

# Modern mikroszkópos technikák

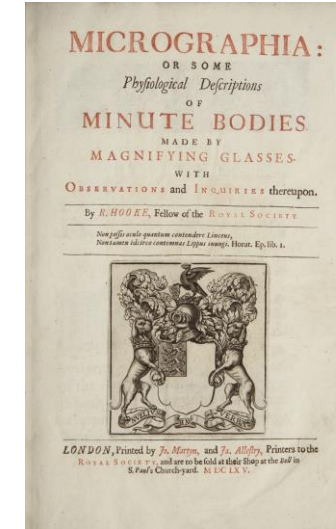
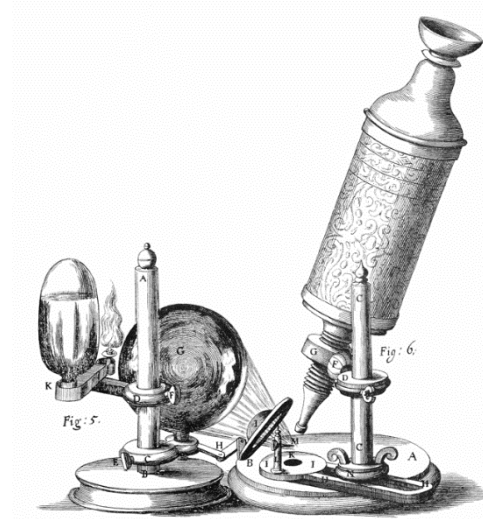
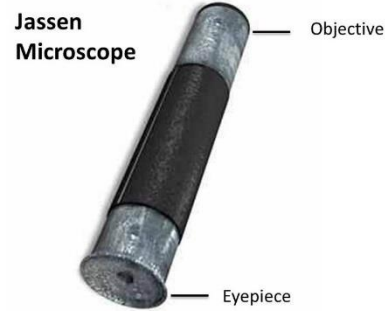
Haluszka Dóra

2024.11.06

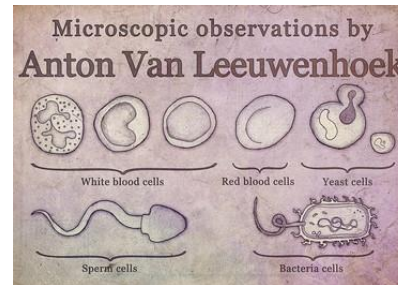
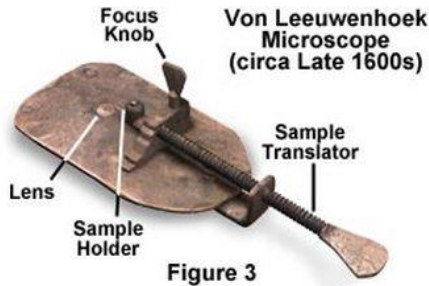
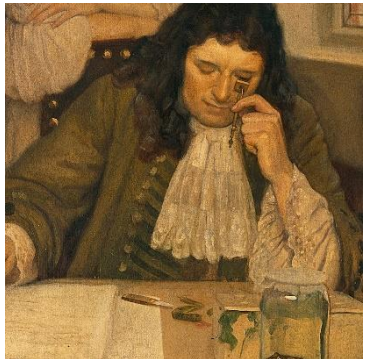


# A mikroszkópia rövid története

- már az ókori Rómában...vízzel töltött üveggömb
- 1600-as évek elején: Zacharias Jansen – teleszkóp/mikroszkóp feltalálója
- 1667: Robert Hooke – angol polihisztor – „Micrographia”, parafa cellái



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



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

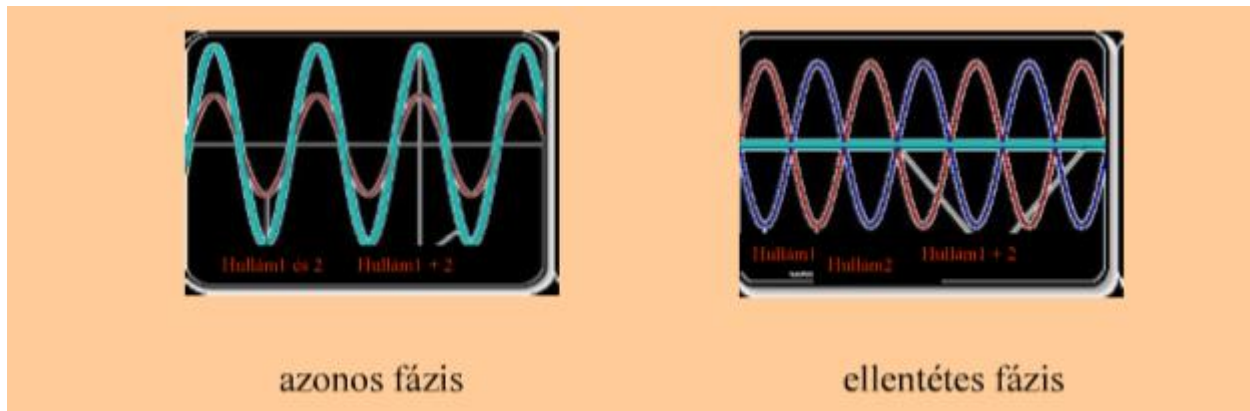


Figure 2

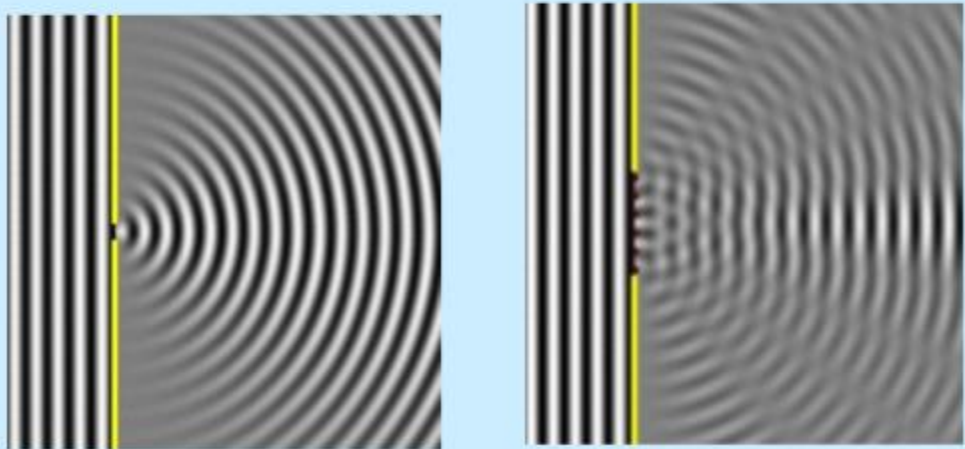




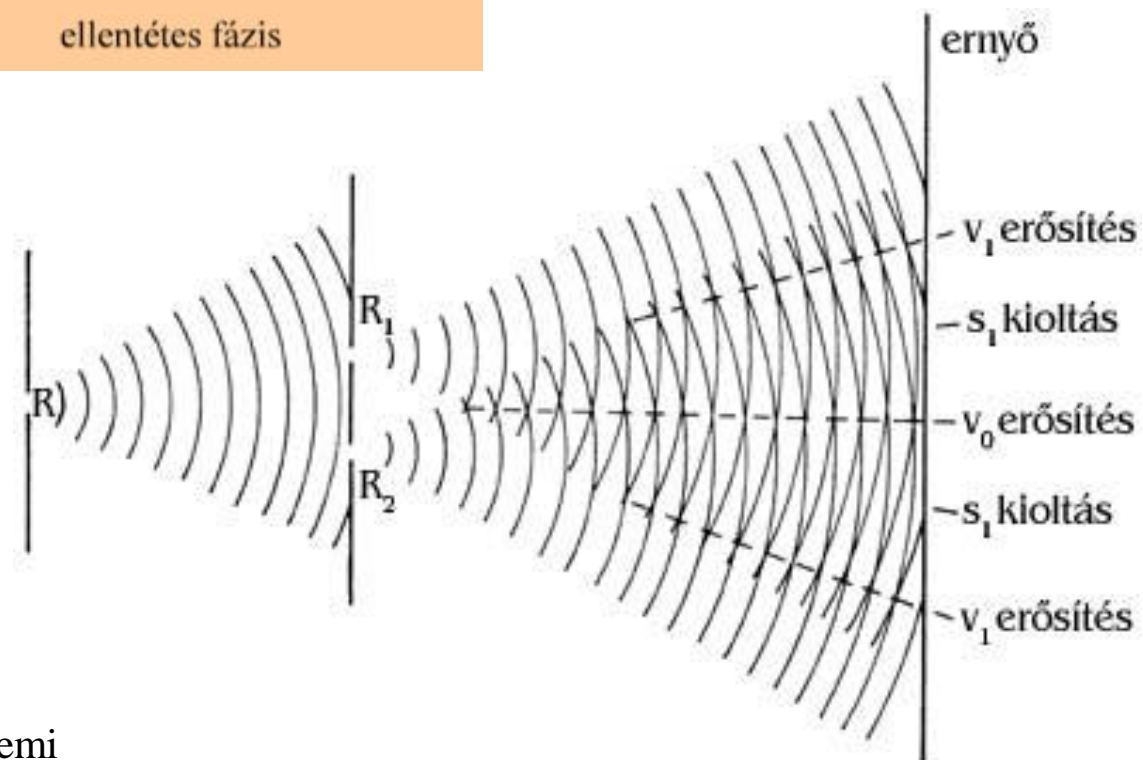
# A hullámoptika alapjai



## Huygens-elv



A hullámfront úgy terjed, hogy egy adott hullámfelület minden pontjából elemi gömbhullámok indulnak ki. A hullámtérben az új hullámfelület ezen elemi gömbhullámok közös burkolója lesz.



Young kísérlet

# A felbontóképesség korlátai...



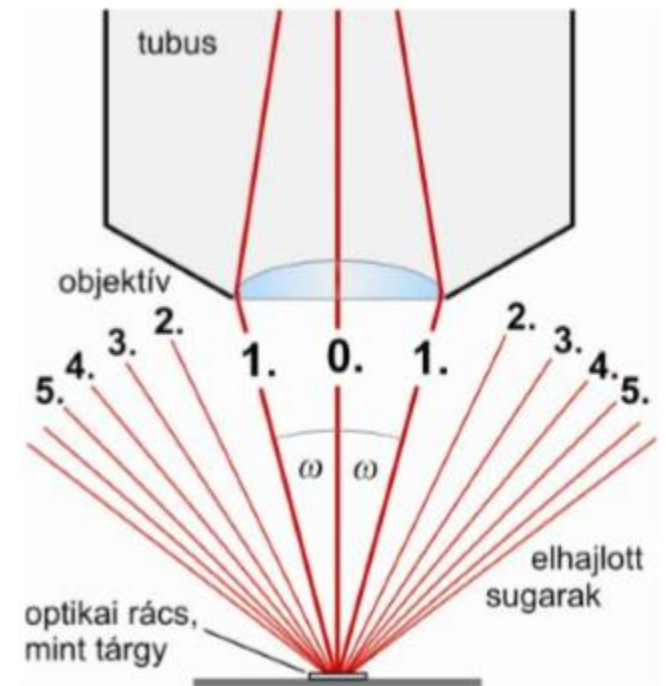
Ernst Abbe (1840-1905)

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 képképzésben

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

$\delta$  felbontási határ - legkisebb  $d$  távolság, amely távolságra elhelyezkedő tárgypontok még különálló képpontokként képeződnek le

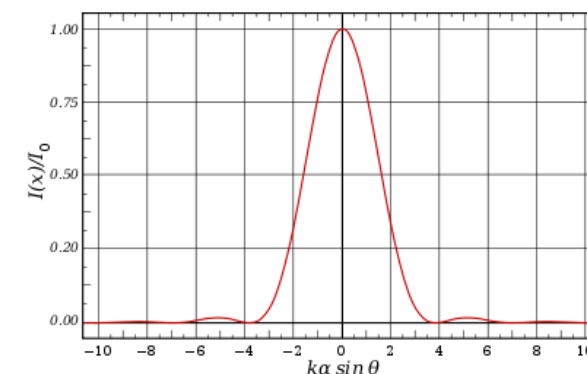
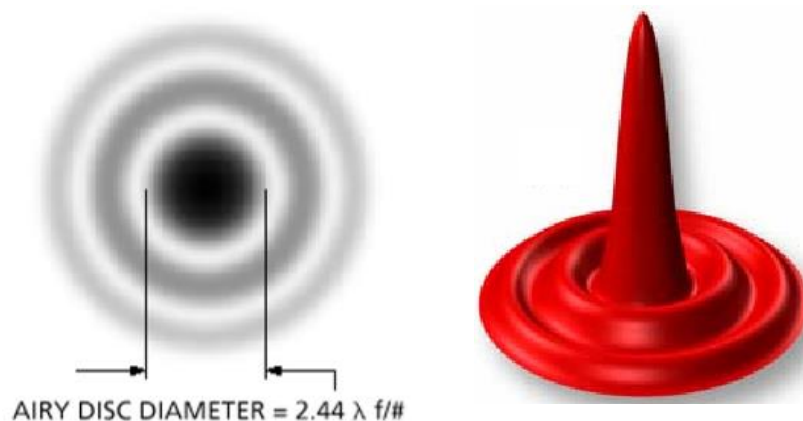
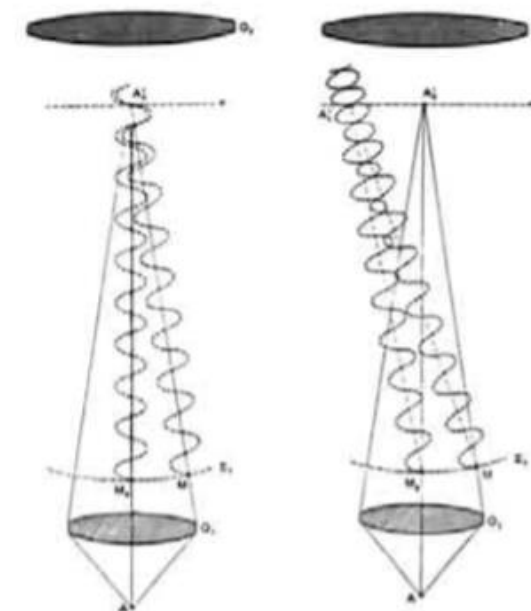
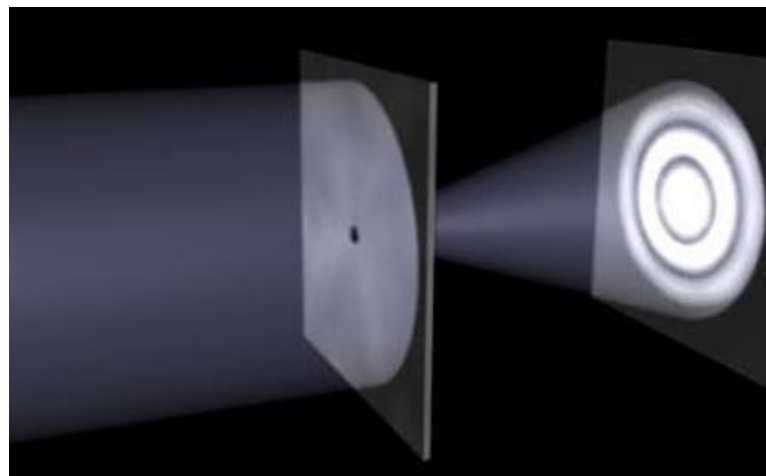


# Airy korongok – a fény hullámtermészetének bizonyítéka

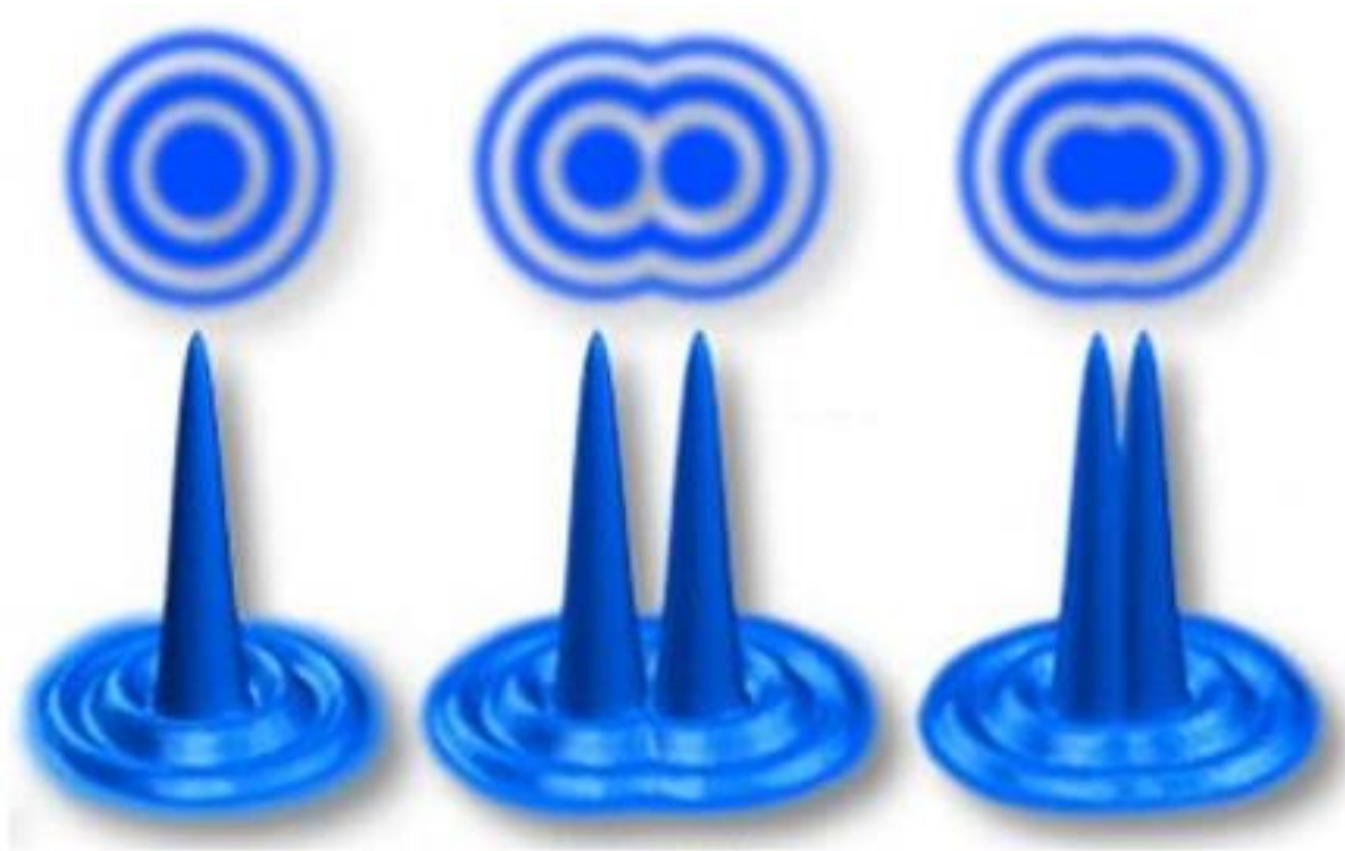
Egy fénypont ideális optikai lencsével leképezett képe az Airy korong

Keletkezése: A kép síkjában fázisban levő hullámok (bal oldal) diffrakciós maximumot, míg  $180^\circ$ -kal eltolódott hullámok minimumot hoznak létre (jobb oldal).

Point Spread Function (PSF): A tárgy egy pontjának képek nem egy pont, hanem egy adott intenzitáseloszlású folt.



Mikor különböztethető meg két különálló pontszerű tárgy képe?

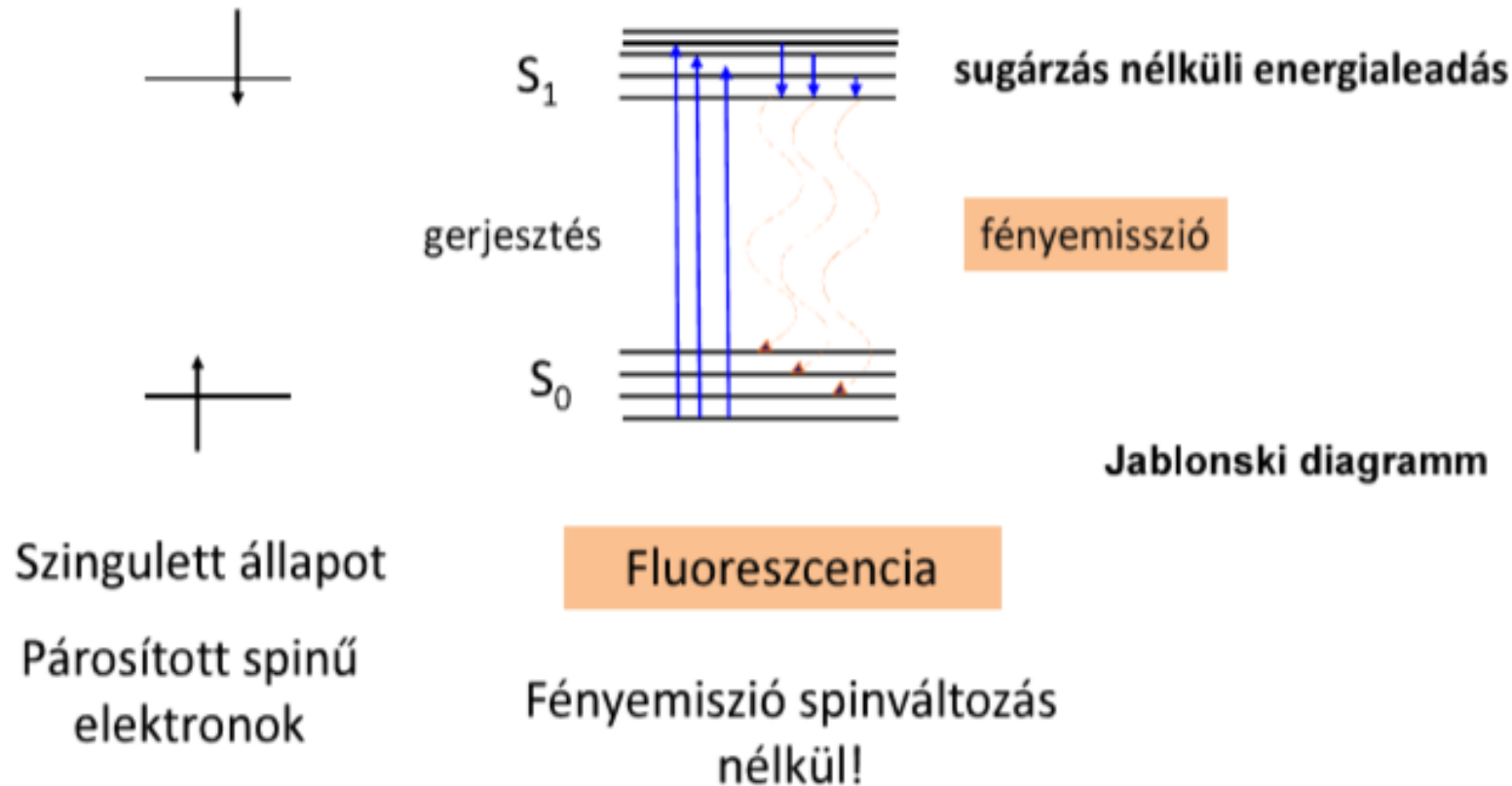


### **Rayleigh –féle kritérium:**

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



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

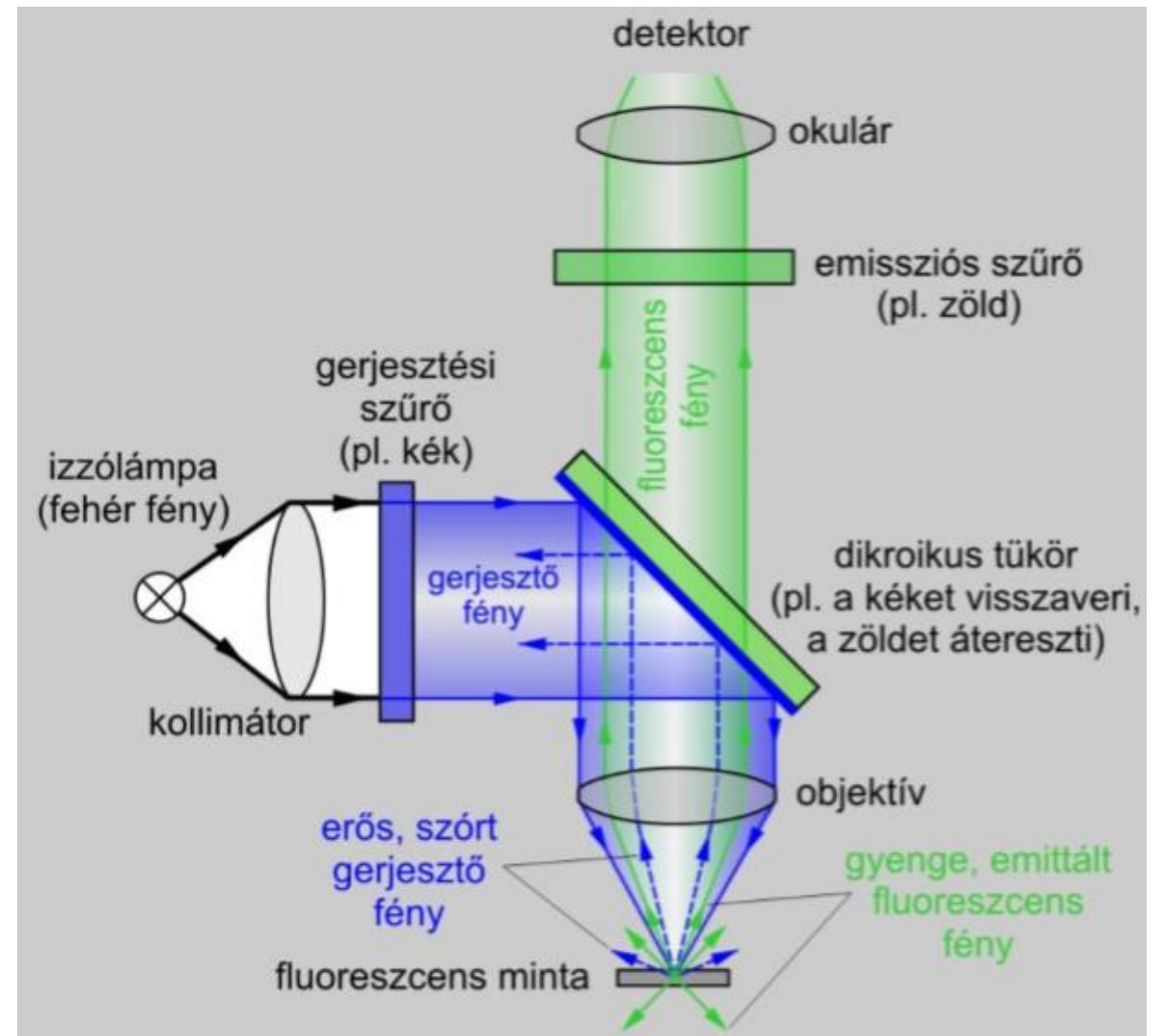
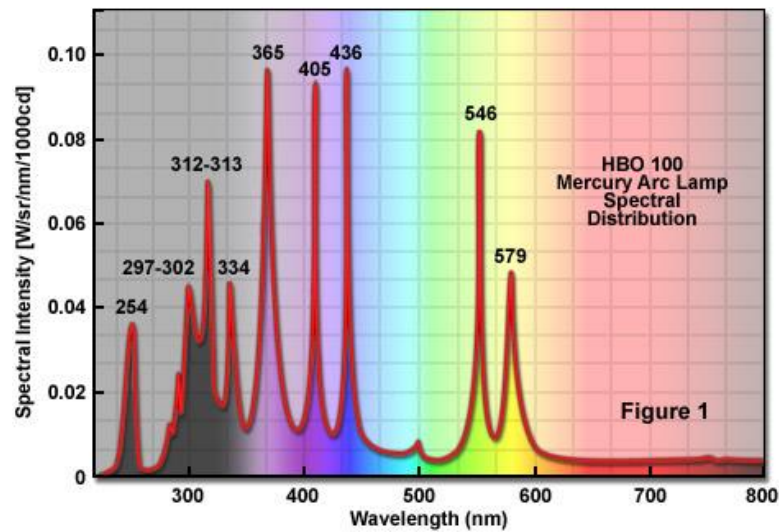
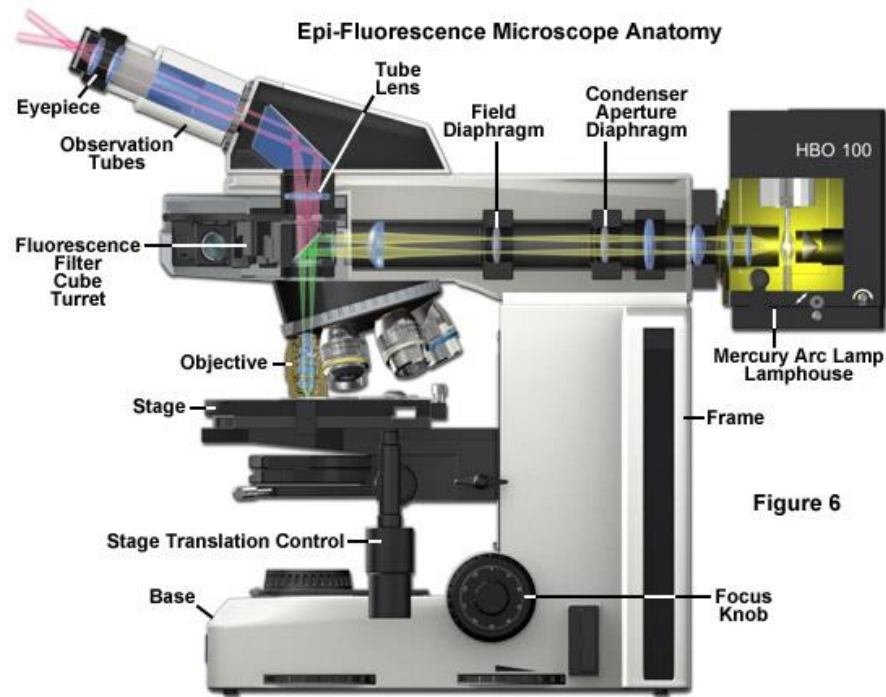
$$\lambda_{\text{gerjesztés}} \leq \lambda_{\text{fluoreszcencia}}$$

Stokes-eltolódás



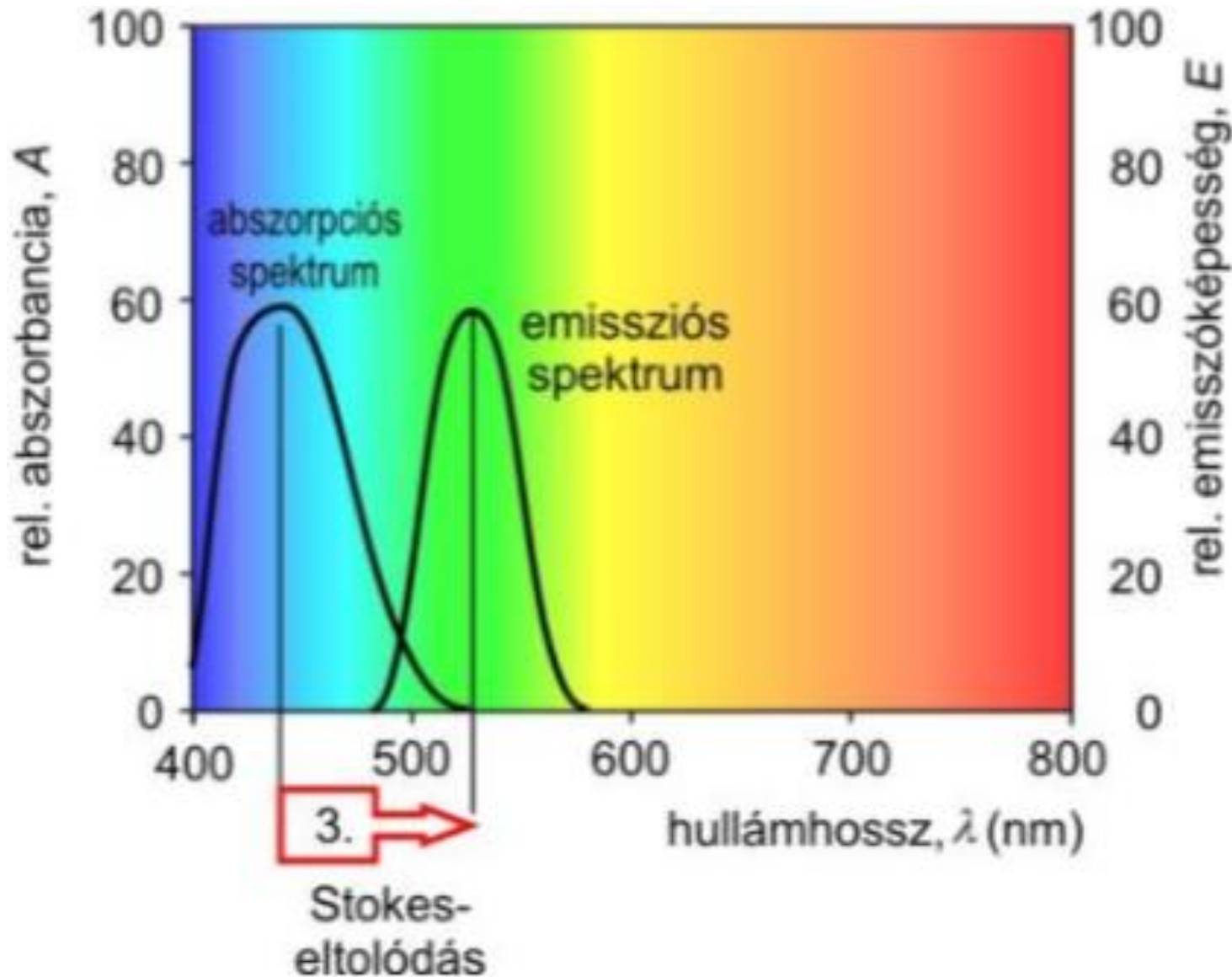
**Kasha szabály:** a fényemisszió a legalsó gerjesztett elektronállapot legalsó rezgési nívójáról történik

# Fluoreszcencia mikroszkóp





# Abszorpció és emissziós spektrum



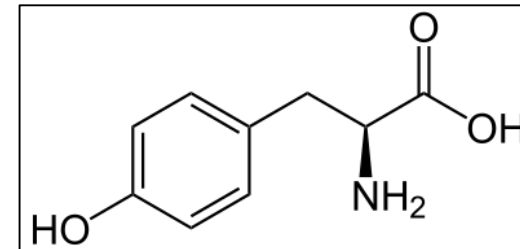
$$E_{\text{gerjesztés}} \geq E_{\text{fluoreszcencia}}$$

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

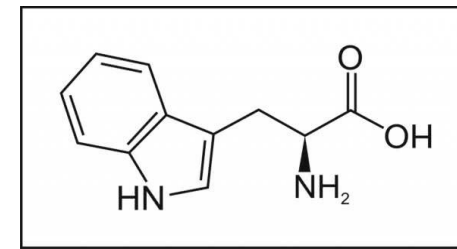
# Fluoreszcencia forrása

- **Intrinsic** (belső) fluorofórok:

pl: triptofán, tirozin aminosavak, porfirinek



tirozin



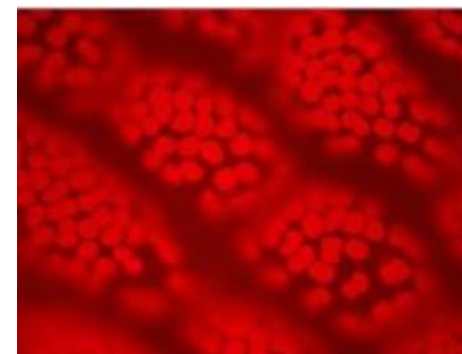
triptofán

- **Extrinsic** (külső) fluorofórok:

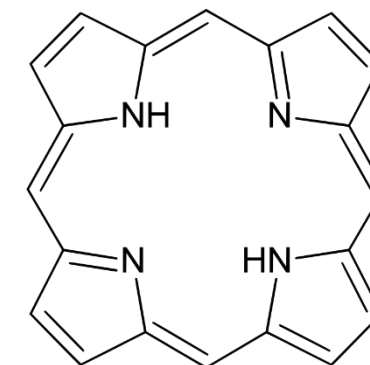
pl: kívülről bevitt festékmolekulák

## Az ideális fluorofór:

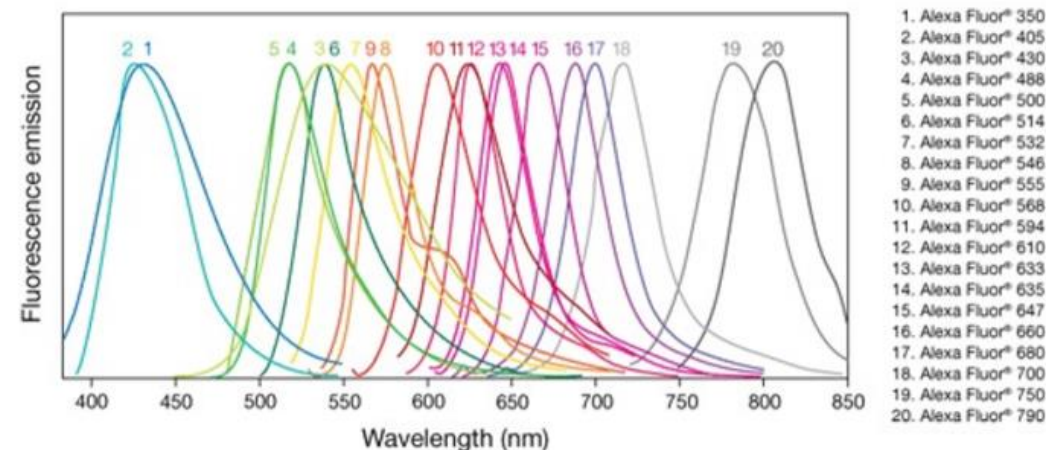
- Kicsi
- Hidrofil
- A látható tartományban nyel el és emittál
- A Stokes eltolódás nagy
- Specifikusan kötődik
- Nem eredményez fotokémiai reakciókat



porfirin fluoreszcencia



porfirin

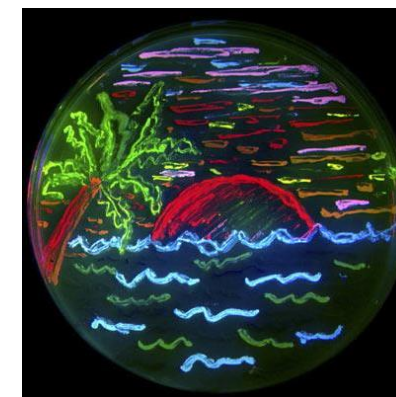
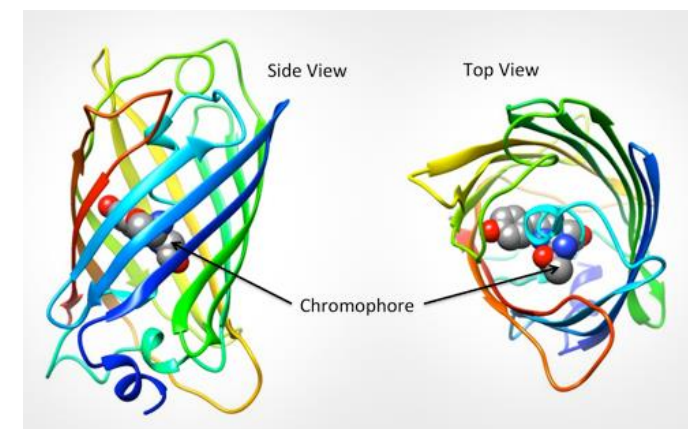


# Fluoreszcens fehérjék

- Green Fluorescent Protein (GFP)
- 1960-as évek, medúzából izolálták
- ~27 kDa, 238 as, 11 szálú  $\beta$ -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



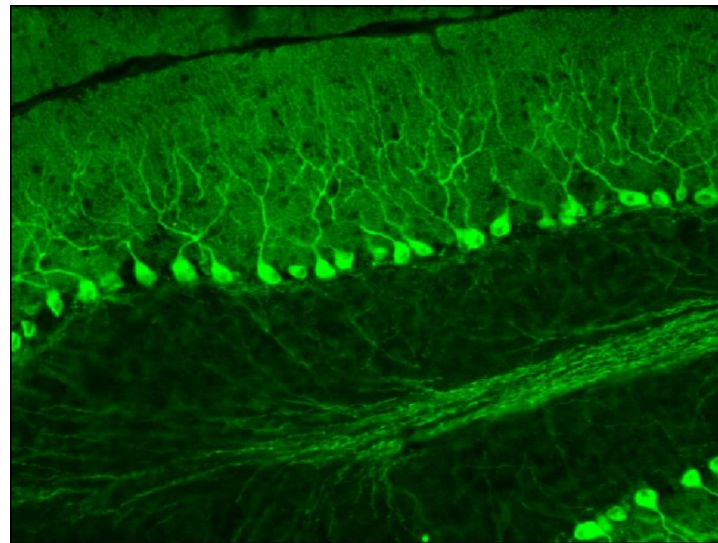
*Aequorea victoria*



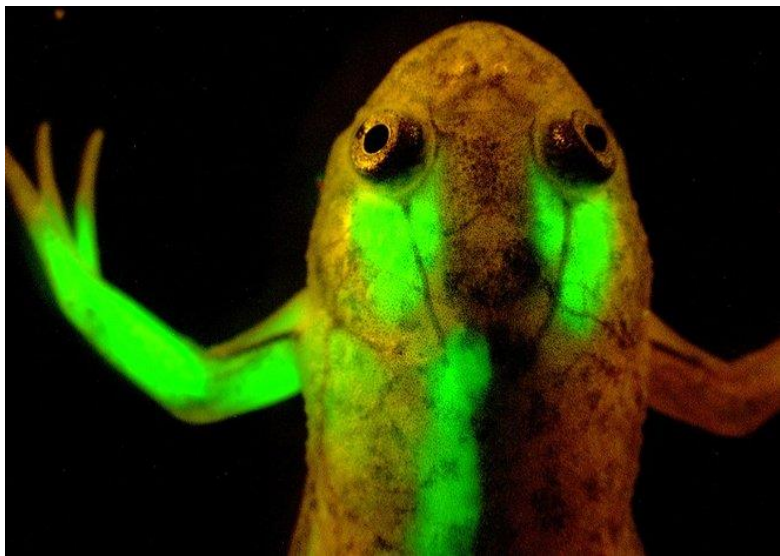




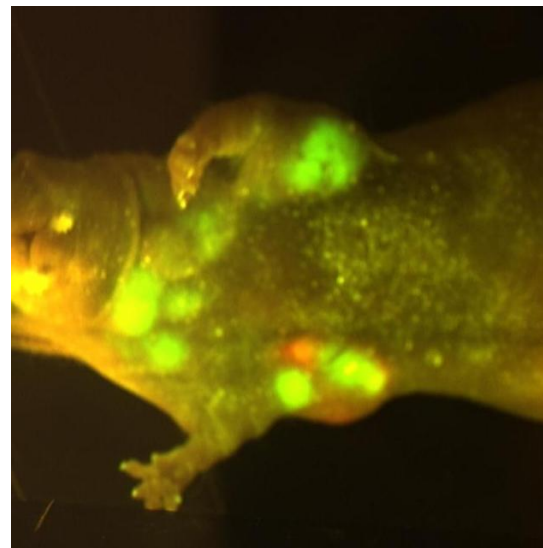
Transzgén egerek



Egér Purkinje sejtek



Béka izom sejtek GFP jelölése



Tumor sejtek követése

## 2008. Kémiai Nobel-díj

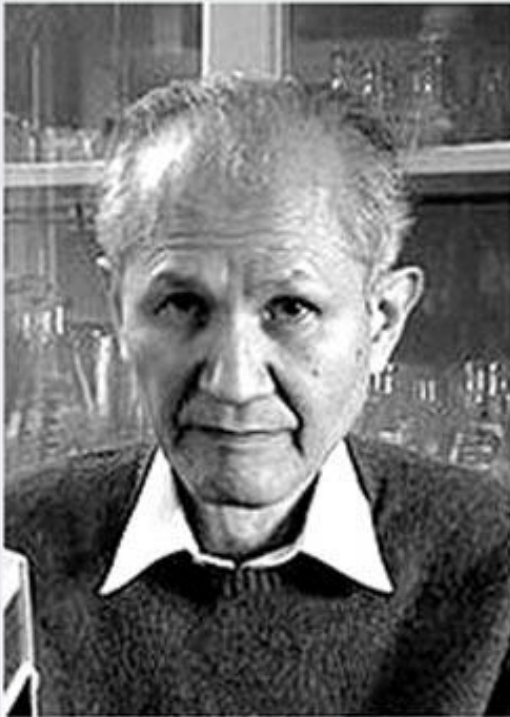


Photo: J.  
Henriksson/SCANPIX

**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

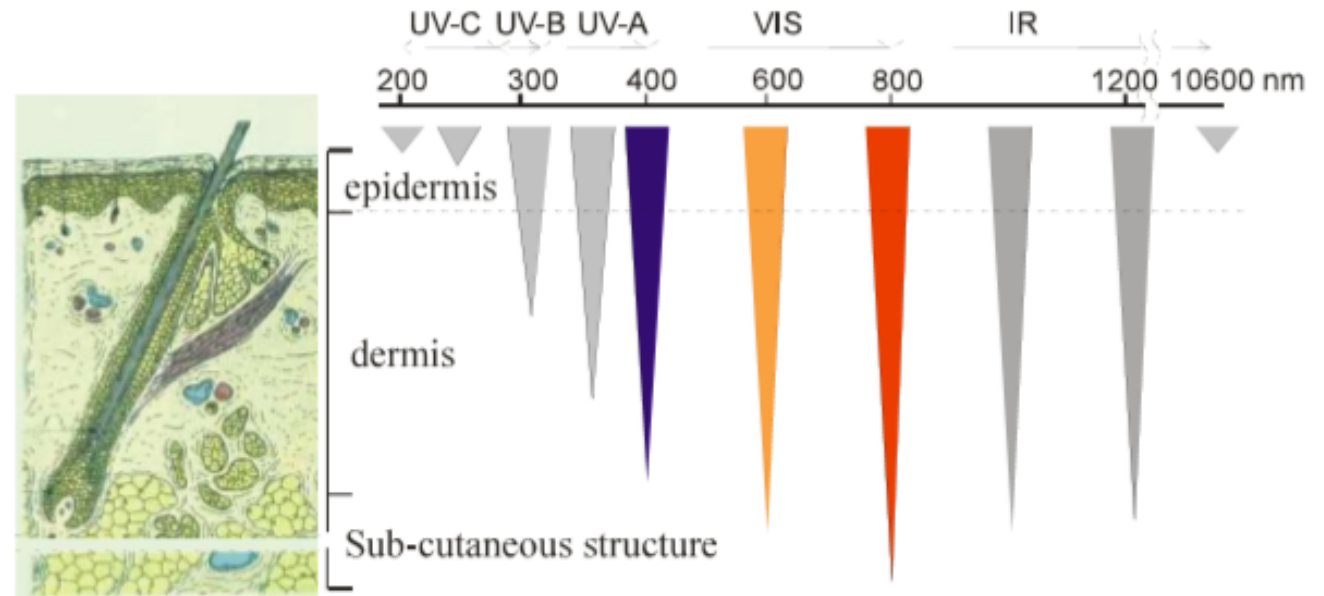
Rövid impulzusidő lehetséges – *ps, fs*

Nagy teljesítmény érhető el– *kW - GW*

Nagy teljesítménysűrűség lehetséges



## Fény behatolási mélysége a bőrbe



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

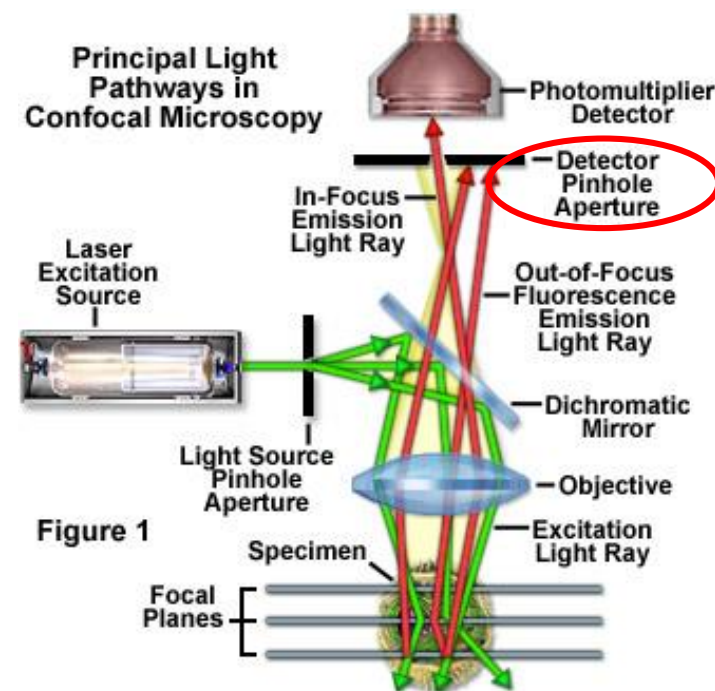
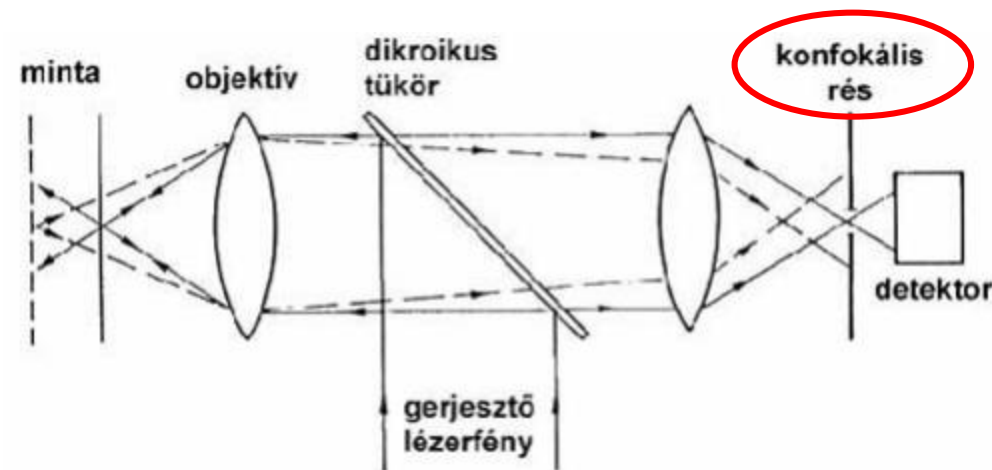
Az, hogy a fény milyen mélyen képes behatolni a szövetbe, hullámhossz függő!!!



# Konfokális pásztázó mikroszkóp

**Konfokális elv:** *apertúra* segítségével takarjuk ki a nem fókuszsíkból érkező fénynyalábokat – a detektorba csupán a fókuszsíkból eredő nyalábok jutnak

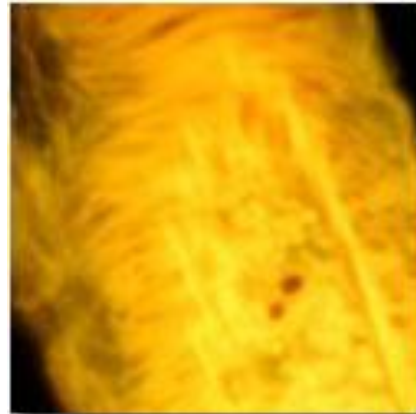
- lézer fényforrás
- fényútba helyezett szűrőkkel a hullámhossz kiválasztható
- minta pásztázása pontról pontra
- XY irányban – pásztázó tükrök
- számítógépes vezérlés
- „optikai szeletelés” – 3D képképzés



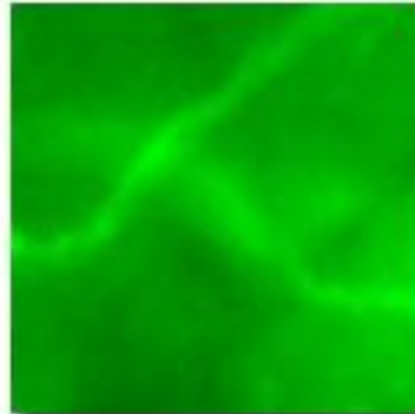
# Fluoreszcens és konfokális mikroszkóp képalkotás – összehasonlítás

fluoreszcens

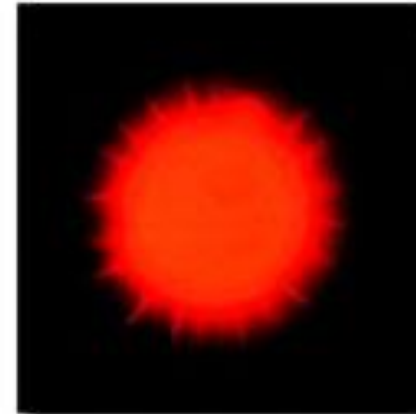
Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy



(a)

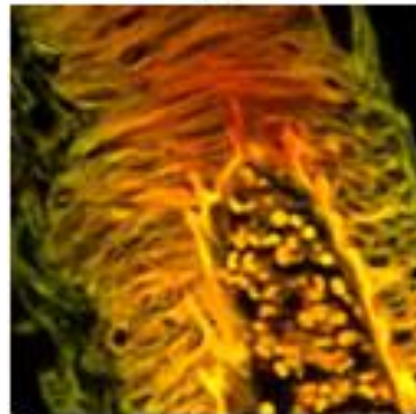


(b)

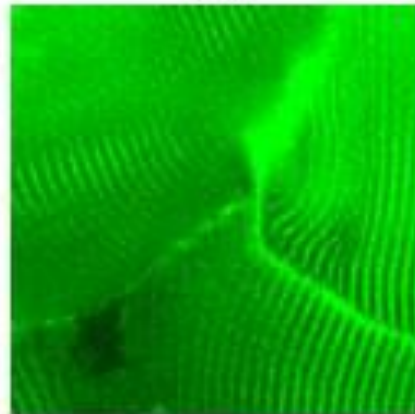


(c)

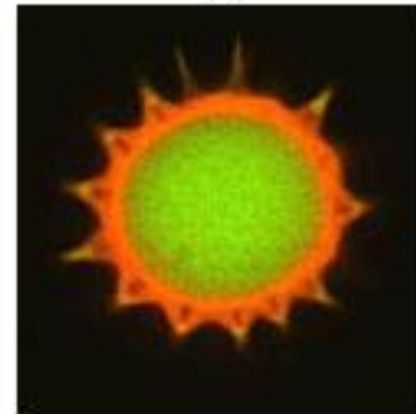
konfokális



(d)



(e)



(f)

Figure 1

humán medulla

nyúl izom

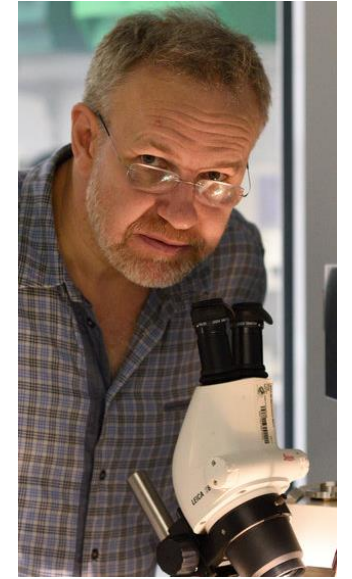
pollen

# Kétfoton mikroszkópia

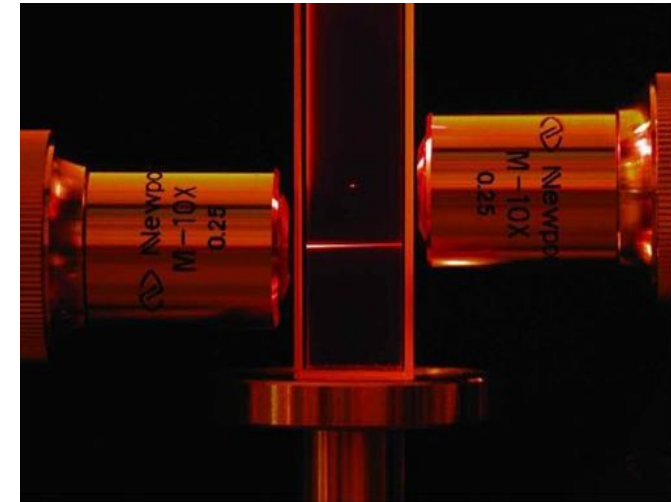
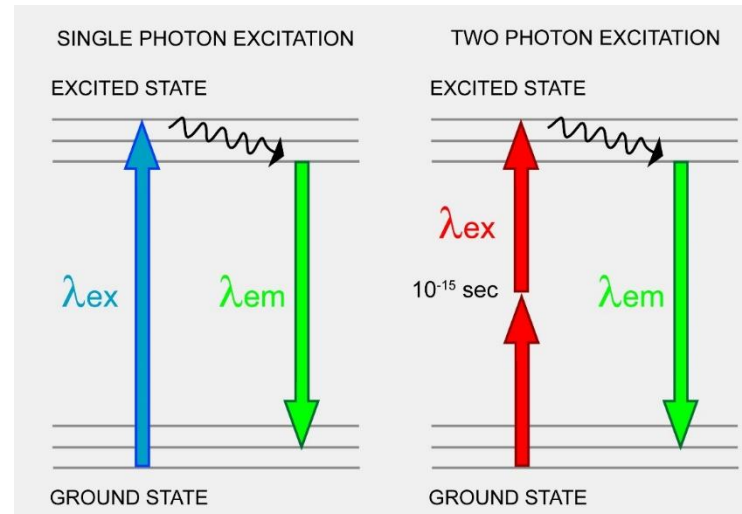
- 1931. Maria Göppert-Mayer
- a gerjesztendő molekulába egyszerre két foton abszorbeálódik, és energiájuk összeadódik
- nagy intenzitású lézer fényforrás ~ megfelelő fotonsűrűség
- 1990. Első kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp
- Wientfried Denk, Cornell University



Maria Göppert-Mayer (1906-1972)



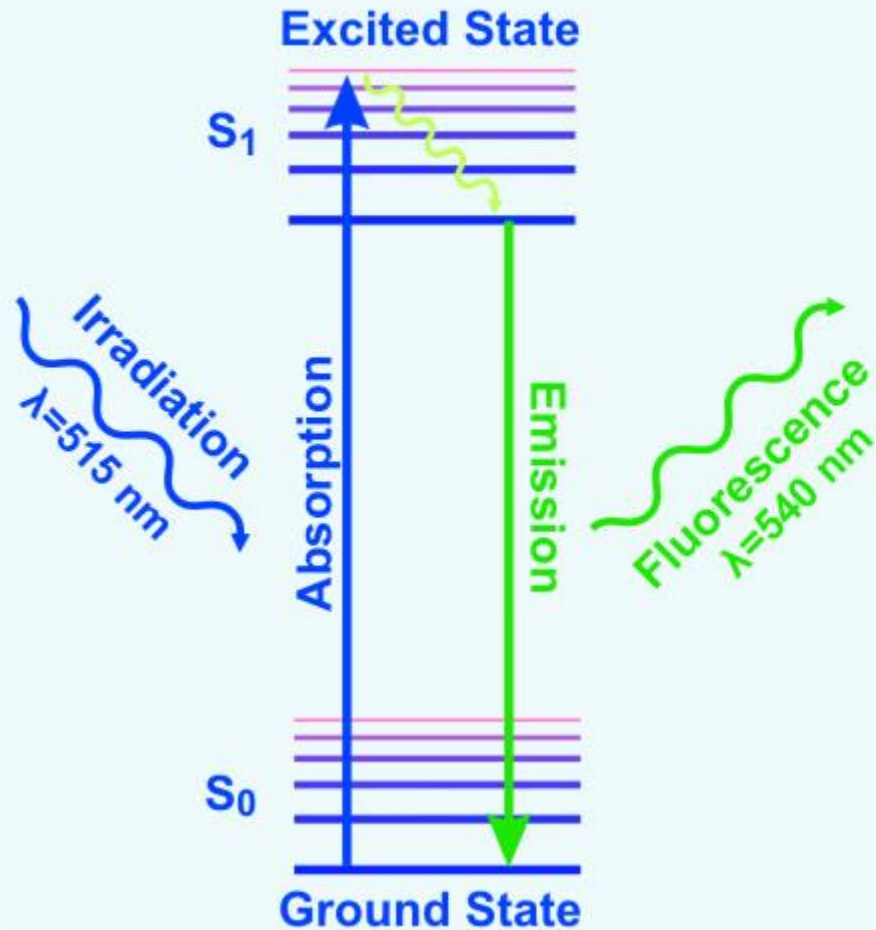
Wientfried Denk (1957-)



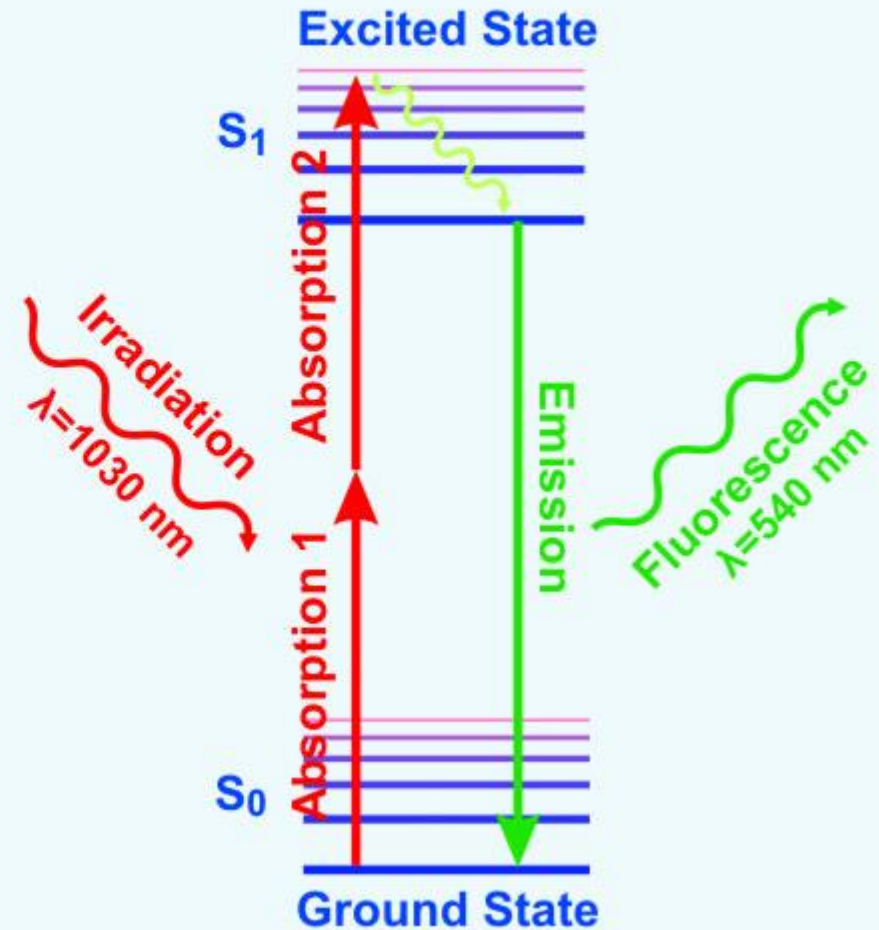


# Kétfoton gerjesztés

One photon excitation

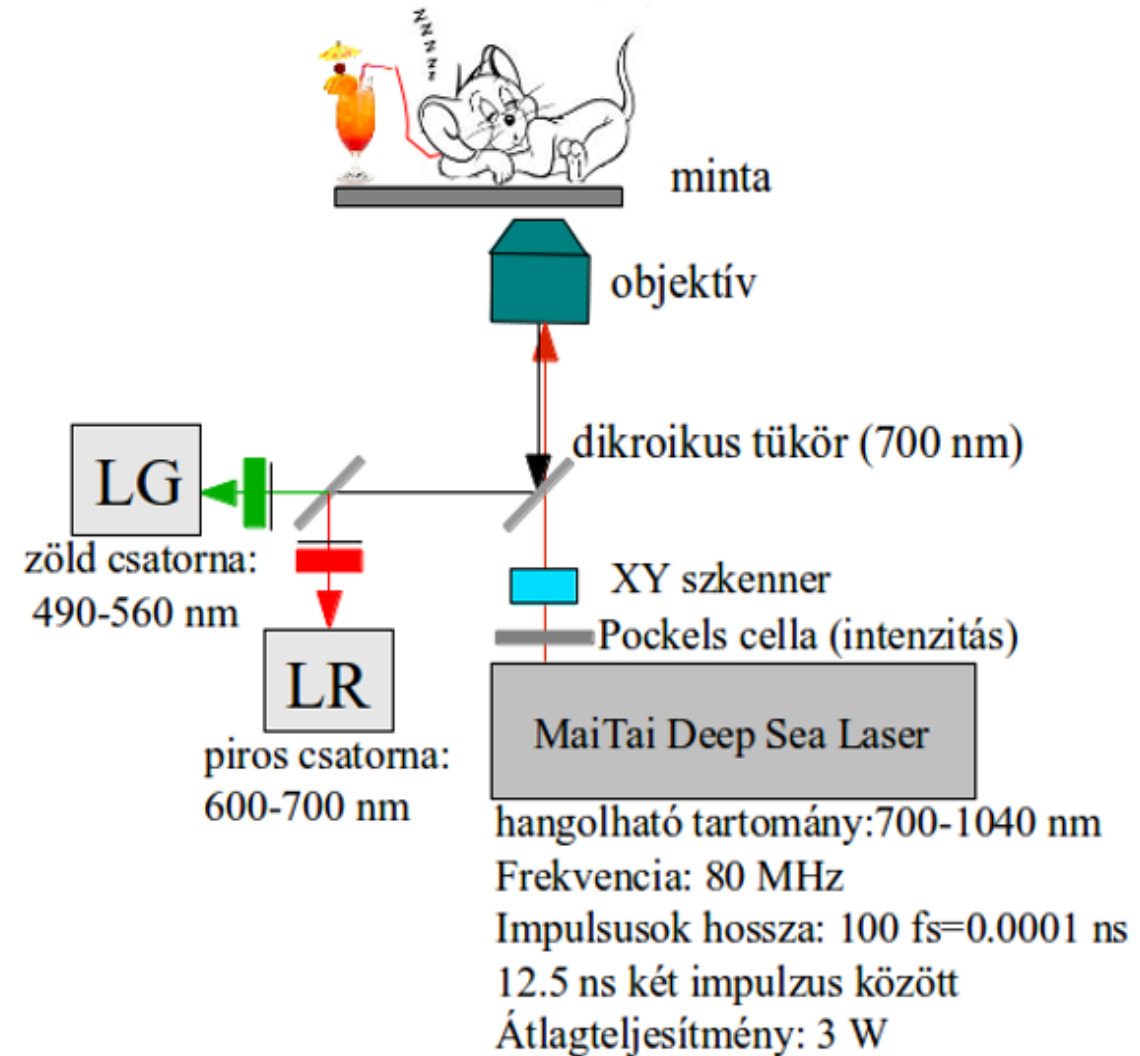


Two photon excitation



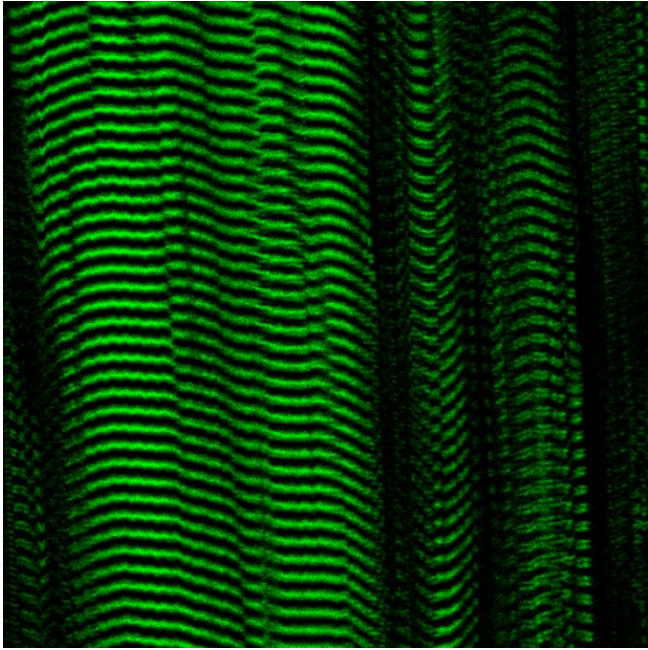
# Előnyök

- Csak a fókuszoltban 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

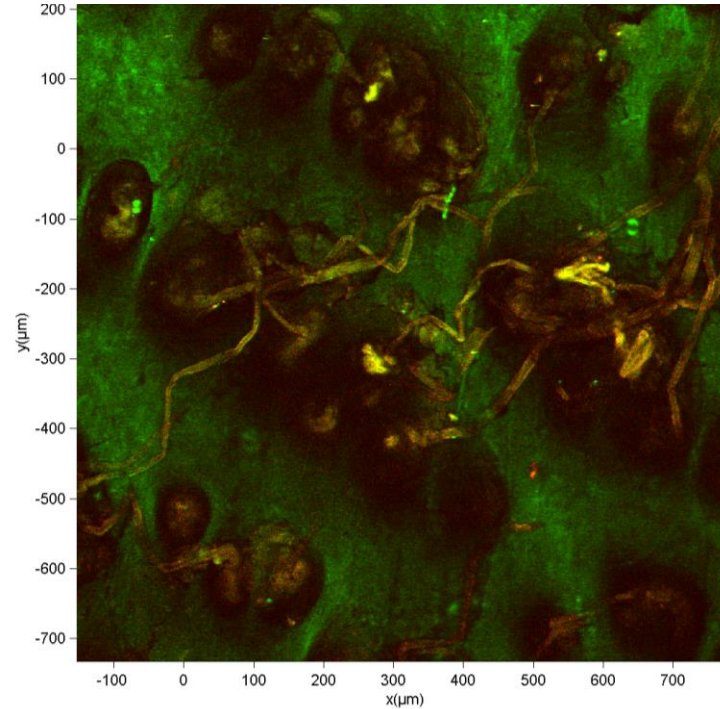




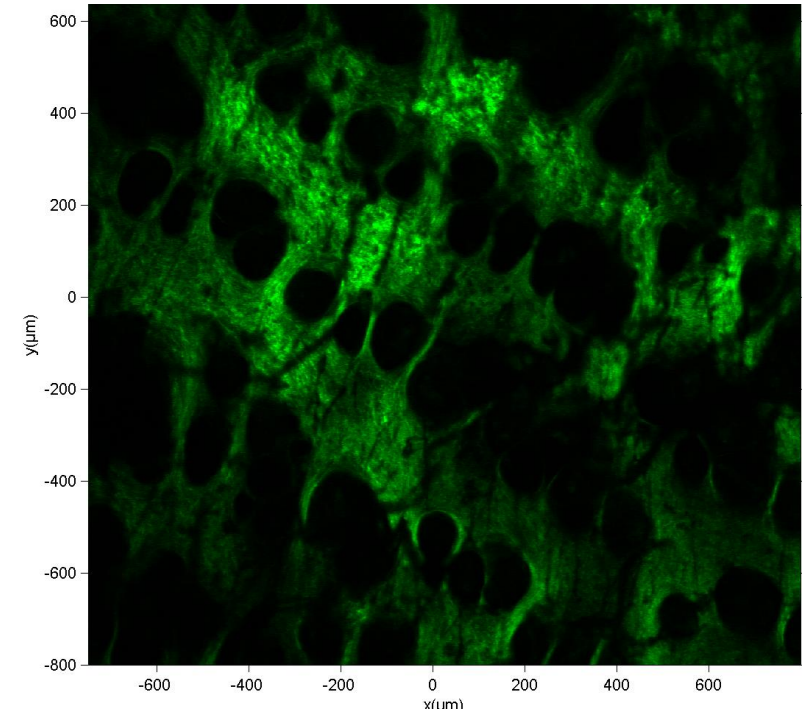
# Jelölés nélküli képalkotás



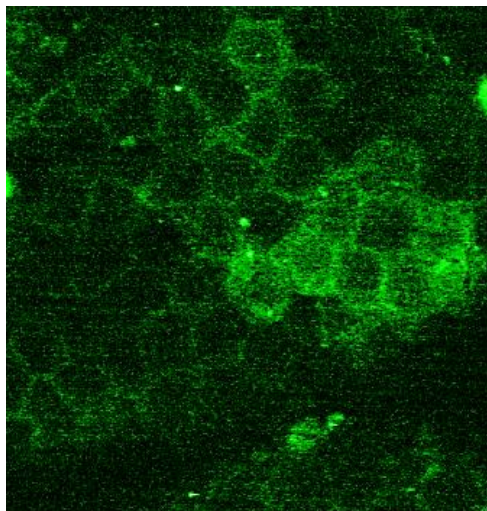
izom miozin



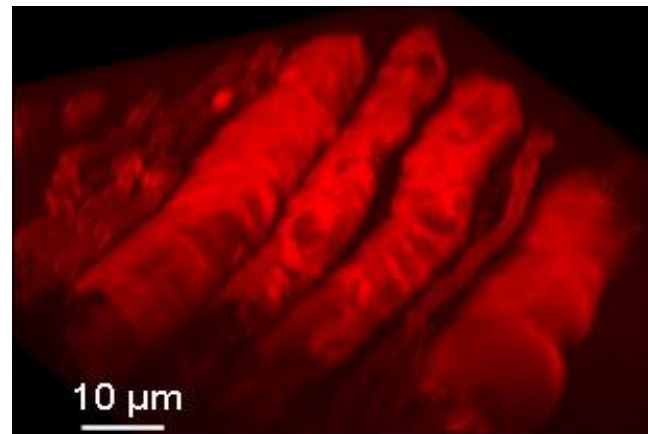
egér epidermis



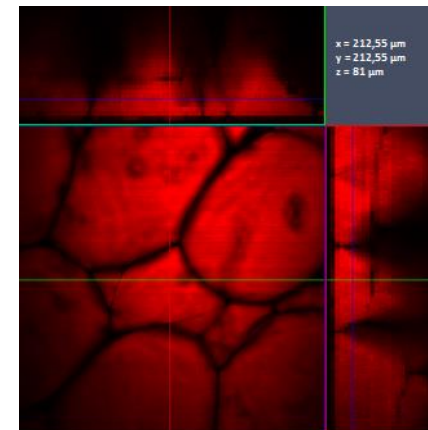
egér dermis kollagén



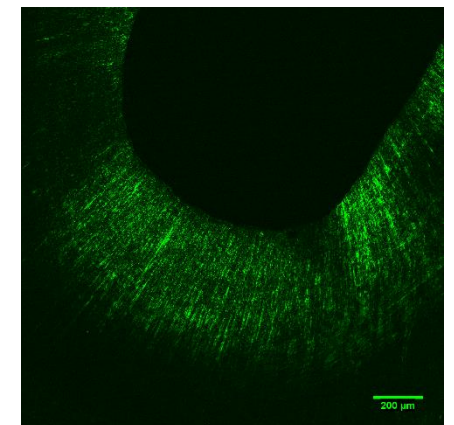
keratin



mielinhüvely



adipociták

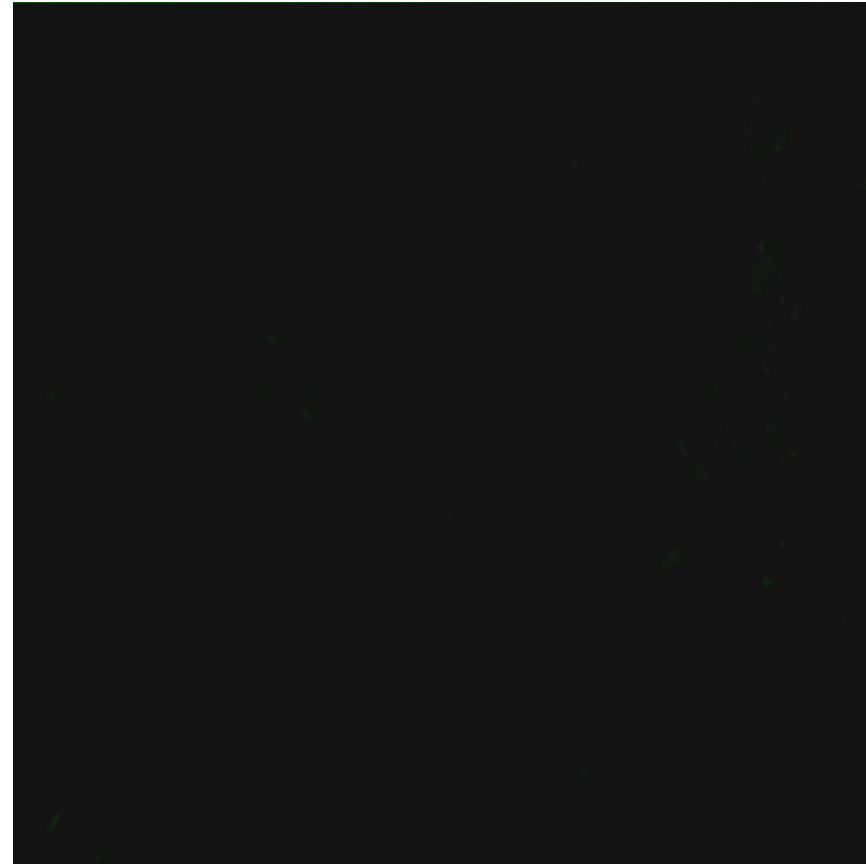


dentincsatornák



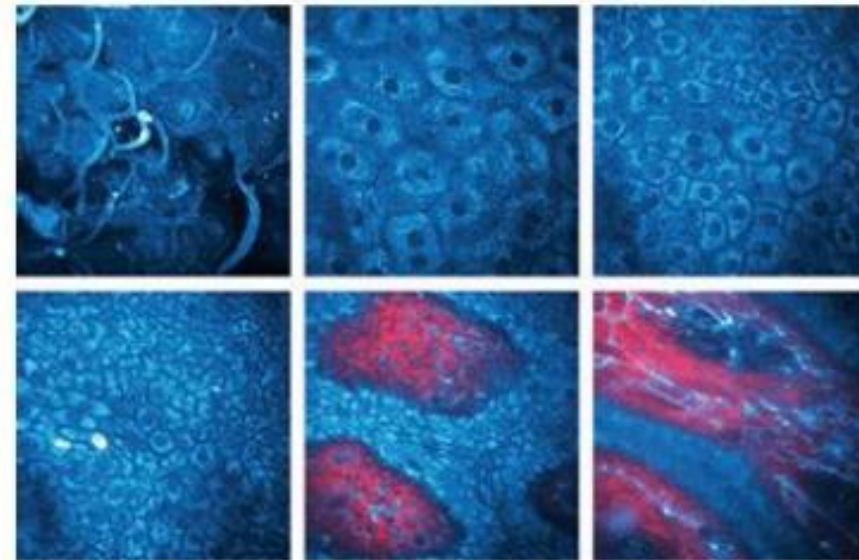
# 3D képalkotás

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



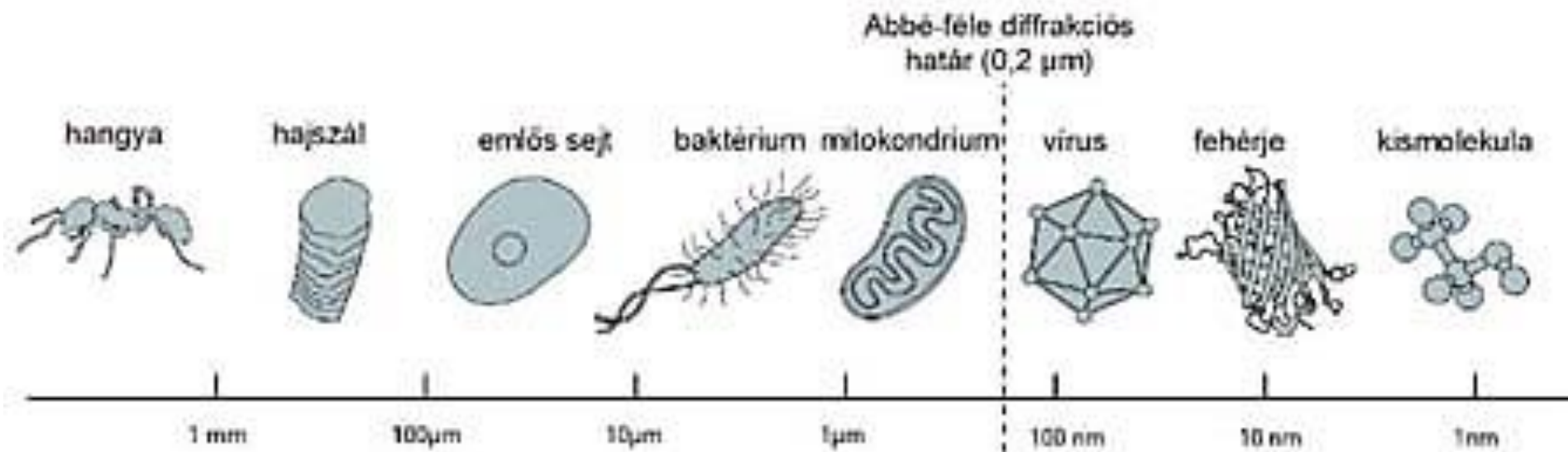
200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$   
exc: 990 nm

# *In vivo* alkalmazás



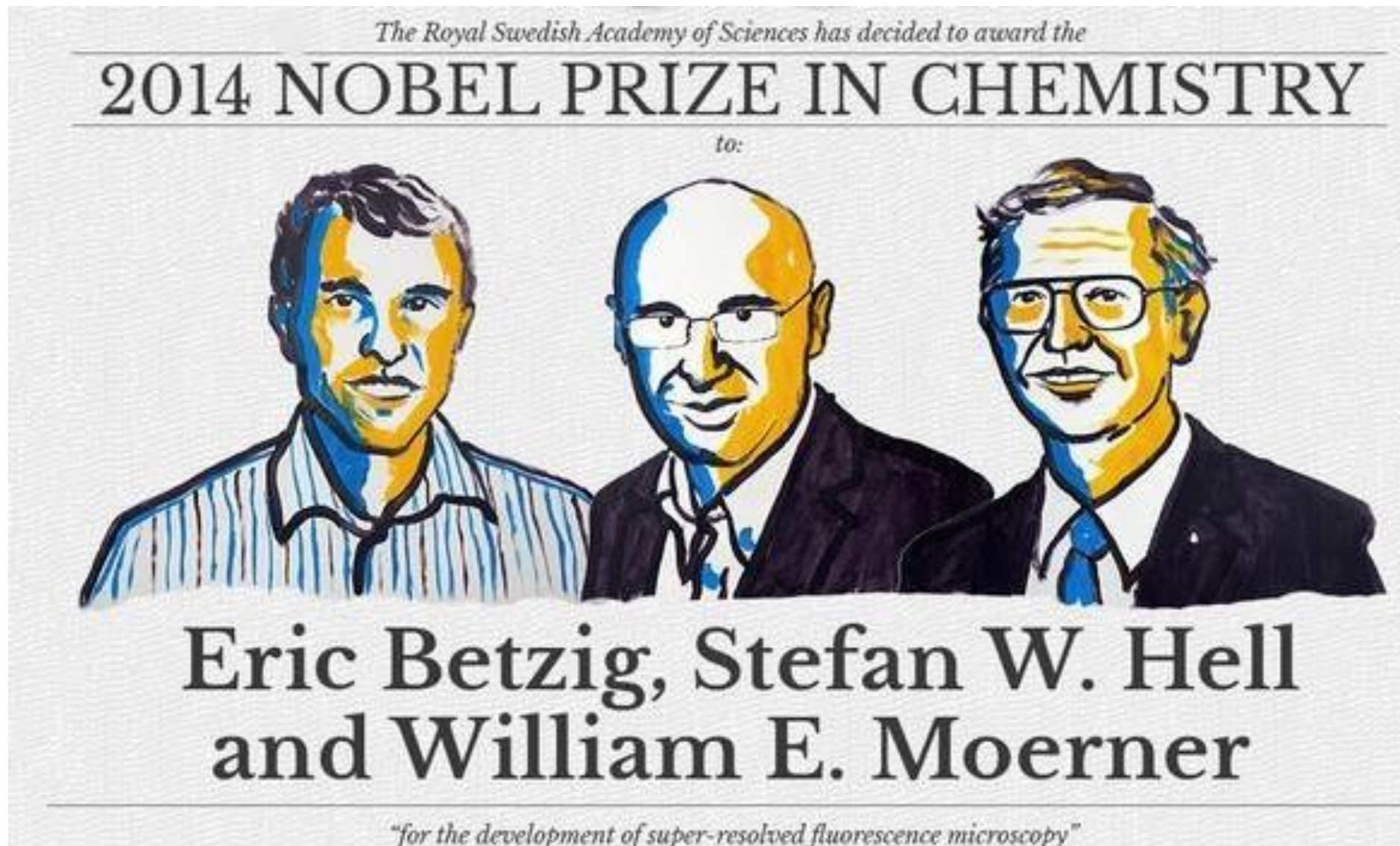
El Madani HA, Tancrède-Bohin E, Bensussan A, Colonna A, Dupuy A, Bagot M, Pena AM. (2012) In vivo multiphoton imaging of human skin: assessment of topical corticosteroid-induced epidermis atrophy and depigmentation. J Biomed Opt, 17(2)

# Mekkorák a dolgok?



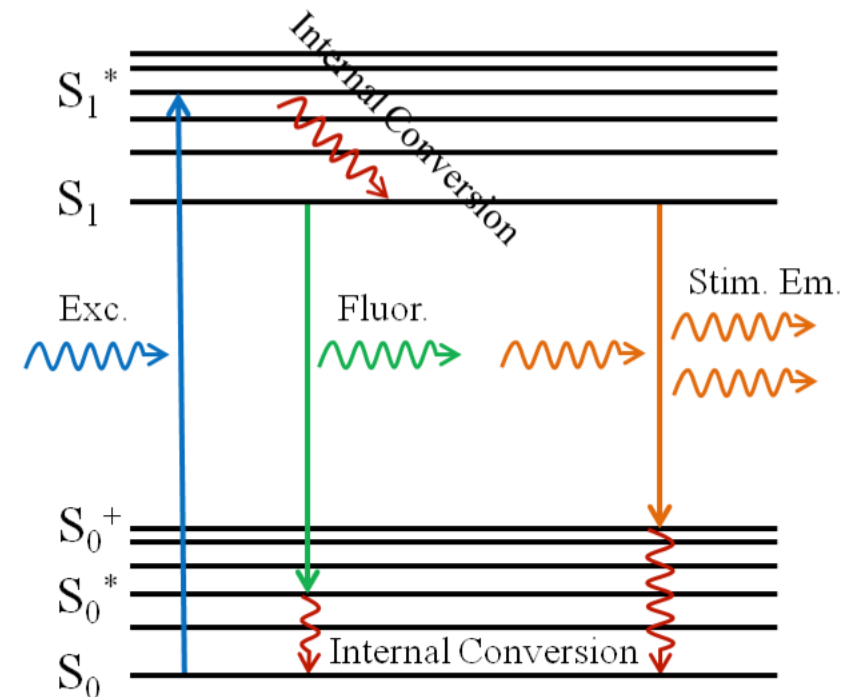
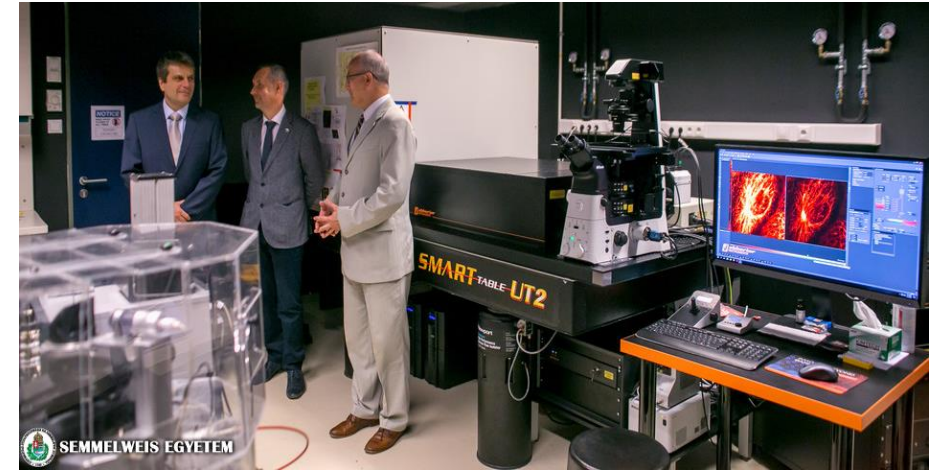


# Szuperrezolúciós mikroszkópia

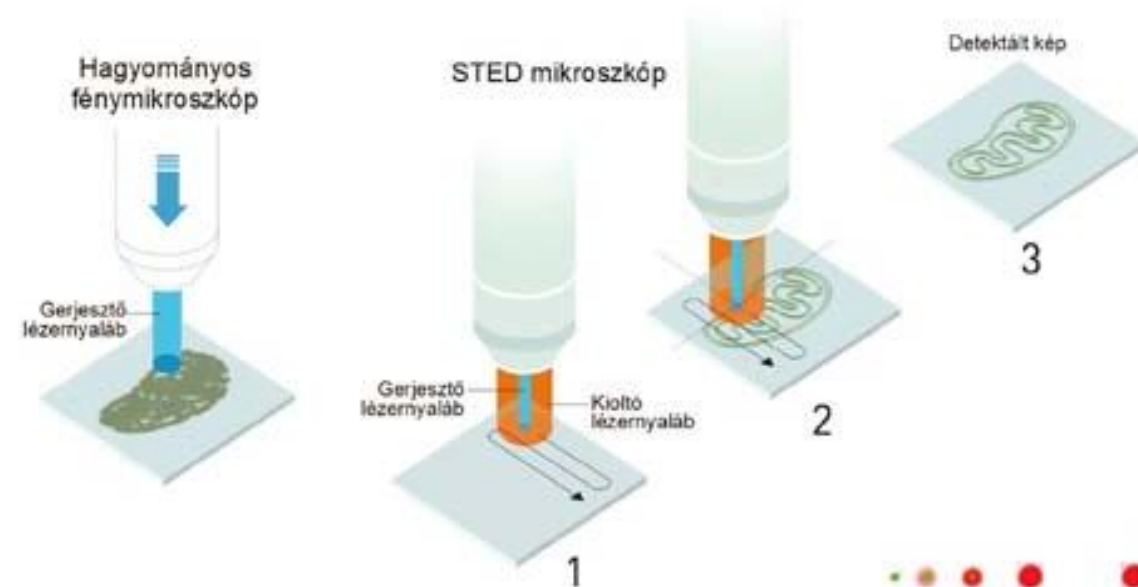
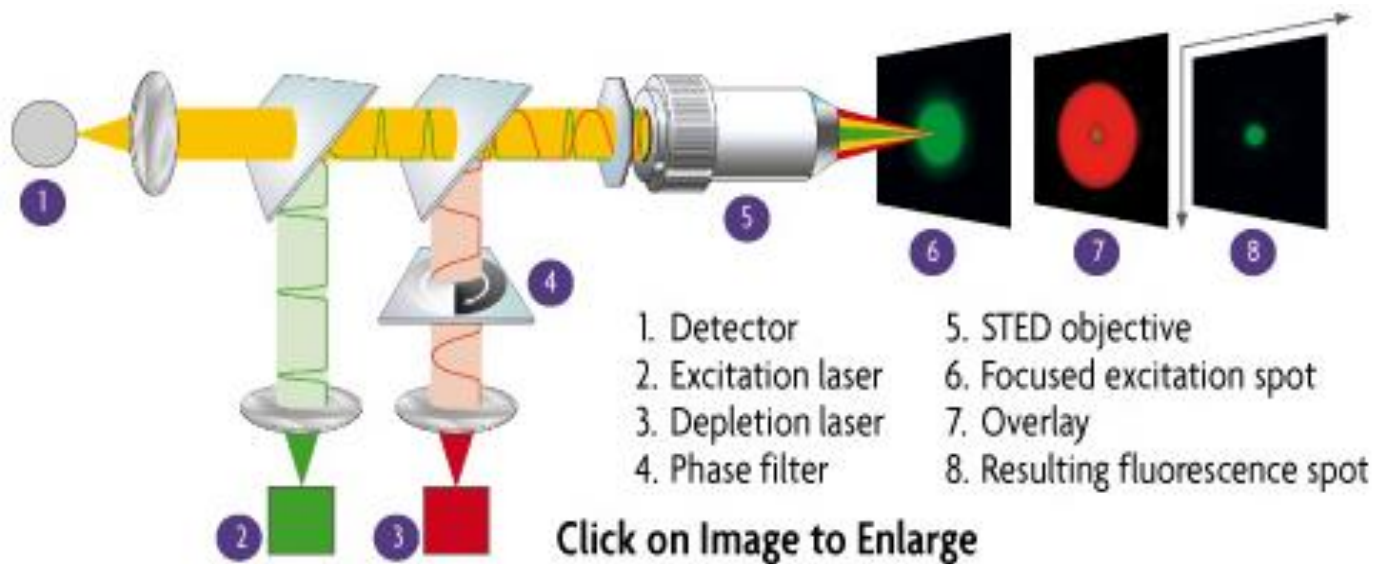
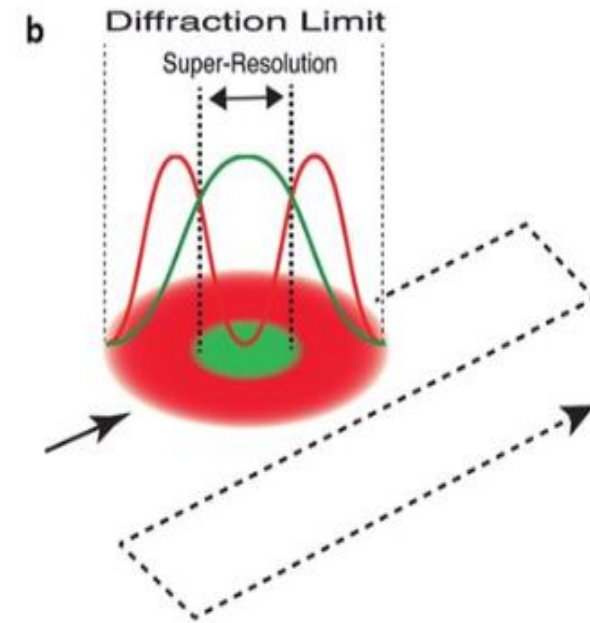


# Szuperrezolúciós mikroszkópia

- 2014-ben Eric Betzig, Stefan W. Hell és William E. Moerner kémiai Nobel-díjban részesültek
  - STED (stimulated emission depletion microscopy)
  - Intézetünkben 2018. augusztus
  - nanométeres, molekuláris felbontást tesz lehetővé
  - fluorofórok szelektív deaktiválása
- 
- egy bizonyos hullámhosszú foton kölcsönhat egy gerjesztett atomi vagy molekuláris elektronnal, melynek hatására az elektron visszatér egy alacsonyabb energiaállapotba és a felszabaduló energia távozik egy foton formájában, amelynek fázisa, hullámhossza, polarizációja és kilépési iránya is megegyezik a beeső fotonéval
  - elektron magasabb rezgési állapotba kerül, a két állapot energiakülönbsége alacsonyabb, mint a normál fluoreszcencia különbség



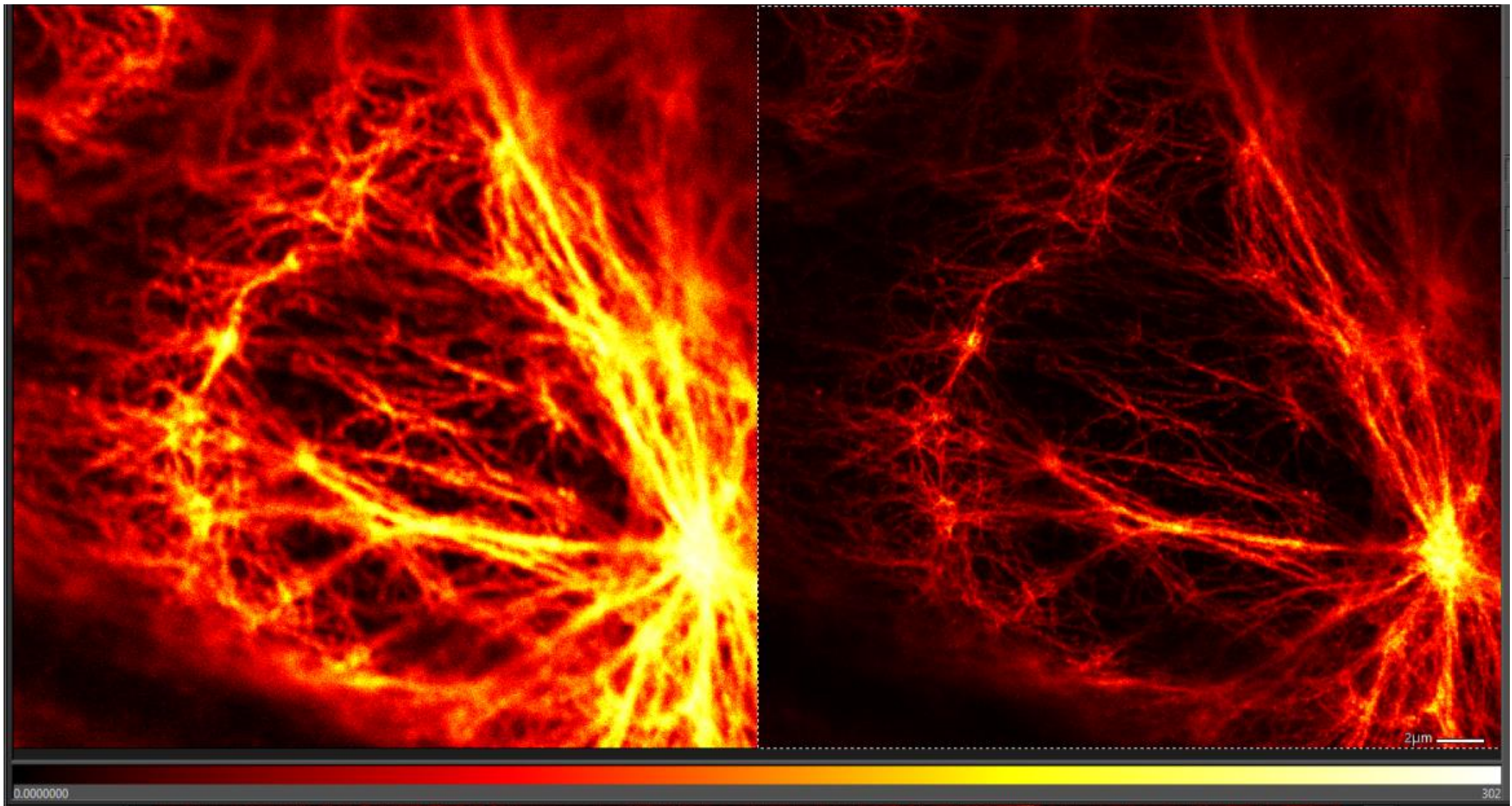
- A STED nyaláb hullámhosszának megfelelő megválasztásával a gerjesztett fluorofórokat kényszerített emisszióval alapállapotba lehet juttatni, így az általuk kibocsátott foton nem járul hozzá a képalkotáshoz
- a leképezés pásztázó lézernyalábbal történik pontról pontra





konfokális

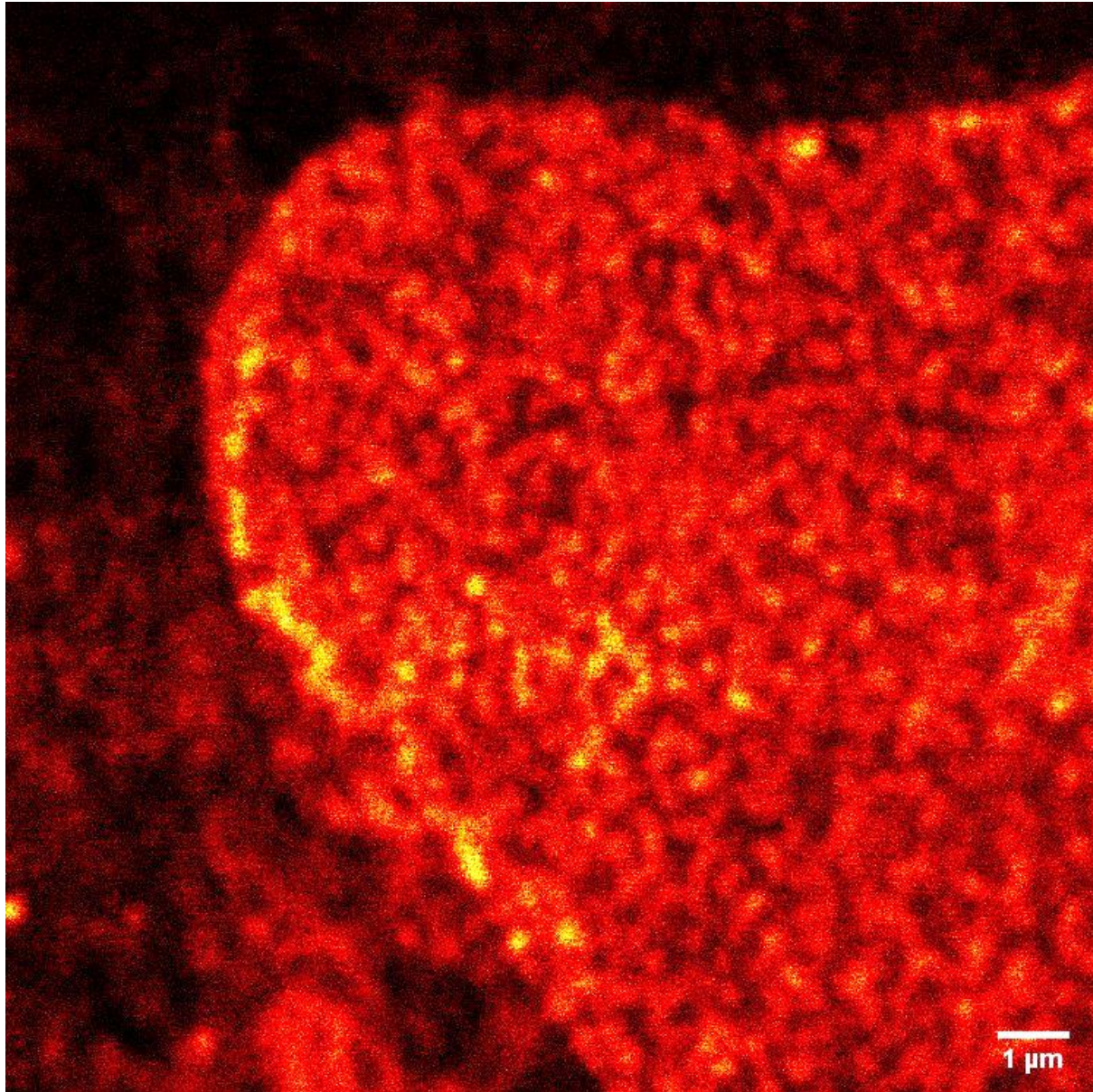
STED



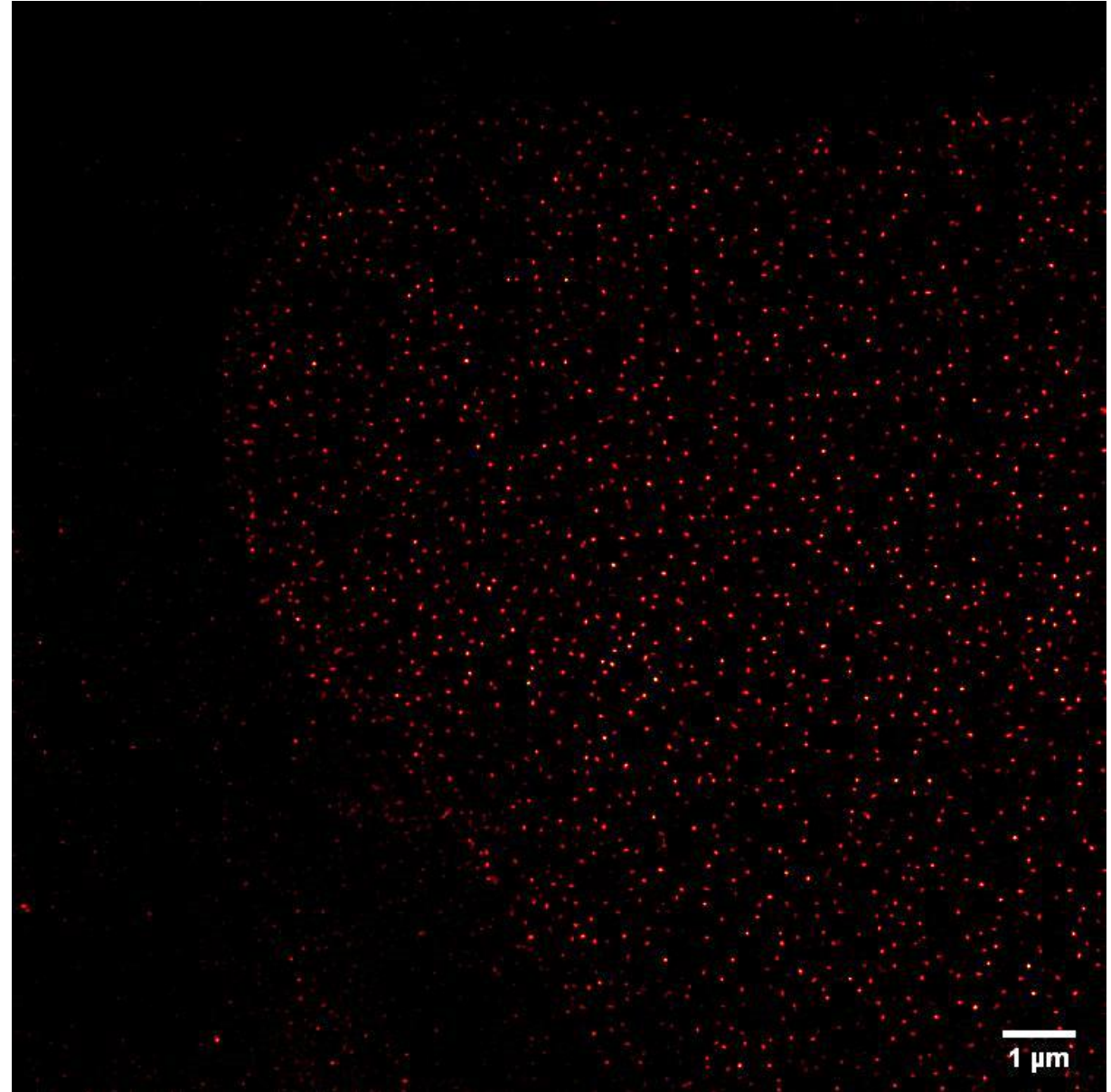


# Nuclear pores of HeLa cells

konfokális



STED



# Ellenőrző kérdések felkészüléshez:

- ✓ a felbontóképesség korlátai
- ✓ 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