

Optische Mikroskopie

Vortrag im Rahmen
der Vorlesung Biophysik 1
von Jörg Breitbarth

Inhalt

1. Problematik
2. Phasenkontrastmikroskopie und Nomarski-Interferenz-Mikroskopie
 - 2.1. Phasenkontrastmikroskopie
 - 2.2. Nomarski-Interferenz-Mikroskopie
 - 2.3. Beispiele und Vergleich
3. Fluoreszenzmikroskopie
 - 3.1. Zur Erinnerung: Fluoreszenz
 - 3.2. Warum Fluoreszenzmikroskopie?
 - 3.3. Markierung der zu untersuchenden Objekte
 - 3.3.1. Immunfluoreszenz
 - 3.3.2. GFP
 - 3.4. Das Fluoreszenzmikroskop
4. Konfokale Mikroskopie
 - 4.1. Prinzip
 - 4.2. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)
 - 4.3. Zwei-Photonen-Anregung
 - 4.4. 4pi-konfokale Mikroskopie
 - 4.5. Weitere Verbesserung der Auflösung durch stimulierte Emission
5. Literatur

1. Problematik

Die meisten biologischen Proben sind transparent.
⇒ mit ‚normalen‘ Lichtmikroskopen ist keine Abbildung möglich

2. Phasenkontrastmikroskopie und Nomarski-Interferenz-Mikroskopie

2.1. Phasenkontrastmikroskopie

Amplitudendifferenzen ergeben Helligkeitsunterschiede für das Auge. Phasendifferenzen kann das Auge nicht wahrnehmen.

Bei einem Phasenkontrastmikroskop werden Phasen- in Amplitudendifferenzen umgewandelt.

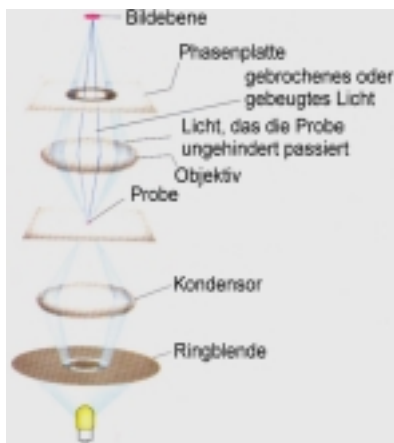


Abb.1 Strahlengang in einem Phasenkontrastmikroskop

Die Probe wird durch eine Ringblende beleuchtet. In der Probe wird das Licht zum Teil gebeugt. Die Phasenplatte absorbiert einen Teil des ungebeugten Lichts und verschiebt seine Phase um $\lambda/4$. Ungebeugtes und gebeugtes Licht haben damit ungefähr gleiche Intensität und interferieren in der Bildebene.

2.2. Nomarski-Interferenz-Mikroskopie

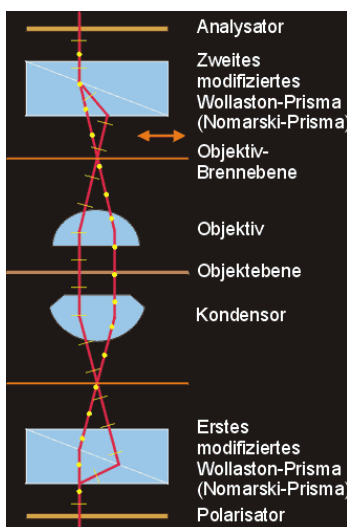


Abb.2 Strahlengang im Normaski-Interferenz-Mikroskop

Das Licht wird linear polarisiert und durch ein Nomarski-Prisma in zwei Strahlen aufgeteilt, deren Polarisation senkrecht zueinander liegt. Durch ein geeignetes Linsensystem treten die Strahlen in minimalem Abstand senkrecht durch die Probe und werden dahinter wieder zusammengeführt. Dann durchlaufen sie ein zweites Nomarski-Prisma und treffen auf einen Analysator. Es entsteht ein reliefartiger Kontrast.

Aber: Die dreidimensionale Struktur des Bildes muss nicht bedeuten, dass das Objekt auch eine 3-D Struktur aufweist. Die Struktur kann ihre Ursachen auch in einem Unterschied in der Brechzahl haben!

2.3. Beispiele und Vergleich

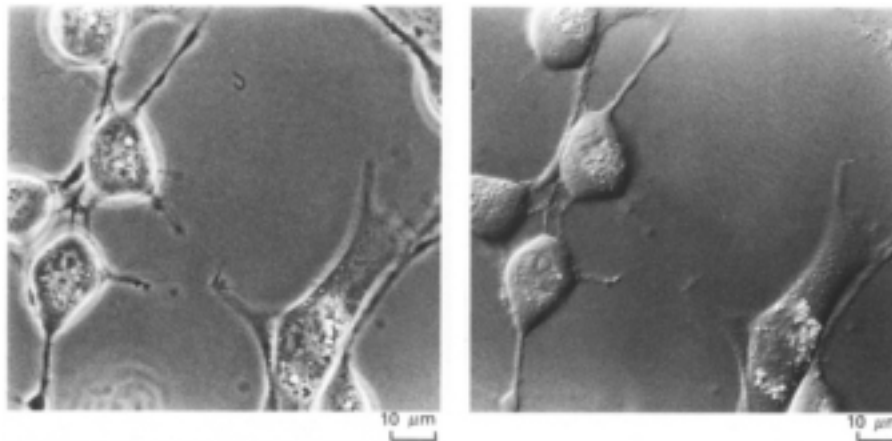


Abb.3 kultivierte Fibroblasten
links: PK-Mikroskop
rechts: NI-Mikroskop

Vergleich von Phasenkontrast- und Nomarski-Interferenz-Mikroskopie:

Bei der Phasenkontrastmikroskopie hat man eine gute Beobachtung der Struktur und der Bewegung von Organellen. Es lassen sich damit allerdings nur Einzelzellen oder dünne Zellrasen untersuchen. Bei zu dicker Probe wird der Halo-Effekt (Lichtsäume um die Objekte) zu stark. Mit der Nomarski-Interferenz-Mikroskopie lassen sich auch dickere Proben untersuchen. Organellen werden aber nicht so detailliert abgebildet. Die maximale Auflösung bei beiden Verfahren entspricht in etwa der, die man auch mit konventionellen Lichtmikroskopen erreichen kann. Sie beträgt ungefähr 200nm. Gemeinsam ist beiden Vorgehensweisen auch, dass die Probe während der Untersuchung weder angegriffen noch zerstört wird. Nachteilig ist die eher schlechte Abbildung der Organellen und die fehlende Möglichkeit, selektiv abzubilden.

3. Fluoreszenzmikroskopie

3.1. Zur Erinnerung: Fluoreszenz

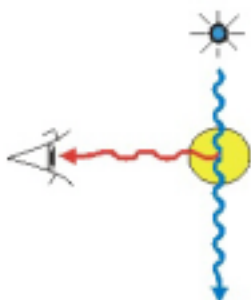


Abb.4 Beobachtung von Fluoreszenz

Licht bestimmter Wellenlänge wird in das fluoreszierende Medium (Fluorochrom) eingestrahlt. Dann wird Licht mit erhöhter Wellenlänge (in alle Richtungen) beobachtet. Bei einer Beobachtung senkrecht zur Einstrahlrichtung stört das Anregungslicht nicht.

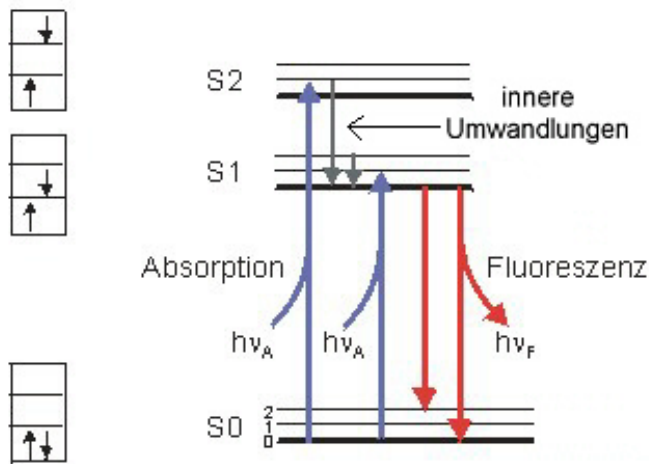


Abb.5 Jablonski-Diagramm

Licht wird absorbiert, d.h. es werden höhere elektronische Zustände erreicht. Elektronenübergänge sind dann auch ohne Lichtemission möglich. Es handelt sich dann um ‚innere Umwandlungen‘, wie z.B. Schwingungs- und Rotationsanregungen. Der Übergang ins Grundniveau geschieht jedoch unter Lichtemission \Rightarrow Fluoreszenz.

Zeitdimensionen: Absorption: $\sim 10^{-15}$ s; Fluoreszenz: $\sim 10^{-8}$ s

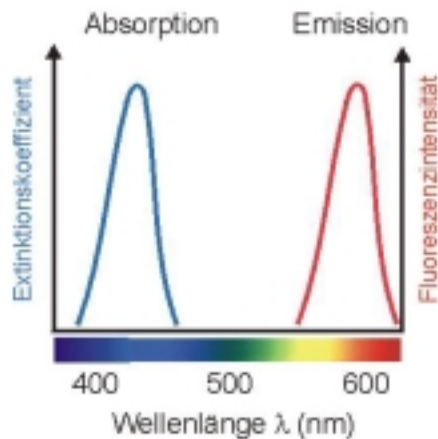


Abb.6 Absorptions- und Emissionsspektrum

Das Maximum der Emission liegt bei höherer Wellenlänge (= niedrigere Energie) als das der Absorption (Stokessche Regel). Der Energieverlust ist hierdurch erkennbar. Der Abstand zwischen Absorption und Emission ist hier übertrieben dargestellt. In der Realität überlappen beide Linien sogar meistens, wie es z.B. weiter unten zu sehen ist.

3.2. Warum Fluoreszenzmikroskopie?

Absorptions- und Emissionsspektrum sind getrennt. Damit lassen sich die gewünschten Wellenlängen leicht durch Filter trennen. Man hat kein störendes Licht.

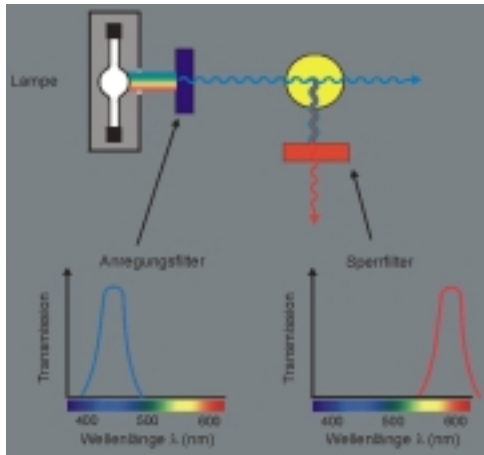


Abb.7

3.3. Markierung der zu untersuchenden Objekte

3.3.1. Immunfluoreszenz

Beispiele für Farbstoffgruppen:

- Rhodamin
- Fluorescein

Diese Farbstoffe lassen sich schlecht an die gewünschten Moleküle in der Probe anbringen, sie lassen sich aber außerhalb der Probe chemisch gut an Antikörper binden.



Abb.8

Zu jedem Antikörper gibt es ein entsprechendes Antigen. Nach Einbringen in die Gewebeprobe wird der Antikörper (mit angehängtem Fluorochrom) an das jeweilige Antigen gebunden. Unter Bestrahlung mit dem Anregungslicht, leuchtet dieses auf.

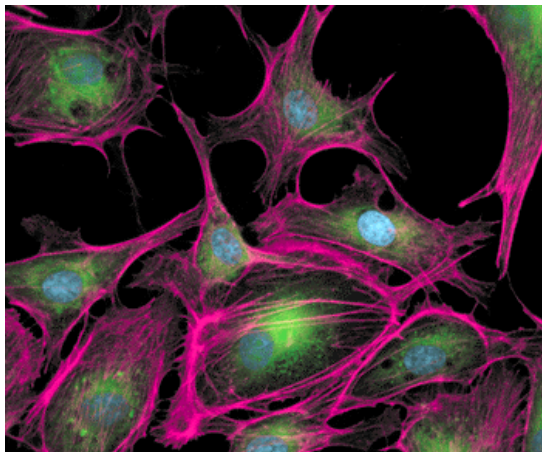


Abb.9 Beispiel einer Probe, die mittels Immunfluoreszenz gefärbt wurde. (Struktur von Arterienzellen der Lunge eines Rindes)

3.3.2. GFP (grün fluoreszierendes Protein)



Abb.10

Manche Quallen leuchten. Das dafür verantwortliche Protein konnte isoliert werden \Rightarrow GFP (green fluorescing protein).

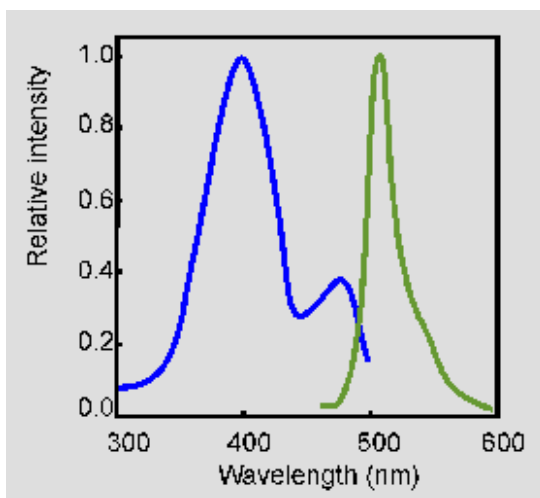


Abb.11 Absorptions- und Emissionsspektrum von GFP

Die Absorptionsmaxima liegen bei 395nm und 470nm, die Emissionsmaxima bei 509nm und 540nm.

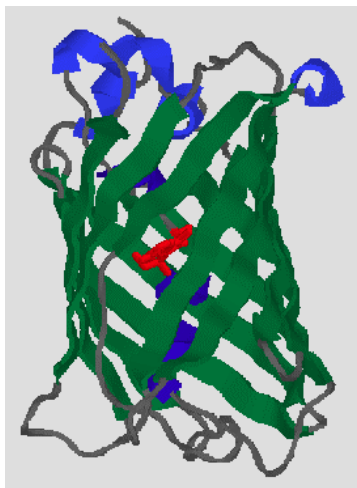


Abb.12 Dreidimensionale Struktur von GFP

Man hat eine neue Struktur bei GFP: ‚beta-can‘. Sie besteht außen aus β -Faltblättern (grün), innen aus α -Helizes (dunkelblau). Außerdem enthält sie kurze spiralförmige Segmente (hellblau) und das Chromophor in der Mitte (rot). Der Durchmesser dieser Struktur beträgt $\sim 30\text{\AA}$ und die Länge $\sim 40\text{\AA}$.

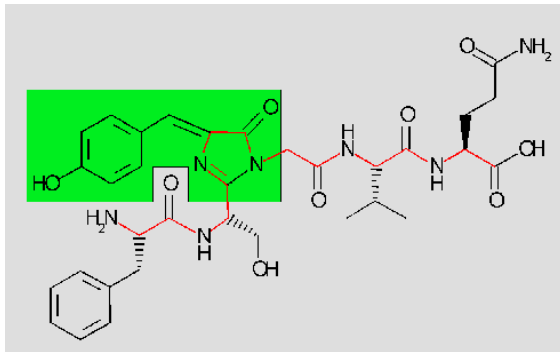


Abb.13 Chromophor von GFP
rot: Peptidkette
grün: verantwortlich für Fluoreszenz

Die Ringstruktur innerhalb des Peptids wurde bei selber Aminosäurefolge bisher nirgends beobachtet.

Vorteile von GFP: es kann leicht an andere Proteine angehängt werden; sie verlieren dabei meist nicht ihre Funktion, auch wenn sie selbst ungefähr die selbe Größe haben wie das GFP oder sogar kleiner sind..

GFP lässt sich selektiv an ein bestimmtes Protein binden, welches dann in seiner Funktion ‚verfolgt‘ werden kann. Bei der Immunfluoreszenz sind es meistens Proteingruppen.



Abb.14 GFP (links) wird an ein anderes Protein (rechts) angehängt

Außer GFP gibt es noch andere fluoreszierende Proteine, mit anderen Farben. Somit können mehrere Proteine (mittels verschiedener Farben) gleichzeitig untersucht werden.

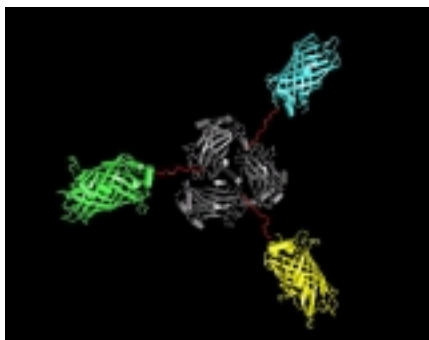


Abb.15 Untersuchung mit drei verschiedenen fluoreszierenden Proteinen



Abb.16 Verdeutlichung der Wirkung von GFP
Mäusen wurde GFP in ein Hautprotein eingebaut

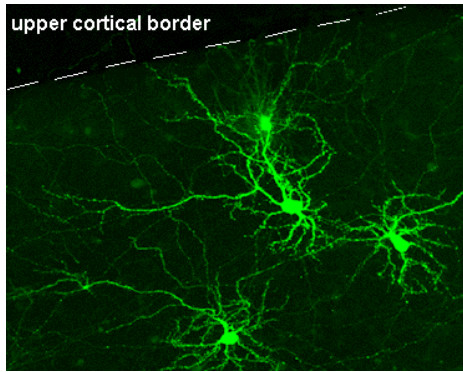


Abb.17 Beispiel einer Probe, die durch GFP gefärbt wurde
 An einen Botenstoff im Nervensystem wurde GFP angehängt. Der Verlauf der Nervenbahnen ist dadurch gut zu erkennen.

3.4. Das Fluoreszenzmikroskop

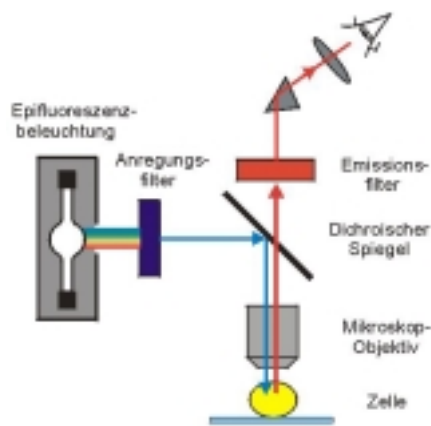


Abb.18 Strahlengang im Fluoreszenzmikroskop (schematisch)

Die gewünschte Wellenlänge zur Anregung wird herausgefiltert. Der dichroische Spiegel dient zur Strahlteilung. Ist die auftreffende Wellenlänge kleiner als eine bestimmte Grenzwellenlänge funktioniert er als Spiegel. Größere Wellenlängen werden durchgelassen. Das zusätzliche Emissionsfilter filtert Störungen (z.B. Eigenfluoreszenz) heraus. Der Betrachter beobachtet das Bild durch ein Okular.

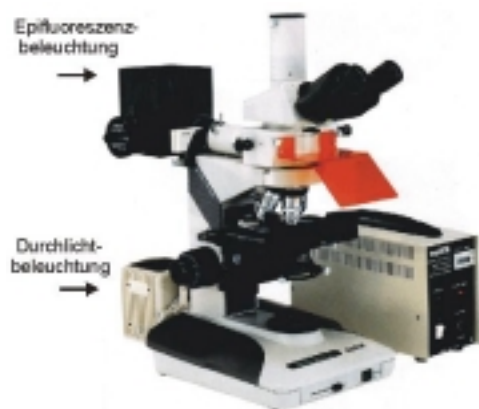


Abb.19 Handelsübliches Fluoreszenzmikroskop

Objektive in Fluoreszenzmikroskopen müssen UV-tauglich sein, da das Anregungslicht im UV-Bereich liegen kann. Die rote Platte schützt die Augen vor streuendem UV-Licht.

Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie:

- Beobachtung in Echtzeit
- Guter Kontrast durch Einfärbung

Nachteile der Fluoreszenzmikroskopie:

- Manchmal Zerstörung der Probe durch Farbstoffe (Immunfluoreszenz) und Anregungslicht (UV)
- Alle Ebenen in z-Richtung werden gleichzeitig angeregt \Rightarrow keine z-Auflösung

Die maximale Auflösung liegt auch bei etwa 200nm.

4. Konfokale Mikroskopie

4.1. Prinzip

Mit ‚normalen‘ Mikroskopen erhält man keine z-Auflösung. Dadurch ist bei Proben oft wenig zu erkennen, weil die Bildinformation aus der gesamten Tiefe kommt und die vielen Schichten sich gegenseitig verdecken. Einen Ausweg bietet die konfokale Mikroskopie.

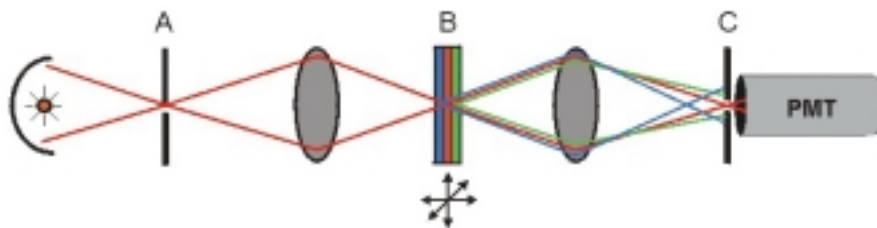


Abb.20 Strahlengang in einem konfokalen Mikroskop (schematisch)

Das Licht, das im Photomultiplier (PMT) ankommt stammt aus einer Ebene der Probe (B).

Das wird erreicht durch:

1. Die erste Lochblende (A) sorgt dafür, dass nur eine Ebene der Probe beleuchtet wird (roter Strahl)
2. Das wenige Licht, das dennoch aus anderen Ebenen kommt (grüner und blauer Strahl), wird durch die zweite Lochblende (C) ausgeblendet

Um ein Bild zu erhalten, muss die Probe abgescannt werden.

Ein Fluoreszenzmikroskop lässt sich natürlich auch konfokal betreiben. Man erhält dann z-aufgelöste Bilder.

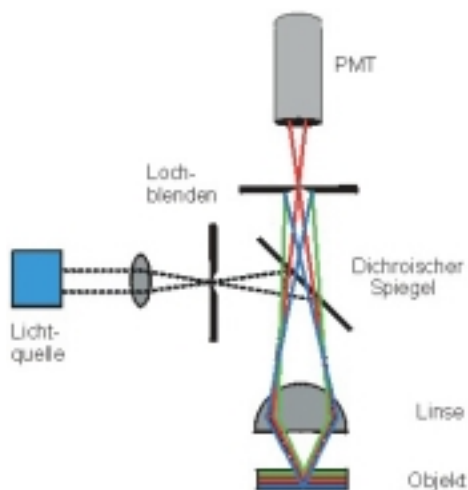


Abb.21 Strahlengang in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop

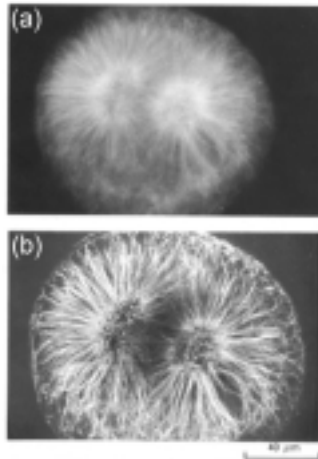


Abb.22 Aufnahme eines befruchteten Seeigeleis, das sich in der Mitosephase befindet.

(a) mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie ist die Mitosespindel durch die Hinter- und Vordergrund-fluoreszenz verdeckt

(b) durch die z-Auflösung ist die Mitosespindel gut zu sehen

4.2. CLSM

Die üblichste Verwendungsform eines konfokalen Mikroskops ist das CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope). Hier dient ein Laser zur Fluoreszenzanregung.

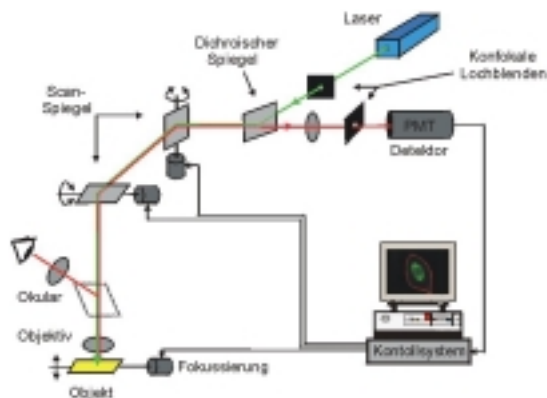


Abb.23 Confocal Laser Scanning Microscope

Der PC steuert die Scanspiegel (x- und y-Achse) und die Probe (z-Achse) und setzt die Daten zu einem Bild zusammen. Nachdem eine Ebene abgescannt wurde, kann eine weitere Schicht gescannt werden, usw. Die optischen Schnitte können dann zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden.

Geschwindigkeit und Auflösung: Die Scangeschwindigkeit liegt bei 1-2 Frames/s. Durch verschiedene Tricks kann sie jedoch verbessert werden. Schlitz- statt Lochblenden z.B., verringern zwar die Qualität des Bildes, die Scangeschwindigkeit erhöht sich aber auf Videorate (25 Frames/s). Die maximale Auflösung eines CLSMs beträgt 200nm lateral und 500-900nm axial.



Abb.24 Handelsübliches CLSM
Leica TCS SP

4.3. Zwei-Photonen-Anregung

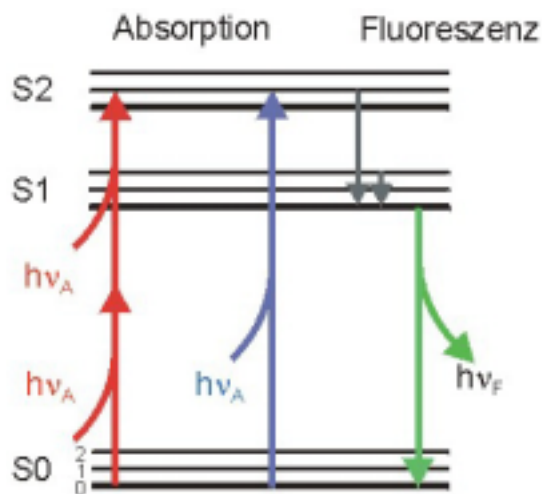


Abb. 25 Prinzip der Zwei-Photonen-Anregung

Die Anregung ins nächsthöhere Niveau kann durch ein Photon oder durch zwei Photonen doppelter Wellenlänge (= halbe Energie) erfolgen. Voraussetzung ist, dass beide Photonen innerhalb der Absorptionszeit von 10^{-15} s absorbiert werden müssen. Man benötigt also eine hohe Photonendichte, die durch Laserpulse erreicht wird.

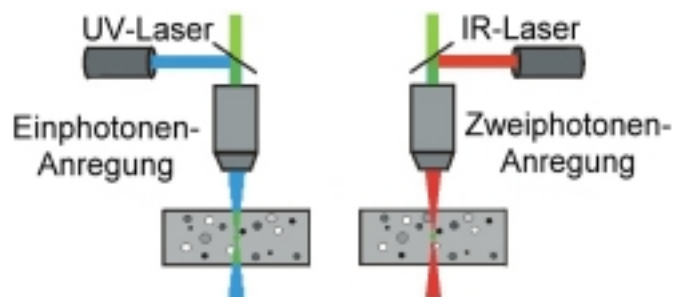


Abb. 26 Verdeutlichung des Unterschiedes zwischen Ein- und Zwei-Photonen-Anregung

Einphotonen-Anregung: Die Probe wird auch außerhalb des Brennpunktes zu Fluoreszenz angeregt. Es ist eine konfokale Optik nötig.

Zweiphotonen-Anregung: Nur im Brennpunkt ist die Intensität groß genug zur Anregung. Ein Vorteil besteht auch darin, dass die Proben durch IR-Licht weniger geschädigt werden als durch UV-Licht.

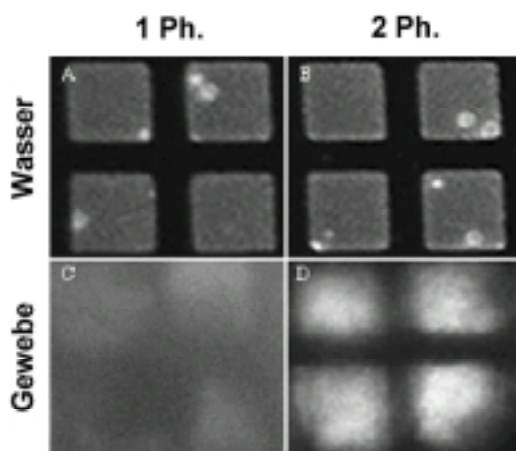


Abb.27 Zwei-Photonen-Mikroskopie in Geweben

Ein weiterer Vorteil ist, dass sich die Autofluoreszenz gut von der Zwei-Photonen-Anregung trennen lässt.

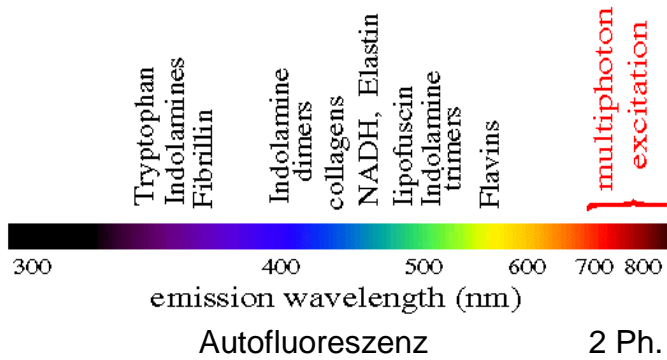


Abb.28



Abb.29 Handelsübliches Zwei-Photo-nen-Mikroskop
Leica TCS MP

4.4. 4pi-konfokale Mikroskopie

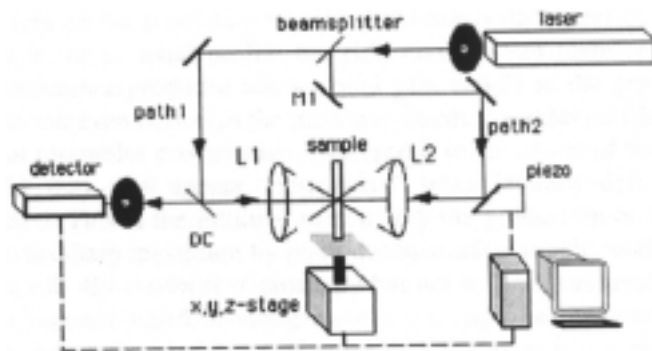


Abb.30 Strahlengang in einem 4pi-konfokalen Mikroskop

Zwei Laserstrahlen interferieren. Es entsteht ein Maximum und ein Nebenmaximum auf jeder Seite des Hauptmaximums. Dieses ist 3-4 mal schmaler als der Brennpunkt in der Zwei-Photonen-Anregung. Die Nebenmaxima können dann aus dem entstehendem Bild herausgerechnet werden.

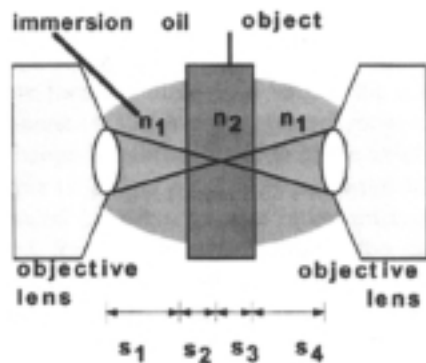


Abb.31 Warum wird ein Piezo eingesetzt?

Innerhalb einer Probe können unterschiedliche Brechungsindizes auftreten. Das ist kein Problem wenn in der Mitte der Probe gescannt wird (bei homogenen Proben). Eine andere z-Ebene ergibt jedoch unterschiedliche Weglängen in den verschiedenen Brechungsindizes. Das führt zu einer Phasenverschiebung, was durch Nachregeln mit dem Piezo ausgeglichen wird. Auch inhomogene Proben lassen sich untersuchen, das Nachregeln ist allerdings komplizierter.

Durch die 4pi-konfokale Mikroskopie bleibt die maximale laterale Auflösung gleich (200nm). Die maximale axiale Auflösung wird jedoch verbessert. Sie beträgt etwa 150nm. Damit wird die axiale Auflösung besser als die laterale.

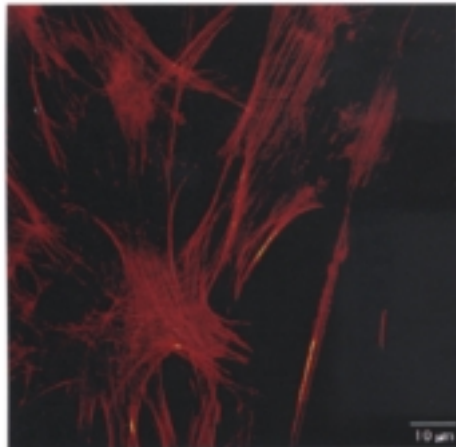


Abb.32 Fibroblasten in der Haut einer Maus aufgenommen mit einem konventionellen konfokalen Mikroskop

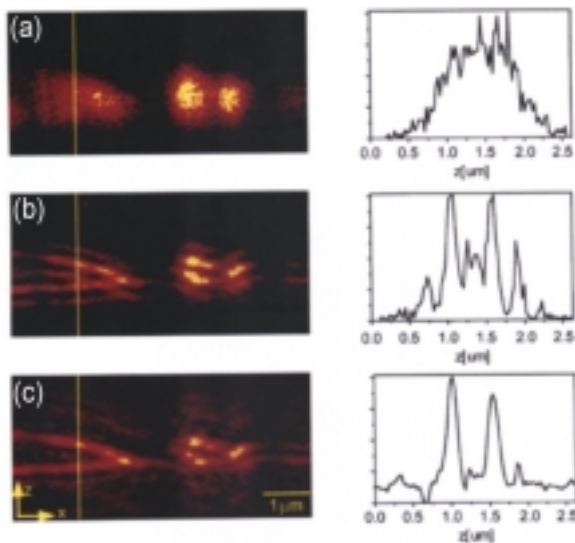


Abb.33 Vergrößerter Ausschnitt der Fibroblasten

(a) Zwei-Photonen-Mikroskop

(b) 4pi-konfokales Mikroskop mit Nebenmaxima

(c) 4pi-konfokales Mikroskop; Nebenmaxima herausgerechnet

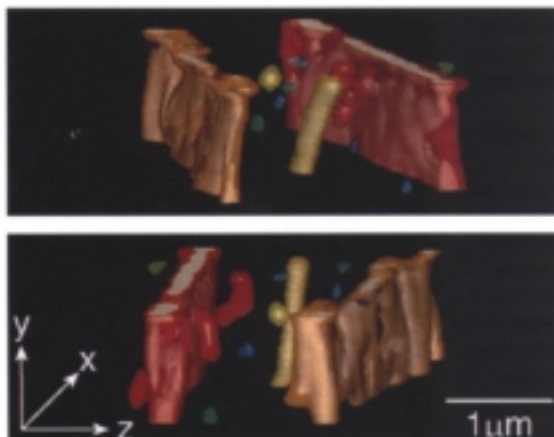


Abb.34 Zusammensetzung der einzelnen Schnitte zu einem dreidimensionalen Bild; Aufnahme durch das 4pi-konfokale Mikroskop

4.5. Weitere Verbesserung der Auflösung durch stimulierte Emission

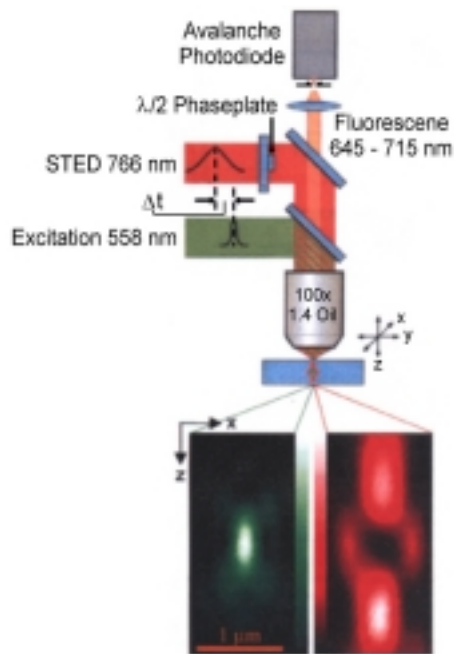


Abb.35 Prinzip der Verbesserung durch stimulierte Emission

Dem eigentlichen anregenden Strahl (grün) wird im Abstand Δt ein weiterer Strahl (rot) überlagert. Dieser STED-Strahl (stimulated emission depletion) sorgt für eine strahlungslose Entleerung der angeregten Zustände (stimulierte Emission). Durch die Geometrie beider Strahlen (s. Abb.35 unten) wird die Spotgröße verringert (das Volumen beträgt nur noch 1/18). Der STED-Strahl sorgt nämlich genau am Rand des Anregungsstrahls für die strahlungslose Entleerung.

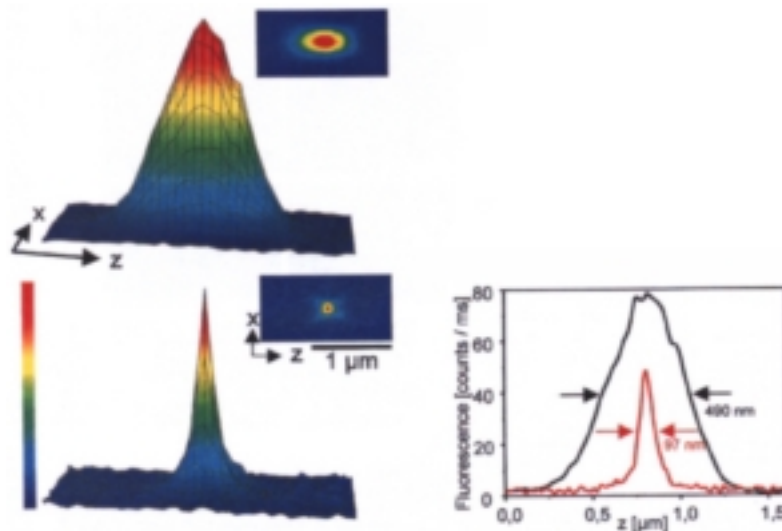


Abb.36 Vergleich der Spotgröße
oben: konventionelle konfokale Optik
unten: STED-Optik
rechts: Vergleich des axialen Intensitätsprofil (Reduzierung des axialen FWHM (full width at half maximum) um das 5,1fache)

Durch diese Methode wird sowohl die maximale axiale, als auch die maximale laterale Auflösung verbessert. Sie liegen beide im Bereich von 90 - 110 nm.

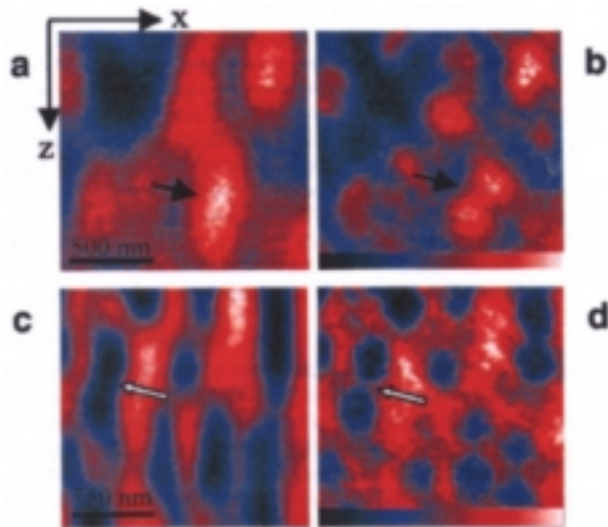


Abb.37 Vergleich von konfokaler (a,c) und STED-Fluoreszenz (b,d) Mikroskopie
a und b, bzw. c und d entsprechen jeweils derselben Aufnahme

5. Literatur

5.1. Bücher/Artikel

- **Allgemein:**
Darnell, J; Lodish, H.; Baltimore, D.: Molekulare Zellbiologie
- **konfokale Mikroskopie:**
Pawley, J.B.: Handbook of Biological Confocal Microscopy
- **4pi-konfokale Mikroskopie:**
Schrader et al. Biophysical Journal 75 (1998) 1659-1668
- **STED:**
Klar et al. PNAS 97 (2000) 8206-8210

5.2. Internet

- **Allgemein:**
Mikroskopie.de (www.mikroskopie.de/kurse/index.htm)
→ Kurs: Aufbau, Handhabung & Kontrastverfahren
- **Fluoreszenzmikroskopie:**
Vorlesungsskript zellbiologische Methoden
(www.kfa-juelich.de/ibi/ibi-1/stefring/methoden/methodin.htm)
→ Fluoreszenztechniken 1;2
- **GFP:**
Structure and Function of Green Fluorescent Protein
(public-1.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/jonda/index.htm)
- **Bildergalerie von Proben:**
Molecular Probes - Gallery
(www.probes.com/servlets/gallery/)