

BOHDAN PATERCZYK

*Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1, 02-093 Warszawa
E-mail: bataki@biol.uw.edu.pl*

DROGA DO NANOSKOPII

MIKROSKOPIA A NANOSKOPIA

Szeroko pojęta mikroskopia świetlna umożliwia obserwacje drobnych obiektów o rozmiarach leżących daleko poza granicą zdolności rozdzielczej nieuzbrojonego w mikroskop ludzkiego oka. Zgodnie z danymi w Tabeli 1 najmniejsze obiekty, które możemy w ten sposób rozdzielić mają rozmiary około ćwierci mikrometra, czyli 250 nm. Termin nanoskopia sugeruje, że jest to technika zajmująca się obserwacją obiektów o rozmiarach nanometrowych, a ponieważ 250 nm to też rozmiar nanometrowy, ktoś mógłby zadać pytanie, po co wprowadzam nowy termin. Tabela zawiera listę granicznych zdolności

rozdzielczych wybranych, nowych systemów mikroskopowych. Łatwo można zauważyć pewną ogólną tendencję, a mianowicie stopniowe poprawianie maksymalnej zdolności rozdzielczej. Najlepsze pod tym względem systemy dochodzą do wartości 10 nm, czyli do rozmiarów średniej cząsteczki białka, i jest to już ogromna, jakościowa zmiana możliwości obrazowania, na przykład procesów życiowych na poziomie molekularnym. Dlatego też zdecydowałem się zatytułować ten krótki i z konieczności pobieżny przegląd współczesnych technik mikroskopowych „Droga do nanoskopii”.

ROZDZIELCZOŚĆ MIKROSKOPU OGRANICZONA JEST ZJAWISKIEM DYFRAKЦИИ

Praktyczna rozdzielczość mikroskopu optycznego już dosyć dawno osiągnęła granice wynikające z równań optyki falowej i z tego też powodu mikroskop został uznany za doskonały przykład potęgi naszej nauki i technologii. Uważaliśmy, że wyprodukowaliśmy urządzenie, którego zgodnie z obowiązującymi prawami fizyki nie da się już poprawić i to poczucie dumy towarzyszyło ludziom przez dość długi czas. Dalsze poszukiwania nie tyle zakwestionowały podstawowe prawa optyki, co doprowadziły do odkrycia nowych. Te nowe odkrycia stopniowo umożliwiały skonstruowanie mikroskopu kontrastowo-fazowego i całej rodziny mikroskopów interferencyjnych. Jednak prawdziwy przełom w mikroskopii biologicznej nastąpił po

wprowadzeniu dużej i ciągle rozwijającej się grupy mikroskopów działających w oparciu o zastosowanie sond znakowanych fluorescencyjnie. Dopiero w grupie mikroskopów fluorescencyjnych udało się przełamać fizyczne ograniczenia maksymalnej zdolności rozdzielczej.

Informacja o strukturze subtelnej zapisana jest głównie w ugiętych przez drobne elementy preparatu promieniach świetlnych wychodzących z preparatu. Im drobniejsza jest struktura, tym mocniej ugina promienie świetlne. Granica zdolności rozdzielczej obiektywu zależy od jego kąta aperturowego. Apertura numeryczna jest iloczynem kąta aperturowego i współczynnika załamania światła ośrodka znajdującego się pomiędzy

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Ryc. 1. Oryginalny zapis równania opisującego zdolność rozdzielczą mikroskopu optycznego zapisany ręką Ernsta Abbe'go.

preparatem a czołową soczewką obiektywu. Oprawa soczewki obiektywu jest granicą, która odcina promienie tak mocno ugięte, że nie mieszczą się w kącie aperturowym i nie wchodząc do obiektywu nie mogą już uczestniczyć w tworzeniu obrazu najdrobniejszych struktur znajdujących się w preparacie. Dlaczego więc nie skonstruować obiektywów o jeszcze większej aperturze? Poprzestańmy na stwierdzeniu, że jest to niezwykle trudne i kosztowne, a ewentualne efekty i tak są minimalne. Podobnie jest z biegiem na 100 m. Możliwe jest co prawda, że jakiś biegacz poprawi rekord świata, ale ta poprawa nie będzie miała wymiaru sekundowego. Czy wyobrażacie sobie wynik biegu na 100 m zbliżony do 5 s? Poprawa szybkości sprintera może dotyczyć setnych albo tysięcznych części sekundy. W przypadku obiektywów mikroskopowych taka „poprawa” jest mało interesująca i praktycznie bez znaczenia. Jak udało się inteligentnie pokonać tą barierę przeczytacie w rozdziale o mikroskopii 4Pi.

Wartość d we wzorze (Ryc. 1) oznacza minimalną odległość pomiędzy dwoma punktami obserwowanego przedmiotu, które w obrazie będą widoczne jako rozłączne, według pewnego ścisłego kryterium pomiarowego. Zależy nam na tym, żeby ta wartość była jak najmniejsza. Zdolność rozdzielcza

układu optycznego jest tym większa, im mniejsza jest odległość d we wzorze. Jak wynika ze wzoru, im mniejszą zastosujemy długość fali λ , tym zdolność rozdzielcza mikroskopu będzie większa. Pomijając bardzo szczególny i rzadki typ mikroskopów pracujących w ultrafiolecie, do dyspozycji mamy zakres długości fal światła od 400 do 700 nm, a w przypadku mikroskopii dwufotonicznej (omówionej w dalszej części tekstu) zakres od 700 do 1000 nm i takie wartości możemy wstawiać do wzoru, żeby zorientować się jak w każdym przypadku długość fali wpływa na rozdzielczość mikroskopu. Dalej możemy stwierdzić, że zwiększenie wartości współczynnika załamania n w mianowniku także zwiększa zdolność rozdzielczą mikroskopu. Zostało to praktycznie wykorzystane przy konstrukcji obiektywów immersyjnych. Ostatnia składowa wzoru mówi nam, że im większą wartość ma sinus kąta aperturowego obiektywu (lub inaczej, im większa jest apertura numeryczna zastosowanego obiektywu, która jest iloczynem kąta aperturowego i współczynnika załamania), tym zdolność rozdzielcza mikroskopu jest większa. Pisząc wcześniej o mikroskopie jako o urządzeniu, które osiągnęło teoretyczne granice doskonałości wynikające z praw optyki, miałem na myśli to, że jakość klasycznych mikroskopów osiągnęła to, co wtedy wydawało się możliwe.

Najlepsze, współcześnie produkowane obiektywy pozwalają w optymalnych warunkach widzieć w postaci rozdzielonej obiekty położone nie bliżej od siebie niż 0,25 μm , czyli 250 nm. Czy tę granicę można przekroczyć?

W Tabeli 1 zebrałem przybliżone rozdzielczości wybranych typów mikroskopów optycznych w porównaniu z transmisyjnym mikroskopem elektronowym. Łatwo jest za-

Tabela 1. Maksymalne wartości rozdzielczości osiągane przez różnego rodzaju mikroskopy optyczne w porównaniu z transmisyjnym mikroskopem elektronowym.

Typ mikroskopu	Maksymalna rozdzielczość dwupunktowa
Standardowy mikroskop optyczny	250 nm
Konfokalny mikroskop skaningowy (CSLM)	180–200 nm
Mikroskop Leica 4Pi	100 nm
Mikroskop Leica STED*	25–30 nm
Mikroskop Nikon STORM	10 nm
Elektronowy transmisyjny (TEM)*	1 nm

*te typy mikroskopów nie zostały omówiony w niniejszym artykule

uważyć nie tylko ciągły postęp w osiąganiu coraz wyższych rozdzielczości, ale także zbli-

żanie się możliwości mikroskopów optycznych i elektronowych.

ZJAWISKO FLUORESCENCJI I SONDY ZNAKOWANE FLUORESCENCYJNIE

Praktyczne wykorzystanie zjawiska fluorescencji we wszystkich typach mikroskopów fluorescencyjnych polega na możliwości cyklicznego wzbudzania (ładowania energią) wybranych cząsteczek barwników. Wzbudzone cząsteczki barwników fluorescencyjnych emitują następnie część energii do środowiska w postaci fotonów. Zjawisko absorpcji i emisji promieniowania przez fluorochromy podlega pewnym prostym regułom. Prawie zawsze pochłaniane kwanty promieniowania mają wyższą energię i mniejszą długość fali (widmo absorpcyjne) niż emitowane kwanty promieniowania fluorescencyjnego (widmo emisyjne). Bierze się to stąd, że pewna część energii pochłoniętej przez cząsteczkę barwnika fluorescencyjnego rozpraszana jest w postaci energii drgań wewnętrznych (oscylacji) i rotacji cząsteczki. Tak zmniejszona porcja energii, w postaci kwantu światła o mniejszej energii i większej długości fali, jest przez wzbudzoną cząsteczkę emitowana na zewnątrz. Zmiana długości fali pomiędzy fotonami absorbowanymi a emitowanymi nosi nazwę przesunięcia Stokes'a.

Praktyczną ilustracją tego zjawiska może być zachowanie się najpopularniejszego barwnika fluorescencyjnego jakim jest fluoresceina. Jej cząsteczki pochłaniają wybiórczo kwanty światła o maksimum absorpcji przy 494 nm (niebieska część widma), a emitują kwanty o energiach w zielonym zakresie widma światła widzialnego z maksimum położonym przy 521 nm. Stosując odpowiednie filtry interferencyjne można odciać niebieskie fale świetlne użyte do wzbudzenia naszego przykładowego barwnika (fluore-

sceiny), a przepuścić tylko zielone promieniowanie wyemitowane przez wzbudzony fluorochrom. W rezultacie możemy się cieszyć obrazem rozmieszczenia świecących na zielono cząsteczek fluoresceiny na pięknie czarnym tle w obszarach preparatu, gdzie fluoresceiny nie było.

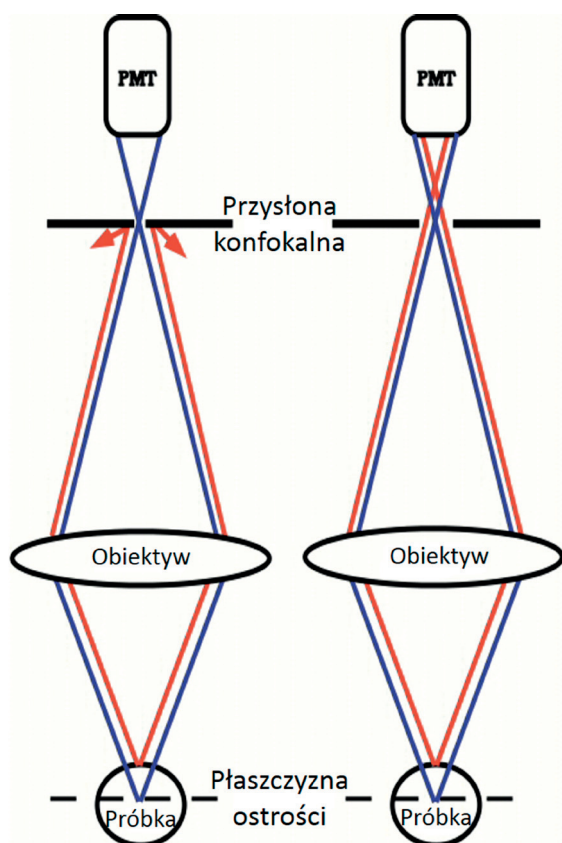
Jednak sam barwnik fluorescencyjny nie wystarczy do specyficznego wyznakowania struktur wewnątrzkomórkowych, ponieważ fluoresceina nie wykazuje żadnej wobec nich selektywności. Większość sond znakowanych fluorescencyjnie, używanych do specyficznego znakowania struktur komórkowych wymaga dodatkowego komponentu, jakim są przeciwciała (immunoglobuliny) o wysokiej specyficzności wobec pewnych unikalnych białek wchodzących w skład interesujących nas struktur komórkowych, zwanych markarami.

Podsumowując ten niezwykle uproszczony wstęp trzeba podkreślić, że znakomita większość używanych w immunocytochemii sond fluorescencyjnych składa się ze specyficznego przeciwciała odpowiadającego za precyzyjne rozpoznanie interesującego nas obiektu, a kowalencyjnie przywiązane do przeciwciała cząsteczki barwnika fluorescencyjnego odpowiadają tylko za możliwość wizualizacji znakowanej struktury. Znając konstrukcję sondy możemy powiedzieć, że sygnał fluorescencyjny pochodzi tylko z tych obszarów komórki, w których przeciwciała rozpoznały komplementarne antygeny znajdujące się w poszukiwanych strukturach komórkowych. Wiedza ta jest konieczna dla prawidłowej interpretacji obrazu.

KLASYCZNY MIKROSKOP FLUORESCENCYJNY

Wraz z wprowadzeniem technik fluorescencyjnych do mikroskopii optycznej radykalnie zmieniły się zasady tworzenia obrazu mikroskopowego. W tradycyjnym mikroskopie odpowiedni stopień skonstrastowania różnych struktur uzyskiwało się dzięki specyficznym barwnikom (nie fluorescencyjnym) i/lub zróżnicowanemu pochłanianiu światła, dzięki czemu otrzymywaliśmy w obrazie jaśniejsze i ciemniejsze obszary w różnych kolorach.

Wprowadzenie barwników fluorescencyjnych zasadniczo zmieniło sytuację. Emitujące światło cząsteczki fluorochromów mają rozmiary znacznie mniejsze od granicznej zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego. Ich poprawne obrazowanie polega na rejestracji odpowiednio dużej ilości wyemitowanych fotonów, zależnej od czułości detektora. Kiedy do obrazowania struktur wewnątrzkomórkowych używamy sond fluorescen-



Ryc. 2. Zasada działania mikroskopu konfokalnego.

Zmniejszenie średnicy otworu przysłony konfokalnej (pinhole) pozwala na odcięcie promieni świetlnych pochodzących spoza płaszczyzny obrazowania preparatu (lewa strona rysunku). Otwarta przysłona konfokalna, lub jej brak w klasycznym mikroskopie fluorescencyjnym, przepuszcza fluorescencję pochodzącą spoza płaszczyzny obrazowania (prawa strona rysunku). (<http://depts.washington.edu/keck/cfdiag1.jpg>).

cyjnych, obserwujemy tylko rozmieszczenie fluoryzujących cząsteczek na powierzchni wybranych struktur, czyli pośrednio. Możemy zobaczyć tylko to, co wybieramy, już na etapie planowania eksperymentu, konstruując sondy fluorescencyjne o zadanej specy-

ficzności. Cała reszta obserwowanej komórki, to czarna pustka przypominająca „niezmierzone otchłanie kosmosu”.

Jak zobaczymy później, ten nowy, wybiórczy sposób wizualizacji obiektów mikroskopowych będzie miał zasadniczy wpływ na możliwość przekroczenia bariery zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego. Obecnie stosowane mikroskopy fluorescencyjne prawie wyłącznie pracują w trybie epifluorescencji, co oznacza, że światło wybranej linii widma lampy rtęciowej pada na preparat przez obiektyw mikroskopu i tą samą drogą wraca wyemitowane światło fluorescencyjne skupiane na powierzchni detektora.

Istotną wadą mikroskopu fluorescencyjnego jest konieczność przygotowania odpowiednio cienkich preparatów. Taka konieczność wynika z samej zasady działania mikroskopu fluorescencyjnego, a mianowicie z tego, że wiązka światła wzbudzającego, przechodząc przez preparat pobudza do fluorescencji wszystkie cząsteczki fluorochromów w całej jego grubości (Ryc. 2, prawa strona). Chcielibyśmy przecież rejestrować tylko tę fluorescencję, która pochodzi z płaszczyzny obrazowania czy płaszczyzny ostrości preparatu. Cała reszta światła fluorescencyjnego pochodzącego spoza płaszczyzny obrazowania ma tylko i wyłącznie negatywny wpływ na ostrość szczegółów preparatu, jego kontrast czy prawidłowość oddania kolorów użytych sond fluorescencyjnych. Najgorszym skutkiem istnienia tej szkodliwej dla jakości obrazu frakcji światła fluorescencyjnego jest istotne ograniczenie praktycznej zdolności rozdzielczej mikroskopu. Dlatego też mikroskop fluorescencyjny dobrze spełnia swoje zadanie wyłącznie wtedy, gdy fizyczna grubość preparatu jest odpowiednio mała i zawiera możliwie mało obiektów leżących poza płaszczyzną obrazowania/ostrości.

W celu pokonania tych ograniczeń mikroskopu fluorescencyjnego wynaleziono mikroskop konfokalny, o czym piszę w kolejnym rozdziale.

MIKROSKOP KONFOKALNY

Zasadnicza różnica konstrukcyjna pomiędzy mikroskopem fluorescencyjnym a konfokalnym (ang. confocal scanning light microscope, CSLM) polega na wprowadzeniu w tym ostatnim następujących elementów:

- zamiast lampy rtęciowej laserów światła widzialnego (z zakresu 400–700 nm) o

długościach fal emitowanego światła zbliżonych do charakterystycznych linii widmowych lampy rtęciowej (w celu zachowania zgodności z będącymi w powszechnym użytku barwnikami fluorescencyjnymi);

- systemu skanowania powierzchni preparatu wiązką laserową;

- tzw. przysłony konfokalnej umieszczonej tuż przed detektorem fotonów;
- detektora fotonów (najczęściej fotopowielacza).

To od przysłony konfokalnej pochodzi nazwa mikroskopu konfokalnego. Zmiana średnicy otworu przysłony konfokalnej pozwala regulować dwa ważne parametry obrazowania (Ryc. 2). Pierwszy z nich, to stopień odcięcia fluorescencji pochodzącej spoza płaszczyzny obrazowania – im mniejsza jest średnica przysłony konfokalnej, tym mniej fotonów spoza płaszczyzny obrazowania przedostaje się do detektora i tym cieńszy jest uzyskany skrawek optyczny. Odpowiednio wyregulowany mikroskop konfokalny umożliwia uzyskanie grubości płaszczyzny obrazowania preparatu nawet na poziomie około 500 nm. Drugim parametrem zależnym od średnicy otworu przysłony konfokalnej jest kontrast i ostrość obrazu. Im mniejszy otwór przysłony, tym ostrość jest lepsza, ale okupione jest to najczęściej silnym spadkiem jasności i wzrostem poziomu szumu.

Wyżej opisane modyfikacje konstrukcji mikroskopu fluorescencyjnego umożliwiły odcięcie promieniowania fluorescencyjnego pochodzącego spoza płaszczyzny obrazowania, która nie jest tym samym, co płaszczyzna ostrości. Różnicę tę wyraźnie widać w trybie łączenia obrazowania fluorescencyjnego z obrazowaniem w tzw. jasnym polu w świetle przechodzącym. Jest to technicznie możliwe i często bardzo wygodne, gdyż ułatwia dokładniejsze określenie lokalizacji sygnału fluorescencyjnego. Głębina ostrości w jasnym polu zależy od właściwości optycznych obiektywu mikroskopowego i jest stała dla danego obiektywu i otworu średnicy przysłony polowej kondensora, natomiast głębina obrazowania w mikroskopie konfokalnym zależna jest od wielkości otworu przysłony konfokalnej i jest w związku z tym zmienna. Takie ograniczenie grubości obrazowanego skrawka preparatu nazywamy sekcjonowaniem optycznym.

Możliwość sekcjonowania optycznego grubych, trójwymiarowych preparatów pozwala w rezultacie na uzyskanie zbioru kolejnych przekrojów optycznych wzdłuż osi pionowej. Zbiór kolejnych płaszczyzn preparatu nazywamy stosem, a w wyniku następującej, komputerowej procedury składania elementów takiego stosu płaszczyzn, możemy odtworzyć wygląd obiektów przestrzennych z możliwością ich obracania w

przestrzeni. Daje to obserwatorowi szansę na obejrzenie obiektu z różnych kierunków tak, aby leżące bliżej struktury nie zasłaniały dalszych.

Rozdzielczość mikroskopu konfokalnego jest różna w różnych osiach przestrzeni 3D. Rozdzielczość w płaszczyźnie X-Y jest około dwukrotnie większa niż w osi Z. Ma to znaczący, negatywny wpływ na prawidłowość oddania geometrii struktur przestrzennych w wyniku obrazowania 3D. Otrzymane obiekty trójwymiarowe są często mniej lub bardziej rozciągnięte w pionie. Z powodu jeszcze innych czynników poprawność obrazowania w osi Z zależy także od odległości od powierzchni preparatu. Stopień zniekształcenia obserwowanych obiektów rośnie wraz z odległością od szkiełka nakrywkowego. Efekt ten związany jest z obecnością ośrodków o różnych wartościach współczynnika załamania na drodze wiązki światła laserowego. W skrajnym przypadku dla obiektywu, który nie jest przeznaczony do stosowania imersji olejowej, pomiędzy soczewką czołową obiektywu a szkiełkiem nakrywkowym mamy powietrze o współczynniku załamania n równym prawie dokładnie 1,0. Następnie mamy szkiełko nakrywkowe o $n=1,515$, a dalej na przykład środowisko wodne właściwe dla komórek o $n=1,33$. Takie zmiany wartości współczynnika załamania na drodze optycznej wywołują wspomniany efekt rosnącego „wyciągnięcia” obserwowanych struktur w osi Z. Wady tej pozbawiony jest mikroskop naturalnie konfokalny czyli mikroskop dwufotonowy, o czym będzie w następnym rozdziale.

Kolejnym elementem różniącym mikroskop konfokalny od fluorescencyjnego jest system skanowania powierzchni preparatu wiązką lasera. W mikroskopie fluorescencyjnym cała powierzchnia preparatu oświetlana jest światłem pochodzącym z lampy rtęciowej. W mikroskopach ze skanowaniem laserowym, powierzchnia preparatu jest kolejno, punkt po punkcie, oświetlana światłem lasera podobnie jak w systemie telewizyjnym. Oświetlanie kolejnych pikseli wiązką światła laserowego możliwe jest dzięki precyzyjnie kontrolowanemu jej przemieszczaniu wiersz po wierszu, a po czasie potrzebnym do przeskanowania pola widzenia komputer sterujący jest w stanie zarejestrować informację o całej powierzchni preparatu. System skanujący współpracuje z przysłoną konfokalną, która odpowiada

za możliwość odfiltrowania (odcięcia) wielu niekorzystnych zjawisk, które skutecznie obniżają końcową jakość obrazu w klasycz-

nym mikroskopie fluorescencyjnym. Dzięki temu uzyskujemy obraz o znacznie lepszym kontraście, nasyceniu barw i rozdzielczości.

MIKROSKOP DWUFOTONOWY ORAZ JEDNO- (1P) I DWUFOTONOWE (2P) WZBUDZENIE FLUORESCENCJI

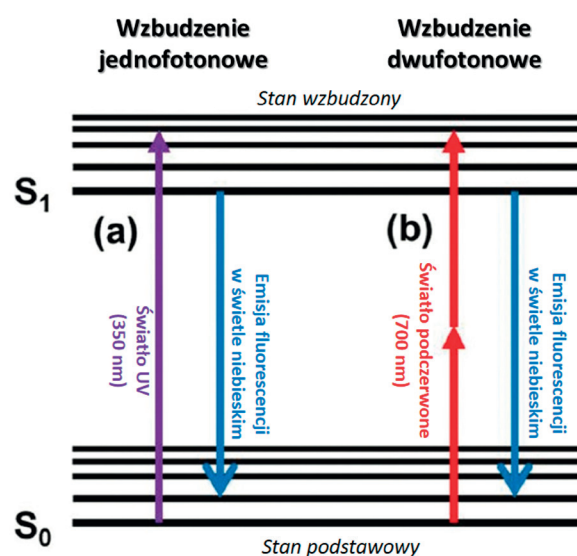
Mikroskop dwufotonowy jest to najczęściej typowy mikroskop konfokalny zmodyfikowany w następujący sposób: zamiast laserów emitujących fotony w zakresie widzialnym stosuje się impulsowy laser podczerwony o regulowanej długości fali światła w zakresie 700–1000 nm. Dodatkowo taki mikroskop różni się od konfokalnego tym, że nie potrzebuje przysłony konfokalnej. Określa się go mianem mikroskopu naturalnie konfokalnego.

Mikroskop dwufotonowy nazywamy naturalnie konfokalnym dlatego, że nie wymaga on odcinania przez przysłonę konfokalną promieniowania fluorescencyjnego pochodzącego spoza płaszczyzny obrazowania. Obserwacje zachowania się barwników fluorescencyjnych znajdujących się w grubszych preparatach wzbudzanych wiązką fotonów podczerwonych z lasera impulsowego wykazały, że cząsteczki barwników wzbudzone są tylko w bardzo wąskiej warstwie obrazowania, a ponad i pod tą płaszczyzną do wzbudzenia w ogóle nie dochodzi. W związku z tym nie ma w ogóle potrzeby stosowania przysłony konfokalnej.

Zasada dwufotonowego wzbudzania barwników fluorescencyjnych polega na odkrytej jeszcze w latach 30. XX w. możliwości wzbudzania fluorochromów poprzez dostarczenie energii wzbudzenia nie w jednej, jak to się dzieje w typowym przypadku, ale w dwóch i więcej porcjach (Ryc. 3). Ogólna zasada jest prosta – ponieważ energia fotonu jest odwrotnie proporcjonalna do długości fali to w przybliżeniu jeden foton o długości fali 488 nm ma tyle samo energii co dwa fotony o długości fali 976 nm. Poza tym nie ma znaczenia czy przerwa energetyczna danego barwnika fluorescencyjnego zostanie zapełniona energią w postaci jednej porcji (kwantu) czy w dwóch porcjach o połowę mniejszych – liczy się suma energii. W obu przypadkach sumaryczna energia będzie praktycznie taka sama. Jest jednak jeden zasadniczy warunek: oba fotony o energii połówkowej muszą zostać zaabsorbowane przez cząsteczkę fluorochromu w odstępie czasu nie dłuższym niż kilkadziesiąt femtosekund

(10^{-15} s). Z tego powodu do dwufotonowego wzbudzania fluorochromów stosuje się lasery impulsowe o dużej mocy, pozwalające na uzyskanie bardzo dużych gęstości strumienia fotonów w płaszczyźnie obrazowania.

Okazało się, że prawdopodobieństwo niemal jednoczesnego (w odstępie kilkudziesięciu femtosekund) trafienia tej samej cząsteczki barwnika fluorescencyjnego przez kolejne dwa fotony o połówkowej energii wzbudzenia maleje wraz z kwadratem odległości od płaszczyzny obrazowania czyli wzdłuż osi Z. Już minimalne, w skali mikroskopowej, odsunięcie się od płaszczyzny obrazowania powoduje, że stożkowatego kształtu wiązka fotonów jest mniej skoncentrowana i gęstość strumienia fotonów szybko maleje. Jeśli średni czas pomiędzy trafieniami tej samej czą-



Ryc. 3. Poziomy energii stanu podstawowego i wzbudzonego cząsteczki barwnika fluorescencyjnego w przypadku wzbudzenia jedno-fotonowego (1P) – lewa strona wykresu i dwufotonowego (2P) – prawa strona wykresu.

Mikroskop fluorescencyjny i konfokalny korzystają ze wzbudzenia 1P, a mikroskop dwufotonowy ze wzbudzenia 2P. (<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/images/multifotonintrofigure1.jpg>)

steczki fluorochromu staje się dłuższy niż te wymagane kilkadziesiąt femtosekund w ogóle nie dochodzi do wzbudzenia fluorescencji.

Do powstania mikroskopów posługujących się laserami emitującymi promieniowanie w zakresie bliskiej podczerwieni (700–1000 nm) przyczyniła się jeszcze inna ich właściwość. Materia, z której składają się żywe organizmy, niezależnie od tego czy mamy do czynienia z obiektem żywym czy utrwalonym, właśnie w zakresie bliskiej podczerwieni wykazuje minimalne pochłanianie i rozpraszanie światła. Oznacza to, że korzystając z tego zakresu długości fal możemy obrazować żywe organizmy do znacznie większej głębokości i uzyskiwać obrazy o wysokiej ostrości i kontraście.

Obrazowanie grubych, oczywiście w skali mikroskopowej, obiektów w przestrzeni 3D jest obecnie kluczowym problemem w mikroskopii, który pozwolę sobie pokrótce omówić. We wczesnych etapach rozwoju technik mikroskopowych, żeby obejrzeć obiekt, który był zbyt gruby należało go utrwalić, wybarwić i pokroić na pewną ilość odpowiedniej grubości skrawków. Jak się łatwo domyśleć nie można było tak potraktowanego obiektu zachować w stanie żywym, co ograniczało zakres badań przyżyciowych do obiektów odpowiednio małych. Przełom spowodowało wprowadzenie przyżyciowych technik fluorescencyjnego barwienia struktur wewnątrzkomórkowych oraz, opisanej wcześniej, metody obrazowania przestrzennego zwanej sekcjonowaniem optycznym. Zamiast kroić utrwalony materiał biologiczny w mikrotomie można skorzystać z precyzyjnego mechanizmu sterowania stolikiem z umieszczonym na nim preparatem w mikroskopie konfokalnym. Ogniskując obiektyw na coraz głębiej leżących obszarach preparatu możemy zarejestrować kolejne skrawki wzdłuż osi Z. Dzięki temu uzyskujemy efekt sekcjonowania

bez fizycznego krojenia preparatu. Zamiast skrawków fizycznych operujemy skrawkami optycznymi, a cały proces nazywamy sekcjonowaniem optycznym. W wyniku takiej operacji zbieramy odpowiednią ilość informacji o przestrzennym rozkładzie fluorochromów w obrębie preparatu, który, tak delikatnie potraktowany, możemy przez cały czas utrzymywać w stanie żywym.

Teraz dopiero przychodzi nam z pomocą podczerwień. Fale świetlne o długościach zawartych w zakresie widma światła widzialnego są stosunkowo silnie pochłaniane i absorbowane przez materię żywą, co powoduje szybki spadek jakości obrazu mikroskopowego wraz z głębokością obrazowania. W typowym przypadku już powyżej 50–250 μm (dokładna wartość bardzo mocno zależy od rodzaju preparatu i jego całkowitej grubości) obserwujemy bardzo silne pogorszenie jakości czy wręcz degradację obrazu. Efekt ten jest na dodatek uzależniony od długości fali użytego lasera. Najmocniej pochłaniane są i rozpraszane fale światła w zakresie fioletowo-niebieskim, ponieważ niosą one relatywnie dużo energii i silnie oddziałują z materią preparatu, powodując często pewne niekorzystne reakcje chemiczne określane ogólnie mianem efektu fototoksycznego. Lepszą penetrację grubych obiektów biologicznych wykazuje światło widzialne z zakresu dalekiej czerwieni (650 nm). Ze względu na znacznie słabsze oddziaływanie z materią, efekt fototoksyczny jest w tym przypadku dużo mniejszy jednakże najlepsze wyniki, zarówno jeśli chodzi o jakość jak i głębokość obrazowania uzyskujemy dopiero w zakresie bliskiej podczerwieni. Jako przykład można podać osiągnięcie głębokości skutecznego obrazowania tkanki nerwowej myszy do głębokości 700–750 μm . Jest to wynik co najmniej 3-krotnie lepszy od uzyskanych w zakresie światła widzialnego.

MIKROSKOP LEICA 4PI

Mikroskopia 4Pi jest kolejnym znaczącym krokiem na drodze rozwoju nanomikroskopii. W swojej najbardziej dojrzałej formie mikroskop 4Pi składa się nie z jednego, ale z dwóch identycznych optycznie obiektywów. Typowy mikroskop posiada z jednej strony preparatu obiektyw, a z drugiej kondensor, który w większości rozwiązań mikroskopii epifluorescencyjnej najczęściej w ogóle nie

jest potrzebny, gdyż to obiektyw pełni jednocześnie rolę układu oświetlającego preparat i wzbudzającego fluorescencję oraz rolę układu optycznego zbierającego wyemitowane przez fluorochromy światło fluorescencyjne. Obiektyw odpowiada więc za utworzenie obrazu rozkładu fluorescencji w preparacie. W mikroskopie 4Pi typu C sytuacja jest trochę bardziej skomplikowana po-

nieważ składa się on z dwóch obiektywów leżących po obu stronach preparatu, które naprzemiennie pełnią funkcję koncentrowania wiązki lasera w płaszczyźnie preparatu i jednocześnie, oba naraz, zbierają fotony fluorescencyjne wyemitowane na obie strony preparatu. Podwojona informacja o strukturze preparatu wykorzystywana jest przez komputer sterujący do tworzenia obrazu fluorescencyjnego o wyraźnie podwyższonej rozdzielczości (patrz Tabela 1). Jak wspomnieliśmy na początku artykułu dwupunktowa zdolność rozdzielcza obiektywu zależy od apertury numerycznej, a ta jest funkcją kąta aperturowego α . Im większy jest kąt, z którego zbierana jest informacja o subtelnej strukturze preparatu, tym większą rozdzielczość możemy osiągnąć. W systemie 4Pi dwa obiektywy o aperturze 1,4 praktycznie powodują podwojenie rozdzielczości całego układu (z 200–250 nm do 100 nm, Tabela 1). Uzyskany wynik jest zdumiewający, a pomysł całkiem prosty!

Żeby móc obrazować preparaty w mikroskopie typu 4Pi konieczna jest zmiana typowej i znanej wszystkim formy preparatu mikroskopowego. Normalnie preparat umieszczamy pomiędzy relatywnie grubym szkiełkiem podstawowym, a przykrywany cienkim i dokładnie zdefiniowanym szkiełkiem nakrywkowym. Szkiełko nakrywkowe jest bardzo ważnym, a najczęściej zupełnie niedocenianym, elementem układu optycznego mikroskopu. Otóż już podczas oblicza-

nia konstrukcji obiektywu uwzględnia się obecność szkiełka nakrywkowego, a wady odwzorowania optycznego jakie ono wprowadza muszą być, z przeciwnym znakiem, skompensowane przy konstruowaniu obiektywu. Dlatego też istnieją ściśle normy określające parametry szkiełka nakrywkowego. Musi mieć ono postać płytki płaskorównoległej o dokładnie zdefiniowanej grubości (najczęściej 0,17 mm) i wartości współczynnika załamania szkła ($n=1,515$). Dodatkowo musi być optycznie jednorodne czyli o całkowicie homogenym rozkładzie wartości współczynnika załamania na całej powierzchni. Szkło, z którego jest wykonane, nie powinno wykazywać autofluorescencji i mieć bardzo dobrą transmitancję w całym zakresie widma światła białego.

Preparat przeznaczony do obrazowania w mikroskopie 4Pi zamykamy pomiędzy dwoma identycznymi szkiełkami nakrywkowymi o bardzo wysokiej jakości optycznej, gdyż oba obiektywy muszą pracować w optymalnych warunkach i w żaden sposób nie powinniśmy pogarszać jakości obrazu tworzonego jednocześnie przez oba obiektywy. Ogólnie można stwierdzić, że im bardziej zaawansowany optycznie system mikroskopowy, tym jakość preparatu musi być wyższa. Inaczej nigdy nie uzyskamy najwyższej, możliwej jakości obrazu. Dotyczy to wszystkich innych mikroskopów, także na przykład mikroskopu konfokalnego, o czym tak często zapominamy...

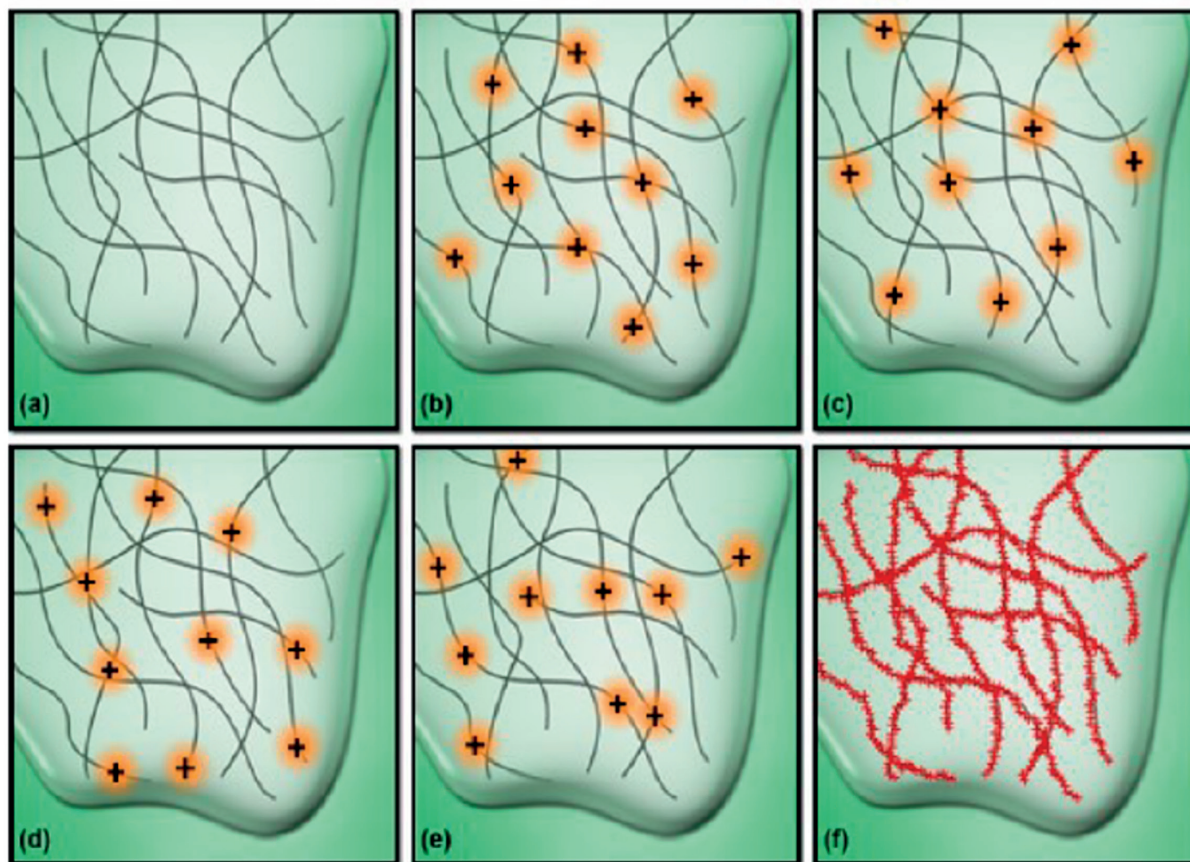
MIKROSKOP SUPERROZDZIELCZY NIKON N-STORM

Główna idea leżąca u podstaw systemu STORM (Mikroskop superrozdzielczy Nikon N-STORM; ang. stochastic optical reconstruction microscopy) przedstawiona jest na Ryc. 4. Wyobraźmy sobie fragment komórki wypełnionej siecią białkowych włókien cytoszkieletu. Każda komórka ma wewnętrzny system takich włókien nazywany cytoszkieletem. Dwa główne typy włókien tworzących cytoszkielet komórki to mikrotubule (średnica 25 nm) zbudowane z białka tubuliny oraz mikrofilamenty o średnicy 7 nm zbudowane z aktyny. Mimo bardzo małej średnicy, leżącej dużo poniżej zdolności rozdzielczej zarówno mikroskopu fluorescencyjnego jak i konfokalnego, możemy je swobodnie oglądać w tych mikroskopach stosując wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi przeciwciała specyficzne

odpowiednio względem tubuliny i aktyny (Ryc. 5).

Problem jednak leży w tym, że średnica włókien na zdjęciach otrzymanych z tych mikroskopów jest znacznie większa niż w rzeczywistości – widzimy tylko grube, świecące linie (Ryc. 5A, C, E). Dopóki gęstość sieci tych włókien jest niewielka to niespecjalnie przeszkadza w badaniu struktury białkowego szkieletu komórki. Poważny problem pojawia się w momencie, gdy te włókna ułożone są bardzo gęsto – zwykle ma to miejsce w przestrzeni otaczającej jądro komórkowe. Obrazy wszystkich włókien nakładają się wtedy na siebie i zlewają, a zamiast sieci włókien widzimy jednorodną, bardzo silnie świecącą plamę o nierozróżnialnej strukturze. Najczęściej też nie jesteśmy nawet w stanie określić czy osobno widoczne włókno w rzeczywistości składa się z jednej

Podstawowe założenia techniki obrazowania STORM



Ryc. 4. Zasada obrazowania zastosowana w mikroskopie superrozdzielczym (nanoskopie) typu STORM.

Panel (a) pokazuje fragment komórki wypełniony włóknami białkowego cytoszkieletu, panele (b), (c), (d) i (e) pokazują wyniki kolejnych czterech rejestracji różnych podzbiorów cząsteczek fluorochromów użytych do specyficznego wyznakowania tych włókien. Odpowiednio duża liczba takich obrazów nałożona na siebie daje w wyniku fluorescencyjny obraz cytoszkieletu przedstawiony na panelu (f). (<http://www.microscopyu.com/articles/stormintro.html>)

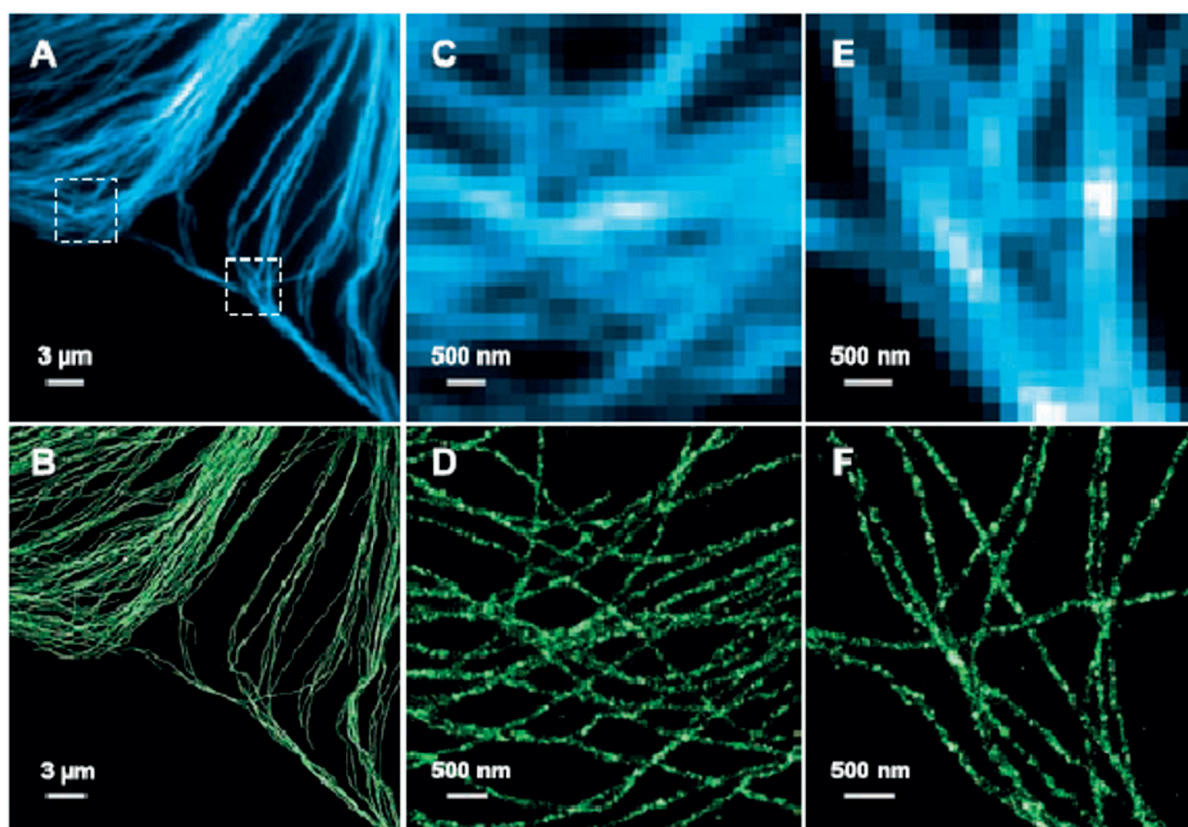
czy z kilku nici (Ryc. 5C, E). W takim przypadku z pomocą przychodzą techniki mikroskopii superrozdzielczej czyli tytułowa nanoskopia.

Od strony optycznej superrozdzielczy mikroskop typu STORM praktycznie jest zwykłym, wysokiej jakości mikroskopem badawczym i równie dobrze mógłby pracować jako optyczna część zestawu do mikroskopii konfokalnej. Efekt superrozdzielczości osiągany jest dzięki specjalnemu sposobowi rejestracji fotonów światła fluorescencyjnego i następującej po niej analizie matematycznej miejsc położenia źródeł ich emisji.

Dla zrozumienia dalszej części opisu bardzo ważne jest zapamiętanie, że włókna cytoszkieletu w preparacie są na całej swojej długości gęsto pokryte sondami znakowanymi fluorescencyjnie i w mikroskopie konfo-

kalnym świecą jednorodnie na całej długości (Ryc. 5A, C, E).

Nowością w systemie STORM jest to, że ostateczny obraz nie jest sumą rozkładu wyemitowanych fotonów (jak w mikroskopie fluorescencyjnym czy konfokalnym), ale tylko punktów oznaczających maksima takich lokalnych rozkładów (Ryc. 6). Przez analogię można to porównać do różnicy pomiędzy obserwacją z lotu ptaka całej góry a znajdującym się na jej szczycie małym kamieniem lub tylko znaku zrobionym farbą w najwyższym punkcie. Mapowanie jedynie takich znaków reprezentujących położenie szczytów dużo bardziej precyzyjnie przedstawia przebieg łańcucha górskiego. Podobnie przedstawia się ten problem w przypadku mapowania przebiegu włókien cytoszkieletu.



Ryc. 5. Obrazy tego samego fragmentu włókien cytoszkieletu w mikroskopie konfokalnym (zdjęcia A, C i E) i w superrozdzielczym mikroskopie typu STORM (zdjęcia B, D i F).

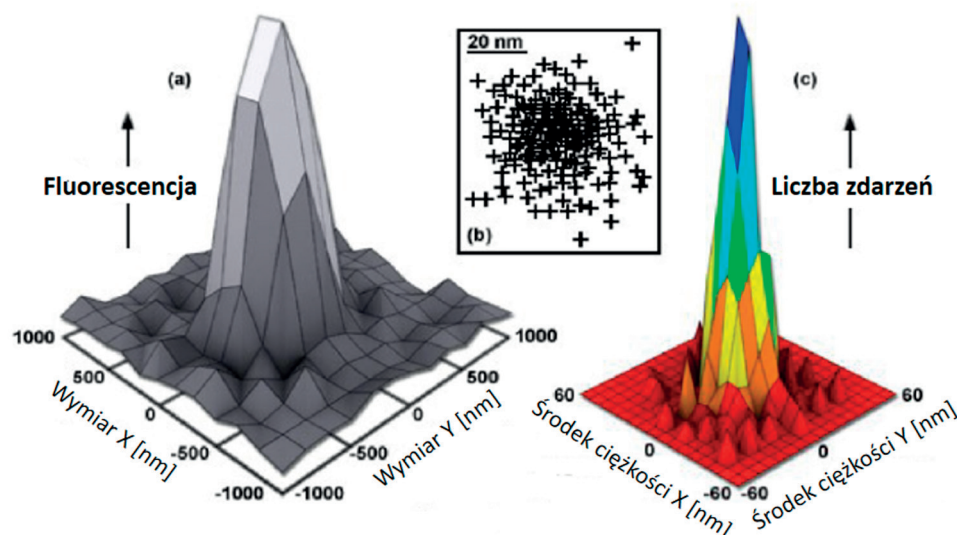
Na zdjęciach C, D, E i F przedstawiono powiększone fragmenty sieci włókien zaznaczonych na zdjęciu A kwadratami. (<http://www.microscopyu.com/articles/stormintro.html>)

Najważniejszym rozwiązaniem warunkującym możliwość uzyskania efektu superrozdzielczości jest takie osłabienie wiązki laserowej używanej do aktywacji cząsteczek barwnika, a następnie wzbudzenia fluorescencji, aby w danym przedziale czasu tylko bardzo niewielka część przypadkowo rozmieszczonych cząsteczek fluorochromów uległa aktywacji i późniejszemu wzbudzeniu (Ryc. 4). W rezultacie obserwujemy tylko fotony, emitowane przez przypadkowo rozmieszczone fluorochromy znajdujące się na włóknach badanego cytoszkieletu. Warunek przypadkowości (stochastyczności) wyboru zestawów różnych subpopulacji fotonów jest kluczowy dla wymuszenia emisji z punktów preparatu leżących daleko od siebie. Optymalny efekt uzyskuje się wtedy, gdy średnia odległość pomiędzy wzbudzonymi cząsteczkami wynosi około 250 nm, gdyż wtedy nie dochodzi do nakładania się plamek dyfrakcyjnych (plamek Airy'ego) na siebie i obniżenia rozdzielczości.

Po zarejestrowaniu rozkładu pierwszej subpopulacji fotonów, ponownie włączając laser wzbudzamy kolejną grupę innych, przypadkowo zaktywowanych cząsteczek fluorochromów i rejestrujemy ich rozkład w preparacie. Zestaw wielu takich częściowych map poddawany jest następnie cyfrowej procedurze znajdowania maksimów, a otrzymane mapy maksimów łączone są w całość. Mamy wtedy pewność, że sumując wszystkie tak otrzymane zbiory punktów w końcowym obrazie otrzymamy pełną informację o wszystkich cząsteczkach barwników fluorescencyjnych znajdujących się na naszym przykładowym włóknie cytoszkieletu osiągając w ten sposób niezwykle efekt superrozdzielczości (Ryc. 5B, D, F).

Komputer sterujący nanoskopem typu STORM wyznacza pozycję każdej cząsteczki fluorochromu poszukując maksimów rozkładu całej populacji fotonów wyemitowanych przez pojedyncze cząsteczki fluorochromów.

Lokalizacja pojedynczych molekuł w technikach super-rozdzielczych



Ryc. 6. Zasada powstawania obrazu w superrozdzielczym mikroskopie optycznym typu STORM.

Po lewej przedstawiono przestrzenny rozkład częstości zliczeń fotonów emitowanych z pojedynczego źródła fluorescencji czyli tak zwaną plamkę dyfrakcyjną (Airy'ego), pośrodku to samo w reprezentacji dwuwymiarowej, a po prawej wynik matematycznej analizy wspomnianej plamki dyfrakcyjnej. W wyniku uzyskaliśmy funkcję zwaną centroidem. Szczególną uwagę należy zwrócić na poprzeczne rozmiary plamki dyfrakcyjnej i centroidu (2000 nm dla plamki dyfrakcyjnej i 120 nm dla centroidu). (<http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/stormintro.html>)

Obrazujemy więc tylko punkty reprezentujące położenie maksimów rozkładu fotonów, a nie rzeczywisty rozkład wszystkich fotonów (Ryc. 6). Tak, w znacznym uproszczeniu, można opisać zasadę działania mikroskopu typu STORM.

Analizując dane przedstawione na rycinie 6 szczególną uwagę należy zwrócić na poprzeczne rozmiary plamki dyfrakcyjnej i centroidu (2000 nm dla plamki dyfrakcyjnej i tylko 120 nm dla centroidu). Proste podzielenie tych wartości pokazuje, że średnica otrzymanego centroidu jest około 17 razy mniejsza niż wyjściowa plamka dyfrakcyjna (ponieważ $2000/120 = \text{ok. } 17$). Dzięki wykonanej wcześniej analizie matematycznej, prowadzącej do wyznaczenia parametrów centroidu, uzyskaliśmy 17-krotne zmniejszenie rozmiaru źródła fluorescencji. Odwołując się do wartości podanych w Tabeli 1 możemy obliczyć, że w przybliżeniu odpowiada to wzrostowi zdolności rozdzielczej z 200 nm w przypadku mikroskopu konfokalnego do ok 12 nm w przypadku mikroskopu typu STORM (ponieważ $20/17 = \sim 12$ nm).

Precyzja wyznaczania centroidu rośnie wraz z liczbą fotonów emitowanych z cząsteczki fluorochromu i dlatego do mikroskopii superrozdzielczej najlepiej nadają się specjalne barwniki o wysokim kontraście i wysokiej wydajności emisji fotonów fluorescencyjnych. Teoretyczna granica rozdzielczości takiego mikroskopu przy założeniu, że uda się zarejestrować około 10 000 fotonów z jednej cząsteczki fluorochromu wynosi 1–2 nm i równa będzie rozdzielczości mikroskopu elektronowego.

W tym momencie możemy zakończyć zadeklarowaną w tytule drogę do nanoskopii. Dalszy postęp będzie zależał od udanej syntezy nowych, bardziej wydajnych barwników fluorescencyjnych i dalszej optymalizacji procedur matematycznej analizy danych. Już dzisiaj widać jednak, że postęp w dziedzinie mikroskopii optycznej w coraz mniejszym stopniu zależy od wąsko pojmowanego mikroskopu, a coraz bardziej zależy od doskonalenia komputerowej analizy danych z niego pochodzących.

DROGA DO NANOSKOPII

Streszczenie

W artykule przedstawiono drogę rozwoju rodziny mikroskopów fluorescencyjnych w celu osiągnięcia coraz wyższych rozdzielczości. Działające obecnie mikroskopy superrozdzielcze typu STORM pozwalają na uzyskanie rozdzielczości rzędu 10 nm, a konstruktorzy mają mocne podstawy by przypuszczać,

że dalszy postęp w zakresie syntezy bardziej wydajnych barwników fluorescencyjnych i doskonalenie komputerowej analizy obrazu pozwoli na osiągnięcie rozdzielczości do ok. 1 nm, czyli poziomu osiąganego obecnie przez mikroskopy elektronowe.

THE WAY TO NANOSCOPY

Summary

In this article the way of evolution of the family of fluorescent microscopes in order to reach substantially higher resolution was presented. Current, STORM-type, superresolution microscopes allow to obtain resolution of the order of 10 nm but ingeni-
enieurs have strong foundations to believe that fur-

ther progress in the area of more efficient fluorescent dyes synthesis and improvement of the computer aided image analysis allow to obtain resolutions close to approximately 1 nm – that is to the level of current electron microscopes.

POLECANA LITERATURA

- GUSTAFSSON M. G. L., BETZIG E., HESS H. F., PATTERSON G. H., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J., DAVIDSON M. W. *Introduction to superresolution microscopy*. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/introduction.html>
- PAWLEY J. B. *Critical aspects of fluorescence confocal microscopy*. http://www.microscopyu.com/articles/confocal/pawley3_gsteps.html
- PISTON D. W., FELLERS T. J., DAVIDSON M. W. *Fundamentals and applications in multiphoton excitation microscopy*. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/multiphotonintro.html>
- ROTTENFUSSER R., WILSON E. E., DAVIDSON M. W. *Image formation in the microscope*. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/print/basics/imageformation-print.html>
- SCHWARTZ S. A., COKER A. B., MARTINI S., DAVIDSON M. W. *Superresolution microscopy via stochastic individual molecule blinking*. <http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/superresolution/stochasticblinking/index.html>
- SEMWOGERERE D., WEEKS E. R. *Confocal microscopy*. <http://www.physics.emory.edu/~weeks/lab/papers/ebbe05.pdf>
- SILFIES J. S., SCHWARTZ S. A., DAVIDSON M. W. *The diffraction barrier in optical microscopy*. <http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/diffractionbarrier.html>
- SILFIES J. S., SCHWARTZ S. A., DAVIDSON M. W. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)*. <http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/stormintro.html>
- SPRING K. R., DAVIDSON M. W. *Introduction to fluorescence microscopy*. <http://www.microscopyu.com/print/articles/fluorescence/fluorescenceintro-print.html>