

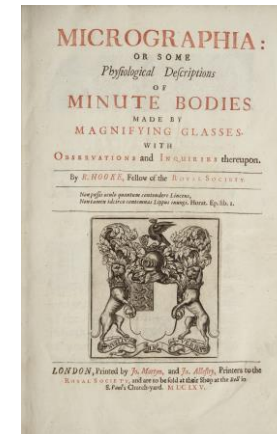
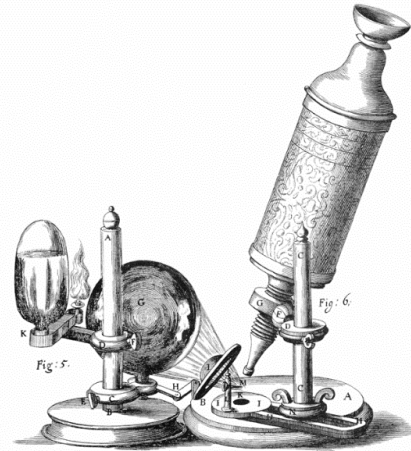
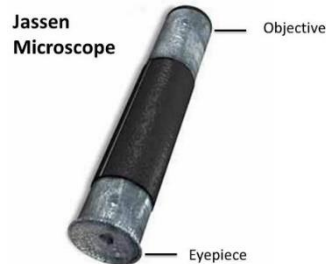
Modern mikroszkópos technikák

Haluszka Dóra, PhD

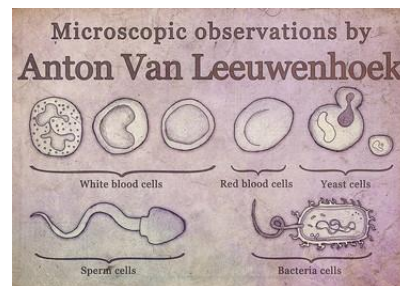
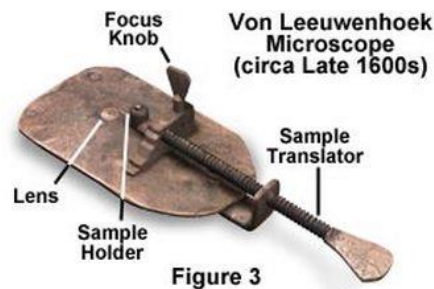
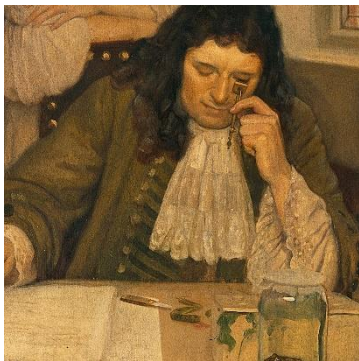


A mikroszkópia rövid története

- már az ókori Rómában...vízzel töltött üveggömb
- 1600-as évek elején: Zacharias Jansen - teleszkóp/mikroszkóp feltalálója
- 1667: Robert Hooke - angol polihisztor - „Micrographia”, parafa cellái



- 1674: Anton van Leeuwenhoek - egy lencse, 270x nagyítás



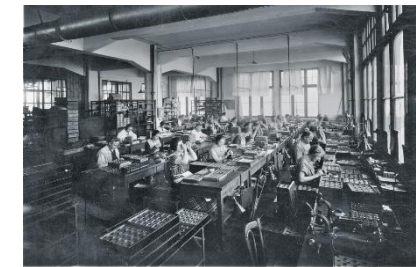
- 1800-as évek eleje
Carl Zeiss - jénai vállalkozó - mikroszkópok fejlesztése
Ernst Abbe - optikai törvények, refrakció, diffrakció



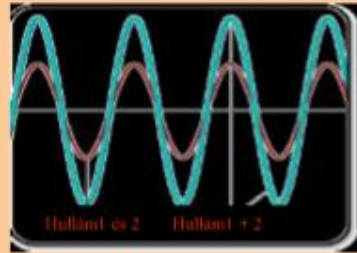
Ernst Abbe (1840-1905)



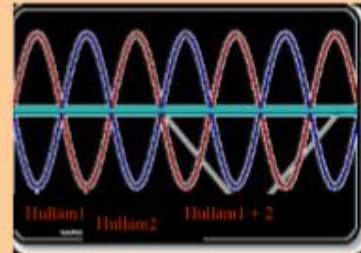
Carl Zeiss (1816-1888)



A hullámoptika alapjai

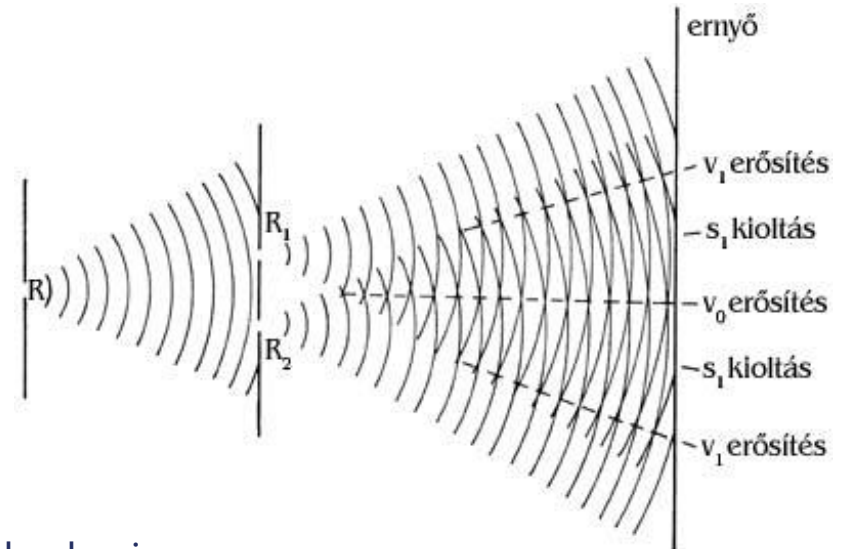
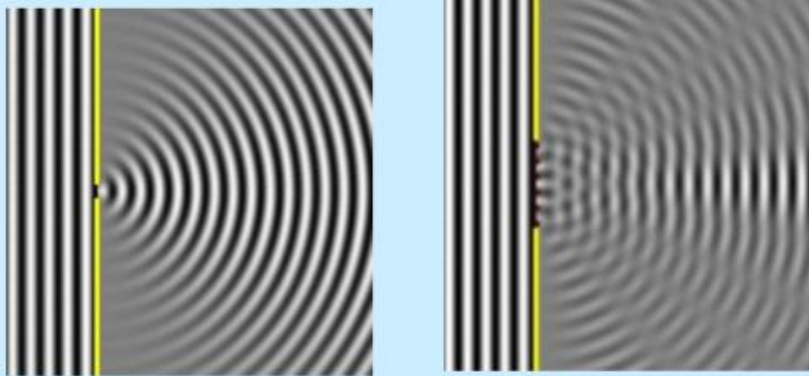


azonos fázis



ellentétes fázis

Huygens-elv



Young kísérlet

A hullámfront úgy terjed, hogy egy adott hullámfelület minden pontjából elemi gömbhullámok indulnak ki. A hullámtérben az új hullámfelület ezen elemi gömbhullámok közös burkolója lesz.

A felbontóképesség korlátai...



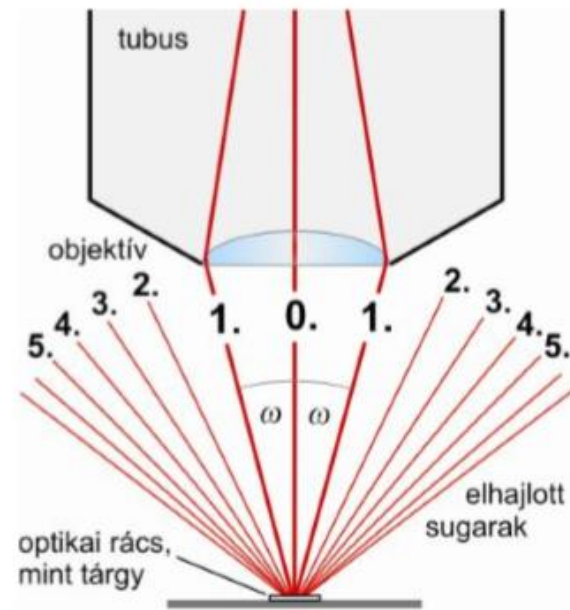
Ernst Abbe (1840-1905)

1873: Ernst Abbe - a fénymikroszkóp feloldóképességének elméleti korlátai vannak

Abbe - elv: a mikroszkópban csak akkor kapunk képet, ha a tárgyon elhajlott sugarak közül a főmaximumon kívül legalább az elsőrendben elhajlottak is bejutnak az objektívbe, és ezek is részt vesznek a képalkotásban

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

δ felbontási határ - legkisebb d távolság, amely távolságra elhelyezkedő tárgyponatok még különálló képpontokként képeződnek le

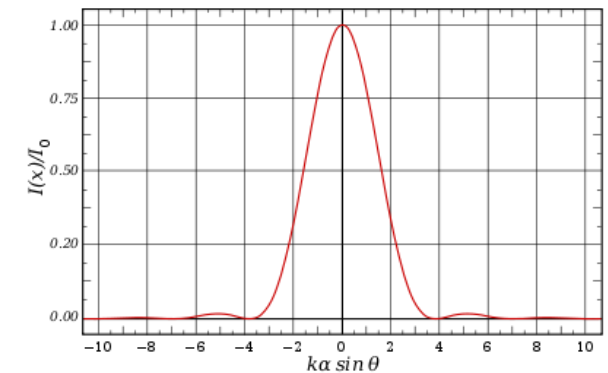
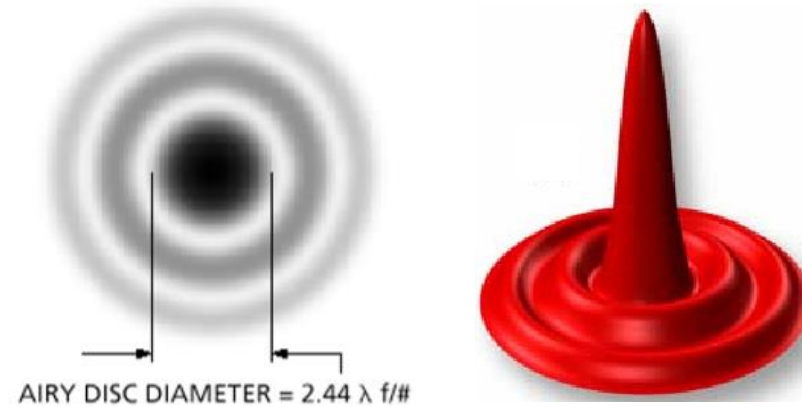
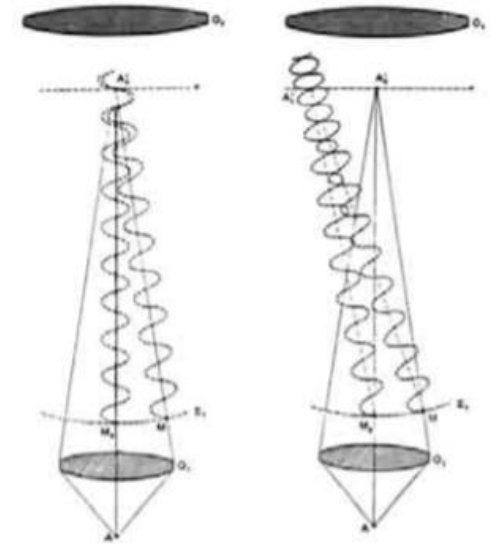
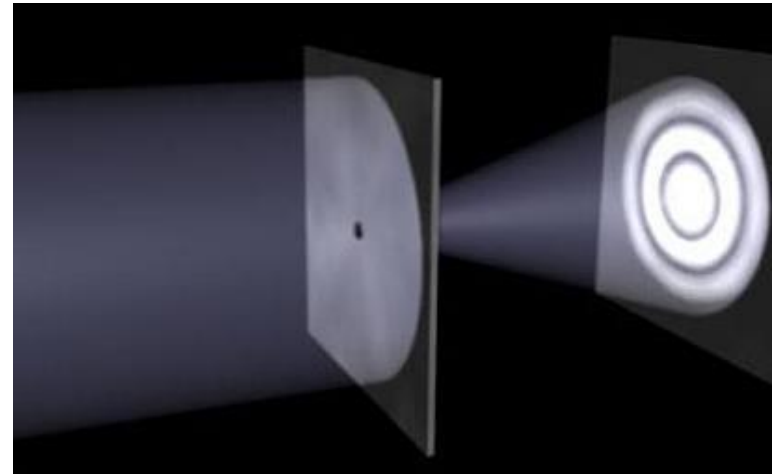


Airy korongok - a fény hullámtermészetének bizonyítéka

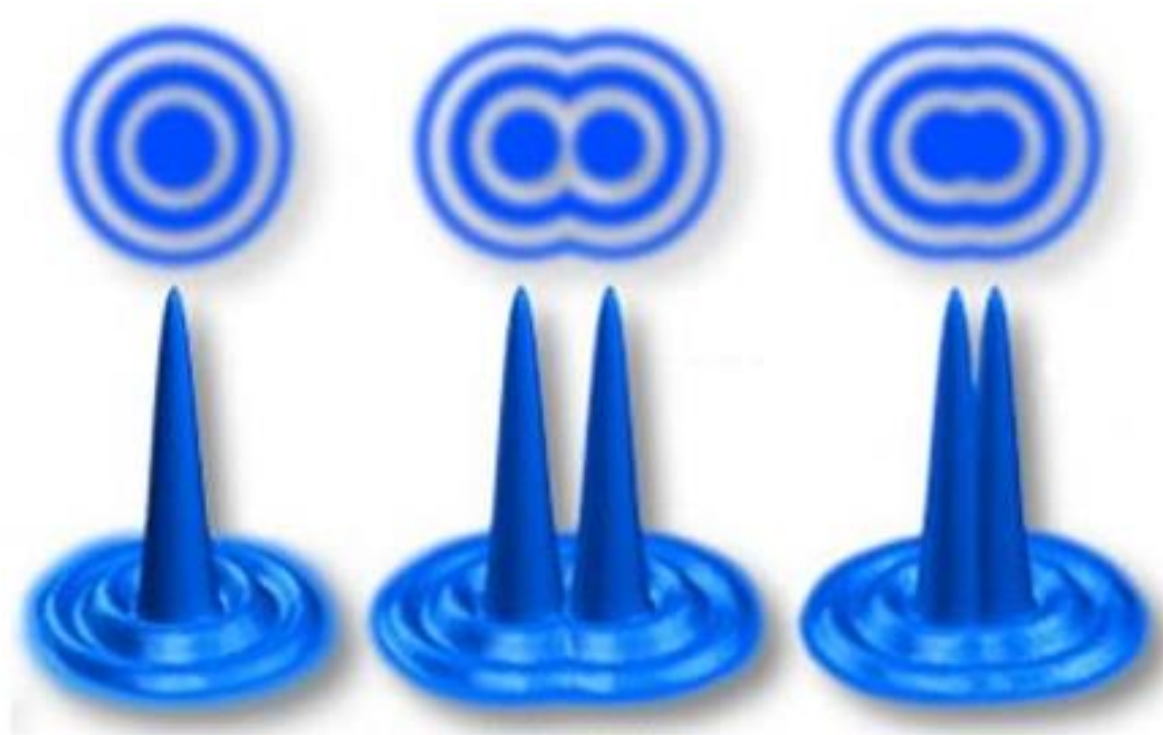
Egy fénypont ideális optikai lencsével leképezett képe az Airy korong

Keletkezése: A kép síkjában fázisban levő hullámok (bal oldal) diffrakciós maximumot, míg 180° -kal eltolódott hullámok minimumot hoznak létre (jobb oldal).

Point Spread Function (PSF): A tárgy egy pontjának képek nem egy pont, hanem egy adott intenzitáseloszlású folt.



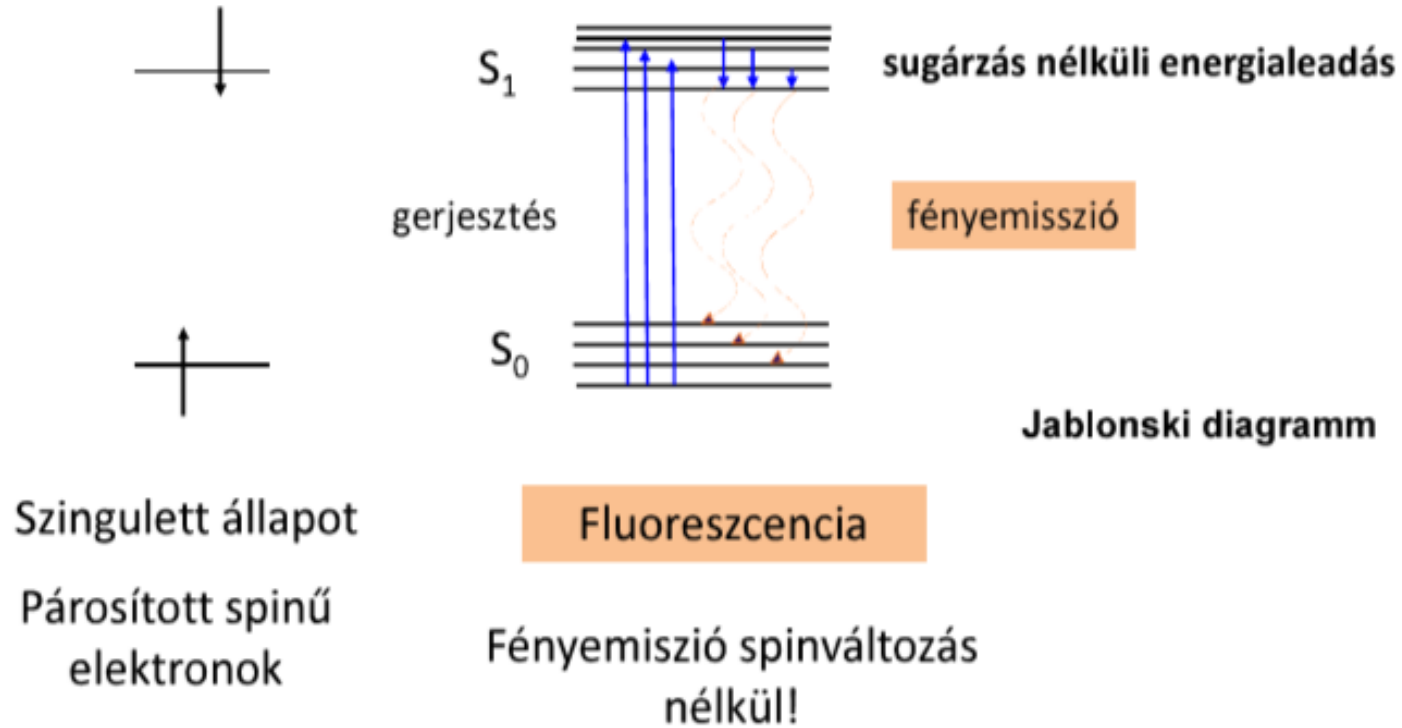
Mikor különböztethető meg két különálló pontszerű tárgy képe?



Rayleigh -féle kritérium:

Két Airy disk éppen elkülöníthető egymástól, ha a köztük levő távolság (d) egyenlő az Airy disk sugarával (r).
Másképp, ha az egyik Airy disk centrális maximuma egybeesik a másik első minimumával

Fluoreszcencia



$$E_{\text{gerjesztés}} \geq E_{\text{fluoreszcencia}}$$

$$\lambda_{\text{gerjesztés}} \leq \lambda_{\text{fluoreszcencia}}$$

Stokes-eltolódás



Kasha szabály: a fényemisszió a legalsó gerjesztett elektronállapot legalsó rezgési nivójáról történik

Fluoreszcencia mikroszkóp

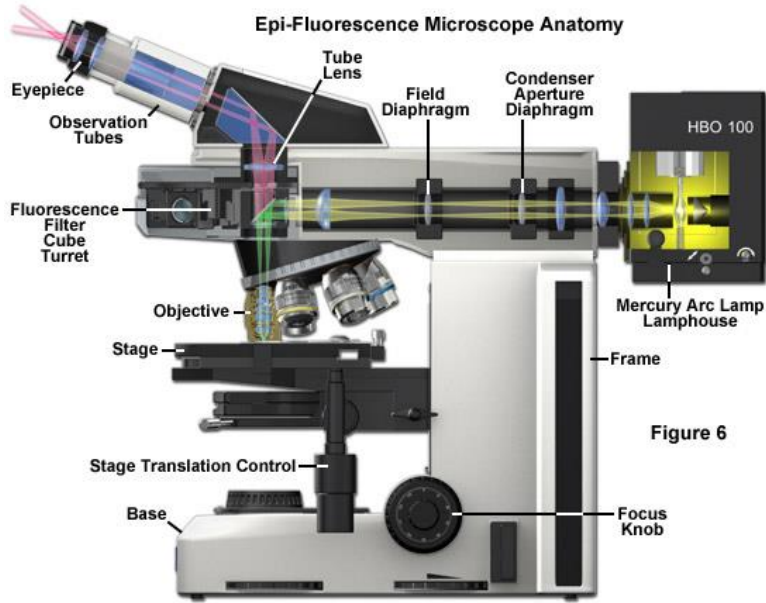


Figure 6

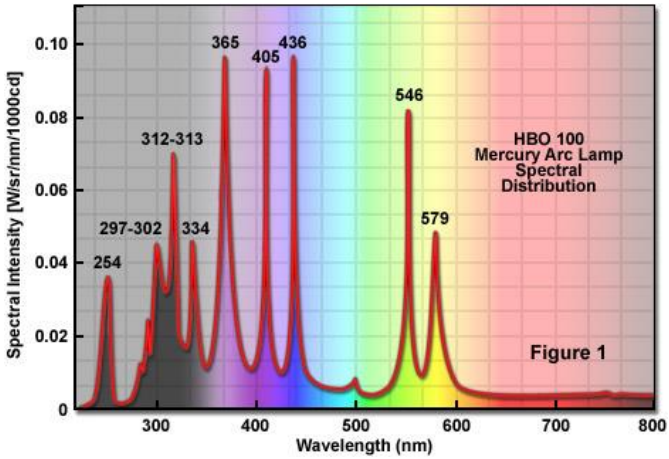
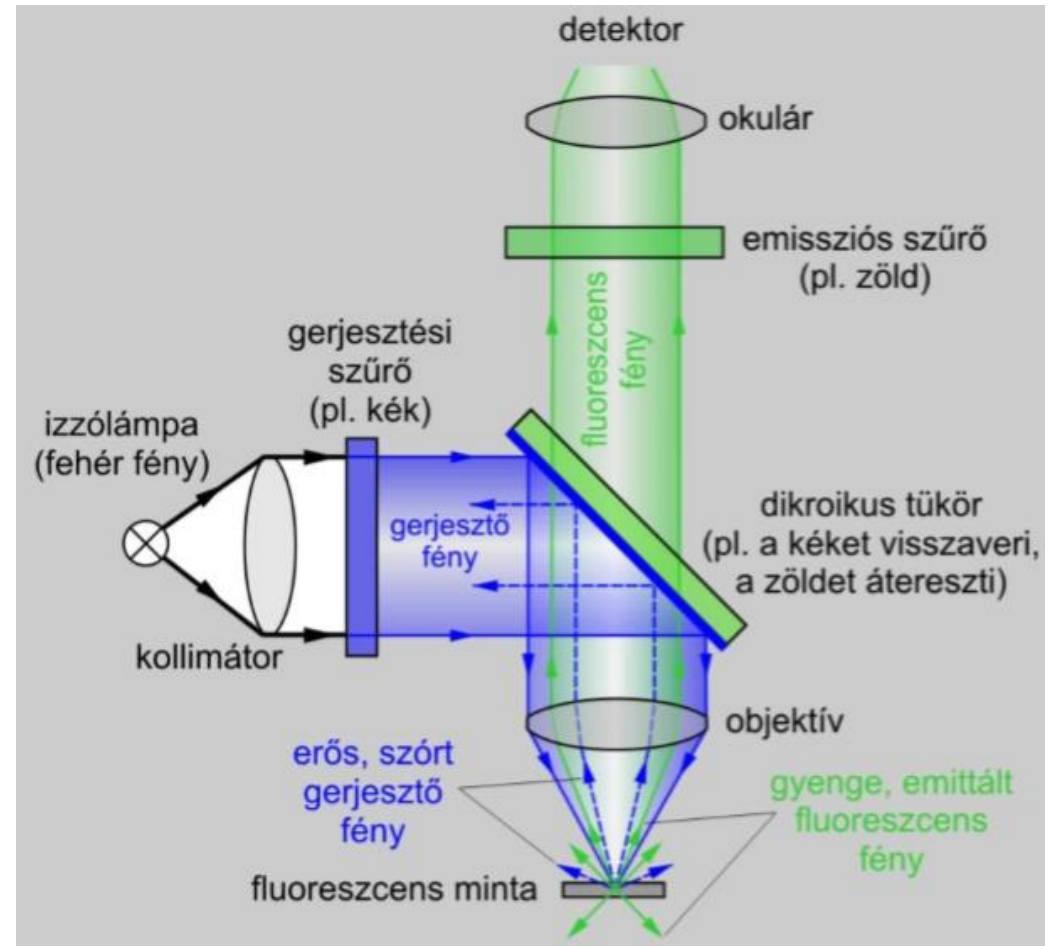
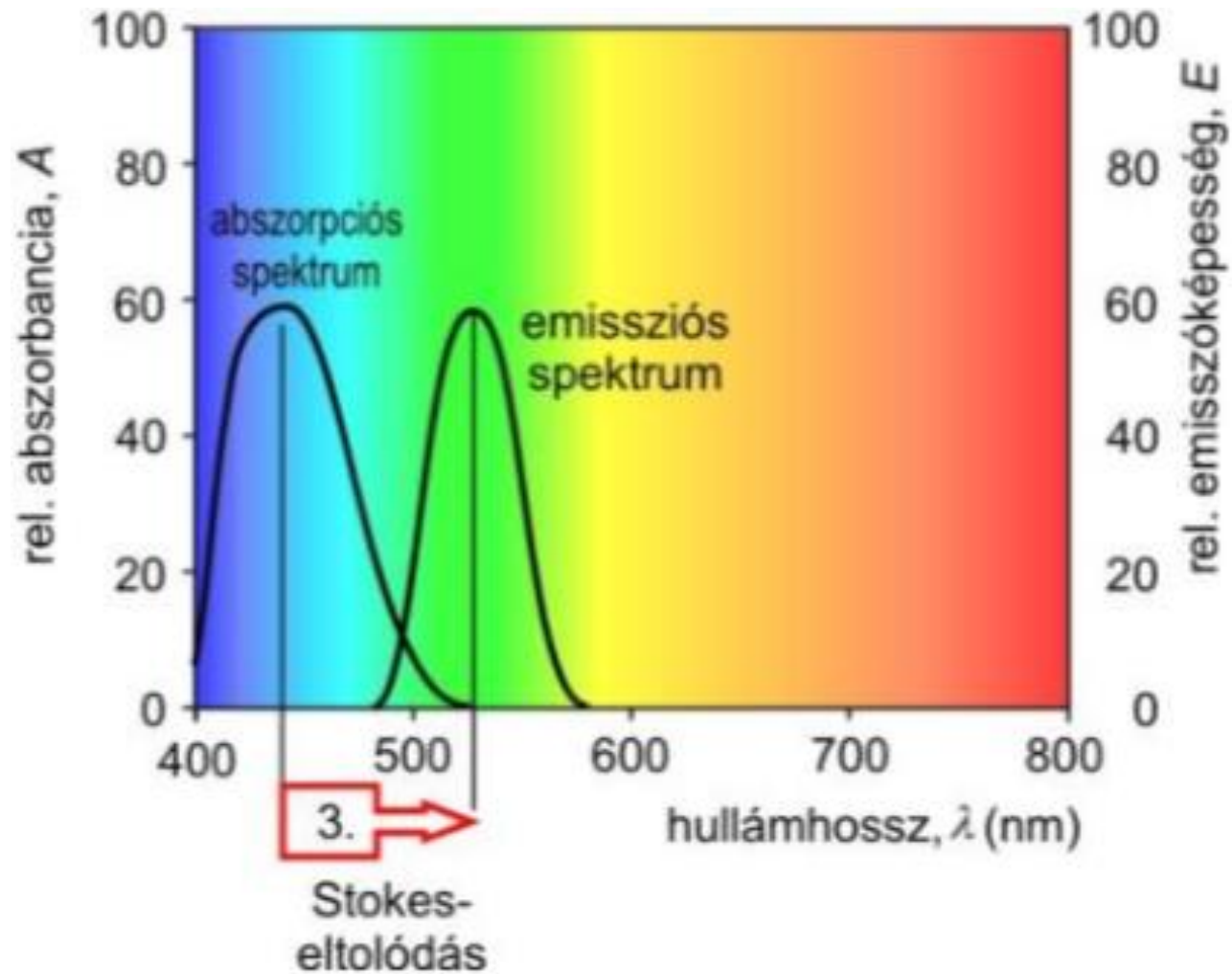


Figure 1



Abszorpciós és emissziós spektrum



$$E_{\text{gerjesztés}} \geq E_{\text{fluoreszcencia}}$$

$$\lambda_{\text{gerjesztés}} \leq \lambda_{\text{fluoreszcencia}}$$

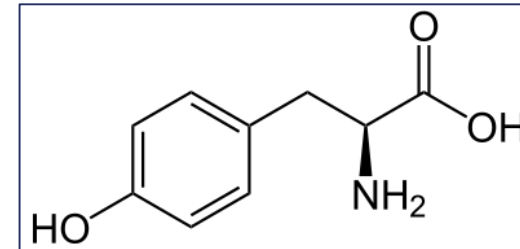
Fluoreszcencia forrása

- **Intrinsic (belső) fluorofórok:**
pl: triptofán, tirozin aminosavak, porfirinek

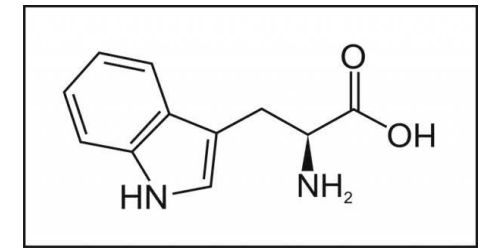
- **Extrinsic (külső) fluorofórok:**
pl: kívülről bevitt festékmolekulák

Az ideális fluorofór:

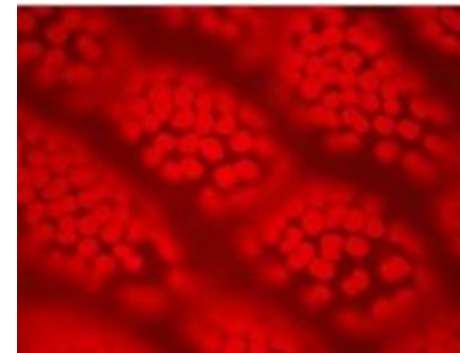
- Kicsi
- Hidrofil
- A látható tartományban nyel el és emittál
- A Stokes eltolódás nagy
- Specifikusan kötődik
- Nem eredményez fotokémiai reakciókat



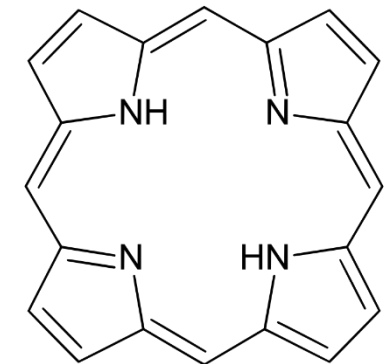
tirozin



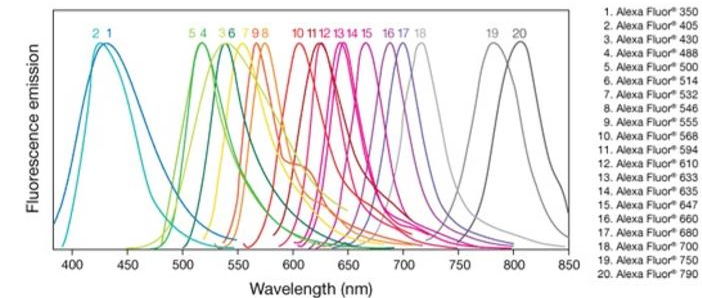
triptofán



porfirin fluoreszcencia

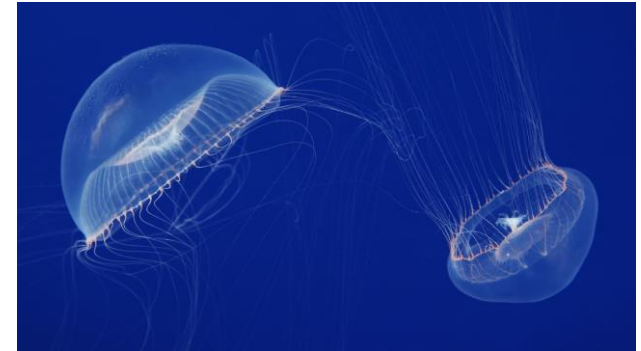


porfirin

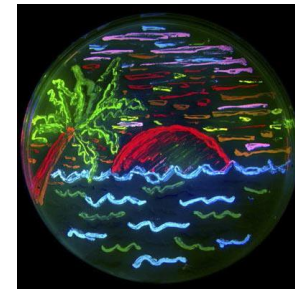
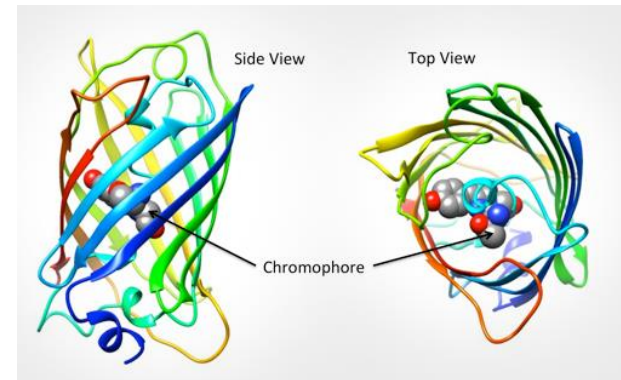


Fluoreszcens fehérjék

- Green Fluorescent Protein (GFP)
- 1960-as évek, medúzából izolálták
- ~27 kDa, 238 as, 11 szálú β -hordó
- A központi hélix Ser-65, Tyr-66, és Gly-67 oldalláncai alkotják a kromofórt
- gerjesztés: kék (475 nm) és UV (396 nm) fényvel
- emisszió: 508 nm-en
- Vizsgálni kívánt fehérjéhez kötik - fúziós fehérje
- Mivel kis méretű - nem zavarja már fehérje funkcióját
- Transzfekció: tenyésztett sejtekbe juttatják a fehérjét
- Transzgenezis: ha megtermékenyített petesejtbe

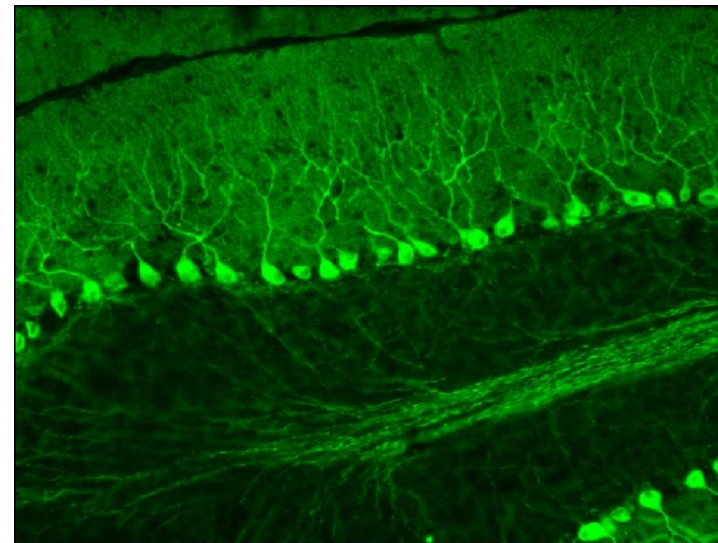


Aequorea victoria

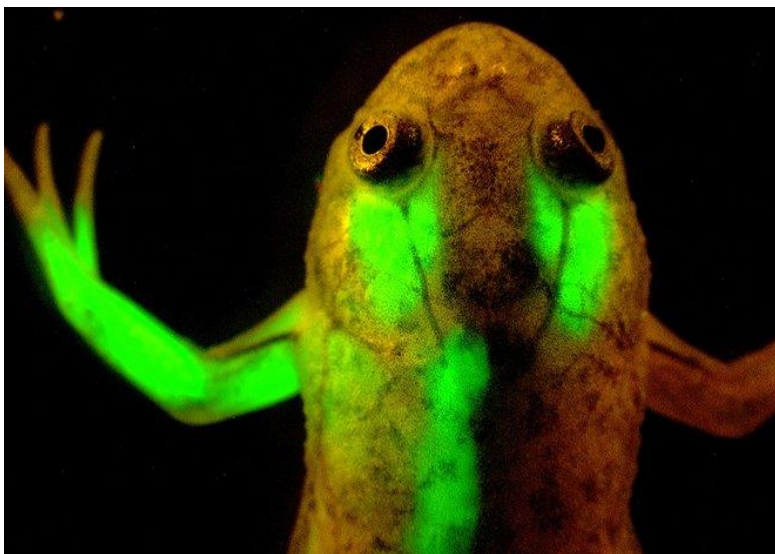




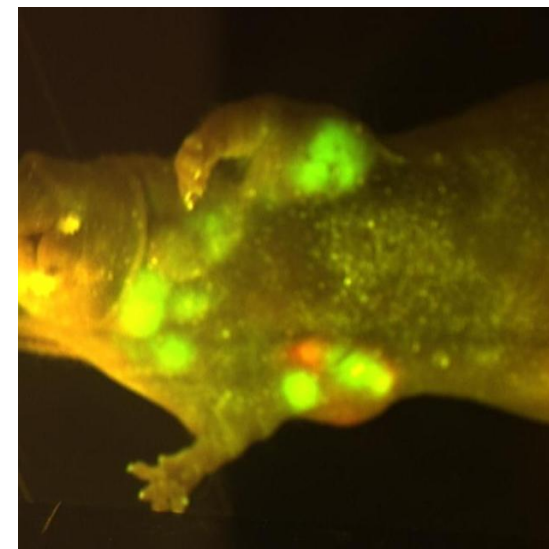
Transzgén egerek



Egér Purkinje sejtek



Béka izom sejtek GFP jelölése



Tumor sejtek követése

2008. Kémiai Nobel-díj

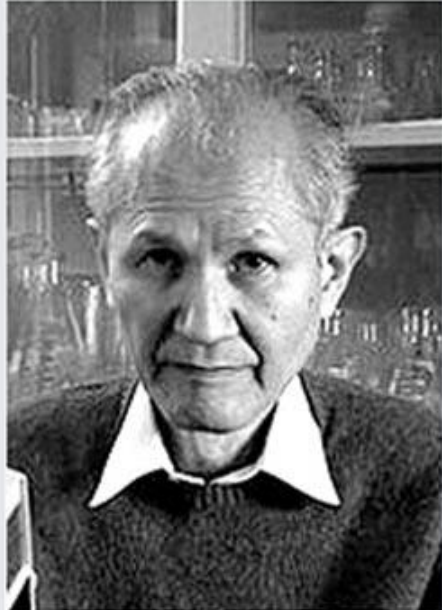


Photo: J.
Henriksson/SCANPIX

Osamu Shimomura



Photo: J.
Henriksson/SCANPIX

Martin Chalfie



Photo: UCSD

Roger Y. Tsien

Lézerek általános tulajdonságai

light amplification by stimulated emission of radiation



- Monokromatikus
- koherens
- poláros
- jól fókuszálható

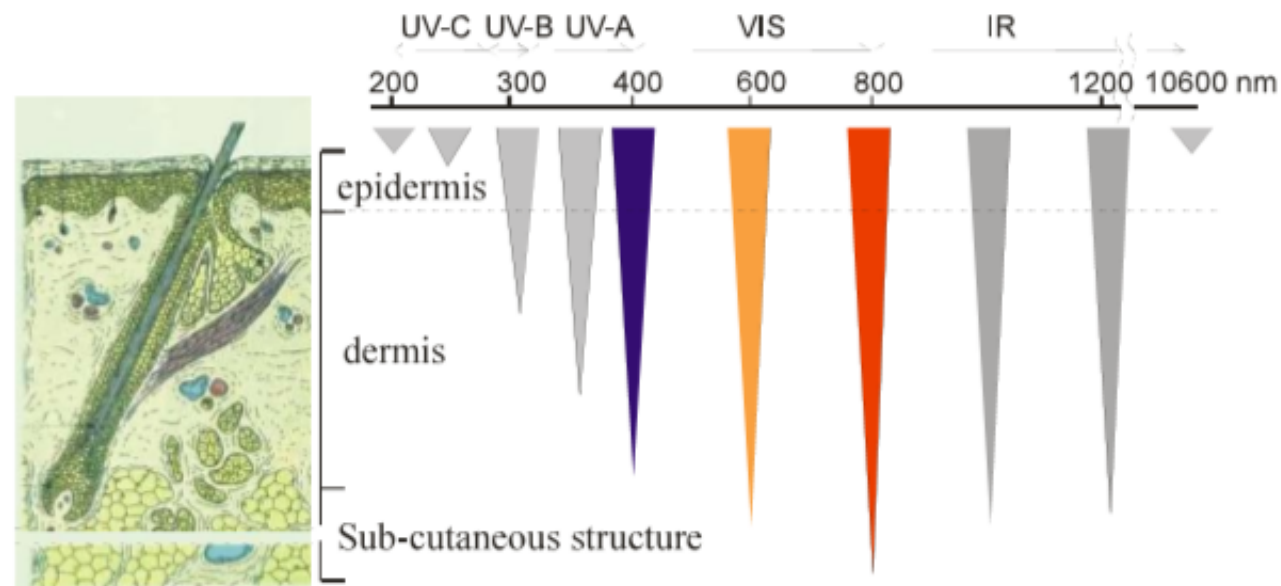
Rövid impulzusidő lehetséges – *ps, fs*

Nagy teljesítmény érhető el– *kW - GW*

Nagy teljesítménysűrűség lehetséges



Fény behatolási mélysége a bőrbe



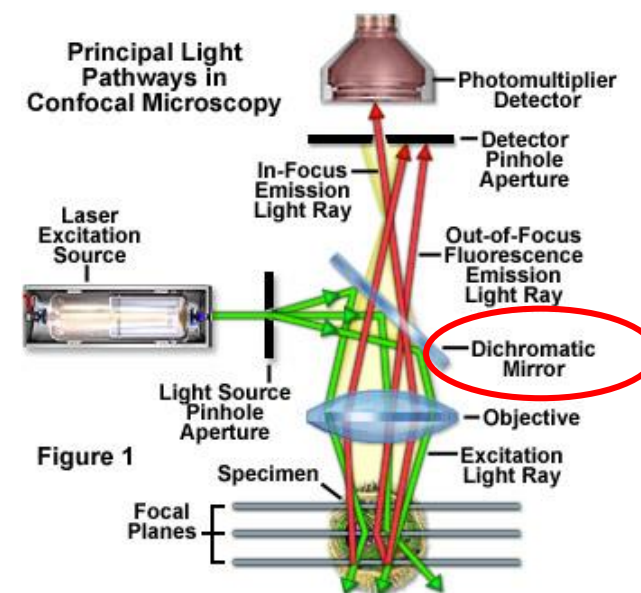
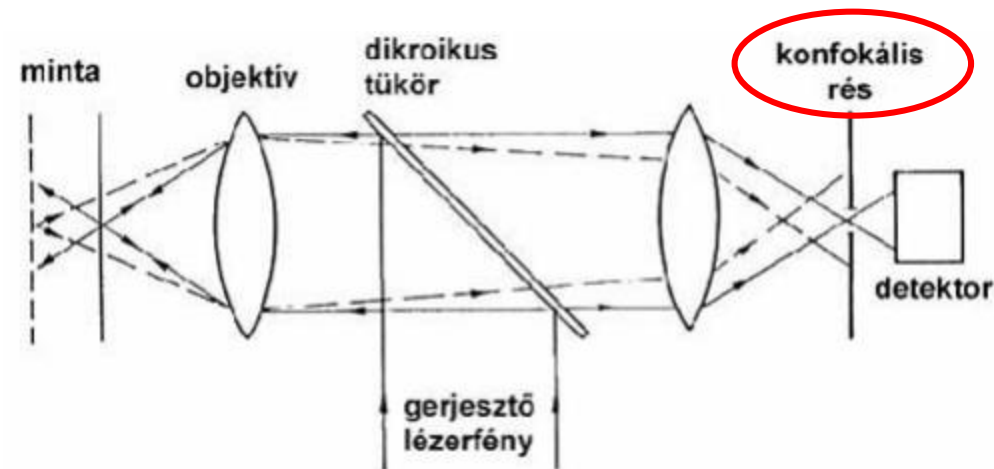
A fény intenzitás gyengülése elnyelődés, fénytörés és visszaverődéssel egyaránt megvalósul.

Az, hogy a fény milyen mélyen képes behatolni a szövetbe, hullámhossz függő!!!

Konfokális pásztázó mikroszkóp

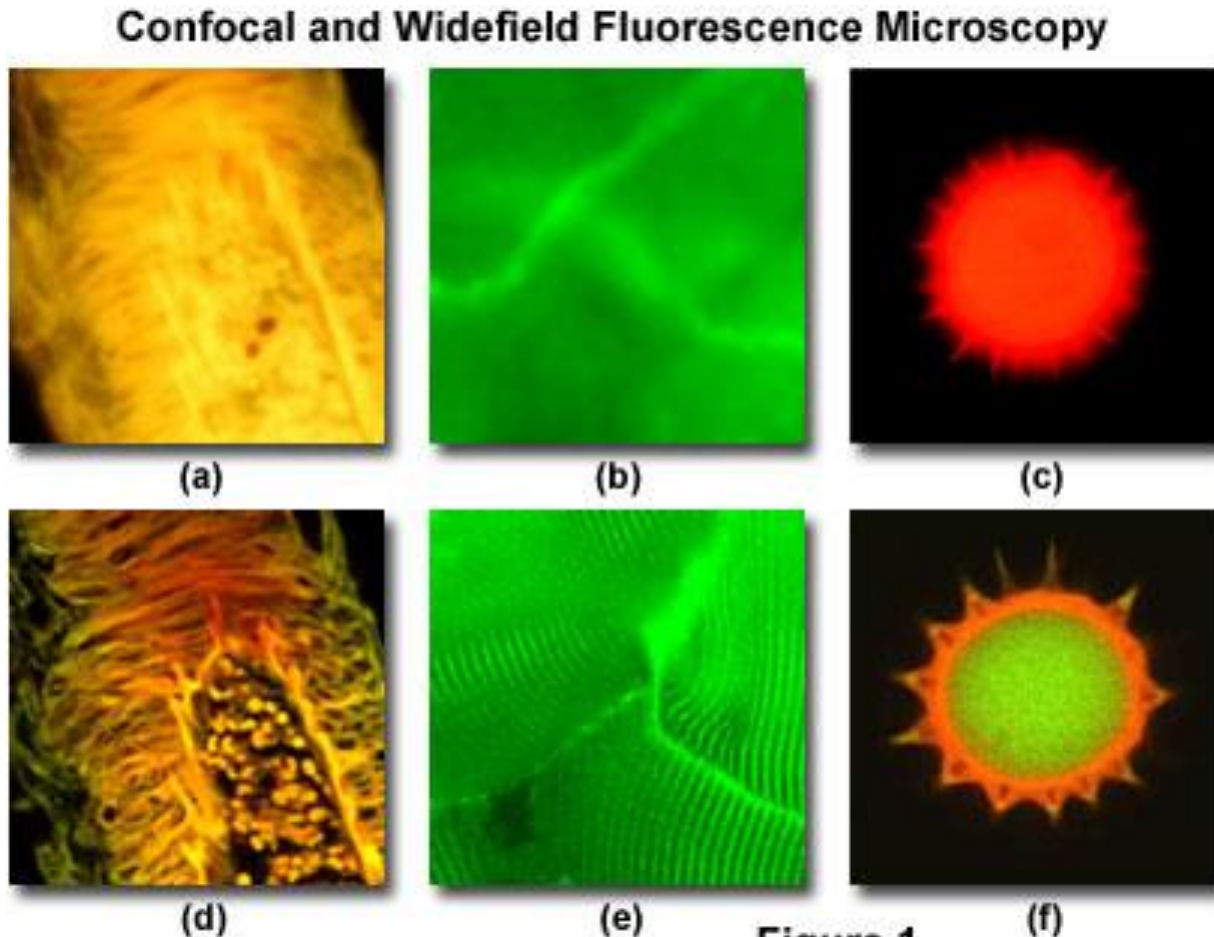
Konfokális elv: *apertúra* segítségével takarjuk ki a nem fókuszsíkból érkező fénynyalábokat - a detektorba csupán a fókuszsíkból eredő nyalábok jutnak

- lézer fényforrás
- fényútba helyezett szűrőkkel a hullámhossz kiválasztható
- minta pásztázása pontról pontra
- XY irányban - pásztázó tükrök
- számítógépes vezérlés
- „optikai szeletelés” - 3D képalkotás



Fluoreszcens és konfokális mikroszkóp képalkotás - összehasonlítás

fluoreszcens



konfokális

humán medulla

izom

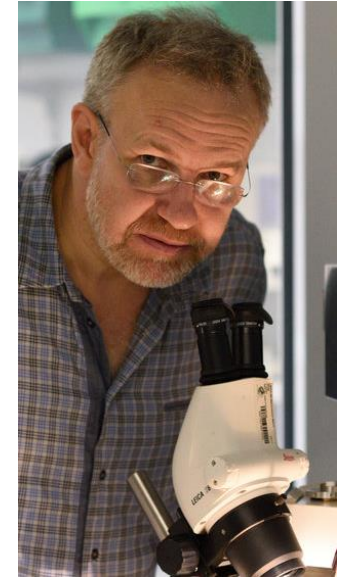
pollen

Kétfoton mikroszkópia

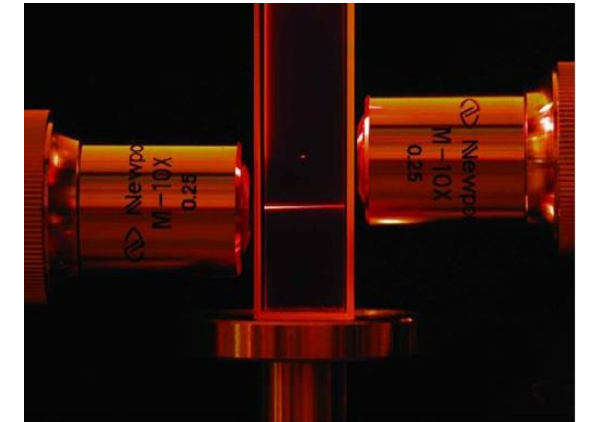
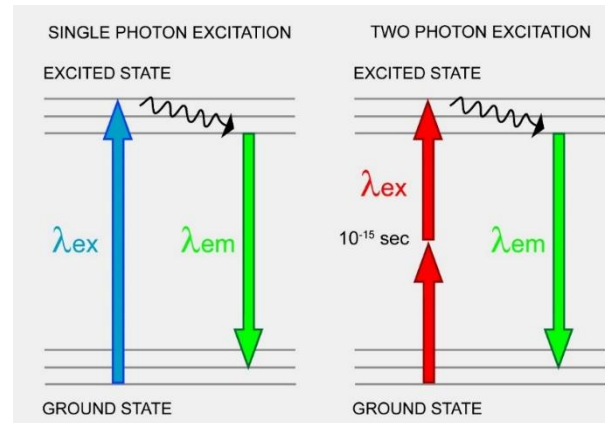
- 1931. Maria Göppert-Mayer
- a gerjesztendő molekulába egyszerre két foton abszorbeálódik, és energiájuk összeadódik
- nagy intenzitású lézer fényforrás ~ megfelelő fotonsűrűség
- 1990. Első kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp
- Wienfried Denk, Cornell University



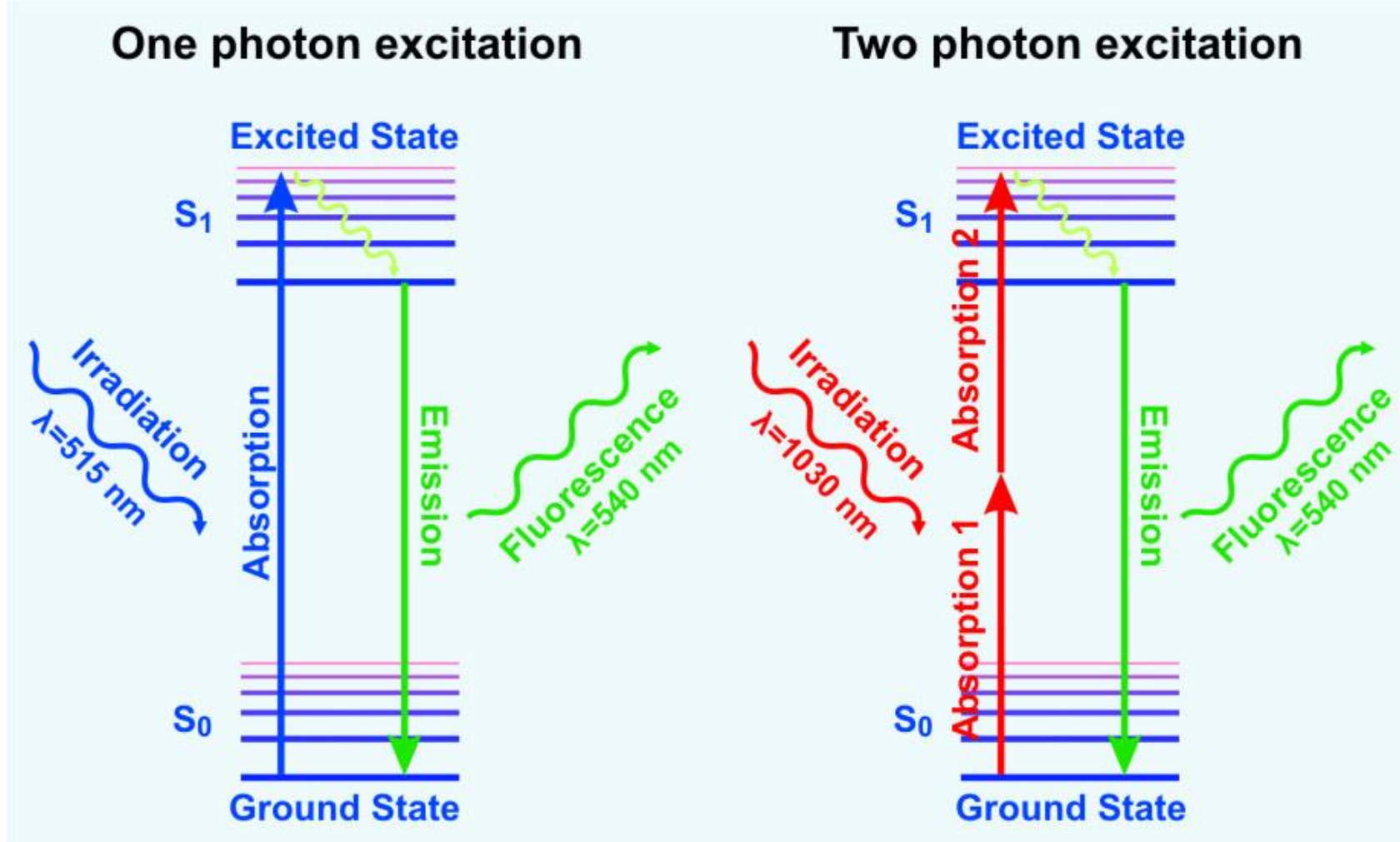
Maria Göppert-Mayer (1906-1972)



Wienfried Denk (1957-)

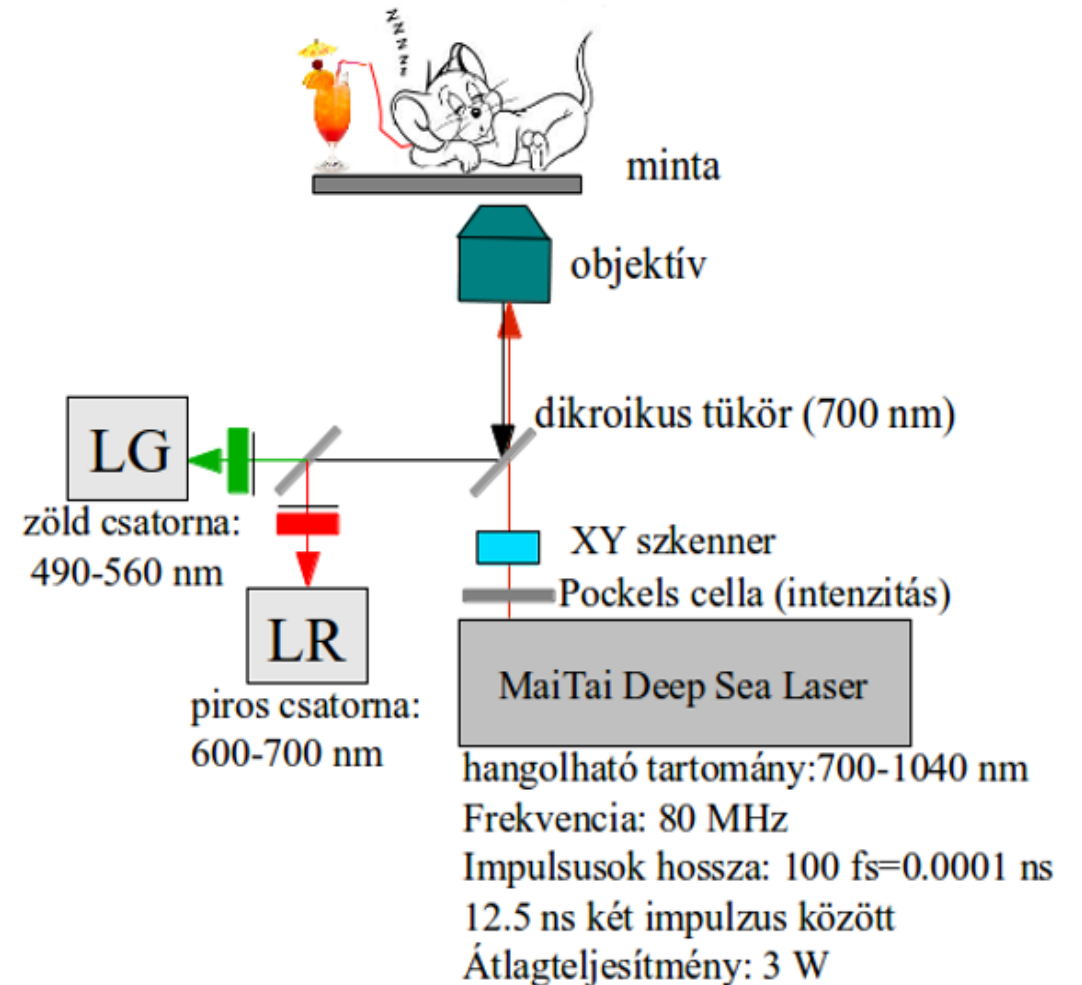


Kétfoton gerjesztés

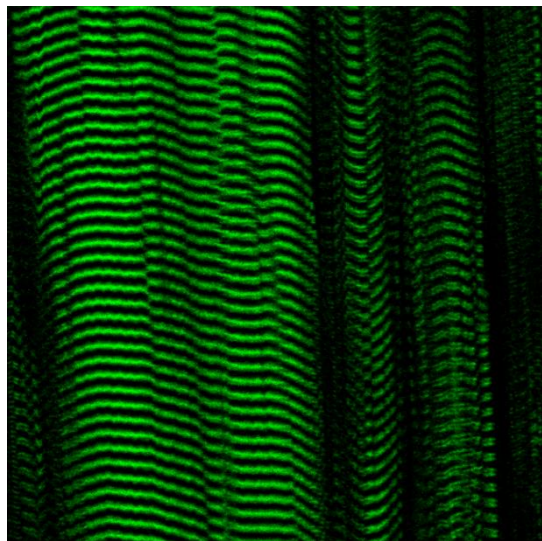


Előnyök

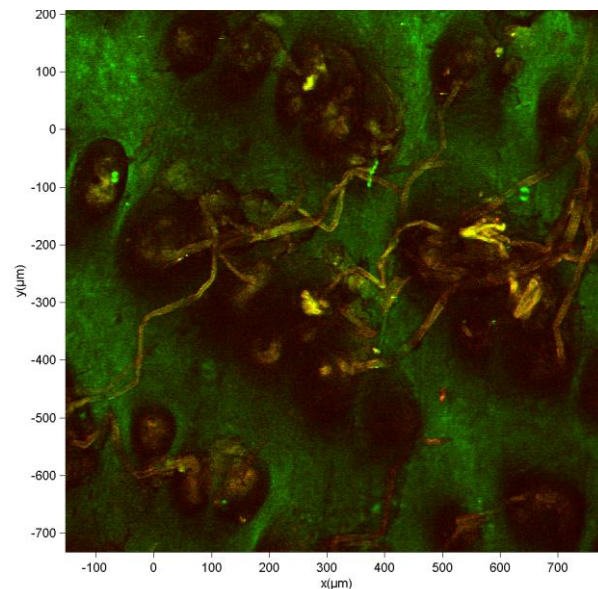
- Csak a fókuszfoltban gerjeszt - nincs kétfoton elnyelődés a fókuszon kívül
- A lézer mintára eső teljesítménye néhány mW - *in vivo* képalkotás
- Infravörös tartományban (700-1300 nm) hangolt fényforrás - kevésbé szóródik
- Mélyebb penetráció
- Több festék gerjeszthető egyszerre
- Az összes fluoreszcencia fényt detektáljuk



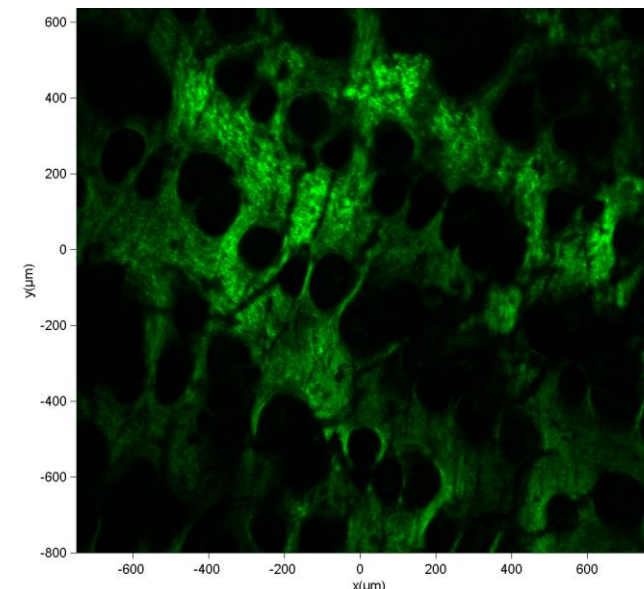
Jelölés nélküli képalkotás



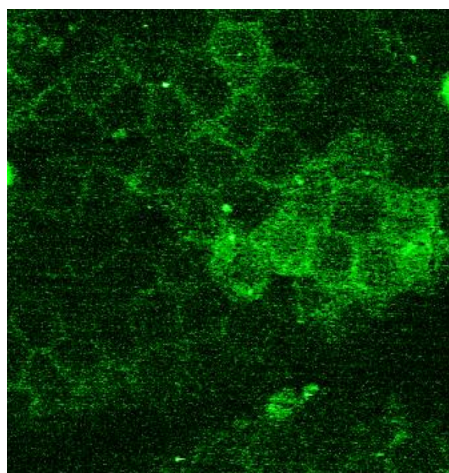
izom miozin



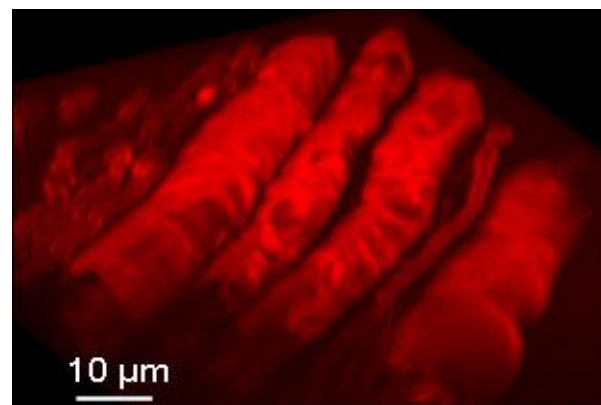
egér epidermis



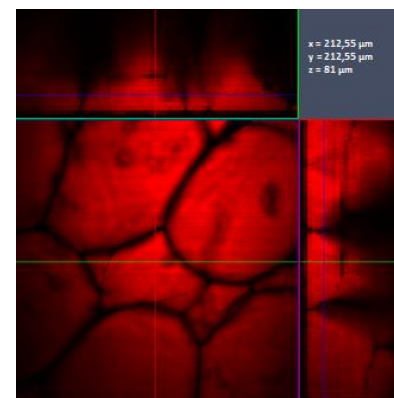
egér dermis kollagén



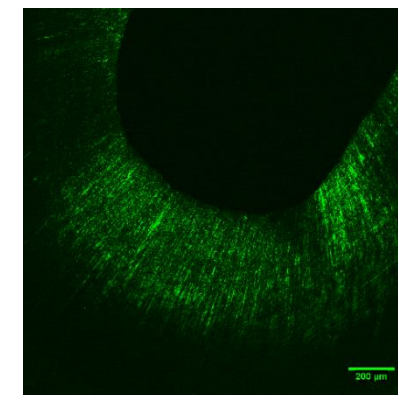
keratin



mielinhüvely



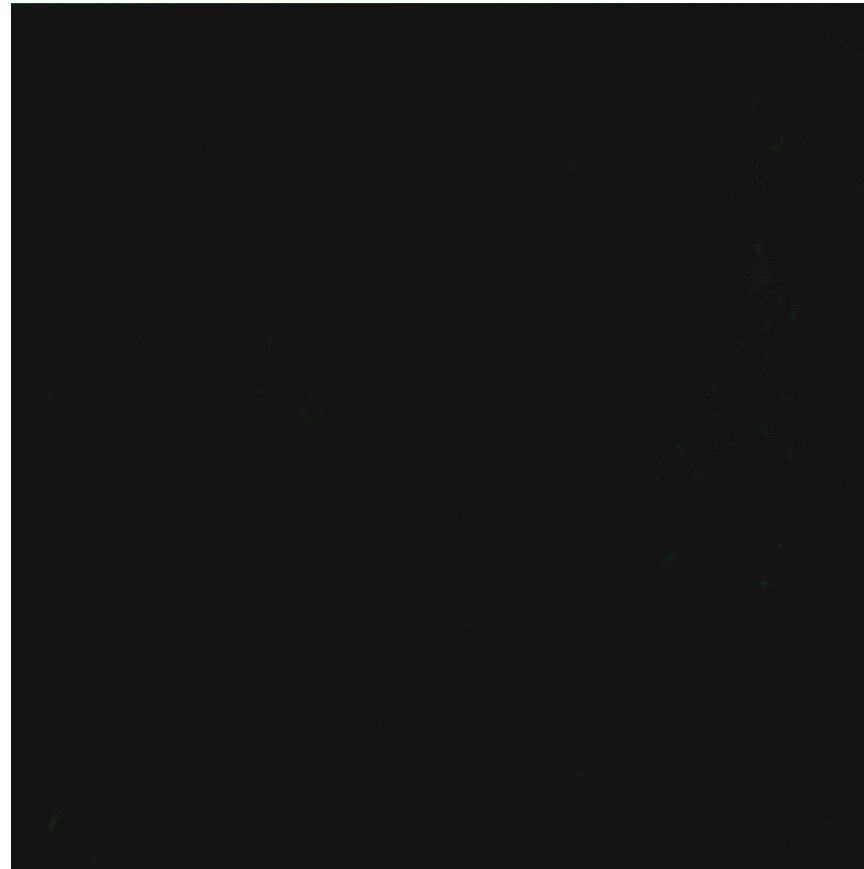
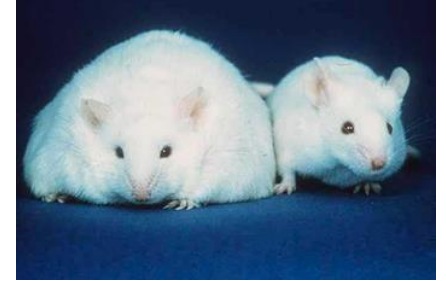
adipociták



dentincsatornák

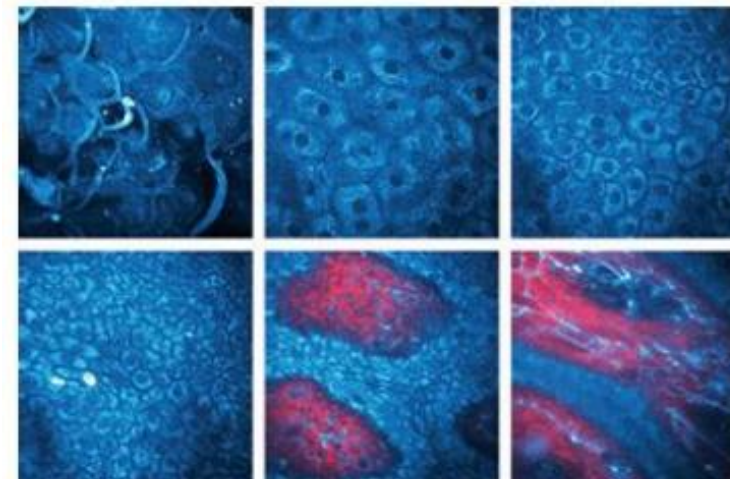
3D képalkotás

Kontroll és 2. típusú cukorbeteg egér dermisz kollagén szerkezetének összehasonlítása *in vivo* kétfoton mikroszkópiával



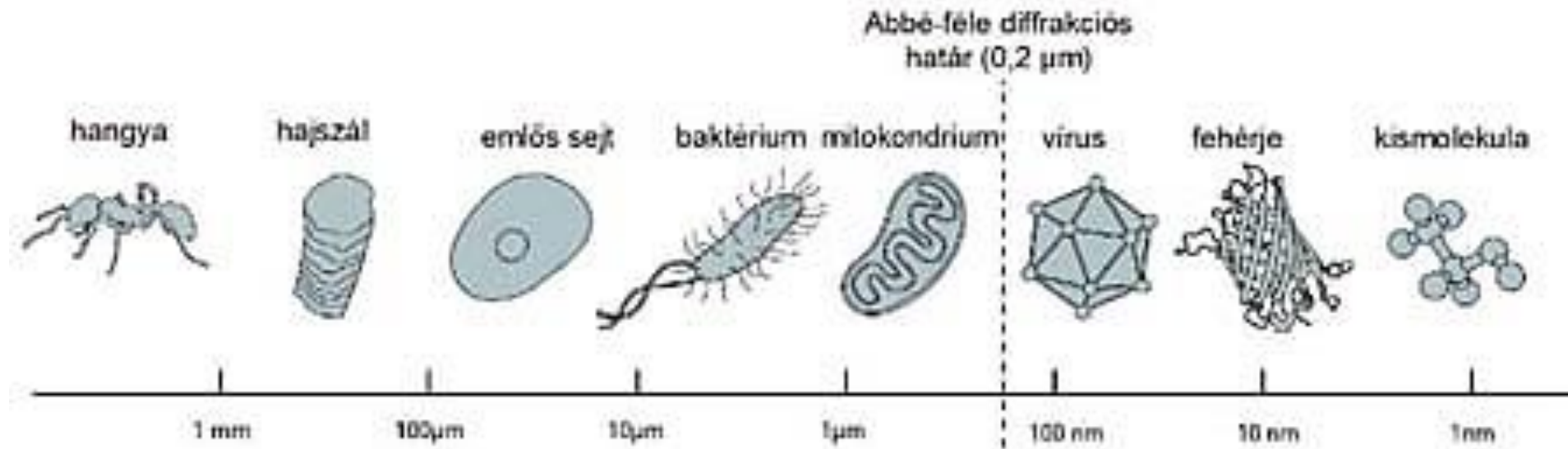
200 μm x 200 μm
exc: 990 nm

In vivo alkalmazás

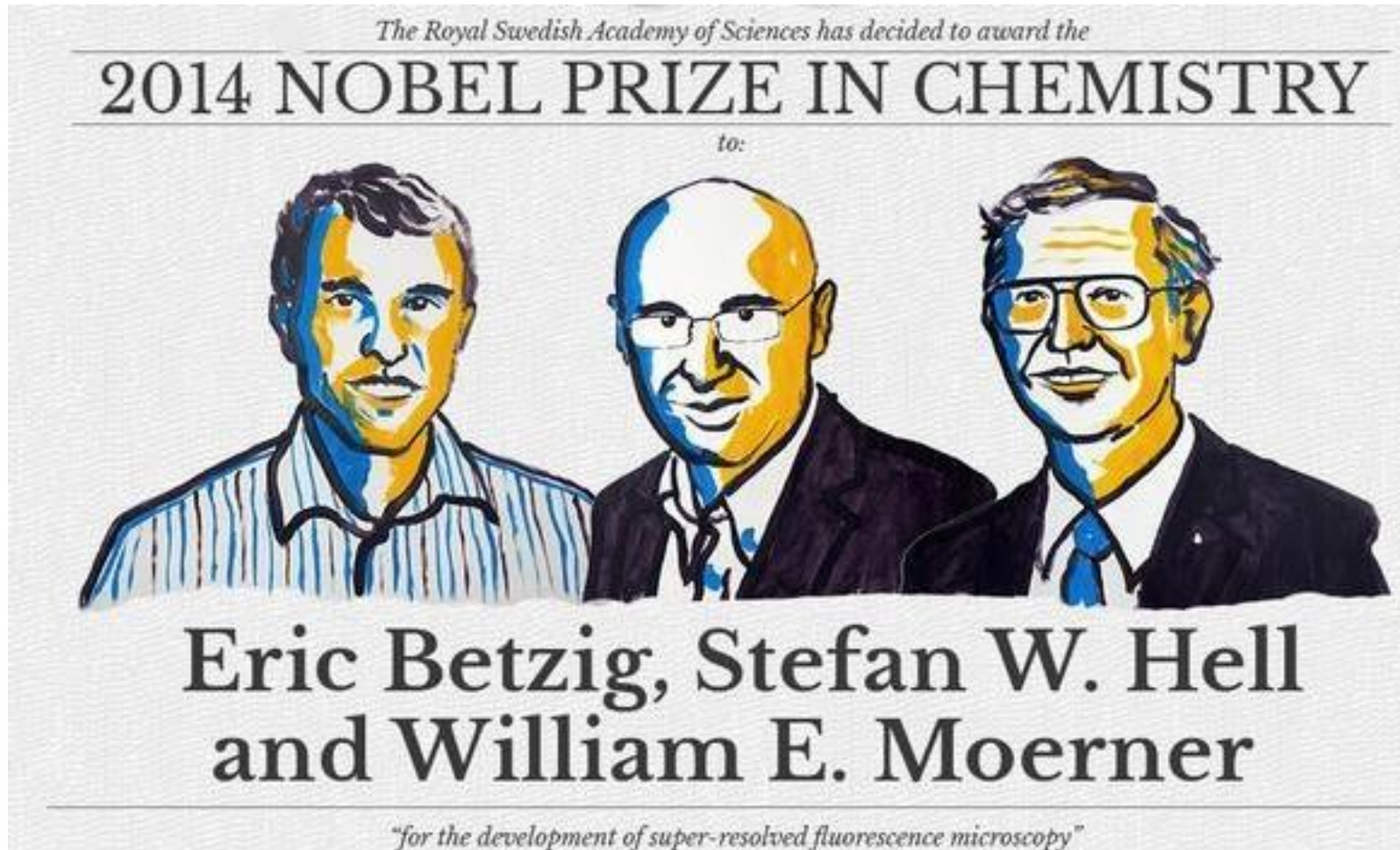


El Madani HA, Tancredi-Bohin E, Bensussan A, Colonna A, Dupuy A, Bagot M, Pena AM. (2012) In vivo multiphoton imaging of human skin: assessment of topical corticosteroid-induced epidermis atrophy and depigmentation. *J Biomed Opt*, 17(2)

Mekkorák a dolgok?

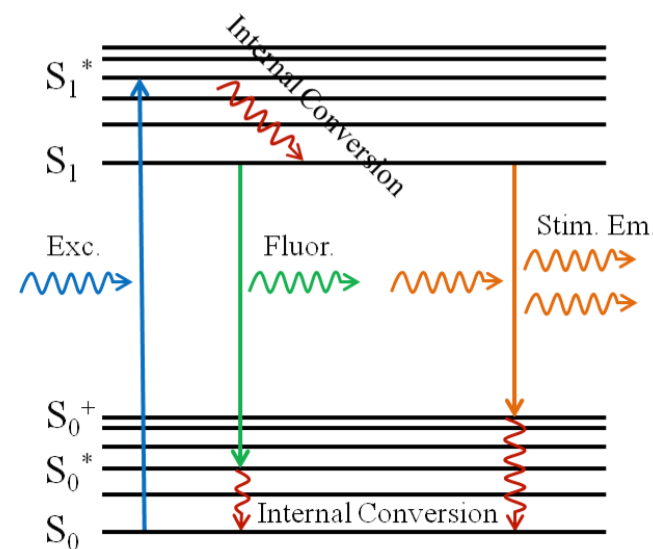
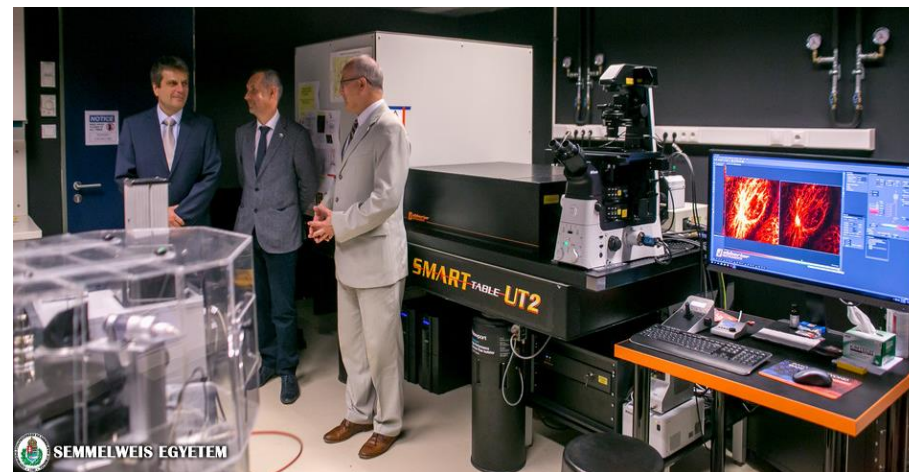


Szuperrezolúciós mikroszkópia

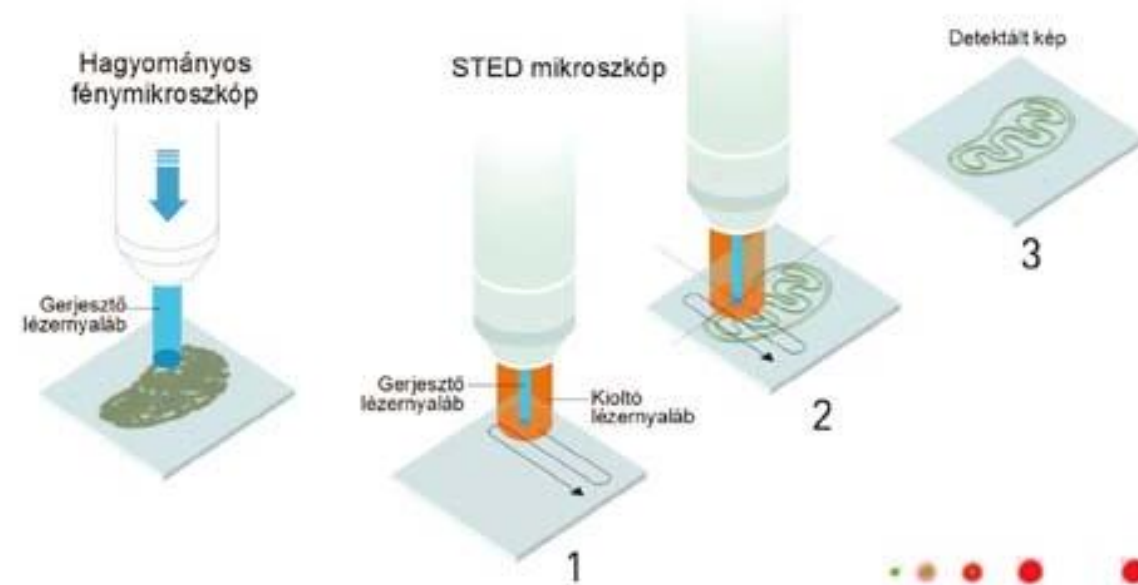
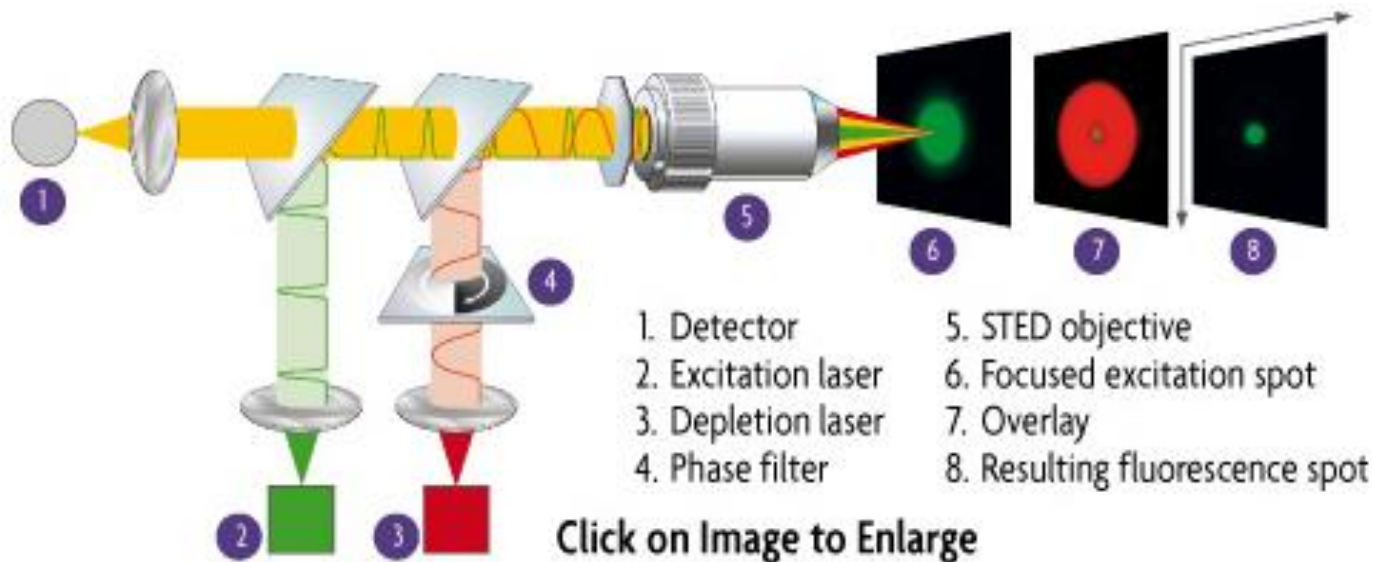
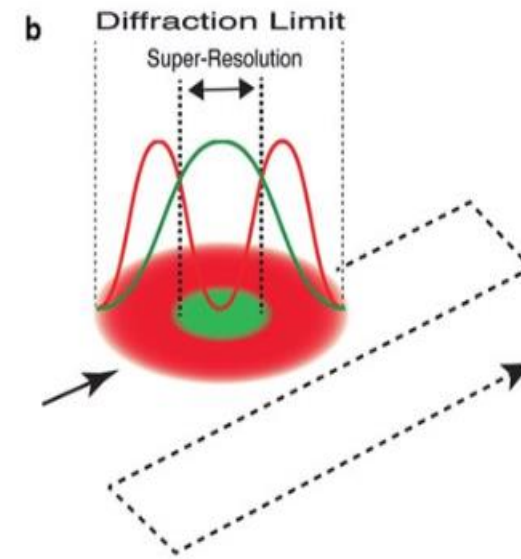


Szuperrezolúciós mikroszkópia

- 2014-ben Eric Betzig, Stefan W. Hell és William E. Moerner kémiai Nobel-díjban részesültek
- STED (stimulated emission depletion microscopy)
- Intézetünkben 2018. augusztus
- nanométeres, molekuláris felbontást tesz lehetővé
- fluorofórok szelektív deaktiválása
- egy bizonyos hullámhosszú foton kölcsönhat egy gerjesztett atomi vagy molekuláris elektronnal, melynek hatására az elektron visszatér egy alacsonyabb energiaállapotba és a felszabaduló energia távozik egy foton formájában, amelynek fázisa, hullámhossza, polarizációja és kilépési iránya is megegyezik a beeső fotonéval
- elektron magasabb rezgési állapotba kerül, a két állapot energiakülönbsége alacsonyabb, mint a normál fluoreszcencia különbség

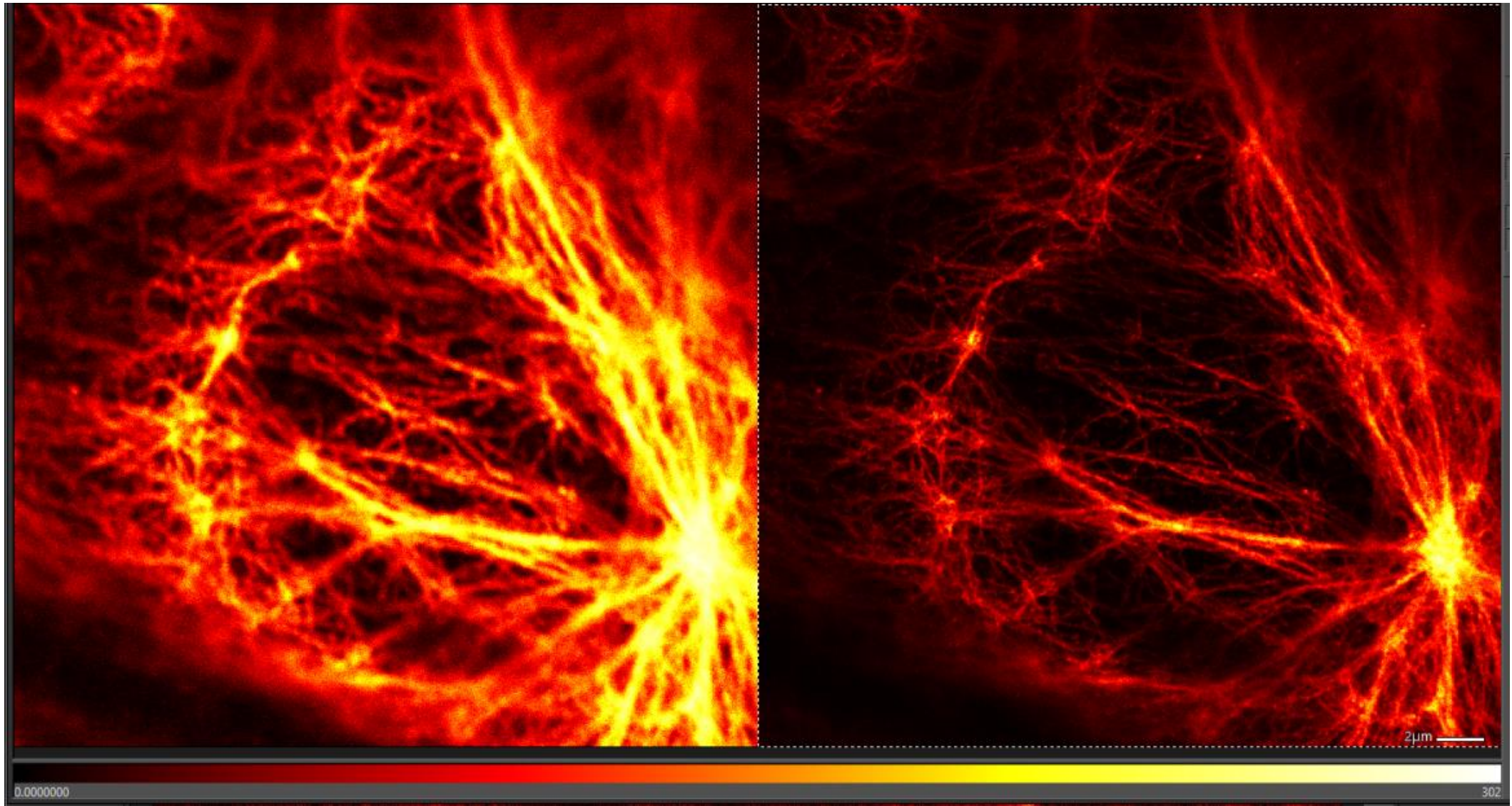


- A STED nyáláb hullámhosszának megfelelő megválasztásával a gerjesztett fluorofórokat kényszerített emisszióval alapállapotba lehet juttatni, így az általuk kibocsátott foton nem járul hozzá a képalkotáshoz
- a leképezés pásztázó lézernyalábbal történik pontról pontra



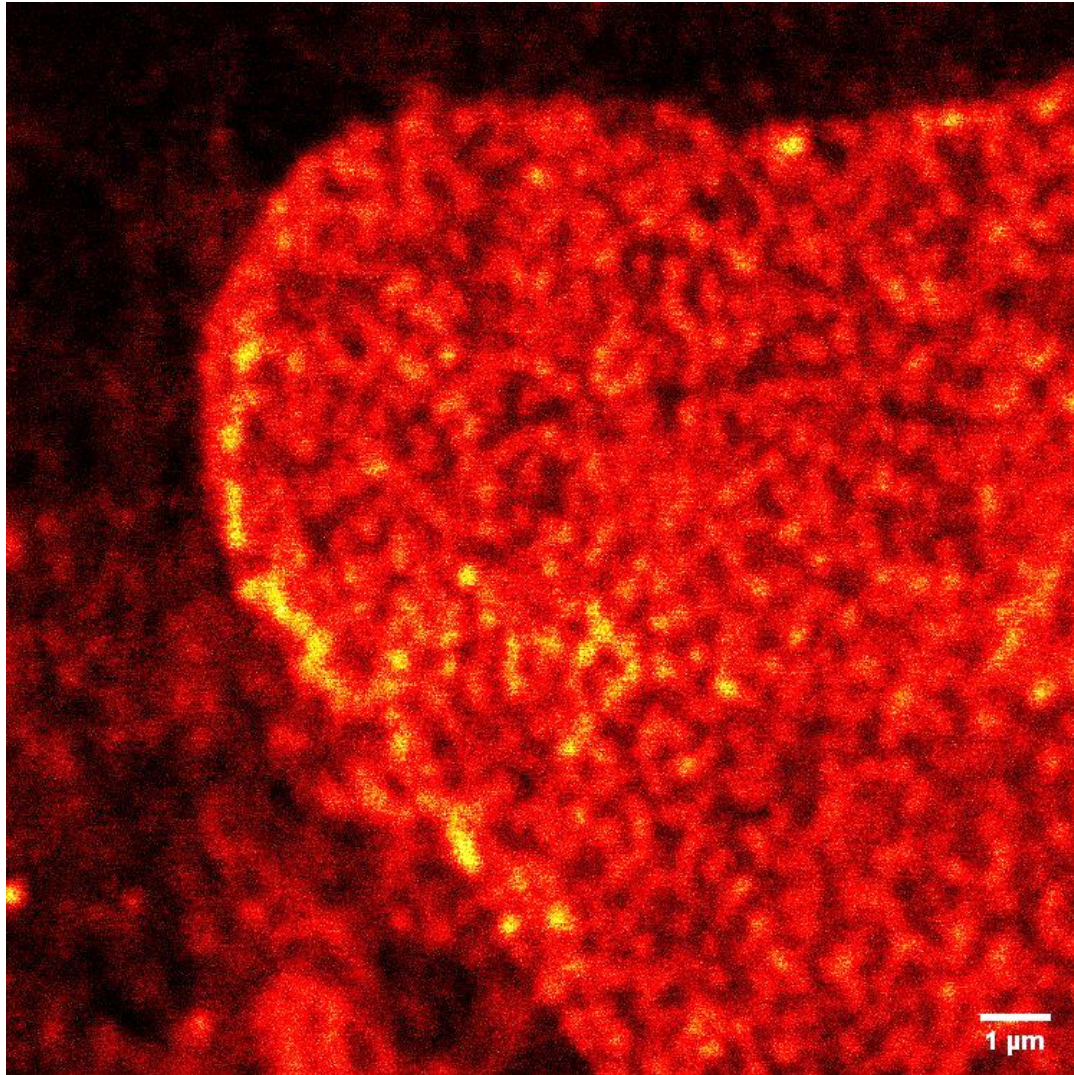
konfokális

STED

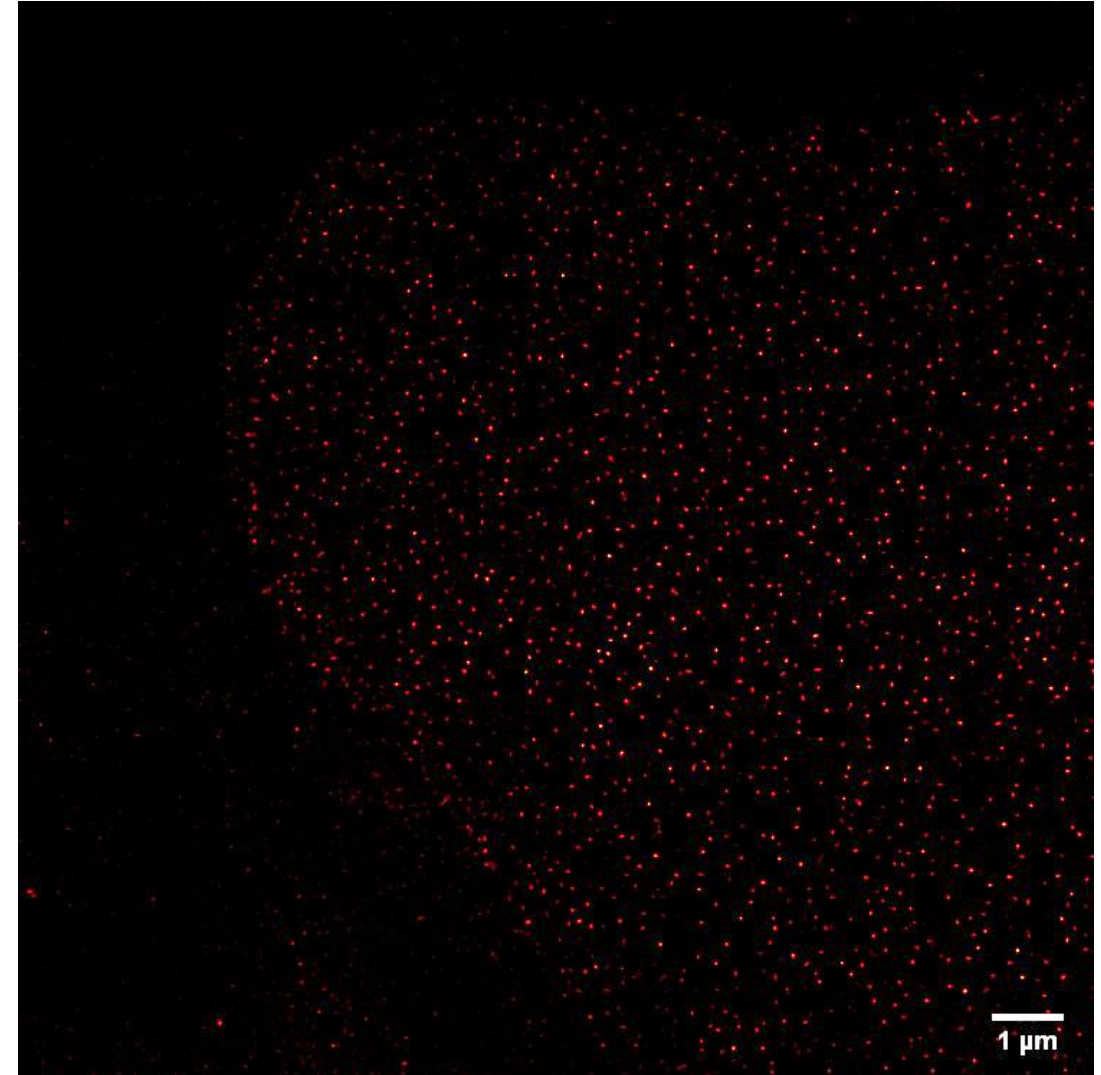


Nuclear pores of HeLa cells

konfokális



STED



Ellenőrző kérdések felkészüléshez:

- ✓ a felbontóképesség korlátai
- ✓ Abbé-elv
- ✓ Fluoreszcencia mikroszkóp működési elve: mi a fényforrás, dikroikus tükör funkciója, gerjesztési/emissziós spektrumok, Stokes-eltolódás
- ✓ Fluoreszcencia forrásai: extrinsic, intrinsic
- ✓ GFP fehérje
- ✓ Konfokális mikroszkópia alapjai: mi a fényforrás, apertura funkciója
- ✓ Kétfoton mikroszkópia alapjai: mi a fényforrás, milyen típusú lézer (fs), milyen hullámhosszon gerjesztjük a mintát, előnyök, gerjesztési/emissziós spektrumok
- ✓ Szuperrezolúciós mikroszkópia: STED képalkotás elve