

Super risoluzione ottica

Francesca Intonti

Dipartimento di Fisica e Astronomia, Università degli studi di Firenze

Laboratorio Europeo per le Spettroscopie Non-lineari – LENS



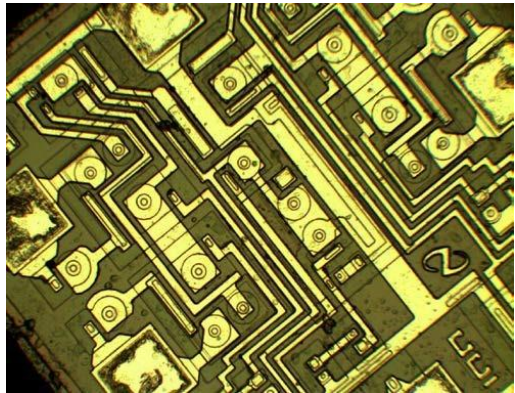
Risoluzione ottica

Risoluzione

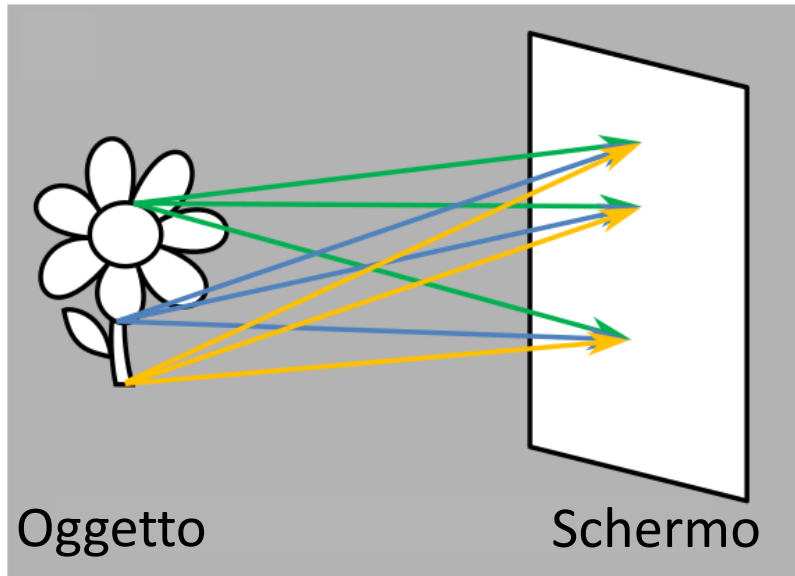


Strumenti ottici

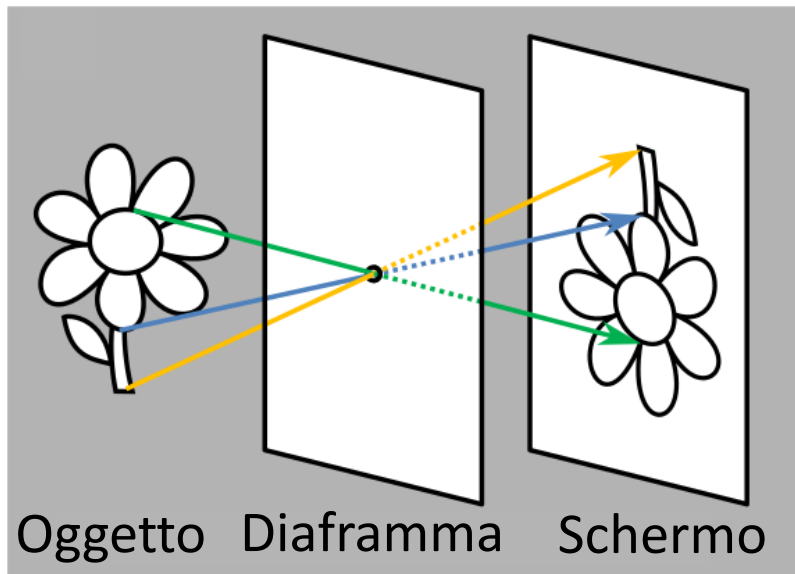
Capacità di distinguere dettagli che sono separati nel campione in osservazione anche nell'immagine del campione stesso



Formazione dell'immagine

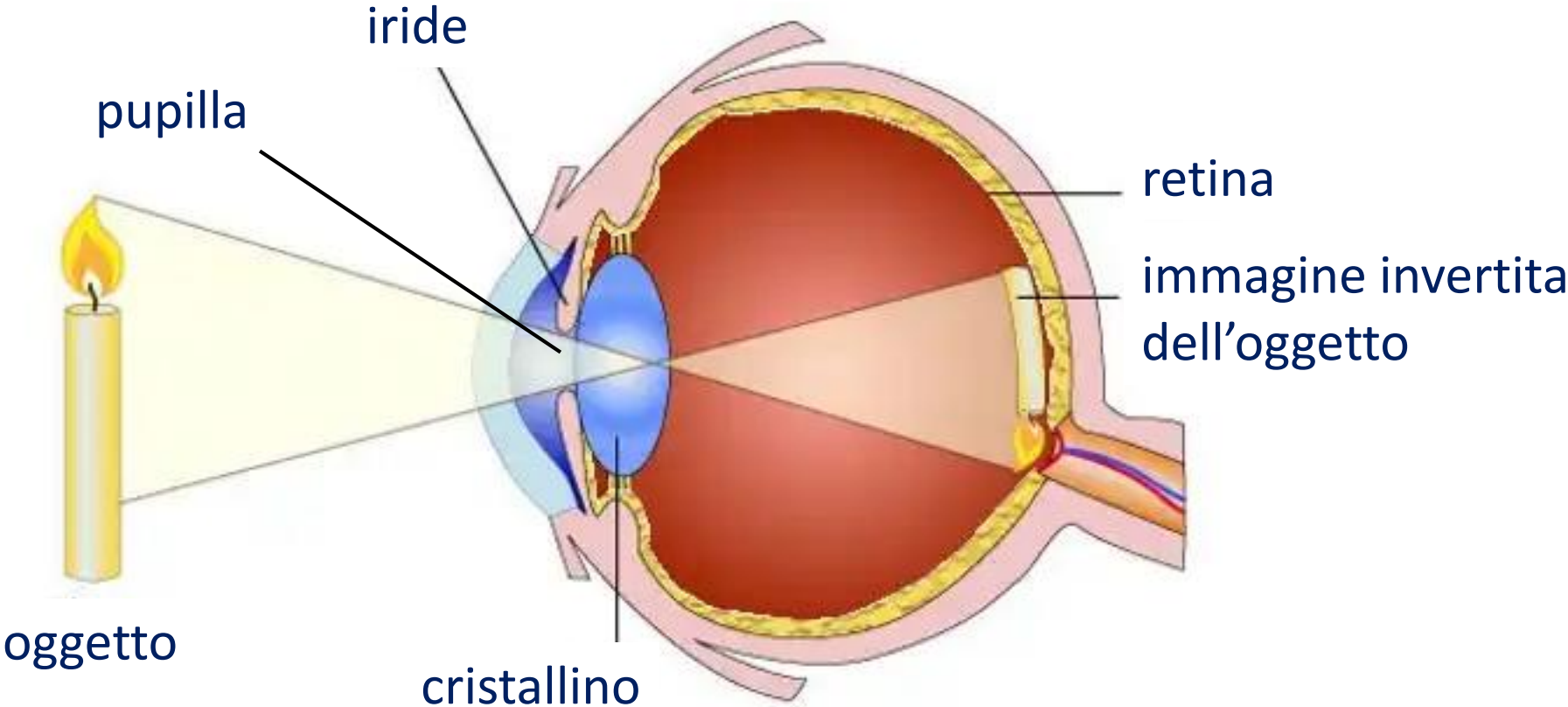


Raggi di luce provenienti da diversi punti dell'oggetto si sovrappongono

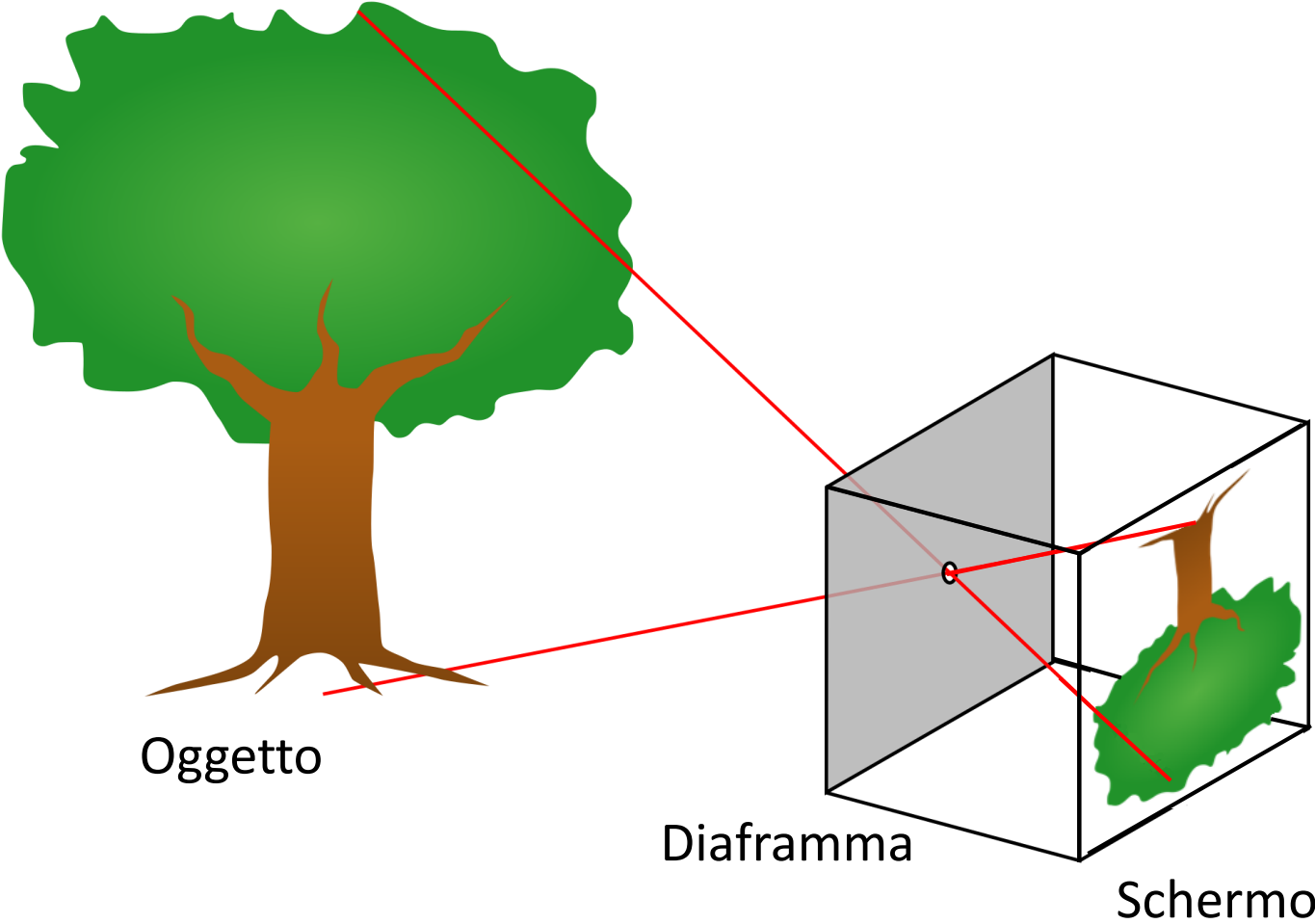


Diaframma filtra i raggi di luce, determinando una una corrispondenza uno a uno tra i punti dell'oggetto e i punti dello schermo

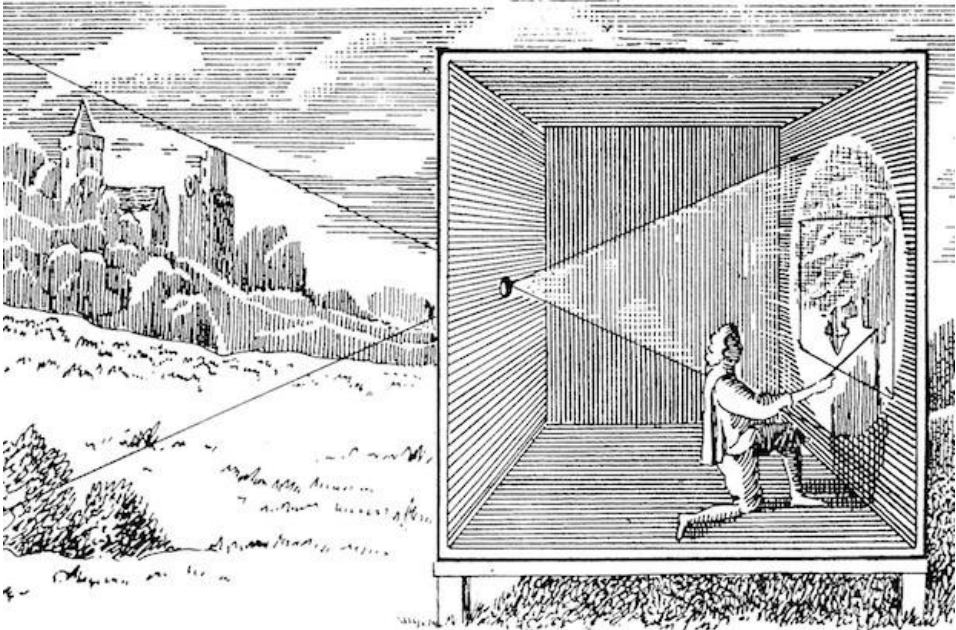
Formazione dell'immagine nell'occhio



Formazione dell'immagine: Camera oscura



Camera Oscura



Formazione dell'immagine: Camera oscura

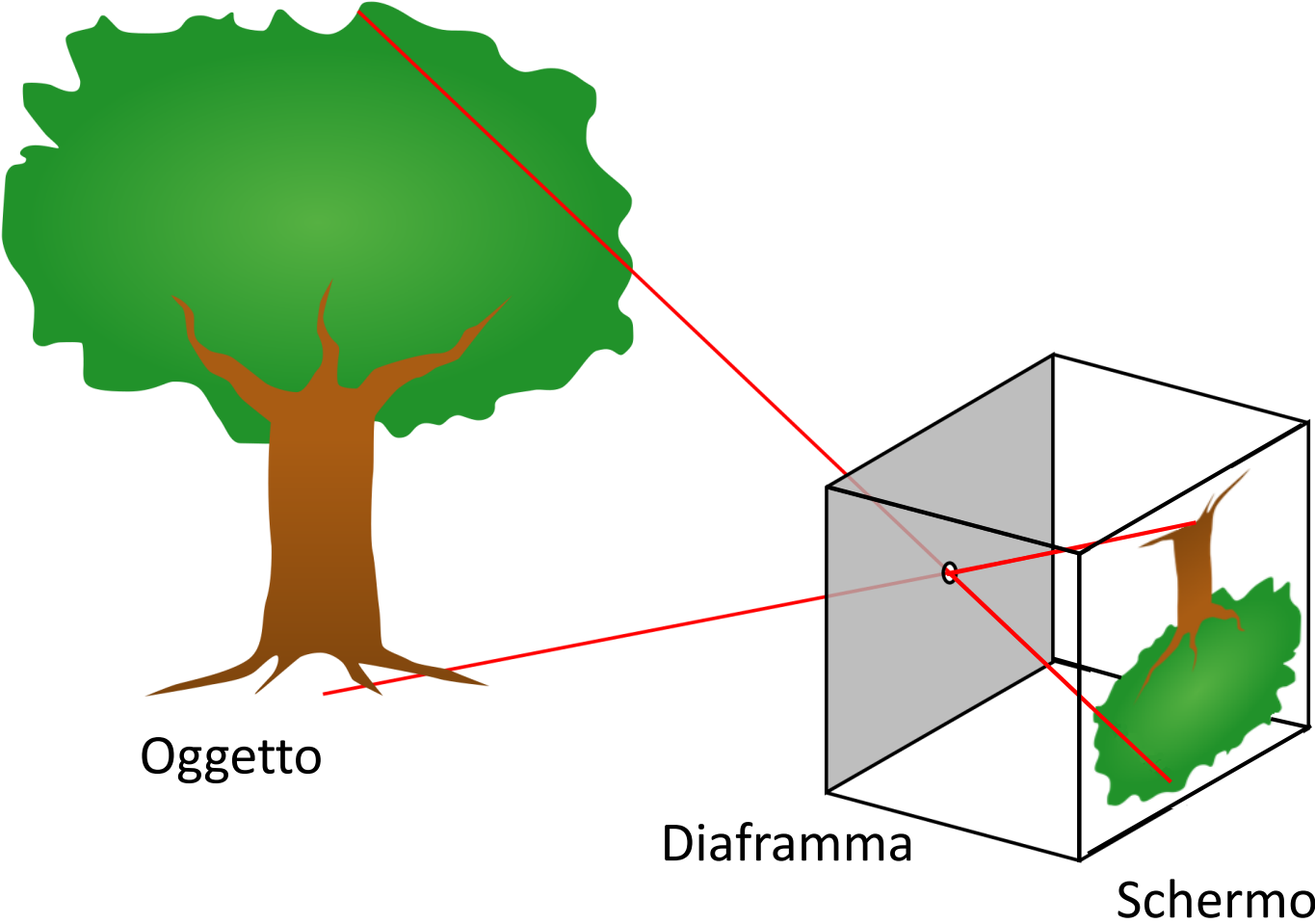


Canaletto (1697-1768): Veduta ottenuta accostando quattro fogli disegnati con l'aiuto di una camera oscura

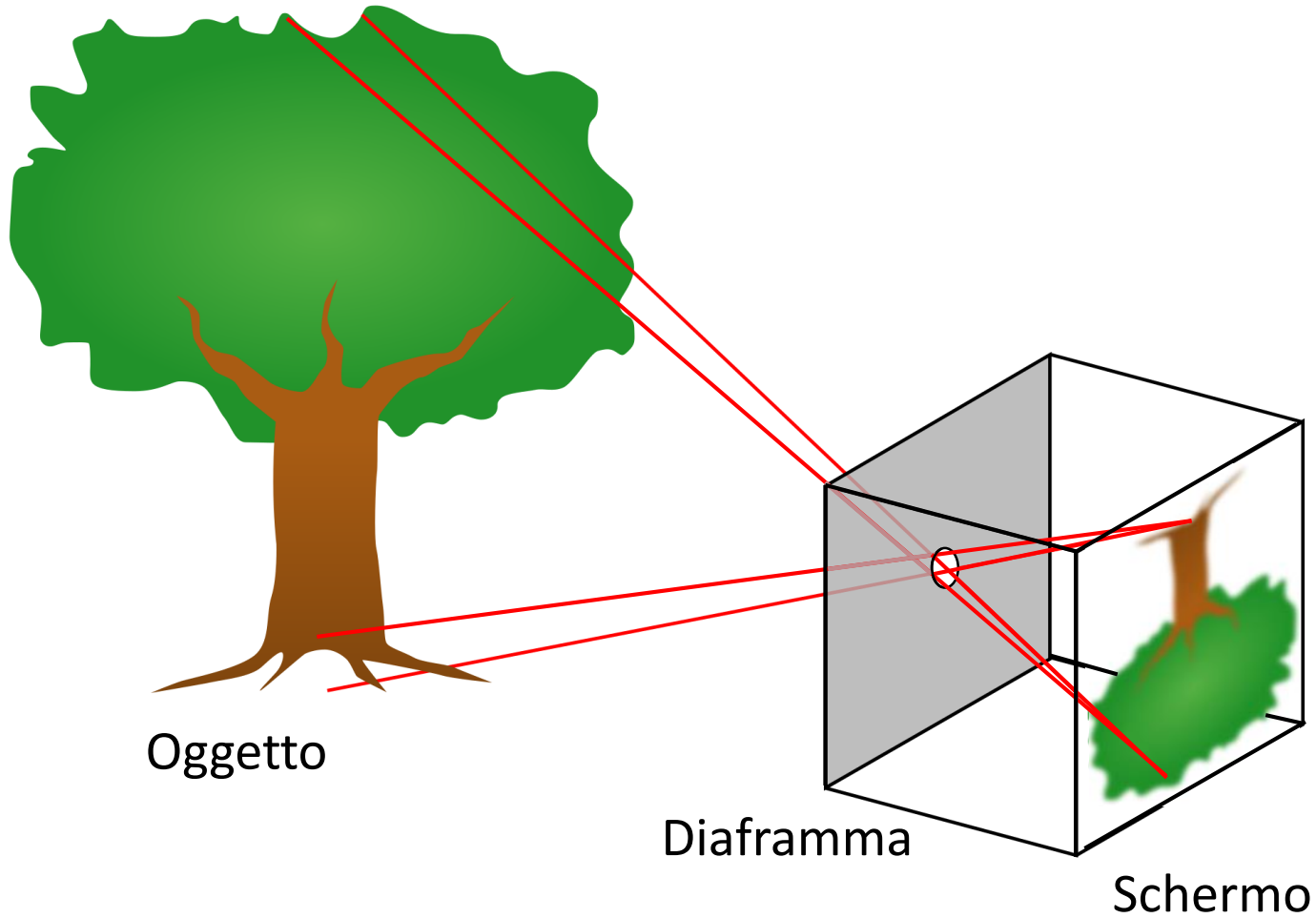


Canaletto (1738)
Campo Santi Giovanni e Paolo, Venezia
Royal Collection Trust – London (UK)

Formazione dell'immagine



Formazione dell'immagine

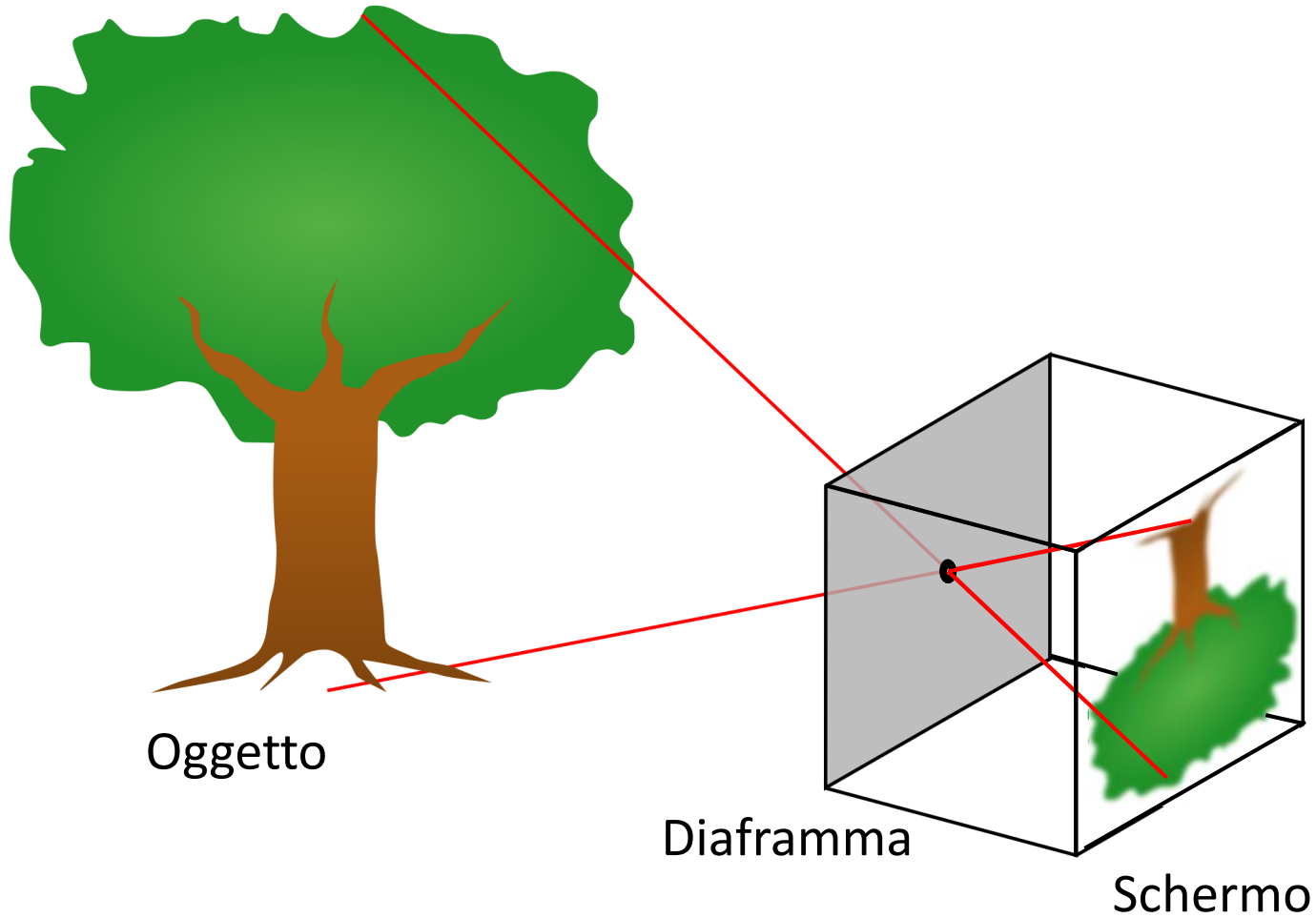


Foro troppo grande:
Immagine sfocata



scarso filtro spaziale

Formazione dell'immagine



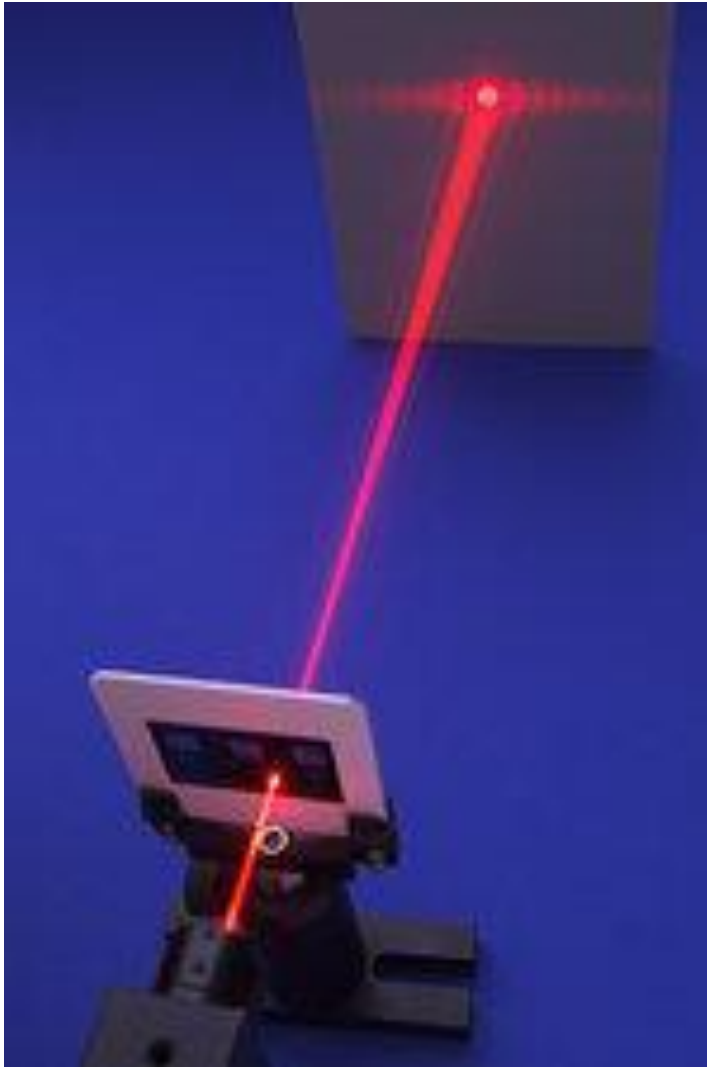
Foro troppo piccolo:
Immagine sfocata



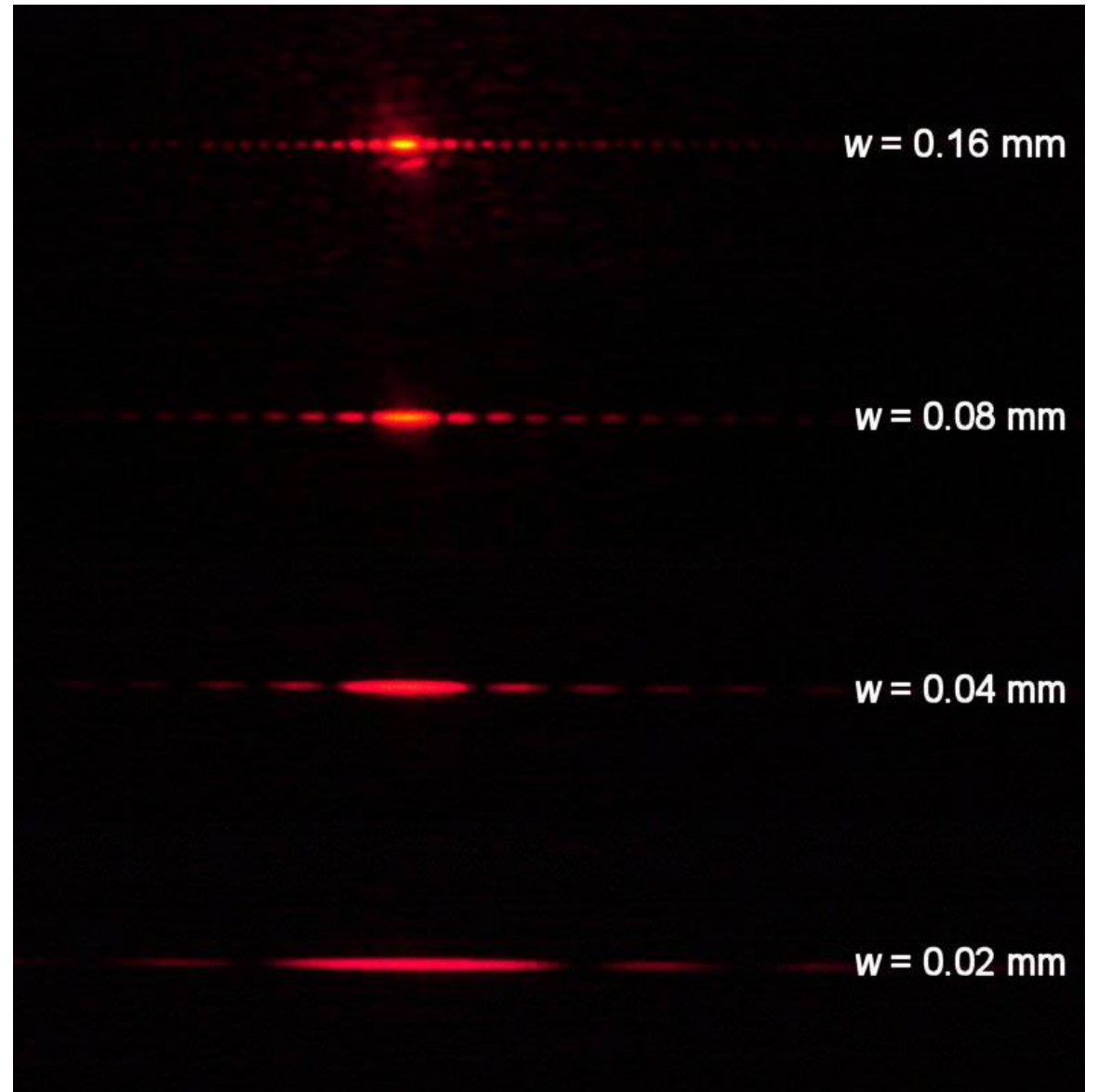
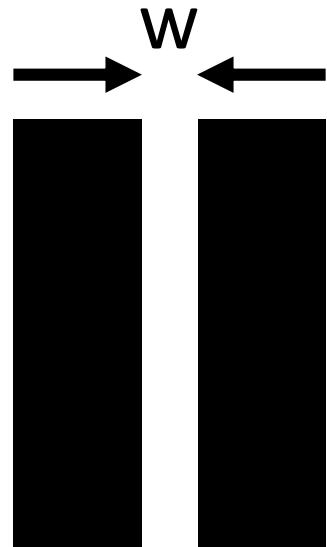
diffrazione

Diffrazione

Laser attraverso una fenditura



$\lambda \approx 600 \text{ nm}$



Diffrazione

Apertura quadrata

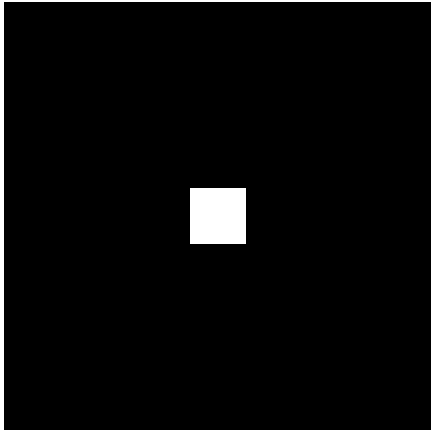
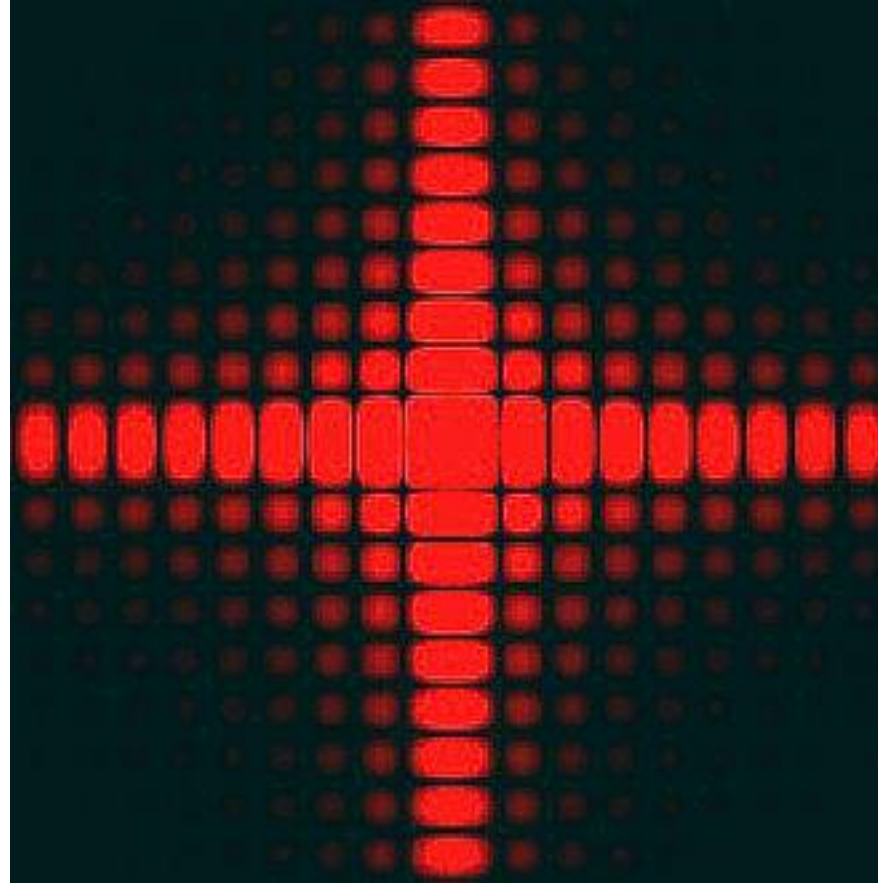
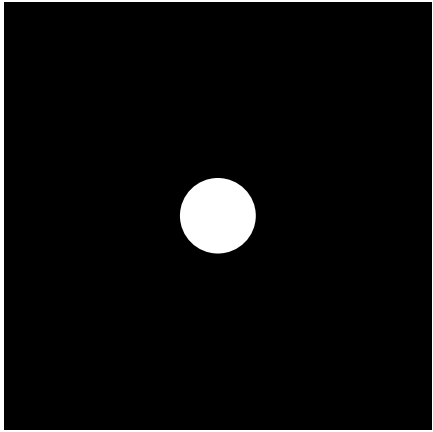


Figura di diffrazione

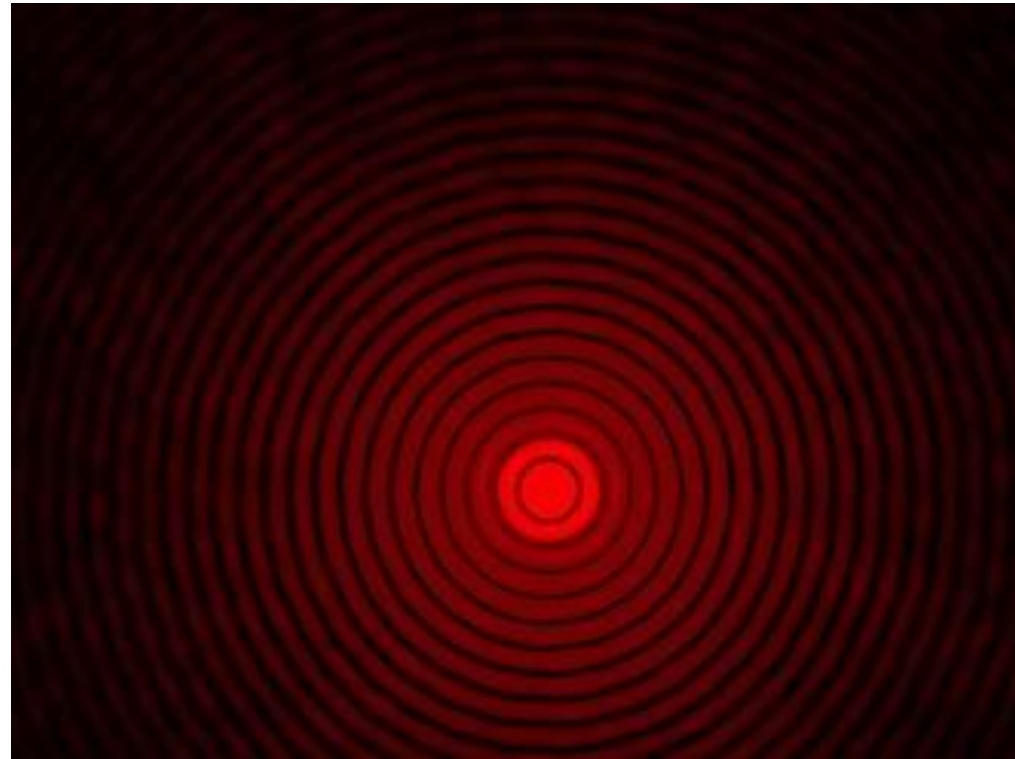


Apertura circolare



$$w = 90 \mu\text{m}$$

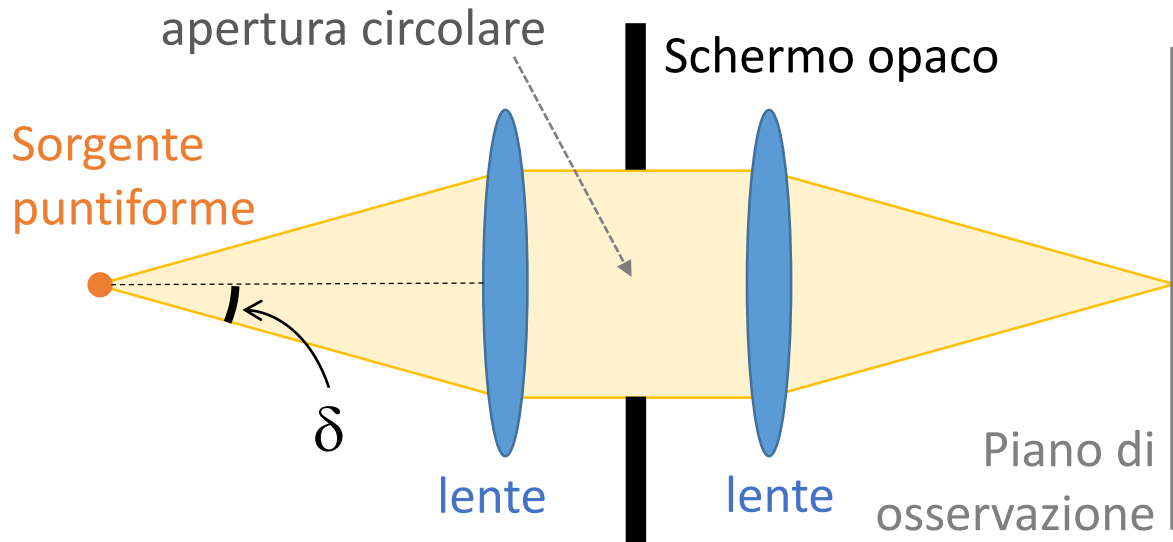
Figura di diffrazione



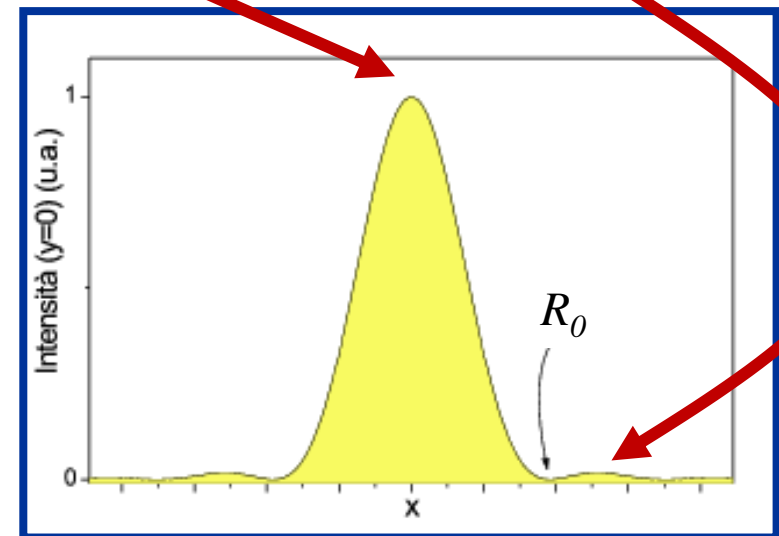
Disco di Airy

Risoluzione ottica

Luce trasmessa attraverso un'apertura circolare di raggio $\gg \lambda$



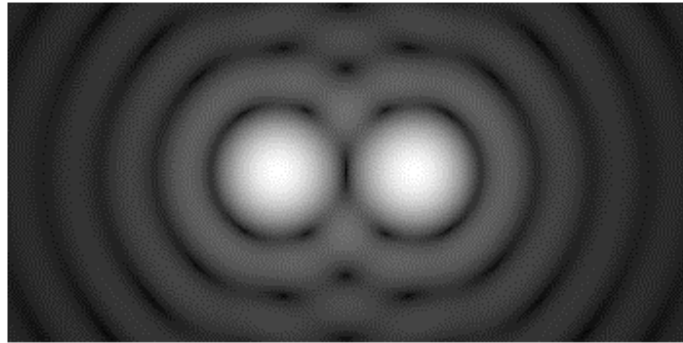
Disco di Airy Primo anello di diffrazione



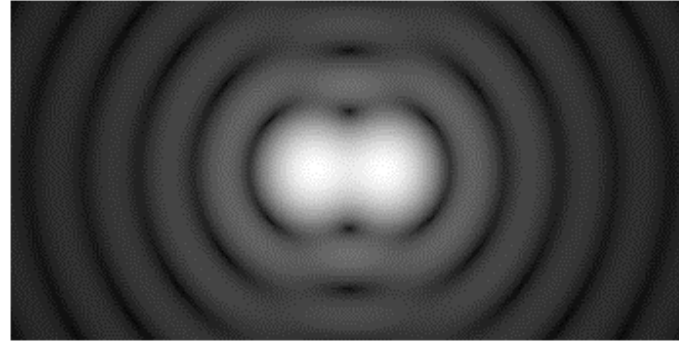
$$R_0 = \frac{0,61 \lambda}{n \sin(\delta)} = \frac{0,61 \lambda}{NA}$$

NA: apertura numerica dell'obiettivo

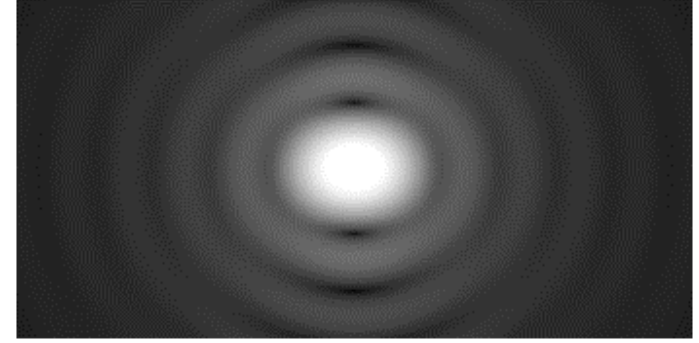
Risoluzione ottica: criterio di Rayleigh



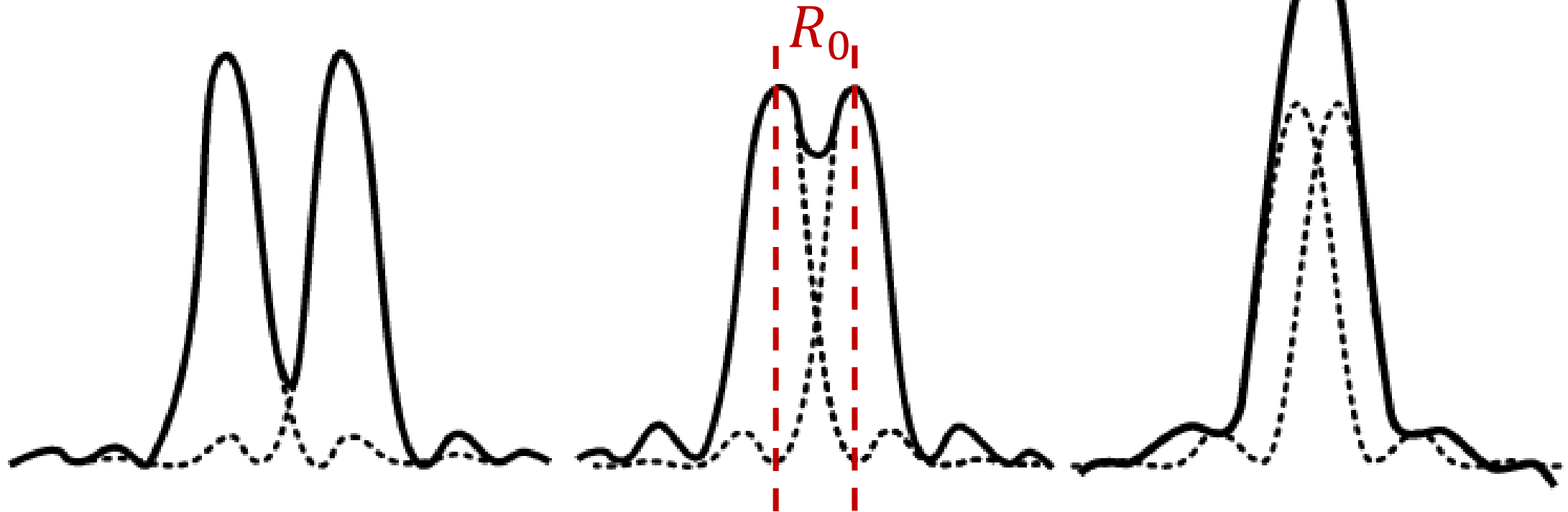
Risolti



Criterio di Rayleigh



Non risolti



Risoluzione ottica: criterio di Rayleigh

NA: 0,3 – 0,9
1,4 per obiettivi ad
immersione

$$R_0 = \frac{0,61 \lambda}{NA}$$

Lunghezza d'onda (nm)	Risoluzione ottica (nm)
350	153
400	174
450	196
500	218
550	240
600	261
650	283
700	305

Risoluzione ottica: Point Spread Function - PSF

Point spread function - PSF

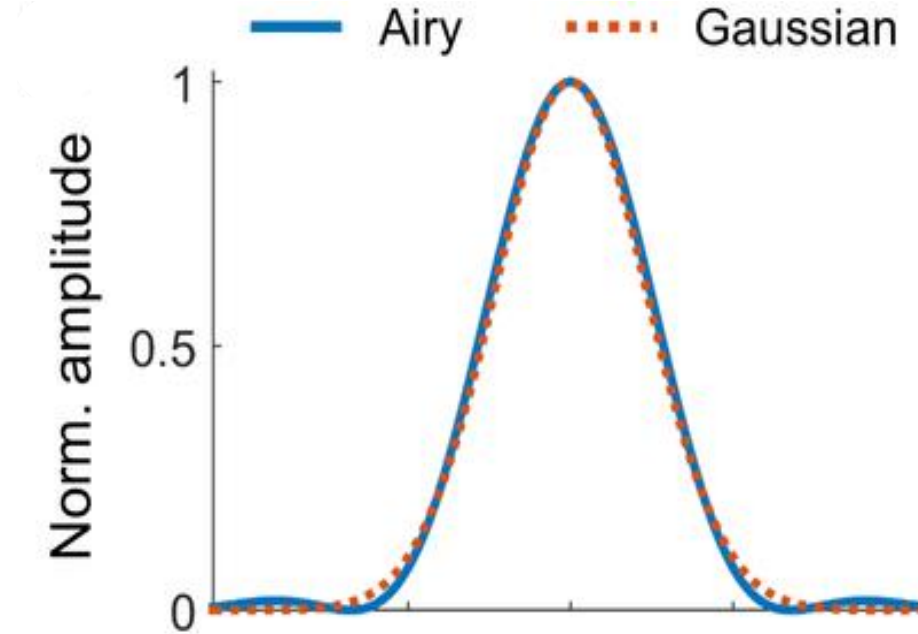
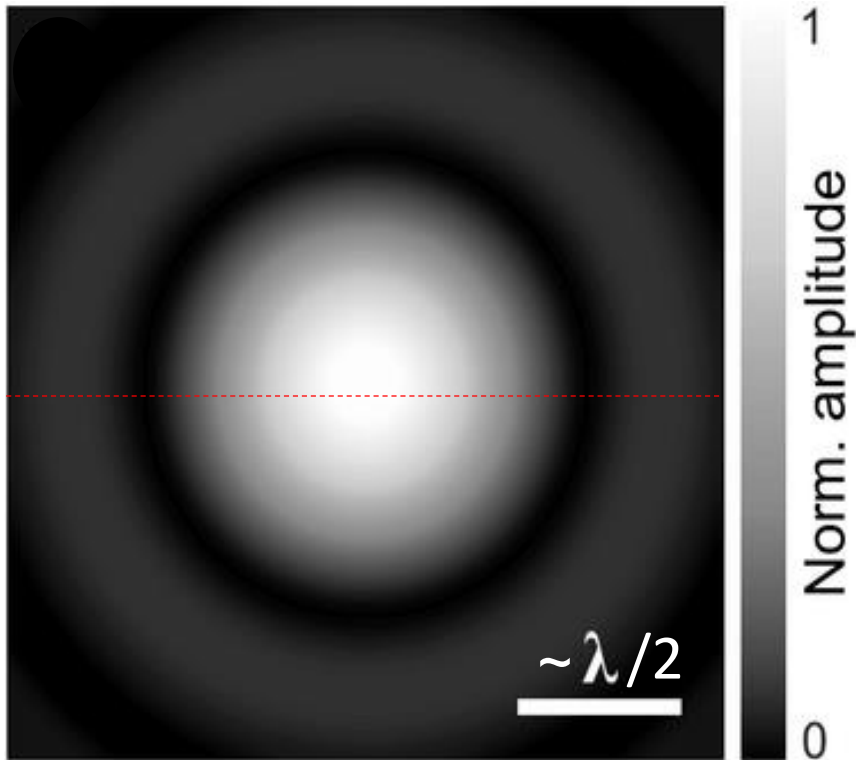
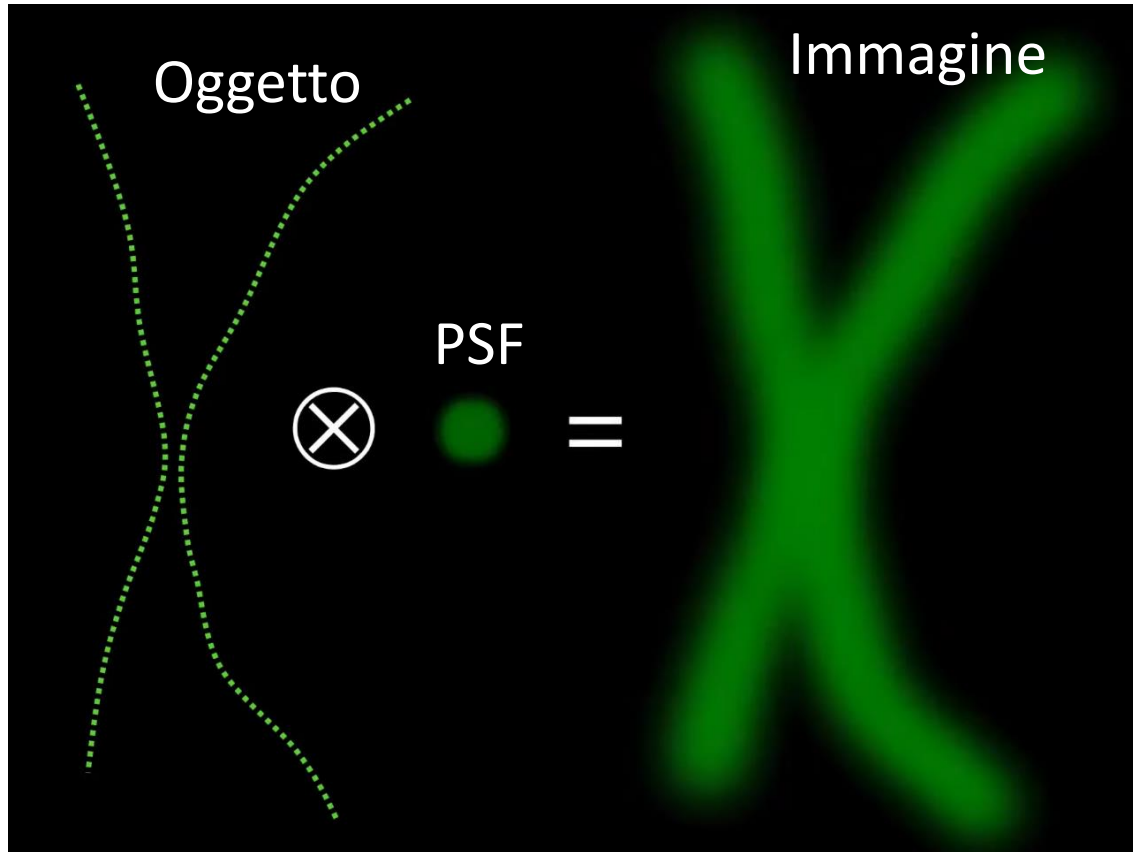


Immagine = Oggetto convoluto PSF



Microscopio con obiettivo NA = 1,4
+
luce verde
=
Risoluzione spaziale: 240 nm

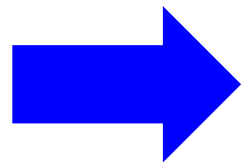
Campione biologico di microtuboli : diametro 25 nm

Proteine fluorescenti

Proteine fluorescenti:
emettono fluorescenza se
opportunamente illuminate



~ 1 nm



Luce blu

+



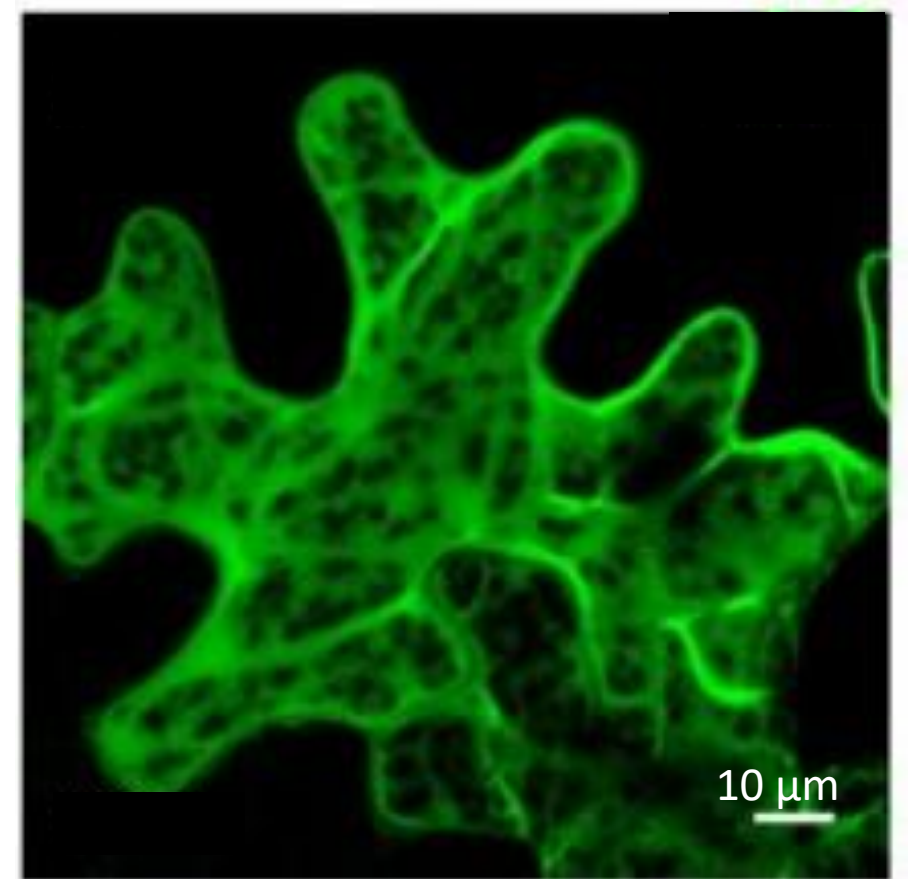
Proteina
fluorescente

=



Fluorescenza verde

Processo di ricombinazione genetica:
Proteine fluorescenti + proteine target



Localizzazione subcellulare

Proteine fluorescenti: diagramma energetico (semplificato)

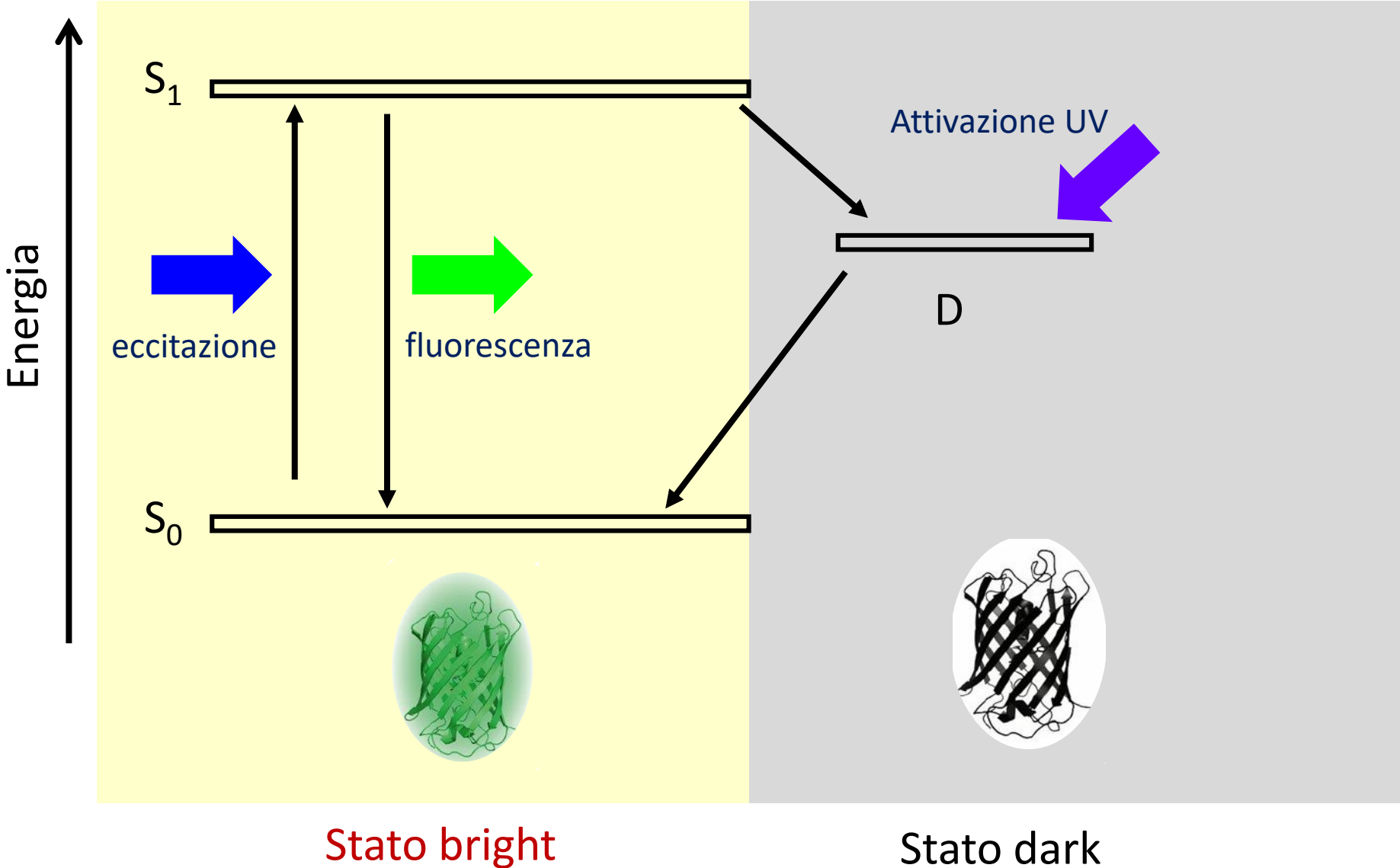
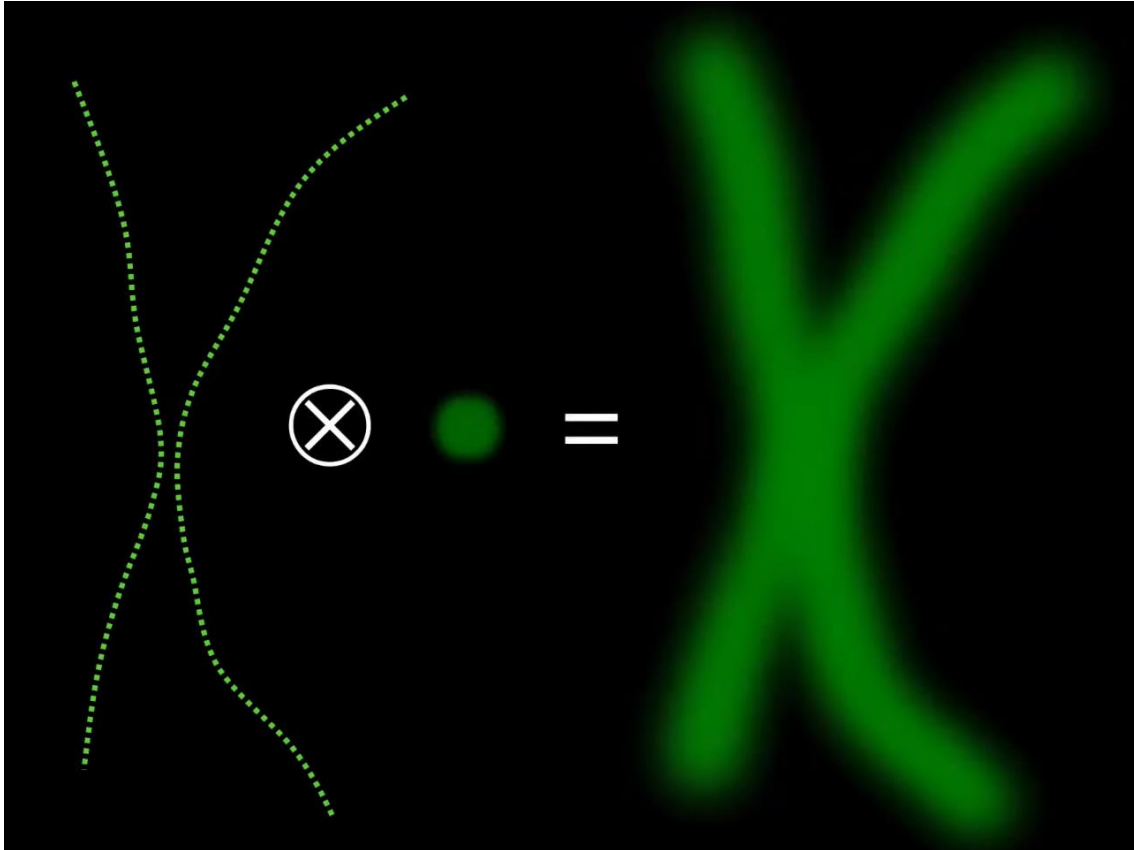


Immagine = Oggetto convoluto PSF



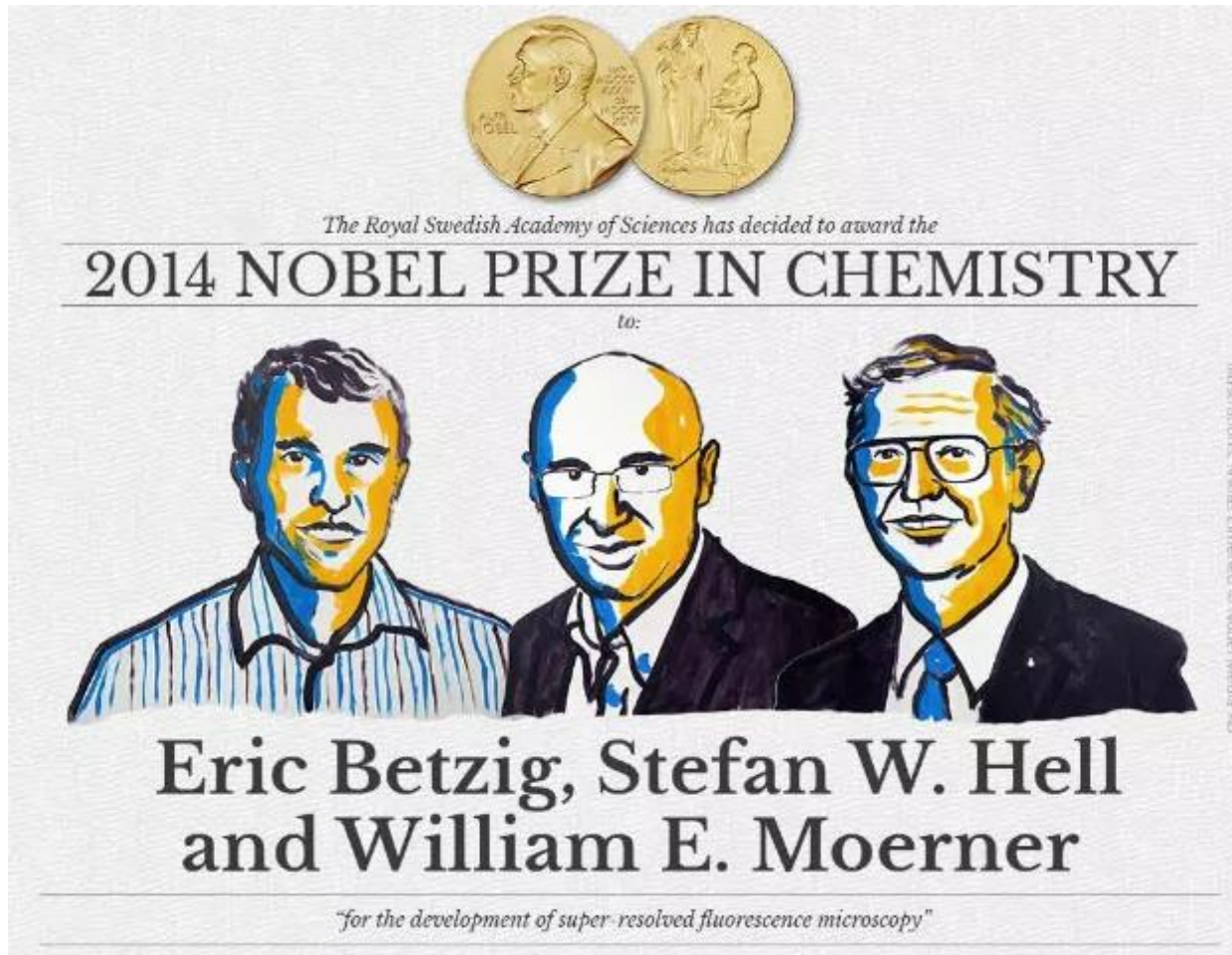
Campione biologico di microtuboli : diametro 25 nm

Microscopio con obiettivo NA = 1,4
+
luce verde
=
Risoluzione spaziale: 240 nm

$$R_0 \approx \frac{\lambda}{2}$$

Premio Nobel per la Chimica 2014

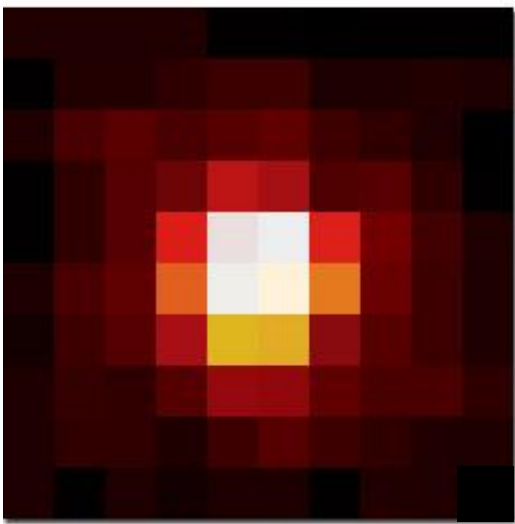
Superamento dei limiti della microscopia ottica



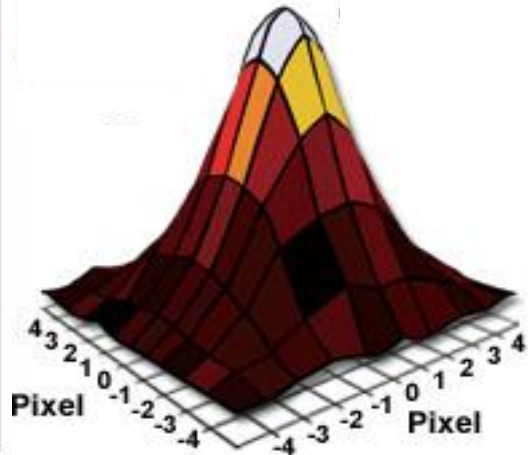
Con l'aiuto di molecole fluorescenti, i Premi Nobel per la Chimica 2014 hanno ingegnosamente aggirato il limite della risoluzione spaziale. Il loro lavoro innovativo ha portato la microscopia ottica nella nano-dimensione

Localizzazione di singola molecola

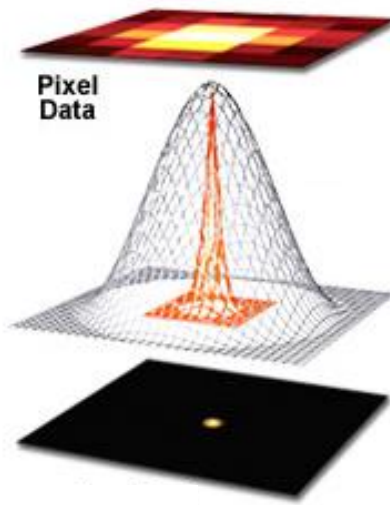
Molecola isolata



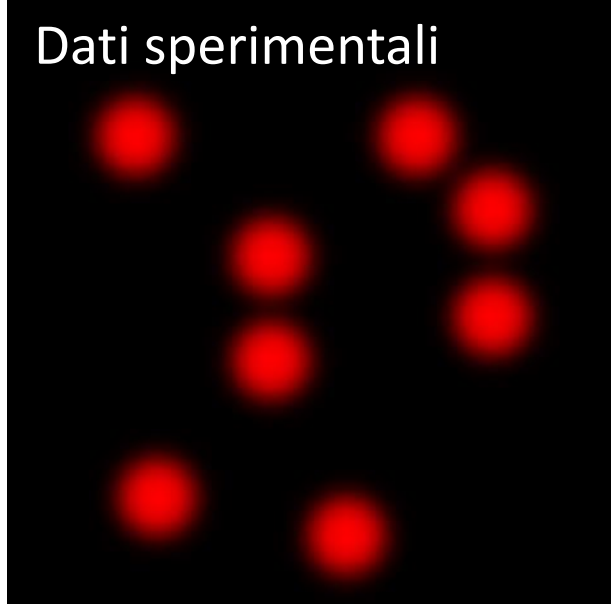
Dati sperimentali



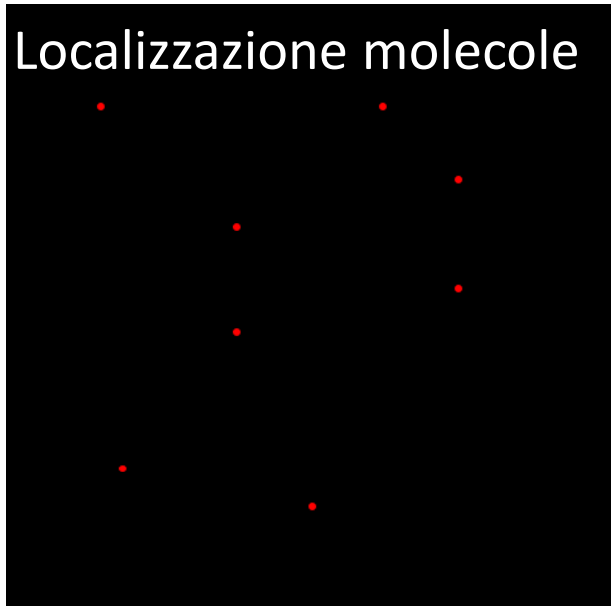
Fit Gaussiano



Localizzazione molecola

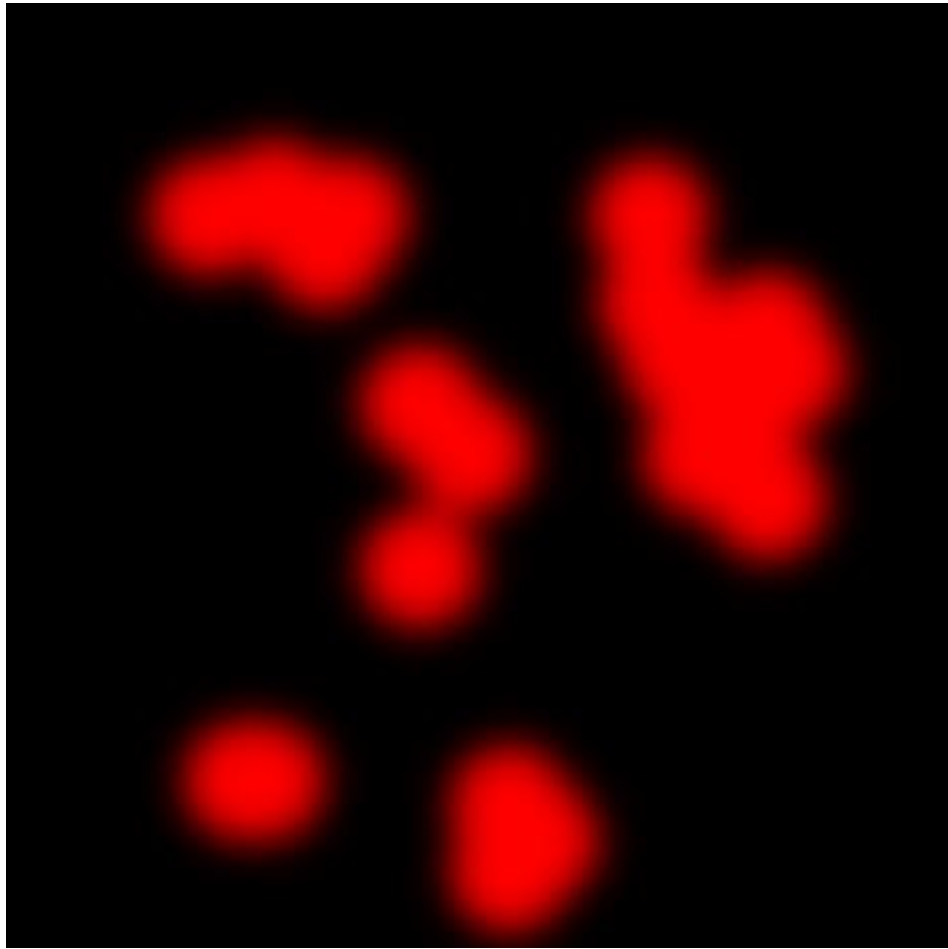


Dati sperimentali

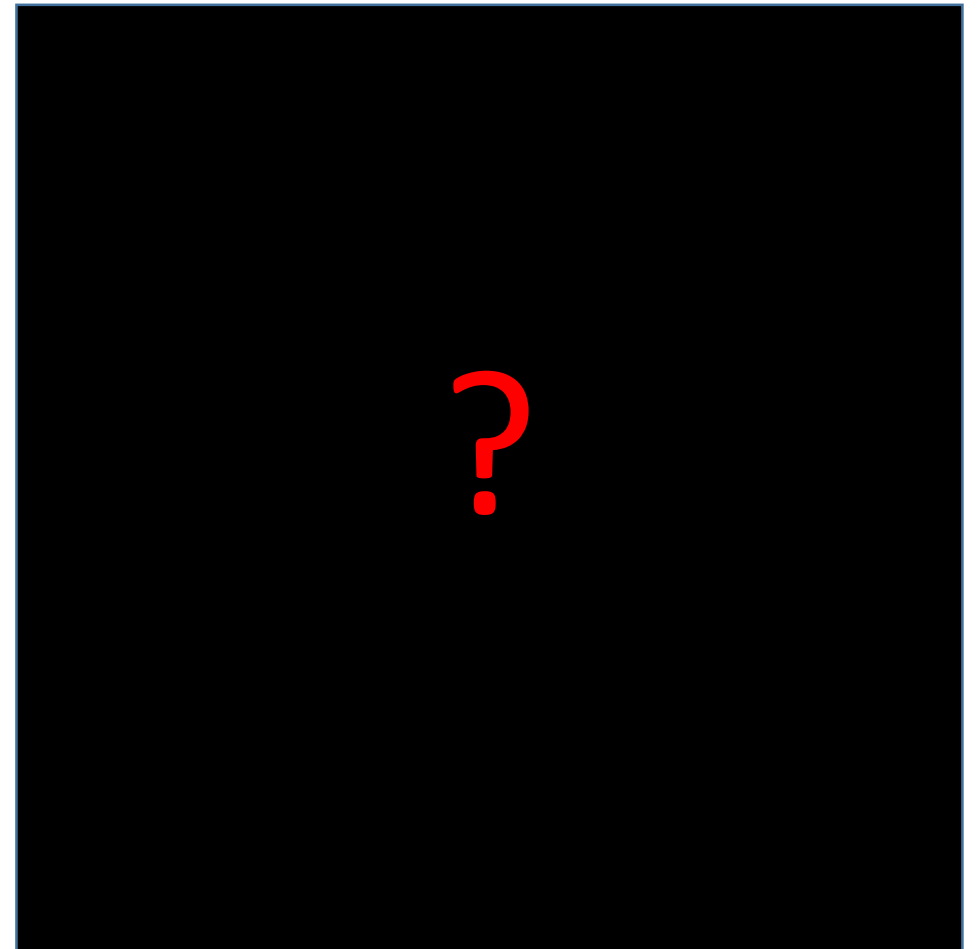


Localizzazione molecole

Localizzazione di singola molecola



Dati sperimentali



Localizzazione molecole

Localizzazione di singola molecola

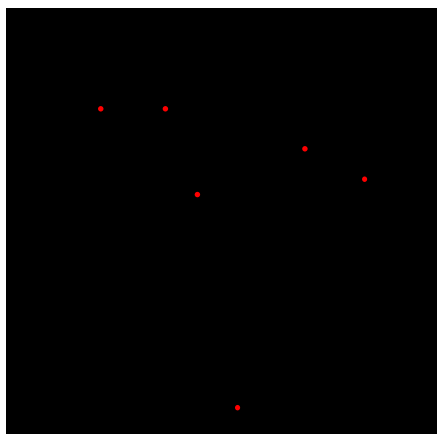
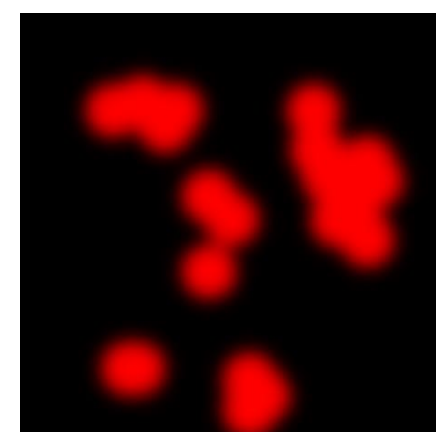
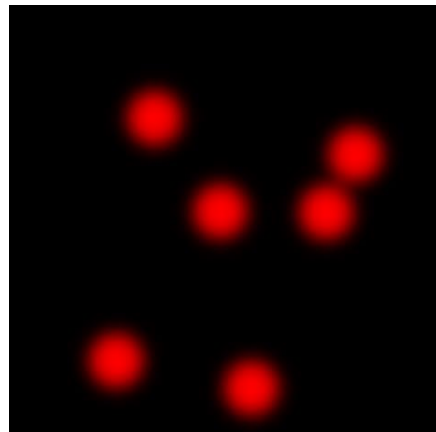
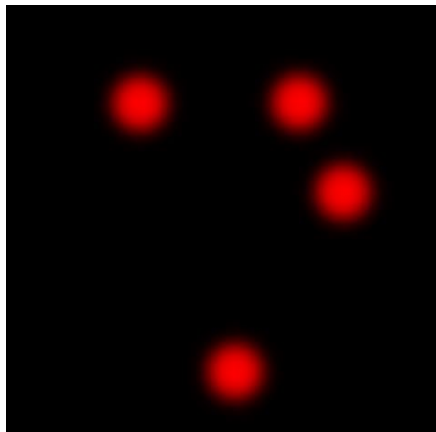
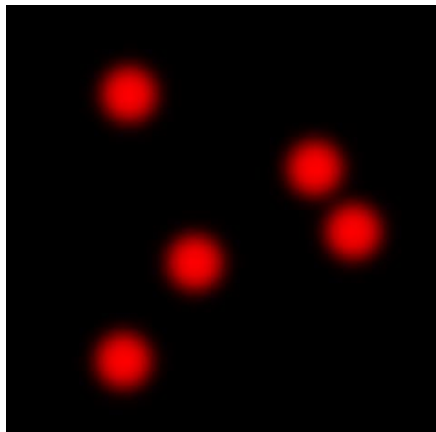
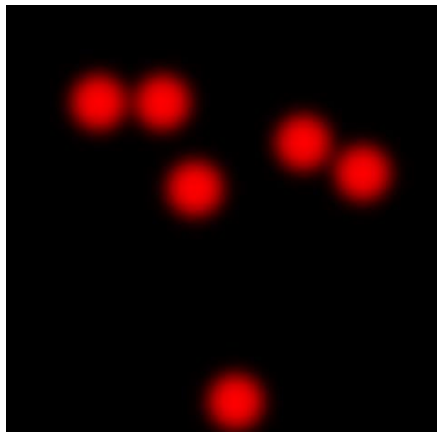
Inibire l'emissione di alcune molecole: densità delle molecole "bright" diminuisce

misura 1

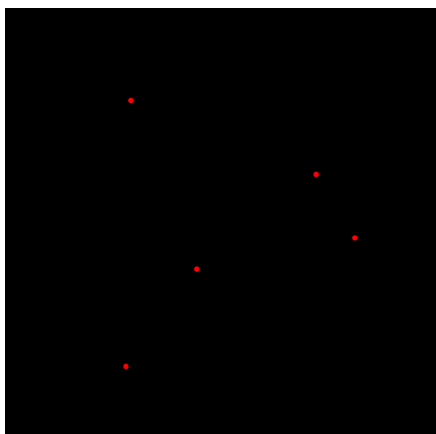
misura 2

misura 3

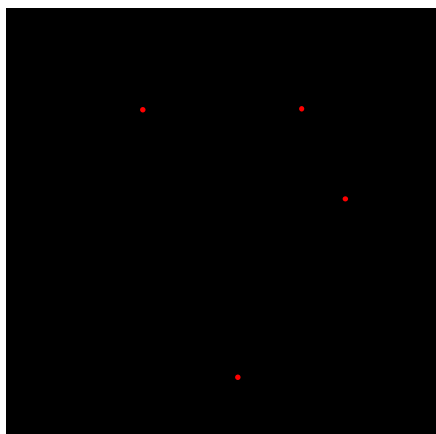
misura 4



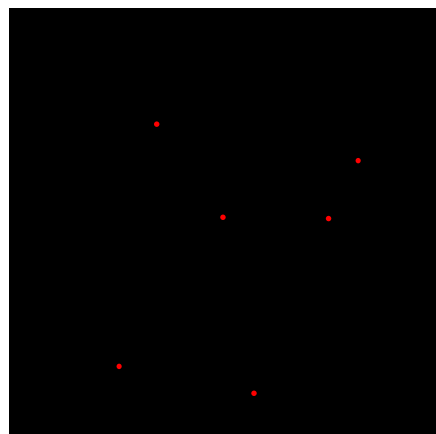
+



+



+



=

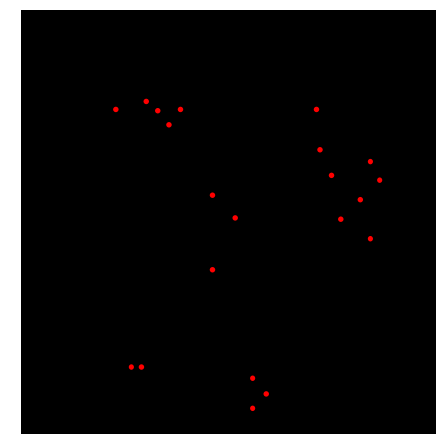


Immagine con super risoluzione

Singole misure

Misura integrate

Localizzazione
singole molecole

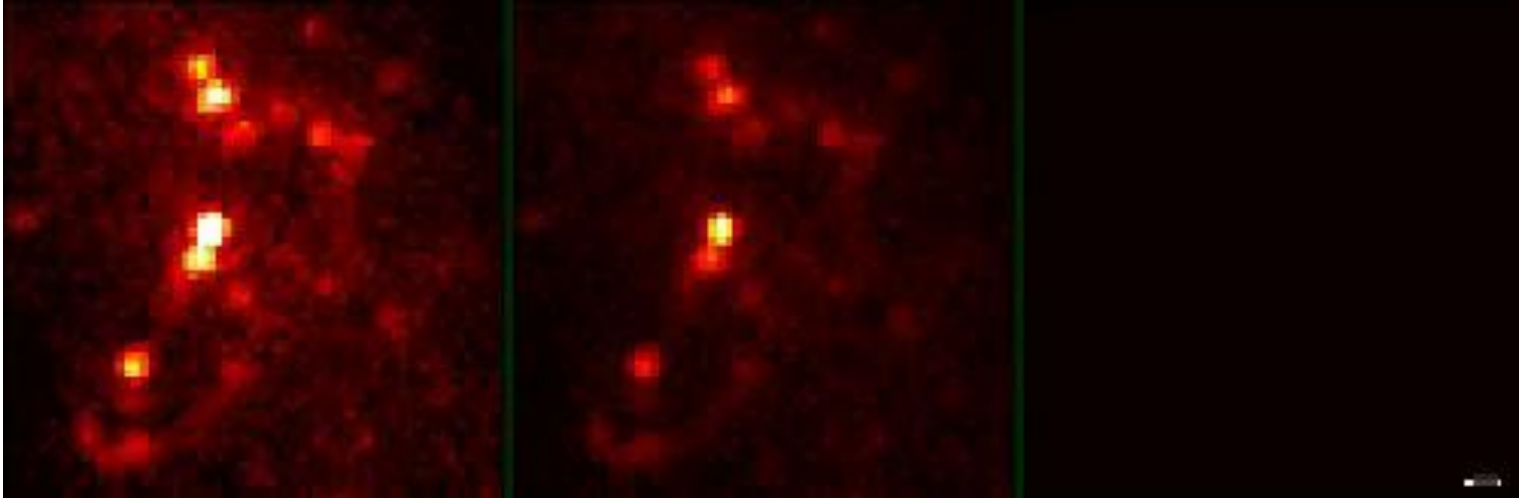
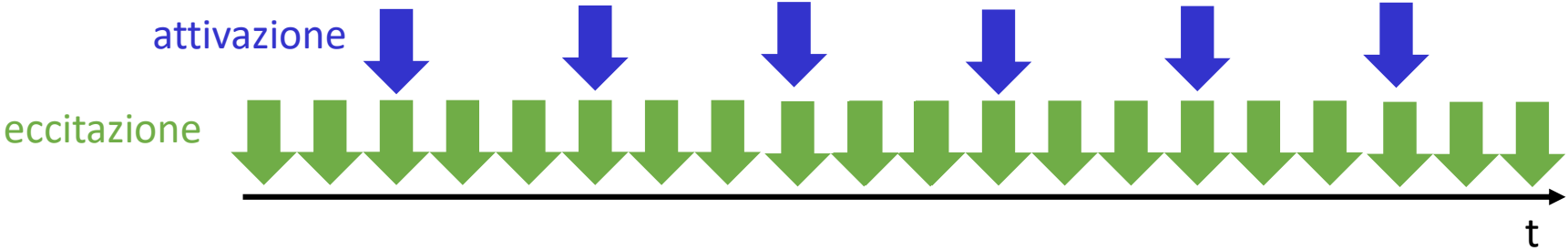


Immagine con
super risoluzione



Microscopia di fluorescenza con super risoluzione

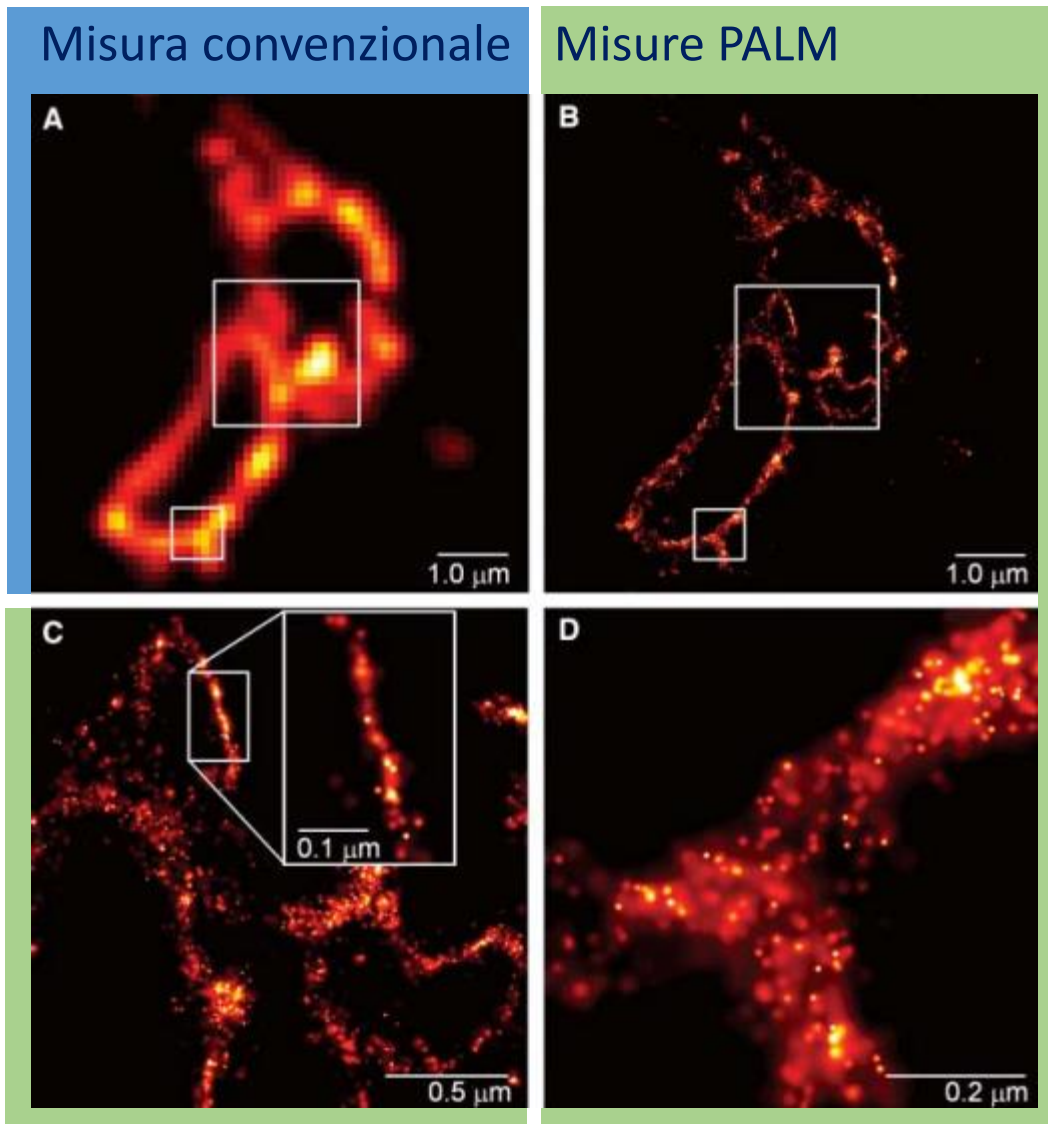
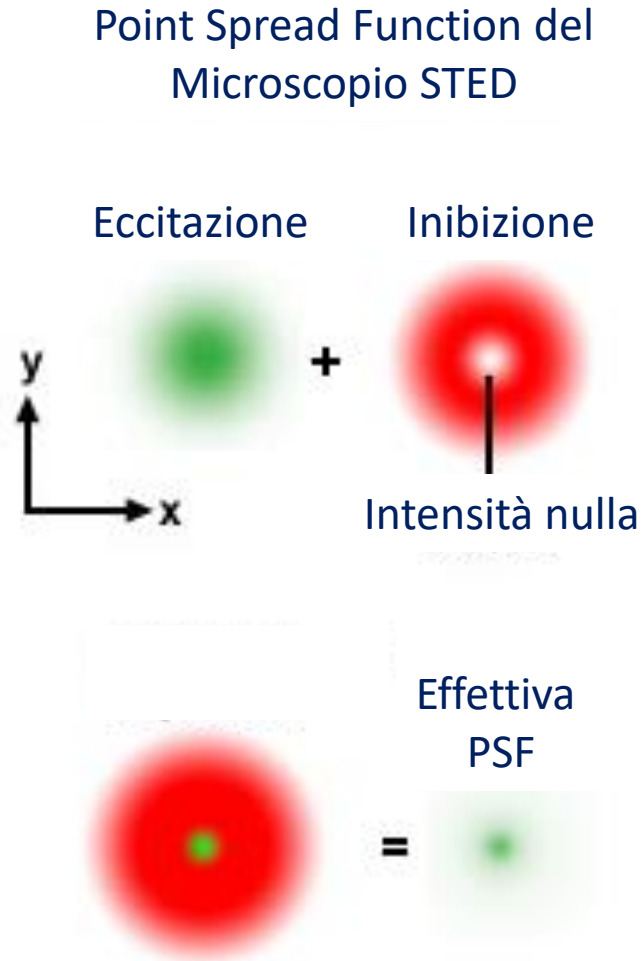


Photo Activated Localization Microscopy
(PALM)
Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
(STORM)

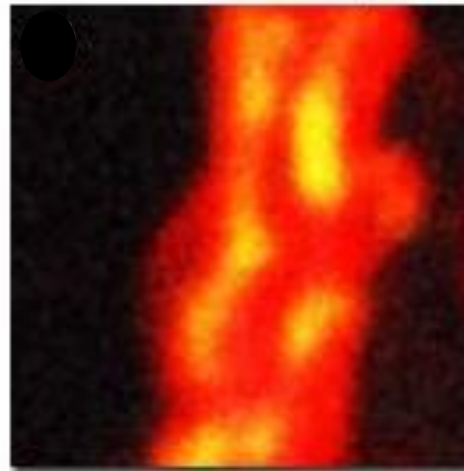
Risoluzione spaziale ~ 10-20 nm



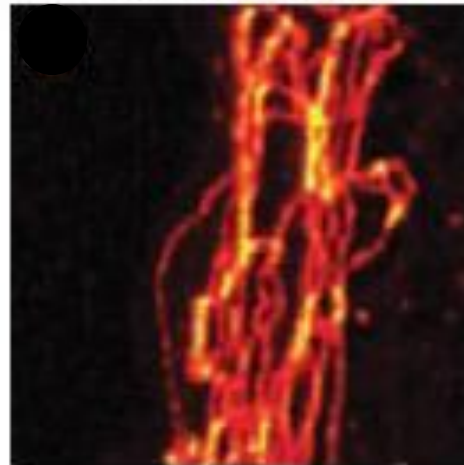
Microscopia di fluorescenza con super risoluzione



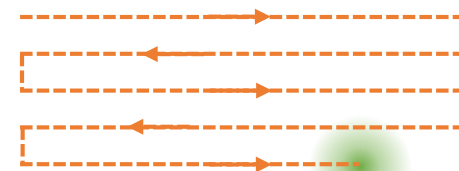
Microscopio convenzionale



Microscopio STED



Stimulated Emission Depletion (STED)

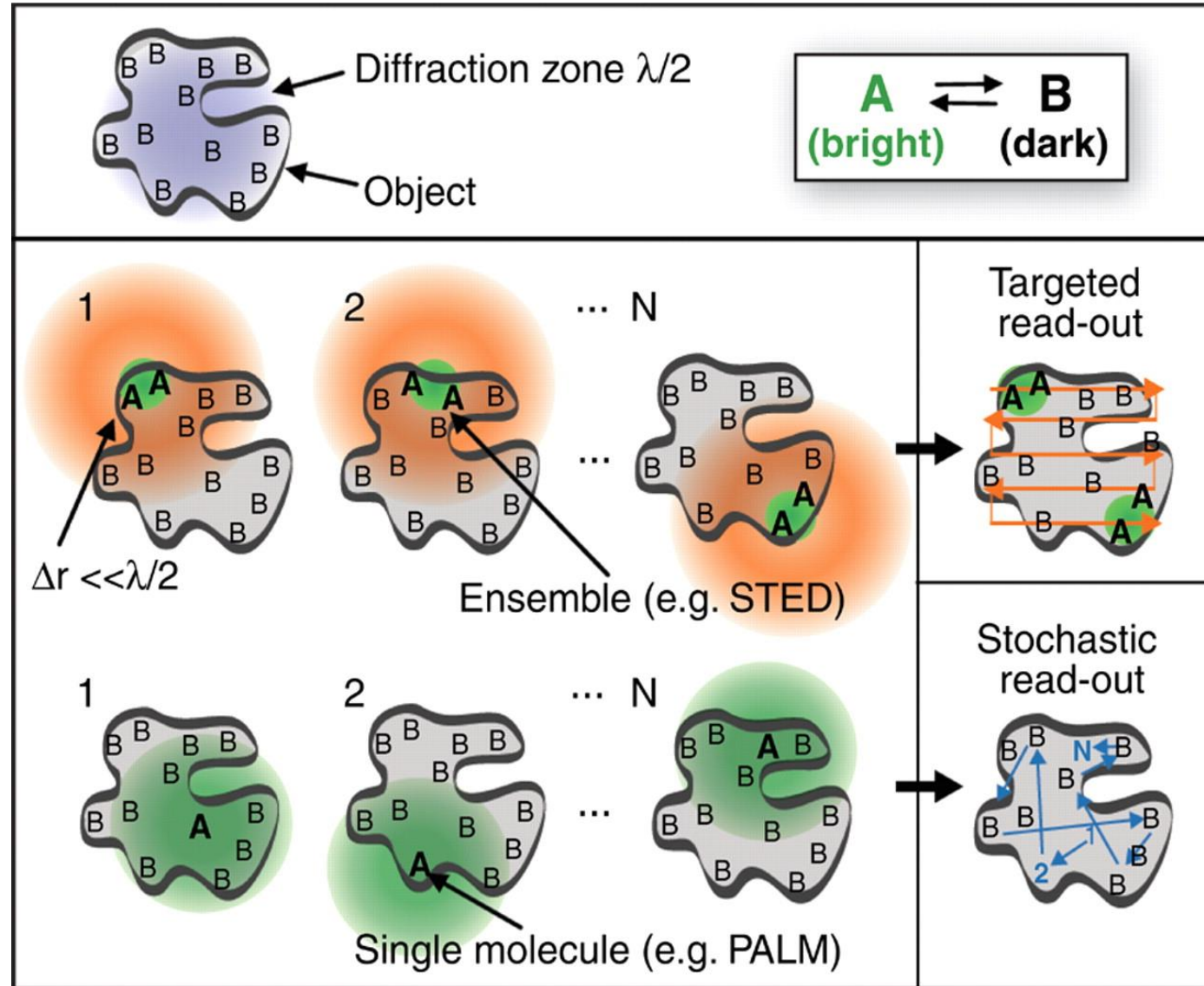


Scansione nel piano xy

Risoluzione spaziale ~ 10-20 nm

STED vs PALM/STORM

Microscopia convenzionale

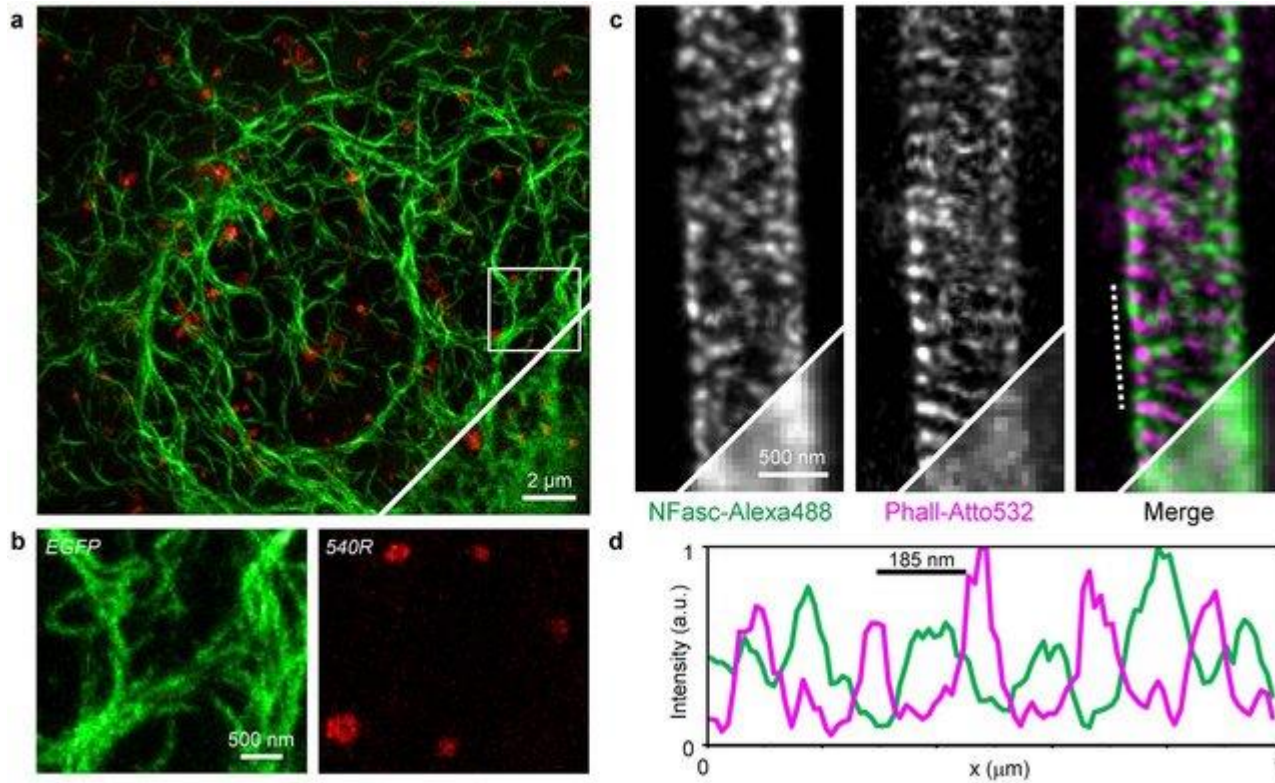


STED
Raccolta dati mirata

PALM/STORM
Raccolta dati stocastica

Superrisoluzione a due colori

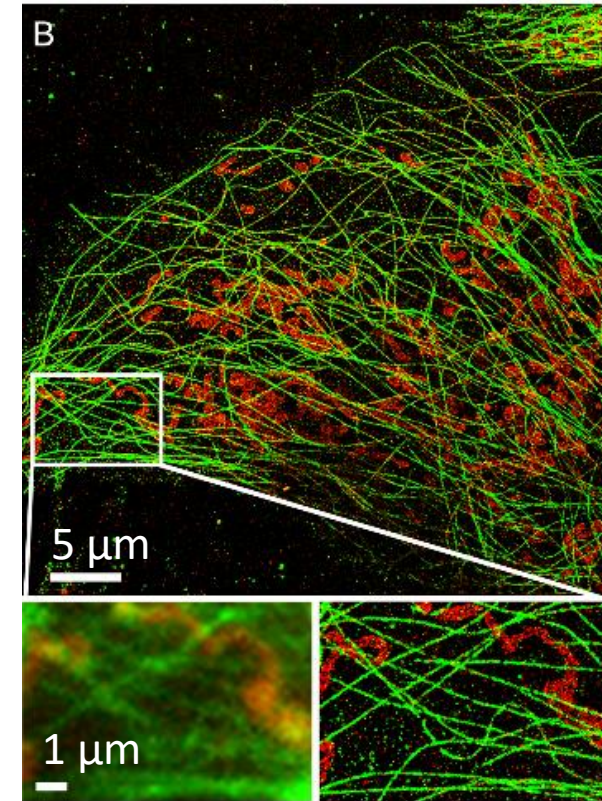
STED



Due differenti proteine
in una cellula HeLa

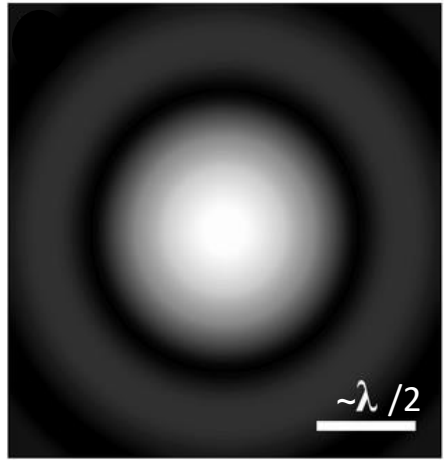
Due differenti proteine in
un assone ippocampale

PALM/STORM

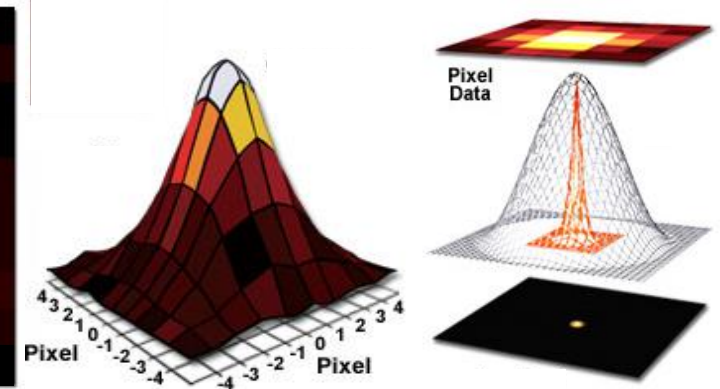
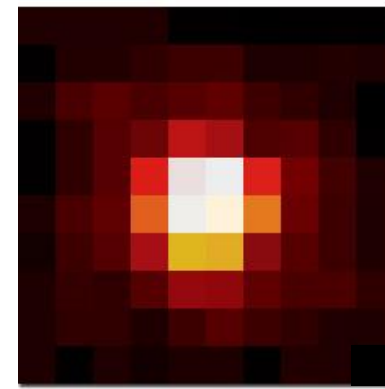


Mitocondri (rosso) e microtuboli (verde)

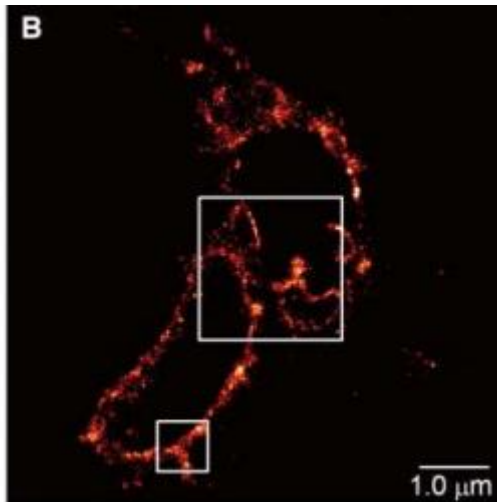
Conclusioni



La risoluzione dei sistemi ottici convenzionali è limitata dalla diffrazione



Attraverso una deconvoluzione del segnale di una singola proteina fluorescente si individua l'emettitore con alta precisione



Individuando tutte le proteine fluorescenti si ricostruisce l'immagine del campione biologico con risoluzione ~ 10 nm
STED, PALM/STORM