

Neue Methoden in der Mikroskopie

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



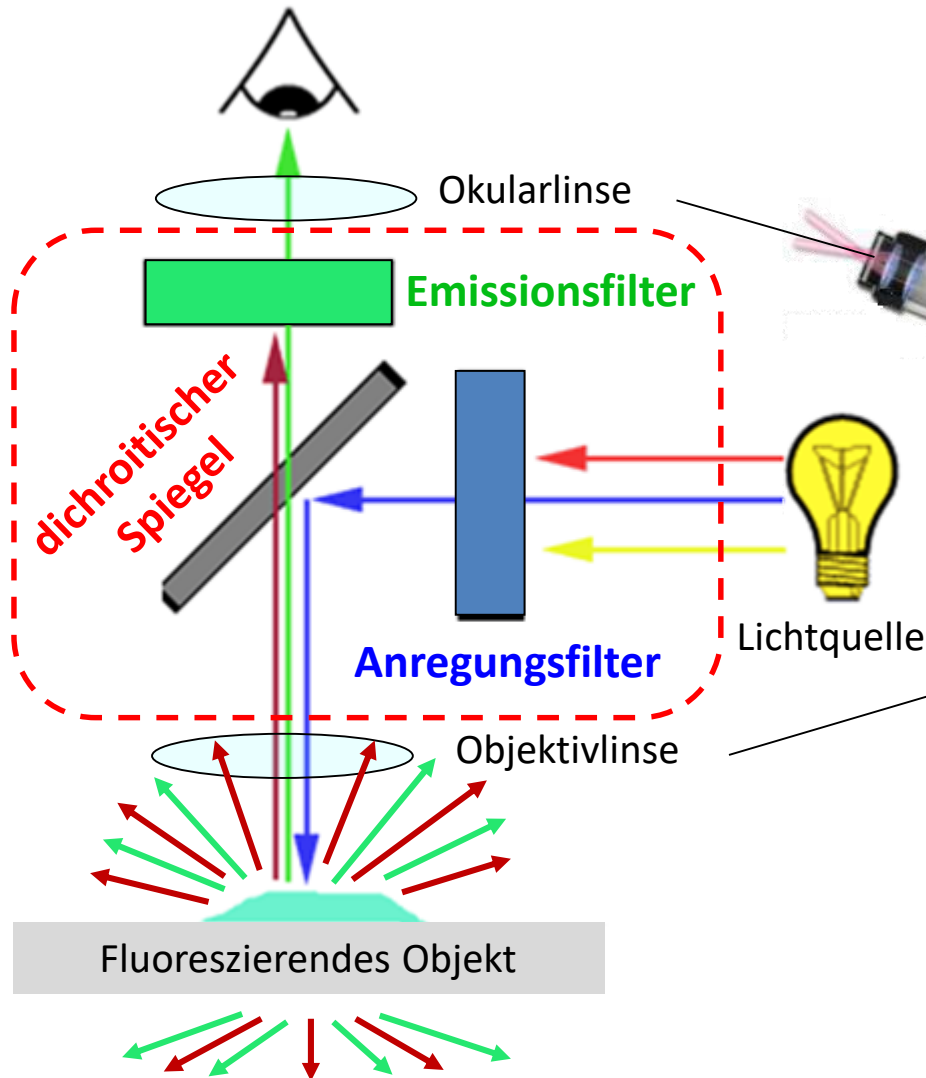
**Myofilament-Mechanobiophysik Forschungsgruppe,
Semmelweis Universität,
Institut für Biophysik und Strahlenbiologie.**

31. Oktober 2023.

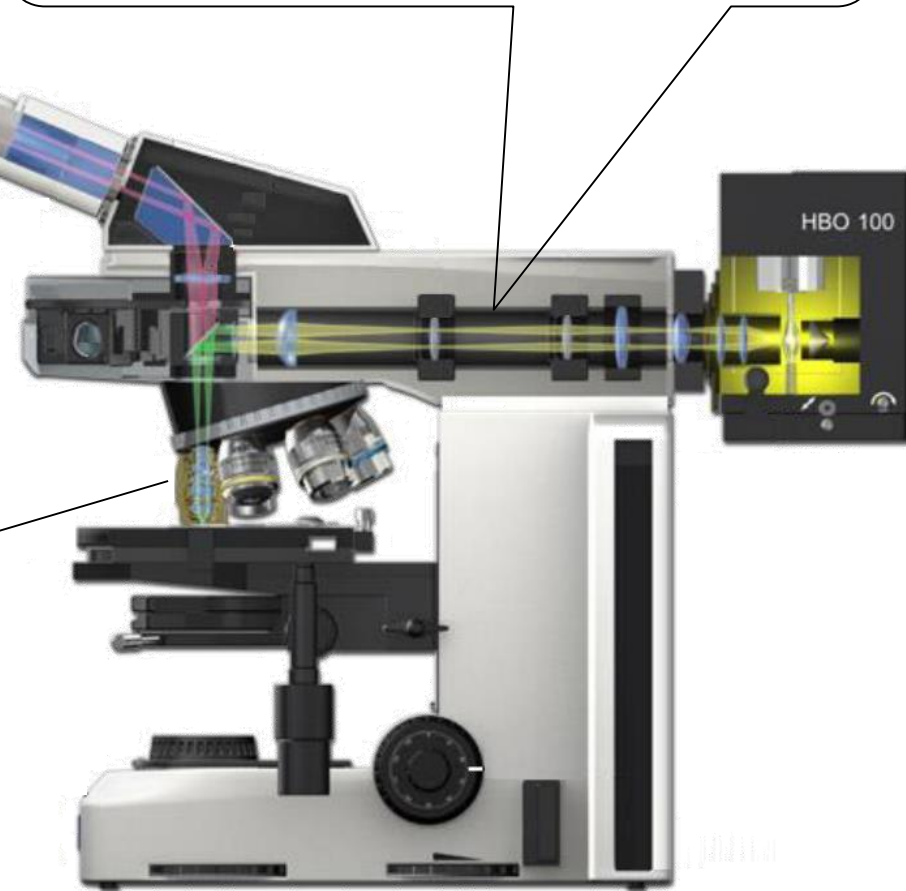
Spezielle Lichtmikroskope

Fluoreszenzmikroskop 1.

Epifluoreszenz-Anordnung:

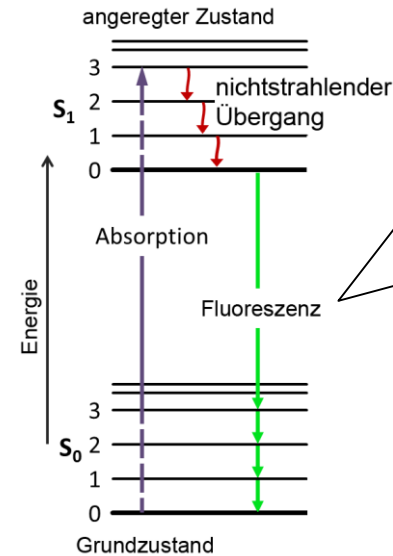
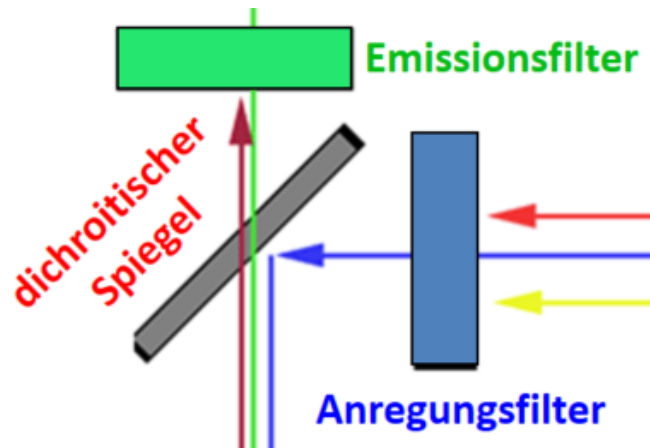


„Auflicht-Fluoreszenzmikroskop“:
Anregungslicht wird über das Objektiv in
das Präparat eingestrahlt.



Fluoreszenzmikroskop 2.

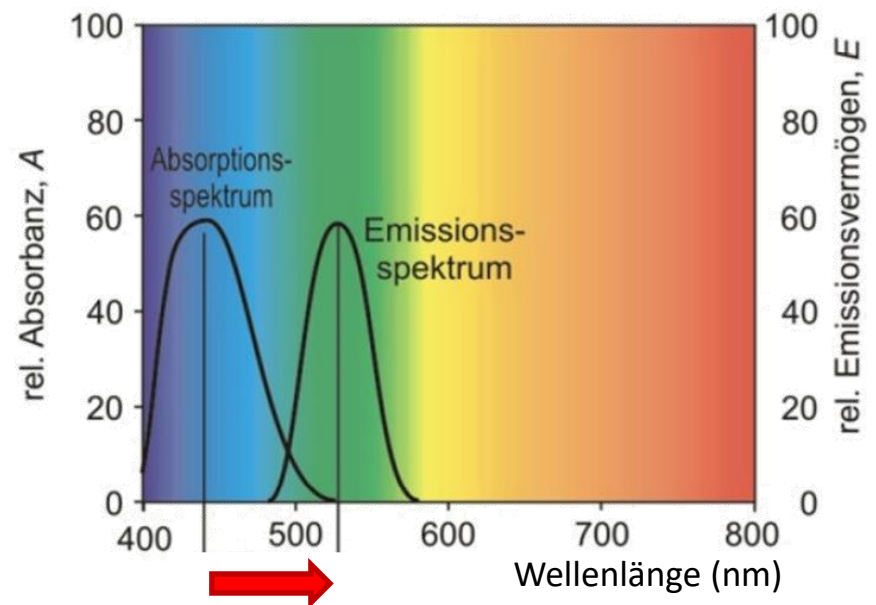
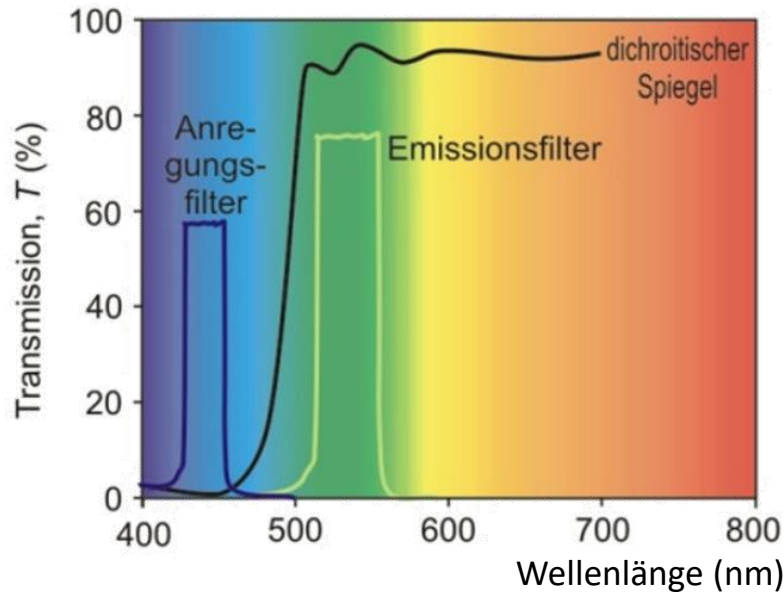
Physikalische Grundlagen:



Stokes-Verschiebung:

$$E_{\text{Abs}} > E_{\text{Fluo}}$$

$$\lambda_{\text{Abs}} < \lambda_{\text{Fluo}}$$



Fluoreszenzmikroskop 3.

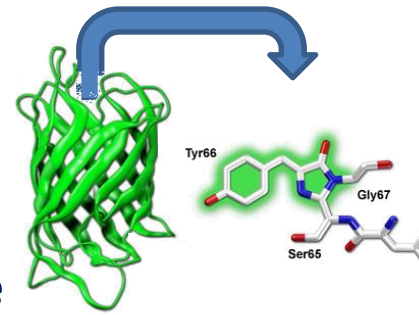
Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

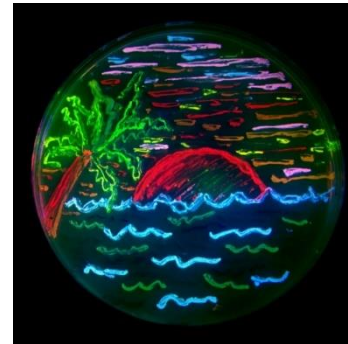
- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

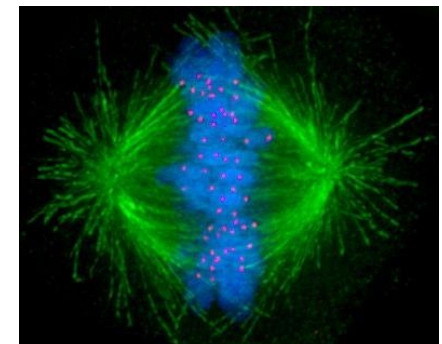
- **Der ideale Fluorophor:**
 - klein
 - hydrophil
 - emittiert im sichtbaren Lichtbereich
 - große Stokes-Verschiebung
 - spezifische Bindung
 - verursacht keine photochemische Reaktionen
- **fluoreszierende Proteine:**
 - GFP: Green Fluorescent Protein
 - FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

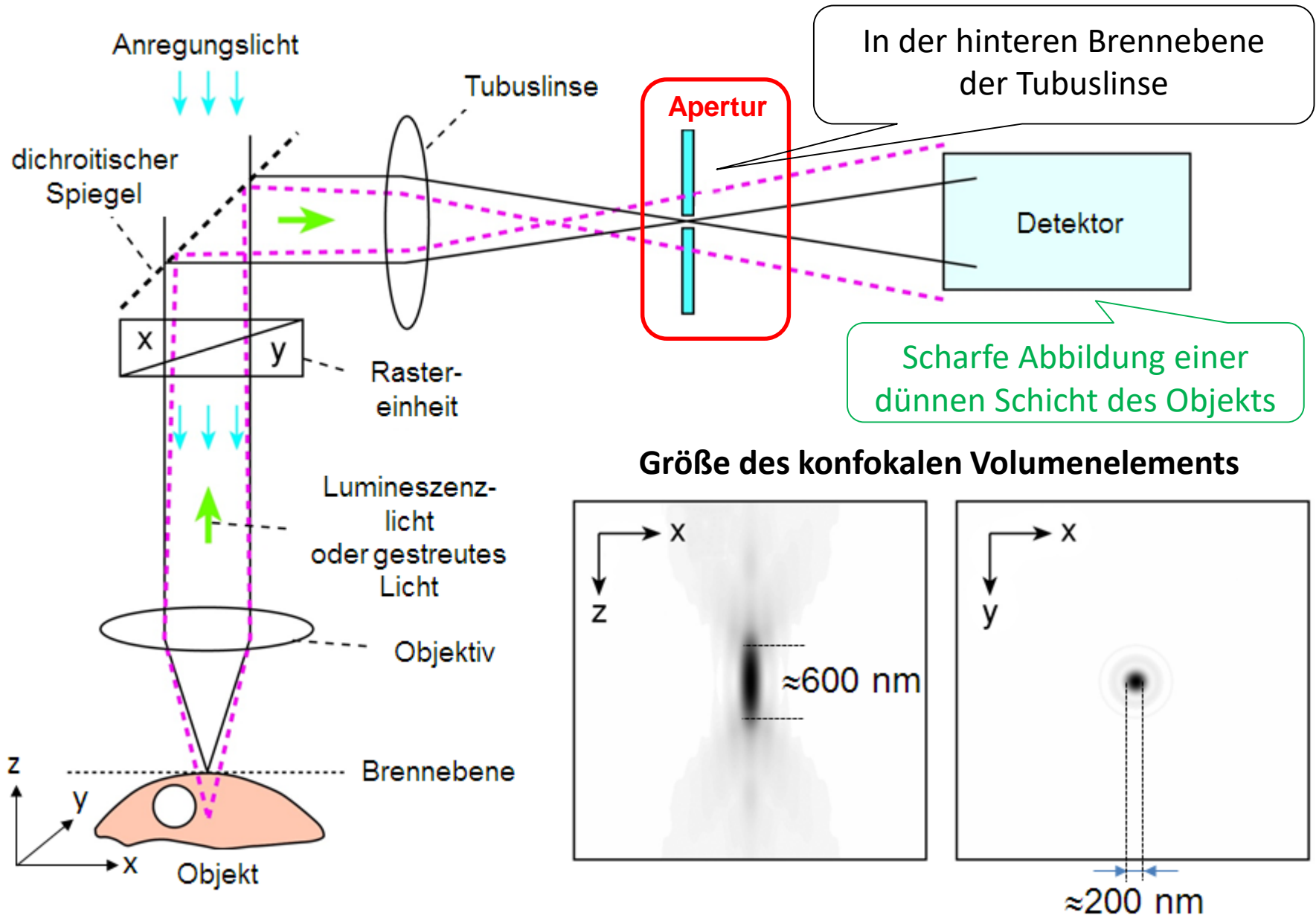


Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren



Mikroskopische Aufnahme während der Metaphase einer Mitose (Mikrotubuli: grün, Chromosomen: blau, Kinetochoren: rosa).

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)

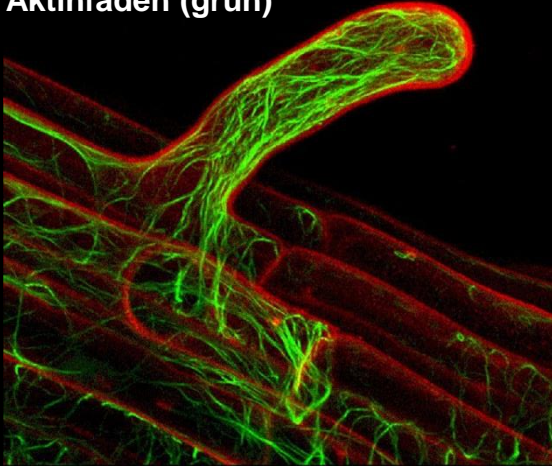


Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM): Funktionsprinzip

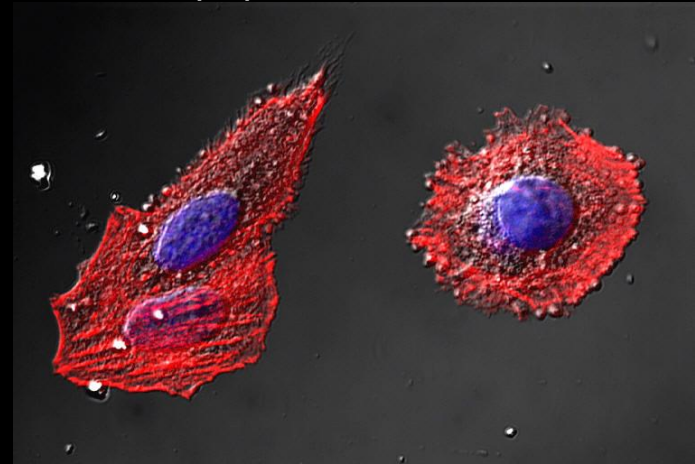
**Fluorescence
and confocal
microscopes**

Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 1.

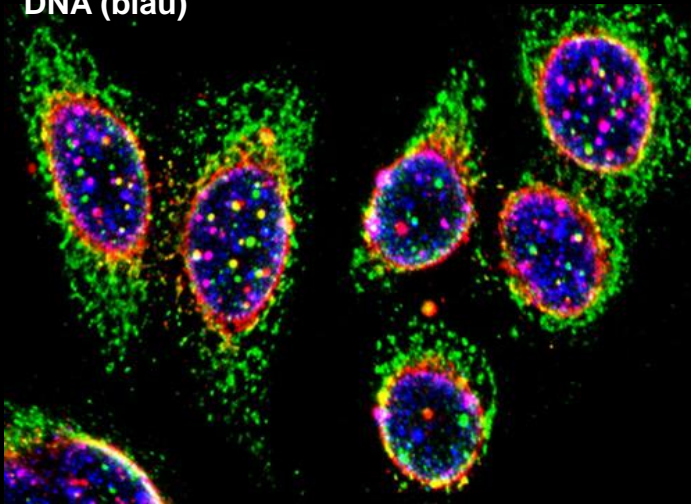
Aktinfaden (grün)



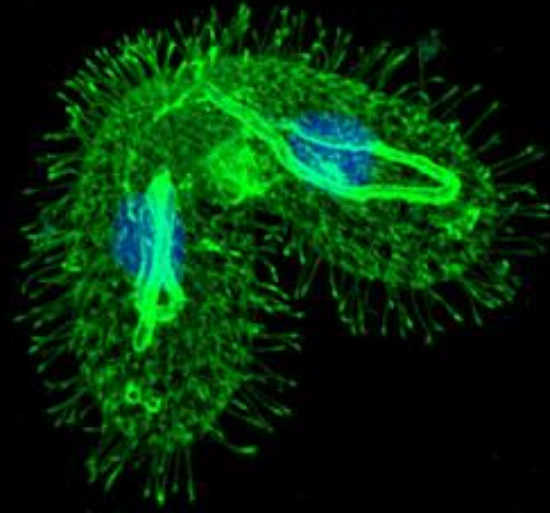
Aktinfaden (rot)



DNA (blau)



Mikrotubuli (grün)



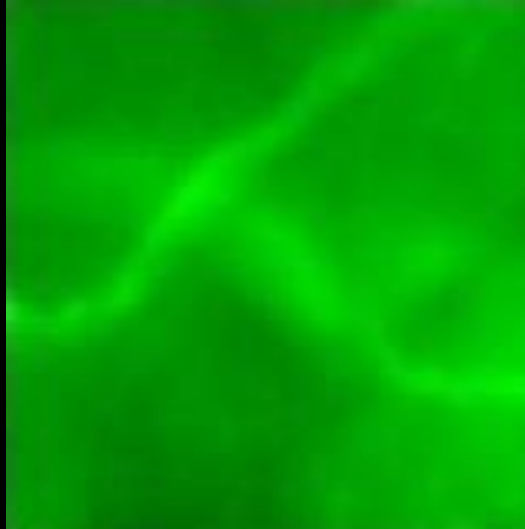
Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 2.

Fluoreszenzmikroskop

Medulla



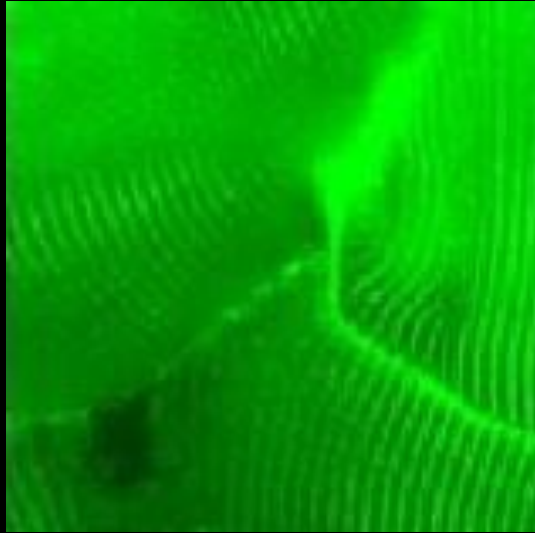
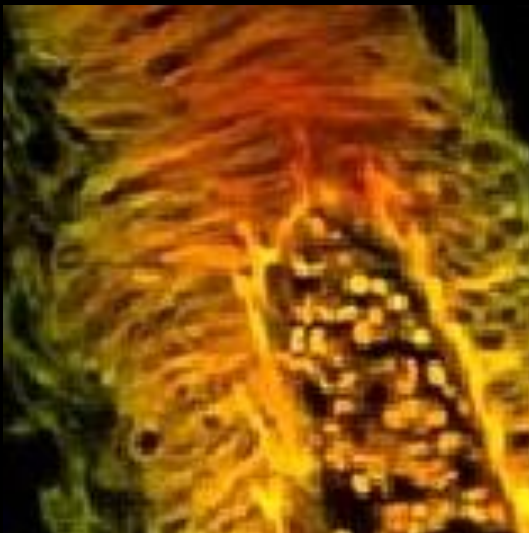
Skelettmuskel



Pollen



CLSM



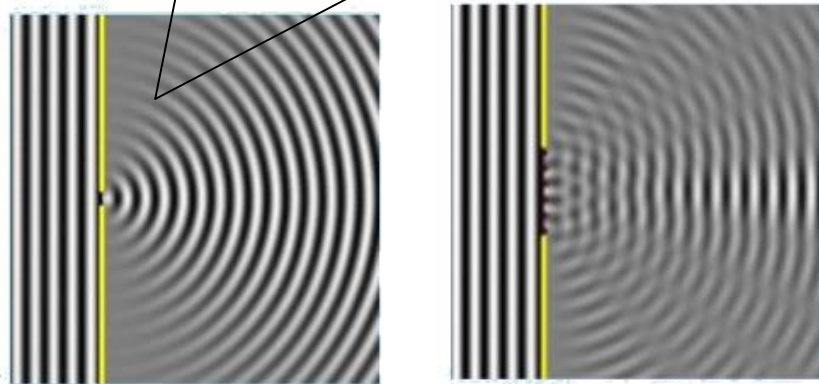
Superresolutionsmikroskope

Grundproblem – 1.

Beugung des Lichtes:

Huygensches Prinzip:

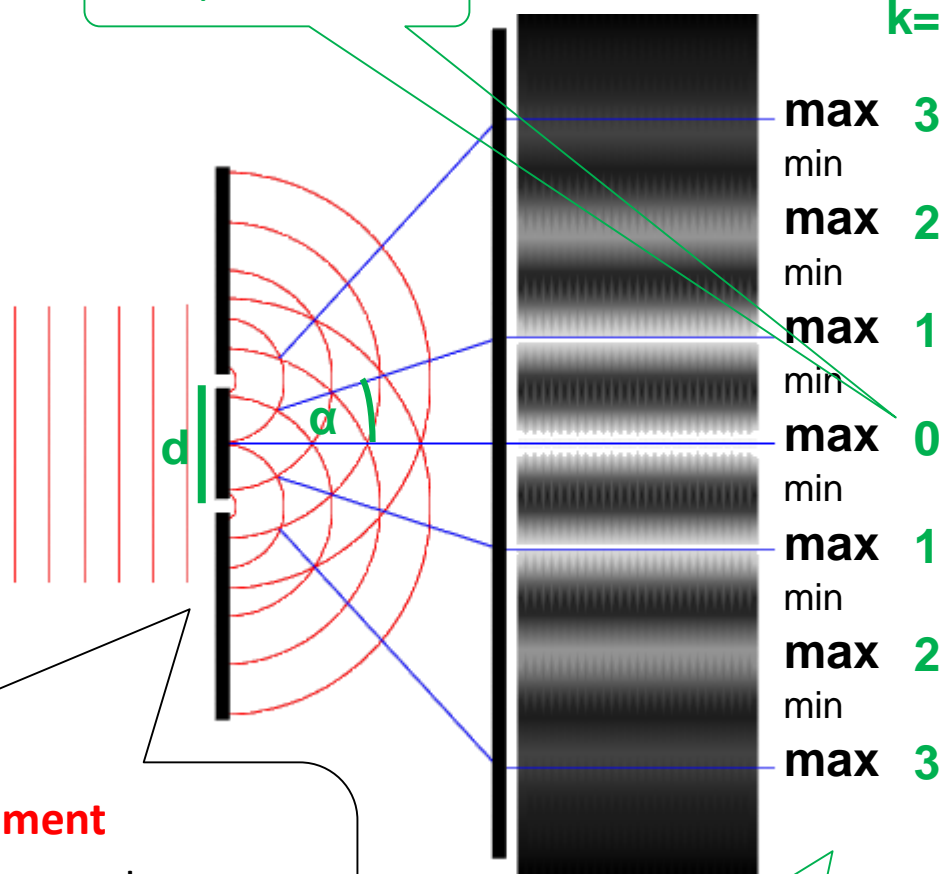
jeder Punkt einer Wellenfront dient als Ausgangspunkt einer neuen Welle



Thomas Young: Doppelspaltexperiment

Interferenzmuster entsteht durch Beugung der Wellenausbreitung am Doppelspalt. Bei monochromatischem Licht besteht dieses Muster auf dem Schirm aus **hellen Streifen (Maxima)** und **dunklen Streifen (Minima)**.

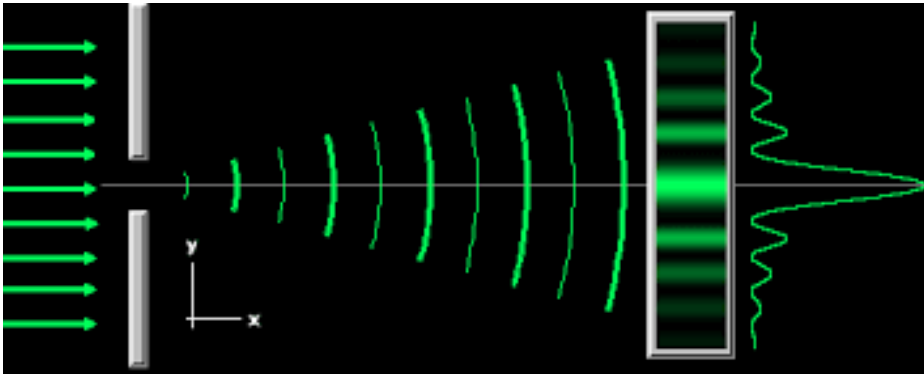
Hauptmaximum



Maximale Verstärkung:
 $k \cdot \lambda = d \cdot \sin(\alpha)$

Grundproblem – 2.

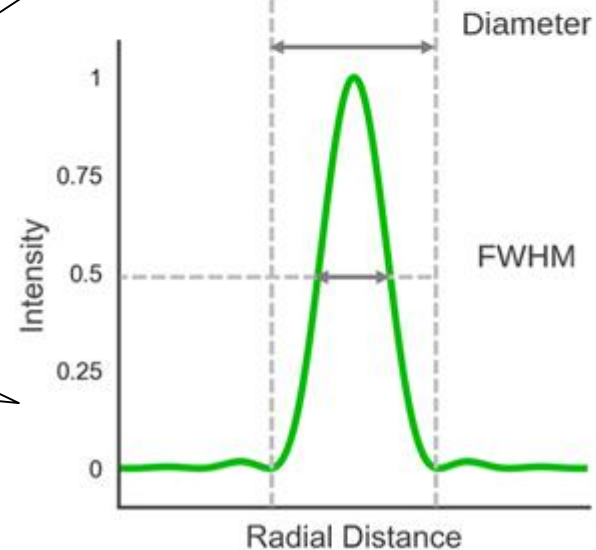
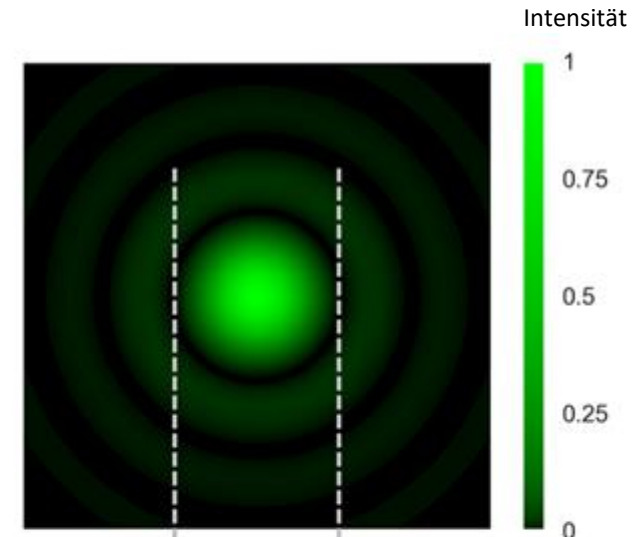
Entstehung der Beugungsscheiben:



Airy-Scheibe:

zentrales Maximum, umgeben von
Ringen abnehmender Intensität.

Das zentrale Maximum enthält 84%
der Intensität, die Umgebung enthält
16% der Intensität.



Grundproblem – 3.

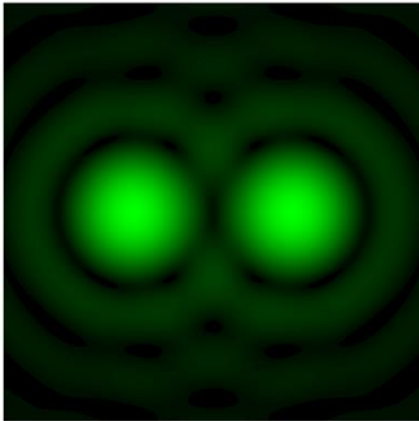
Rayleigh-Grenzfall:

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

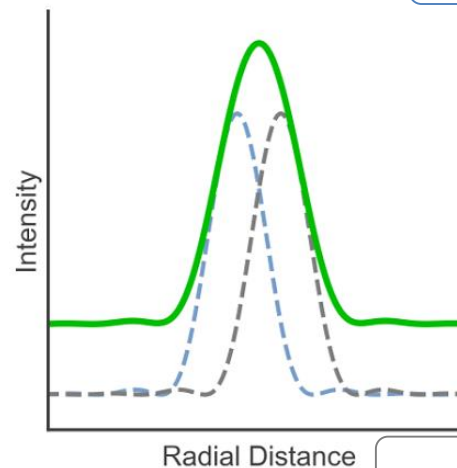
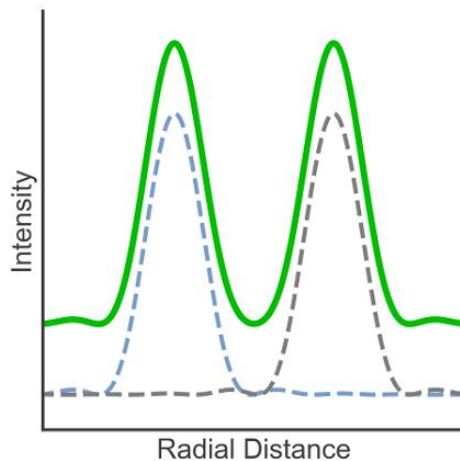
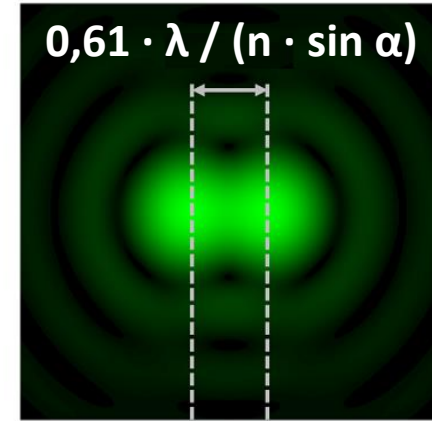
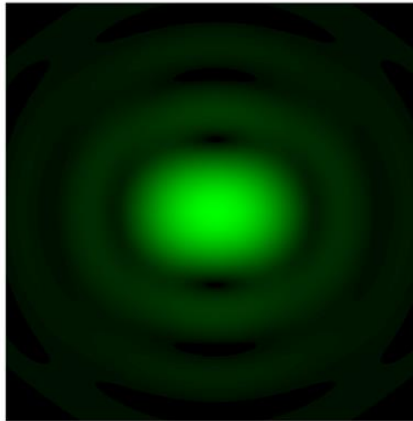
Hauptmaximum stimmt mit dem ersten Minimum der benachbarten

Beugungsscheibe

auflösbar

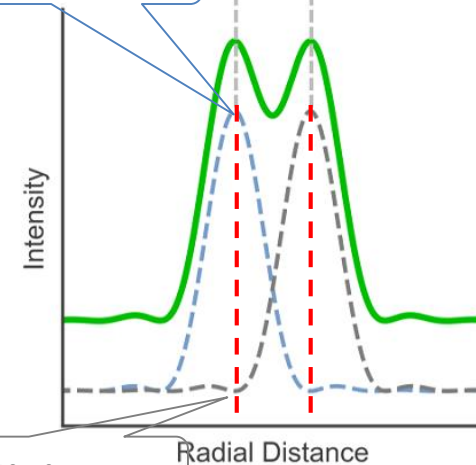


nicht mehr auflösbar

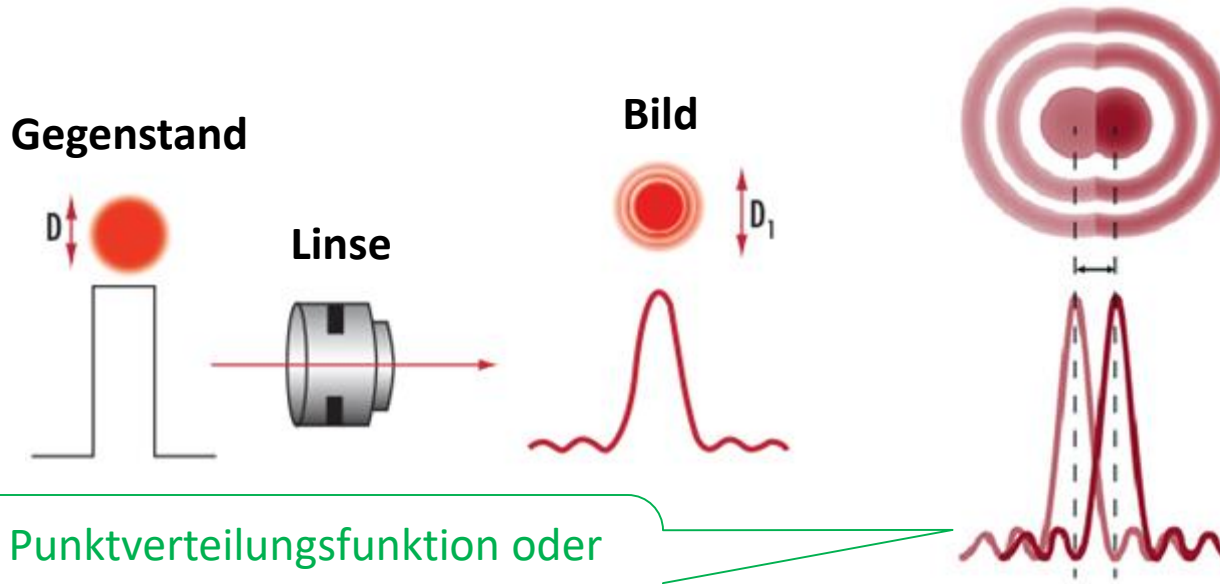


Hauptmaximum

erstes Minimum



Lichtmikroskop



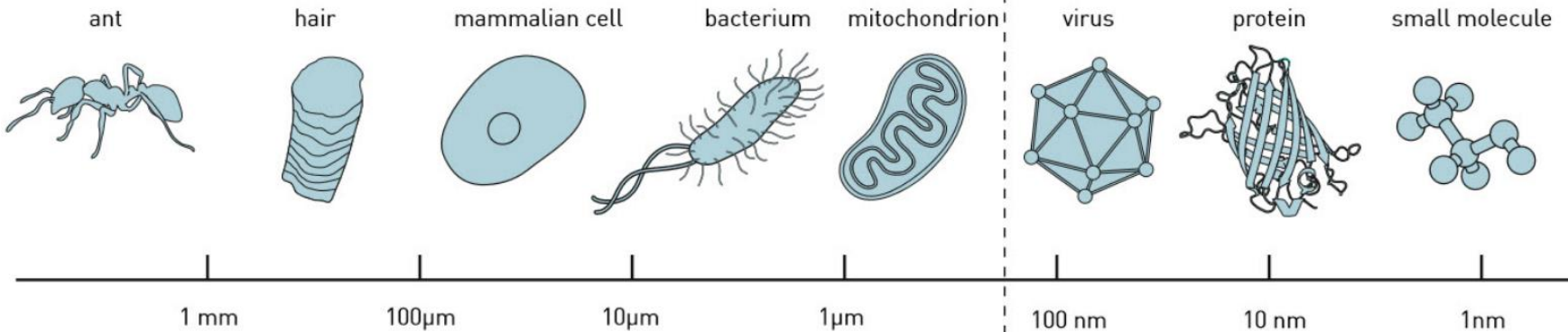
Das Abbesche Prinzip:

Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

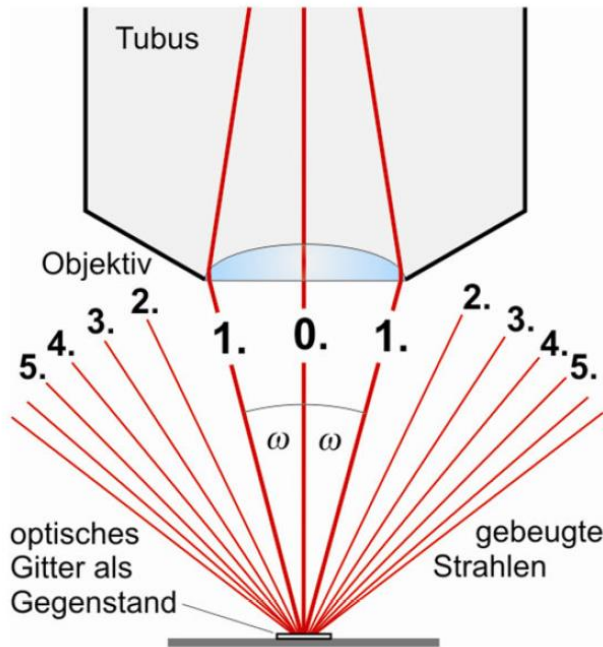
$$\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \omega}$$

Numerische Apertur (NA)

Abbe-Limit bei ~200 nm



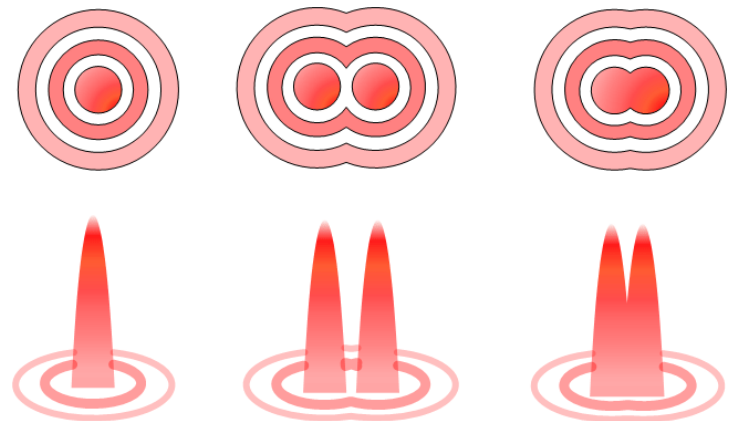
Abbe-Prinzip, Punktverteilungsfunktion



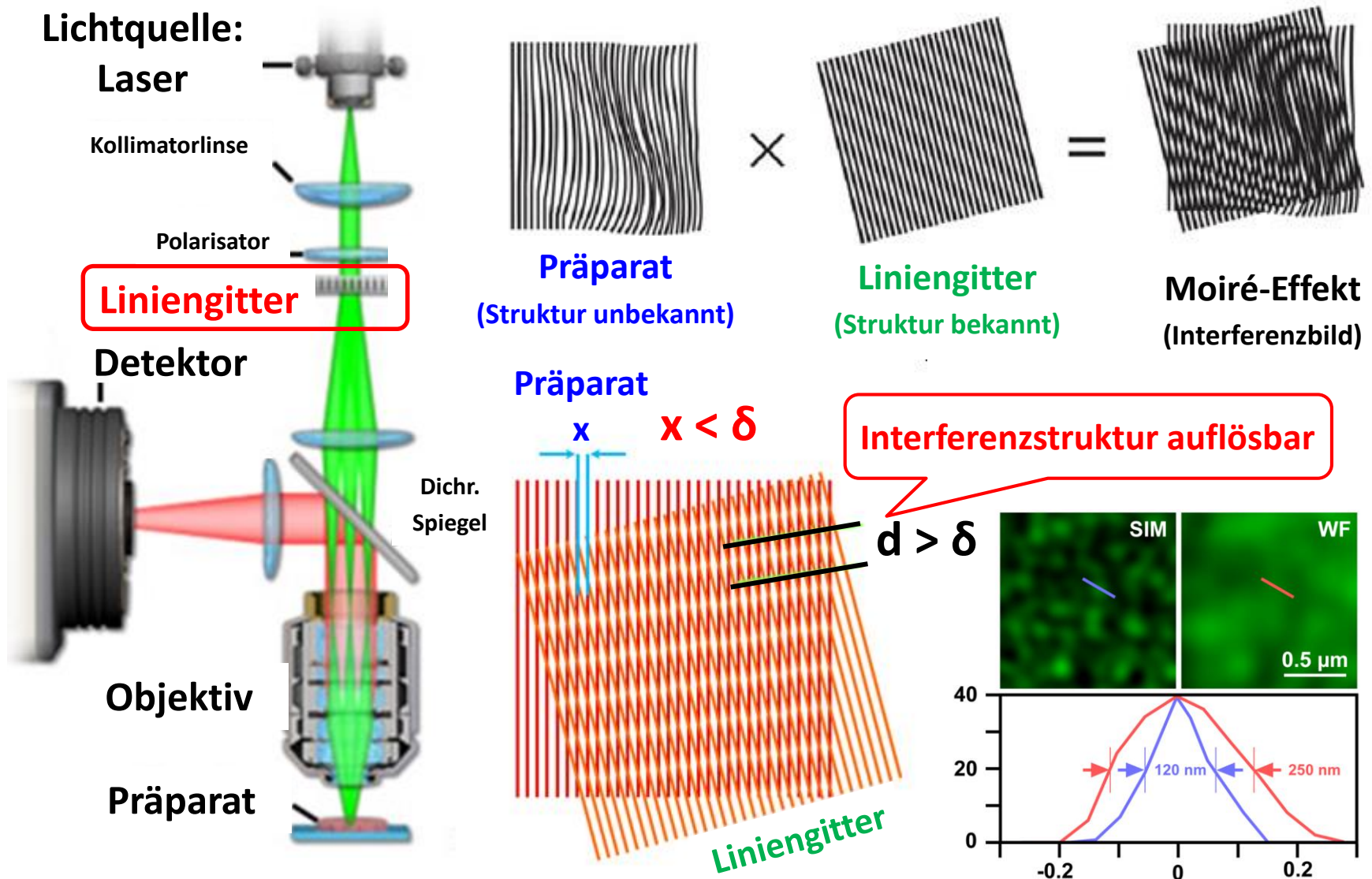
außer dem Hauptmaximum die
Beugungsstrahlen erster Ordnung
sollen in den Tubus gelangen

$$\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \omega}$$

- **λ: Wellenlänge erniedrigen**
 - blauer Lichtfilter,
 - UV-Licht,
 - Elektronenstrahl: SEM, TEM.
- **n: erhöhen (Immersionsöl)**
- **ω: halben Öffnungswinkel erhöhen**



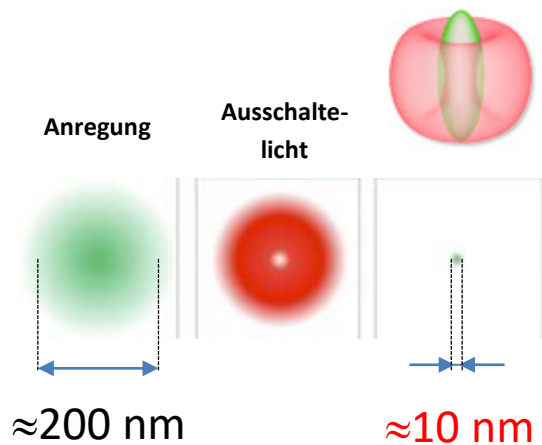
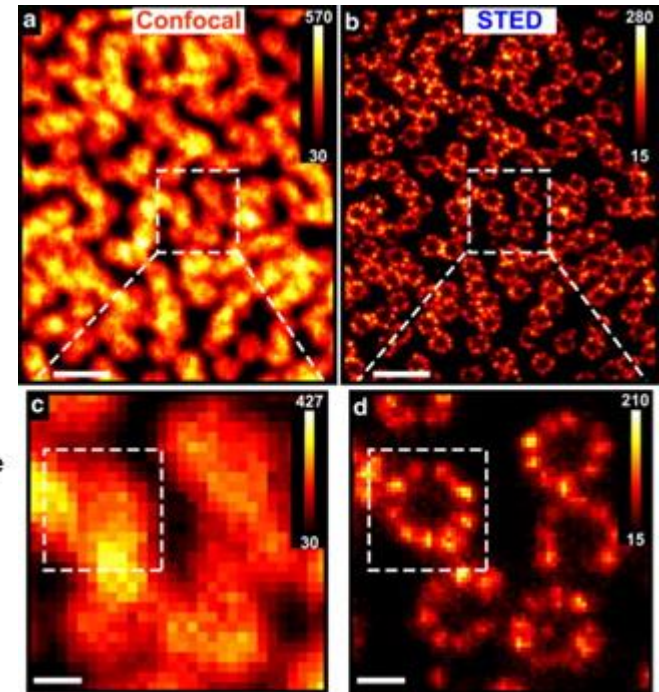
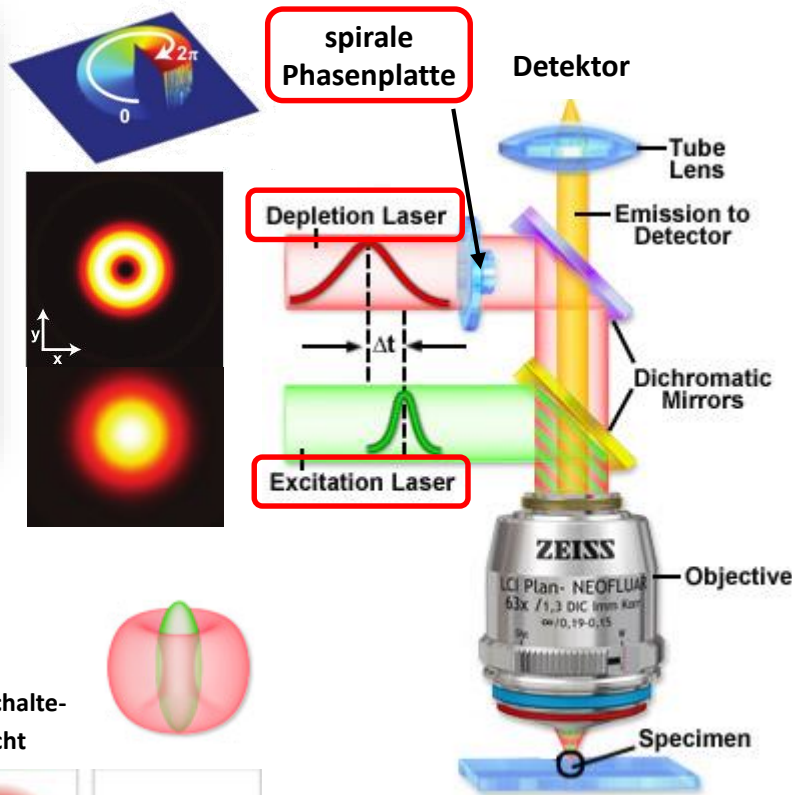
Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung, Structured Illumination Microscopy (SIM)



Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)



Stefan W. Hell
Nobel Preis 2014

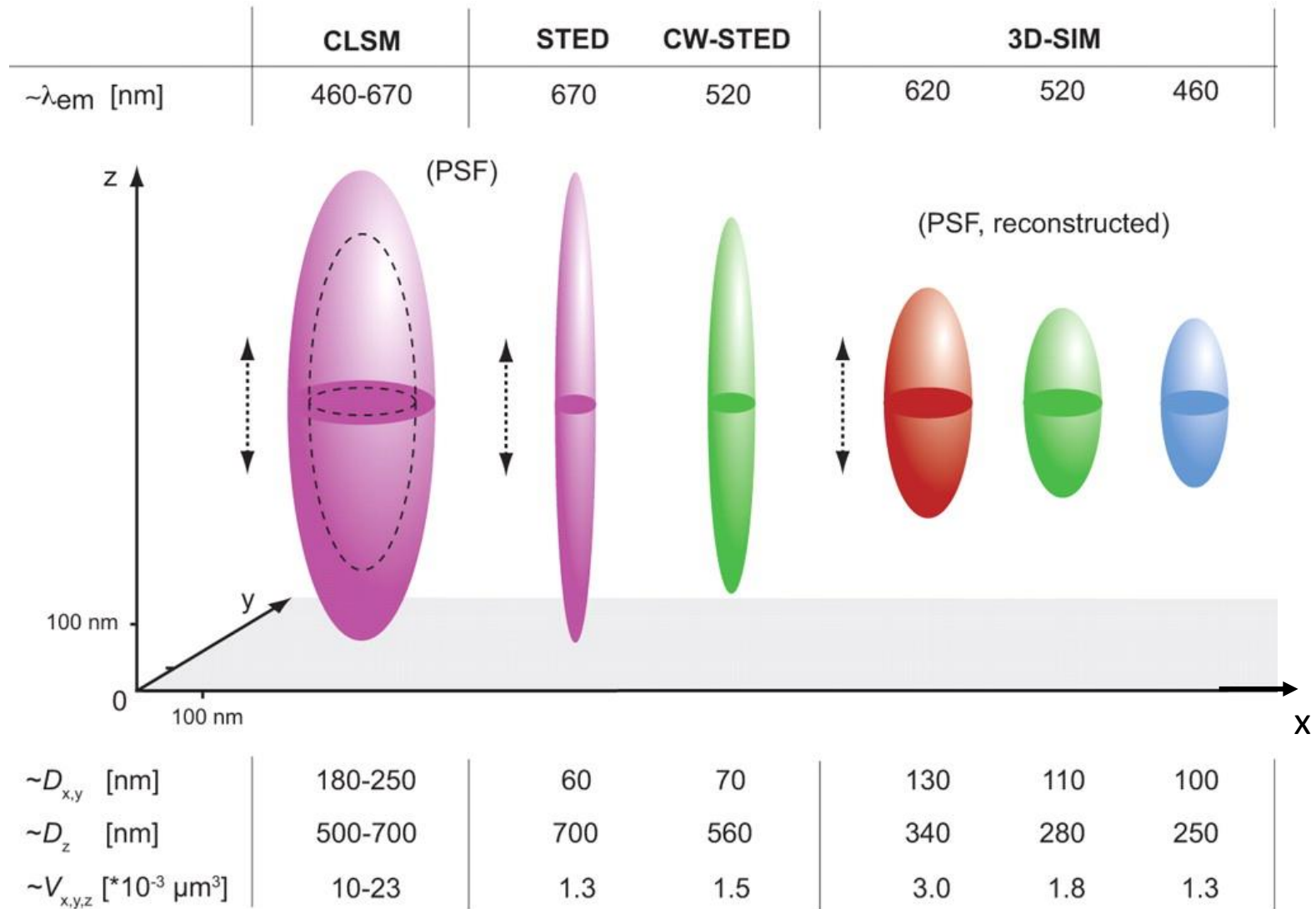


Abbe-Grenze

Superresolution

- **Anregung** gleich nach der „**Ausschaltung**“ der Fluorophoren
- **Stimulierte Emission** in einer sehr kleinen Raumteil: **Spirale Phasenplatte**
- **Abtastung** ist notwendig

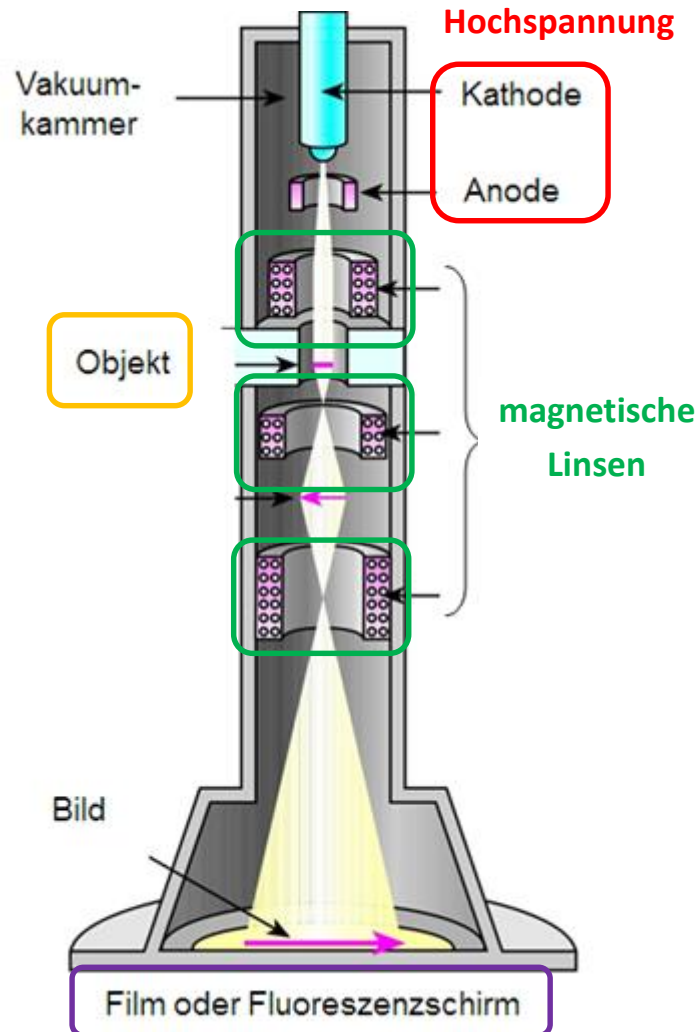
3D-Auflösung der Spezialmikroskope



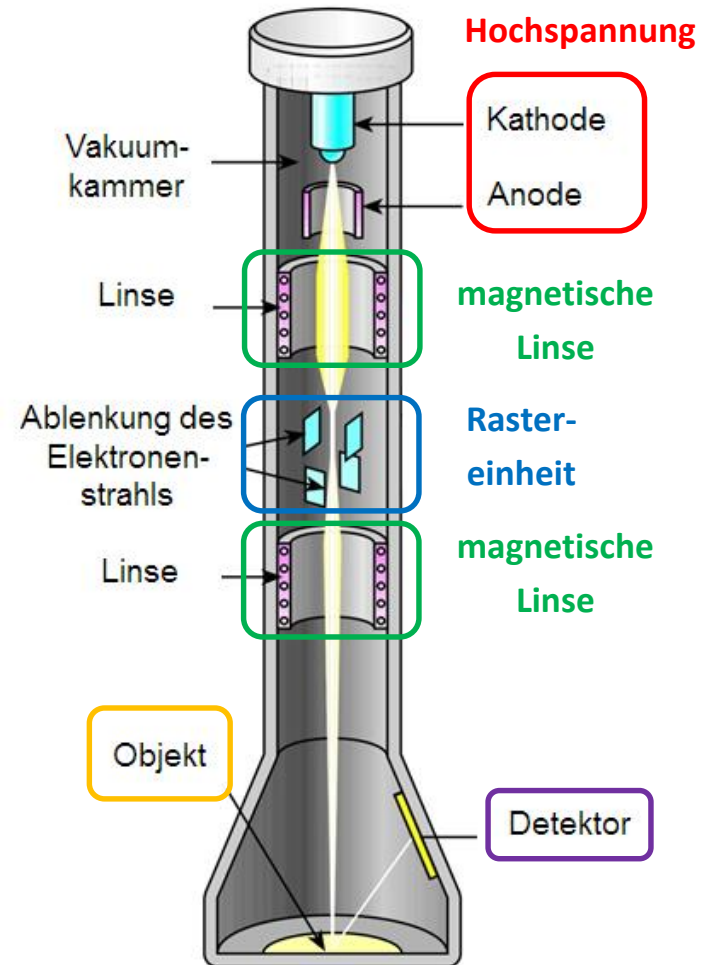
Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskope

Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM)

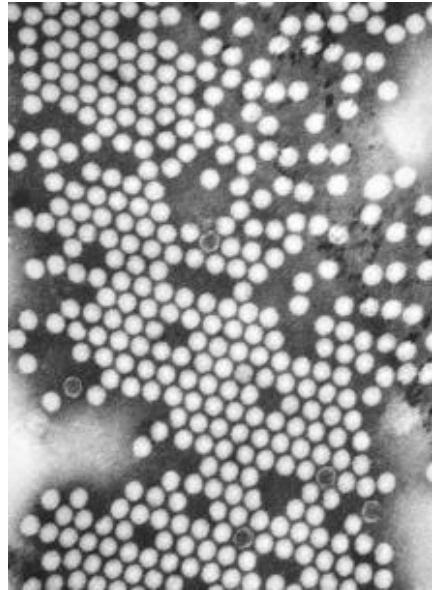


Raster-Elektronenmikroskop (SEM)

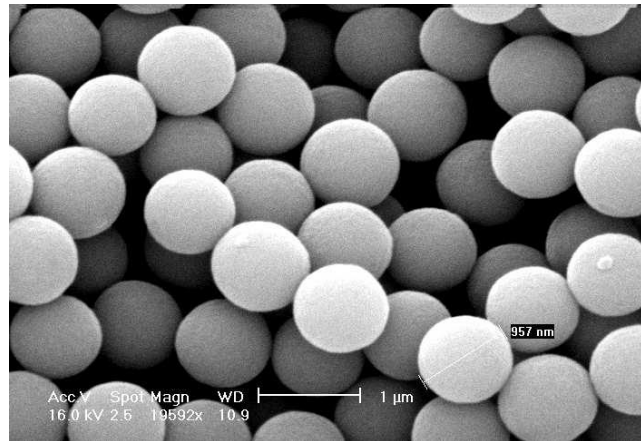


Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugelchen (SEM)



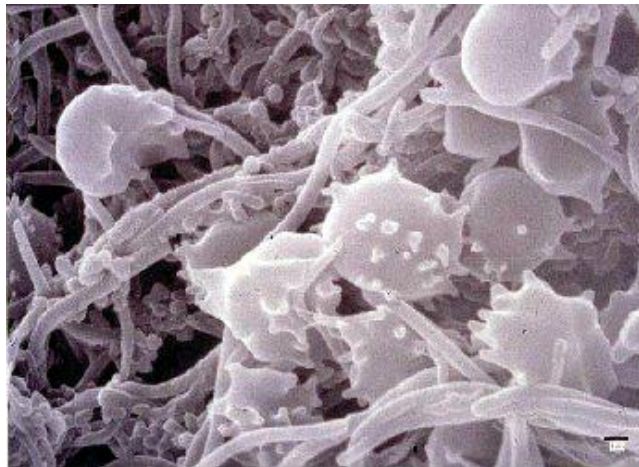
Auflösungsgrenze (δ):

$$\left. \begin{array}{l} \delta \approx \frac{\lambda}{NA} \\ NA \approx 0,03 \\ \lambda \approx 0,005 \text{ nm} \end{array} \right\} \delta \approx 0,2 \text{ nm}$$

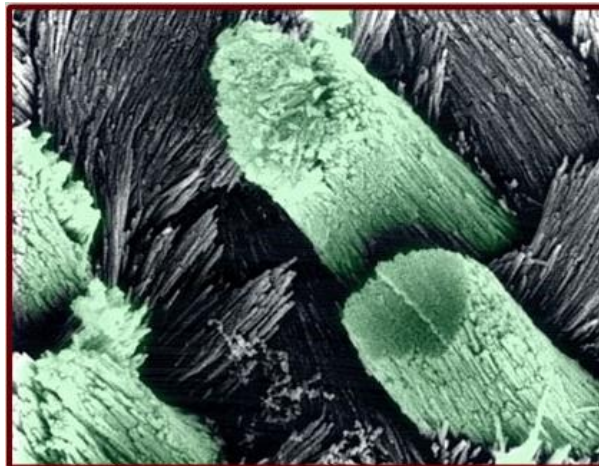
s. Materiewellen

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



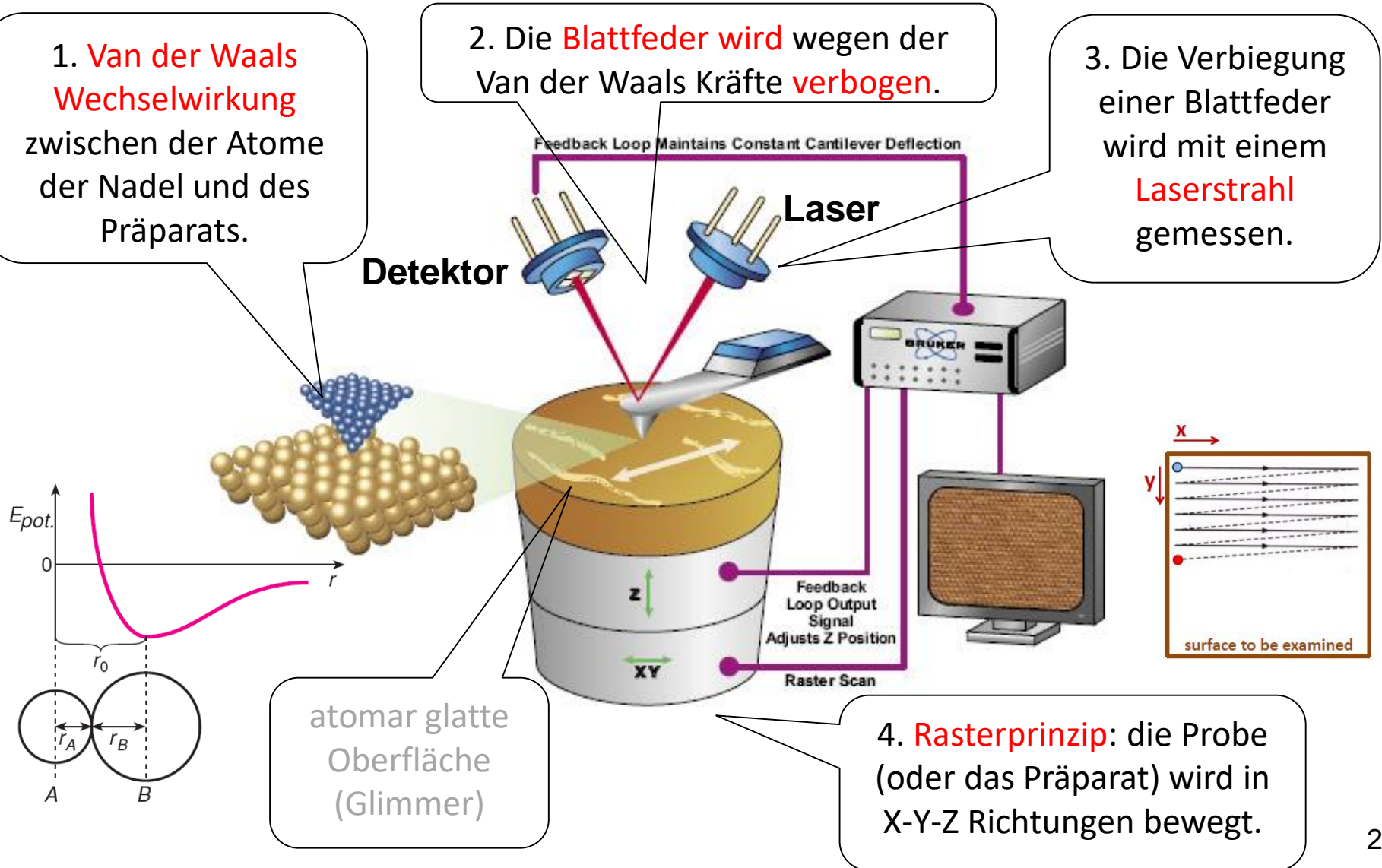
Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



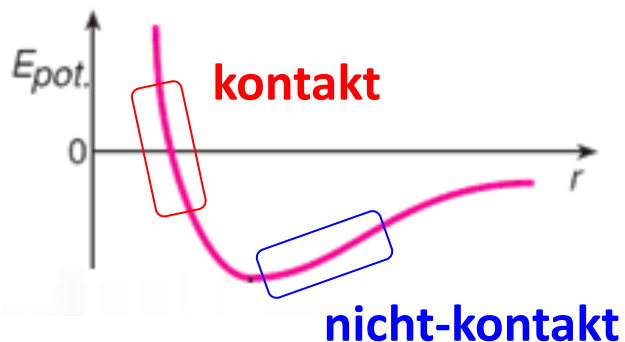
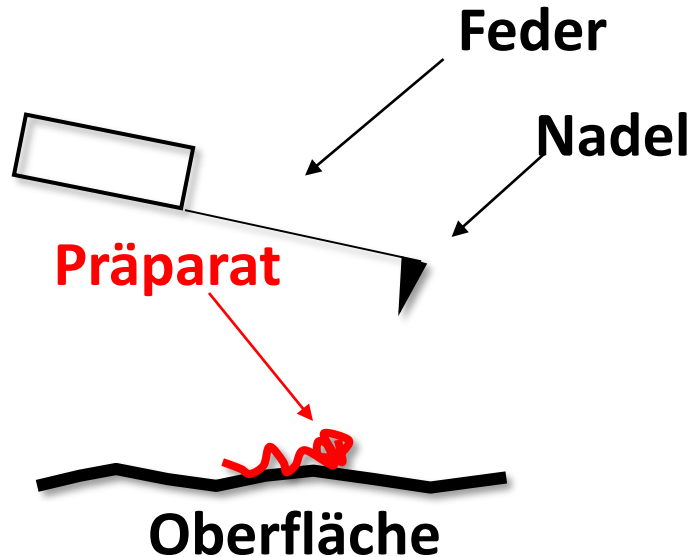
Rastersondenmikroskopie

Rasterkraftmikroskop

(Atomic Force Microscope, AFM)



AFM Betriebsarten



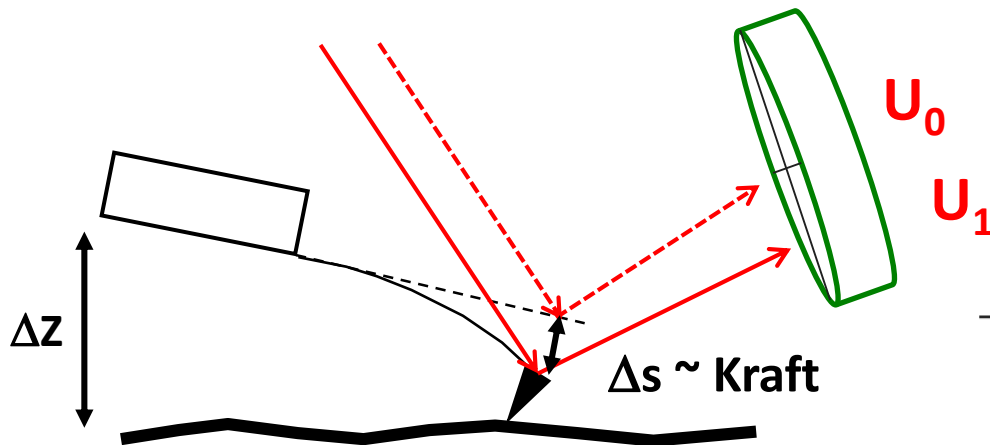
- **Kontakt:** die Messspitze steht in direktem mechanischem Kontakt mit dem Präparat, die **Auslenkung der Feder** liefert die topographische Information.
 - **Z-Rückkopplung:** die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe wird mit dem „Setpoint“ verglichen. Die Regelung bewirkt dann eine Höhenänderung bis die Auslenkung dem Setpoint entspricht.
 - **Die topographische Information** (zB. Höhe) wird in jedem X-Y Bildpunkt aus der ΔZ Höhenänderung des Cantilevers errechnet.
- **Nicht-Kontakt:** der Feder schwingt an seiner Resonanzfrequenz weiter von dem Präparat. Die **Amplitude und die Eigenfrequenz (f_0)** ändern sich mit der Topographie des Präparats.
 - **Z-Rückkopplung:** sorgt für eine **konstante Amplitude** mit der ΔZ Höhenänderung des Cantilevers.

AFM: Kontakt-Modus

eignet zur Untersuchung
von weichen
biologischen Strukturen
(z.B. Zellen)

Laserstrahl

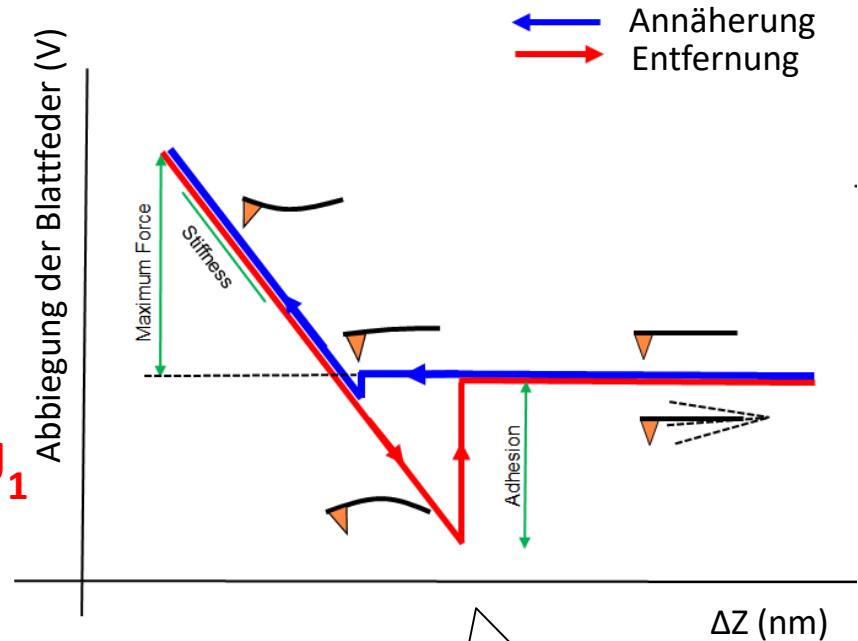
Detektor
(Photodiode)



$$F = D \cdot \Delta s \text{ (Hookesches Gesetz)}$$

Δs : Abbiegung der Blattfeder

D: Federkonstante

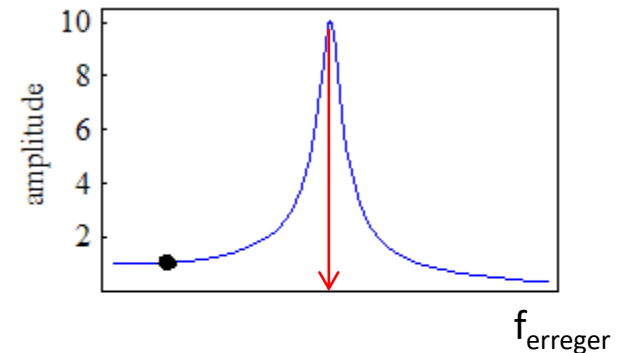
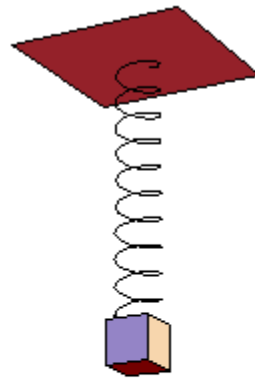


- Kraftmessung
 - Elastizitätsmessung (D)
 - Adhäsionsmessung
- an biologischen Präparaten

AFM: Nicht-Kontakt-Modus

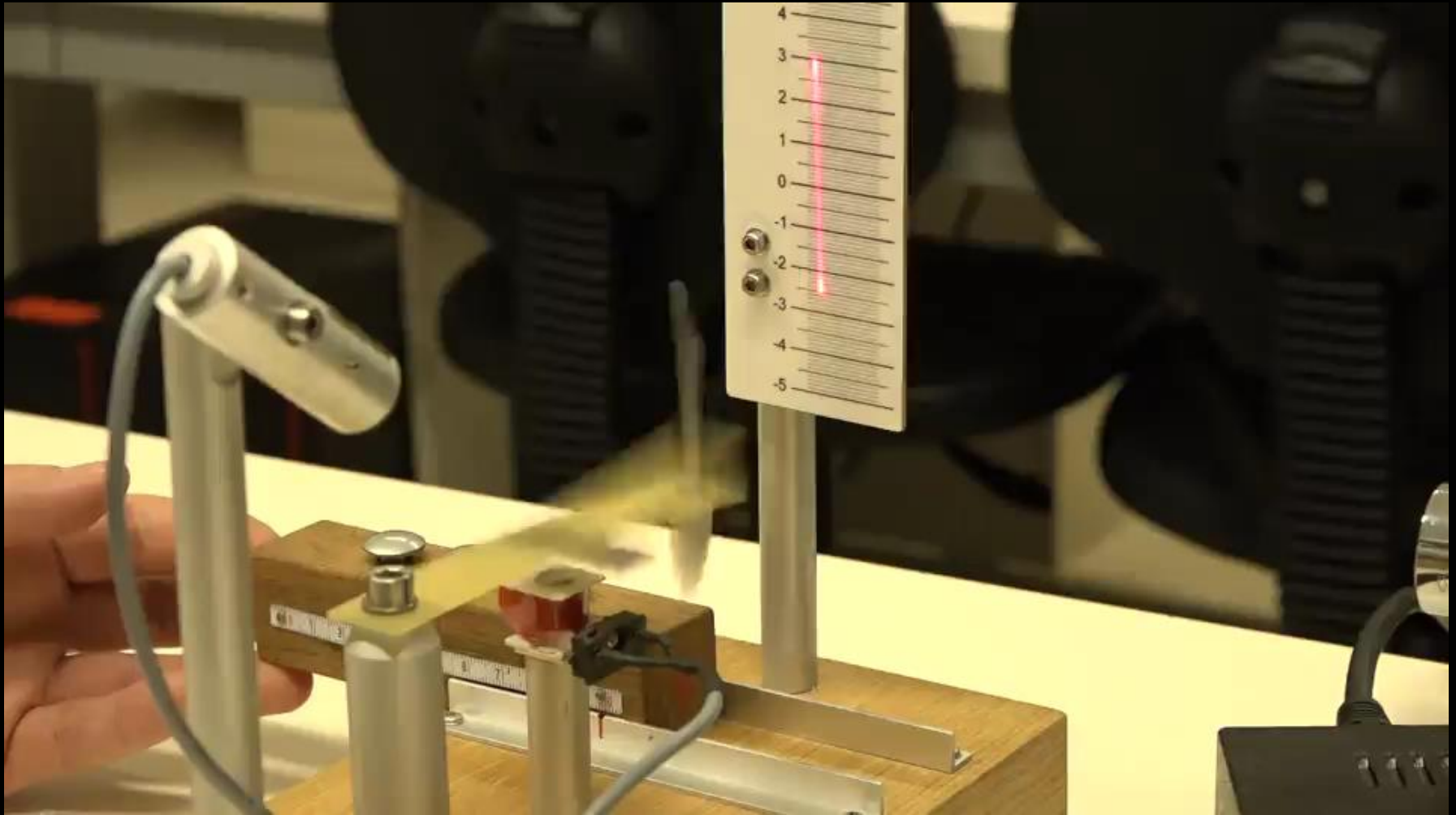
Resonanz: Eine erzwungene Schwingung, bei der die Frequenz der äußeren Krafteinwirkung nahe der Eigenfrequenz des Schwingungssystems liegt. In diesem Fall können sehr große Amplituden auftreten.

Erzwungene Schwingung



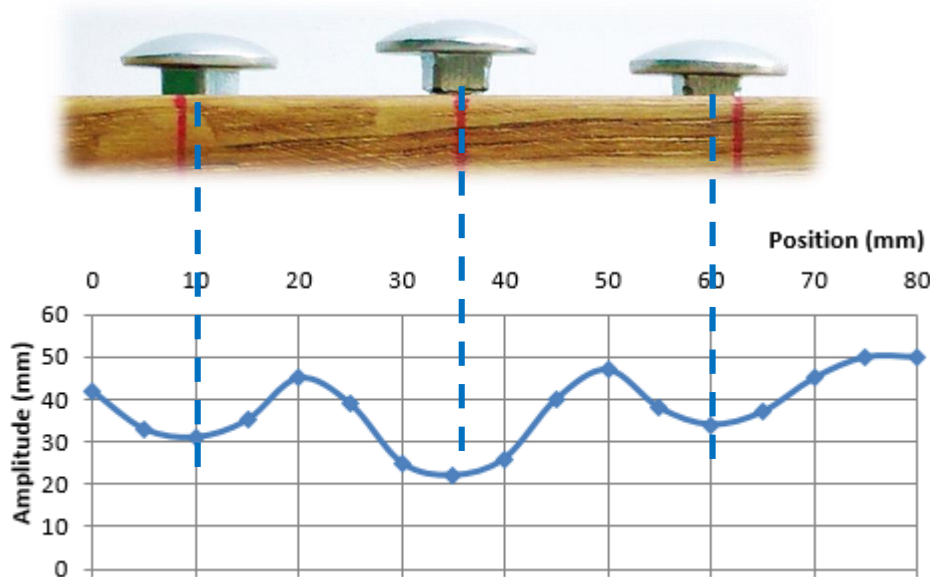
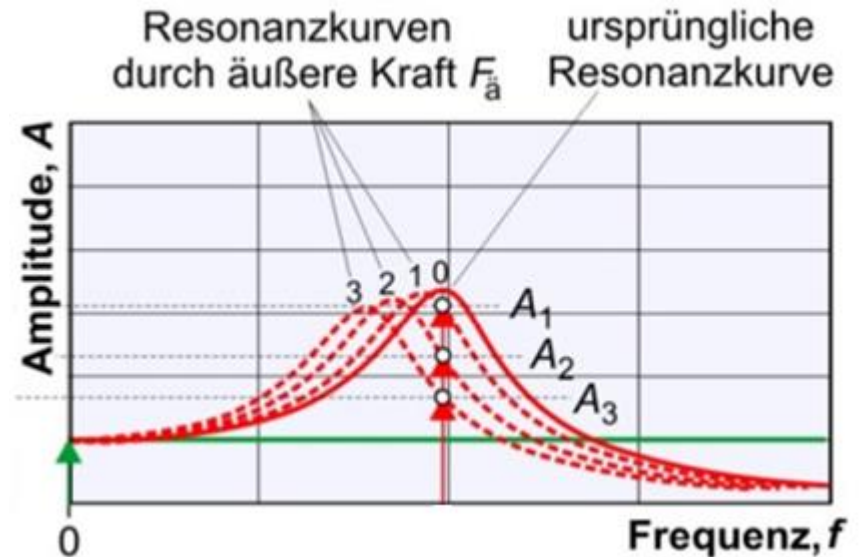
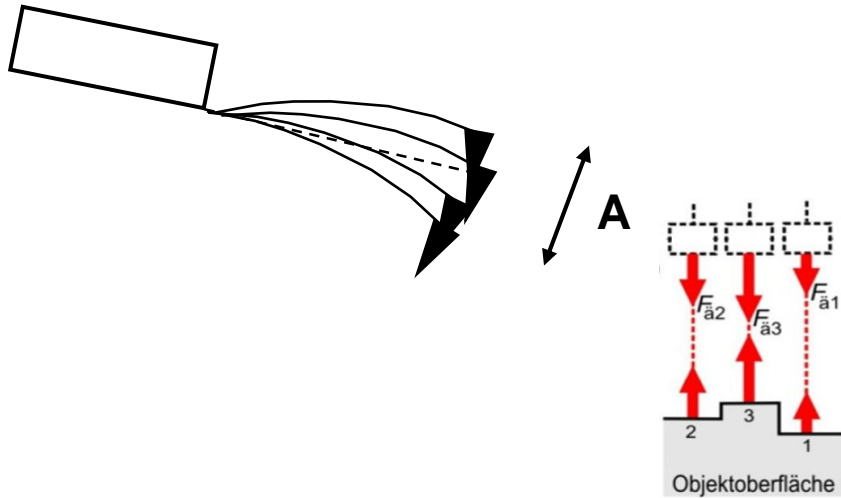
$$f_{\text{erreger}} = f_{\text{eigen}}$$

AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus



N.B.: magnetische Wechselwirkung modelliert die Van der Waals Kräfte

AFM: Nicht-Kontakt-Modus

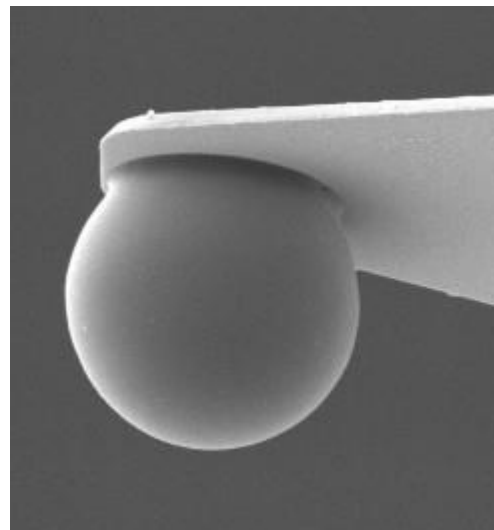
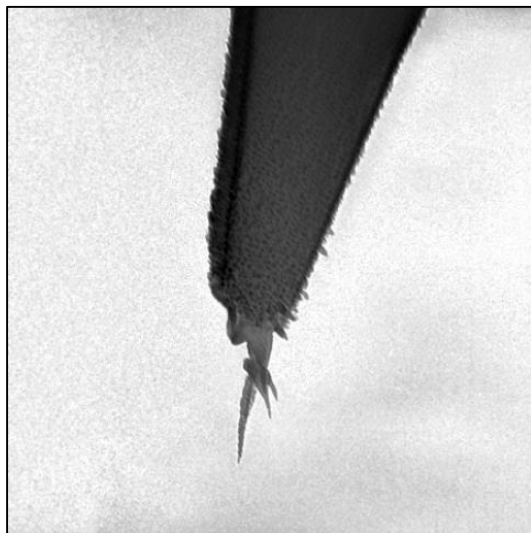
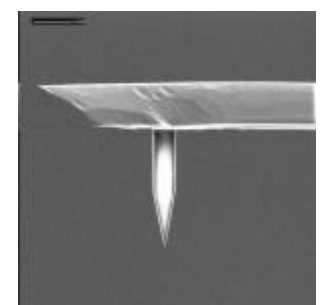
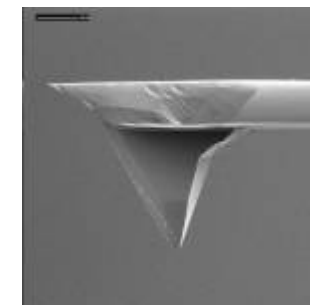
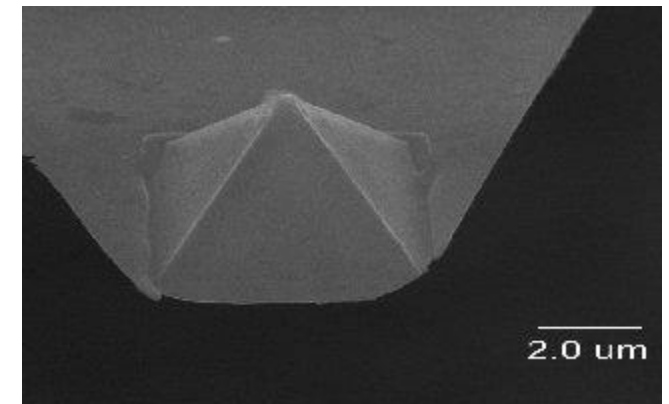
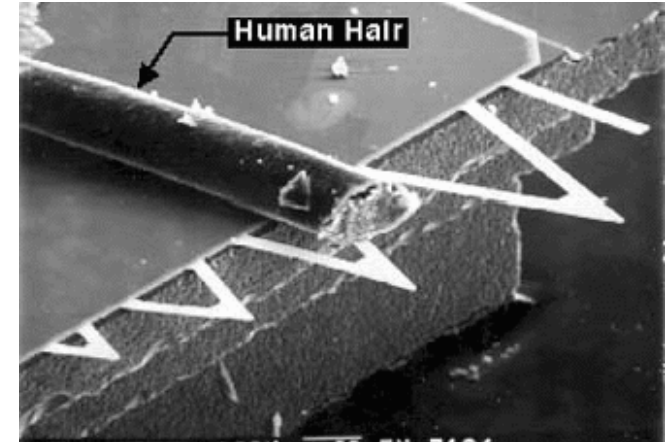


$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m}} \downarrow$$

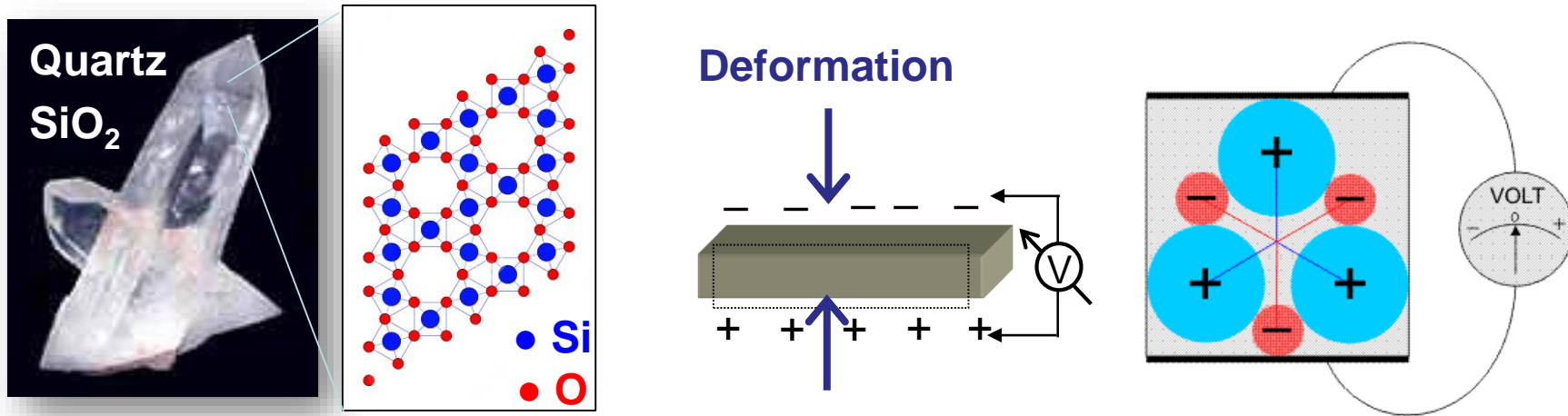
- **Objekthöhe** kann **nur mit Rückkopplung** gemessen werden.

Blattfeder / Cantilever

- Material: Siliciumnitrid (Si_3N_2)
- Krümmungsradius: 0,1 nm- 100 μm
- Federkonstante $\sim 0,1\text{-}10 \text{ N/m}$
- $f_0 \sim 50\text{-}500 \text{ kHz}$

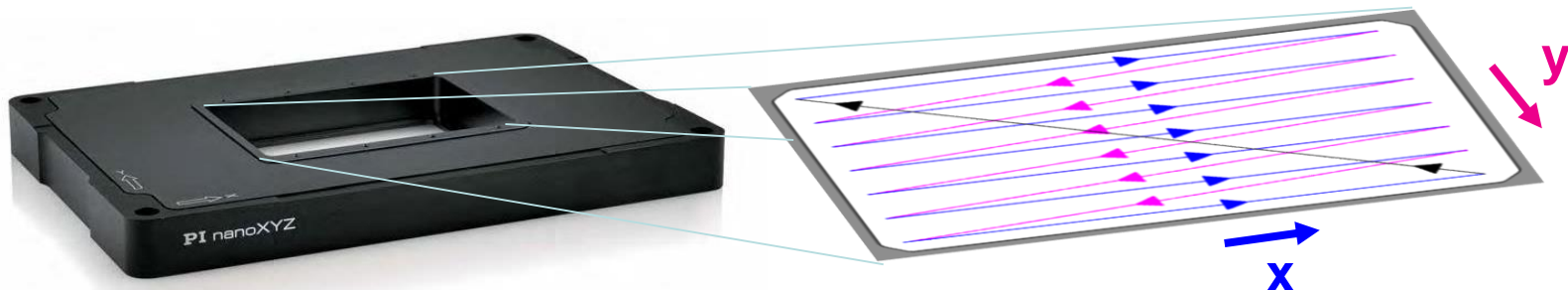


Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



- **Inverser piezoelektrischer Effekt: Spannung → Deformation**
- X, Y, Z Piezotransducer: 150 V → 40 μm

präzise Schrittgröße:
0,1 nm



AFM - Eigenschaften

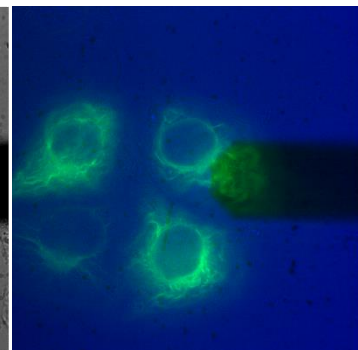
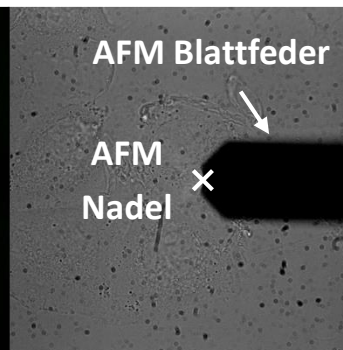
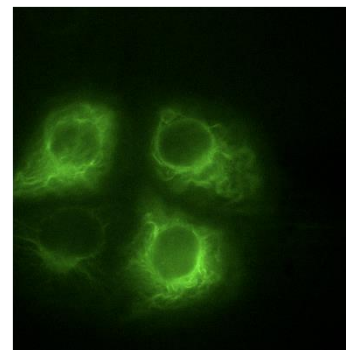
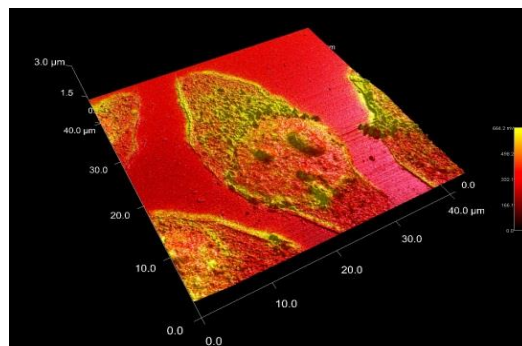
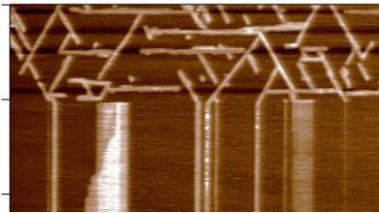
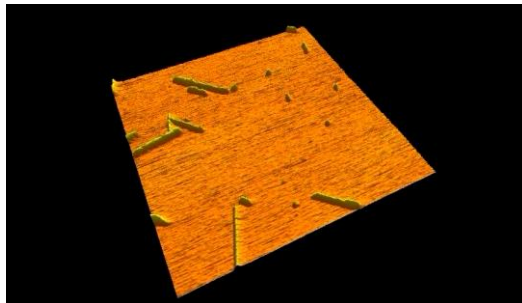
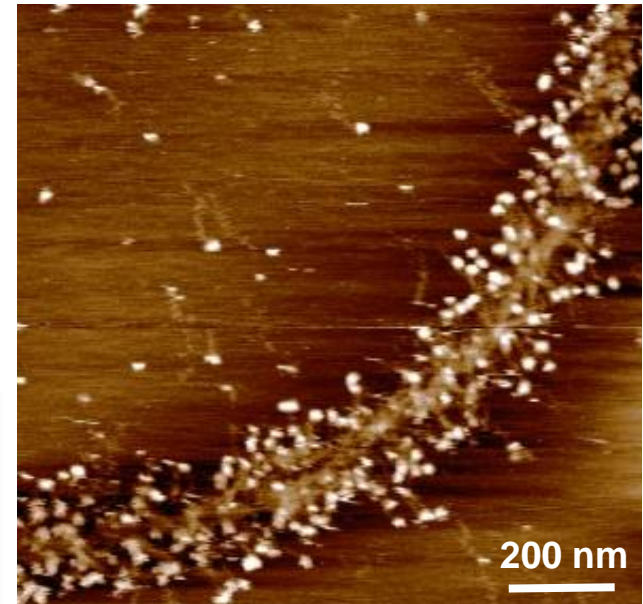
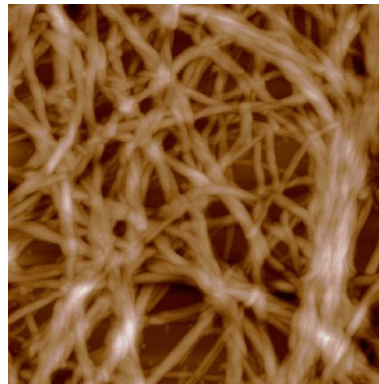
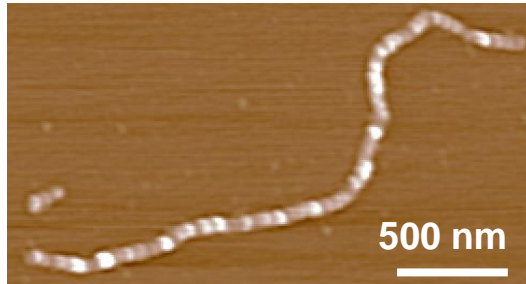
- **Vorteile:**

- 3D topographische Abbildung mit hoher Auflösung.
- Vertikale Auflösung ist im ~ 10 pm-Bereich (laterale Auflösung: schlechter).
- Elektrische Isolatoren oder lebendige Zellen können auch untersucht werden.
- Messung auch in flüssigem Medium möglich.
- Natives Präparat (Färbung oder Fixierung ist nicht notwendig).
- Biologische Strukturen können unter physiologischen Bedingungen untersucht werden (Temperatur, pH, Ionenstärke).

- **Nachteile:**

- Das Präparat soll zur Tragfläche konjugiert werden, dabei ändert sich eventuell seine Struktur.
- Langsame Abtastung.
- Maximale Abtasthöhe ist im μm -Bereich.
- Maximale abtastbare Oberfläche liegt im $100 \mu\text{m}^2$ -Bereich ($10 \times 10 \mu\text{m}$ Rechteck).
- Teuer (Instrument, Vorbereitung des Präparats, Cantilever, usw.).

AFM-Bilder aus unserem Institut

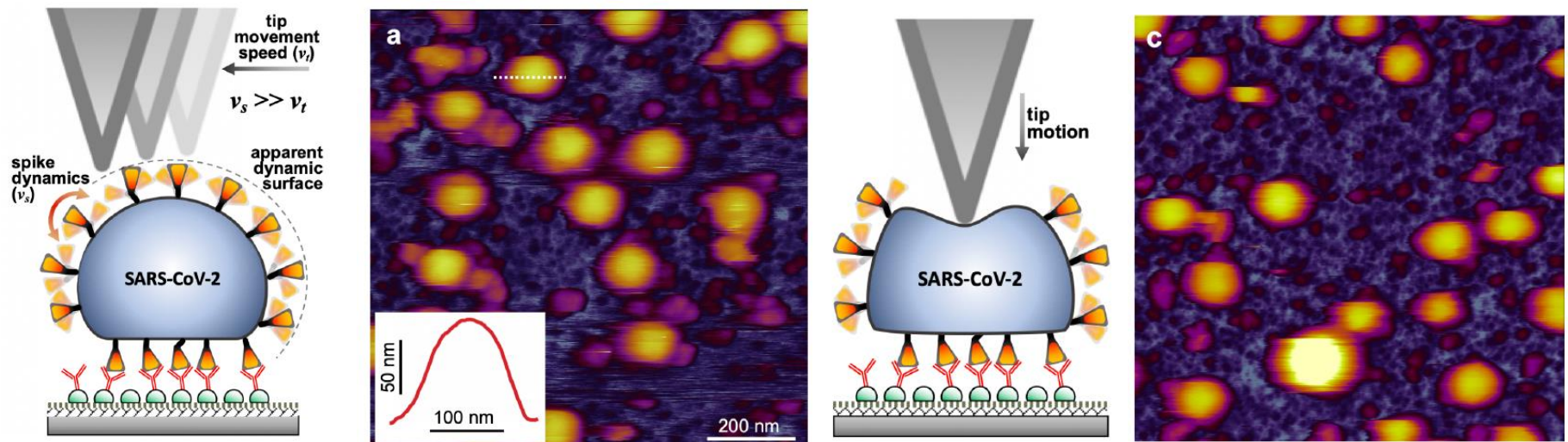


Natives SARS-CoV-2 Virus abgebildet mit AFM

Topography, spike dynamics and nanomechanics of individual native
SARS-CoV-2 virions

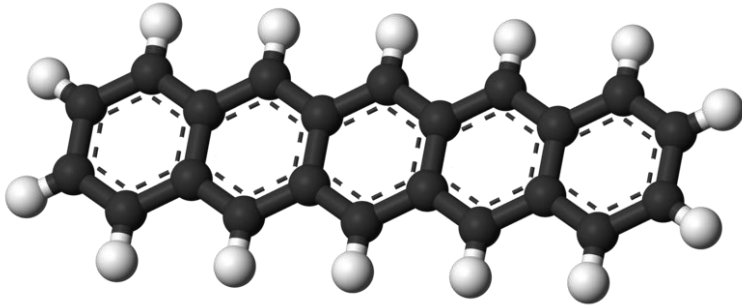
Bálint Kiss^{1#}, Zoltán Kis^{2,3#}, Bernadett Pályi², Miklós S.Z. Kellermayer^{1*}

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.17.302380>

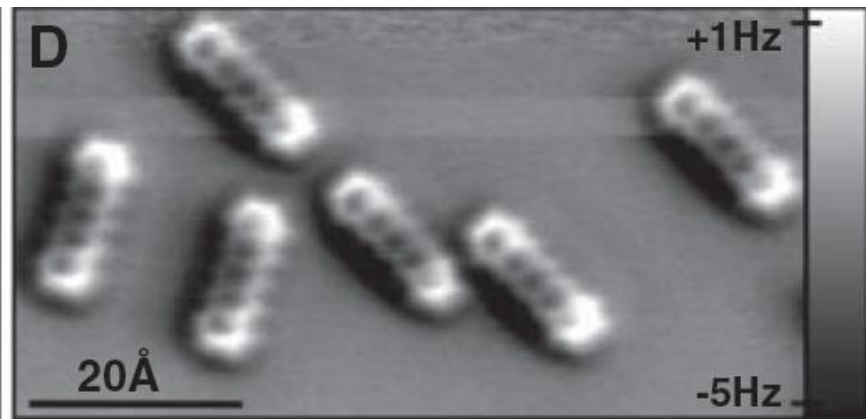
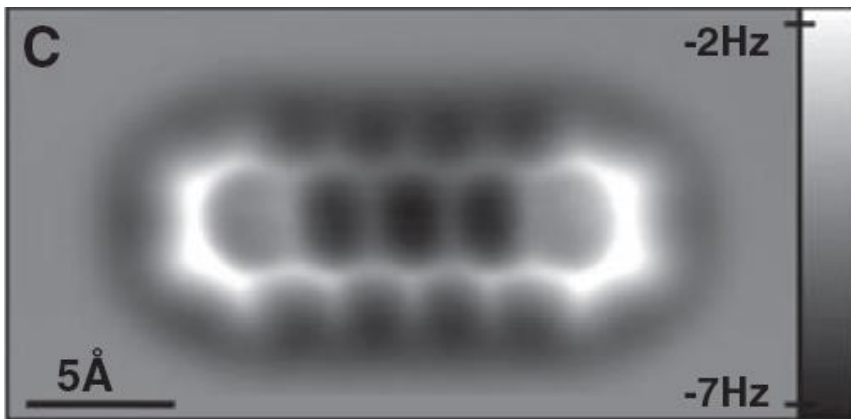


Pentacen Molekül

Tunnelstromstärke durch die Nadel (STM)



Topographie (AFM, die Spitze der Nadel ist mit CO-bedeckt)



Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)

„Stichwörter“

Fluoreszenzmikroskop: Epifluoreszenz-Anordnung

Angewandte fluoreszierende Farbstoffe

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)

Abbe-Prinzip, Punktverteilungsfunktion

Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM)

Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Rasterkraftmikroskop (AFM)

AFM Betriebsarten: kontakt und nicht kontakt Modus

Das Rasterprinzip