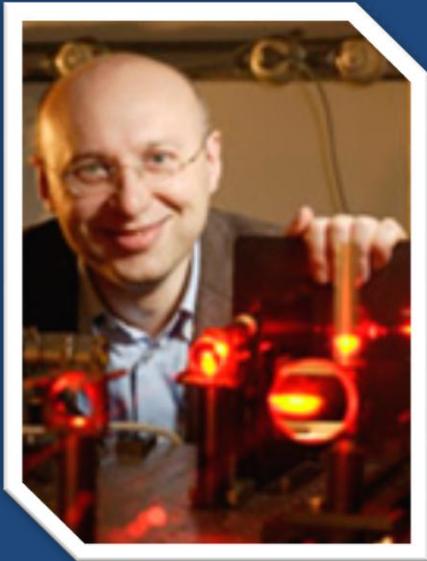


# TOWARD FLUORESCENCE NANOSCOPY



Stefan W Hell

Martín Diego Bordenave

[mdborde@fibertel.com.ar](mailto:mdborde@fibertel.com.ar)

Sabrina Simoncelli

[sabrina.simoncelli@gmail.com](mailto:sabrina.simoncelli@gmail.com)

TEMAS DE NANOFÍSICA

Departamento de Física Juan José Giambiagi, FCEyN, UBA

Septiembre 2010

# ÍNDICE

- **INTRODUCCIÓN**
- **MEJORANDO LA RESOLUCIÓN**
- **ROMPIENDO EL LÍMITE DE DIFRACCIÓN**
- **STED**
  - **STED**
  - **STED + 4-Pi**
- **CONCLUSIONES**



La resolución es la mínima distancia a la cual un microscopio puede discriminar dos o más objetos de la misma clase.

Está limitada por la difracción.

$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Para mejorar la resolución (disminuir  $\Delta r$ ) se puede:

**DISMINUIR** la longitud de onda:

Longitudes de onda menores a 350 nm. son incompatible en sistemas biológicos vivos.

**AUMENTAR** la apertura numérica:

Limitada técnicamente a 70° aproximadamente.

## ERNST ABBE (1873)



Monumento erigido en honor de Ernst Abbe mostrando su ecuación describiendo el límite de difracción. Se encuentra situada en frente al edificio de Psicología de la Universidad de Jena en Alemania.



**MICROSCOPIA CONFOCAL Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MULTIFOTÓNICA**

1. Permitieron imágenes 3D.
2. No mejoraron demasiado la resolución (180 nm en el plano focal y 500-800 nm en el plano óptico)

**MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

1. Detecta moléculas únicas siempre y cuando las demás moléculas estén suficientemente lejos.
2. Distingue una cantidad arbitraria de moléculas mientras que no sean de la misma clase

1. Cómo mejorar la habilidad de la microscopía para **DISTINGUIR MOLÉCULAS ÚNICAS** en una gran densidad espacial.
2. Cómo producir **VOLÚMENES DE FLUORESCENCIA** que sean **MUCHO MENORES** que aquellos logrados por la microscopía Confocal o Multifotónica.

Utilizando:

- A. Luz visible.
- B. Objetivos de microscopio regulares .
- C. A temperaturas entre 18-37°C . Aplicable a CÉLULAS VIVAS.

**MICROSCOPIA 4-PI**

1. Mejoró la resolución axial en un factor de hasta 7 VECES combinando la apertura de los lentes opuestas

**STED**

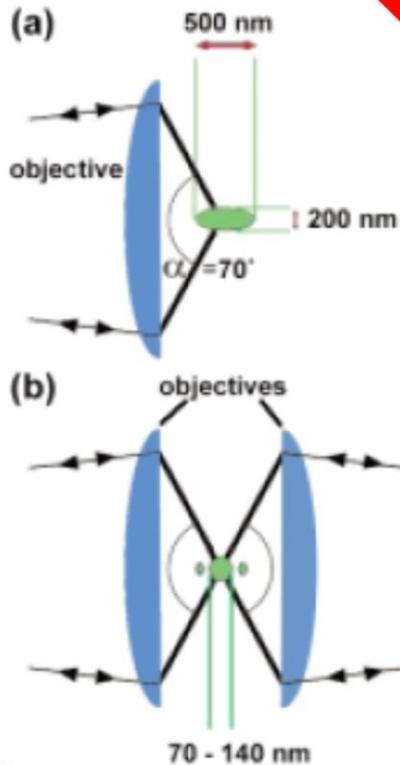
1. Cruzar la barrera de difracción se logrará utilizando una relación NO LINEAL entre la intensidad de luz y la señal medida. Se basa e la saturación de las transiciones entre dos estados moleculares.

¿Qué se podía lograr hasta 1990?

¿Cuál es la idea del *Review*?

¿Que se logró en las últimas décadas?





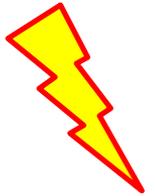
(a) Como resultado de la difracción, luego de enfocar un haz de luz, se forma un spot que se encuentra estirado a lo largo del eje óptico. El ángulo de enfoque de la lente no es un ángulo sólido completo de  $4\pi$ . Si lo fuera, el punto focal sería esférico y la resolución lateral y axial serían iguales.

(b) Dos objetivos de microscopio son utilizados para maximizar el ángulo total.

Las ondas de luz convergentes de los objetivos de microscopio se suman por interferencia constructiva.

Esto resulta en un spot central de luz que ha reducido su tamaño en un factor de 4 a 7 veces. Pero se encuentra acompañado de dos máximos laterales de menor intensidad.

SE AUMENTÓ la Resolución AXIAL en un factor de 4 a 7 veces.



## CONFOCAL PSF

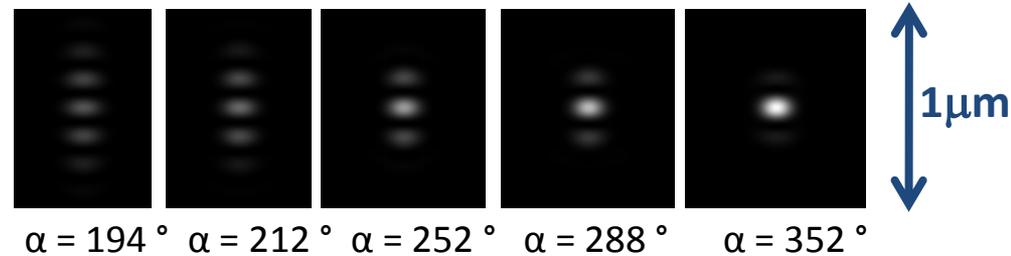


## 4 Pi PSF



### Cálculo de las PSF para un Microscopio 4Pi cambiando la apertura numérica

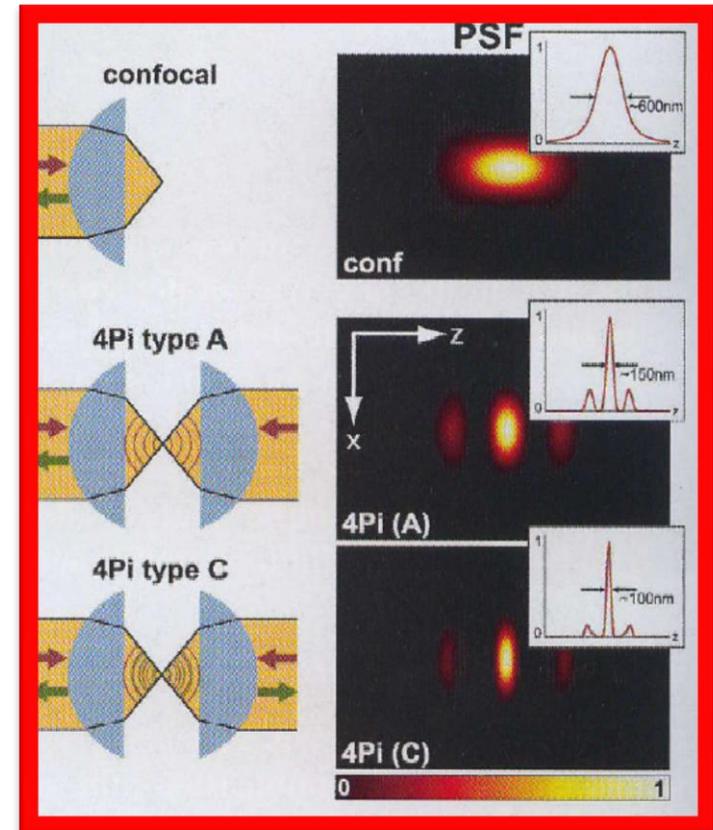
- A. Longitud de onda de Excitación: 488nm.  
B. Longitud de onda de Emisión: 520 nm.



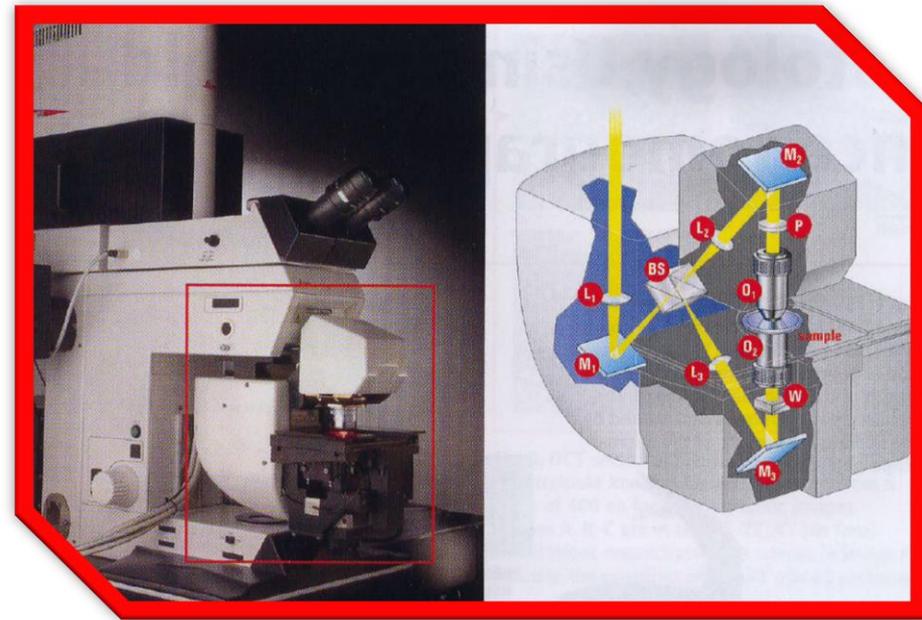
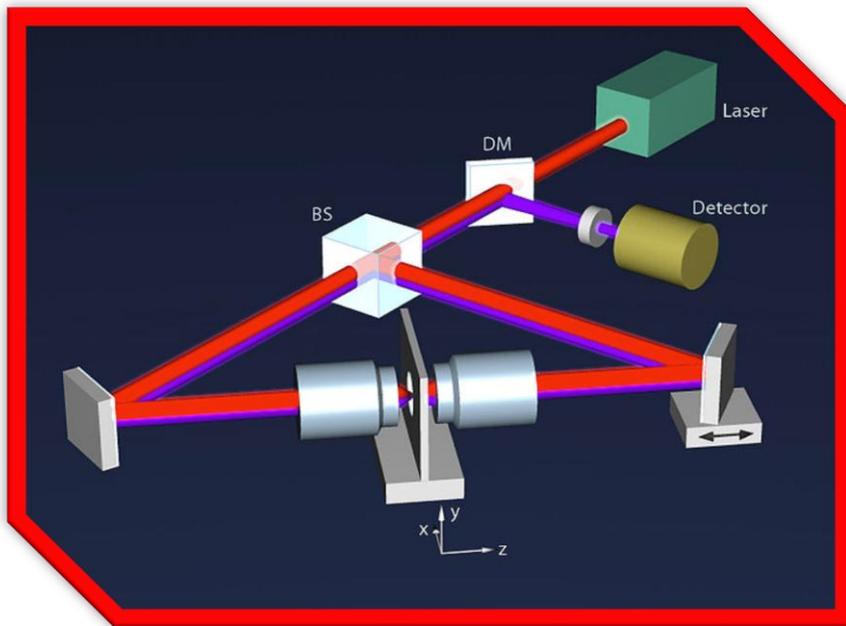
## EL RETO DE LOS LÓBULOS SECUNDARIOS

Los órdenes de interferencia a distancia  $\lambda/2$  del máximo principal producen imágenes fantasma o satélites que se deben remover por deconvolución. La deconvolución es posible si la intensidad de los lóbulos secundarios no supera el 50% de la intensidad del máximo principal. Las lentes comerciales (inmersión) no permite bajar de 60-70%. Por lo tanto se deben usar técnicas especiales de supresión de estos lóbulos

1. **DETECCIÓN CONFOCAL:** Rechaza luz fuera de foco.
2. **EXCITACIÓN POR DOS FOTONES:** Dependencia cuadrática de la intensidad.
3. **DETECCIÓN COHERENTE** (por las dos lentes opuestas): la diferencia en  $\lambda$  entre excitación y emisión reduce la detección de los lóbulos secundarios (están en distinta posición).



## DISPOSICIÓN EXPERIMENTAL



Leica TCS 4Pi

## ALGUNOS EJEMPLOS

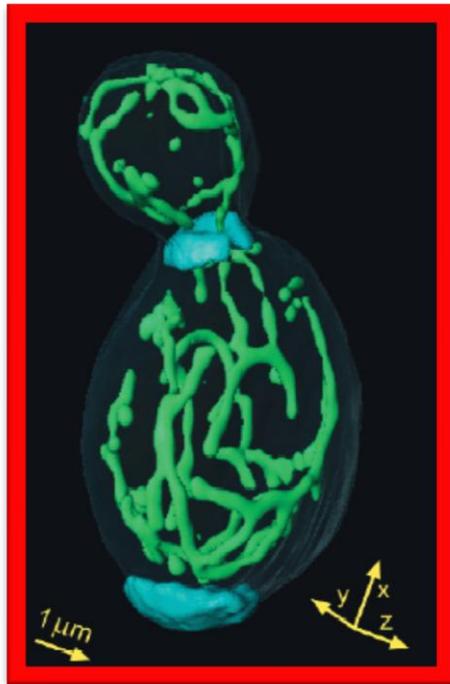
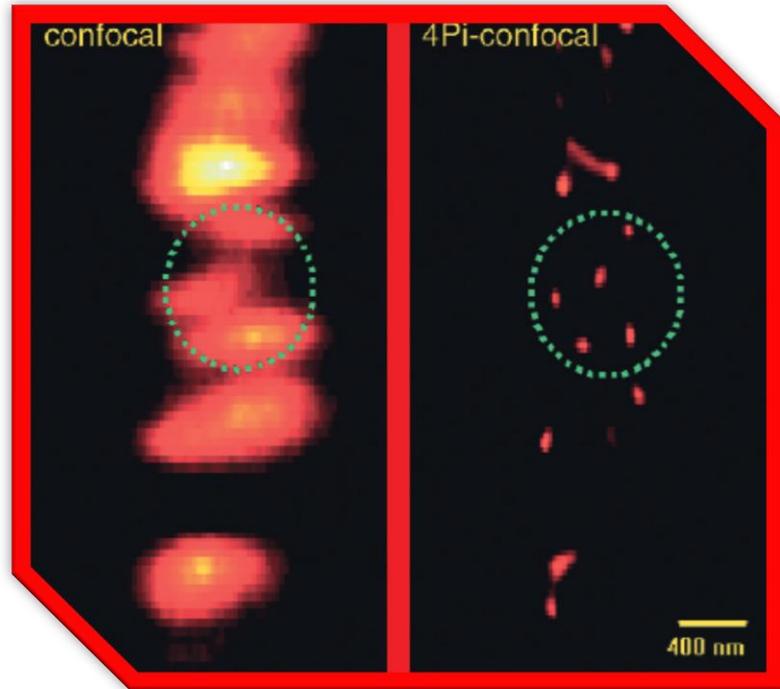
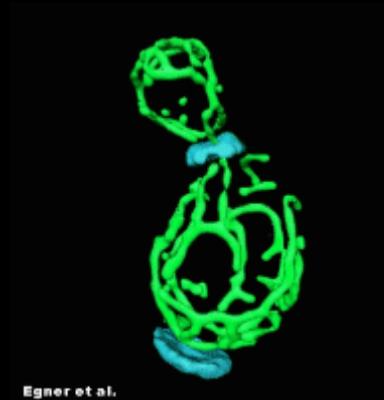


Imagen 3D renderizada de la red mitocondrial de una célula de levadura. La matriz mitocondrial está marcada con GFP, mientras que la pared celular está teñida con el colorante Calcoflúor blanco mostrando el trazado de rayos. Esta imagen 4 Pi de la célula viva con 100 nm. de resolución en 3D permitió estudiar la influencia de determinadas proteínas mitocondriales en la morfología mitocondrial.

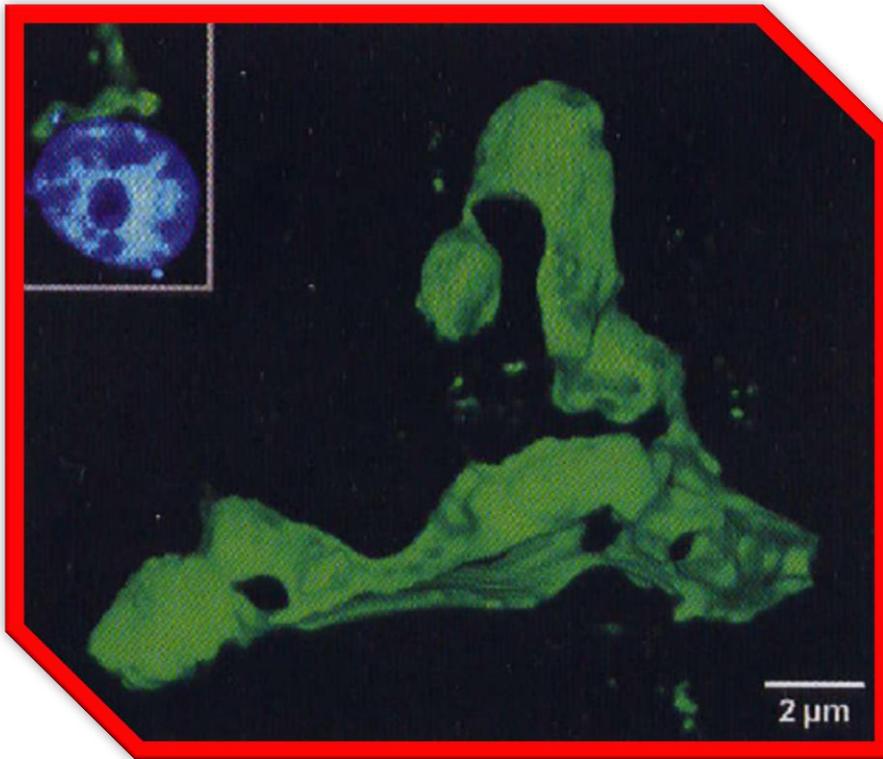


Microtúbulos de células de fibroplasto de ratón fijas y marcadas por inmunofluorescencia.

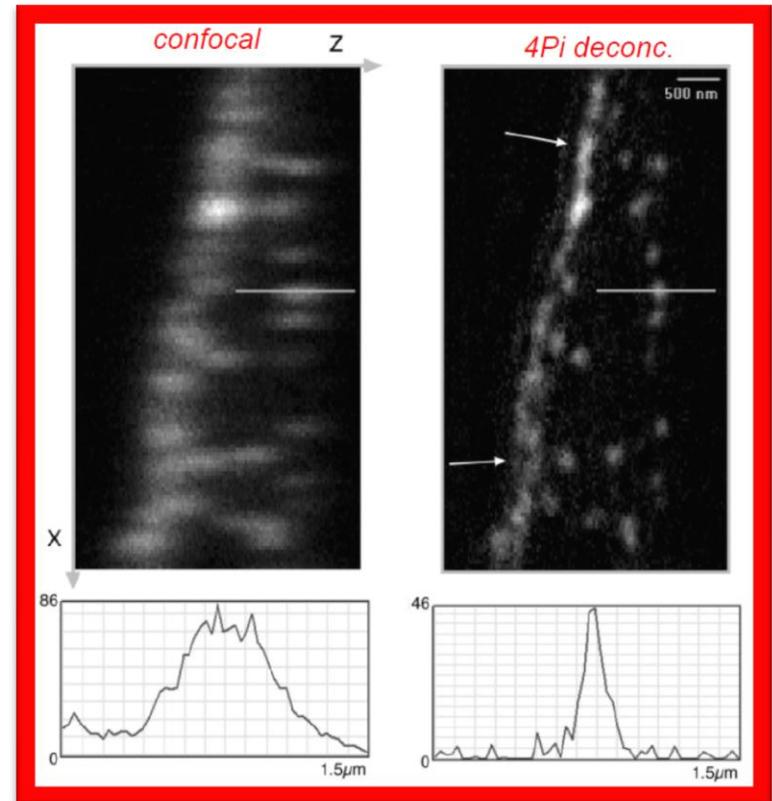
# Imagen 3D de la Red Mitocondrial de una Célula de Levadura



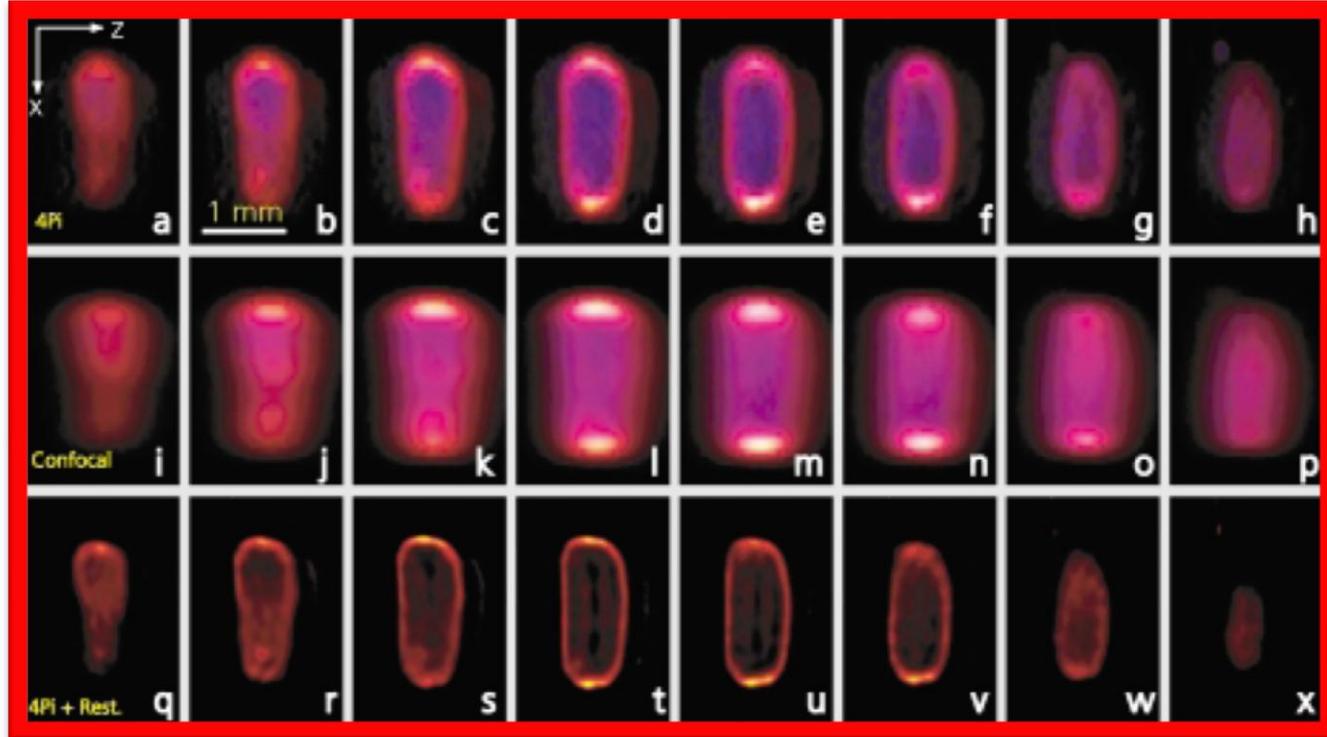
## MÁS EJEMPLOS...



Aparato de Golgi, obtenido a través de MMM-4Pi Imaging de GATT-EGFP en células de Vero vivas con una resolución axial de 100 nm. El Inset muestra una vista de Epi-fluorescencia para correlacionar el aparato de Golgi con los núcleos.



Imágenes de Microtúbulos en Células



Secciones ópticas (imágenes xz) de la bacteria *Escherichia coli*, cuya membrana ha sido teñida con el colorante DF 1-43 (Rojo) y el nucleoide con DAPI (Azul). Las secciones se pueden juntar para formar una imagen en 3D si se las apila en la dirección del eje y. Z corresponde con el eje óptico. Las dimensiones son  $2.7 \times 0.8 \times 1.8 \mu\text{m}^3$  en las direcciones x, y, z.

(a-h) Imágenes 4Pi-Confocal

(i-p) Imágenes Confocales

(q-x) Imágenes 4Pi-Confocal con una restauración utilizando el algoritmo de "Richardson-Lucy" para aumentar la resolución.

# Estado Temprano de División Celular Humana

## Microtúbulos marcados

<http://www.youtube.com/watch?v=daBdvpgYZ-U>

A medida que la imagen rota se puede observar la complejidad del citoesqueleto cuando la célula empieza a separarse.

Esta muestra fue preparada exclusivamente por el Dr. Brian T. Bennett, mientras era un estudiante de grado en la Universidad Médica de Massachusetts en el Laboratorio del Dr. Kendall Knight. La imagen fue capturada utilizando un microscopio Leica TCS 4PI por el Dr. Brian T. Bennett y el Dr. T. Szellas.

<http://www.youtube.com/watch?v=daBdvpgYZ-U>

# Estado Tardío de la División Celular Humana

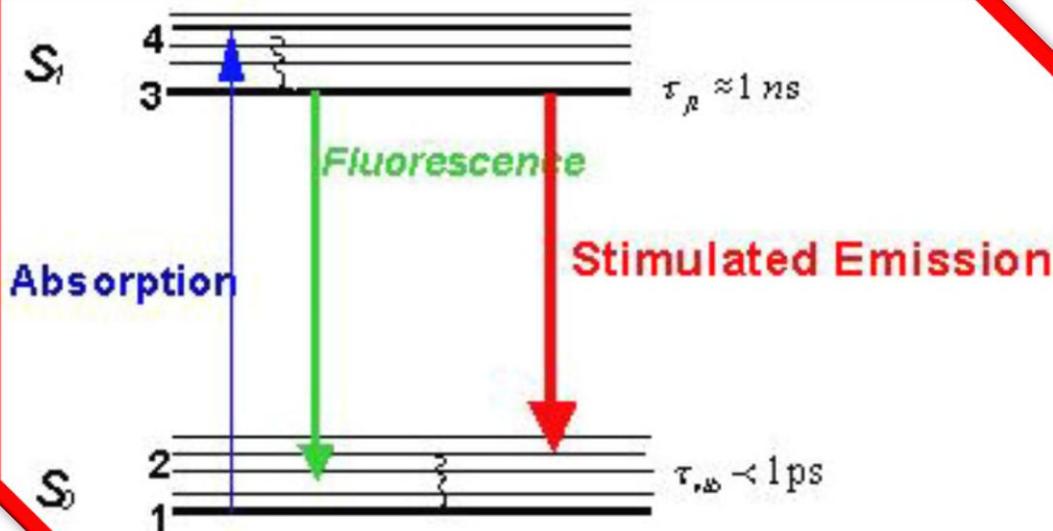
<http://www.youtube.com/watch?v=LT8VUCB0yR8>

Se observa la unión entre dos células, en la etapa tardía de la división. A medida que la imagen gira se puede observar el surco de la unión.

Esta muestra fue preparada exclusivamente por el Dr. Brian T. Bennett, mientras era un estudiante de grado en la Universidad Médica de Massachusetts en el Laboratorio del Dr. Kendall Knight. La imagen fue capturada utilizando un microscopio Leica TCS 4PI por el Dr. Brian T. Bennett y el Dr. T. Szellas.

<http://www.youtube.com/watch?v=LT8VUCB0yR8>

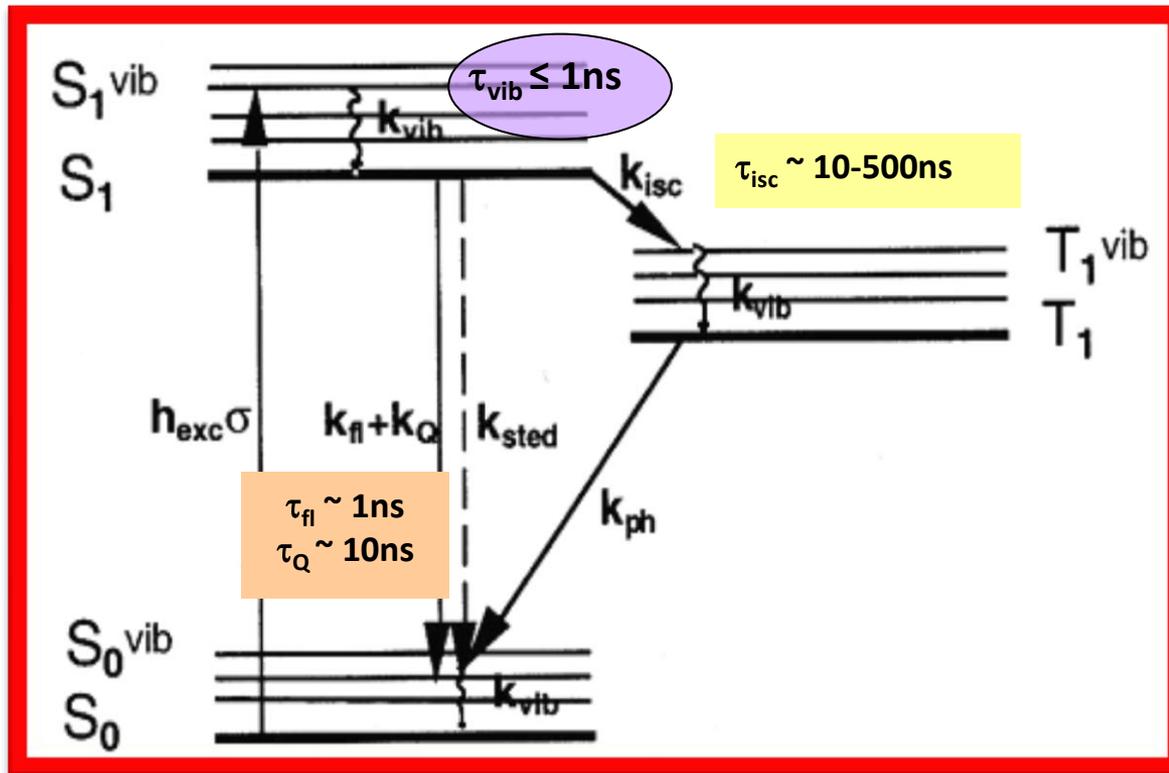
A ←→ B  
Estado Emisor      Estado Oscuro



- 1) **Campo de excitación**  
E<sub>e</sub> puebla el estado excitado (S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub>).
- 2) **Campo de depleción**  
E<sub>d</sub> despuebla el estado excitado por emisión estimulada.

E<sub>d</sub> (modo rosquilla) → moléculas fluorescentes sólo en el centro.





### Mecanismos Competitivos

$$h_{STED} \sigma_{STED} n_1 \geq k_{vib} n_1^{vib}$$

$$h_{STED} \sigma_{STED} n_1 \geq (k_{fl} + k_Q + k_{isc}) n_1$$

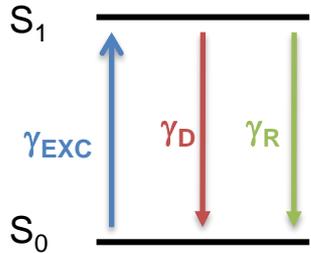
$$h_{STED} \sigma_{STED} n_1 \geq h_{STED} \sigma_{STED} n_0^{vib}$$

→ Haz de excitación y de Depleción Pulsado

→  $\tau_p \sim \text{ps}$  (Relajación de  $S_0^{vib}$ )

Siendo  $\sigma_{exc} \approx \sigma_{STED} \approx 10^{-16} - 10^{-18} \text{ cm}^2$





$$\gamma_{EXC}(r) = \sigma_{EXC} I_{EXC}(r) / \hbar\omega$$

$$\gamma_D(r) = \sigma_{STED} I_{STED}(r) / \hbar\omega$$

$$\frac{\gamma_R}{\gamma_R + \gamma_D}$$

$$\gamma_{fl}(r) = \gamma_{EXC}(r) \frac{\gamma_R}{\gamma_R + \gamma_D(r)} = \frac{\sigma_{EXC}}{\hbar\omega} \frac{I_{EXC}(r)}{1 + d_P(r)}$$

$$d_P(r) = \frac{\sigma_{STED}}{\hbar\omega\gamma_R} I_{STED}(r)$$

**Parámetro de Depleción**

*Resolución*

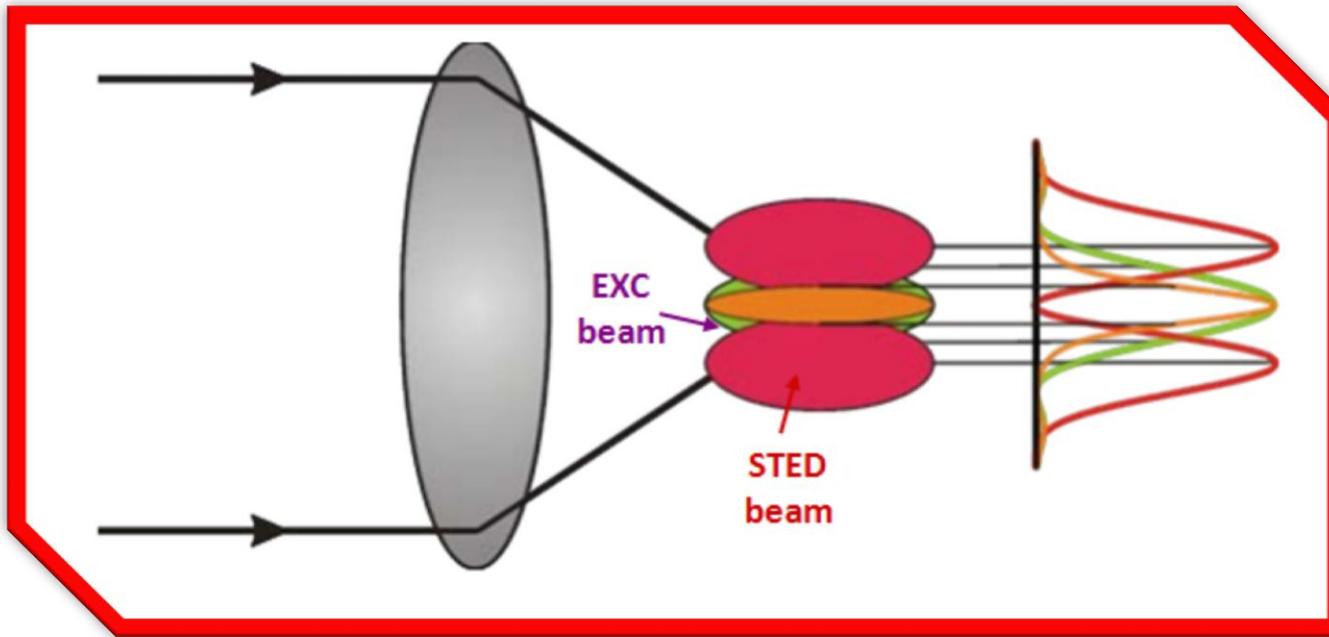
$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \text{sen} \alpha \sqrt{1 + d_P}}$$



$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \text{sen} \alpha \sqrt{1 + I_{depl.} / I_{sat.}}}$$

$I_{depl.}$  : Intensidad del haz aplicado para el despoblamiento o depleción

$I_{sat.}$  : Intensidad de saturación



Despoblamiento del estado excitado por emisión estimulada del estado fluorescente



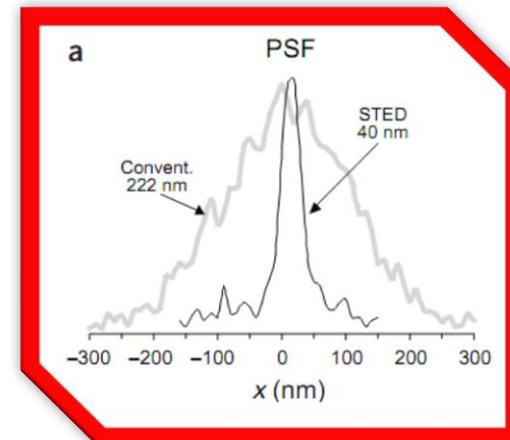
Detección de fluorescencia en el centro de la rosquilla

Resolución clásica:

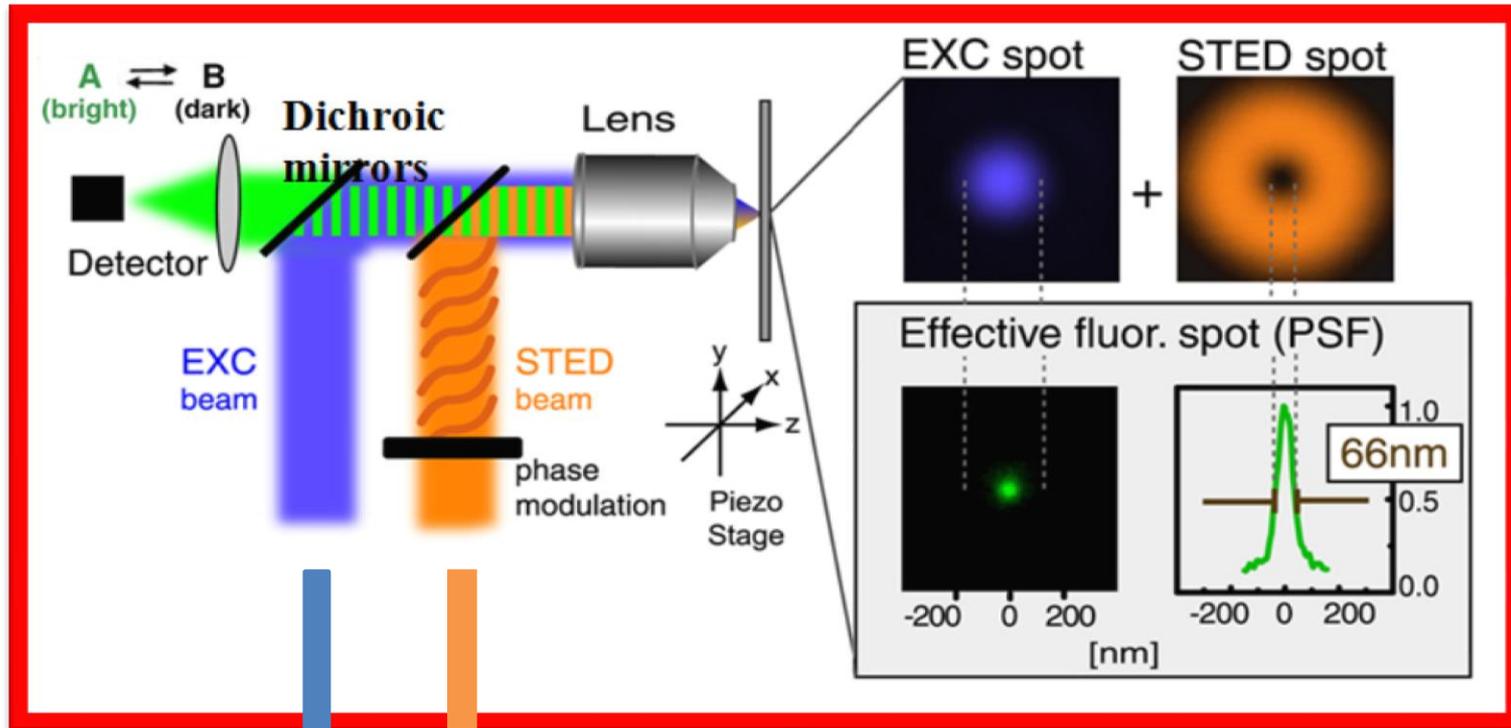
$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \text{sen} \alpha}$$

Resolución STED

$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \text{sen} \alpha \sqrt{1 + I_{\text{depl.}} / I_{\text{sat.}}}}$$



## DISPOSICIÓN EXPERIMENTAL



- Pulsos subpicoseg.
- $\lambda_{exc}$ : Absorción del colorante.
- Haz enfocado al límite difracción.

- Pulsos: Modo Rosquilla (100ps).
- $\lambda_{sted}$ : Emisión del colorante.
- Haz enfocado al límite difracción.

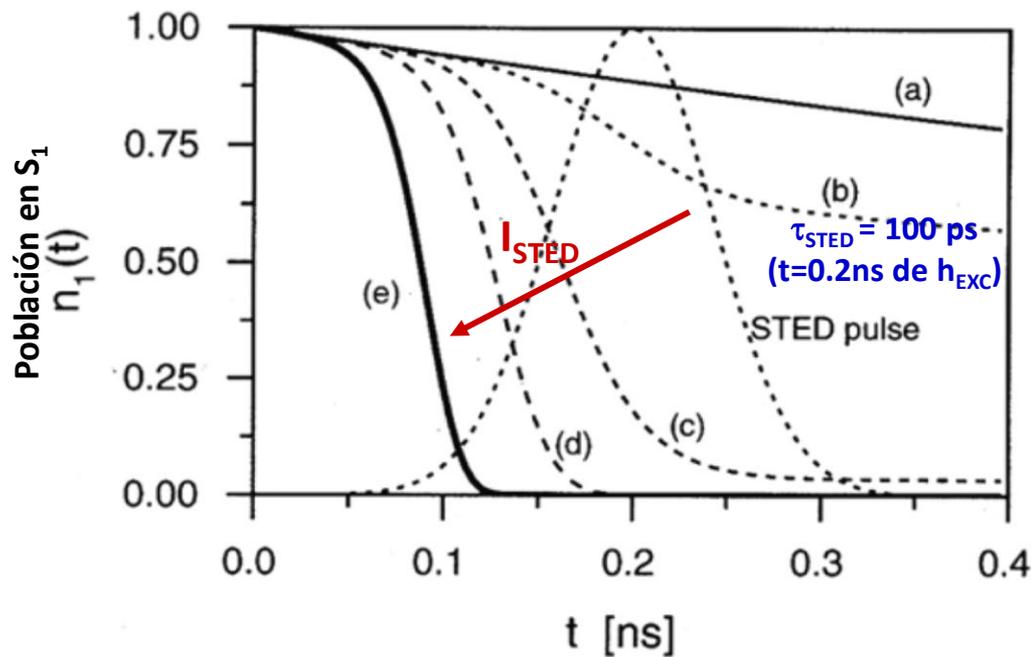
# Colorantes para STED

Dye name (Manufacturer / Distributor)	Exc. Wavelength	Exc. Pulse Length	STED Wavelength	STED Pulse Length	Repetition Rate	Avg. STED Power	Peak Irradiance	Pulse Energy	Spatial Resolution (Direction)	Reference(s)
ATTO 425 (ATTO-TEC GmbH)	440 nm	130 ps	532 nm	1 ns	60 kHz	24 – 162 $\mu$ W	0.4 – 2.7 nJ	500 MW/cm <sup>2</sup>	70 – 80 nm (xy)	B. Rankin et al., <i>Opt. Lett.</i> 33, 2491 (2008)
Mn doped ZnSe Qdots (Nanomaterials & Nanofabrication Laboratories)	440 nm	< 90 ps	676 nm	cw	cw		9 MW/cm <sup>2</sup>		45 nm (xy)	S. Irvine et al., <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 47, 2685 (2008)
ATTO 532 (ATTO-TEC GmbH)	470 nm	100 ps	615 nm	200 ps	80 MHz	14 – 18 mW			66 – 72 nm (xy)	K. Willig et al., <i>Nature</i> 440, 935 (2006) J. Sieber et al., <i>Biophys. J.</i> 90, 2843 (2006) K. Willig et al., <i>New J. Phys.</i> 8, 106 (2006)
ATTO 532 (ATTO-TEC GmbH)	470 nm	80 ps	603 nm	280 ps	250 kHz	0.5 mW		2 nJ	<25 nm (xy)	G. Donnert et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 103, 11440 (2006)
ATTO 532 (ATTO-TEC GmbH)	488 nm	100 ps	615 nm	200 ps	80 MHz	16 mW			60 – 70 nm (xy)	D. Fitzner et al., <i>EMBO J.</i> 25, 5037 (2006) R. Kellner, <i>Neurosci.</i> 144, 135 (2007) L. Meyer et al., <i>Small</i> 4, 1095 (2008)
ATTO 532 (ATTO-TEC GmbH)	488 nm	120 ps	600 nm	200 ps	250 kHz		1.1 GW/cm <sup>2</sup>		<40 nm (xy)	
DY-485XL (Dyomics GmbH)	488 nm	< 100 ps	647 nm	~ 200 ps	72 MHz	(20 + 3) mW			40 – 45 nm (xyz)	R. Schmidt et al., <i>Nat. Meth.</i> 5, 539 (2008)
Alexa Fluor 488 (Invitrogen GmbH)	488 nm	cw	592 nm	cw	cw	< 600 mW			< 60 nm (xy)	G. Moneron et al., <i>Opt. Expr.</i> 18, 1302 (2010)
Chromo 488 (Actif Motif)	488 nm	140 ps	602 nm	200 ps	250 kHz	0.6 mW			~ 30 nm (xy)	L. Meyer et al., <i>Small</i> 4, 1095 (2008) (Supporting Material)
Chromo 488 (Actif Motif)	488 nm	cw	592 nm	cw	cw	< 600 mW			< 60 nm (xy)	G. Moneron et al., <i>Opt. Expr.</i> 18, 1302 (2010)
Oregon Green 488 (Invitrogen GmbH)	488 nm	cw	592 nm	cw	cw	< 600 mW			< 60 nm (xy)	G. Moneron et al., <i>Opt. Expr.</i> 18, 1302 (2010)
FITC	488 nm	cw	592 nm	cw	cw	< 600 mW			< 60 nm (xy)	G. Moneron et al., <i>Opt. Expr.</i> 18, 1302 (2010)
DY-495 (Dyomics GmbH)	488 nm	cw	592 nm	cw	cw	< 600 mW			< 60 nm (xy)	G. Moneron et al., <i>Opt. Expr.</i> 18, 1302 (2010)
GFP	490 nm	100 ps	575 nm	200 ps	80 MHz	7.2 mW			~ 70 nm (xy)	K. Willig et al., <i>Nat. Meth.</i> 3, 721 (2006)
Citrine	490 nm	100 ps	598 nm	300 ps	80 MHz	36 mW	807 MW/cm <sup>2</sup>	0.46 nJ	48 nm (xy)	B. Hein et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 105, 14271 (2008)
Citrine	488 nm	cw	592 nm	cw	cw	112 mW	62 MW/cm <sup>2</sup>		~ 60 nm (xy)	B. Hein et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 105, 14271 (2008)
YFP	490 nm	100 ps	598 nm	300 ps	80 MHz	18 mW	400 MW/cm <sup>2</sup>	0.23 nJ	~ 70 nm (xy)	U. V. Nägerl et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 105, 18982 (2008)
ATTO 565 (ATTO-TEC GmbH)	532 nm	~ 90 ps	640 – 660 nm	~ 90 ps	1 – 2 MHz				30 – 40 nm (xy)	D. Wildanger et al., <i>Opt. Expr.</i> 16, 9614 (2008)
ATTO 565 (ATTO-TEC GmbH)	532 nm	cw	647 nm	cw	cw	114 mW			~ 60 nm (xy)	K. Willig et al., <i>Nat. Meth.</i> 4, 915 (2007)
ATTO 565 (ATTO-TEC GmbH)	1060 nm	300 fs @ 117 MHz, 10 mW	676 nm	cw	cw	200 mW			~ 70 nm (xy)	G. Moneron, <i>S.W. Hell, Opt. Expr.</i> 17, 14567 (2009)
MR 121 SE (Roche Diagnostics)	532 nm	10 ps	793 nm	107 ps	76 MHz	10.4 mW			~ 50 nm (z)	M. Dyba et al., <i>Nat. Biotech.</i> 21, 1303 (2003)
NK51 (ATTO-TEC GmbH)	532 nm	< 100 ps	647 nm	~ 200 ps	72 MHz	(20 + 3) mW			40 – 45 nm (xyz)	R. Schmidt et al., <i>Nat. Meth.</i> 5, 539 (2008)
Sulfonated & rigidized rhodamine derivatives (V. Boyarskiy, Dep. NanoBiophotonics, MPI Göttingen)	532 nm	100 ps	640 nm	~ 300 ps	80 MHz		40 MW/cm <sup>2</sup>		< 90 nm (xy)	V. Boyarskiy et al., <i>Chem. Eur. J.</i> 14, 1784 (2008)
Nitrogen vacancies in diamond	532 nm	60 ps	775 nm	3.2 ns	8 MHz	850 mW	8.6 GW/cm <sup>2</sup>	106 nJ	6 nm (xy)	Rittweger et al., <i>Nat. Photon.</i> 3, 144 (2009)
Pyridine 2 / LDS 722 (Exciton, Radiant Dyes GmbH)	554 nm	250 fs	760 nm	13 ps	76 MHz				33 nm (z)	M. Dyba, <i>S.W. Hell, Phys. Rev. Lett.</i> 88, 163901 (2002)
Pyridine 2 / LDS 722 (Exciton, Radiant Dyes GmbH)	554 nm	250 fs	746 nm	50 – 200 ps	76 MHz	12.2 mW			44 nm (z)	M. Dyba et al., <i>New J. Phys.</i> 7, 134 (2005)
RH 414 (Biotium, Inc.)	554 nm	250 fs	746 nm	13 ps	76 MHz	8.78 mW			30 nm (z)	M. Dyba, <i>S.W. Hell, Phys. Rev. Lett.</i> 88, 163901 (2002)
ATTO 590 (ATTO-TEC GmbH)	570 nm	~ 90 ps	690 – 710 nm	~ 90 ps	1 MHz	1.4 – 2.4 mW		1.4 – 2.4 nJ	30 – 40 nm (xy)	D. Wildanger et al., <i>Opt. Expr.</i> 16, 9614 (2008)
ATTO 590 (ATTO-TEC GmbH)	570 nm	~ 90 ps	690 – 710 nm	~ 90 ps	1 MHz	3.8 mW		3.8 nJ	20 nm (xy)	D. Wildanger et al., <i>J. Microsc.</i> 236, 35 (2009)
Alexa 594 (Invitrogen Corp.)	570 nm	~ 90 ps	690 – 710 nm	~ 90 ps	1 MHz	3.8 mW		3.8 nJ	45 nm (xy), 108 nm (z)	
ATTO 594 (ATTO-TEC GmbH)	570 nm	~ 90 ps	690 – 710 nm	~ 90 ps	1 MHz	3.8 mW		3.8 nJ	30 nm (z)	D. Wildanger et al., <i>J. Microsc.</i> 236, 35 (2009)
DyLight 594 (Thermo Scientific)	570 nm	~ 90 ps	690 – 710 nm	~ 90 ps	1 MHz	3.8 mW		3.8 nJ	40 nm (z)	D. Wildanger et al., <i>J. Microsc.</i> 236, 35 (2009)
ATTO 633 (ATTO-TEC GmbH)	630 nm	~ 90 ps	735 – 755 nm	~ 90 ps	1 – 2 MHz	1.4 – 2.4 mW		1.4 – 2.4 nJ	30 – 40 nm (xy)	D. Wildanger et al., <i>Opt. Expr.</i> 16, 9614 (2008)
ATTO 633 (ATTO-TEC GmbH)	635 nm	100 ps	750 nm	~ 200 ps	76 MHz			~ 1.5 nJ	40 nm (xy)	A. Punge et al., <i>Micr. Res. Techn.</i> 71, 644 (2008)
ATTO 647N (ATTO-TEC GmbH)	635 nm	cw	750 nm	cw	cw	423 mW			~ 50 nm (xy)	K. Willig et al., <i>Nat. Meth.</i> 4, 915 (2007)
ATTO 647N (ATTO-TEC GmbH)	635 nm	100 ps	780 nm	300 ps	250 kHz		700 MW/cm <sup>2</sup>		~ 65 nm (xy)	G. Donnert et al., <i>Biophys. J.: Biophys. Lett.</i> , L67 (2007) V. Westphal et al., <i>Science</i> 320, 247 (2008)
ATTO 647N (ATTO-TEC GmbH)	635 nm	120 ps	750 nm	200 ps	76 MHz		1.2 GW/cm <sup>2</sup>		<40 nm (xy)	L. Meyer et al., <i>Small</i> 4, 1095 (2008)
JA 26 (K.H. Drexhage, Siegen University)	635 nm	68 ps	781 nm	303 ps	40 MHz	10.1 mW		0.25 nJ	40 nm (x)	V. Westphal et al., <i>Appl. Phys.</i> 8, 77, 377 (2003)
JA 26 (K.H. Drexhage, Siegen University)	635 nm	68 ps	775 nm	300 ps	76 MHz		800 MW/cm <sup>2</sup>		16 nm (x)	V. Westphal, <i>S.W. Hell, Phys. Rev. Lett.</i> 94, 143903 (2005)
JA 26 (K.H. Drexhage, Siegen University)	635 nm	68 ps	780 nm	300 ps	80 MHz	90 – 100 mW		1.13 – 1.25 nJ	47 nm (xy)	V. Westphal et al., <i>J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.</i> 38, S695 (2005)
JA 26 (K.H. Drexhage, Siegen University)	637 nm	54 ps	778 – 785 nm	303 ps	40 MHz				120 – 140 nm (xy)	V. Westphal et al., <i>Appl. Phys. Lett.</i> 82, 3125 (2003)

## Resolución vs. Intensidad Aplicada

$$\tau_{fl} = 2 \text{ ns}, \tau_Q = 0.1 \text{ ns}, \tau_{vib} = 1 \text{ ps}, \sigma_{sted} = 10^{-16} \text{ cm}^2$$

$$\lambda_{exc} = 500 \text{ nm}, \lambda_{sted} = 600 \text{ nm}, NA = 1.4 \text{ (aceite)}$$



a) Sin STED

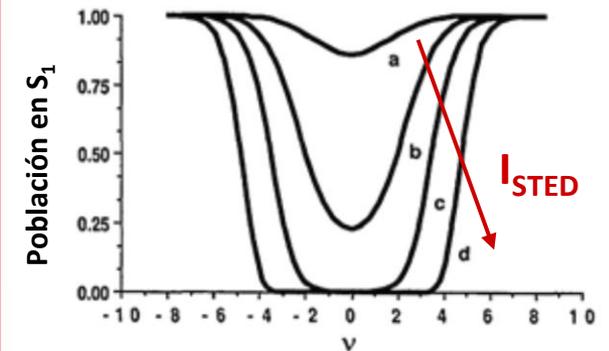
Para  $I_{STED}$  (MW/cm<sup>2</sup>)

b) 10

c) 100

d) 500

e) 1000



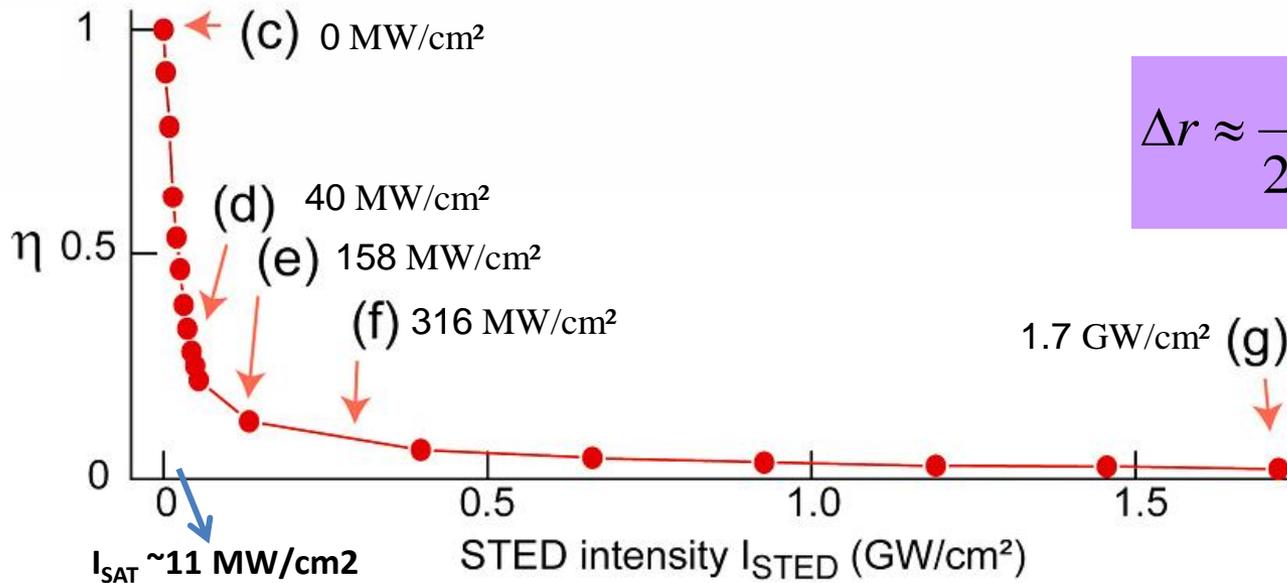
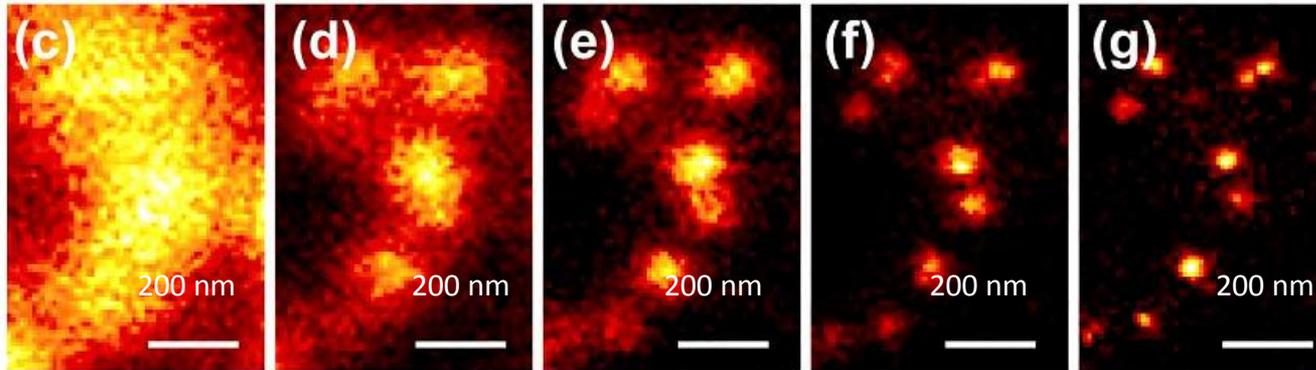
↑  $I_{STED}$  el área de depleción se incrementa en diámetro.

## Resolución vs. Intensidad Aplicada

Nanopartículas fluorescentes de 24nm depositadas sobre un cubreobjeto.

Confocal

STED

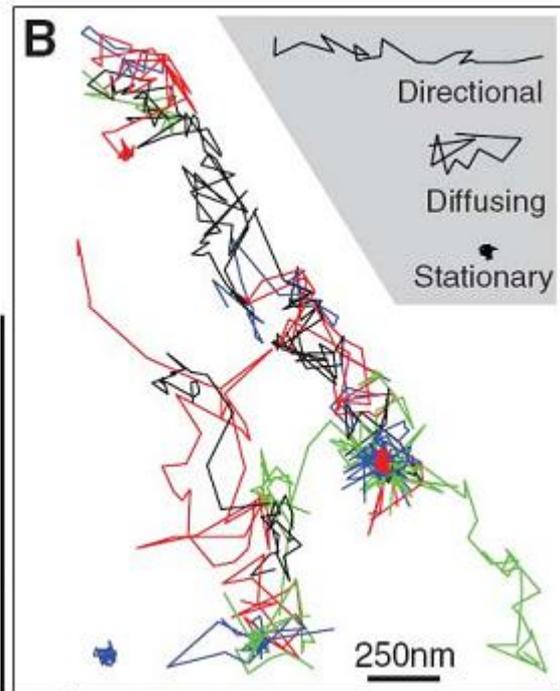
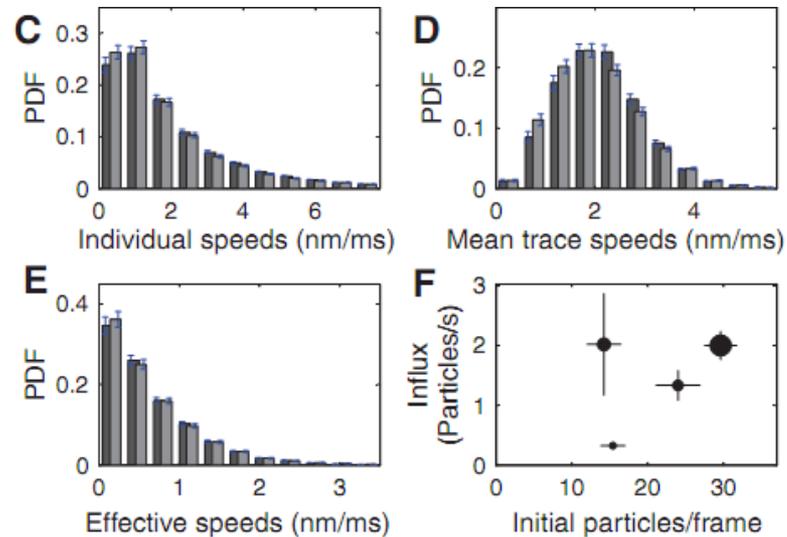


$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{depl.} / I_{sat.}}}$$

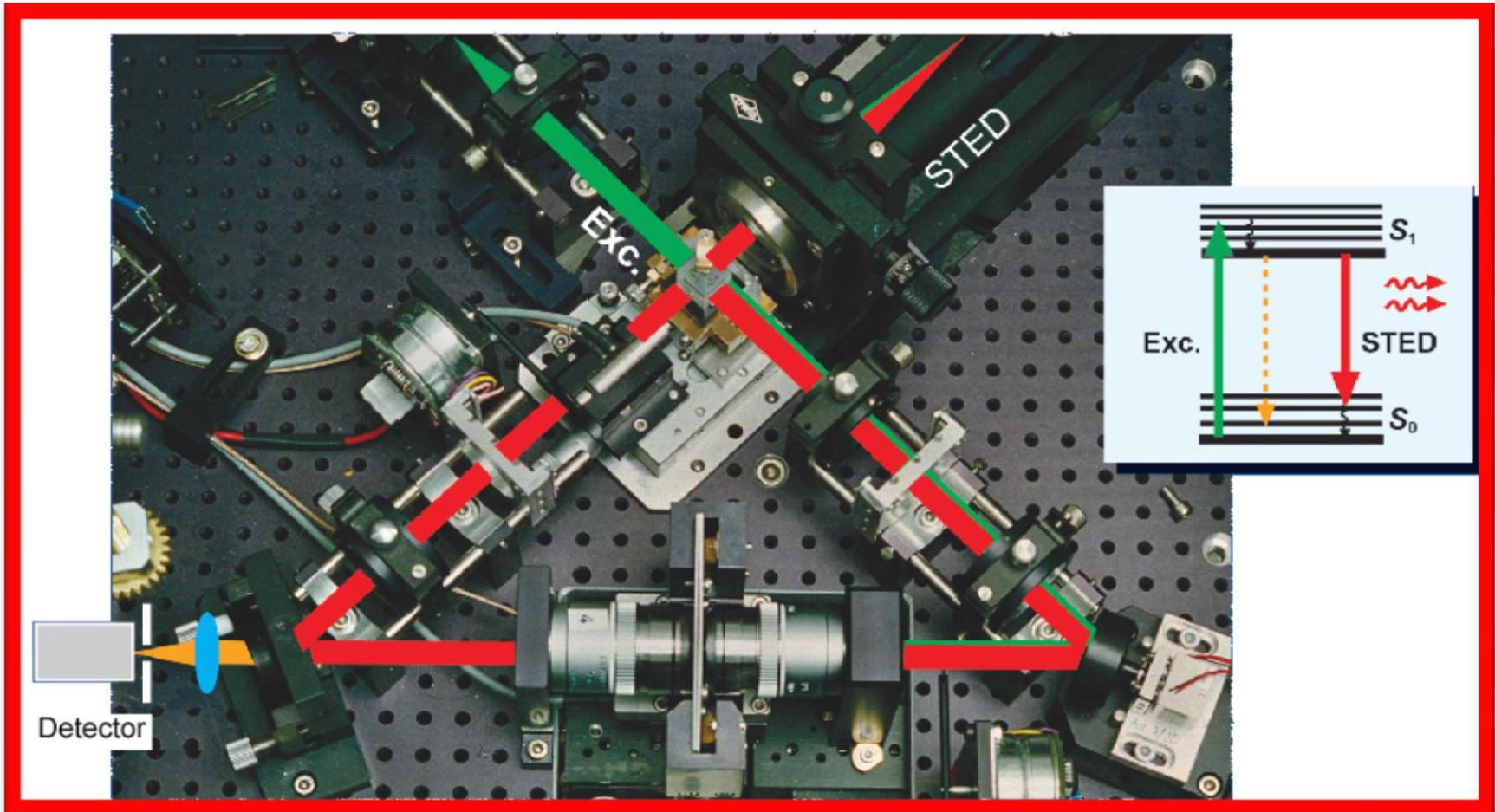
## EJEMPLOS Y APLICACIONES

Velocidad del video = 28 cuadros por segundo  
 Campo de visión = 2,5 x 1,8  $\mu\text{m}$   
 Resolución xy = 62 nm (18x reducción de área)  
 XY: 16-kHz espejo resonante; Z: piezo.

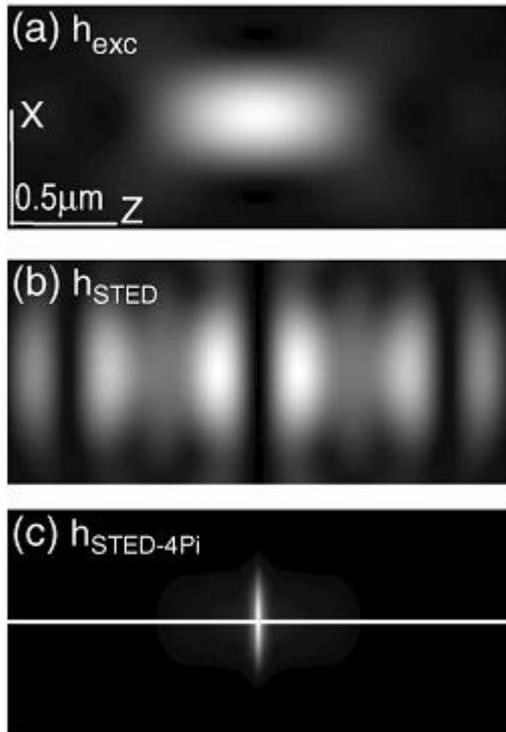
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1154228/DC1>

Trayectorias:Histogramas de las velocidades vesiculares:

## DISPOSICIÓN EXPERIMENTAL

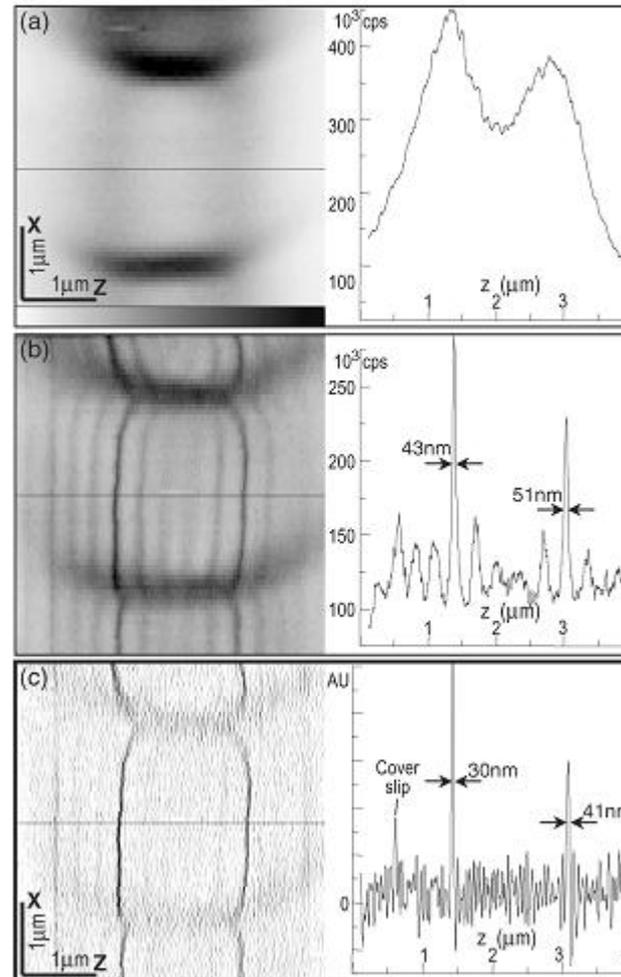
Detección por una sola lente: **Tipo-A**

Intensidad calculada para PSF



Imágenes de la primer microscopia de campo lejano con resolución espacial de 30 de 40 nm, ( $\lambda/23$ ).

Imágenes XZ de la membrana marcada de una bacteria



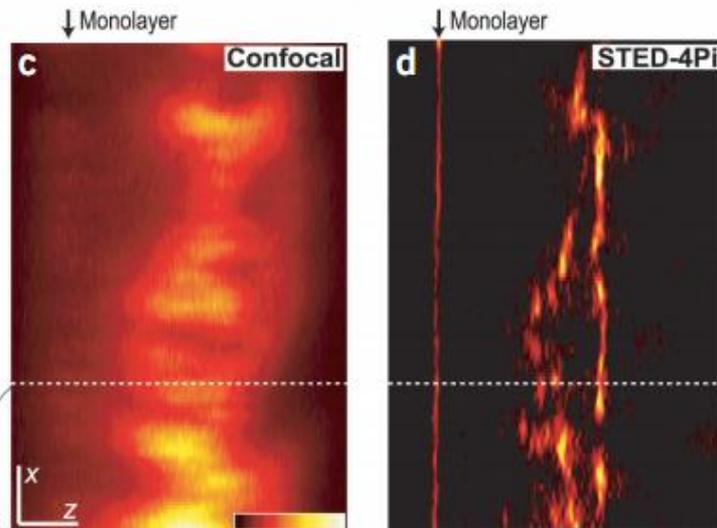
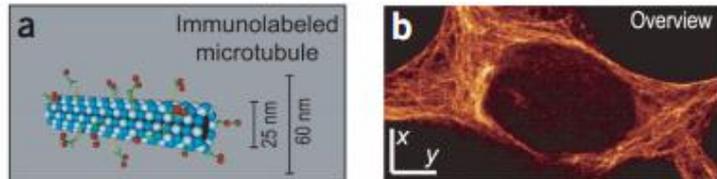
CONFOCAL

STED-4Pi

STED-4Pi  
(Filtro lineal)

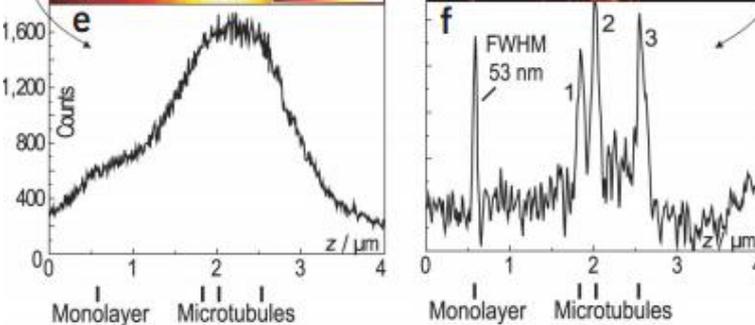
## EJEMPLOS Y APLICACIONES

*Red microtubular de una célula humana embrionaria del riñón (HEK)*



Tamaño del pixel:  
95nm x 9,8nm (x, z)

Resolución axial de ~ 50 nm.  
(1/16,  $\lambda_{exc}=739\text{nm}$ )



# CONCLUSIONES

1. Con la Microscopía 4Pi se aumentó la Resolución AXIAL en un factor de **4 a 7 veces** (comparado con la Microscopía confocal)
2. Se lograron eliminar los lóbulos secundarios.
3. Con la Microscopía 4 Pi se logran imágenes en 3D con resolución de **100 nm** en células vivas.
4. La Microscopía STED rompió el límite de difracción observando resoluciones de  **$\Delta x \sim 30\text{nm}$** .
5. En contraste a las otras microscopias no lineales, STED utiliza intensidades de láseres bajas permitiendo el estudio de células vivas.
6. STED, es la única técnica conocida capaz de observar volúmenes fluorescentes en la escala del zeptolitro.
7. La microscopia 4Pi-STED, permitió observar experimentos de inmunofluorescencia con  **$\Delta z \sim 50\text{nm}$** .



<http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/details/product/leica-tcs-sted/showcase/>



*That's all Folks!*