

## Modern mikroszkópos technikák

Haluszka Dóra

2018.11.05.



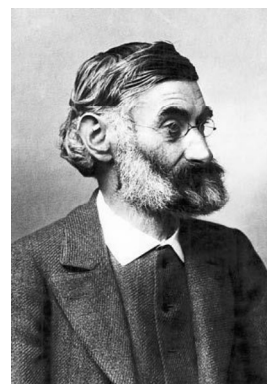
„A nyitott Világegyetem”

## 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: Antony van Leeuwenhoek – egy lencse, 270x nagyítás
- 1800-as évek eleje
- Carl Zeiss – jénai vállalkozó – mikroszkópok fejlesztése
- Ernst Abbe – optikai törvények, refrakció, diffrakció



## A felbontóképesség korlátai...



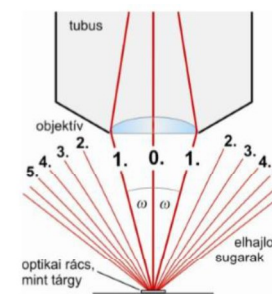
Ernst Abbe (1840-1905)

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

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

$\delta$  felbontási határ - legkisebb  $d$  távolság, amely távolságra elhelyezkedő tárgypontok még különálló képpontokként képeződnek le

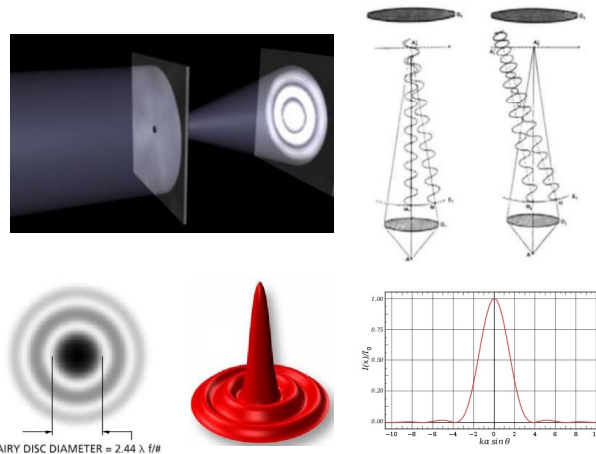


## Airy korongok – a fény hullámtermészetének bizonyítéka

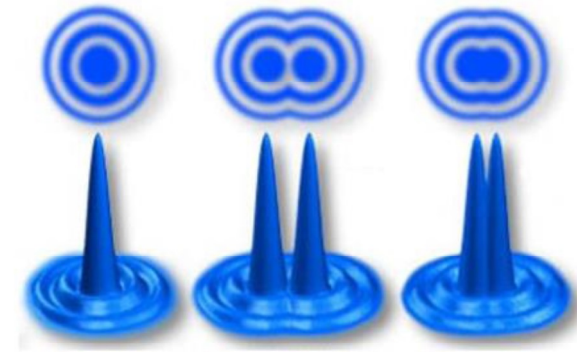
Egy fénypont ideális optikai lencsével leképezett képe az Airy korong

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

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



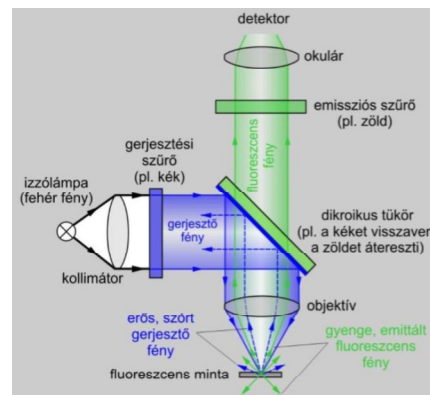
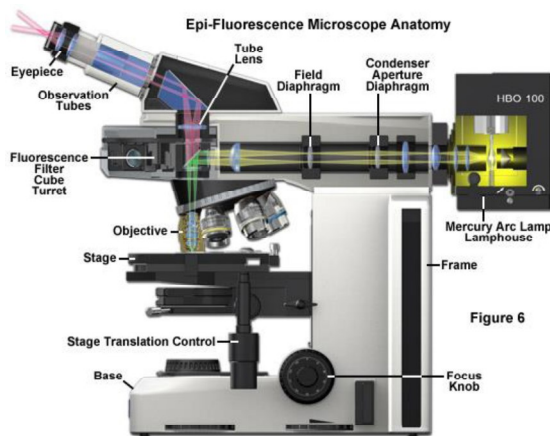
Mikor különböztethető meg két különálló pontszerű tárgy képe?



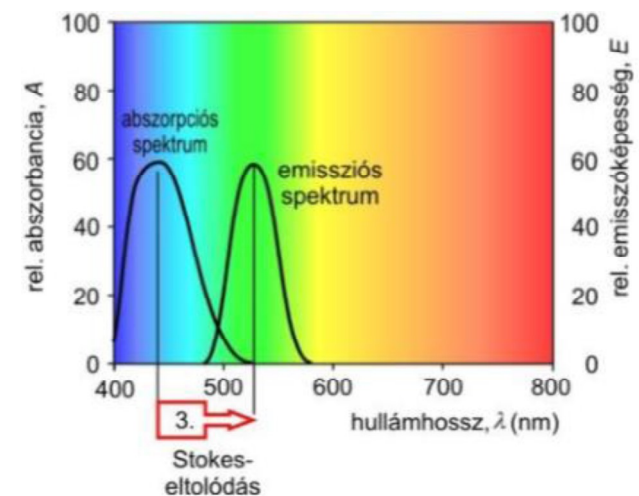
### Rayleigh –féle kritérium:

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 mikroszkóp



## Fény abszorpciós és emissziós spektrum



## Fluoreszcencia forrása

- **Intrinsic** (belső) fluorofórok:

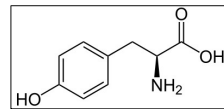
pl: triptofán, tirozin aminosavak, porfirinek

- **Extrinsic** (külső) fluorofórok:

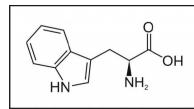
pl: kívülről bevitt festékmolekulák

### Az ideális fluorofór:

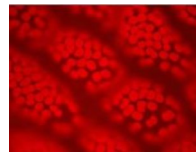
- Kicsi
- Hidrofil
- A látható tartományban nyel el és emittál
- A Stokes eltolódás nagy
- Specifikusan kötődik
- Nem eredményez fotokémiai reakciókat



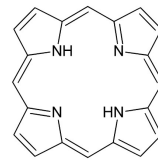
tirozin



triptofán



porfirin fluoreszcencia

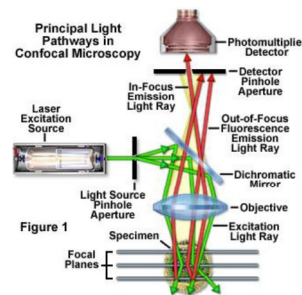
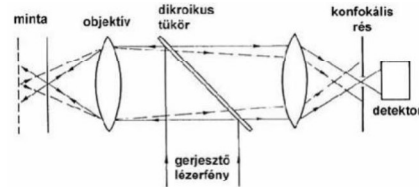




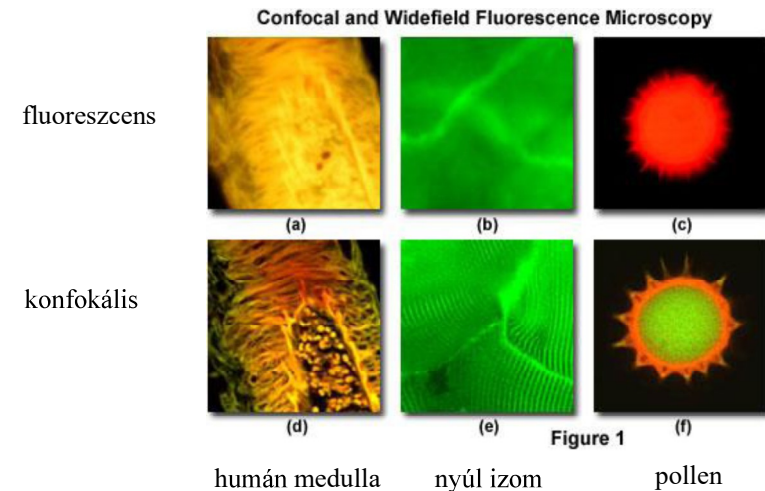
## Konfokális pásztázó mikroszkóp

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

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



## Fluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása



## Kétfoton mikroszkópia

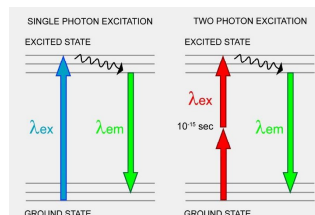
- 1931. Maria Göppert-Mayer
- a gerjesztendő molekulába egyszerre két foton abszorbeálódik, és energiájuk összeadódik
- nagy intenzitású lézer fényforrás ~ megfelelő foton-sűrűség
- 1990. Első kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp
- Wenzel Denk, Cornell University



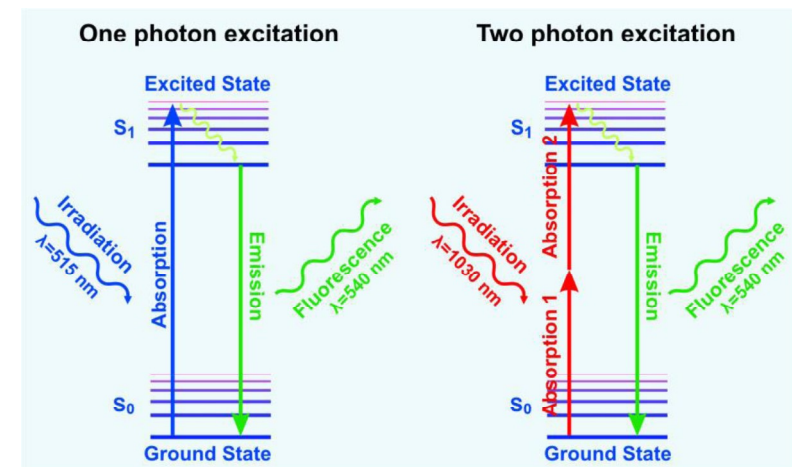
Maria Göppert-Mayer (1906-1972)



Wenzel Denk (1957-)

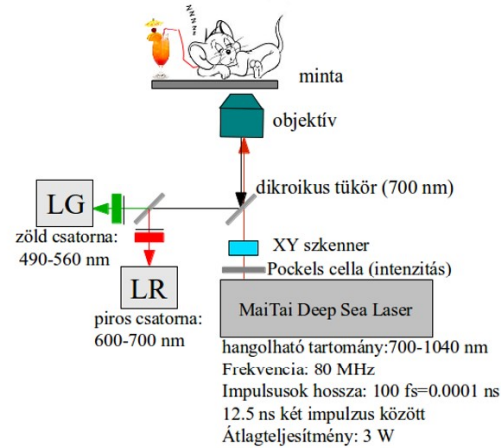


## Fény abszorpciós és emissziós spektrum

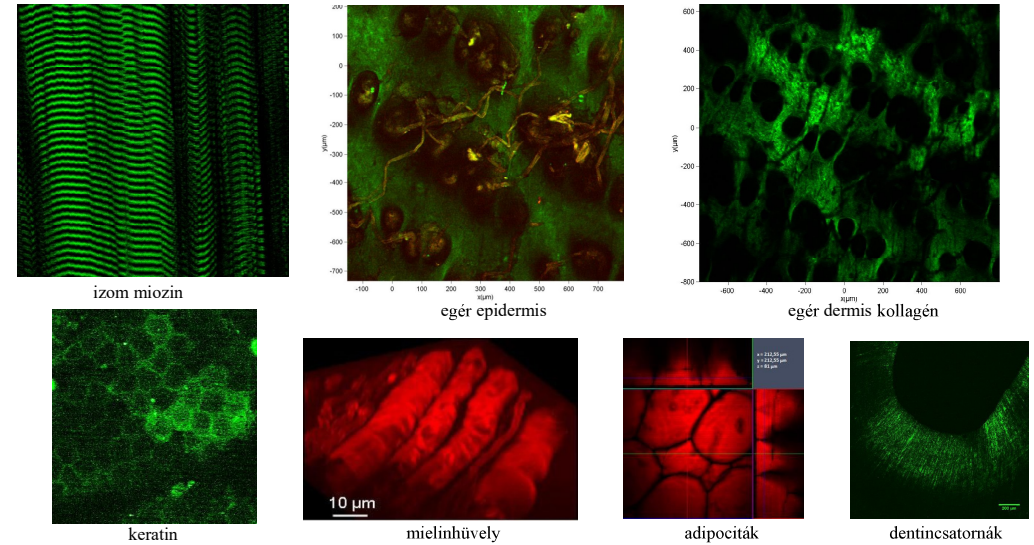


## Előnyök

- 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



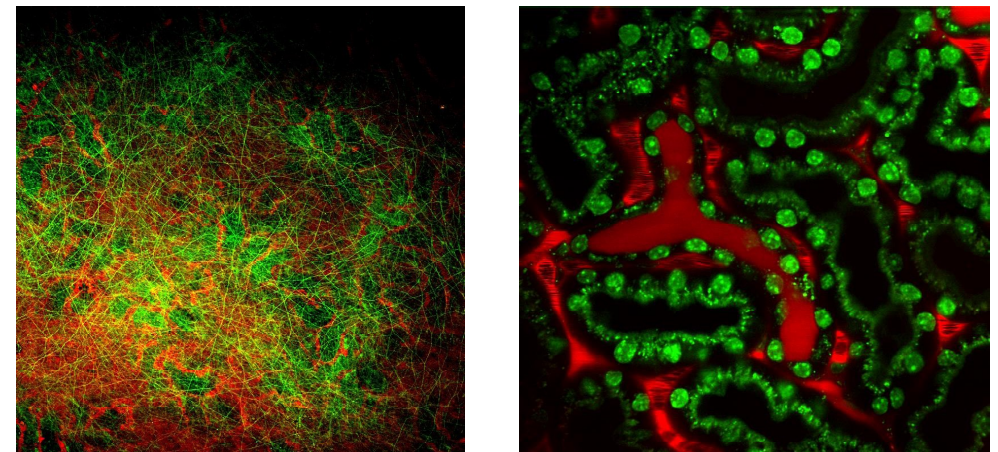
## 3D képalkotás

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



200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$   
exc: 990 nm

## Többszörös fluoreszcens jelölés

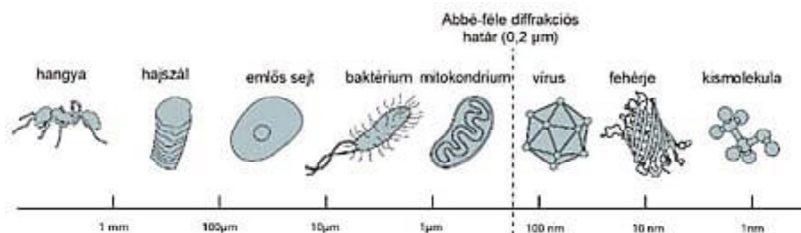


vese kéregállomány

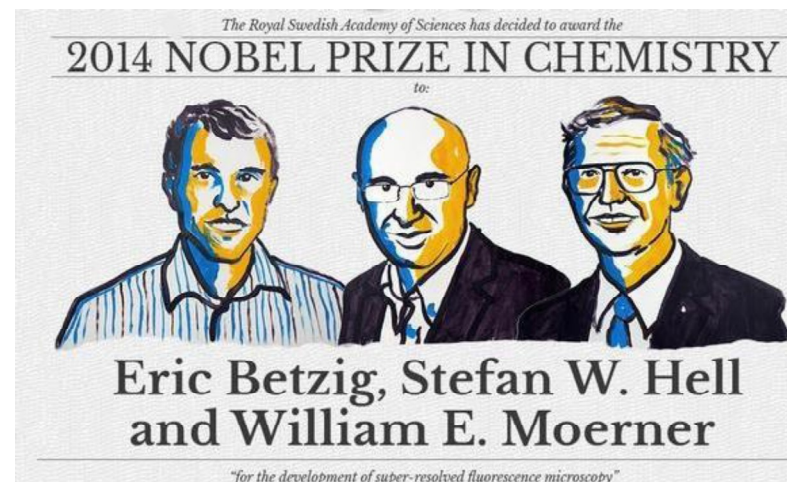
gyújtócsatorna és JGA sejtek



## Mekkorák a dolgok?

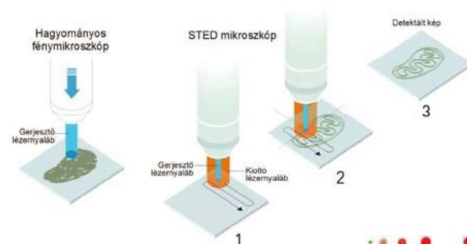
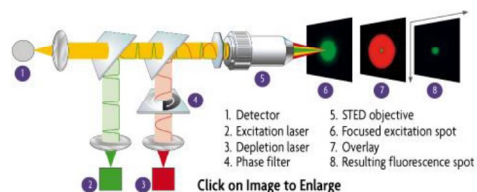


## Szuperrezolúciós mikroszkópia



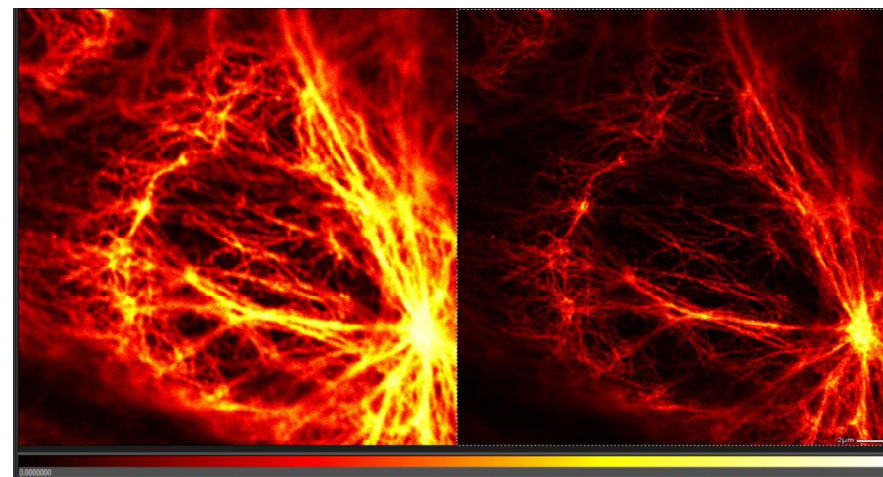
## Szuperrezolúciós mikroszkóp

- 2014-ben Eric Betzig, Stefan W. Hell és William E. Moerner kémiai Nobel-díjban részesültek
- Intézetünkben 2018. augusztus
- nanométeres, molekuláris felbontást tesz lehetővé
- gerjesztő fénynyalábra azzal koncentrikus, gyűrű alakú kioltó fénynyalábot vetítünk
- STED (stimulated emission depletion microscopy)
- a leképezés pásztázó lézernyalábbal történik pontról pontra



konfokális

STED



Kérdés:

Mi a különbség a gerjesztési és emissziós spectrum között fluoreszcens, illetve kétfoton mikroszkópia esetén?