

ΒΙΟΛ-491 Ειδικά Κεφάλαια Βιοτεχνολογίας και Απεικονιστικής Φυτών-ΔΙΑΛΕΞΗ 6



<https://www.imbb.forth.gr/en/research-en/plant-molecular-biology/item/4119-panagiotis-n-moschou>

<https://pmoschoulab.blog/home/>



FORTH

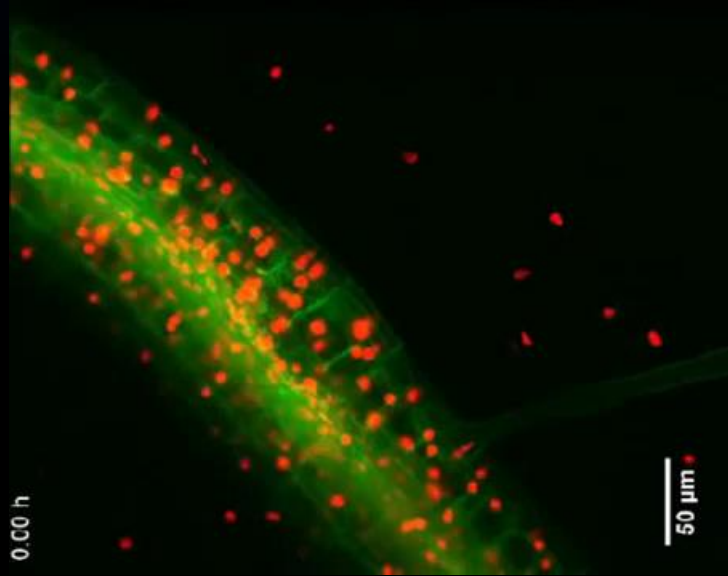
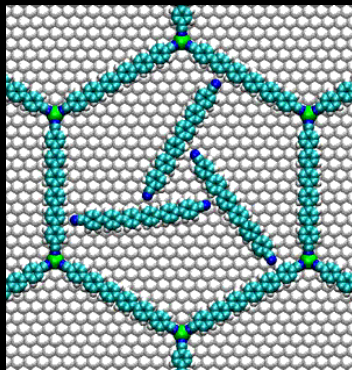
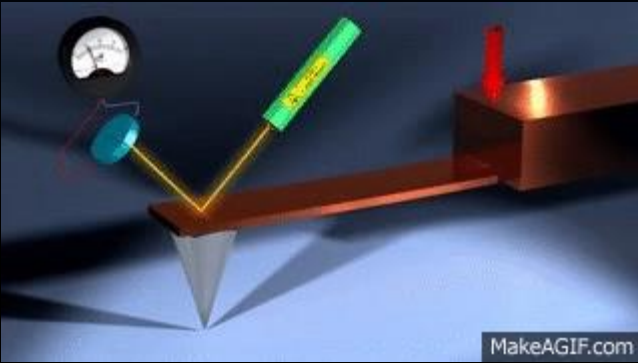
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY



<https://twitter.com/Panosmoschou>



6. Σύγχρονες μέθοδοι απεικονιστικής II (AFM, molecular motors, SEM/TEM, cryoEM, light sheet)



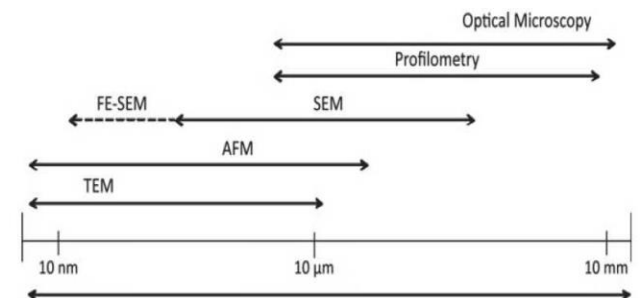
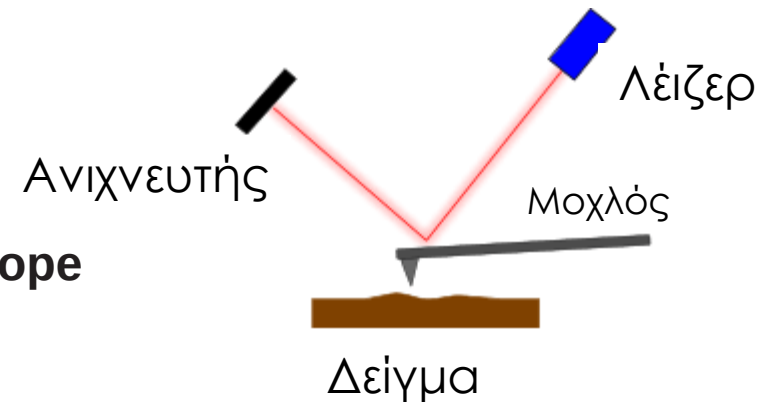
Νέες δεξιότητες-Διάλεξη 6

1. Να **περιγράψετε** τις μεθόδους AFM, SEM/TEM/CryoEM και light sheet
2. Να **περιγράψετε** μοριακές μηχανές και πώς περίπου λειτουργούν

Τι θα θέλατε να ακούσετε; Τι έχετε ακούσει; Τι θα θέλατε να μάθετε σχετικά με εξωτικές τεχνικές μικροσκοπίας;

Μικροσκοπίες σάρωσης με ακίδα

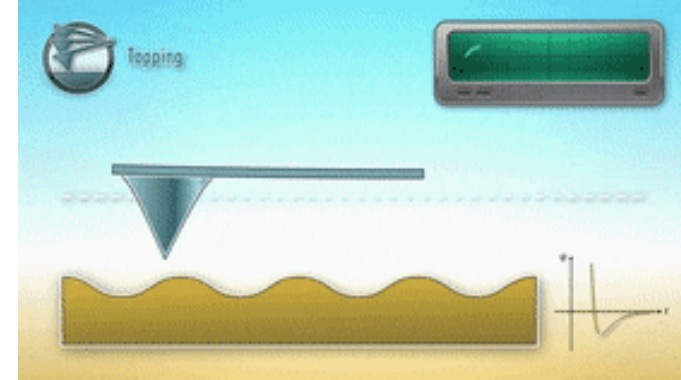
STM scanning tunneling microscope
AFM Atomic force microscope
FFM (or LFM) (Lateral or Friction) force microscope
SEFM Scanning electrostatic force microscope
SFAM scanning force acoustic microscope
AFAM atomic force acoustic microscope
SMM scanning magnetic microscope
MFM magnetic force microscope
SNOM scanning near field optical microscope
SThM scanning thermal microscope
SEcM scanning electrochemical microscope
SKpM scanning Kelvin Probe microscope
SCPM scanning chemical potential microscope
SICM scanning ion conductance microscope
SCM scanning capacitance microscope



Μικροσκοπίες σάρωσης με ακίδα

- Η τεχνική SPM (Scanning probe microscopy) απεικονίζει επιφανειακές δομές με ατομική ανάλυση (ύψος) χωρίς να προοκαλεί τη βλάβη του δείγματος
- Τρισδιάστατη εικόνα
- Η SPM λειτουργεί χωρίς κενό και σε αντίθεση με ηλεκτρονικά και οπτικά μικροσκόπια μπορεί να μετρήσει και φυσικές παραμέτρους

Scanning Tunneling Microscopy (STM)



Atomic Force Microscopy (AFM)

STM scanning tunneling microscope

AFM Atomic force microscope

FFM (or LFM) (Lateral or Friction) force microscope

SEFM Scanning electrostatic force microscope

SFAM scanning force acoustic microscope

AFAM atomic force acoustic microscope

SMM scanning magnetic microscope

MFM magnetic force microscope

SNOM scanning near field optical microscope

SThM scanning thermal microscope

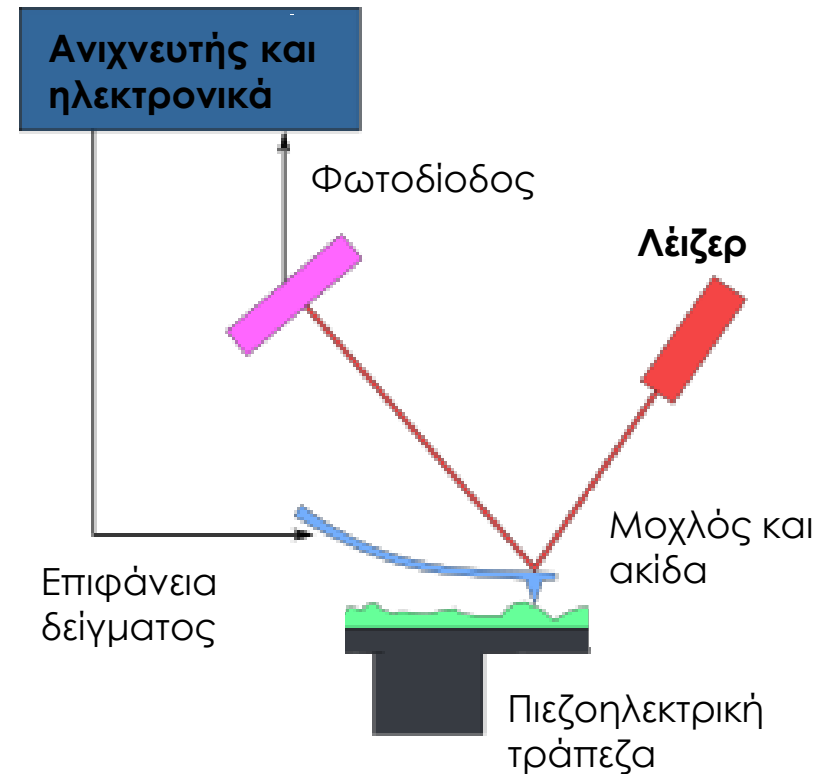
SEcM scanning electrochemical microscope

SKpM scanning Kelvin Probe microscope

SCPM scanning chemical potential microscope

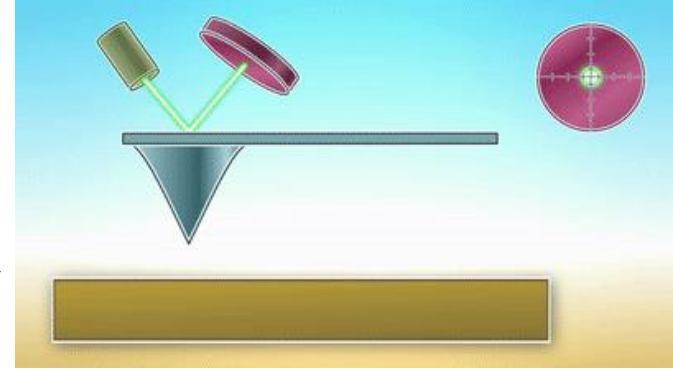
SICM scanning ion conductance microscope

SCM scanning capacitance microscope



Μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων

Atomic Force Microscopy (AFM)

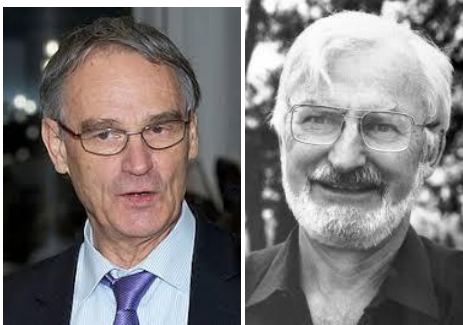


Το 1981, οι G. Binnig και H. Rohrer
εφηύραν το STM

Nobel 1986



Η νέα του μορφή είναι το AFM

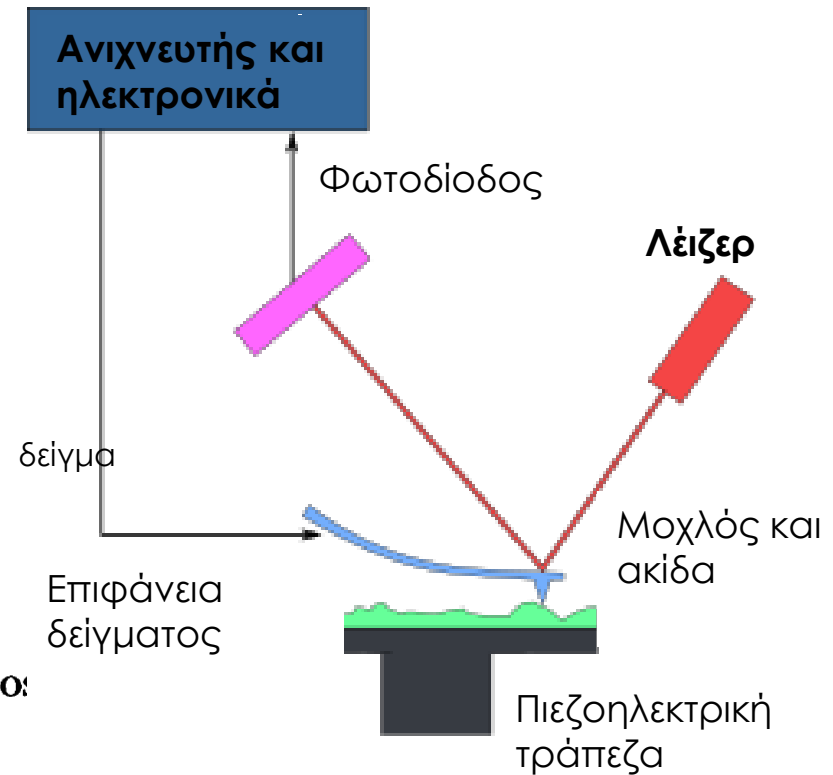


SCANNING TUNNELING MICRO:

G. BINNIG and H. ROHRER

IBM Zurich Research Laboratory, CH-88003 Rüschlikon, Switzerland

Received 30 September 1982



Το AFM βασίζεται σε δια-ατομικές δυνάμεις

8

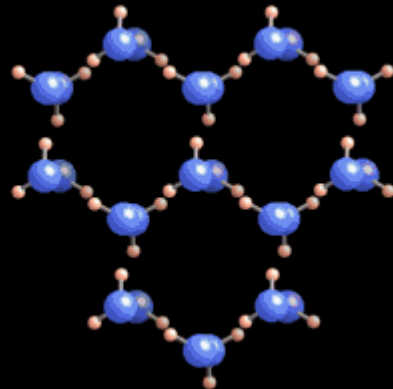
Εφαρμογές

- ✓ Μετουσίωση πρωτεϊνών μπορεί να μελετηθεί
- ✓ Μπορεί να μελετηθεί η προσδεσιμότητα
- ✓ Εντοπισμός στην επιφάνεια του κυττάρου
- ✓ Μελέτη επιφανειακής τριβής σε επιφάνειες

Μειονεκτήματα

- Περιορισμένο εύρος
- Περιορισμός στη μεγέθυνση
- Μπορεί η ακίδα και το δείγμα να χαλάσουν
- Περιορισμός στην ταχύτητα σάρωσης

- Van der Waals
- Ηλεκτροστατικές
- Μαγνητικές
- Από επαφή

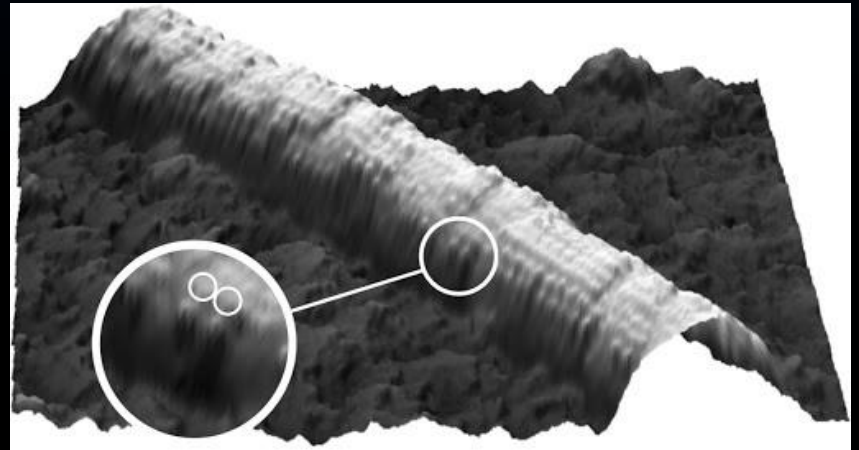
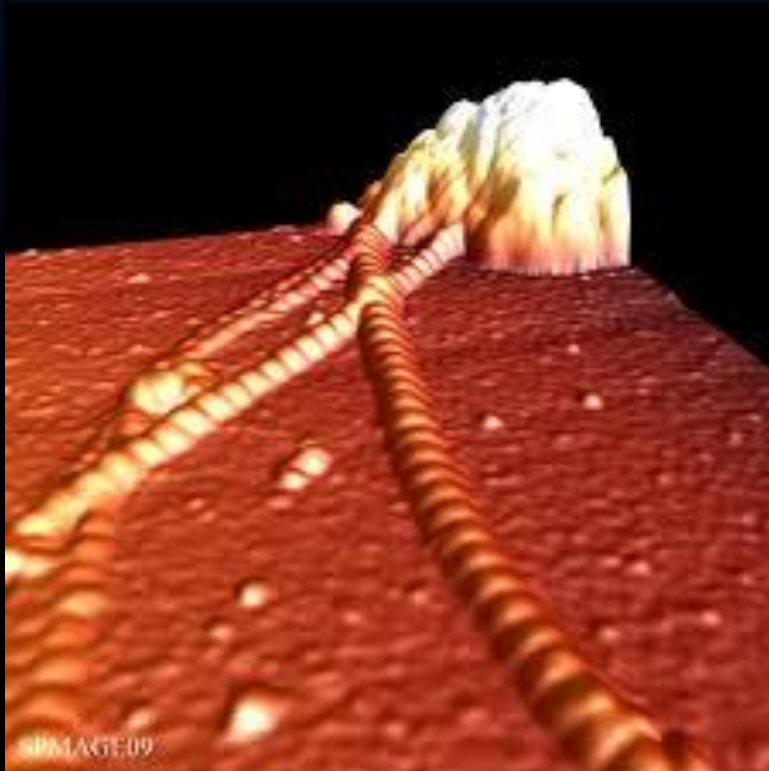


Πλεονεκτήματα

- Εύκολη προετοιμασία δείγματος
- Λειτουργεί σε κενό, αέρα και υγρό
- Ακριβής υψομετρική απεικόνιση
- Ζωντανό ιστό

Εικόνες από AFM

9

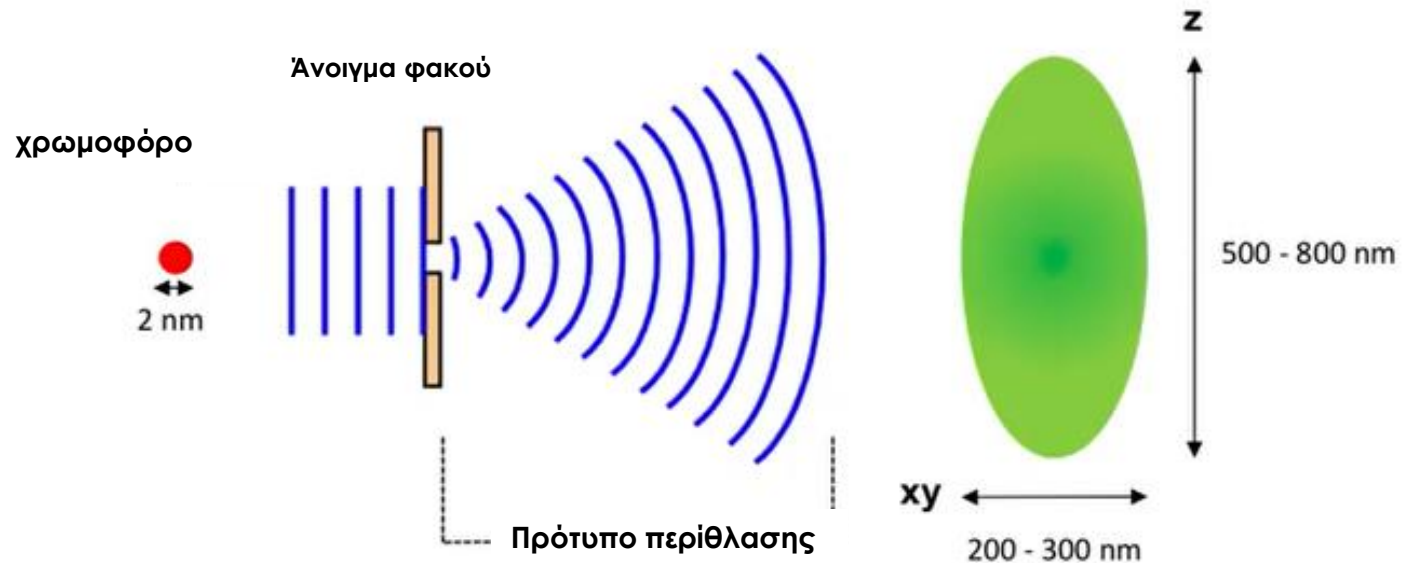


TEM/SEM/CryoEM

	AFM	SEM	TEM
Προετοιμασία δείγματος	Μικρή ή καμία	Μικρή ή μεγάλη	Μικρή ή μεγάλη
Ανάλυση	0.1 nm	5 nm	0.1 nm
Κόστος	Μικρή	Μεσαίο	Υψηλό
Περιβάλλον δείγματος	Οποιοδήποτε	Κενό ή αέριο	Κενό
Βάθος πεδίου	Φτωχό	Καλό	Φτωχό
Είδος δείγματος	Αγώγιμο ή μη	Αγώγιμο	Αγώγιμο
Χρόνος απεικόνισης	αγώγιμο	0.1-1 λεπτά	0.1-1 λεπτά
Μέγεθος δείγματος	2-5 λεπτά	1 mm	100 nm
Μέγιστο μέγεθος	Απεριόριστο	30 mm	2 mm
Μετρήσεις	3D	2D	2D

Όριο περίθλασης

11



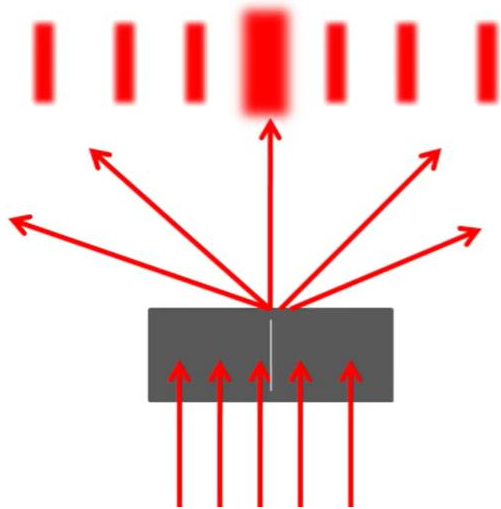
$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

$$d (GFP) = \frac{510}{(1.4 * 2)} = 182 \text{ nm}$$

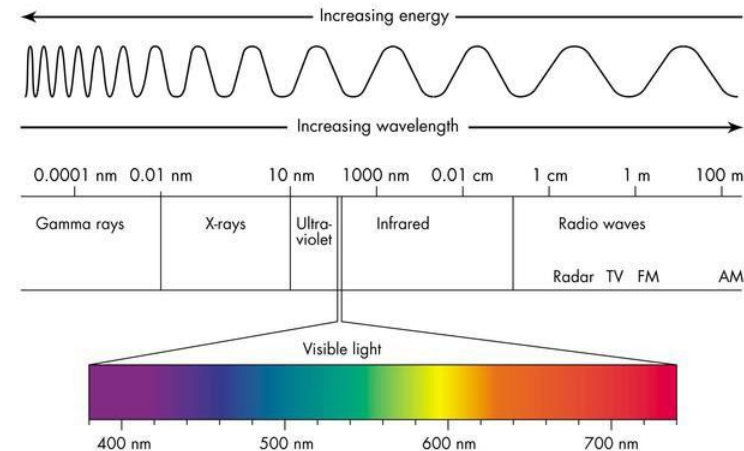
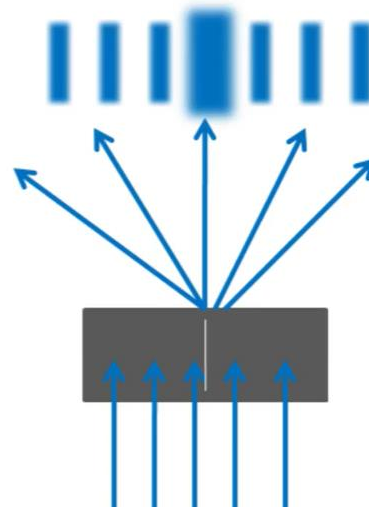
Abbe, 1873

Όριο περίθλασης: εξαρτάται από το μήκος κύματος¹²

Κόκκινο: πολλή περίθλαση

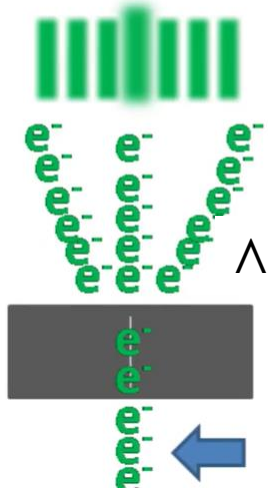


Μπλε: όχι τόσο περίθλαση



Η ιδέα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

13



Περίθλαση

Λόγω της κυματικής φύσης του φωτός

ηλεκτρόνια



Louis de Broglie

Υψηλή και κυματική μορφή-σωματιδική φύση

$$\lambda = h / mv$$

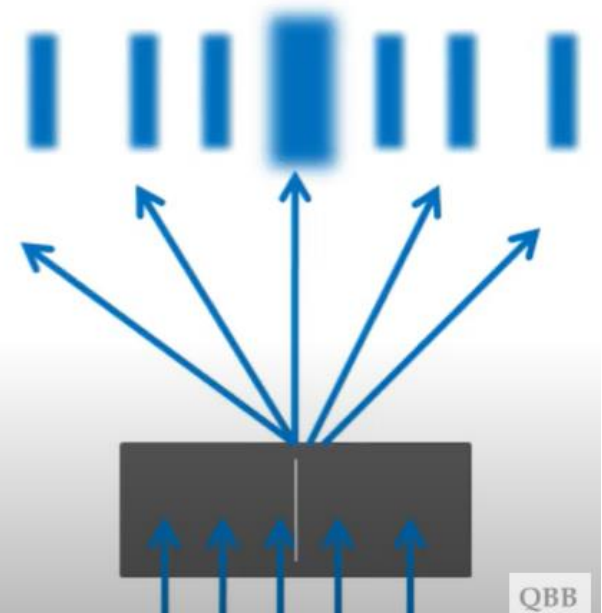
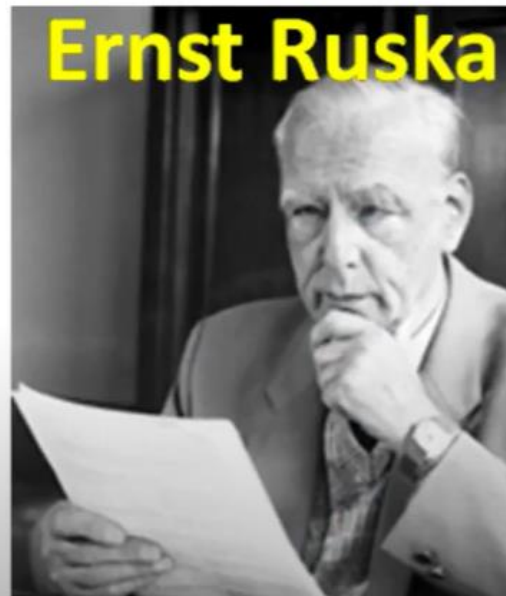
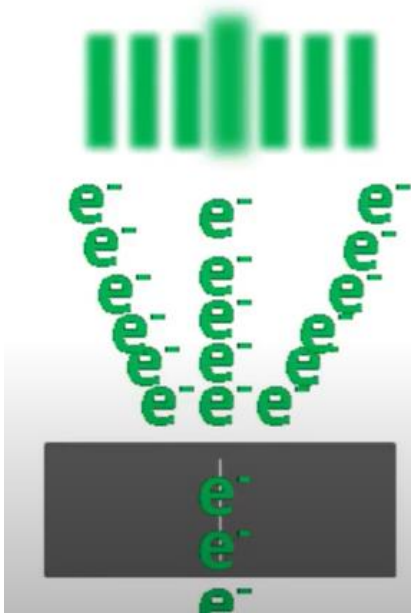
mécanique ondulatoire
(wave mechanics)

Περίθλαση του ηλεκτρονίου <<< Περίθλαση του
φωτονίου με βάση τη μάζα



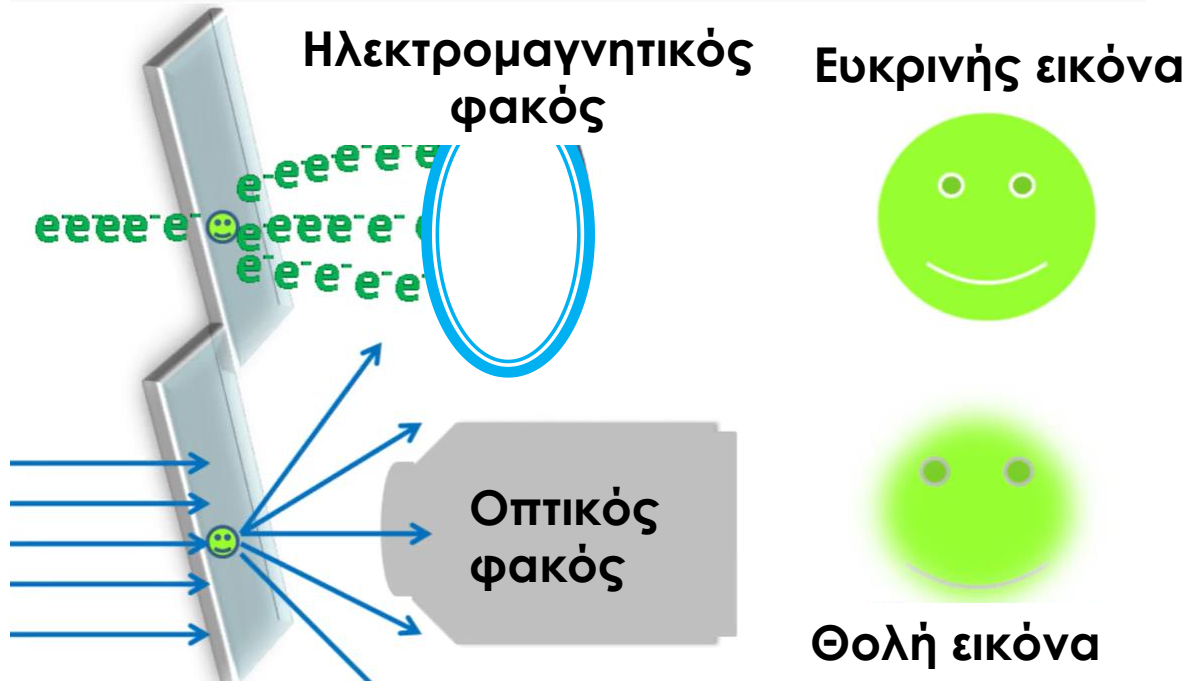
Η ιδέα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

Περίθλαση του ηλεκτρονίου <<< Περίθλαση του
φωτονίου



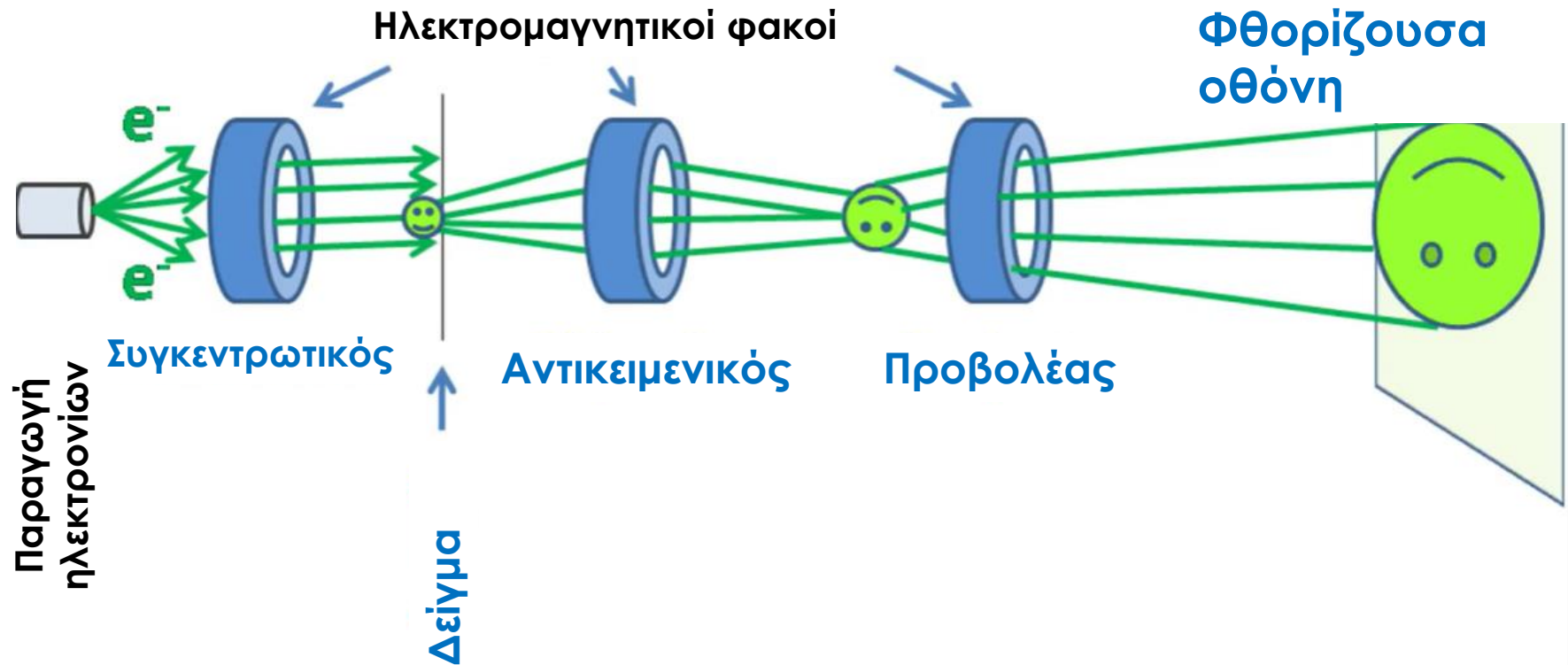
Η ιδέα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

15



TEM

10

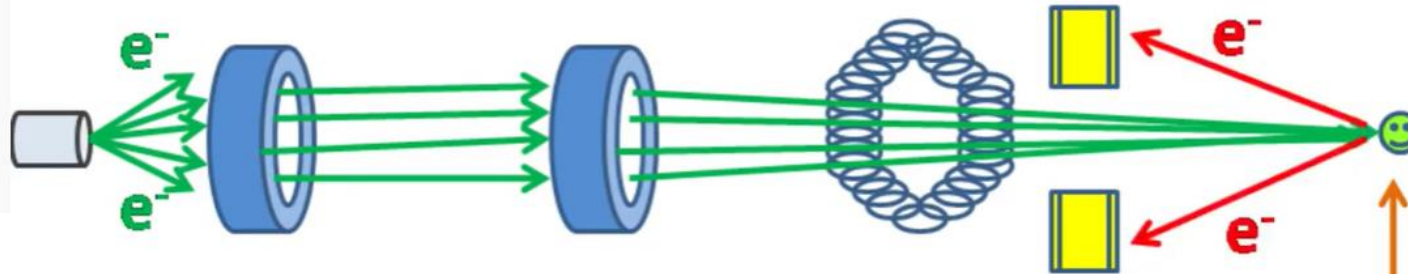


Χρώση δείγματος: οξικό ουρανύλιο

SEM

Ηλεκτρομαγνητικοί φακοί

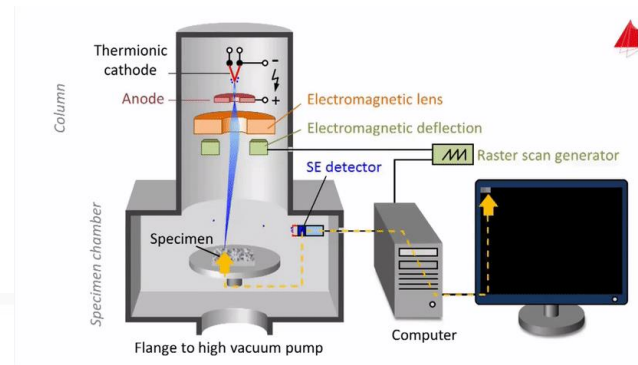
Συμπυκνωτής Αντικειμενικός Πλέγμα σάρωσης



Παραγωγή
ηλεκτρονίων

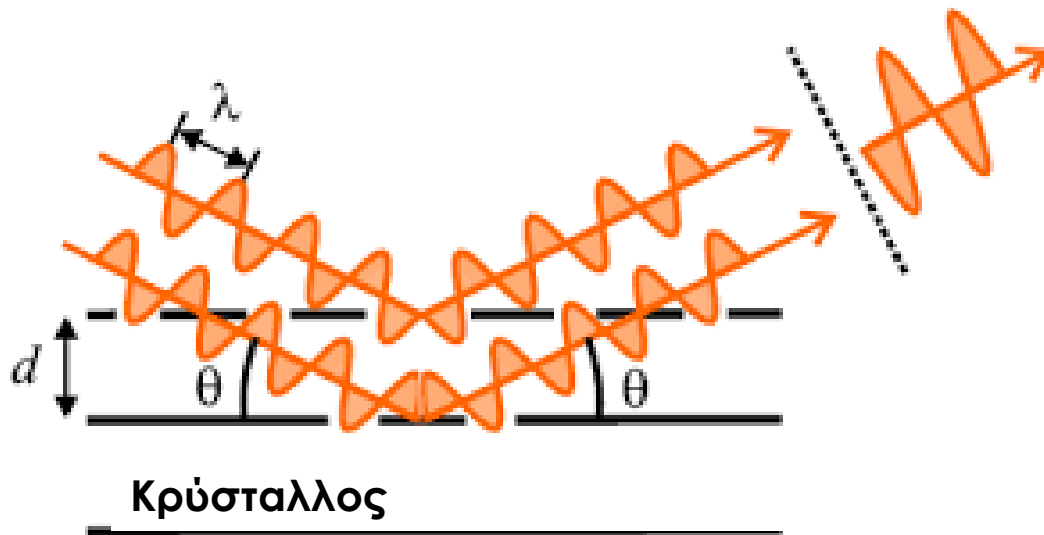
Ανιχνευτές
σκεδαζόμενων
ηλεκτρονίων

Δείγμα καλυμμένο με
πλατίνα, ιρίδιο κτλ.

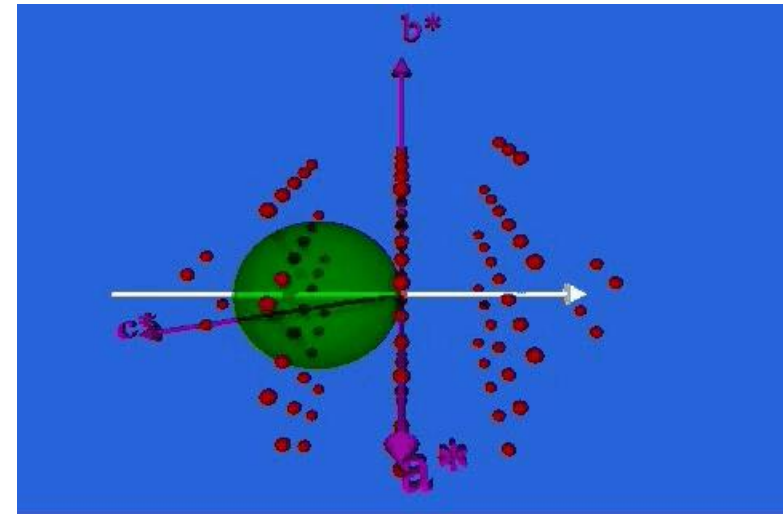
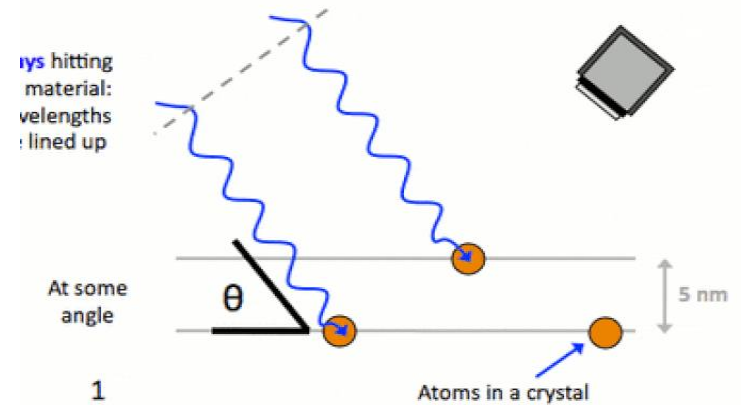


SEM

Κρυσταλλογραφία



X-Ray Diffraction

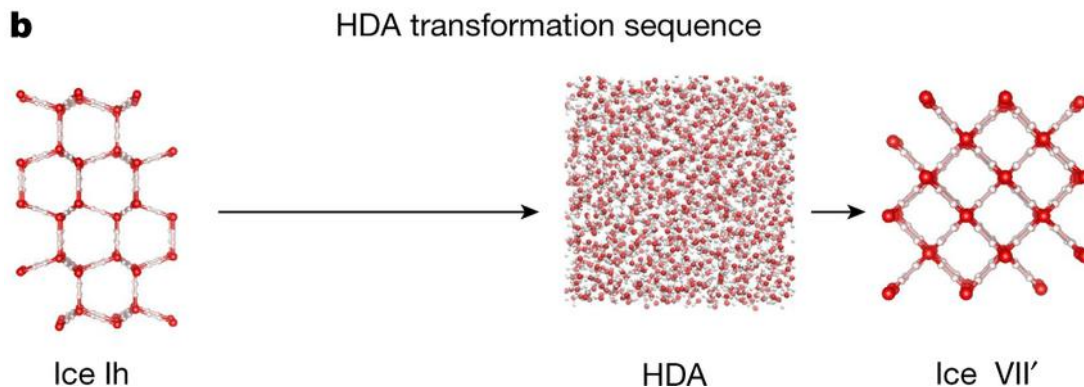
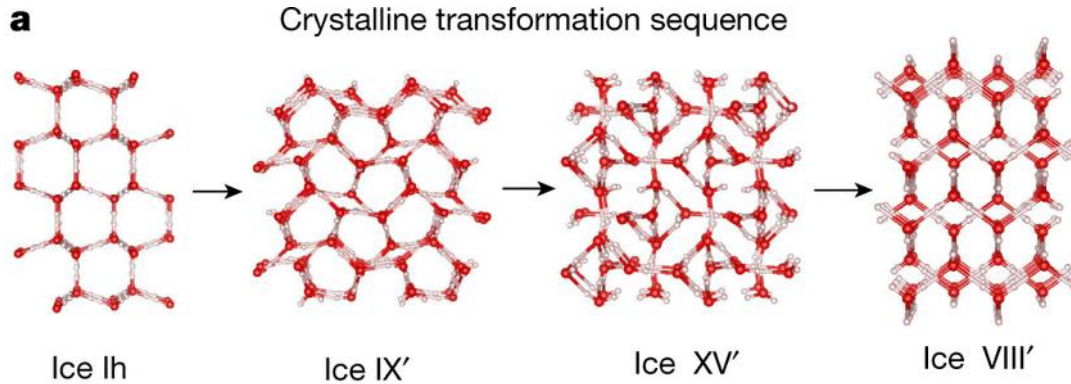


Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι πολύ δύσκολη διαδικασία

Ο πάγος σώνει

19

Άμορφος πάγος (δεν έχει νούμερο): >17 μορφές πάγου, πολλές μετασταθερές
Ο πάγος στη γη μας έχει εξαγωνική διευθέτηση



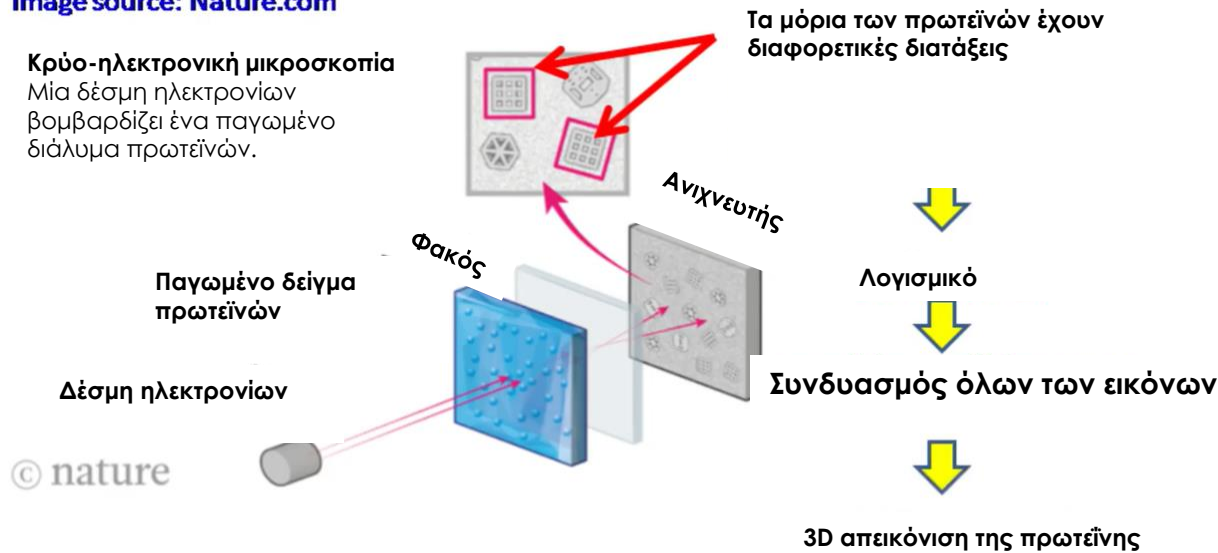
Η κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

20

Image source: Nature.com

Κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

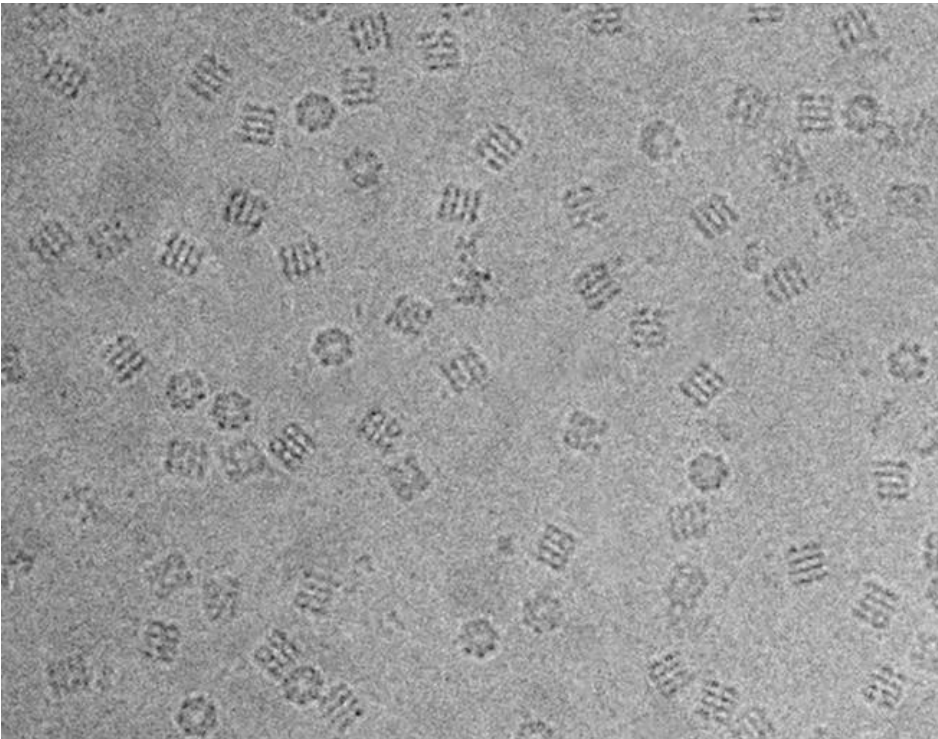
Μία δέσμη ηλεκτρονίων
βομβαρδίζει ένα παγωμένο
διάλυμα πρωτεϊνών.



Άμορφος πάγος (δεν έχει νούμερο): >17 μορφές πάγου, πολλές μετασταθερές
Ο πάγος στη γη μας έχει εξαγωνική διευθέτηση

Η κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

21



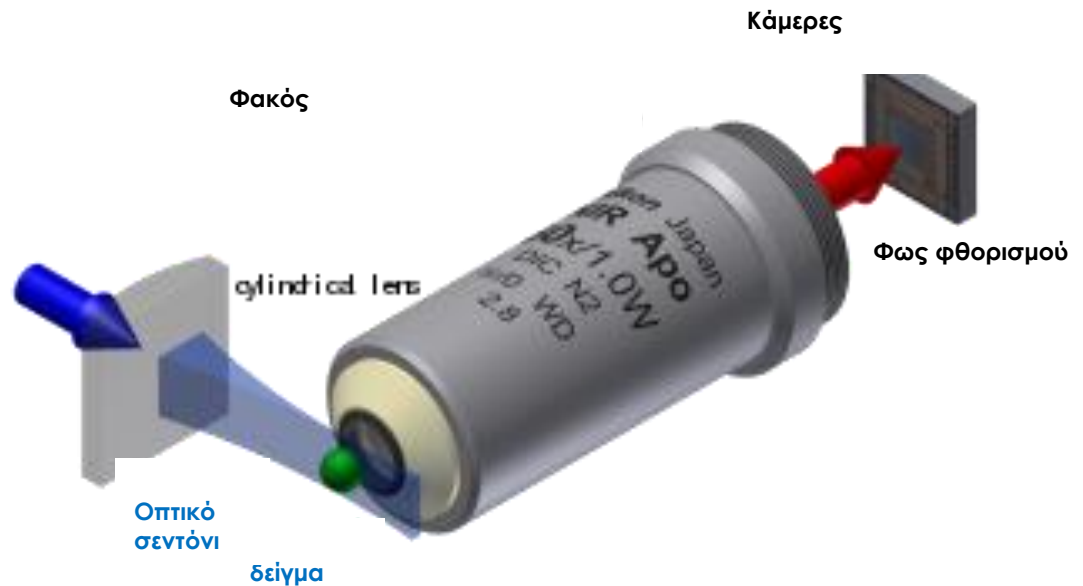
Τυπική εικόνα από CryoEM

Light sheet fluorescence microscopy

22

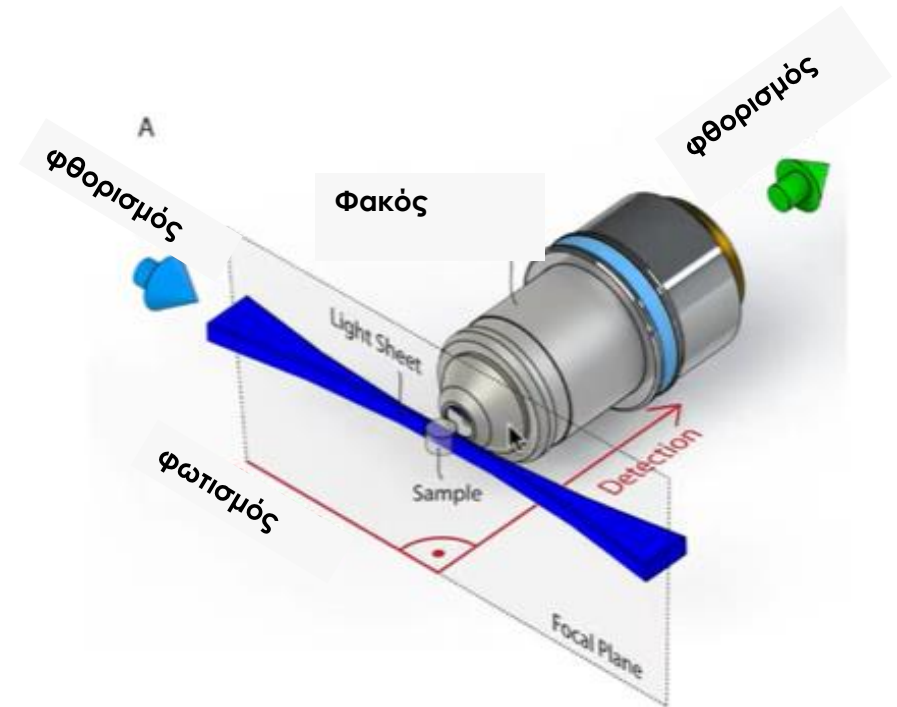
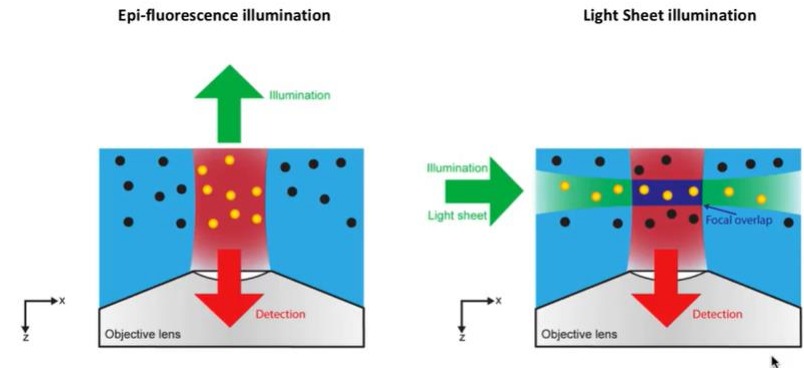
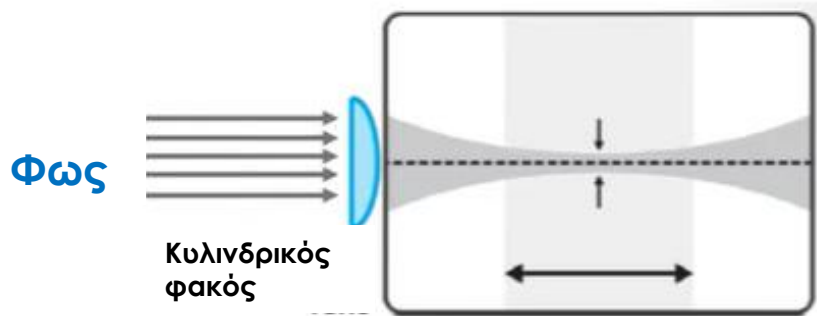
Στόχος

- ✓ Να μειώσει τη φωτοκαταστροφή
- ✓ Παρατήρηση για μεγάλα διαστήματα
- ✓ Να κάνει αναδόμηση 3D
- ✓ Να μειώσει το θόρυβο περίθλασης σε τομές



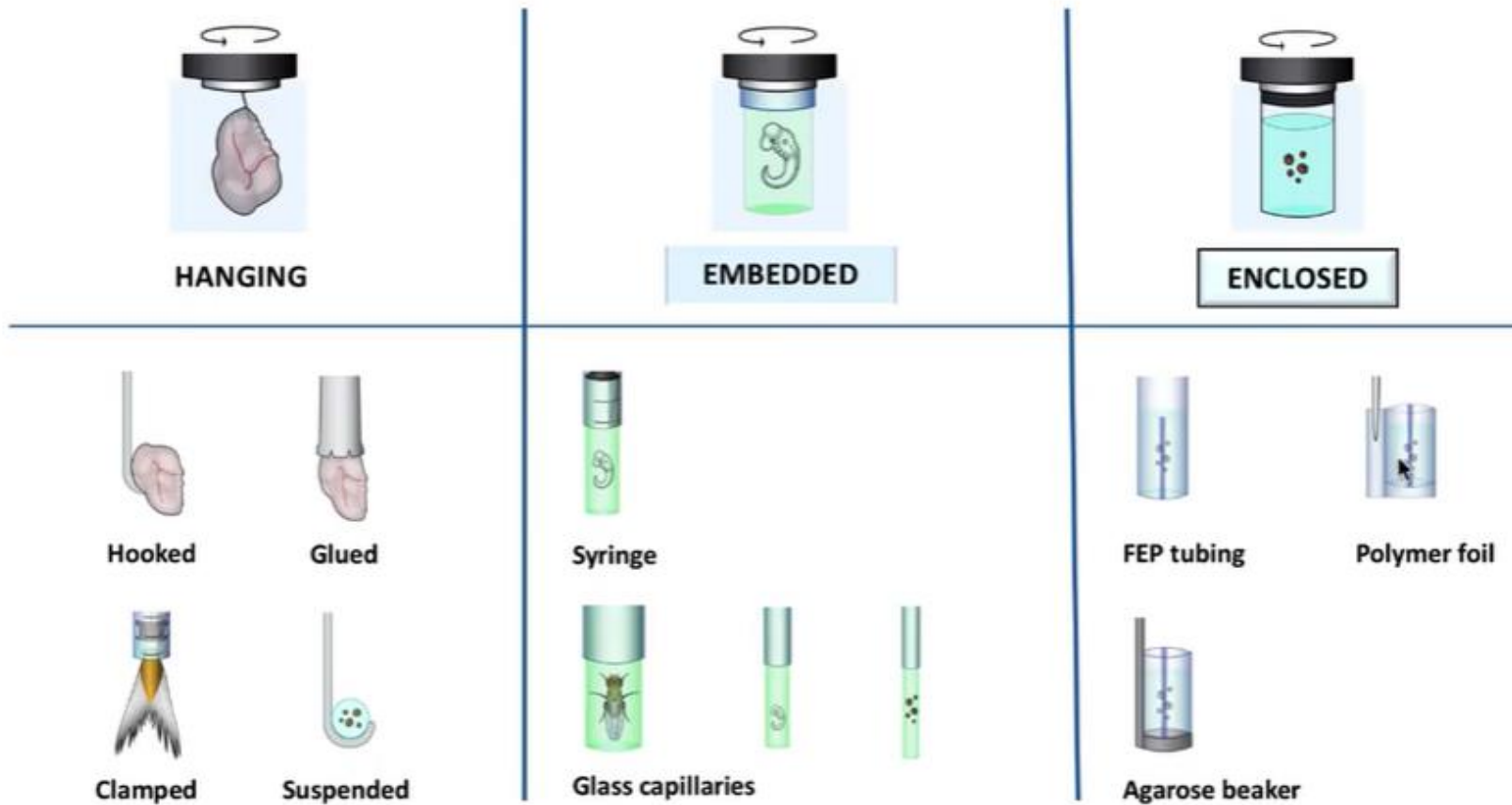
Πώς λειτουργεί;

- ✓ Απόξευση του φωτισμού και ανίχνευσης
- ✓ Κυλινδρικός φωτισμός δημιουργεί ένα light sheet



Προετοιμασία δείγματος

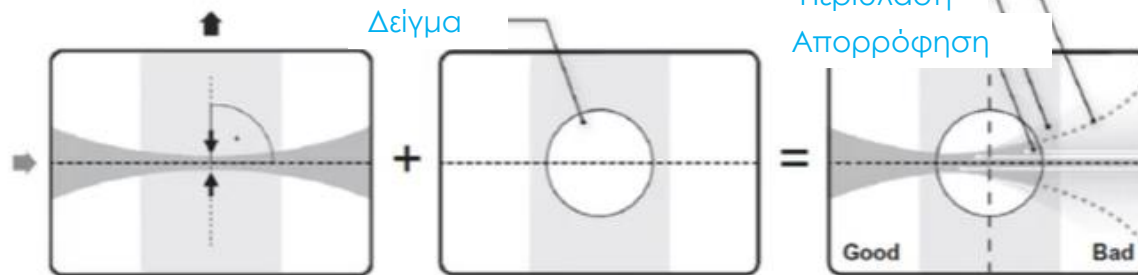
24



Μειονεκτήματα

25

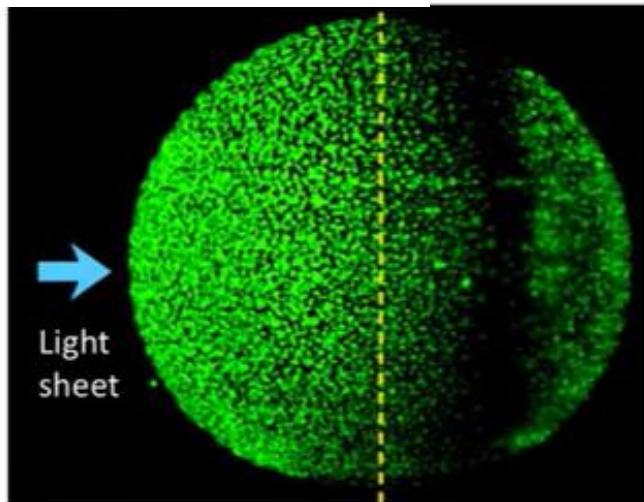
Μονόπλευρος
φωτισμός



Το πρόβλημα της σκίασης

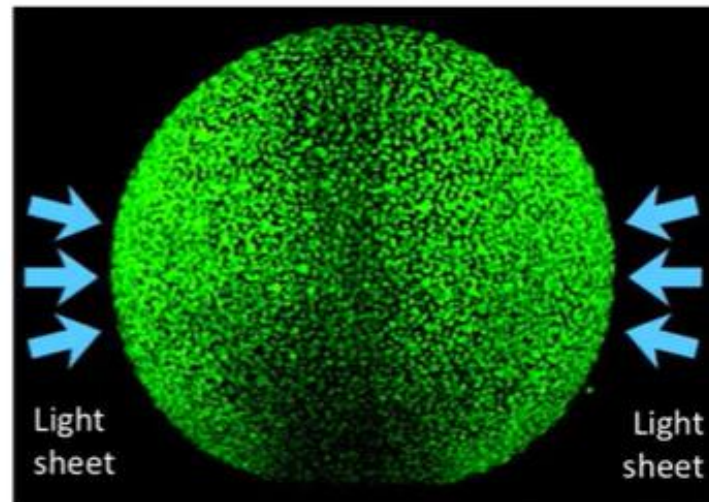
26

Μονόπλευρος
φωτισμός



Zebrafish embryo 8 hours post-fertilization imaged using single illumination SPIM. The light sheet was introduced from the left.

Αμφίπλευρος
φωτισμός



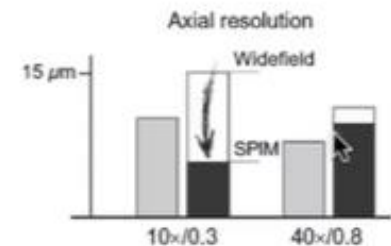
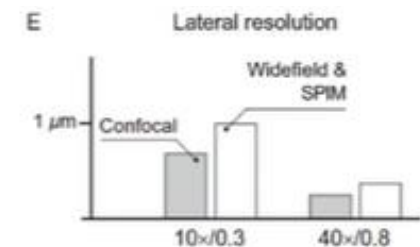
Zebrafish embryo 8 hours post-fertilization imaged using single illumination SPIM. The light sheet was introduced from the left and right.

Huisken, J. & Stainier, D. Y. R. (2009) Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*. Jun;136(12):1963-75. doi: 10.1242/dev.022426

Συγκριτική ανάλυση τύπων μικροσκοπίας

Technique	Resolution XY	Resolution Z	Resolution temporal	Imaging depth	Usability	Cost ^a	SNR ^b	Photobleaching/phototoxicity
Wide-field (WF)	Diffraction limited (≈ 200 nm)	Poor (usually worse than $1 \mu\text{m}$)	Best (msec/frame, signal limited)	Worst	Simple	\$	High	Best (usually μWatts distributed over large imaging field)
Total Internal Reflection (TIRF)	Diffraction limited but low background	Best but only first 200-300 nm	Good (msec/frame, signal limited)	< 300 nm	Good	\$\$	High	Better
Laser-Scanning Confocal (LSCM)	Diffraction limited to nearly $2\times$ diffraction limit (Airy Scan)	Good (better than 700 nm)	Varies with scanner type (typically 1-30 f.p.s)	Better (less than $100 \mu\text{m}$)	Complex but most versatile	\$2-\$7	Moderate	Can be bad (μWatts of power focused to spot)
Multi-point/slit confocal	Diffraction limited	Good (slightly worse than LSCM)	Good (msec/frame, signal limited)	Typically $< 50 \mu\text{m}$	Better	\$2-\$4	Moderate	Better (usually lower excitation flux density than LSCM)

Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM)	Diffraction Limited but typically low-mid level NA lenses are used	Good depends on light sheet thickness and objective NA	Best for 3-D imaging	Best (hundreds of microns)	Better but requires calibration	\$2-\$6	High	Best for 3D (Z stack) or 4D (Z- stack over time) imaging
Lattice Light Sheet with SIM	Super-resolution to $2\times$ diffraction limit with deconvolution	Super-resolution to $2\times$ diffraction limit with deconvolution	Best for 3-D imaging	Typically $< 20 \mu\text{m}$	Complex	\$2-\$6	Moderate	Best for 3D (Z stack) or 4D (Z stack over time) imaging



Weber, M., Mickoleit, M. and Huisken, J. (2014) **Light Sheet Microscopy**. *Methods in Cell Biology*. Jan 01; 123:193-215; doi: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00011-2

Combs, C. & Shroff, H. (2017) **Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods**. *Current Protocols in Neuroscience*. Apr 10;79:2.1.1-2.1.25. doi: 10.1002/cpns.29

Το πρώτο μικροσκόπιο light sheet

28



Henry Siedentopf



Slit Ultra Darkfield (1903),
Siedentoph and Zsigmondy

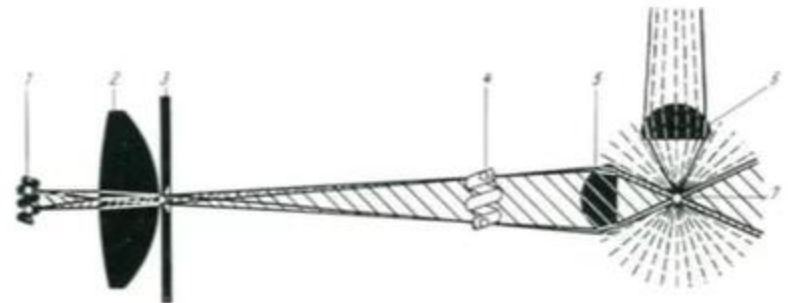
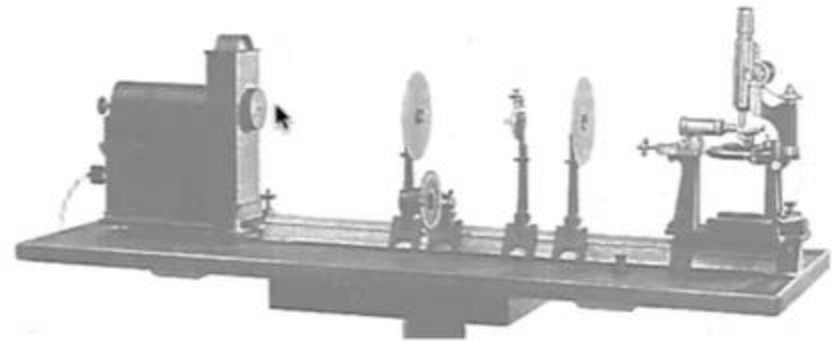
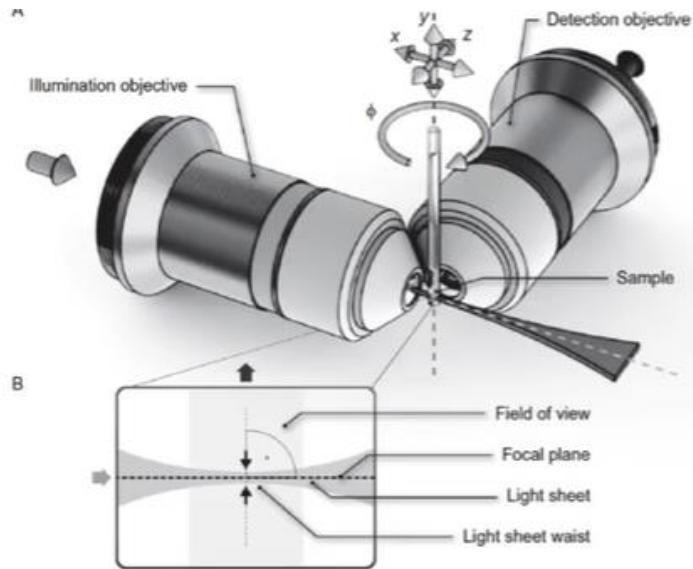


Abb. 215. Strahlengang beim Slit-Ültramikroskop

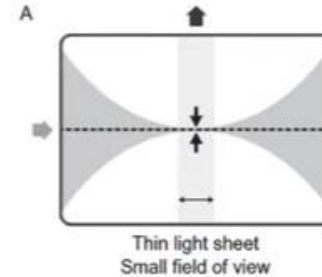
Προσαρμογή των φακών

29

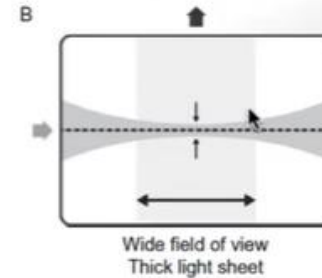


Illumination
objective

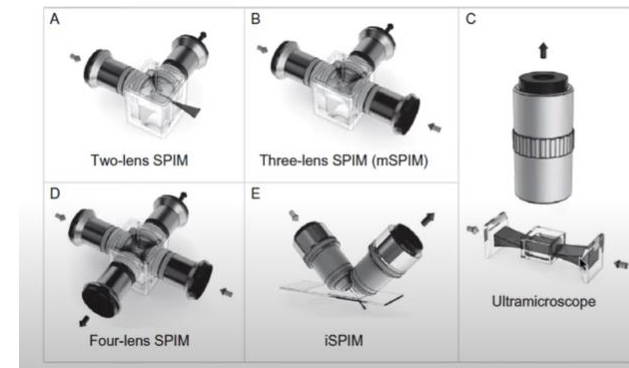
High NA



Low NA



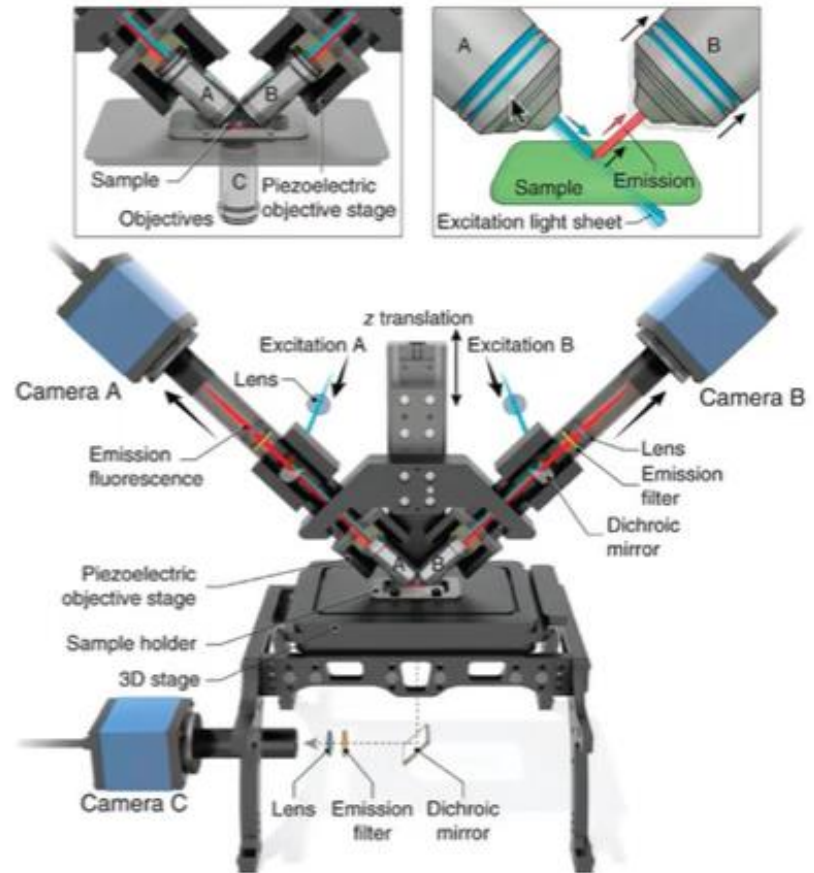
Weber, M., Mickoleit, M. and Huisken, J. (2014) **Light Sheet Microscopy**. *Methods in Cell Biology*. Jan 01; 123:193-215; doi: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00011-2



Dual view inverted SPIM (diSPIM)

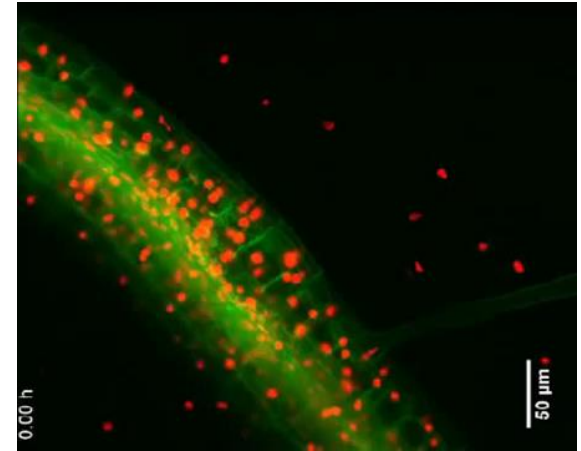
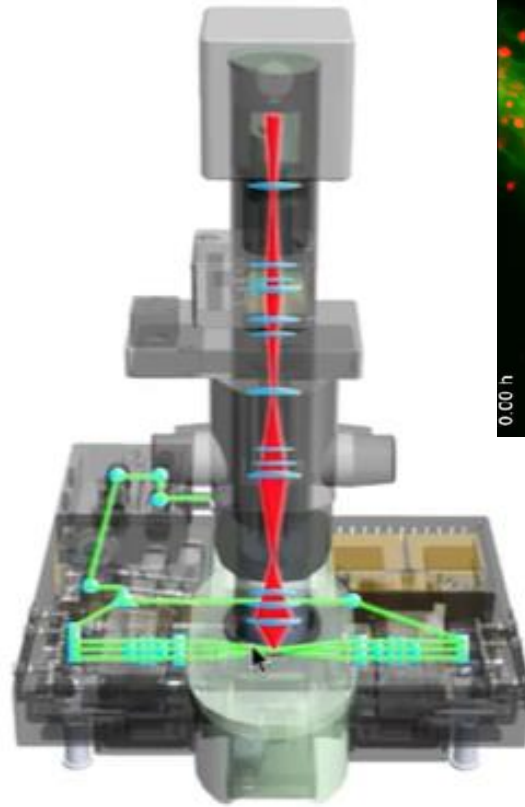


Abhishek, K., Wu, Y., Christensen, R., Chandris, P., Gandler, W., McCreedy, E., Bokinsky, A., Colon-Ramos, D. A., Bao, Z., McAuliffe, M., Rondeau, G. & Shroff, H. (2014) **Dual-view plane illumination microscopy for rapid and spatially isotropic imaging.** *Nat Protoc.* Nov; 9(11): 2555-2573; doi: 10.1038/nprot.2014.172



Ultramicroscope

31



Ταυτόχρονα και 6 φωτισμοί

Φτιάξε το μόνο σου!

32

OpenSPIM

Content

Parts list

Assembly

Operation

Setup Extensions and Modifications

Frequently Asked Questions

Mailing List

Gallery

Who has an OpenSPIM?

Downloads

Publications

Cleared Tissue

Recent changes

Search

Go

Search

Main page

Discussion

View source

History

Welcome to the OpenSPIM Wiki

The Idea

OpenSPIM is an *Open Access* platform for applying and enhancing **Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM)**.

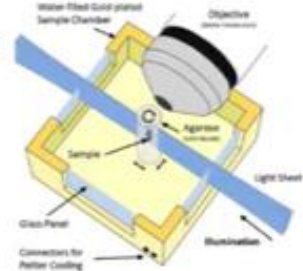
We hope that OpenSPIM in its radical openness will demonstrate that the benefits brought to science by the Open Source approach apply equally well to hardware.

SPIM principle

The SPIM technology offers fast, optically-sectioning, minimally-invasive 3D acquisition of fluorescing specimen over time. It achieves that by focusing a thin laser light-sheet into the specimen, taking two-dimensional images of the illuminated slice with a perpendicularly positioned detector (CCD camera). Three-dimensional stacks are obtained by moving the specimen orthogonal to the light-sheet between consecutive images. By mounting the sample in a rigid medium, e.g. agarose, and hanging it into the sample chamber in front of the detection lens, it is possible to rotate the sample and collect 3d stacks from multiple angles (views).

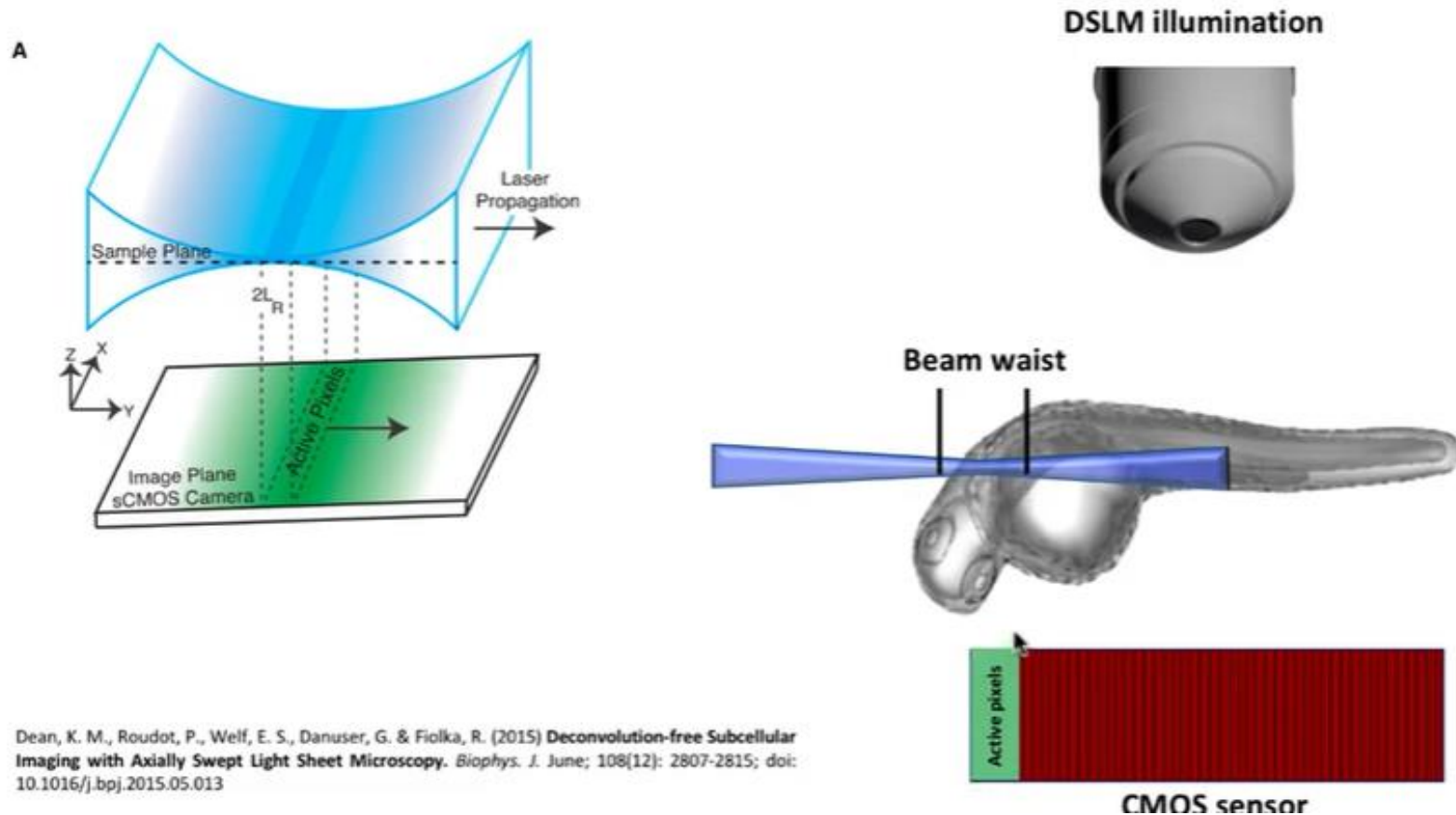
News

- 2015-10-16 Brightfield illumination by Michael Redd
- 2014-08-15 EMBO practical course on light sheet microscopy
- 2014-04-22 Multiview deconvolution
- 2014-04-11 Sample prep for Zebrafish embryo
- 2013-12-15 OpenSPIM optics 101



Digitally Scanned Laser Light Sheet (DSLM)

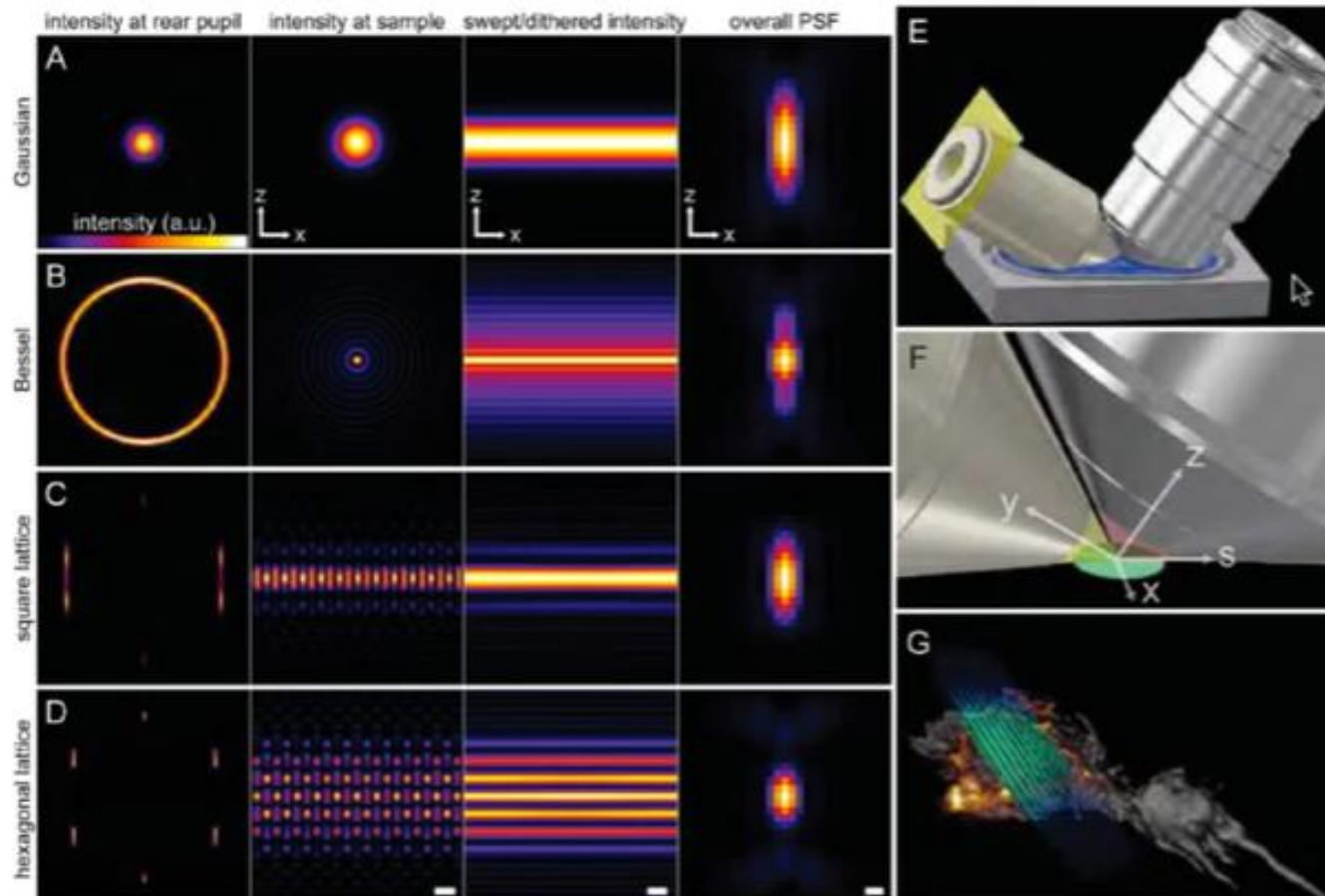
33



Dean, K. M., Roudot, P., Welf, E. S., Danuser, G. & Fiolka, R. (2015) Deconvolution-free Subcellular Imaging with Axially Swept Light Sheet Microscopy. *Biophys. J.* June; 108(12): 2807-2815; doi: 10.1016/j.bpj.2015.05.013

Lattice Light Sheet

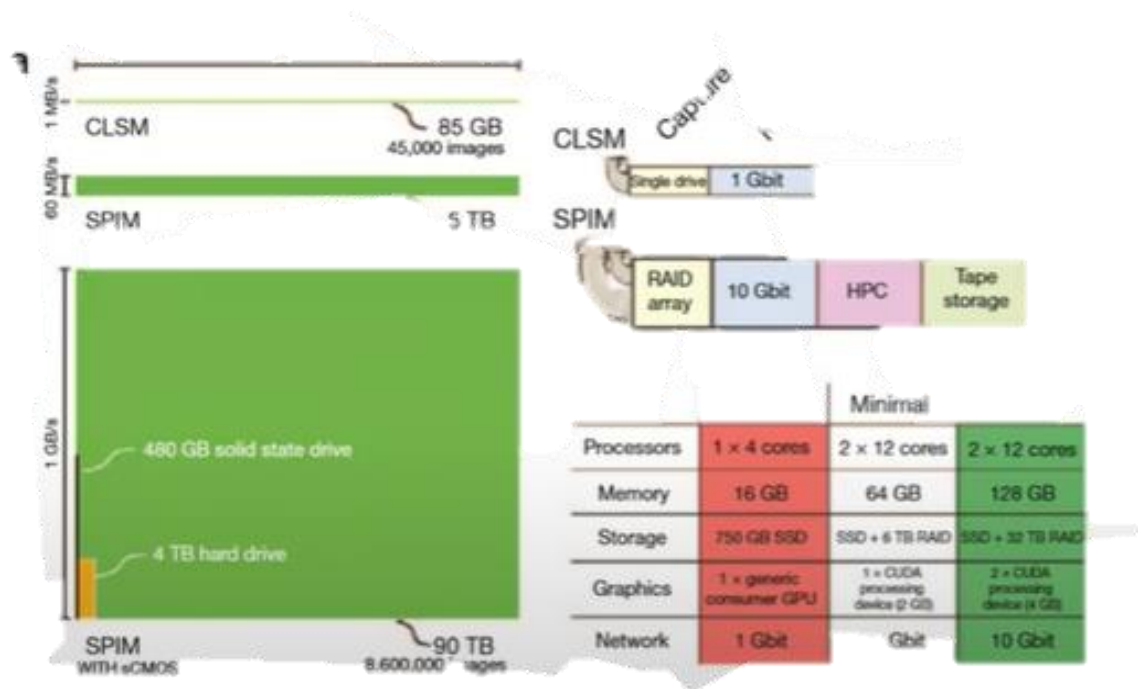
34



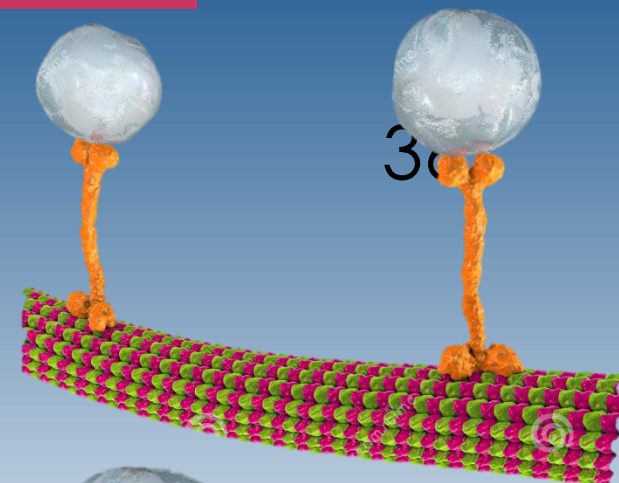
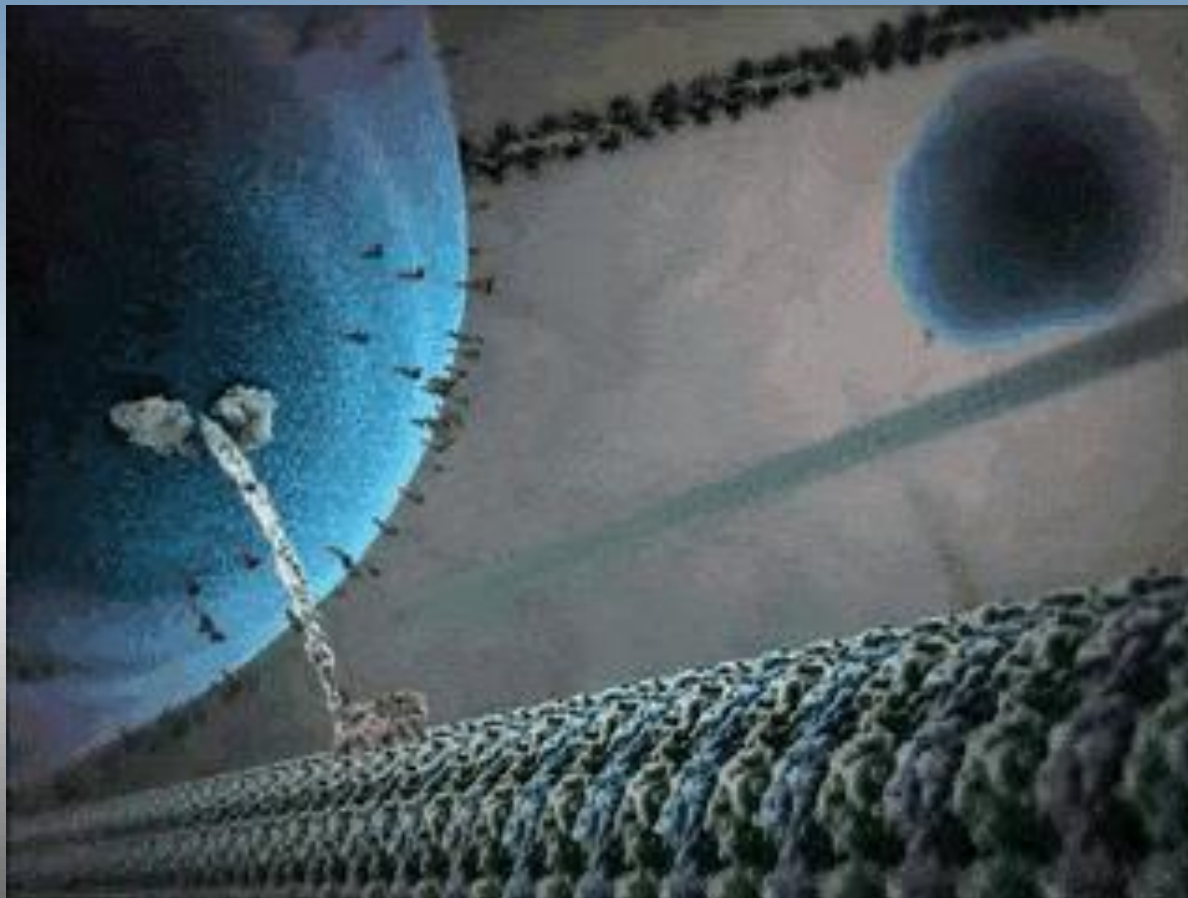
Power, R. M. & Huisken, J. (2017) A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nature Methods*. Mar 31;14(4):360-73; doi: 10.1038/nmeth.4224

Το πρόβλημα της διαχείρισης των δεδομένων

Ένα iSPIM 1 ώρα 2 TB
Αναδόμηση εικόνας 2 ημέρες
Cluster

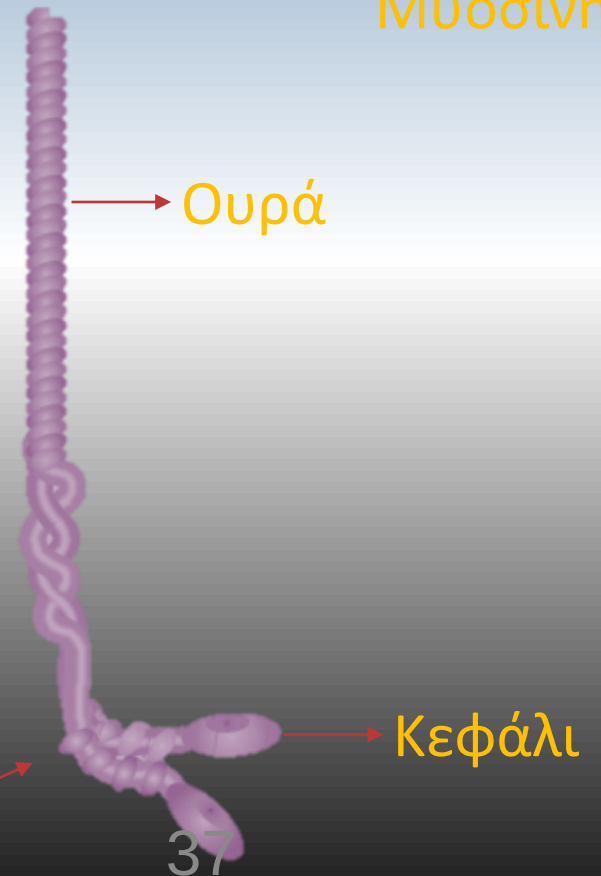
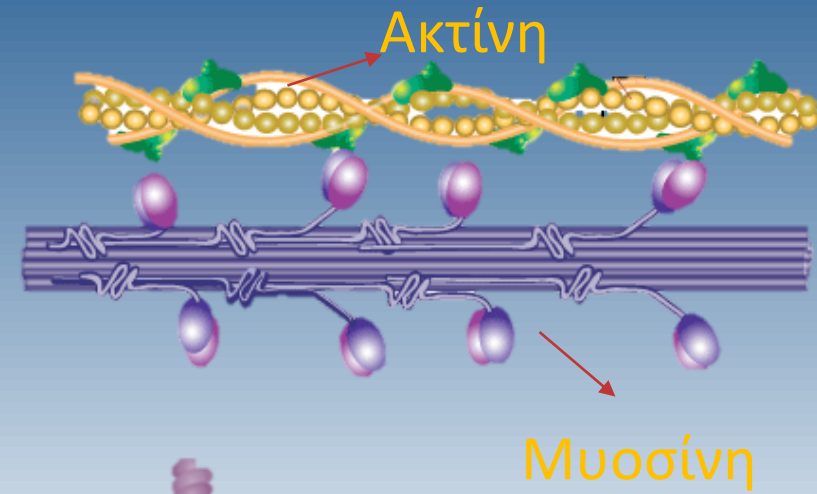
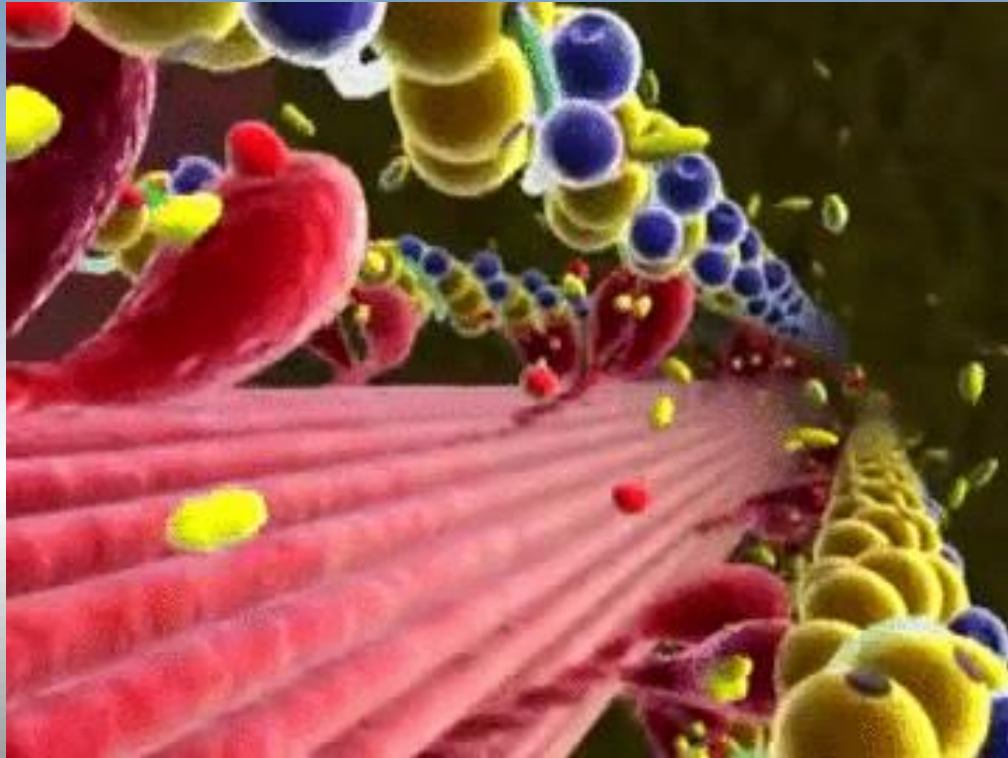


Κινεσίνες

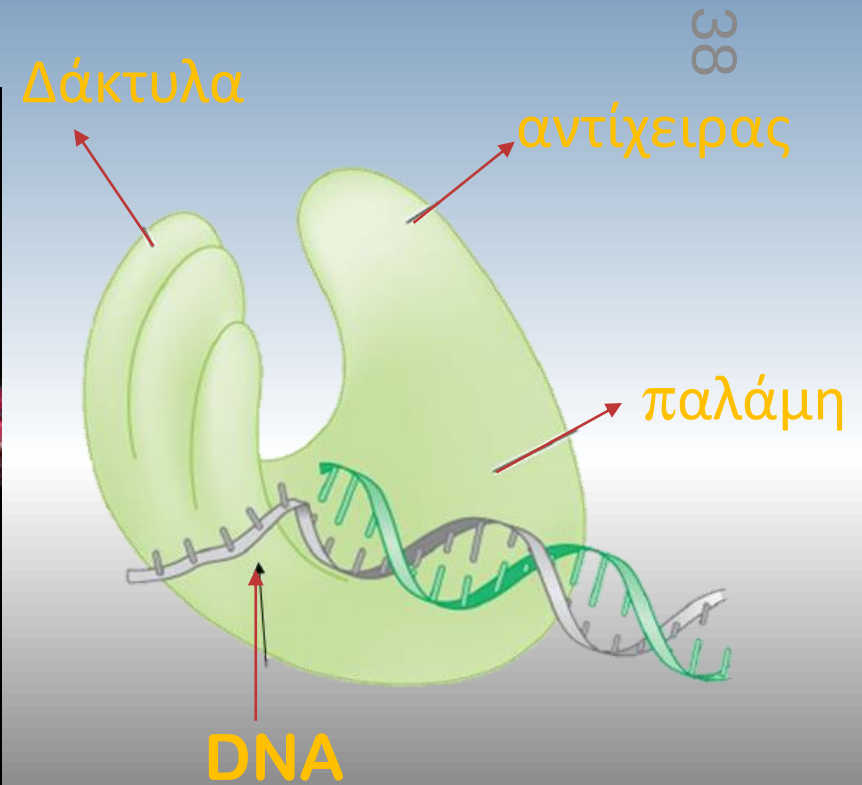
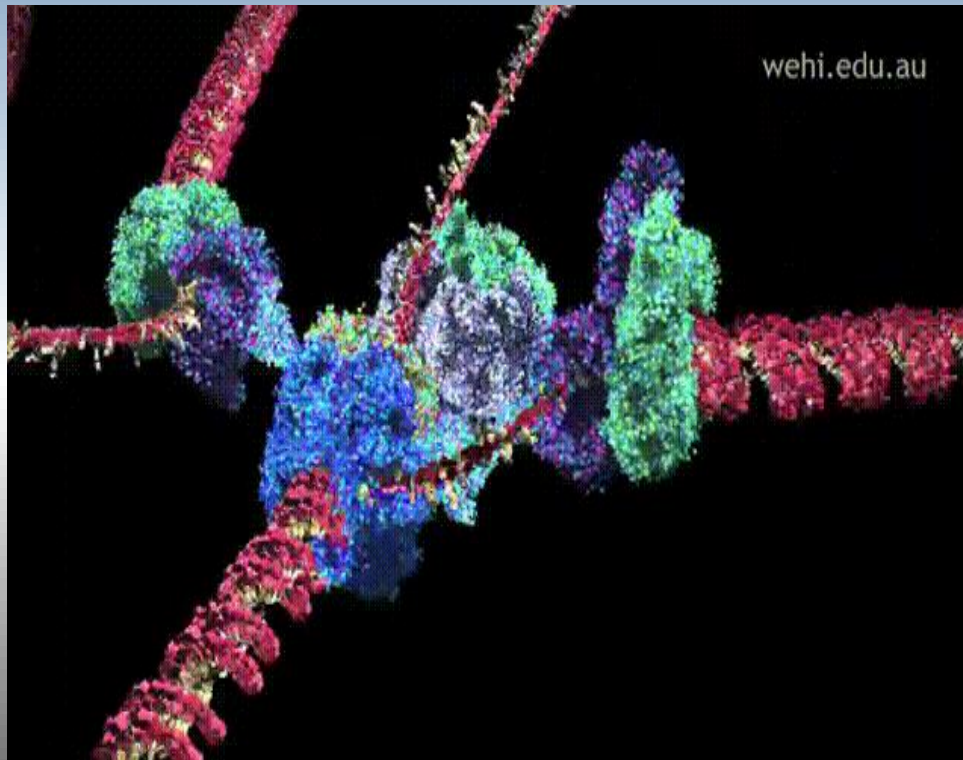


Ελαφριές αλυσίδες

Μυοσίνες (Myosins)

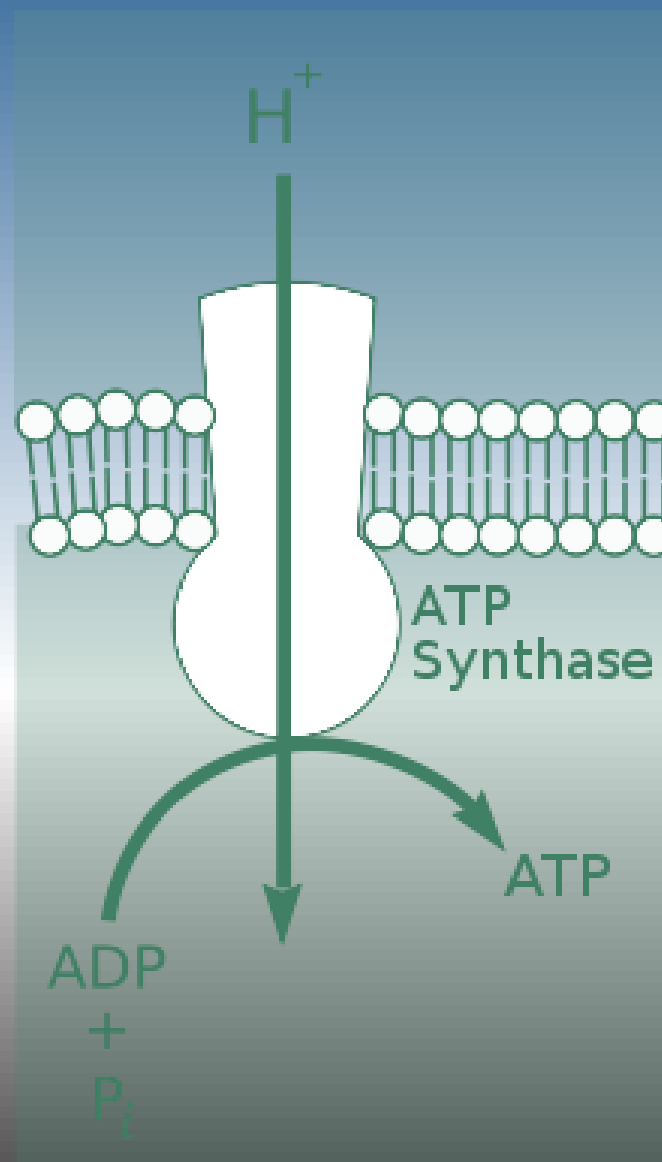
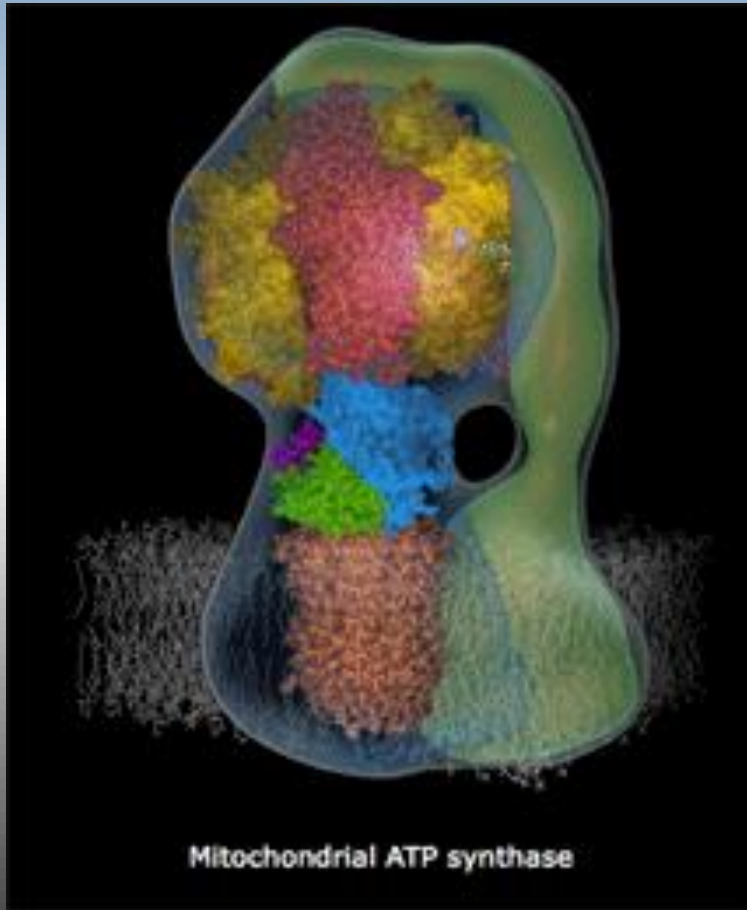


Πολυμεράσες



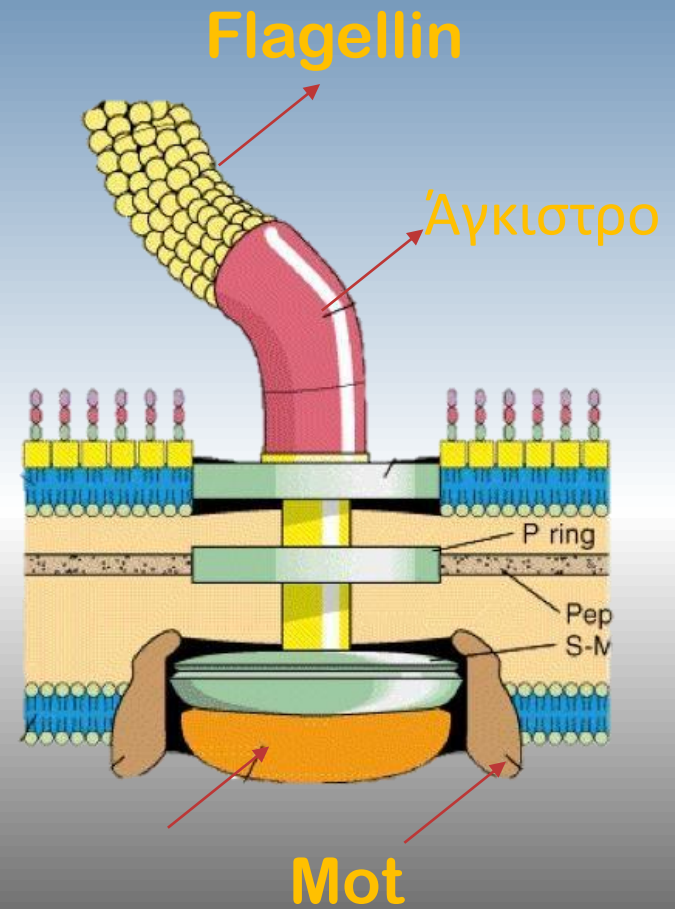
Συνθάση του ATP

39



Το βακτηριακό μαστίγιο

40



Γιατί μας ενδιαφέρουν οι μοριακοί κινητήρες;

- ✓ Σχετίζονται με τη βιολογία:

Σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες

- ✓ Σχετίζονται με την ιατρική:

Μεταφορικές ανωμαλίες οδηγούν σε ασθένειες.

Η ρύθμιση των μοριακών κινητήρων μπορεί να επιφέρει θεραπείες.

- ✓ Σχετίζονται με τη (νανο)μηχανική:

Η κατανόηση του πώς οι μοριακοί κινητήρες λειτουργούν στο επίπεδο νανομέτρων μπορεί να μας επιτρέψει την παραγωγή μικρών (νανοκλίμακα) μηχανών

Φυσικές συνθήκες

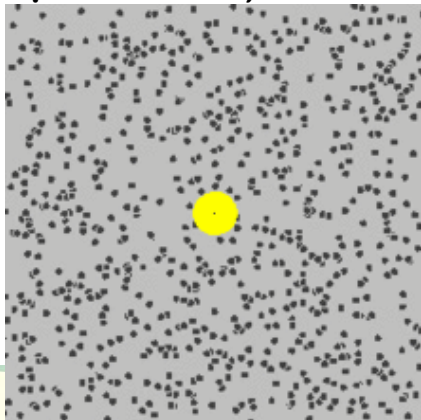
Τα βιομόρια ακολουθούν τους ίδιους φυσικούς κανόνες;

- Τι δεν είναι σημαντικό για τους μικροκινητήρες που είναι σημαντικό για εμάς?

Αδράνεια (διάχυση) & Ορμή

- Τί είναι πιο σημαντικό

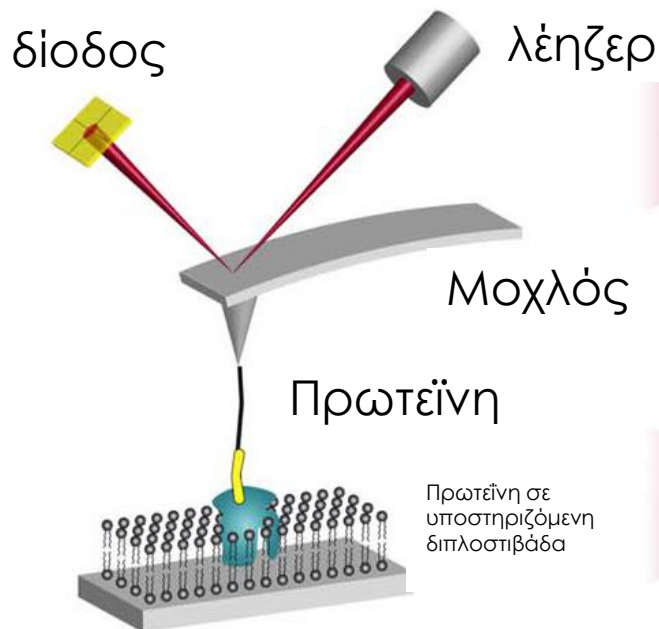
Ιξώδες, θερμικός θόρυβος **Thermal noise (assumptions; local equilibriums)**



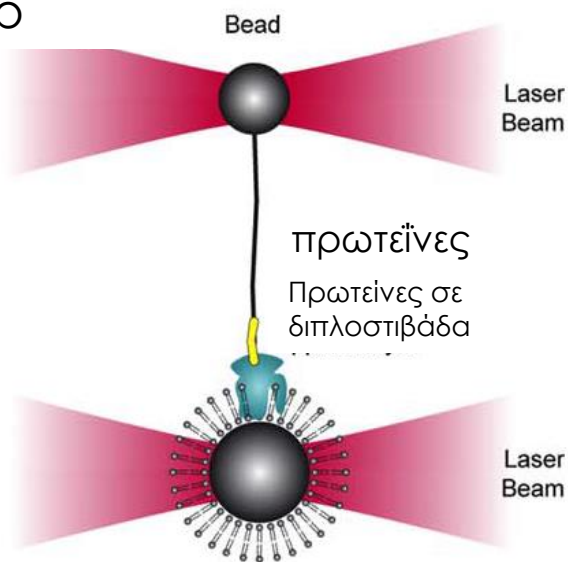
(started in 1927 drop no. 9)
The pitch drop experiment (Ig Noble 2005)
R. Edgeworth, B.J. Dalton and T. Parnell
Eur. J. Phys (1984) 198-200

Πώς τα ξέρουμε όλα αυτά;

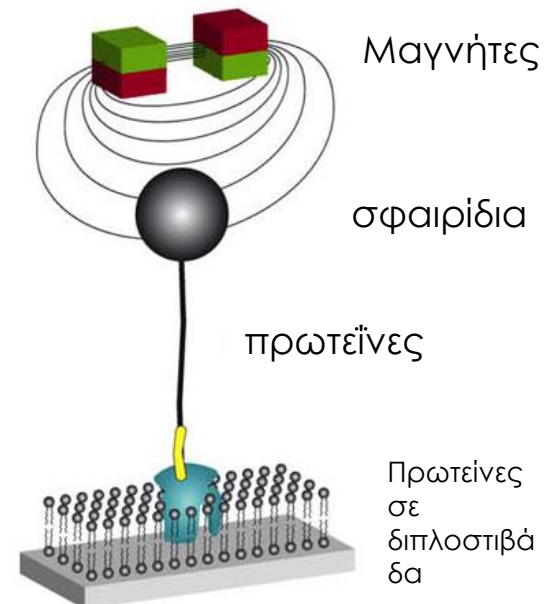
(a) AFM



(b) Οπτική παγίδα



(c) Μαγνητική παγίδα



Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles

A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu

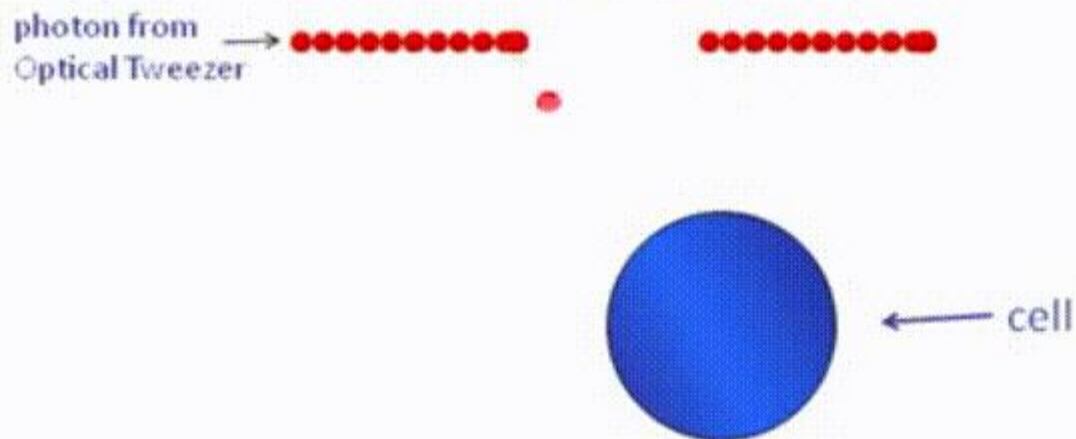
Author Information ▾

Find other works by these authors ▾

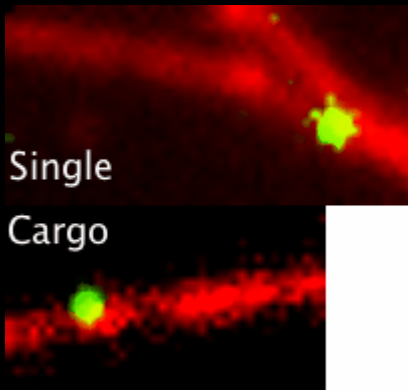
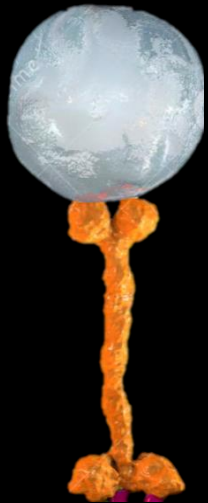
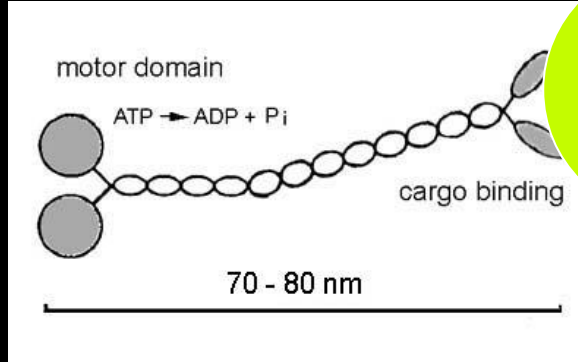


44

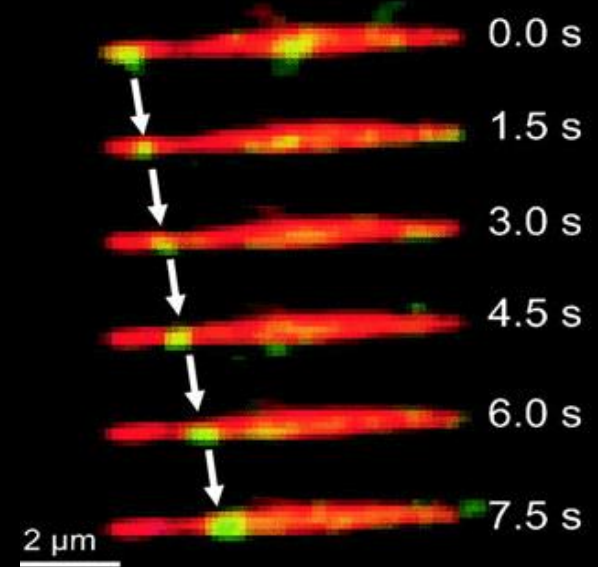
How optical tweezers work:
Forces created by photons



Θεωρητικά μοντέλα



Ross lab



$$V=s/t$$

Δύναμη ~ pN

Απόσταση ~ nm

- Χρησιμοποιεί **ATP**
- Μετακίνηση πάνω σε μικροσωληνίσκους, μονομερές μέγεθος **8 nm**
- Μετακίνηση περίπου **100 βημάτων**
- Δύναμη **6-7 pN**

Θεωρητικά μοντέλα

Κινητήρες που κινούνται



Σε μικρά γκρουπ
(e.g. κινεσίνη)



Porters



Μη κινούμενοι κινητήρες



Δουλεύουν σε γκρουπ (π.χ. μυοσίνη II)



Rowers



Την επόμενη φορά...

47

**7. Λειτουργική απεικονιστική
ανάλυση** (FRAP, FRET, FLIM,
Molecular tracks, diffusion
coefficient, κτλ.)