

# 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.

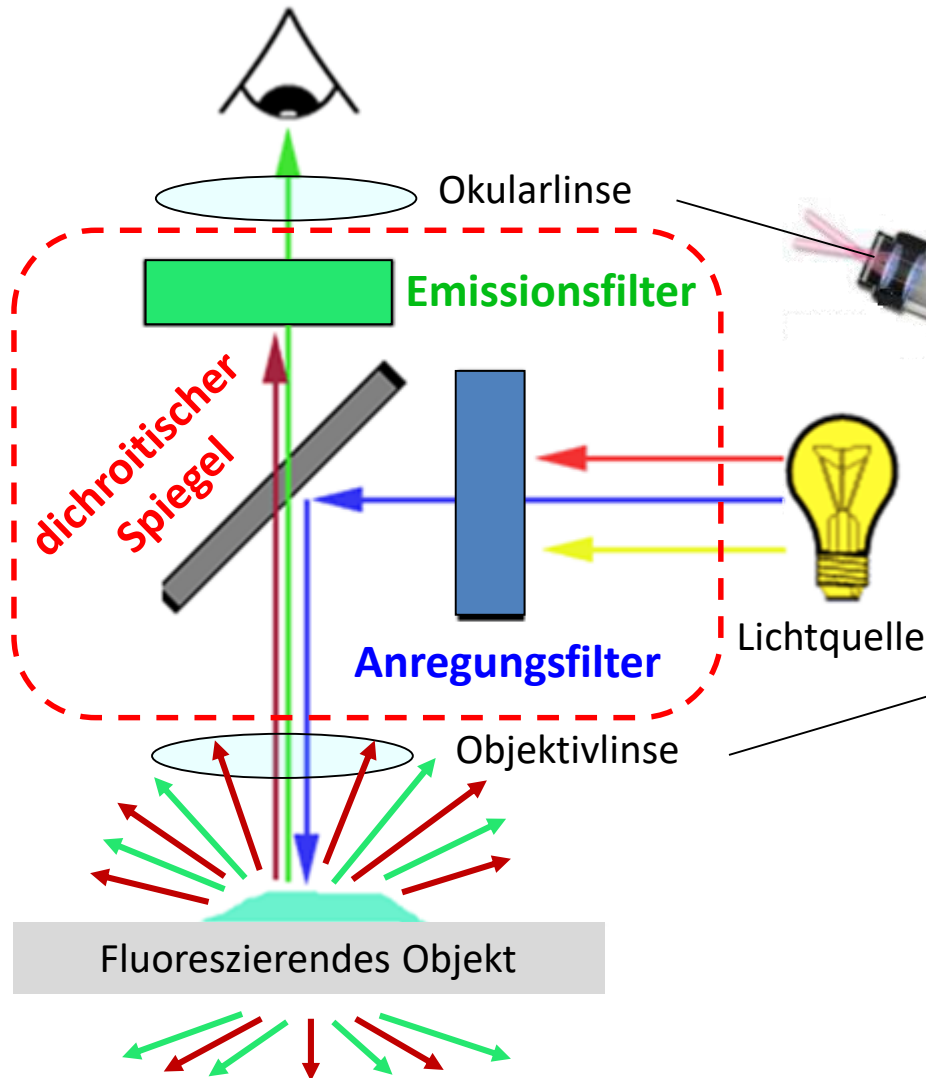
## d) Rastersondenmikroskope:

- AFM: Rasterkraftmikroskop.

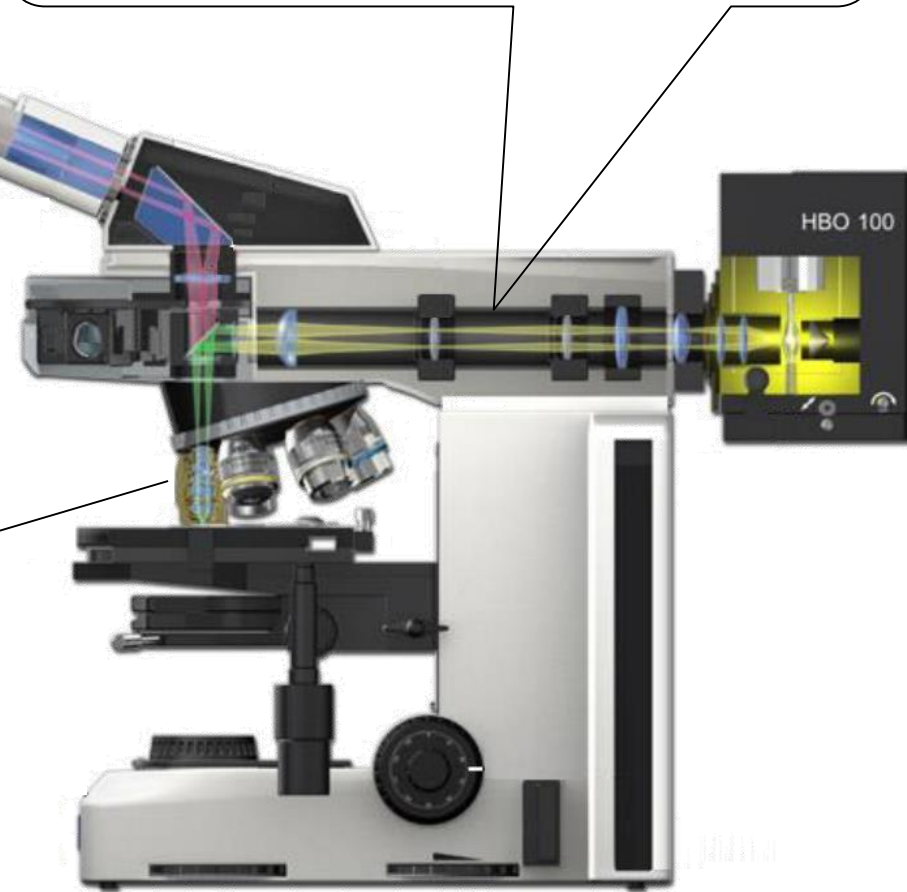
# **Spezielle Lichtmikroskope**

# Fluoreszenzmikroskop 1.

## Epifluoreszenz-Anordnung:

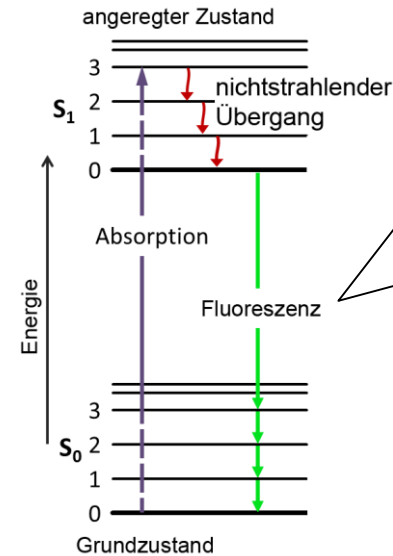
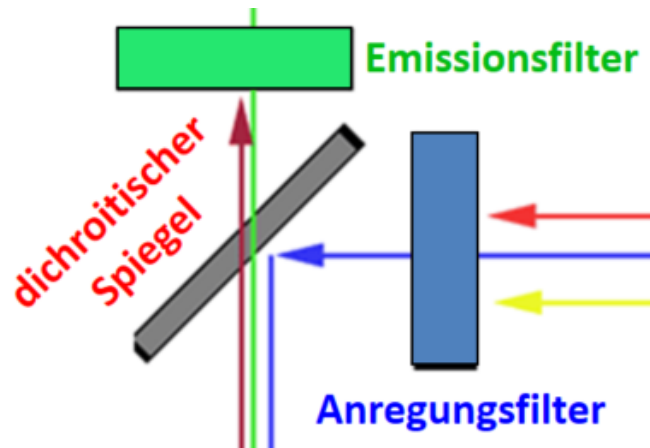


„Auflicht-Fluoreszenzmikroskop“:  
Anregungslicht wird über das Objektiv in  
das Präparat eingestrahlt.



# Fluoreszenzmikroskop 2.

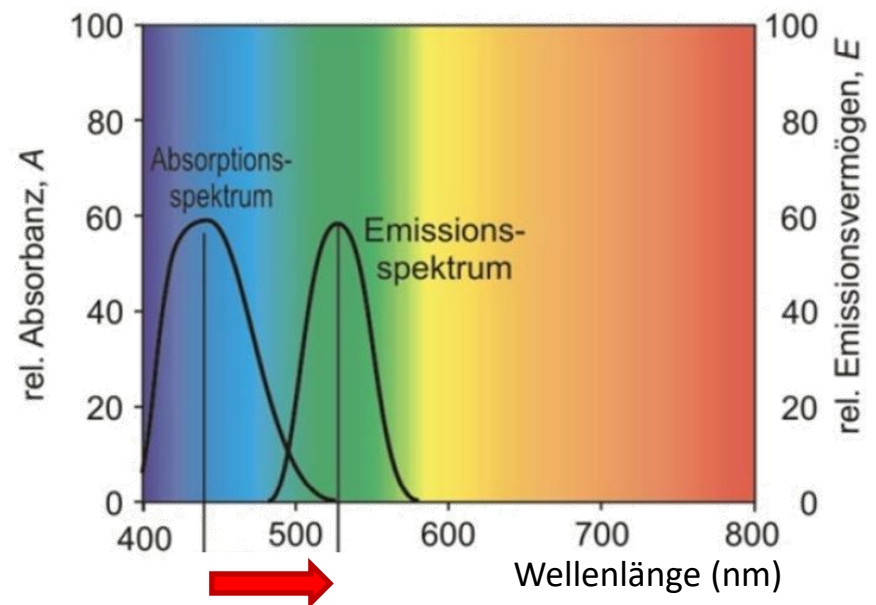
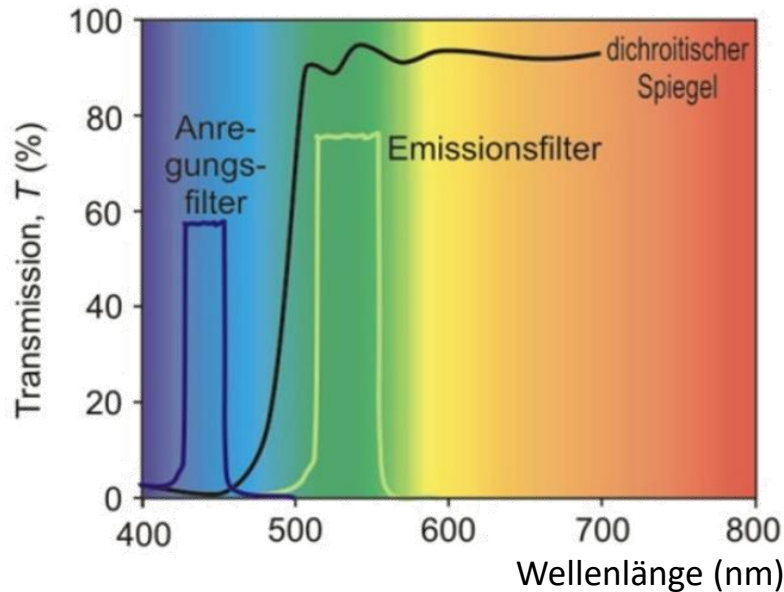
## Physikalische Grundlagen:



**Stokes-Verschiebung:**

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

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



# Fluoreszenzmikroskop 3.

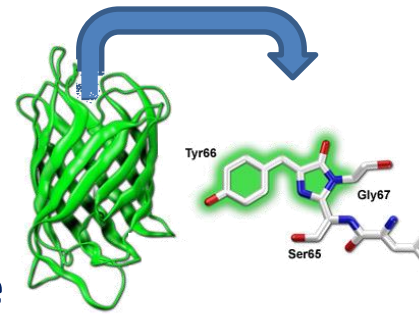
## Angewandte fluoreszierende Farbstoffe:

### Intrinsic Fluorophore: „Eigenfluoreszenz“

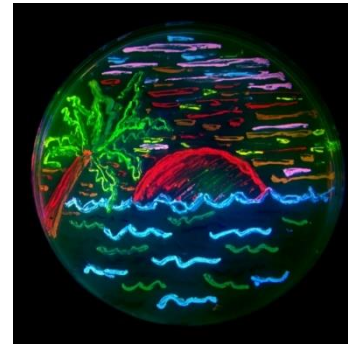
- Tryptophan, Tyrosin, Porphyrine

### Extrinsic Fluorophore: fluoreszierende Stoffe

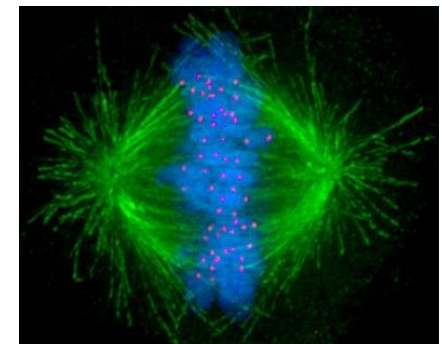
- **Der ideale Fluorophor:**
  - klein
  - hydrophil
  - emittiert im sichtbaren Lichtbereich
  - große Stokes-Verschiebung
  - spezifische Bindung
  - verursacht keine photochemische Reaktionen
- **fluoreszierende Proteine:**
  - GFP: Green Fluorescent Protein
  - FMN-bindende: Flavinmononukleotid



Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

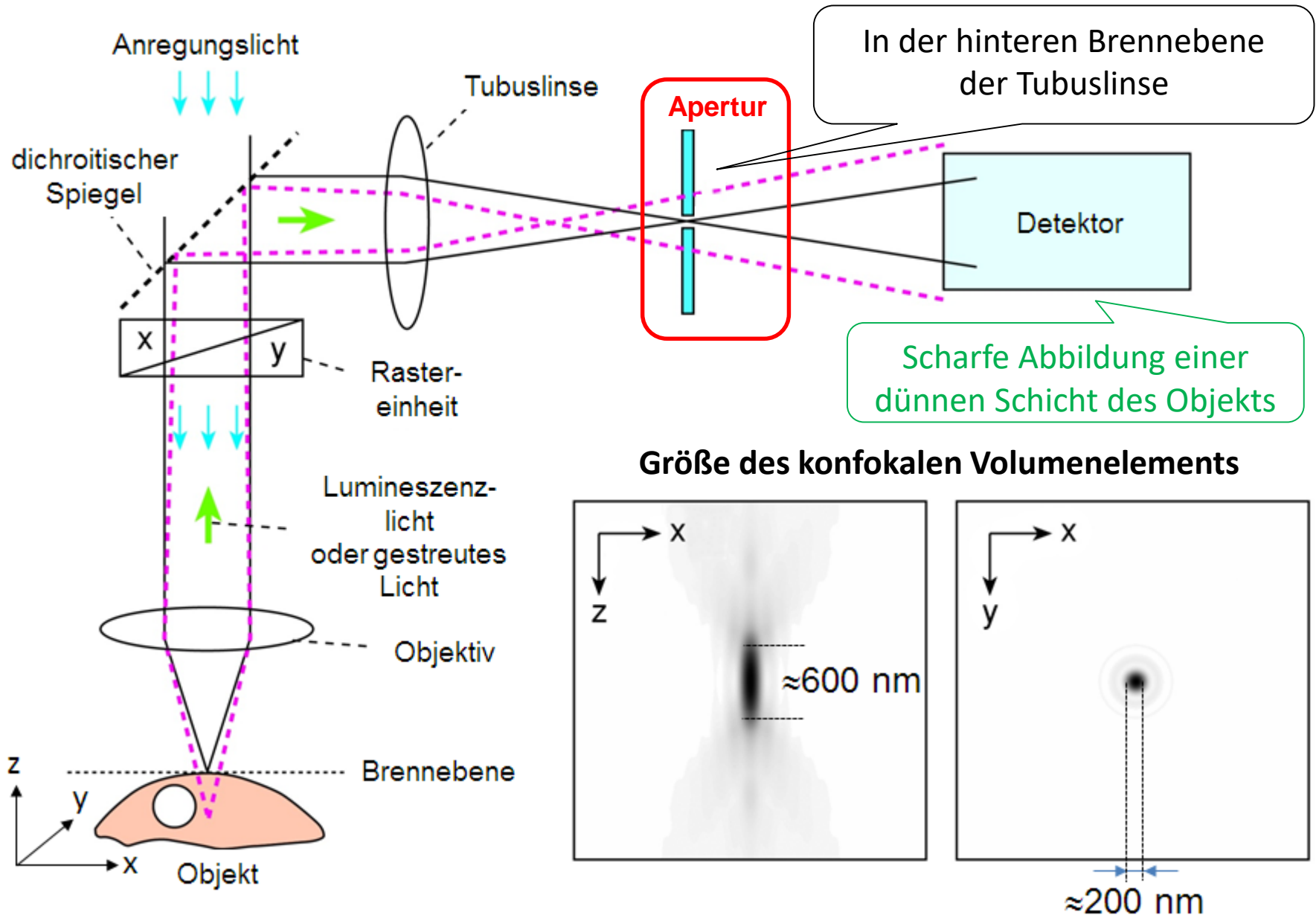


Bakterienkulturen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren



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

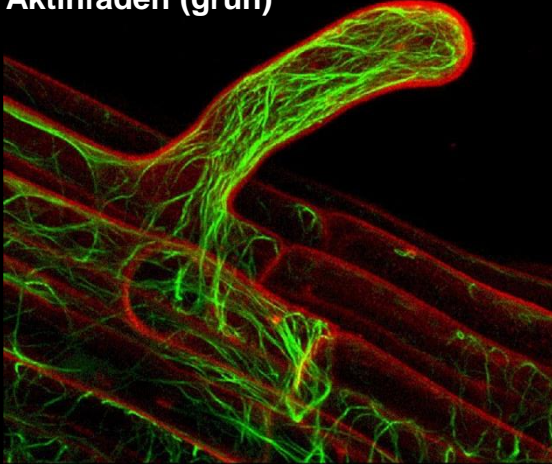
# Konfokales Laser Rastermikroskop (CLSM)



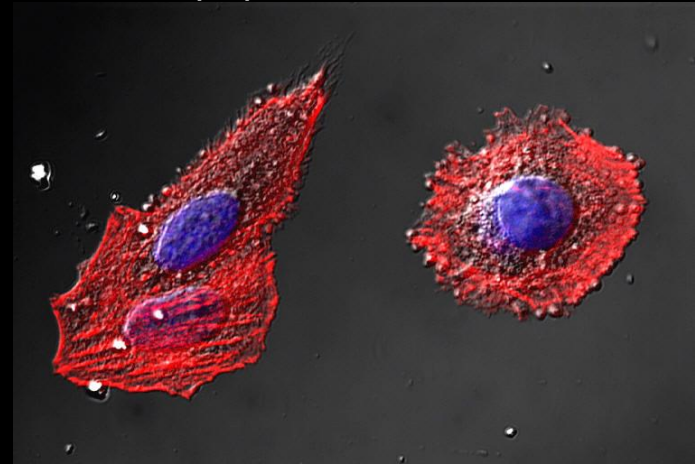


# Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 1.

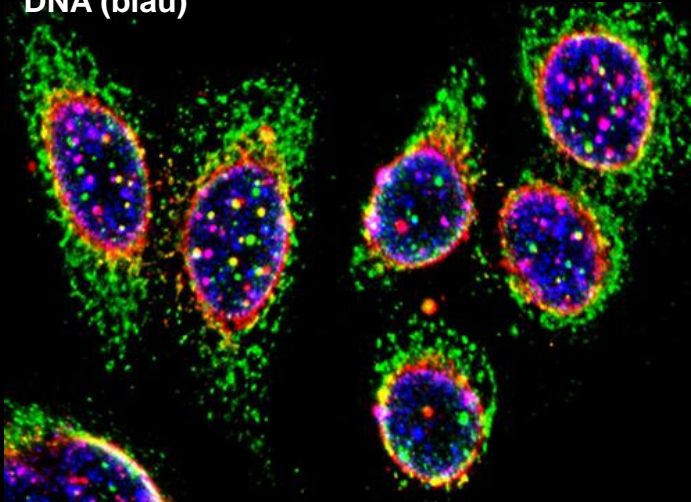
Aktinfaden (grün)



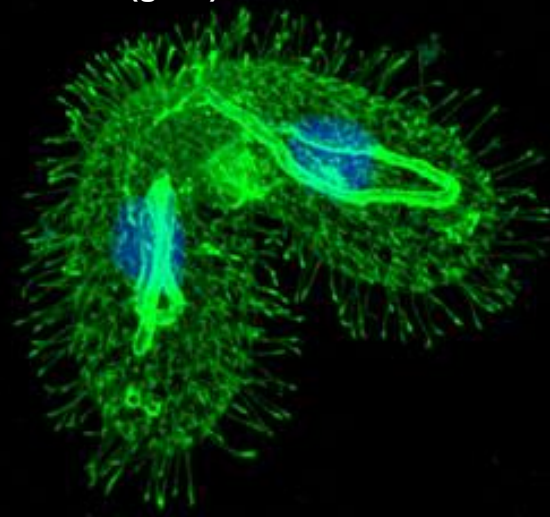
Aktinfaden (rot)



DNA (blau)



Mikrotubuli (grün)





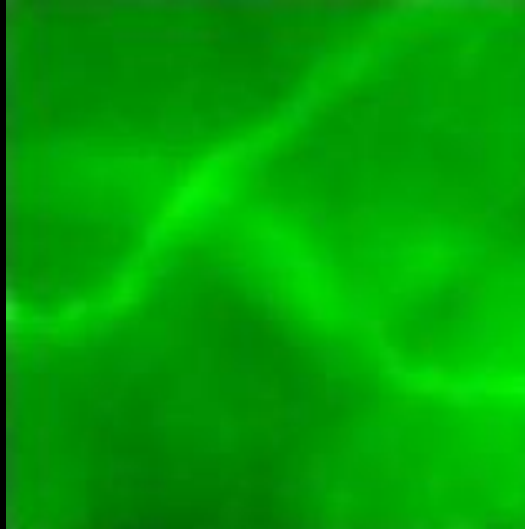
# Beispiele: CLSM-Aufnahmen – 2.

Fluoreszenzmikroskop

Medulla



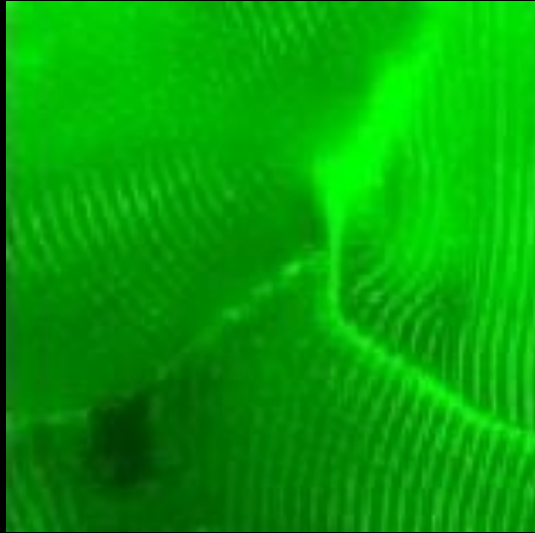
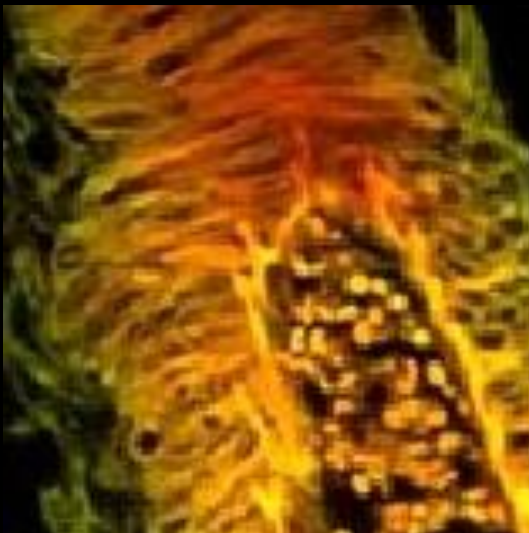
Skelettmuskel



Pollen



CLSM



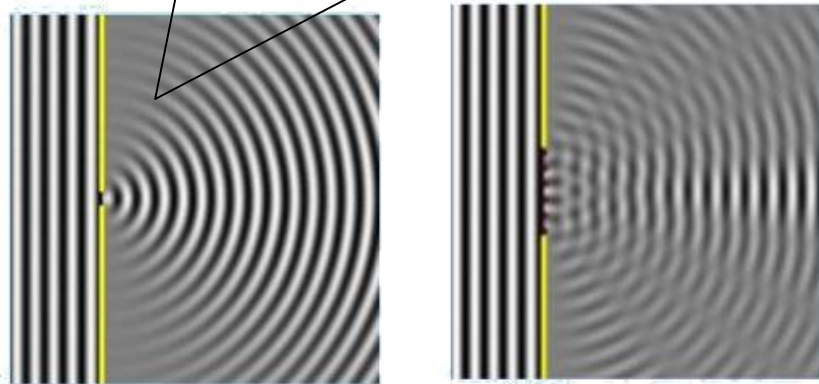
# **Superresolutionsmikroskope**

# Grundproblem – 1.

## Beugung des Lichtes:

### Huygensches Prinzip:

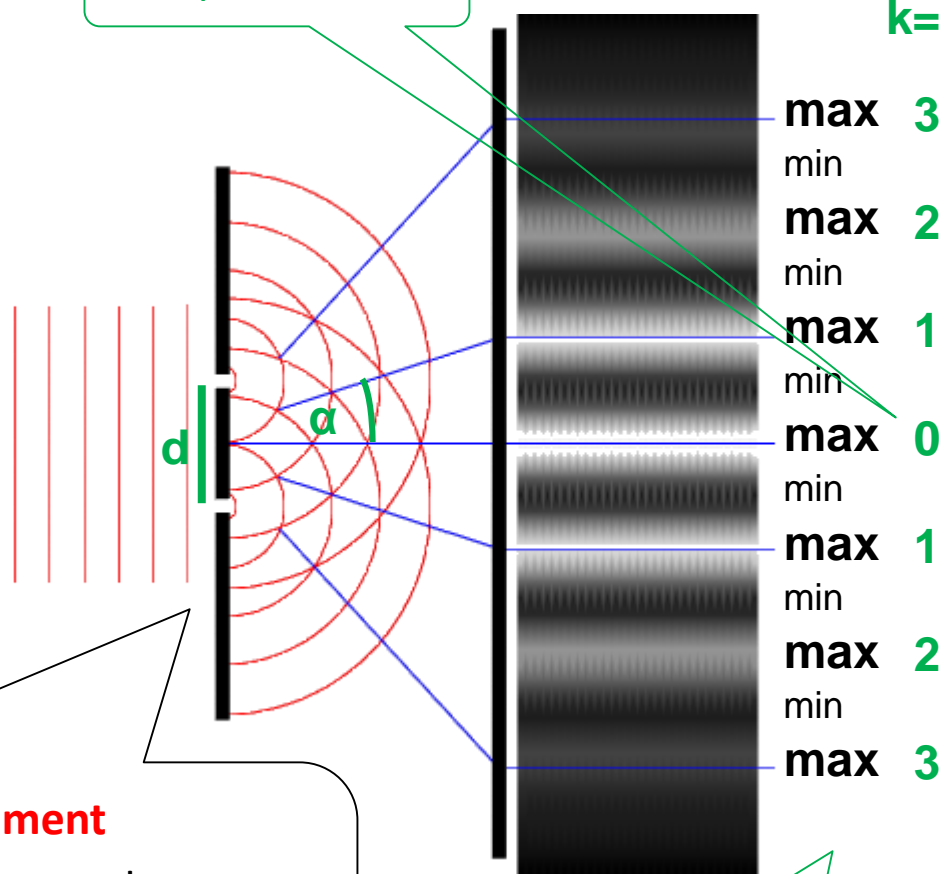
jeder Punkt einer Wellenfront dient als Ausgangspunkt einer neuen Welle



### 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)**.

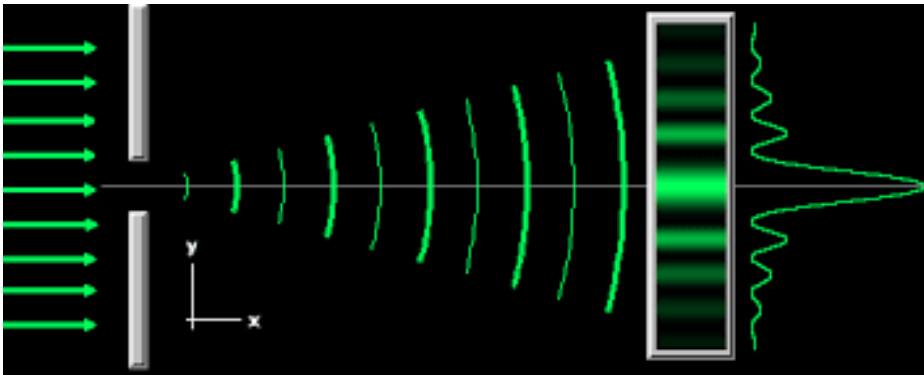
Hauptmaximum



Maximale Verstärkung:  
 $k \cdot \lambda = d \cdot \sin(\alpha)$

# Grundproblem – 2.

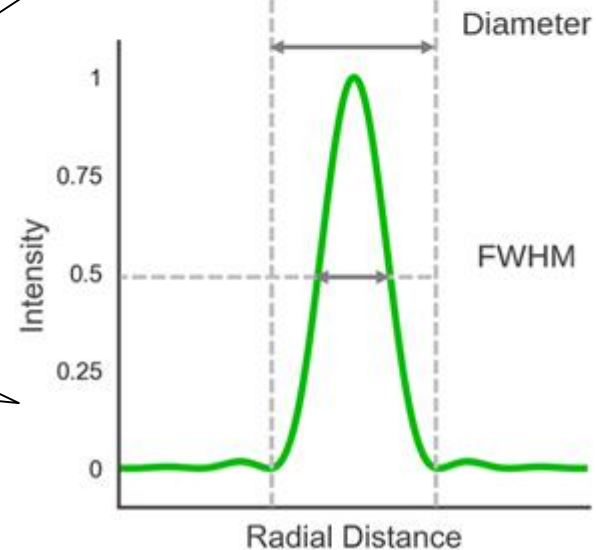
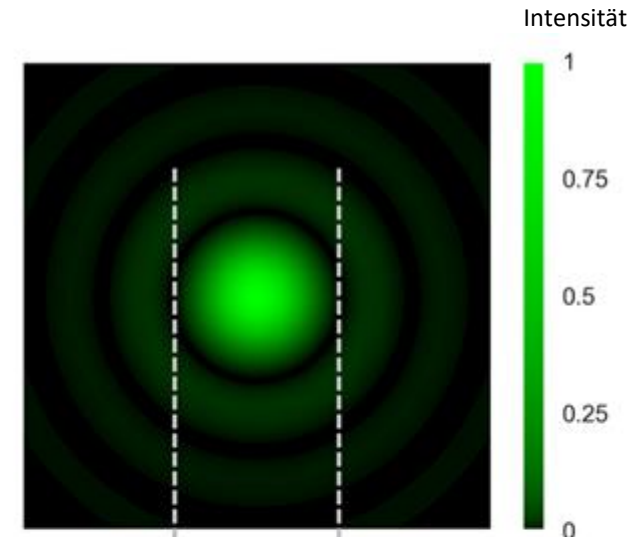
## Entstehung der Beugungsscheiben:



### **Airy-Scheibe:**

zentrales Maximum, umgeben von  
Ringen abnehmender Intensität.

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



# Grundproblem – 3.

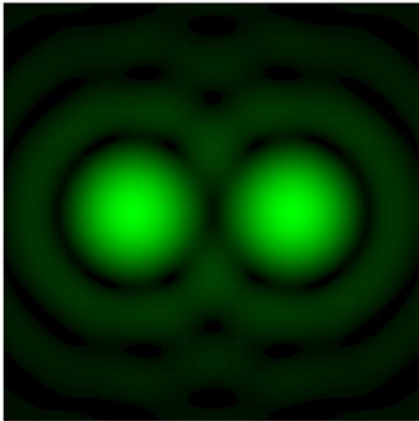
**Rayleigh-Grenzfall:**

## Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops:

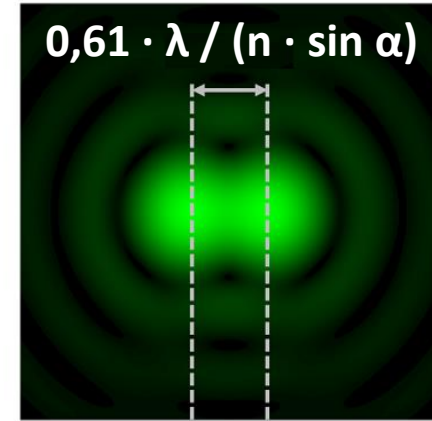
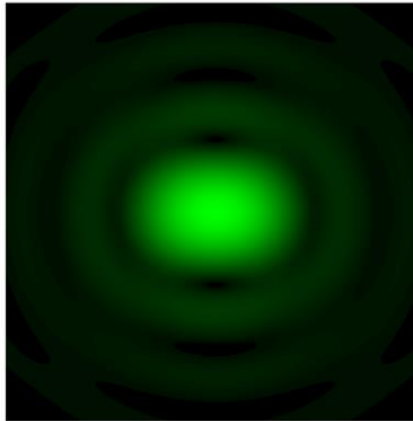
Hauptmaximum stimmt mit dem ersten Minimum der benachbarten

Beugungsscheibe

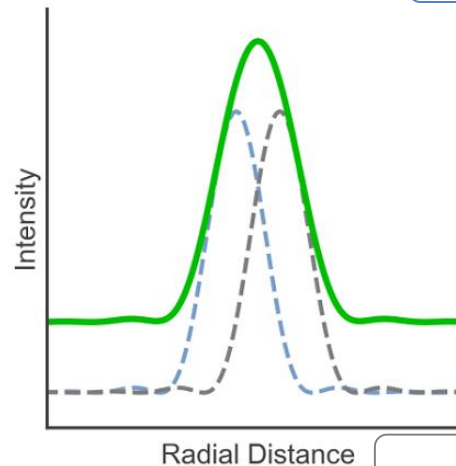
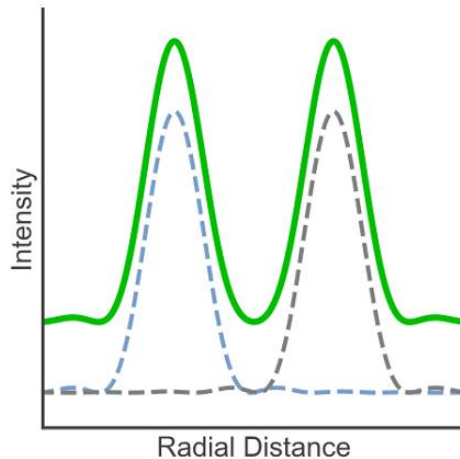
**auflösbar**



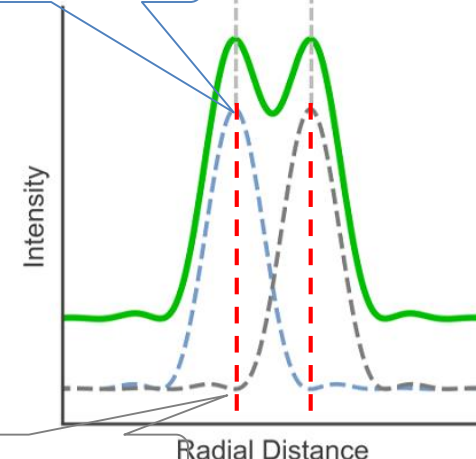
**nicht mehr auflösbar**



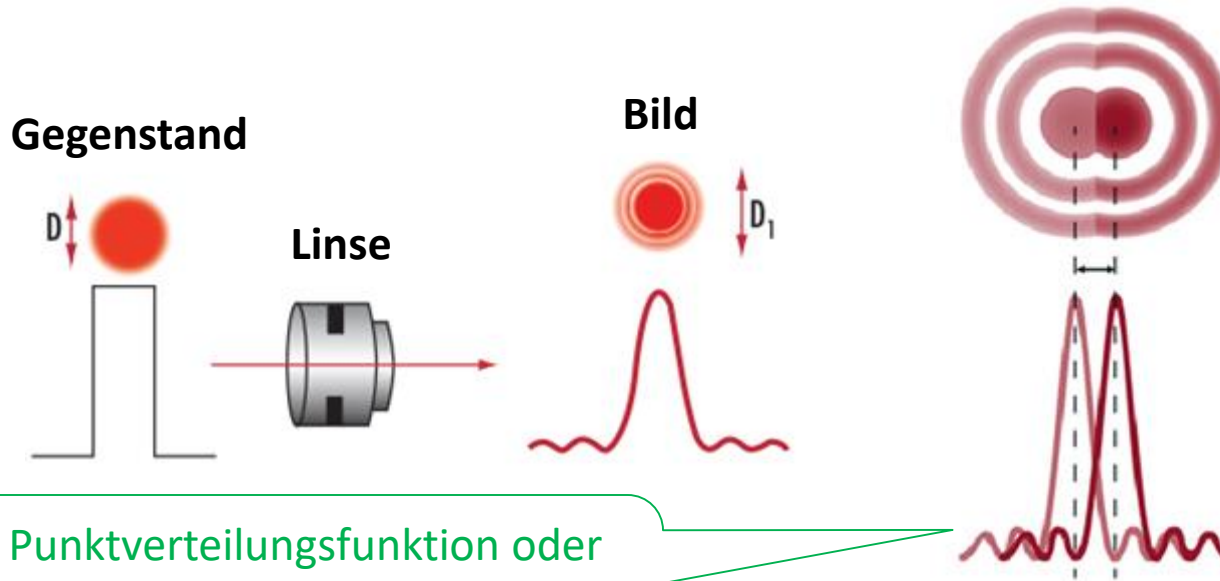
Hauptmaximum



erstes Minimum



# Lichtmikroskop



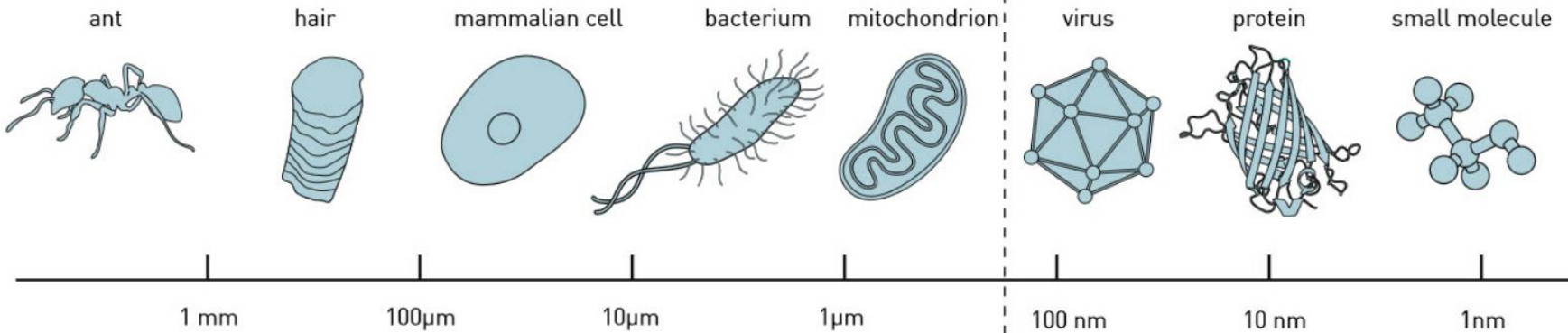
## Das Abbesche Prinzip:

Auflösungsgrenze des  
Lichtmikroskops:

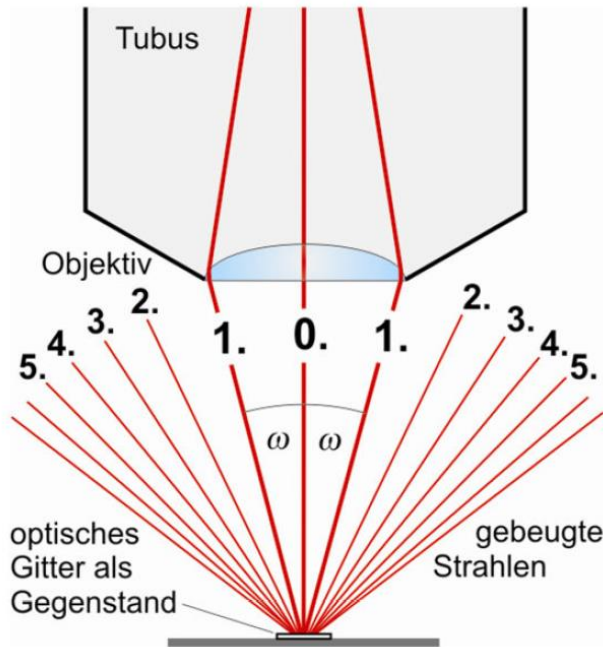
$$\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \omega}$$

Numerische Apertur  
(NA)

Abbe-Limit bei ~200 nm



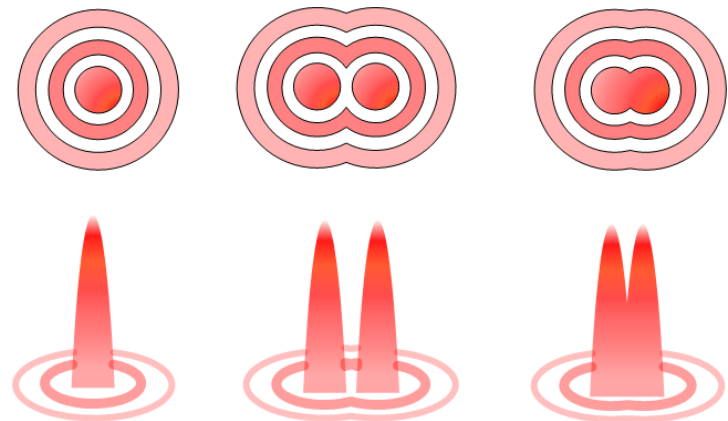
# Abbe-Prinzip, Punktverteilungsfunktion



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

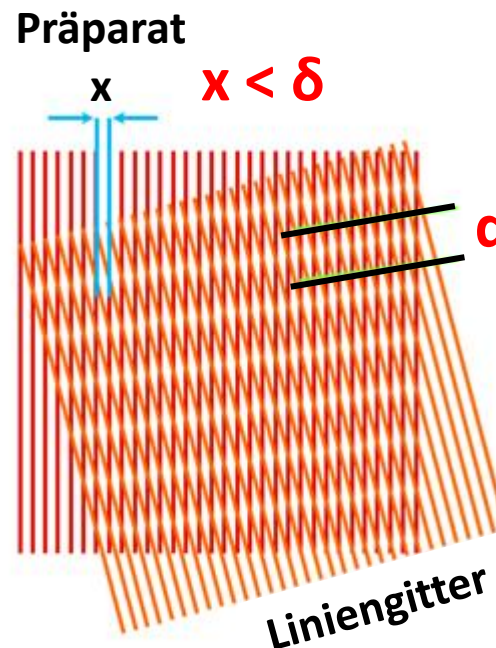
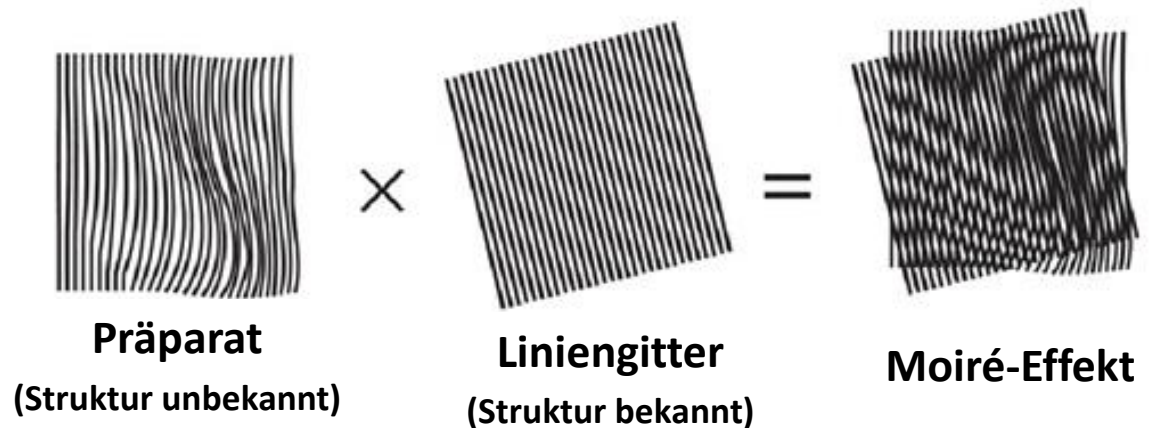
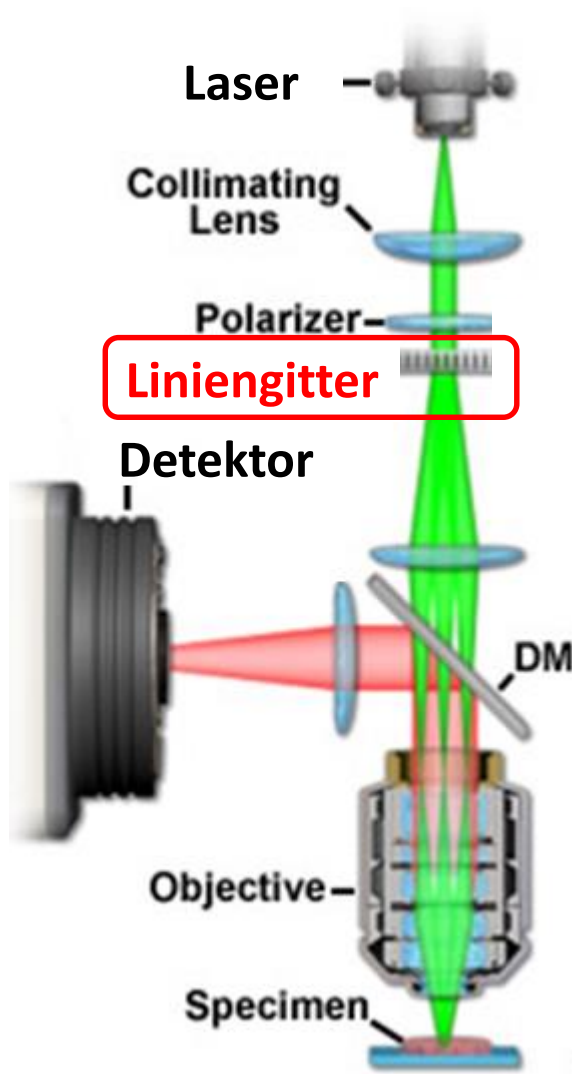
$$\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \omega}$$

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

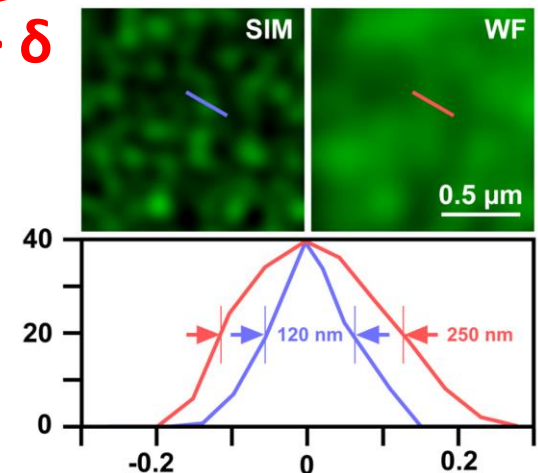




# Structured Illumination Microscopy (SIM)



Struktur auflösbar

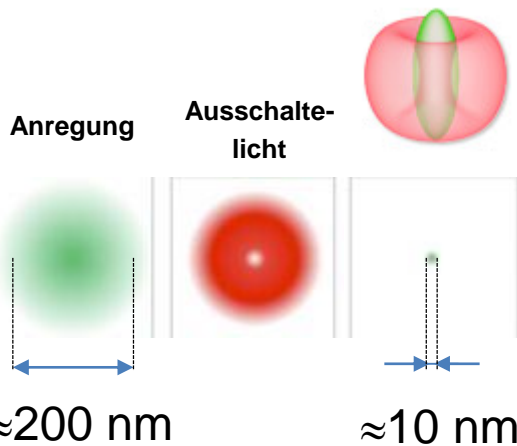
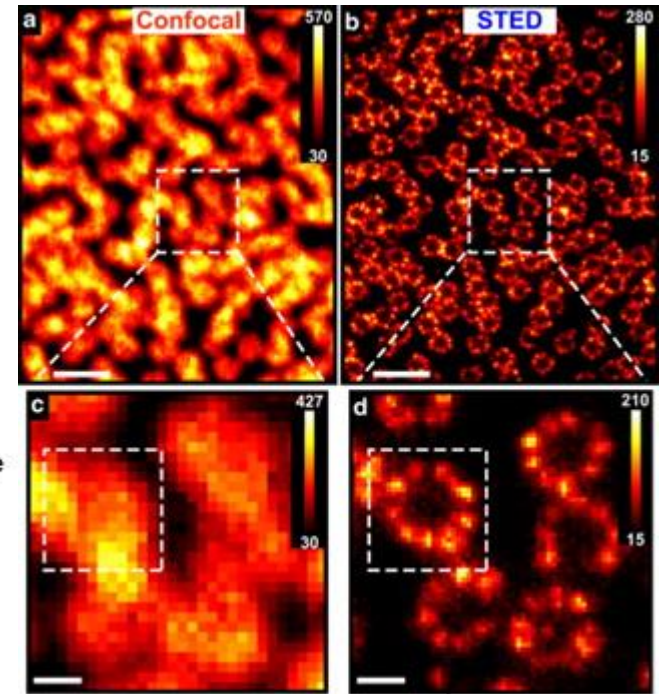
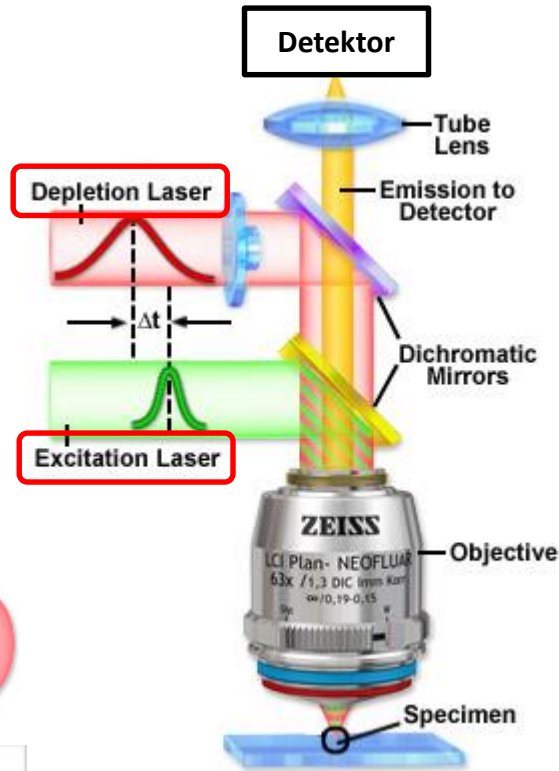


# Stimulierte Emission Depletion Mikroskopie (STED)



**Stefan W. Hell**

Nobel Preis 2014

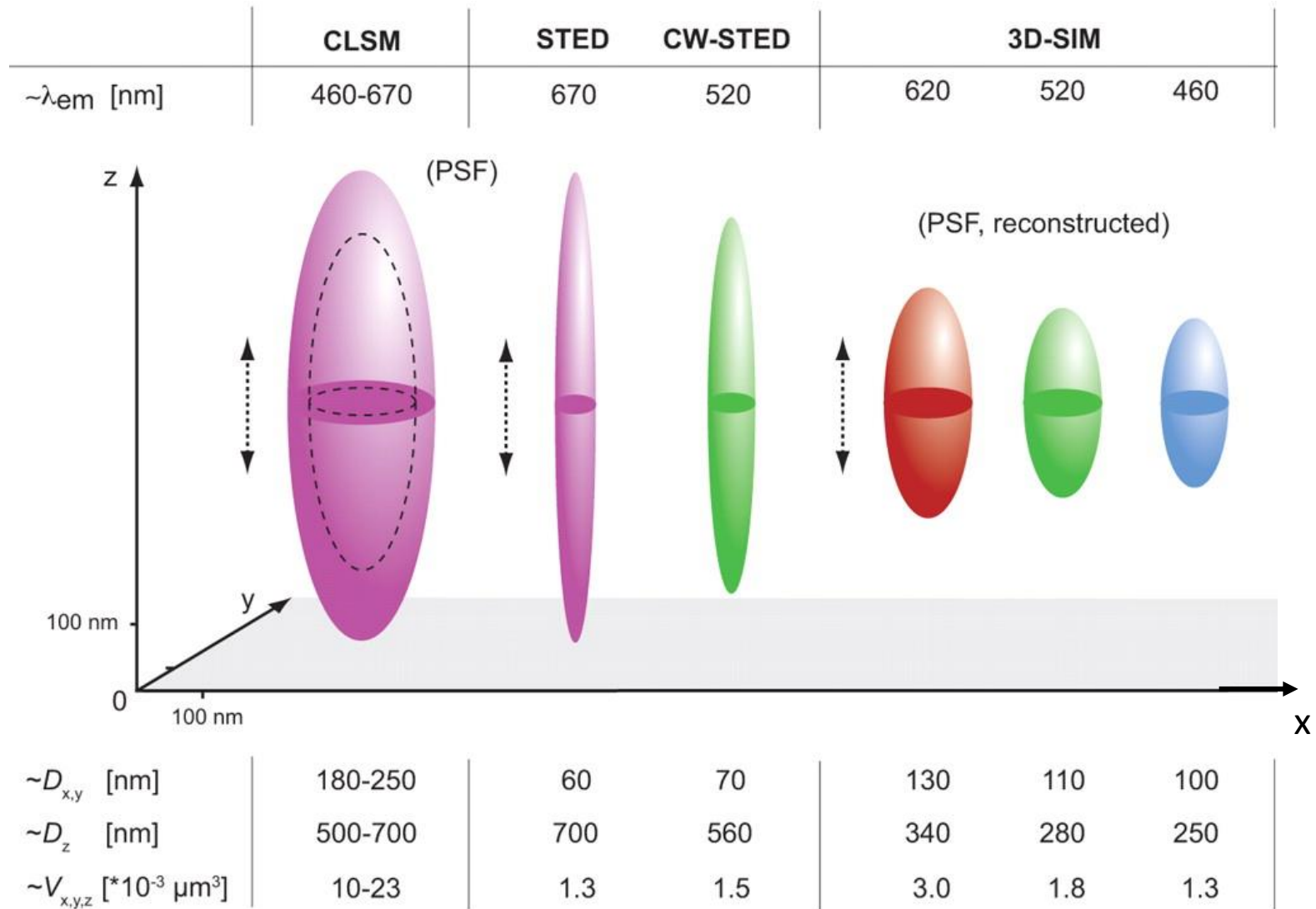


**Abbe-Grenze**

**Superresolution**

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

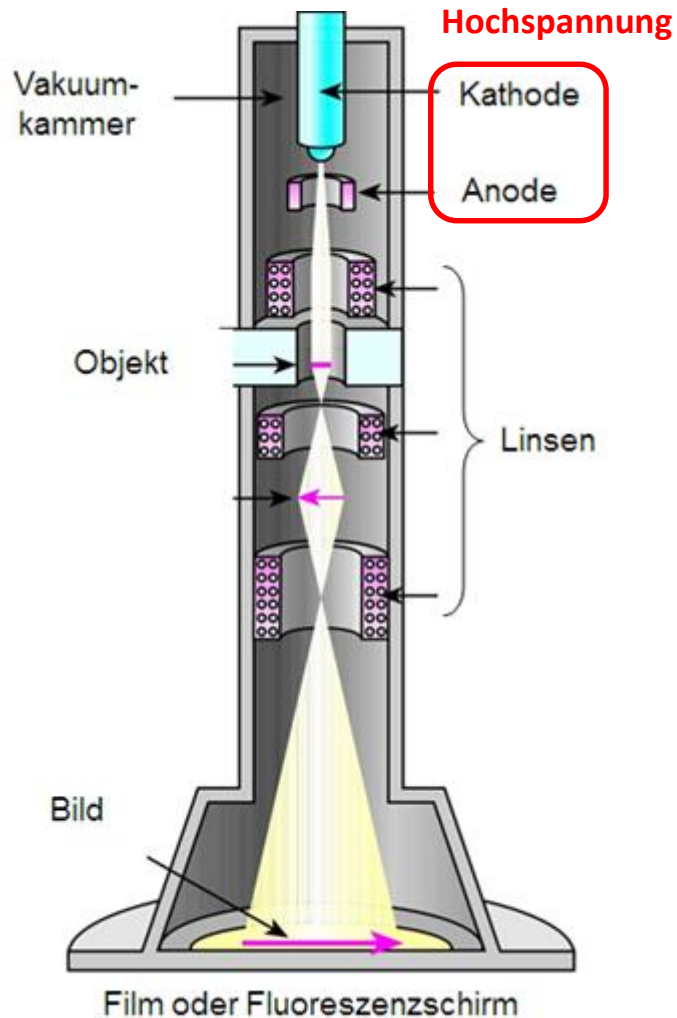
# 3D-Auflösung der Spezialmikroskope



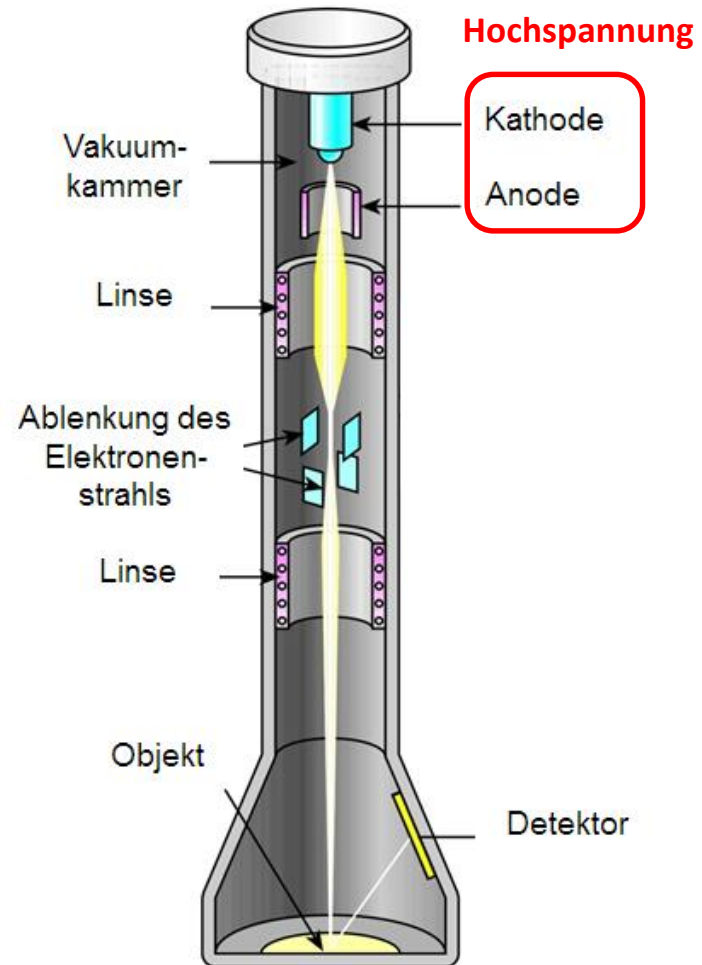
# Elektronenmikroskopie

# Elektronenmikroskope

## Transmissions- Elektronenmikroskop (TEM)



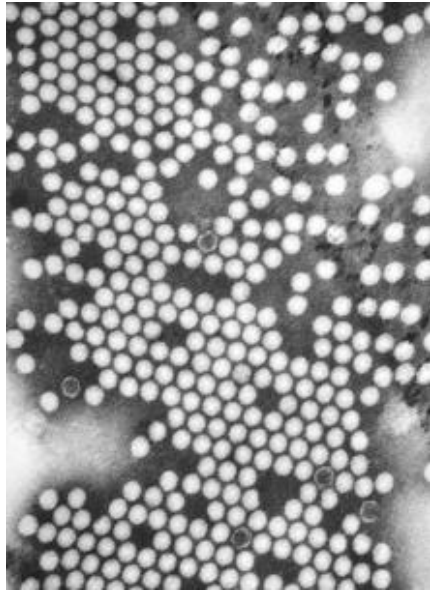
## Raster- Elektronenmikroskop (SEM)



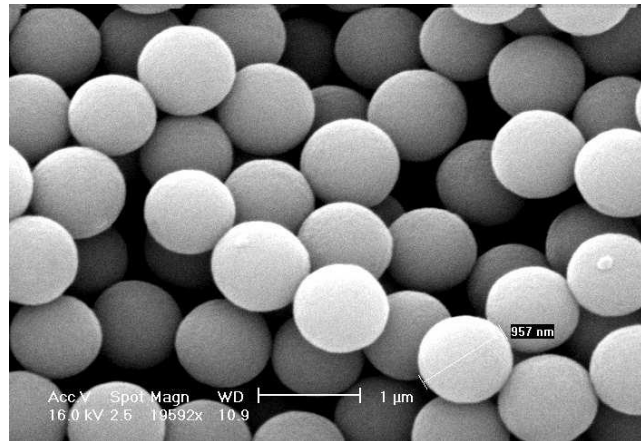


# Elektronenmikroskope – Grundprinzip, Beispiele

Viren der Kinderlähmung (TEM)



TiO-Kugelchen (SEM)



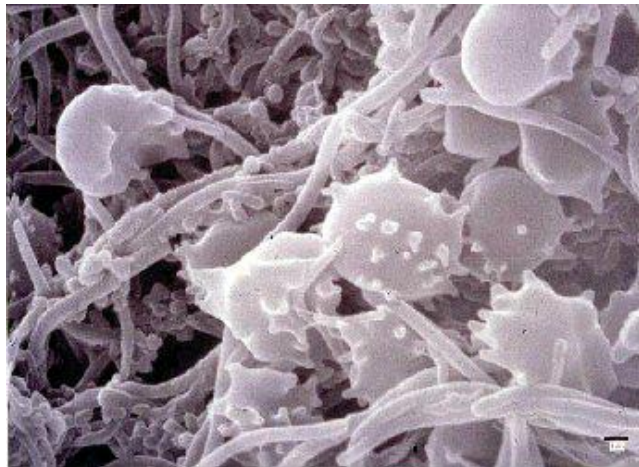
Auflösungsgrenze ( $\delta$ ):

$$\left. \begin{array}{l} \delta \approx \frac{\lambda}{NA} \\ NA \approx 0,03 \\ \lambda \approx 0,005 \text{ nm} \end{array} \right\} \delta \approx 0,2 \text{ nm}$$

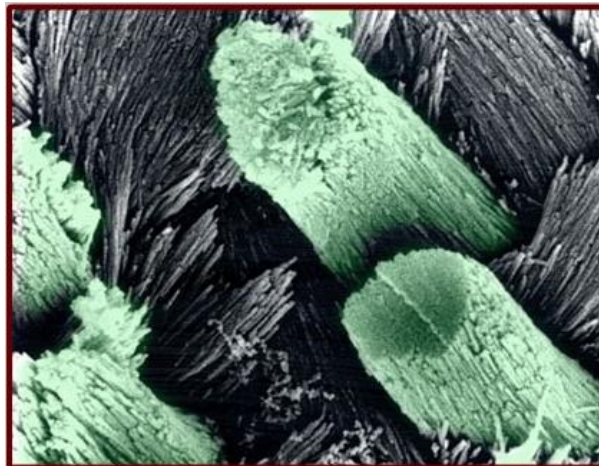
s. Materiewellen

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

Zahnplaque (SEM)



Zahnschmelzprismen mit den Apatitkristallen (SEM)



Dentin mit den Odontoblasten (SEM)

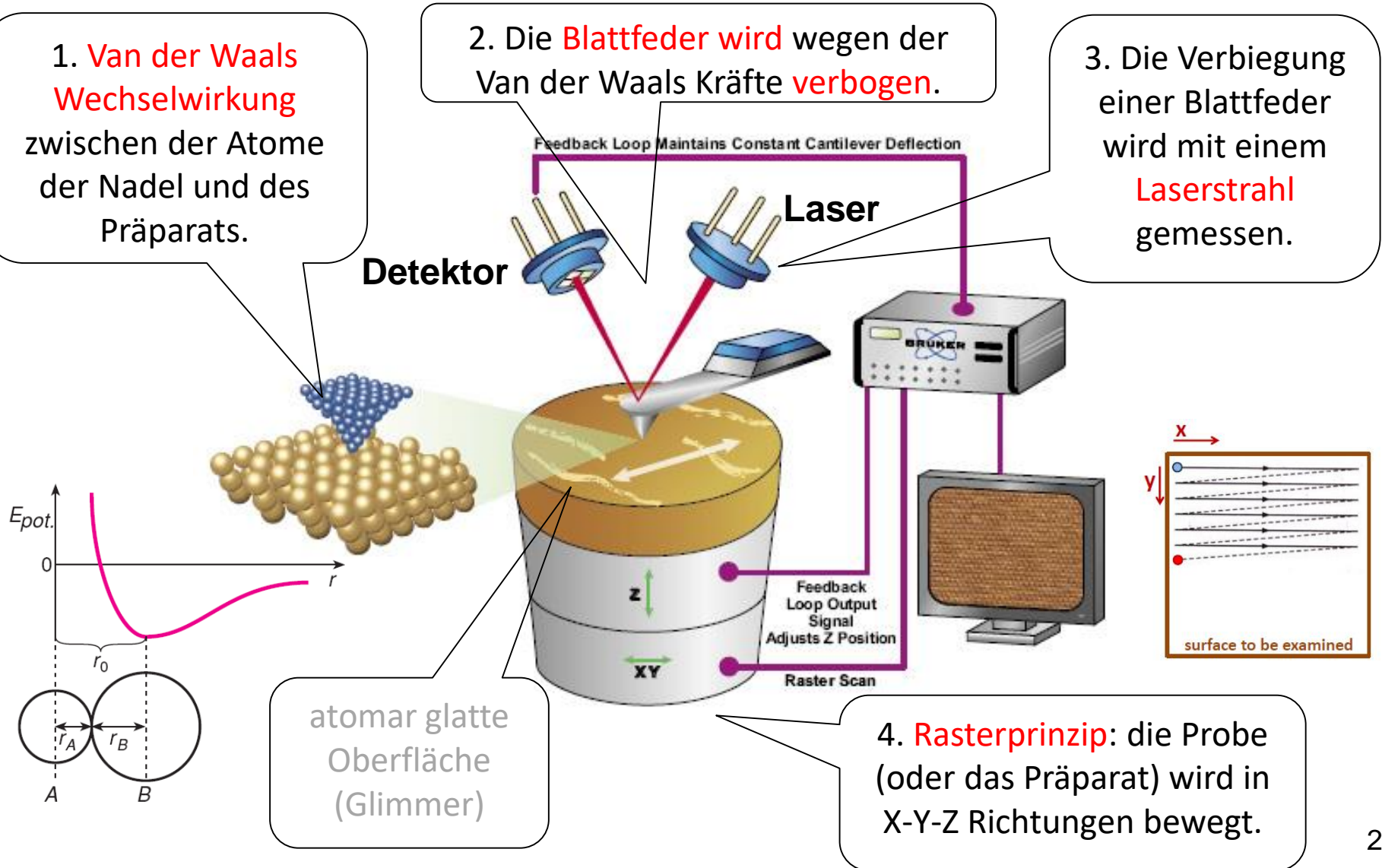


# **Rastersondenmikroskopie**

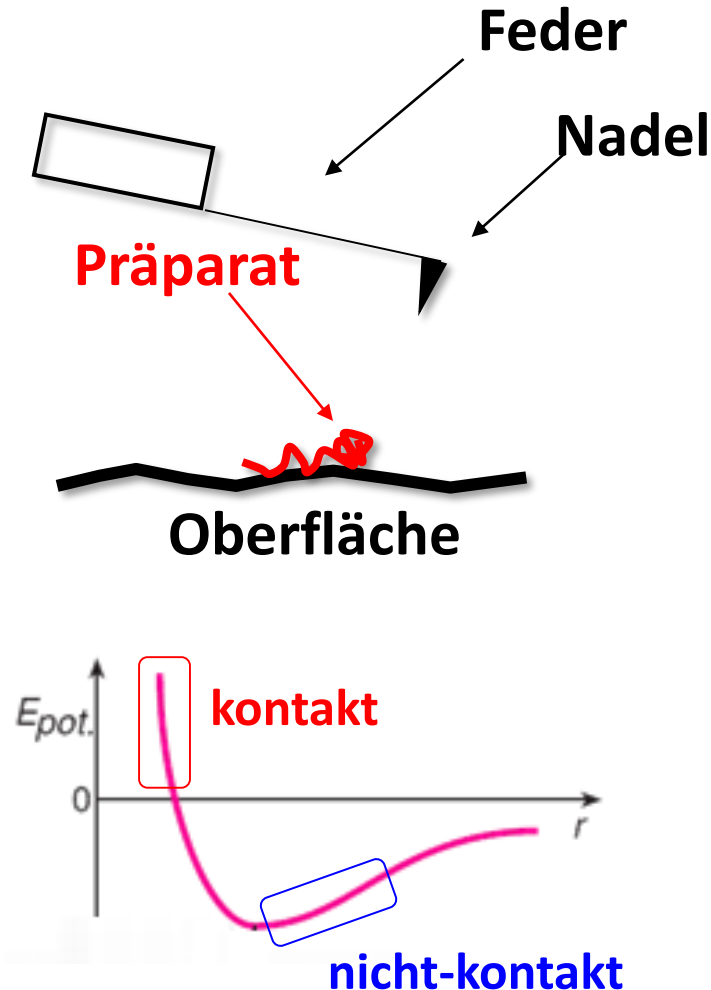


# Rasterkraftmikroskop

## (Atomic Force Microscope, AFM)



# AFM Betriebsarten



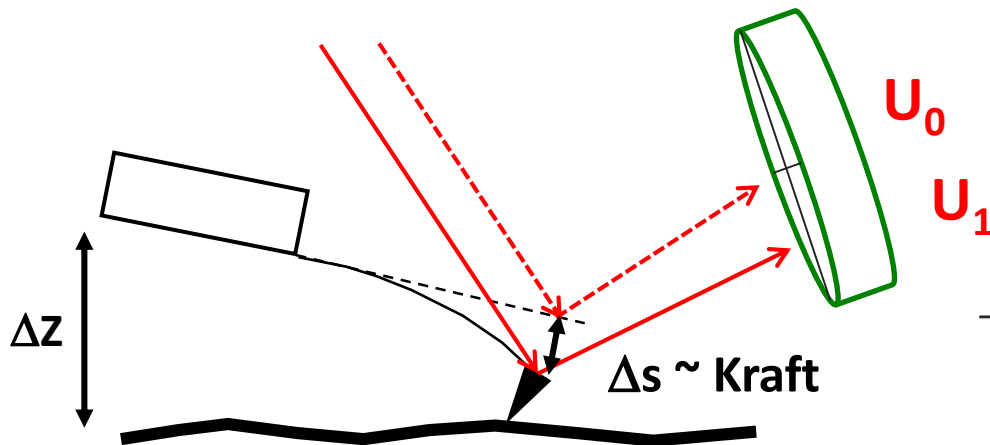
- **Kontakt:** die Messspitze steht in direktem mechanischem Kontakt mit dem Präparat, die **Auslenkung der Feder** liefert die topographische Information.
  - **Z-Rückkopplung:** die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe wird mit dem „Setpoint“ verglichen. Die Regelung bewirkt dann eine Höhenänderung bis die Auslenkung dem Setpoint entspricht.
  - **Die topographische Information** (zB. Höhe) wird in jedem X-Y Bildpunkt aus der  $\Delta Z$  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  $\Delta Z$  Höhenänderung des Cantilevers.

# AFM: Kontakt-Modus

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

Laserstrahl

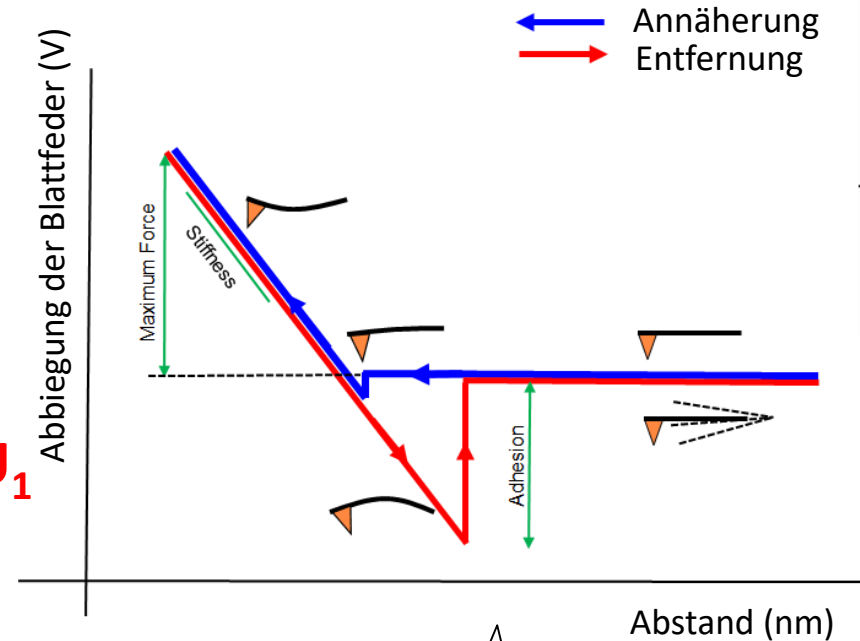
Detektor  
(Photodiode)



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

$\Delta s$ : Abbiegung der Blattfeder

D: Federkonstante

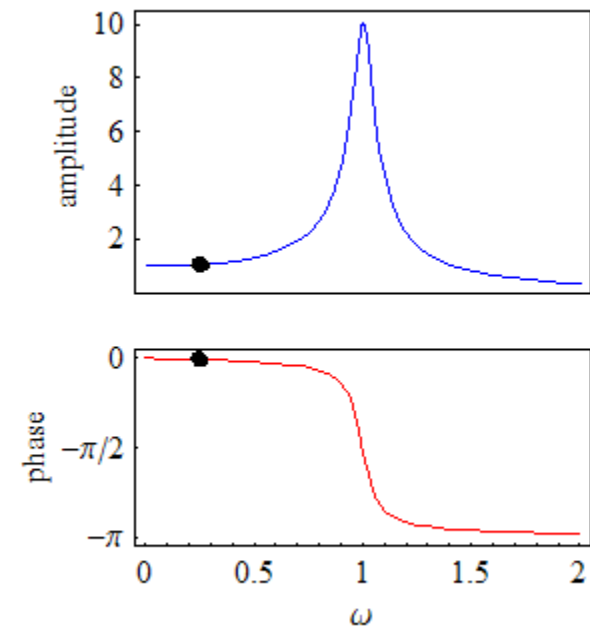
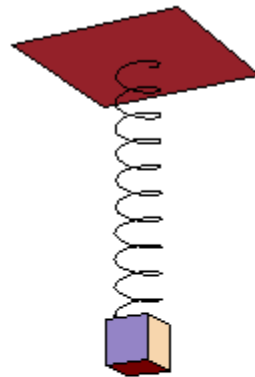


Kraftmessung /  
Elastizitätsmessung an  
biologischen Präparaten

# AFM: Nicht-Kontakt-Modus

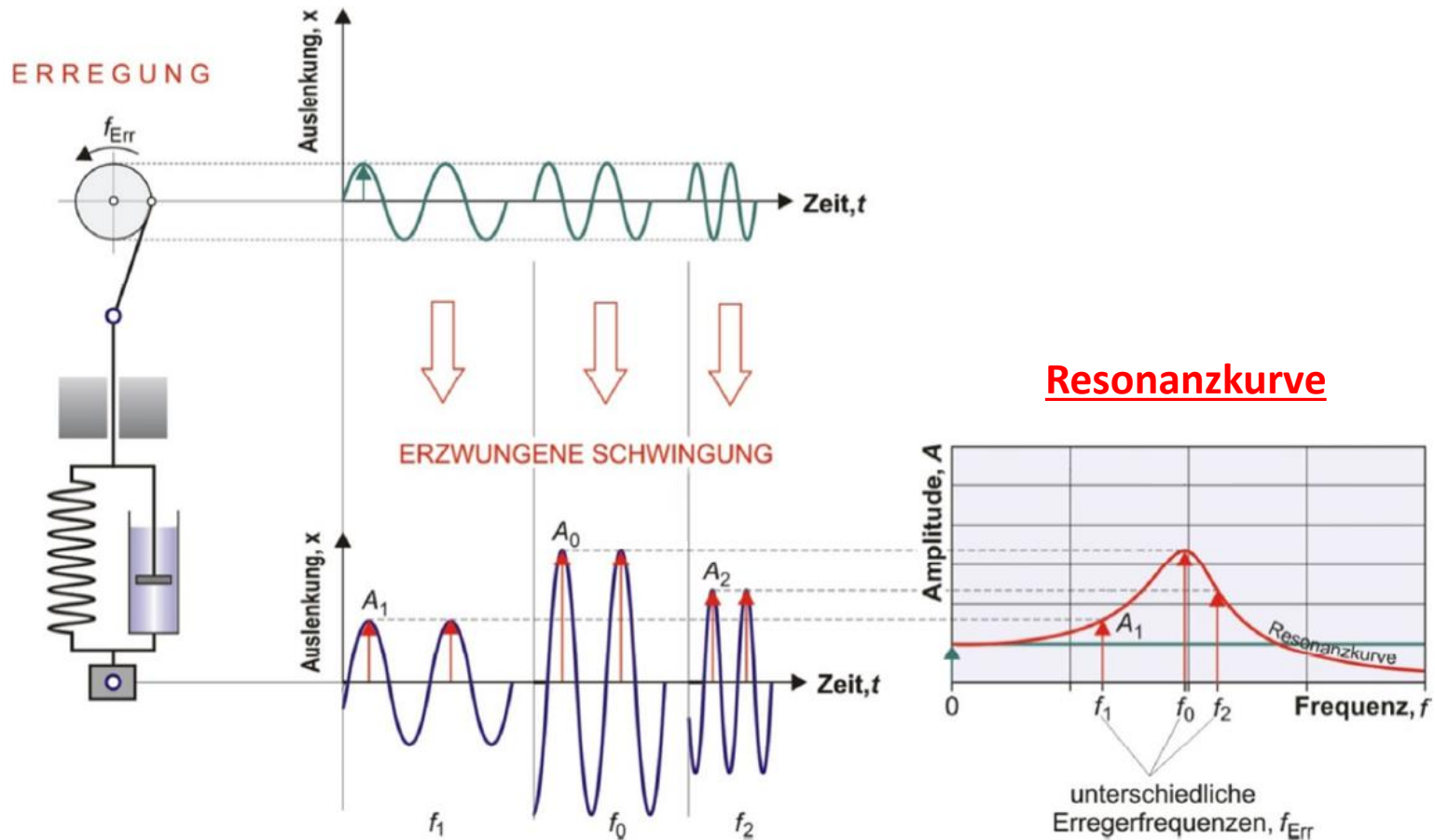
**Resonanz:** Eine erzwungene Schwingung, bei der die Frequenz der äußeren Krafteinwirkung nahe der Eigenfrequenz des Schwingungssystems liegt. In diesem Fall können sehr große Amplituden auftreten.

## Erzwungene Schwingung

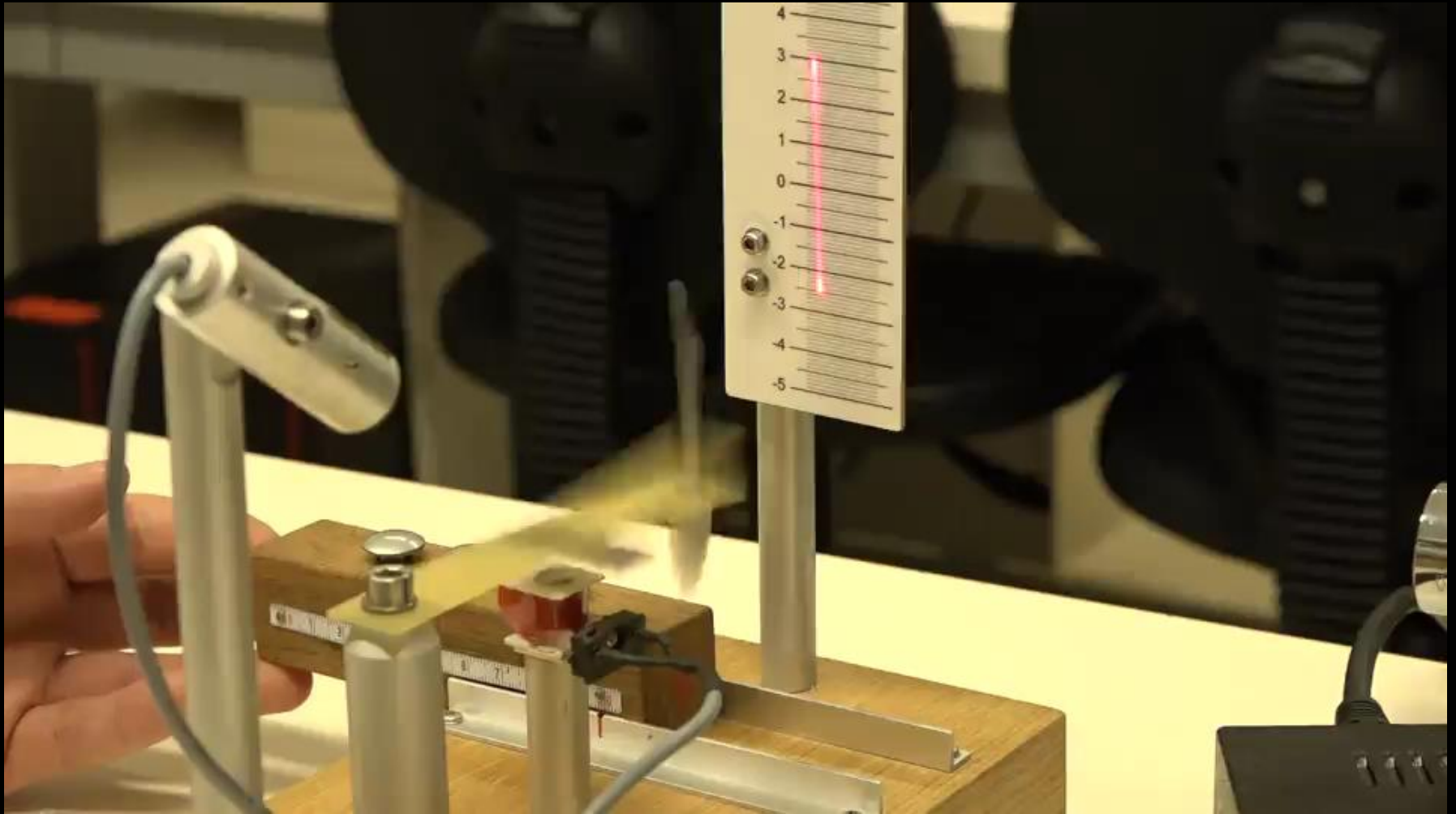


# AFM: Nicht-Kontakt-Modus

**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.

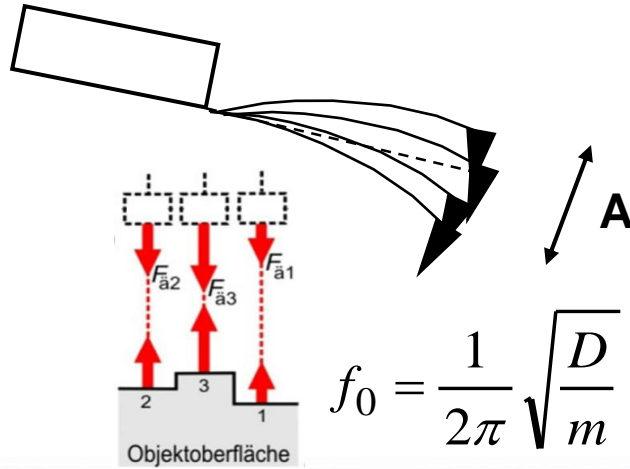


# AFM Modell: Nicht-Kontakt-Modus

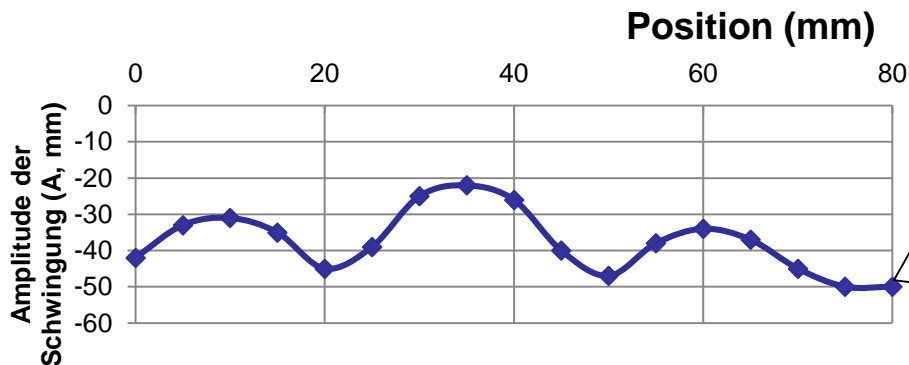
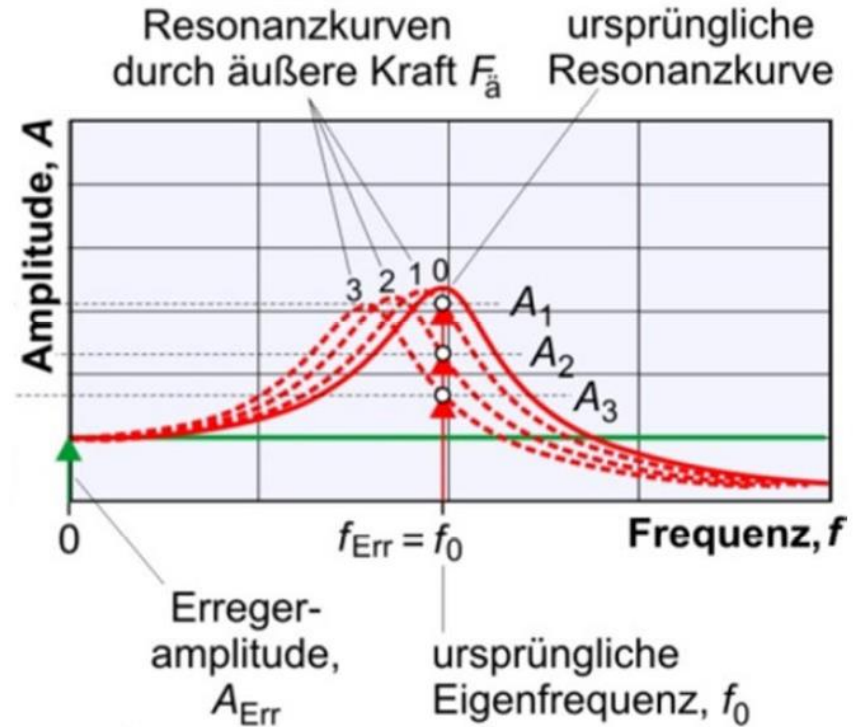
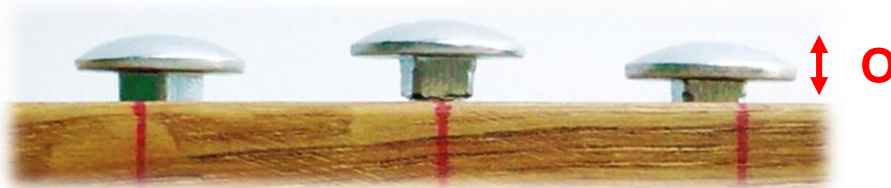


**N.B.: magnetische Wechselwirkung modelliert die Van der Waals Kräfte**

# AFM: Nicht-Kontakt-Modus



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



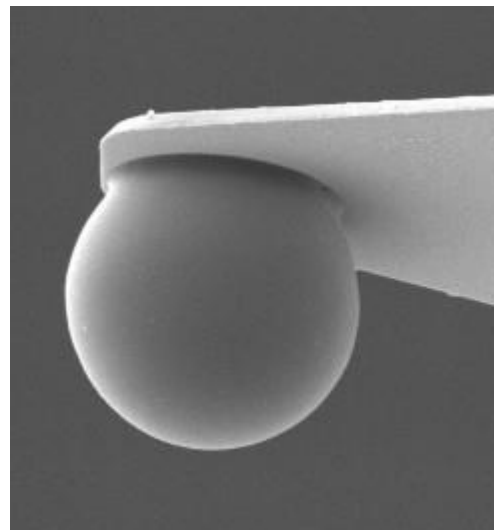
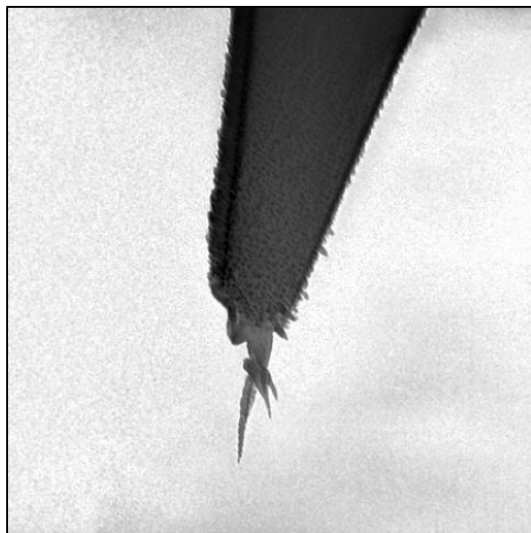
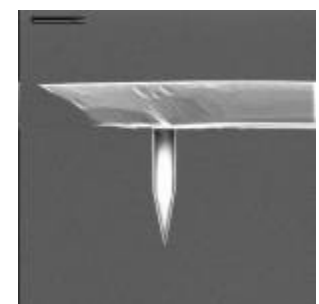
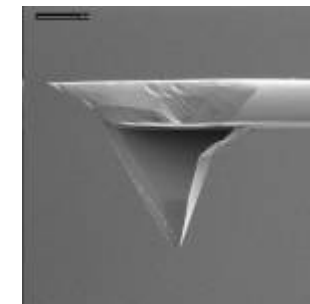
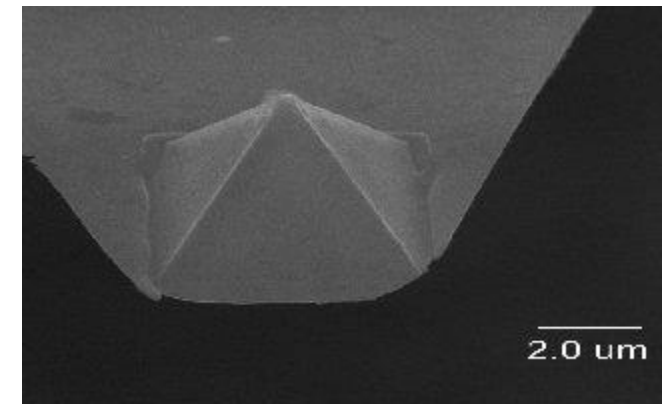
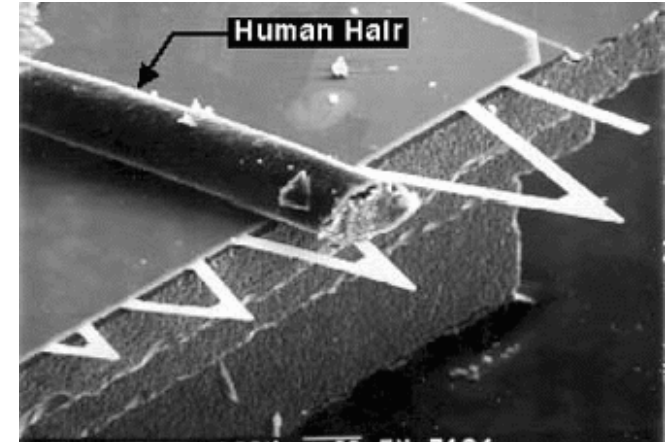
Amplitude  
 $\neq$   
Objekthöhe

Objekthöhe kann  
nur durch  
Rückkopplung  
gemessen werden.



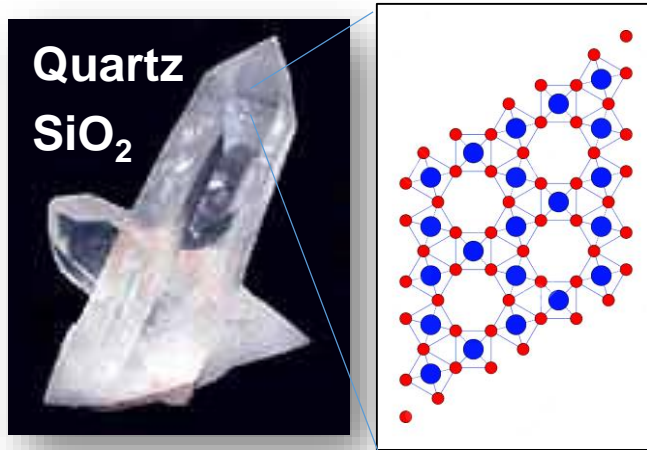
# Blattfeder / Cantilever

- Material: Siliciumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_2$ )
- Krümmungsradius: 0,1 nm- 100  $\mu\text{m}$
- Federkonstante  $\sim 0,1\text{-}10 \text{ N/m}$
- $f_0 \sim 50\text{-}500 \text{ kHz}$

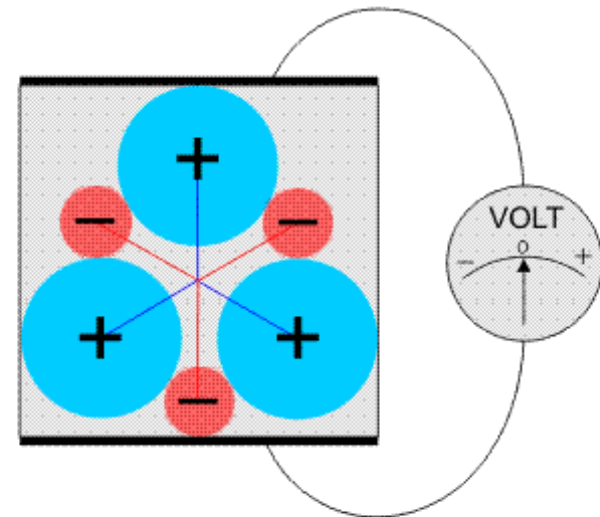


# AFM - Abbildungsartefakten

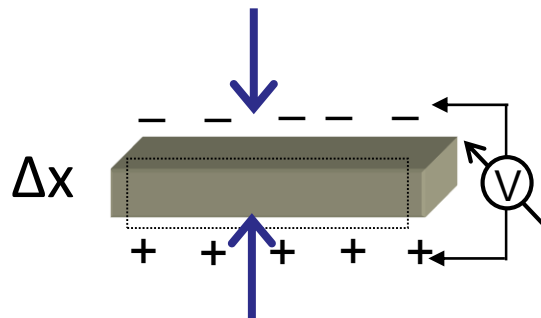
# Das Rasterprinzip: Piezoelektrizität



● Si  
● O



Deformation



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

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

## Inverser piezoelektrischer Effekt:

Spannung  $\rightarrow$  Deformation

X, Y, Z Piezotransducer:  $150 \text{ V} \rightarrow 40 \mu\text{m}$

präzise  
Schrittgröße:  
0,1 nm

# AFM - Eigenschaften

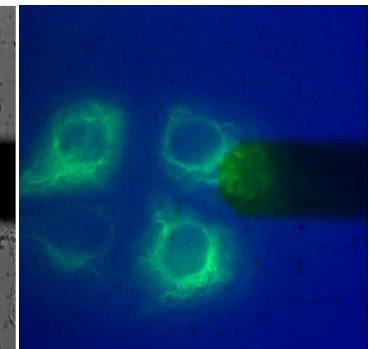
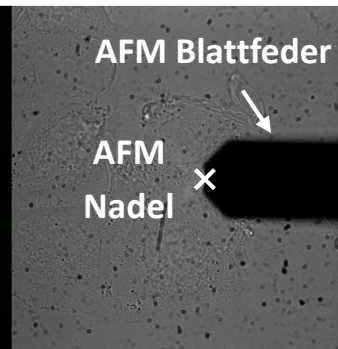
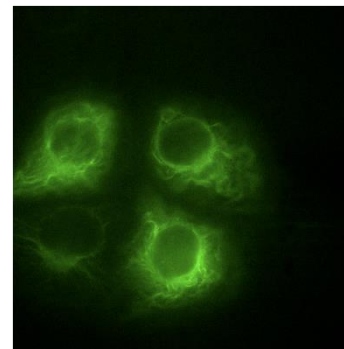
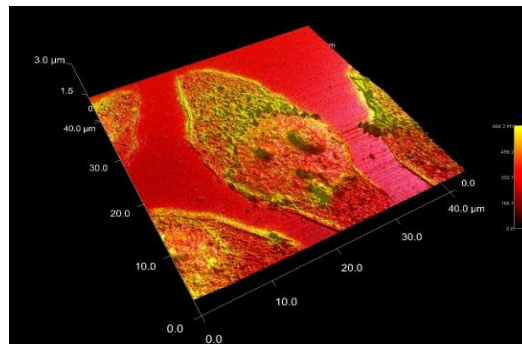
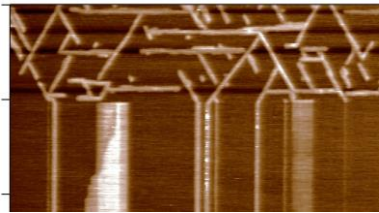
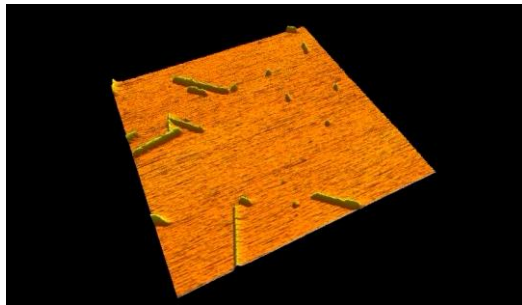
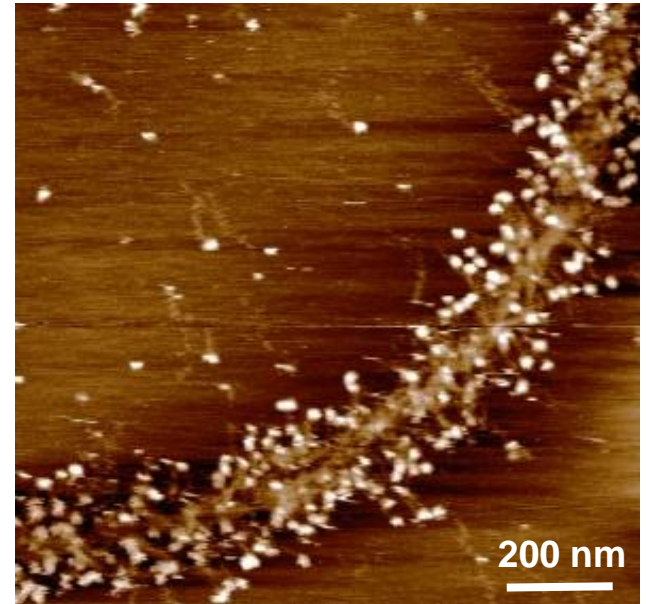
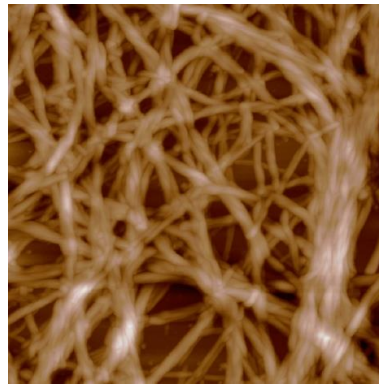
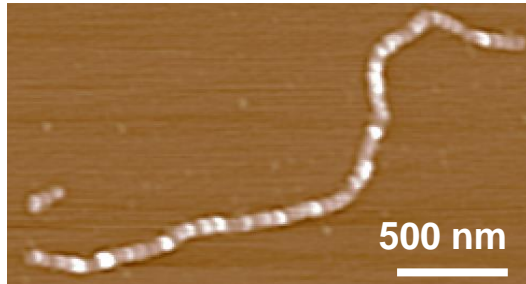
- **Vorteile:**

- 3D topographische Abbildung mit hoher Auflösung.
- Vertikale Auflösung ist im  $\sim 10$  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  $\mu\text{m}$ -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



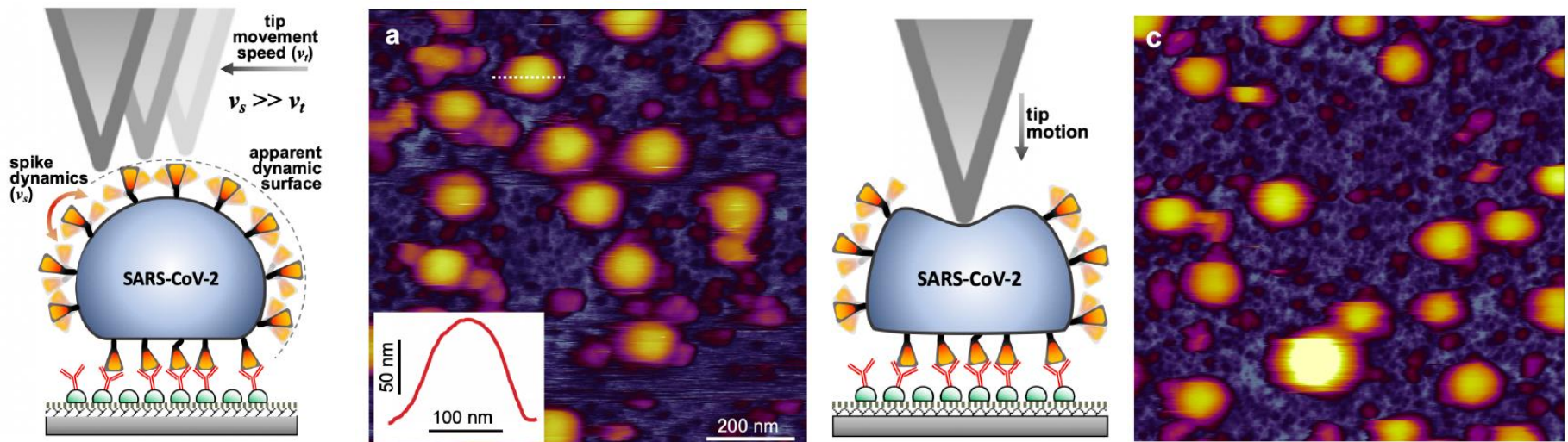


# Natives SARS-CoV-2 Virus abgebildet mit AFM

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

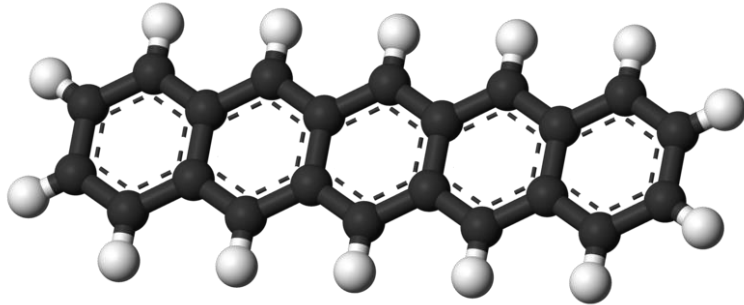
Bálint Kiss<sup>1#</sup>, Zoltán Kis<sup>2,3#</sup>, Bernadett Pályi<sup>2</sup>, Miklós S.Z. Kellermayer<sup>1\*</sup>

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

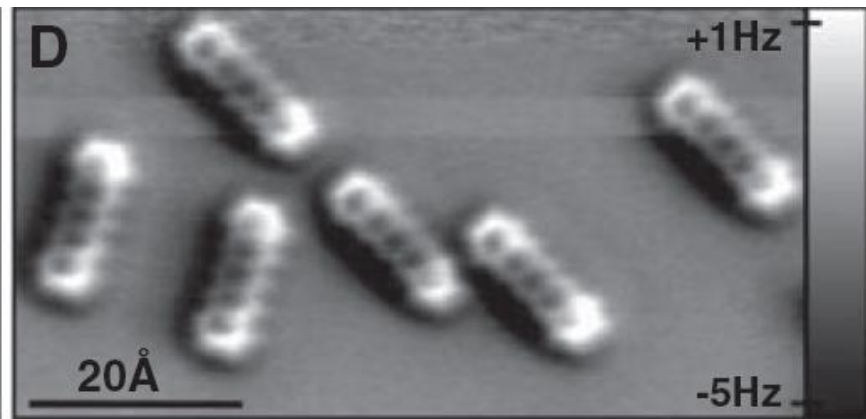
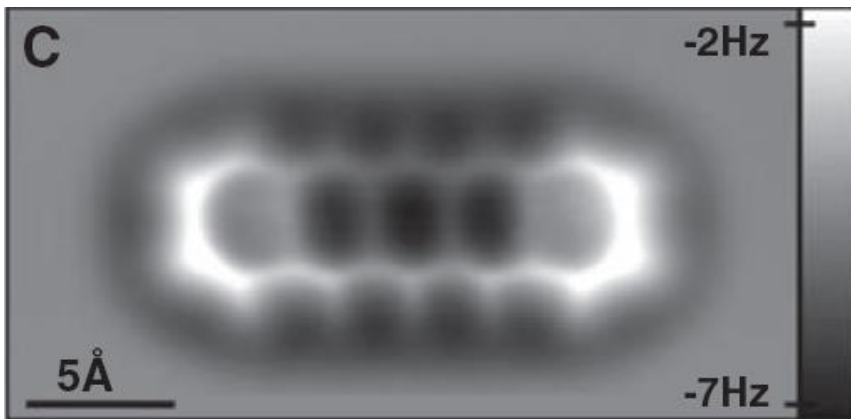


# Pentacen Molekül

Tunnelstromstärke durch die Nadel (STM)



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



*Nature Chemistry* 1, 597 - 598 (2009)