

OPTIKAI POINTILLIZMUS: A LOKALIZÁCIÓS OPTIKAI MIKROSKÓPIA

Erdélyi Miklós, Sinkó József

Szegedi Tudományegyetem, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Az optikai mikroszkópok hamar a tudományos megismerés egyik legfontosabb eszközévé váltak, hiszen a korábban szabad szemmel vizsgált élő vagy élettelen minták felnagyított képének tanulmányozásával a tudósok közelebb kerültek a természeti jelenségek mögött rejlő törvényszerűségek megértéséhez. Ez a folyamatos alkalmazásorientáltság a mikroszkópok egyik legfontosabb paramétere, a nagyítás növelésére sarkallta a fejlesztőket. Az egyre finomabb struktúrák feloldásával újabb és újabb mikrovilágok – napjainkban már nanovilágok – tárulnak fel az ember szeme előtt. Az idők során a mikroszkópia számos részterülete alakult ki, amely igen széles tudományággá nőtte ki magát. Jelen cikkünkben egy viszonylag új (2006-ban publikált), az optikai tartományban működő fluoreszcens mikroszkópiai eljárást mutatunk be, amellyel nanoszkopikus struktúrák feltérképezése vált lehetővé.

A térbeli feloldás fogalma

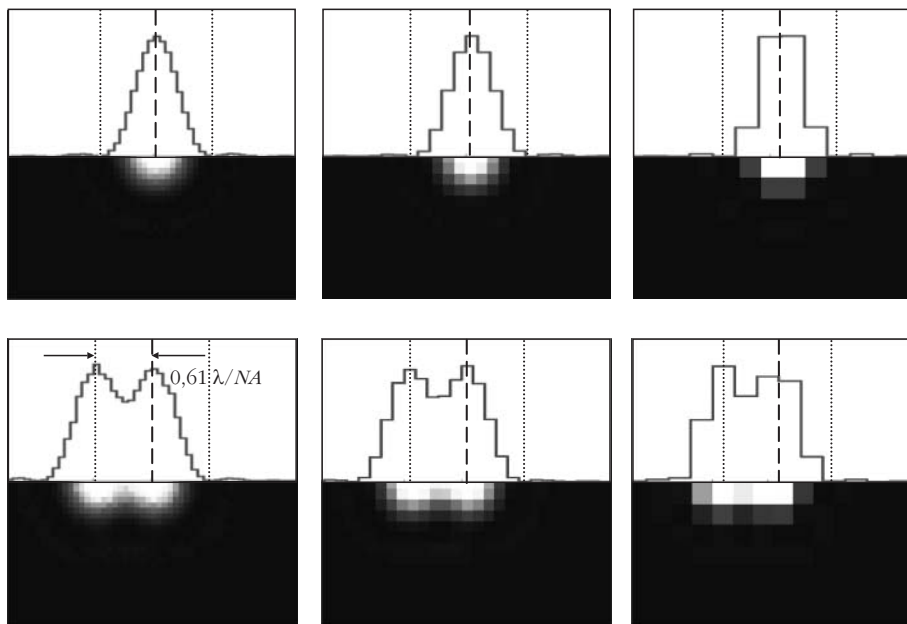
Az optikai mikroszkópiában alapvető kérdés, hogy a nagyítást meddig lehet növelni, illetve a térbeli feloldásnak van-e elméleti határa?

A Wikipedia, korunk „Galaxis útikalauza” *Mikroszkóp* címszava alatt a következőket olvashatjuk: „A fénymikroszkópok fénytörő lencsákat alkalmaznak, melyek gyakran üvegből, néha műanyagból készülnek. Ezek segítségével irányítják a fényt a szembe, vagy más fényérzékenybe. A fénymikroszkóp nagyítása legtöbbször maximum 1500-szoros, elméleti felbontóképességük 0,2 mikrométer. Speciális technikákkal (úgy, mint a konfokális pásztázó mikroszkóp) képesek vagyunk át-

lépni ezt a nagyításhatárt, de a diffrakció miatt a felbontás nem növelhető minden határon túl.”

Elméleti felbontóképesség alatt általában a bevezető optika kurzusokon megtanult Rayleigh-féle feloldási küszöböt szokás érteni, ami a fény hullámtermészetét bizonyító elhajlási jelenségen (diffrakción) alapszik és a leképező eszközök feloldását csupán egyetlen számmal jellemzi. Ennek alapján két pontforrást akkor tekintünk megkülönböztethetőnek, ha az egyik diffrakciós képének központi maximuma egybeesik a másik pontforrás diffrakciós képének első minimumával. Ha a két pontforrás (például két fluoreszcens molekula) ennél közelebb van, akkor a két objektum nem különböztethető meg, a leképező rendszer egy pontforrásnak tekinti őket. Ez a látható tartományban működő hagyományos fluoreszcens mikroszkópoknál körülbelül 200 nm-es határt jelent. A Rayleigh-féle feloldási küszöb egy könnyen érthető jósági tényező, nem csoda tehát, hogy az optikai leképező eszközök jellemzésére széles körben elterjedt. Alkalmazhatósága azonban több esetben megkérdőjelezhető. Nem használható például a fotonszámtól és a detektor pixelméretétől függő egy-molekula mikroszkópiában. Ennek oka, hogy a heurisztikus Rayleigh-kritérium – ami abban a korban fejlődött ki, amikor az emberi szem jelentette a legjobb detektort – nem veszi figyelembe például a detektált fotonok számát, vagy a detektor térbeli méreteit, pixelnagyságát.

1. ábra. Rayleigh-féle feloldóképesség szemléltetése két pontforrással különböző pixelméretű (feloldási határ/10, feloldási határ/5 és feloldási határ/2,5) esetén.



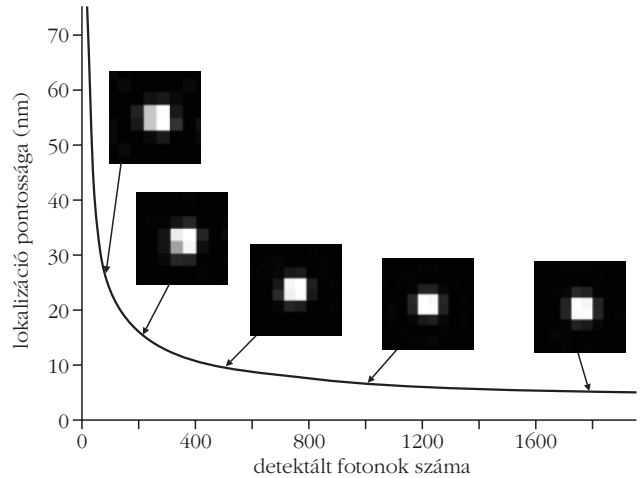
Sinkó József publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergenciaprogram című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatásokat a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj és a Marie Curie Integrációs (618273) pályázat támogatásával végeztük.

Vizsgáljuk meg, hogyan alkalmazható a Rayleigh-féle feloldás a nagyítás függvényében, azaz változtassuk meg a diffrakciós kép és a kamera pixelméretének arányát. Az 1. ábra felső sorában egyetlen pontszerű forrás elhajlási képe látható különböző pixelméretnek esetén. A második sorban két, egymástól pontosan a Rayleigh-kritérium által meghatározott távolságban ($0,61 \lambda/NA$, ahol λ a hullámhossz és NA a numerikus apertúra) levő világító pontforrás képe látható különböző pixelméretnek esetén. Ennél közelebb elhelyezkedő pontforrásokat a leképező rendszer már nem képes feloldani.

Nagyobb pixelméret mellett az elhajlási kép egyre kevésbé rajzolódik ki, a gyűrűs szerkezet és így az első minimum helye nem határozható meg. Ezért logikus lenne minél kisebb pixelméreteket használni, azaz csökkenteni a nagyítást. Egy-molekula detektálás esetén azonban figyelembe kell venni a detektálható fotonok számát is. Kis pixelérték esetén az egyes pixelekre eső fotonok száma igen alacsony lehet, ami nagymértékben rontja a detektálás jel/zaj viszonyát. Meg kell találni azt a középutat, ahol még felismerhető az elhajlási kép és a fotonszám is elegendő a detektáláshoz. Így érthető, hogy a kritérium nem ültethető át a nagy érzékenységű kamerákon alapuló modern mikroszkópok jellemzésére. A „super-resolution” kifejezéssel jelölt új eljárások csupán az eddig alkalmazott heurisztikus definíciók korlátaira utalnak, de nem kérdőjelezzik meg a fizikai törvények igazságát. A diffrakció a küszöb alatti feloldást elérő rendszereknél is ugyanazon törvényszerűségek alapján számítható, csak a feloldás definícióját változtatjuk meg. Egy-egy molekula képe minden esetben a diffrakció által leírt elhajlási kép lesz, ám a Rayleigh-limit alatti térbeli információk egy-egy ötletes trükkkel kinyerhetők.

Nagyfeloldású mikroszkópiai technikák

Az optikai mikroszkópia területén jelenleg három nagyfeloldású módszer áll a fejlesztések homlokterében. A STED (*ST*imulated *E*mission *D*epletion) mikroszkópia [1] egy pásztázó eljárás. A gerjesztő nyaláb fókuszpontjában (korong alakú terület) a fluoreszcens festékek gerjesztett állapotba kerülnek. A gerjesztést követően egy második, nagyobb hullámhosszú és gyűrű alakú, úgynevezett STED-nyalábbal a gerjesztett korong szélén lévő molekulákat kényszerített emisszióval alapállapotba visszük vissza. Ennek következtében a molekulák csak a fókuszpont közepén lévő (a gyűrűs nyaláb kontrasztjától függő) kis tartományban maradnak aktív állapotban. Ezzel a módszerrel a gerjesztett térfogat laterális mérete 50 nm alá csökkenthető. A SIM (*Structured Illumination Microscopy*) mikroszkópia [2] a Moiré-jelenségen alapszik. A mintát egy térben szinuszosan modulált nyalábban szekvenciálisan – általában három orientációval és irányonként három fázissal – gerjesztik. A detektált 2D képek Fourier-kiértékelése során egy, az eredeti feloldásnál kétszer nagyobb feloldású képet lehet



2. ábra. A lokalizációs pontosság fotonszámfüggése.

rekonstruálni. Ez a feloldási küszöb a módszer nemlineáris kiterjesztésével tovább növelhető [3]. A módszer alkalmas valós idejű, élő sejt mérésre is. A harmadik módszer a *lokalizációs elven működő eljárásokat* [4] foglalja magába, és a továbbiakban ezt a módszert tárgyaljuk részletesen.

A lokalizációs mikroszkópia alapjai

A hagyományos fluoreszcenciás technikák esetén a gerjesztett tartományban elhelyezkedő molekulák mindegyike aktív állapotban van, azaz gerjeszthető. A lokalizációs mikroszkópia során fotokémiai folyamatok révén érjük el azt, hogy a képmezőben egy időben csak kevés számú molekulát aktiválunk, azaz hagyunk aktív állapotban, így az egyes molekulák diffrakciós foltjainak leképezését időben szétválasztjuk. Itt a kevés azt jelenti, hogy a molekulák diffrakciós mintázatai ne fedjenek át, az aktív molekulák képei jól elkülöníthetően detektálhatók legyenek (aktív molekulák távolsága $> 3 \times$ Rayleigh-távolság). Ebben az esetben az elhajlási kép maximuma, vagyis a molekula helye egyszerű illesztéssel meghatározható, a molekula lokalizálható. A lokalizáció pontossága függ a detektált fotonok számától, hiszen nagyobb fotonszám pontosabb illesztést biztosít. Részletes számításokkal megmutatható, hogy a lokalizáció pontossága

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8 \pi s^4 b^2}{a^2 N^2}$$

képlettel adható meg [5], ahol s az elhajlási kép standard deviációja (Gauss-eloszlást feltételezve), a a CCD pixelmérete, N a detektált fotonszám és b a zaj. Három következményre érdemes külön felhívni a figyelmet: (i) a fotonszámfüggésre, (ii) az optimális pixelméretre és a (iii) zaj szerepére. Zaj nélkül a lokalizáció pontosságának fotonszámfüggését a 2. ábra mutatja. A pixelméret 130 nm volt, a standard deviáció 208 nm, a zaj 0,7, a detektált fotonok száma pedig 20 és 2000 között változott.

Látszik, hogy <10 nm lokalizációs pontosság eléréséhez ~ 500 db foton detektálására van szükség. Nem meglepő, hogy a lokalizációs pontosság függ a pixelmérettől. A pontos számolások azt mutatják, hogy a lokalizációs pontosság akkor maximális, ha a diffrakciós korong standard deviációja megegyezik a detektor pixelméretével. Ez az eredmény meglepő lehet, de az optimum létezését könnyű belátni, ha meggondoljuk a két szélső esetet, mint ahogy az 1. ábra esetén tettük. Ha konstans fotonszám mellett nagyon megnöveljük a nagyítást, azaz sok pixelen oszlanak el az emittált fotonok, akkor egy pixelre kevés foton jut. Következésképpen romlik a jel/zaj viszony és ezzel együtt a lokalizációs pontosság. Másrészt extrém kicsi nagyítás mellett az összes foton egy pixelre fog jutni, ami lehetetlenné teszi az illesztést. A pixelméret optimalizációjának egy másik következménye, hogy a lokalizációs mikroszkópban nincs mód az elhajlási kép alakjának pontos vizsgálatára, hiszen az eloszlásfüggvény erősen alulmintavételezett, tipikusan csupán egy 5×5 pixel területen oszlik el. A lokalizációs pontosságot befolyásoló harmadik tényező a képet terhelő zajszint. Ennek csökkentése érdekében általában TIRF (teljes visszaverődésen alapuló) gerjesztési módot alkalmaznak, amelynél a mintát csak egy vékony rétegben gerjesztik, ezzel csökkentve a fluoreszcens háttérjelet.

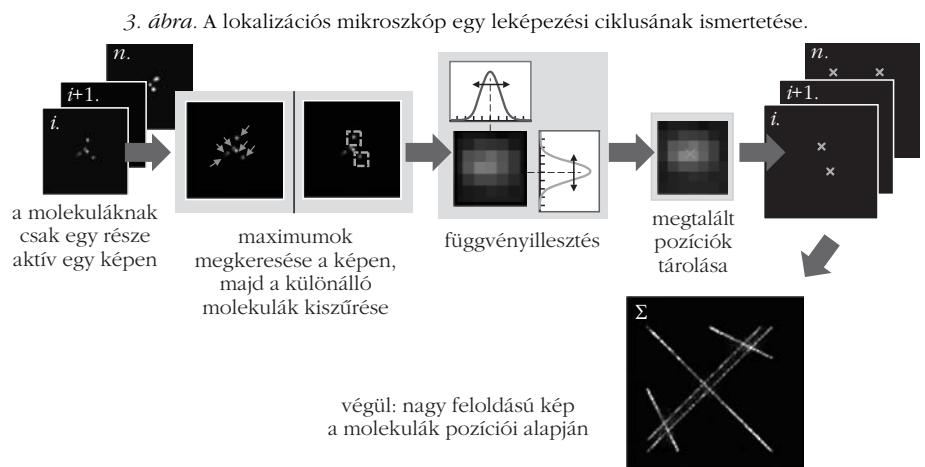
Mivel egy kép felvétele csak véges számú (a látótérrel függő, de tipikusan <50) molekula lokalizációját teszi lehetővé, egy összetett kép rekonstruálásához több ezer, esetleg több tízezer kép felvételére van szükség, ami az adatgyűjtés idejét jelentősen, gyakran >10 perc időtartamra növeli. Ezért fontos, hogy a minta ne mozduljon el az adatgyűjtés során, illetve, ha elmozdul, akkor ismerjük az elmozdulás nagyságát. A gyakorlatban ezt folyamatosan világító, úgynevezett markerek (fluoreszcens gömbök, arany nano-gömbök stb.) segítségével követhetjük nyomon.

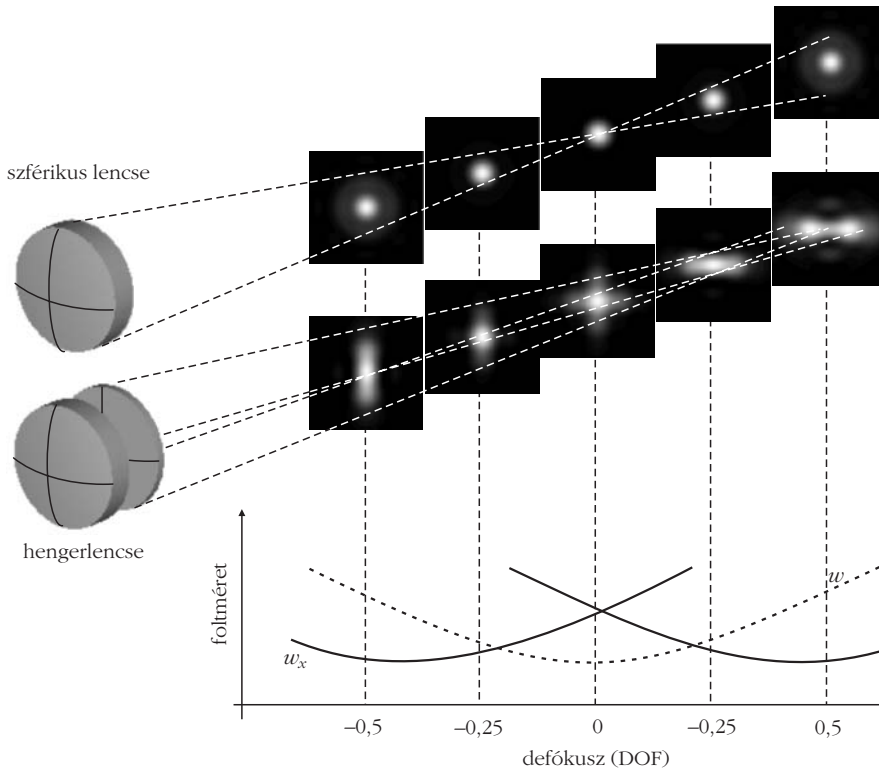
A lokalizációs mikroszkóp egy leképezési ciklusát láthatjuk a 3. ábrán. Mint már említettük, egy olyan képcsoomag áll rendelkezésünkre, amelynek egyes képein csupán néhány, de mindig más molekula képeződött le. A képeket külön dolgozzuk fel: megkeresük a maximumokat, majd kiválogatjuk azokat, amelyekhez tartozó molekulák képei nem fednek át egymással. Ezt követően történik az illesztés, a maximum helyének megkeresése, vagyis a lokalizáció. A pozíciók koordinátáit tároljuk, majd az összes kép feldolgozását követően egy térképet készítünk, összeadjuk a kapott pozíciókat. Végeredményül egy nagy feloldású képet kapunk a molekulák elhelyezkedéséről.

A lokalizációs mikroszkópia kulcsa a festékmolekulák időbeli kapcsolása. Ennek megvalósítási módja szerint beszél-

hetünk fotoaktivációs lokalizációs (PALM), sztochasztikus optikai rekonstrukciós (STORM), illetve direkt STORM (dSTORM) módszerekről. A PALM eljárásban fotoaktiválható fluoreszcens fehérjéket használunk. Egyik példa a PaGFP, amely alapállapotban nem fluoreszkál, de 400 nm-es megvilágítás hatására konformáció-változást szenved és aktív, azaz fluoreszcens állapotba kerül. Ezeket az aktív molekulákat egy 488 nm-en folytonosan működő, kiolvasó lézerral ismételtelen fluoreszcenciára készítjük úgy, hogy irreverzibilis bomlásuk (bleach) előtt a mikroszkóprendszer a lehető legtöbb foton gyűjtse össze. Az aktivált molekulák kiolvasása és bleach-elődése után a 400 nm lézert újabb használatával új, eddig passzív molekulákat aktiválunk és lokalizálunk. A folyamat lépéseit sokszor megismételve rekonstruálhatjuk a minta képét. A PALM eljárás előnye, hogy a célfehérjét transzfekció útján direkt módon jelölhetjük meg, azaz a jelölés nagyon specifikus. A módszer alkalmas élő sejttes leképezésre, illetve molekulák mozgásának (diffúziójának stb.) követésére. A fluoreszcens fehérjék azonban gyenge emitterek, kevés foton bocsátanak ki, korlátozva ezzel a lokalizációs pontosságát. A STORM módszerekben szerves festékeket alkalmaznak (Alexa, ATTO stb.), amelyek jóval fényesebbek, azaz időegység alatt több foton bocsátanak ki, és ezáltal növelik a lokalizációs pontosságot. A festékek alkalmazása azonban két probléma megoldását is szükségessé teszi: a célmolekulák specifikus jelölését, vagyis az optimális festési sűrűség beállítását, valamint a festékek aktiválásának, azaz a villogás dinamikájának időbeli kontrollját. Ez utóbbit egy pufferyoldék segítségével érik el, amelynek szerepe kettős. Egyrészt oxigént köt meg – tipikusan enzimátikus úton – csökkentve a festék nagy lézerteljesítmény okozta kifakulását, másrészt biztosítja, hogy a triplet állapot kiürítésén keresztül a festék egy hosszú élettartamú, sötét állapotba kerüljön [6]. A mérés során a mintát tartalmazó küvetát gyakran légmentesen le is kell zárni.

Eddigiekben a lokalizációs mikroszkópok kétdimenziós képalkotásának elvét ismertettük. Felmerül a kérdés, hogy a harmadik, axiális kiterjedésben is elérhető-e hasonló diffrakciós küszöb alatti feloldás. Az elmúlt években számos megoldás született az axiális

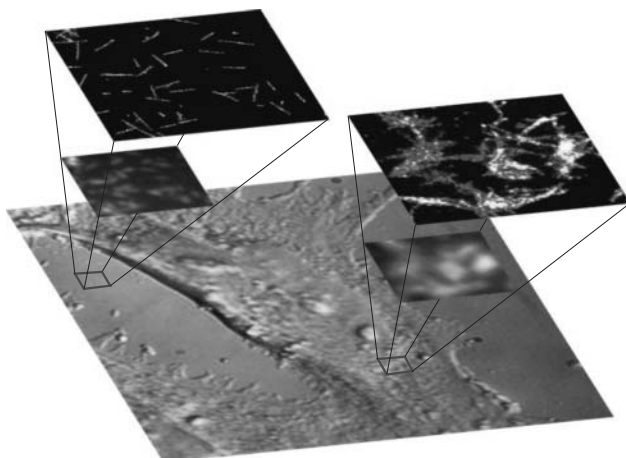




4. ábra. Az asztigmás háromdimenziós leképezés elve.

feloldás növelésére, amelyek közül a legelterjedtebb az úgynevezett asztigmás eljárás. Hasonló módszert használnak a CD-lejátszóknál a lemez pozicionálására. Ennek során egy hengerlencse segítségével egy gyenge asztigmatizmust vezetünk be a detektorokba, ami a fókuszfoltot elliptikussá teszi (4. ábra). A molekula axiális pozíciójától függően (defókusz) változik az ellipszis orientációja, két főtengelyének aránya. Ebben az esetben tehát az illesztéskor a maximum helyének meghatározása mellett a félérték szélességek (w_x és w_y , a 4. ábrán) is információt hordoznak. A rendszer pontos kalibrálást igényel, ami után a molekula axiális pozíciója 50 nm pontossággal meghatározható. Fontos megemlíteni, hogy az axiális tartományt, amelyen belül ez a

5. ábra. Festett amyloid-beta szálak sejten kívül (bal oldali kép) és sejten belül (jobb oldali kép). A dSTORM képek alatt a hagyományos diffrakció limitált fluoreszcens képek látszanak.



pontosság elérhető, a rendszer mélységélessége ($\text{DOF} \approx 600 \text{ nm}$), míg TIRF gerjesztés esetén az evanescens tér behatolási mélysége ($\approx 150 \text{ nm}$) limitálja. Azaz a lokalizációs mikroszkópokkal felvett 3D képek képtere axiális irányban jelentősen kisebb, mint laterális irányban. Valódi 3D felvételhez a minta pásztázására és az így kapott egyes képek pontos összeillesztésére, regisztrációjára van szükség.

Alkalmazási lehetőségek, kitekintés

A lokalizációs elven működő mikroszkópok 2006-os megjelenésük óta intenzív fejlesztés alatt állnak. Jelenleg az optikai mikroszkópia egyik legdinamikusabban fejlődő irányát jelentik, de mint általában minden új módszernek, ennek is bizonyítania kell alkalmazhatóságát és előnyeit a többi technikához képest.

A lokalizációs mikroszkópia – a potenciális 10 nm alatti térbeli feloldással – a közeljövőben a molekuláris szintű mechanizmusokat vizsgáló kutatók egyik fontos eszközévé válhat (5. ábra). A módszert elsősorban biológiai kutatásokra fejlesztették ki részben az – összetett minta-előkészítést igénylő – elektronmikroszkópia kiváltására. A térbeli feloldás ugyan nem éri el az elektronmikroszkópokét, de az optikai módszer számtalan előnye miatt várhatóan széles körben el fog terjedni. E cél eléréséhez még számos problémát kell megoldani, amelyek közül a legfontosabbak a (i) a mérési idő csökkentése, (ii) többszínű és (iii) axiális irányban is kiterjedtebb képterű 3D leképezés fejlesztése, illetve (iv) élő sejt mérések.

Irodalom

1. S. W. Hell, J. Wichmann: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19/11 (1994) 780–782.
2. M. G. L. Gustafsson: Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* 198 (2000) 82–87.
3. M. G. L. Gustafsson: Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102/37 (2005) 13081–13086.
4. S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer: Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocol* 6/7 (2011) 991–1009.
5. R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb: Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* 82/5 (2002) 2775–2783.
6. S. van de Linde, M. Sauer: How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. *Cem. Soc. Rev.* DOI: 10.1039/c3cs60195a (2013).