

Neue Methoden in der Mikroskopie.

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



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

03. November 2020.

Überblick

a) Spezielle Lichtmikroskope:

- Stereomikroskop,
- Polarisationsmikroskop,
- Phasenkontrastmikroskop,
- Fluoreszenzmikroskop,
- CLSM: Konfokales Laser Rastermikroskop (Confocal Laser Scanning Microscopy).

b) Superresolutionsmikroskope:

- SIM: Structured Illumination Microscopy,
- STED: Stimulierte Emission Depletion.

c) Elektronenmikroskope:

- TEM: Transmissionselektronenmikroskopie,
- SEM: Rasterelektronenmikroskopie.

d) Rastersondenmikroskope:

- AFM: Rasterkraftmikroskop.

2

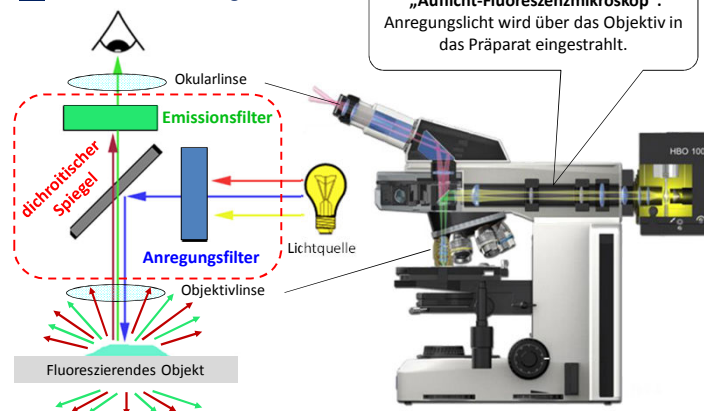
Spezielle Lichtmikroskope

3

Fluoreszenzmikroskop 1.

Lehrbuch: S. 388-389.

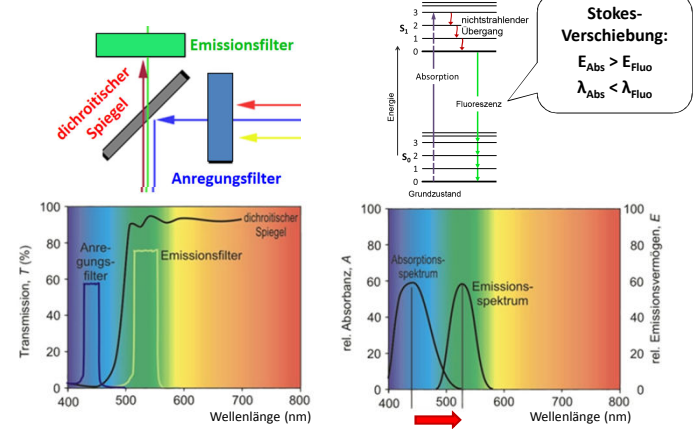
Epifluoreszenz-Anordnung:



4

Fluoreszenzmikroskop 2.

Physikalische Grundlagen:



5

Fluoreszenzmikroskop 3.

Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

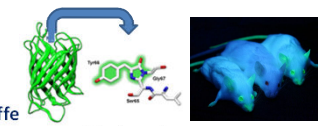
Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

Der ideale Fluorophor:

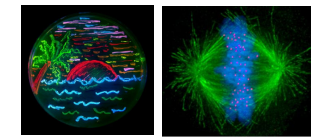
- klein
- hydrophil
- emittiert im sichtbaren Lichtbereich
- große Stokes-Verschiebung
- spezifische Bindung
- verursacht keine photochemischen Reaktionen

fluoreszierende Proteine:

- GFP: Green Fluorescent Protein
- FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

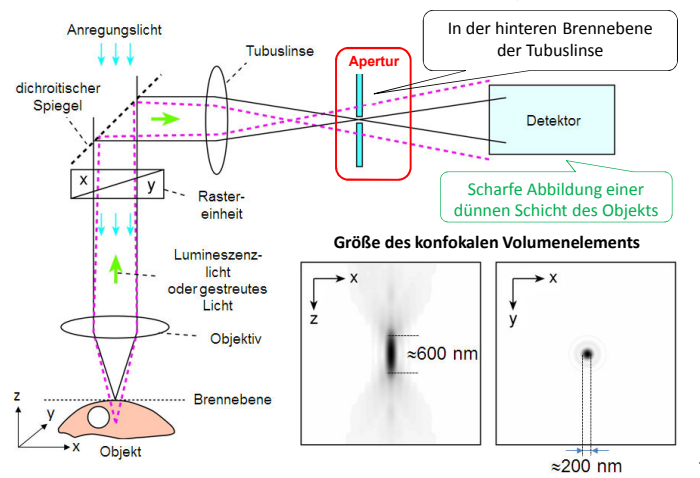


Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren

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

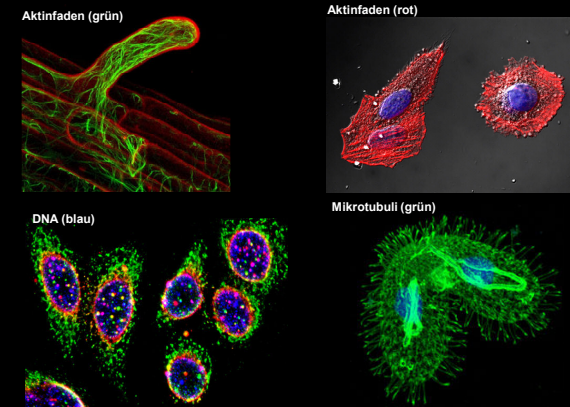
6

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)

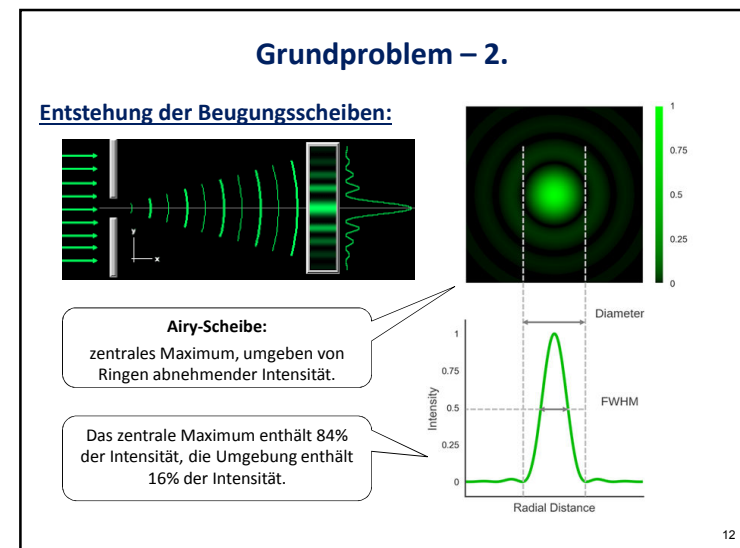
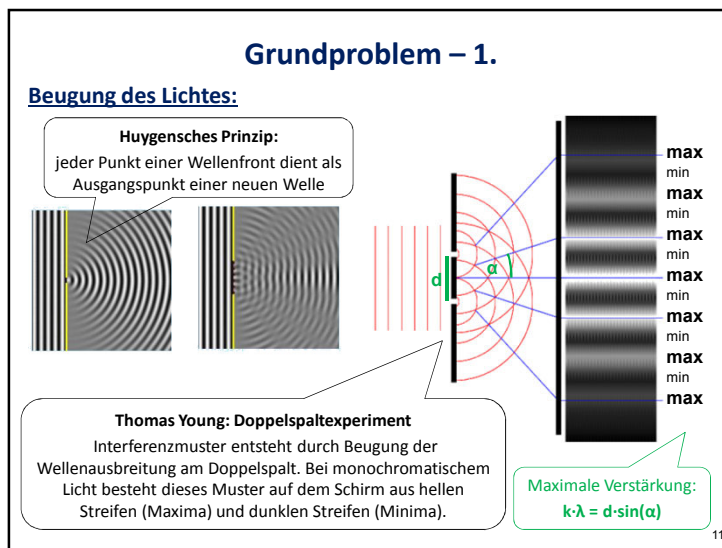
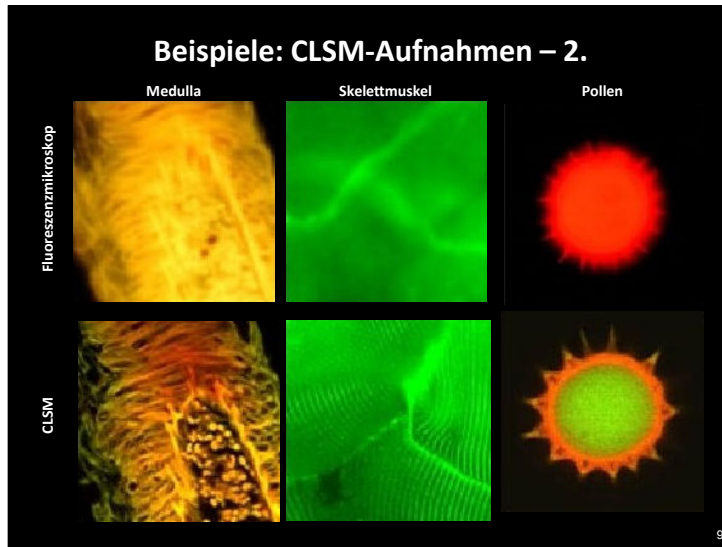


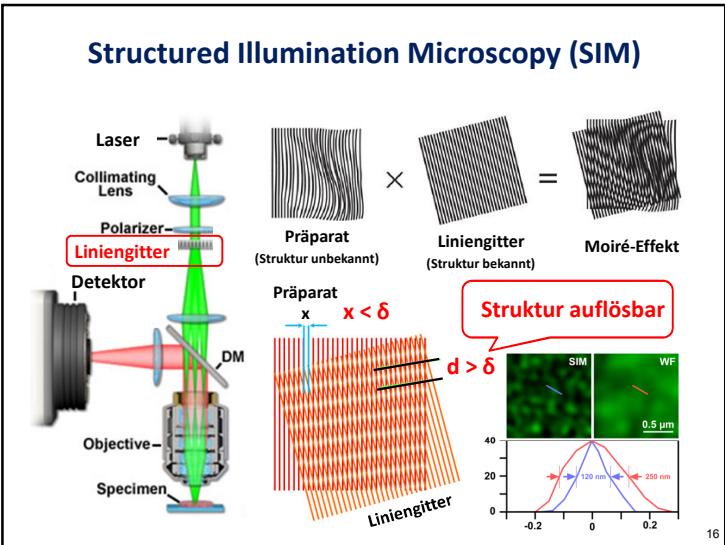
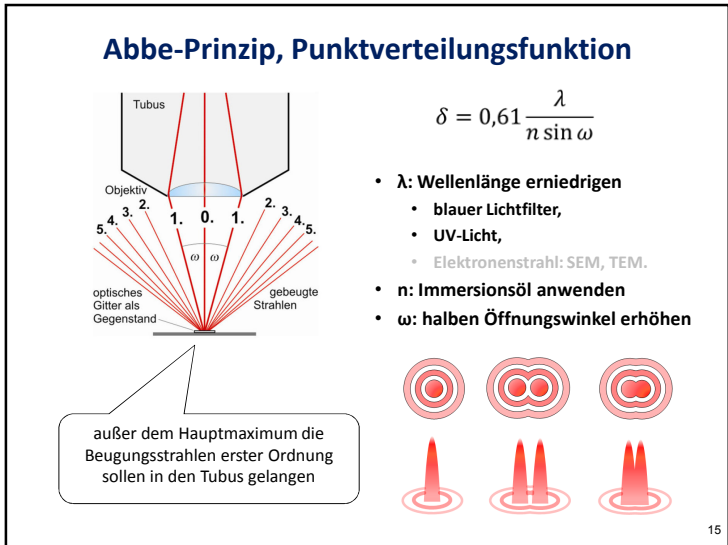
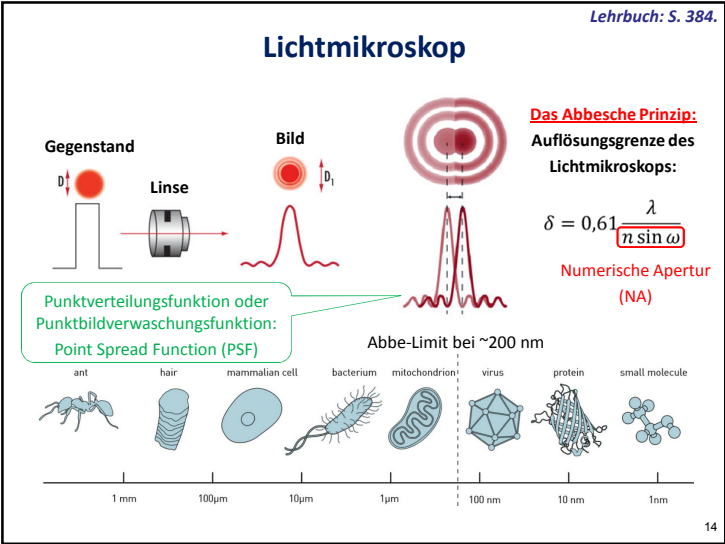
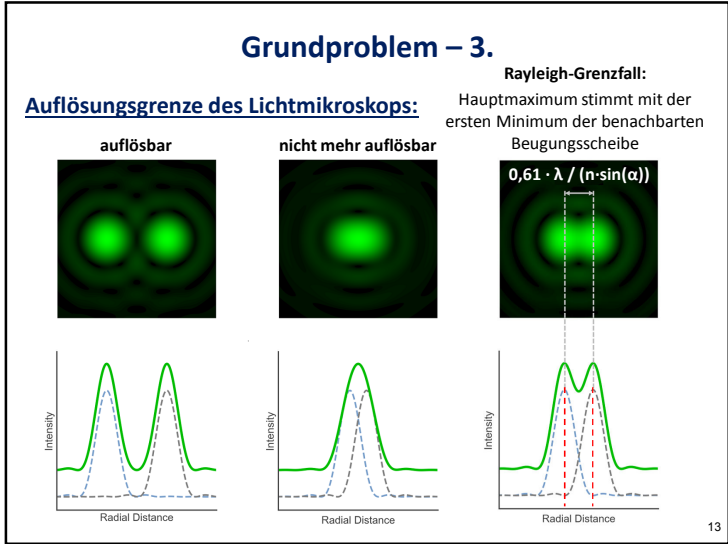
7

Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 1.



8

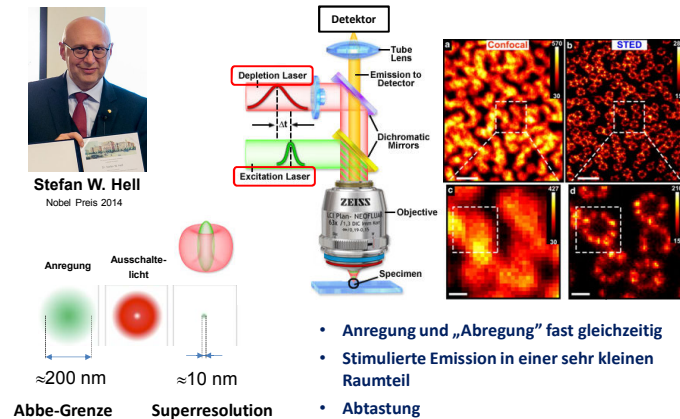




Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)

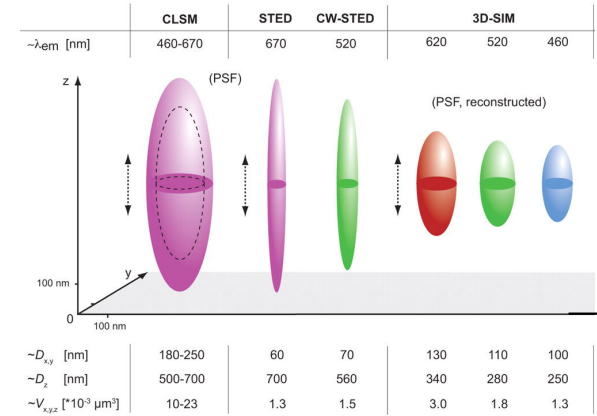


Stefan W. Hell
Nobel Preis 2014



17

3D-Auflösung der Spezialmikroskope



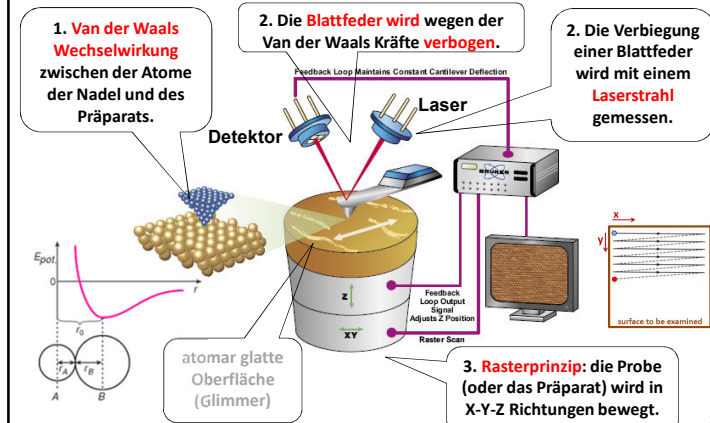
18

Rastersondenmikroskopie

19

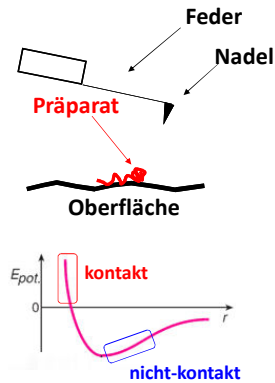
Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

Lehrbuch: S. 579.



20

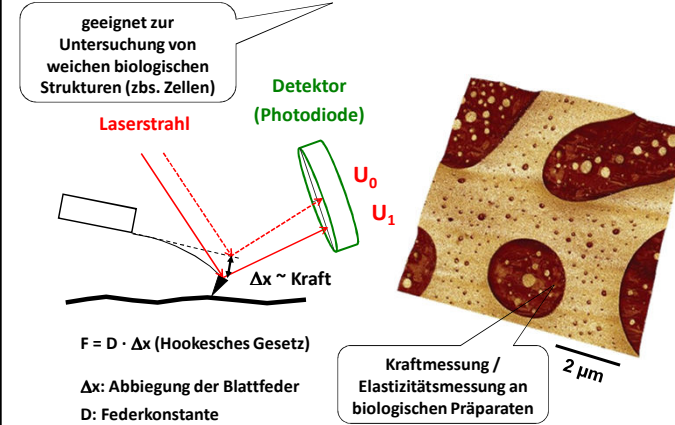
AFM Betriebsarten



- **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.

21

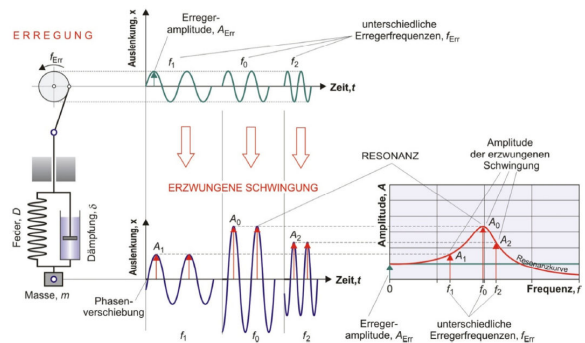
AFM: Kontakt-Modus



22

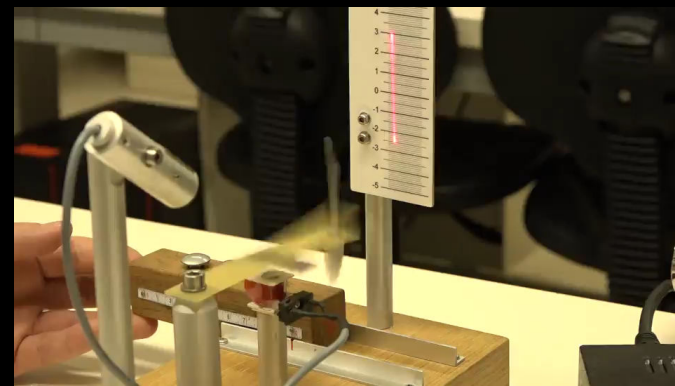
AFM: Nicht-Kontakt-Modus

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.



23

AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus



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

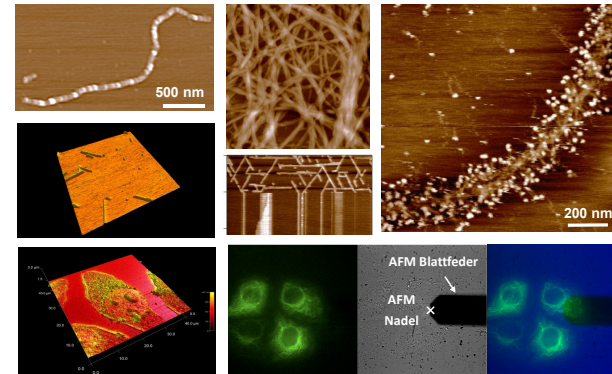
24

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.).

29

AFM-Bilder aus unserem Institut



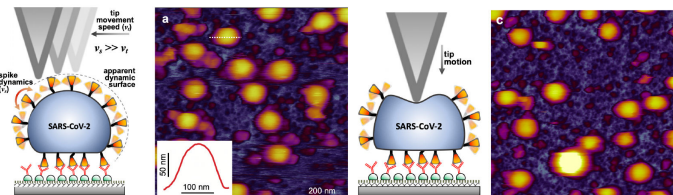
30

Natives SARS-CoV-2 Virus abgebildet mit AFM

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

Bálint Kiss¹*, Zoltán Kis^{2,3*}, Bernadett Pályi², Miklós S.Z. Kellermayer^{1*}

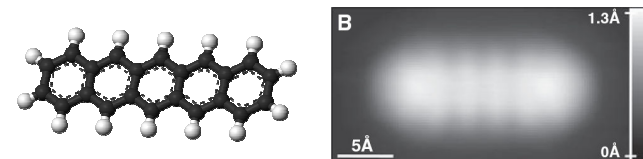
bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.17.302380>



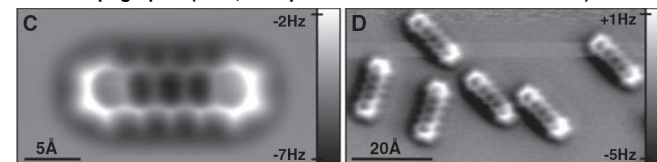
31

Pentacen Molekül

Tunnelstromstärke durch die Nadel (STM)



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



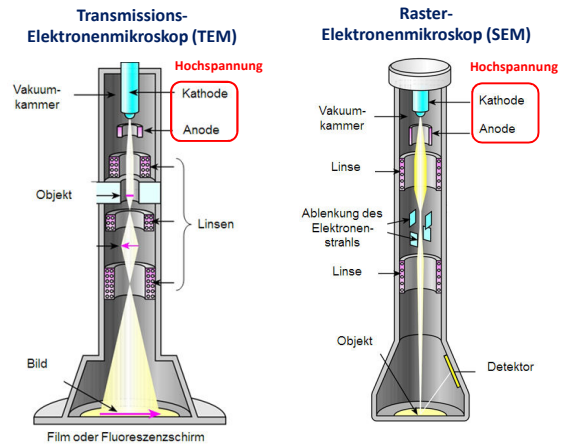
Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)

32

Elektronenmikroskopie

33

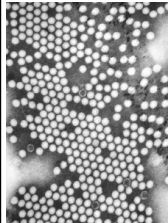
Elektronenmikroskope



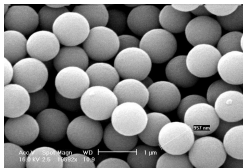
34

Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugeln (SEM)



Auflösungsgrenze (δ):

$$\delta \approx \frac{\lambda}{NA}$$

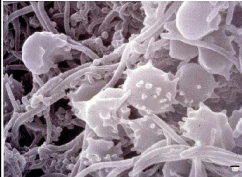
$$NA \approx 0,03$$

$$\lambda \approx 0,005 \text{ nm}$$

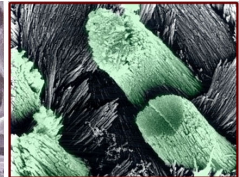
$$\delta \approx 0,2 \text{ nm}$$

s. Materiewellen! $\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



36