

Physikalisches A-Praktikum

STED-Mikroskopie

Praktikant: Philip Marszal

Betreuer:

Gruppe:

Durchgeführt:
Abgegeben:

E-Mail: philip.marszal@stud.uni-goettingen.de



Testat

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Durchführung	1
2.1	Messung der PSF	2
2.2	Tiefendiskriminierung	3
2.3	STED-Auslöschung	6

1 Einleitung

2 Durchführung

Die Durchführung des Versuches kann grob in vier Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Teil wird die Form der PSF der beiden Laser bestimmt. Dazu werden 80 nm große Goldkügelchen als Probe verwendet. Da die PSF der reinen fokussierten Laser betrachtet werden soll, wird die Phasenplatte aus dem Strahlengang entfernt.

Der Strahlteiler, der einen Teil des Lichts an den Photomultiplier (PMT) weitergibt wird eingesetzt. Mithilfe der Kamera wird die Fokusebene eingestellt. Dazu wird die z-Achse zunächst grob per Hand in die Nähe der Goldkügelchen bewegt, und anschließend die Feineinstellung mit dem Motor durchgeführt.

Nun können die Goldkügelchen mit dem Inspector im Scanmodus betrachtet werden. Für die Messung wird nun ein Goldkügelchen möglichst zentriert und sein Bild in der xy -, xz - und yz -Ebene gescannt. Aus diesen Bildern lässt sich nachher die PSF rekonstruieren.

Als nächstes wird die Tiefendiskriminierung des Anregungslasers bestimmt. Hierfür wird ein dünner Farbstofffilm als Probe verwendet. Anstelle des PMT wird nun eine Avalanche-Photodiode (APD) als Detektor verwendet. Die APD ist direkt an eine Faser gekoppelt deren Kern die Rolle der konfokalen Lochblende übernimmt.

Der Farbstofffilm wird nun in z-Richtung gescannt und die gemessene Intensität in abhängigkeit von der z-Tiefe bestimmt.

Für den zweiten Teil wird die Überlagerung von Anregungslaser und STED-Laser untersucht. Dazu müssen zunächst die PSF der beiden Laser mittels des dikroitischen Spiegels überlagert werden. Es empfiehlt sich dies direkt an die Messung der Goldkügelchen anzuschließen und die durch ein Goldkügelchen erzeugten PSFs zu überlagern.

Jetzt kann die Auslöschung der Fluoreszenz durch den STED-Laser untersucht werden. Als Probe wird nun eine Lösung von fluoreszierenden Nanoteilchen verwendet (Größe 40 nm).

Bei konstanter Anregungsleistung wird die gemessene Intensität in Abhängigkeit von der STED-Leistung bestimmt. Pro STED-Leistung wird sechs mal die integrierte Intensität über einen Bereich bestimmt. Zwei mal nur mit dem Anregungslaser, zweimal mit Anregungs- und STED-Laser und wieder zweimal nur mit dem Anregungslaser. Die Messungen mit dem Anregungslaser, werden vor und nach der STED-Beleuchtung durchgeführt um Effekte durch Ausbleichen der Probe auszugleichen.

Dies wird für steigende STED-Leistungen durchgeführt. Wichtig für die Auswertung sind die Verhältnisse zwischen reiner Fluoreszenz durch den Anregungslaser und Auslöschung durch den STED-Laser.

Im dritten Teil des Versuches wird die Auflösung der STED-Mikroskopie bestimmt. Vorbereitend wird dafür mittels der Phasenplatte die 'Doughnut'-Form des STED-Lasers erzeugt. Um die PSF möglichst gut justieren zu können wird wieder die Goldkugelnprobe verwendet, und die Form der STED-PSF durch Verschieben der Phasenplatte justiert. Außerdem muss, das Minimum der STED-PSF mit der Anregungs-PSF überlagert werden. Für die Auswertung wird die Restintensität am Minimum der STED-PSF bestimmt.

Die Auflösung der STED-Mikroskopie wird nun anhand der fluoreszierenden Probe aus dem zweiten Teil bestimmt.

Für steigende STED-Intensitäten werden Bilder der fluoreszierenden Kügelchen aufgenommen. Die Probe wird dabei nach jeder Aufnahme neu justiert, damit das Ausbleichen der Fluoreszenzpartikel möglichst wenig Einfluss auf die Messungen nimmt.

Im vierten Teil des Versuchs werden nun Säugetier-Zellen mithilfe von STED-Mikroskopie untersucht. Bei den fluoreszierenden Teilen der Zelle handelt es sich um von fluoreszierenden Antikörpern besetztes Tubulin.

Zunächst wird eine Stelle mit dichten Tubulinstrukturen nur mithilfe des Anregungslasers gesucht. Von dieser Stelle werden nun Aufnahmen nur mit dem Anregungslaser, mit Anregungs- und STED-Laser und nur mit dem STED-Laser gemacht.

2.1 Messung der PSF

Zur Bestimmung der Form der PSF werden Aufnahmen, der xy-, xz, und yz-Ebene der Golbeads verwendet. Dabei wird jeweils die Ausdehnung des Bildes in x-,y- und z-Richtung bestimmt. Da die Goldkugeln in erster Näherung als rund angenommen werden können, ist die Form der PSF theoretisch bekannt. Sie folgt der Besselfunktion J_1 , für die Beugung von Licht an einer Kreisblende. Dieses Interferenzmuster kann angenähert werden durch die Funktion 1

$$f(x) = I_0 \cdot \exp(-k \cdot x^2) \cdot \cos(-\omega \cdot x). \quad (1)$$

Die Ausdehnung der Airyscheibe entspricht nach dem Rayleigh-Kriterium dem Abstand der beiden ersten Minima voneinander. Durch (1) ist der Abstand des ersten Minimums vom ersten Maximum eindeutig mit dem Parameter w bestimmt

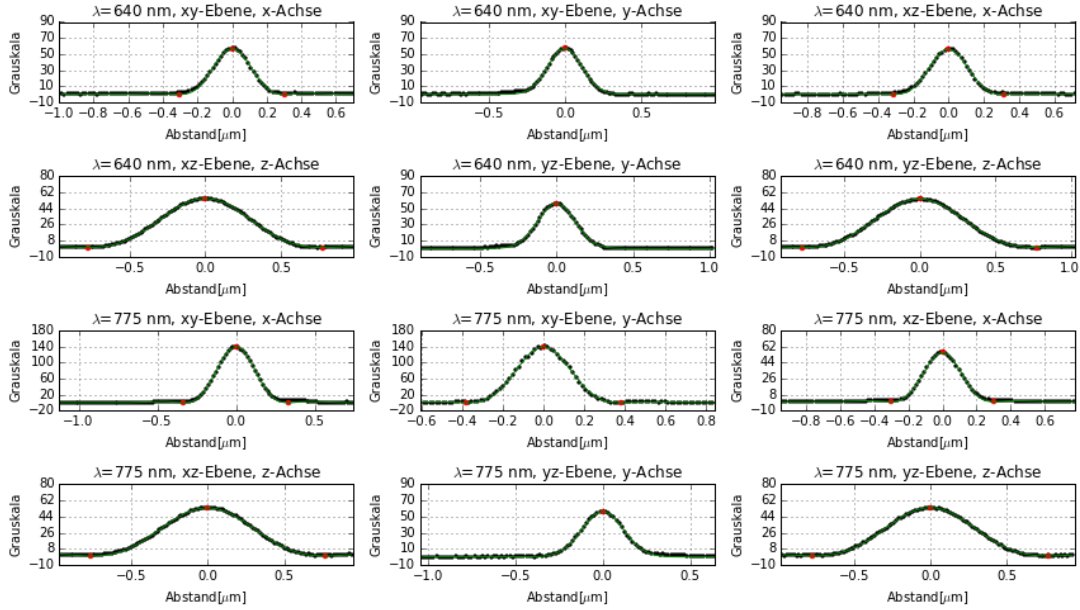


Abbildung 1: Verteilung der Intensität der Aufnahmen, als Funktion des Abstandes vom ersten Maximum. Mit ImageJ bestimmte Werte sind schwarz dargestellt. Maxima und erste Minima sind in rot hervorgehoben. Die gefittete Funktion (grün) entspricht Gleichung (1). Für die Messungen der y-Achse für die Wellenlängen 640 nm und 775 nm, liefert diese Methode der bestimmung der Minima keine sinnvollen Ergebnisse.

als:

$$x_{min} = \frac{\pi}{2}\omega. \quad (2)$$

Die PSF wird mit ImageJ vermessen indem das Profil entlang der jeweiligen Achse durch das Maximum bestimmt wird. In Abb. 1 sind die alle Vermessungen der PSF zu sehen. In Tab. 1 sind die durch nonlinear-regression bestimmten Werte aufgetragen, der Fehler ergibt sich aus der bei der Regression auftretenden Standardabweichung.

Die aus dem Aufbau nach Gleichung (??) bestimmte Airyscheibe hat einen Durchmesser von 557.7 nm für eine Wellenlänge von 640 nm und 675.4 nm für eine Wellenlänge von 775 nm.

2.2 Tiefendiskriminierung

In Abb. 2 ist der Intensitätsverlauf in Abhängigkeit von der z-Achse entlang der Farbfilmprobe dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der nonlinear-regression für den Abstand der ersten Minima von einander, für jede Messung. Die Fehler ergeben sich aus der Standardabweichung der Messwerte von der mit der Regression bestimmten Kurve. Für die y -Achsen Messwerte ist der Fehler der Regression viel größer als der bestimmte Durchmesser, der weit außerhalb der betrachteten Region liegen würde.

Wellenlänge [nm]	Ebene	Achse	Durchmesser der Airyscheibe [μm]
640	xy	x	0.604(6.0)
		y	0.0(100000000.0)
	xz	x	0.626(9.0)
		z	1.559(6.0)
	yz	y	0.0(100000000.0)
		z	1.555(6.0)
	775	xy	0.668(6.0)
		y	0.761(8.0)
775	xz	x	0.611(6.0)
		z	1.53(9.0)
	yz	y	0.0(100000000.0)
		z	1.546(8.0)
	Gesamt	x	0.610(5)
		y	—
		z	1.557(4)
		x	0.639(5)
		y	0.761(8)
		z	1.546(8)

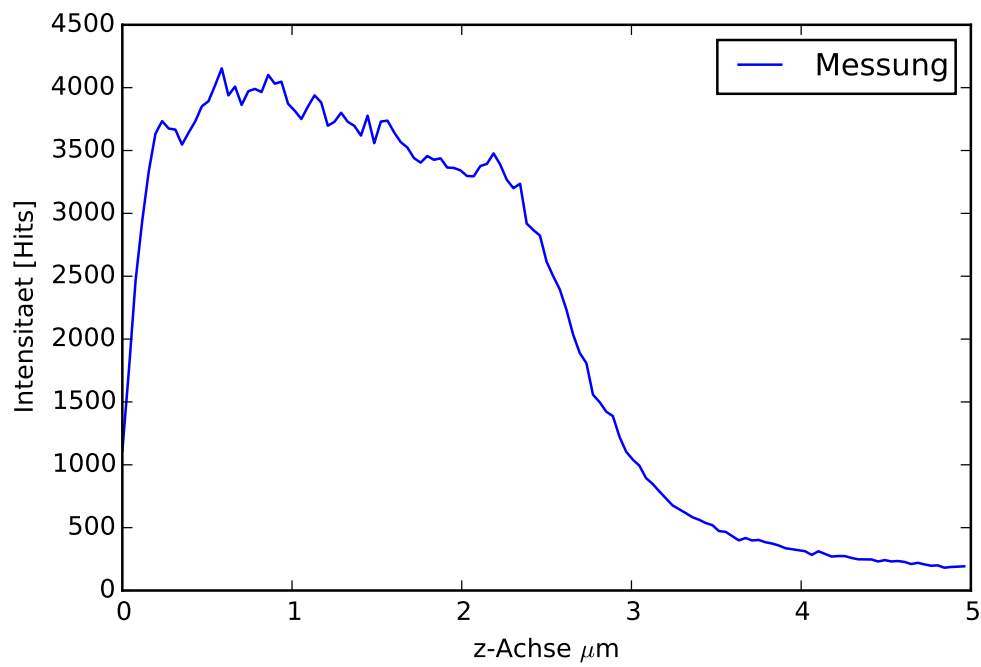


Abbildung 2: Verlauf der gemessenen Intensität beim Scannen des Farbfilms entlang der z -Achse. Die Intensität entspricht der Anzahl der detektierten Photonen im Photomultiplier.

2.3 STED-Auslöschung

Zur Bestimmung der Sättigungsintensität I_S wurde die Auslöschung, der durch den Anregungslaser erzeugten Fluoreszenz durch den STED-Laser bestimmt. Das Verhältnis zwischen Intensität des Anregungslasers und Restintensität ist in Abb. 3 dargestellt. Die Fehler der Messung werden als die Standardabweichung der Messwerte für eine gegebene STED-Leistung und Beleuchtung angenommen.

Die Sättigungsintensität wird durch einen Fit der Funktion

$$f(x) = A \cdot \exp(-k \cdot x). \quad (3)$$

bestimmt. Für die Sättigungsintensität gilt:

$$I_S = \frac{\log 2}{k}. \quad (4)$$

Der über die Regression bestimmte Wert liegt bei 3.08(1) mW.

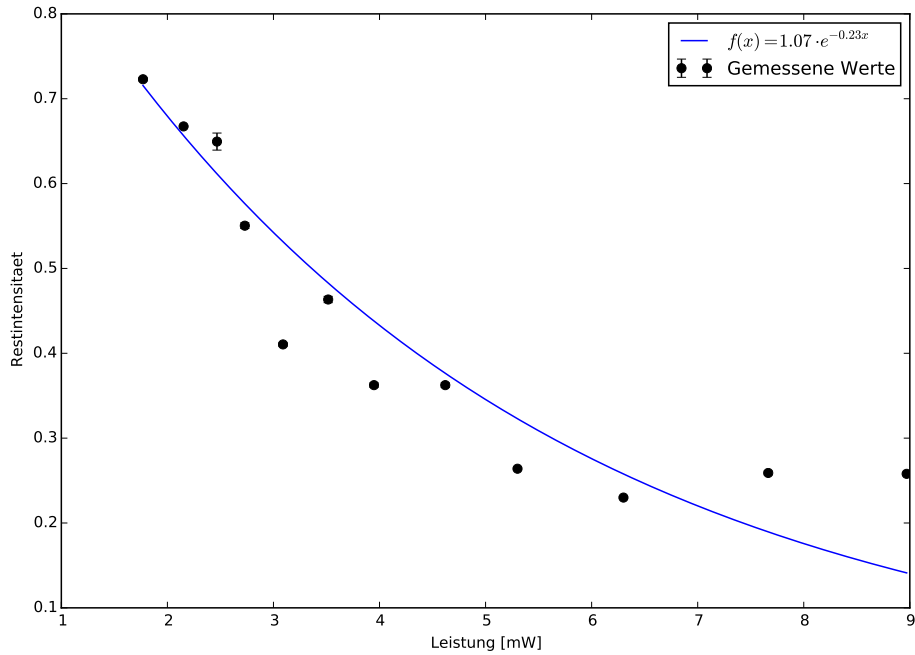


Abbildung 3: Restintensität als Anteil der Anregungsintensität für verschiedene STED-Leistungen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung der einzelnen Messungen für eine gegebene STED-Leistung und Beleuchtungsart. Die Messung der Intensität bei Beleuchtung durch den Anregungslaser allein ergibt vier Messwerte je STED-Leistung, und die Messung der Intensität bei gleichzeitiger Beleuchtung mit Anregungs- und STED-Laser liefert zwei Messwerte. Die Kurve folgt einem exponentiellen Abfall mit Abfallrate $k = 0.23 \text{ [mW]}^{-1}$. Die dadurch bestimmte Sättigungsintensität ist $3.08(1) \text{ mW}$.