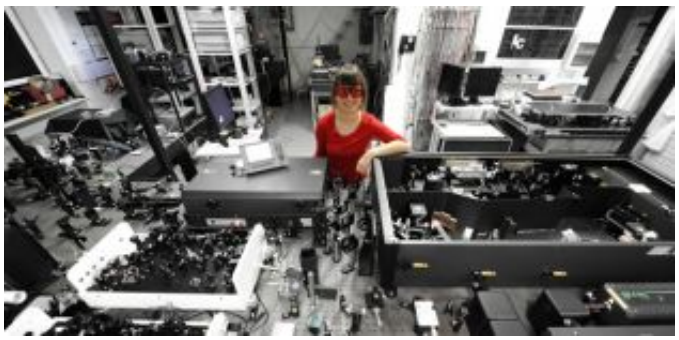
Superrozdzielczy mikroskop powstał na Wydziale Fizyki UW

2012-01-02



Joanna Oracz w laboratorium optycznym Wydziału Fizyki UW. (Źródło: Grzegorz Krzyżewski/FUW)

Mikroskopy optyczne wciąż są bezkonkurencyjne przy badaniu próbek biologicznych. Problemem pozostaje ich mała rozdzielczość, którą udało się poprawić dopiero w ostatnich latach w mikroskopach STED. Przyrząd tego typu, jeden z pierwszych w Polsce, skonstruowała studentka Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Z powodu ograniczenia dyfrakcyjnego mikroskopy optyczne nigdy nie będą mogły rozróżniać szczegółów mniejszych od 200 nanometrów – tak sądzono jeszcze kilkanaście lat temu. W ostatnich latach naukowcom udało się pokonać to ograniczenie i zbudować przyrządy superrozdzielcze, m.in. konfokalne mikroskopy STED. Prototypowe urządzenie tego typu powstało ostatnio na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego (FUW), w ramach pracy magisterskiej Joanny Oracz. Od przyszłego roku nowy mikroskop będzie używany nie tylko do badań z zakresu optyki, ale również do analizy próbek biologicznych.

Nauka zna wiele metod obrazowania z rozdzielczością rzędu nanometrów (miliardowych części metra), np. mikroskopię elektronową czy sił atomowych. Metody te wymagają odpowiedniego spreparowania próbek i umożliwiają obrazowanie wyłącznie samej powierzchni. Tam, gdzie w grę wchodzą próbki pochodzenia biologicznego, nierzadko żywe, mikroskopia optyczna nadal jest bezkonkurencyjna. Do jej zalet należy m.in. możliwość obrazowania przestrzennej struktury próbki. Poważną wadą jest natomiast mała rozdzielczość.

Za pomocą mikroskopu optycznego można rozróżniać szczegóły nie mniejsze niż połowa długości fali świetlnej oświetlającej próbkę. Ograniczenie wynika z dyfrakcji, która uniemożliwia zogniskowanie wiązki światła do punktu. W efekcie gdy użyjemy źródła światła czerwonego o długości fali na przykład 635 nanometrów, w najlepszym przypadku będziemy w stanie zobaczyć szczegóły o rozmiarach około 300 nanometrów.

W 1994 roku Stefan W. Hell z Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie w Göttingen zaproponował teoretyczny sposób przekroczenia ograniczeń dyfrakcyjnych w mikroskopii optycznej za pomocą wygaszania emisją wymuszoną (STimulated Emission Depletion, STED). Pięć lat później zbudował pierwszy superrozdzielczy mikroskop fluorescencyjny STED.

W standardowej fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej wiązka lasera skanuje próbkę biologiczną i lokalnie wzbudza cząsteczki barwnika, wcześniej w odpowiedni sposób wprowadzone do próbki. Po wzbudzeniu cząsteczki te zaczynają emitować światło. Jest ono przepuszczane przez filtr i rejestrowane przez detektor umieszczony za otworem konfokalnym. Rozmiar otworu powoduje, że światło z płaszczyzn poza ogniskiem obiektywu zostaje usunięte, co zwiększa kontrast obrazu. Sam barwnik dobiera się tak, aby gromadził się we fragmentach żywej komórki budzących zainteresowanie badaczy.

W mikroskopii STED używa się dodatkowej wiązki laserowej – wygaszającej. Wiązka ma taką długość fali, że w oświetlonych nią cząsteczkach barwnika dochodzi do emisji wymuszonej. Cząsteczki, które za pomocą emisji wymuszonej pozbyły się energii, nie są już zdolne do fluorescencji. Zatem ich światło (podobnie jak światło z emisji wymuszonej) nie przedostanie się przez filtr przed detektorem i nie będą widoczne na rejestrowanym obrazie.

Istota metody STED polega na tym, że wiązka wygaszająca przypomina w przekroju obwarzanek – w środku jest wytłumiona. Jeśli tak ukształtowana wiązka zostanie odpowiednio zgrana w czasie i przestrzeni z wiązką oświetlającą, fluorescencja będzie zachodzić przede wszystkim w tym obszarze próbki, który znajduje się w centrum wiązki wygaszającej.

„Dzięki drugiej wiązce obszar próbki, świecący wskutek fluorescencji, jest wyraźnie mniejszy od średnicy wiązek laserowych. Mamy taki efekt, jakbyśmy lepiej zogniskowali wiązkę oświetlającą, co oznacza, że możemy skanować próbkę z większą rozdzielczością”, wyjaśnia Joanna Oracz i dodaje, że gdy rok temu rozpoczynała pracę nad swoim urządzeniem, w Polsce działał tylko jeden mikroskop typu STED, zakupiony za półtora miliona euro.

Do budowy mikroskopu konfokalnego z układem STED na Wydziale Fizyki UW wykorzystano komercyjnie dostępne elementy. Największym problemem okazało się zapewnienie przekrywania się obu wiązek laserowych. „Aby zaobserwować efekt STED, obie wiązki muszą być idealnie współliniowe – minimum wiązki wygaszającej musi się dokładnie pokrywać z centrum wiązki wzbudzającej”, mówi Oracz.

Prototypowy mikroskop na FUW ma rozdzielczość ok. 100 nm, ponaddwukrotnie lepszą od standardowego mikroskopu konfokalnego. Prace nad zwiększeniem rozdzielczości wciąż trwają. „Zaletą naszego mikroskopu jest możliwość kontrolowania wszystkich parametrów i badania fizyki zachodzących zjawisk optycznych”, podkreśla Oracz, obecnie doktorantka w Laboratorium Procesów Ultraszybkich Instytutu Fizyki Doświadczalnej FUW. Celem jest osiągnięcie rozdzielczości ok. 60 nm. Pozwoliłaby ona obserwować tak drobne szczegóły, jak kolce dendrytyczne neuronów.

„Skonstruowanie tak wyrafinowanego przyrządu nie byłoby możliwe bez współpracy z innymi instytucjami naukowymi”, podkreśla prof. dr hab. Czesław Radzewicz, kierownik Laboratorium Procesów Ultraszybkich Instytutu Fizyki Doświadczalnej FUW. Podczas prac skorzystano m.in. z doświadczeń zgromadzonych przy budowie mikroskopu konfokalnego w Centrum Laserowym Instytutu Chemii Fizycznej PAN i Wydziału Fizyki UW. Barwienie próbek do testów przeprowadzał Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego.