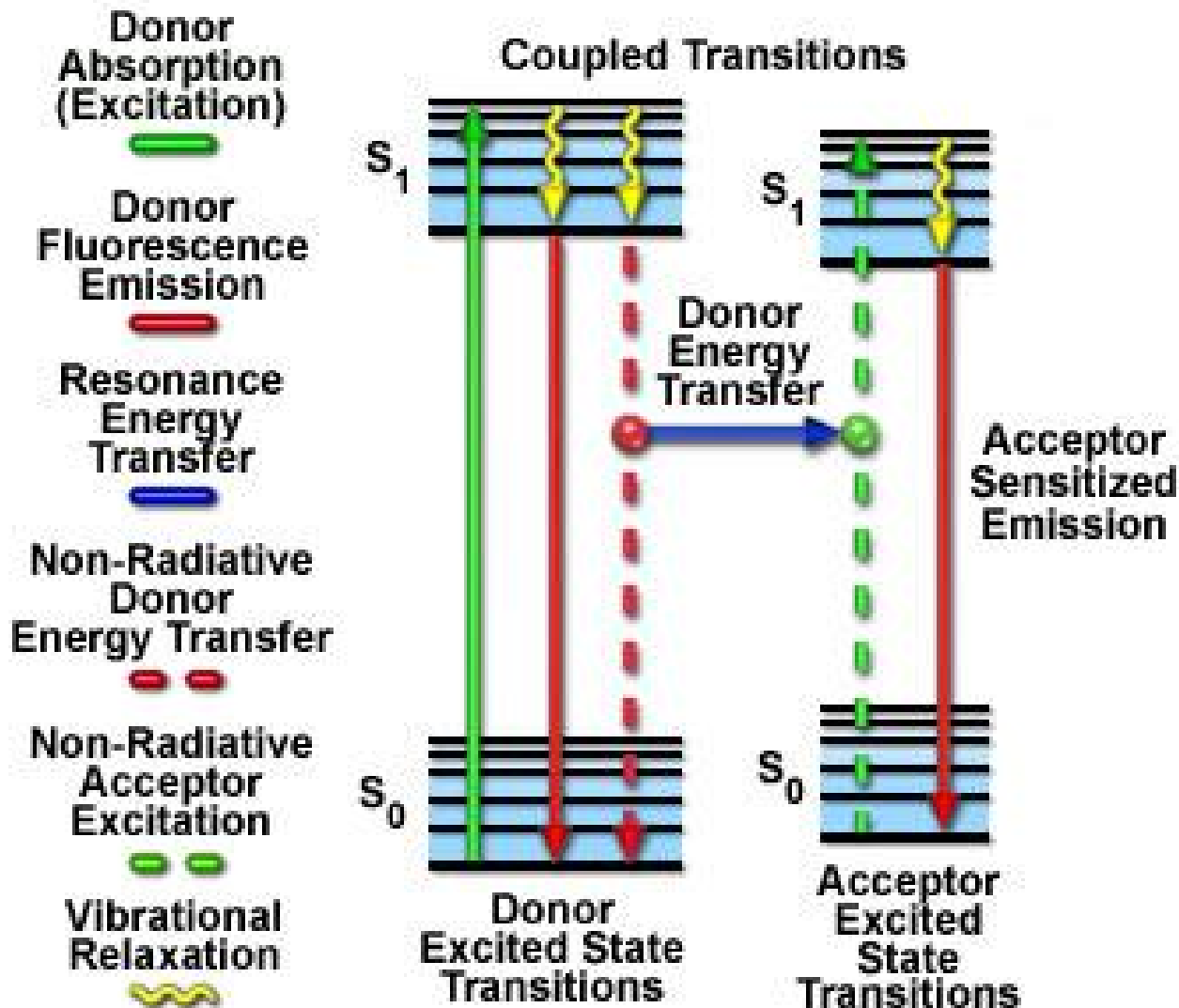


Figure 5

FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram



Az energiatranszfer hatásfoka:

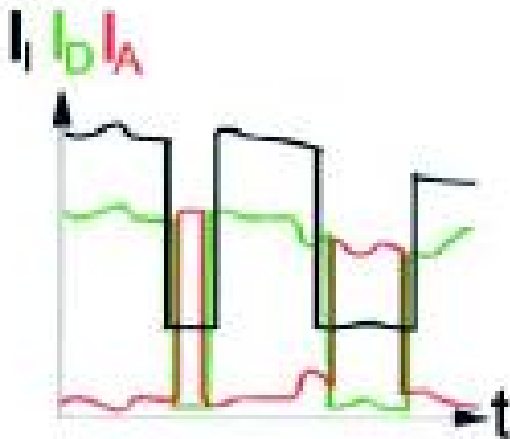
$$K_T = (1/\tau_D) \cdot [R_0/r]^6$$

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

Fluoreszcens indikátorok



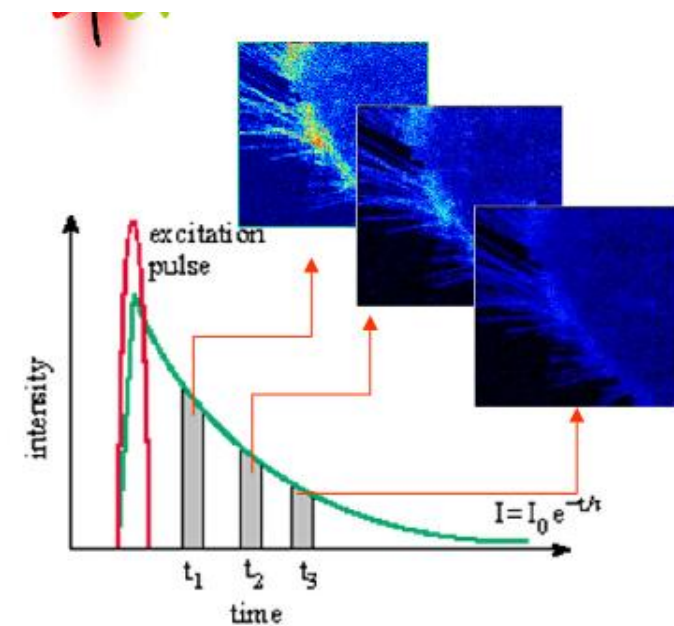
Ioncsatorna működése
a helyi ionkoncentrá-
ció mérése alapján



Ionkoncentráció és
konformációs változá-
sok együttes mérése

FLIM- fluoreszcencia élettartam kép

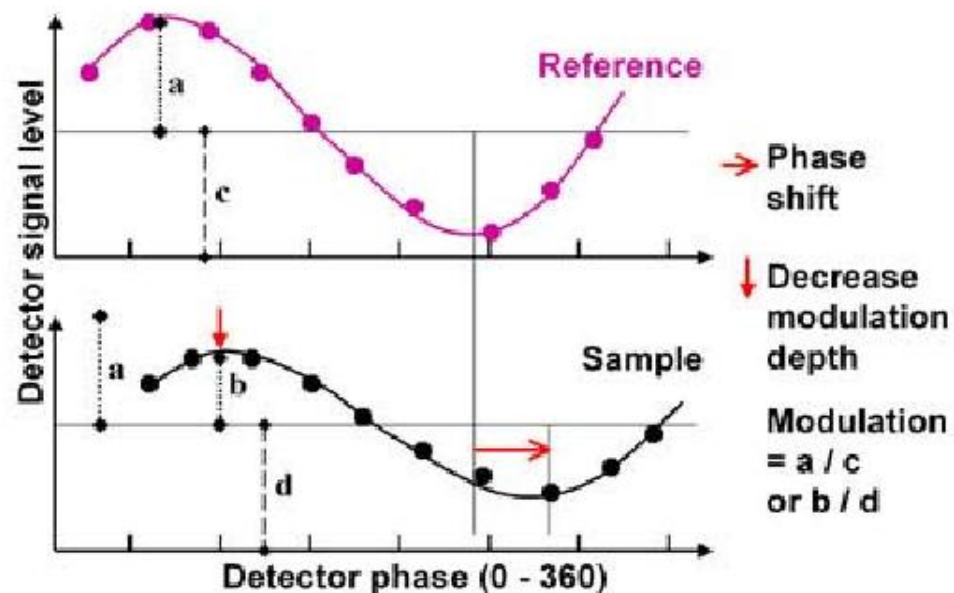
idő alapú mérés



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

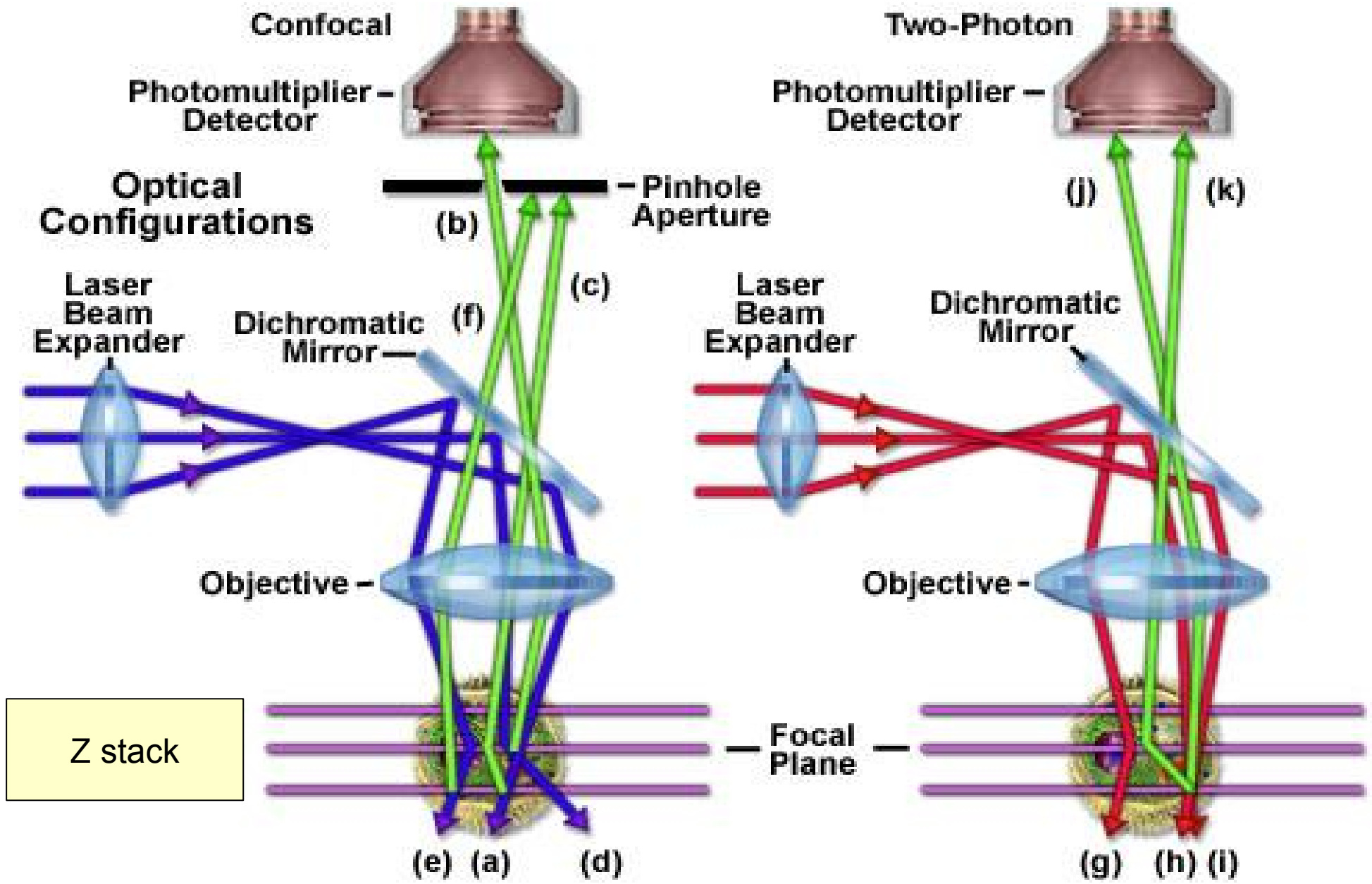
frekvencia alapú mérés



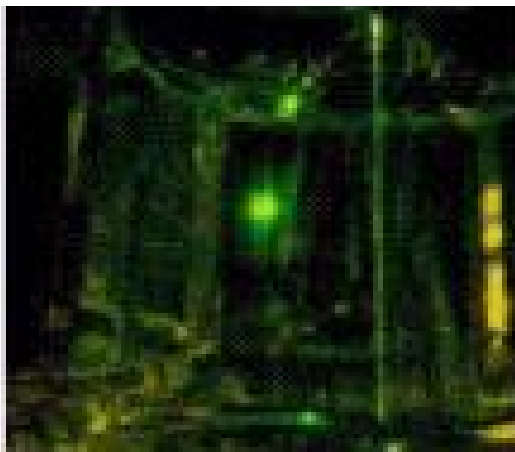
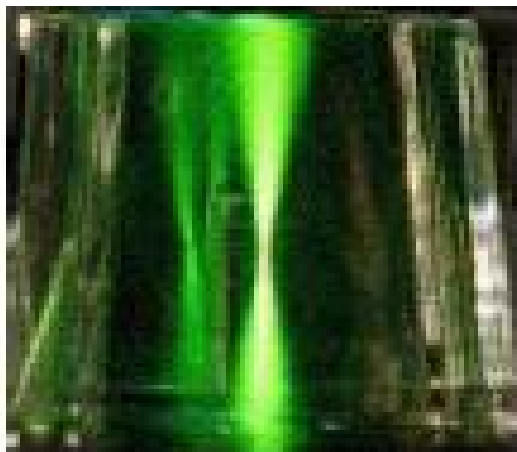
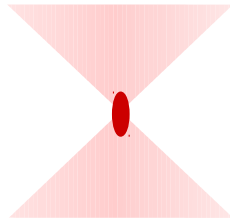
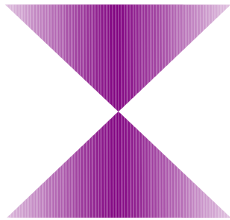
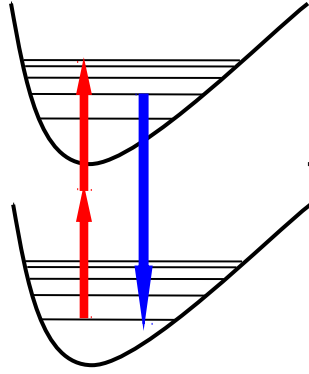
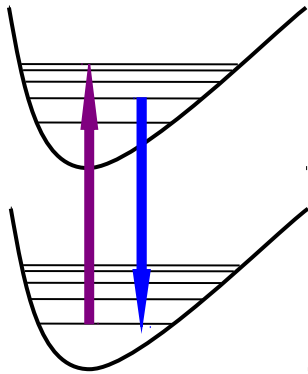
A sample is excited by a modulated light source

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 fókuszban gerjeszt (femtoliternyi!)

-kevésbé szóródik a hosszabb hullámhosszú gerjesztés (szövetbe bejut)

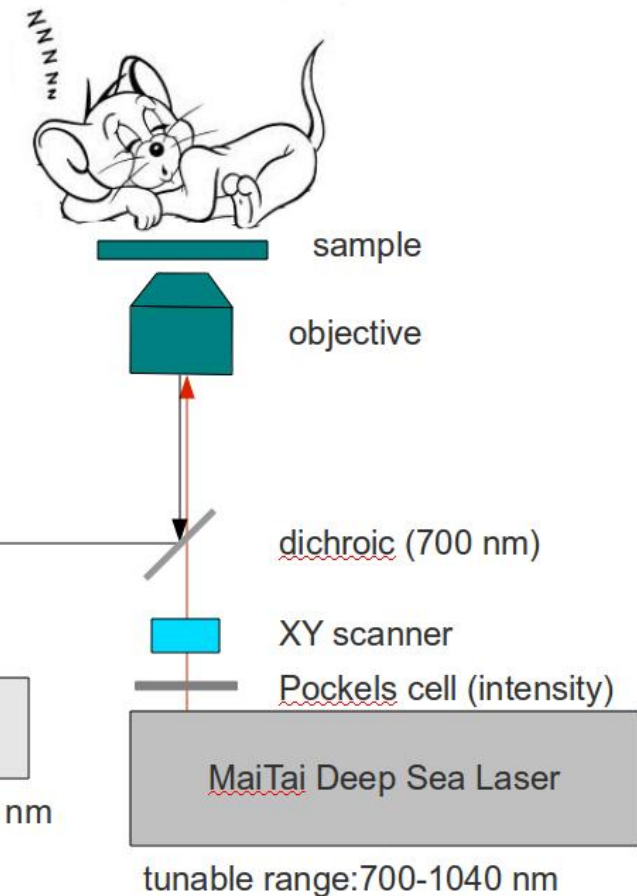
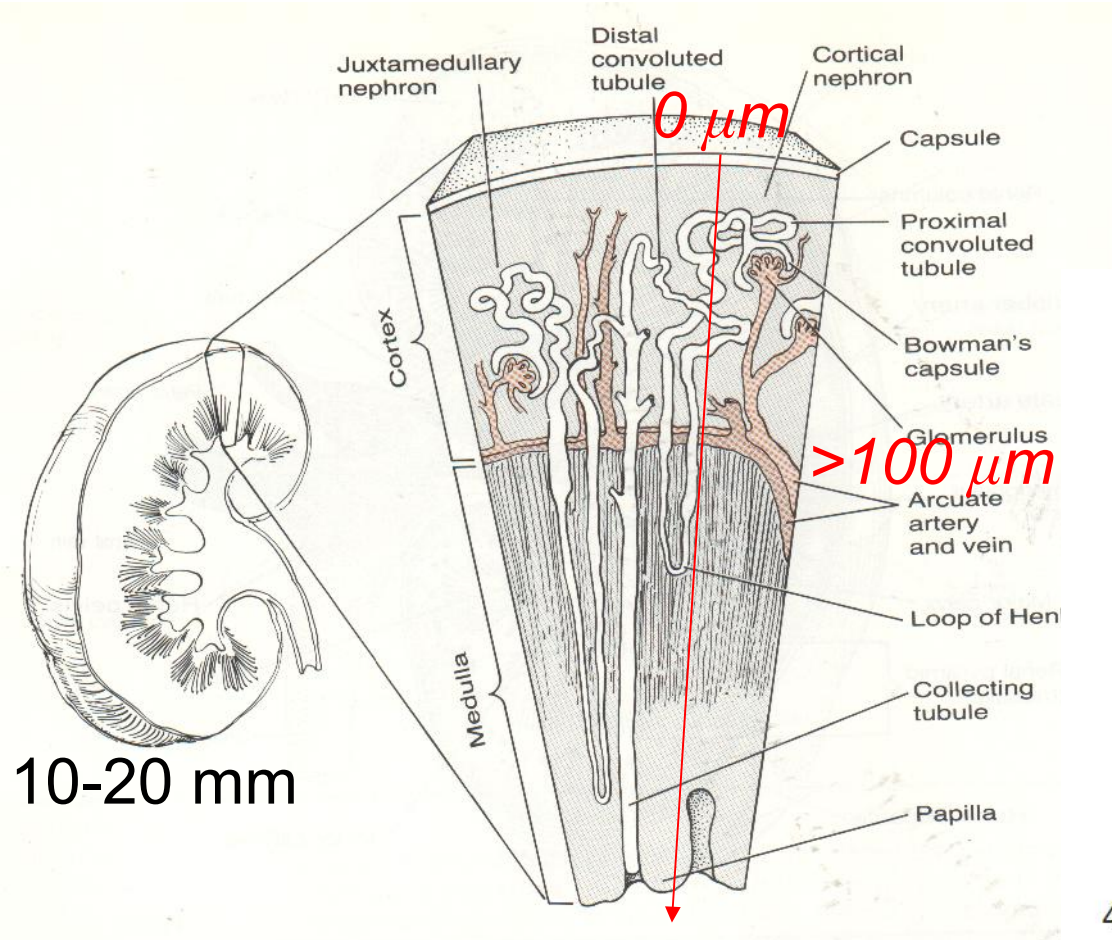
-beépített szelekció, optikai szeletelés, 3D rekonstrukció

-a szórt fluoreszcencia fényt is össze lehet gyűjteni (csak a fókuszából származhat)

-kevésbé ég a minta

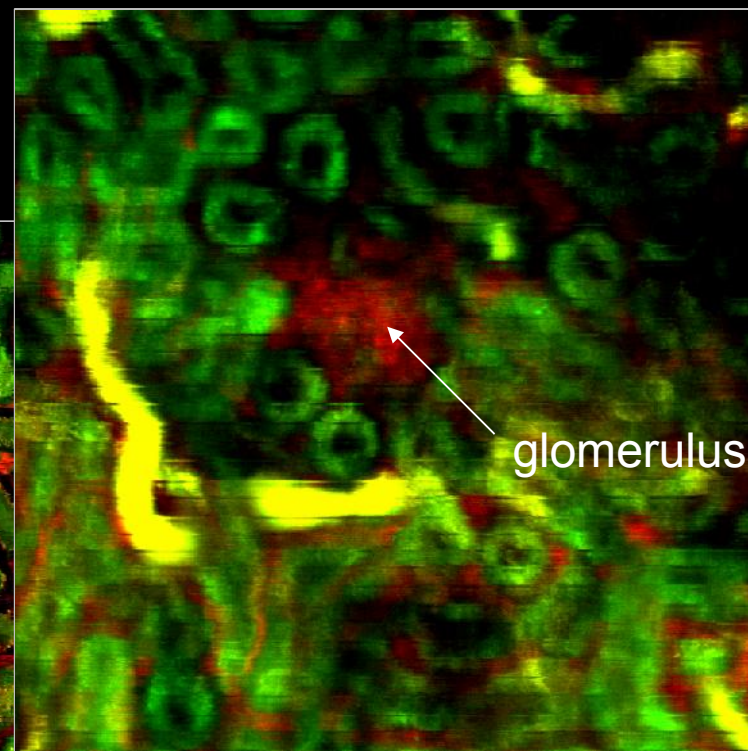
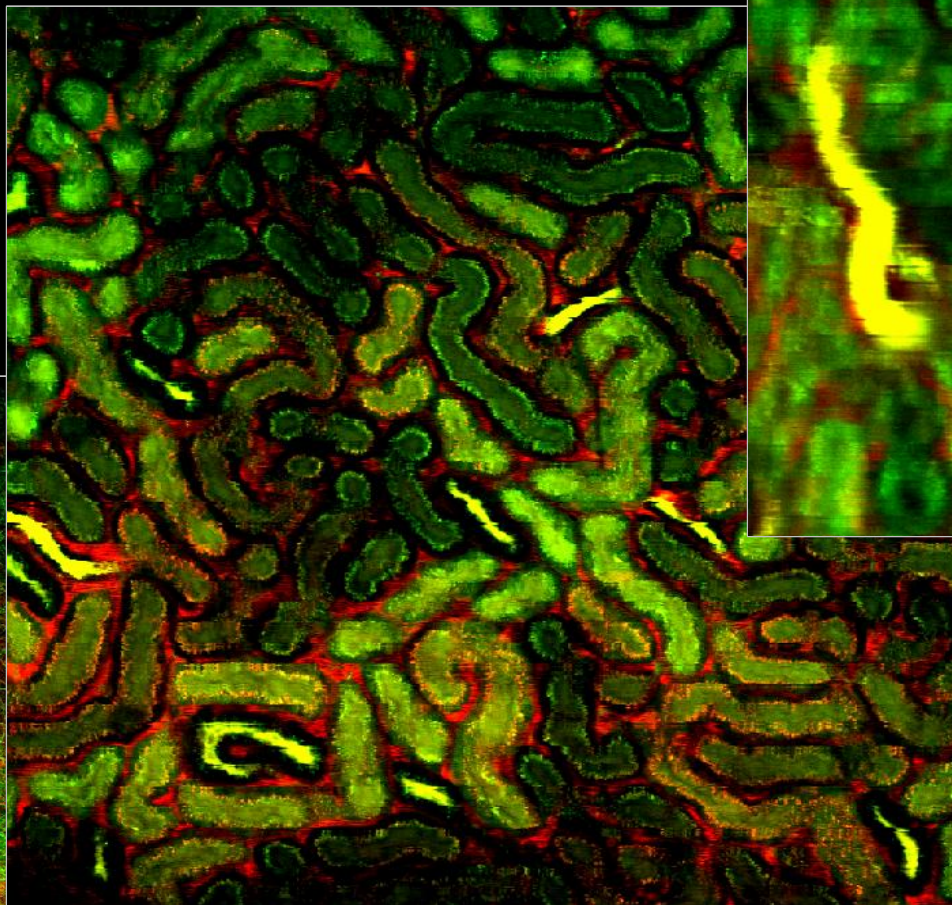
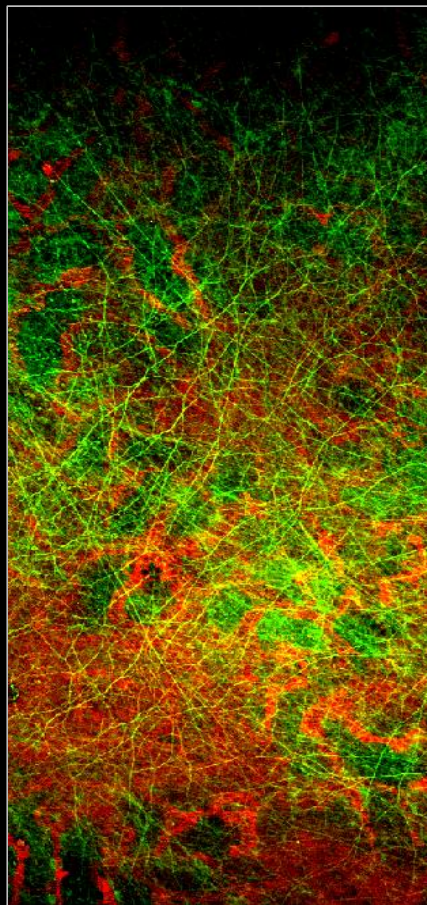
- autofluoreszcencia (festék nélkül is látszik)

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)



80 μm deep

20 μm deep

0 μm deep, the capsule

Renin termelődés a vesében immunoszuppresszáns kezelést követően multifoton mikroszkópia

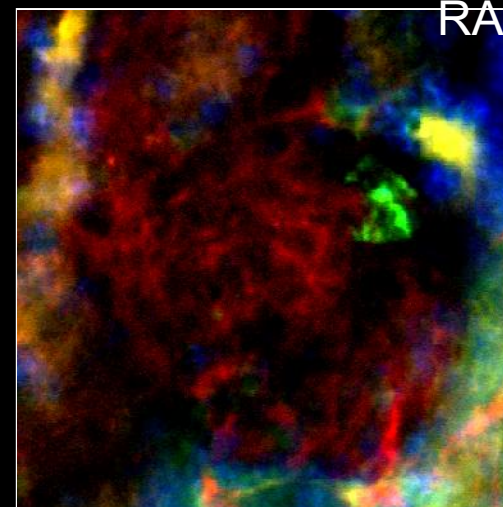
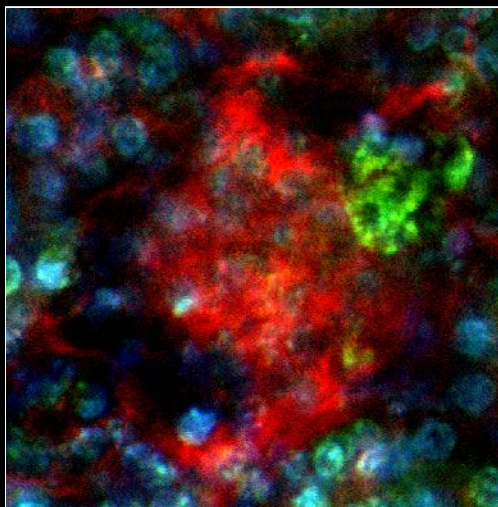
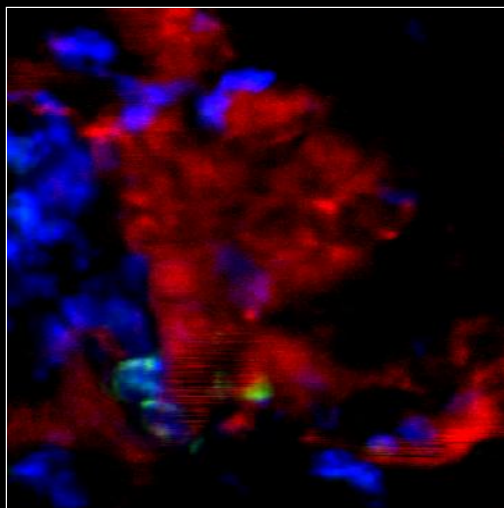
kontroll

Tac kezelt

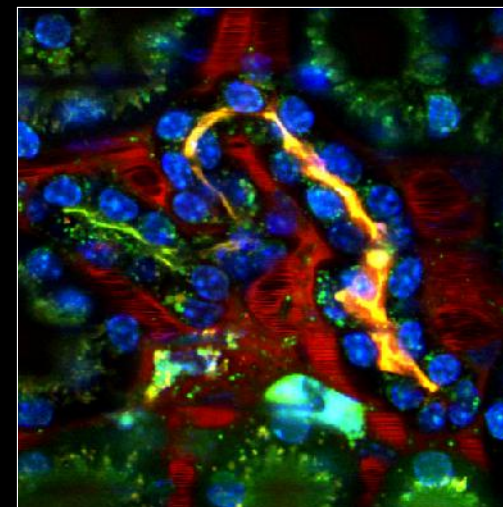
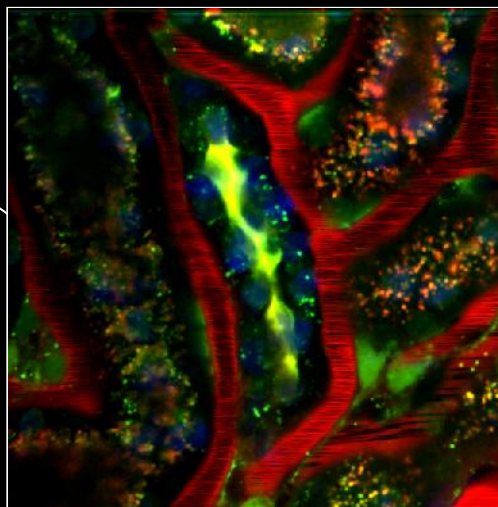
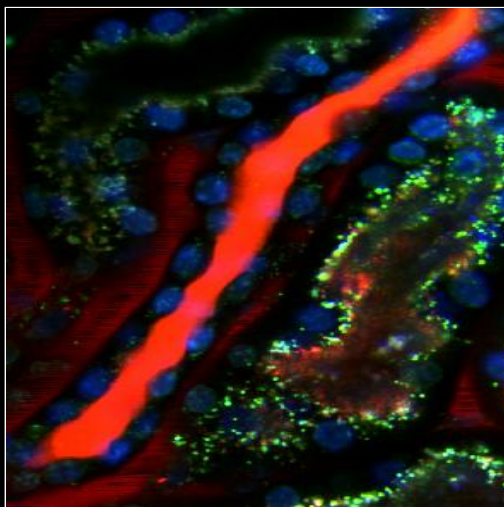
CyA kezelt

RAS gatlok

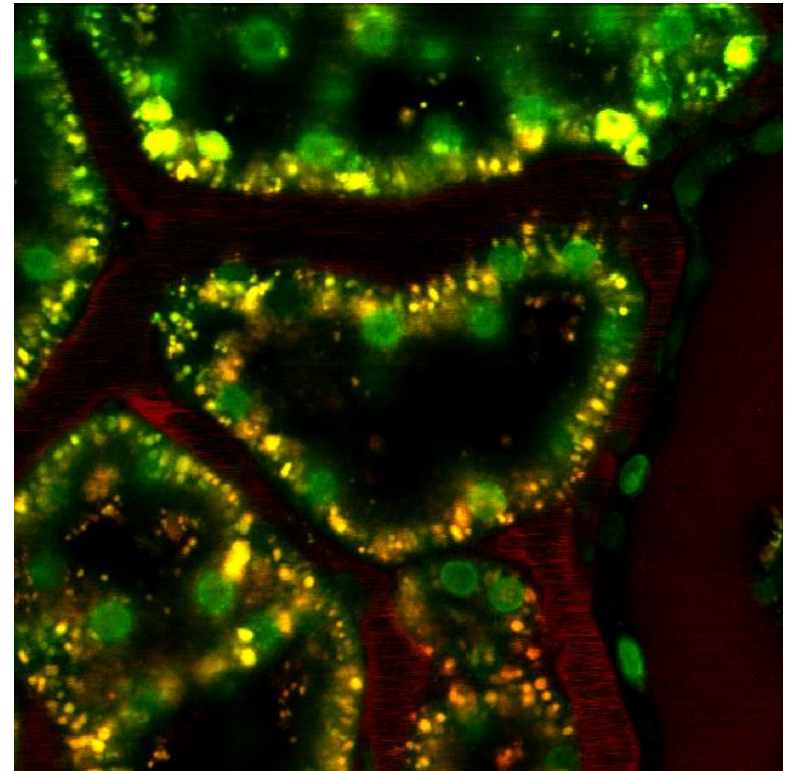
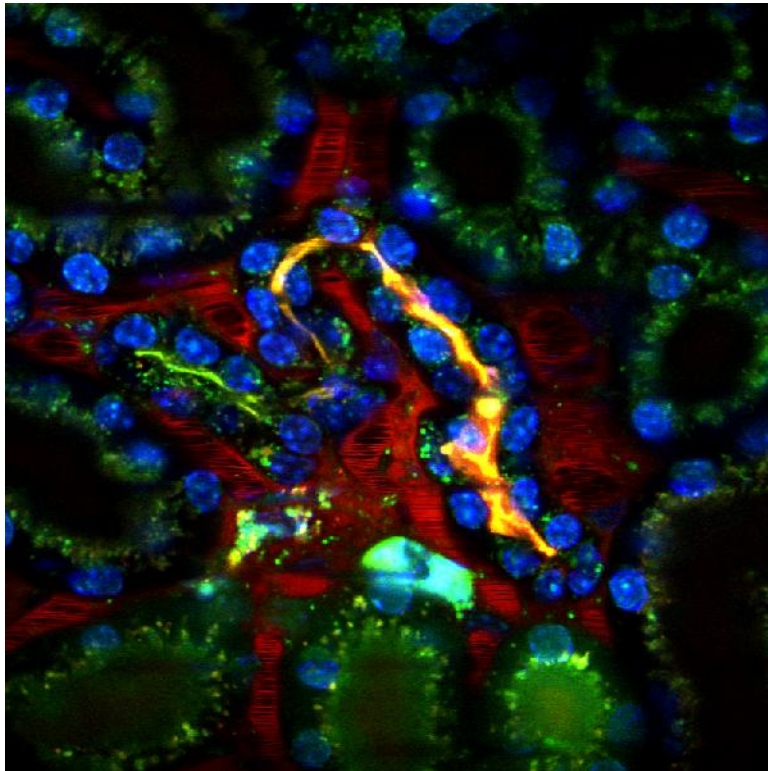
glomerulus + JGA



gyűjtőcsatorna



A festékek eloszlása

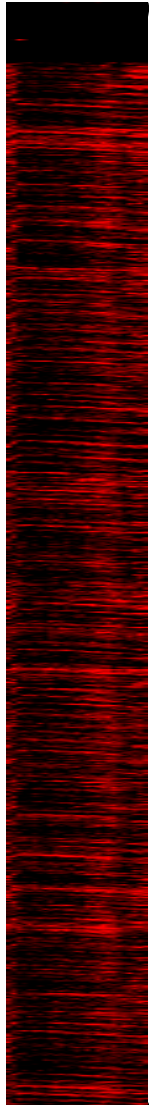


Z stack

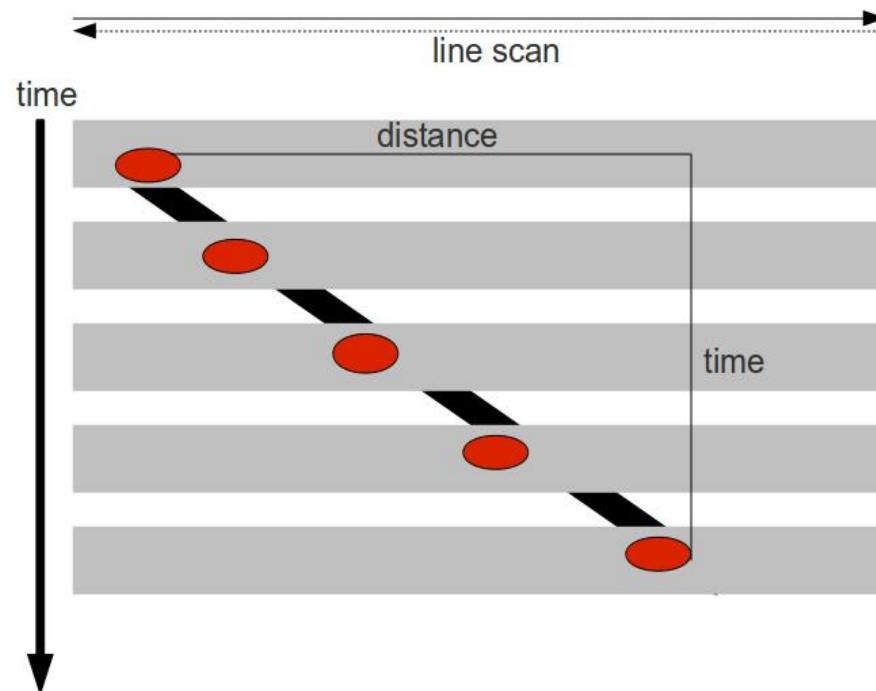
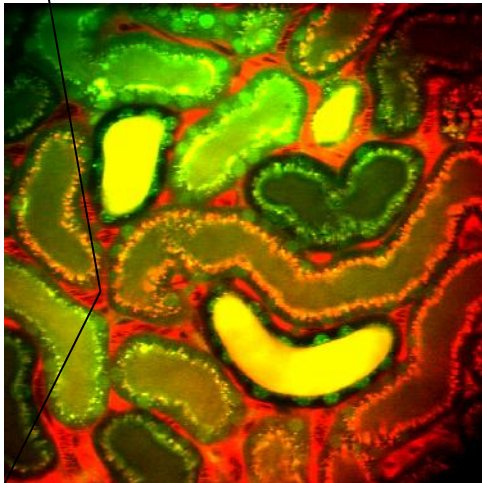


a fókusztávolságot változtatva

Véráramlás sebességének mérése



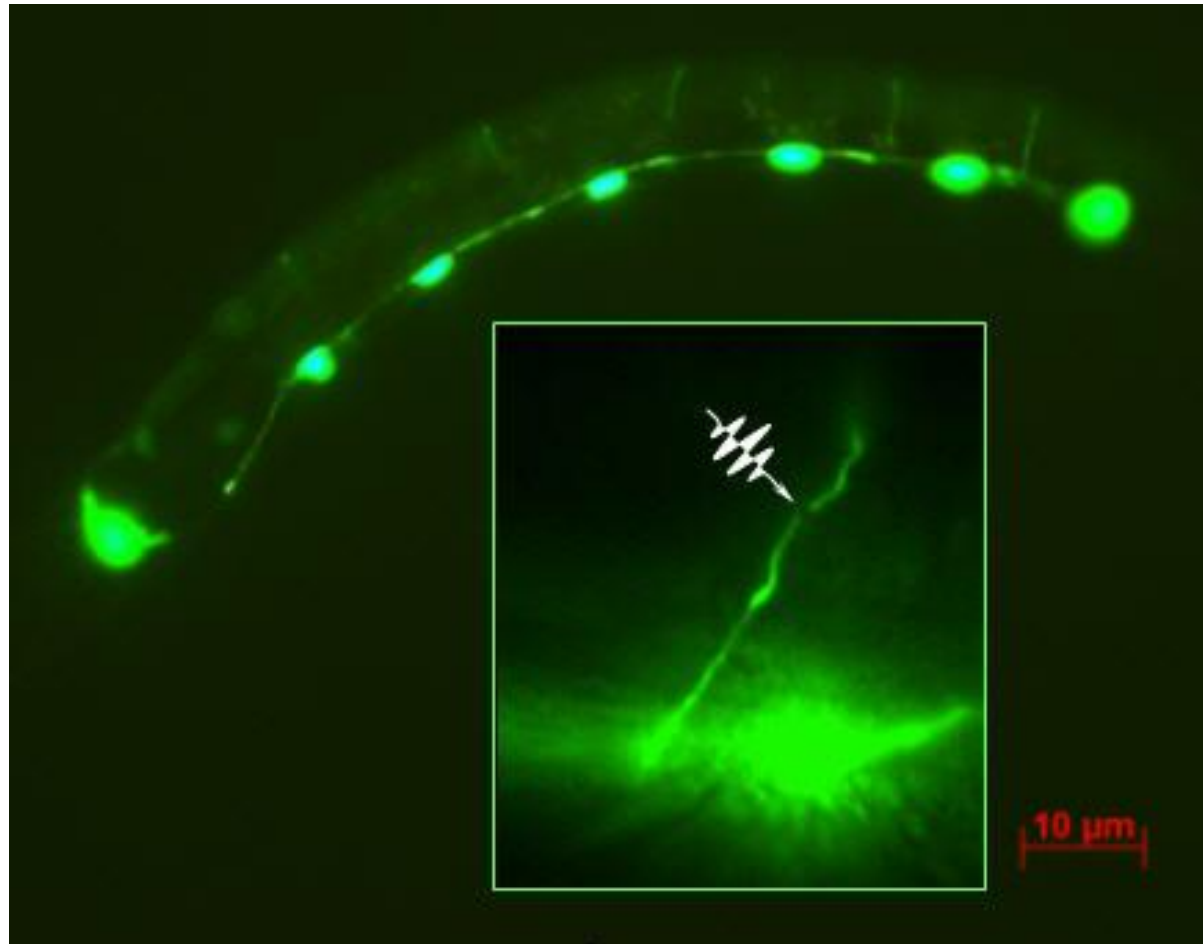
line scan
1 ms/line, 0.05 μm /pixel
 $V \sim 1\text{-}2\text{ mm/s}$,
diameter: 7-11 μm



Mozgóképf

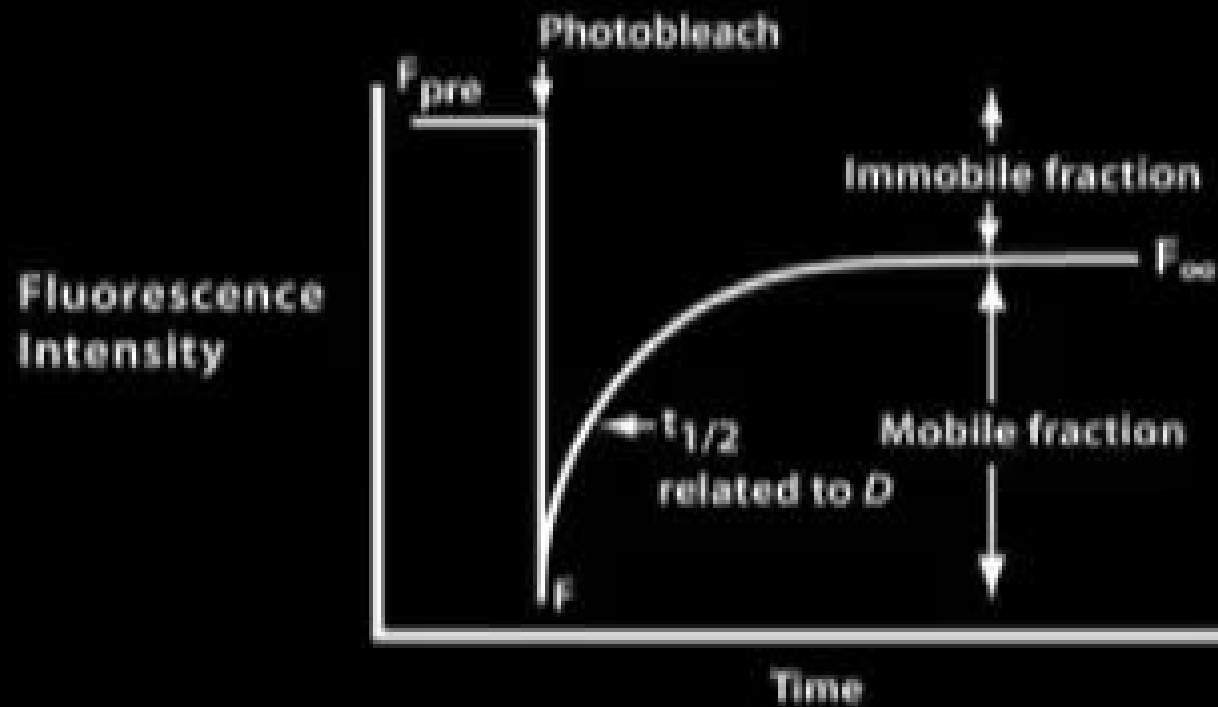


Élőlények fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



Caenorhabditis elegans 302 neuronja közül egyetlen idegsejt axonjának átvágása

FRAP

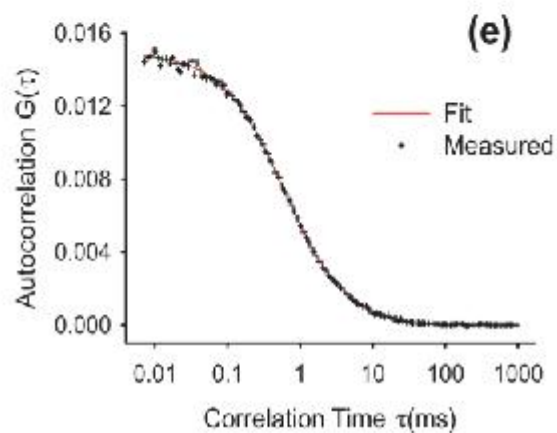
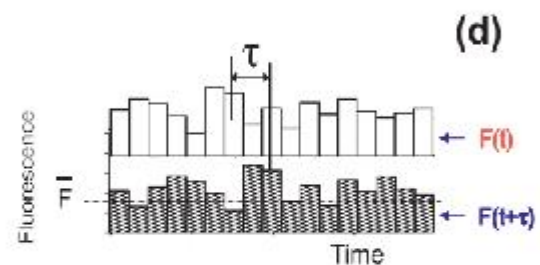
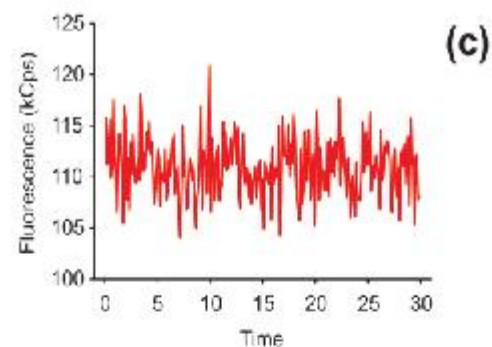
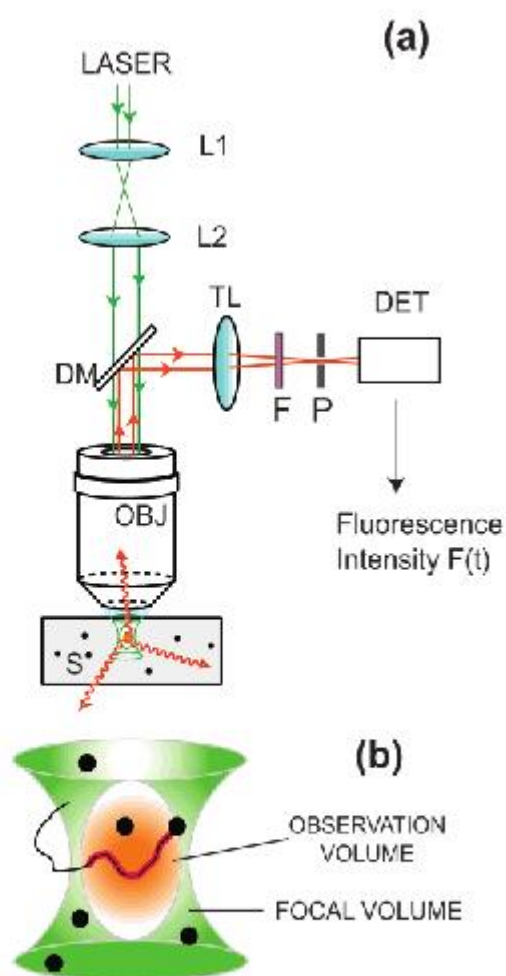


Korrelációs módszerek

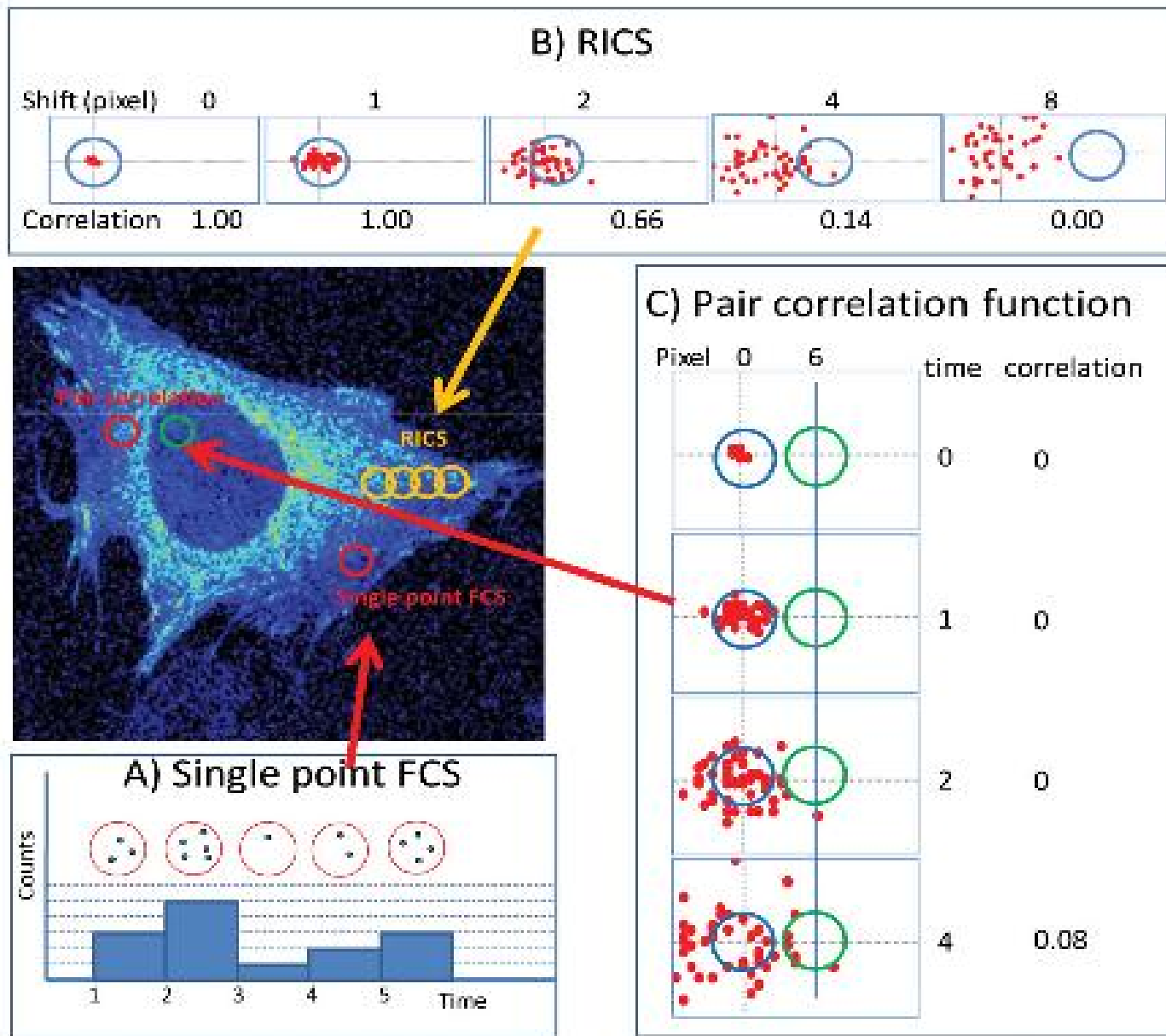
FCS

diffúziós állandó

fényesség-aggregáció

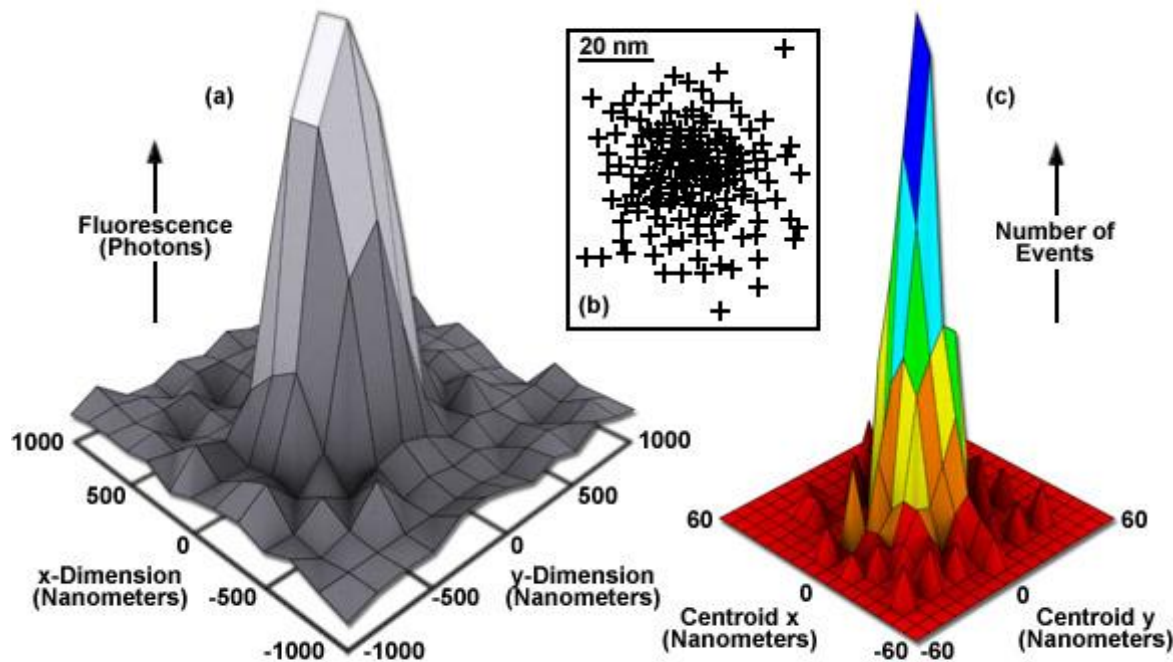


Raszter képben is van információ



vonal mentén,
kör mentén is
lehet
szkennelni

Szuperrezolúció (nanoszkóp)



LOKALIZÁCIÓ
akár nm
pontosan!

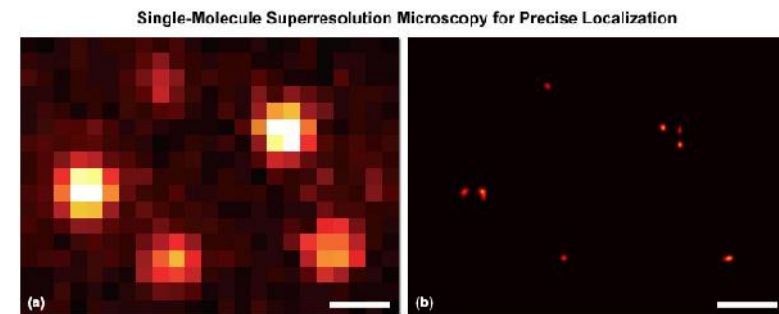


Figure 1

$$\sigma_{\mu_i} = \sqrt{\left(\frac{s_i^2}{N}\right) + \left(\frac{a^2/12}{N}\right) + \left(\frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}\right)}$$

fotonszám, pixelméret, háttér

Szuperrezolúció (nanoszkóp)

Basic Principle of STORM Superresolution Imaging

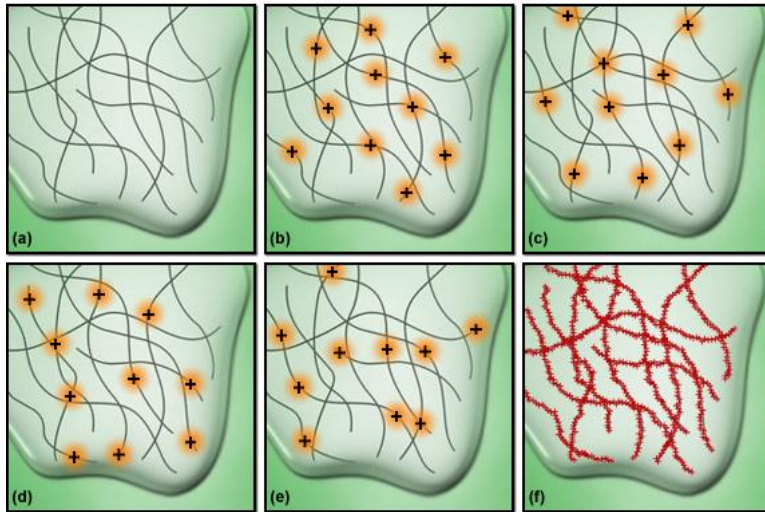


Figure 1

STORM-stochastic optical reconstruction microscopy
véletlenszerűen megvilágított szubpopuláció

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

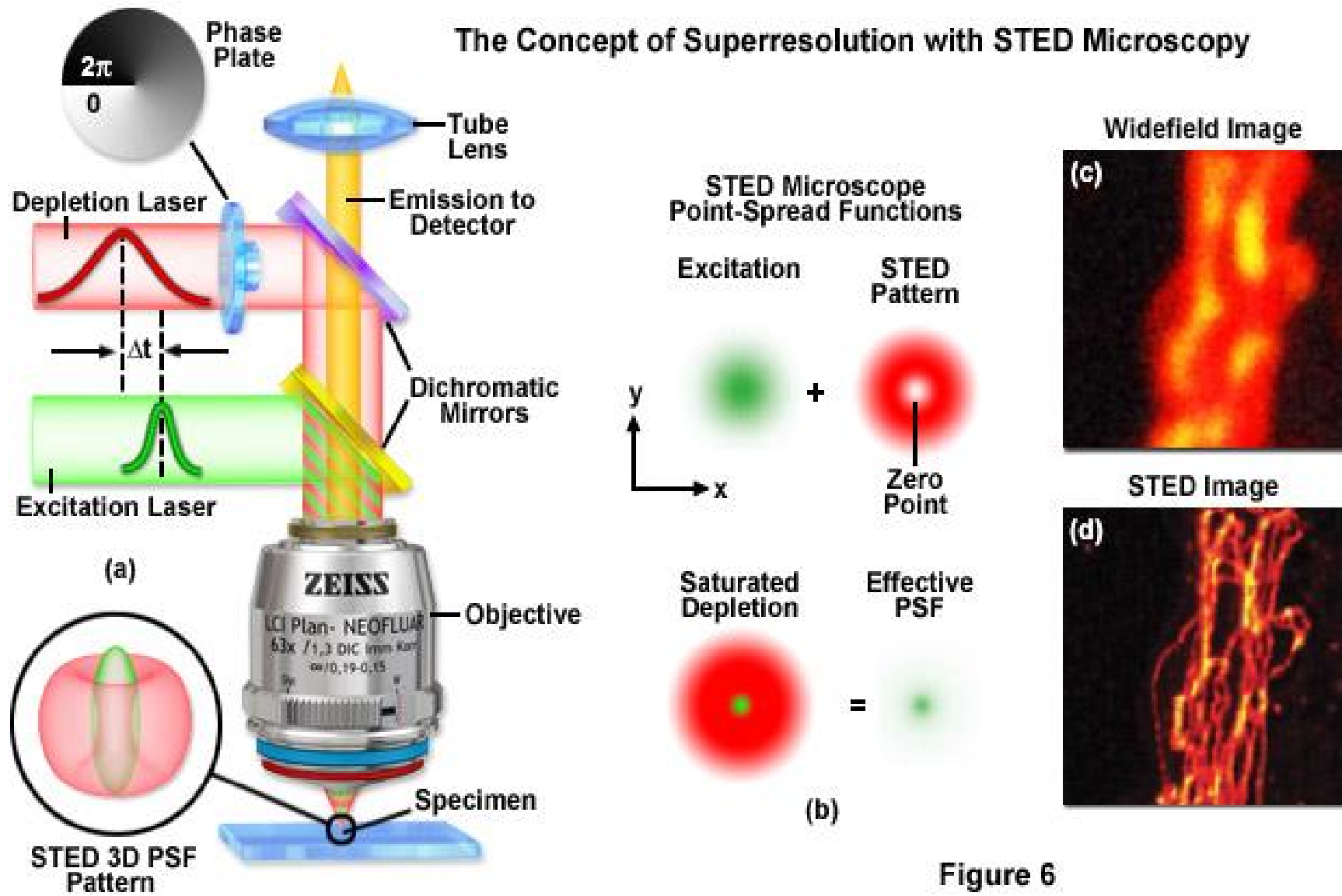
FIONA fluorescence imaging with one-nanometer accuracy

SHRImP single-molecule high-resolution imaging

SHREC single molecule high-resolution colocalization

PAINT point accumulation for imaging in nanoscale topography

STED (stimulated emission depletion)



STED (stimulated emission depletion)

RESOLFT Concepts for Superresolution Microscopy

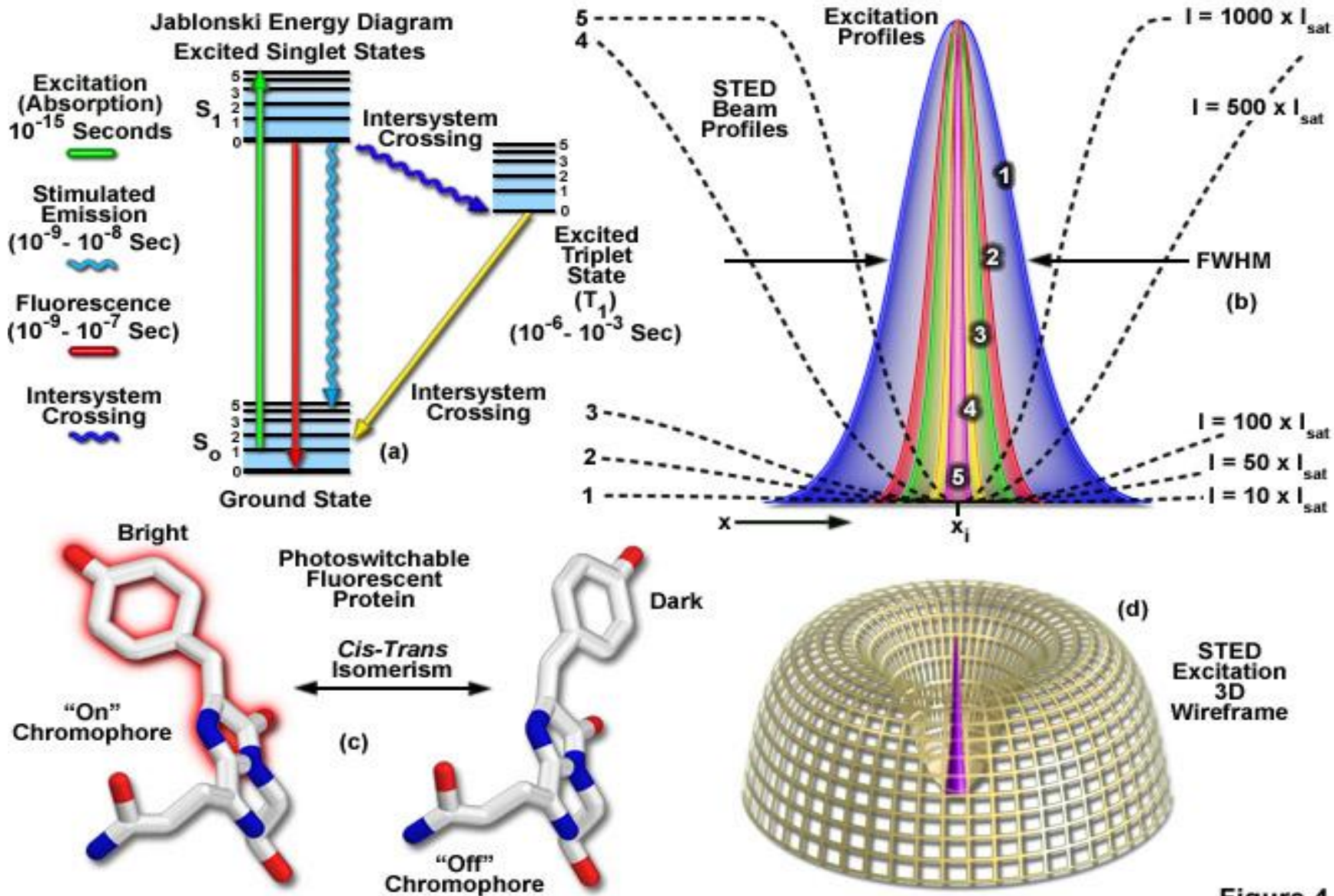


Figure 4

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/