

WOJCIECH BRUTKOWSKI

*Pracownia Obrazowania Struktur i Funkcji Tkankowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: w.brutkowski@nencki.gov.pl*

MIKROSKOPIA KONFOKALNA A MIKROSKOPIA SZEROKIEGO POLA – DWA PODEJŚCIA DO BADAŃ PRZYŻYCIOWYCH

WSTĘP

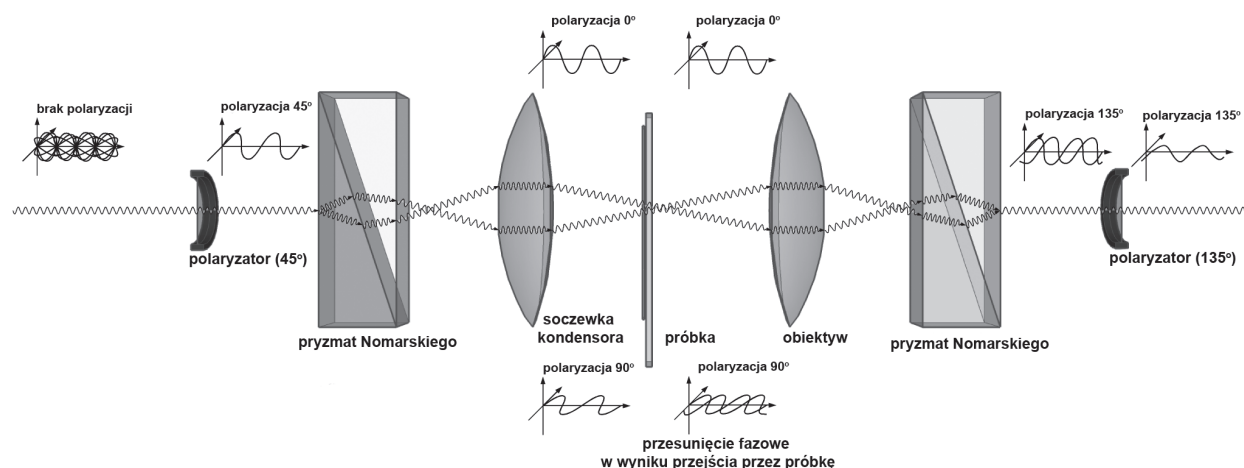
Rozwój mikroskopii jest ściśle związany z rozwojem biologii i medycyny. Mikroskopy pozwoliły zwiększyć rozdzielczość obserwowanego obrazu, czyli zdolność rozróżniania dwóch niewielkich, blisko siebie położonych obiektów, jako pojedyncze. Umożliwiły też zwiększenie kontrastu (poprzez zastosowanie znaczników fluorescencyjnych), dzięki czemu możliwe stało się wykrywanie różnych regionów badanej próbki na podstawie intensywności fluorescencji lub koloru. Jednak przede wszystkim, mikroskopy pozwoliły na obserwację małych obiektów w dużym powiększeniu nawet do 1000x. Ludzkie oko

jest w stanie rozróżniać obiekty rzędu 0,1 mm, natomiast w mikroskopie świetlnym możliwa jest obserwacja obiektów o wielkości ok. 200 nm w płaszczyźnie poziomej, a obecnie wraz z rozwojem mikroskopii wysokiej rozdzielczości obserwuje się obiekty rzędu 50-20 nm (CEBECAUER i współaut. 2012). Ponieważ komórki oraz ich komponenty są z reguły bardzo małe (typowa komórka ma rozmiar 20-30 μm , a przykładowe organelle komórkowe takie jak mitochondria ok. 2-5 μm), badacze potrzebują mikroskopów, które zapewnią im odpowiednią rozdzielczość, kontrast oraz powiększenie.

MIKROSKOPIA W ŚWIETLE PRZECHODZĄCYM

Do obserwacji obiektów w badaniach biologicznych lub medycznych często korzysta się z podstawowej mikroskopii świetlnej wykorzystującej światło białe. Najbardziej podstawową techniką mikroskopii w świetle przechodzącym jest jasne pole (ang. bright-field), która polega na oświetleniu preparatu wiązką uformowanego światła. Obserwowany obraz tworzy się dzięki różnicy w pochłanianiu światła oświetlającego przez elementy preparatu. Ze względu na to, że większość komórek, jak i ich organelli jest przezroczysta i bezbarwna, istotnym problemem w tej technice jest zaobserwowanie niewielkich różnic w kontraście poszczególnych elementów. Możliwość rozróżnienia takich elementów wiąże się z kolei z koniecznością ograni-

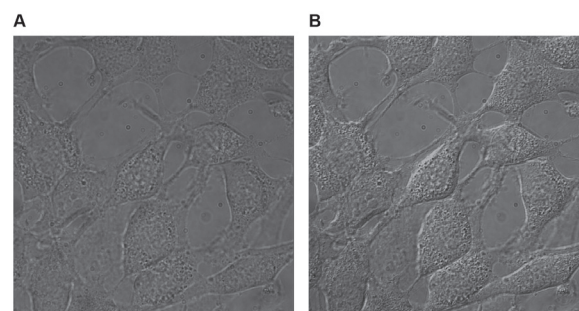
czenia stosowanego powiększenia. Problem ten jest jeszcze większy w przypadku preparatów tkankowych, gdzie różnice w stopniu absorpcji światła są na tyle małe, że prawie całkowicie uniemożliwiają szczegółową obserwację. W 1934 r. duński fizyk Frits Zernike znalazł rozwiązanie problemu niskiego kontrastu występującego przy obserwacji żywych komórek, poprzez zastosowanie skonstruowanego przez siebie mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym. Mikroskop ten wykorzystywał różnice we współczynnikach załamania światła w badanym obiekcie, co skutkowało pojawieniem się fal różniących się przesunięciem fazowym. Obraz powstawał poprzez nałożenie na siebie dwóch wiązek światła, jednej, pochodzącej bezpośred-



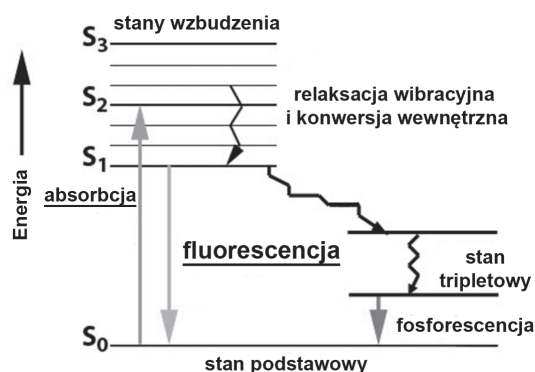
Ryc. 1. Schemat przedstawiający zasadę obrazowania preparatu przy zastosowaniu metody kontrastu interferencyjno-różniczkowego (<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/334873>).

nio z oświetlacza, i drugiej, która przeszła przez badany obiekt. Za możliwość obserwacji próbek biologicznych w kontraście fazowym Frits Zernike dostał w 1953 r. nagrodę Nobla, a technika ta zaczęła być szeroko wykorzystywana przez badaczy wszędzie tam, gdzie poszczególne elementy preparatu nie różnią się właściwościami absorpcyjnymi, a tylko współczynnikami załamania światła bądź swoją grubością. Kolejnym krokiem w udoskonalaniu obserwacji żywych komórek przy wykorzystaniu mikroskopu ze światłem przechodzącym było wynalezienie przez Grzegorza Nomarskiego kontrastu interferencyjno-różniczkowego (ang. differential interference contrast, DIC). W technice tej wykorzystuje się polaryzator oraz, umieszczone za nim, dwa pryzmaty Nomarskiego specjalnej konstrukcji (zmodyfikowane pryzmaty Wollastona). Pryzmat Nomarskiego ma budowę prostokątnej kostki złożonej z dwóch trójkątnych pryzmatów sklejonych ze sobą, które rozdzielają wiązkę światła na dwa spolaryzowane promienie, rozchodzące się względem siebie pod pewnym kątem. Światło przechodzi przez pryzmat dwukrotnie, wobec czego spełnia on równocześnie rolę kondensora. Obraz powstaje poprzez nałożenie na siebie dwóch wiązek spolaryzowanego światła przechodzącego przez pryzmaty, w wyniku czego uzyskujemy oświetlenie preparatu przez wiązkę normalną oraz przesuniętą o 90° (Ryc. 1). Jeżeli w badanym obiekcie znajdują się obszary zdolne do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego liniowo, to interferencja wiązki penetrującej z wiązką odniesienia pozwoli na uwidocznienie tych obszarów w mikroskopie (ALLEN i współ-

aut. 1969). Zdolność do skręcania płaszczyzny światła mają związki chiralne, takie jak białka, polisacharydy czy kwasy nukleinowe. Kontrast Nomarskiego pozwala na uzyskanie quasi-przestrzennego obrazu i jest bardzo często wykorzystywany w badaniach przy-
czystościowych migracji czy proliferacji różnego typu komórek, słabo widocznych w technice jasnego pola. Porównanie obrazów komórek uzyskanych w obu technikach przedstawia Ryc. 2. Udoskonalenie technik z wykorzystaniem światła przechodzącego otworzyło nową drogę do badań z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego i znacznie poprawiło jakość uzyskiwanego obrazu. Jednak nadal pracowano nad możliwością powiększenia ilości obserwowanych detali oraz poprawą kontrastu oglądanych obiektów. Rozwiązaniem tego problemu stało się wprowadzenie i zastosowanie w badaniach mikroskopowych fluorescencji. Zjawisko fluorescencji było intensywnie badane już na przełomie XVIII i



Ryc. 2. Porównanie obrazów fibroblastów wykonanych metodą jasnego pola (A) oraz techniką kontrastu interferencyjno-różniczkowego (B).



Ryc. 3. Diagram Jabłońskiego.

W wyniku absorpcji światła cząsteczka barwnika fluorescencyjnego przechodzi ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego (S_2). Na skutek oddziaływania z innymi cząsteczkami, wzbudzona cząsteczka oddaje część energii do otoczenia, w sposób bezpromienisty (brak emisji fotonu). Następnie wraca z najniższego poziomu oscylacyjnego (S_1) na poziom podstawowy (S_0) oddając energię w postaci fotonu światła.

XIX w., kiedy zauważono, że niektóre barwniki mają zdolność wybiórczego wiązania się z wybranymi składnikami komórek, takimi jak kwasy nukleinowe, lipidy czy białka. Termin fluorescencja został po raz pierwszy użyty przez Sir George'a Gabriela Stokesa, który w 1843 r. opisał zjawisko luminescencji w chlorku wapnia jako fluorescencję. Jako źródło światła wzbudzającego Stokes użył światła słonecznego przepuszczonego przez filtr zawierający roztwór wodorotlenku miedzi w wodnym roztworze amoniaku. Po zogniskowaniu się na preparacie nastąpiła emisja światła, które wraz ze światłem wzbudzającym zostało przepuszczone przez żółty filtr zawierający wodny roztwór dwuchromianu

potasu. Całe zjawisko było obserwowane przez Georga Stokesa gołym okiem (STOKES 1852). Jego obserwacje stały się podstawą do zbudowania w 1910 r. przez Heinricha Lehmana pierwszego epi-fluorescencyjnego mikroskopu, w którym obiektyw pełnił rolę kondensora, a wzbudzenie próbki falą świetlną, jak i obserwacja fali emisji, zachodziło z tej samej strony próbki (światło dwukrotnie przechodziło przez obiektyw, najpierw jako światło wzbudzenia, a następnie z powrotem jako światło emisji). Dopiero taki sposób obserwacji preparatu, stosowany również powszechnie obecnie, umożliwił wykorzystanie mikroskopu fluorescencyjnego do badań biologicznych. Samo zjawisko fluorescencji zostało w pełni opisane dopiero w 1935 r. przez Aleksandra Jabłońskiego. Stworzył on diagram ilustrujący proces absorpcji światła przez cząsteczkę barwnika fluorescencyjnego, a następnie emisję fluorescencji podczas przejścia cząsteczki ze stanu wzbudzonego na poziom podstawowy (Ryc. 3). Rozwój mikroskopii fluorescencyjnej spowodował ogromny postęp technologiczny w budowie samego mikroskopu, jak również technik fluorescencyjnych. Dzięki nim możliwe stało się bardzo dokładne i specyficzne obrazowanie pojedynczych struktur lub białek w komórkach czy tkankach, jak również badanie interakcji pomiędzy białkami, oraz śledzenie przemieszczania się pojedynczych molekuł. Obecnie dzięki coraz doskonalszym mikroskopom oraz ciągle rosnącej ilości dostępnych znaczników fluorescencyjnych uzyskuje się coraz bardziej precyzyjne dane. Metody fluorescencyjne dzięki swojemu potencjałowi oraz łatwości stosowania mogą wspomagać lub zastępować inne dotychczas stosowane techniki badawcze, takie jak np. znakowania izotopowe (KANNO i współaut. 2012).

FUNKCYJONALNA I MORFOLOGICZNA INFORMACJA W TRZECH WYMIARACH

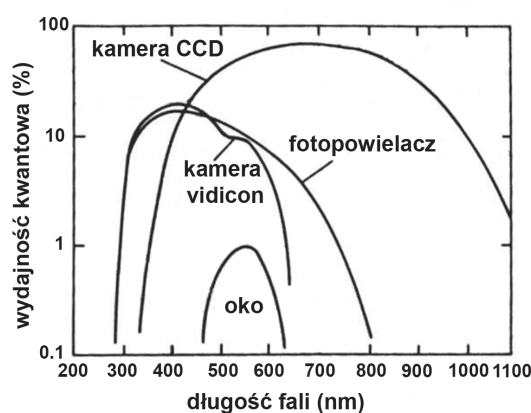
FLUORESCENCYJNE BADANIA PRZYŻYCIOWE W „KLASYCZNYM” MIKROSKOPIE SZEROKIEGO POLA

W dużym uproszczeniu mikroskopy fluorescencyjne można podzielić na dwa typy: szerokiego pola oraz konfokalne. Oba typy mikroskopów pozwalają na uzyskanie szczegółowych przestrzennych informacji morfologicznych lub funkcjonalnych o badanych preparatach i mogą być w nich stosowane takie same znaczniki fluorescencyjne. Również generalna zasada wzbudzania znacznika fluorescencyjnego odpowiednim źródłem

światła i detekcja jego emisji jest taka sama. Jednocześnie, pomiędzy obydwojema typami mikroskopów występują znaczące różnice, nie tylko w budowie i zasadzie działania, ale również w możliwościach wykorzystania ich w różnego typu badaniach, w tym również w badaniach przyżyciowych. W „klasycznym” mikroskopie fluorescencyjnym, inaczej zwanym mikroskopem szerokiego pola, w przeciwieństwie do mikroskopu konfokalnego, całe pole widzenia jest oświetlane, a uzyskany w ten sposób sygnał jest kierowa-

ny do okularu lub do odpowiedniego detektora. We wczesnych latach 80. jako detektor sygnału fluorescencyjnego służył fotopowielacz, który szybko został zastąpiony przez bardzo czułe kamery potrafiące przechwytywać całą przestrzenną informację. Systemy mikroskopów fluorescencyjnych oparte na kamerach znalazły szerokie zastosowanie w wielu aplikacjach biologicznych. Jeżeli model eksperymentalny nie jest bardzo skomplikowany, wykorzystuje się pojedynczą warstwę komórek oraz interesuje nas ogólna przestrzenna lokalizacja różnych elementów w dużym polu widzenia (bardziej niż wewnątrzkomórkowa lokalizacja na poziomie indywidualnych organelli), to mikroskopia szerokiego pola może być użytecznym narzędziem doświadczalnym z wieloma zaletami. Po pierwsze, wymaga ona bardzo podstawowej konfiguracji, takiej jak dobrej jakości mikroskop fluorescencyjny wraz ze źródłem światła, którym najczęściej jest lampa fluorescencyjna, dająca światło w pełnym zakresie widma. System ten musi posiadać również możliwość kontroli długości fali wzbudzenia i emisji oraz być wyposażony w czułą i szybką kamerę CCD. Zestaw taki jest relatywnie tani i łatwo można zaimplementować go do różnych metod obrazowania. Po drugie, w badaniach przyżyciowych, a w szczególności badaniach procesów kinetycznych lub stężenia różnego rodzaju jonów w cytoplazmie, gdzie bardzo istotna jest szybkość zbierania poszczególnych obrazów przy jednoczesnym zachowaniu niskiej fototoksyczności, zastosowanie bardzo czułych detektorów, jakimi są kamery CCD, może dać bardzo dobre rezultaty. Kamery CCD (ang. charge coupled device) składają się z wielu światłoczułych elementów umożliwiających rejestrację oraz odczytanie sygnału elektronicznego proporcjonalnego do ilości padającego na nie światła. Urządzenia te, w stosunku do fotopowielaczy charakteryzują się w zakresie światła widzialnego istotnie wyższą wydajnością kwantową. Określa ona, jaka ilość fotonów padających na detektor CCD zamieniana jest na sygnał wyjściowy, tzn. ile elektronów zostało wybitych z matrycy przy danej ilości padających fotonów. Im wyższa ilość elektronów tym wydajność kwantowa jest większa. Typowa wydajność kwantowa dla nowoczesnych kamer CCD może wynosić nawet ok. 80–90% w szerokim zakresie widma, a w szczególności w świetle czerwonym i podczerwonym, gdzie czułość klasycznych fotopowielaczy znacznie spada. Z drugiej strony,

fotopowielacze charakteryzują się znacznie wyższą wydajnością kwantową w zakresie światła niebieskiego i ultrafioletowego (Ryc. 4) (JOUBERT i SHARMA 2011). Kamery CCD zapewniają również wysoką rozdzielczość i głębię koloru dochodzącą nawet do 16 bitów (65 000 poziomów intensywności), przy zachowaniu niskiego stosunku sygnału do szumu. Jednocześnie, cały obraz z pola widzenia (jedna klatka) jest przechwytywany przez światłoczułą matrycę, w przeciwieństwie do detektorów punktowych wykorzystywanych w mikroskopii konfokalnej, dzięki czemu możliwe jest zbieranie nawet kilkuset klatek na sekundę. Obecnie jest dostępnych komercyjnie wiele różnych typów kamer CCD (EMCCD – electron-multiplying CCD, scientific imaging CCD, ICCD – intensifier CCD), charakteryzujących się różnymi parametrami i mających zastosowania w różnego rodzaju aplikacjach. Gdy zależy nam, na przykład, na wysokiej czułości, niskim poziomie szumu odczytu oraz szybkości, dobrym wyborem może być kamera EMCCD, w której wytworzone przez fotony na matrycy elektrony są dodatkowo powielane przed odczytem. Do wad tego typu kamer należy przede wszystkim nieduży zakres dynamiczny oraz wysokie koszty samego urządzenia. Trzeba też pamiętać, że dobór odpowiedniego rodzaju detektora może mieć kluczowe znaczenie dla przeprowadzanych doświadczeń. Drugim, istotnym elementem umożliwiającym uzyskanie wysokiej szybkości zbierania obrazów jest zastosowanie w mikroskopie fluorescencyjnym zamiast klasycznych kostek filtrowych, kół filtrowych zawierających filtry wzbudzeniowe lub filtry emisyjne. Dzięki nim możli-



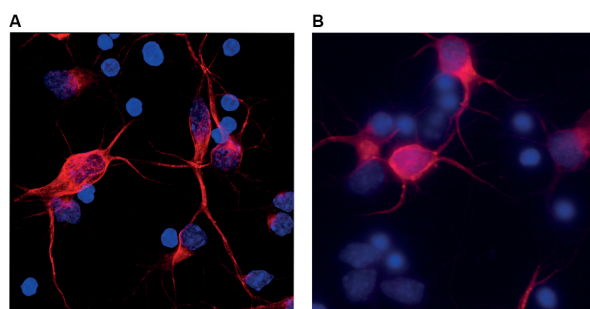
Ryc. 4. Porównanie wydajności kwantowej różnego rodzaju detektorów w szerokim zakresie widma. Wydajność kwantową przedstawiono na skali logarytmicznej. (MCLEAN 1989).

wa jest szybka zmiana pomiędzy dwoma lub więcej długościami fali wzbudzenia lub emisji. Zastosowanie takiego systemu pozwala na przykład przeprowadzać pomiary stężenia jonów z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych, takich jak Fura2-AM, mających dwie długości fali wzbudzenia i jedną emisji, przy zachowaniu bardzo wysokiej szybkości zbierania obrazu (KAMINSKI i współaut. 2012). Klasyczny mikroskop fluorescencyjny szerokiego pola ma wiele zalet zarówno w obrazowaniu utrwalonych próbek jak i badaniach przyżyciowych. Można do nich zaliczyć szerokie pole widzenia, wysoką szybkość zbierania obrazu przy zastosowaniu odpowiednich detektorów, możliwość uzyskiwania jasnych obrazów o wysokiej intensywności fluorescencji oraz relatywnie niską fototoksyczność. Dzięki zastosowaniu komory środowiskowej kontrolującej temperaturę oraz stężenie dwutlenku węgla, doskonale nadaje się do różnego rodzaju długotrwałych (24–72 h) badań przyżyciowych wykorzystujących światło przechodzące, takich jak migracja czy proliferacja. Wydaje się też jednym z najlepszych narzędzi do fluorescencyjnych badań wewnątrzkomórkowego stężenia jonów. Głównym ograniczeniem tego typu mikroskopu jest fakt, że obraz dochodzący do detektora nie pochodzi tylko z płaszczyzny ostrości, ale również spoza niej, ponieważ obiektyw mikroskopu zbiera światło z całego przekroju próbki. Obraz oglądanych obiektów jest ostry i wyraźny tylko w płaszczyźnie ogniskowej, natomiast obrazy obiektów leżących przed i za nią tym bardziej tracą ostrość, im dalej od tej płaszczyzny się znaj-

dują. W wyniku tego uzyskiwany obraz charakteryzuje się wysokim tłem i zmniejszoną ostrością konturów. Dodatkowo stosowane w mikroskopii szerokiego pola filtry emisyjne mogą powodować, że fluorescencja z dwóch różnych zastosowanych znaczników fluorescencyjnych może częściowo na siebie nachodzić, utrudniając prawidłową analizę. Oba te problemy mogą zostać wyeliminowane, gdy do obrazowania wykorzysta się mikroskop konfokalny (Ryc. 5).

FLUORESCENCYJNE BADANIA PRZYŻYCIOWE W MIKROSKOPIE KONFOKALNYM

Za twórcę zasad działania mikroskopu konfokalnego uważa się Marviną Minskiego, który w 1957 r. po raz pierwszy zaprezentował ten typ mikroskopu. Jednak dopiero w 1982 r. firma Carl Zeiss pokazała swój pierwszy komercyjnie dostępny laserowy mikroskop konfokalny (MASTERS 2010). Podstawowym założeniem mikroskopii konfokalnej jest wyeliminowanie obrazów pochodzących spoza płaszczyzny ogniskowej poprzez zastosowanie przesłony konfokalnej (pinhole). Dzięki temu możliwe jest uzyskanie obrazu o wysokiej ostrości i ze znacznie słabszym tłem. Obrazowanie w mikroskopie konfokalnym jest zupełnie odmienne od obrazowania w klasycznym mikroskopie fluorescencyjnym. Jak wcześniej zostało wspomniane, w mikroskopach optycznych oświetlany jest cały obserwowany obiekt i tworzony jednocześnie cały obraz tego obiektu. Jako źródło światła stosuje się w tym przypadku lampę fluorescencyjną. W mikroskopie konfokalnym lampa fluorescencyjna zastąpiona jest przez wiązkę lasera o odpowiedniej długości fali, która skupiana jest na pojedynczym punkcie obserwowanego obiektu. Światło odbite od tego punktu przechodzi przez układ optyczny do detektora. Istotną różnicą w stosunku do mikroskopu fluorescencyjnego jest sposób tworzenia obrazu, powstający metodą punkt po punkcie, dzięki skokowemu przemieszczaniu się wiązki po obiekcie. Dodatkowo, zmieniając położenie przesłony konfokalnej wzdłuż osi optycznej, uzyskuje się zmianę płaszczyzny ogniskowej, co pozwala na uzyskanie szeregu przekrojów badanego obiektu na różnej głębokości. Dzięki tej właściwości możliwe jest tworzenie trójwymiarowego obrazu badanego obiektu. Ze względu na sposób zbierania sygnału w mikroskopie konfokalnym, jako detektory stosuje się niskoszumowe fotopowielacze (ang. photomultiplier tube, PMP) rejestrujące w formie cyfrowej natężenie światła. Czytelnika zainte-



Ryc. 5. Rysunek przedstawia komórki neuronalne, w których jądra komórkowe (kolor niebieski) znakowano DAPI, a α -tubulinę (kolor czerwony) znakowano przeciwciałem przeciwko α -tubulinie, skoniugowanym z fluoroforem Alexa 555. Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu konfokalnego (A) oraz mikroskopu fluorescencyjnego (B).

resowanego szczegółowymi informacjami w zakresie budowy i funkcji mikroskopu konfokalnego odsyłam do artykułu Jarosława Korczyńskiego w tym numerze KOSMOSU. Użytkiwane obrazy w mikroskopie konfokalnym najczęściej charakteryzują się wysoką rozdzielczością oraz kontrastem, jakością znacznie przewyższając te, które można uzyskać w klasycznym mikroskopie szerokiego pola. Pozwala on również na całkowite odseparowanie widm emisji dwóch lub więcej różnych znaczników fluorescencyjnych, umożliwiając obrazowanie tak wyznakowanych preparatów bez niebezpieczeństwa pojawienia się zjawiska nakładania się poszczególnych widm (ang. crosstalk). Wiąże się to jednak z pewnymi ograniczeniami, które zaczynają mieć szczególne znaczenie w przypadku badań przyżyciowych. Pierwszym z napotykanym problemem jest sposób wzbudzania próbki. Jej punktowy charakter i zastosowanie jako źródła światła lasera o relatywnie krótkiej długości fali (standardowo stosowane lasery mają zakresy od 400 do 650 nm.), a co za tym idzie dużej mocy skupionej w jednym punkcie, może powodować wyświecanie badanego preparatu, jak również mieć negatywny wpływ na przeżywalność komórek. W badaniach przyżyciowych, prowadzonych szczególnie przez długi czas, krytyczne znaczenie może mieć zachowanie komórek w dobrej kondycji, ponieważ wszelkie zmiany w ich morfologii niespodziewane warunkami doświadczenia, a tylko uszkodzeniem wynikającym z zastosowanego źródła światła, mogą powodować problemy w interpretacji wyników. Drugim dosyć istotnym problemem, na jaki może natknąć się badacz wykorzystujący mikroskop konfokalny, jest jego szybkość działania. Gdy w przypadku utrwalonych preparatów szybkość zbierania obrazów nie musi mieć istotnego znaczenia, wykonanie doświadczeń wymagających bardzo szybkiego rejestrowania poszczególnych klatek obrazu może być problematyczne. Za zbieranie obrazu w mikroskopie konfokalnym odpowiada skaner przesuwający się z wiązką światła lasera poziomo od góry do dołu punkt po punkcie po klatce obrazu. Powoduje to, że zebranie jednej klatki zajmuje znacznie więcej czasu niż ma to miejsce w klasycznym mikroskopie fluorescencyjnym, gdzie oświetlony obraz jest od razu w całości rejestrowany. Ilustruje to następujący przykład. Gdy zastosujemy jedną z najczęściej wykorzystywanych rozdzielczości obrazu 512×512 pikseli, to w przypadku mikroskopu konfokalnego szybkość zbierania kolejnych klatek nie będzie

większa niż 2–3 obrazy na sekundę. Klasyczny mikroskop fluorescencyjny wyposażony w odpowiednią kamerę CCD jest w stanie zebrać 30 klatek na sekundę lub więcej (PETTY 2007). Oczywiście konstruktorzy mikroskopów konfokalnych zdawali sobie sprawę z jego ograniczeń, szczególnie jeżeli chodziło o szybkość rejestracji obrazów, dlatego też obecnie niektóre mikroskopy wyposażone są w skaner rezonansowy działający z jedną określoną szybkością skanowania (zazwyczaj 8000 Hz w stosunku do standardowych 1600 Hz lub 16000 Hz do 3200 Hz w trybie skanowania dwukierunkowego) bez możliwości jej zmiany (SHEPPARD i KOMPNER 1978). Dzięki zastosowaniu tego elementu możliwy jest ok. 10-krotny wzrost szybkości rejestracji obrazów przy zachowaniu wszystkich parametrów. Jest to już wystarczająca szybkość umożliwiająca pomiary zmian stężenia jonów, ruchu cząsteczek czy przepływu płynów w żywych komórkach. Z drugiej strony, brak możliwości sterowania szybkością skanera powoduje, że wszelkiego typu doświadczenia muszą być rejestrowane tak samo, nawet takie, które nie wymagają tak wysokich szybkości zbierania obrazów. Powoduje to niepotrzebne wielokrotne naświetlania preparatu, co może prowadzić do jego uszkodzenia. Fototoksyczność laserów stosowanych w mikroskopii konfokalnej, szczególnie, gdy mamy do czynienia z wrażliwymi żywymi preparatami, może być częściowo zmniejszona poprzez zastosowanie lasera dwufotonowego. W tego typu konstrukcjach do wzbudzenia fluorochromu stosuje się promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni o energii kwantu równej połowie energii wzbudzenia. Wzbudzenie cząsteczki fluorochromu nastąpi tylko wtedy, gdy cząsteczka zaabsorbuje prawie jednocześnie dwa kwanty promieniowania. (DENK i współaut. 1990) Zastosowanie lasera dwufotonowego ma szereg zalet wynikających ze stosowania wiązki wzbudzenia z zakresu bliskiej podczerwieni. Po pierwsze, wiązka tego lasera niesie znacznie niższą energię niż tradycyjne lasery, co powoduje znacznie mniejsze uszkodzenia fotochemiczne i termiczne badanego obiektu. Dodatkowo, promieniowanie w zakresie podczerwonym znacznie lepiej penetruje preparaty biologiczne niż światło krótkofalowe, co umożliwia pracę ze znacznie grubszyimi obiektami, jednocześnie technika ta charakteryzuje się większą czułością, co pozwala na pracę z niższymi stężeniami fluorochromów.

ZAAWANSOWANE TECHNIKI FLUORESCENCYJNE W BADANIACH PRZYŻYCIOWYCH

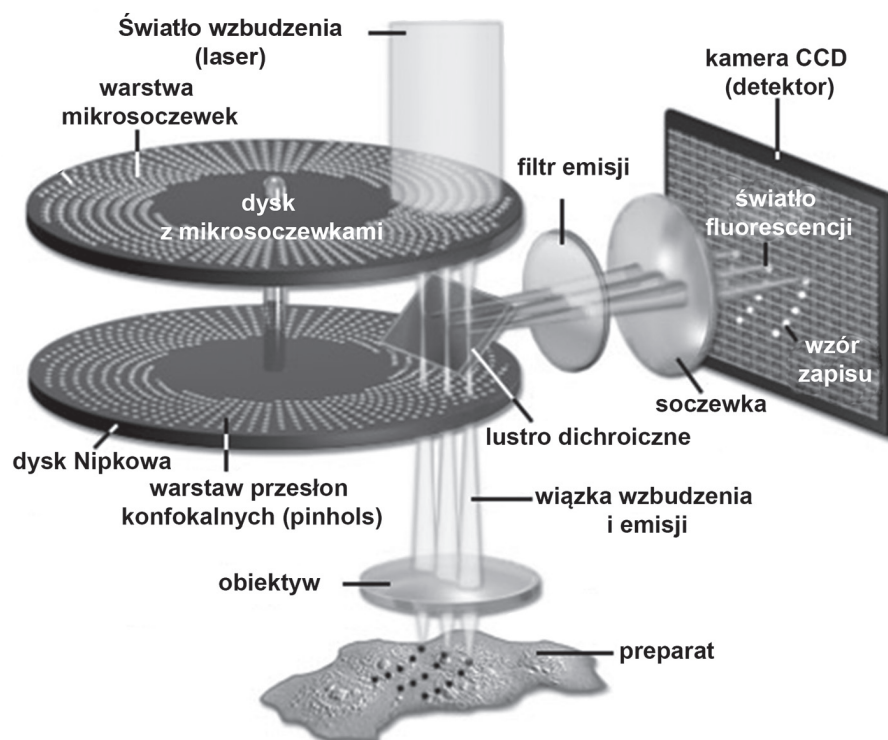
Mikroskopia konfokalna daje nie tylko możliwość wykonywania wysokiej jakości zdjęć w trzech wymiarach, ale dzięki swoim właściwościom jest także potężnym narzędziem w badaniach przyżyciowych sygnałów fluorescencyjnych generowanych punktowo lub pochodzących z różnych warstw optycznych komórki. Niektóre metody, takie jak metoda całkowitego wewnętrznego odbicia fluorescencji (ang. total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF), umożliwiają przeprowadzanie badań bardzo cienkich warstw komórki mających 100 lub mniej nm. Polega ona na detekcji światła wzbudzonego, padającego pod kątem granicznym, czyli takim, przy którym dochodzi do całkowitego wewnętrznego odbicia, dzięki czemu wzbudzamy selektywnie tylko sondy fluorescencyjne znajdujące się tuż przy szkiełku podstawowym, na którym umieszczona jest próbka. Stosowanie tej metody pozwala na obserwację i śledzenie przemieszczania się pojedynczych znakowanych fluorescencyjnie molekuł, badania dynamiki egzocytozy i endocytozy, czy prowadzenie doświadczeń dotyczących lokalizacji, działania oraz budowy strukturalnej różnych kanałów jonowych (RAVIER i współaut. 2008). Inną metodą pozwalającą uzyskiwać informacje z niewielkich regionów lub powierzchni żywych komórek jest FRET (ang. Förster resonance energy transfer), który polega na bezpromienistym transferze energii z jednego znacznika fluorescencyjnego zwanego donorem do drugiego zwa-

nego akceptorem, ale tylko wtedy, gdy dystans pomiędzy tymi dwiema molekułami nie jest większy niż 10 nm. Częsteczką będącą akceptorem może następnie oddać tę energię w postaci fotonu przy określonej długości fali, która jest analizowana (JARES-ERIJMAN i JOVIN 2003). Technika FRET najczęściej wykorzystywana jest do badań interakcji pomiędzy różnymi białkami lub pomiędzy białkiem a błoną plazmatyczną (PISTON i KREMERS 2007). Metoda ta umożliwia ze znacznie wyższą precyzją niż standardowe metody kolokalizacji wykazać różnego rodzaju oddziaływania zachodzące w komórce. Kolejną metodą pozwalającą na badanie dynamiki białek w komórkach jest FRAP (ang. fluorescence recovery after photobleaching), czyli przywracanie fluorescencji po fotowygazaniu. Polega ona na wygaszaniu fluorescencji we fragmentach struktury subkomórkowej zawierającej znakowane fluorescencyjne białko. Następnie monitoruje się dyfuzję nowych cząsteczek fluorescencyjnych w miejscu, w którym wygaszono fluorescencję. Umożliwia to analizę własności kinetycznych i motorycznych białek, współczynnika dyfuzji czy szybkości ich transportu w żywej komórce. Wymienione powyżej metody stanowią tylko część różnych technik fluorescencyjnych stosowanych obecnie w mikroskopii, które połączone z możliwościami mikroskopu konfokalnego pozwalają badać szereg procesów zachodzących w żywych komórkach z niespotykaną dotychczas dokładnością.

MIKROSKOPIA KONFOKALNA Z WIRUJĄCYM DYSKIEM

Zarówno mikroskop konfokalny, jak i mikroskop szerokiego pola, pozwalają na względnie łatwą i szczegółową wizualizację różnego rodzaju procesów w żywych komórkach. Niestety oba systemy prócz wielu zalet mają również wady, które w niektórych przypadkach mogą uniemożliwiać przeprowadzenie zamierzonego doświadczenia. Rozwiązaniem tych problemów byłoby połączenie możliwości mikroskopu konfokalnego z szybkością rejestrowania obrazów klasycznego mikroskopu fluorescencyjnego przy jednoczesnym zachowaniu niskiej fototoksyczności. Urządzeniem, które w pewnym stopniu łączy cechy obu typów mikroskopów jest spinning disk confocal microscope,

czyli mikroskop konfokalny wyposażony w dodatkowy układ dwóch wirujących dysków. Podstawą do stworzenia tego typu mikroskopu było wynalezienie przez Paula Nipkova specjalnego dysku, w 1884 r., podczas pracy nad zjawiskiem przesyłania obrazu na odległość. Jako pierwszy na świecie skonstruował on osadzoną na osi rotującą tarczę, nazwaną później od nazwiska twórcy dyskiem Nipkowa, która stała się w późniejszych czasach podstawowym elementem pierwszych telewizorów i kamer telewizyjnych. Wirująca tarcza ze spiralnie ułożonymi otworami rozkładała obraz przedmiotu na impulsy elektryczne, które można było przysyłać na dowolną odległość. Migocąca żarówka, jako



Ryc. 6. Schemat pokazujący działanie mikroskopu konfokalnego z układem dwóch wirujących dysków (<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>).

źródło światła, modulowała obraz przedmiotu (jasny-ciemny). Druga, synchronicznie wirująca tarcza miała umożliwiać rekonstrukcję obrazu u odbiorcy. Główną słabością dysku Nipkova był fakt, że relatywnie słabe światło przechodziło przez niewielki otwór w dysku, powodując pojawianie się małej ilości impulsów elektrycznych, czego efektem była słaba wydajność wykrywania i wyświetlania informacji. Dopiero 82 lata później, w 1968 r., Mojmir Petran stworzył pierwszy, skanujący pojedynczą wiązką światła mikroskop światła odbitego, wykorzystujący zasadę działania dysku Nipkova, gdzie wzbudzenie preparatu i detekcja obrazu pojawiały się w tandemie, wykorzystując otworki znajdujące się zarówno po jednej, jak i po drugiej stronie dysku. Niestety, wciąż głównym problemem zastosowania tej metody była niewielka ilość światła wzbudzającego, dochodzącego do detektora, ze względu na organiczną powierzchnię z otworkami. Dodatkowo, pojawiały się problemy z precyzyjnym rozmieszczeniem otworów na dysku, aby możliwe było zastosowanie ich zarówno do wzbudzenia, jak i emisji (PETRAN i współaut. 1968). Rozwój technologiczny, związany szczególnie z mikroskopią konfokalną oraz kamerami CCD,

spowodował, że początkowe problemy z mikroskopem z dyskiem Nipkova zostały prawie całkowicie rozwiązane. Zasada działania nowoczesnego urządzenia tego typu opiera się obecnie najczęściej na zastosowaniu zamiast pojedynczej przesłony konfokalnej, lub pojedynczego dysku, układu dwóch dysków. System ten został stworzony i opatentowany przez firmę Yokogawa Electric i od tej pory nazywany jest jednostką Yokogawy (ang. Yokogawa unit) lub CSU (ang. confocal scanning unit). Powierzchnia pierwszego z dysków wyposażona jest w układ wielu mikrosoczewek, które mają za zadanie zbierać jak największą ilość światła i skupiać go na powierzchni pokrytej ok. 1000 przesłon konfokalnych (pinholes), znajdujących się na drugim dysku (dysk Nipkova). Powoduje to rozdzielenie światła wzbudzającego na wiele znacznie słabszych wiązek, które następnie oświetlają preparat ze znacznie niższą mocą. Dzięki temu fototoksyczność takiej wiązki jest znacznie mniejsza niż w przypadku klasycznego sposobu wzbudzania. Następnie światło przekazywane jest w całości poprzez odpowiedni filtr emisyjny do detektora (Ryc. 6). Zastosowanie takiego układu pozwala na natychmiastowe przekazanie ca-

łego obrazu z pola widzenia na światłoczułą matrycę przy jednoczesnym zachowaniu rozdzielczości konfokalnej. Umożliwia to wykonywanie bardzo szybkich serii zdjęć, zarówno w różnych płaszczyznach ostrości, jak i w osi czasowej, co pozwala na wykonywanie nawet takich przyżyciowych doświadczeń, w których duża ilość rejestrowanych klatek na sekundę oraz wysoka rozdzielczość (rozdzielczość konfokalna) w trzech wymiarach może być krytyczna dla jego powodzenia. Jako źródło światła w tym typie mikroskopu stosuje się lasery o różnych długościach fali wzbudzenia, natomiast detektorami są szybkie kamery EMCCD. W zależności od typu zastosowanej jednostki Yokogawy, maksymalna prędkość rotacji dysków może wynosić od 1800 nawet do 10 000 obr/min, co pozwala na skanowanie 12 ramek podczas jednego obrotu. Dzięki temu można osiągnąć maksymalną teoretyczną szybkość zbierania obra-

zu nawet 2000 ramek na sekundę (NAKANO 2002). Oczywiście w realnych doświadczeniach prędkość ta, ze względu na konieczność zsynchronizowania obrotów dysku z czasem ekspozycji potrzebnym do zebrania pojedynczego zdjęcia, jest znacznie niższa i zależy głównie od typu kamery CCD. Obecnie, dostępne kamery charakteryzują się bardzo wysoką czułością i szybkością działania dzięki zastosowaniu w nich różnych zaawansowanych technologii. Dzięki temu możliwe jest znaczne zmniejszenie czasu ekspozycji pojedynczego zdjęcia, obniżenie fototoksyczności i wzrost szybkości zbierania obrazu (ADAMS i współaut. 2003). Mikroskop z wirującymi dyskami nie oferuje tak dużej elastyczności i możliwości konfiguracji, jakie oferuje mikroskopia konfokalna, jednakże w niektórych zastosowaniach, szczególnie, jeżeli dotyczy to badań przyżyciowych, może być bardzo dobrą alternatywą.

PODSUMOWANIE

Dzięki wynalezieniu i rozwinięciu technik mikroskopowych możliwe było znaczne rozwinięcie różnego rodzaju badań przyżyciowych. Dodatkowo, pojawienie się i ciągły rozwój różnorodnych znaczników fluorescencyjnych pozwala obecnie na obserwację w czasie rzeczywistym procesów zachodzących w żywych komórkach, takich jak przemieszczanie się określonych struktur komórkowych czy interakcja pomiędzy białkami. Możliwe stało się również śledzenie i analizowanie zmian w komórce pod wpływem różnych czynników zewnętrznych. Techniki mikroskopowe, zaczynając od prostego obrazowania, a kończąc na zaawansowanych technikach FRET, FRAP czy TIRF, całkowicie zrewolucjonizowały nasze badania żywych komórek czy skrawków tkankowych. Ogromna ilość różnych urządzeń na rynku pozwala

la badaczom na wybór mikroskopu dopasowanego dokładnie do jego profilu badań. Zarówno mikroskop szerokiego pola, jak i mikroskop konfokalny, w odpowiednich zastosowaniach, potrafią być bardzo potężnymi narzędziami badawczymi, niepozbawionymi jednak wad, które zostały opisane w powyższym artykule. Dodatkowo trzeba pamiętać, że w metodach obrazowania bardzo istotny jest również rodzaj jak i sposób wyznakowania badanych preparatów. Prawidłowe zastosowanie i wybór odpowiednich znaczników fluorescencyjnych w połączeniu z nowoczesnym mikroskopem pozwala w znaczny sposób pomóc w uzyskiwaniu prawidłowych wyników i może mieć istotne znaczenie w badaniach przyżyciowych, w których bardzo często mogą pojawiać się problemy z fototoksycznością, czy zanikiem sygnału.

MIKROSKOPIA KONFOKALNA A MIKROSKOPIA SZEROKIEGO POLA- DWA PODEJŚCIA DO BADAŃ PRYŻYCIOWYCH

Streszczenie

Doświadczenia na żywych organizmach od lat były podstawą badań w naukach biologicznych. Pozwalają one na bezpośrednią obserwację mechanizmów biologicznych zachodzących w różnego rodzaju komórkach, mikrobach czy nawet w żywych zwierzętach. Dzięki rozwojowi różnego rodzaju technik fluorescencyjnych i wykorzystaniu tradycyjnej mikroskopii fluorescencyjnej czy mikroskopii konfokalnej badania przyżyciowe prowadzi się

obecnie w laboratoriach na całym świecie. Rozwój technik obrazowania przyżyciowego na wielu płaszczyznach technologicznych, zaczynając od różnego rodzaju komponentów optycznych, mechanicznych czy elektronicznych, poprzez koncepcyjne podejścia do tego typu badań, a kończąc na tworzeniu nowych znaczników fluorescencyjnych, których właściwości chemiczne są dostosowane do konkretnych doświadczeń, pozwolił na obserwacje i

śledzenie nawet pojedynczych molekuł czy badanie interakcji pomiędzy białkami. Artykuł ten przybliży podstawowe techniki badań przyżyciowych z wy-

korzystaniem mikroskopu szerokiego pola oraz mikroskopu konfokalnego, jak również zalety i wady stosowania obu rodzajów mikroskopów.

CONFOCAL MICROSCOPY AND WIDE-FIELD MICROSCOPY, TWO APPROACHES TO THE LIVE STUDY

Summary

Experiments on living organisms has always been one of the most important research in the life sciences. They allow direct observation of biological mechanisms occurring in different types of cells, microbes, or even in living animals. With the development of the various techniques for measuring fluorescence signals, using either wide field or confocal microscopy, are by now extremely well established and routine in many laboratories in the world. This resulted in development of live techniques in many areas of technology, starting with the various components (optical components, mechanical or elec-

tronic) by a conceptual approach to this type of research, ending with the creation of new fluorescent dyes which chemical properties are adjusted to the specific experiments. Thanks to the current available techniques, it is possible to observe and track even single molecules or study the interactions between proteins. This article introduces the basic techniques of live experiments using a wide field microscopy and confocal microscopy as well as the advantages and disadvantages of those two microscopes.

LITERATURA

- ADAMS M. C., SALMON W. C., GUPTON S. L., 2003. *A high-speed multispectral spinning disk confocal microscope system for fluorescent speckle microscopy of living cells*. *Methods* 29, 29–41.
- ALLEN R. D., DAVID G. B., NOMARSKI G., 1969. *The Zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy*. *Z. Wiss. Mikrosk.* 69, 193–221.
- CEBECAUER M., HUMPOLÍČKOVÁ J., ROSSY J., 2012. *Advanced imaging of cellular signaling events*. *Methods Enzymol.* 505, 273–89.
- DENK W., STRICKLER J. H., WEBB W. W., 1990. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. *Science* 248, 73–76.
- JARES-ERIJMAN E. A., JOVIN T. M., 2003. *FRET imaging*. *Nat. Biotechnol.* 21, 1387–1395.
- JOUBERT J., SHARMA D., 2011. *Light microscopy digital imaging*. *Curr. Protoc. Cytom.* 2, Unit 2.3.
- KAMINSKI M. T., LENZEN S., BALTRUSCH S., 2012. *Real-time analysis of intracellular glucose and calcium in pancreatic beta cells by fluorescence microscopy*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823, 1697–707.
- KANNO S., YAMAWAKI M., ISHIBASHI H., KOBAYASHI N., I., HIROSE A., TANOI K., NUSSAUME L., NAKANISHI T. M., 2012. *Development of real-time radioisotope imaging systems for plant nutrient uptake studies*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 367, 1501–1508.
- MASTERS B., 2010. *The Development of Fluorescence Microscopy*. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons.
- MCLEAN I. S., 1989. *Electronic and Computer-Aided Astronomy – From Eyes to Electronic Sensors*. Prentice Hall.
- NAKANO A., 2002. *Spinning-disk confocal microscopy – a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic*. *Cell Struct. Funct.* 27, 349–355.
- PETRAŃ M., HADRAVSKY M., EGGER D., GALAMBOS R., 1968 *Tandem-scanning reflected-light microscopy*. *J. Opt. Soc. Am.* 58, 661–664.
- PETTY H. R., 2007. *Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology*. *Microsc. Res. Tech.* 70, 687–709.
- PISTON D. W., KREMERS G. J., 2007. *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. *Trends Biochem. Sci.* 32, 407–414.
- RAVIER M. A., TSUBOI T., RUTTER G. A., 2008. *Imaging a target of Ca²⁺ signalling: dense core granule exocytosis viewed by total internal reflection fluorescence microscopy*. *Methods* 46, 233–238.
- SHEPPARD C. J. R., KOMPFFNER R., 1978. *Resonant scanning optical microscope*. *Appl. Optics* 17, 2879–2882.
- STOKES G. G., 1852. *On the change of refrangibility of light*. *Phil. Trans. R. Soc.* 142, 463–562.