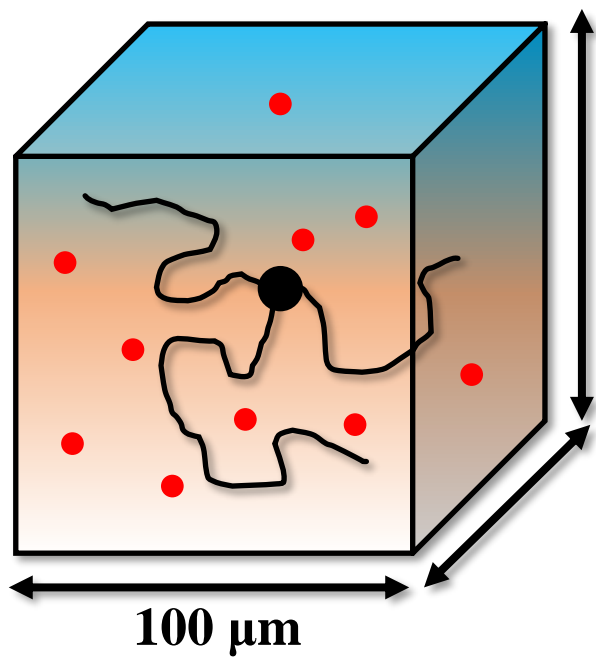


Νανοσκοπία (STED)



THE CHALLENGE



Για τη μελέτη βιολογικής δομής και λειτουργίας απαιτείται ιδανικά η απεικόνιση ενός κύβου πλευράς **100 μm** με ανάλυση ίση ή καλύτερη των **50 nm**!

Τυπικό βακτήριο



~1 μm

Σπερματοζωάριο



~1 μm

Ερυθρό αιμοσφαίριο



~8 μm

C.Elegans



~60 μm

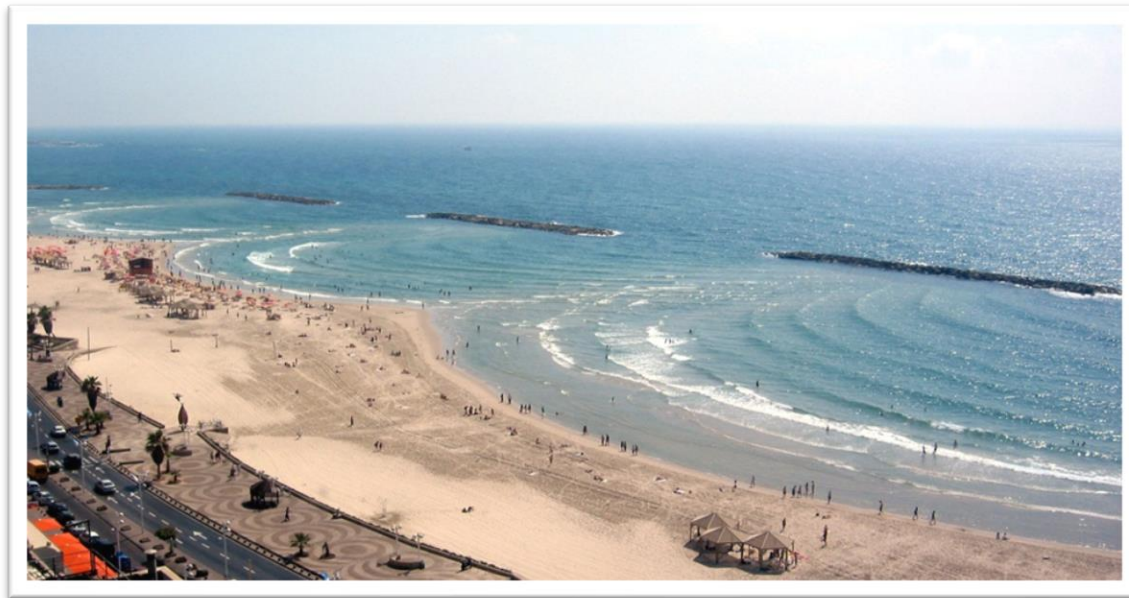
(διάμετρος)

Ζυγωτό κύτταρο



~100 μm

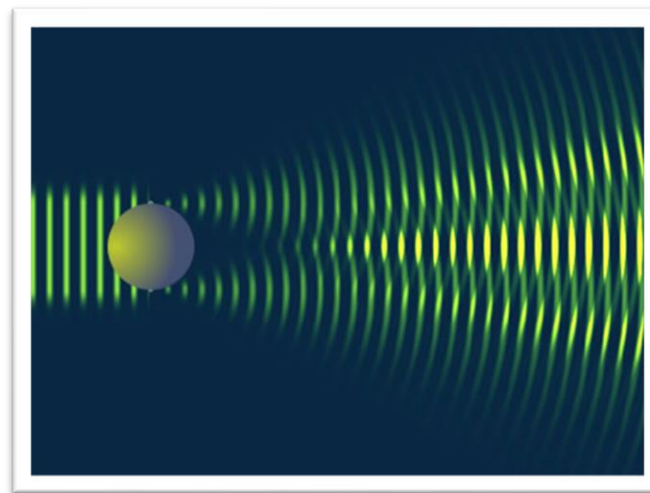
Περίθλαση υδάτινων κυμάτων

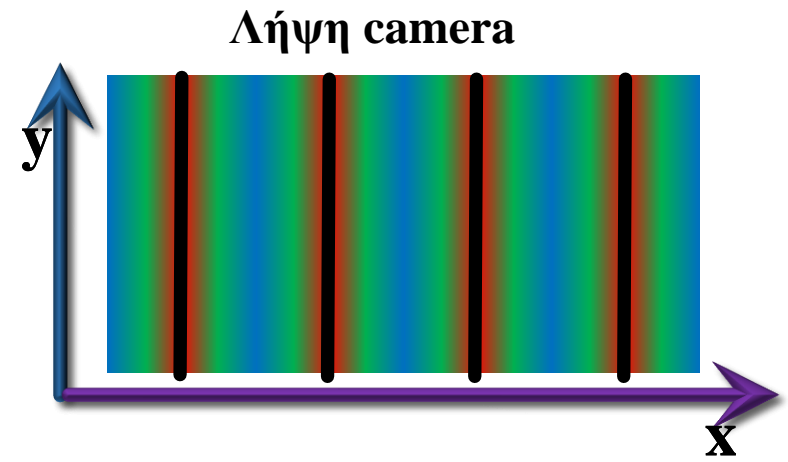
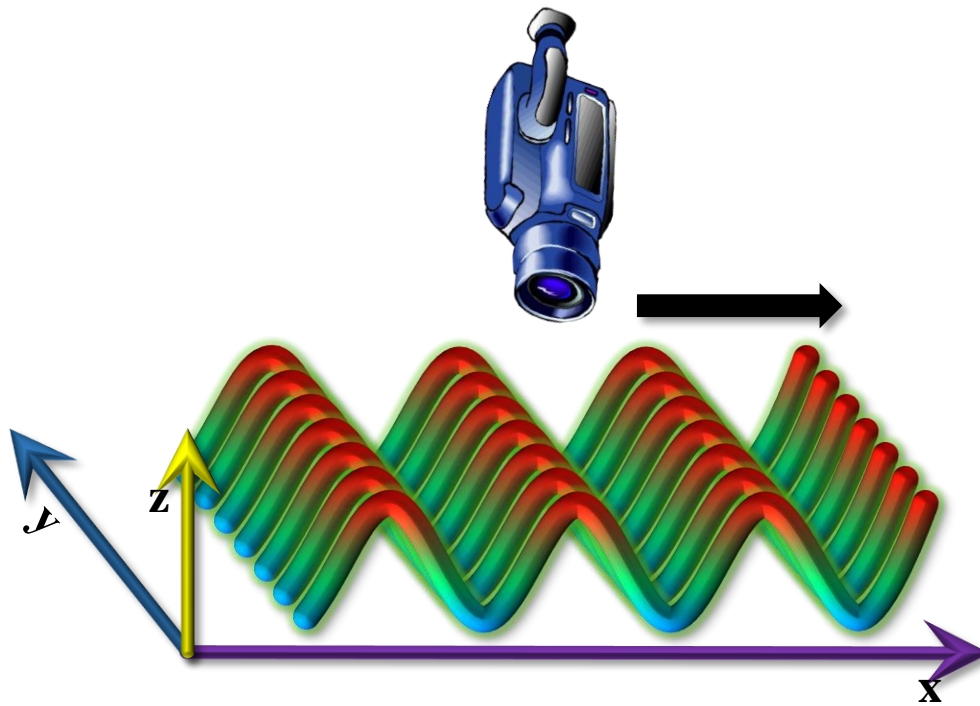


Περίθλαση ηλιακού φωτός



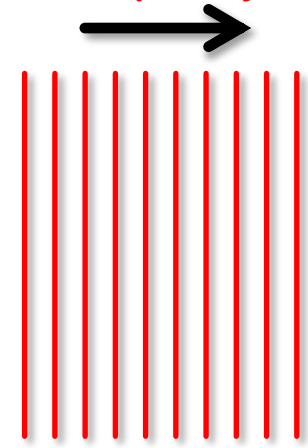
Περίθλαση από εμπόδιο



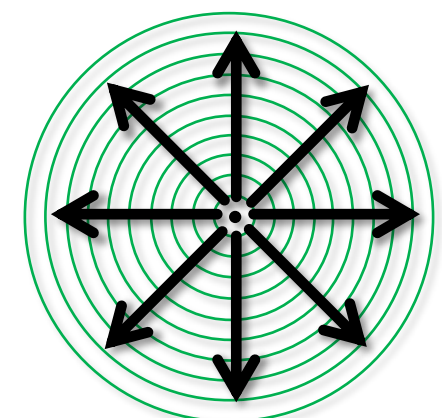


Μέτωπα κύματος: Οι τόποι σημείων του κύματος που χαρακτηρίζονται από την ίδια φάση

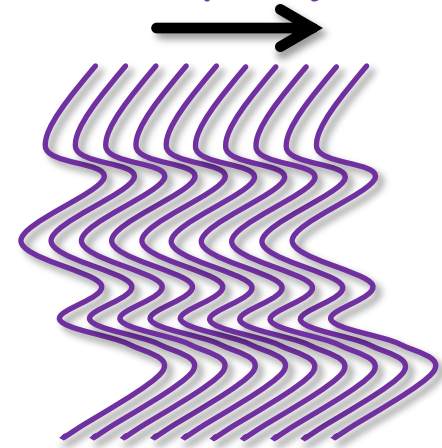
Επίπεδα μέτωπα κύματος



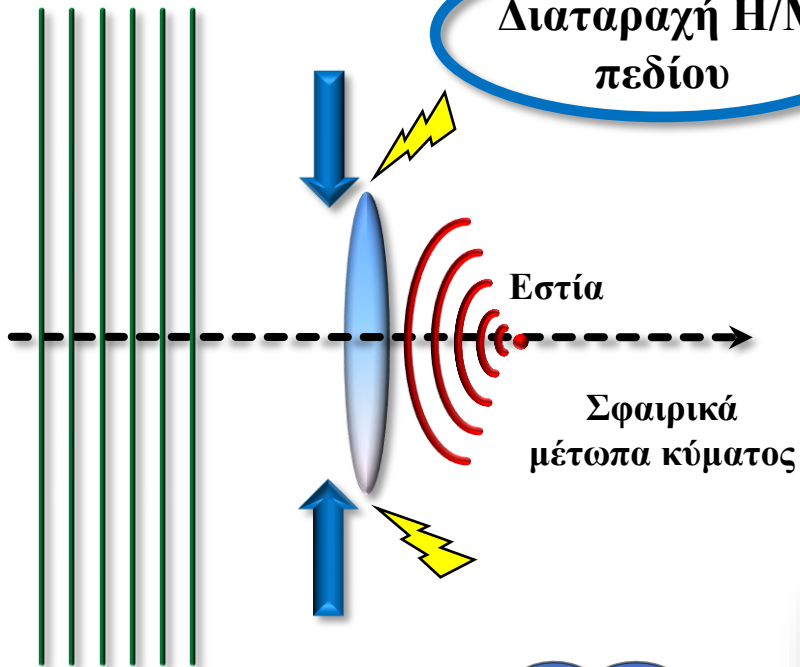
Σφαιρικά μέτωπα κύματος



Ακανόνιστα μέτωπα κύματος



Διαταραχή Η/Μ πεδίου



- Η περίθλαση σε ένα οπτικό σύστημα είναι άμεση συνέπεια της διάδοσης ενός εκτεταμένου μετώπου κύματος διαμέσου ενός πεπερασμένου ανοίγματος
- Η διαταραχή του Η/Μ πεδίου μεταβάλλει συνεχώς το προφίλ της έντασης του μετώπου κύματος καθώς αυτό συγκλίνει στην εστία

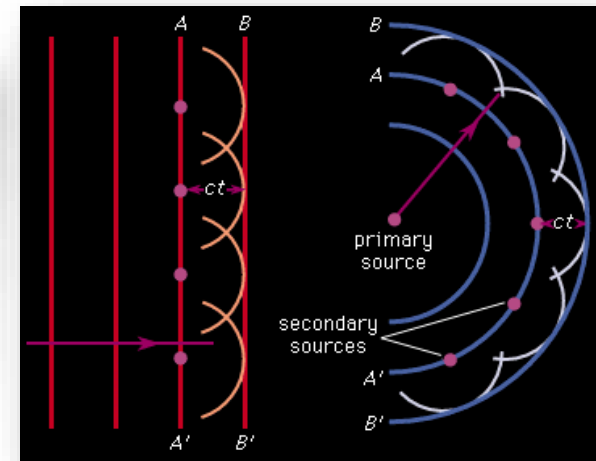
Αρχή Huygens

Επίπεδα
μέτωπα
κύματος

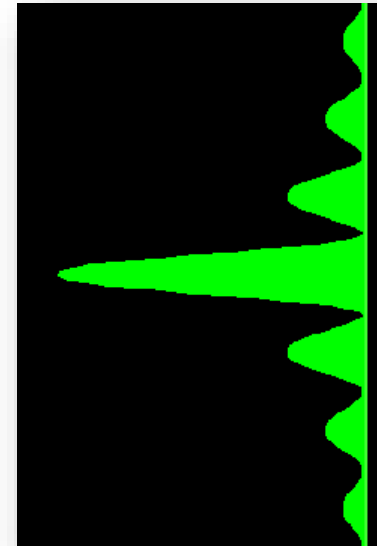
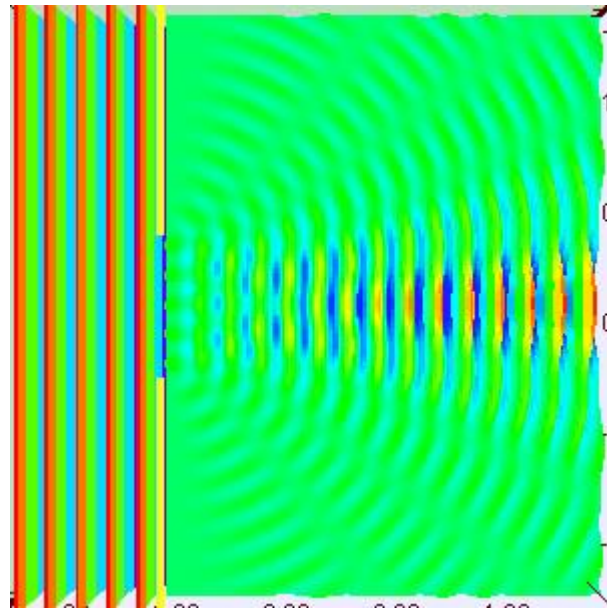
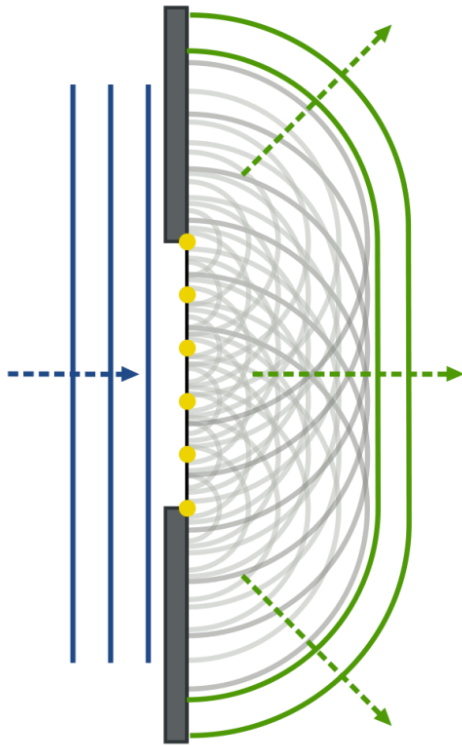
Τι θα δούμε εάν
τοποθετήσουμε ένα
πέτασμα στην εστία
του φακού;



Christiaan Huygens



- Κάθε σημείο του κυρίου μετώπου κύματος αποτελεί την πηγή δευτερευόντων σφαιρικών κυμάτων
- Μπορούμε να προβλέψουμε το κύριο μέτωπο κύματος σε μελλοντικό χρόνο, παίρνοντας την περιβάλλουσα των δευτερευόντων κυμάτων



Airy pattern



George Biddell Airy



- Τα δευτερεύοντα σφαιρικά κύματα συμβάλλουν ενισχυτικά ή καταστροφικά, δημιουργώντας μέγιστα και ελάχιστα έντασης
- Ο δίσκος Airy περιέχει το ~84% της ενέργειας του προσπίπτοντος φωτός
- Σε ένα οπτικό σύστημα που περιορίζεται μόνο από την περίθλαση (diffraction limited), η διακριτική ικανότητα καθορίζεται από το μέγεθος του δίσκου Airy

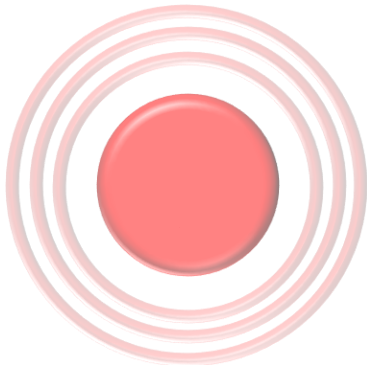
Κριτήριο Rayleigh



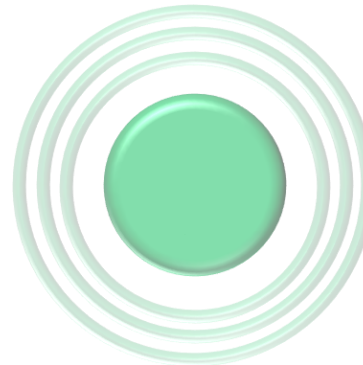
Lord Rayleigh



ΧΩΡΟΣ
ΕΙΔΩΛΩΝ



R



$$R = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$



ΟΠΤΙΚΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ

R: Ελάχιστη απόσταση για την οποία δύο σημειακά αντικείμενα διακρίνονται ως ξεχωριστά

λ: Μήκος κύματος της ακτινοβολίας

NA: Ενεργό αριθμητικό άνοιγμα οπτικού συστήματος ($NA = n \cdot \sin\theta$)

ΧΩΡΟΣ
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΩΝ



R

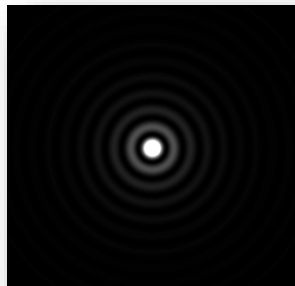




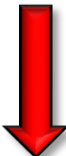
*Μικρότερο R
σημαίνει καλύτερη
ανάλυση!*



$$R = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$



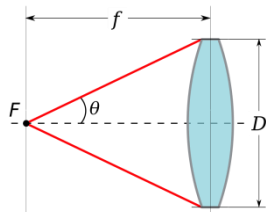
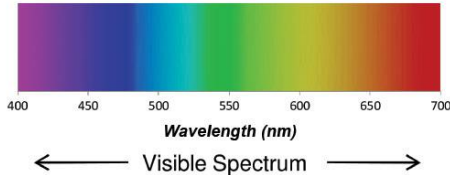
Πετυχαίνουμε καλύτερη ανάλυση για:



*Μείωση μήκους
κύματος (λ)*



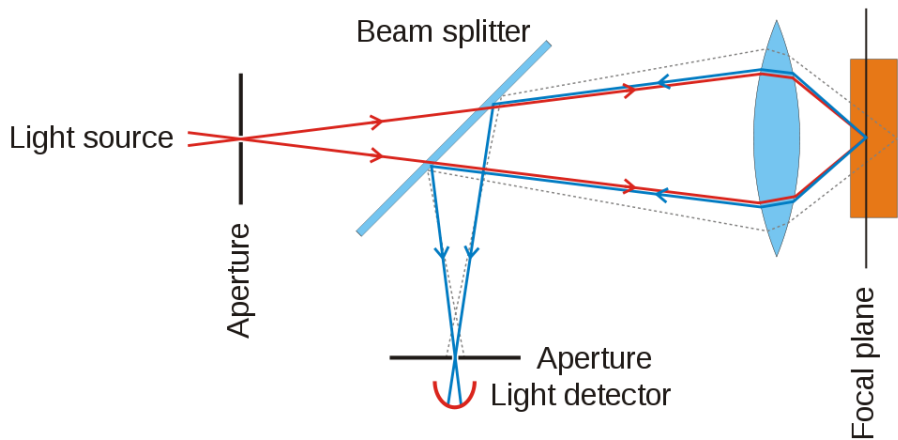
*Αύξηση
αριθμητικού
ανοίγματος (NA)*



**Αδρά
χαρακτηριστικά**

**Διάκριση
λεπτομερειών**

Ο περιορισμός της χωρικής ανάλυσης στο confocal



Όταν το διάφραγμα είναι απειροστά ανοιχτό, μπορεί θεωρητικά να επιτευχθεί μια μικρή βελτίωση στην ανάλυση (~1.4 φορές)



Στην πράξη, η ανάλυση δεν υπερβαίνει τα **200-250 nm!**

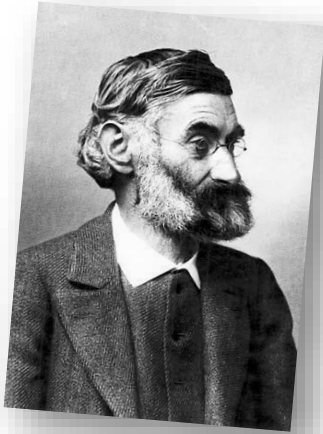
- ...αν χρησιμοποιήσουμε **μικρό μήκος κύματος**
- ...αν διαθέτουμε το **μέγιστο αριθμητικό άνοιγμα** στον αντικειμενικό φακό (~1.4)
- ...αν είμαστε **100%** διορθωμένοι για **ΟΛΕΣ** τις οπτικές εκτροπές
- ...αν το παρατηρούμενο δείγμα **δεν παραμορφώνει** το μέτωπο κύματος
- ...αν υποθέσουμε ότι το διάφραγμα είναι **απειροστά ανοιχτό**
- ...αν ο ανιχνευτής του σήματος είναι **εξαιρετικά ευαίσθητος**



$$R = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

Για $\lambda = 450 \text{ nm}$ και $NA = 1.4 \rightarrow R = 196 \text{ nm}$

Η θεωρητική μέγιστη ανάλυση ενός μικροσκοπίου confocal είναι της τάξης των **140 nm!**



Ernst Abbe

Η εργασία του Abbe υποδηλώνει την ύπαρξη του **ορίου περίθλασης** στην ανάλυση της οπτικής μικροσκοπίας

1873

121 χρόνια...



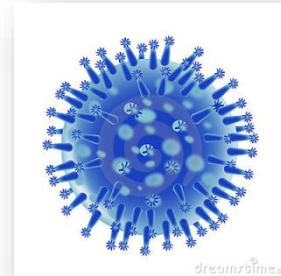
Stefan Hell

1994



Ανάλυση κάτω από το όριο περίθλασης!

1999



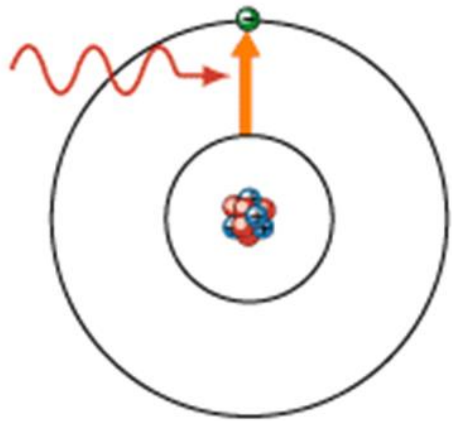
20-300 nm



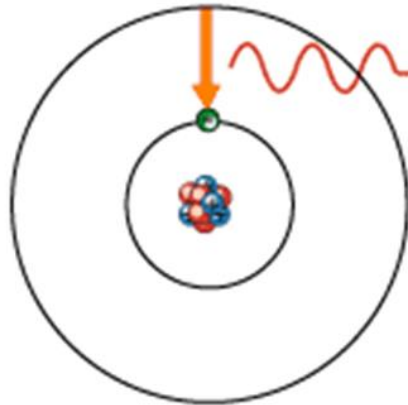
Ανάλυση Confocal: 250 nm
Ανάλυση που επιτεύχθηκε:
5.8 nm!

2009

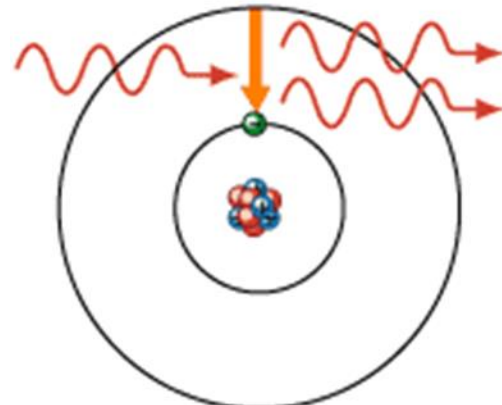
Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας-ύλης



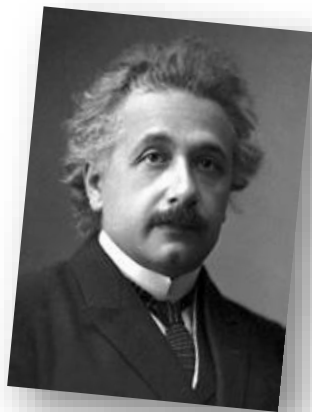
Απορρόφηση



**Αυθόρμητη
εκπομπή**



**Εξαναγκασμένη
εκπομπή**

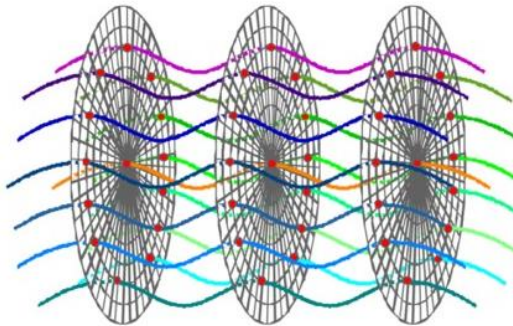


**Albert
Einstein**

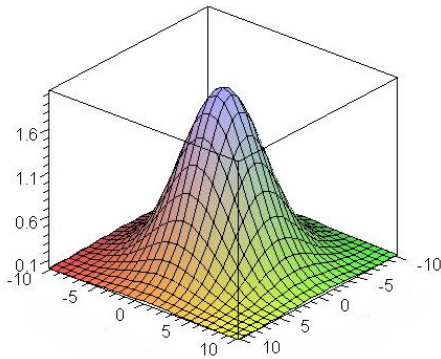
- Προβλέπεται για πρώτη φορά (1917) η δυνατότητα της εξαναγκασμένης εκπομπής φωτονίου, γεγονός που θα οδηγήσει αργότερα (1960) στη δημιουργία του πρώτου LASER
- Στην εξαναγκασμένη εκπομπή, το άτομο εξαναγκάζεται μέσω διαδικασίας συντονισμού να μεταπηδήσει στην βασική του στάθμη απορροφώντας ένα φωτόνιο κατάλληλης ενέργειας. Τα δύο φωτόνια που εκπέμπονται είναι ταυτόσημα του αρχικού φωτονίου και αναδύονται μαζί ως σύμφωνη ακτινοβολία

Γκαουσιανή δέσμη Ελικοειδής δέσμη

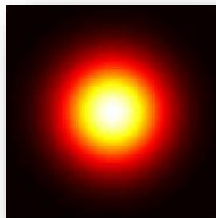
Προφίλ φάσης



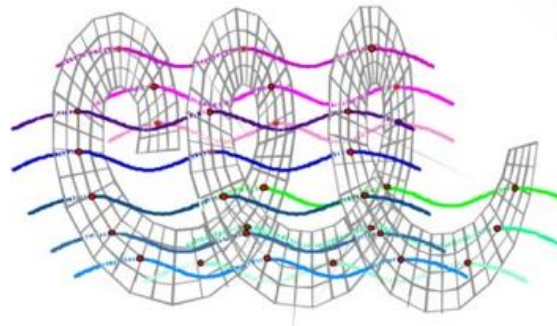
Προφίλ έντασης



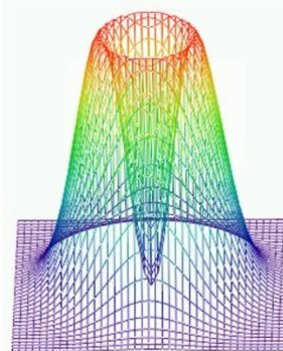
Spot



Προφίλ φάσης



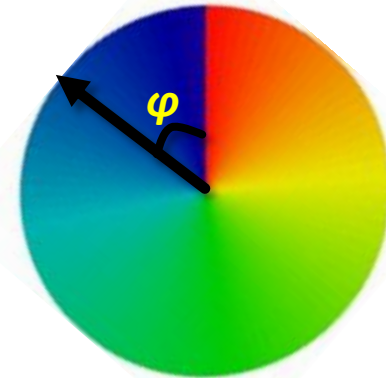
Προφίλ έντασης



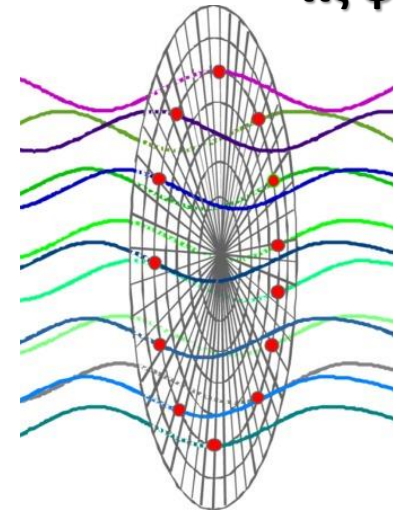
Spot



0 2π

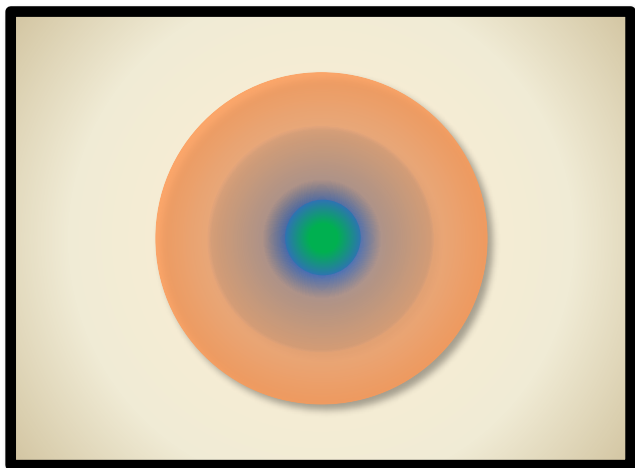


Το κέντρο του επιπέδου περιέχει 'όλες' τις φάσεις!

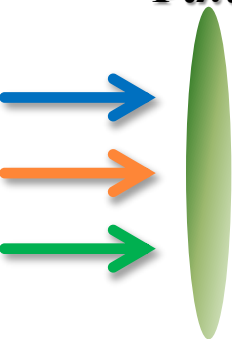


Λόγω καταστρεπτικής συμβολής, το πεδίο στο κέντρο είναι μηδέν!

Βιολογικό δείγμα



Φίλτρο



Ανιχνευτής

Δονητική αποδιέγερση

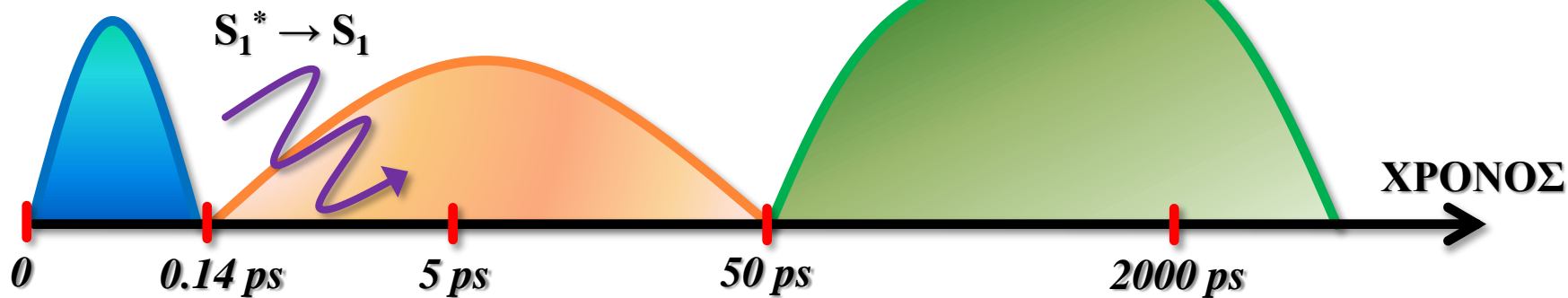
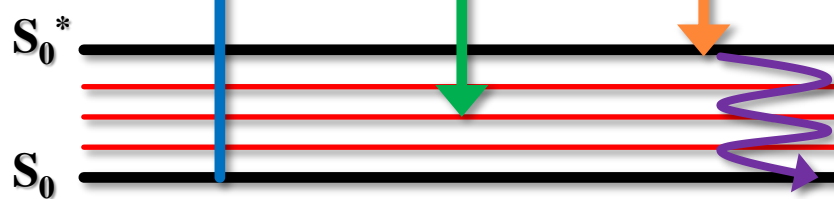


Διέγερση

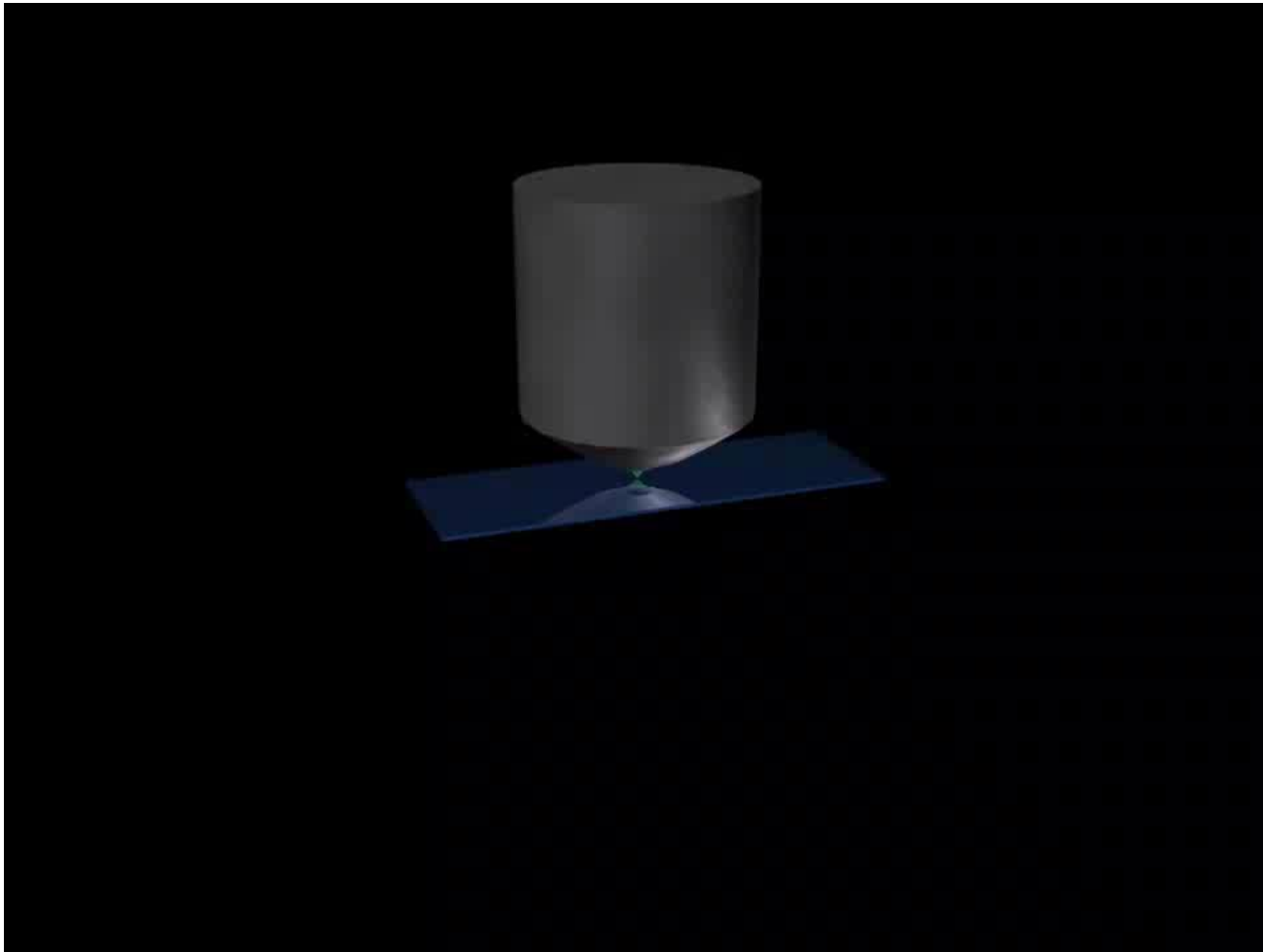
Φθορισμός

STED

Εξαναγκασμένη εκπομπή με $\lambda_{STED} > \lambda_{exc}$

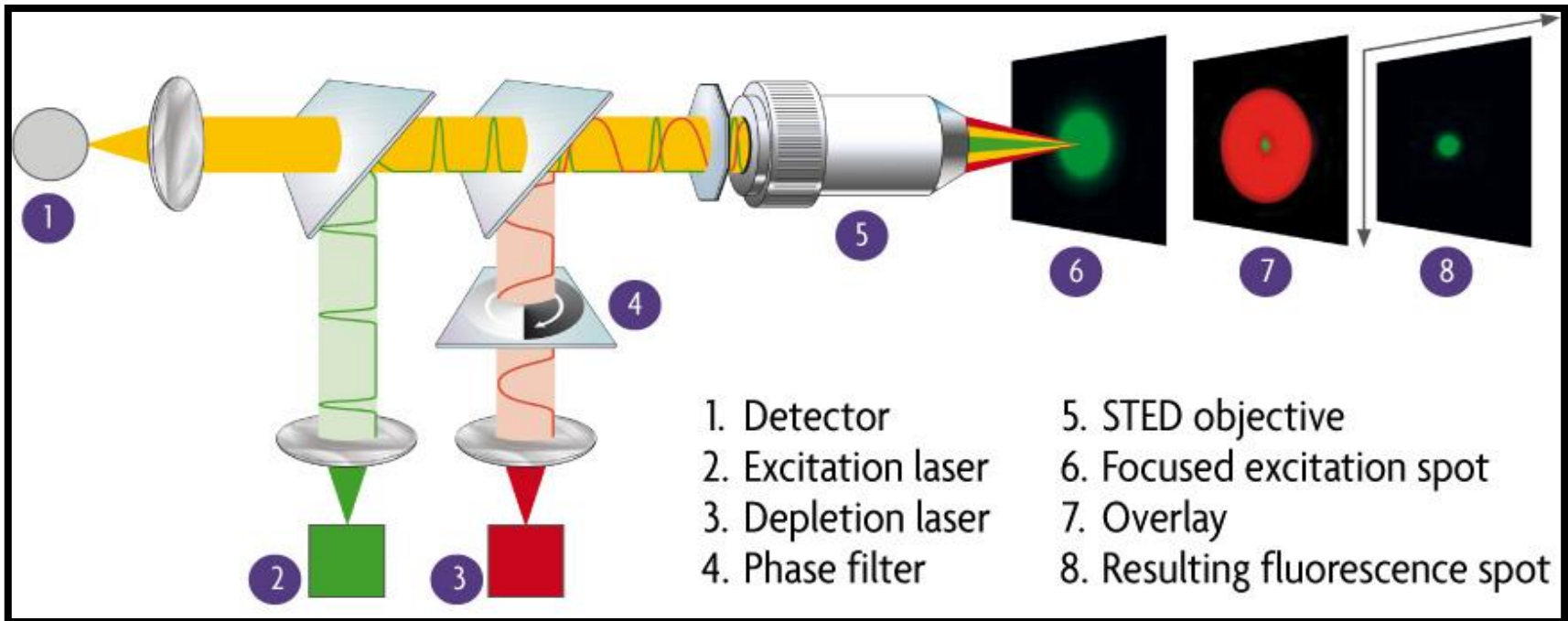


Τρισδιάστατη αναπαράσταση της αρχής STED



<https://www.youtube.com/watch?v=nFaGOEbBkyk>

Μικροσκοπία STED (Stimulated Emission Depletion)



Δεν υπάρχει θεωρητικό όριο στην ανάλυση που μπορούμε να πετύχουμε μέσω της μικροσκοπίας STED!



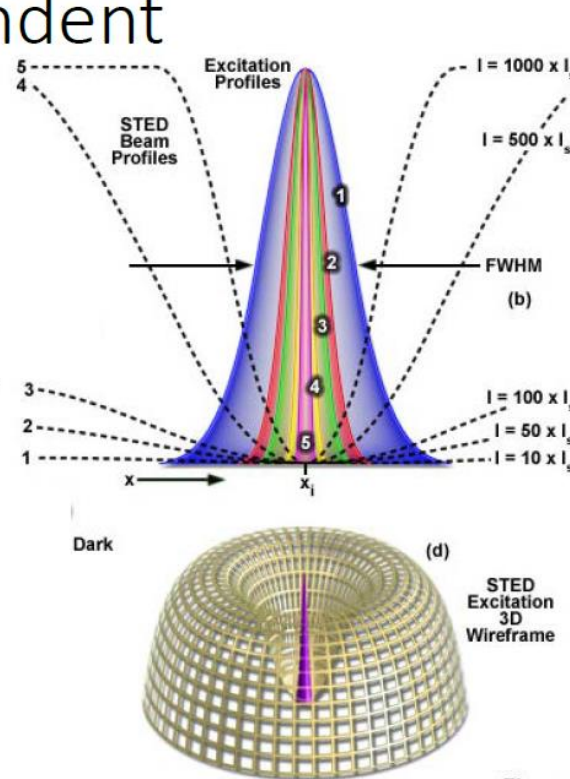
Ο ουρανός, το μόνο όριό μας...

STED PSF is intensity and wavelength dependent

- More power = higher resolution
- Higher photobleaching and toxicity as well
- Diminishing returns in resolution, but increasing returns in cell death with increasing lasers

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_S}}}$$

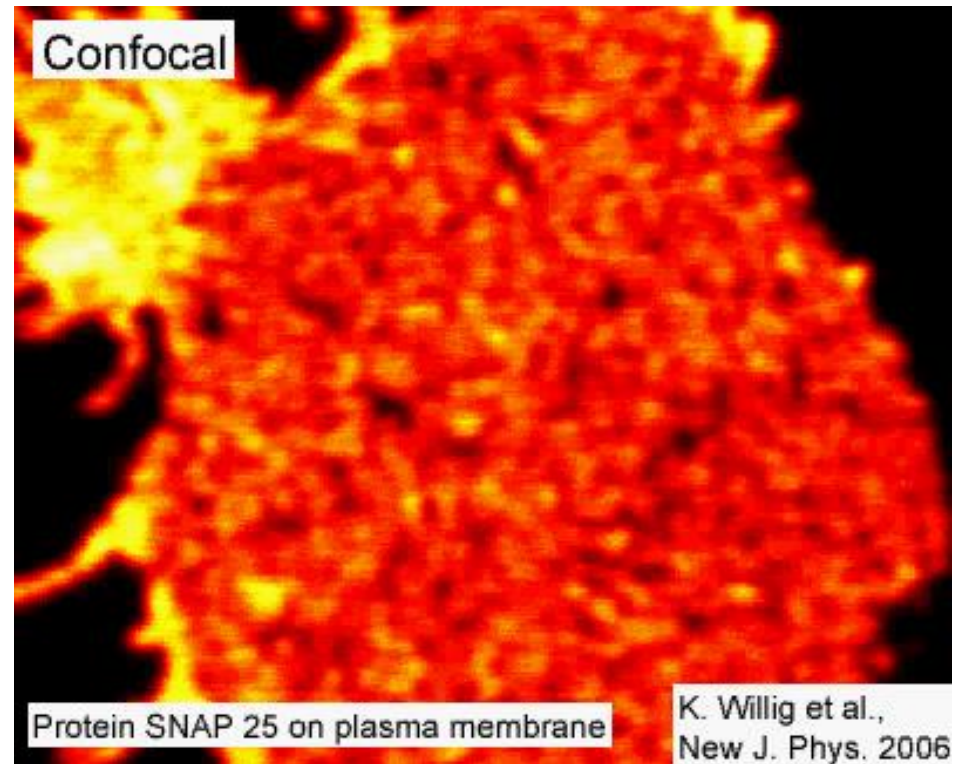
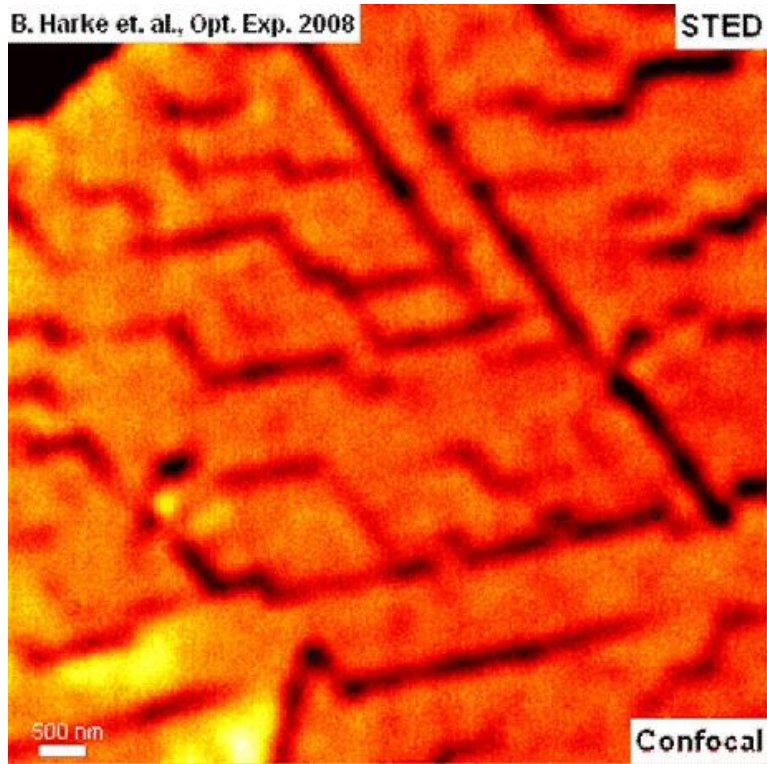
- Intensity must be above I_S , the threshold at which 50% fluorophores undergo stimulated emission (ie. Depleted fluorescence)



| Dye Name | Manufacturer | Exc. λ (nm) | STED λ (nm) |
|------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| Atto 425 | ATTO-TEC GmbH | 440 | 532 |
| Atto 532 | ATTO-TEC GmbH | 488 | 615 |
| DY-485XL | Dyomics GmbH | 488 | 647 |
| Alexa Fluor 488 | Invitrogen Corp. | 488 | 592 |
| Chromo 488 | Active Motif | 488 | 602 |
| Oregon Green 488 | Invitrogen Corp. | 488 | 592 |
| FITC | Cappel Corp. | 488 | 592 |
| DY-495 | Dyomics GmbH | 488 | 592 |
| GFP | | 488 | 575 |
| Citrine | | 488 | 592 |
| YFP | | 488 | 598 |
| Atto 565 | ATTO-TEC GmbH | 532 | 640-660 |
| MR 121 SE | Roche Diagnostics | 532 | 793 |
| NK51 | ATTO-TEC GmbH | 532 | 647 |
| RH 414 | Biotium Inc. | 554 | 745 |
| Atto 590 | ATTO-TEC GmbH | 570 | 690-710 |
| Alexa 594 | Invitrogen Corp. | 570 | 690-710 |
| DyLight 594 | Thermo Scientific | 570 | 690-710 |
| Atto 633 | ATTO-TEC GmbH | 635 | 750 |
| Atto 647N | ATTO-TEC GmbH | 635 | 750 |
| Atto 655 | ATTO-TEC GmbH | 635 | 780 |
| Malachite Green | | 635 | 730-750 |
| E2-Crimson | | 635 | 750 |

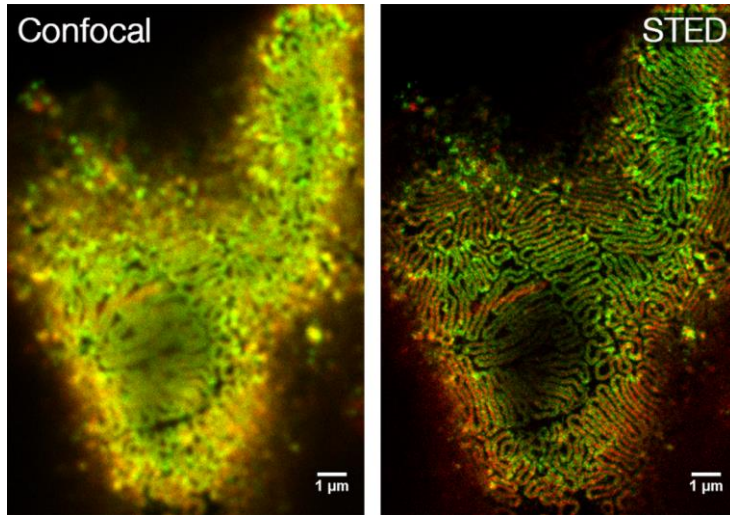
Figure 4
Full list at:
<http://nanobiophotonics.mpibpc.mpg.de/old/dyes/>

4. Ποτέ μη λες ποτέ

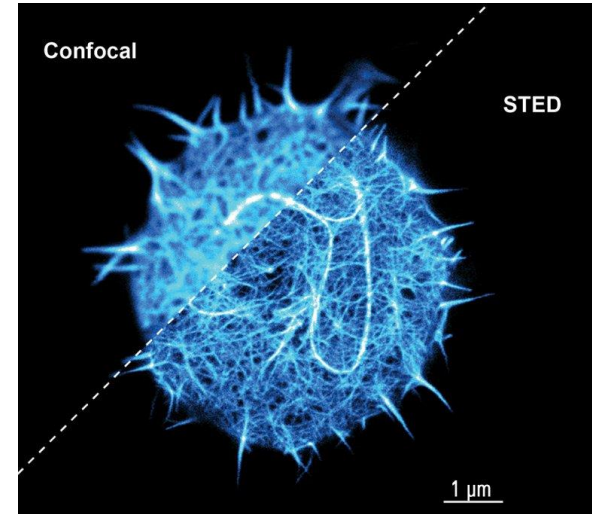


2-color 2D STED image of a cleared adult kidney sample of a rat

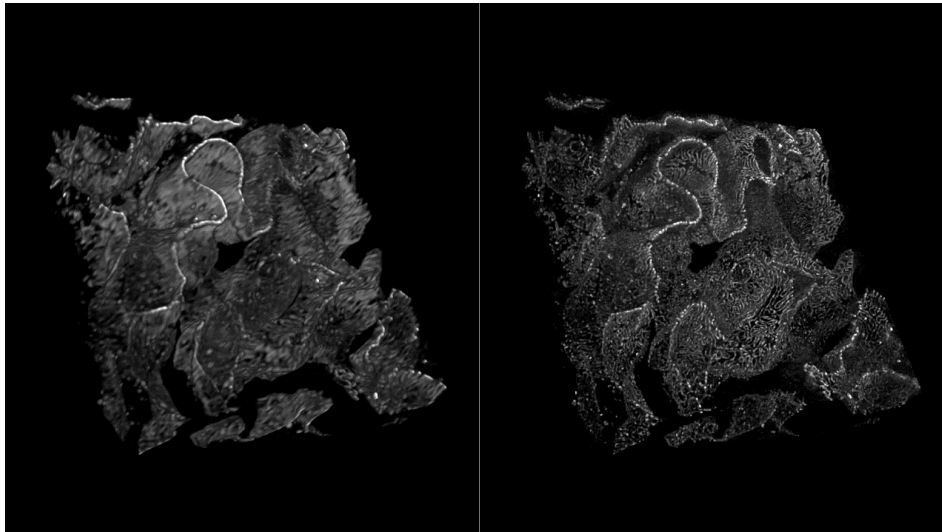
Shown is an image of a renal corpuscle showing Nephrin (red, Abberior STAR635P) structures inbetween the Podocin slits (green, AlexaFluor594).



Living T cell in suspension. 3D reconstruction of confocal and STED stacks. Maximum projection.



Deep nanoscopy 45-65 µm inside cleared adult kidney sample of a rat. 20 µm xyz stack confocal/3D STED. Nephrin visualized with STAR 635P.



Photoactivated Localization Microscopy

Basic Principle of STORM Superresolution Imaging

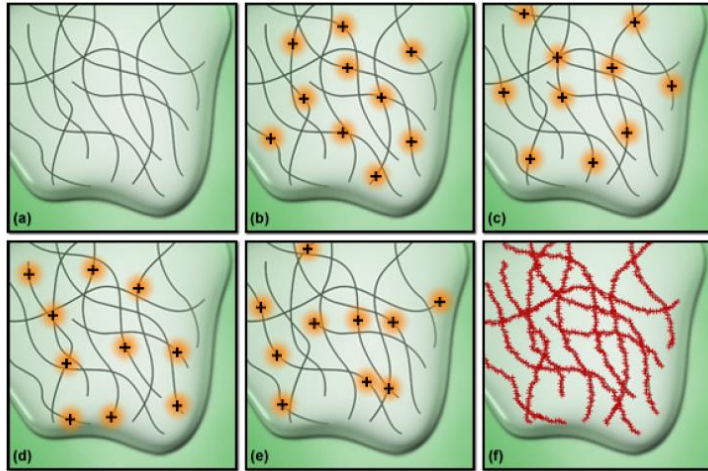


Figure 1

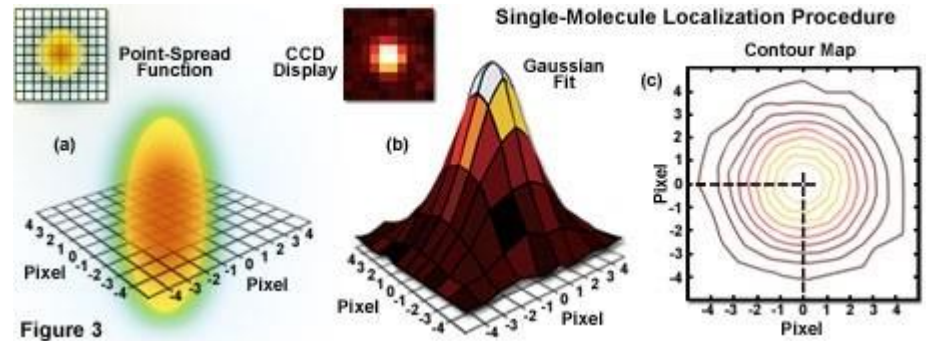


Figure 3

Molecular Density in Single-Molecule Superresolution Imaging

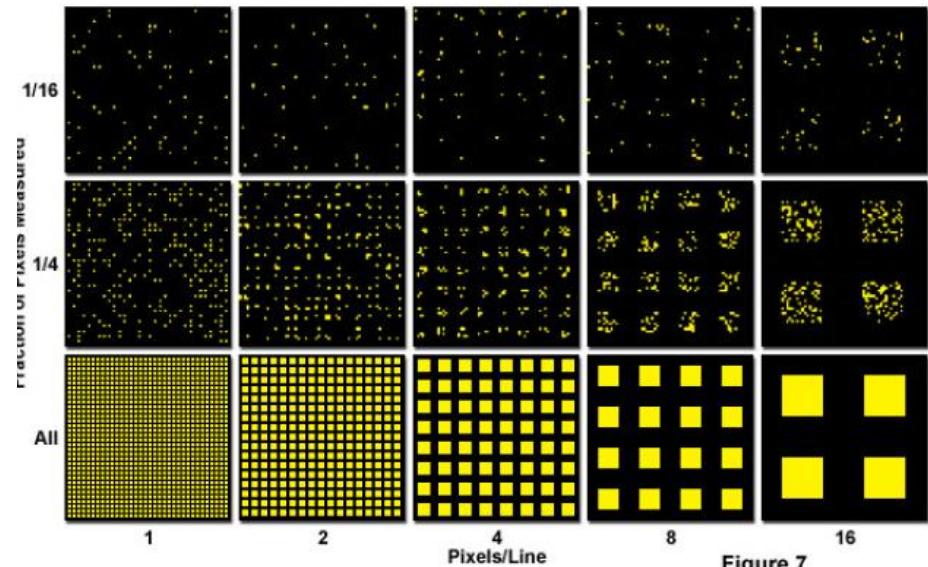


Figure 7

Single-Molecule Superresolution Basic Microscope Configuration

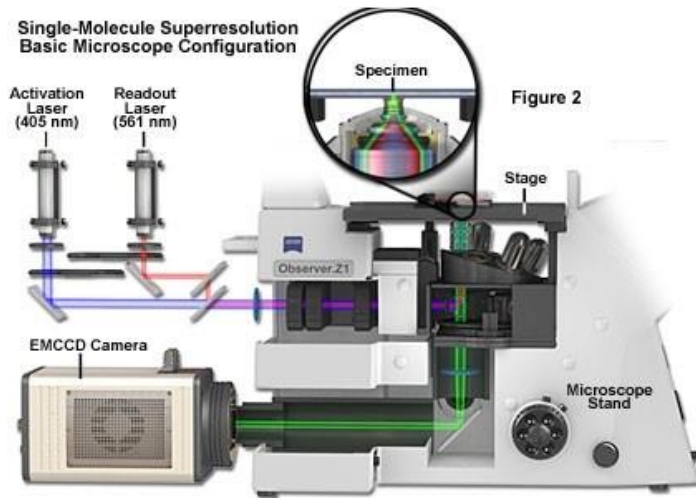
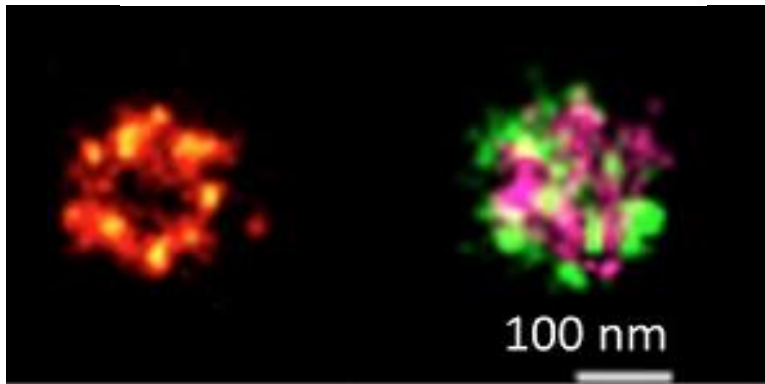
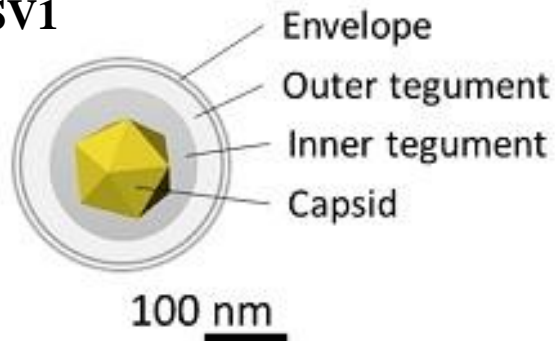


Figure 2

Ποια ερωτήματα πρέπει να μπορούμε να απαντάμε;

Ιός HSV1



- Τι είναι η περίθλαση και πώς συνδέεται με τη χωρική διακριτική ικανότητα ενός μικροσκοπίου;
- Ποιες είναι οι τρεις διαδικασίες αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας – ύλης;
- Πώς σχηματίζεται μια δέσμη doughnut;
- Ποια είναι η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας STED;
- Από τι εξαρτάται η χωρική ανάλυση της τεχνικής STED και μέχρι τι τιμές μπορεί να φτάσει;

Προαιρετική μελέτη σχετικά με Photoactivated Localization Microscopy

<https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>