

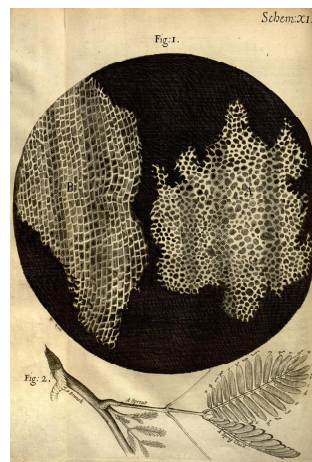
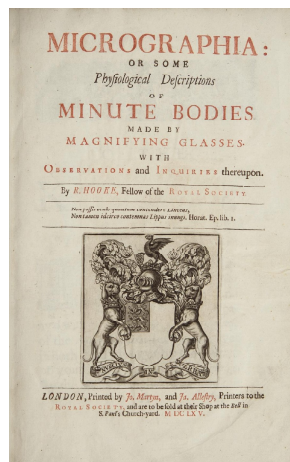
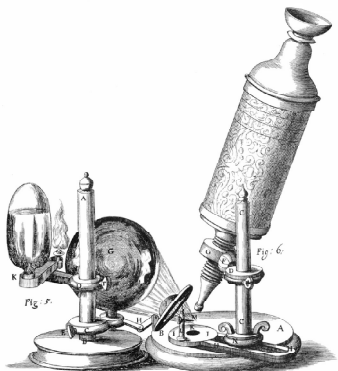
Modern mikroszkópos technikák

Haluszka Dóra

2019.11.04.

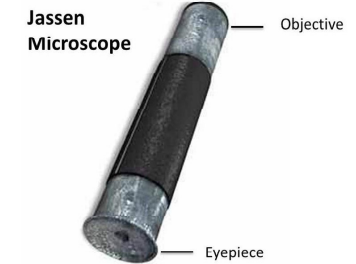


- 1667: Robert Hooke – angol polihisztor – „Micrographia”, parafa cellái



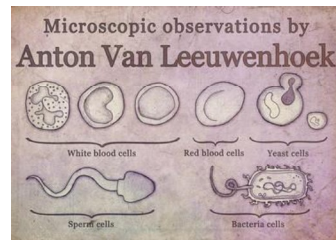
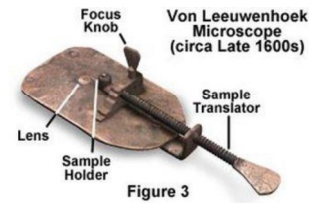
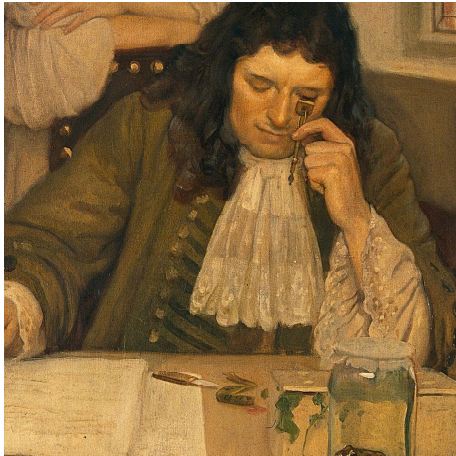
A mikroszkópia rövid története

- már az ókori Rómában...vízzel töltött üveggömb
- 1600-as évek elején: Zacharias Jansen – teleszkóp/mikroszkóp feltalálója



„A nyitott Világegyetem”

- 1674: Antony van Leeuwenhoek – egy lencse, 270x nagyítás

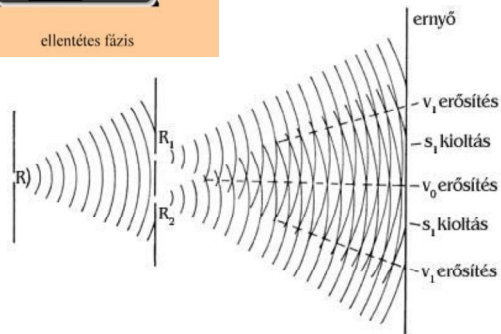
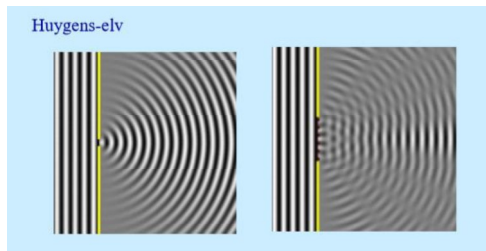
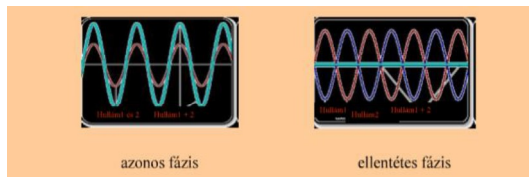


- 1800-as évek eleje
- Carl Zeiss – jénai vállalkozó – mikroszkópok fejlesztése
- Ernst Abbe – optikai törvények, refrakció, diffrakció



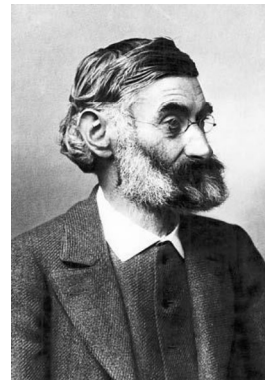
Carl Zeiss mikroszkóp (1879)

A hullámoptika alapjai



Young kísérlet

A felbontóképesség korlátai...



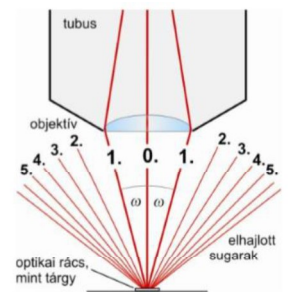
Ernst Abbe (1840-1905)

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 tárgypontok még különálló képpontokként képeződnek le

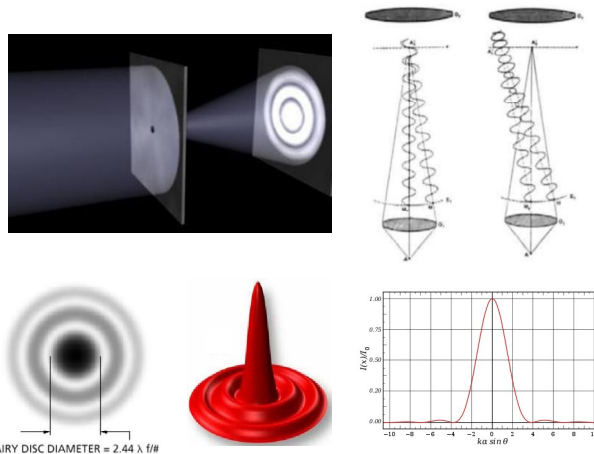


Airy korongok – a fény hullámtermészetének bizonyítéka

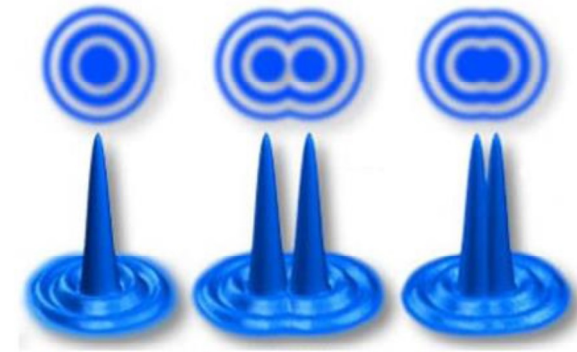
Egy fénypont ideális optikai lencsével leképezett képe az Airy korong

Keletkezése: A kép síkjában fázisban levő hullámok (bal oldal) diffrakciós maximumot, míg 180° -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.



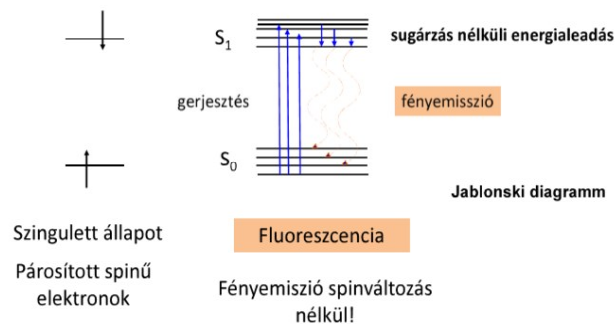
Mikor különböztethető meg két különálló pontszerű tárgy képe?



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



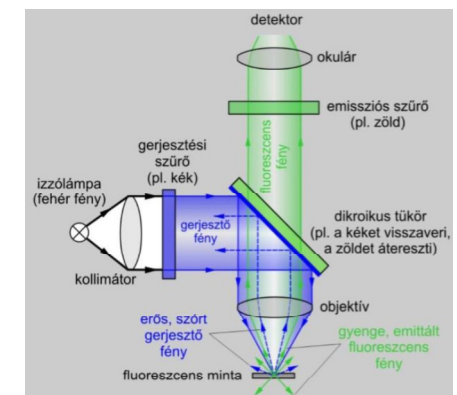
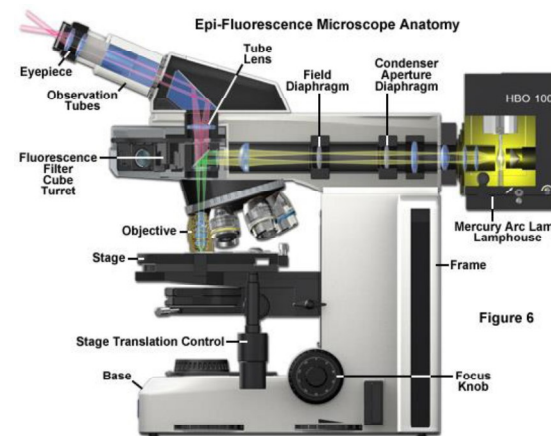
$$E_{\text{gerjesztés}} \geq E_{\text{fluoreszcencia}}$$

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

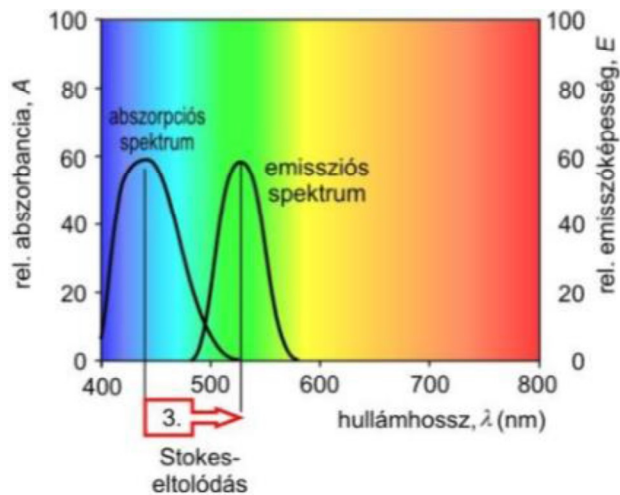
Stokes-eltolódás



Fluoreszcencia mikroszkóp



Fény abszorpció és emissziós spektrum



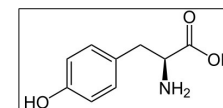
$$E_{\text{gerjesztés}} \geq E_{\text{fluoreszcencia}}$$

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

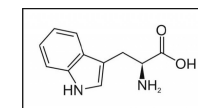
Fluoreszcencia forrása

- **Intrinsic** (belső) fluorofórok:

pl: triptofán, tirozin aminosavak, porfirinek



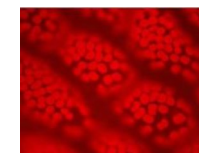
tirozin



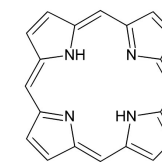
triptofán

- **Extrinsic** (külső) fluorofórok:

pl: kívülről bevitt festékmolekulák



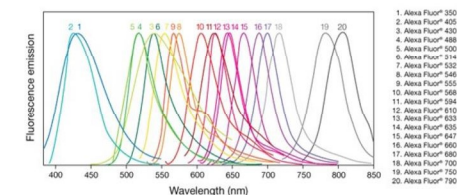
porfirin fluoreszcencia



porfirin

Az ideális fluorofór:

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

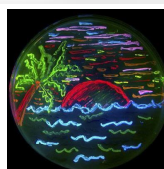
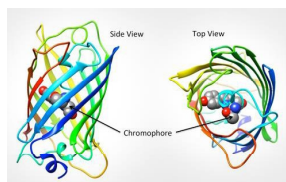


Fluoreszcens fehérjék

- 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) fénnel
- emisszió: 508 nm-en



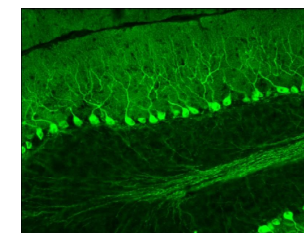
Aequorea victoria



- Vizsgálni kívánt fehérjéhez kötik – fúziós fehérje
- Mivel kis méretű – nem zavarja már fehérje funkcióját
- Transzfekció: tenyésztett sejtekbe juttatják a fehérjét
- Transzgenezis: ha megtermékenyített petesejtbe



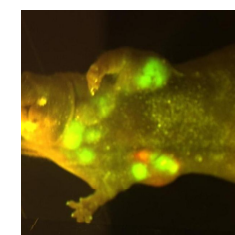
Transzgén egerek



Egér Purkinje sejtek

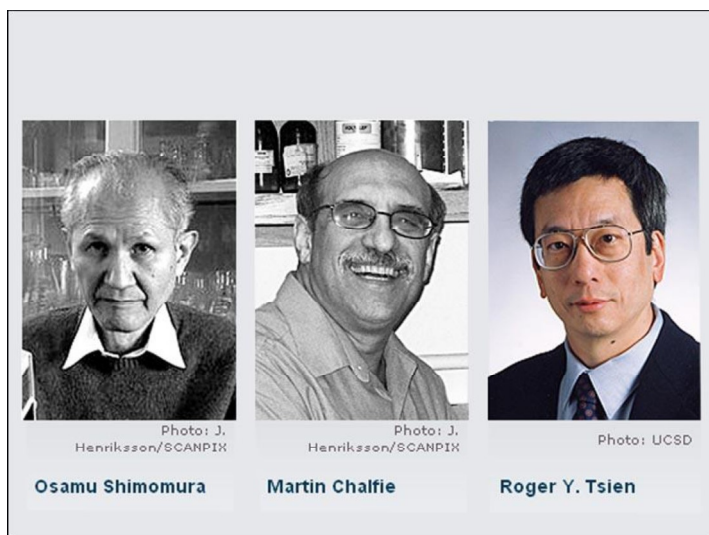


Béka izom sejtek GFP jelölése



Tumor sejtek követése

2008. Kémiai Nobel-díj



Lézerek általános tulajdonságai

light amplification by stimulated emission of radiation



- Monokromatikus
- koherens
- poláros
- jól fókuszálható

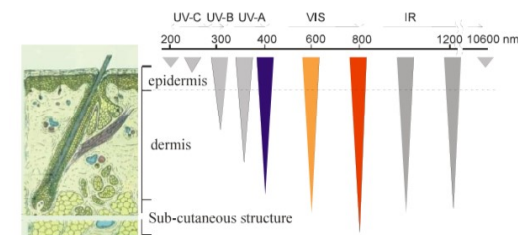
Rövid impulzucidő lehetőség – ps, fs

Nagy teljesítmény érhető el– kW - GW

Nagy teljesítménysűrűség lehetséges



Fény behatolási mélysége a bőrbe



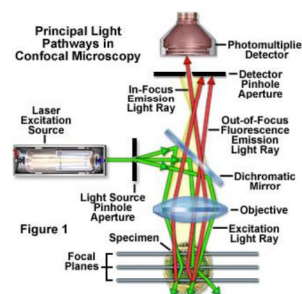
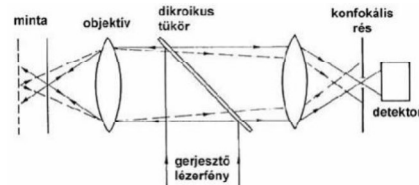
A fény intenzitás gyengülése elnyelődés, fénytörés és visszaverődéssel egyaránt megvalósul.

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

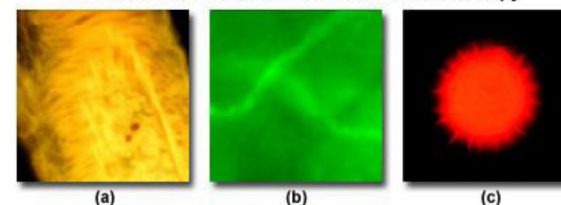
- lézer fényforrás
- fényútba helyezett szűrőkkel a hullámhossz kiválasztható
- minta pásztázása pontról pontra
- XY irányban – pásztázó tükrök
- számítógépes vezérlés
- „optikai szeletelés” – 3D képalkotás



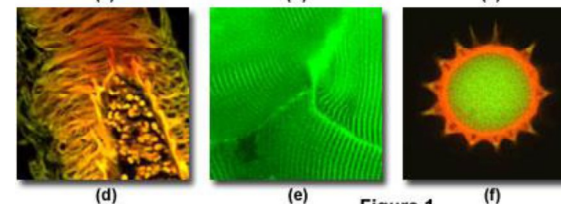
Fluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása

Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

fluoreszcens



konfokális



humán medulla

nyúl izom

pollen

Figure 1

Kétfoton mikroszkópia

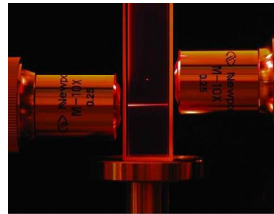
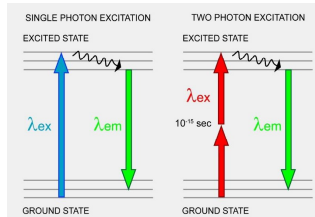
- 1931. Maria Göppert-Mayer
- a gerjesztendő molekulába egyszerre két foton abszorbeálódik, és energiájuk összeadódik
- nagy intenzitású lézer fényforrás ~ megfelelő fotonsűrűség
- 1990. Első kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp
- Wiefried Denk, Cornell University



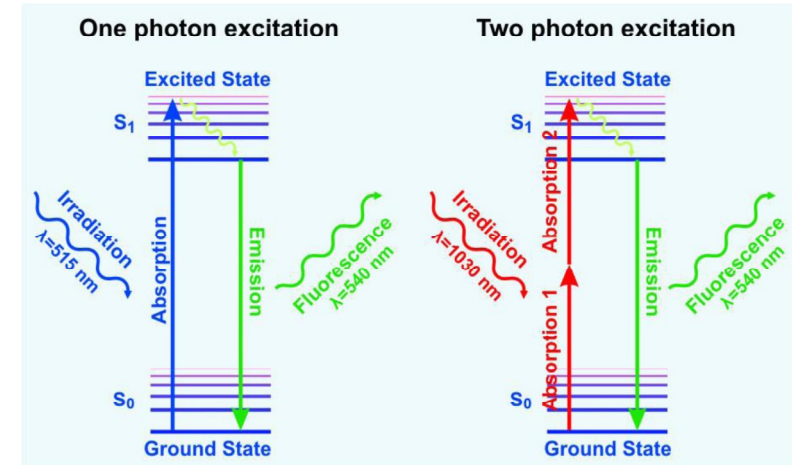
Maria Göppert-Mayer (1906-1972)



Wiefried Denk (1957-)

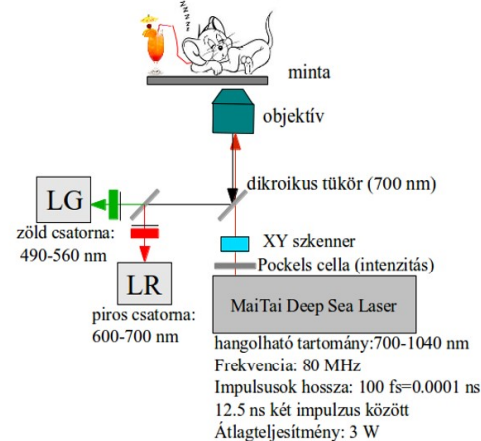


Fény abszorpciós és emissziós spektrum

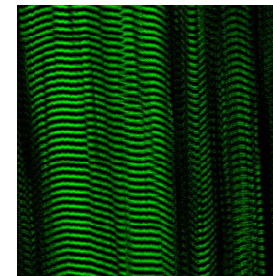


Előnyök

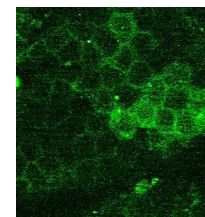
- Csak a fókuszfoltban gerjeszt – nincs kétfoton elnyelődés a fókuszon kívül
- A lézer mintára eső teljesítménye néhány mW – *in vivo* képalkotás
- Infravörös tartományban (700-1300 nm) hangolt fényforrás – kevésbé szóródik
- Mélyebb penetráció
- Több festék gerjeszthető egyszerre
- Az összes fluoreszcencia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



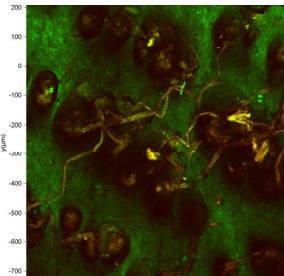
Jelölés nélküli képalkotás



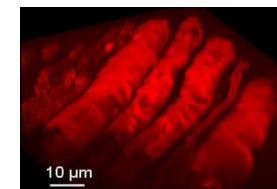
izom miozin



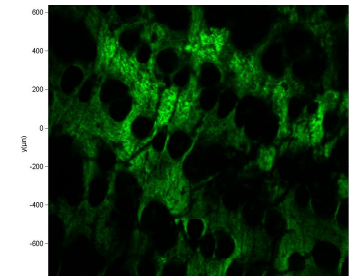
keratin



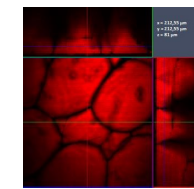
egér epidermis



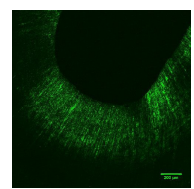
mielinhüvely



egér dermis kollagén



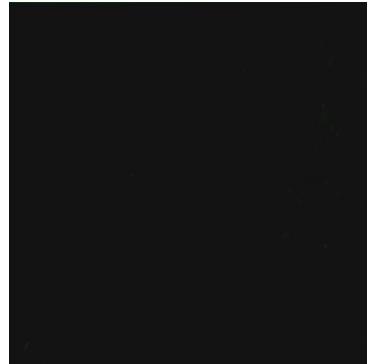
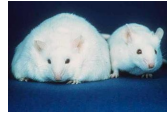
adipociták



dentincsatomák

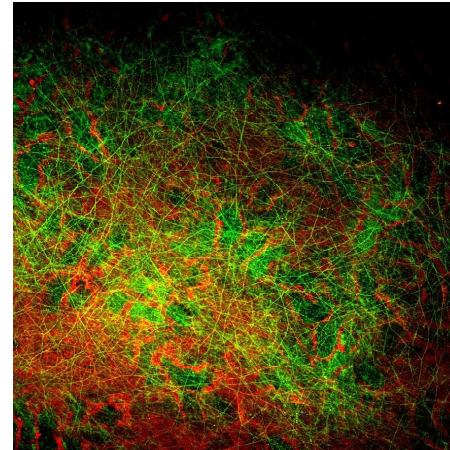
3D képalkotás

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

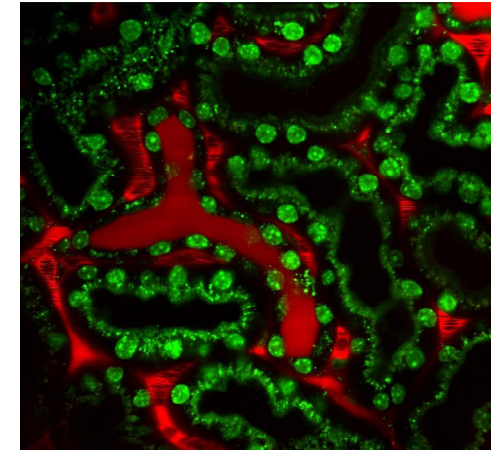


200 μm x 200 μm
exc: 990 nm

Többszörös fluoreszcens jelölés

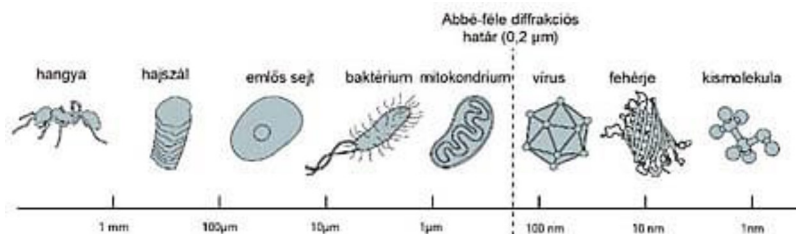


vese kéregállomány

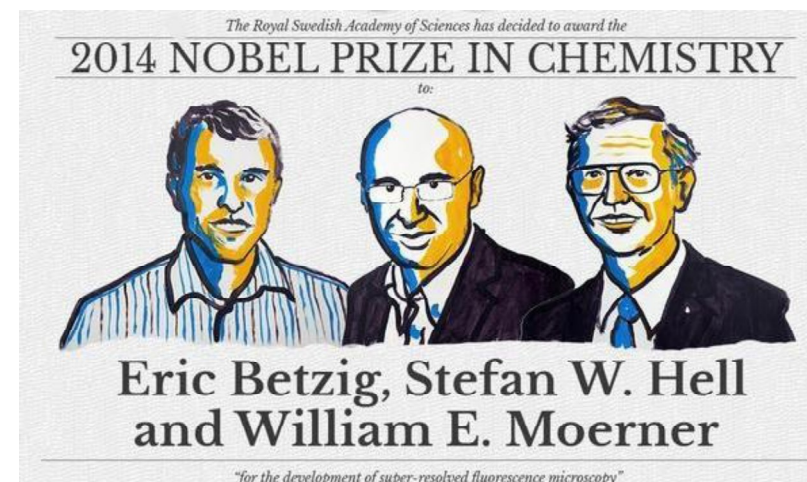


gyűjtőcsatorna és JGA sejtek

Mekkorák a dolgok?

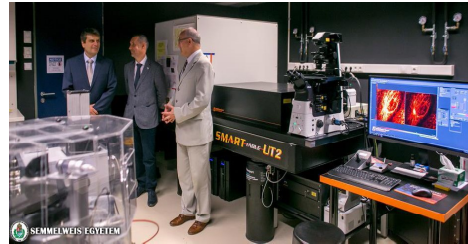


Szuperrezolúciós mikroszkópia

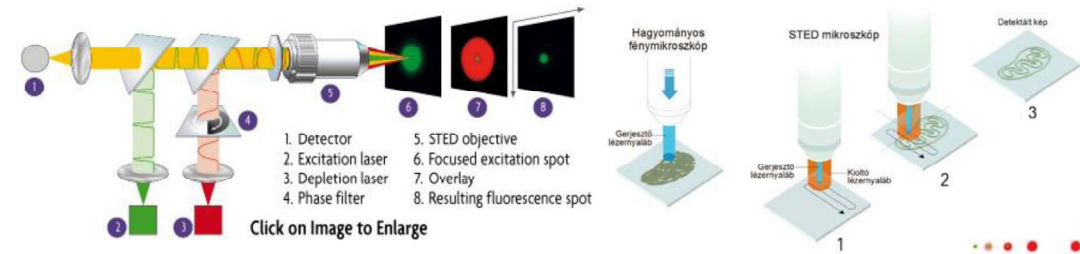


Szuperrezolúciós mikroszkópia

- 2014-ben Eric Betzig, Stefan W. Hell és William E. Moerner kémiai Nobel-díjban részesültek
- Intézetünkben 2018. augusztus
- nanométeres, molekuláris felbontást tesz lehetővé

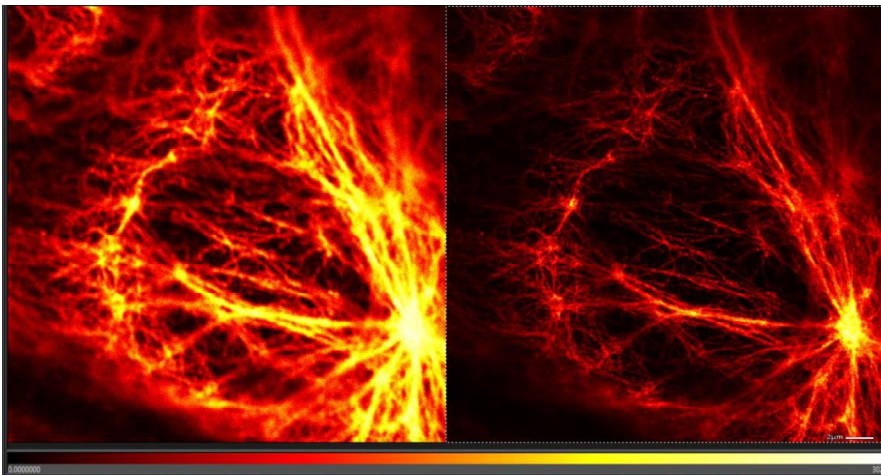


- gerjesztő fénynyalábra azzal koncentrikus, gyűrű alakú kioltó fénynyalábot vetítünk
- STED (stimulated emission depletion microscopy)
- a leképezés pásztázó lézernyalábbal történik pontról pontra



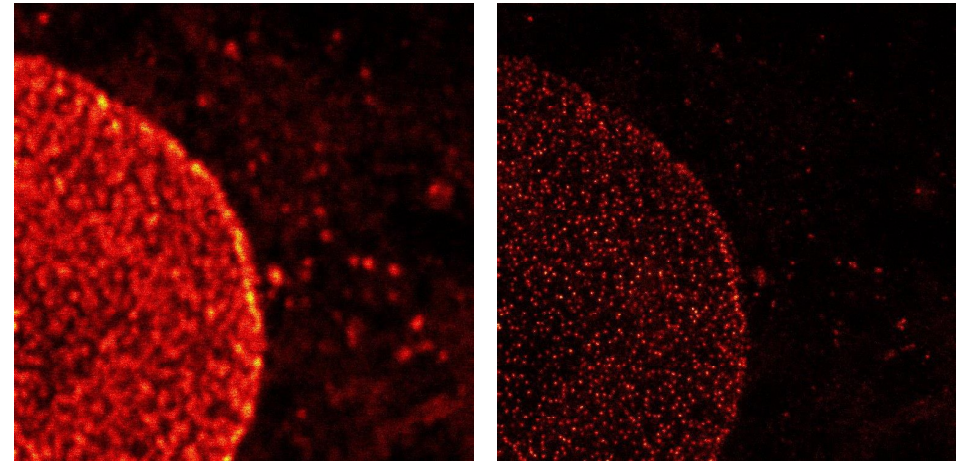
konfokális

STED



konfokális

STED



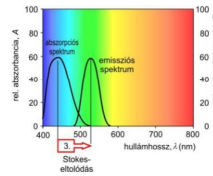
Ellenőrző kérdések felkészüléshez:

- ✓ a felbontóképesség korlátai

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

- ✓ Abbé-elv

- ✓ Fluoreszcencia mikroszkóp működési elve: mi a fényforrás, dikroikus tükör funkciója, gerjesztési/emissziós spektrumok, Stokes-eltolódás



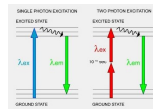
- ✓ Fluoreszcencia forrásai: extrinsic, intrinsic



- ✓ GFP fehérje

- ✓ Konfokális mikroszkópia alapjai: mi a fényforrás, aptertura 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

