

Pozsgai Imre

A fluoreszcens mikroszkópia  
hagyományos és superfelbontású  
módszereinek alapjai



Pozsgai Imre

A fluoreszcens  
mikroszkópia  
hagyományos és  
szuperfelbontású  
módszereinek alapjai

A kötet megjelenését a Magyar Tudományos Akadémia támogatja.



© Pozsgai Imre, Typotex, Budapest, 2019

Engedély nélkül semmilyen formában nem másolható!

ISBN 978 963 493 072 3

Lektorálta: Dr. Karabélyos Csaba

Kedves Olvasó!

Köszönjük, hogy kínálatunkból választott olvasnivalót!

Újabb kiadványainkról és akcióinkról a [www.typotex.hu](http://www.typotex.hu)

és a [facebook.com/typotexkiado](https://facebook.com/typotexkiado) oldalakon értesülhet.

Typotex Kiadó

Alapította Votisky Zsuzsa, 1989

A kiadó az 1795-ben alapított Magyar Könyvkiadók  
és Könyvterjesztők Egyesülésének tagja.

Felelős kiadó: Németh Kinga

Főszerkesztő: Horváth Balázs

Felelős szerkesztő: Széll Szilvia

Műszaki szerkesztő: Janković Milán

A borítót készítette: Szalay Éva

Készült a Multiszolg Bt. nyomdájában

Felelős vezető: Kajtor Bálint

# Tartalom

<b>ELŐSZÓ</b>	9
<b>Köszönetnyilvánítás</b>	9
<b>1. RÉSZ. A FLUORESZCENS MIKROSKÓPIA HAGYOMÁNYOS MÓDSZEREI</b>	11
<b>1.1. A szuperfelbontás előzményei dióhéjban</b>	11
<b>1.2. Optikai alapfogalmak</b>	13
<b>1.3. A lumineszcencia és a fluoreszcencia jelensége</b>	18
<b>1.4. A fluoreszcenciához kapcsolódó folyamatok</b>	22
1.4.1. A fény abszorpciója	24
1.4.2. Kvantumhozam	24
1.4.3. Fluoreszcens élettartam	25
1.4.4. Stokes- és anti-Stokes-eltolódás	26
1.4.5. Kétfotonos gerjesztés	28
1.4.6. Fotonfelkonvertálódás	29
1.4.7. Másodharmonikus és harmadik harmonikus generálás	30
1.4.8. Fluoroforkifakulás	31
1.4.9. Csillapítás	32
1.4.10. Autofluoreszcencia	32
<b>1.5. A fluoreszcens mikroszkópok alapvető típusai</b>	33
1.5.1. Széles látóterű mikroszkóp	34
1.5.2. Konfokális pásztázó lézer mikroszkóp	37
1.5.2.1. <i>Nipkow-tárcsás konfokális mikroszkóp</i>	42
1.5.2.2. <i>Yokogawa-tárcsás konfokális mikroszkóp</i>	43
1.5.2.3. <i>Konfokális fluoreszcens mikroszkóp programozható mátrixdetektorral</i>	45
<b>1.6. A fluoreszcens mikroszkópia műszaki-tudományos háttere</b>	48
1.6.1. Fényforrások	48
1.6.1.1. Ívlámpák	49
1.6.1.2. Világító diódák (LED)	50
1.6.1.3. Lézerek	53
1.6.2. Fluoreszcens festékek	61
1.6.2.1. <i>Természetes fluoreszkáló anyagok</i>	61
1.6.2.2. <i>Fluoreszcens festékek kémiai kötődése</i>	62
1.6.2.3. <i>Fotoaktiválható és fotokonvertálható festékek</i>	71
1.6.2.4. <i>Kvantumpontok</i>	71
1.6.2.5. <i>A fluoreszcens festékek gyakorlati alkalmazása</i>	74

1.6.3. Szűrők, nyalábosztó tükrök és filter kockák	76
1.6.4. Mikroszkóp objektívek	83
1.6.5. Pásztázási megoldások	88
1.6.6. Fotodetektorok	90
1.6.6.1. Fotoelektron-sokszorozó	91
1.6.6.2. Fotodiódák	93
1.6.6.3. Lavina fotodetektorok	93
1.6.6.4. CCD kamera	94
<b>Irodalom</b>	<b>98</b>
<b>2. RÉSZ. A FLUORESCENS MIKROSKÓPIA SPECIÁLIS MÓDSZEREI</b>	<b>103</b>
<b>2.1. Bevezetés</b>	<b>103</b>
<b>2.2. Kétfotonos fluoreszcens mikroszkópia</b>	<b>104</b>
<b>2.3. Három- és többfotonos mikroszkópia</b>	<b>110</b>
<b>2.4. Belső totálreflexiós fluoreszcens mikroszkópia (TIRF)</b>	<b>115</b>
<b>2.5. Fénysíkgerjesztésű fluoreszcens mikroszkópia (LSFM)</b>	<b>121</b>
2.5.1. Szelektív fénysík-megvilágítású mikroszkóp (SPIM)	122
2.5.2. Digitális pásztázott fénysíkú lézermikroszkóp	128
2.5.3. Fénysík-gerjesztés Bessel-sugárral	132
2.5.4. Minta-előkészítés a fénysík-mikroszkópiához	136
2.5.5. Kereskedelmi forgalomban kapható fénysíkgerjesztésű fluoreszcens mikroszkópok	137
<b>2.6. Fluoreszcens élettartamon alapuló mikroszkópia (FLIM)</b>	<b>140</b>
2.6.1. Fluoreszcens élettartam	140
2.6.2. Mire használható a fluoreszcens élettartammérés?	141
2.6.3. Fluoreszcens élettartam mérése fotonok egyenkénti számlálásával időkorrelációban (TCSPC)	141
<b>2.7. Gerjesztési energia átadása rezonancia révén (FRET)</b>	<b>146</b>
<b>2.8. Képkalkotás fluoreszcens élettartamméréssel, gerjesztésienergia-átadás alapján (FLIM-FRET)</b>	<b>154</b>
<b>2.9. Fluoroforkifakuláson alapuló mikroszkópiák</b>	<b>157</b>
2.9.1. Fluoreszcencia helyreállása fluoroforkifakulás után (FRAP)	157
2.9.2. Fluoreszcenciavesztés fluoroforkifakuláskor (FLIP)	158
2.9.3. Dekonvolúciós mikroszkópia, 3D fluoreszcens mikroszkópia	159
<b>2.10. A speciális módszerek műszaki-tudományos háttere</b>	<b>165</b>
2.10.1. Impulzus üzemmódú lézerek a speciális fluoreszcens mikroszkópokhoz	165
2.10.2. Lézereket jellemző paraméterek	166
2.10.2.1. Hullámhossztartomány	166

2.10.2.2. <i>A nyaláb geometriája</i>	166
2.10.2.3. <i>Impulzusok szélessége</i>	168
2.10.2.4. <i>Átlagos teljesítmény, csúcsteljesítmény</i>	169
2.10.2.5. <i>Pulzusisméltési frekvencia</i>	170
2.10.3. <i>Lineáris és nemlineáris optika</i>	171
2.10.4. <i>A lézerek impulzus üzemmódjának elvi megvalósítása</i>	174
2.10.4.1. <i>Q-kapcsolás</i>	174
2.10.4.2. <i>Módusszinkronizáció Kerr-lencsével</i>	176
2.10.4.3. <i>Módusszinkronizáció félvezető telíthető abszorbens tükörrel</i>	179
2.10.4.3. <i>Diszperzió és kompenzálása</i>	180
2.10.4.4. <i>Ultrarövid impulzusok erősítése</i>	184
2.10.5. <i>Ultragyors Ti:zafír lézer és segédberendezései</i>	185
2.10.5.1. <i>Ultragyors Ti:zafír lézer</i>	185
2.10.5.2. <i>Nd:YAG lézer</i>	188
2.10.5.3. <i>Diódalézerek</i>	189
2.10.5.4. <i>Optikai parametrikus oszcillátor (OPO)</i>	191
2.10.5.6. <i>Itterbium és erbiium dópolású szállézerek mint a Ti:zafír lézer alternatívái</i>	195
2.10.6. <i>Érzékeny és/vagy gyors fénydetektorok</i>	201
2.10.6.1. <i>Mikrocsatorna-lemezű fotoelektron-sokszorozó (MCP-PMT)</i>	201
2.10.6.2. <i>Egy-foton lavinadióda (SPAD)</i>	201
2.10.6.3. <i>Fotoelektron-sokszorozó és lavinadióda hibridje</i>	203
2.10.6.4. <i>CCD és CMOS kamerák speciális változatai</i>	205
<b>Irodalom</b>	208
<b>3. RÉSZ. SZUPERFELBONTÁSÚ FLUORESZCENS MIKROSKÓPIA</b>	215
<b>3.1. Bevezetés</b>	215
<b>3.2. Festékek és eszközök a superfelbontáshoz</b>	217
3.2.1. <i>Fluoroforok a superfelbontáshoz</i>	217
3.2.2. <i>Hullámlemezek</i>	219
3.2.3. <i>Spirális fázislemez (vortex lencse)</i>	221
<b>3.3. Valódi superfelbontás</b>	225
3.3.1. <i>4Pi fluoreszcens mikroszkópia</i>	225
3.3.2. <i>SIM: fénymintázat-megvilágítású mikroszkópia</i>	228
3.3.3. <i>3D SIM, háromdimenziós, fénymintázat-megvilágítású mikroszkópia</i>	233
3.3.4. <i>Nemlineáris SIM; nemlineáris telített fénymintázat-megvilágítású mikroszkópia</i>	236

3.3.4.1. <i>SSIM: telített fénymintázat-megvilágítású mikroszkópia</i>	236
3.3.4.2. <i>Nemlineáris SIM fotokapcsolható fehérjékkel</i>	238
3.3.5. Rács-fénysík megvilágítású mikroszkópia (LLS)	240
<b>3.4. Molekulacsoportok szuperfelbontású leképezése</b>	<b>246</b>
3.4.1. STED mikroszkópia (Stimulált emisszió-kioltáson alapuló mikroszkópia)	246
3.4.2. GSD mikroszkópia (az alapállapot kiürítésén alapuló fluoreszcens mikroszkópia)	255
3.4.3. CW-STED: stimulált emissziókioltás folytonos üzemmódú lézerrel	258
3.4.4. gSTED: időkapuzott, stimulált emissziókioltás	259
3.4.5. Izotróp STED (isoSTED)	261
3.4.6. „Könnyű-STED” (Easy-STED)	263
3.4.7. A 3D-STED és a 3D-EasySTED a kereskedelmi forgalomban	264
3.4.8. Módszerek a STED-áramok csökkentésére	266
3.4.8.1. <i>RESCue-STED</i>	267
3.4.8.2. <i>MINFIELD-STED</i>	267
3.4.8.3. <i>DyMIN-STED</i>	268
3.4.9. RESOLFT mikroszkópia	271
3.4.10. A RESOLFT-elv	280
<b>3.5. Egyedi molekulák szuperfelbontású mikroszkópiája</b>	<b>283</b>
3.5.1. PALM (fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia) és FPALM (fluoreszcens fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia)	284
3.5.2. STORM: sztochasztikus, optikai rekonstrukciós mikroszkópia	290
3.5.3. dSTORM vagy GSDIM mikroszkópia	295
3.5.4. iPALM, interferometrikus PALM	297
3.5.5. PALMIRA	300
3.5.6. sptPALM, egyedi molekulák nyomkövetése PALM-mal	302
3.5.7. A lokalizációs mikroszkópiához használt festékek	303
3.5.8. Élő minták vizsgálata	308
<b>Irodalom</b>	<b>312</b>
<b>FÜGGELÉK</b>	<b>319</b>
<b>Néhány rövidítés angol és magyar jelentése</b>	<b>323</b>



# Előszó

Előszó, amit „használati utasítás”-nak is nevezhetnénk. A könyvben gyakran szerepelnek zárójeles kifejezések, amelyek célja, hogy könnyítsék az olvasást. Alkalmazásuk a következő esetekben fordul elő:

– A (NAGYBETŰ SZÁM) formátum az idézett irodalomra vonatkozik. Ezek egy részét folyóiratokban fellelhető cikkek teszik ki, ekkor a NAGYBETŰS SZÓ az első szerző nevét, a SZÁM a cikk megjelenésének évét jelenti. Amikor a NAGYBETŰS SZÓ intézményekre, cégekre vonatkozik, akkor az évszám hiányzik, mert a cégek az esetek túlnyomó többségében nem közölnek időpontot. A harmadik lehetőség az, hogy a NAGYBETŰS SZÓ a YouTube-ra vagy a Wikipediára utal, ekkor az évszám hiányát az információnak az internetről való letöltési ideje helyettesíti. A könyv három részéhez külön irodalomjegyzékek tartoznak.

– A (kisbetűs zárójeles megjegyzések) a vizsgán nem számonkérendő információkat tartalmaznak. Például egy zárójeles (angol kifejezés) azt segíti elő, hogy az interneten utána lehessen keresni a szóban forgó témának angol nyelven. Másrészt számos olyan angol kifejezéssel találkozunk, amelynek eddig nem volt magyar megfelelője. Ilyenkor az angol kifejezés kapcsolatot létesít az angol és a magyar szakirodalom között.

– A (kisbetűs zárójeles megjegyzések) másik típusa kutatók, tudósok nevét vagy numerikus adatokat tartalmaz, vagy olyan információt, amelyek memorizálása szükségtelen. Ezek átugrása javíthatja az olvasás élményét.

A könyvben szereplő rövidítések angol és magyar feloldása a könyv végén található. A szövegben egy idő után ezek a betűszók helyettesíthetik a több szóból álló megnevezéseket.

Jó szórakozást!

*A szerző*

## Köszönetnyilvánítás

A szerző megköszöni Kittel Ágnesnek és Pécz Bélának, a Magyar Tudományos Akadémia doktorainak a kézirattal kapcsolatos segítségüket. Köszönet illeti dr. Karabélyos Csabát a szakmai és Széll Szilviát a nyelvi, valamint tipográfiai lektorálásáért.



## 1. rész

# A FLUORESzcENS MIKROSKÓPIA HAGYOMÁNYOS MÓDSZEREI

### 1.1. A szuperfelbontás előzményei dióhéjban

A könyv célja a fluoreszcens mikroszkópia bemutatása három szinten: az alapok, a speciális módszerek és végül a szuperfelbontás szintjén. A szuperfelbontás a 2014-es kémiai Nobel-díj (Eric Betzig, Stefan W. Hell és William E. Moerner) miatt került nemcsak a szakemberek, hanem a nagyközönség érdeklődésének középpontjába is. A szuperfelbontás a klasszikus fénymikroszkópra jellemző kb. 200-250 nm-es felbontási határnál legalább kétszer jobb felbontást jelent. A fejlődés napjainkban ott tart, hogy nem ritka a tízszer jobb felbontás, azaz 20-25 nm sem.

Már a 2. részben tárgyalt speciális fluoreszcens mikroszkópia is lehetőséget ad az élő sejtek dinamikus változásaiba betekinteni két vagy három dimenzióban, akár hosszú időn keresztül, anélkül, hogy a vizsgált életfolyamatokat befolyásolnánk. A szuperfelbontás pedig tovább bővíti a lehetőségeket a sokkal jobb felbontóképesség révén. Ettől az várható, hogy forradalmasítja a biológiát és az orvostudományt.

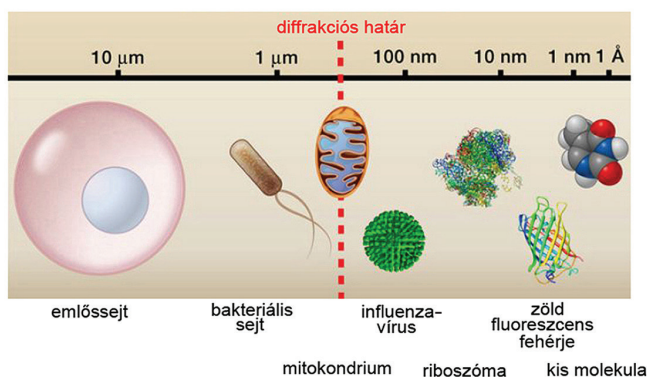
A fénymikroszkópia (és a hozzákapcsolódó tudományágak) fejlődéséből csak néhány dátumot ragadunk ki, amelyek mérföldköveket jelentettek:

- 1590 A holland Hans Jansen és fia, Zacharias Jansen megalkotja az első összetett fénymikroszkópot.
- 1609 Galileo Galilei kifejleszti a konvex és konkáv lencséből álló összetett mikroszkópot, majd 1624-ben bemutatja Federico Cesi hercegnek, az Accademia dei Lincei alapítójának.
- 1674 Antonie van Leeuwenhoek egyszerű mikroszkópot fejleszt ki biológiai vizsgálatokra, és emiatt őt tekintik a „mikrobiológia atyjának”.
- 1873 Ernst Abbe felfedezi a fénymikroszkóp felbontását korlátozó diffrakciós határt.
- 1913 A Zeiss cég megkezdte a lumineszcens mikroszkóp gyártását August Köhler, Henry Siedentopf, Moritz von Rohr és mások úttörő munkáját követően.
- 1956 Marvin Minsky megalkotja a konfokális mikroszkópot.
- 1960 Theodore H. Maiman megépíti az első működő lézert.
- 1962 Shimomura Oszamu felfedezi a zöld fluoreszkáló fehérjét (GFP).

- 1980 -as évek A konfokális lézer fluoreszcens mikroszkóp standard technikává válik.
- 1984 Aaron Lewis és Dieter Pohl csoportja egymástól függetlenül megalkotják a közelteres (lencse nélküli) pásztázó fénymikroszkópiát (angol rövidítése NSOM vagy SNOM), amely az Abbe-féle diffrakciós határ első áttörését jelentette.
- 1994 Megjelenik Stefan Hell és Jan Wichmann elméleti munkája, amely lehetővé teszi a stimulált emisszió kiürítése alapján történő (STED) szuperfelbontású mikroszkóp kifejlesztését.
- 1999 A STED mikroszkóp első kísérleti megvalósítása (Stefan Hell és Thomas Klar), a diffrakciós határ olyan áttörése, amely a biológiát forradalmasíthatja.
- 2008 Martin Chalfie, Shimomura Oszamu és Roger Tsien kémiai Nobel-díjat kapnak a zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) kapcsolatos munkájukért.
- 2014 Eric Betzig, Stefan Hell és William Moerner kémiai Nobel-díjat kap a szuper-felbontású fluoreszcens mikroszkópiáért.

A klasszikus és a fluoreszcens fénymikroszkópia közös vonása, hogy a vizsgálandó objektumot fénnel világítja meg. A különbség közöttük abban áll, hogy a klasszikus fénymikroszkópiában a besugárzó fény megváltozását használjuk képalkotásra, a fluoreszcens fénymikroszkópiában pedig a besugárzó fény által gerjesztett fluoreszcens fényt.

A fluoreszcens mikroszkópia többek között az igen nagy érzékenységgel és kontrasztjával tűnik ki. Egyik legfontosabb alkalmazási területe a biológia, ezért a vizsgálódás méretskáláját biológiai objektumokkal érzékeltetjük:



1.1.1. ábra. Méretskála szemléltetése (Huang 2010)

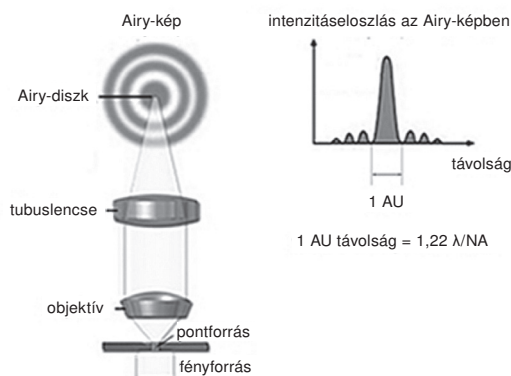
Az 1.1.1. ábrán jelzett diffrakciós határra a következő alponban térünk ki.

## 1.2. Optikai alapfogalmak

A mikroszkópot jellemezhetjük a nagyítással vagy a felbontással. A nagyítással való jellemzés pontatlan, mert egy bizonyos nagyítás felett a nagyítás „üressé válik”, nem látunk újabb részleteket. Egy fénymikroszkóp nagyítása kb. 1000-szeres értékig hasznos, ezen felül üres a nagyítás.

Szerencsésebb a mikroszkópot a felbontással jellemezni, amely az a távolság, amelynél két pontot még különálló objektumnak látunk. Ez a fénymikroszkópnál kb. 200 nm, és függ az alkalmazott fény hullámhosszától.

A fénymikroszkópok felbontását a diffrakció jelensége korlátozza. Az irodalomban gyakran használják a „diffrakció által korlátozott felbontás” kifejezést (angolul: diffraction limited resolution). A fény elhajlik az objektívlencse foglalatán, ennek következtében egyetlen pont képe elmosódott koncentrikus körökből álló diffrakciós képpé, az ún. Airy-képpé válik (angolul: Airy pattern George Airy [1801–1892] brit csillagász tiszteletére). Az Airy-kép középű foltját Airy-diszknak nevezzük (1.2.1. ábra).



1.2.1. ábra. Pontforrás képe, az Airy-kép

Megragadjuk az alkalmat a gyakran használt távolságegység, az Airy-egység definíciójának megadására (Airy Unit, rövidítve AU): az intenzitás-maximumot körülvevő két intenzitásminimum közötti távolság:

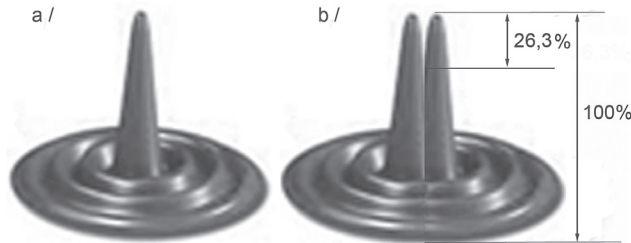
$$1 \text{ AU} = 1,22 \lambda/NA \quad (1.2)$$

ahol  $\lambda$  a fény hullámhossza,  
 NA a numerikus apertúra,  $NA = n \sin \theta$ ,  
 $n$  a törésmutató,  
 $\theta$  az objektívlencse nyílásszögének a fele.



1.2.2. ábra. A fél nyílásszög ( $\theta$ ) definíciójához

Két egymáshoz közel álló pont képében a megfelelő Airy-képek részlegesen átlapolódnak (1.2.3. ábra). A két pont akkor tekinthető felbontottak, ha a hozzájuk tartozó Airy-képek maximumai közé legalább egy minimum is esik. Ekkor a két Airy-kép maximuma között egy 26,3%-os intenzitás-„gödör” van.



1.2.3. ábra. a) Egy pont és b) két közeli képpont Airy-képe

Az Airy-kép matematikai formája ún. pontkiterjedési függvény (Point Spread Function, PSF).

A diffrakció által limitált felbontóképességre először Ernst Abbe adott kvantitatív összefüggést 1873-ban, amelyet Lord Rayleigh pontosított 1896-ban.

Az Abbe által adott, diffrakció által korlátozott felbontás az optikai tengelyre merőleges x-y síkban

$$\frac{\lambda}{2n \sin\theta} \quad (1.3)$$

ahol  $\lambda$  a fény hullámhossza,

$n$  a törésmutató,

$\theta$  az objektívlencse nyílásszögének a fele, miként azt az (1.2) egyenlet kapcsán már definiáltuk.

Az ugyancsak Abbe által adott felbontás az optikai tengellyel párhuzamos z irányban:

$$\frac{2\lambda}{(n \sin\theta)^2} \quad (1.4)$$

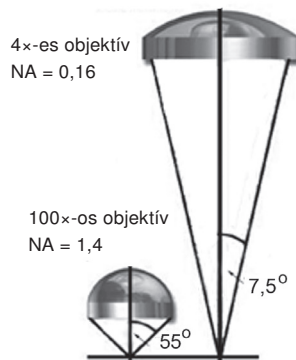
Míg 550 nm-es zöld fényt és 1,4 numerikus apertúrát feltételezve 196 nm felbontást kapunk az x-y síkban az (1.3) képlet szerint, addig a z irányban 561 nm-t az (1.4) képlet szerint.

Rayleigh az Abbe-képlet 0,5-es szorzó tényezőjét 0,61-re módosította, így a Rayleigh-felbontás az x-y síkra vonatkozóan:

$$\frac{0,61\lambda}{n \sin\theta} \quad (1.5)$$

ami az előző számpéldában kapott 196 nm helyett 239 nm-t eredményez.

Az üvegek törésmutatóját és a szinuszfüggvényt figyelembe véve az 1,4-es numerikus apertúra nagynak számít (1.2.4. ábra).



1.2.4. ábra. Kis és nagy numerikus apertúra szemléltetése

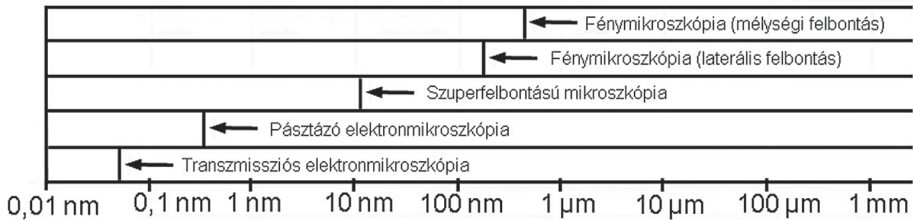
Az Airy-kép nem teljesen forgásszimmetrikus, hanem elliptikus alakú, ami abból adódik, hogy az objektívet elhagyó hullámfront nem szimmetrikus.

A felbontás javítható hullámhossz csökkentésével, a numerikus apertúra növelésével, immerziós olajok alkalmazásával. Az első siker a diffrakciós korlát megkerülésére a lencse nélküli közelteres leképezéssel sikerült 1984-ben. Később a távolteres szuperfelbontású fluoreszcens technikák segítségével sikerült a fénymikroszkópos felbontást 10-20 nm-re javítani. (A távolteres kifejezés lényegében a lencsék segítségével történő leképezést jelenti.)

Ez a könyv kizárólag a távolteres leképezéssel foglalkozik, akkor is, ha külön nem említjük.

A diffrakciós határ nem olyan éles, mint ahogyan az 1.1.1. ábrán jelölve van. Előljáróban annyit, hogy függ a fény hullámhosszától, és erősen eltér a képsíkban (x-y sík) és az arra merőleges ún. axiális irányban (z irány). Az x-y síkban kb. 200-250 nm, z irányban kb. 500-800 nm.

Érdeemes összevetni a fénymikroszkóppal és elektronmikroszkóppal elérhető felbontásokat. Az 1.2.5. ábra alapján a diffrakció által korlátozott fénymikroszkópia felbontását a szuperfelbontástól egy nagyságrend választja el, majd újabb egy-egy nagyságrendnyi javulás figyelhető meg a pásztázó elektronmikroszkópia és a transzmissziós elektronmikroszkópia irányában.



1.2.5. ábra. A fénymikroszkópia és elektronmikroszkópia felbontása

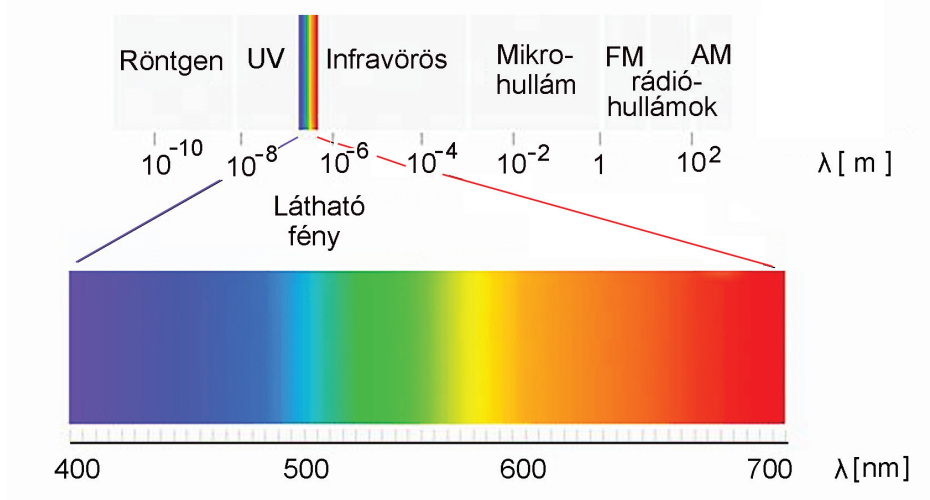
Ha azonban figyelembe vesszük, hogy fénymikroszkóppal az élő sejteken belül lezajló folyamatok dinamikája követhető, és ez elektronmikroszkóppal viszont nem lehetséges, akkor arra a következtetésre juthatunk, hogy a felbontóképesség sokszor szükséges, de nem elégséges feltétele egy feladat megoldásának. A sejtbiológiai folyóiratokat átlapozva azt találjuk, hogy a sejtekről készült képek több, mint 80%-át fluoreszcens mikroszkóppal készítették (HUANG 2010).

A fény kettős természetű, elektromágneses hullámként és részecskeként (foton) is viselkedik.

Az elektromágneses spektrum látható része igen szűk tartomány (400–700 nm) (1.2.6. ábra). Ha az anyag tulajdonságának a megismeréséhez a teljes elektromágneses spektrumot (látható és láthatatlan részt egyaránt) hasznosítjuk, akkor is csak az anyag kb. 4,9% százalékát ismerhettük meg eddig, mert a sötét anyag és sötét energia teszi ki a hiányzó 95,1%-ot (WIKIPEDIA 3).

A szín igen értékes információ, az elektronmikroszkópok nem tudják visszaadni. Az emberi szem érzékenységének optimuma kb. az 555 nm-es hullámhosszra esik, itt a vörösnél kb. 30-szor kisebb intenzitású zöld fényt képes észlelni. Az 1.2.6. ábra bal szélén látható 400 nm is fontos érték. Az optikai szaküzletekben úgy ellenőrzik a napszemüvegünk védőhatását, hogy a 400 nm-nél rövidebb hullámhosszú ultraibolya sugárzás ne menjen át rajta.





1.2.6. ábra. Az elektromágneses spektrum (fenn) és annak látható része (lenn)

Különös, hogy bár a látható tartomány felső határát 750-760 nm-ben szokták megadni, egyes kísérletekben 1060 nm-es hullámhosszúságú infravörös sugárzást is képesek voltak emberi szemmel észlelni (SLINEY 1976).

A fluoreszcens mikroszkópiában a fluoreszcens festékeket vagy az optikai szűrőket a fény hullámhosszával ( $\lambda$ ) szokás jellemezni.

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1.6)$$

ahol  $E$  a sugárzás energiája,  
 $\nu$  a fény frekvenciája,  
 $h$  a Planck-állandó,  
 $c$  a fény sebessége vákuumban.

A fluoreszcens mikroszkópiában nemcsak a látható fénytartományt használjuk ki. Bár az ultraibolya sugárzás alkalmas fluoreszcens gerjesztésre, de ekkor léphet fel sugárkárosodás a biológiai mintákban a legnagyobb valószínűséggel. Az infravörös tartomány is hasznosítható gerjesztésre, ezt a kétfotonos és többfotonos mikroszkópiánál fogjuk látni. Az infravörös sugárzás kevésbé szóródik, mélyre hatol, és kis sugárkárosodást okoz a mintában (WIKIPEDIA 4), ami élő sejtek vizsgálatánál fontos szempont.