

# Fluoreszenzmikroskopie

Elisabeth Hahm

Physikalisches Proseminar, 31.06.2023

- 1 Motivation
  - Lichtmikroskop
- 2 Fluoreszenz
- 3 Erweiterungen des Fluoreszenzmikroskopes
  - konfokale Fluoreszenzmikroskopie
  - stimulated emission depletion (STED)
  - single molecule microscopy

# Motivation

- lebende Zellen betrachten
- in die Zelle schauen

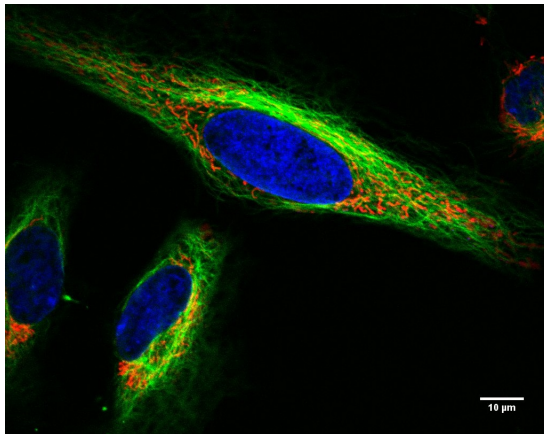


Abbildung: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer lebenden Zelle [2]

# Motivation - Lichtmikroskop

- Auflösungslimit:  
Wann kann man zwei Objekte gerade noch so als zwei unterschiedliche Objekte wahrnehmen?
- Lichtmikroskopie: Abbe Limit

$$d = \frac{\lambda}{n * \sin(\alpha)}$$

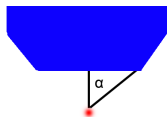


Abbildung: der halbe Öffnungswinkel  $\alpha$  [6]

- für Selbstleuchtende Punkte:

$$d = \frac{0.61 * \lambda}{n * \sin(\alpha)}$$

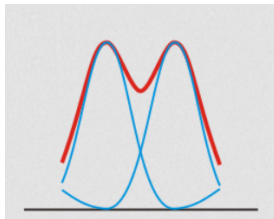


Abbildung: Das Raylight-Kriterium [3]

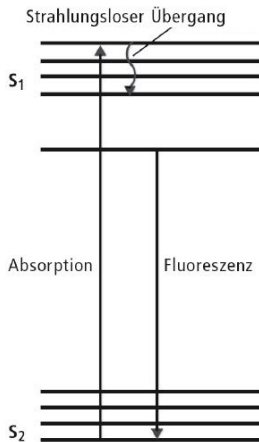


Abbildung: Schematische Darstellung von Fluoreszenz [4]

- koppelung an Proteine, Antikörper
- bei mehreren Farbstoffen unterschiedliche Emissionsspektren

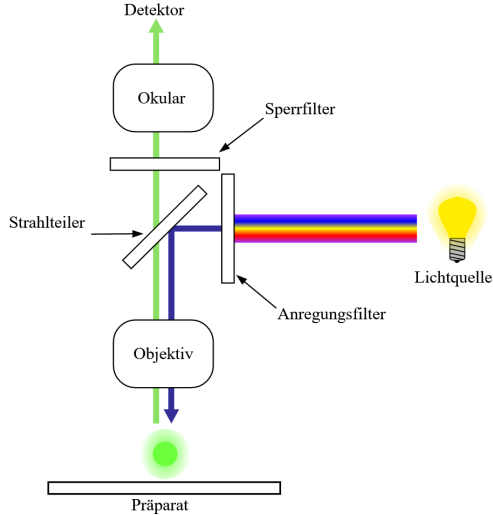
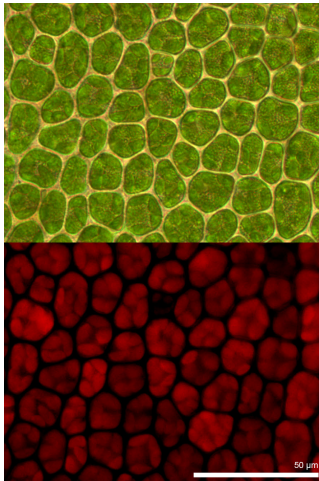


Abbildung: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops [5]





**Abbildung:** Aufnahme eines Mooses, oben mit einem Lichtmikroskop, unten mit einem Fluoreszenzmikroskop [7] (der weiße Balken ist 50  $\mu m$  lang)

- eine Lochblende blockiert das Licht aus unscharfen Ebenen
- Verringer dadurch Rauschen

# Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

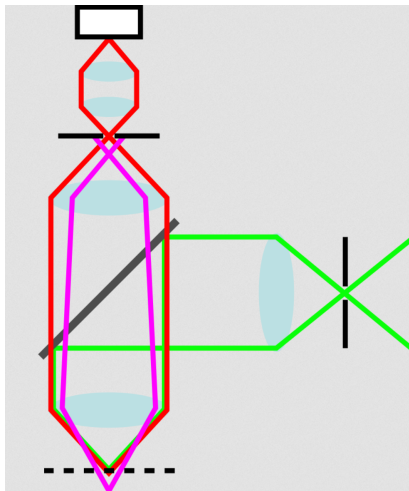


Abbildung: Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops[8]

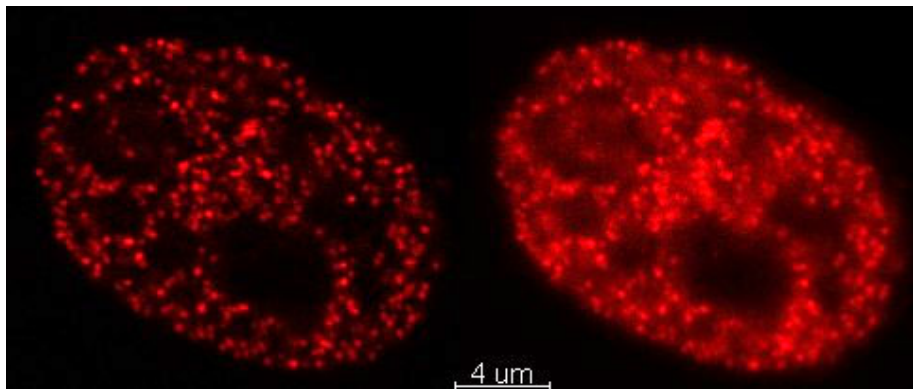
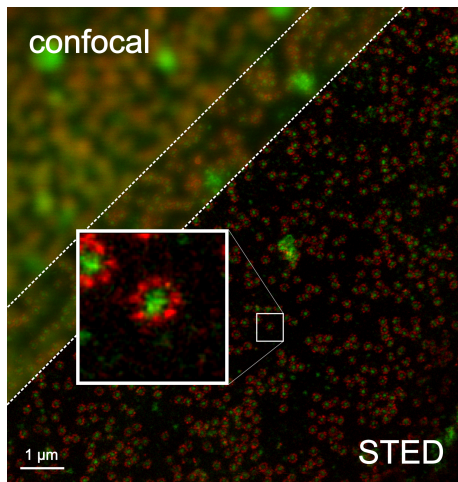


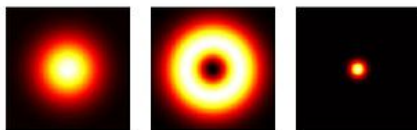
Abbildung: links konfokale, rechts nicht konfokale Aufnahme[9]



**Abbildung:** Eine STED Aufnahme im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie[10]

- Problem: der Anregungsstrahl, kann nicht beliebig Fokussiert werden

- Problem: der Anregungsstrahl, kann nicht beliebig Fokussiert werden



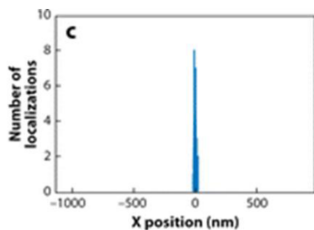
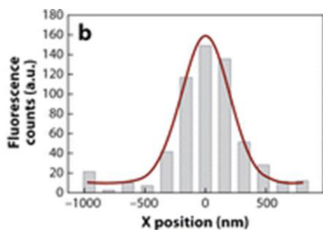
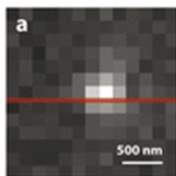
**Abbildung:** Den Anstaltestahl, den Ausschaltestahl und der angeregter Bereich[11]

- 1/3 Nobelpreis in Chemie 2014, Stephan Hell

- Man regt die Farbstoffe nacheinander an, und nimmt viele Bilder von einer Probe
- die Warscheinlichkeit, dass zwei Moleküle gleichzeitig leuchten, wird dadurch stark verringert
- Man berechnet aus den Bildern den Ort einzelner Farbstoffmoleküle und legt sie für ein entgültiges Bild übereinander



# single molecule microscopy




 Thompson MA, et al. 2012.  
Annu. Rev. Biophys. 41:321–42

Abbildung: die Aufbereitung eines Signals [12]

- Eric Betzig und William Moerner bekamen jeweils 1/3 des Nobelpreises für Chemie 2014

# Quellen

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Airy\\_Pattern.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Airy_Pattern.svg)

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Multicolor\\_fluorescence\\_image\\_of\\_a\\_living\\_HeLa\\_cell.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Multicolor_fluorescence_image_of_a_living_HeLa_cell.jpg)

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RayleighCriterion.svg>

<https://shimadzu-laborwelt.de/application/wieviel-fluoreszenz-zeigt-ein-polymer-fuer-eine-qualitaetskontrolle/>

[https://www.chemie-schule.de/KnowHow/Datei:Fluoreszenzmikroskopie\\_2008-09-28.svg](https://www.chemie-schule.de/KnowHow/Datei:Fluoreszenzmikroskopie_2008-09-28.svg)

[https://de.wikipedia.org/wiki/Auflösung\\_\(Mikroskopie\)#/media/Datei:Oeffnungswinkel.png](https://de.wikipedia.org/wiki/Auflösung_(Mikroskopie)#/media/Datei:Oeffnungswinkel.png)

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zz\\_Plagiomnium\\_undulatum\\_fluorescence.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zz_Plagiomnium_undulatum_fluorescence.jpg)

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ConfocalPrinciple.svg>

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Combined-confocal-unconfocal003.jpg>

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2color-STED-example.png>

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:STED\\_Mikroskop\\_PSFs.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:STED_Mikroskop_PSFs.jpg)

<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/advanced-chemistryprize2014.pdf>

[https://de.wikipedia.org/wiki/Auflösung\\_\(Mikroskopie\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Auflösung_(Mikroskopie))

<https://de.moleculardevices.com/technology/fluorescence>

<https://www.edmundoptics.de/knowledge-center/application-notes/microscopy/confocal-microscopy/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494126/>