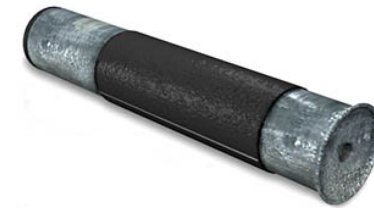
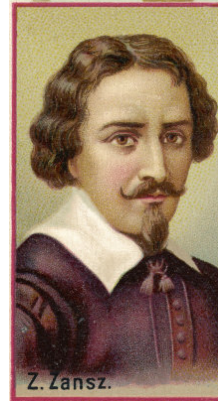


## Szuperrezolúciós mikroszkópi módszerek

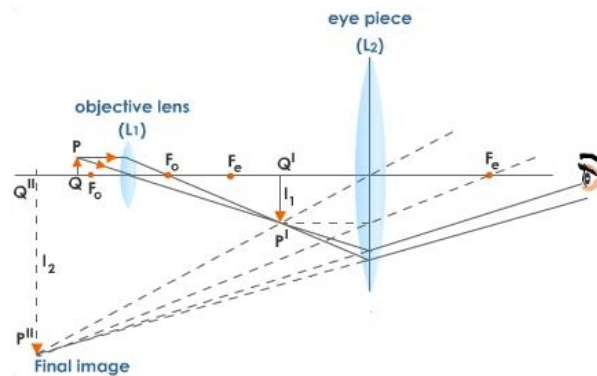
**Osváth Szabolcs**

Semmelweis Egyetem

**Hans Jansen és Zacharias Jansen  
1590-ben összetett mikroszkópot épít**



## Összetett mikroszkóp optikai útja



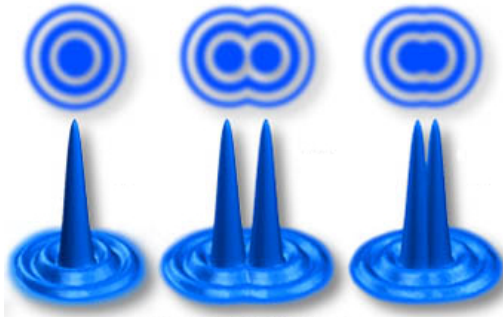
## Point Spread Function (PSF)

A PSF a mikroszkóp átviteli függvénye.

A (fluoreszcens) tárgy egy pontjának képe, nem egy pont, hanem adott intenzitáseloszlású folt. Ez a tulajdonság a fény hullámtermészetének a következménye.

Az objektív segítségével egy térrészbe lehet a fényt fókuszálni, nem egy pontba.

### A fény hullámtermészetének hatása a képre



### Abbe elv

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

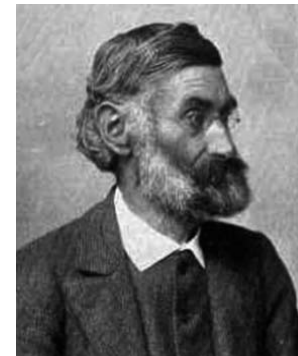
### Abbe összefüggés

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

Hallgatólagos feltevések:

- a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet
- a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képfoltokat ad.

### Ernst Karl Abbe (1840-1905)



Fizikus és társadalomreformer

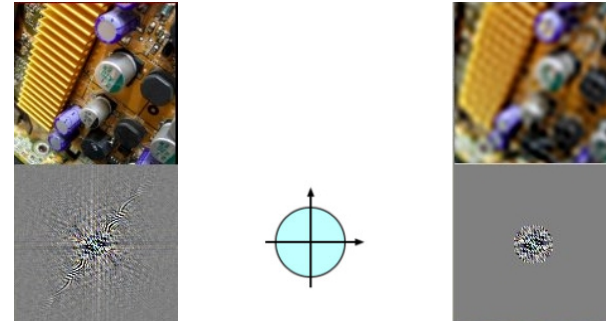
Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

### Szuperrezolúciós mikroszkóp

A szuperrezolúciós mikroszkópi technikák kidolgozásáért 2014-ben kémiai Nobel díjat kaptak:

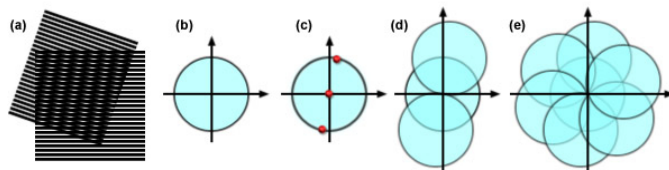
- Eric Betzig
- Stefan W. Hell
- William E. Moerner

### Abbe elv a minta térbeli frekvenciái szempontjából

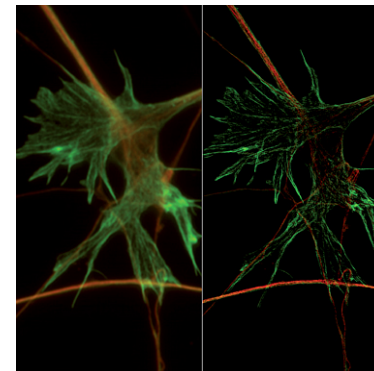


A képen lévő térbeli frekvenciákból a mikroszkóp objektív csak egy szűk tartományt enged át, ami korlátozza a térbeli feloldást.

### Strukturált megvilágításos mikroszkóp

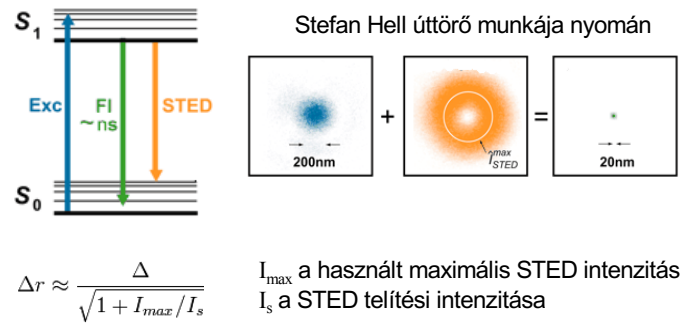


### Strukturált megvilágításos mikroszkóp

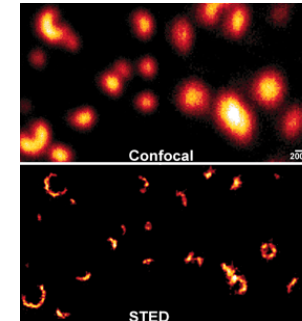


Hagyományos (bal) és strukturált megvilágításos mikroszkópi kép (jobb) idegsejtekről.

### STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

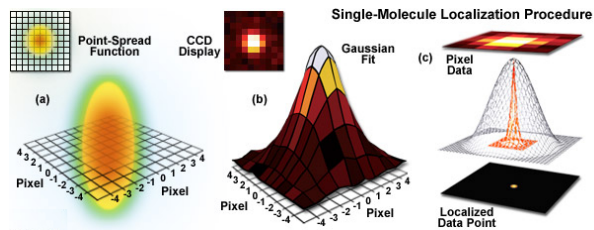


### STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

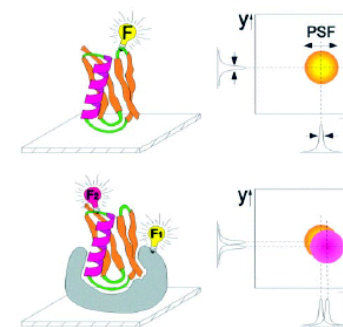


Szinaptolizin szerveződése az újra-hasznosított szinaptikus vezikulákban.

### Lokalizáció



### Lokalizáció és kolokalizáció

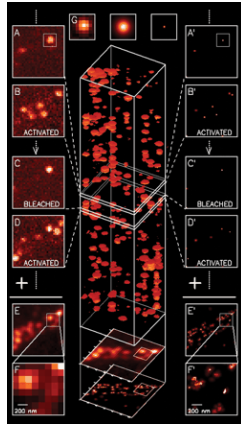


A PSF illesztése alapján nm pontossággal tudjuk megállapítani a jelölt makromolekula helyét.

Két különböző színű kromofór helyének megállapítása.

A kolokalizáció nem feltétlen jelent kölcsönhatást.

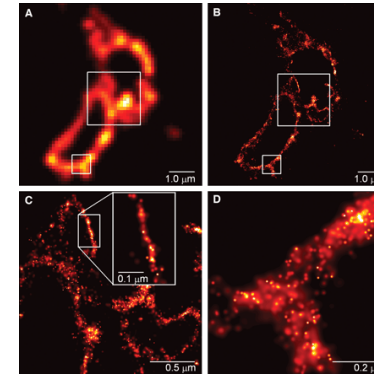
### Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)



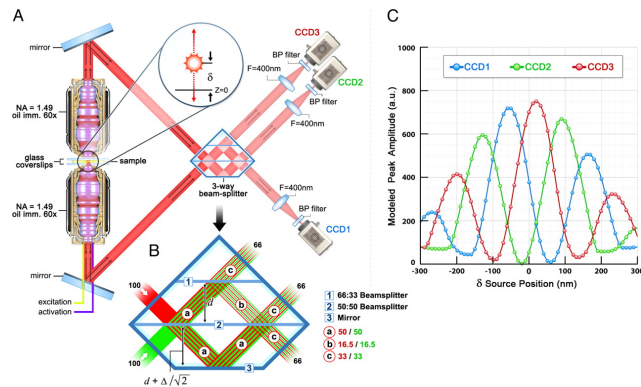
Eric Betzig és Harald Hess  
találmánya nyomán

### Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

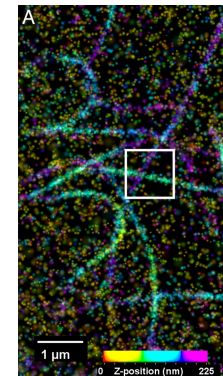
CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje



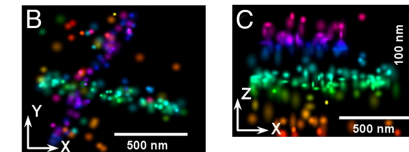
### Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



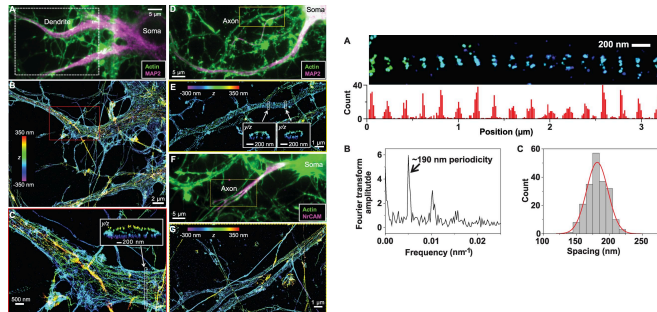
### Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



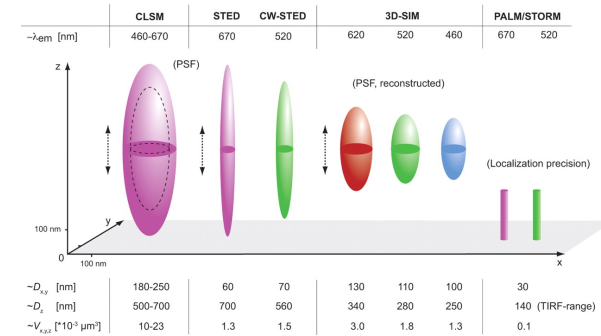
Mikrotubulus szerkezete PtK1 sejtekben,  
amelyek humán tubulinhoz fuzionált  
m-KikGR fluorofórt fejeznek ki.



### Axonok citoskeletális szerkezete



### Szuperrezolúciós technikák összehasonlítása

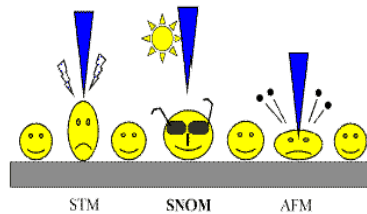


### Pásztázó tűszondás mikroszkópok

(Scanning Probe Microscopy – SPM)

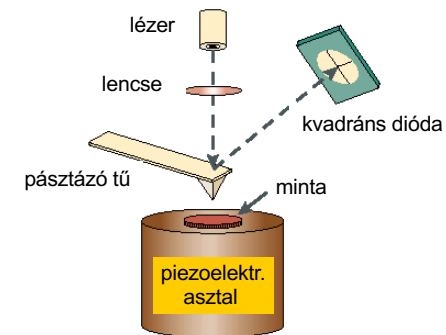
A mikroszkópok olyan családja, amely a minta felszínének domborzati képét hozza létre. Egy hegyes tűvel pásztázzunk a felszínt és a hegy-minta kölcsönhatást mérjük.

STM feltalálói (1981): Heinrich Rohrer and Gerd Binnig 1986-ban Nobel díjat nyertek ezért a munkáikért



### Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy - AFM)

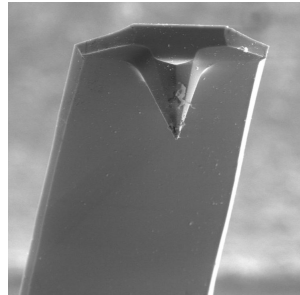
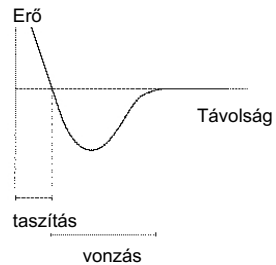
**AFM:** a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



### A tű és a minta közötti erő

A tű jellemzői:

- tipikusan 100  $\mu\text{m}$  hosszú, 1  $\mu\text{m}$  vastag, V alakú
- kis rugóállandó
- nagy rezonanciafrekvencia
- szilícium (-oxid, -nitrid)



### Contact Mode AFM

A tű és a minta állandó kontaktusban vannak.

A taszító tartományban dolgozik.

Állandónak tartja az erőt: követi a felszín hullámzását.

A mérőrugó függőleges deformációját detektáljuk.

Lokális erő spektroszkópia: a felület egy adott pontjában az erő/elmozdulás függvény.

### Tapping Mode AFM

A tű 20-100 nm amplitúdójú rezgéseket végez, minden rezgésnél érinti a felületet.

A rezgési amplitúdó és fázis változik ahogy a felszínen a kiemelkedések és mélyedések vannak.

### Előnyök és hátrányok

#### Contact Mode AFM

Előny:

gyors pásztázás  
atomi felbontás  
érdes felületekre jó

Hátrány:

a vízszintes erők torzítják a képet  
torzítás a minta felületén lévő víz miatt  
a lágy biológiai mintákat megkarcolja

#### Tapping Mode AFM

Előny:

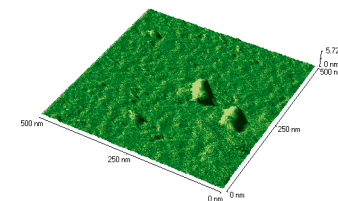
nagyobb laterális felbontás (1 – 5nm)  
kevésbé teszi tönkre a lágy mintákat

Hátrány:

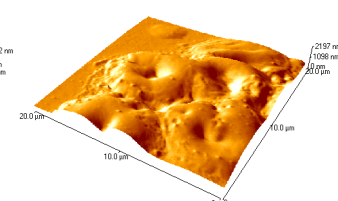
lassabb pásztázás

### Biológiai mintákról készült AFM képek

Hőssokk fehérjék



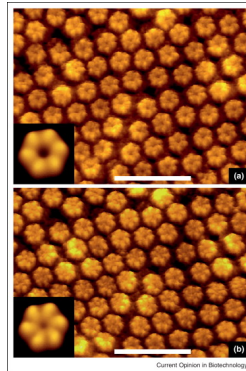
Vörös vérsejtek



### Extra-celluláris konnexon AFM képe

Kalcium-indukált konformáció változás az extra-celluláris konnexon felszínben.

A vonal 23 nm hosszú.



### Az elektron mint hullám



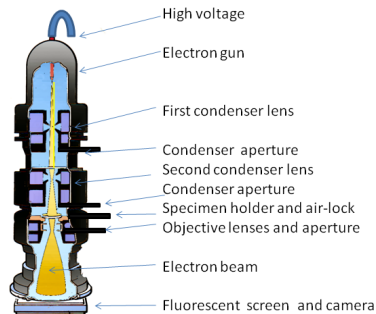
Louis de Broglie:

$$\lambda = h / p$$

$\lambda$  az elektron hullámhossza  
 $h$  a Planck állandó  
 $p$  az elektron impulzusa

Louis-Victor-Pierre-Raymond,  
 de Broglie hetedik hercege

### Transzmissziós elektronmikroszkóp

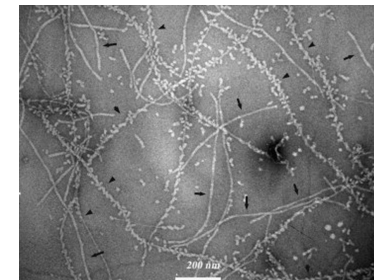


Ruska 1933-ban épült  
 elektronmikroszkópja



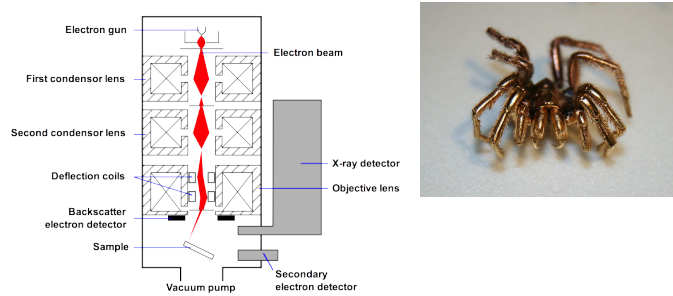
Ernst August Friedrich Ruska és Max Knoll készítették az első elektronmikroszkópot 1931-ben. Ruska 1986-ban Nobel díjat kapott az elektronoptika fejlesztése terén elért eredményeiért.

### Amiloid szálak transzmissziós elektronmikroszkópi képe



Koleszterin kötődése  
 amiloid fibrillumokhoz.

## SEM



## SEM



## ESEM

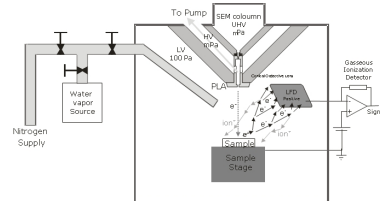
$p > 609 \text{ Pa}$   
 $p \cdot L = 1 \text{ Pa} \cdot \text{m}$

előny:

- hidratált minta
- nem csak vezető minta
- a gáz mint detektor

hátrány:

- a mintatér magassága:  
töredék
- $\text{mm} < 10 \text{ mm}$
- limitált képterület



## Pollen pásztázó elektronmikroszkópos képe

