

Neue Methoden in der Mikroskopie.

Balázs Kiss

kissb3@gmail.com



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

26. Oktober 2021.

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.

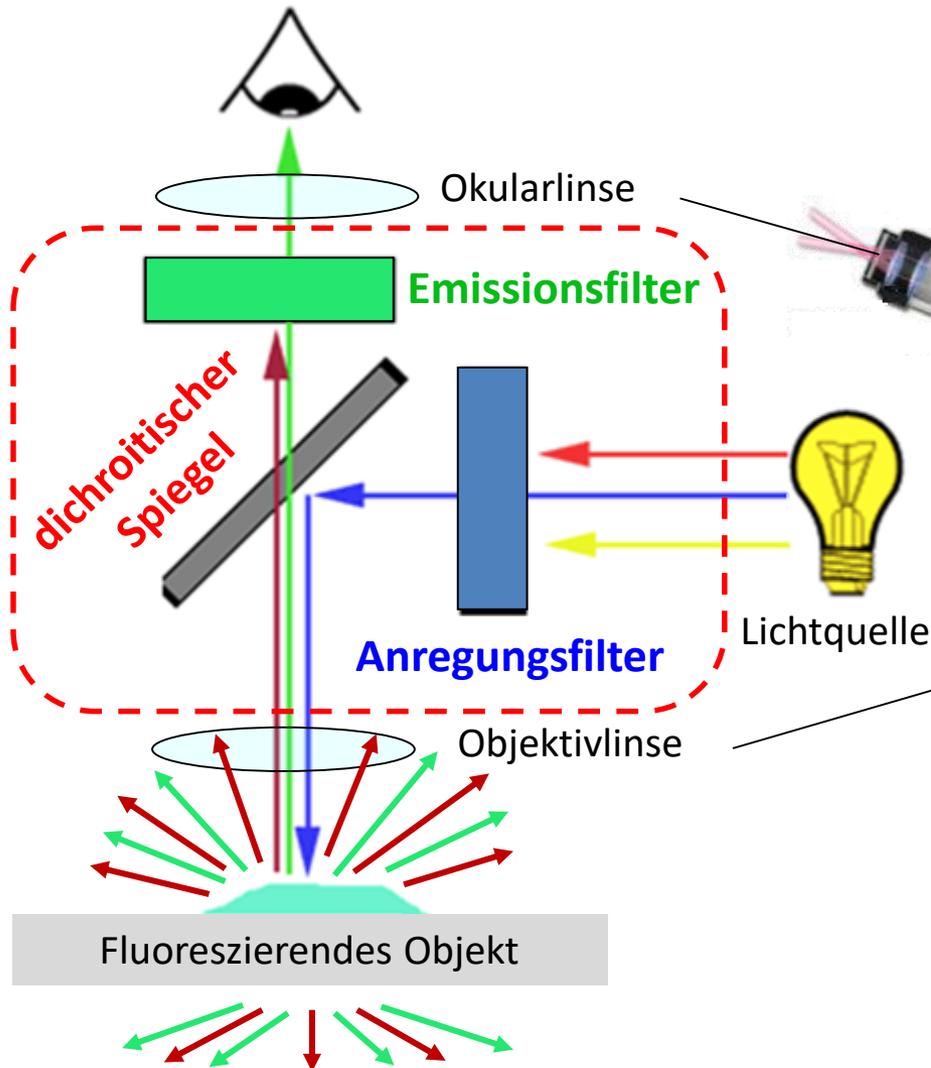
d) Rastersondenmikroskope:

- AFM: Rasterkraftmikroskop.

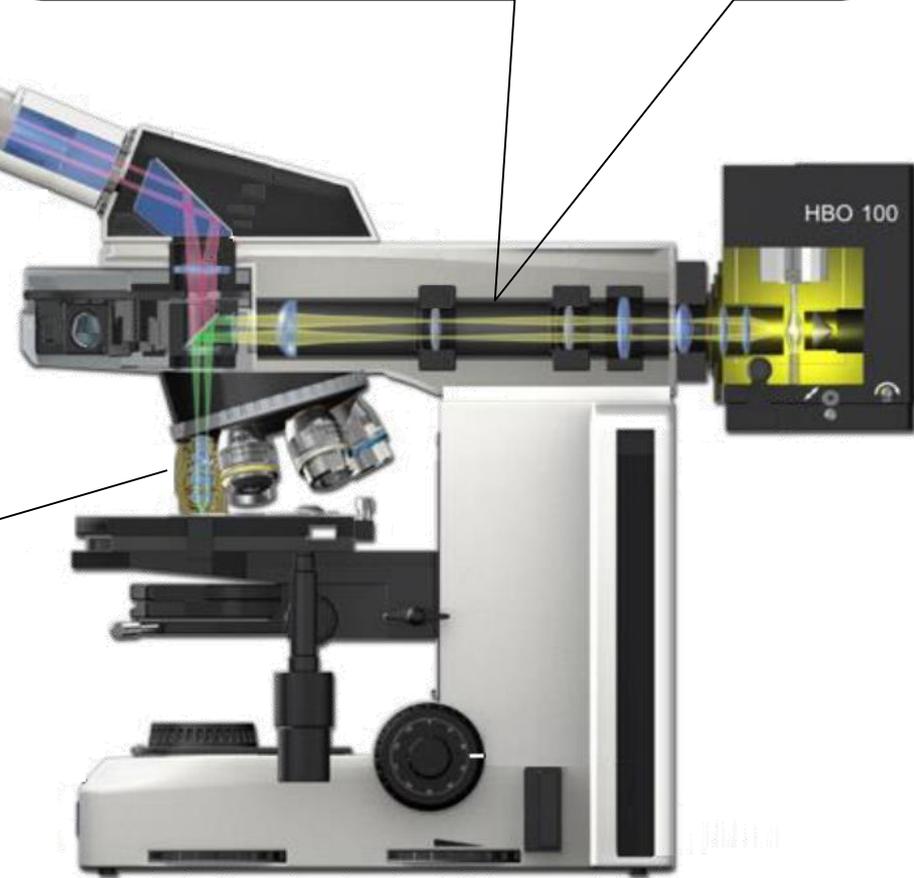
Spezielle Lichtmikroskope

Fluoreszenzmikroskop 1.

Epifluoreszenz-Anordnung:

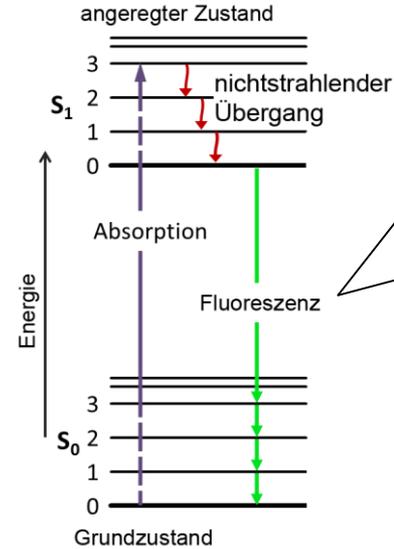
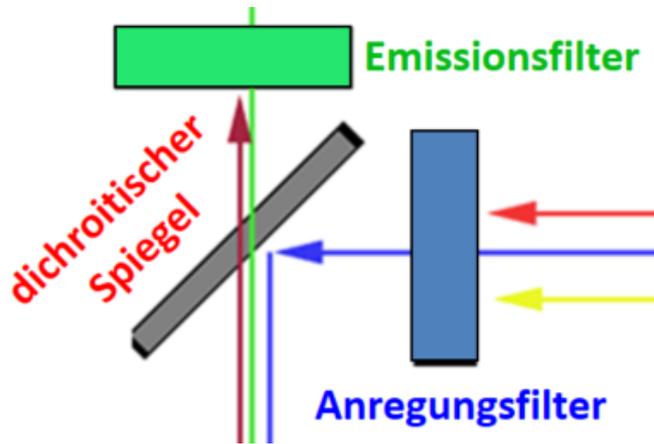


„Auflicht-Fluoreszenzmikroskop“:
Anregungslicht wird über das Objektiv in
das Präparat eingestrahlt.



Fluoreszenzmikroskop 2.

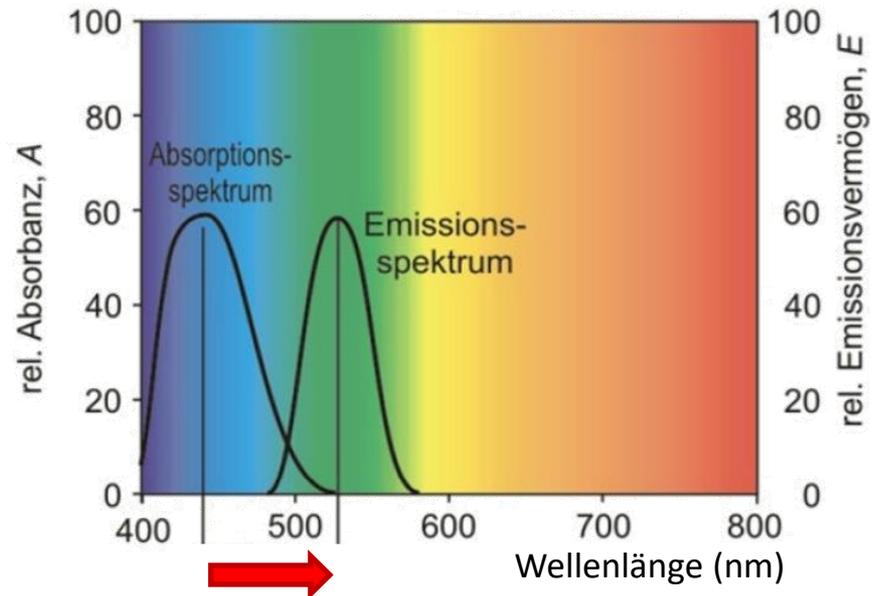
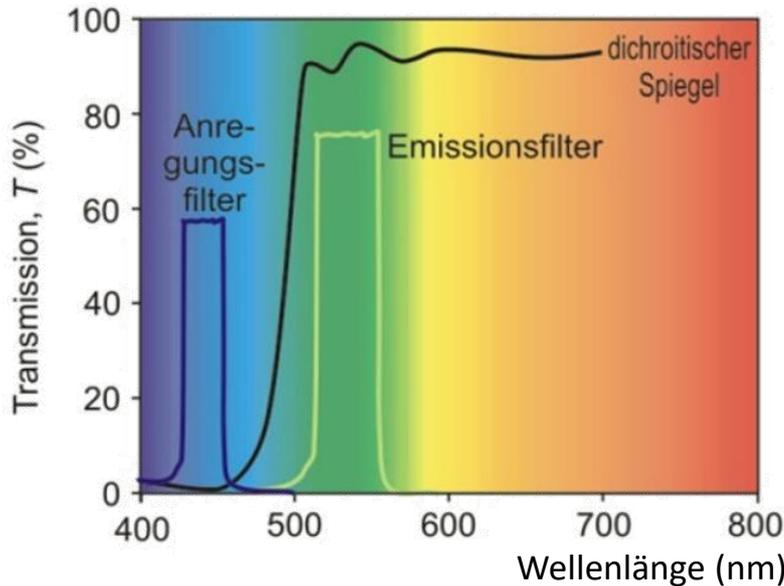
Physikalische Grundlagen:



Stokes-Verschiebung:

$$E_{\text{Abs}} > E_{\text{Fluo}}$$

$$\lambda_{\text{Abs}} < \lambda_{\text{Fluo}}$$



Fluoreszenzmikroskop 3.

Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

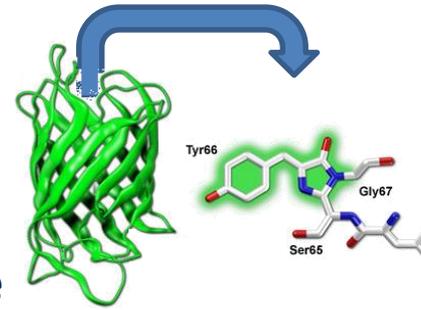
Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

- **Der ideale Fluorophor:**

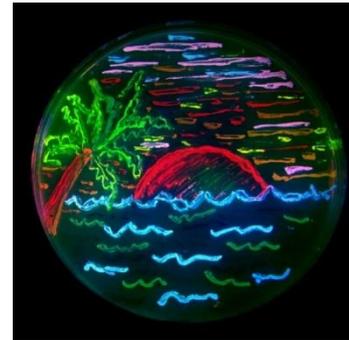
- klein
- hydrophil
- emittiert im sichtbaren Lichtbereich
- große Stokes-Verschiebung
- spezifische Bindung
- verursacht keine photochemische Reaktionen

- **fluoreszierende Proteine:**

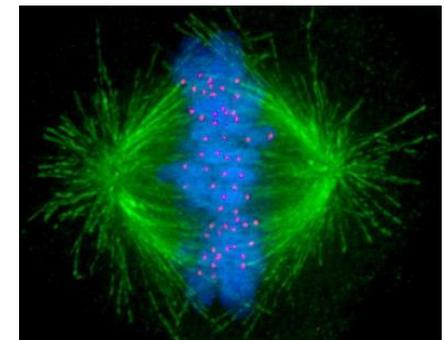
- GFP: Green Fluorescent Protein
- FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

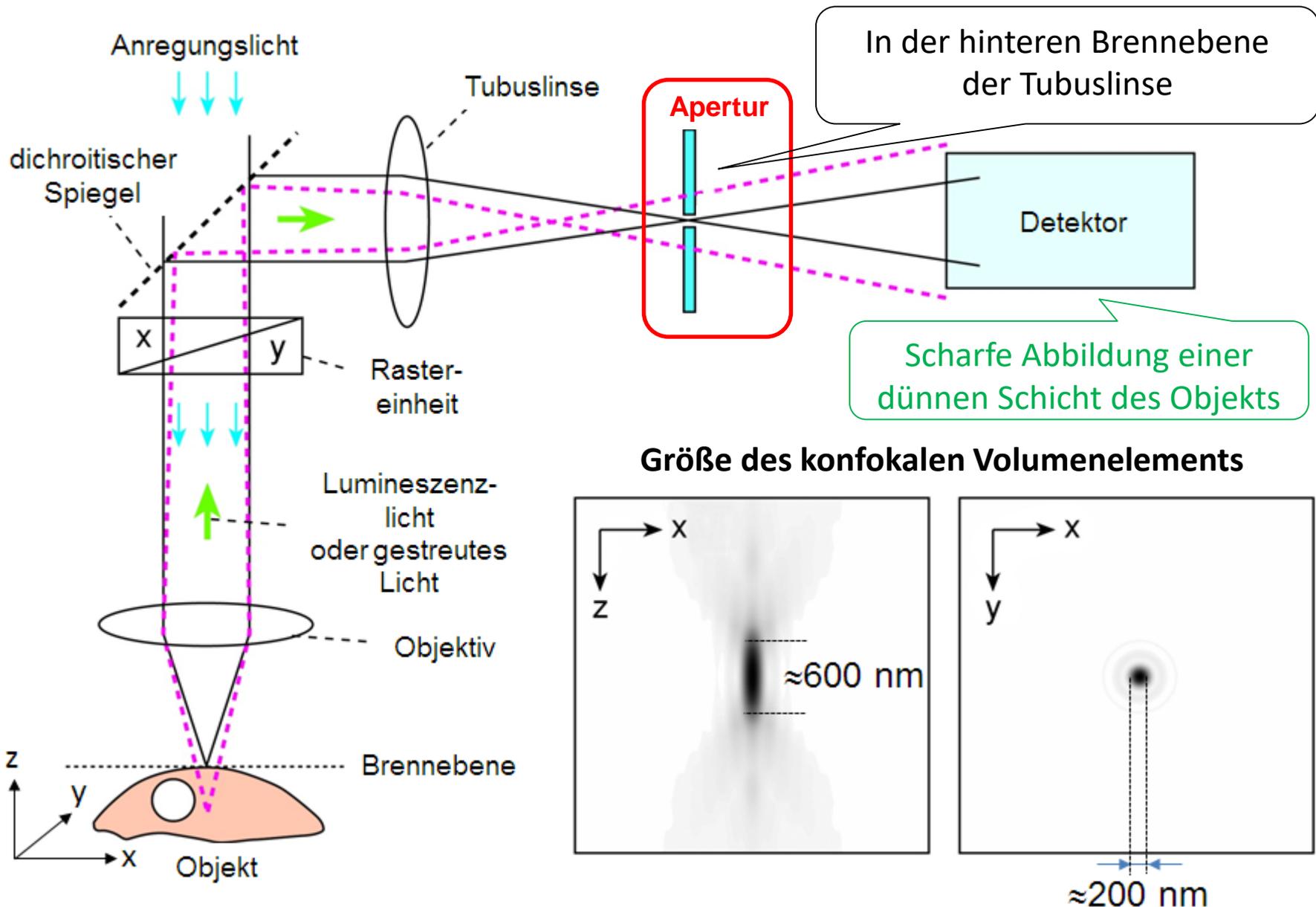


Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren



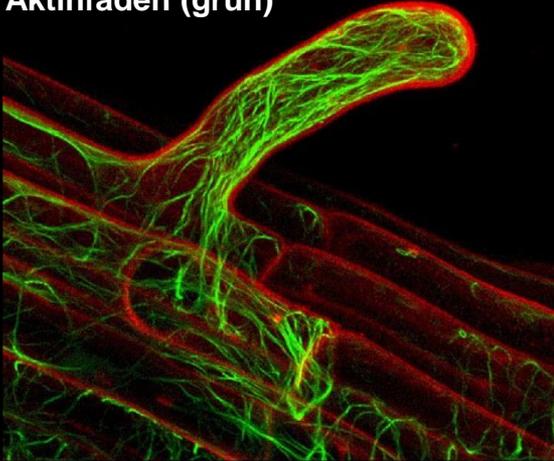
Mikroskopische Aufnahme während der Metaphase einer Mitose (Mikrotubuli: grün, Chromosomen: blau, Kinetochoren: rosa).

Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)

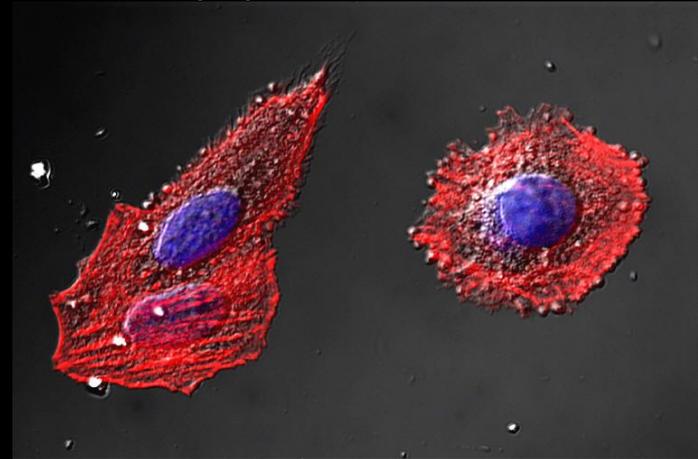


Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 1.

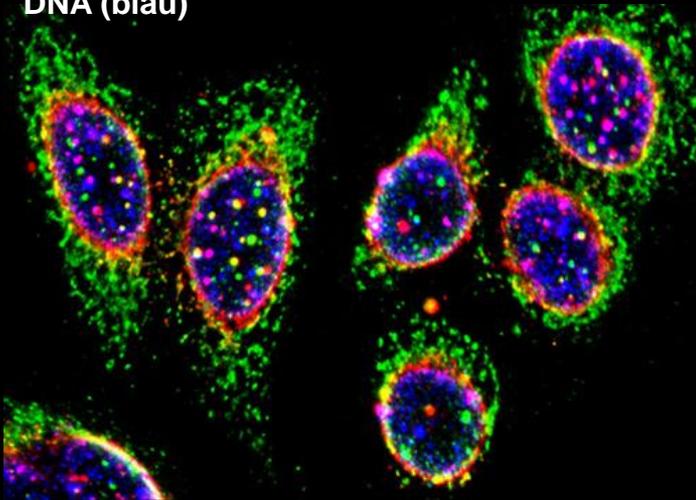
Aktinfaden (grün)



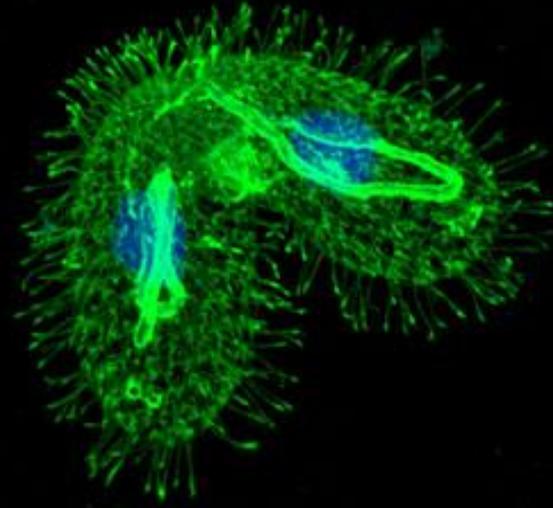
Aktinfaden (rot)



DNA (blau)



Mikrotubuli (grün)



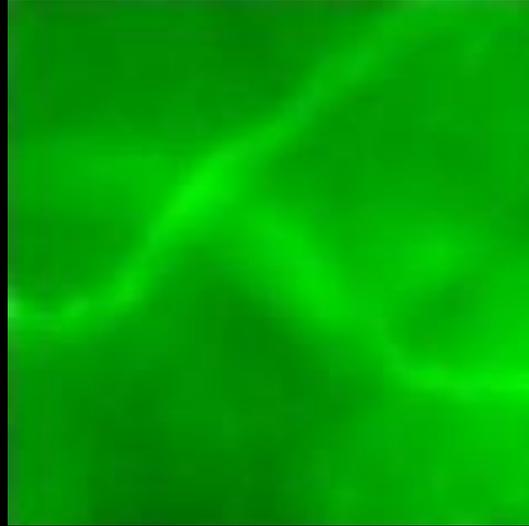
Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 2.

Fluoreszenzmikroskop

Medulla



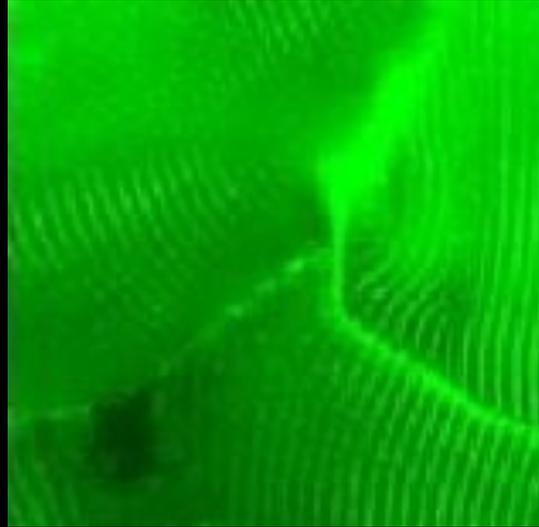
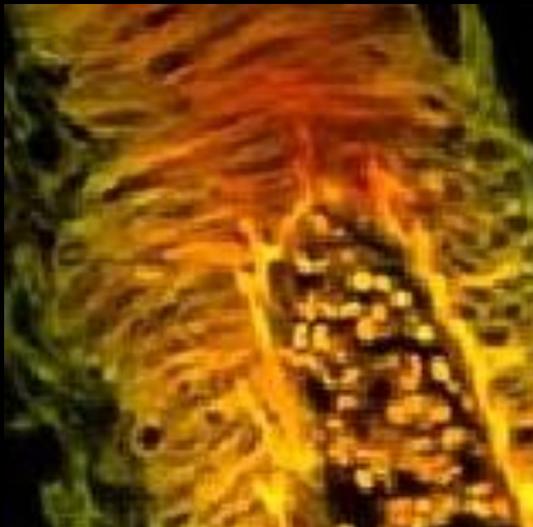
Skelettmuskel



Pollen



CLSM



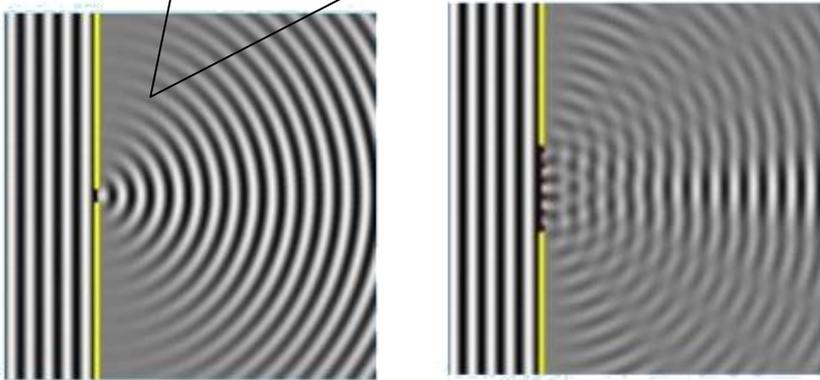
Superresolutionsmikroskope

Grundproblem – 1.

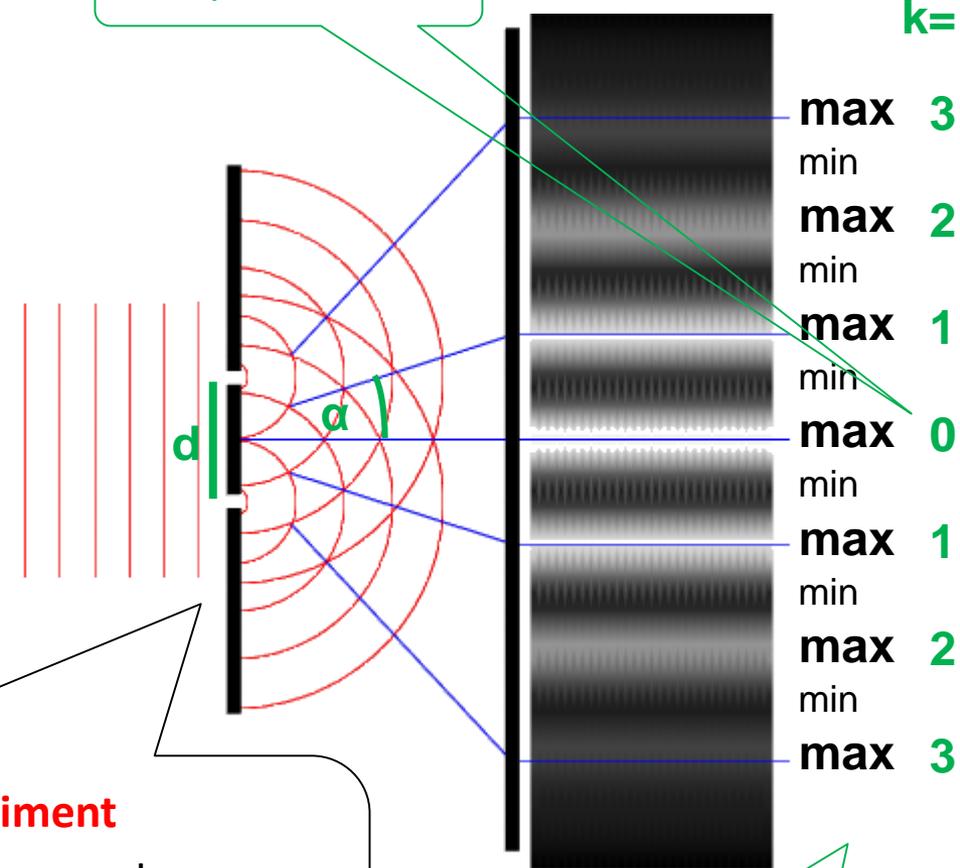
Beugung des Lichtes:

Huygensches Prinzip:

jeder Punkt einer Wellenfront dient als Ausgangspunkt einer neuen Welle



Hauptmaximum



Thomas Young: Doppelspaltexperiment

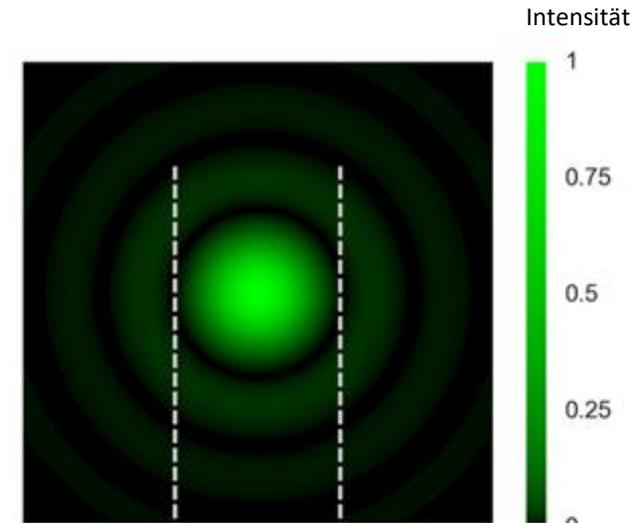
Interferenzmuster entsteht durch Beugung der Wellenausbreitung am Doppelspalt. Bei monochromatischem Licht besteht dieses Muster auf dem Schirm aus **hellen Streifen (Maxima)** und **dunklen Streifen (Minima)**.

Maximale Verstärkung:

$$k \cdot \lambda = d \cdot \sin(\alpha)$$

Grundproblem – 2.

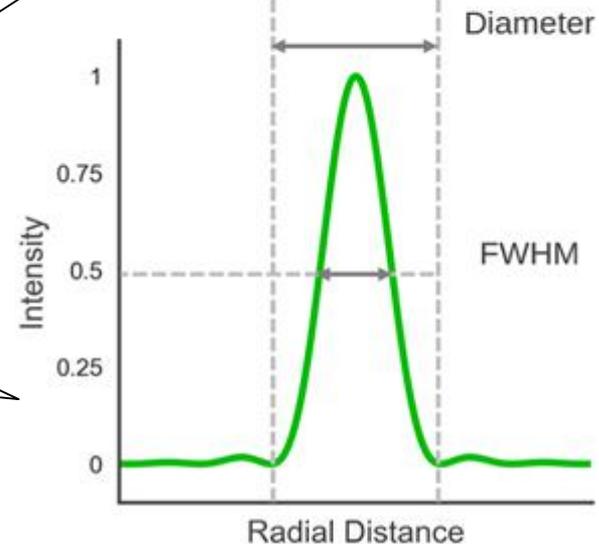
Entstehung der Beugungsscheiben:



Airy-Scheibe:

zentrales Maximum, umgeben von Ringen abnehmender Intensität.

Das zentrale Maximum enthält 84% der Intensität, die Umgebung enthält 16% der Intensität.



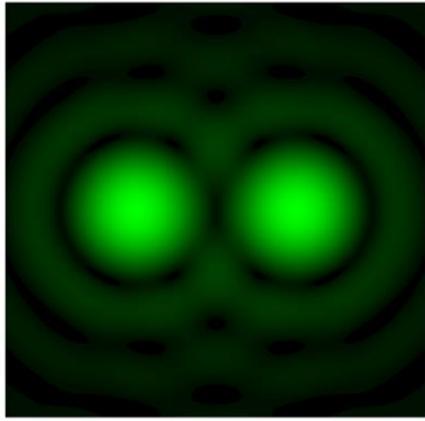
Grundproblem – 3.

Rayleigh-Grenzfall:

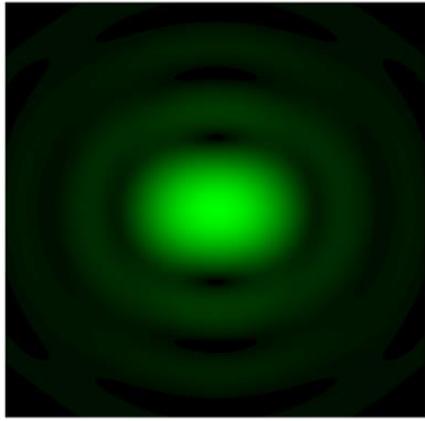
Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

Hauptmaximum stimmt mit dem ersten Minimum der benachbarten Beugungsscheibe

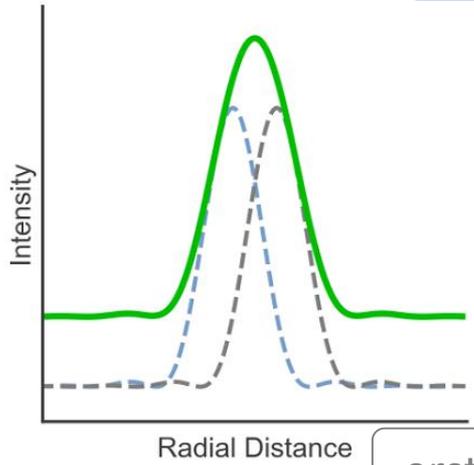
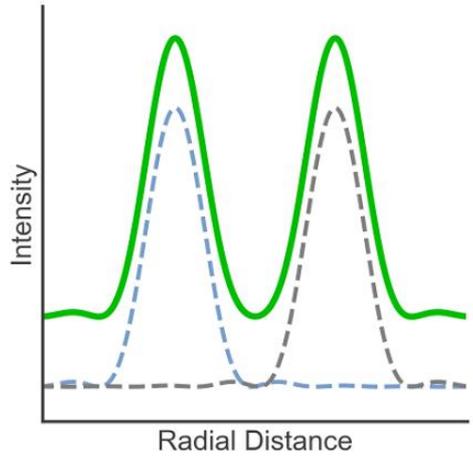
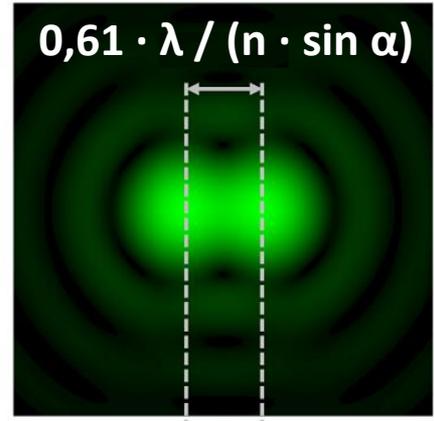
auflösbar



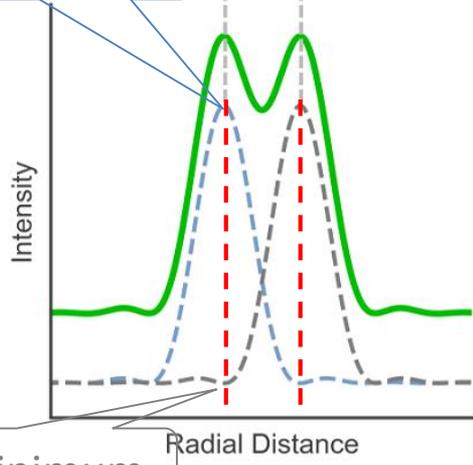
nicht mehr auflösbar



Beugungsscheibe

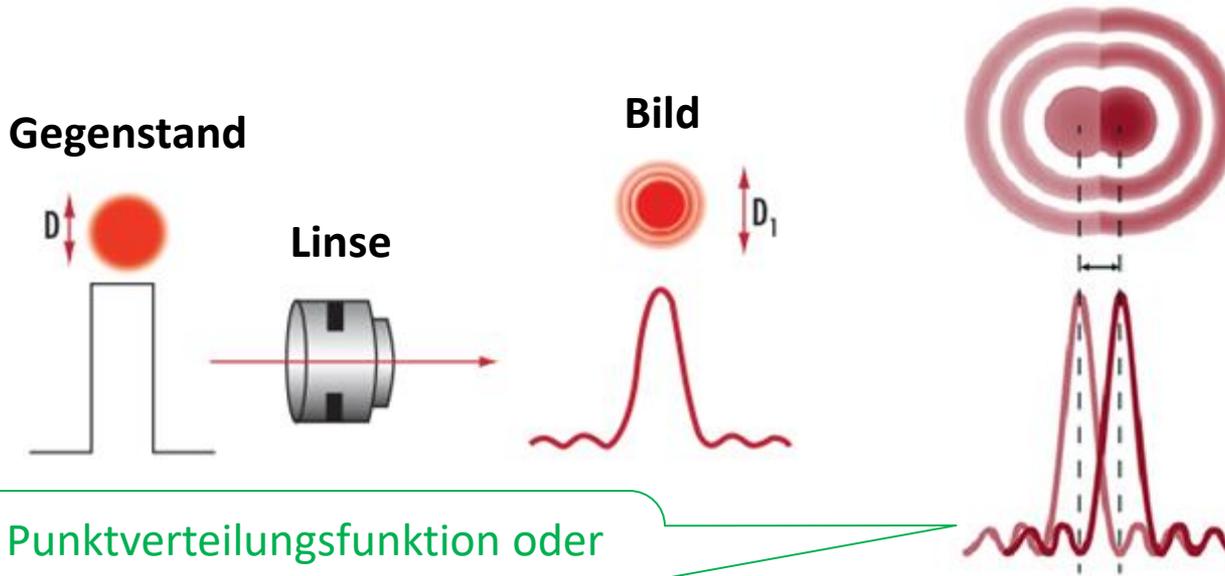


Hauptmaximum



erstes Minimum

Lichtmikroskop



Das Abbesche Prinzip:

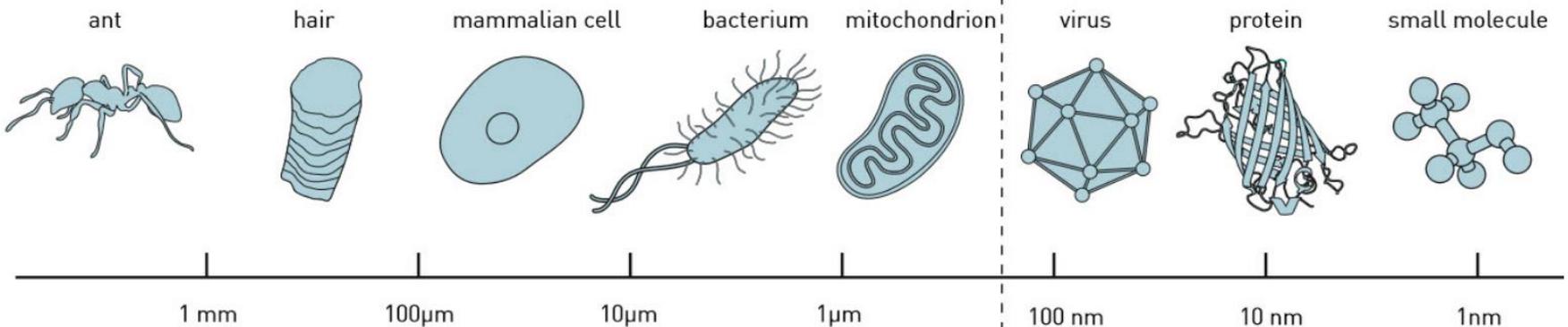
Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

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

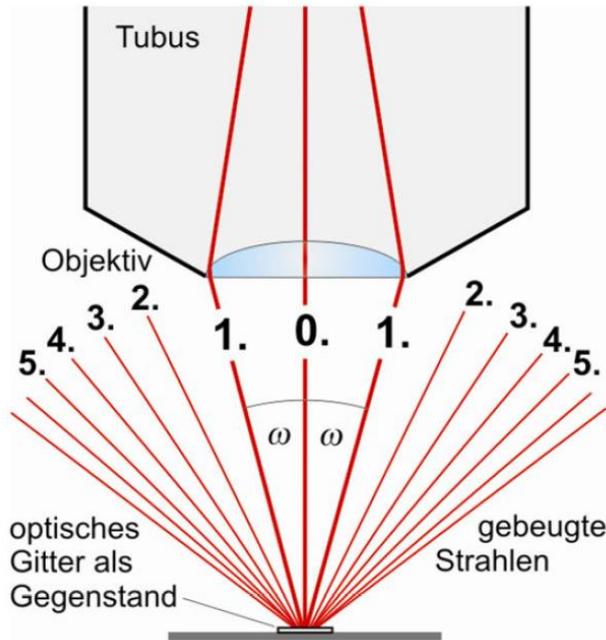
Numerische Apertur (NA)

Punktverteilungsfunktion oder Punktbildverwaschungsfunktion:
Point Spread Function (PSF)

Abbe-Limit bei ~ 200 nm



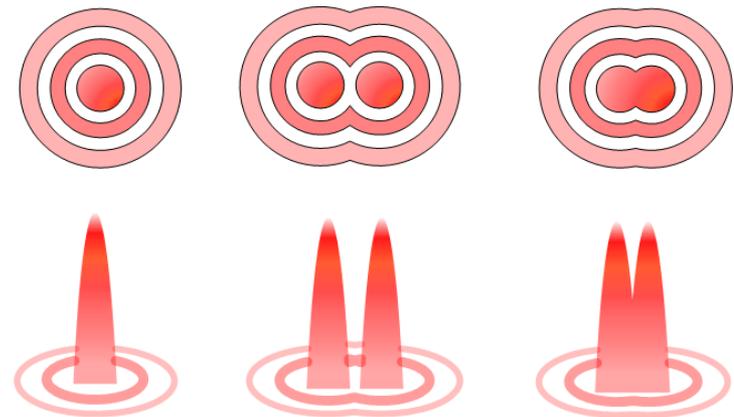
Abbe-Prinzip, Punktverteilungsfunktion



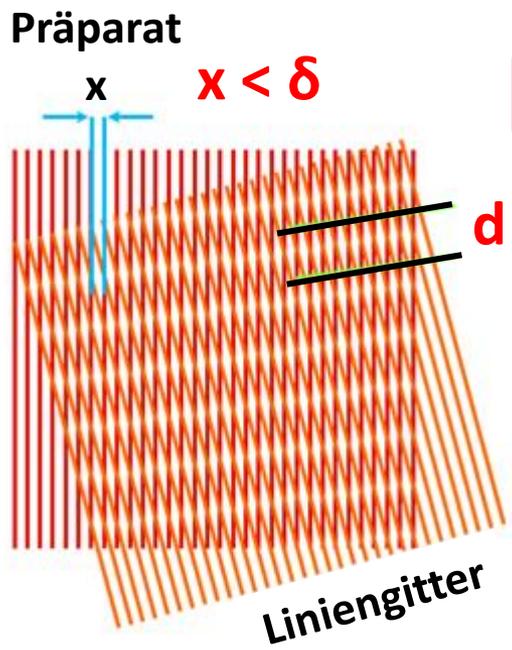
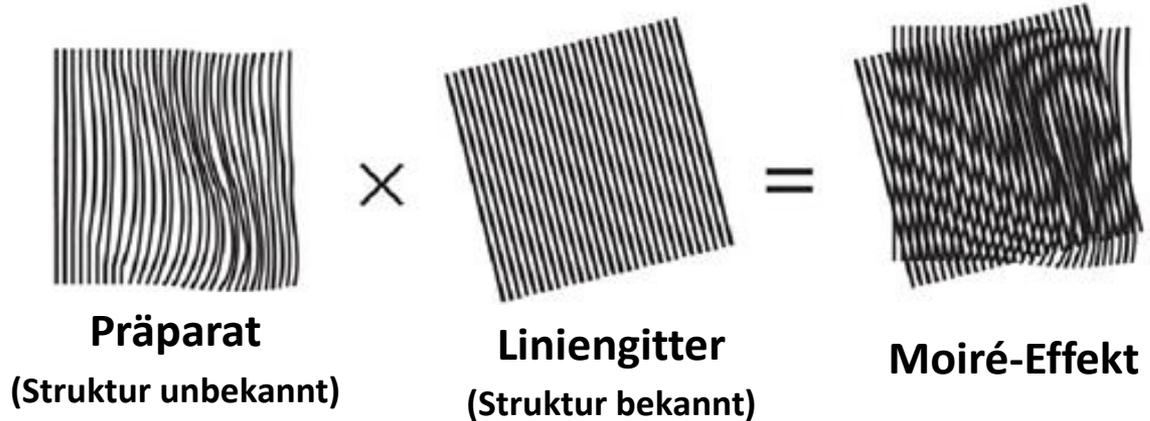
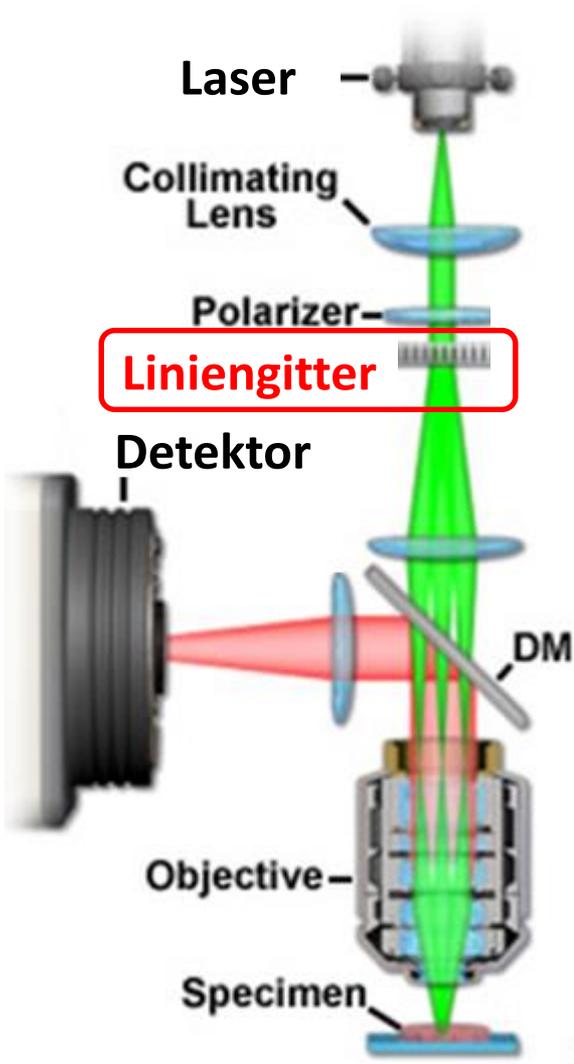
$$\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \omega}$$

- **λ: Wellenlänge erniedrigen**
 - blauer Lichtfilter,
 - UV-Licht,
 - Elektronenstrahl: SEM, TEM.
- **n: erhöhen (Immersionöl)**
- **ω: halben Öffnungswinkel erhöhen**

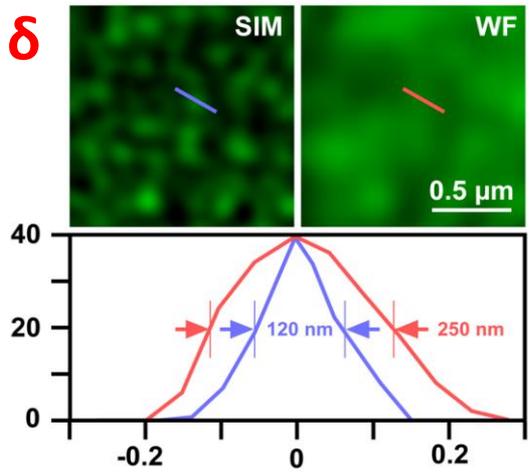
außer dem Hauptmaximum die Beugungsstrahlen erster Ordnung sollen in den Tubus gelangen



Structured Illumination Microscopy (SIM)



Struktur auflösbar

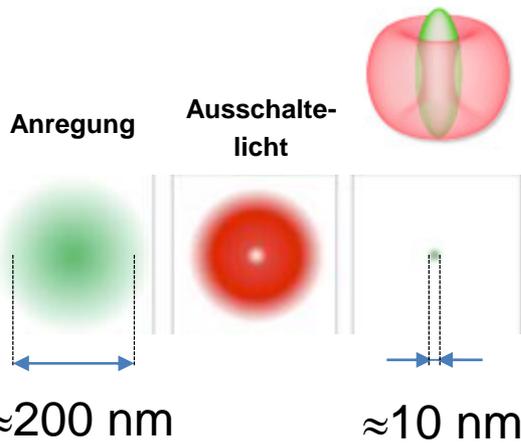
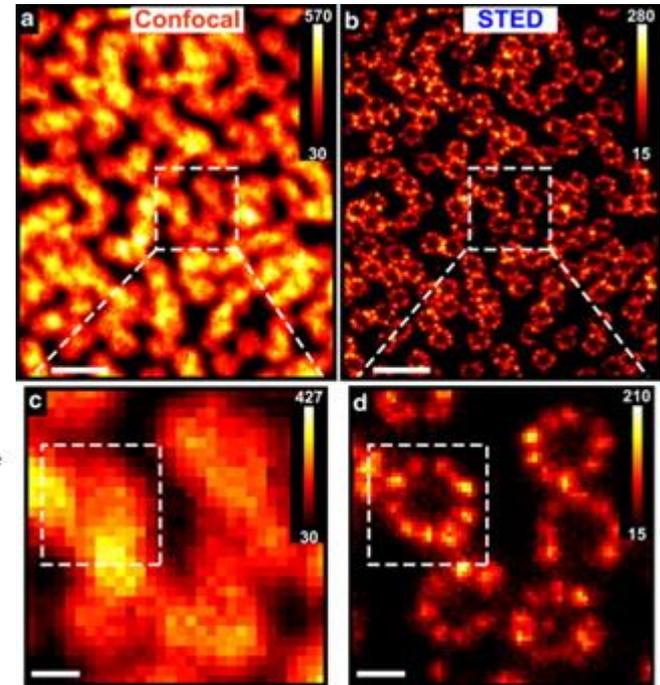


Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)



Stefan W. Hell

Nobel Preis 2014

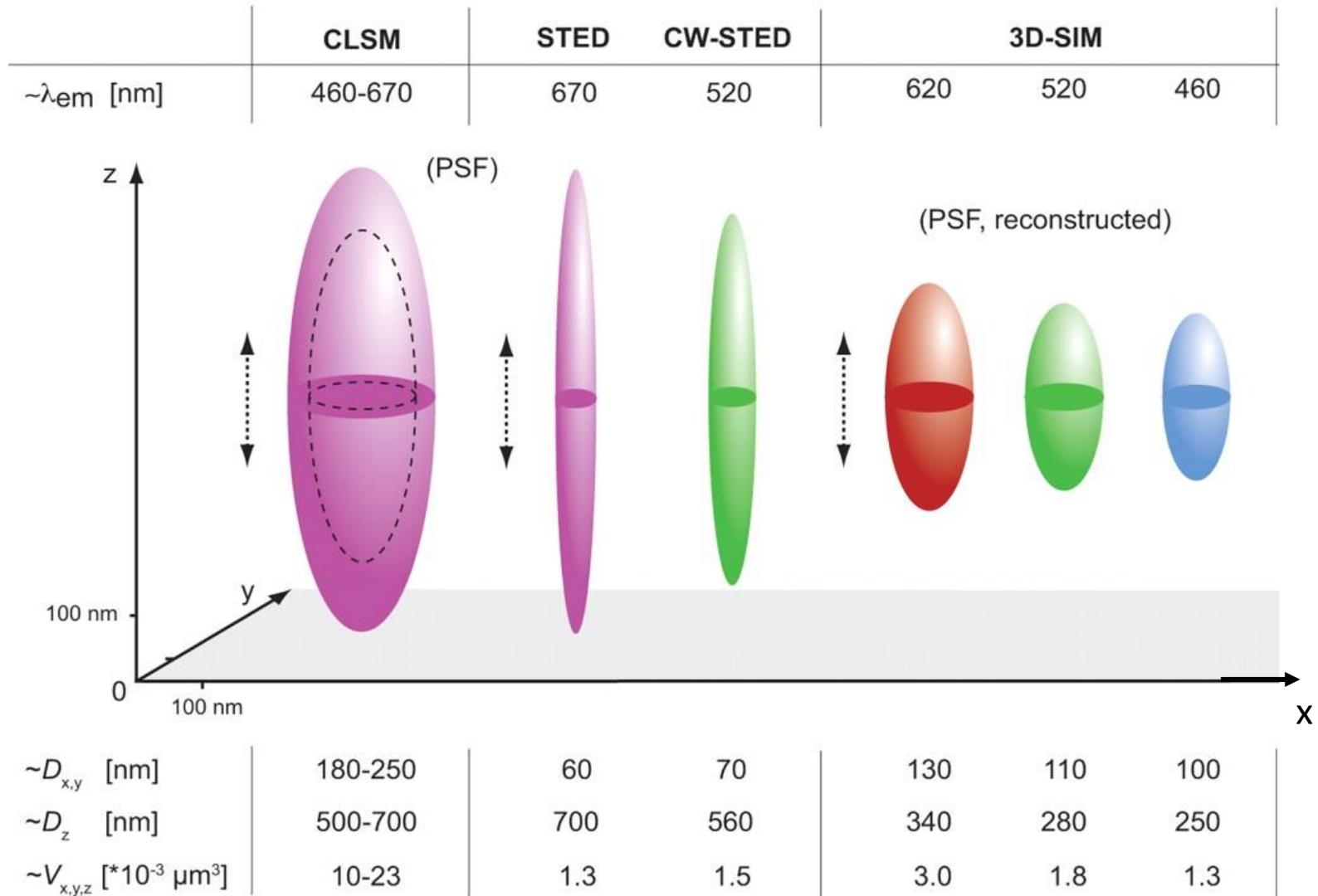


Abbe-Grenze

Superresolution

- Anregung und „Abregung“ fast gleichzeitig
- Stimulierte Emission in einer sehr kleinen Raumteil
- Abtastung

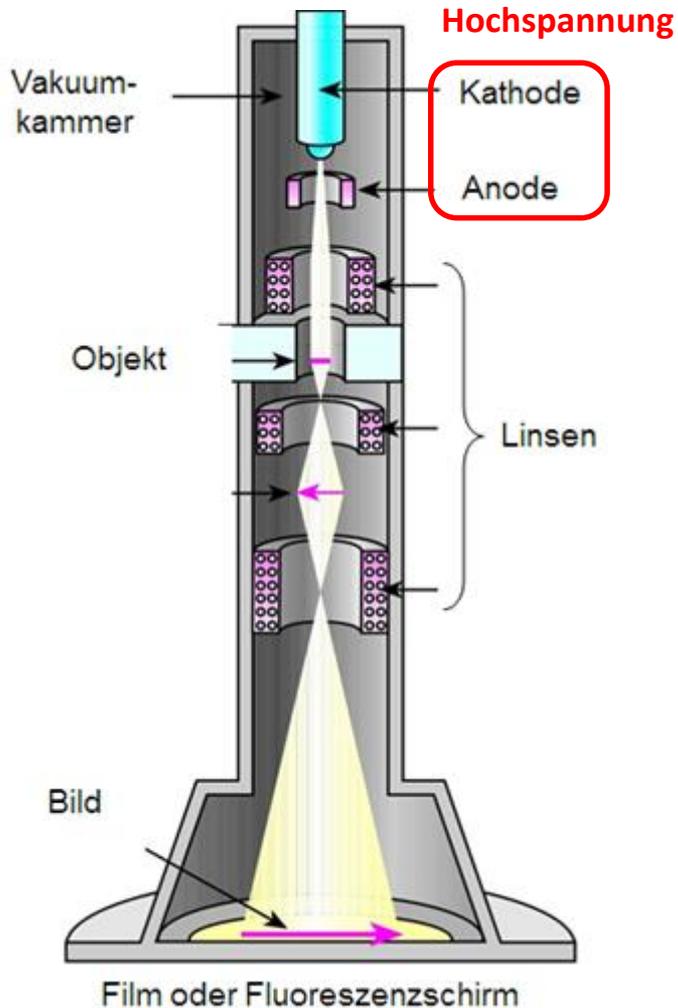
3D-Auflösung der Spezialmikroskope



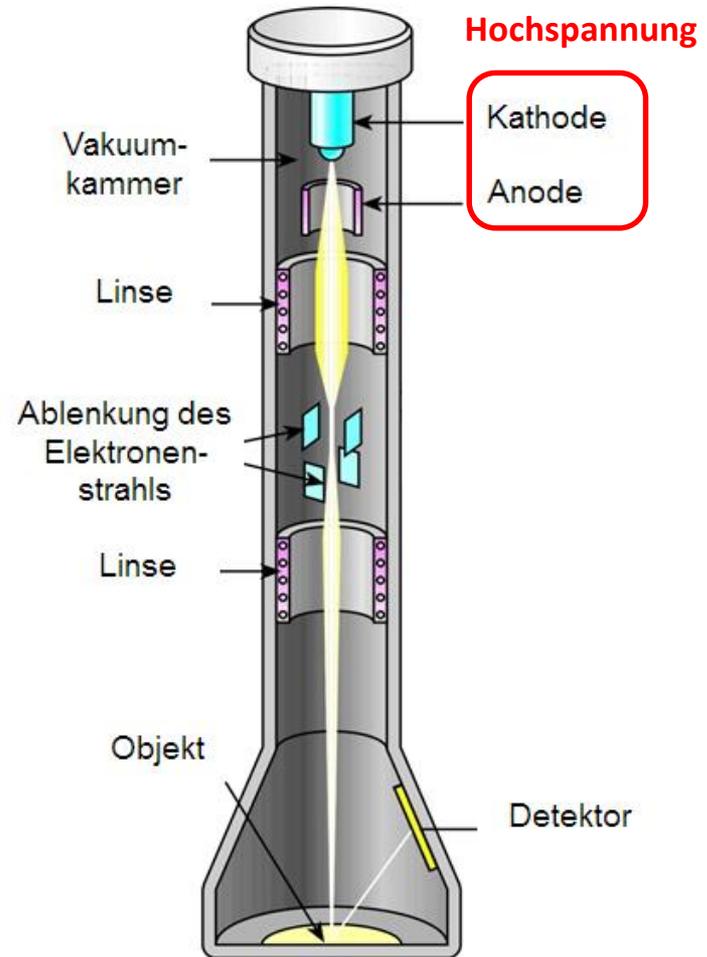
Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskope

Transmissions- Elektronenmikroskop (TEM)

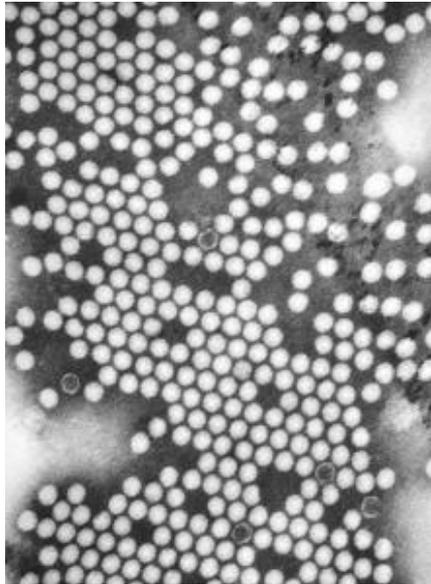


Raster- Elektronenmikroskop (SEM)

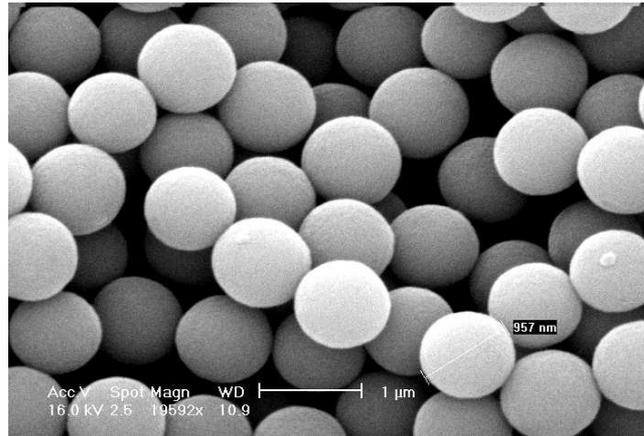


Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugelchen (SEM)



Auflösungsgrenze (δ):

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

$$NA \approx 0,03$$

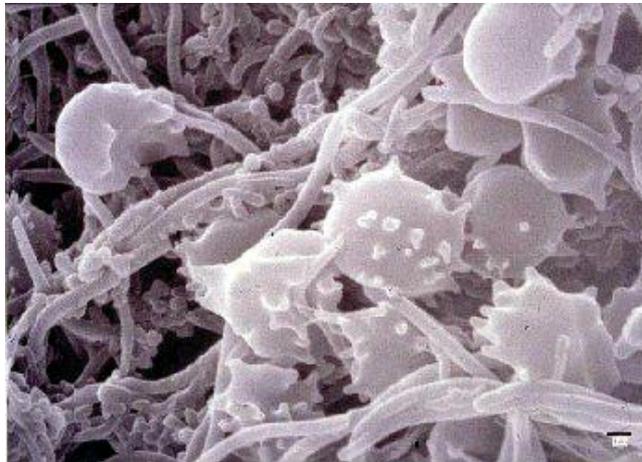
$$\lambda \approx 0,005 \text{ nm}$$

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

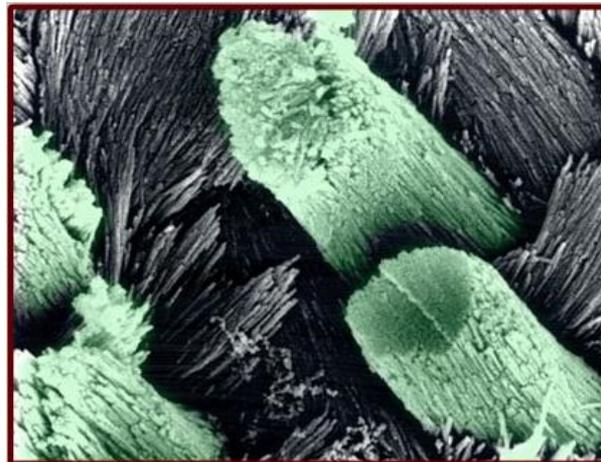
s. Materiewellen

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



Dentin mit den Odontoblasten (SEM)



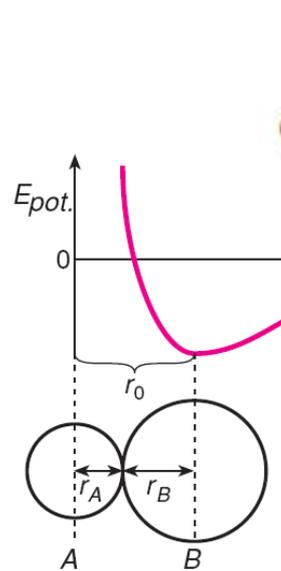
Rastersondenmikroskopie

Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM)

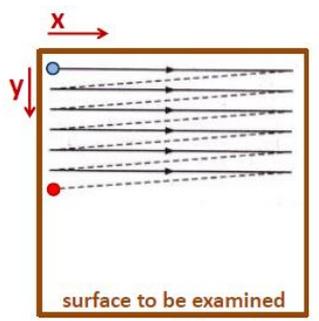
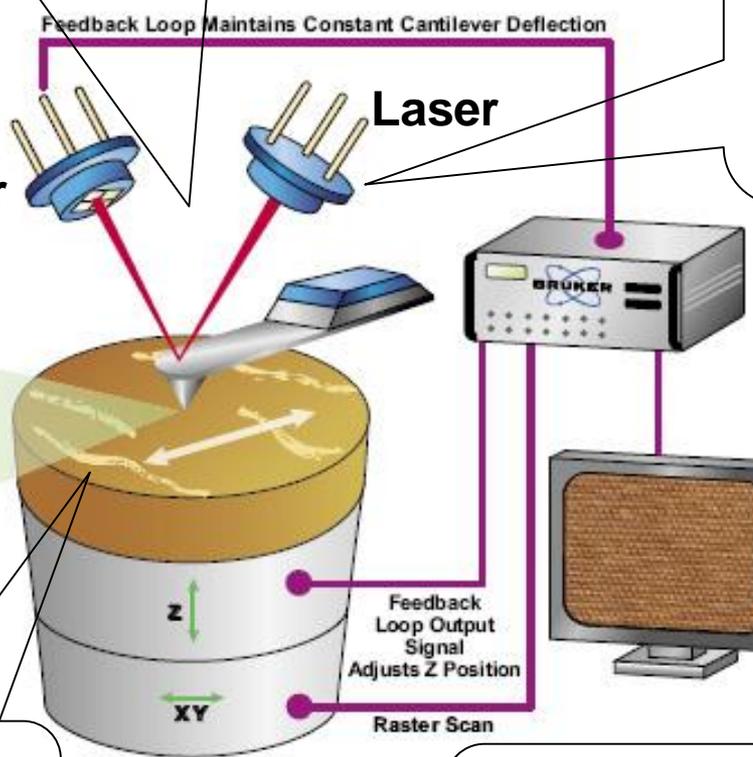
1. **Van der Waals Wechselwirkung** zwischen der Atome der Nadel und des Präparats.

2. Die **Blattfeder** wird wegen der Van der Waals Kräfte **verbogen**.

3. Die Verbiegung einer Blattfeder wird mit einem **Laserstrahl** gemessen.

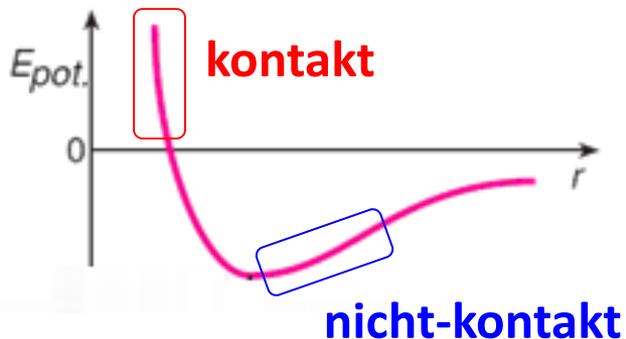
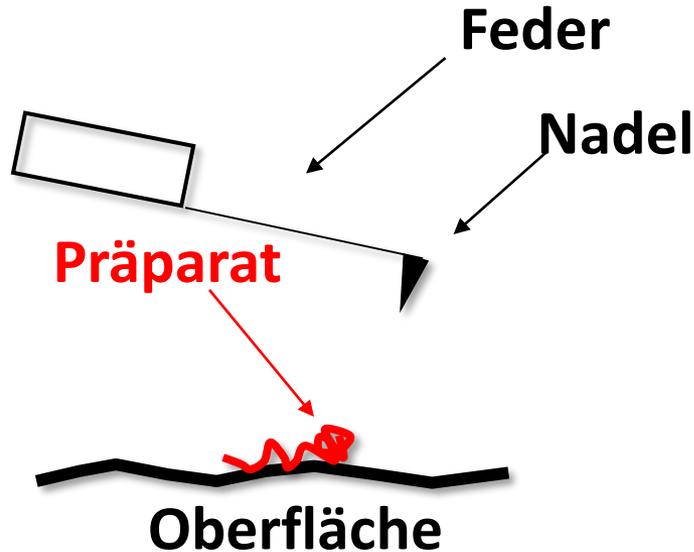


atomar glatte Oberfläche (Glimmer)



4. **Rasterprinzip**: die Probe (oder das Präparat) wird in X-Y-Z Richtungen bewegt.

AFM Betriebsarten



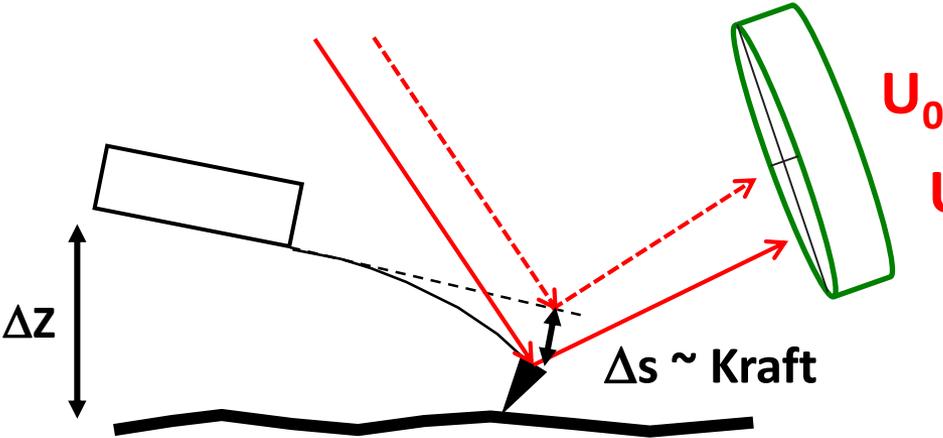
- **Kontakt:** die Messspitze steht in direktem mechanischem Kontakt mit dem Präparat, die **Auslenkung der Feder** liefert die topographische Information.
 - **Z-Rückkopplung:** die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe wird mit dem „Setpoint“ verglichen. Die Regelung 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.

AFM: Kontakt-Modus

eignet zur Untersuchung von weichen biologischen Strukturen (zbs. Zellen)

Laserstrahl

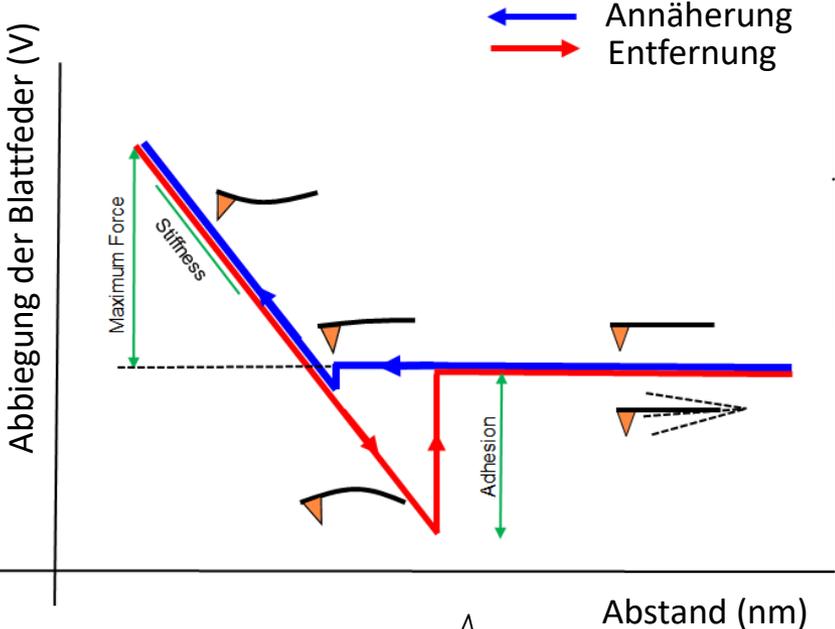
Detektor (Photodiode)



$F = D \cdot \Delta s$ (Hookesches Gesetz)

Δs : Abbiegung der Blattfeder

D: Federkonstante

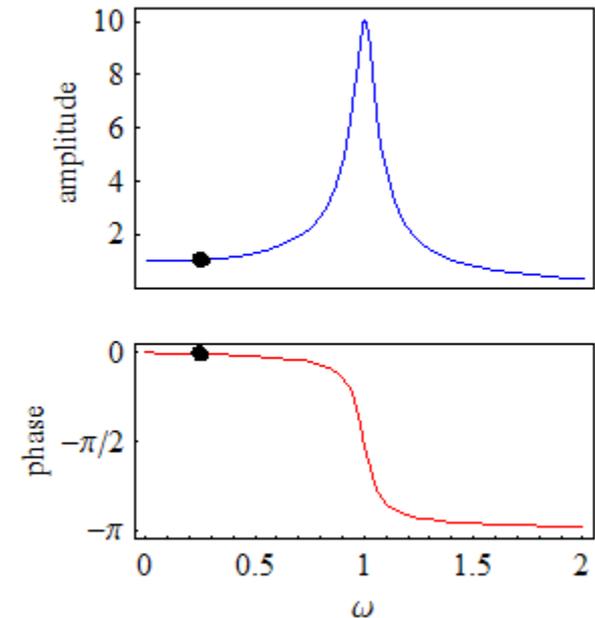
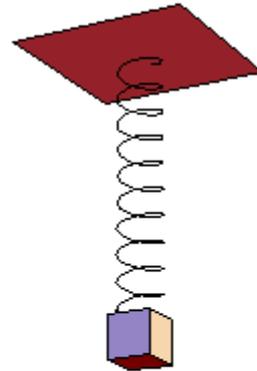


Kraftmessung / Elastizitätsmessung an biologischen Präparaten

AFM: Nicht-Kontakt-Modus

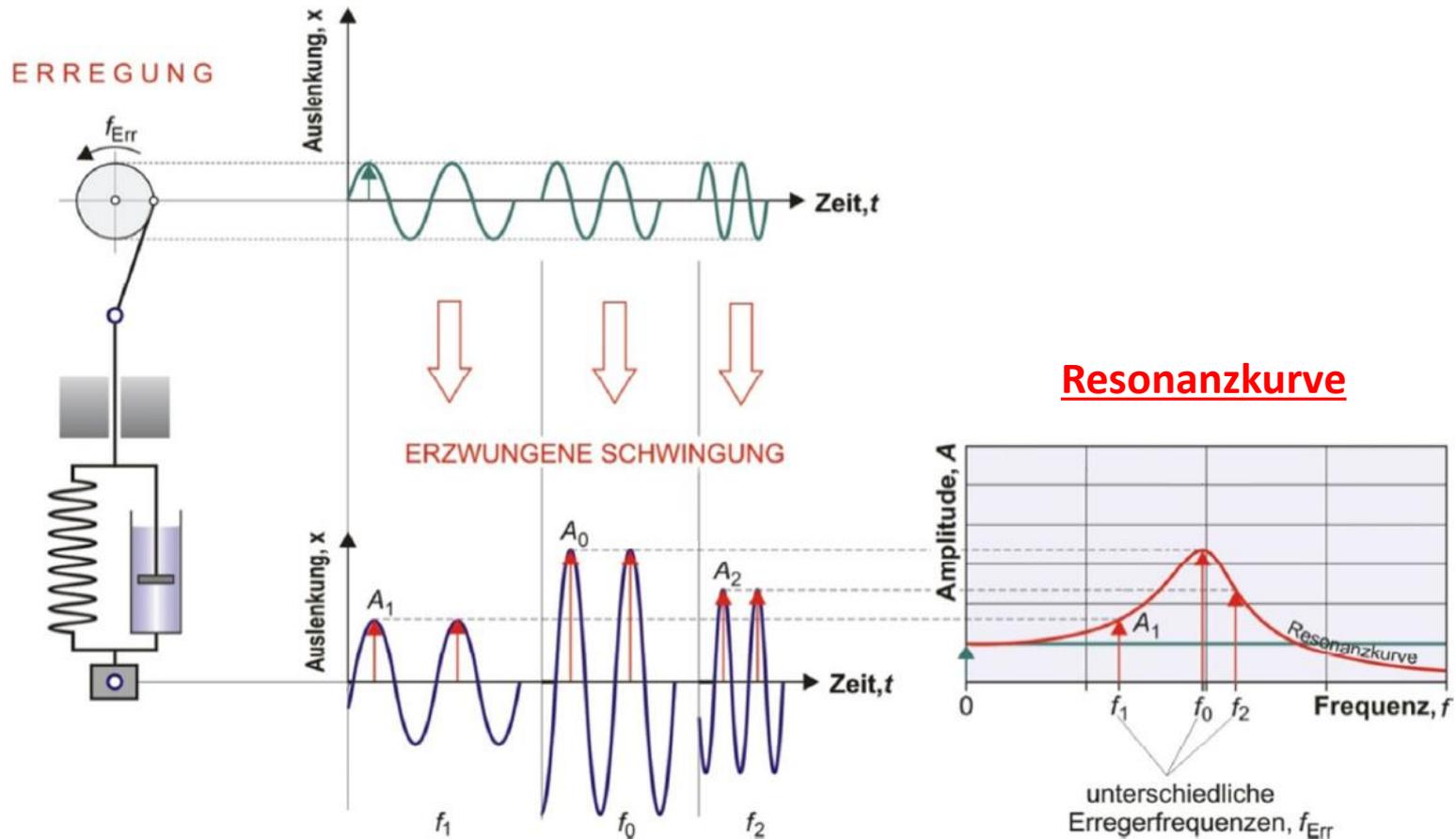
Resonanz: Eine erzwungene Schwingung, bei der die Frequenz der äußeren Krafteinwirkung nahe der Eigenfrequenz des Schwingungssystems liegt. In diesem Fall können sehr große Amplituden auftreten.

Erzwungene Schwingung

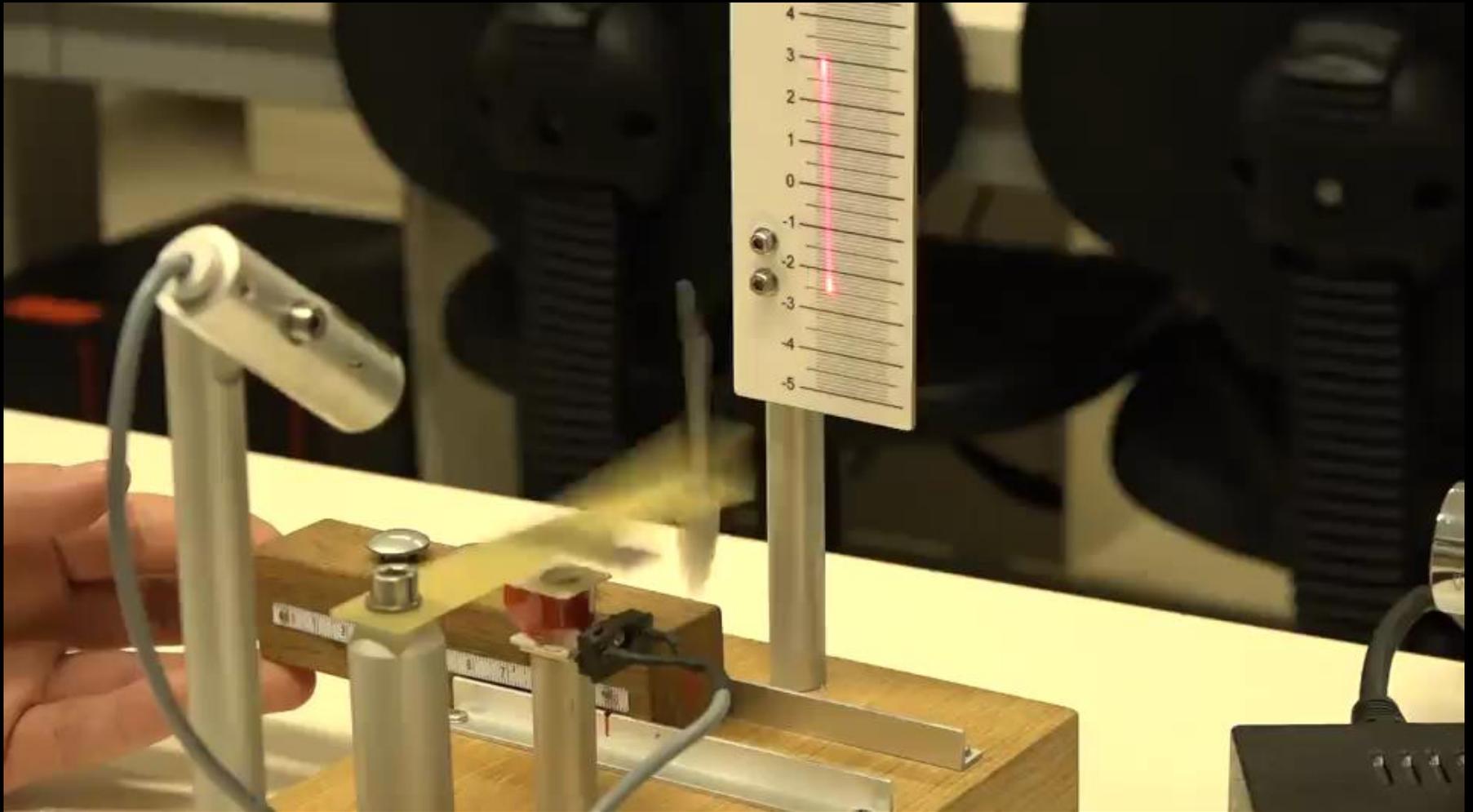


AFM: Nicht-Kontakt-Modus

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.

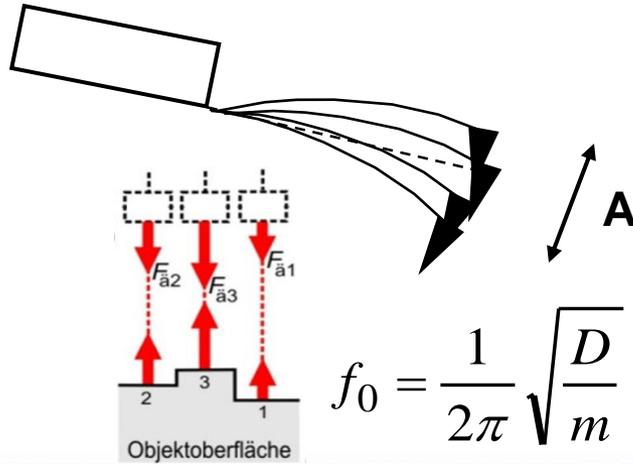


AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus

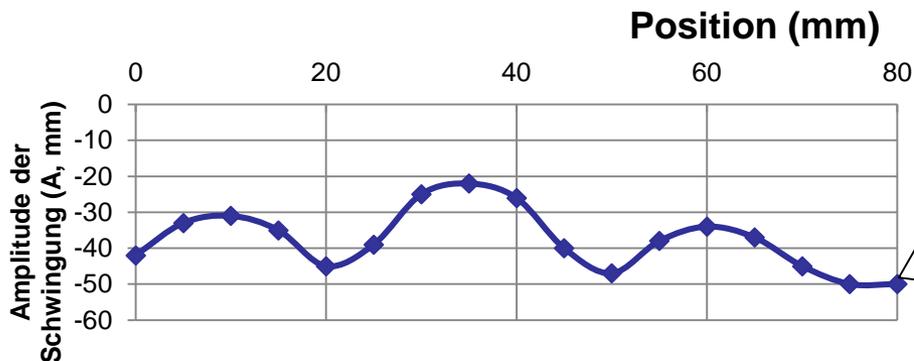
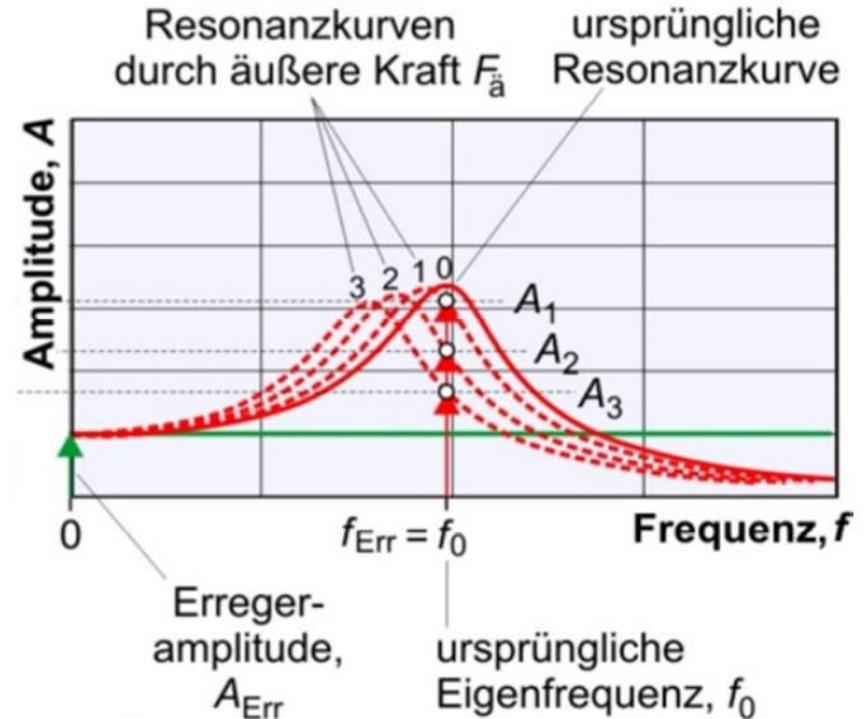
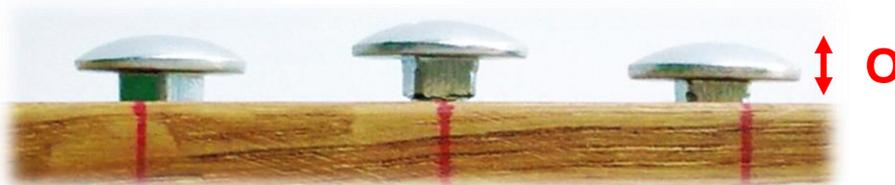


N.B.: magnetische Wechselwirkung modelliert die Van der Waals Kräfte

AFM: Nicht-Kontakt-Modus



$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m}}$$

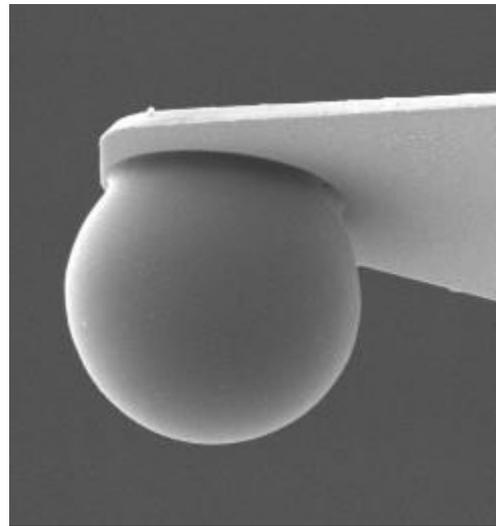
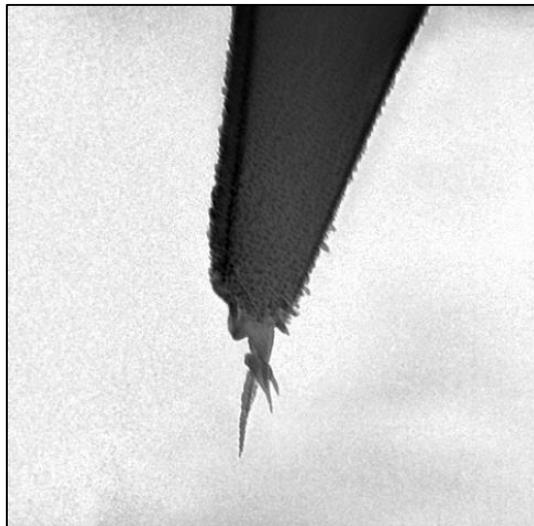
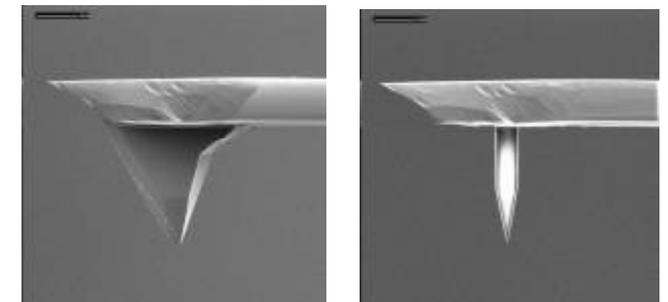
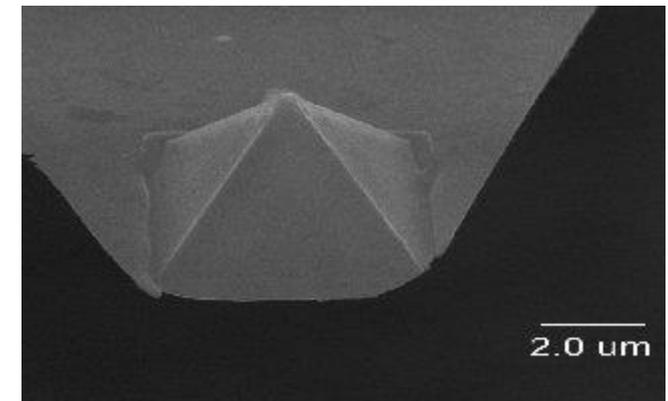
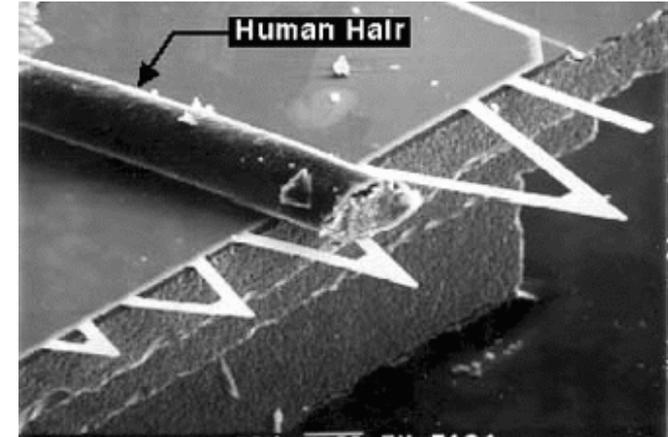


Amplitude
≠
Objekthöhe

Objekthöhe kann
nur durch
Rückkopplung
gemessen werden.

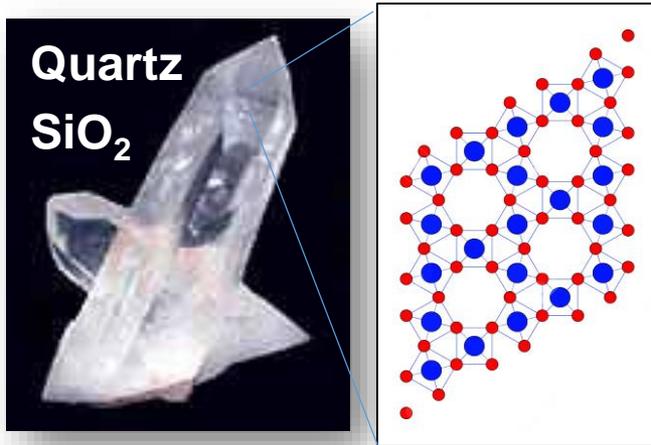
Blattfeder / Cantilever

- Material: Siliciumnitrid (Si_3N_2)
- Krümmungsradius: 0,1 nm- 100 μm
- Federkonstante $\sim 0,1\text{-}10 \text{ N/m}$
- $f_0 \sim 50\text{-}500 \text{ kHz}$

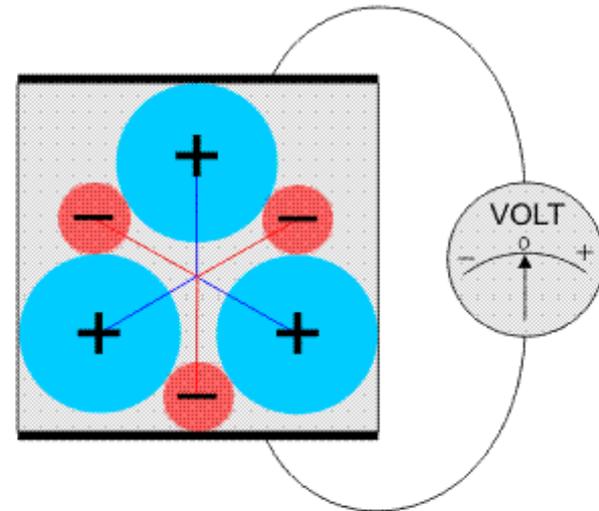


AFM - Abbildungsartefakten

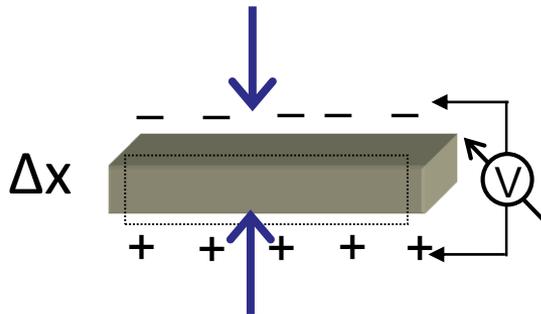
Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



● Si
● O



Deformation



$$U = \delta \cdot \Delta x$$

z.B für Quartz: $\delta \approx 10^{12}$ V/m

Inverser piezoelektrischer Effekt:

Spannung \rightarrow Deformation

X, Y, Z Piezotransducer: 150 V \rightarrow 40 μ m

präzise
Schrittgröße:
0,1 nm

AFM - Eigenschaften

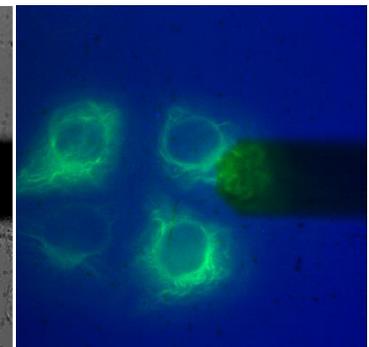
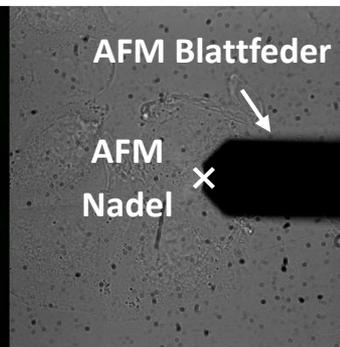
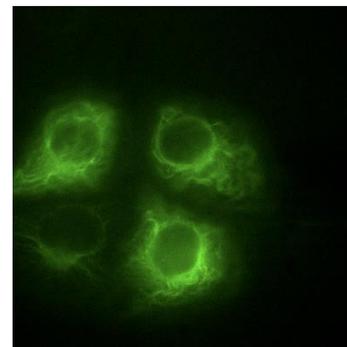
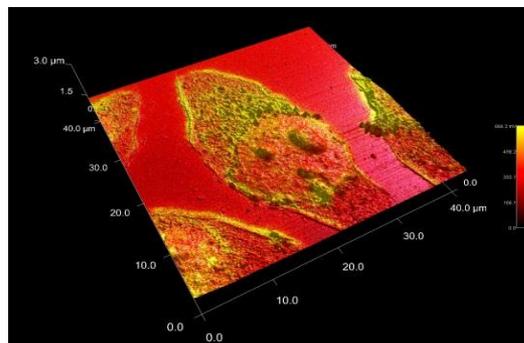
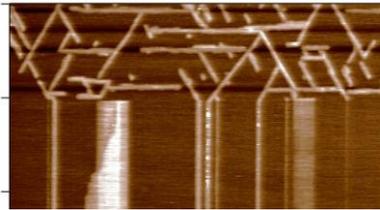
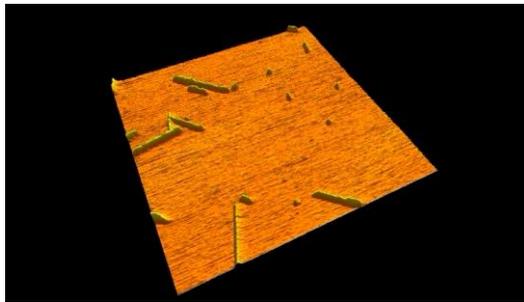
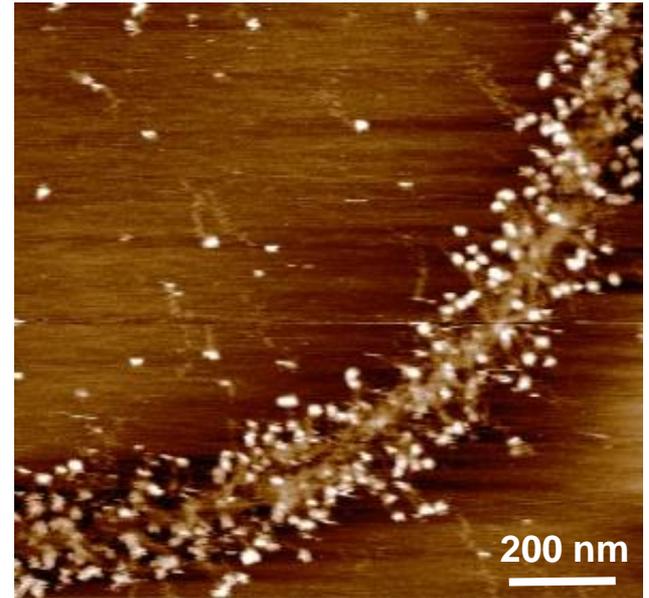
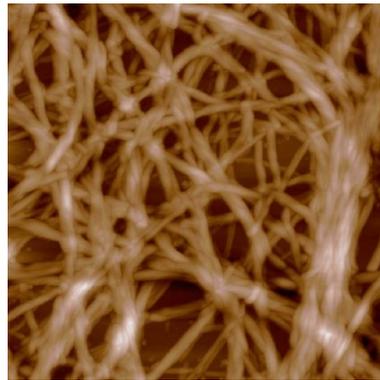
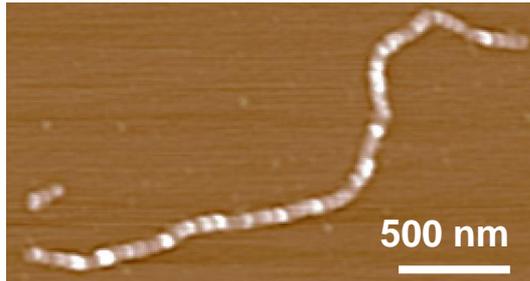
- **Vorteile:**

- 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.).

AFM-Bilder aus unserem Institut

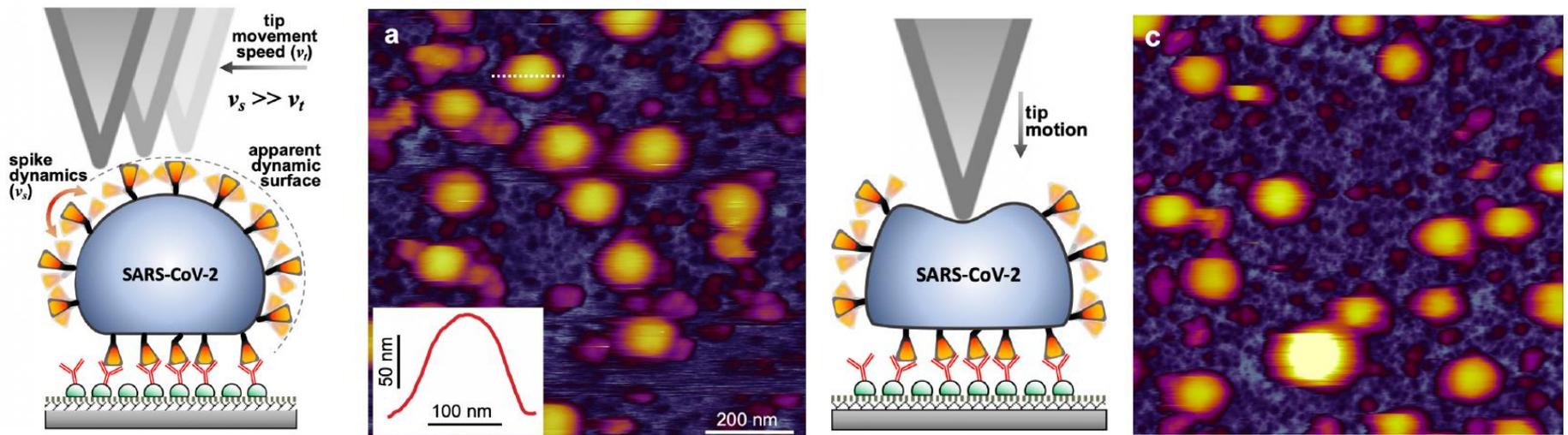


Natives SARS-CoV-2 Virus abgebildet mit AFM

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

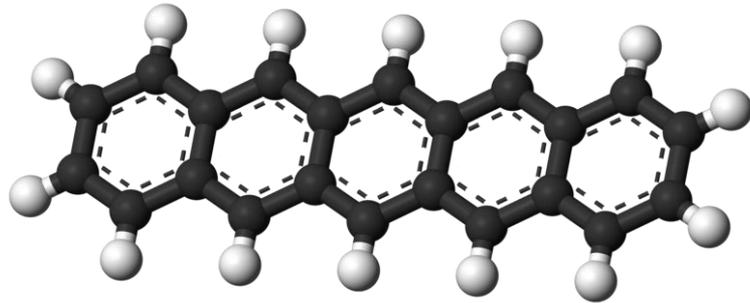
Bálint Kiss^{1#}, Zoltán Kis^{2,3#}, Bernadett Pályi², Miklós S.Z. Kellermayer^{1*}

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

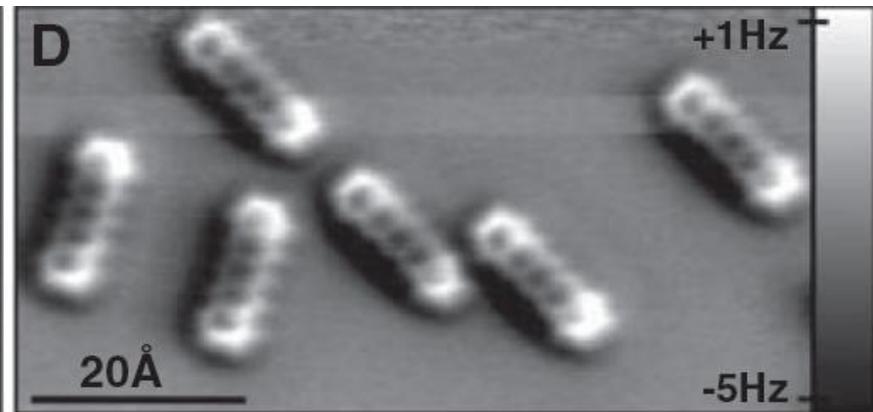
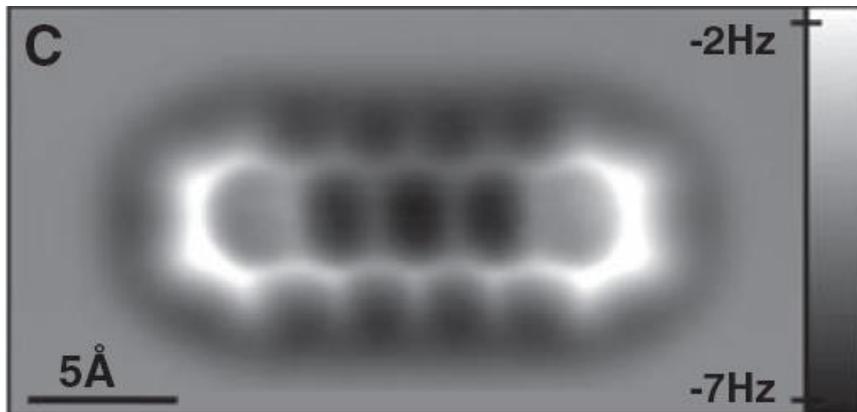


Pentacen Molekül

Tunnelstromstärke durch die Nadel (STM)



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



Nature Chemistry 1, 597 - 598 (2009)