Uniwersytet Warszawski Wydział Fizyki

Joanna Oracz Nr albumu: 248249

Mikroskopia fluorescencyjna wysokiej zdolności rozdzielczej

Praca magisterska na kierunku fizyka w zakresie optyki

> Praca wykonana pod kierunkiem prof. Czesława Radzewicza Instytut Fizyki Doświadczalnej

Warszawa, IX 2011

Oświadczenie kierującego pracą

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora (autorów) pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Podpis autora (autorów) pracy

Data

Streszczenie

Praca dotyczy konstrukcji prototypowego mikroskopu STED (ang. *STi-mulated Emission Depletion*), który pozwala uzyskiwać obrazy z rozdzielczością lepszą, niż ta zdefiniowana przez ograniczenie dyfrakcyjne. W pierwszej części pracy opisano podstawy fizyczne ograniczenia dyfrakcyjnego i idee, dzięki której można je pokonać. Druga część to szczegółowy opis konstrukcji układu i wykazanie subdyfrakcyjnej rozdzielczości mikroskopu.

Słowa kluczowe

Mikroskopia fluorescencyjna, mikroskopia konfokalna, nanoskopia, ograniczenie dyfrakcyjne, wygaszanie fluorescencji przez emisję wymuszoną, mikroskopia STED

Dziedzina pracy (kody wg programu Socrates-Erasmus)

13.2 Fizyka

Podziękowania

Chciałabym serdecznie podziękować wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania tej pracy magisterskiej.

Prof. Czesławowi Radzewiczowi, który zaproponował mi ten ciekawy temat, umożliwił pracę w Laboratorium Procesów Ultraszybkich, był źródłem niewyczerpanej wiedzy, a swoimi cennymi pomysłami i uwagami zawsze motywował do dalszego rozwoju.

Dr Yuriyowi Stepanenko za cierpliwość i nieocenioną pomoc podczas pracy w laboratorium.

Mgr Michałowi Karpińskiemu, mgr Piotrowi Ciąćce za konstruktywne uwagi i wnikliwe przeczytanie pracy.

Dr Grzegorzowi Wilczyńskiemu, mgr Jakubowi Włodarczykowi za wsparcie od strony biologicznej i przygotowanie wielu preparatów fluorescencyjnych.

Koleżanką i Kolegom z Laboratorium Procesów Ultraszybkich i Centrum Laserowego za ciekawe rozmowy i miłą atmosferę pracy.

Moim Rodzicom za to, że umożliwili mi studiowanie w Warszawie i zawsze mnie wspierali.

iv

Spis treści

1	Wstęp		3	
2	Wprowadzenie teoretyczne 7			
	2.1	Wybrane aspekty teorii obrazowania	7	
	2.2	Mikroskopia skaningowa	12	
	2.3	Mikroskopia fluorescencyjna	14	
	2.4	Mikroskopia fluorescencyjna z wygaszaniem przez emisję		
		wymuszoną	17	
	2.5	Jakość układu obrazującego	20	
3	Kor	nstrukcja mikroskopu STED	23	
	3.1	Akwizycja danych w mikroskopie skaningowym	23	
	3.2	Obiektyw mikroskopowy	26	
	3.3	Przygotowanie wiązek	28	
	3.4	Układ doświadczalny	33	
4	Wy	niki	37	
	4.1	Mikroskop konfokalny	37	
		4.1.1 Zdolność rozdzielcza	37	
		4.1.2 Próbki biologiczne	39	
	4.2	Mikroskop STED	40	
		4.2.1 Wydajność emisji wymuszonej, a synchronizacja		
		czasowa	40	
		4.2.2 Nanosfery Crimson Fluorescent Protein	42	
5	Pod	lsumowanie	47	

Rozdział 1

Wstęp

Mikroskop to urządzenie, które umożliwia oglądanie obrazu niewidocznego dla ludzkiego oka. Początki tak zdefiniowanej mikroskopii można datować na koniec XVI wieku. Były to z reguły proste układy kilku soczewek. W 1655 roku powstała pierwsza naukowa publikacja *Micrographia* Roberta Hooka [1], gdzie wykorzystano powiększenie soczewek do obserwacji obiektów biologicznych, a badania udokumentowano w postaci starannych rysunków. Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) skonstruował około 500 mikroskopów, opartych na pojedynczej soczewce, obrazujących obiekty o rozmiarze mikrometra. Po raz pierwszy opisał życie w kropli wody – w formie bakterii i pierwotniaków.

Przełom w mikroskopii nastąpił w XIX wieku, kiedy zaczęto stosować barwienia i barwniki fluorescencyjne do znakowania oglądanych obiektów. W 1914 roku powstał pierwszy mikroskop fluorescencyjny. Umiejętność znakowania często przezroczystych dla światła widzialnego obiektów biologicznych spowodowała, że mikroskop optyczny stał się podstawowym urządzeniem badawczym i do dziś odgrywa niepodważalną rolę w naukach przyrodniczych.

Wraz z poprawą technik instrumentalnych, zaczęto zdawać sobie sprawę z fundamentalnego ograniczenia mikroskopu optycznego; ograniczenia wynikającego z falowej natury światła. W 1835 roku George Airy dostrzegł, że światło przechodzące przez kołową aperturę tworzy strukturę dyfrakcyjną - nazwaną później dyskiem Airy'ego [2]. Blisko 40 lat później podstawy matematyczne mikroskopii ograniczonej dyfrakcyjnie stworzył Ernst Abbe [3]. W swoich pracach zauważył on, że zdolność rozdzielcza soczewki Δr , Δz jest ograniczona i zależy od długości fali świetlnej λ użytej do obrazowania:

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

gdzie Δr , Δz – to zdolność rozdzielcza w kierunku odpowiednio poprzecznym i równoległym do osi optycznej soczewki, $n \sin \alpha$ to apertura numeryczna soczewki.

Zdolność rozdzielczą można zatem poprawić przez zastosowanie krótkich długości fali lub zwiększenie apertury numerycznej.

W 1904 roku w zakładach optycznych Carla Zeissa powstał pierwszy mikroskop UV inspirowany pracami Abbego. Okazało się jednak, że użycie małych długości fali jest niepraktyczne w zastosowaniach biologicznych z powodu, po pierwsze, zwiększonego rozpraszania światła, i po drugie drastycznego obniżenia progu zniszczenia próbki wraz ze spadkiem długości fali. W praktyce do obserwacji próbek biologicznych wykorzystuje się światło z zakresu 400-800 nm. Z drugiej strony poprawę zdolności rozdzielczej uzyskano przez zwiększenie apertury numerycznej obiektywu - dzięki umieszczeniu ośrodka imersyjnego pomiędzy preparatem a obiektywem [4], bądź przez wprowadzenie dodatkowego obiektywu zbierającego światło (w technice nazywanej mikroskopią 4-Pi [5]). Współczesne obiektywy z ciekłym ośrodkiem imersyjnym posiadają aperturę numeryczną do 1,5, co odpowiada połówkowemu kątowi zbierania światła 70°. Ograniczeniem są dostępne materiały.

W latach 60. udało się poprawić zdolność rozdzielczą mikroskopu przez zastosowanie odpowiedniego układu detekcyjnego, w którym wycięto sygnał z płaszczyzn pozaogniskowych - powstał pierwszy mikroskop konfokalny [6]. W następnych latach przesuwano ograniczenie dyfrakcyjne przez np. zastosowanie fali ewanescencyjnej na granicy ośrodków (ang. *Total Internal Reflection Fluorescence microscopy*, TIRF) [7,8], wykorzystanie efektów nieliniowych (mikroskopia wielofotonowa) [9,10], czy użycie algorytmów dekonwolucyjnych do przetwarzania obrazów [11–13].

Rozwijana była równocześnie inna klasa technik mikroskopii - tzw. mikroskopia bliskiego pola, zaproponowana w 1928 roku przez E. H. Synge'a [14]. Dzięki użyciu oświetlonej apertury o rozmiarach mniejszych niż długość fali i umieszczeniu badanej próbki bardzo blisko takiego źródła światła (w odległości mniejszej niż długość fali), można teoretycznie otrzymać rozdzielczość atomową. Z uwagi na problemy techniczne mikroskopia tego typu długo nie znalazła praktycznego zastosowania. Dopiero w 1972 roku uzyskano zdolność rozdzielczą $\frac{\lambda}{60}$ [15]. Mikroskopia bliskiego pola jest ograniczona jedynie do badania powierzchni.

Odmiennym typem technik subdyfrakcyjnych są techniki RESOLFT (ang. *REversible Saturable OpticaL Fluorescence Transition*). Wymagają one po pierwsze wygaszenia znacznika fluorescencyjnego przez nasycenie przejścia optycznego pomiędzy stanem wzbudzonym i stanem ciemnym, po drugie ukształtowania wiązki wygaszającej tak, aby posiadała minimum natężenia w środku. Wykorzystując efekt nasycenia można uzyskać teoretycznie nieograniczoną zdolność rozdzielczą.

Pierwszą techniką mikroskopii subdyfrakcyjnej dalekiego pola, zaliczaną do technik RESOLFT, jest mikroskopia STED (ang. *STimulated Emission Depletion microscopy*), zaproponowana przez Stefana Hella [16] w 1994 roku i zrealizowana po raz pierwszy doświadczalnie pięć lat później [17]. Nasycenie przejścia optycznego uzyskano przez proces emisji wymuszonej. Pokazano możliwości tej metody w obrazowaniu komórek żywych w trzech wymiarach i uzyskano obrazy z częstością klatek wideo [18–20]. Otrzymana rozdzielczość dla próbek biologicznych wynosi 20-100 nm.

Równocześnie zaczęto stosować metody stochastyczne, gdzie wykorzystuje się selektywne wzbudzenie fluoroforu jest to tzw. mikroskopia PAL-M (ang. *PhotoActive Localization Microscopy*). W tej metodzie należy upewnić się, że jeżeli dwie cząsteczki fluoroforu znajdują się bardzo blisko siebie, to nie mogą zostać wzbudzone w tym samym czasie. To znaczy, że prawdopodobieństwo wzbudzenia musi być mniejsze niż 1 molekuła na rozmiar ogniska wiązki wzbudzającej. Zebranie odpowiednio dużej ilości danych i lokalizacja położenia odpowiednich fluoroforów pozwala uzyskać rozdzielczość poniżej 40 nm [21].

Celem niniejszej pracy jest konstrukcja układu doświadczalnego do mikroskopii STED. W rozdziale 2 opisano podstawy teoretyczne tego typu mikroskopii pod kątem praktycznego zastosowania wyników. Następnie omówiono szczegóły doświadczalne zbudowanego układu w rozdziale 3. W ostatnim rozdziale 4 przedstawiono analizę wyników pomiarów potwierdzających subdyfrakcyjną rozdzielczość przyrządu.

Rozdział 2

Wprowadzenie teoretyczne

W rozdziale tym przedstawiono podstawy teorii obrazowania, przy czym ograniczono się do analizy obrazu w płaszczyźnie ogniskowej. Główna część analizy została przeprowadzona na podstawie książki Tony'ego Wilsona i Colina Shepparda [22], którzy dokładnie opisali teorię tworzenia obrazu w różnych typach mikroskopii skaningowej. W dalszej części rozdziału przedstawiono ideę mikroskopii fluorescencyjnej, by na końcu przedstawić fizyczne podstawy łamania ograniczenia dyfrakcyjnego w mikroskopii STED.

2.1 Wybrane aspekty teorii obrazowania

Dyfrakcja Fresnela i Fraunhofera

Scisły opis zjawisk dyfrakcyjnych jest niezwykle skomplikowany, dlatego w praktyce korzysta się z przybliżenia Huygensa. Mówi ono, że każdy punkt ośrodka do którego dociera fala, staje się wtórnym źródłem emitującym falę kulistą. Obwiednia tych elementarnych fal wyznacza wypadkowy front falowy za obiektem. Przy tym już na początku zakładamy, że odległość źródła od pola obserwacji dyfrakcji jest wielokrotnie większa niż długość fali oraz używamy przybliżenia skalarnego, co oznacza w przypadku światła zaniedbanie polaryzacji.

Rozkład pola elektrycznego u_2 w płaszczyźnie (x_2, y_2) w funkcji rozkładu pola u_1 w płaszczyźnie wejściowej (x_1, y_1) jest opisany całką dyfrak-



Rysunek 2.1: Schemat układu dyfrakcyjnego. W płaszczyźnie wejściowej (x_1, y_1) przedstawiono szczelinę. W odległości z od niej znajduje się płaszczyzna (x_2, y_2) , dla której szukamy rozkładu pola.

cyjną Kirchhoffa (Rys. 2.1):

$$u_2(x_2, y_2) = \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{i\lambda R} u_1(x_1, y_1) \exp\left(-ikR\right) \mathrm{d}x_1 \mathrm{d}y_1, \qquad (2.1)$$

gdzie k – wektor falowy, λ – długość fali, R – odległość elementu od pola obserwacji.

Każdy punkt szczeliny, na który pada fala, staje się źródłem elementarnej fali kulistej. W celu znalezienia rozkładu pola elektrycznego w dowolnej płaszczyźnie za obiektem sumujemy po wszystkich takich wirtualnych źródłach tworzących szczelinę. Jeśli zamiast szczeliny mamy do czynienia z komplementarnym obiektem, to zgodnie z regułą Babineta, obraz dyfrakcyjny ma taką samą strukturę, lecz minimum natężenia w pierwszym rozkładzie odpowiada maksimum natężenia w drugim. Jeżeli możemy założyć, że odległość punktu obserwacji R jest zdecydowanie większa od rozmiarów poprzecznych obiektu $(z \gg (x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2)$, to powyższy wzór możemy uprościć do tzw. przybliżenia Fresnela

$$u_{2}(x_{2}, y_{2}) = \frac{\exp(-ikz)}{i\lambda z}$$
$$\cdot \iint_{-\infty}^{+\infty} u_{1}(x_{1}, y_{1}) \exp\left\{-\frac{ik}{2z} \left[(x_{2} - x_{1})^{2} + (y_{2} - y_{1})^{2}\right]\right\} dx_{1} dy_{1}. \quad (2.2)$$

Jeżeli możemy przyjąć ponadto, ż
e $z\gg \frac{1}{2}k(x_1^2+y_1^2)_{max}$ mówimy, że mamy do czynienia z dyfrakcją Fraunhofera (dalekie pole) i wzór 2.1 możemy zapisać jako

$$u_{2}(x_{2}, y_{2}) = \frac{\exp(-ikz)}{i\lambda z} \exp\left[-\frac{ik}{2z}(x_{2}^{2} + y_{2}^{2})\right] \\ \cdot \iint_{-\infty}^{+\infty} u_{1}(x_{1}, y_{1}) \exp\left[\frac{ik}{z}(x_{1}x_{2} + y_{1}y_{2})\right] dx_{1} dy_{1}. \quad (2.3)$$

W powyższym równaniu zauważamy wyrażenie odpowiadające dwuwymiarowej transformacie Fouriera \tilde{u}^1 , co pozwala nam ostatecznie zapisać:

$$u_2(x_2, y_2) = \frac{\exp(-ikz)}{i\lambda z} \exp\left[-\frac{ik}{2z}(x_2^2 + y_2^2)\right] \tilde{u}_1(x_2/\lambda z, y_2/\lambda z). \quad (2.4)$$

Równanie to przedstawia istotny fakt – w dalekim polu rozkład pola elektrycznego jest proporcjonalny do transformaty Fouriera rozkładu pola w płaszczyźnie przedmiotu.

Cienka soczewka

W przypadku układów mikroskopowych sytuacja jest bardziej skomplikowana - do obserwacji obiektów używamy soczewek. Tutaj ograniczymy się do wyidealizowanego przypadku cienkiej soczewki. Pod tym

$$\tilde{u}(m,n) = \iint_{-\infty}^{+\infty} u(x,y) \exp\left[2\pi i(mx+ny)\right] dxdy,$$
$$u(x,y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{u}(m,n) \exp\left[-2\pi i(mx+ny)\right] dmdn.$$

 $^{^1 \}mathrm{Transformatę}$ Fouriera $\tilde{u}(m,n)$ funkcjiu(x,y)oraz transformatę odwrotną definiujemy

pojęciem rozumiemy soczewkę, która wprowadza jedynie kwadratową zmianę fazy, oraz jest na tyle cienka, że znacząco nie przesuwa padających na nią promieni świetlnych. Zmianę wprowadzaną przez soczewkę możemy uwzględnić mnożąc amplitudę fali padającej przez czynnik

$$t(x,y) = \exp\left[\frac{ik}{2f}(x^2+y^2)\right].$$
 (2.5)

Musimy uwzględnić skończony rozmiar soczewki przez wprowadzenie funkcji aperturowej P(x, y). Jeśli oświetlimy soczewkę falą płaską o jednostkowej amplitudzie, to za soczewką amplituda pola ma postać:

$$u_1(x_1, y_1) = P(x_1, y_1) \exp\left[\frac{ik}{2f}(x_1^2 + y_1^2)\right].$$
 (2.6)

Amplituda pola, zgodnie z równaniem 2.3, w płaszczyźnie ogniskowej wynosi:

$$u_{2}(x_{2}, y_{2}) = \frac{\exp(-ikf)}{i\lambda f} \exp\left[-\frac{ik}{2f}(x_{2}^{2} + y_{2}^{2})\right]$$

$$\cdot \iint_{-\infty}^{+\infty} P(x_{1}, y_{1}) \exp\left[\frac{ik}{f}(x_{1}x_{2} + y_{1}y_{2})\right] dx_{1}dy_{1}.$$
 (2.7)

Całka stanowi transformatę Fouriera funkcji aperturowej, którą będziemy oznaczać $h(x_2, y_2)$. W związku z tym natężenie w płaszczyźnie ogniskowej soczewki jest dane przez

$$I_2(x_2, y_2) = |h(x_2, y_2)|^2 / \lambda^2 f^2.$$
(2.8)

Ponieważ często mamy do czynienia z aperturami kołowymi, całkę 2.7 rozpisuje się jako transformatę Fouriera-Bessela i otrzymuje rozkład natężenia w płaszczyźnie ogniskowej nazywany *dyskiem Airy'ego*

$$I_2(\nu) = \left(\frac{2J_1(\nu)}{\nu}\right)^2,$$
 (2.9)

gdzie J_1 – funkcja Bessla pierwszego rzędu, ν – znormalizowana współrzędna optyczna $\nu=\frac{2\pi r NA}{\lambda}, r$ – odległość od środka ogniska, NA– apertura numeryczna soczewki.

Obrazowanie koherentne i niekoherentne

Wyróżniamy dwa typy obrazowania o różnych własnościach przejawiających się zarówno w otrzymywanej zdolności rozdzielczej, jak i w kontraście obrazu.

Mówimy o obrazowaniu koherentnym, w przypadku gdy w płaszczyźnie obrazowej dodają się amplitudy pola elektrycznego od poszczególnych części przedmiotu, tworząc wypadkową amplitudę obrazu. Taki rodzaj obrazowania występuje wtedy, gdy rejestrowane promieniowanie jest spójne, czyli są zachowane relacje fazowe pomiędzy różnymi częściami wiązki.

W przypadku takiego obrazowania pokazano w [22], że natężenie w płaszczyźnie obrazowej

$$I_3(x_3, y_3) \sim \left| \iint_{-\infty}^{+\infty} t(x_1, y_1) h(x_1 + x_3/M, y_1 + y_3/M) \mathrm{d}x_1 \mathrm{d}y_1 \right|^2.$$
(2.10)

Powyższe równanie opisuje obraz tworzony przez transmisję monochromatycznej fali płaskiej o jednostkowej amplitudzie przez preparat umieszczony w płaszczyźnie (x_1, y_1) , o transmisji $t(x_1, y_1)$. Za preparatem znajdowała się soczewka o powiększeniu M, obrazująca preparat na ekran w płaszczyźnie (x_3, y_3) . $h(x_1 + x_3/M, y_1 + y_3/M)$ to transformata Fouriera funkcji aperturowej soczewki w płaszczyźnie obrazowej.

Dla obiektu punktowego $t(x_1, y_1) = \delta(x_1)\delta(y_1)$, przy obrazowaniu soczewką o sferycznej aperturze, natężenie wyraża się wzorem 2.9, jest to dysk Airego. W ogólnym wypadku otrzymywany obraz stanowi splot funkcji transmisji obiektu t z funkcją h.

Innym rodzajem obrazowania jest obrazowanie niekoherentne. Występuje ono wtedy, gdy natężenia fal pochodzących od poszczególnych części obiektu dodają się tworząc obraz. Taki rodzaj obrazu powstaje w przypadku obiektów świecących termicznie, gdy nie są zachowane relacje fazowe w rejestrowanym świetle. Natężenie w płaszczyźnie obrazowej

$$I'_{3}(x_{3}, y_{3}) \sim \iint_{-\infty}^{+\infty} |t(x_{1}, y_{1})|^{2} |h(x_{1} + x_{3}/M, y_{1} + y_{3}/M)|^{2} \mathrm{d}x_{1} \mathrm{d}y_{1}, \quad (2.11)$$

stanowi splot natężenia transmisji obiektu $|t|^2$ oraz natężenia funkcji aperturowej soczewki w płaszczyźnie obrazowej $|h|^2$. Okazuje się, że dla obiektu punktowego rozkład natężenia jest taki sam jak w przypadku koherentnym. Różnice uwidaczniają się dla bardziej skomplikowanych

obiektów - np. krawędzi. W przypadku niekoherentnym obraz jest bardziej gładki, ale cechuje się mniejszym kontrastem, niż dla obrazowania koherentnego.

2.2 Mikroskopia skaningowa

Mikroskop skaningowy, to urządzenie w którym obraz otrzymuje się przez skanowanie próbki punkt po punkcie i rejestrację sygnału dla każdego piksela obrazu. O rozdzielczości takiego układu decyduje rozmiar ogniska używanej wiązki światła. Układ przedstawiono na rysunku 2.2.



Rysunek 2.2: Uproszczony schemat mikroskopu skaningowego.

Światło jest zbierane przez soczewkę o funkcji aperturowej $P_1(x_1, y_1)$ i ogniskowane na próbce o transmisji $t(x_0 - x_s, y_0 - y_s)$, gdzie x_s, y_s – parametry skanowania próbki. Światło przechodzące przez próbkę jest rejestrowane na detektorze o czułości amplitudowej określonej funkcją $P_2(x_2, y_2)$. Tuż za obiektem amplituda pola elektrycznego

$$u_2(x_0, y_0; x_s, y_s) = h_1(x_0, y_0)t(x_0 - x_s, y_0 - y_s), \qquad (2.12)$$

gdzie h_1 to transformata Fouriera funkcji aperturowej soczewki opisana równaniem 2.7.

W celu znalezienia rozkładu pola na detektorze korzysta się z przybli-

żenia Fraunhofera (równanie 2.4) i otrzymuje

$$u_{3}(x_{2}, y_{2}; x_{s}, y_{s}) = \iint_{-\infty}^{+\infty} h_{1}(x_{0}, y_{0})t(x_{0} - x_{s}, y_{0} - y_{s})$$

$$\cdot \exp\left[\frac{ik}{d}(x_{2}x_{0} + y_{2}y_{0})\right] dx_{0}dy_{0}.$$
(2.13)

Dla uproszczenia pominięto stałą i fazę przed całką. Sygnał rejestrowany na detektorze dany jest wyrażeniem

$$I(x_s, y_s) = \iint_{-\infty}^{+\infty} |u_3(x_2, y_2; x_s, y_s) P_2(x_2, y_2)|^2 dx_2 dy_2.$$
(2.14)

Jak pokazano w [22], dla nieskończenie dużego detektora o jednostkowej czułości P_2 obrazowanie jest niekoherentne. W drugim granicznym przypadku, dla nieskończenie małego rozmiaru detektora, mamy do czynienia z obrazowaniem koherentnym. Oczywiście detektor ma skończone rozmiary i w przypadku mikroskopii skaningowej mówi się o obrazowaniu częściowo koherentnym.

W praktyce pomiędzy detektorem a próbką umieszcza się dodatkową soczewkę w celu efektywnego zebrania promieniowania do detektora.

Mikroskop konfokalny

Jeśli światło padające na próbkę ma ograniczony dyfrakcyjnie rozmiar wiązki i rozmiar wiązki na detektorze jest z nim porównywalny, to mówimy o mikroskopii konfokalnej². Układ konfokalny mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiono na rysunku 2.4. Typowo przyjmuje się, że otwór konfokalny powinien mieć rozmiar rzędu *dysku Airy'ego*, zdefiniowanego jako odległość pomiędzy kolejnymi minimami w rozkładzie 2.9.

Stosując mały rozmiar detektora wycina się promieniowanie pochodzące z płaszczyzn pozaogniskowych i uzyskuje zwiększoną rozdzielczość. W tym wypadku rejestrowane natężenie jest opisane wyrażeniem

$$I(x_s, y_s) = \left| \iint_{-\infty}^{+\infty} h_1(x_0, y_0) t(x_0 - x_s, y_0 - y_s) h_2(-x_0, -y_0) \mathrm{d}x_0 \mathrm{d}y_0 \right|^2.$$
(2.15)

²Konfokalny oznacza posiadający sprzężone ogniska. W przypadku mikroskopu konfokalnego ognisko wiązki w płaszczyźnie obrazowej jest ściśle związane z ogniskiem w płaszczyźnie przedmiotowej.

W przypadku jednakowych sferycznych soczewek (ogniskującej wiązkę na preparacie i zbierającej sygnał na detektor) obraz obiektu punktowego jest iloczynem transformat Fouriera z apertur wejściowych obu soczewek i natężenie wynosi:



$$I(\nu) = \left(\frac{2J_1(\nu)}{\nu}\right)^4.$$
 (2.16)

Rysunek 2.3: Porównanie rozkładów natężenia dla mikroskopu tradycyjnego i układu konfokalnego. Długość fali światła użytego do obrazowania to 635 nm, apertura numeryczna soczewki 1.4. Szerokość FWHM dla pierwszego przypadku to 226 nm, dla układu konfokalnego 164 nm.

Stosując wzory 2.9 i 2.16 przedstawiono rozkład natężenia obrazu punktowego obiektu (Rys. 2.3). Dla układu konfokalnego jest on węższy o 27% niż dla konwencjonalnego mikroskopu. Szerokość połówkowa rozkładu wynosi, dla wiązki o długości fali 635 nm i apertury soczewki 1.4, w przypadku konwencjonalnego mikroskopu 226 nm, a dla układu konfokalnego 164 nm.

2.3 Mikroskopia fluorescencyjna

Świecenie obiektów własnym światłem pod wpływem padającego na nie zewnętrznego promieniowania dzielimy na dwie kategorie. Kiedy świecenie zachodzi w ciągu krótkiego czasu (rzędu $10^{-8} - 10^{-4}$ s) mówimy



Rysunek 2.4: Schemat konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego. EX, EM – filtr wzbudzania i emisji, DM – lustro dichroiczne, Obj – obiektyw. Światło z płaszczyzny pozaogniskowej jest wycinane przez otwór konfokalny.



Rysunek 2.5: Widmo absorpcji i fluorescencji barwnika ATTO 647N [37].

o fluorescencji, natomiast kiedy czas ten jest dłuższy mówimy o fosforescencji. Fluorescencja zachodzi z reguły na większych długościach fali niż absorpcja (Rys. 2.5), co jest związane z nieradiacyjnymi stratami energii przez elektrony. Przesunięcie w długościach fali nosi nazwę przesunięcia Stokesa.

Wiele ciał wykazuje naturalną fluorescencję pod wpływem promienio-

wania UV (kryształy, witaminy, masło). Próbki biologiczne z reguły są przezroczyste i należy stosować specjalne metody znakowania fluoroforami.

Typowy układ konfokalnego mikroskopu fluoresencyjnego przedstawiono na rysunku 2.4. Światło, które dociera do próbki nie bierze udziału w tworzeniu obrazu, ma na celu jedynie wzbudzenie fluorescencji. Fluorescencja emitowana z preparatu jest zbierana za pomoca obiektywu i kierowana do układu detekcji. Wiekszość światła wzbudzającego, które uległo rozproszeniu na próbce i zostało zebrane przez obiektyw, jest odbijane z powrotem przez lustro dichroiczne, do źródła promieniowania. Dodatkowo, przed detektorem umieszczony jest filtr emisyjny, przepuszczający światło o długościach fali odpowiadających fluorescencji i tłumiący światło wzbudzające fluorescencję. Przed układem detekcyjnym znajduje się otwór konfokalny, który wycina sygnał spoza płaszczyzny ogniskowej. Rozróżniamy dwa typy mikroskopu, w zależności od rodzaju oświetlenia. Jeśli zarówno wiązka wzbudzająca jak i fluorescencja są zbierane przez ten sam obiektyw, jak przedstawiono na rysunku 2.4, mówimy o typie *epi*, w przeciwnym razie typ nazywamy *dia*. W tego typu mikroskopii kluczowy jest dobór filtrów przepuszczających flurescencję i blokujących światło wzbudzające, zależny od rodzaju używanego znacznika fluorescencyjnego. Jeżeli znacznik charakteryzuje się dużym przesunięciem Stokesa to sytuacja znacznie się upraszcza.

Jakość otrzymanego obrazu zależy od efektywności, z jaką dany fluorofor absorbuje światło wzbudzające, oraz od tzw. wydajności kwantowej. Wydajność kwantowa jest to stosunek liczby wyemitowanych fotonów względem liczby zaabsorbowanych fotonów przez cząsteczkę fluorescencyjną. Ważnym czynnikiem jest również trwałość fotochemiczna znacznika. Na skutek oddziaływania ze światłem wzbudzającym cząsteczka fluorescencyjna ulega powolnej, trwałej degradacji (ang. *photobleaching*). Aktywność flouroforu zależy od natężenia światła, i można zminimalizować efekt wybielania znacznika przez zmniejszczenie natężenia światła wzbudzającego, a co za tym idzie również emisji promieniowania przez próbkę. W związku z tym niezwykle ważne jest zadbanie o wysoką czułość układu detekcji.

2.4 Mikroskopia fluorescencyjna z wygaszaniem przez emisję wymuszoną

Światłem można nie tylko wzbudzić molekuły, lecz również przenieść je do stanu ciemnego w wyniku emisji wymuszonej. Zdeaktywowana w ten sposób molekuła może zostać natychmiast ponownie wzbudzona. Przy opowiednio dużym natężeniu wiązki wymuszającej molekuła zostaje przeniesiona do stanu podstawowego zanim nastąpi fluorescencja. Idea mikroskopii STED polega na wykorzystaniu dodatkowej wiązki laserowej w układzie mikroskopu fluorescencyjnego, w celu nasycenia przejścia optycznego. Wiązka ma kształt obwarzanka i selektywnie wygasza fluorescencję przez emisję wymuszoną. Ponadto, jest przesunięta ku czerwonej części widma fluorescencji i nie rejestrowana, wraz z sygnałem wymuszonym, przez detektor.

Zdolność rozdzielcza³ mikroskopu STED jest opisana wyrażeniem:

$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I_{STED}}{I_{sat}}}}.$$
(2.17)

Może ona być teoretycznie nieograniczenie duża, dla odpowiednio dużego stosunku natężenia wiązki wygaszającej I_{STED} względem parametru I_{sat} zwanego natężeniem nasycenia. Praktycznym ograniczeniem jest wartość natężenia wiązki STED, przy której znacznik fluorescencyjny ulega zniszczeniu. Niedawano pokazano rozdzielczość rzędu 4 nm na centrach barwnych w diamencie [23].

Mikroskopia STED jest typem mikroskopii RESOLFT, gdzie stan jasny to wzbudzony stan elektronowy S_1 , a stan ciemny to podstawowy stan elektronowy S_0 (Rys. 2.6). Poszczególne cieńsze kreski na rysunku odpowiadają wzbudzeniom wibracyjnym. Wiązka wzbudzająca przez absorpcję przenosi cząsteczkę do wyższego poziomu wibracyjnego stanu S_1 . Następuje relaksacja z czasem τ_2 , fluorescencja z czasem τ_f i relaksacja do poziomu podstawowego po czasie τ_1 . Typowe czasy dla barwników fluorescencyjnych to $\tau_1, \tau_2 \sim 1-5$ ps, $\tau_f \sim 2$ ns [16].

W obecności wiązki wygaszającej obsadzenie poziomu S_1 opisuje w

³przy założeniu parabolicznego kształtu minimum obwarzankowej wiązki wygaszającej [24]

przybliżeniu⁴ równanie:

$$\frac{\mathrm{d}N_1}{\mathrm{d}t} = -\left(\frac{1}{\tau_f} + \sigma_{STED}I_{STED}\right)N_1,\tag{2.18}$$

gdzie N_1 to obsadzenie poziomu S_1 . Przyjmując warunek brzegowy $N_1(\infty) = 0$ otrzymujemy rozwiązanie:

$$N_1(t) = N_1(0) \exp^{-(1/\tau_f + \sigma_{STED}I)t}.$$
(2.19)



Rysunek 2.6: Idea mikroskopii STED: schemat poziomów energetycznych typowego barwnika fluorescencyjnego (a), poglądowy rysunek poszczególnych wiązek w płaszczyźnie ogniskowej mikroskopu (b), zależność otrzymywanej rozdzielczości w płaszczyźnie xy w funkcji natężenia wiązki STED (c).

 $^{^4{\}rm przyjęto}$ czas relaksacji z poziomów wibracyjnych równy zero, oraz pominięto zjawisko gaszenia fluorescencji na skutek innych form przekazu energii niż promieniowanie

Natężenie przy którym połowa obsadzenia jest przeniesiona do stanu podstawowego, względem wartości obsadzenia przy nieobecności wiązki wygaszającej ($I_{STED} = 0$), nazwano natężeniem nasycenia I_{sat} [24]. Dla prostokątnego impulsu STED o czasie trwania τ wynosi ono:

$$I_{sat} = \frac{\ln 2}{\tau \sigma_{STED}} . \tag{2.20}$$

Jest to wielkość zależna od charakterystyki czasowej impulsu wygaszającego. Typowo $I_{sat} \sim 10 \text{ MW/cm}^2$. Dla takiej wartości parametru I_{sat} , aby otrzymać rozdzielczość 25 nm, konieczne jest zastosowanie wiązki STED o 70-krotnie większym natężeniu (Rys. 2.6).

W celu uzyskania dobrej jakości obrazu impuls STED powinien przychodzić bezpośrednio za impulsem wzbudzającym. Ponadto, aby uzyskać wysoki kontrast wygaszania, czas trwania impulsu powinien być dłuższy niż czas relaksacji τ_1^{5} .

W ostatnich latach pokazano, że możliwe jest wykorzystanie laserów pracy ciągłej w mikroskopii STED. Wiąże się to z szybszą akwizycją danych i uproszczeniem układu doświadczalnego, przez brak konieczności czasowej synchronizacji impulsów [24,30,40]. Ceną, jaką za to płacimy jest konieczność stosowania dużych wartości natężenia wiązki STED w celu uzyskania dobrej rozdzielczości. Wywołuje to trudnościami w obserwacji komórek biologicznych.

Aby otrzymać zwiększoną zdolność rozdzielczą, wiązka wygaszająca musi posiadać centralne minimum w płaszczyźnie ogniskowej obiektywu. Typowo kształtuje się ją tak, aby otrzymać obwarzanka. Metod jest kilka, np. nałożenie spiralnej fazy przestrzennej na front falowy wiązki za pomocą komercyjnej płytki fazowej [25,39] lub wykorzystując modulator ciekłokrystaliczny SLM (ang. *Spatial Light Modulator*) [29], przestrzenna zmiana polaryzacji w wiązce [38]. Metody te opierają się na wytworzeniu nieoznaczoności fazy w centralnej części wiązki w taki sposób, aby na skutek interferencji w ognisku obiektywu, powstało wysokiej jakości minimum.

Zwiększenie zdolności rozdzielczej jest możliwe nie tylko w kierunku poprzecznym r względem osi optycznej obiektywu, lecz również w kierunku podłużnym z. Minimum w wiązce wygaszającej wytwarza się przez nałożenie na wiązkę maski fazowej ze skokiem o π w centralnej części. Uzyskano w ten sposób rozdzielczość $\Delta z < 100$ nm [41].

 $^{^5 \}rm wtedy$ wszystkie cząsteczki w stanie wzbudzonym mogą zostać przeniesione do stanu ciemnego, oczywiście przy odpowiednio dużym natężeniu wiązki wygaszającej

2.5 Jakość układu obrazującego

Miarą jakości odwozorowania optycznego może być zdolność rozdzielcza lub funkcja rozmycia obiektu punktowego (ang. *Point Spread Function*, PSF). Otrzymane wyniki zależą od stosowanych kryteriów i konwencji.

Zdolność rozdzielcza

Zdolność rozdzielcza układu optycznego odpowiada na pytanie jak blisko mogą być położone dwa bardzo małe obiekty, aby ich obraz mógł zostać rozróżniony. W tym wypadku najczęściej stosuje się kryterium Rayleigha lub kryterium Sparrowa.

KRYTERIUM RAYLEIGHA

Kryterium Rayleigha wprowadzono dla obrazowania niekoherentnego. Dodaje się natężenie obrazów dwóch takich samych obiektów punktowych (plamek Airy'ego, równanie 2.9). Warunkiem rozróżnienia jest pokrycie minimum natężenia obrazu pierwszego obiektu z maksimum natężenia obrazu drugiego obiektu. Jak pokazano w [22], kryterium równoważnie⁶ odnosi się do dowolnego układu obrazowania, gdzie rozmiar źrenicy wejściowej detektora jest równa rozmiarowi źrenicy obiektywu. Ogólnie, w przypadku obrazowania koherentnego otrzymywana zdolność rozdzielcza zależy od różnicy faz emitowanego światła przez dwa obiekty punktowe. Może być zarówno większa jak i mniejsza niż w przypadku niekoherentnym.

KRYTERIUM SPARROWA

Kryterium Sparrowa mówi, że granicznym warunkiem rozdzielenia obrazu dwóch punktów jest zerowanie się drugiej pochodnej po rozkładzie natężenia I(r) w połowie odległości między obiektami punktowymi (r = 0). Warunek można opisać równianiem:

$$\frac{\partial^2 I}{\partial r^2}\Big|_{x=0} = 0 \tag{2.21}$$

Kryterium Sparrowa można stosować dla dowolnego typu obrazowania, jednak jest ono niepraktyczne – trudno stwierdzić czy dany obraz, płaski w centralnej części, pochodzi akurat od dwóch bardzo małych obiektów.

 $^{^6}$ Oznacza to, że jeśli dwa punkty są rozróżnialne w obrazie niekoherentnym wg. kryterium, to również są rozróżnialne w dowolnym obrazowaniu ze źrenicą detektora równą źrenicy obiektywu.

Funkcja rozmycia obiektu punktowego

Przedstawione kryteria w zasadzie nie uwzględniały aberracji układu optycznego. Kryterium, które uwzględnia również wady odwzorowania jest PSF (ang. *Point Spread Function*, PSF). PSF definiuje się jako obraz obiektu punktowego i jest to trójwymiarowa funkcja. Jak pokazano wcześniej, dla bardziej złożonych struktur, otrzymywany obraz ma postać splotu rzeczywistego obiektu i funkcji rozmycia obiektu punktowego. Znajomość tej wielkości pozwala na zastosowanie algorytmów dekonwolucyjnych i odzyskanie orginalnego obrazu [21]. Teoretyczną PSF, wynikającą z dyfrakcji dla mikroskopu tradycyjnego i konfokalnego, przedstawiono wcześniej na rysunku 2.3.

Rozdział 3

Konstrukcja mikroskopu STED

Konstrukcja mikroskopu STED składa się z kilku etapów. Należy wybrać sposób skanowania próbki, metodę detekcji, zaprogramować akwizycję obrazu, wybrać wiązki laserowe, zestaw luster dichroicznych i filtrów – zależny od używanego barwnika fluorescencyjnego – i wreszcie przestrzennie przygotować wiązki, przekryć w płaszczyźnie ogniskowej i wzajemnie zsynchronizować czasowo. Ten rozdział poświęcony jest szczegółowemu opisowi każdego z etapów konstrukcji przeprowadzonych w Laboratorium Procesów Ultraszybkich.

3.1 Akwizycja danych w mikroskopie skaningowym

W mikroskopii skaningowej mamy dwie możliwości zbierania obrazu. Pierwszą z nich jest przesuwanie obiektu względem nieruchomej wiązki laserowej, drugą – skanowanie wiązką nieruchomego obiektu. W pierwszym przypadku z reguły wykorzystuje się stoliki piezoelektryczne, umożliwiające skanowanie z nanometrową precyzją, niezależnie w trzech kierunkach. W drugim używa się luster skanujących. Zdecydowaną zaletą jest tutaj możliwość szybkiego skanowania próbki, wadą brak jednakowego wypełnienia apertury obiektywu podczas skanowania wiązką laserową - co skutkuje różną zdolnością rozdzielczą w różnych częściach obrazu. W związku z tym zdecydowano się wykorzystać stolik piezoelektryczny.

Schemat akwizycji danych przedstawiono na rysunku 3.1. Do skanowa-

nia obiektów użyto stolika piezoelektrycznego TRITOR 102 CG (Piezosystem Jena), który umożliwia pozycjonowanie w trzech kierunkach z rozdzielczością 2 nm. Kontrola pozycji stolika odbywała się za pomocą wzmacniacza sygnału NV 40/3 CLE (Piezosystem Jena). Na wejście wzmacniacza podawano napięcia z zakresu 0-10 V, generowane przez wielofunkcyjną kartę pomiarową NI USB-6259 (National Instruments). Karta sterowana była autorskim programem napisanym w środowisku LabView 2010 (National Instruments). Po wzmocnieniu sygnał elektryczny miał napięcie w zakresie od -20 do 130 V. Pozycja stolika, z dobrym przybliżeniem, była liniową funkcją przykładanego napięcia. Używany sterownik umożliwiał odczyt aktualnego, dokładnego położenia stolika w postaci sygnału analogowego ± 5 V (wewnętrzne sprzężenie zwrotne).



Rysunek 3.1: Schemat układu akwizycji danych. Sygnał cyfrowy jest generowany przez program w platformie LabView. Następnie przez kartę NI (National Instruments) jest zamieniany na sygnał analogowy i przez sterownik kierowany do stolika piezoelektrycznego. W czasie skanowania sygnał z detektora i sygnał zwrotny ze stolika są konwertowane przez kartę na sygnały cyfrowe. Generacja i detekcja są wzajemnie zsynchronizowane przez wewnętrzny zegar karty.

Na wejścia X,Y sterownika stolika piezoelektrycznego podawano napięcia pokazane na rysunku 3.2. Kierunek Z kontrolowano przez podanie dowolnej stałej podczas skanu wartości napięcia. Z uwagi na niezależne programowanie każdej z trzech osi stolika, łatwo można zmodyfikować program w celu tworzenia obrazów 3D, lub dowolnej zamiany osi skanowania.

Typowa szybkość skanowania: dla zgrubnego skanu z krokiem 1 μ m to 200 $\frac{\mu m}{s}$, dla dokładnego z krokiem 20 nm, jest rzędu 10-20 $\frac{\mu m}{s}$. W przy-



Rysunek 3.2: Przykładowe funkcje napięcia sterujące stolikiem piezoelektrycznym, dla kierunku szybkiego skanu X i wolnego skanu Y.

padku większych prędkości funkcja położenia stolika od czasu nie jest liniowa. Możliwa jest korekcja otrzymanego obrazu przez interpolacje zebranych danych na regularną siatkę, zgodnie z parametrami zwrotnymi określającymi położenie stolika. W napisanym programie procedura ta, dla dużych macierzy położeń i obrazu, była bardzo czasochłonna i w praktyce bardziej opłacało się ograniczyć szybkość skanowania stolikiem do zakresu liniowego.

Początkowo próbowano programować stolik tak, aby skanował tam i z powrotem wzdłuż osi szybkiej X, bez wracania na początek linii. Wiązałoby się to z szybszą akwizycją danych. Niestety utrudnia to znacznie proces tworzenia obrazu z zebranego sygnału i ostatecznie zdecydowano przeprowadzać skan w jednym kierunku, z szybkim powrotem do nowej pozycji początkowej [Rys. 3.2]. Jak się okazało później, analogiczne rozwiązanie stosuje się w komercyjnym urządzeniu.

Rejestracja obrazu odbywa się przez kartę NI, do której wejścia podłączany jest sygnał detektora. Napisany program pozwala rejestrować obraz na dwa sposoby: przez wykorzystanie fotodiody i mierzenie wartości napięcia, lub przez użycie licznika pojedynczych fotonów i rejestrację sygnału TTL. Oba tryby rejestracji są zsynchronizowane z zadanymi przez użytkownika parametrami skanowania. Dla fotodiody istnieje możliwość przełączenia zbieranego sygnału na inną kartę National Instruments, zsynchronizowaną z pierwszą, co poprawia jakość otrzymywanego obrazu z uwagi na obserwowane przesłuchy napięć pomiędzy kanałami karty. Program umożliwia również dokładne ustawienie płaszczyzny ogniskowej obiektywu. W tym wypadku należy ustawić skanowanie wzdłuż wybranej linii w płaszczyźnie poprzecznej względem osi obiektywu XY i znaleźć taką wartość położenia w kierunku Z, aby rejestrowany sygnał był maksymalny. Możliwy jest odczyt natężenia wzdłuż dowolnej linii obrazu i dopasowanie funkcji gaussowskiej – co jest przydatne przy pomiarach PSF.

W układzie STED używano wyłącznie licznika fotonów opartego na fotodiodzie lawinowej SPCM-AQRH (PerkinElmer). Umożliwia on rejestrację fotonów w szerokim zakresie spektralnym 450-1060 nm, z dobrą wydajnością kwantową dla przewidywanego widma fluorescencji rzędu 65%. Licznik posiada złącze światłowodowe FC/PC, co umożliwia doprowadzenie sygnału przez światłowód.

3.2 Obiektyw mikroskopowy

Sercem układu mikroskopowego jest obiektyw. To od jego parametrów, w znacznej mierze, zależy jakość uzyskiwanego obrazu. W tym doświadczeniu wykorzystano obiektyw Plan-Apo VC $1.4/100 \times$ (Nikon) schematycznie przedstawiony na rysunku 3.3. Jest to obiektyw o najwyższym stopniu korekcji aberracji chromatycznych, przeprowadzonym dla maksymalnie 5 różnych wartości długości fali. Plan oznacza korekcję krzywizny pola, Apo to korekcja apochromatyczna, na aberracje sferyczną i chromatyczna soczewek obiektywu. VC (ang. Violet Corrected) oznacza korekcję dla krótkiej długości fali, 405 nm. Powiększenie obiektywu wynosiło 100, cieczą imersyjną jest olej. Apertura numeryczna wynosi 1,4. Przy bardzo dużych powiększeniach obiektywy są projektowane na konkretną grubość szkiełka nakrywkowego, tutaj 0,17 mm. Jest on skorygowany na nieskończoność co oznacza, że obiektyw nie tworzy obrazu pośredniego, lecz kolimuje wiązkę światła. Obraz jest tworzony przez dodatkową soczewkę referencyjną (ang. tube lens), umieszczaną pomiędzy okularem i obiektywem. To względem ogniskowej tej soczewki podaje się powiększenie obiektywu. Typowo ogniskowa wynosi od 160 do 200 mm. W naszym przypadku to 200 mm [26].

Oznaczenie DIC to różnicowy kontrast interferencyjny (ang. Differential



Rysunek 3.3: Wybrane parametry używanego w pracy obiektywu. Odległość robocza WD = 0.13 mm, ogniskowa f = 2 mm, źrenica wejściowa d = 5.6 mm, szkiełko nakrywkowe CG powinno mieć grubość 0.17 mm.

Interference Contrast), opisujący specjalistyczną cechę budowy obiektywu. Nie ma on żadnych wewnętrznych modyfikacji, natomiast został zaprojektowany do użytku ze specjalnie zmodyfikowanym Wollastonem lub pryzmatem Nomarskiego, w celu zwiększenia kontrastu obrazu. N2 określa typ kondensorowego pryzmatu Nomarskiego z którym może pracować obiektyw, jeśli jest on w wyposażeniu mikroskopu. Kiedy nie używamy pryzmatu, obiektyw może być zastosowany w innych typach mikroskopii.

Ważnym parametrem w mikroskopii konfokalnej jest średnica źrenicy obiektywu *D*, którą można opisać wzorem:

$$D = 2NA \cdot f, \tag{3.1}$$

gdzie f– ogniskowa obiektywu, NA– apertura numeryczna. Znając powiększenie obiektywu i ogniskową soczewki referencyjnej, mo-

żemy łatwo policzyć, że f = 2 mm. Korzystając z powyższego wzoru średnica źrenicy wejściowej obiektywu d = 5,6 mm.

3.3 Przygotowanie wiązek

Wybór wiązek laserowych i luster dichroicznych

Z grupy barwników fluorescencyjnych, dla których zaobserwowano efekt STED [27], zdecydowano się zaprojektować układ dla barwników AT-TO 633 i ATTO 647N. Było to uwarunkowane po pierwsze dobrymi rezultatami dla tych fluoroforów otrzymanymi wcześniej [33,34], po drugie stosowaniem tych barwników w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN, co umożliwiło otrzymanie preparatów fluorescencyjnych do charakterystyki jakości mikroskopu.

ATTO 633 to barwnik, którego widmo absorpcji i emisji przedstawiono na rysunku 3.4. Centralna długość fali absorpcji światła przypada na 629 nm, fluorescencji na 657 nm. Czas zaniku fluorescencji wynosi 3,3 ns, wydajność kwantowa to 64%. Własności spektralne ATTO 647N są podobne, przedstawiono je wcześniej na rysunku 2.5. Maksimum absorpcji przypada na 644 nm, fluorescencja jest maksymalna dla 669 nm, a jej czas zaniku wynosi 3,5 ns. Na wykresie naniesiono używane zakresy spektralne wzbudzenia, detekcji i emisji wymuszonej.

Źródłem wiązki wygaszającej jest przestrajalny laser femtosekundowy MaiTai (Newport Corp). Laser może pracować w zakresie centralnych długości fali 690-1090 nm, z różną mocą wyjściową w przedziale 1-3 W. Emituje wiązkę impulsów femtosekundowych, o czasie trwania ~ 100 fs i częstości repetycji 80 MHz. Wybrano wiązkę wygaszającą o długości fali 750 nm i szerokości połówkowej FWHM (ang. *Full-Width at Half Maximum*) 9 nm. Moc wyjściowa lasera dla tej długości fali to 2,5 W. Laserem wzbudzającym fluorescencję jest dioda laserowa emitująca impulsy pikosekundowe (LDH-P-C-635B, PicoQuant), o czasie trwania ~ 80 ps. Długość fali to 635 ± 10 nm. Pracę diody kontroluje sterownik PDL-800-B (PicoQuant), który umożliwia synchronizację lasera z zewnętrznym sygnałem elektronicznym i ma możliwość ustawienia częstości repetycji impulsów z zakresu od 5 MHz do 80 MHz. Rozrzut czasowy układu wyzwalającego (ang. *jitter*) jest mniejszy od 40 ps.

Parametry używanych luster dichroicznych i filtru zebrano w tabeli



Rysunek 3.4: Widmo absorpcji i fluorescencji barwnika ATTO 633. Naniesiono okna spektralne wzbudzenia, detekcji fluorescencji, emisji wymuszonej – wynikające z używanych luster dichroicznych i filtrów.

Тур	Nr katalogowy	Specyfikacja
Płytka światłodzie-	Z635 (Chroma)	R 635 nm > 90%, T 650–
ląca DM1		900 nm > 90%
Lustro dichroiczne	FF-721 (Semrock)	R 750 nm > 87%, T 630–
DM2		700 nm > 90%
Filtr pasmowy BF	F47-686 (Chroma)	centralna długość fali T
		$685~\mathrm{nm},$ szerokość $85~\mathrm{nm}$

Tabela 3.1: Lustra dichroiczne i filtr zastosowane w mikroskopie STED. R,T to odpowiednio transmisja i odbicie.

3.3. Użyto oznaczeń zgodnych z zamieszczonym w dalszej części pracy rysunkiem 3.7. Kluczowe jest dobranie zestawu filtrów tak, aby zbierać fluorescencję w możliwie szerokim oknie spektralnym.



Rozciąganie impulsu wygaszającego

Rysunek 3.5: Schemat kompresora siatkowego używanego do rozciągnięcia impulsu. DG - siatka dyfrakcyjna, M – lustro, ω_0 – centralna częstość impulsu

Jak uzasadniono we wcześniejszej części pracy, impulsy wygaszające nie powinny być krótsze niż 1 ps. W praktyce, z uwagi na rozrzut czasowy wyzwalania impulsu wzbudzającego, czas trwania impulsu wygaszającego powinien być rzędu 100 ps. Impuls femtosekundowy musi zatem zostać rozciągnięty w czasie tysiąc razy. W tym celu zbudowano kompresor siatkowy, złożony z dwóch identycznych siatek o liczbie rys 1500/mm (Spectrogon). Układ kompresora przedstawiono na rysunku 3.5. Pierwsza siatka służy do przestrzennego rozdzielenia różnych składowych spektralnych impulsu. Druga powoduje, że wszystkie składowe biegną równolegle. Następnie wiązka odbija się od lustra i wracając jest składana ponownie w jeden impuls, o zmienionej charakterystyce czasowej. W tym układzie składowa o większej długości fali pokonuje dłuższą drogę niż krótsza, co przejawia się ich rozsunięciem w czasie. Taki układ wprowadza ujemną dyspersję i z reguły służy do kompresji impulsu z dodatnim świergotem. Jeżeli rozsunięcie siatek jest bardzo duże, to wprowadzona ujemna faza spektralna spowoduje odwrotny efekt rozciągnięcia czasowego impulsu. Faza spektralna wprowadzana przez układ [42] jest dana przez:

$$\frac{\mathrm{d}^2\varphi}{\mathrm{d}\omega^2}\Big|_{\omega=0} \approx -\frac{\lambda_0^3}{2\pi c^2 d^2} \frac{L}{\cos^2\beta'} , \qquad (3.2)$$

gdzie λ_0 – centralna długość fali impulsu, d– stała siatek, L, β' – zaznaczono na rysunku 3.5.

Znajomość fazy spektralnej i widma (tutaj widmo gaussowskie, FWHM = 9 nm) pozwala na obliczenie czasu trwania impulsu po przejściu przez układ kompresora. W tym celu należy rozpisać postać pola elektrycznego w domenie częstości i za pomocą transformaty Fouriera otrzymać czasowe własności impulsu.

Czas wyznaczono dzięki programowi napisanemu przez dr Pawła Wnuka. W naszym przypadku, dla kąta padania 45° i odległości siatek 0,5 m, przewidywany czas trwania impulsu za kompresorem to 61 ps.

Z uwagi na długą drogę rozseparowanych spektralnie składowych impulsu zadbano o taką osłonę układu, aby zminimalizować efekty związane z wpływem fluktuacji powietrza na otrzymywaną wiązkę pikosekundową.

Problemem w przypadku wykorzystania siatek do rozciągnięcia impulsu jest ograniczenie mocy wiązki, jaka może padać na siatkę, wynikające z obserwowanych efektów termicznych. W celu zabezpieczenia siatek zdecydowano ograniczyć zakres mocy wejściowej wiązki wygaszającej do 300 mW.

Kształtowanie wiązki STED

Minimum w wiązce wygaszającej otrzymano przez nałożenie spiralnej fazy przedstawionej na rysunku 3.6. Transformata Fouriera z wiązki gaussowskiej o takiej fazie przestrzennej, powoduje powstanie minimum w środku wiązki. Do nałożenia fazy początkowo używano przestrzennego modulatora światła SLM (PLUTO, Holoeye). Składa się on z matrycy komórek ciekłokrystalicznych, do których przykładane jest napięcie w celu zmiany ich orientacji i tym samym fazy w wiązce laserowej. Modulator posiada 1920 × 1080 pikseli oraz duży współczynnik wypełnienia 87%. Pracuje w trybie odbiciowym, o wydajności odbicia 60% i wysokiej wydajności dyfrakcyjnej, powyżej 80%. Umożliwia zadanie dowolnej fazy, w zakresie długości fali do 1550 nm. Aby modulator pracował poprawnie, konieczna jest kalibracja przykładanego napięcia na wprowadzaną zmianę fazy. Wspólnie z Maciejem Kowalczykiem wykonano kalibrację metodą interferencji dwóch prostopadłych polaryzacji - ulegającej modulacji, oraz odbitej od modulatora.

W trakcie eksperymentów zauważono, że modulator zniekształca front falowy używanej wiązki. Wprowadzono samokorekcję fazy na modulatorze.

Wiązkę STED obserwowano na kamerze CCD (scA1400-17fm, Basler) w ognisku długoogniskowej soczewki (f = 1000 mm). Wynik przedstawiono na rysunku 3.6. Głębokość otrzymanego minimum < 0.4% względem maksymalnego natężenia. Modulator posiada tą niewątpliwą zaletę, że można dowolnie modyfikować fazę w celu uzyskania jak najlepszej jakości wiązki wygaszającej w ognisku. Dzięki temu można otrzymać bardzo dobrą charakterystykę przestrzenną wiązki, problemem okazuje się jednak dynamika czasowa urządzenia.

Modulator był podłączany do komputera przez złącze HDMI i traktowany jako zewnętrzny monitor. Sygnał na modulatorze odświeżał się z częstością odświeżania karty graficznej komputera 60 Hz, co mogłoby spowodować otrzymanie gorszej jakości obrazu w mikroskopie STED. Z



Rysunek 3.6: Porównanie otrzymanych ognisk wiązki wygaszającej dla różnych sposobów nałożenia spiralnej fazy, narysowanej w prawym górnym rogu.

tego powodu zaniechano wykorzystywania modulatora w doświadczeniu i posłużono się komercyjną, wirową płytką fazową VPP-1a (RPC Photonics). Natężenie otrzymanej w ten sposób wiązki, przedstawiono na rysunku 3.6. Zastosowanie płytki pozbawiło nas możliwości korekcji wiązki STED przez kontrolowaną modyfikację fazy. Głębokość minimum w obu przypadkach jest porównywalna. Wiązka wytworzona przez modulator charakteryzuje się jednak mniejszą eliptycznością.

Wiązka wzbudzająca

Wiązka pochodząca z oscylatora szafirowego była praktycznie jednomodowa. Wiązka wzbudzająca, generowana z diody laserowej, pracowała w wielu wyższych modach poprzecznych. Aby otrzymać ograniczoną dyfrakcyjnie wiązkę wzbudzającą konieczne było przeprowadzenie filtrowania przestrzennego za pomocą standardowego światłowodu jednomodowego SM (Thorlabs) (Rys. 3.7).

3.4 Układ doświadczalny

Schemat układu doświadczalnego przedstawiono na rysunku 3.7. Wiązka wzbudzająca diody laserowej jest filtrowana przestrzennie za pomocą światłowodu jednomodowego SM. Następnie przechodzi przez polaryzator, który jest ustawiony tak, aby wiązka miała ortogonalną polaryzację względem wiązki wygaszającej. Za polaryzatorem ustawiono teleskop, który powiększa wiązkę do rozmiaru źrenicy obiektywu, tutaj około 5,6 mm¹. Następnie wiązka wzbudzająca jest odbijana za pomocą lustra dichroicznego DM1.

Wiązka wygaszająca przechodzi przez półfalówkę i polaryzator – jest to układ kontroli mocy lasera. Kolejna półfalówka służy zmianie kierunku liniowej polaryzacji wiązki laserowej. Kierunek ustawiono tak, aby wydajność kompresora była możliwie największa. Następnie wiązka pada na teleskop kolimujący – w ten sposób uzyskuje się długi zasięg Rayleigha i przechodzi przez kompresor. Impuls ulega rozciągnięciu do dziesiątek pikosekund. Za kompresorem ustawiony jest drugi teleskop,

¹Podaje się, że rozmiar wiązki powinien być dwukrotnie większy od źrenicy wejściowej obiektywu [35]. Z uwagi na ograniczenie mocy wiązki wygaszającej przez kompresor siatkowy zdecydowano powiększyć wiązki do rozmiaru źrenicy wejściowej.

który odpowiednio powiększa wiązkę. Lustro dichroiczne DM2 służy do łączenia przestrzennego obu wiązek. Wiązki przechodzą przez wysokiej klasy szerokopasmową ćwierćfalówkę (2-APW-L/4-012, Altechna), której oś ustawiona jest pod kątem 45° względem polaryzacji wiązek, aby uzyskać polaryzację kołową. Polaryzacja kołowa zapewnia równomierne wzbudzanie molekuł, niezależnie od ich orientacji przestrzennej, ma również korzystny wpływ na głębokość minimum wiązki STED, z uwagii na destruktywną interferencję w ognisku obiektywu. Wiązki są kierowane do komercyjnego mikroskopu Eclipse-Ti (Nikon), gdzie w kostce mikroskopowej zamiast zestawu filtrów umieszczono lustro. Wiązki przechodzą przez obiektyw, są ogniskowane, a część fluorescencji jest zbierana i wraca. Przechodzi przez lustra dichroiczne DM1, DM2 i wchodzi do układu detekcyjnego. Układ detekcyjny składa się z długoogniskowej soczewki i światłowodu wielomodowego MM, o średnicy rdzenia 62,5 μ m (M31L01, Thorlabs), stanowiącego otwór konfokalny. Ogniskowa soczewki w układzie detekcyjnym jest dobrana tak, aby rozmiar otrzymanego ogniska pokrywał się z rozmiarem rdzenia światłowodu. Swiatłowód prowadzi wiązkę do detektora, licznika pojedynczych fotonów SPCM.

Synchronizacja czasowa wiązek odbywa się na podstawie sygnału z fotodiody P. Zgrubne dopasowanie czasu przyjścia obu impulsów, w momencie połączenia wiązek, uzyskano przez dobranie odpowiedniej długość kabla BNC łączącego fotodiodę ze sterownikiem lasera pikosekundowego. Długość dobrano obserwując wskazania drugiej, bardzo szybkiej fotodiody (Ultra High Speed Photoreceiver with Si PIN Photodiode, FEMTO) o czasie narastania sygnału ~ 250 ps, ustawionej w miejscu przestrzennego połączenia wiązek. Dokładną synchronizację przeprowadzano przez przesuwanie fotodiody P na stole optycznym i obserwację rejestrowanego obrazu mikroskopowego, o czym będzie mowa w dalszej części pracy.

Położenie światłowodu MM, w płaszczyźnie prostopadłej do osi optycznej, ustawiono wstępnie korzystając z dodatkowego lustra. Lustro dokręcano zamiast obiektywu do korpusu mikroskopu. Przy poprawnym ustawieniu wiązki wchodzącej do obiektywu (tzn. wchodzącej centralnie i równolegle do osi optycznej), wiązka odbita od tak zamocowanego lustra powinna wracać dokładnie tą samą drogą co wiązka wejściowa. Korzystając z tego faktu ustawiono za pomocą luster L1, L2 położenie i kierunek wiązki wzbudzającej. Kierunek drugiej wiązki (STED) ustawiano względem pierwszej. Przy czym niezwykle ważne jest dokładne przestrzenne przekrycie dwóch wiązek. Wykorzystano w tym celu kamerę CCD (scA1400-17fm, Basler). Rejestrowano obraz wiązek bardzo blisko punktu połączenia, oraz w możliwie dużej odległości (u nas ok. 1,5 m). Wyznaczono centralne położenie wiązki wzbudzającej za pomocą dopasowania dwuwymiarowej funkcji Gaussa do rozkładu natężenia. Następnie do tej pozycji dopasowano położenie centralne wiązki STED. Okazało się, że przy dużych rozmiarach wiązek ok. 5,6 mm, dokładność ustawienia przekrywania przestrzennego w ten sposób nie jest wystarczająca. Konieczne było przekrycie wiązek w trybie pracy mikroskopu, przy wykorzystaniu sygnału z detektora.



Rysunek 3.7: Schemat układu doświadczalnego. Oznaczenia: P – fotodioda, $\lambda/2$, $\lambda/4$ – odpowiednio półfalówka i $\acute{e} wier \acute{e} fal \acute{o} wka, \ T-teles kop, \ DG-siatka \ dy frakcyjna, \ VP-spiralna \ plytka \ fazowa, \ DM1, \ DM2 - lustra \ dichroiczne, \ CM1, \ DM2 - lustra \ dichroiczne, \ di$ BF – filtr pasmowy, SM, MM – światłowód jednomodowy, światłowód wielomodowy.

Rozdział 4

Wyniki

4.1 Mikroskop konfokalny

4.1.1 Zdolność rozdzielcza

Pomiar otrzymanej rozdzielczości w układzie konfokalnym (bez użycia wiązki wygaszającej) wykonano na nanosferach Crimson Fluorescent Protein CFP (Invitrogen), o nominalnym rozmiarze 20 nm. Przykładowy wynik rejestrowanego obrazu przedstawiono na rysunku 4.1. Szybkość skanowania zgrubnego z krokiem 1 $\frac{\mu m}{px}$ to 250 $\frac{\mu m}{s}$, dokładnego z krokiem 10 $\frac{nm}{px}$ to 2 $\frac{\mu m}{s}$. Skalę odległości przedstawiono na rysunku. Możemy zaobserwować obraz klastra nanosfer i kilka obrazów bardzo małych obiektów, prawdopodobnie pojedynczych fluorosfer. Są one symetryczne, co świadczy o poprawnym filtrowaniu przestrzennym wiązki wzbudzającej. Przykładowy rozkład natężenia obrazu od pojedynczego obiektu przedstawiono na rysunku 4.2. Na wykresach narysowano profil rejestrowanego natężenia w kierunkach x, y, oraz dopasowaną funkcję gaussowską. FWHM wynosi odpowiednio w kierunku x - 237 nm, w kierunku y - 266 nm.

PSF mikroskopu konfokalnego wyznaczono wykonując kilkanaście analogicznych pomiarów. Końcowy rezultat to:

$$\begin{split} \mathrm{PSF}_{\mathrm{x}} &= 250 \pm 39 \ \mathrm{nm} \\ \mathrm{PSF}_{\mathrm{y}} &= 276 \pm 27 \ \mathrm{nm}, \end{split}$$

gdzie PSF_x , PSF_y – to FWHM obrazu obiektu punktowego w kierunkach odpowiednio x, y zaznaczonych na rysunku 4.2. Niepewność pomiaru wyznaczono jako odchylenie standardowe. Niepewność systema500 nm 10 µm

tyczna wynikająca z dokładności dopasowania funkcji gaussowskiej była pomijalnie mała.

Rysunek 4.1: Nanosfery obrazowane w układzie konfokalnym. Nanosfery wzbudzano wiązką o długości fali 634 nm. Obraz górny przedstawia dokładny skan zaznaczonego na dolnym obrazie obszaru.



Rysunek 4.2: Obraz nanosfery w układzie konfokalnym wraz z dopasowaną funkcją gaussowską. PSF (FWHM) w kierunku x, y odpowiednio wynoszą 237 nm, 266 nm.

4.1.2 Próbki biologiczne



Rysunek 4.3: Neuron mysi znakowany barwnikiem ATTO 647N. Odpowiednie odległości przedstawiono na rysunku.

Mikroskopu użyto do obserwacji próbek biologicznych. Próbki przygotowano w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN. Były to neurony mysie znakowane barwnikiem ATTO 647N, oraz później ATTO 633.

Przykładowy zarejestrowany obraz przedstawiono na rysunku 4.3. W prawym górnym rogu widzimy neuron mysi, na dole przedstawiono powiększenie jądra neuronu. Na dolnym obrazie widać, że skanowano ze zbyt dużą prędkością 200 $\frac{\mu m}{s}$, przy zadanym kroku skanu 100 $\frac{nm}{px}$. W lewym górnym rogu przedstawiono powiększenie zaznaczonego obszaru neuronu. Prędkość skanowania to 2 $\frac{\mu m}{s}$, przy kroku 20 $\frac{nm}{px}$.

4.2 Mikroskop STED

4.2.1 Wydajność emisji wymuszonej, a synchronizacja czasowa.



Rysunek 4.4: Względny sygnał fluorescencji w funkcji opóźnienia czasowego impulsu STED, względem impuslu wzbudzającego. Mierzono stosunek zliczanych fotonów przy włączonej wiązce STED, względem sygnału przy nieobecności wiązki dla barwników CFP i ATTO647N.

W celu znalezienia optymalnego względnego opóźnienia impulsów przeprowadzono pomiar wydajności emisji wymuszonej w funkcji położenia fotodiody P (Rys. 3.7). Dla każdego położenia fotodiody mierzo-

no sygnał na detektorze SPCM dla dwóch barwników: ATTO 647N i CFP. Podczas zmian położenia zachowano stałą wartość poziomu sygnału elektronicznego z fotodiody, regulując natężenie padającego na nią światła. Zmiana położenia odpowiadała zmianie względnego opóźnienia impulsów. Zubożenie fluorescencji w funkcji opóźnienia impulsów przedstawiono na rysunku 4.4. Użyto wiązek gaussowskich zarówno do



Rysunek 4.5: Rejestrowany sygnał fluorescencji przy wyłączonej wiązce STED i po jej włączeniu. Stosunek maksymalnej wartości sygnału spada do 8% sygnału początkowego.

wzbudzenia barwnika, jak i jego wygaszenia – usunięto maskę fazową i nie kształtowano wiązki STED w obwarzanek. Zadbano o możliwie dokładne przekrycie wiązek w płaszczyźnie ogniskowej. Podczas pomiaru skanowano obiekt cały czas wzdłuż jednej linii. Mierzono maksymalny sygnał rejestrowany przez licznik pojedynczych fotonów, gdy do układu mikroskopu wpuszczano obie wiązki, a następnie mierzono ten sam sygnał przy obecności jedynie wiązki wzbudzającej. Było to konieczne z uwagii na zjawisko wybielania fluoroforu. Względny sygnał to stosunek otrzymanego sygnału z wiązką wymuszającą i bez niej. Minimum wykresu odpowiada optymalnemu ustawieniu fotodiody. Otrzymany wynik jest splotem postaci czasowej impulsu wygaszającego z funkcją zaniku fluorescencji w czasie.

Pomiary dla fluoroforów wykonano przy porównywalnej mocy wiązki wygaszającej < 50 mW. Jak widać wydajność wygaszania emisjii dla ATTO 647N jest dużo niższa, niż dla CFP, co być może jest spowodowane większą wartością natężenia nasycenia dla tego barwnika. W dalszej części przeprowadzono doświadczenia głównie z CFP.

Otrzymany kontrast przy dokładnym przekryciu wiązek, optymalnym ustawieniu fotodiody i maksymalnej mocy wiązki STED dla CFP przedstawiono na rysunku 4.5. Po włączeniu wiązki STED sygnał spada poniżej 8%.

4.2.2 Nanosfery Crimson Fluorescent Protein

Pomiarów parametrów zbudowanego mikroskopu STED dokonano używając nanosfer FluoSpheres crimson fluorescent proteins, o średnicy 20 nm. Roztwór nanosfer rozcieńczano w wodzie destylowanej (około 1:10 000) i umieszczano kroplę na szkiełku nakrywkowym. Szkiełko na kilka minut kładziono na platformie obrotowej, aby zapewnić równomierne rozłożenie preparatu. Następnie dodawano kroplę alkoholu poliwinylowego PVA w celu zahamowania rotacji cząsteczek i przyklejano szkiełko nakrywkowe do szkła mikroskopowego. W celu zabezpieczenia przed przesunięciem powierzchni szkiełka względem szkła mikroskopwoego dodatkowo pomalowano jego krawędź lakierem bezbarwnym. Tak przygotowane szkiełko, po pewnym czasie, gwarantowało w miarę równomierne rozłożenie utwardzonych fluorosfer. Próbkę mocowano na stoliku piezoelektrycznym za pomocą taśmy klejącej - aby nie przesuwała się w czasie skanowania. Przed wykonaniem pomiaru ustawiano płaszczyzne ogniskową. Wybierano położenie próbki w kierunku z w centralnej części obszaru, gdzie rejestrowany był sygnał fluorescencji. W ten sposób uzyskiwano pewność, że ognisko nie znajdowało się w pobliżu szkła. Następnie skanowano preparat z zadanymi parametrami, przy wyłączonej wiązce STED i po jej włączeniu. Przykładowe obrazy przedstawiono na rysunku 4.6. Możemy zaobserwować zwiększoną zdolność rozdzielczą układu STED. Wyznaczając FWHM obrazów poszczególnych nanosfer w układzie konfokalnym i mikroskopie STED możemy się przekonać, że uzyskany obraz jest ponad dwukrotnie węższy dla mikroskopu STED. Dokładniej w kierunku x jest węższy $2,3\pm0,3$ razy, w kierunku $y 2,5 \pm 0,9$ razy. Niepewność wyznaczono jako odchylenie standardowe. Poniżej (Rys. 4.7) zamieszczono przykładowe profile natężenia w kierunkach x, y dla obiektu punktowego w mikroskopie STED i układzie konfokalnym. Otrzymane FWHM dla mikroskopu STED (w nawiasach przedstawiono wartość dla mikroskopu konfokalnego) to w kierunku x 98 (225) nm, oraz w kierunku y 138 (290) (FWHM). Rejestrowany profil natężenia nie jest w przybliżeniu funkcją gaussowską i FWHM odczytano bezpośrednio z pomiaru, podobnie jak robiono to w innych układach [31,39].

Końcowe PSF wyznaczono na podstawie kilkunastu pomiarów i odpowiednio wynosi:

$$PSF_x = 103 \pm 18 \text{ nm}$$

 $PSF_y = 119 \pm 25 \text{ nm}.$

Niepewność pomiarową wyznaczono analogicznie jak dla układu konfokalnego. Ograniczeniem w uzyskaniu lepszego wyniki wydaje się być dostępna moc wiązki wygaszającej.



mikroskop konfokalny

STED

Rysunek 4.6: Nanosfery Crimson Fluorescent Protein w układzie konfokalnym i mikroskopie STED



Rysunek 4.7: Nanosfery Crimson Fluorescent Protein w układzie konfokalnym i mikroskopie STED

Rozdział 5

Podsumowanie

Skonstruowano układ doświadczalny do mikroskopii konfokalnej oraz mikroskopii STED, bazując na komercyjnym mikroskopie Eclipse Ti (Nikon).

W układzie konfokalnym uzyskano rozdzielczość 263 ± 33 nm, podobną do deklarowanej w komercyjnym mikroskopie, przy takiej samej długości fali wiązki wzbudzającej (245 nm). Przez wprowadzenie dodatkowej wiązki wygaszającej fluorescencję uzyskano subdyfrakcyjną rozdzielczość 111 ± 22 nm i ponad dwukrotnie poprawiono rozdzielczość układu. W ramach pracy magisterskiej zaprogramowano stolik piezoelektryczny, skonstruowano detekcję konfokalną używając jako detektora licznika pojedynczych fotonów, wybrano zestaw luster dichroicznych i filtrów do mikroskopu fluorescencyjnego i wprowadzono wiązkę wygaszającą, którą ukształtowano w obwarzanka. Użycie siatek dyfrakcyjnych do rozciągania impulsu STED umożliwi w przyszłości badanie wpływu parametrów czasowych impulsu na wydajność emisji wymuszonej.

Bibliografia

- [1] R. Hook, "Micrographia: of some physilogical description of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon", London (1864)
- [2] G. B. Airy, On the diffraction of an object-glass with circular aperture, Trans. Cambridge Phil. Soc. 5, 283–291 (1835)
- [3] E. Abbe, Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, Archiv fur mikroskopische Anatomie, 9(1873):413–468.
- [4] Q.Wu, G. D. Feke, R. D. Grober, and L. P. Ghislain. Realization of numerical aperture 2.0 using a gallium phosphide solid immersion lens. Applied physics letters, 75:4064, 1999.
- [5] S. Hell and E. H. K. Stelzer, Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope, Journal of the Optical Society of America A,9(12):2159-2166,1992.
- [6] M. Minsky, Microscopy apparatus, 1961. US Patent 3,013,467.
- [7] D. Axelrod, Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence, J. Cell Biol. 89, 141–145 (1981)
- [8] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution, Nature 374, 555–559 (1995)
- [9] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, Science, 248:73-76, 1990.

- [10] Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., & Tank, D. W. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. Nature 385, 161.165 (1997).
- [11] Agard, D. A. & Sedat, J. W. Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. Nature 302, 676–681 (1983)
- [12] Carrington, W. A. et al. Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure. Science 268, 1483–1487 (1995)
- [13] Wallace W, Schaefer LH, Swedlow JR (2001). "A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy". BioTechniques 31 (5): 1076–8, 1080.
- [14] E. Synge, A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region, Philosophical Magazine, 6(1928):356.
- [15] E. A. Ash, G. Nichols, "Super-resolution aperture scanning microscope", Nature, 237(5357), 510-512. Nature Publishing Group. Pobrane z http://www.nature.com/nature/journal/
- [16] Stefan W. Hell and Jan Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy", Opt. Lett. 19, 780-782 (1994)
- [17] Thomas A. Klar and Stefan W. Hell, "Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy", Opt. Lett. 24, 954-956 (1999)
- [18] B. Hein, K. Willig, S. W. Hell, Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein - labeled organelle inside a living cell. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(2008)(38):14271-14276.
- [19] R. Schmidt, C. A. Wurm, S. Jakobs, J. Engelhardt, A. Egner, S. W. Hell, Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells, Nature Methods, 5(2008)(6):539–544.
- [20] V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, S. W. Hell, Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement, Science, 320(2008)(5873):246–249.

- [21] D. Macmillan, Nanoscale Resolution Imaging using PALM Microscopy, Carl Zeiss MicroImaging, LCC (2011). Pobrane z http://conference2011.msc-smc.org/
- [22] T. Wilson and C. J. R. Sheppard, "Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy" (Academic, New York, 1984)
- [23] E. Rittweger, "Maximizing far-field optical microscopy resolution through selected fluorophore transitions", (PhD-thesis, MPI fur biophysikalische Chemie, Goettingen, 2009)
- [24] B. Harke, "3D STED Microscopy with Pulsed and Continuous Wave Lasers", Ph.D.-Thesis Georg-August-University Goettingen, Germany (2008)
- [25] Benjamin Harke, Jan Keller, Chaitanya K. Ullal, Volker Westphal, Andreas Schönle, and Stefan W. Hell, "Resolution scaling in STED microscopy," Opt. Express 16, 4154-4162 (2008)
- [26] Strona internetowa Nikon Microscopy, http://www.microscopyu.com
- [27] Strona internetowa Wydziału Nanobiofotoniki, Instytutu Maxa Plancka Chemii Biofizycznej, http://www.mpibpc.mpg.de/groups/hell/
- [28] J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy" (Plenum, New York, 1983)
- [29] A. Engler, "Adaptive elements for STED microscopy" (PhD-thesis, MPI fur biophysikalische Chemie, Goettingen 2009)
- [30] M. Lauterbach, "Fast STED microscopy" (PhD-thesis, MPI fur biophysikalische Chemie, Goettingen 2009)
- [31] B. Hein, "Live Cell STED Microscopy Using Genetically Encoded Markers" (PhD-thesis, MPI fur biophysikalische Chemie, Goettingen, 2009)
- [32] "Nature milestones in light microscopy", Nature (2009).
 Pobrane z
 http://www.nature.com/ milestones/light-microscopy
- [33] D. Wildanger et al., Opt. Expr. 16, 9614 (2008).

- [34] L. Meyer et al., Small 4, 1095 (2008).
- [35] J. Pawley, Handbook of Biological Confocal Microscopy, (2006)
- [36] Michael J. Nasse and Jörg C. Woehl, "Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy." J. Opt. Soc. Am. A 27, 295-302 (2010)
- [37] ATTO-TEC, Fluorescent Labels and Dyes, Pobrane z http://www.atto-tec.com/
- [38] Matthias Reuss, Johann Engelhardt, and Stefan W. Hell, "Birefringent device converts a standard scanning microscope into a STED microscope that also maps molecular orientation," Opt. Express 18, 1049-1058 (2010)
- [39] Dominik Wildanger, Eva Rittweger, Lars Kastrup, and Stefan W. Hell, "STED microscopy with a supercontinuum laser source," Opt. Express 16, 9614-9621 (2008)
- [40] Gael Moneron, Rebecca Medda, Birka Hein, Arnold Giske, Volker Westphal, and Stefan W. Hell, "Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers," Opt. Express 18, 1302-1309 (2010)
- [41] B. Harke, C. Ullal, J. Keller, S.W. Hell. Three-Dimensional Nanoscopy of Colloidal Crystals. Nano letters, DOI: 10.1021/nl073164n, 2008.
- [42] R. Trebino, Ultrafast Opitcs, Lecture 5, Dispersion, pobrane z http://frog.gatech.edu/lectures/index.html.
- [43] E. Treacy. Optical pulse compression with diffraction gratings. Quantum Electronics, IEEE Journal of In Quantum Electronics, IEEE Journal of, Vol. 5, No. 9. (1969), pp. 454-458.
- [44] Thomas Feurer. A virtual femtosecond laser labolatory. Bern, Switzerland 2009. Pobrane z http://www.lab2.de.