Pokročilé zobrazovací metody: Dvoufotonová, superrozlišovací a korelační mikroskopie

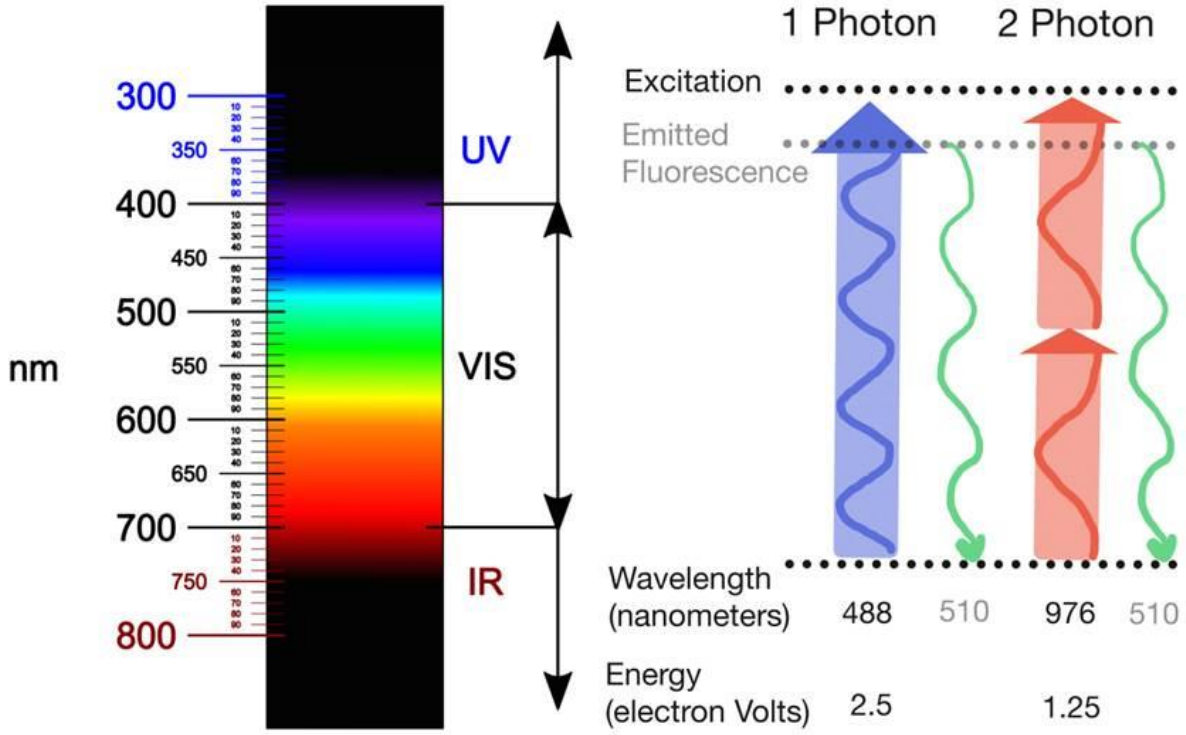
Zuzana Sumbalová Koledová

Dvoufotonová mikroskopie

- Fluorescenční zobrazovací technika
- Vhodná především pro zobrazování živých tkání do hloubky 1 mm
- Dvoufotonová absorpce
  - 1931: Maria Goeppert-Mayer
  - 2 fotony rovnaké nebo rozdílné frekvence dokáží excitovat molekulu ze stavu 1 (základní) do stavu s vyšší energií v jedné kvantové události
  - Oba fotony musí zasáhnout molekulu během 1 femtosekundy

  - lasery produkující velice rychlé pulzy světla (80 MHz) s vysokou energií (150.000 W)

Dvoufotonová mikroskopie



Tradiční FM:
Jeden foton 390-700 nm
Po excitaci návrat do stabilního stavu za emise fotonu s nižší energií než excitační

Dvoufotonová FM:
dva fotony s dvounásobnou vlnovou délkou
Po excitaci návrat do stabilního stavu za emise fotonu jako u ekvivalentu FM

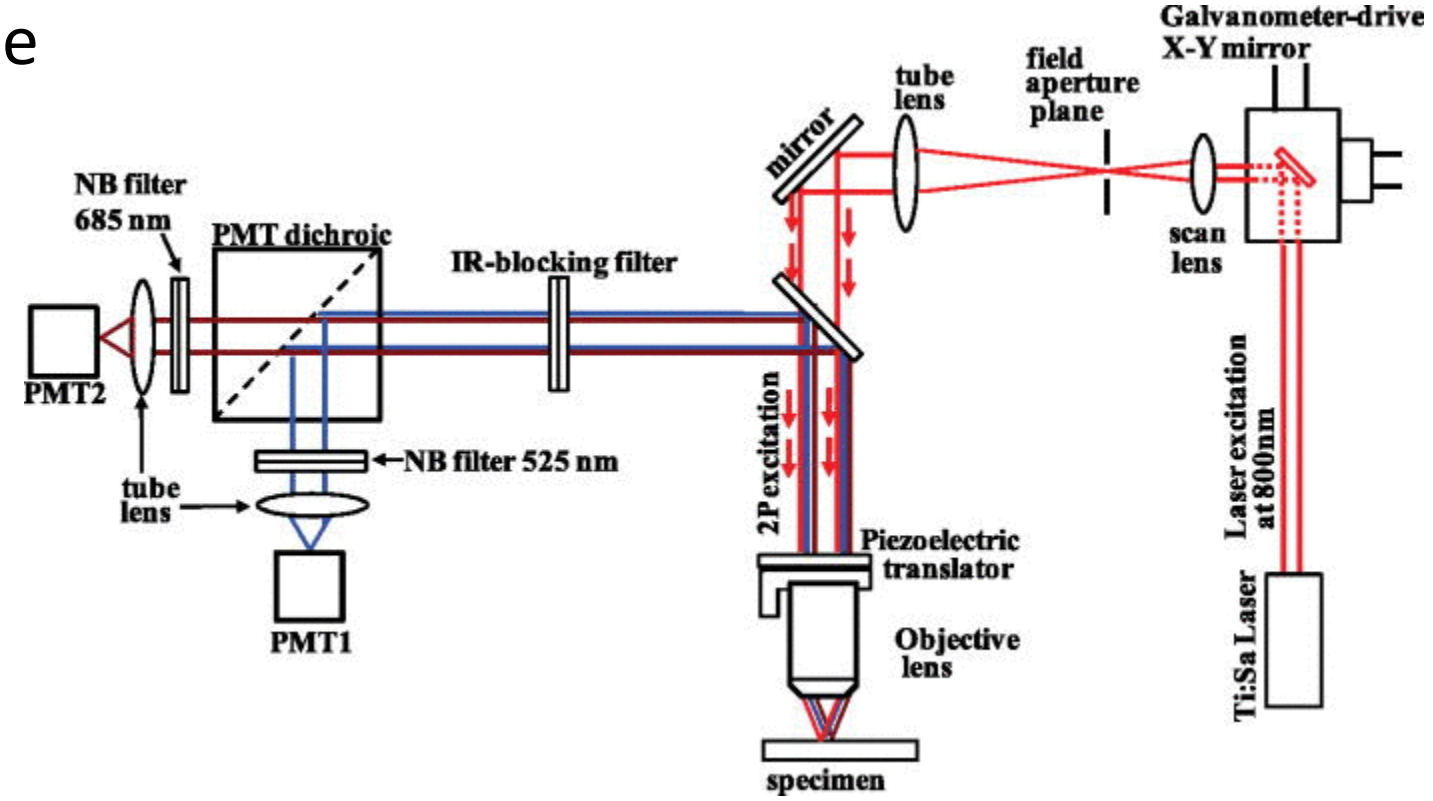
Excitace fluorescenčních barviček:
Tradiční FM: 400-500 nm
Dvoufotonová FM: 800-1000 nm

http://www.signaltonoisemag.com/allarticles/2018/9/17/dissecting-two-photon-microscopy

Dvoufotonová mikroskopie

- 1990: Winfried Denk & James Strickler, laboratoř Dr. Watt W. Webb (Cornell University)
- dvoufotonová absorpce

  + laserový skener



DOI: 10.1063/1.4825319

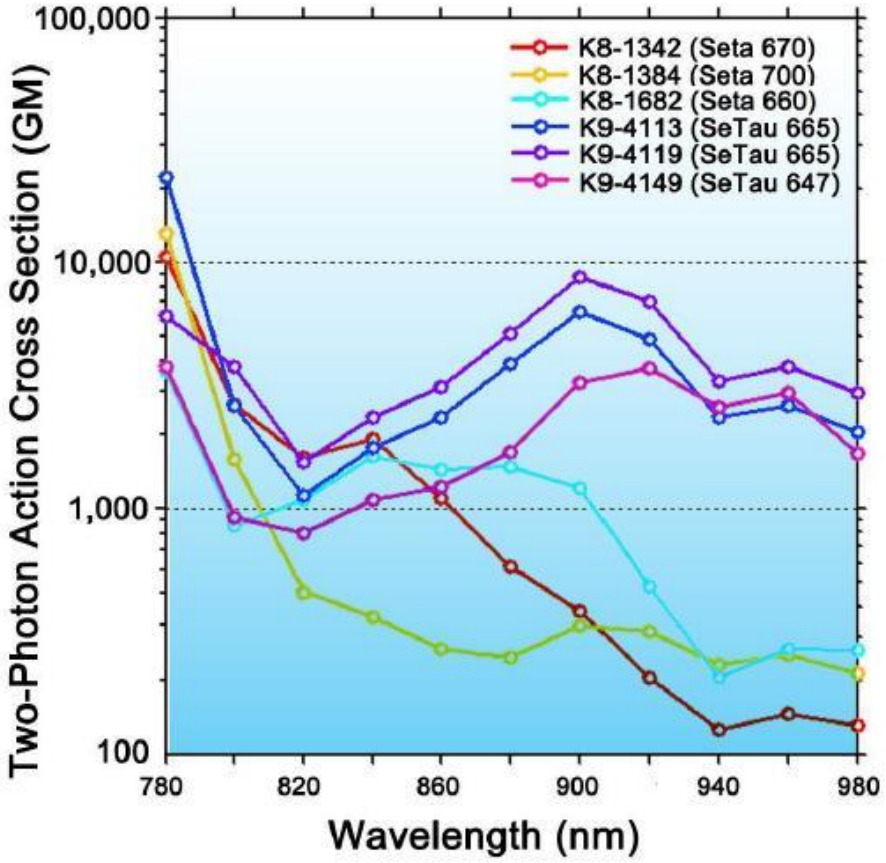
Dvoufotonová mikroskopie

- Výhody:
  - Delší vlnové délky se méně rozptylují než kratší – vysoké rozlišení
  - Fotony s nižší energií způsobují méně škod v tkáni/vzorku
  - Detekce fotonů je účinnější než u konfokální mikroskopie – i rozptýlené fotony přispívají k použitelnému signálu
- Nevýhody:
  - Vyšší pořizovací náklady
  - Dvoufotonové absorpční spektrum molekuly se může signifikantně lišit od jejího jednofotonového absorpčního spektra

Dvoufotonová mikroskopie - barvičky

- Klasické fluorescenční proteiny – CFP, GFP, YFP, RFP
- Squarainové barvy
  (Seta-670, Seta-700, Seta-660)
- Squarainové rotaxany
  (Se Tau-647, Se-Tau 665)

– velmi vysoká účinnost dvoufotonové absorpce



https://www.setabiomedicals.com/2-photon-microscopy.html

Dvoufotonová mikroskopie: použití

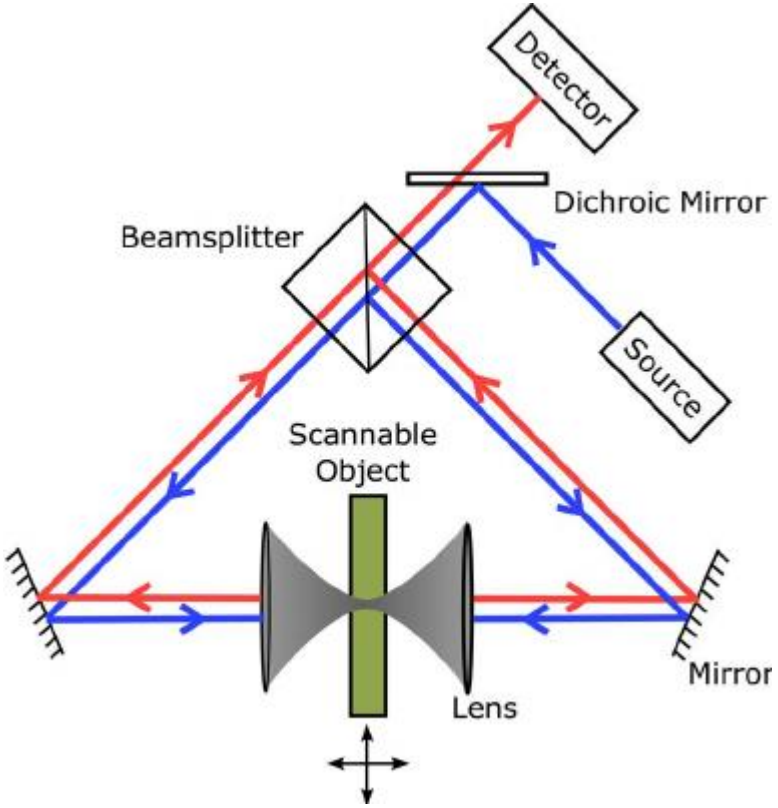
- Embryologie a vývojová biologie, fyziologie, neurobiologie, výzkum rakoviny, tkáňové inženýrství

- https://www.youtube.com/watch?v=Pmw-KGgM_eo

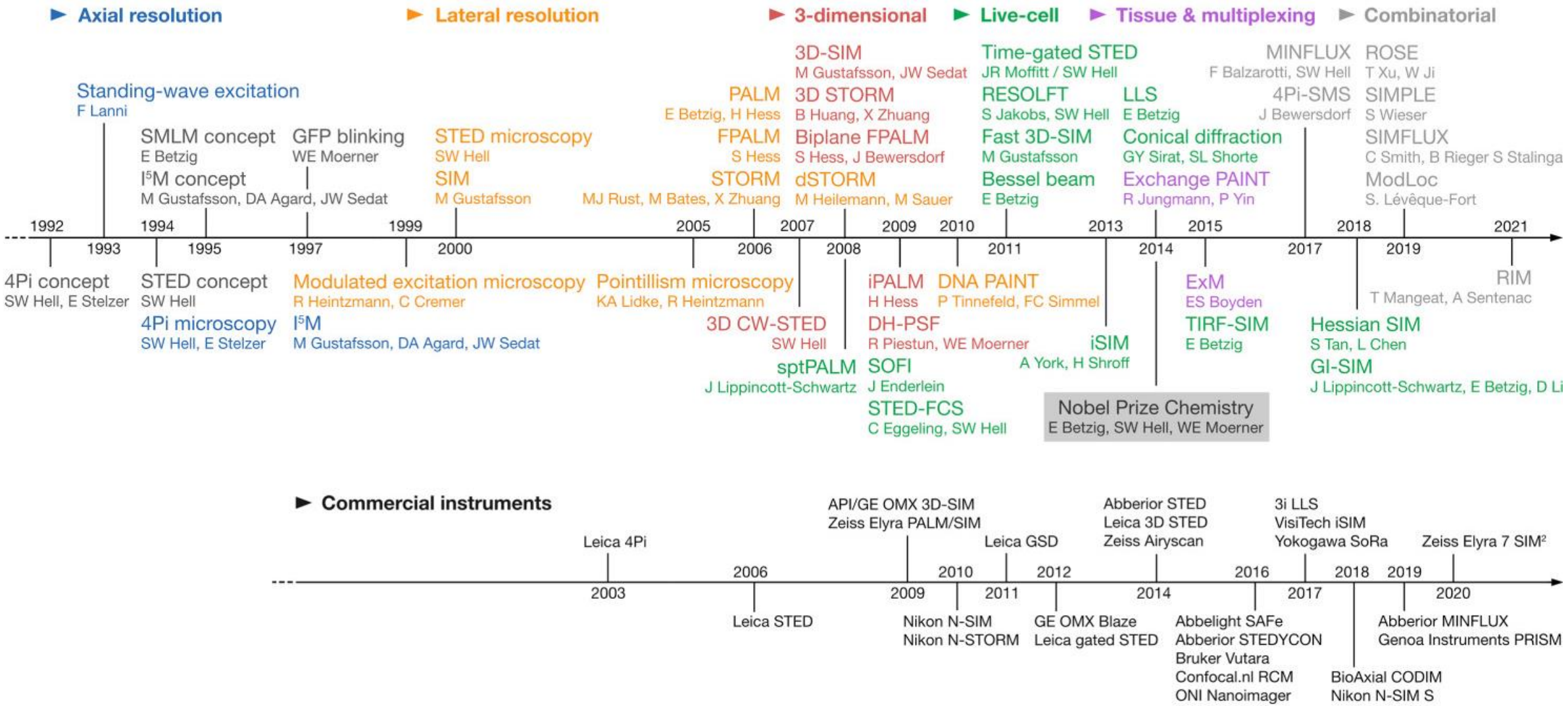
Superrozlišovací mikroskopie

- Techniky světelné mikroskopie, které umožňují vyšší rozlišení než je difrakční limit

- 4 Pi mikroskop
  - Axial resolution: 500-700 nm ⇨ 100-150 nm



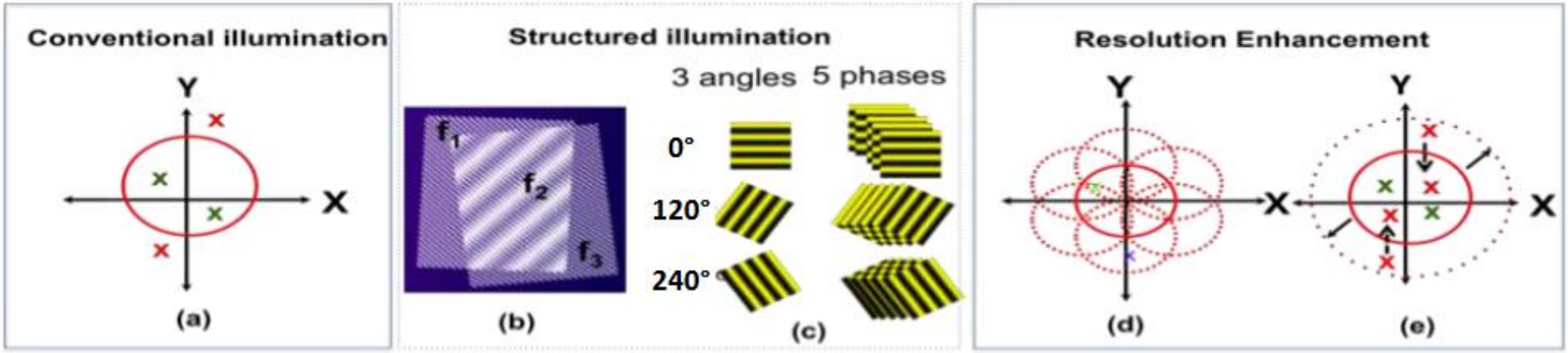
Superrozlišovací mikroskopie



Kirti P, Benedict D, Rainer H, Lothar S. Phil. Trans. R. Soc. A.2022 http://doi.org/10.1098/rsta.2021.0110

Superrozlišovací mikroskopie: SIM

- Strukturní iluminační mikroskopie (SIM)
  - Excitace struktury neuniformním světelným vzorem – posun v prostorových frekvencích vzorku, vznik „Moiré fringes“
  - 3D SIM: laterální posun iluminační mřížky (5 fází), 3 úhly, záznam prostorově modelovaných obrazů



Superrozlišovací mikroskopie: SIM

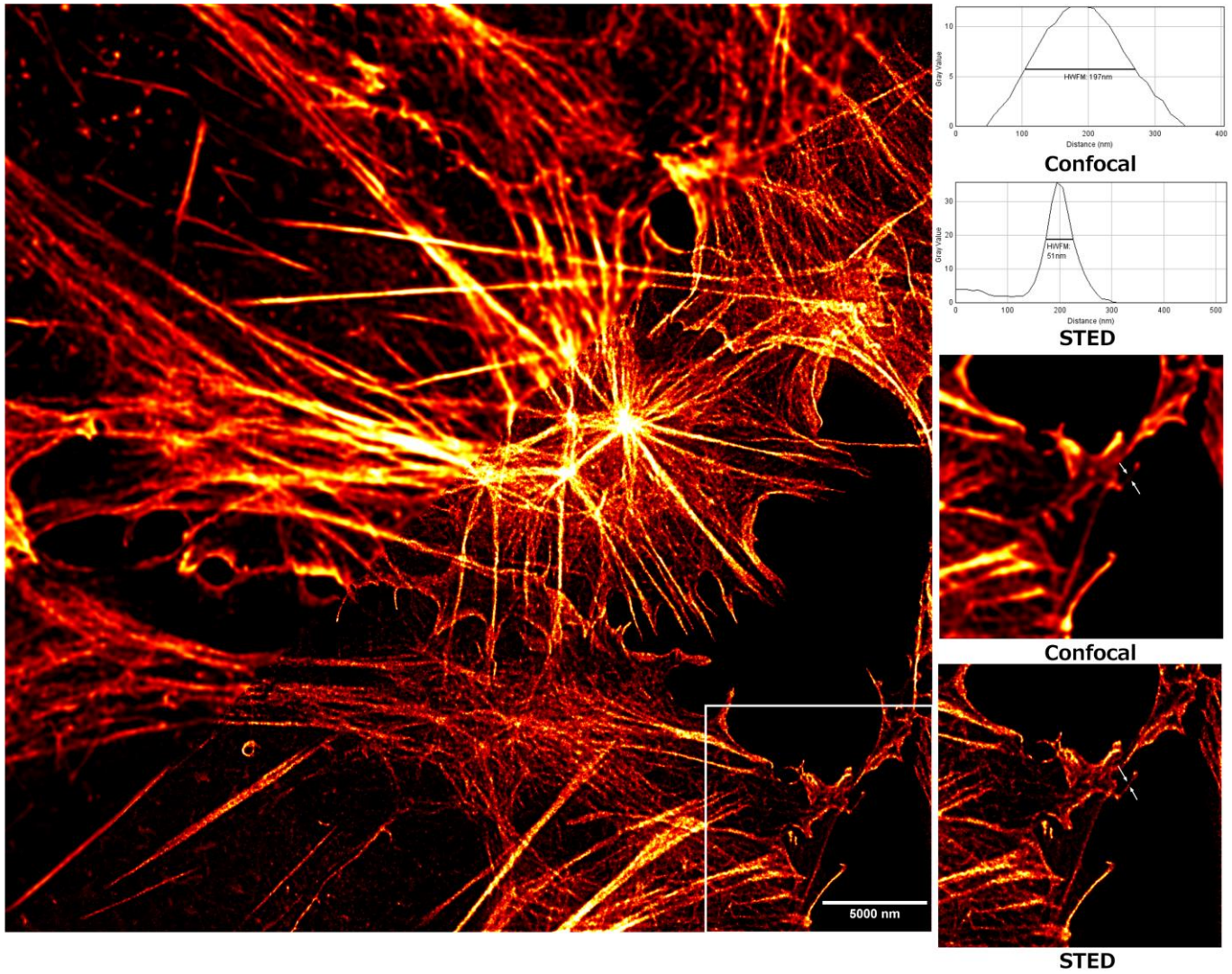
- Strukturní iluminační mikroskopie (SIM)
  - Excitace struktury neuniformním světelným vzorem – posun v prostorových frekvwencích vzroku, vznik „Moiré fringes“
  - 3D SIM: laterální posun iluminační mřížky (5 fází), 3 úhly, záznam prostorově modelovanách obrazů

Superrozlišovací mikroskopie: STED

- Stimulovaná deplece emise
  - Dva pulzy laseru: excitační a STED
  - FWHM

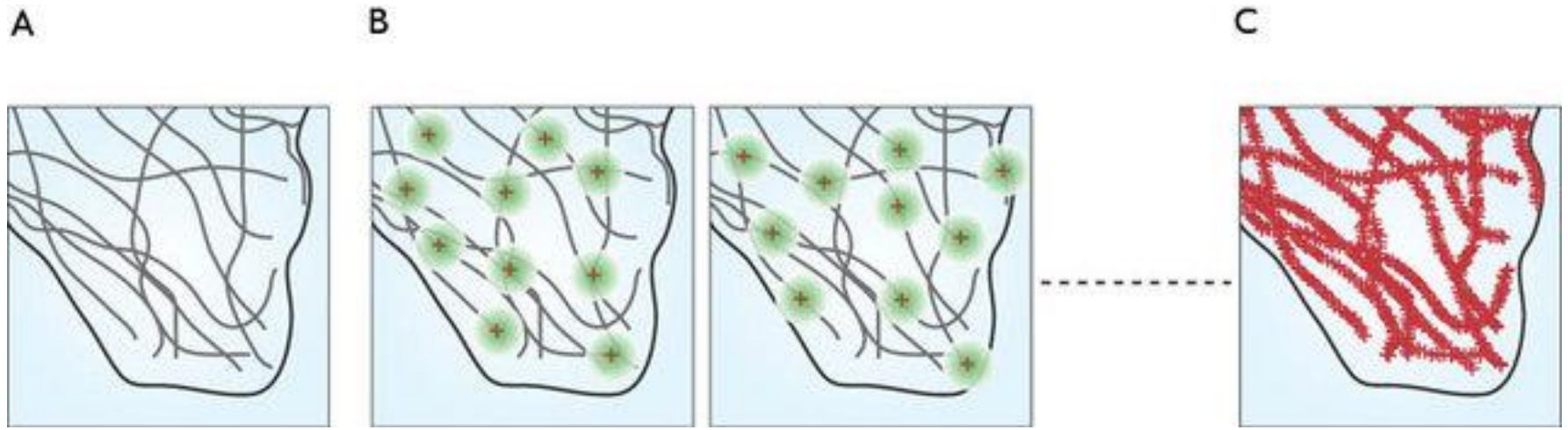
$$\Delta r \approx \frac{\Delta}{\sqrt{1 + I_{\max}/I_s}}$$

Δr - Laterální rezoluce
Δ – FWHM / PSF
I_{max} – vrcholová intenzita STED laseru
I_s – hraniční intenzita púro saturovanou depleci emise



Superrozlišovací mikroskopie: STORM, PALM, FPALM

- Stochastická optická rekonstrukční mikroskopie (STORM)
- Fotoaktivační lokalizační mikroskopie (PALM)
- Fluorescenční PALM (FPALM)
- Sekvenční aktivace a časově rozlišená lokalizace fotopřepínatelných fluoroforů



Nature Photonics, 2009

Superrozlišovací mikroskopie

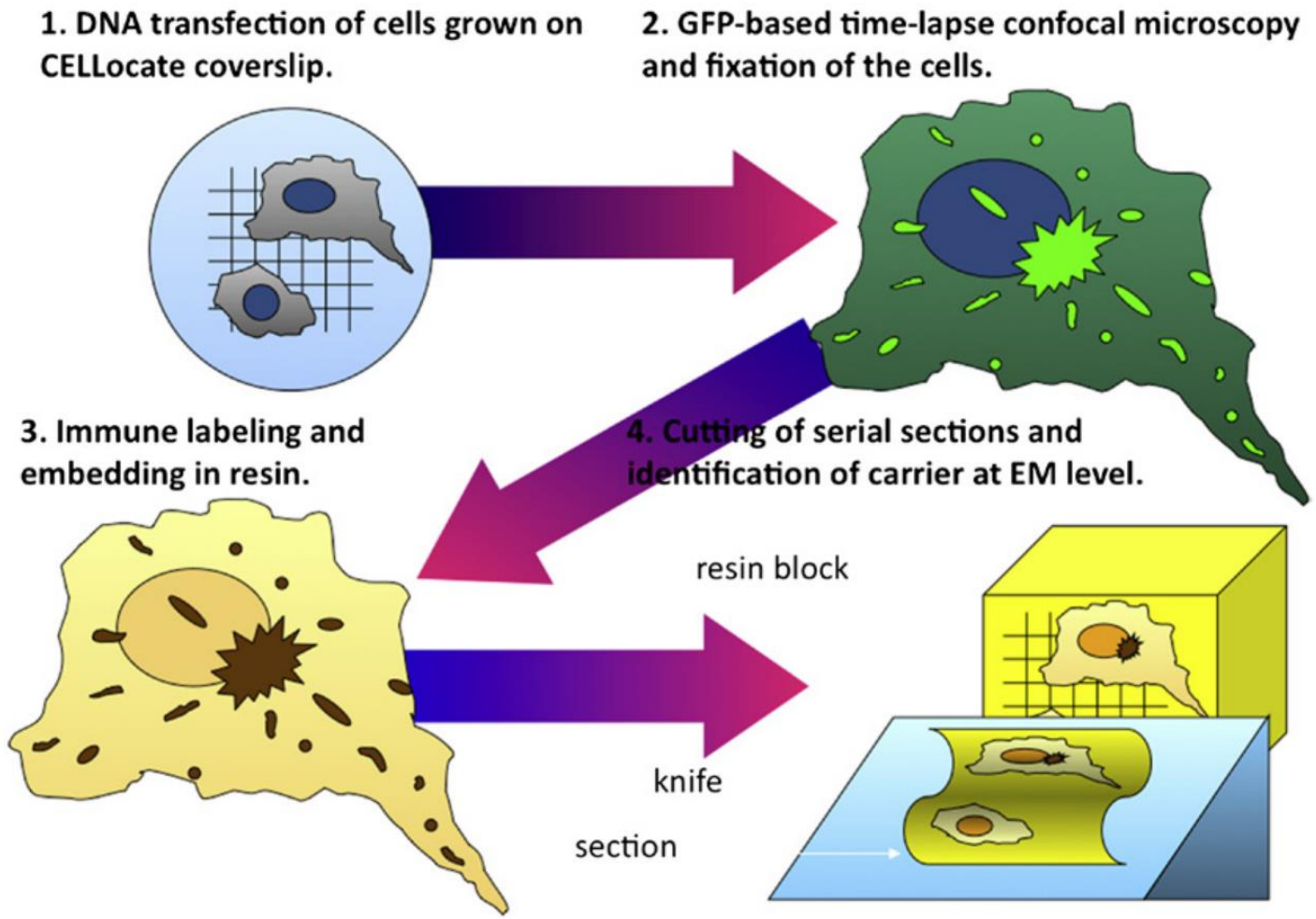
SIM	PALM/STORM
Nenáročná příprava vzorků	Náročná příprava vzorků
Možnost použití konvenčních fluoroforů	Fotoaktivovatelné fluorofory, Alexa, Atto
Snímaní živých dějů	Vhodné zejména pro fixované preparáty
Rozlišení cca 80-100 nm (x,y), 250 nm (z)	Rozlišení 10-20 nm (x,y), 50 nm (z)
Vysoká rychlost	

Korelační mikroskopie

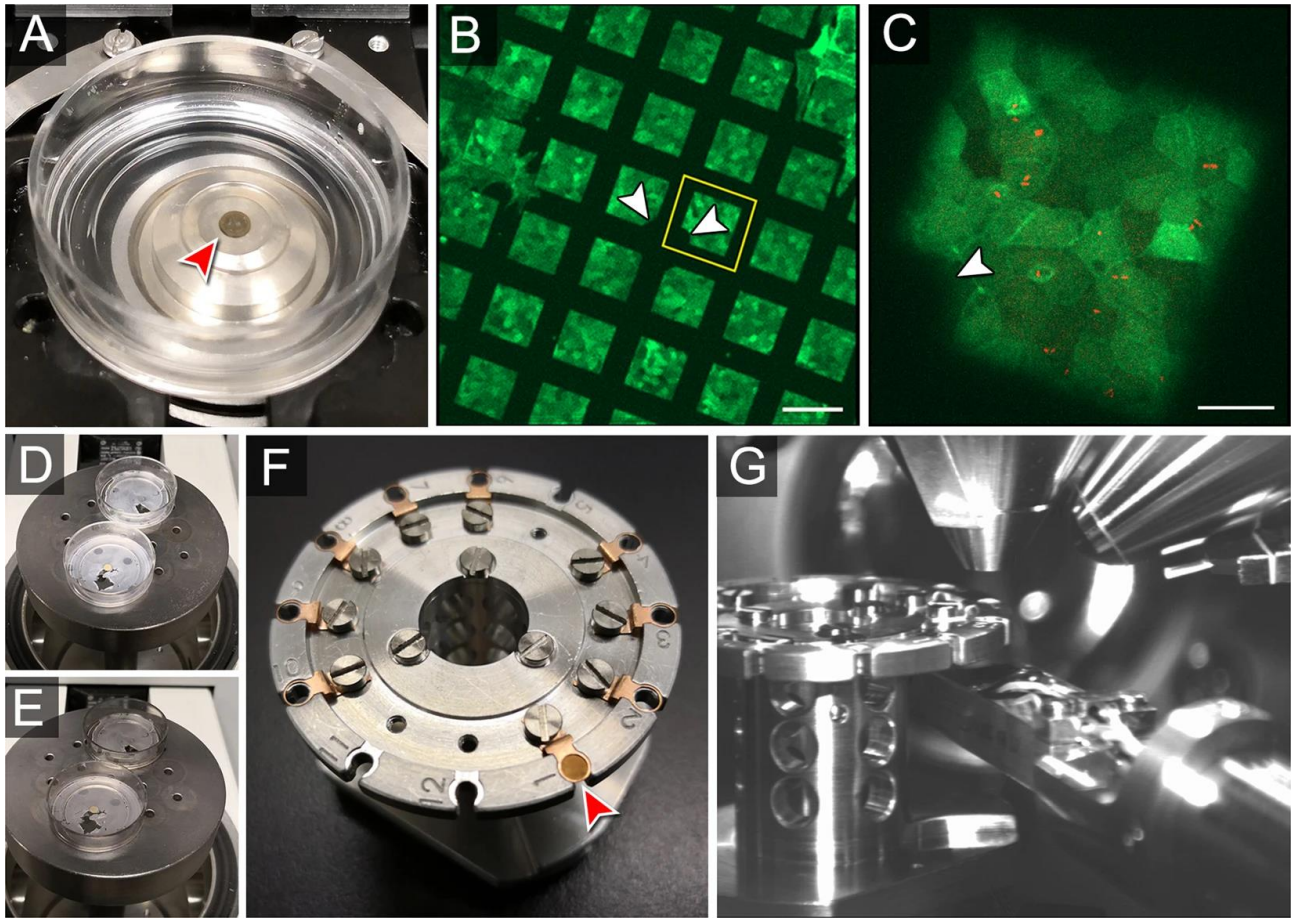
- Kombinace dvou technik mikroskopie pro analýzu toto samého vzorku
  - Nejčastěji světelná a elektronová
- CLEM: korelační (C) světelná (L) a elektronová (EM)

kontext + vysoké rozlišení

Korelační mikroskopie



Korelační mikroskopie

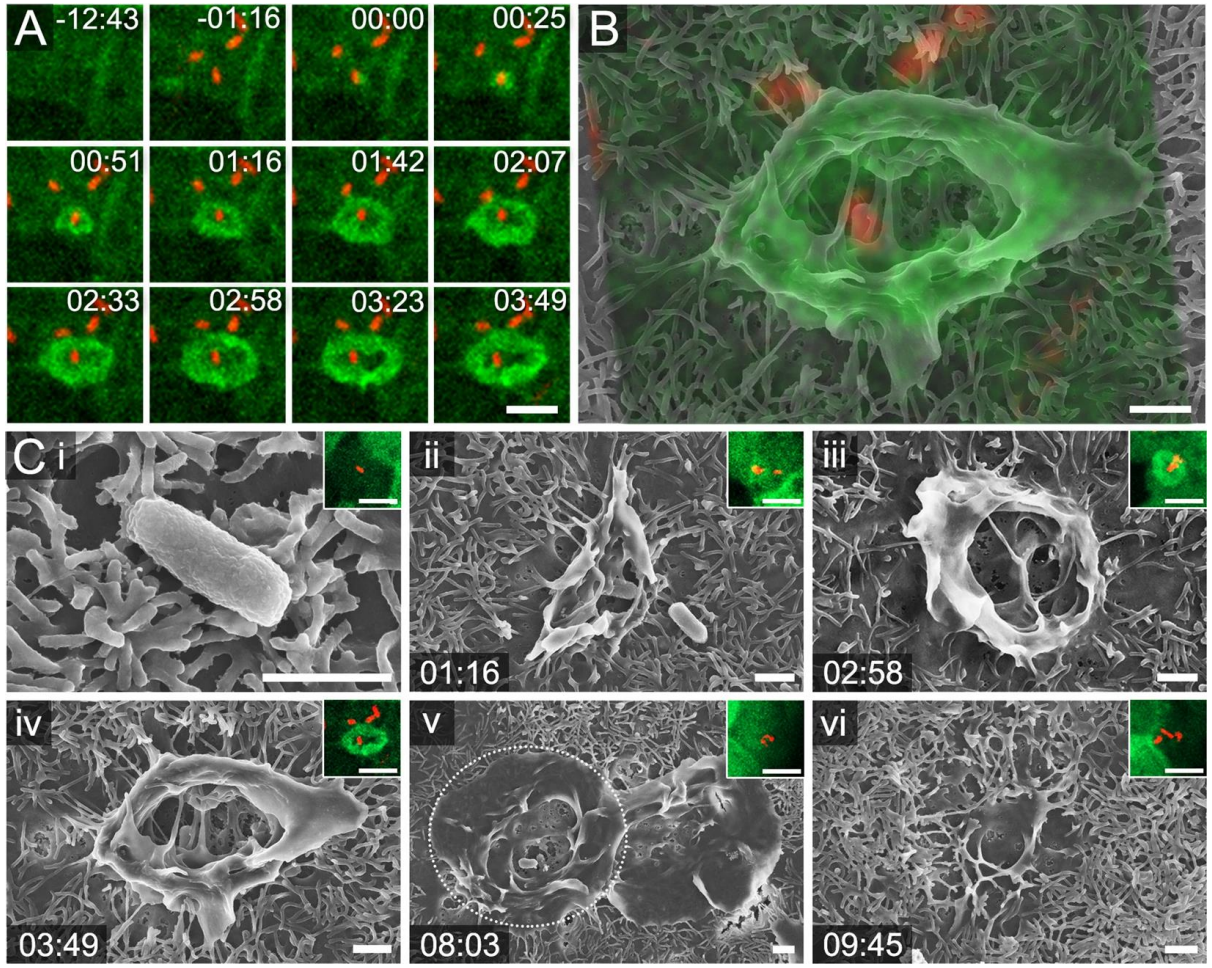


Konfokální + skenovací elektronová mikroskopie;
Infekce epitelových buněk salmonelou

Polarized Lifeact-eGFP MDCK cells (green) were infected with STM WT (red).

Kommnick, C., Lepper, A. & Hensel, M. *Sci Rep* **9**, 17079 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-53085-6

Korelační mikroskopie

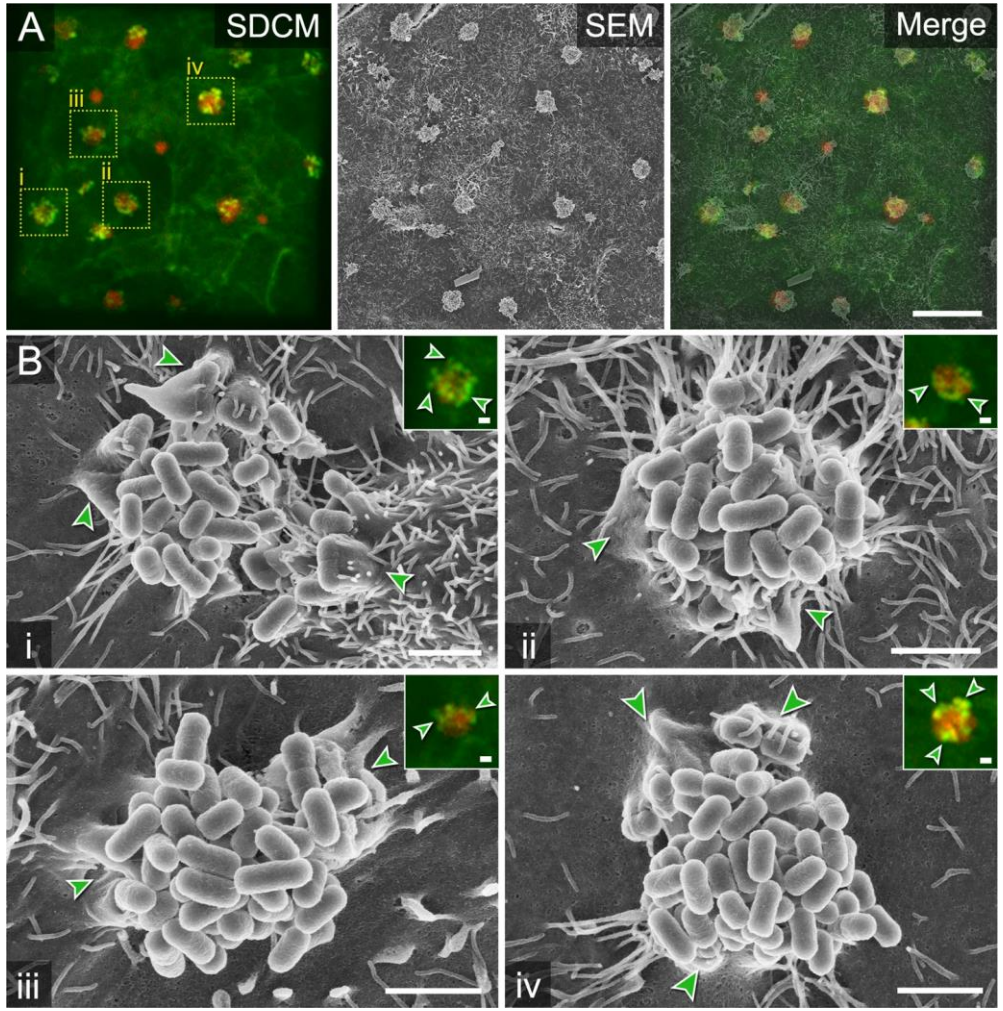


Konfokální + skenovací elektronová mikroskopie;
Infekce epitelových buněk salmonelou

Polarized Lifeact-eGFP MDCK cells (green) were infected with STM WT (red).

Kommnick, C., Lepper, A. & Hensel, M. *Sci Rep* **9**, 17079 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-53085-6

Korelační mikroskopie



Konfokální + skenovací elektronová mikroskopie;
Infekce epitelových buněk enteropatogenní E. coli (EPEC)

Polarized Lifeact-eGFP MDCK cells (green) infected with EPEC (red)

Kommnick, C., Lepper, A. & Hensel, M. *Sci Rep* **9**, 17079 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-53085-6