

A fénymikroszkóp felbontási határának áttörése?

STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy)

Műhelyünkben *Az endokannabinoid jelpálya molekuláris szerveződése és szerepe a szinapszisokban* címmel tartott előadást dr. Katona István (MTA KOKI, Molekuláris Neurobiológia Kutatócsoport) . Ez előadás során sokat megtudhattunk az endokannabinoid jelátvitelről, de az előadás nem szorítkozott a kutatási eredmények tárgyalására, hanem betekintést nyújtott a kutatás gyakorlatába is. A gyakori kérdések mellett: mi lehet a jelpálya szerepe, mik lehetnek az alkotó elemei, hol helyezkednek el az alkotóelemek; arra kérdésre is választ kaphattunk, hogyan határozhatjuk meg az alkotóelemek pontos elhelyezkedését? Ekkor került említésre a STORM elnevezésre hallgató mikroszkópiás technika, mely annak ellenére, hogy elektronmikroszkóp helyett fénymikroszkópot használ, mégis képes nanométeres felbontást biztosítani.

Napjainkra a technológiai fejlődésnek hála már a fénymikroszkópok felbontásának nem a lencsék tisztasága vagy minősége szab határt, hanem maga a fizika. Egy fénymikroszkóp feloldóképességét három tényező határozza meg: a használt fény hullámhossza (λ), a mikroszkóp objektívje és a minta között lévő közeg törésmutatója (n), valamint az objektívbe jutó fénynyaláb félnyílásszögének a szinusza ($\sin(\mu)$). $d = \lambda / [n \cdot \sin(\mu)]$ Ezeket a paramétereket optimalizálva is a maximális feloldóképesség csupán 200nm körüli.

A 200nm-nél kisebb molekulák láthatóvá tételét úgy lehet könnyen megoldani, ha valamilyen módon jelöljük azokat. Így ugyan a felbontás nem változik, de mégis tudjuk, hogy a látótéren belül hol helyezkednek el a vizsgálni kívánt objektumok. Erre a legalkalmasabb a fluoreszcens jelölés.

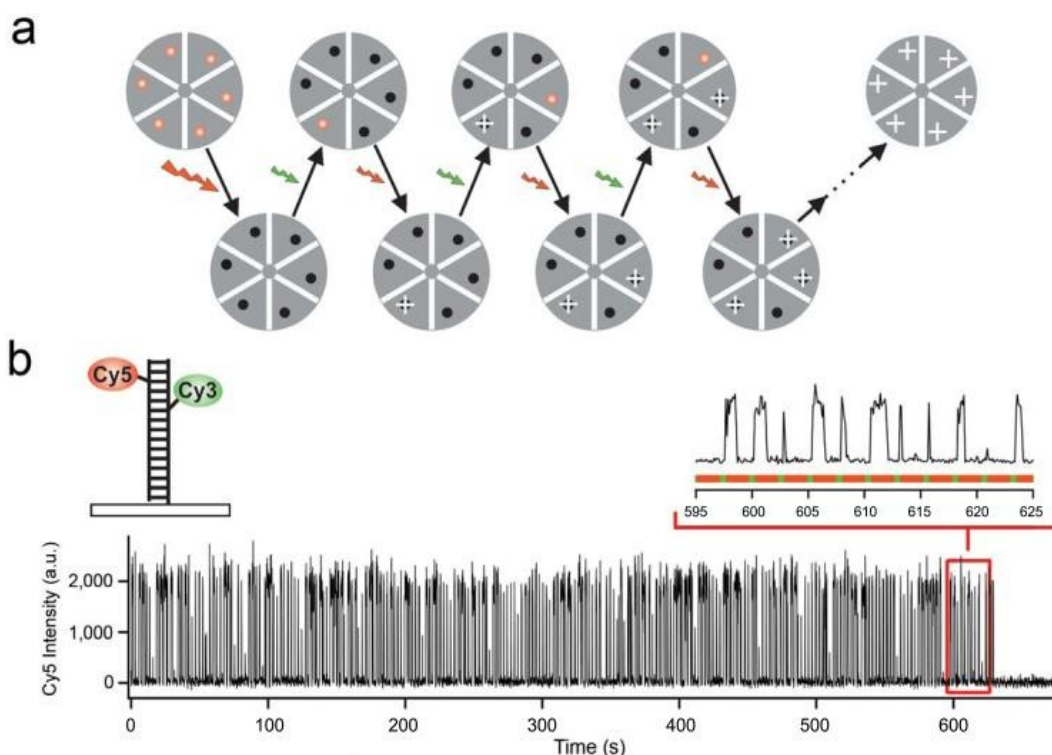
A fluoreszkálás egy fizikai jelenség, melynek során egy anyag elnyel (abszorbeál) bizonyos hullámhosszúságú fénysugarakat (gerjesztő fény) és ennek hatására fényt bocsájt ki a bejövő sugárzástól eltérő hullámhosszon. Ez a jelenség a megfelelő optikai szűrők és dikromatikus tükör (egy adott hullámhossznál rövidebb hullámhosszú fénysugarakat tükörként veri vissza, míg a nagyobb hullámhosszú fénysugarakat átengedi) felhasználásával lehetővé teszi, hogy csak a fluorofór által kibocsájtott fény jusson el a detektorba.

A fluoreszcens mikroszkópia hatalmas előnye, hogy noninvazív, így lehetséges az élősejtek valósidejű vizsgálata is. Ezért érthető, hogy miért folynak olyan kutatások, melyek a fluoreszcens mikroszkópok felbontását próbálják javítani. Ilyen kutatások vezettek el a STORM megszületéséhez.

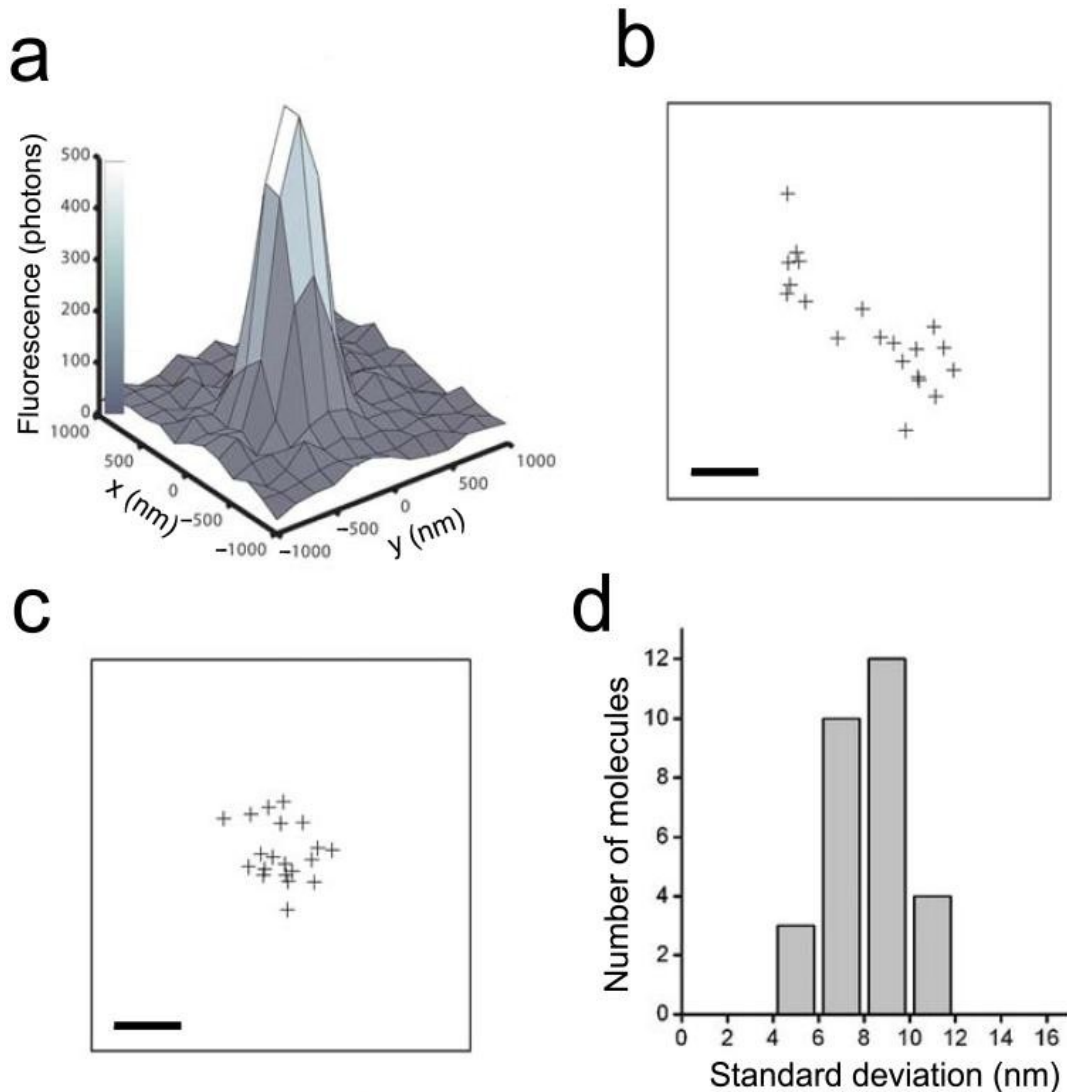
A STORM elnevezés az angol **stochastic optical reconstruction microscopy** névből képzett betűszó a módszer megnevezésére, melyet magyarul nevezhetnénk sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópnak, vagy, egy kicsivel magyarosabban, valószínűségszámításra épülő helyreállítós fénymikroszkópnak. Ez a forradalmian új eljárás csupán néhány pontban különbözik az átlag fluoreszcens mikroszkópnál megszokottaktól.

Először is a kívánt molekula jelöléséhez olyan speciális fluorofórokot illetve fluorofór komplexeket alkalmaznak, melyek bizonyos fénnel való megvilágítás hatására átválnak gerjeszthető állapotból nem gerjeszthető állapotba és viszont (photoswitchable fluorophore). Például ilyen tulajdonságokkal rendelkezik a Cy5 elnevezésű festék. A Cy5 festék vörös fénnel gerjeszthető, valamint gerjesztés után átkapcsol inaktív (nem gerjeszthető) állapotba. Ebben az állapotban a festék nem fluoreszkál, ahhoz, hogy a Cy5 festék ismét működőképes fluorofór legyen, zöld fénnel kell bevilágítani, de még egy Cy3 festékre is szükség van, mely segíti a Cy5 festék helyreállítását. Ezen festékek több száz ki-bekapcsolási ciklust képesek elviselni mielőtt elveszítenék fluoreszcens tulajdonságukat.

Másodszor a mintát nem folyamatosan világítják meg a gerjesztő fénnel. Ehelyett először egy hosszú és intenzív gerjesztő fénnel való besugárzással az összes festéket inaktív állapotba alakítják át, majd több megvilágítási ciklus következik, melyek teljesen azonos felépítésűek. A ciklus egy rövid aktiváló besugárzásból és egy hosszabb gerjesztő és egyben inaktíváló besugárzásból tevődik össze. A rövid aktiváló besugárzás hatására a fluorofóroknak csupán egy része kerül gerjeszthető állapotba, majd a gerjesztő fény hatására fluoreszkálnak és inaktív állapotba kerülnek. Az kölcsönzi a módszer sztochasztikus jellegét, hogy teljesen a véletlen függvénye, hogy mely fluorofórok válnak gerjeszthetővé.



Végül következik a számítógépes képfeldolgozás. Ennek során az összes gerjesztéses megvilágítás során készült képeken, olyan magányosan elhelyezkedő fluofórokat keresnek, melyekről kellő mennyiségű foton érkezett a detektorba, majd leolvassák a legintenzívebb pontok x és y koordinátáit. Ezt követően minden egyes fluorofór esetén elkészítik az eloszlási függvényét, melyet a legkisebb négyzetek elve szerint illesztnek egy kétdimenziós Gauss-görbéhez, mely alapján már megadható nagy bizonyossággal a fluorofór helyzete.



Ezen változtatásoknak köszönhetően a módszer feloldóképesség akár a 20nm-t is elérheti. A STORM cianin festékekkel (Cy3 és Cy5) jól használható nagy felbontású képek készítésére fluoreszcens in situ hibridizációk valamint immunhisztokémiák esetén. Megfelelő tulajdonságú fluoreszcens fehérjék esetén akár élősejtek valósidejű vizsgálatára is felhasználható.

Felhasznált irodalom:

Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*. 2006 Oct; 3(10):793-5.

