

*Сверхвысокое разрешение
световой микроскопии.
Шаг за предел Аббе.*

Н.Б. Рубцов

08/10/2014
15:35

Нобелевская премия по химии присуждена за суперфлуоресцентную микроскопию сверхвысокого разрешения

Нобелевская премия в области химии 2014 года присуждена Штефану Хеллю (Германия), Уильяму Мернеру (США) и Эрику Бетцигу (США) за вклад в развитие флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. Об этом сообщается на сайте Нобелевского комитета.

Лауреатами Нобелевской премии по химии в 2013 году стали Мартин Карплус, Майкл Левитт и Ари Уоршел за создание многоуровневых моделей сложных систем.

Вчера, 7 октября, Нобелевская премия в области физики 2014 года была присуждена японским ученым Исаму Акасаки, Хироши Амано и Сюдзи Нахамура за изобретение светодиодов - энергоэффективного и экологически чистого источника света.

Нобелевская премия в области медицины и физиологии 2014 года была присуждена 6 октября неврологу Джону О'Кифу (Великобритания), а также физиологам Мэй-Бритт Мозер и Эдварду Мозеру (Норвегия) за открытие клеток мозга, которые отвечают за самоопределение в пространстве (внутренний GPS мозга).

Eric Betzig, Stefan Hell, and W. E. Moerner Win 2014 Nobel Prize In Chemistry

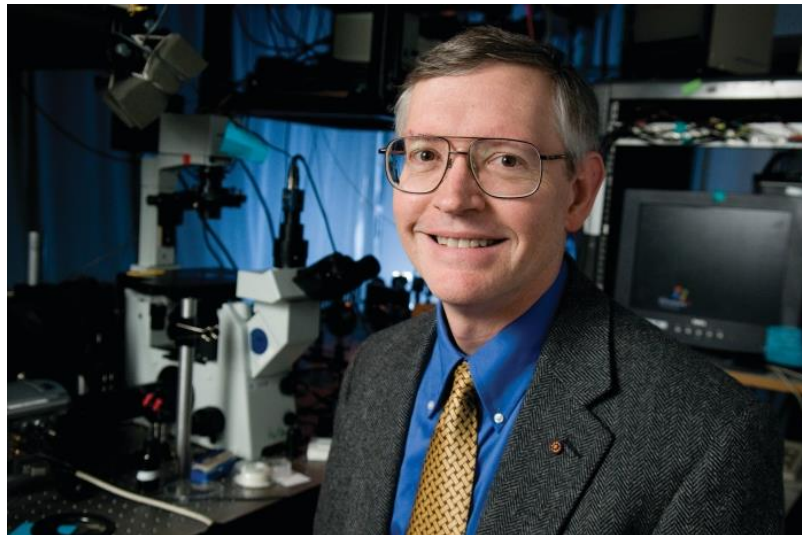
Awards: Superresolution fluorescence microscopy has made it possible to capture nanoscale images of cells



Betzig
Credit:
Matt
Stanley/HHMI



Hell
Credit: Max Planck
Institute for Biophysical
Chemistry



Moerner
Credit:
L.A. Cicero

W. Moerner впервые в мире смог детектировать отдельную флуоресцирующую молекулу. Это было сделано в IBM's Almaden Research Center in San Jose, Calif. Затем, работая в University of California, San Diego Moerner открыл возможность включения и выключения по команде одного из вариантов GFP. При возбуждении светом с длиной волны 488-nm GFP выгорал и не мог быть задействован снова. Но Moerner обнаружил что облучение светом с длиной волны 405-nm реактивировало белок, и он мог снова возбуждаться светом с длиной волны 488-nm .

Eric Betzig заложил основы для микроскопии одиночных молекул, разработав механизм, позволяющий как бы «включать» и «выключать» флуоресцентное свечение каждой молекулы. Такие фотовключаемые белки стали основой для **PhotoActivated Localization Microscopy (PALM)**, разработанной в 2006 году Eric Betzig совместно с Harald Hess in. Оригинальная установка было собрана прямо в жилой комнате Harald Hess.

Stefan Hell. Разработанный им метод—**STimulated Emission Depletion (STED) microscopy** — имеет принципиальные отличия. При использовании STED microscopy один лазерный луч стимулирует флуоресценцию флуорохрома, тогда как другой перекрывающий его лазерный луч с тороидальным сечением выключает флуоресценции везде за исключением наноразмерного объема, позволяя при сканировании образца построить изображение с наноразмерным разрешением. Этот метод свехразрешающей флуоресцентной спектроскопии улучшает латеральное разрешение, но практически не меняет разрешение по оси Z.

Световая микроскопия: разрешение

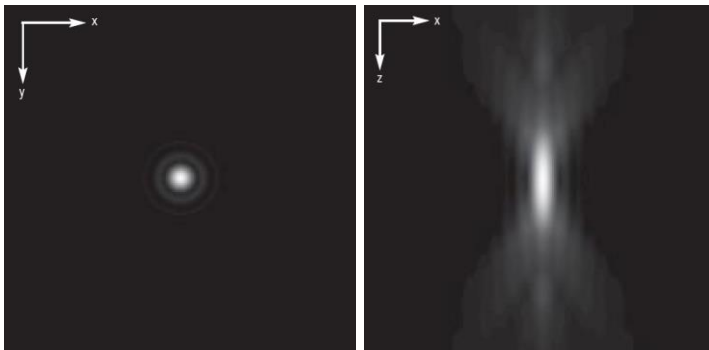
Оптическое изображение точки не является точкой, представляет собой 3D распределение интенсивности, описываемое PSF.

Формирование оптического изображения образца может быть рассчитано как PSF всех его точек.

Деконволюция представляет собой решение обратной задачи: описание сигналов во всех точках образца по оптическому изображению (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/deconvolution/deconvolutionhome.html>).

Point Spread Function

$$PSF_{tot}(x,y,z) = PSF_{fill}(x,y,z) \cdot PSF_{det}(x,y,z)$$



Конволюция



Деконволюция

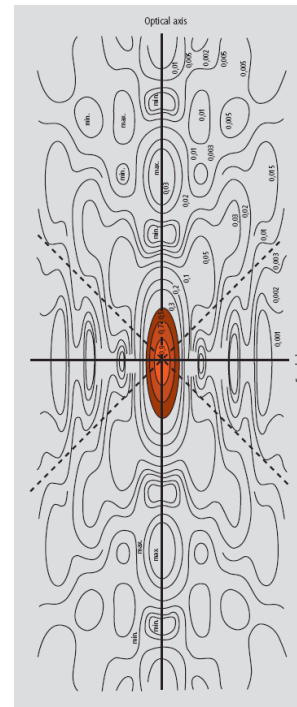
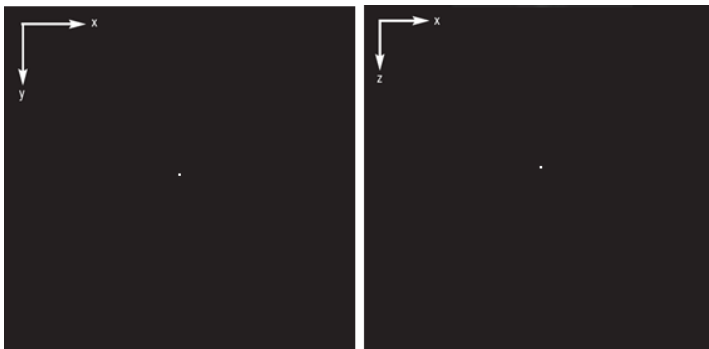
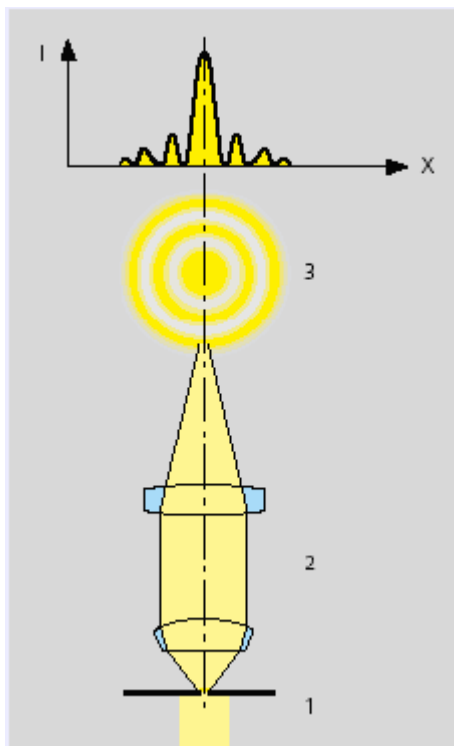
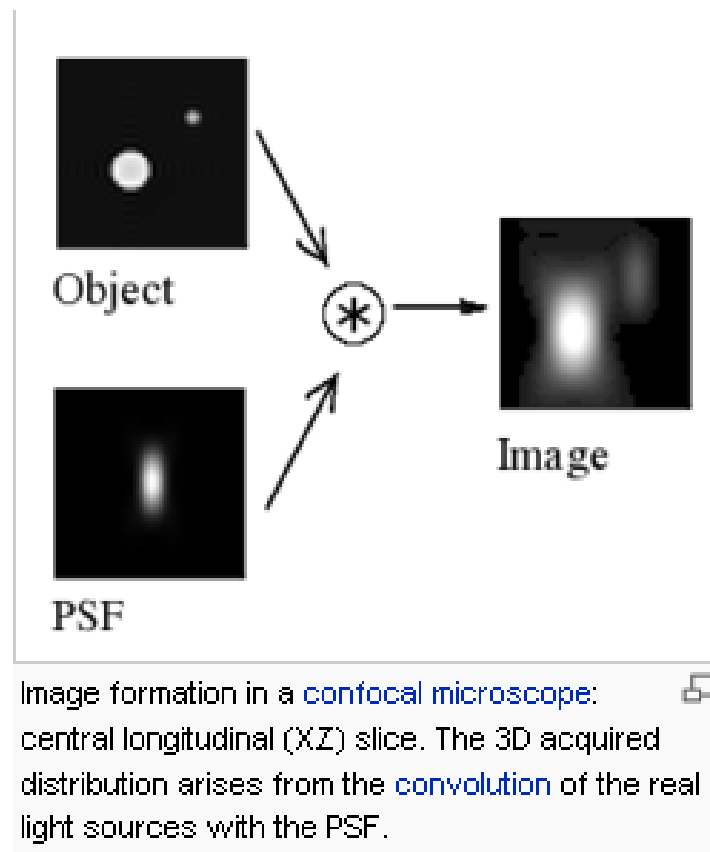


Диаграмма изофот интенсивности сигнала, идущего из точки (PSFill).



От объекта к его изображению через PSF

Изображение точки, находящейся в фокальной плоскости не является точкой, а представляет собой распределение сигнала на определенной площади. Его описывает функция распределения сигнала из точки (Point Spread Function - PSF). PSF зависит от оптической системы микроскопа и длины волны испускаемого свете



Пространственное разрешение



$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

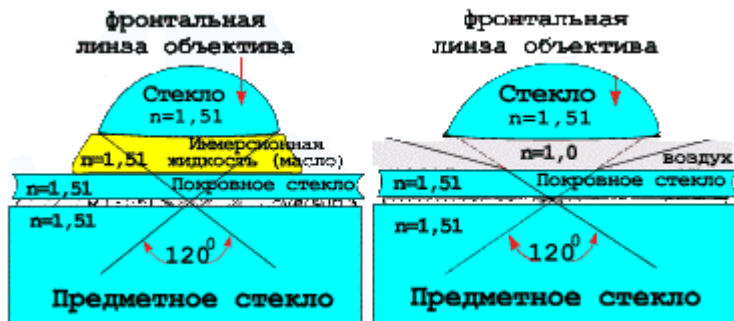
Разрешение микроскопа

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

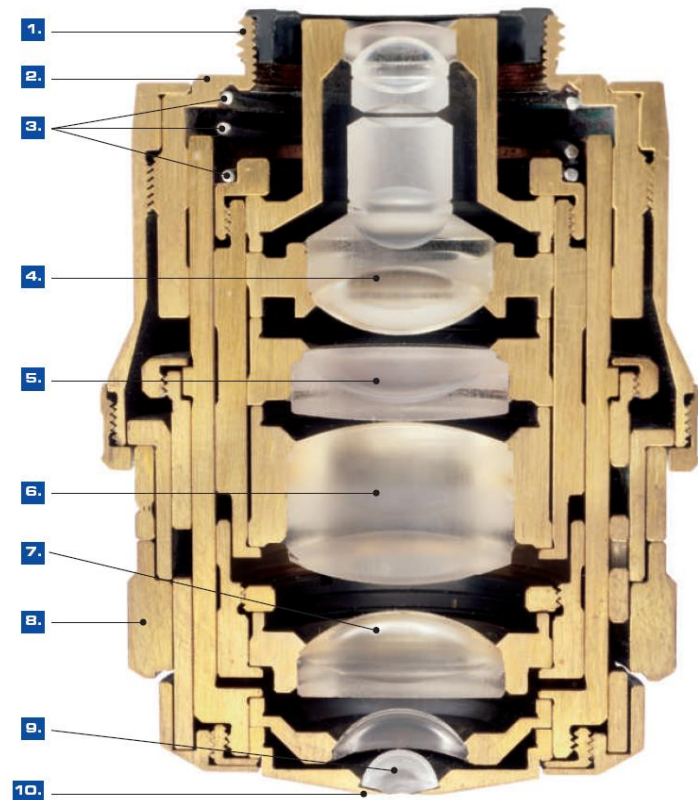
λ = wavelength of the light used (effective wavelength of white light: 550 nm)

n = refractive index of the optical medium between the front lens and cover glass (air = 1; H₂O = 1.33; immersion oil = 1.518)

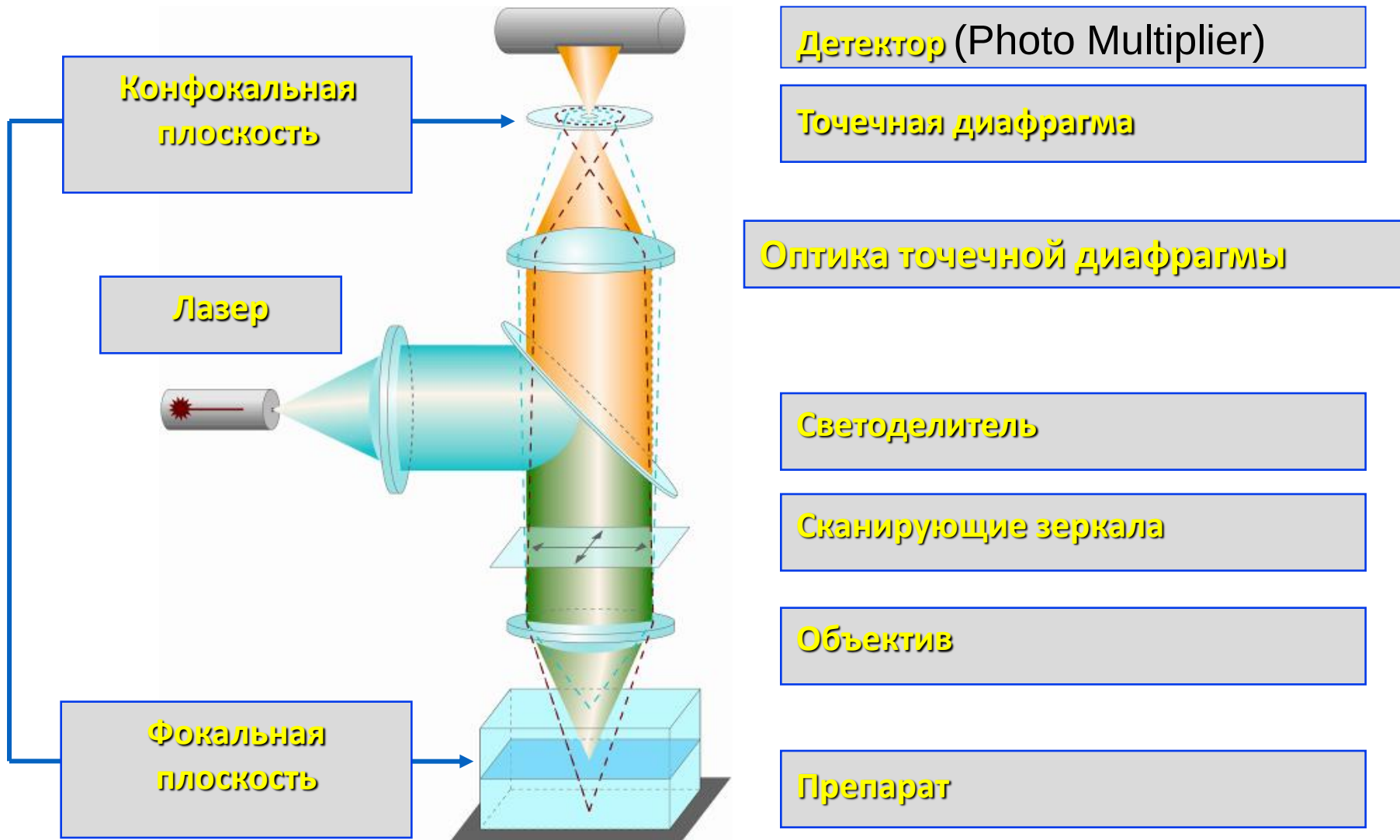
α = half the opening angle of the objective used



$$NA = n \cdot \sin(\alpha)$$

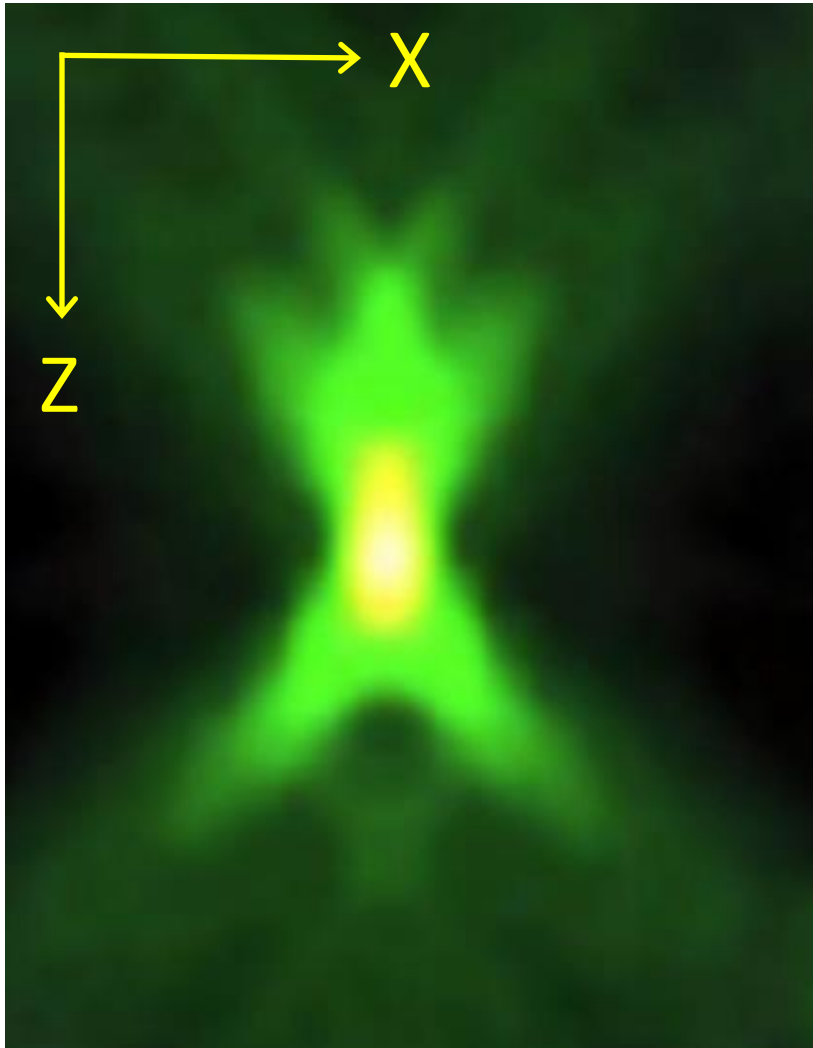


Лазерная сканирующая микроскопи

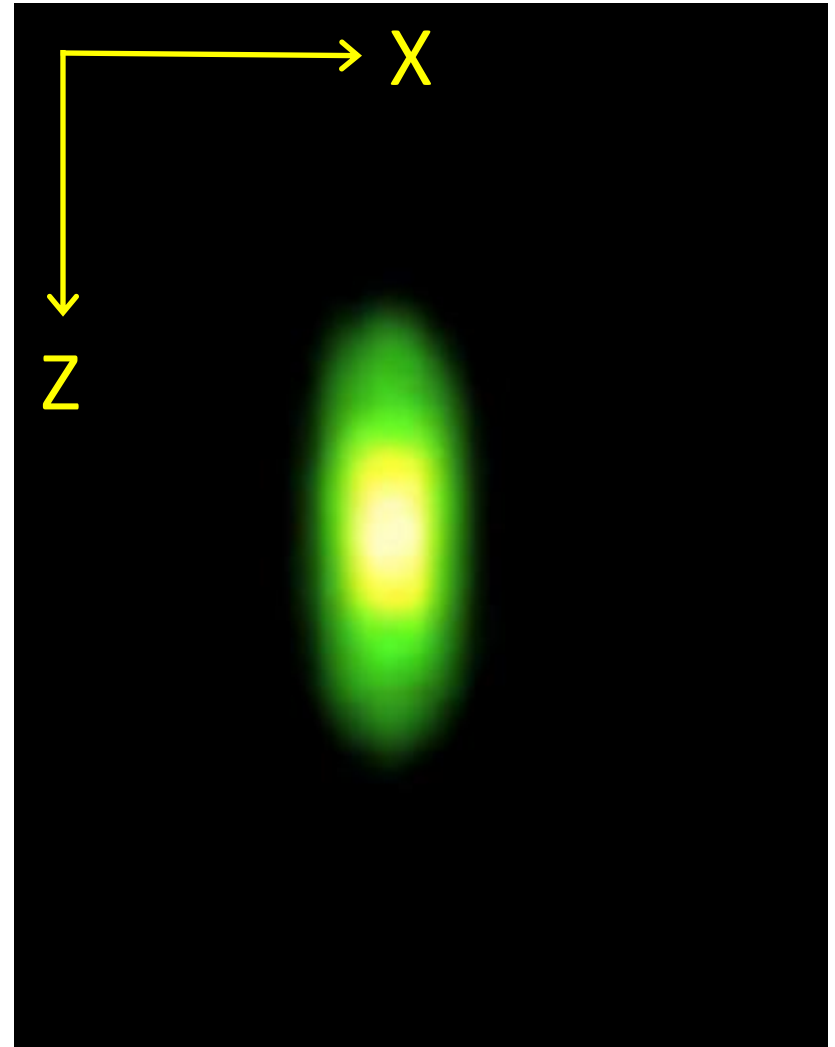


Функция рассеяния точки

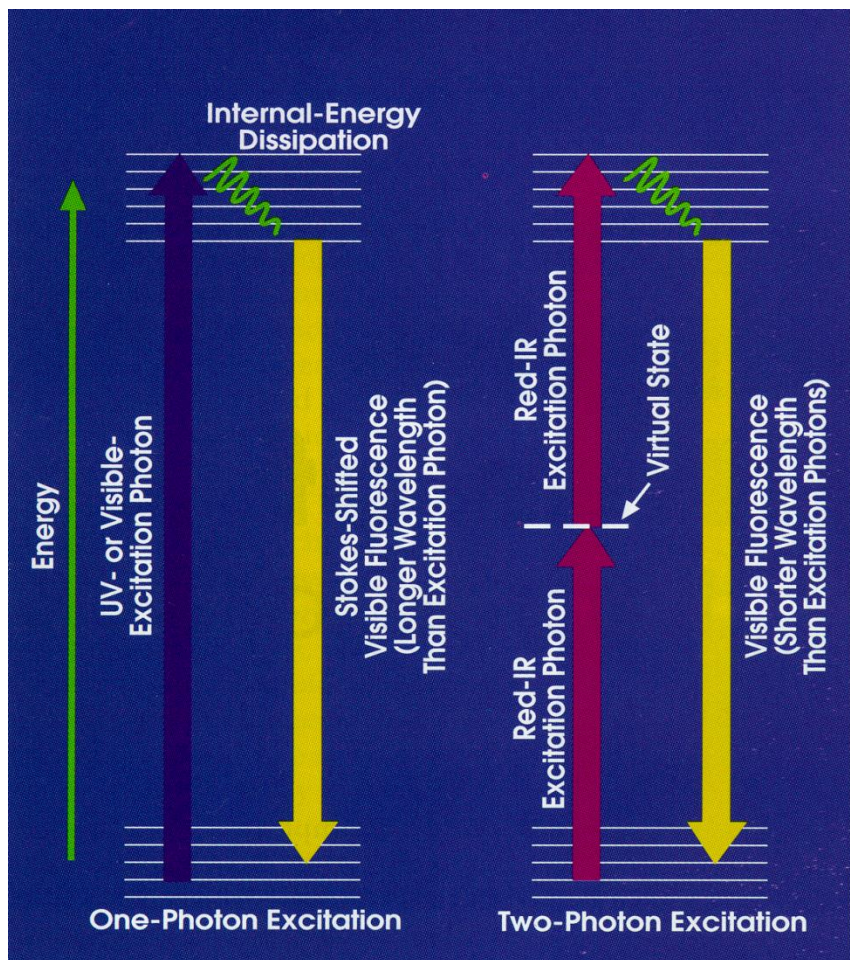
Обычный



Конфокальный



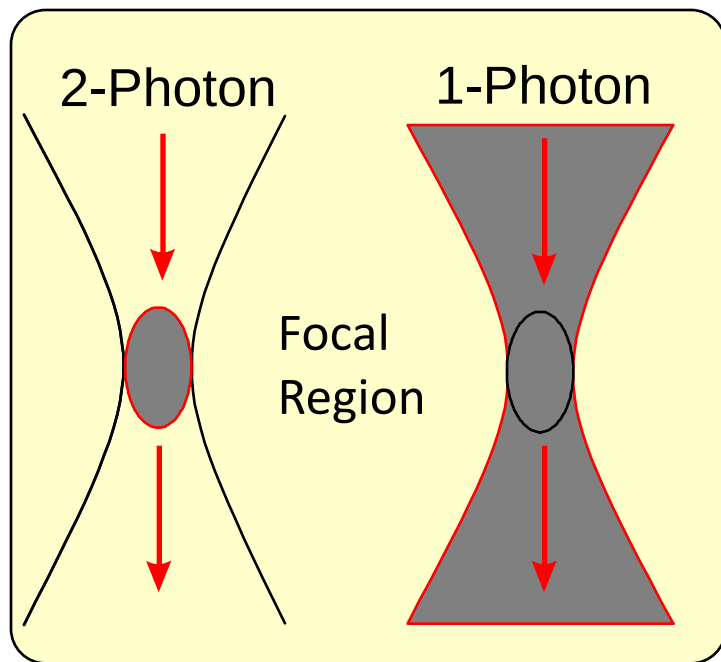
Принцип Мультифотонной Микроскопии



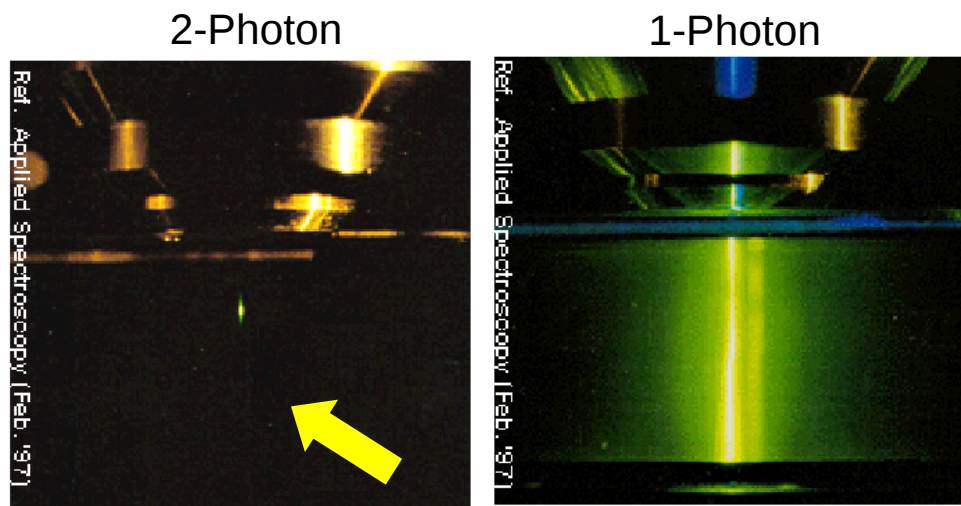
- Абсорбция 2 NIR фотонов
- Высокая фотонная плотность
- Non-Linear-Optical (NLO) эффект

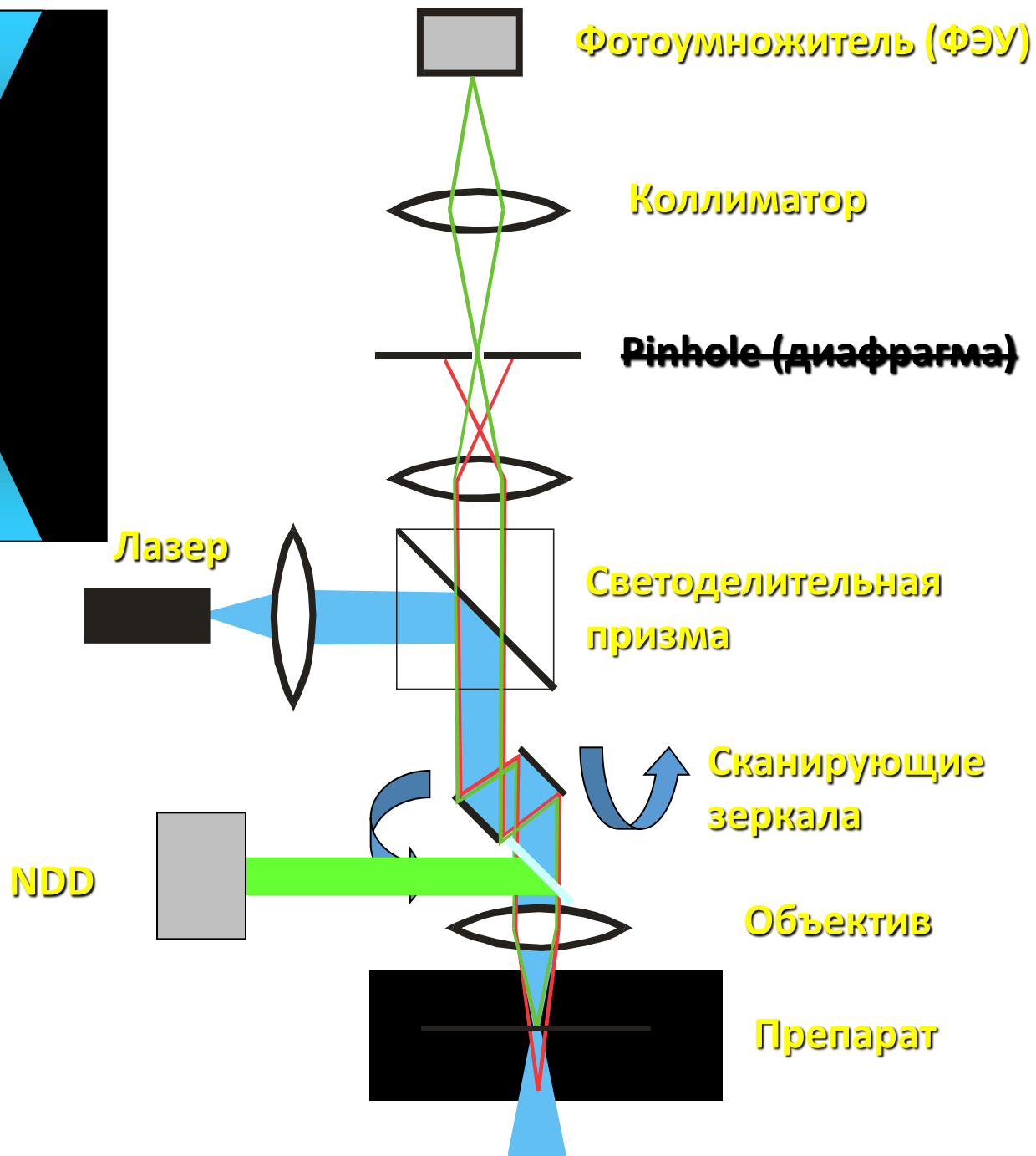
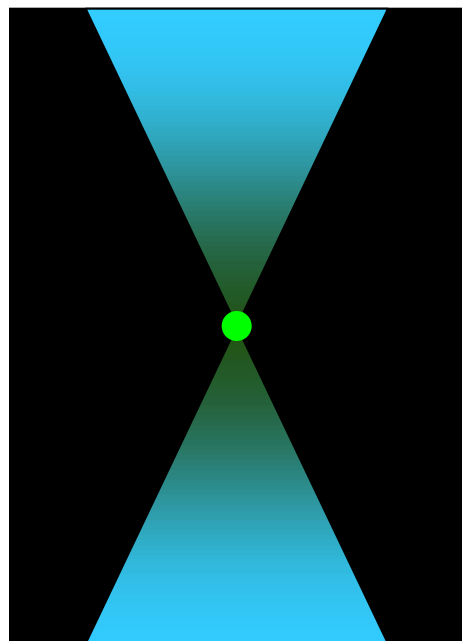
Принцип Мультифотонной Микроскопии

Мультифотонное возбуждение (нелинейное возбуждение, NLO)



- Конфокальное возбуждение внутри V детекции
- Возбуждающий Focal Volume ниже $0.1 \mu\text{m}^3$
- **3D-различие - Pinhole не требуется**



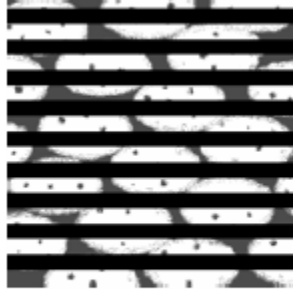


Арототе

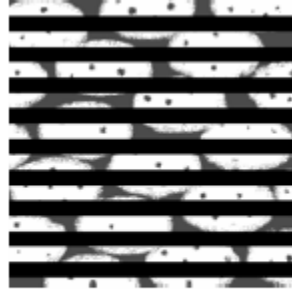
структурированное освещение



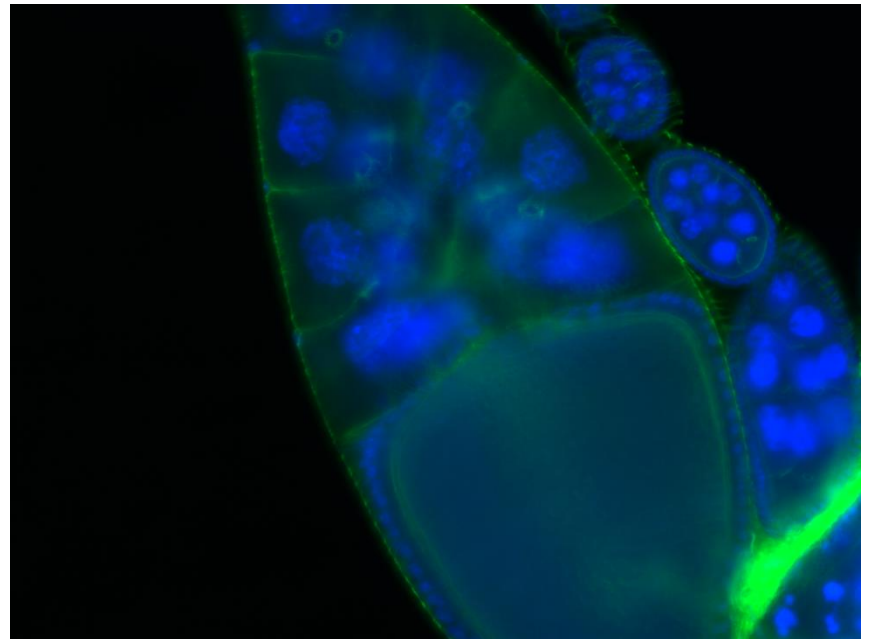
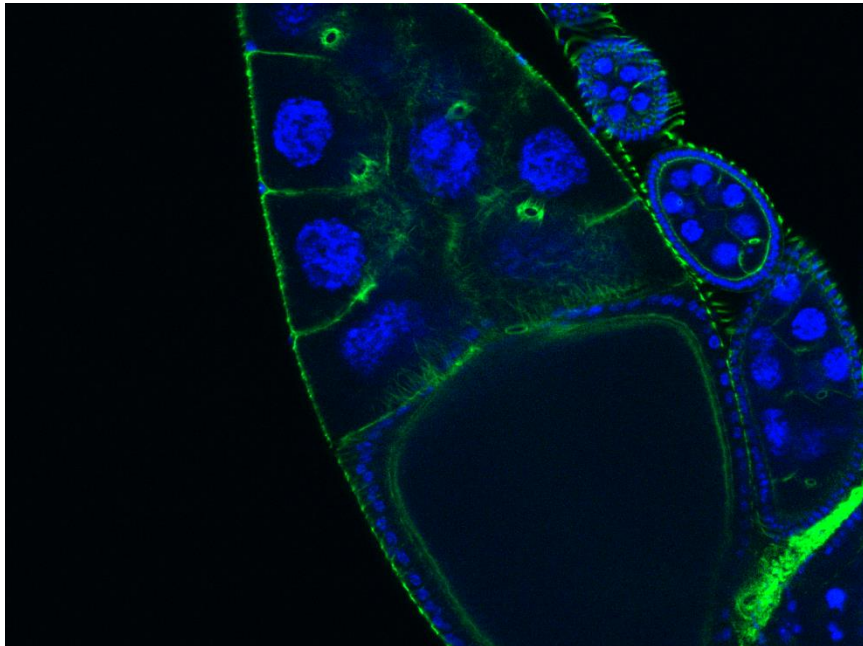
Grid Position 1



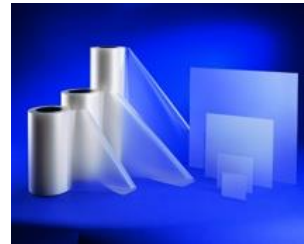
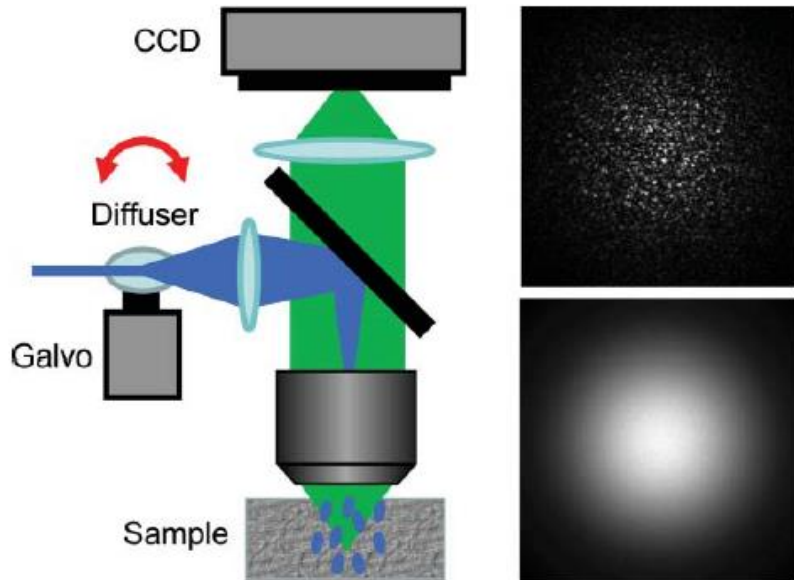
Grid Position 2



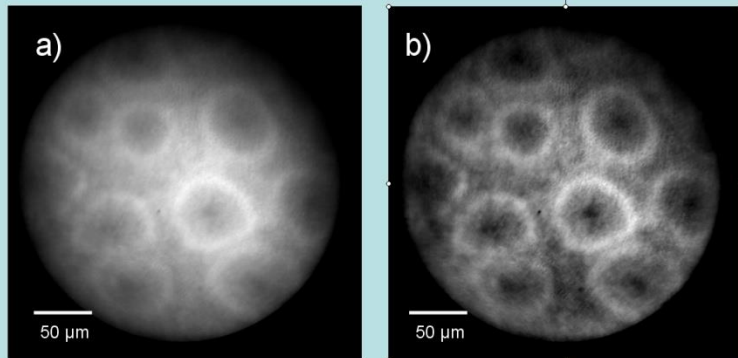
Grid Position 3



HiLo Microscopy



7 fps



(a) Wide-field image of rat colonic mucosa

(b) HiLo image.

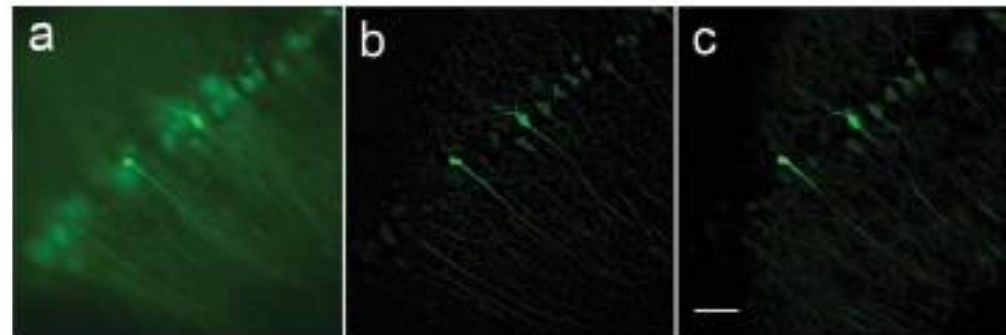
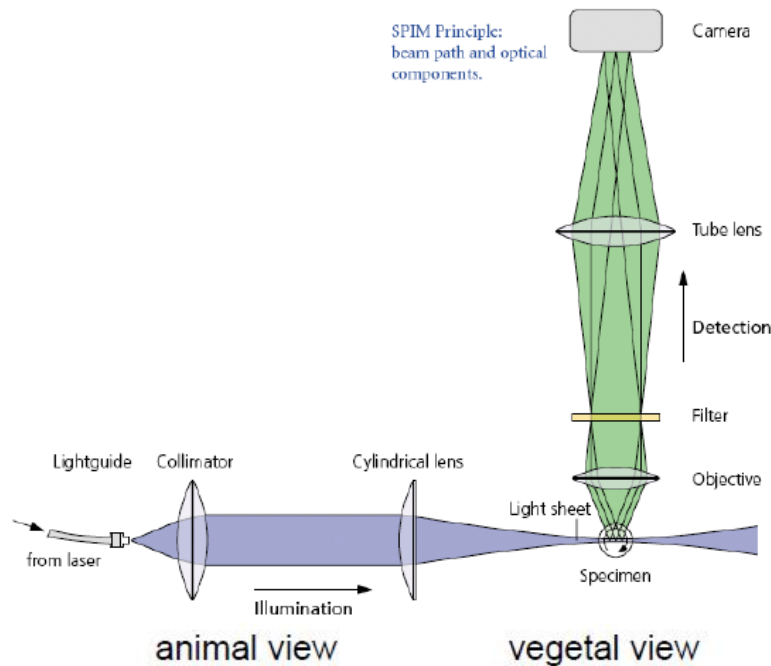
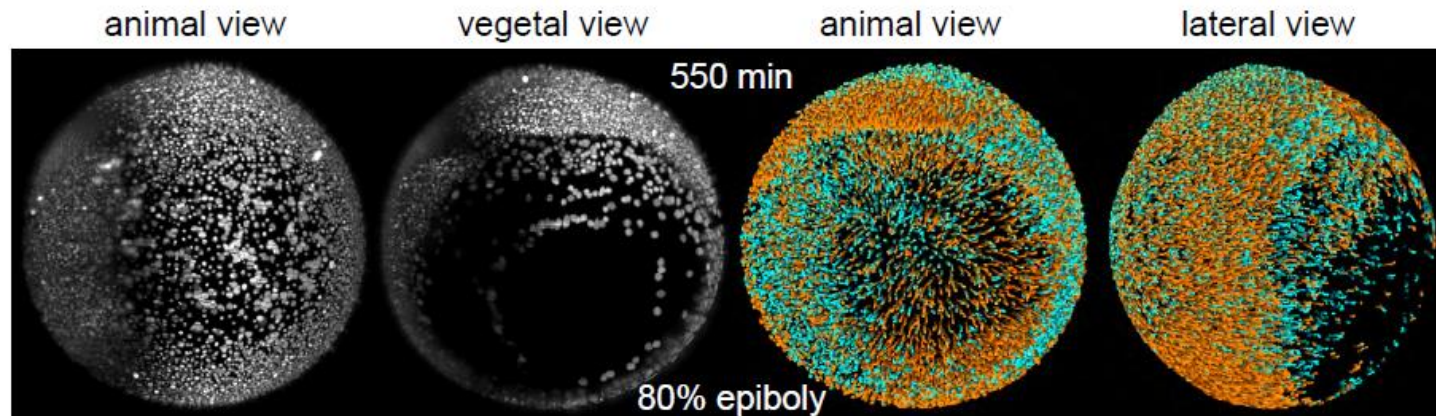
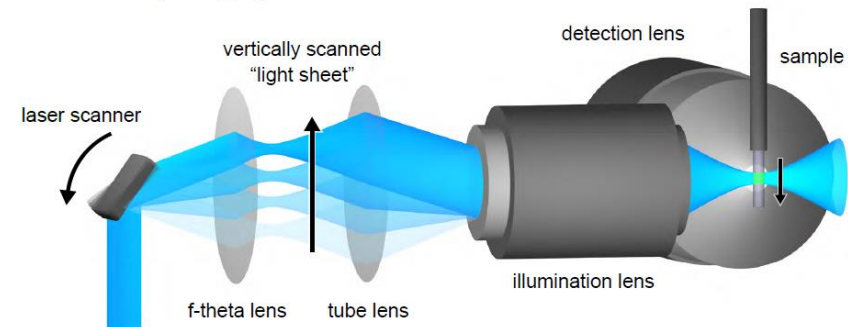


Fig. 2 Volumetric imaging of a mouse brain hippocampus slice (100 μm thick) labeled by cytoplasmic EGFP by *in utero* electroporation.¹⁷ z-stacks comprising 200 slices with 0.5 μm step size were acquired with a HiLo microscope and a commercial confocal microscope (Olympus FluoView 1000), in both cases using a 20 $\times$ water immersion objective (Olympus UAp0/340). Co-located z-slices (single frames)

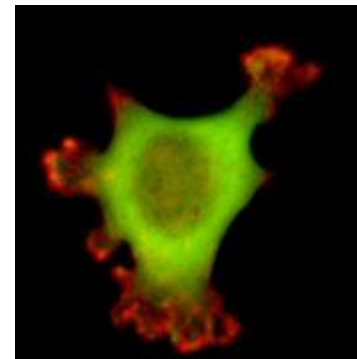
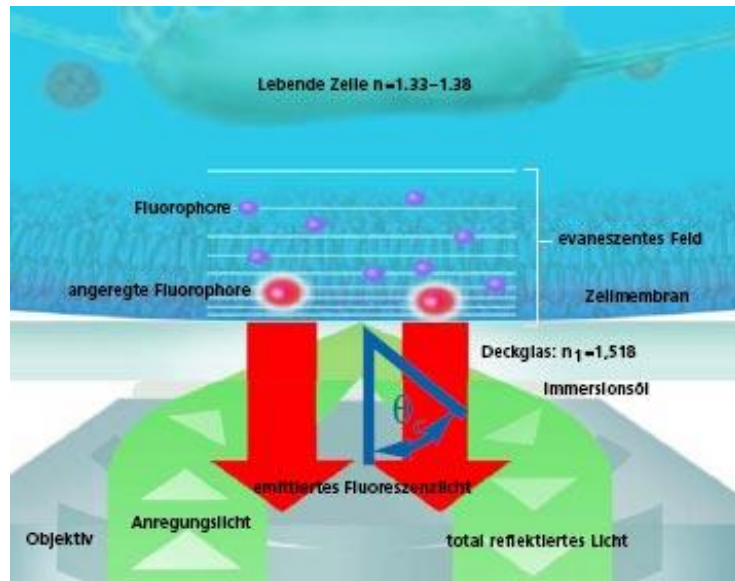
Selective Plane Illumination/Digital Scanned Laser Light Sheet Fluorescence (SPIM/DSLM)



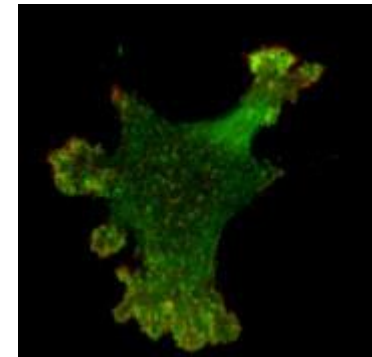
Keller *et al.* (2008); figure 1 **Scienceexpress**



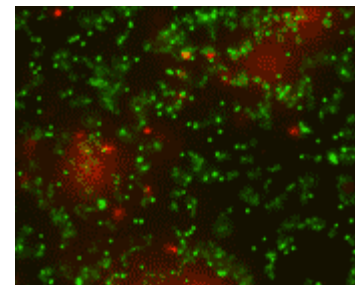
TIRF u SIRF микроскопия



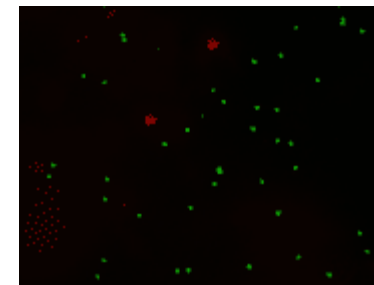
Epi fluorescence



TIRF



Epi fluorescence



SIRF

Сверхвысокое разрешение

- Förster (or Fluorescence) Resonance Energy Transfer (**FRET**) microscopy techniques.
- Structured Illumination Microscopy (Elyra, N-SIM)
- *4Pi*-microscopy
- Fluorescent/Electron Microscopy
- Fluorescence Photo**A**ctivation Localization **M**icroscopy (**FPALM**),
- Stochastic **O**ptical **R**econstruction **M**icroscopy (**STORM**)
- **ST**imulated **E**mission **D**epletion microscopy (**STED** microscopy)
- **PhotoA**ctivated **L**ocalization **M**icroscopy (**PALM**), Fluorescence

FRET basics

HEK 293T cells

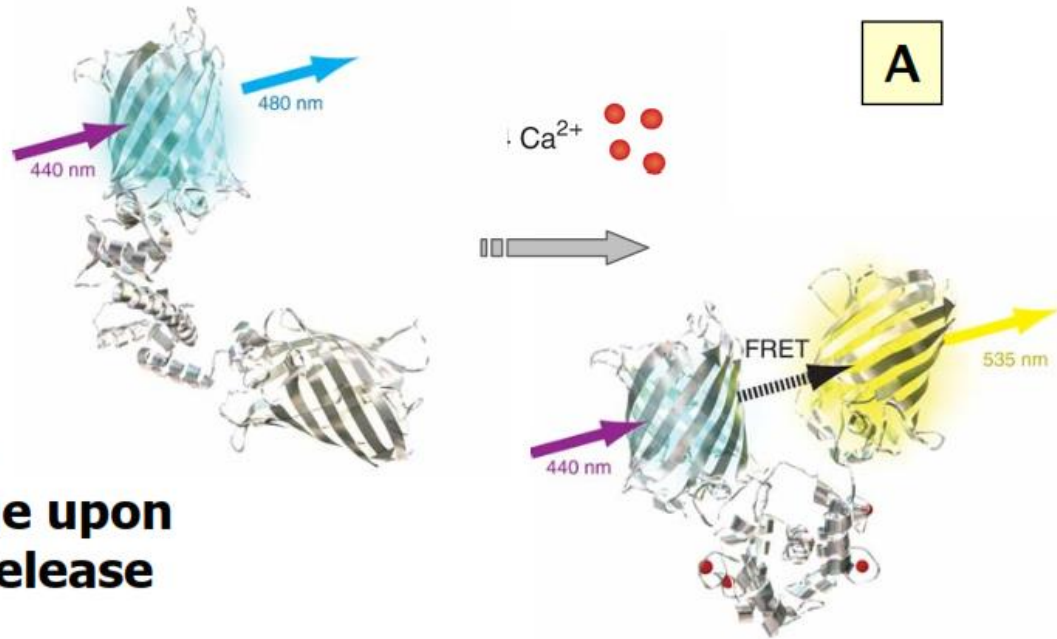
B

Color
change upon
 Ca^{2+} release

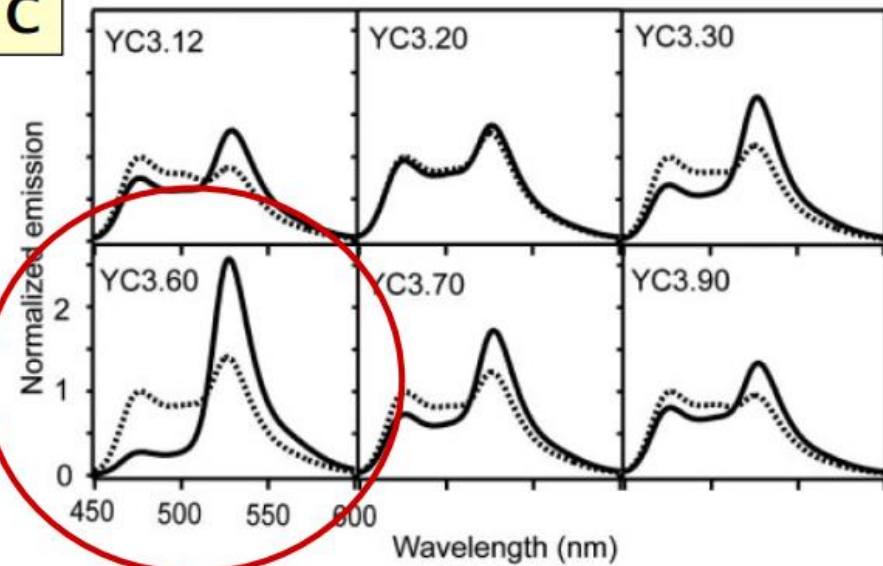


— $+\text{Ca}^{2+}$
.... $-\text{Ca}^{2+}$

A



C



Miyawaki et al. (1997) *Nature* 388: 882
Nagai et al. (2004) *PNAS* 101:10554

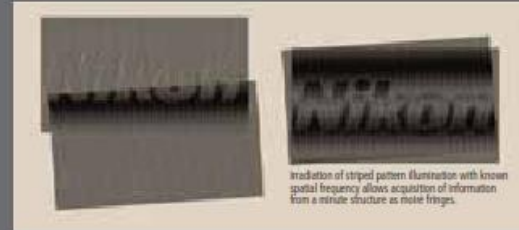
N-SIM

(x-y 100nm)

Principle of the Structured Illumination Microscopy

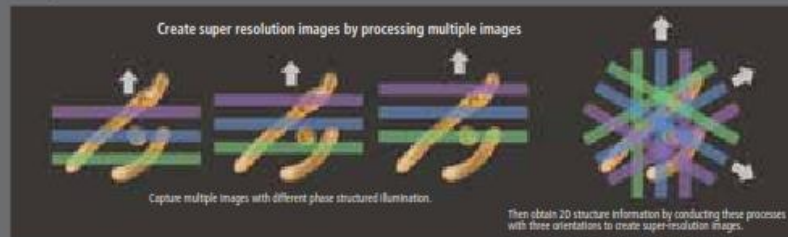
Analytical processing of recorded moiré patterns produced by overlay of a known high spatial frequency pattern mathematically restores sub-resolution structure of a specimen.

Utilization of high spatial frequency laser interference to illuminate sub-resolution structure within a specimen produces moiré fringes, which are captured. These moiré fringes include modulated information of the sub-resolution structure of the specimen. Through image processing, the unknown specimen information can be recovered to achieve resolution beyond the limit of conventional optical microscopes.



Create super resolution images by processing multiple moiré pattern images

An image of moiré patterns captured in this process includes information of the minute structures within a specimen. Multiple phases and orientations of structured illumination are captured, and the displaced "super resolution" information is extracted from moiré fringe information. This information is combined mathematically in "Fourier" or aperture space then transformed back into image space creating an image at double the conventional resolution limit.

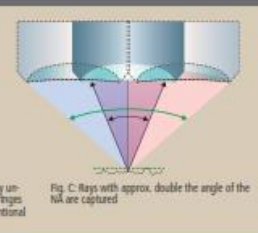
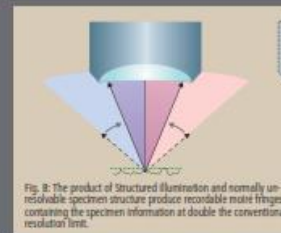
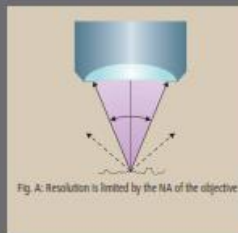


Utilizing High Frequency striped illumination to double the resolution

The capture of high resolution, high spatial frequency information is limited by the Numerical Aperture (NA) of the objectives, and spatial frequencies of structure beyond the optical system aperture are excluded (Fig. A).

Illuminating the specimen with high frequency structured illumination, which is multiplied by the unknown structure in the specimen beyond the classical resolution limit, brings the displaced "super resolution" information within the optical system aperture (Fig. B).

When this "super resolution" information is then mathematically combined with the standard information captured by the objective lens, it results in an effective doubling of the NA, and therefore resolution of the optical system (Fig. C).



Comparison images: with TIRF-SIM and with conventional microscope

Images of $\phi 100\text{nm}$ fluorescent beads captured with a conventional microscope and super resolution microscope N-SIM.

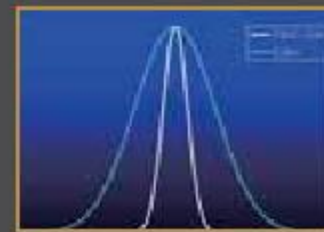
The intensity profiles of single point images indicate that the resolving power of the super resolution microscope is about double that of the conventional epi-fluorescence microscope.



With conventional epi-fluorescence microscope

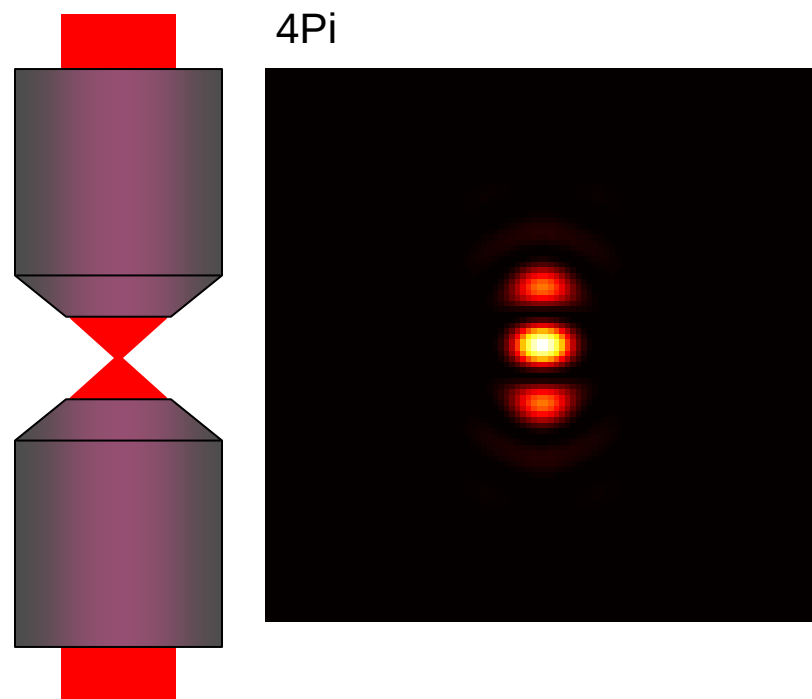
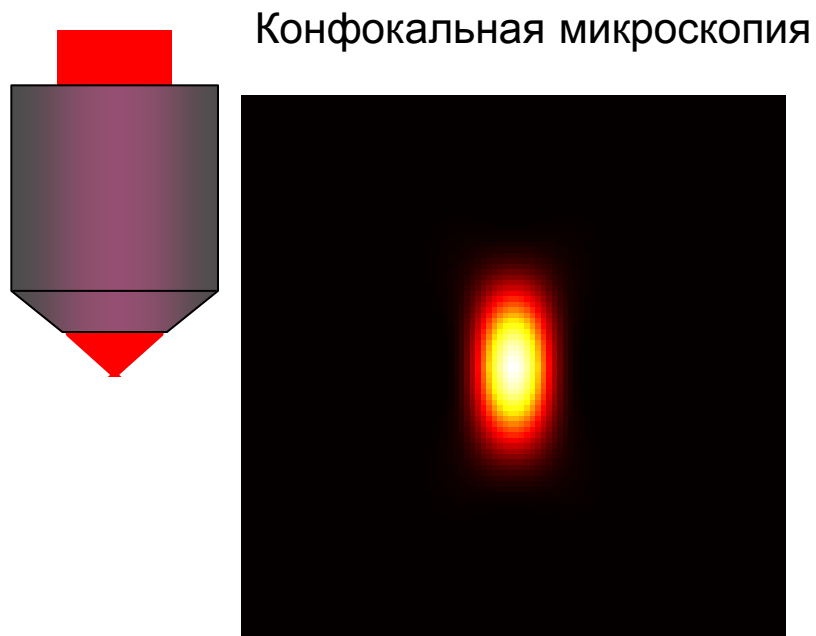


With TIRF-SIM

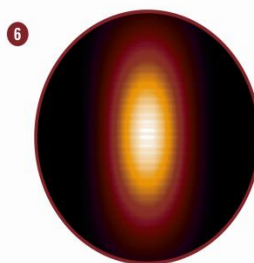
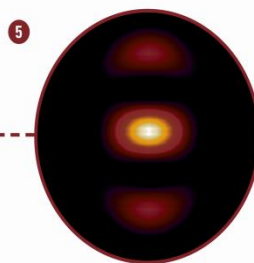
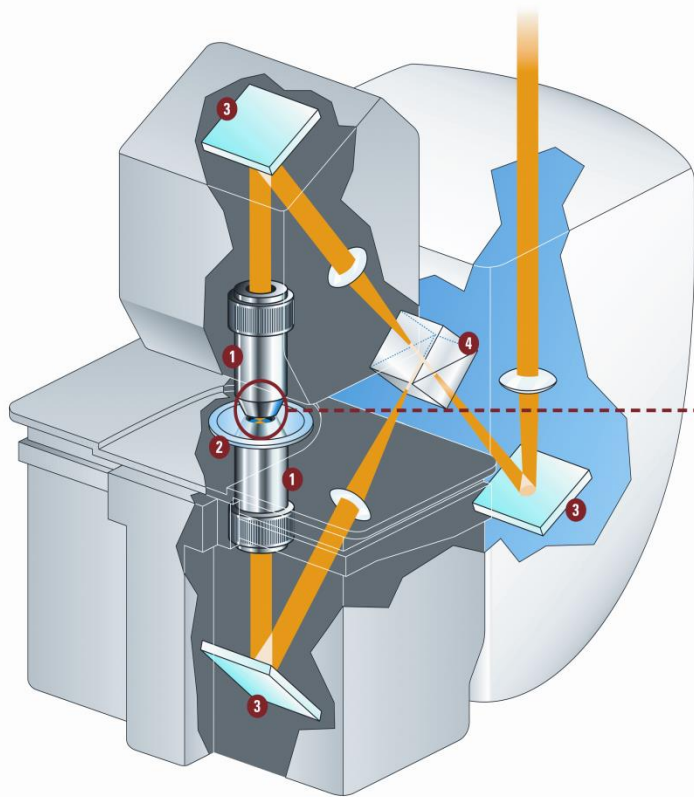


Intensity profiles

*Конфокальная микроскопия по сравнению с
4Pi: функция рассеяния точки*

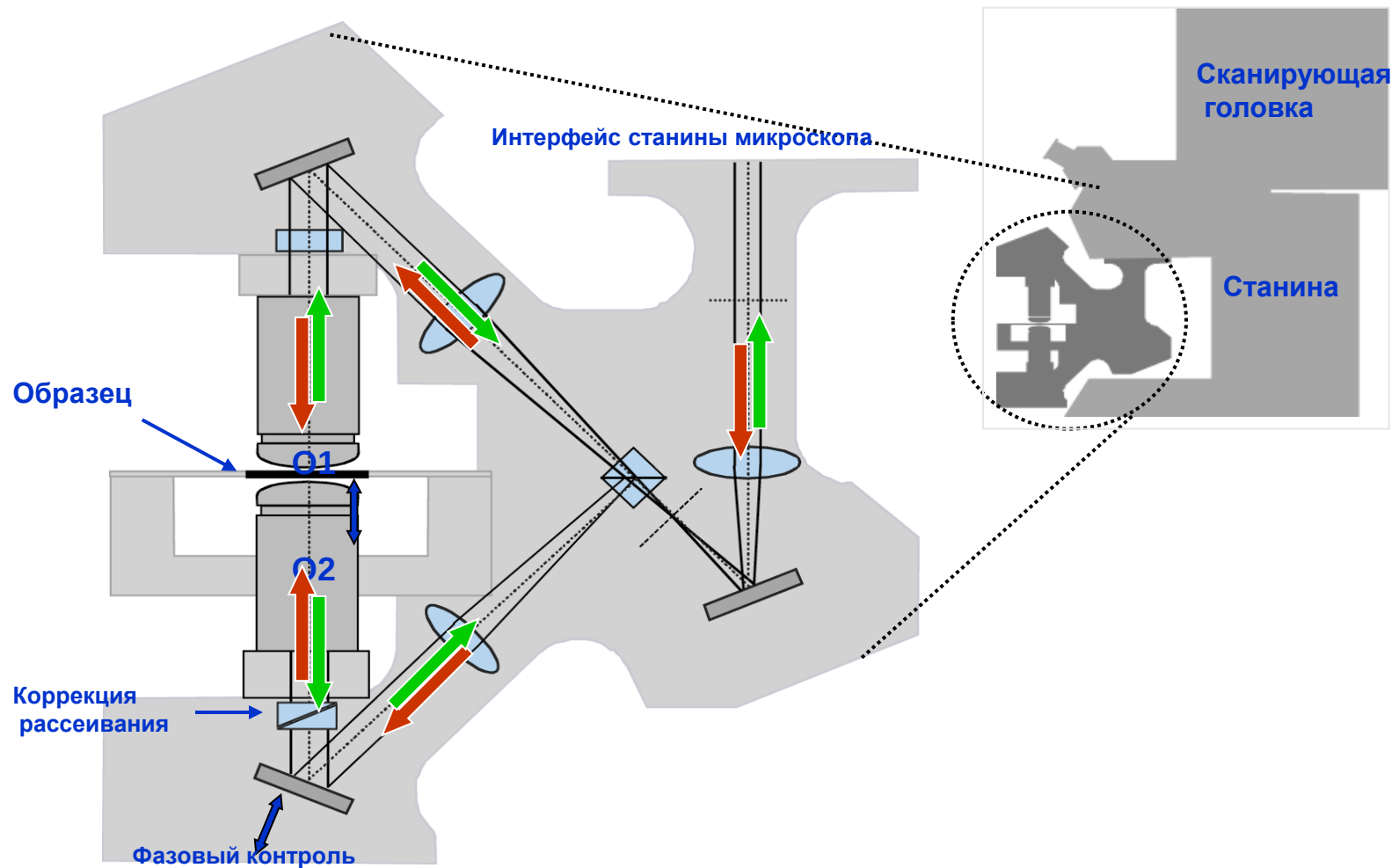


4 рі настройка



- Освещение и получение изображения с обеих сторон, фазовая интерференция и интерференция с коррекцией волнового фронта
- Конфокальная/мультифотонная система для захвата изображения с высокой чувствительностью
Детекторы с лавинным диодом
- осевая разрешающая способность 110 нм @
Длина волны освещения 750 нм

Компактный 4Pi модуль

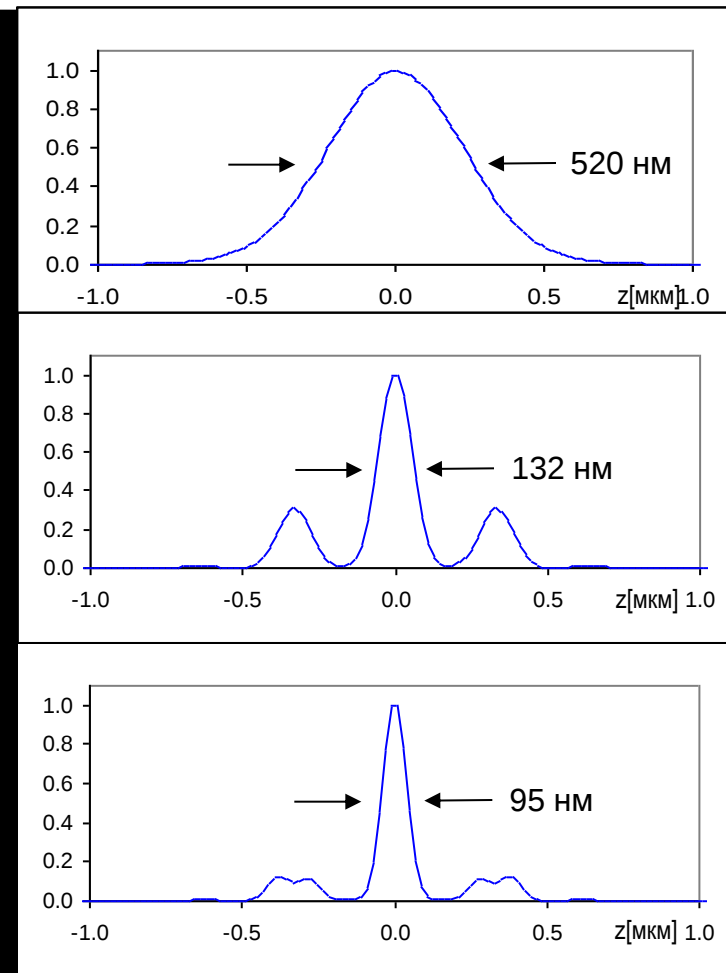
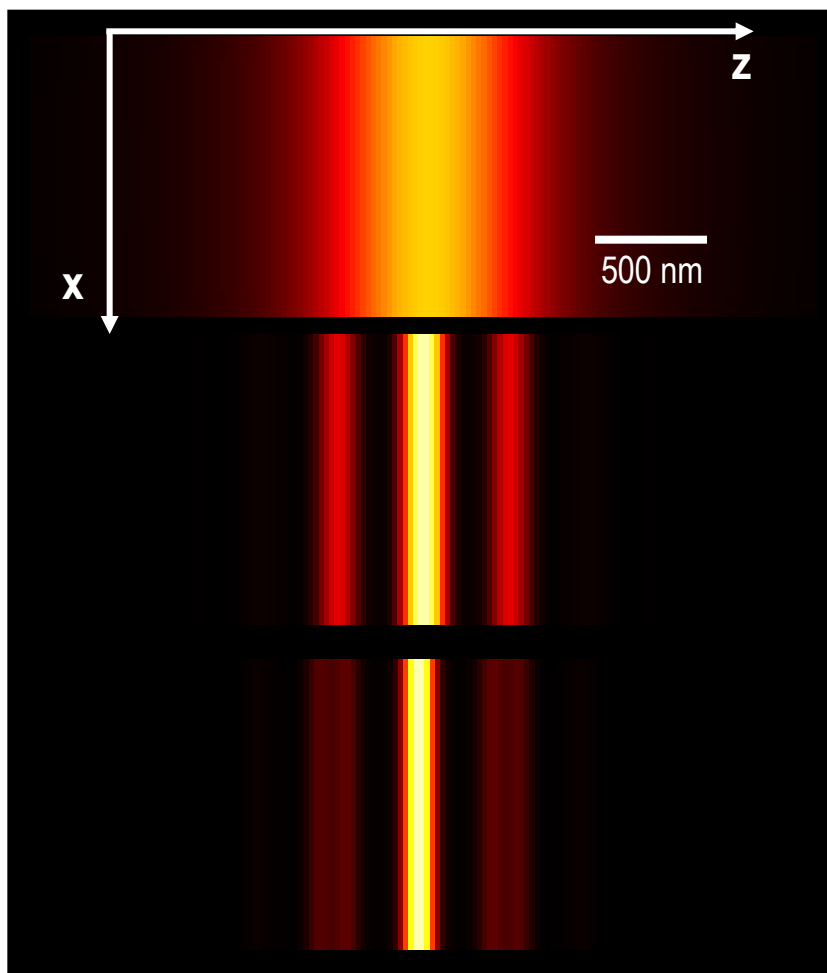


Компактный 4Pi- (тип С)

***Разрешающая способность: Теоретическая
разрешающая способность по Z оси тонкой плёнки***

2-фотон / 840 нм
1.35NA масляная иммерсия

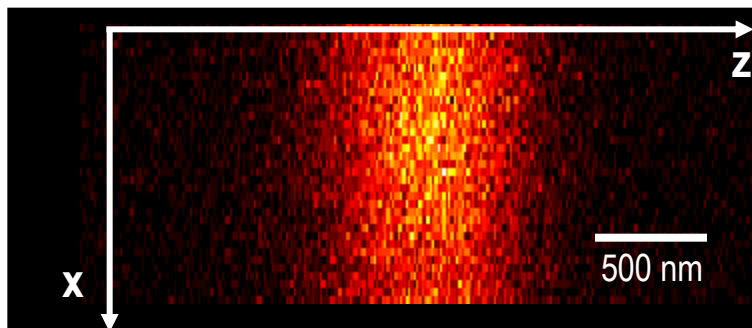
Конфо-
кальная
микроско-
пия



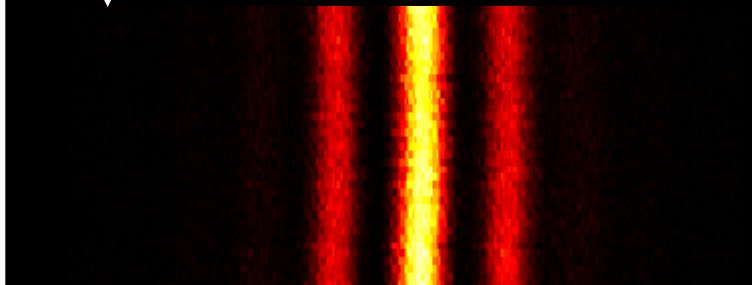
*Экспериментальная разрешающая способность по z оси в
флуоресцентном слое, предоставляемая
Leica TCS 4PI*

2-фотон / 840 нм
1.35NA масляная иммерсия

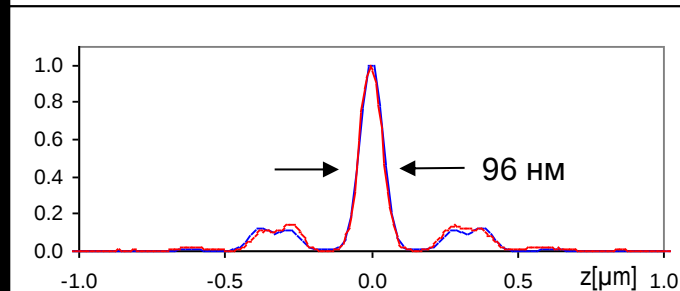
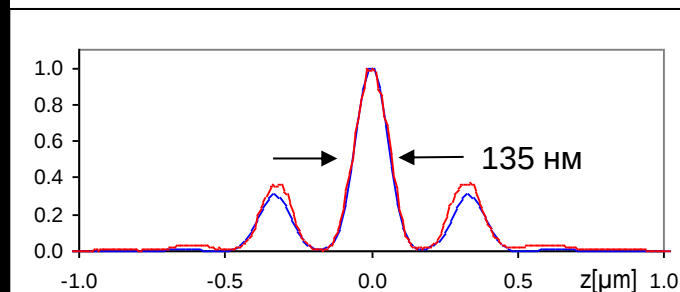
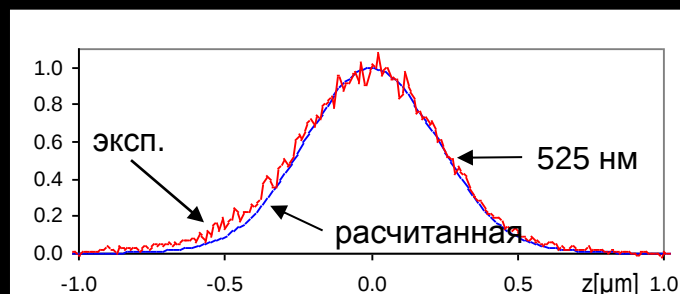
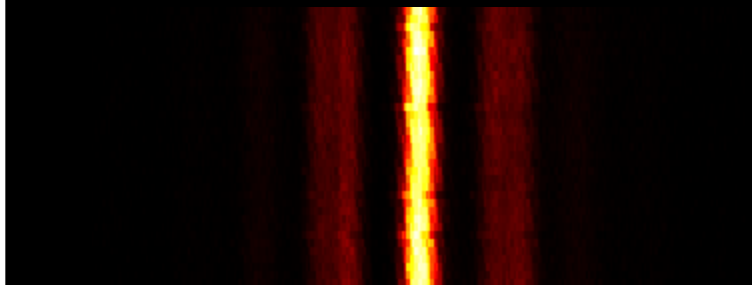
Конфо-
кальная
микроско-
пия



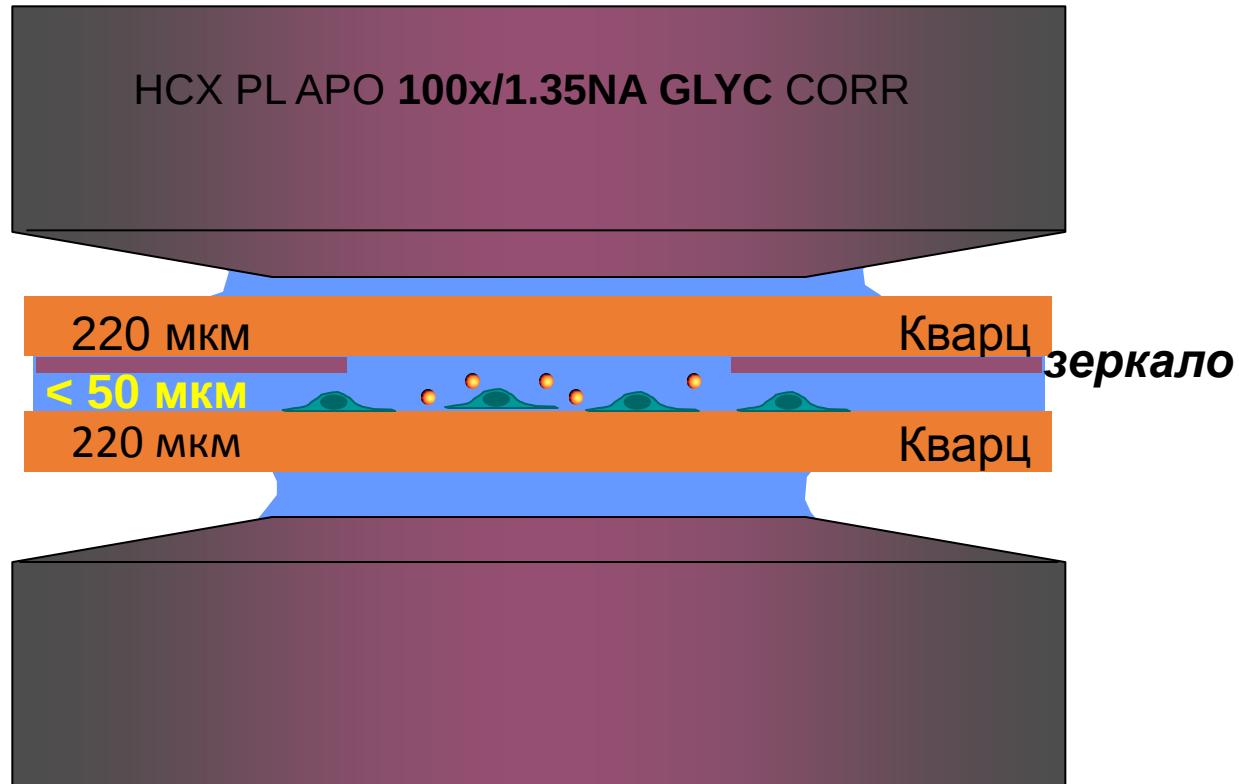
4 Pi (A)



4 Pi (C)



4Pi геометрия образца



Пример использования: E. Coli, бактерия

**Изображение,
полученное на
конфокальном
микроскопе**

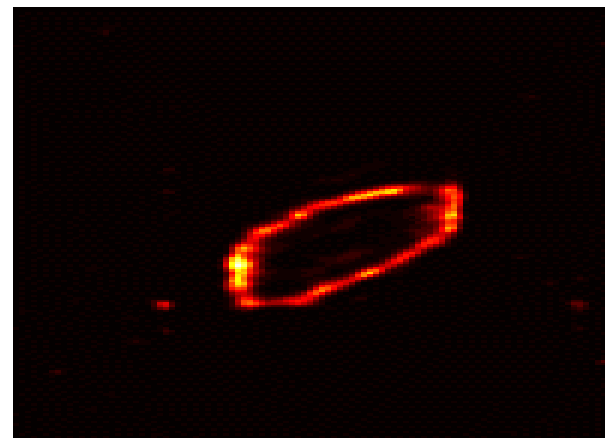
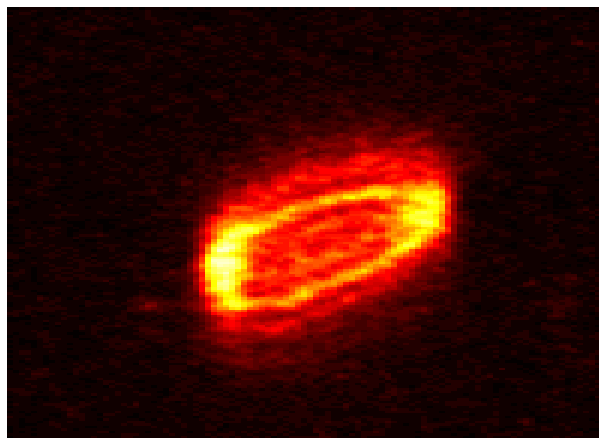
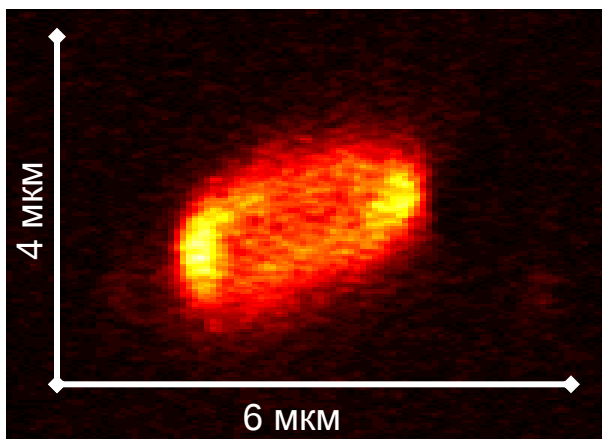
Объектив: 100x 1.35 NA
Глицерин
Возбуждение: 488 нм
Выявление метки: 650 нм –
700 нм

4Pi тип С

Объектив: 100x 1.35 NA
Глицерин
Возбуждение: 488 нм
Выявление метки: 650 нм –
700 нм

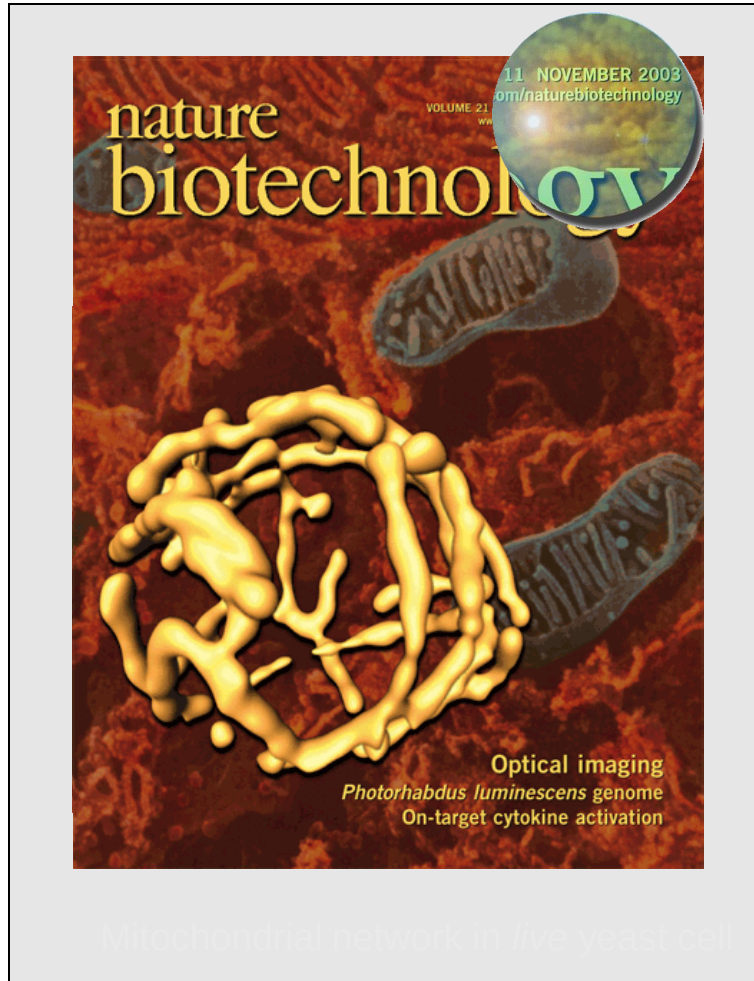
4Pi тип С

С деконволюцией



Escherichia coli

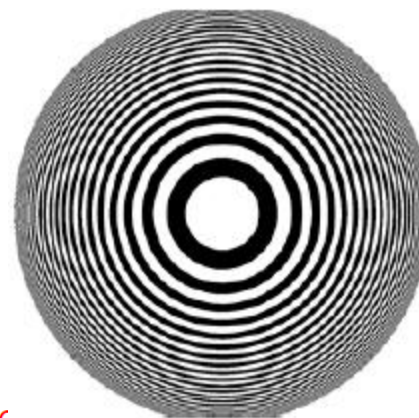
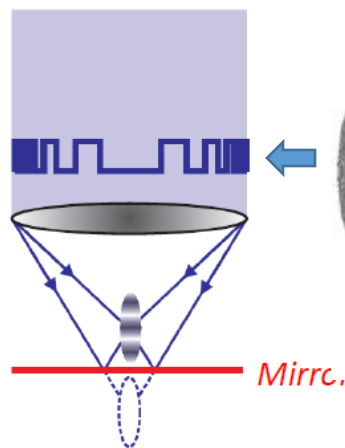
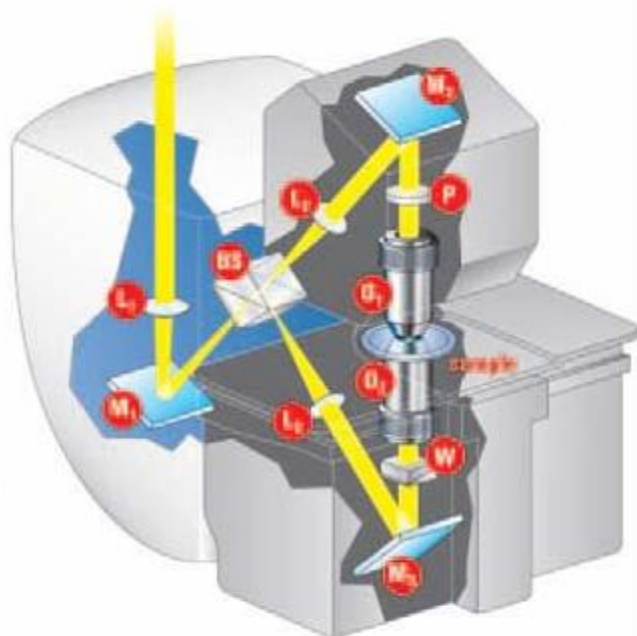
*Титульный лист журнала
Nature Biotechnology (Hell et al, 2003)*



Трёхмерное изображение
митохондриального комплекса
живой клетки дрожжей

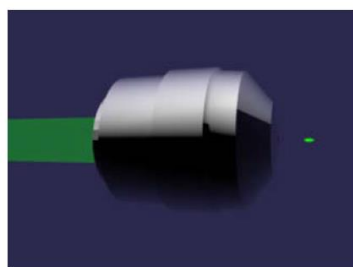
Наложенное на цветную сканированную
электронную микрофотографию
митохондрии и шероховатого
эндоплазматического ретикулума

Микроскопия 4Pi с одним объективом



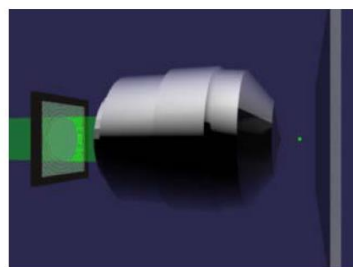
SLM (Spatial Light Modulator)

Standard confocal microscopy



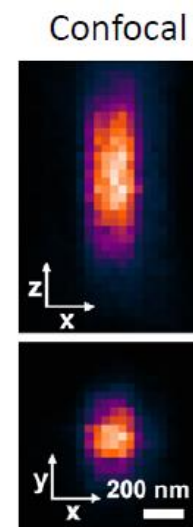
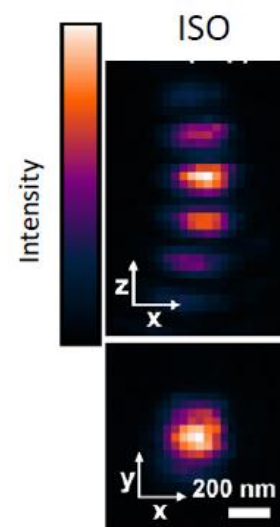
Objective lens

ISO microscopy



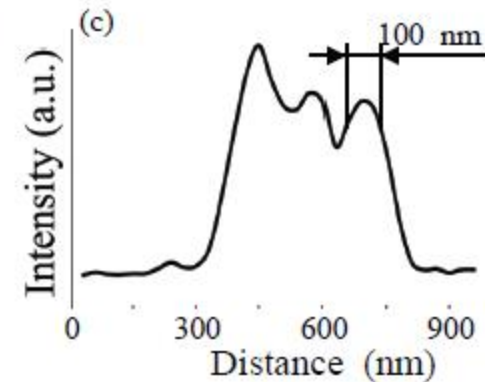
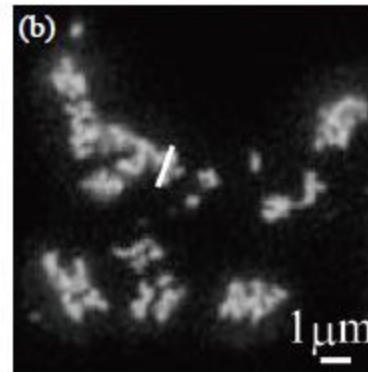
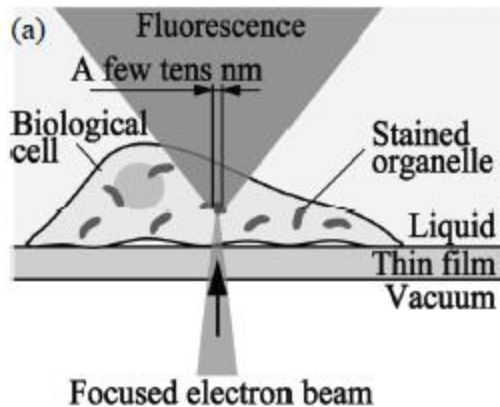
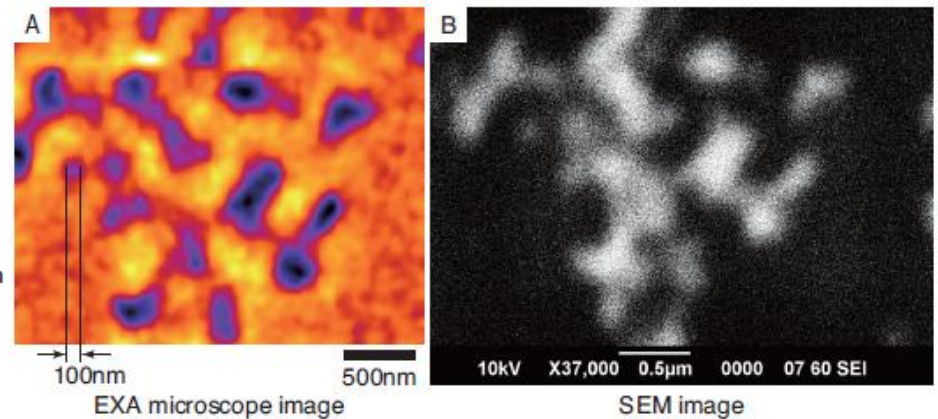
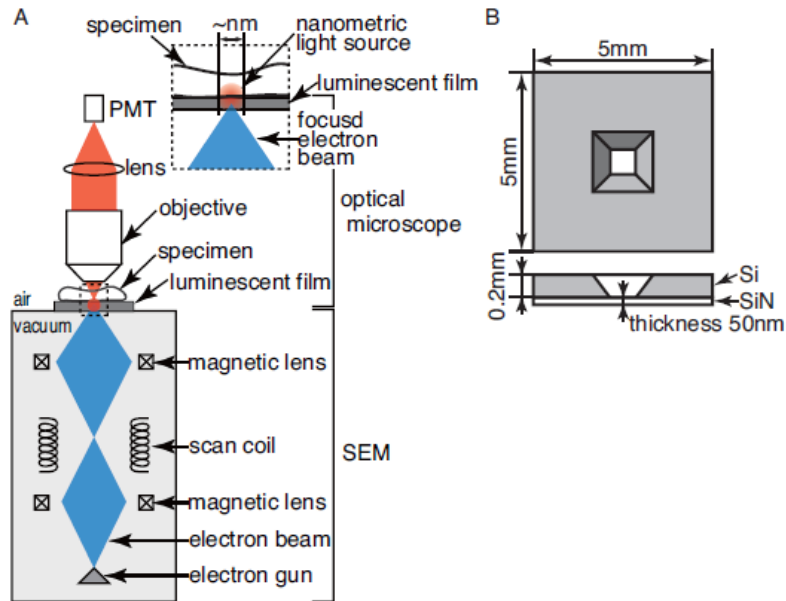
Spatial Light Modulator

Mirror substrate



Fluorescent/Electron Microscopy

³CREST, Japan Science and Technology Agency, Japan

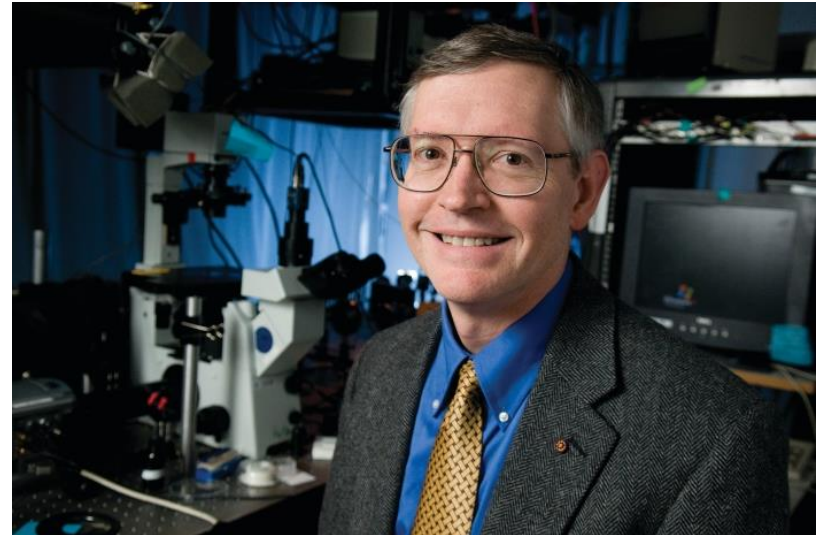


Eric Betzig, Stefan Hell, and W. E. Moerner Win 2014 Nobel Prize In Chemistry

Awards: Superresolution fluorescence microscopy has made it possible to capture nanoscale images of cells



Betzig
Credit:
Matt
Stanley/HHMI



Moerner
Credit:
L.A. Cicero

W. Moerner впервые в мире смог детектировать отдельную флуоресцирующую молекулу. Это было сделано в IBM's Almaden Research Center in San Jose, Calif. Затем, работая в University of California, San Diego Moerner открыл возможность включения и выключения по команде одного из вариантов GFP. При возбуждении светом с длиной волны 488-nm GFP выгорал и не мог быть задействован снова. Но Moerner обнаружил что облучение светом с длиной волны 405-nm реактивировало белок, и он мог снова возбуждаться светом с длиной волны 488-nm .

Eric Betzig заложил основы для микроскопии одиночных молекул, разработав механизм, позволяющий как бы «включать» и «выключать» флуоресцентное свечение каждой молекулы. Такие фотовключаемые белки стали основой для **PhotoActivated Localization Microscopy (PALM)**, разработанной в 2006 году Eric Betzig совместно с Harald Hess in. Оригинальная установка было собрана прямо в жилой комнате Harald Hess.



В ходе проведения PALM, фотоактивируемые белки одновременно включались и выключались в небольшом количестве. Было необходимо, чтобы индивидуальные молекулы находились друг от друга на достаточном расстоянии, чтобы их локализация могла быть точно определена. Имидж строился как результат обработки многократно повторяемых циклов регистрации сигнала небольшого числа отдельных молекул флуорофора. Сходные методы были также разработаны в 2006 году Xiaowei Zhuang в Harvard University (stochastic optical reconstruction microscopy, or STORM) и Samuel T. Hess of в University of Maine (fluorescence PALM, or fPALM).

Single-Molecule Superresolution Basic Microscope Configuration

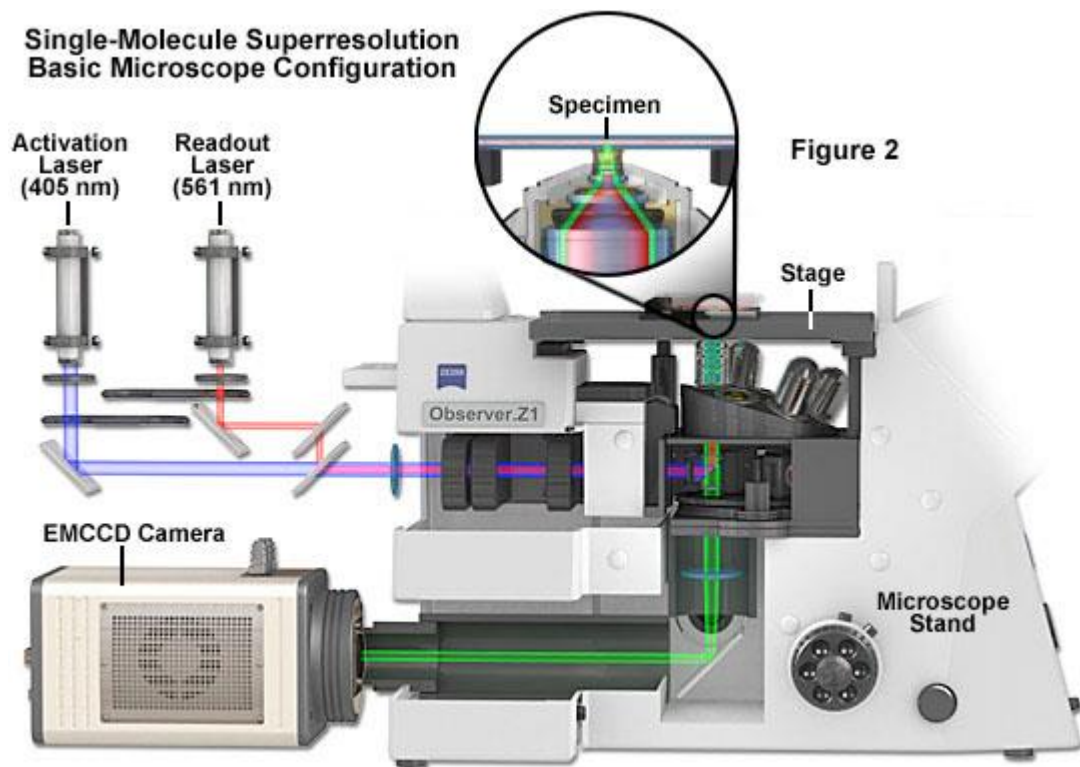


Figure 2

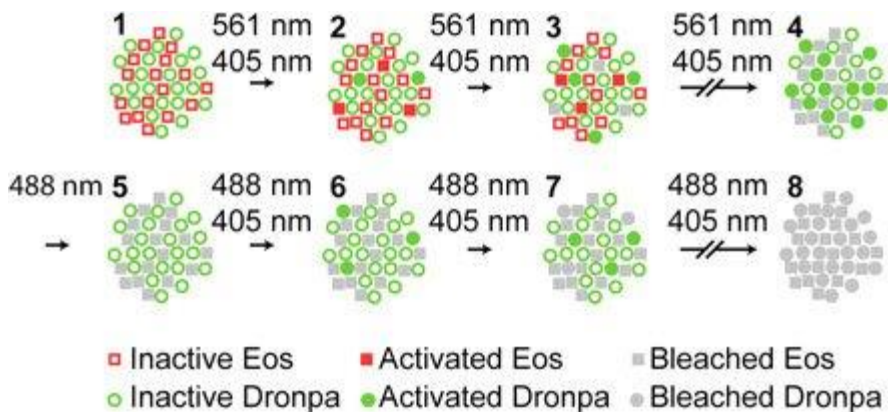
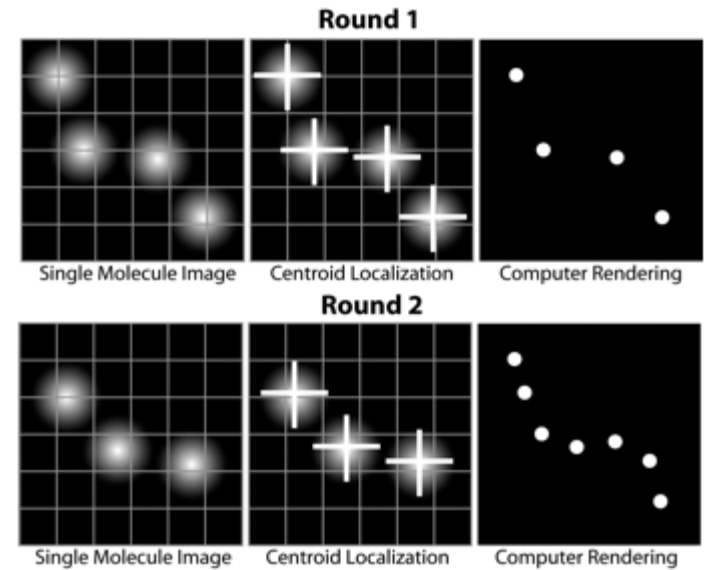
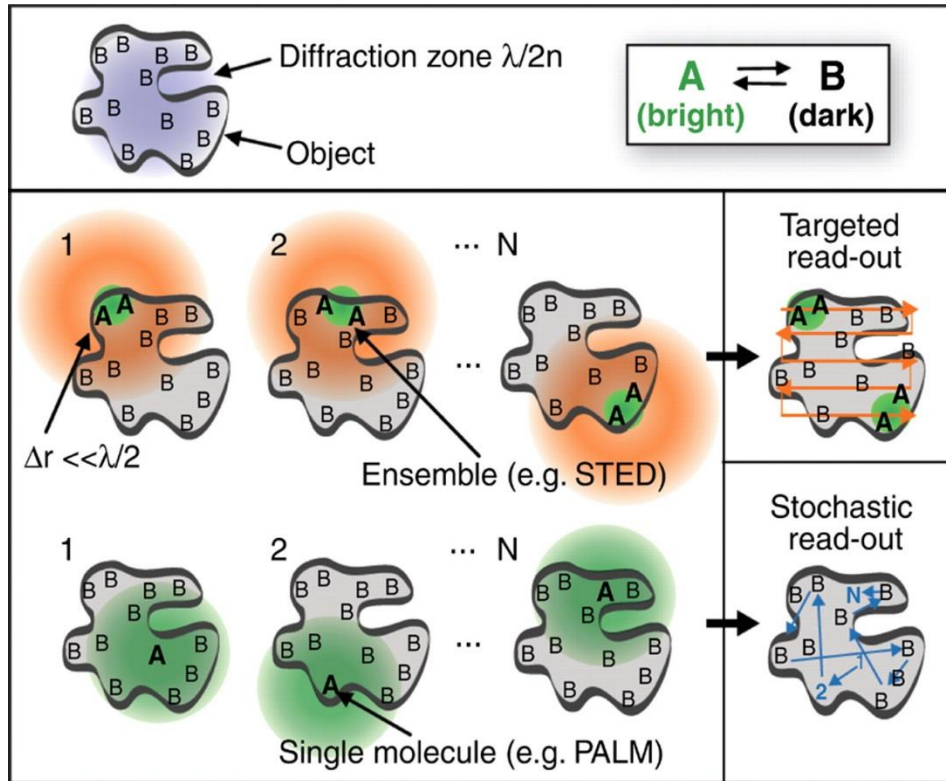
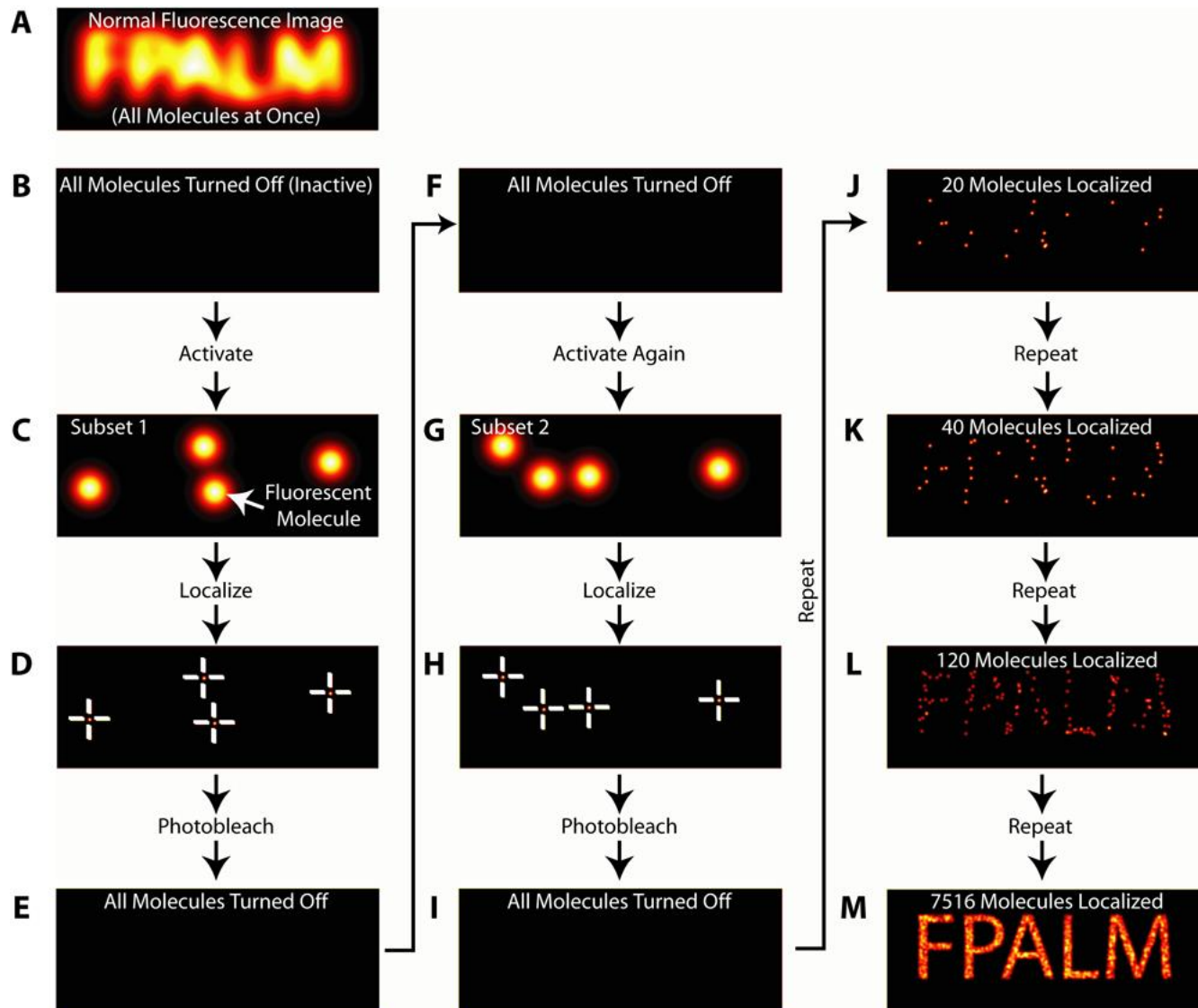


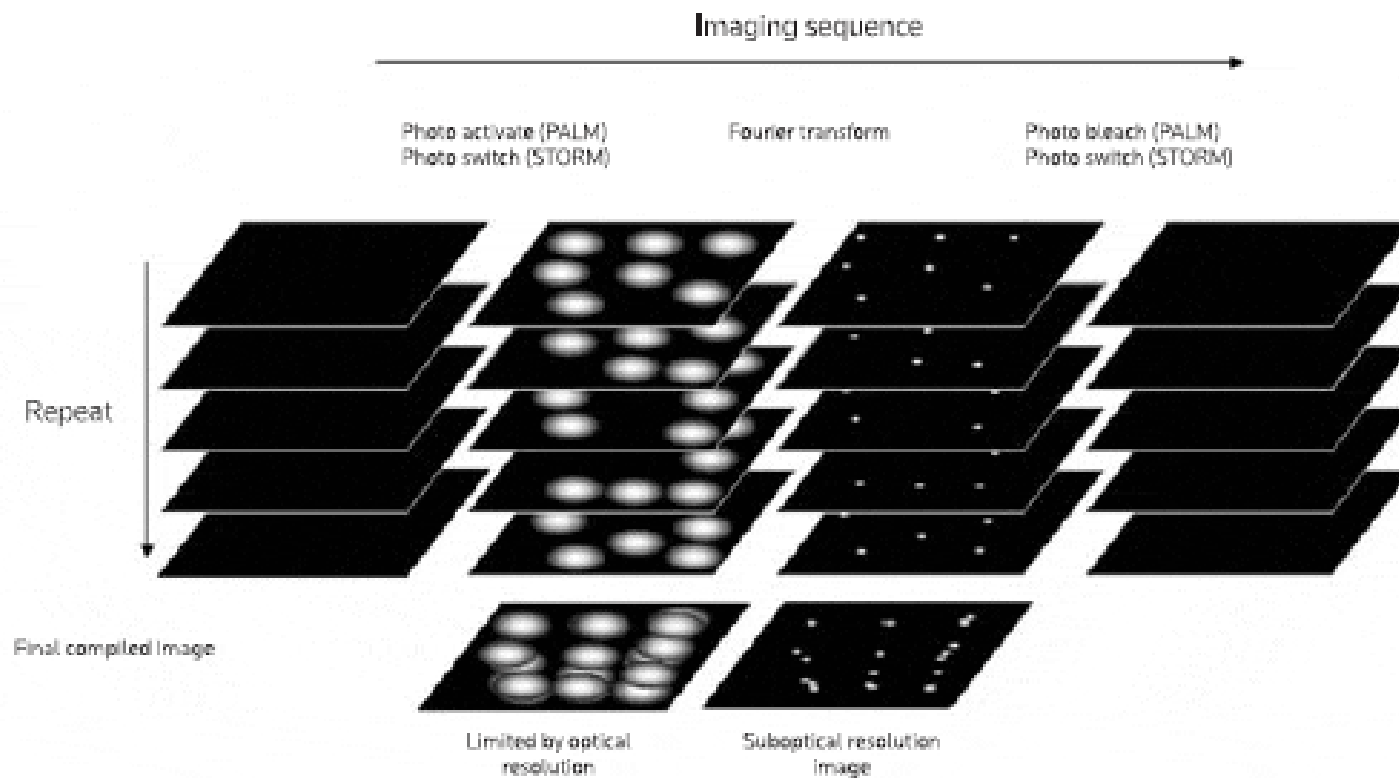
Fig. 2. Targeted versus stochastic time-sequential readout of fluorophore markers of a nanostructured object within the diffraction zone whose lower bound is given by $\lambda/2n$.



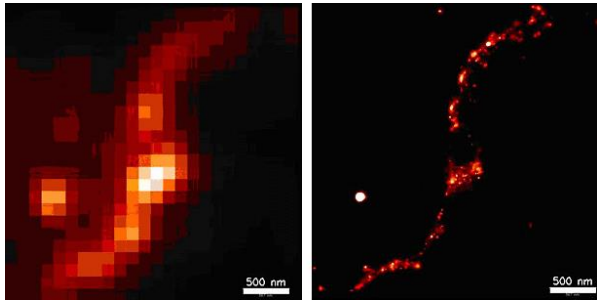
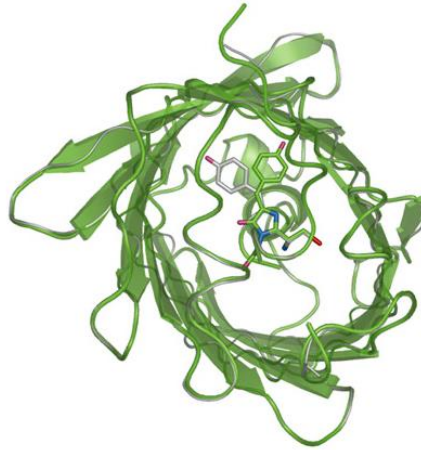
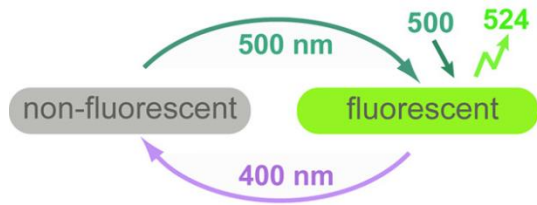
S W Hell Science 2007;316:1153-1158



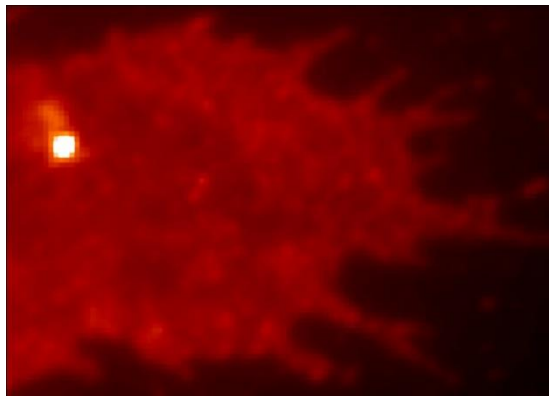




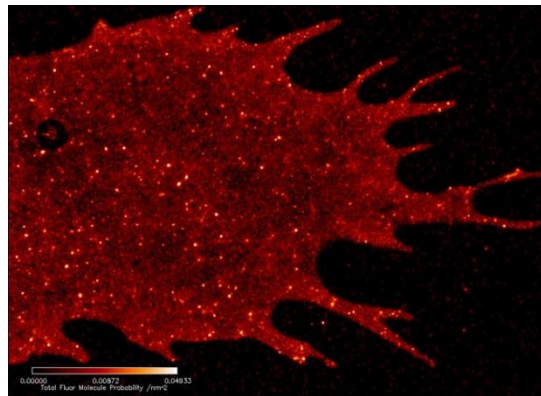
Photoswitchable proteins and PALM (S. Jakobs; H. Hess)



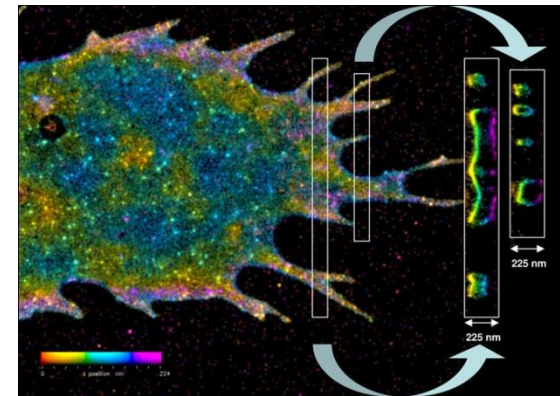
Fluo



PALM



iPALM
interferometric photoactivated localization
microscopy



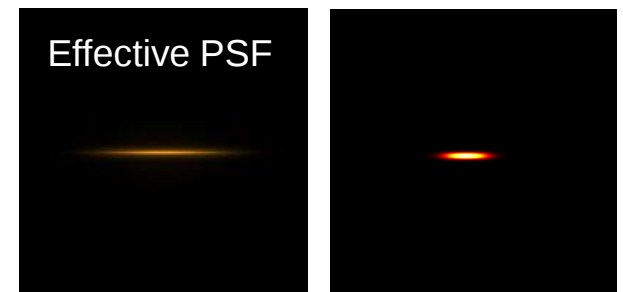
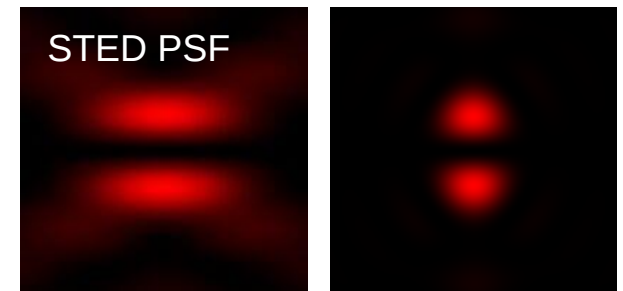
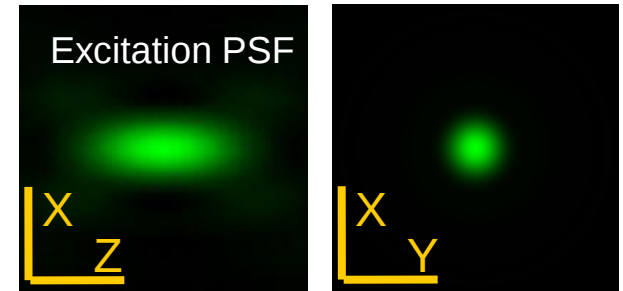
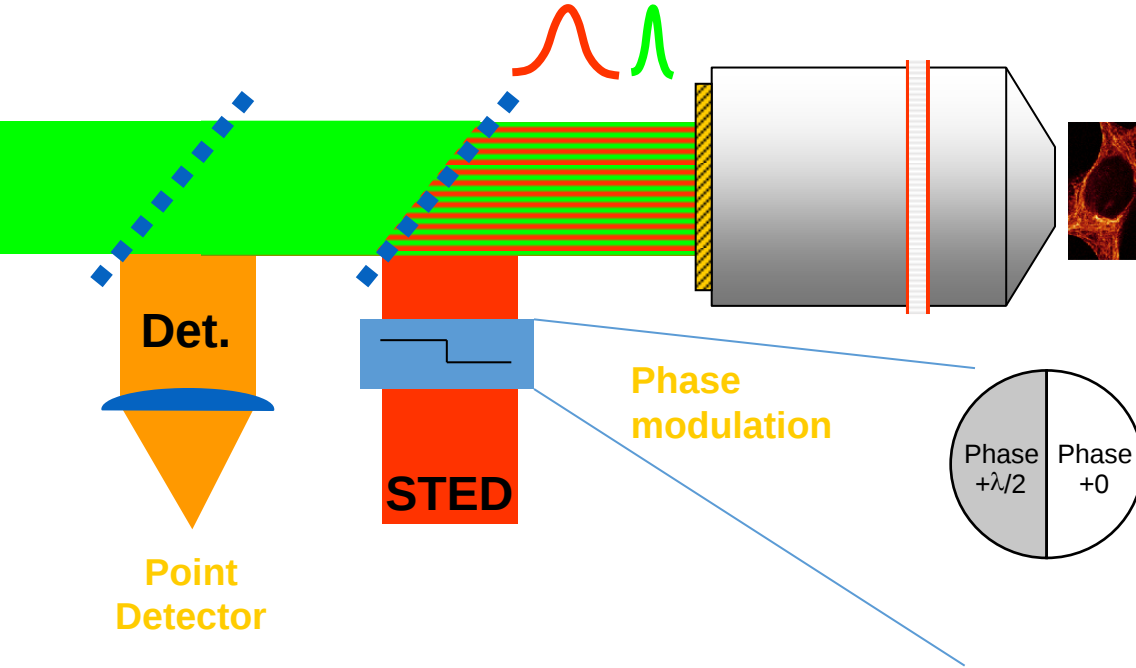
Hell

Credit: Max Planck
Institute for Biophysical
Chemistry



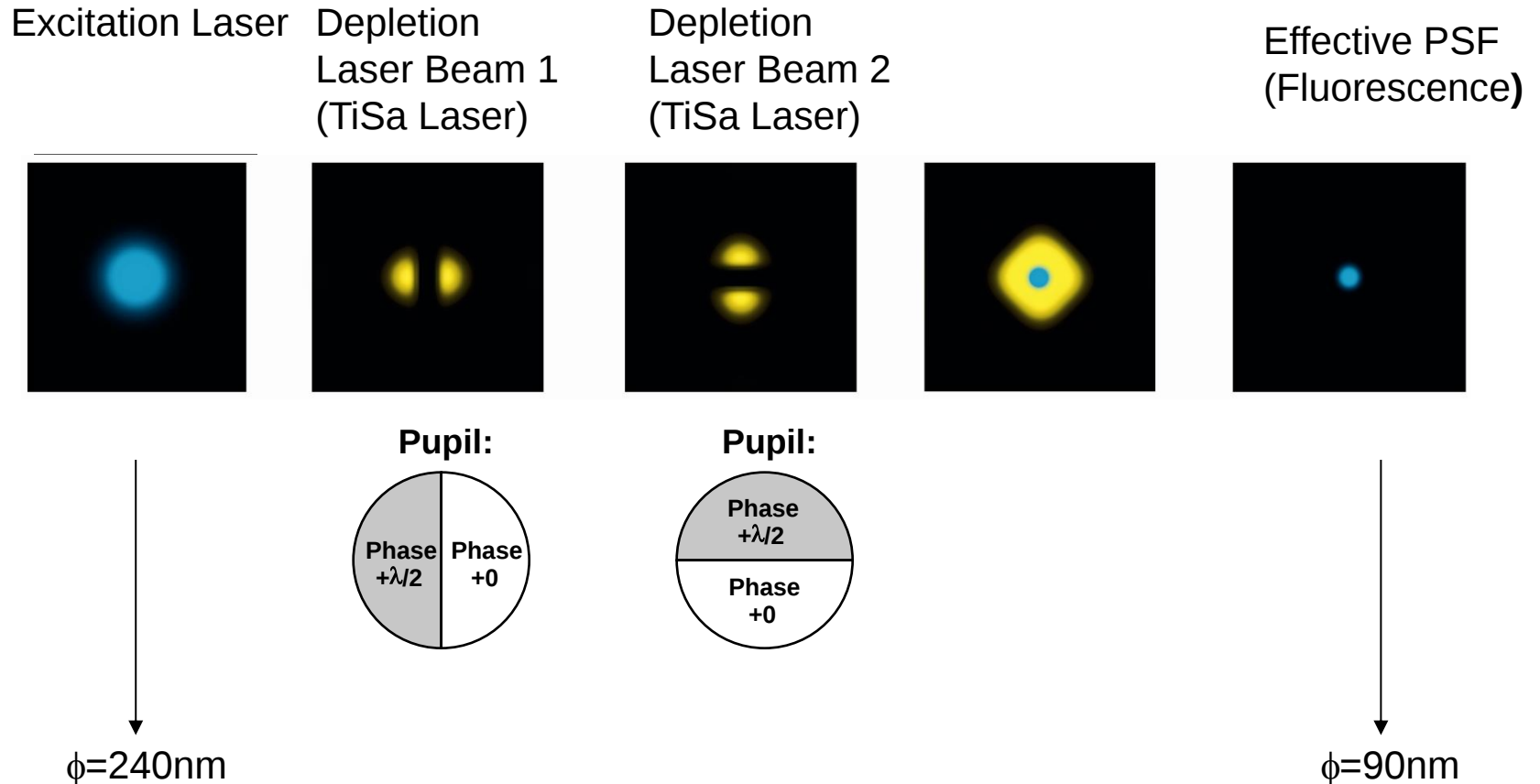
Stefan Hell. Разработанный им метод—**ST**imulated **E**mission **D**epletion (STED) microscopy — имеет принципиальные отличия. При использовании STED microscopy один лазерный луч стимулирует флуоресценцию флуорохрома, тогда как другой перекрывающий его лазерный луч с тороидальным сечением выключает флуоресценции везде за исключением наноразмерного объема, позволяя при сканировании образца построить изображение с наноразмерным разрешением. Этот метод свехразрешающей флуоресцентной спектроскопии улучшает латеральное разрешение, но практически не меняет разрешение по оси Z.

STED: Lateral resolution enhancement



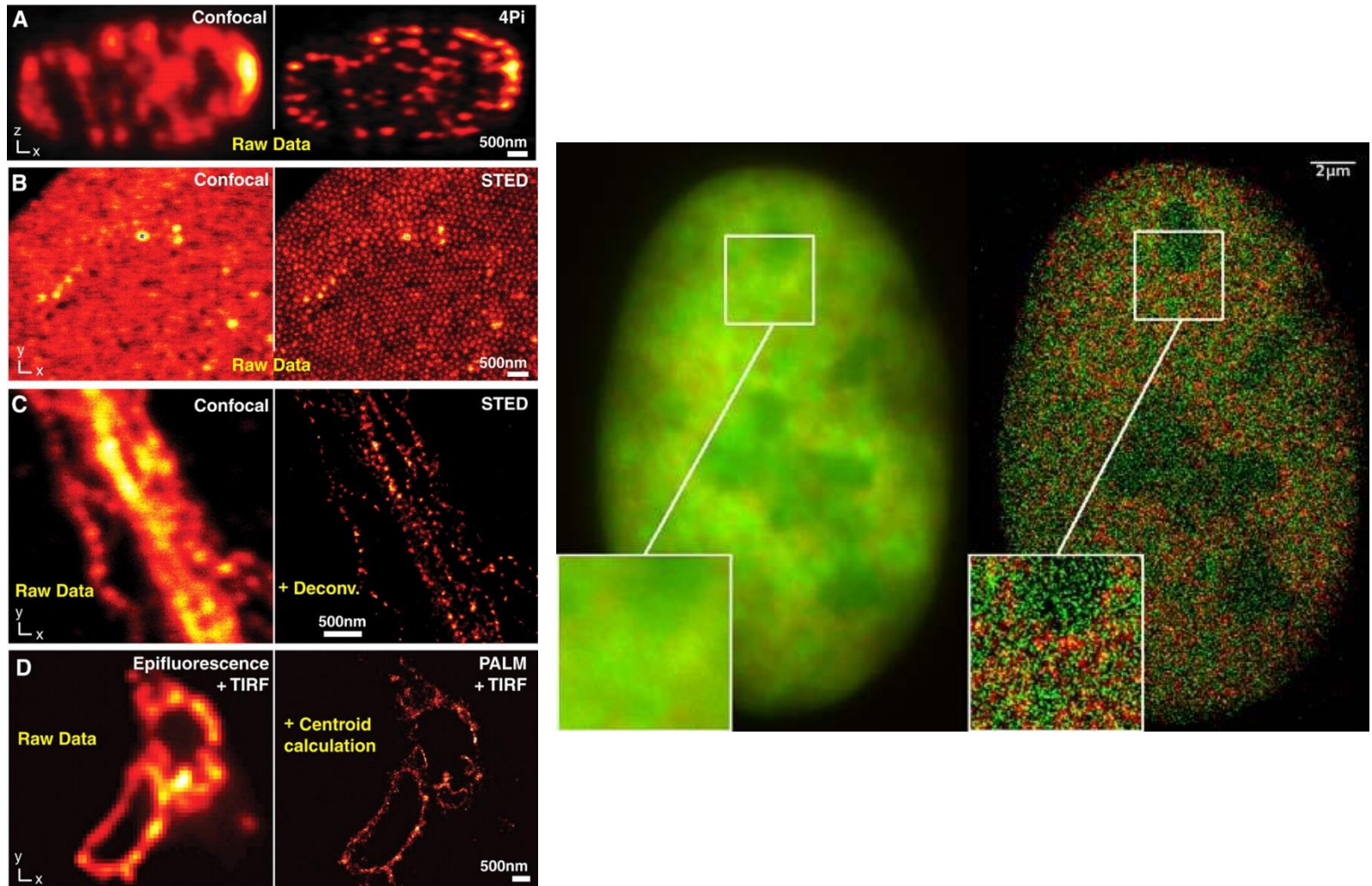
Stimulated Emission Depletion – STED microscopy

Beam geometry (II): the full STED donut is created by superimposition of two half donuts from two beams



- Blue: Excitation spot
- Yellow: Depletion beam

Fig. 4. Side-by-side comparisons.

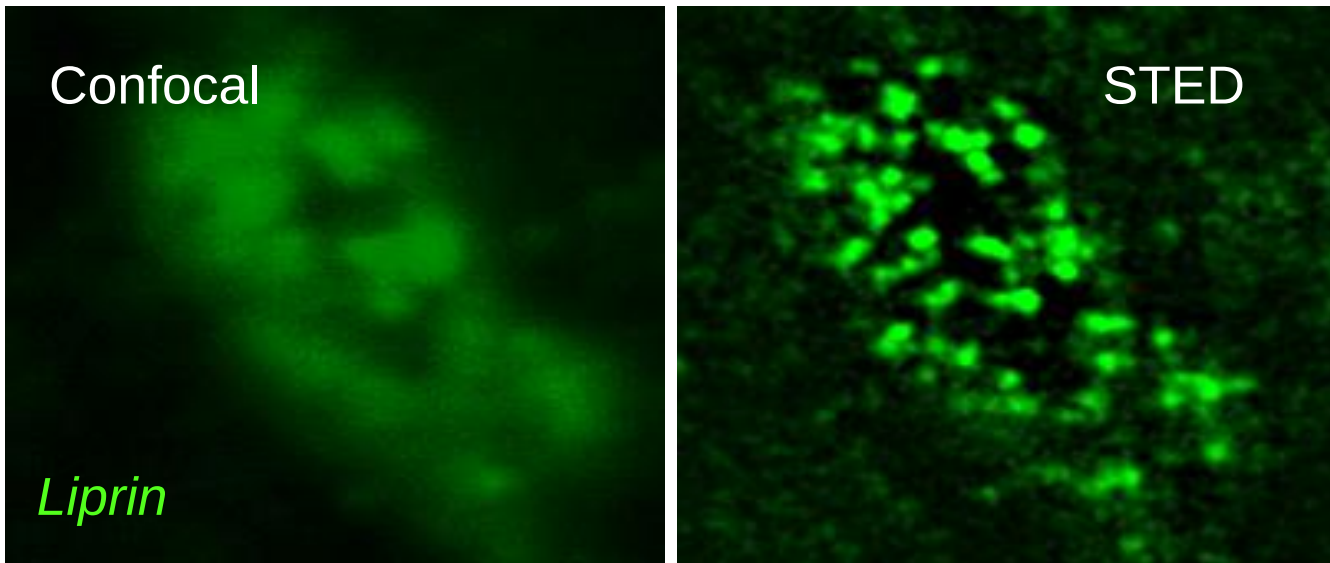


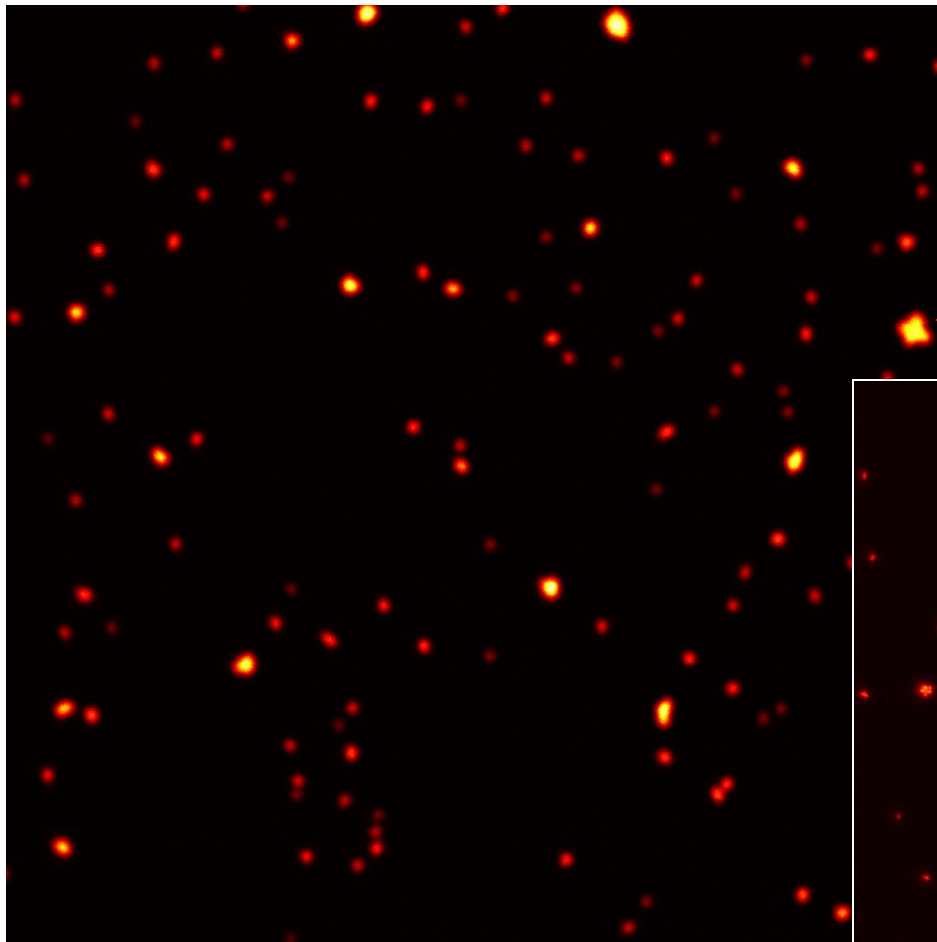
S W Hell Science 2007;316:1153-1158

Confocal

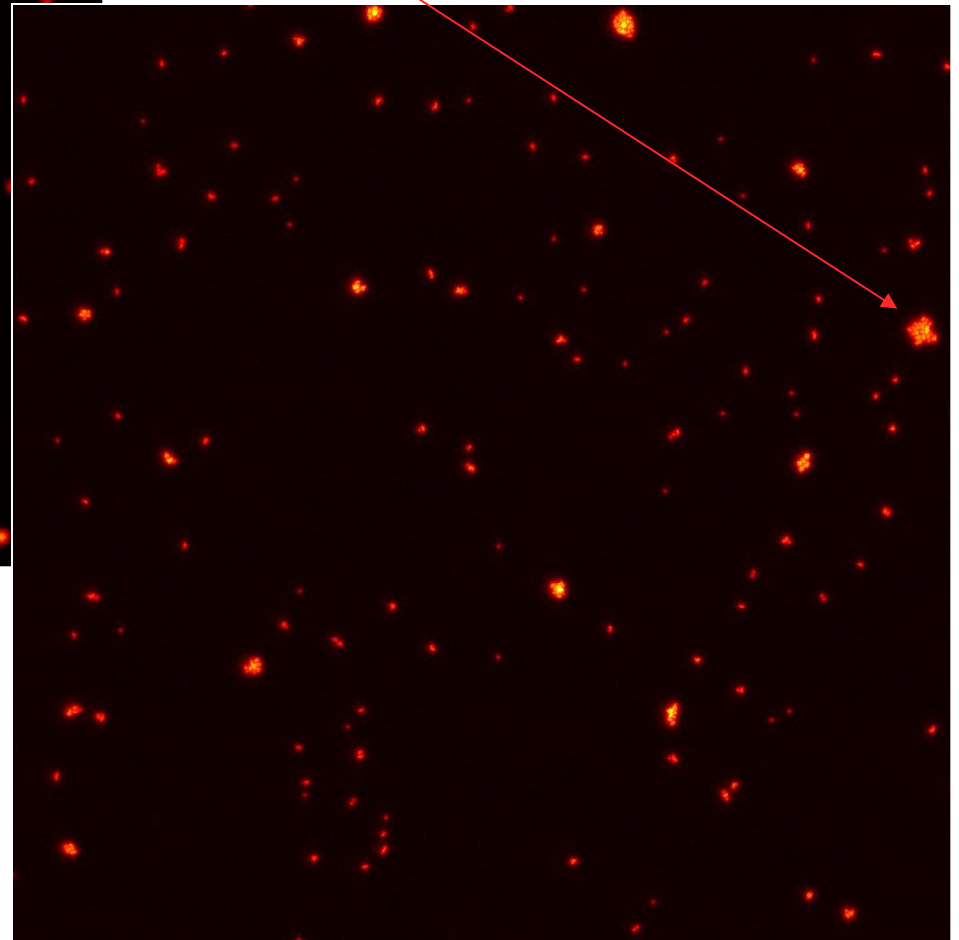
Liprin

STED



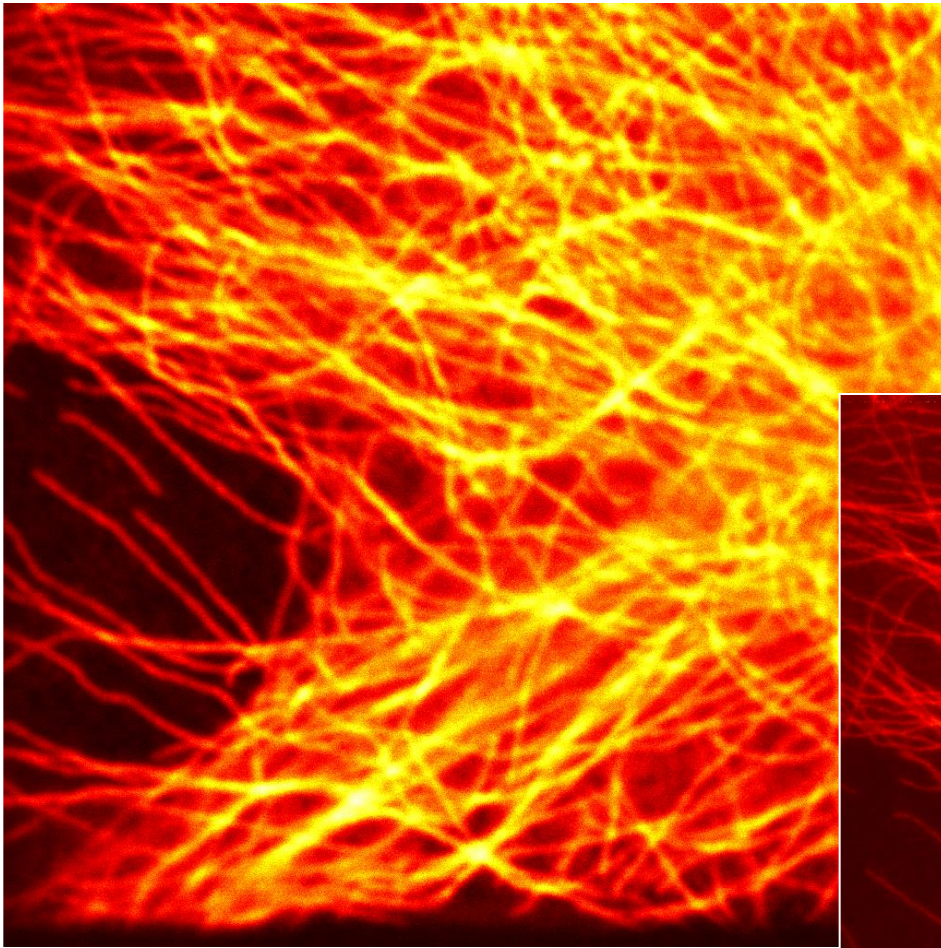


Confocal



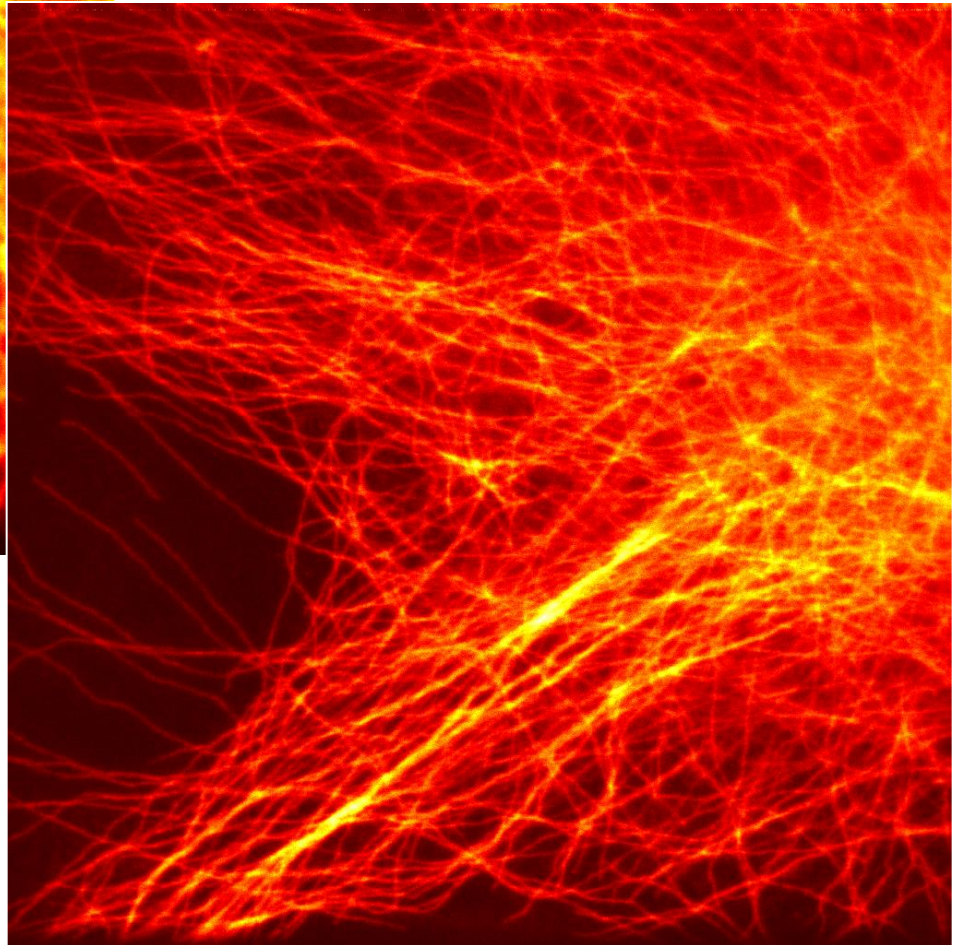
STED

Fluorescent Glas Nanoparticles

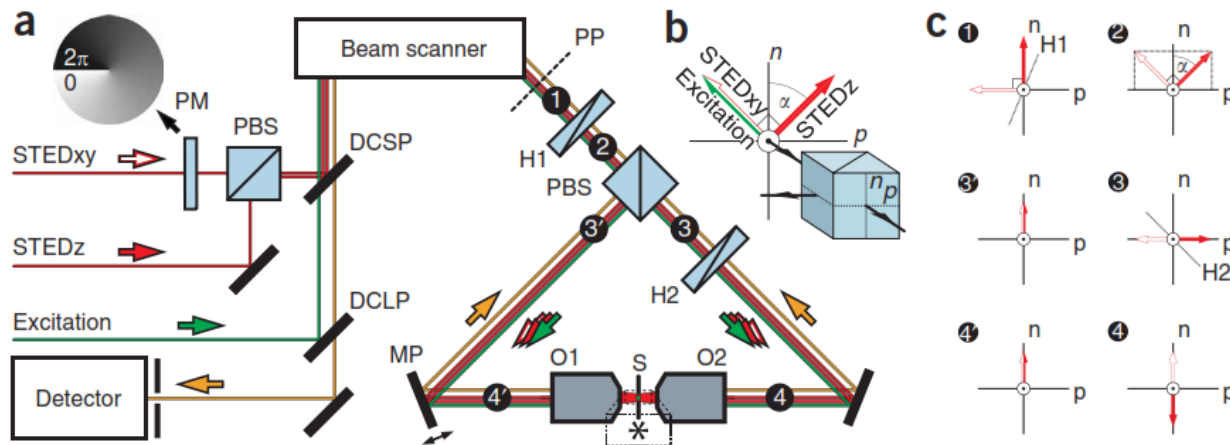


Confocal

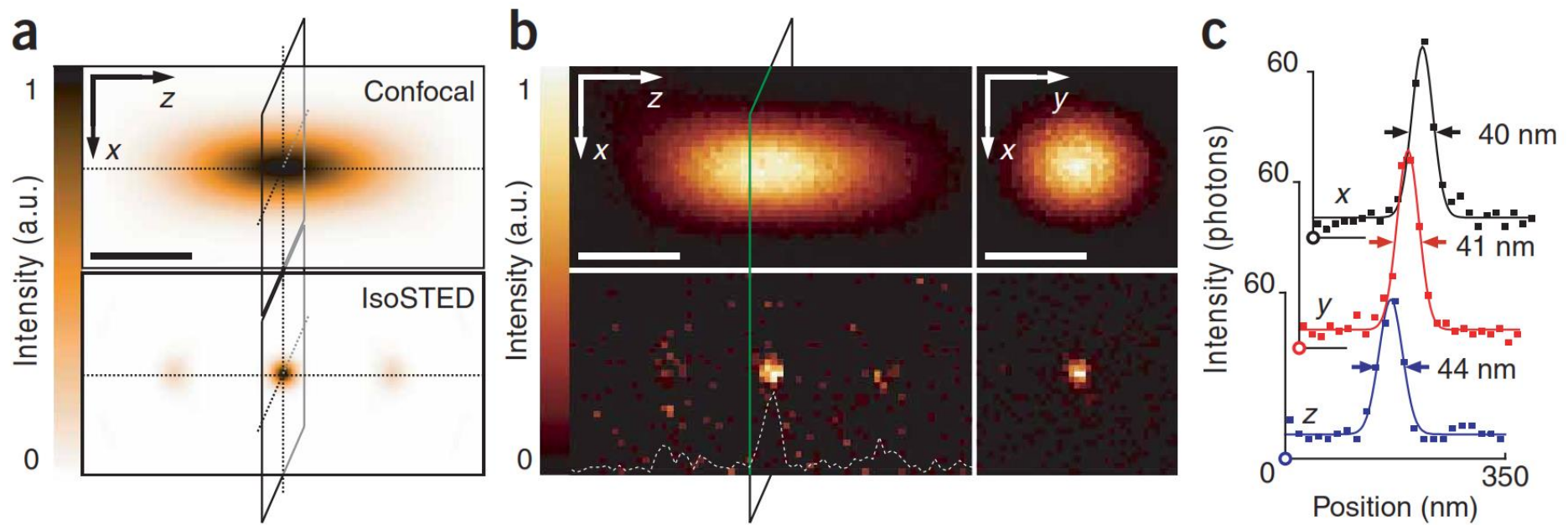
STED



Microtubular Network in Ptk2 Cell



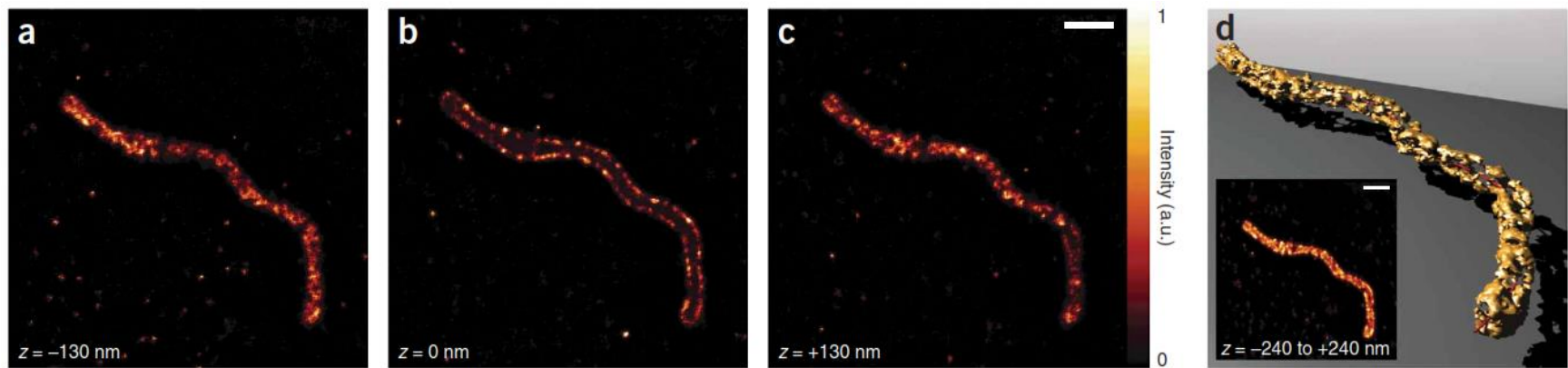
Fluorescence microscopy setup with isotropic 3D focal spot. (a) Beams for excitation, STEDxy (lateral) and STEDz (axial) are combined using a dichroic mirror (DCSP) and then fed through a beam scanner into a 4Pi unit with two opposing objective lenses (O1 and O2; HCX PL APO 100, 1.46 NA OIL CORR; Leica Microsystems). The fluorescence light (orange) collected by both lenses backpropagates along the same optical path to the detector, passing through the DCSP and a second dichroic mirror (DCLP). The pivot plane (PP) of all scanning beams is conjugated to the entrance pupils of the objective lenses. The incoming beams are divided by a polarizing beam-splitter (PBS) and coherently superimposed at both lenses' common focal plane inside the sample (S). A piezodriven mirror (MP) controls the difference in pathlength between both cavity arms and thereby the 4Pi phases of all beams. The polarization state of STEDxy and STEDz is adjusted by two half-wave retarder plates (H1 and H2). Numbers in black circles indicate points for which these polarization states are displayed in c. (b) The excitation beam and the STED beams for lateral (STEDxy, imprinted with a circular phase ramp (PM)) and axial (STEDz) fluorescent spot compression are polarized under a j 451 with respect to the perpendicular direction (n) to the splitting plane (p) of the polarizing beam-splitter. STEDxy and STEDz are polarized orthogonal to each other. (c) Polarization state of STEDxy (outlined) and STEDz (solid) at indicated points in the setup. By tuning the orientation of the half wave retarder plate H1 and thereby α , the branching ratio between both arms is adjusted for matching intensities of the partial beams (position 1 and 2). Right behind the polarizing beam-splitter, the partial beams of STEDxy and STEDz are mutually orthogonally polarized (positions 3 and 3'). Parallel polarization for both beam pairs is rectified by the second half wave retarder plate H2 (positions 4 and 4'). Notably, the relative phase between the STEDxy and STEDz beam pairs now differs by π .



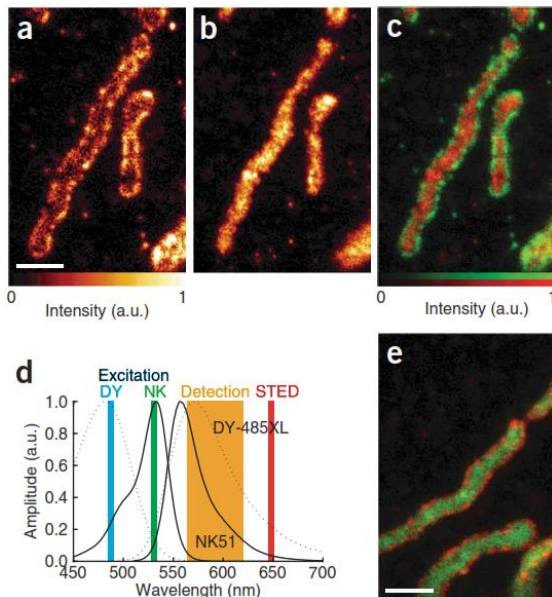
Isotropic effective focal spot (PSF) on the nanoscale.

- (a) Calculated PSF of a confocal fluorescence microscope and the corresponding spherical PSF of the isoSTED microscope at $I_m/I_s = 15$ (NA = 1.4; wavelength parameters).
- (b) Experimental counterpart to (a) as measured with a 21-nm-diameter fluorescence bead. The FWHM of the confocal setup (1.46 NA) is 165 nm in the lateral and 405 nm in the axial direction. Switching on the STED pattern shown leads to a largely spherical main focal fluorescence spot.
- (c) Gaussian fits through the lateral and axial profiles of the focal spot yield indicated FWHM, corresponding to an isotropic far-field optical 3D resolution of $\lambda/16$. Baselines are marked with colored circles.

Scale bars, 250 nm.



IsoSTED fluorescence microscopy dissects a mitochondrion by focusing light into the interior of a mammalian (Vero) cell; here the distribution of the protein Tom20 is imaged. **(a-c)** Optical sections through the bottom **(a)**, center **(b)** and top **(c)** planes of the mitochondrion reveal distinct Tom20 clusters. The x-y image through the center plane shows that the clusters are located at the rim of the organelle. The sections shown are part of a 3D stack of 62 x-y images, all equally spaced in the z dimension by 22 nm. The image data shown were obtained after deconvolution as described in Methods. **(d)** 3D reconstruction of the Tom20 distribution (the red filament is to guide the eye). Inset, sum of all x-y images from $z = -240$ nm to $z = +240$ nm. This mimics a nanoresolving (STED) microscope with standard confocal resolution along the z direction, showing that axial super-resolution is essential for unraveling the protein distribution in this sub-wavelength-sized organelle. Scale bars, 1 μ m.



Two-color isoSTED imaging of mitochondria in Vero cells. **(a,b)** Distribution of the outer membrane protein Tom20 labeled with the organic fluorophore DY-485XL **(a)** and of the NK51-labeled matrix protein mtHsp70 **(b)**. **(c)** Overlay of the two images showing Tom20 in green and mtHsp70 in red. **(d)** Excitation and absorption spectra for DY-485XL (dotted line) and NK51 (solid line). The two fluorophores are separated by subsequently exciting the sample at 488 nm (DY-485XL) and 532 nm (NK51). Both dyes are depleted by stimulated emission at 647 nm. **(e)** Reverse staining as a control (Tom20 with NK51 and Hsp70 with DY-485XL) yields similar results as the initial recording **(c)**. Scale bars, 1 μ m.

С момента разработки PALM, STORM, STED и fPALM были разработаны варианты 3D-микроскопии с их использованием.

Методы уже были использованы в конкретных исследованиях:

Stefan Hell использовал STED при изучении живых нейронов

William Moerner получил 3D-изображения живых бактериальных клеток

и т.д.

Eric Betzig микроскопия раковой клетки, движение нематоды.

http://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=vNWQI6IQULc

http://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=h6BfWJnW8Z0

3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy

Liang Gao, Lin Shao, Bi-Chang Chen & **Eric Betzig**

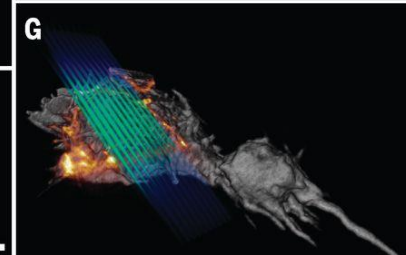
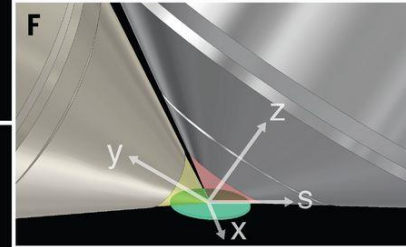
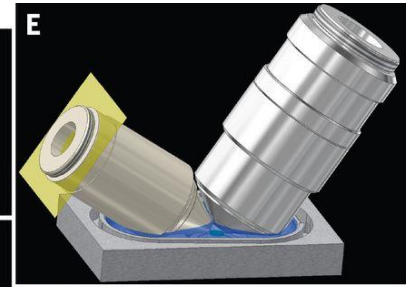
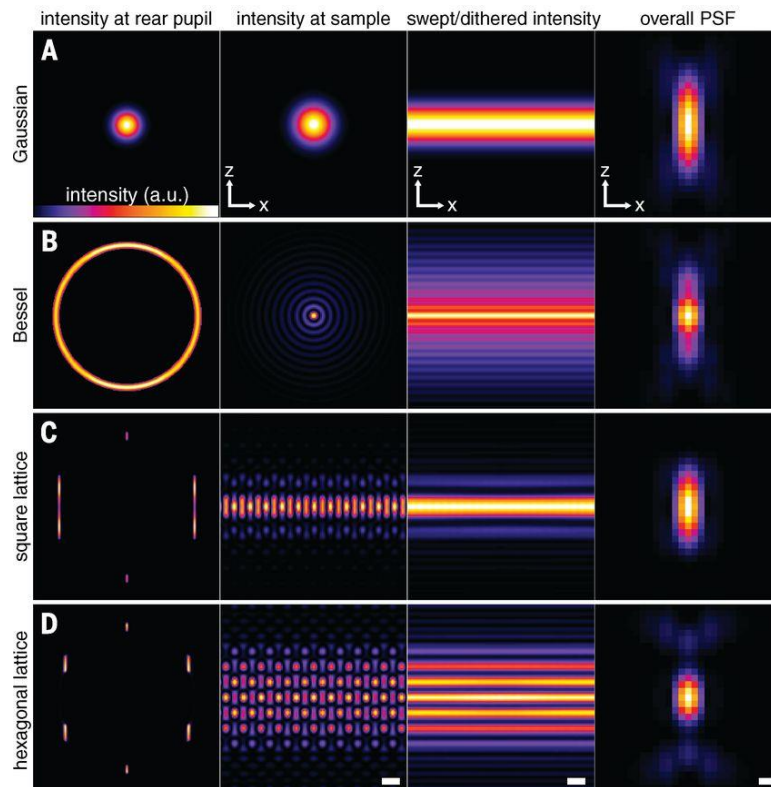
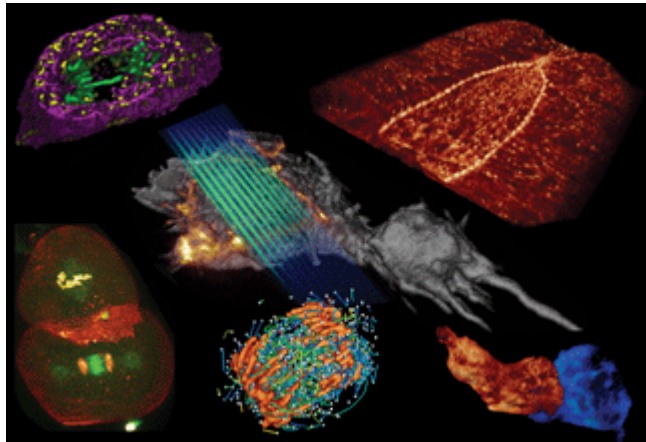
Published online 10 April 2014;

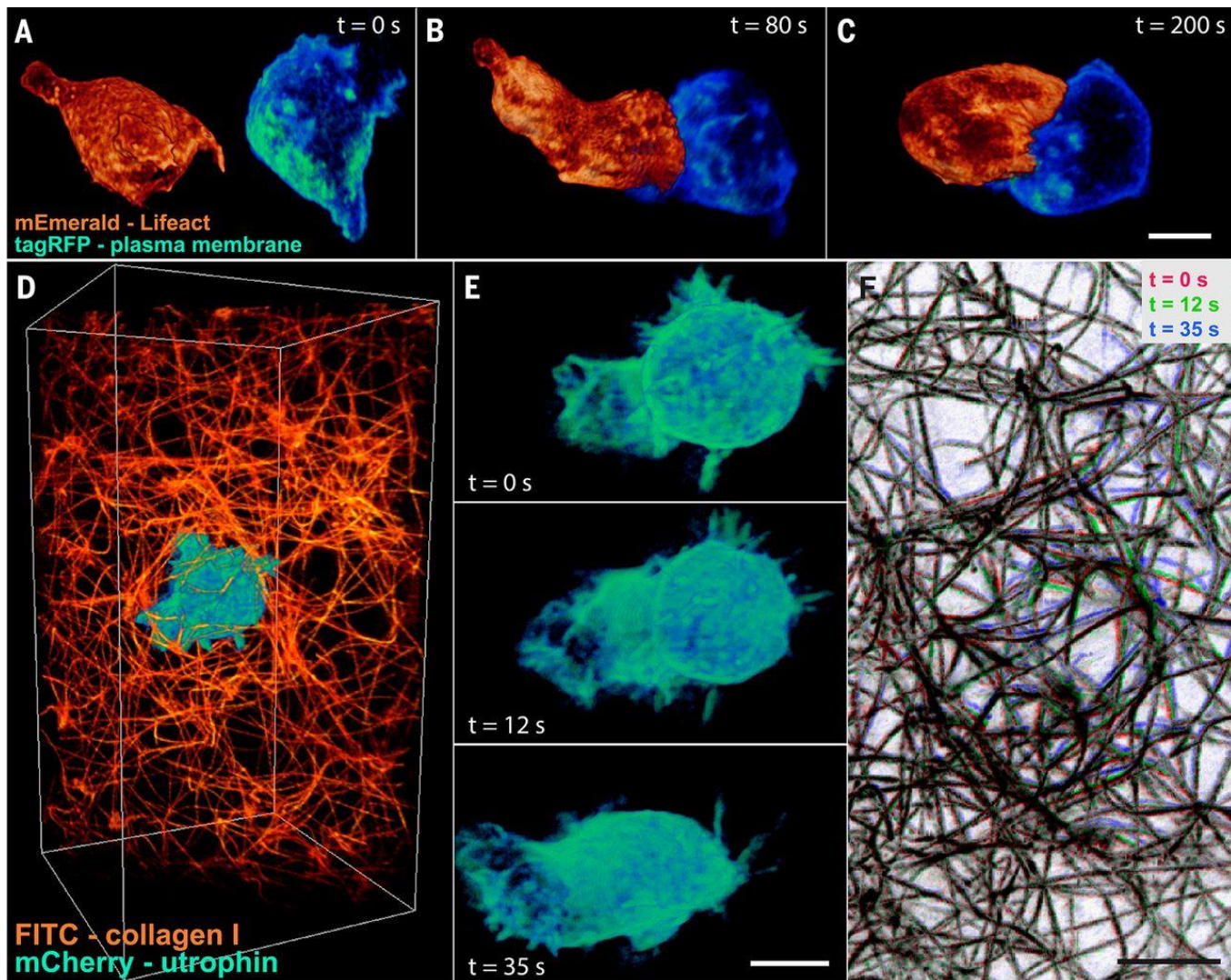
nature protocols | VOL.9 NO.5 | 2014 | 1083

Science 24 October 2014:
Vol. 346 no. 6208
DOI: 10.1126/science.1257998
•Research Article

Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution

[Bi-Chang Chen](#), [Wesley R. Legant](#), [Kai Wang](#), [Lin Shao](#), [Daniel E. Milkie](#), [Michael W. Davidson](#), [Chris Janetopoulos](#), [Xufeng S. Wu](#), [John A. Hammer III](#), [Zhe Liu](#), [Brian P. English](#), [Yuko Mimori-Kiyosue](#), [Daniel P. Romero](#), [Alex T. Ritter](#), [Jennifer Lippincott-Schwartz](#), [Lillian Fritz-Laylin](#), [R. Dyche Mullins](#), [Diana M. Mitchell](#), [Joshua N. Bembenek](#), [Anne-Cecile Reymann](#), [Ralph Böhme](#), [Stephan W. Grill](#), [Jennifer T. Wang](#), [Geraldine Seydoux](#), [U. Serdar Tulu](#), [Daniel P. Kiehart](#), [Eric Betzig](#)





А теперь вопросы (если они есть)