

Modern mikroszkópos technikák

Haluszka Dóra



Fluoreszcencia mikroszkóp

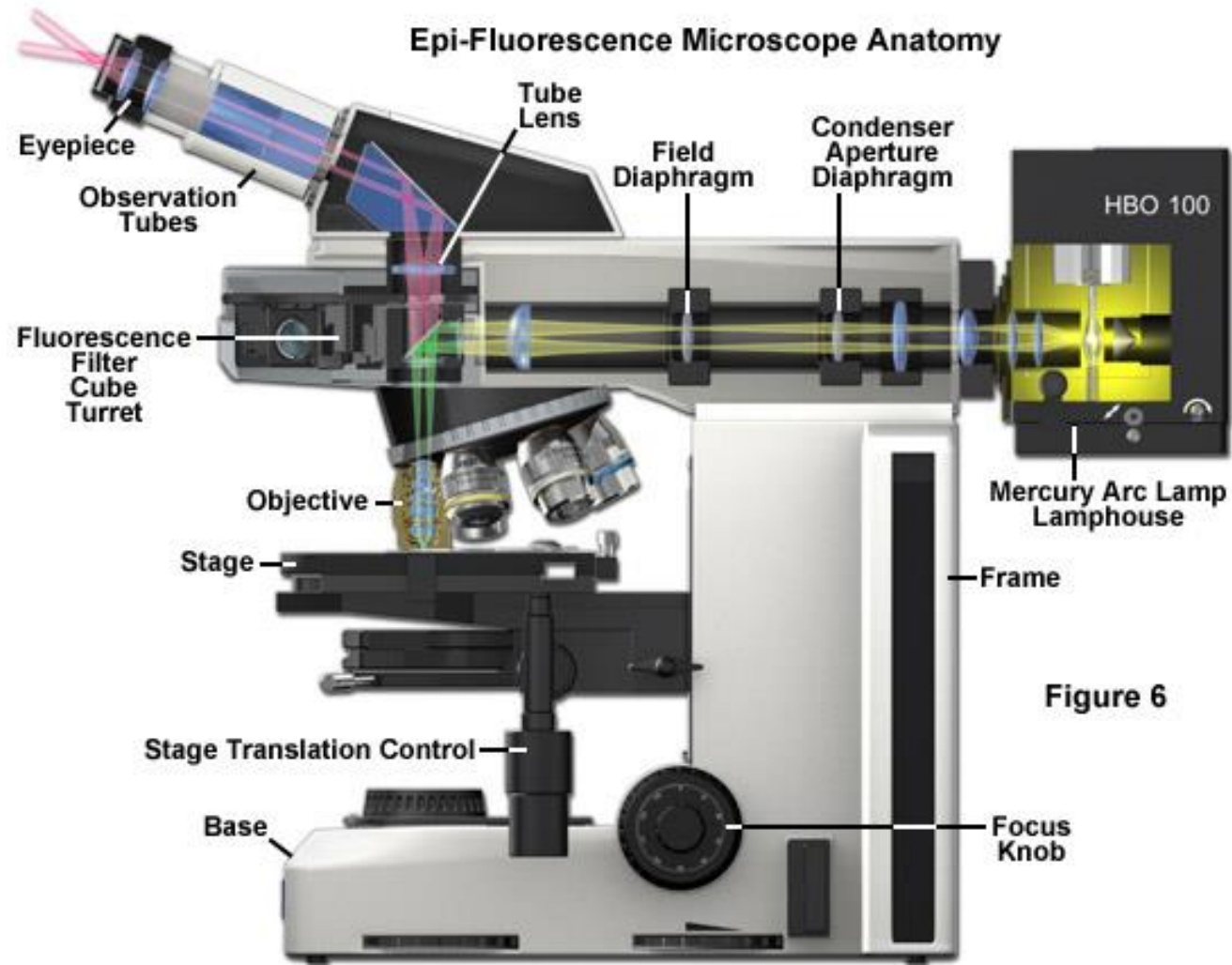
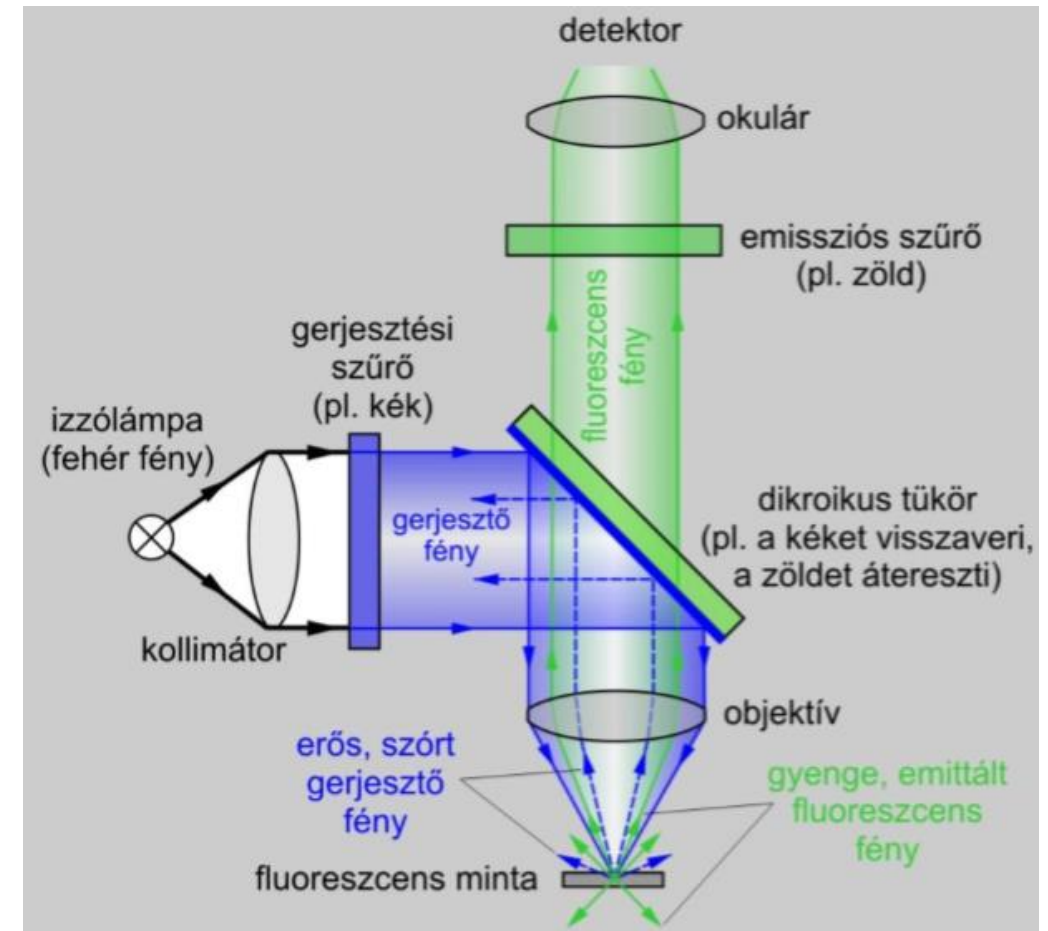
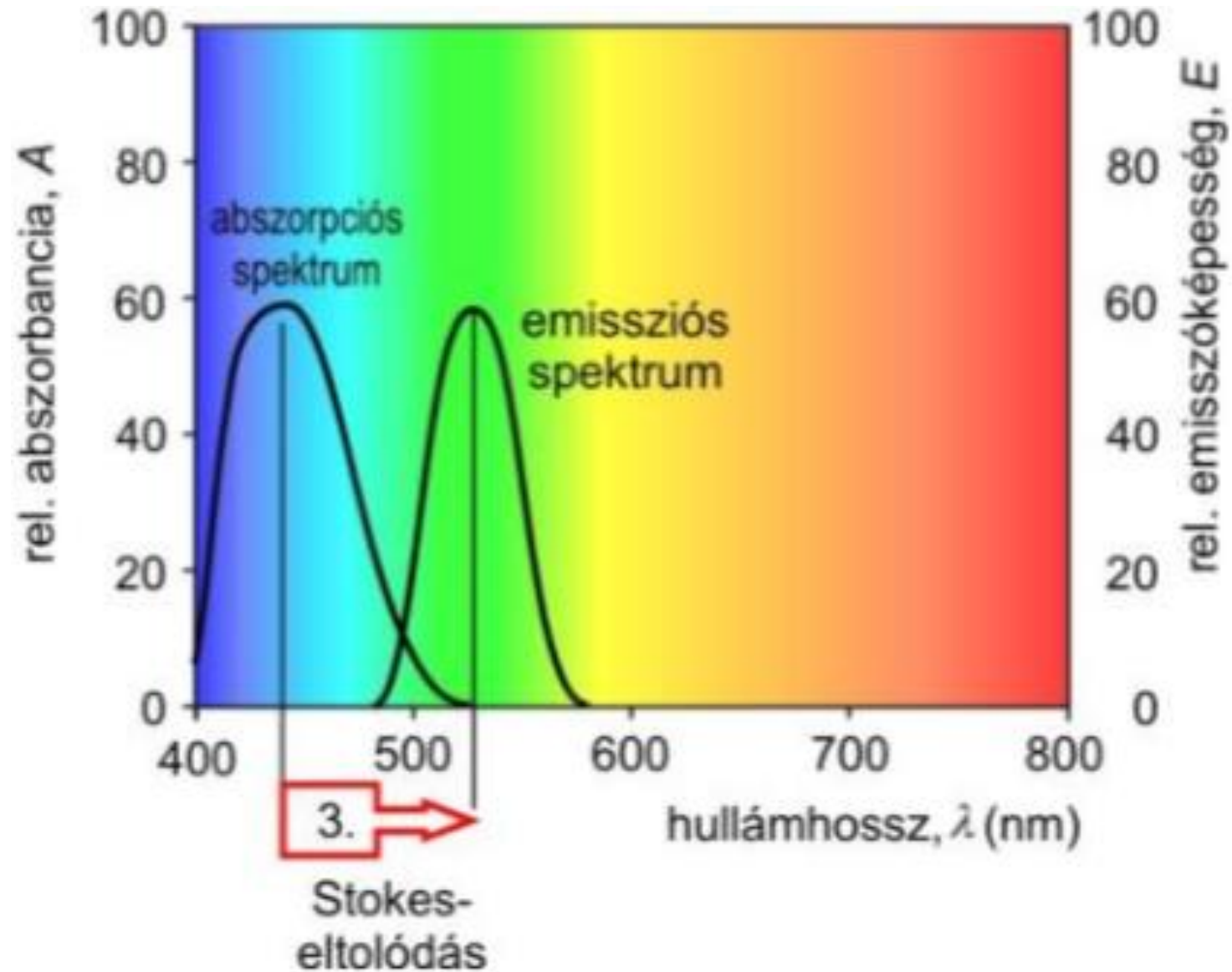


Figure 6



Fény abszorpció és emissziós spektrum



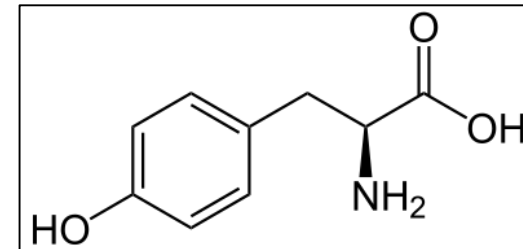
$$E_{\text{gerjesztés}} \geq E_{\text{fluoreszcencia}}$$

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

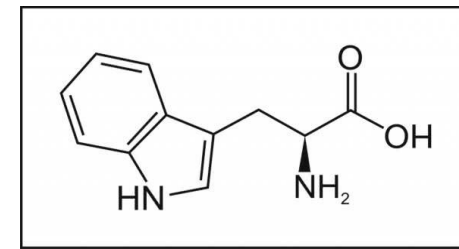
Fluoreszcencia forrása

- **Intrinsic** (belső) fluorofórok:

pl: triptofán, tirozin aminosavak, porfirinek



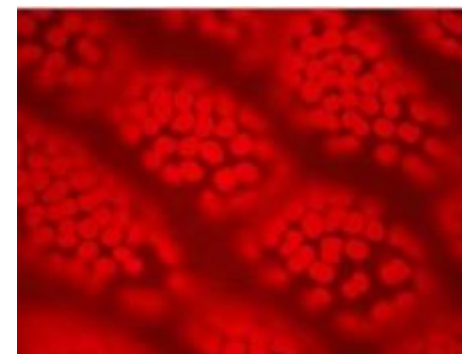
tirozin



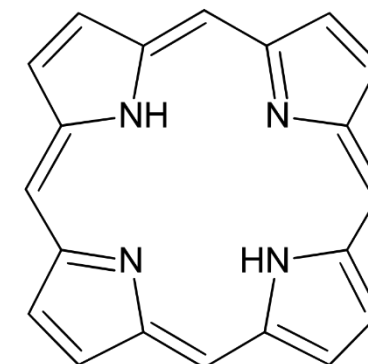
triptofán

- **Extrinsic** (külső) fluorofórok:

pl: kívülről bevitt festékmolekulák



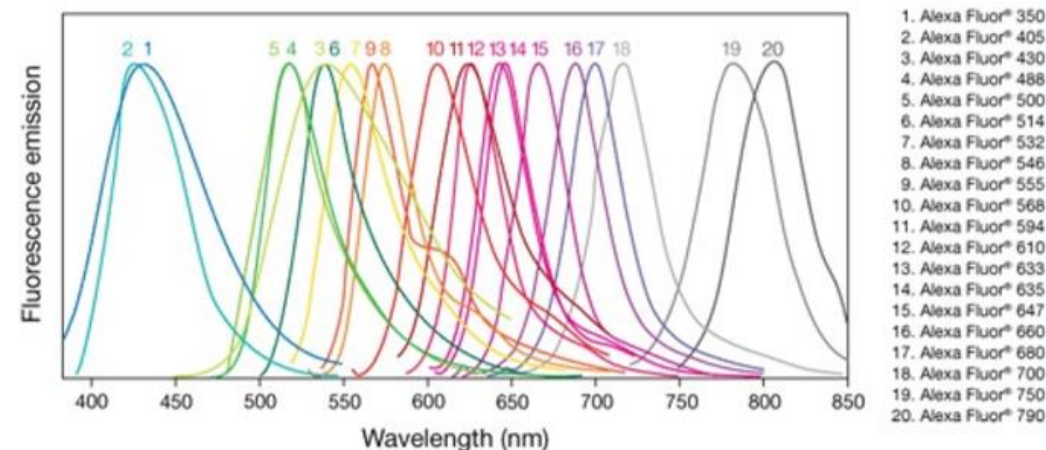
porfirin fluoreszcencia



porfirin

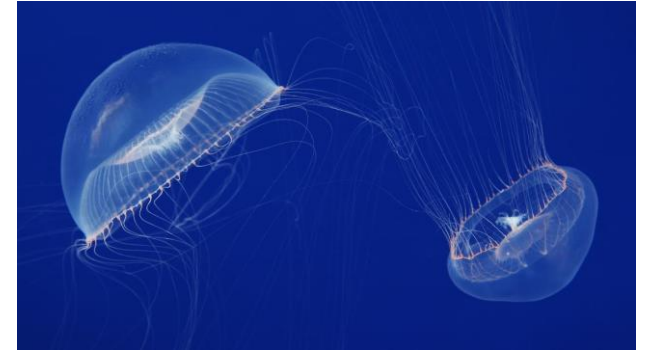
Az ideális fluorofór:

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

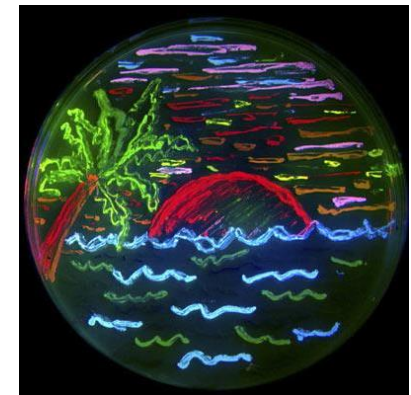
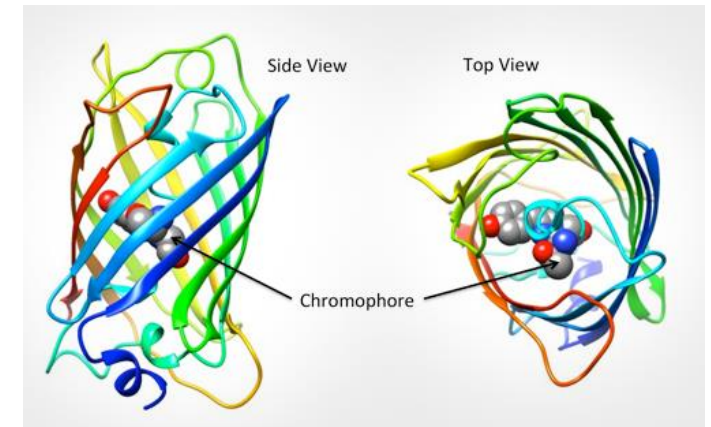


Fluoreszcens fehérjék

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

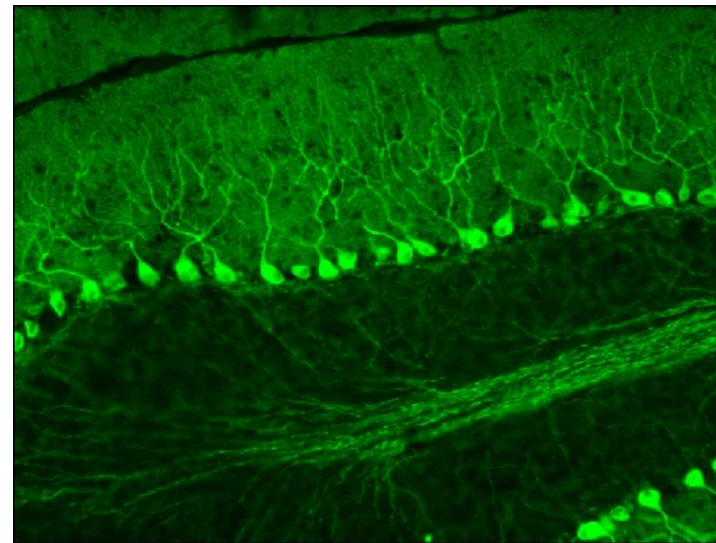


Aequorea victoria

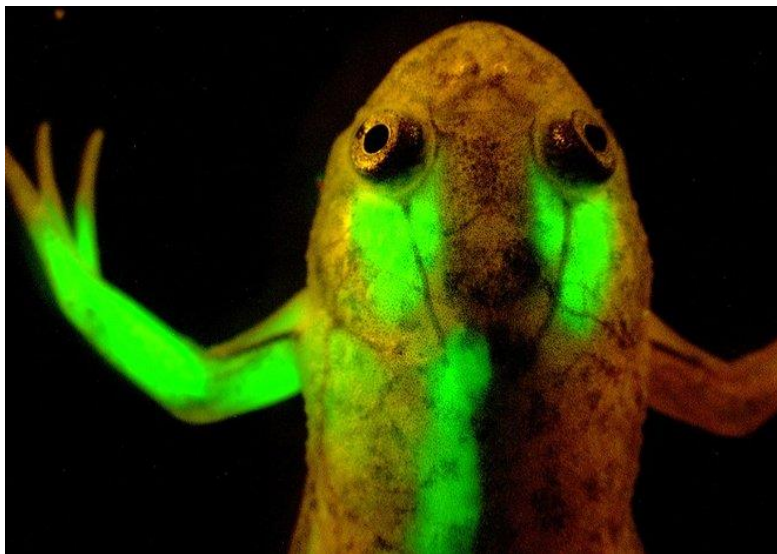




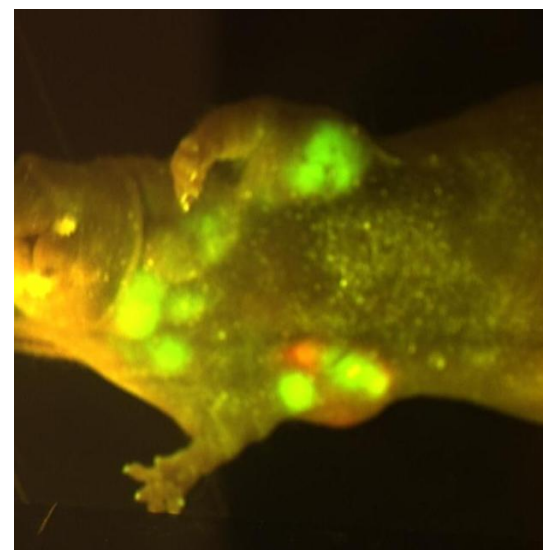
Transzgén egerek



Egér Purkinje sejtek



Béka izom sejtek GFP jelölése



Tumor sejtek követése

2008. Kémiai Nobel-díj

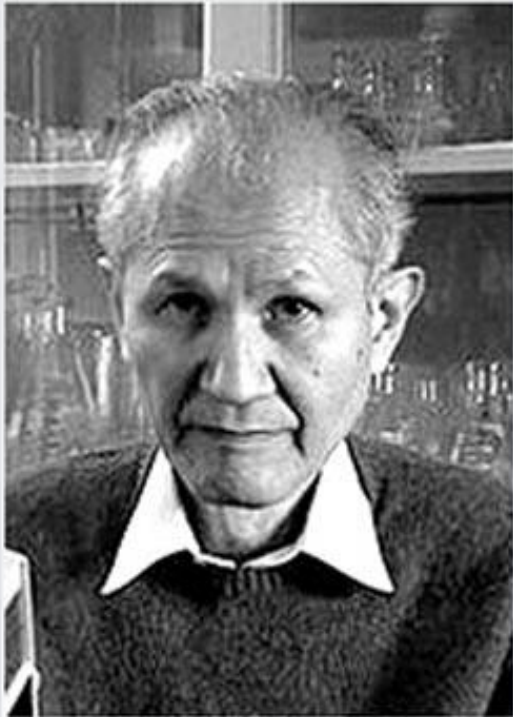


Photo: J.
Henriksson/SCANPIX

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

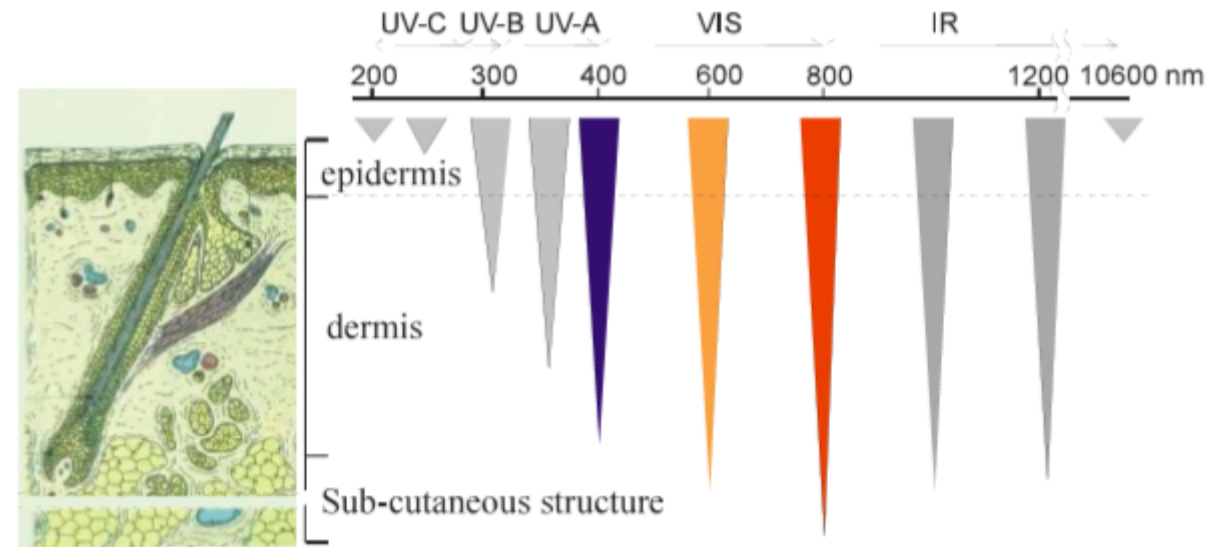
Rövid impulzusidő lehetséges – *ps, fs*

Nagy teljesítmény érhető el– *kW - GW*

Nagy teljesítménysűrűség lehetséges



Fény behatolási mélysége a bőrbe



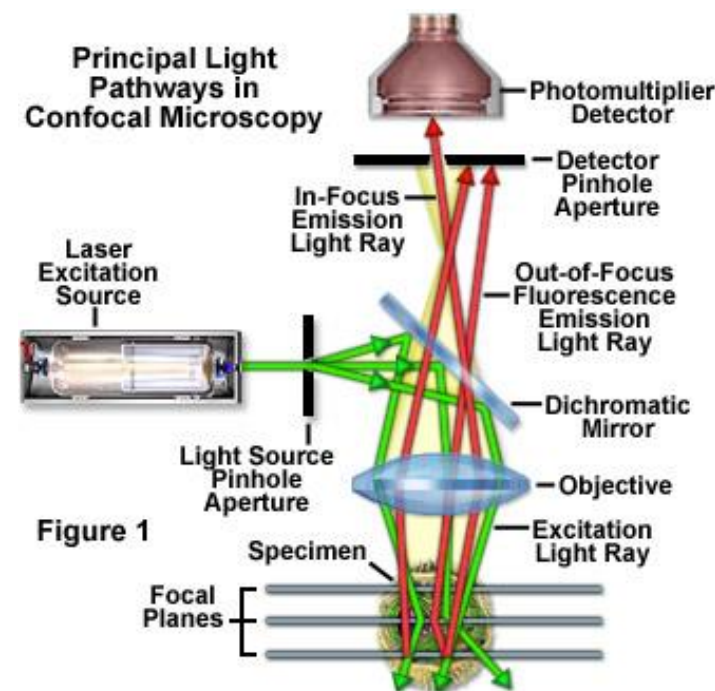
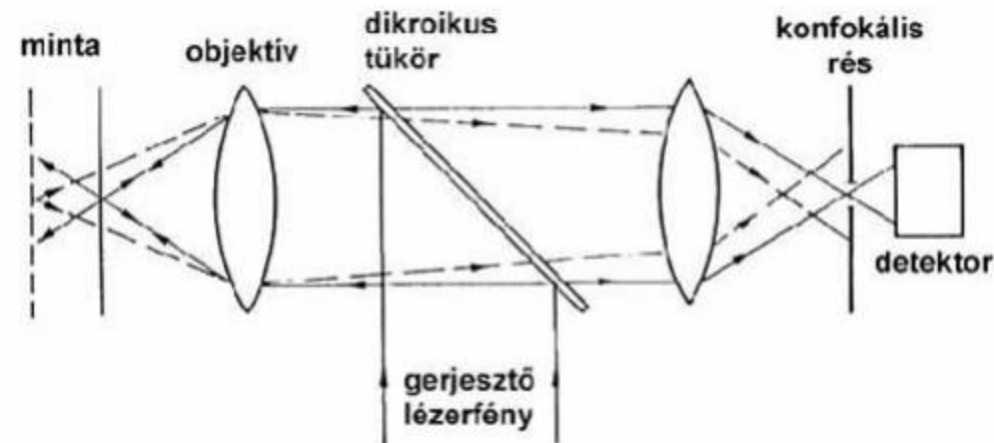
A fény intenzitás gyengülése elnyelődés, fénytörés és visszaverődéssel egyaránt megvalósul.

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

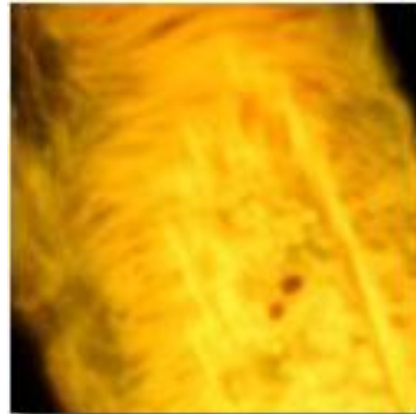
- lézer fényforrás
- fényútba helyezett szűrőkkel a hullámhossz kiválasztható
- minta pásztázása pontról pontra
- XY irányban – pásztázó tükrök
- számítógépes vezérlés
- „optikai szeletelés” – 3D képalkotás



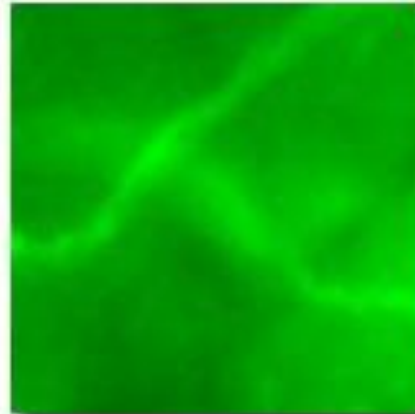
Fluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása

fluoreszcens

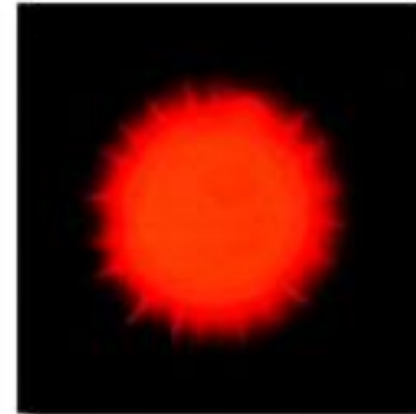
Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy



(a)

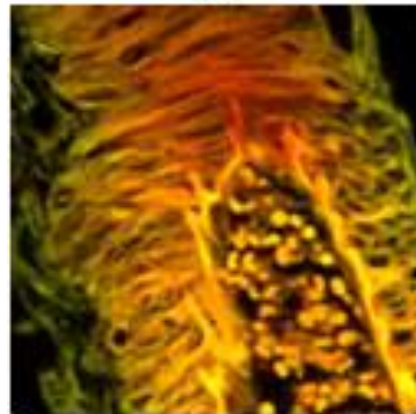


(b)

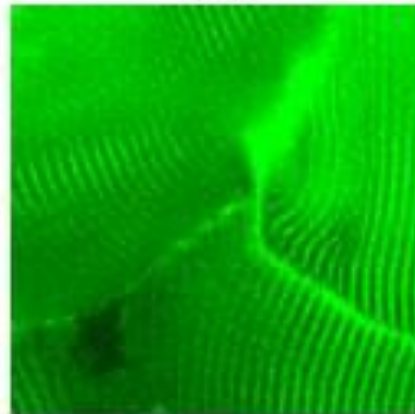


(c)

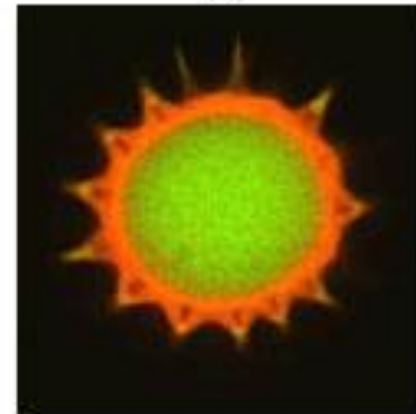
konfokális



(d)



(e)



(f)

Figure 1

humán medulla

nyúl izom

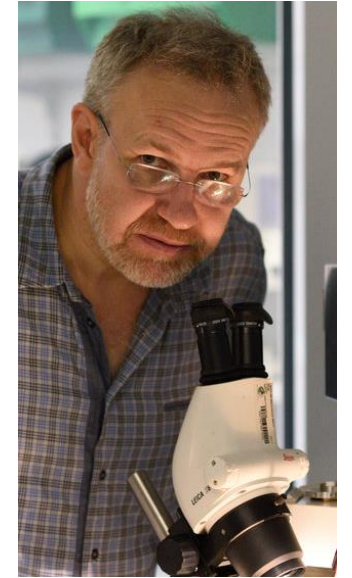
pollen

Kétfoton mikroszkópia

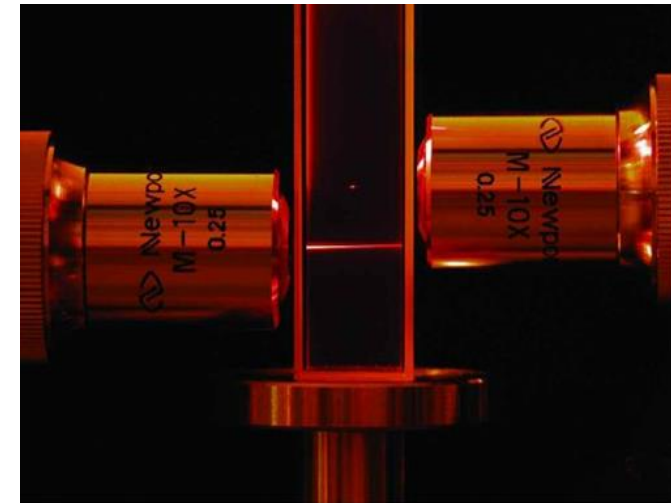
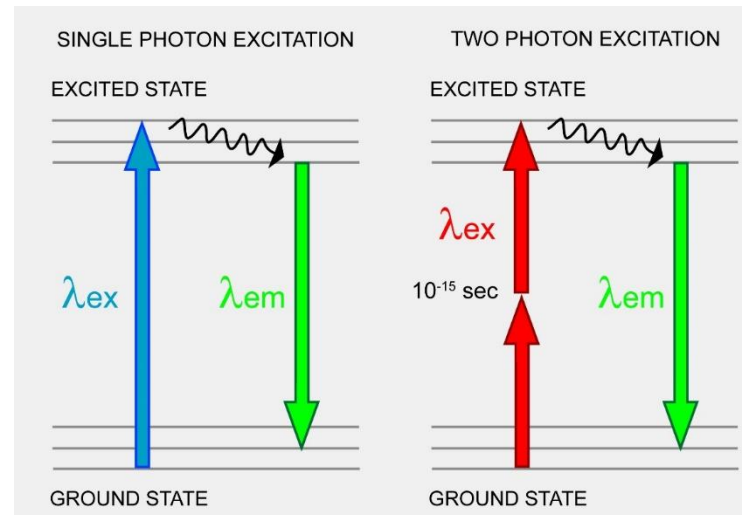
- 1931. Maria Göppert-Mayer
- a gerjesztendő molekulába egyszerre két foton abszorbeálódik, és energiájuk összeadódik
- nagy intenzitású lézer fényforrás ~ megfelelő fotonsűrűség
- 1990. Első kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp
- Wiefried Denk, Cornell University



Maria Göppert-Mayer (1906-1972)

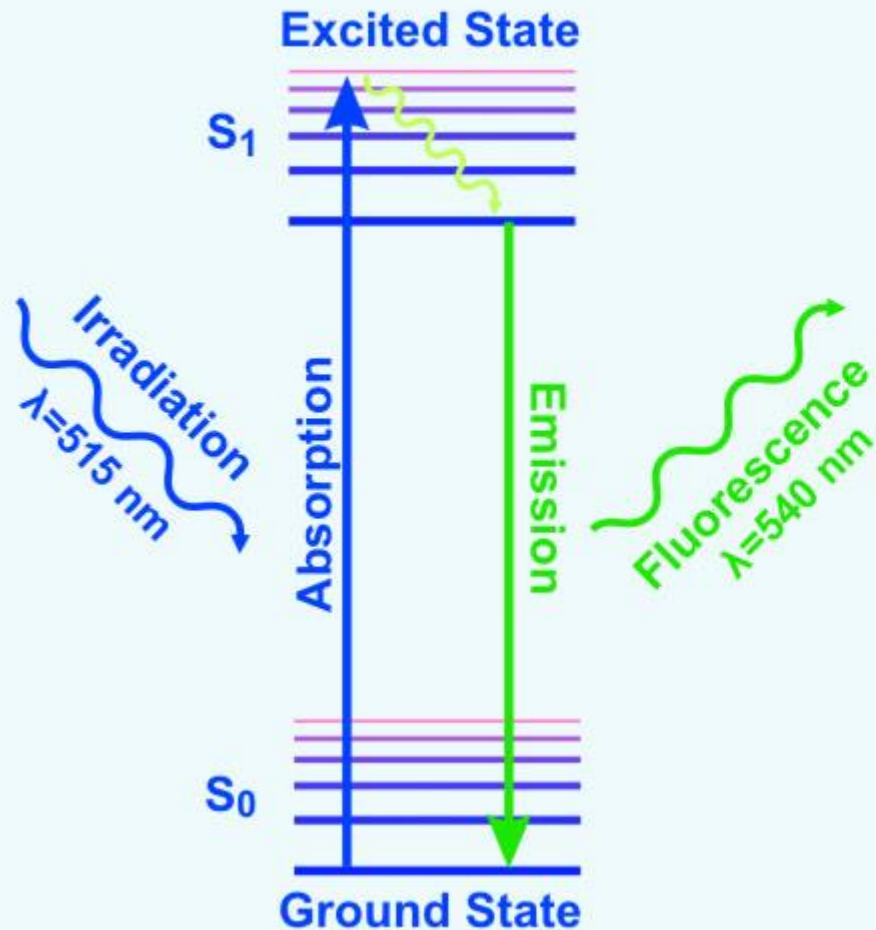


Wiefried Denk (1957-)

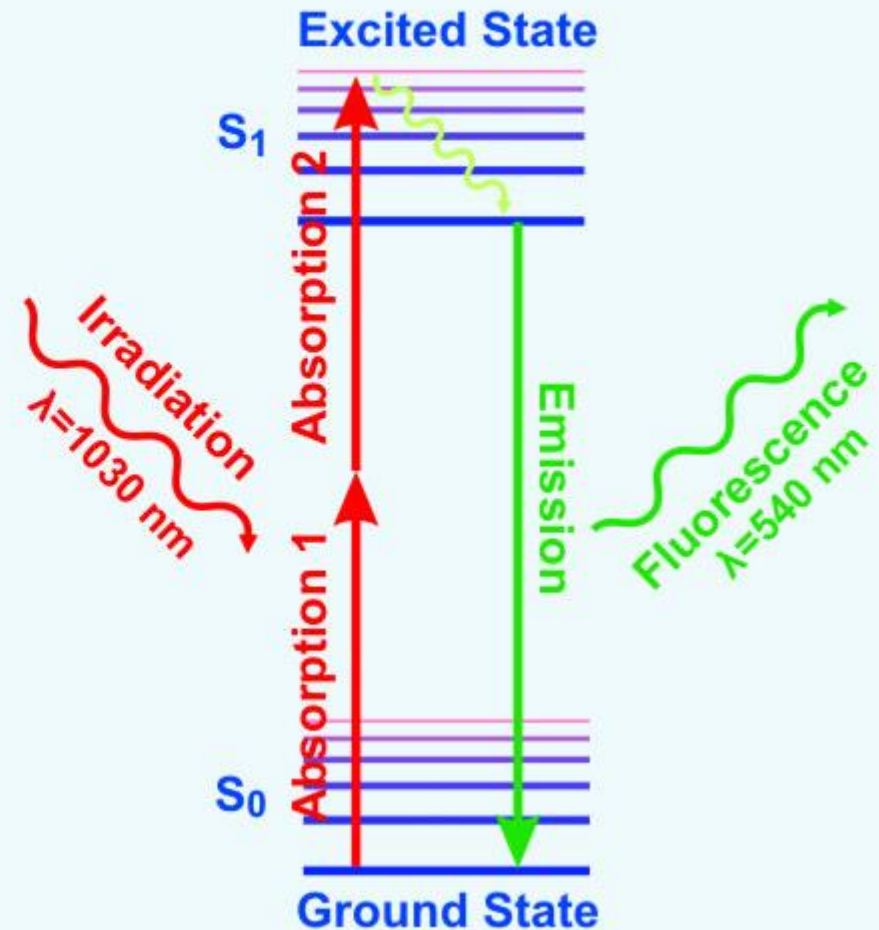


Fény abszorpció és emissziós spektrum

One photon excitation

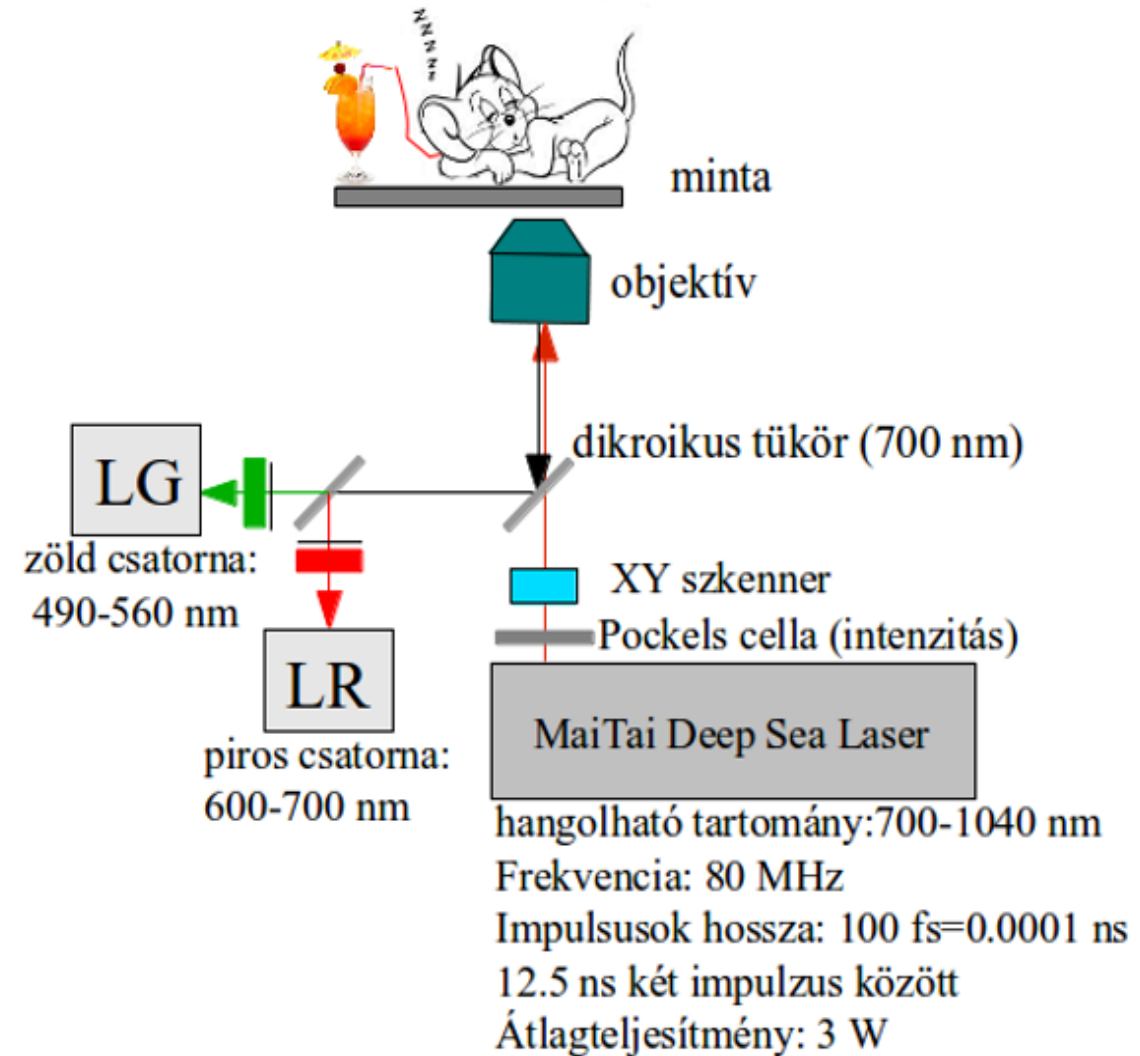


Two photon excitation

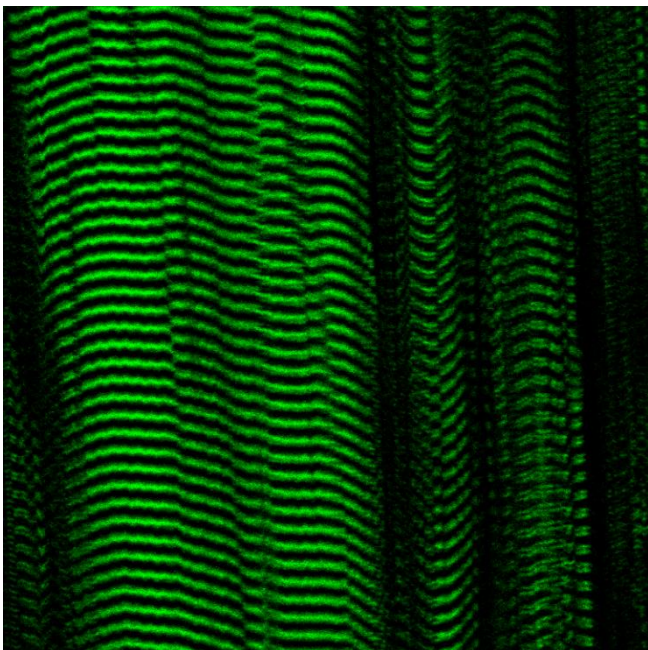


Előnyök

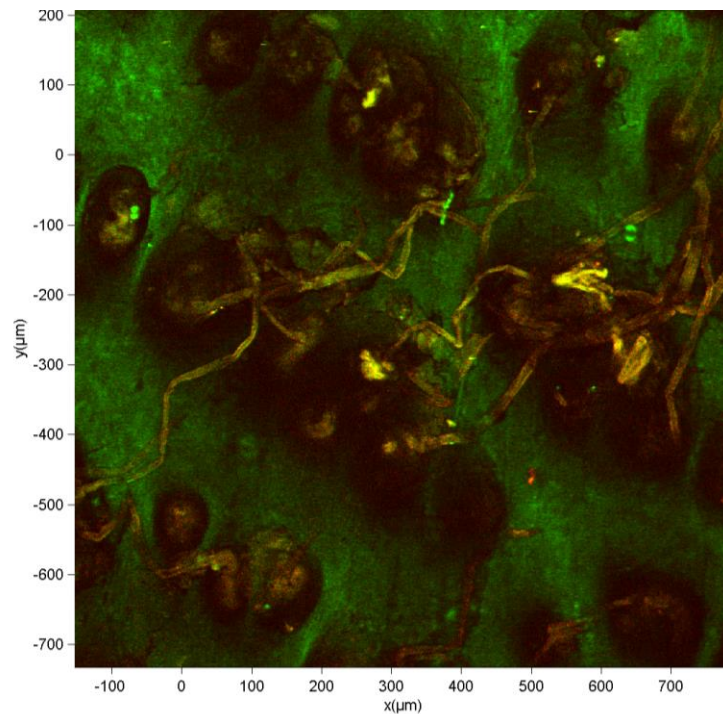
- Csak a fókuszfoltban gerjeszt – nincs kétfoton elnyelődés a fókuszon kívül
- A lézer mintára eső teljesítménye néhány mW – *in vivo* képalkotás
- Infravörös tartományban (700-1300 nm) hangolt fényforrás – kevésbé szóródik
- Mélyebb penetráció
- Több festék gerjeszthető egyszerre
- Az összes fluoreszcencia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



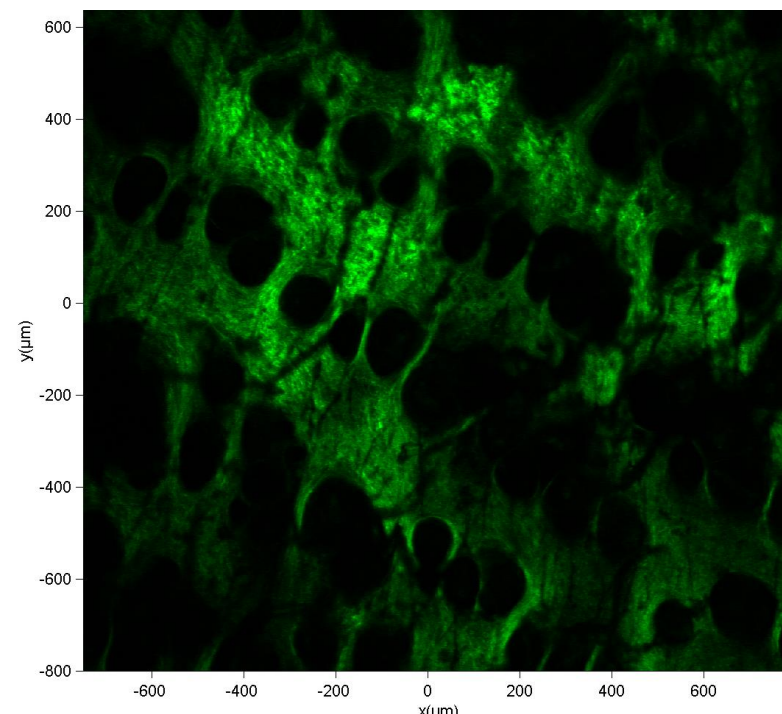
Jelölés nélküli képalkotás



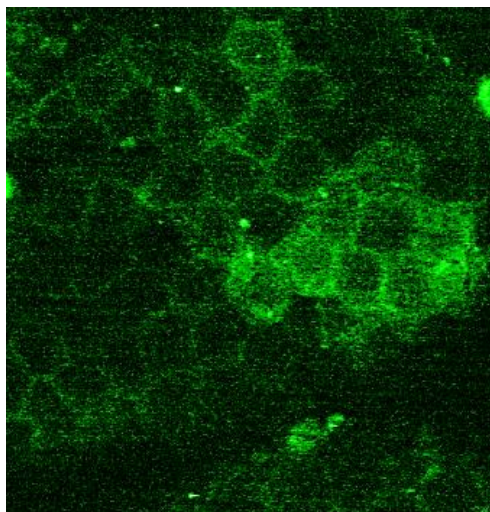
izom miozin



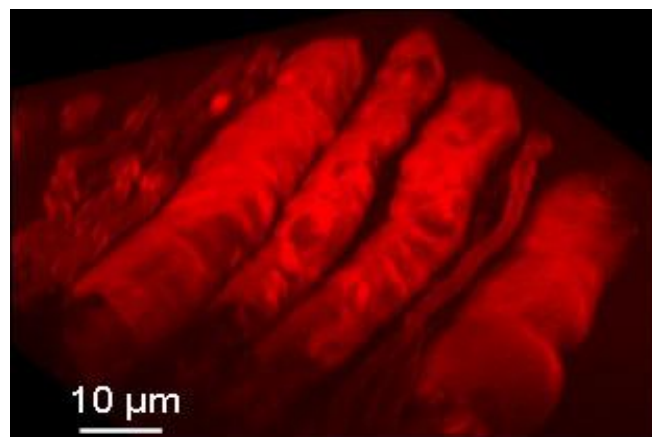
egér epidermis



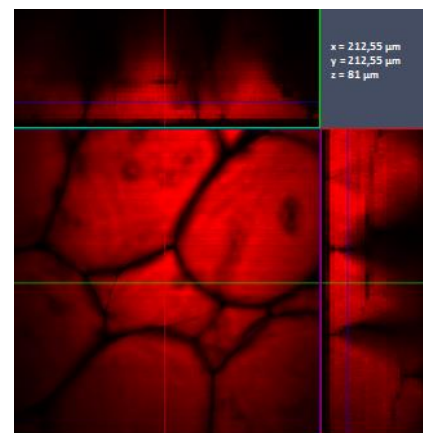
egér dermis kollagén



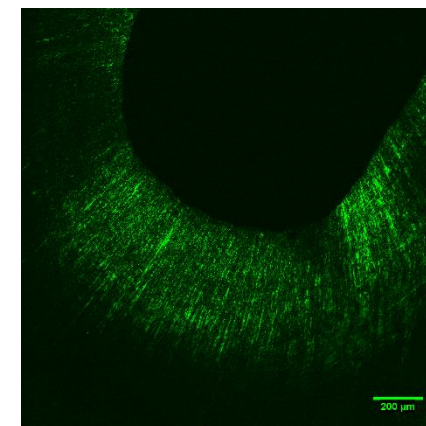
keratin



mielinhüvely



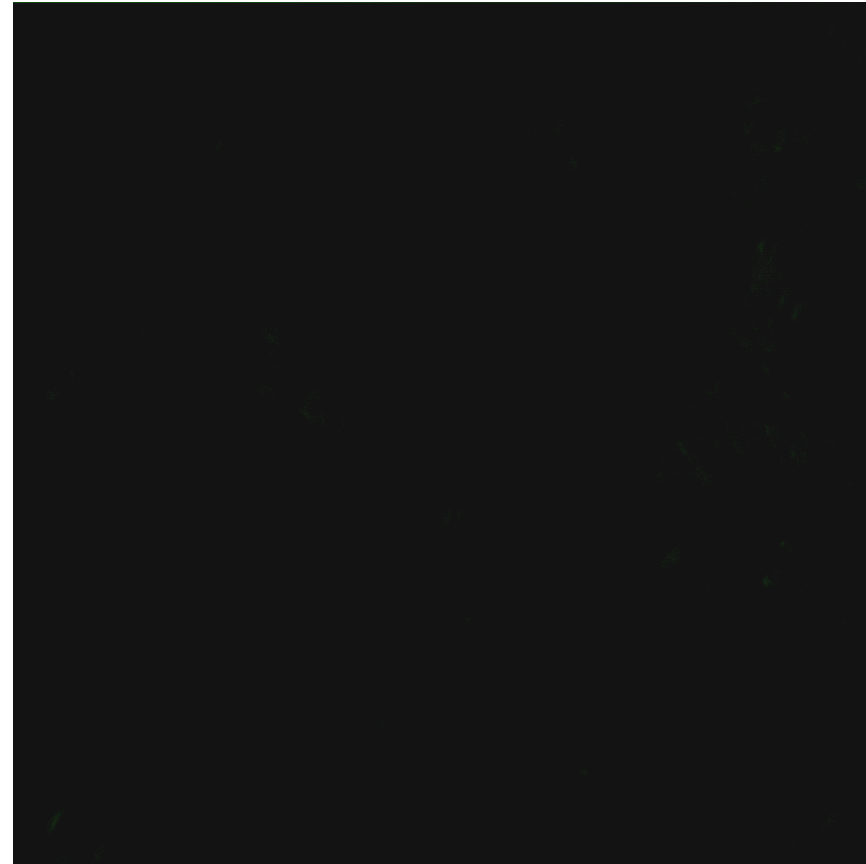
adipociták



dentincsatornák

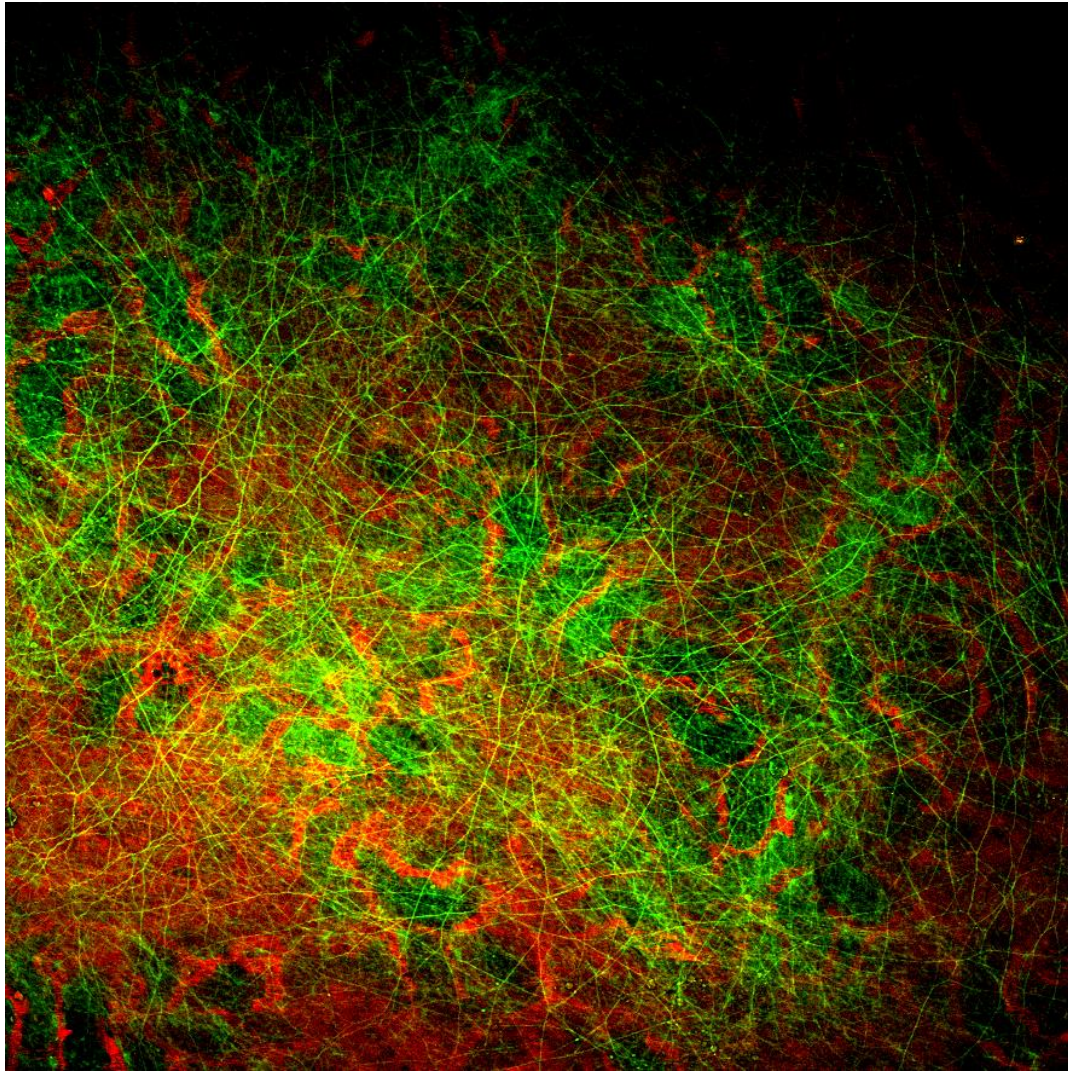
3D képalkotás

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

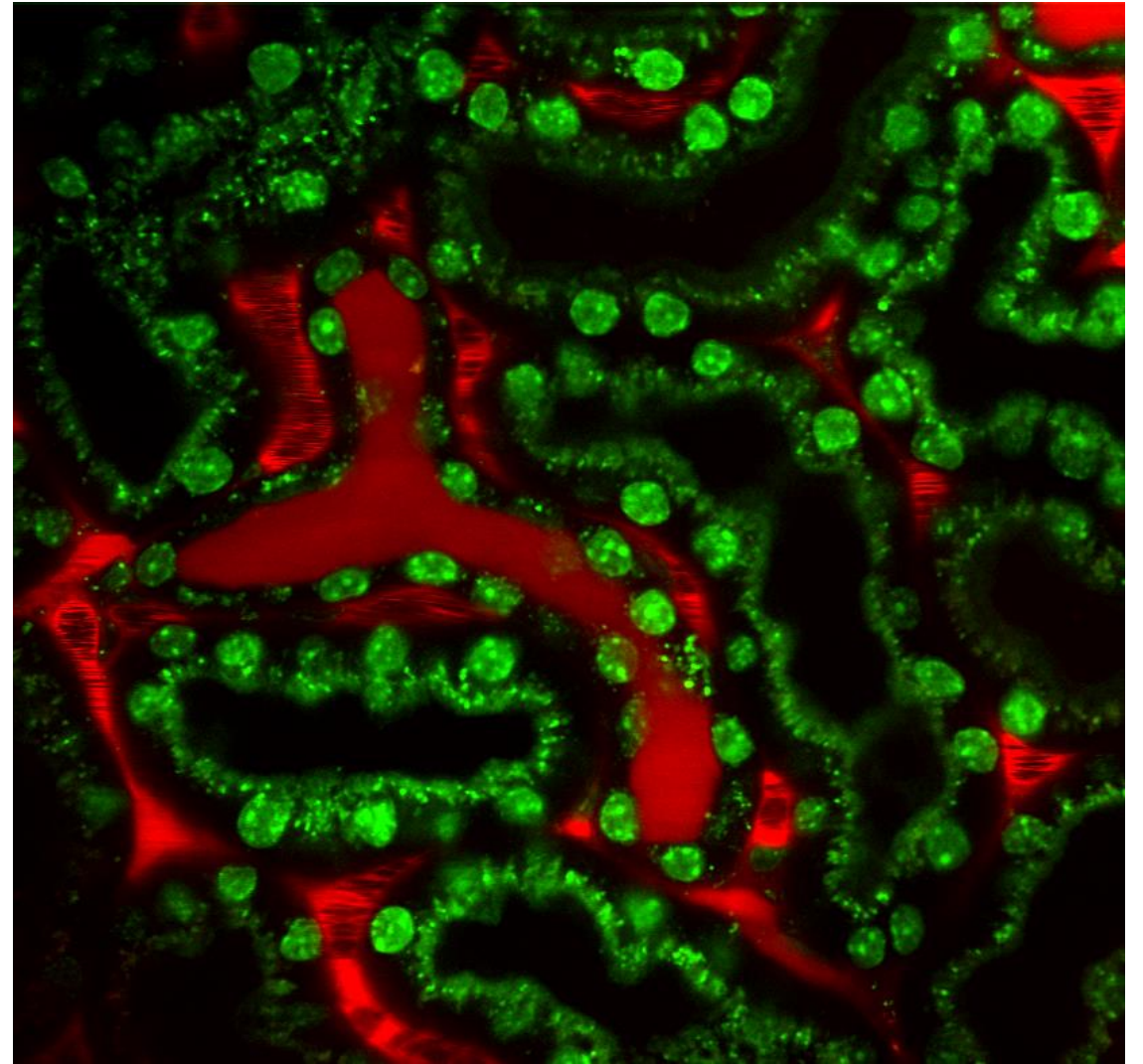


200 μm x 200 μm
exc: 990 nm

Többszörös fluoreszcens jelölés

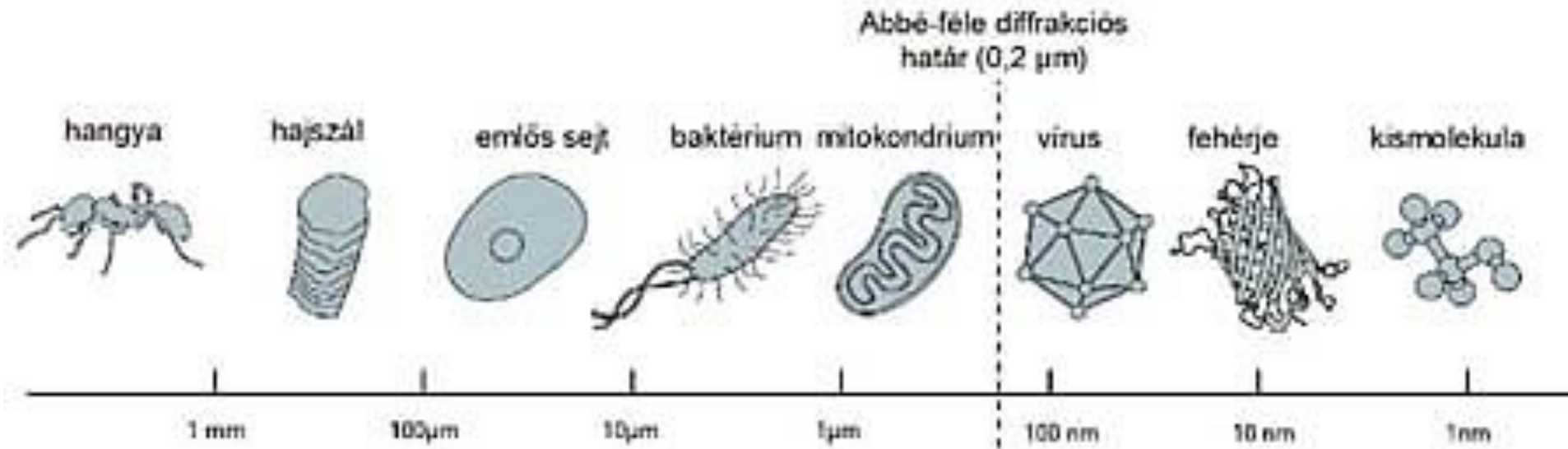


vese kéregállomány

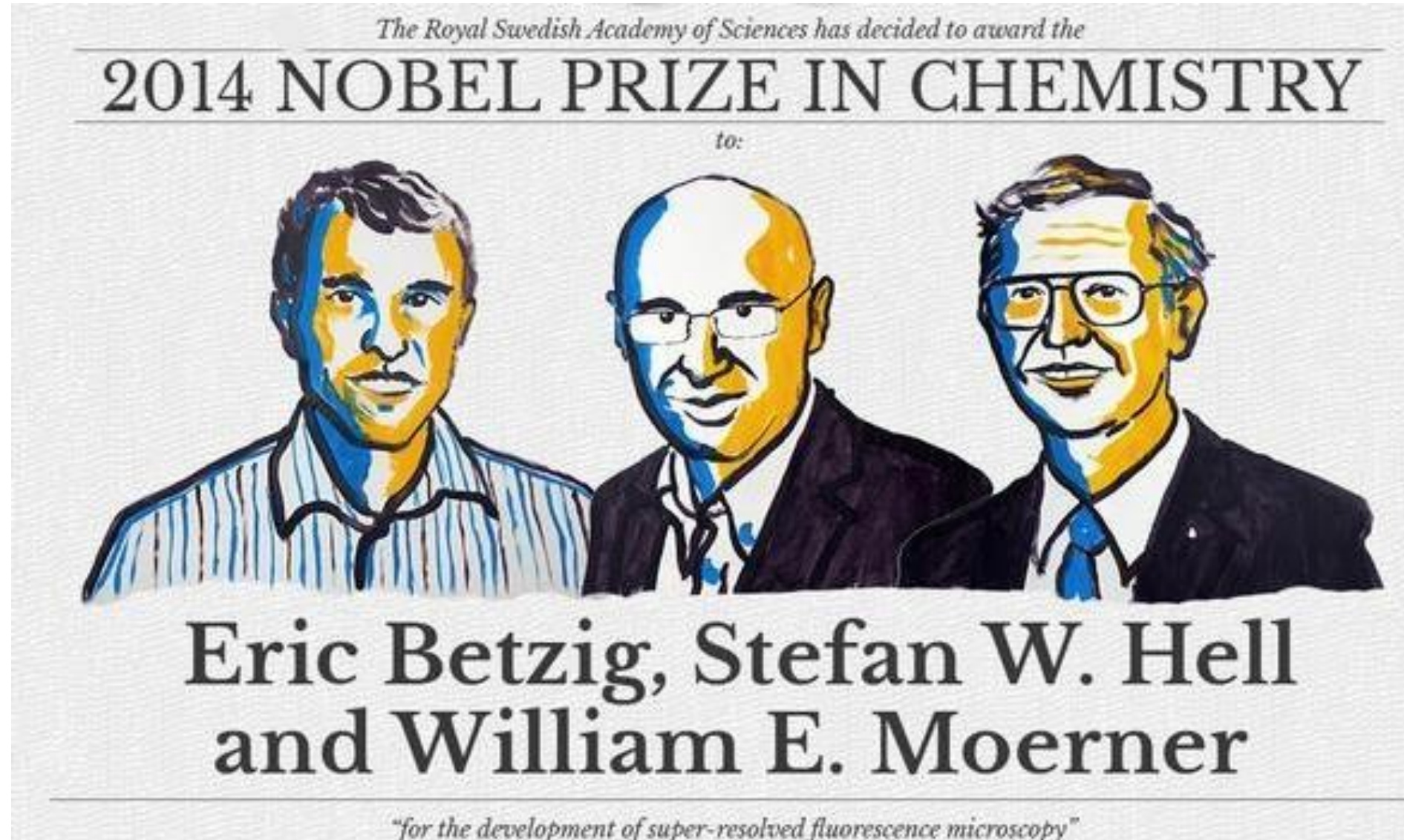


gyűjtőcsatorna és JGA sejtek

Mekkora a dolgok?

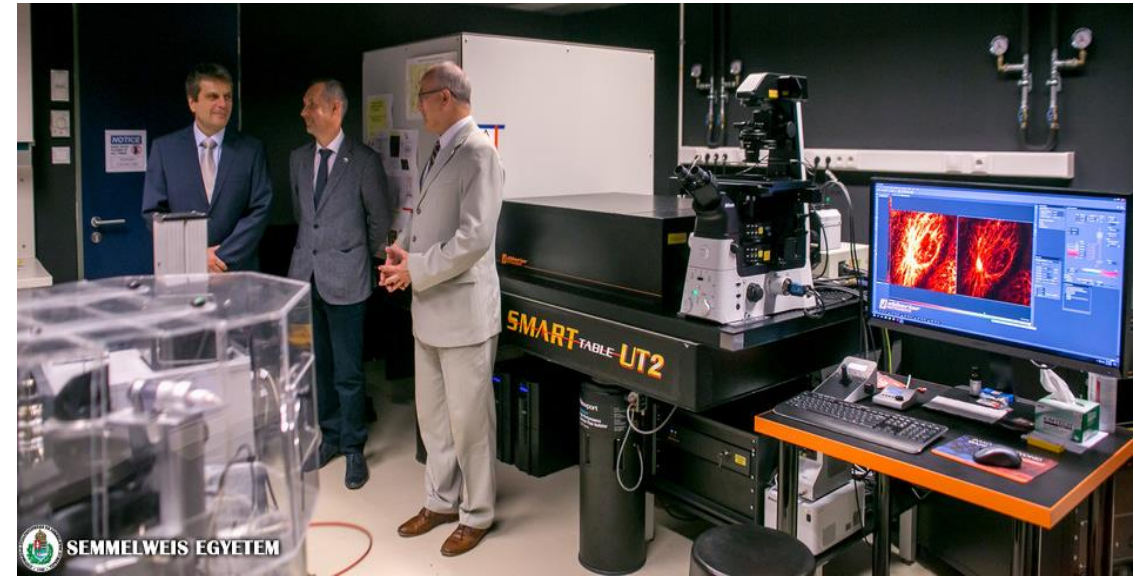


Szuperrezolúciós mikroszkópia

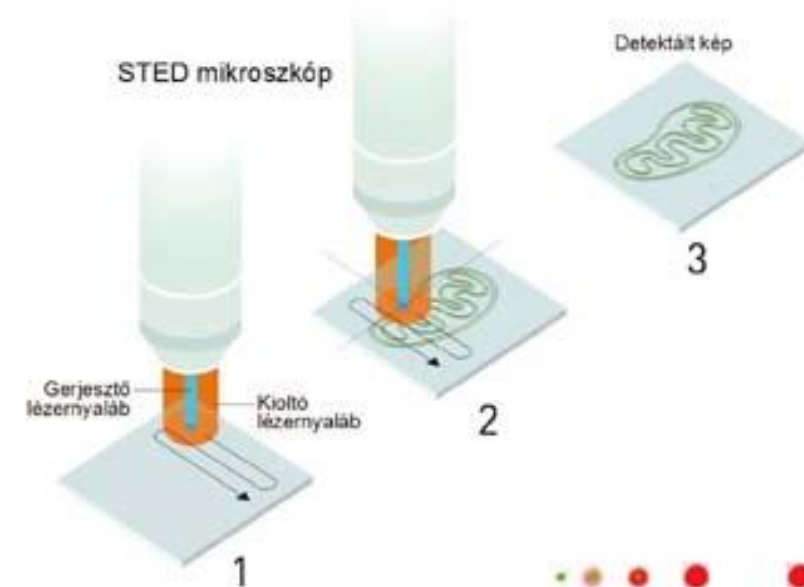
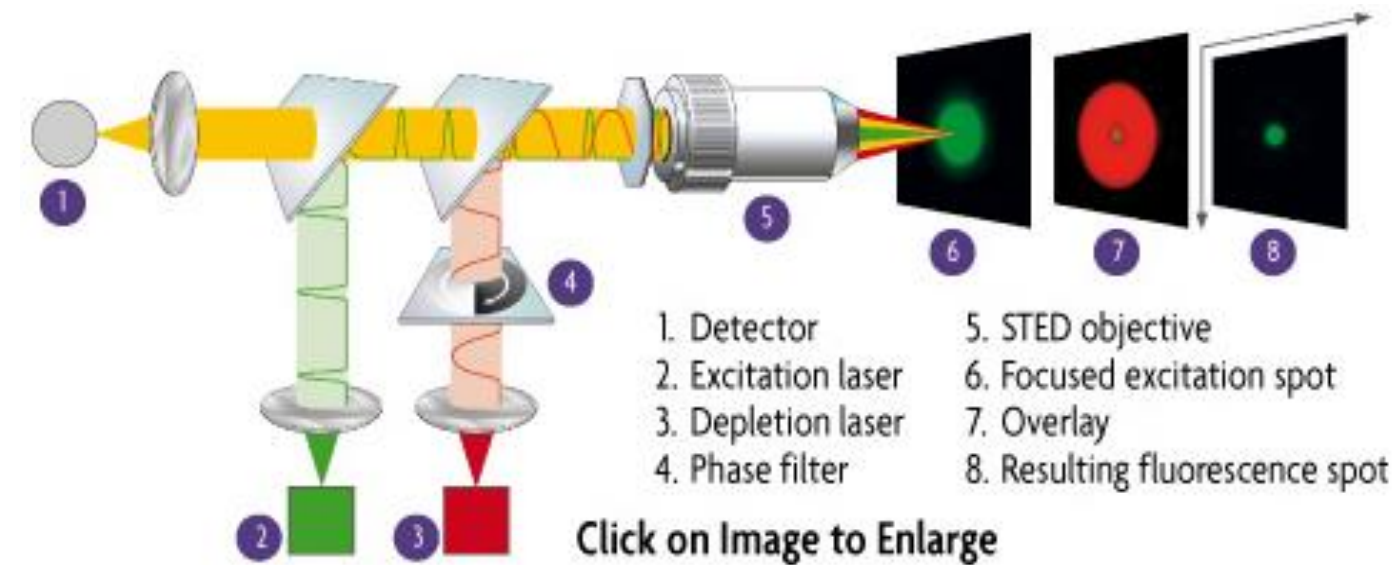
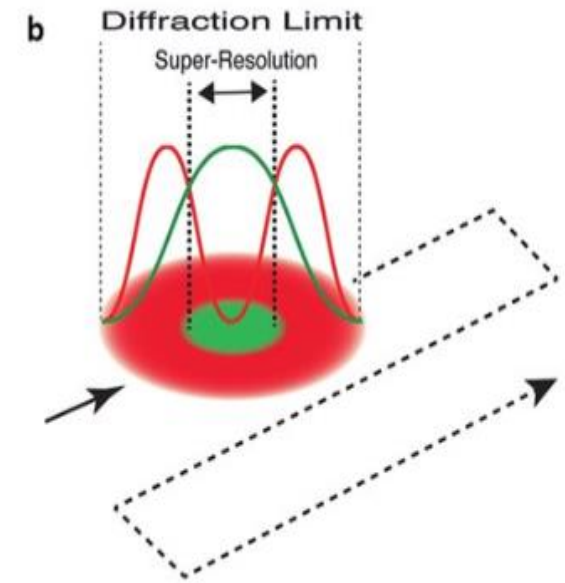


Szuperrezolúciós mikroszkópia

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

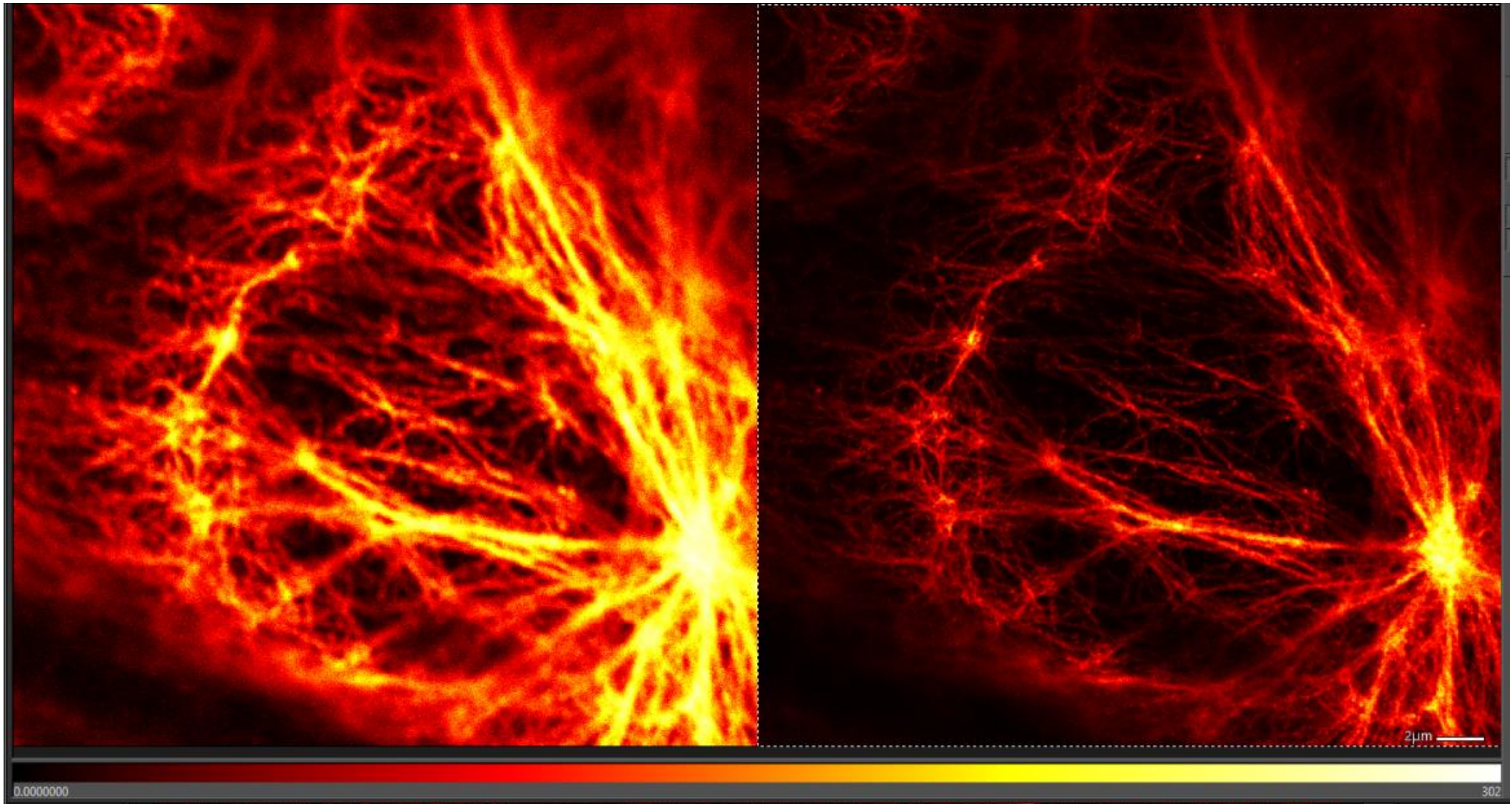


- gerjesztő fénynyalábra azzal koncentrikus, gyűrű alakú kioltó fénynyalábot vetítünk
- STED (stimulated emission depletion microscopy)
- a leképezés pásztázó lézernyalábbal történik pontról pontra

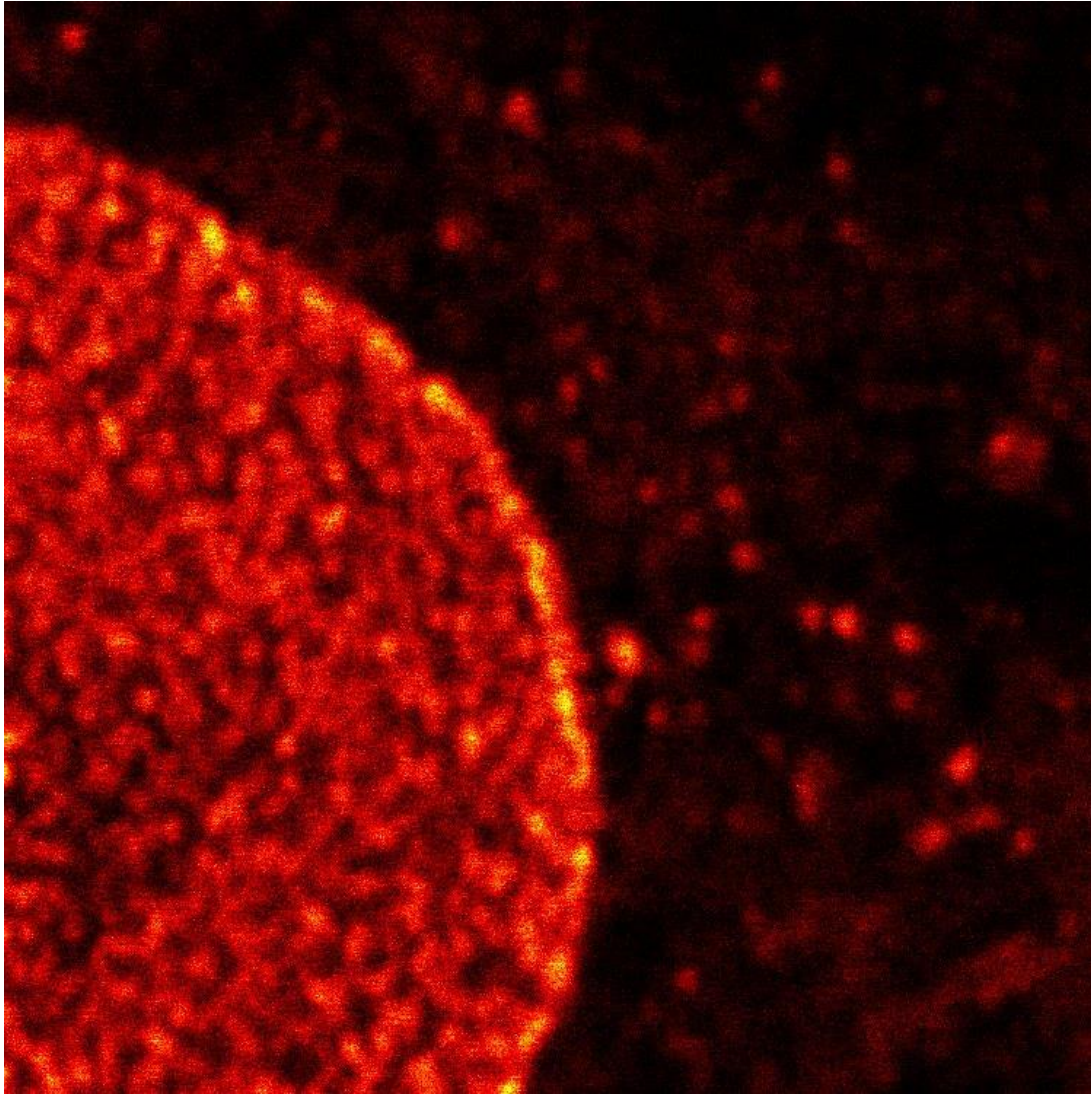


konfokális

STED



konfokális



STED

