

Epifluoreszcencia-, konokális-, STED mikroszkópia

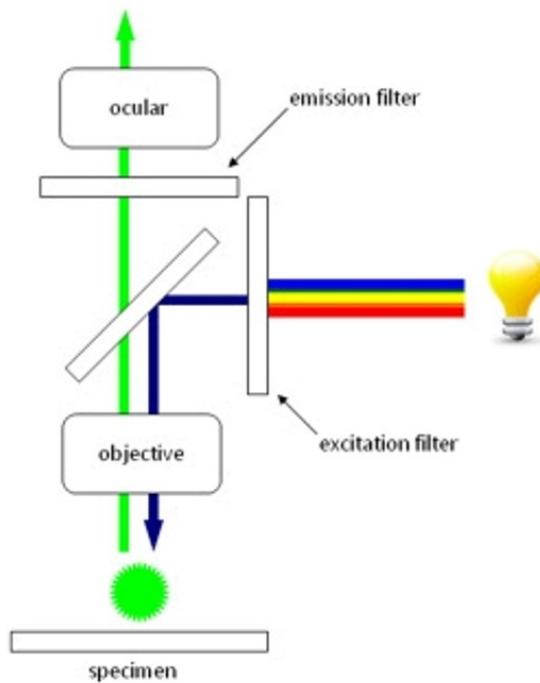
Illés Gergő

2023. március 18.

1. Epifluoreszcenciás mikroszkópia

1.1. Elméleti áttekintés

A fluoreszcens mikroszkópia egy olyan mikroszkópiai eljárás, ahol a mintát valamelyen módon bevilágítjuk, majd a minta által kisugárzott jelet rögzítjük. A módszer sajátossága, hogy az objektív a bevilágítással egy oldalon helyezkedik el ami segít elkülöníteni a minta által szort fényt a mérendő jelről. Az epifluoreszcens mikroszkóp felépítését az 1. ábra mutatja. Fontos megjegyezni, hogy a biológiai minták többsége előkészítést igényel, ami fluoreszcens festék megfelelő helyekre juttatását jelenti.



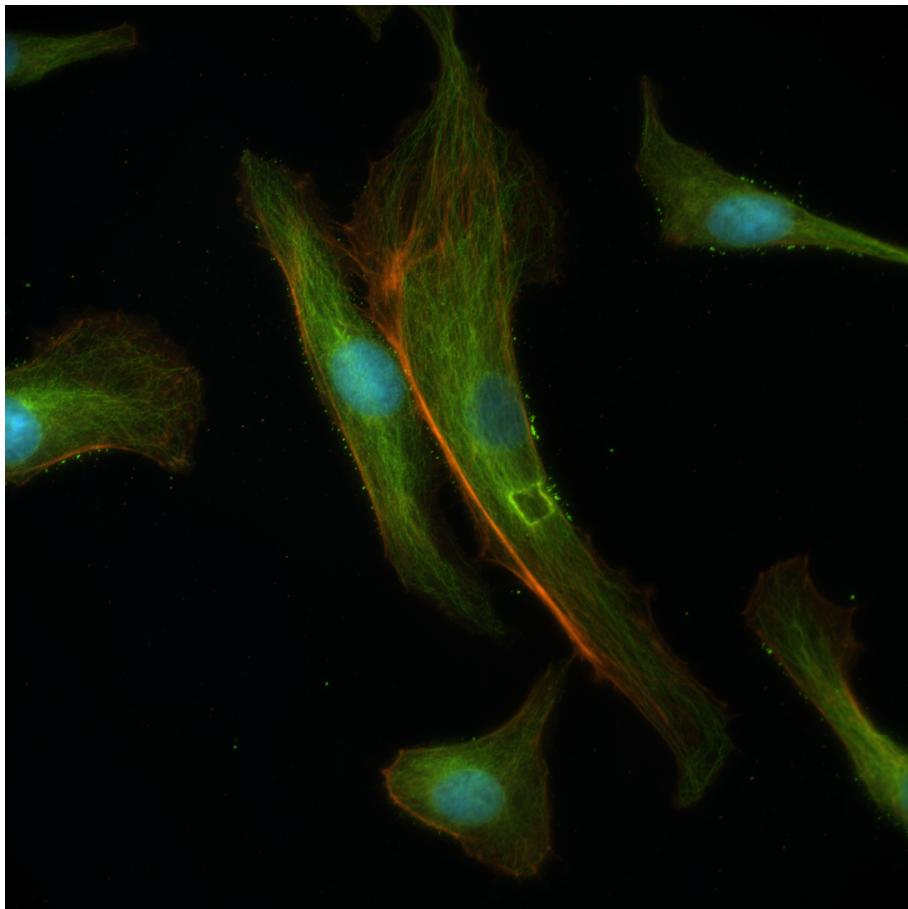
1. ábra. Epifluoreszcens mikroszkóp sematikus rajza

A fényforrás epifluoreszcens mikroszkópokban a gerjesztésre időben valamint a látható tartományban folytonos spektrumú fényforrás használatos ami esetünkben higanygőz lámpa. Ezután a kiválasztjuk a fluorofórnak megfelelő hullámhosszat az úgynevezett gerjesztési szűrővel. Ezután a fény egy dikroikus tükrön visszaverődve valamint az objektíven keresztül a mintára esik, majd a fluoreszcens jel ugyanezen objektíven és ezúttal a dikroikus tükrön is áthaladva

egy további, emissziós szűrőre esik majd utána egy detektorra. Érdemes lehet alkalmazunk di-kroikus tükröket és szűrőket egyszerre, noha ezek külön-külön is szűrik a jelet, érdemes lehet a lehető leginkább elkülöníteni a gerjesztő- és válaszjelet mivel a gerjesztés intenzitása akár nagyságrendekkel nagyobb ezért kis áthatolás esetén is ronthatja a kapott képet.

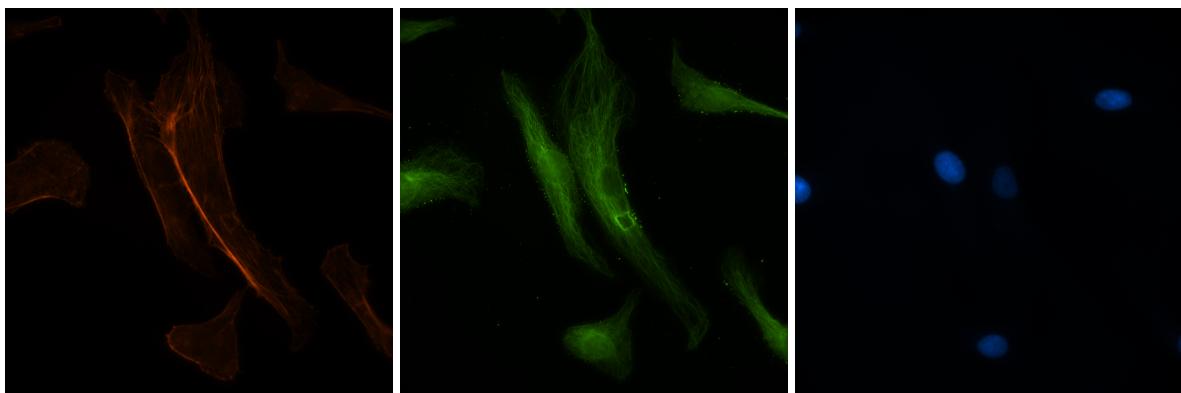
1.2. Felvétel készítése

Az általunk használt mikroszkóp váz típusa Nikon Ti/2 Eclipse volt. Ezen 20-szoros nagyítású objektívet használtunk, a kamera egy 2048×2048 pixel felbontású kamera volt, megvilágításra higanygőz lámpát használtunk. A minta 3 színnel volt megfestve, egy narancssárga, zöld és kék fény által gerjesztett festékkel. A képen az egyes színek a hozzájuk tartozó festéket reprezentálja.



2. ábra. Epifluoreszcens kompozit kép

A képen szépen látható a sejt felépítése, jól elkülönül a kék sejtmag, a zöld belső hálós szerkezet és a narancs külső háló. A szerkezet további vizsgálata érdekében válasszuk szét az egyes felvételeket.



3. ábra. Epifluoreszcens csatornák elkülönítve

Az elkülönített és összeillesztett képeket együtt vizsgálva jól láthatjuk a minta felépítését, azonban a felbontás tovább javítható, valamint további információ nyerhető ki akkor, ha a mintát megvizsgáljuk konfogkális üzemmódban.

2. Konfokális mikroszkópia

2.1. Elmélet áttekintés

A konfokális mikroszkóp az epifloureszcens mikroszkóp egy továbbfejlesztett változata.