

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

WINFRIED DENK,\* JAMES H. STRICKLER, WATT W. WEBB

Science, New Series, Vol. 248, No. 4951 (Apr. 6, 1990), pp. 73-76

Andrés Arias Durán  
Quimey Pears Stefano



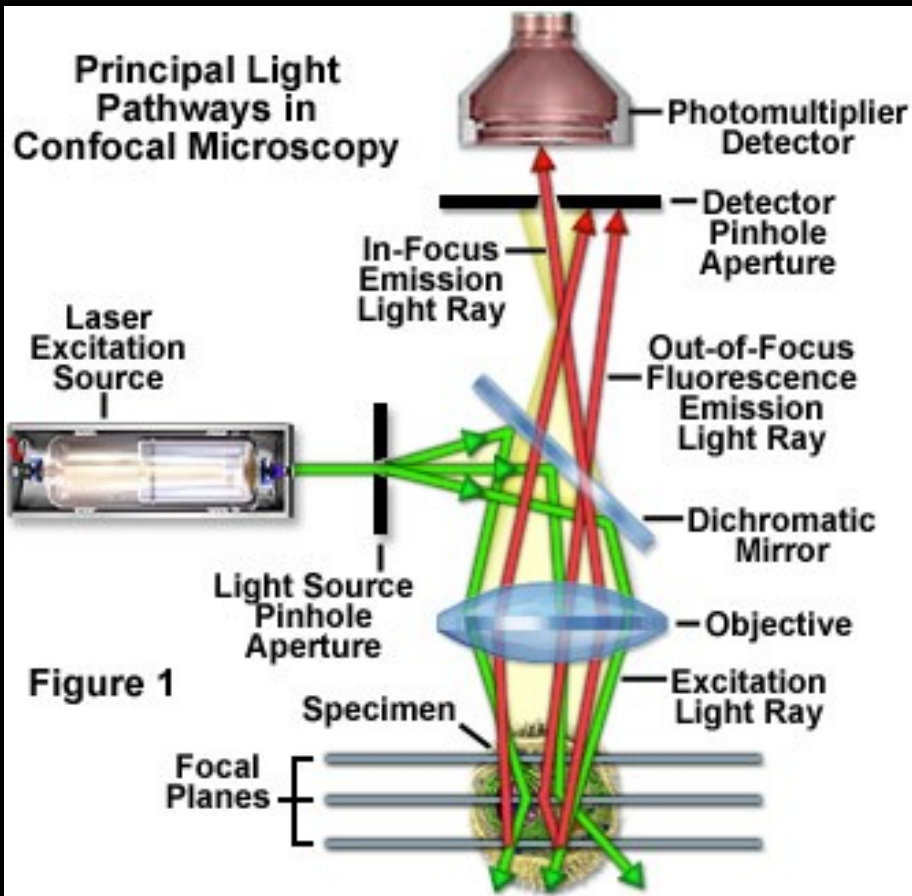
# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Contenido

- ✓ **Antecedentes**
  - Confocal Scanning Microscopy
  - Two-photon excitation fluorescence (2PEF)
  
- ✓ **Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy(TPM)**
  
- ✓ **Conclusiones**

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Microscopio Confocal



$$\text{Min}[\Delta r_{\perp}] = 2n \frac{\lambda}{NA^2}$$
$$\text{Min}[\Delta r_{\parallel}] \approx 0,61 \frac{\lambda}{NA}$$

Si tomamos  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ,  $NA=1.4$ , y  $n=1.50$

$$\text{Min}[\Delta r_{\perp}] \approx 560 \text{ nm}$$

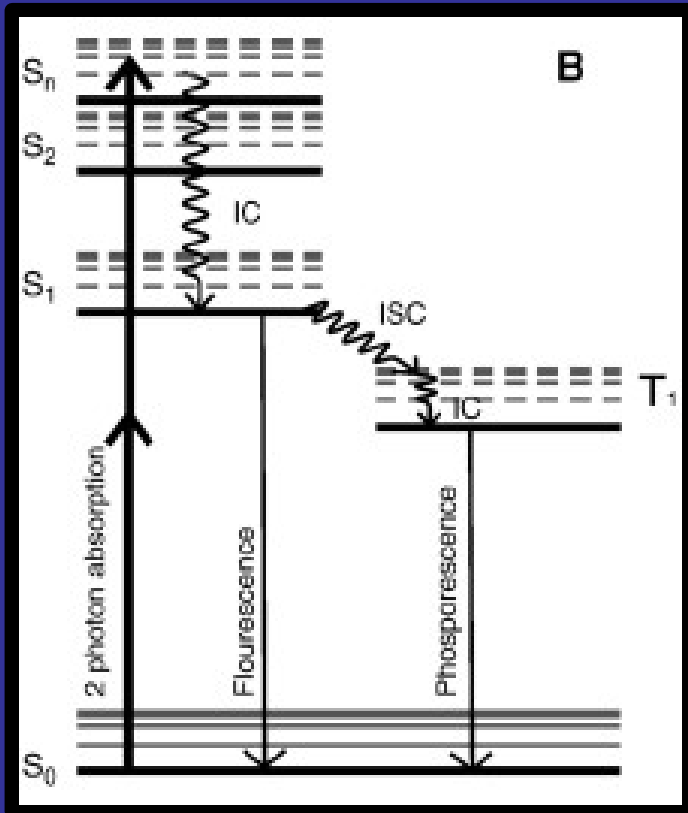
$$\text{Min}[\Delta r_{\parallel}] \approx 160 \text{ nm}$$

$$\text{PSF}_{\text{conf}} = (\text{PSF}_{\text{ilum}}) \times (\text{PSF}_{\text{detec}}) \approx \text{PSF}^2(z, \rho)$$

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Two-photon excitation fluorescence: Göppert-Mayer (1931)

Proceso no lineal que involucra la absorción de dos fotones cuya energía (total) es suficiente para inducir una transición molecular a un estado electrónico excitado



- Los dos fotones deben llegar “simultáneamente” ( $\sim 10^{-18}$  fs); alto flujo de fotones ( $10^{20} - 10^{30}$  fot/cm<sup>2</sup>s)
- La eficiencia depende de la sección eficaz de absorción para dos fotones, que es una propiedad de la molécula
- También depende de la distribución espacial y temporal de la luz

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Two-photon excitation fluorescence (2PEF)

- El número de fotones absorbidos por molécula por pulso es:

$$n_a \approx \frac{P_0^2}{\tau_p f_p^2} \delta \left( \frac{A^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2$$

Donde: t: duración del pulso

f: frecuencia de repetición del pulso

$\delta$ : sección eficaz

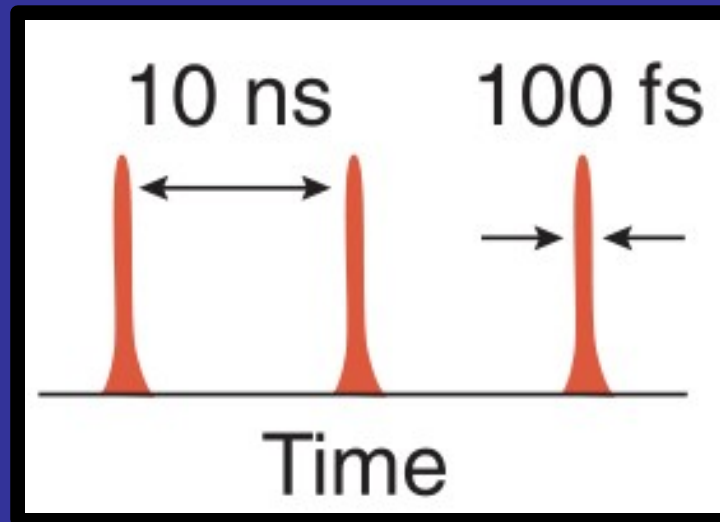
A: apertura numérica

$P_0$ : potencia promedio incidente del laser

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

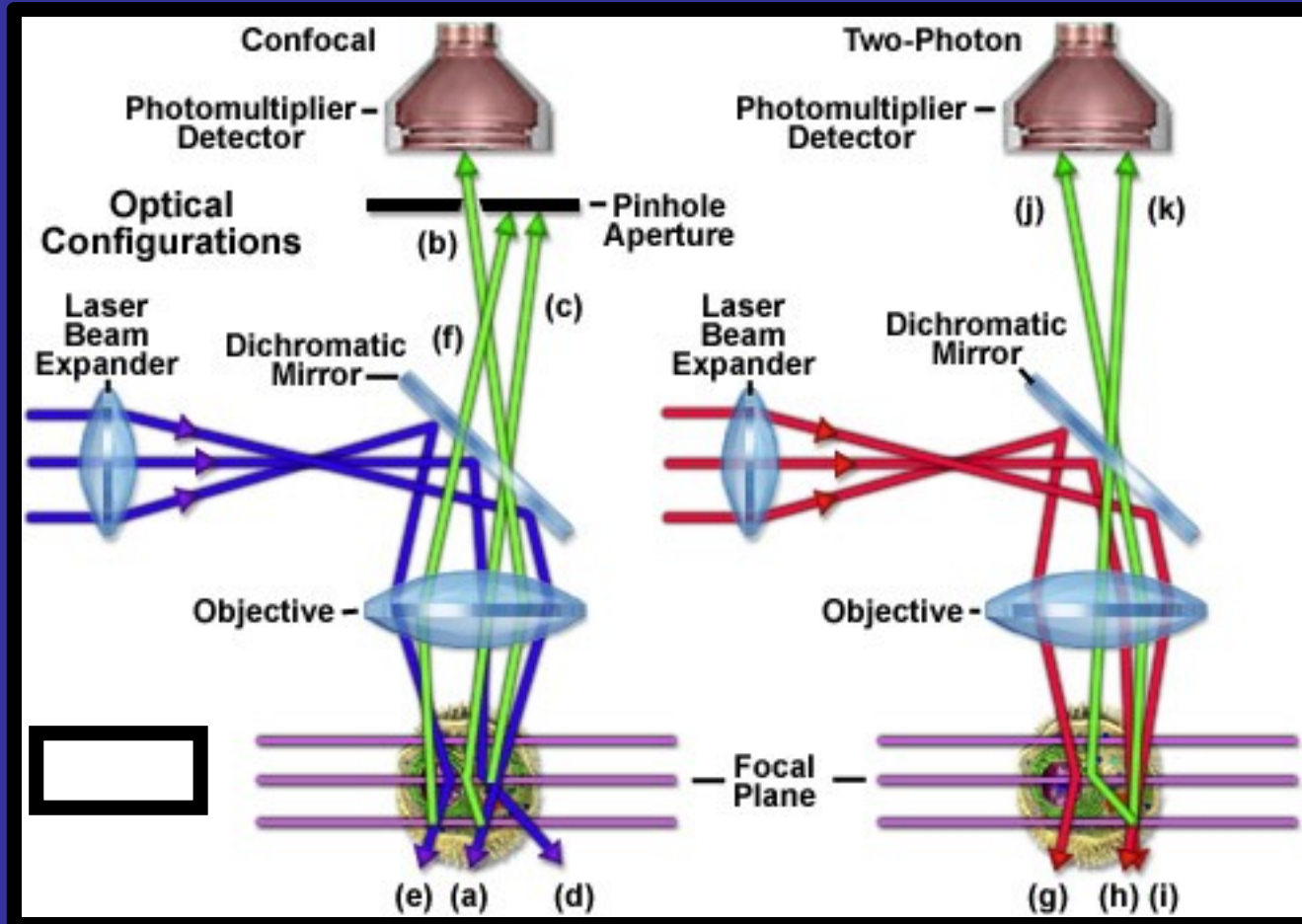
## Two-photon excitation fluorescence (2PEF)

- Como valor de la sección eficaz es muy bajo es necesario concentrar la luz de excitación en el espacio y el tiempo
- Para esto se usan lasers que emiten pulsos ultracortos



# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Two-photon laser scanning fluorescence Microscopy:

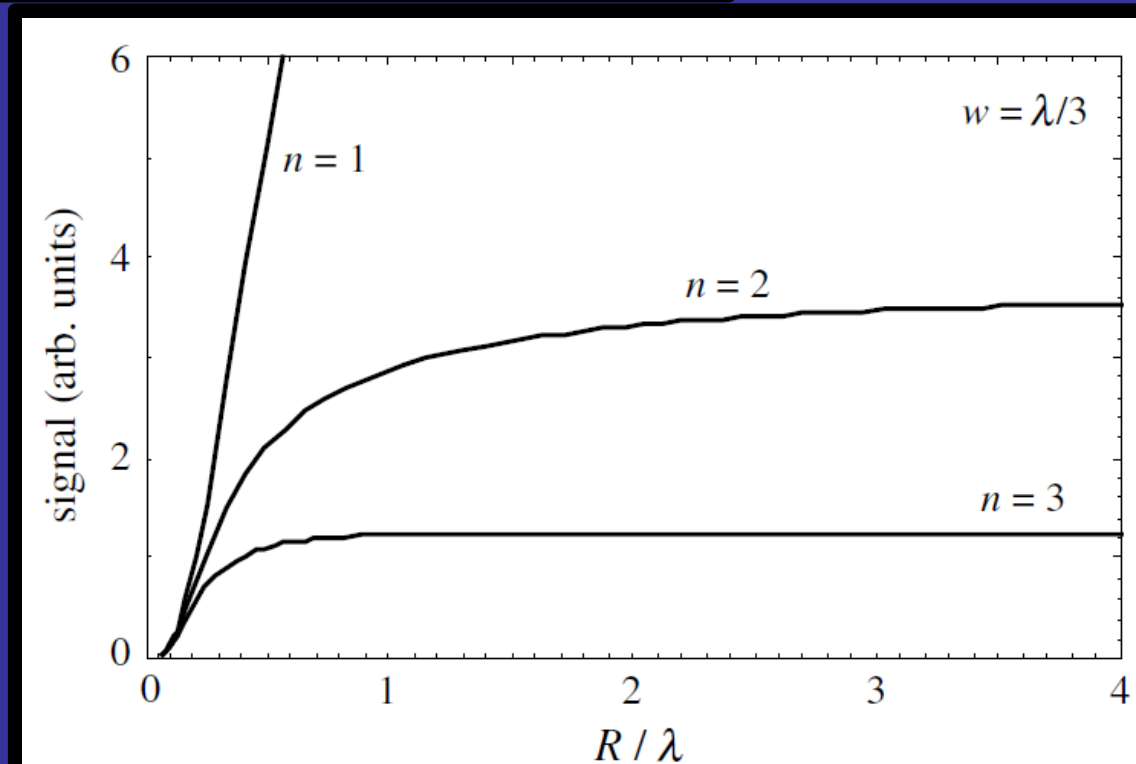
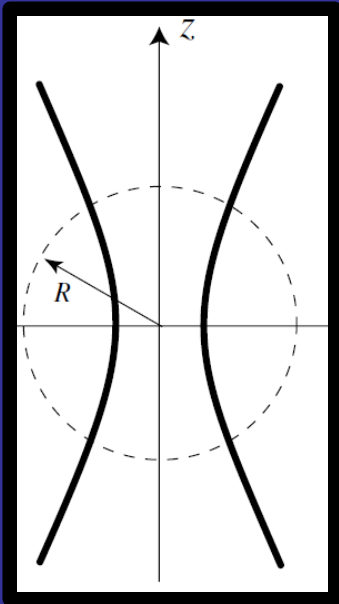


# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

Volumen de Fluorescencia:

$$S(\vec{r}) \propto \delta_n [\vec{E}(\vec{r}) \cdot \vec{E}^*(\vec{r})]^n$$

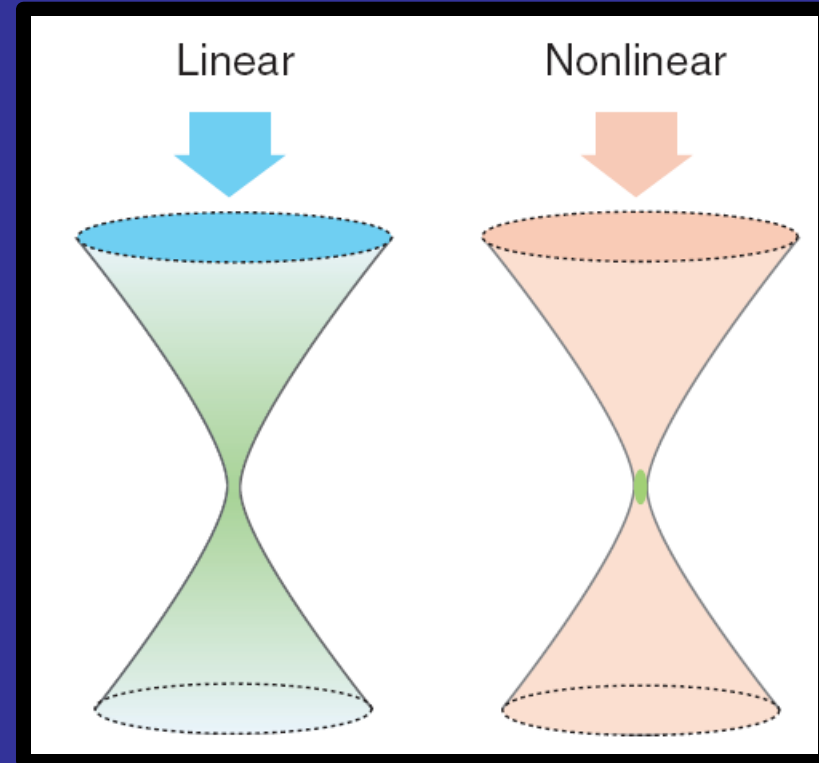
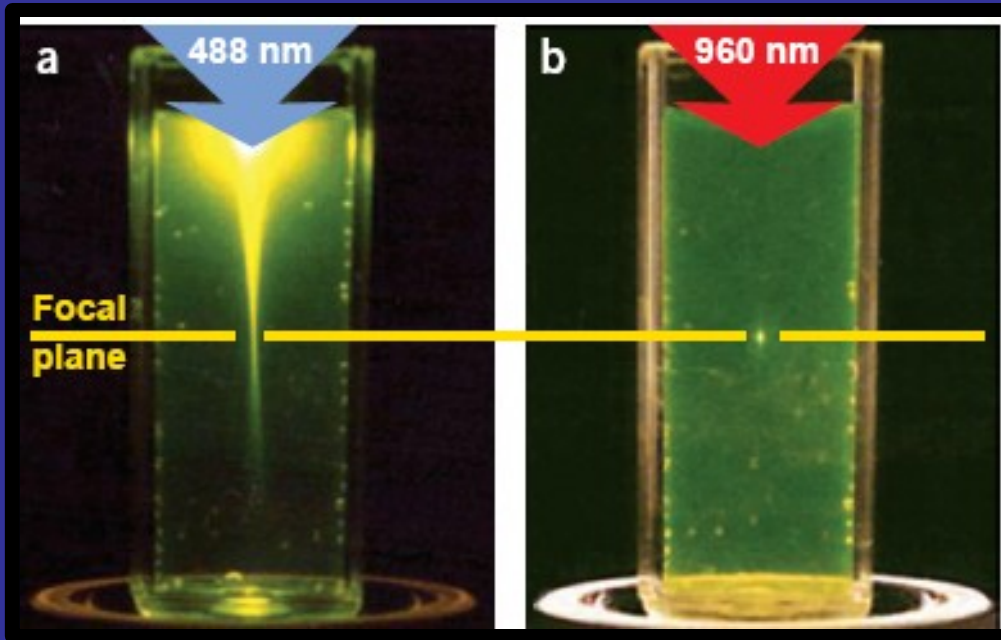
$$S_{tot} \propto \delta_n \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \int_0^R |\vec{E}(r, \theta, \varphi)|^{2n} r^2 \sin \theta d\varphi d\theta dR$$





# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

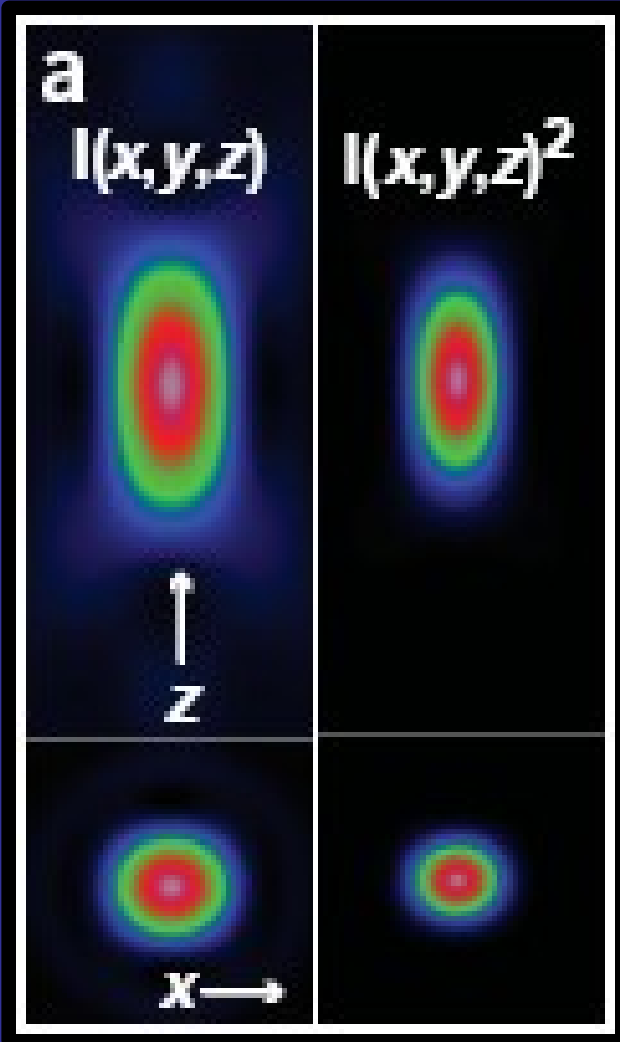
Volumen de Fluorescencia:



$$PSF_{\text{twophoton}} = (PSF_{\text{illum}})^2 \approx PSF^2(z/2, \rho/2)$$

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

Resolución:

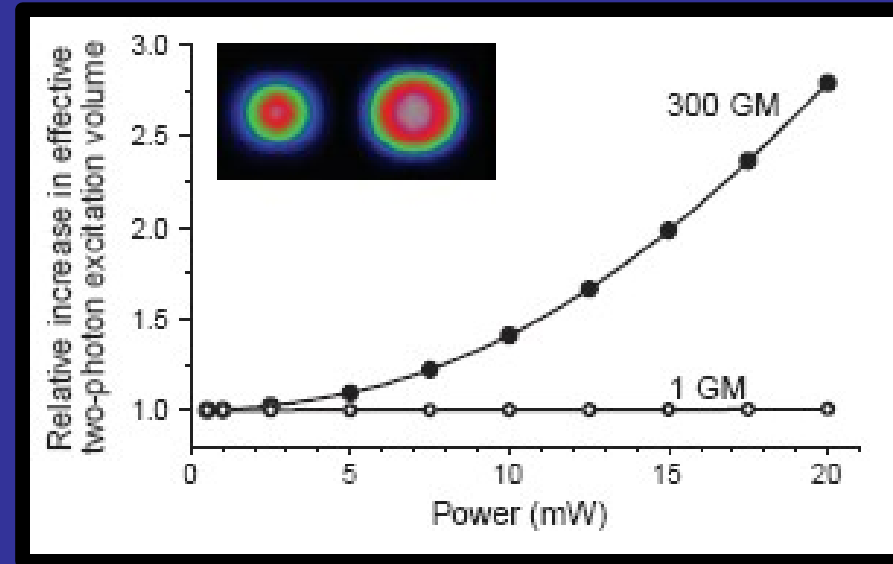
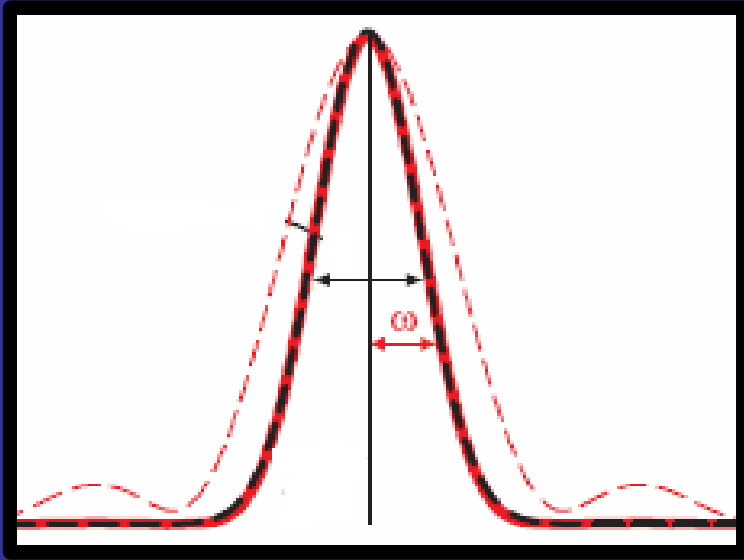


$$\omega_z = 2,3 n \frac{\lambda}{NA^2}$$

$$\omega_{xy} = \begin{cases} 0,226 \frac{\lambda}{NA} & NA \leq 0,7 \\ 0,226 \frac{\lambda}{NA^{0,91}} & NA > 0,7 \end{cases}$$

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

Resolución:



$$V_{\text{TPE}} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z$$

Para  $\lambda = 730 \text{ nm}$ ,  $\text{NA}=1.4$   $\longrightarrow$

$$\begin{aligned} V_{\text{TPE}} &\approx 0,1 \mu\text{m}^3 \\ \omega_{xy} &\approx 120 \text{ nm} \\ \omega_z &\approx 1,3 \mu\text{m} \end{aligned}$$

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

Intensidad de la fluorescencia

Potencia promedio laser:

$$n_a \approx \frac{p_0^2}{\tau_p f_p^2} \delta \left( \frac{A^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2$$

si  $\delta \approx 10^{-58} m^4 s / \text{photon}; \quad \tau_p = 100 fs; \quad f_p = 80 MHz$

Saturación del fluorosforo  
mediante TPE



$$P_0 = 50 \text{ mW}$$

Saturación del fluorosforo  
mediante OPE



$$P_0 = 3 \text{ mW}$$

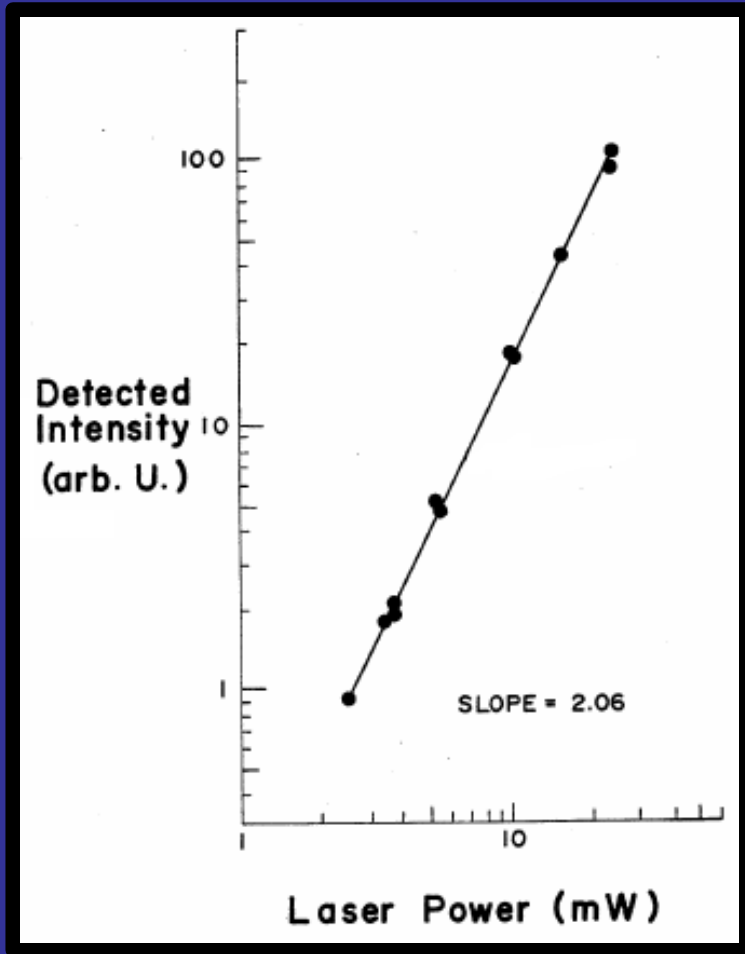
Para incrementar la fluorescencia:

$$f_p \approx \tau_f^{-1} \approx 10^9 s^{-1}$$

←  $\tau_f$  : duración fluorescencia  
de una molécula

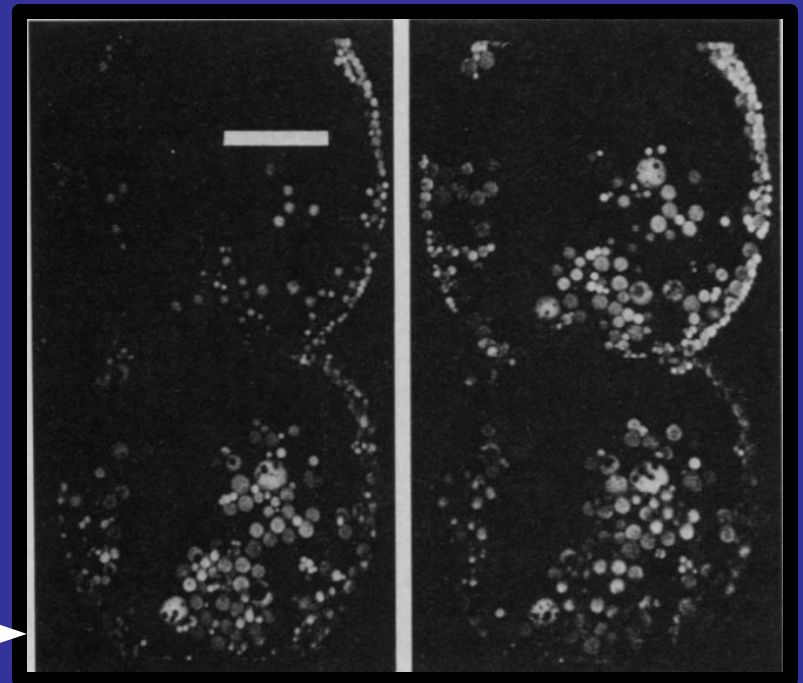
# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Intensidad de la fluorescencia



- La pendiente de 2.06 coincide con absorción de dos fotones ( $I \propto E^2$ )
- A partir de la concentración de la tinta, el tamaño de la zona iluminada y los datos del pulso se estima:

$$\delta \approx 5 \cdot 10^{-58} m^4 s / \text{photon}$$



4 planos xy – Escala 50  $\mu\text{m}$  – 2 seg  
 $\Delta Z = 3 \mu\text{m}$

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

*In vivo* neocortex de un ratón

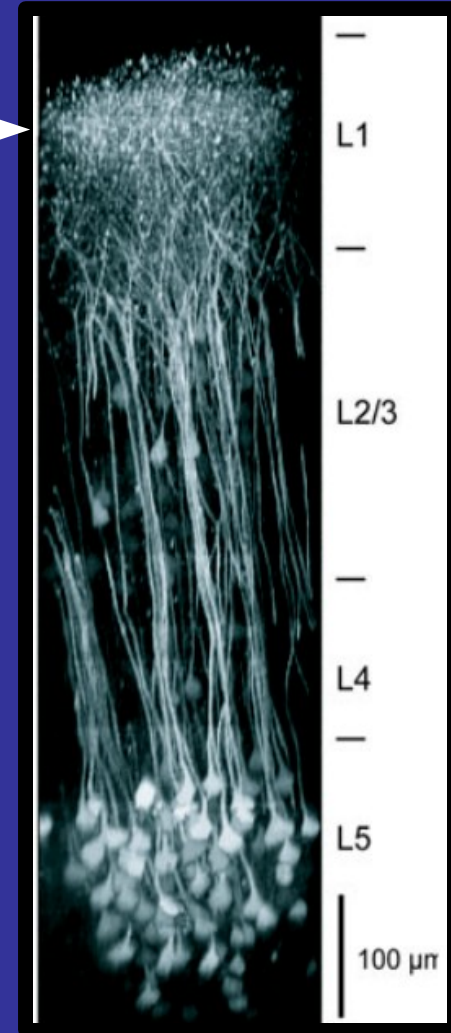
Lente 40x NA 0.8

Se observa toda la profundidad del *neocortex*



*Celulas de riñon de cerdo vivas (cultivo)*

Escala 10  $\mu\text{m}$

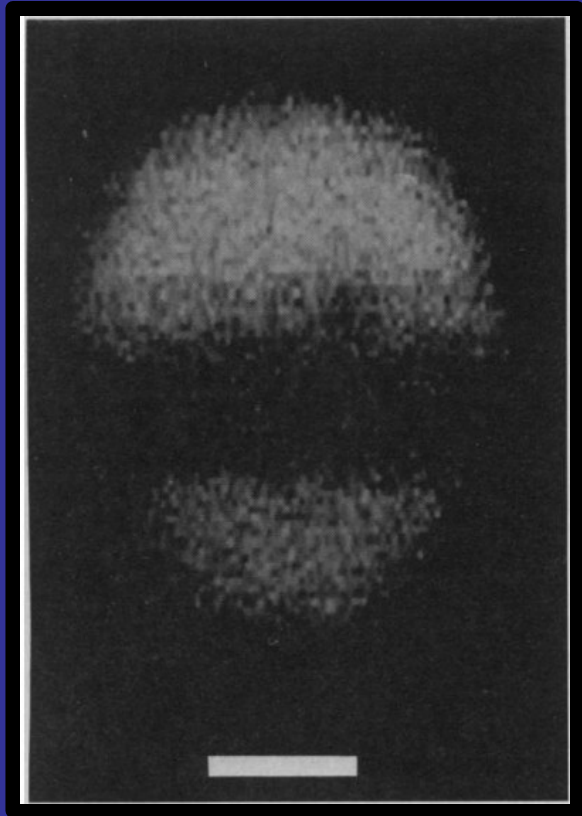


*Helmchen & Denk - Deep tissue two-photon microscopy*

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

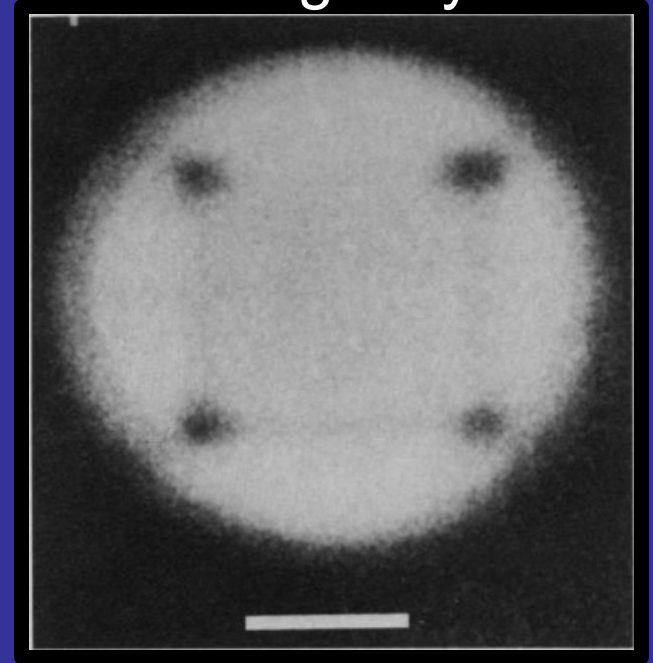
## Efecto de photo-bleaching

Photo-bleaching muy localizado



2 $\mu$ m

xz – Escala 2  $\mu$ m – 6 min



xy – Escala 2  $\mu$ m – 13 s

En 2PEF, la intensidad cae fuertemente por encima y por debajo del plano focal

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Ventajas con respecto al confocal

### En el confocal:

- Fluorescencia “activada” en todas las posiciones en el eje axial
- Todo el espécimen es “blanqueado” aún mirando un solo plano imagen
- El *pinhole* restringe la cantidad de luz que llega al detector
- No se puede usar fluoróscoros UV porque dañan las células vivas
- No hay lentes para UV corregidas cromaticamente



# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Conclusiones

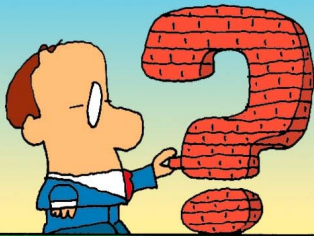
- Efecto de seccionamiento óptico en el eje axial sin necesidad de *pinhole* – reconstrucción 3D de células vivas y otros objetos microscópicos
- Resoluciones similares a las del *confocal*
- Excitación de la fluorescencia muy localizada
- Fluorescencia en el UV – Nuevos Fluoróforos
- No se ve muy afectado por la luz dispersada por la muestra – Buen Contraste
- Confina el “foto-daño” y el “foto-blanqueado” a un pequeño volumen
- Se necesita un laser pulsado con pulsos en el orden de los 100 fs.

# Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

## Bibliografía

- *Denk, W., Strickler, J.H. & Webb, W.W.* Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73–76 (1990).
- *Denk WJ, Strickler JP, Webb WW.* 1991. Two-photon laser microscopy. *United States Patent*, 5,034,613, July 23, 1991.
- *Helmchen, F. & Denk, W.* Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* 2, 932–940 (2005)
- *Zipfel, W.R., Williams, R.M. & Webb, W.W.* Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* 21, 1369-1377 (2003).
- *Novotny, L. & Hecht, B.* Principles of nano-optics. *Cambridge University Press* (2006).

## La duda



GUTIÉRREZ

# GRACIAS!!!