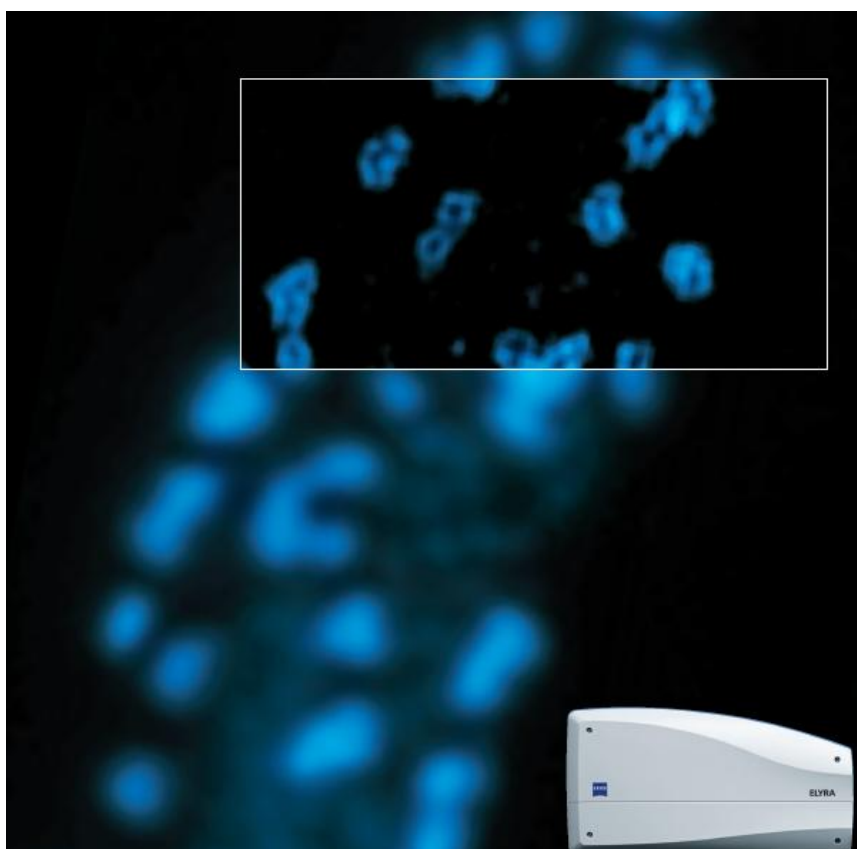


Systemy super-rozdzielcze

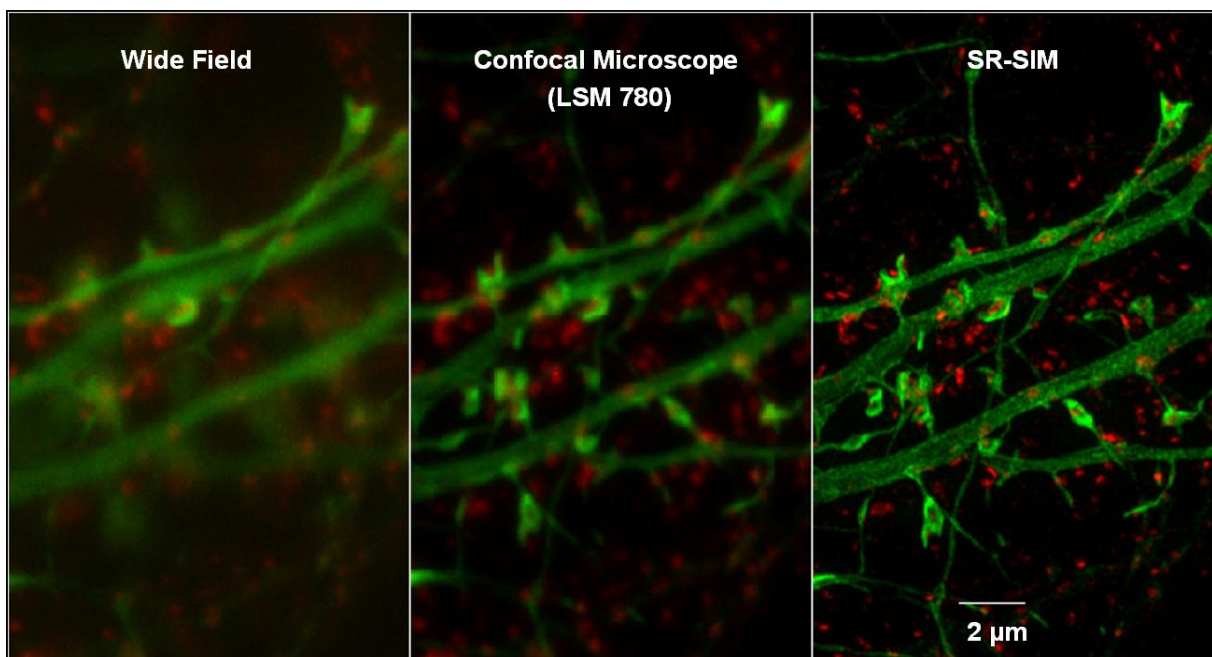
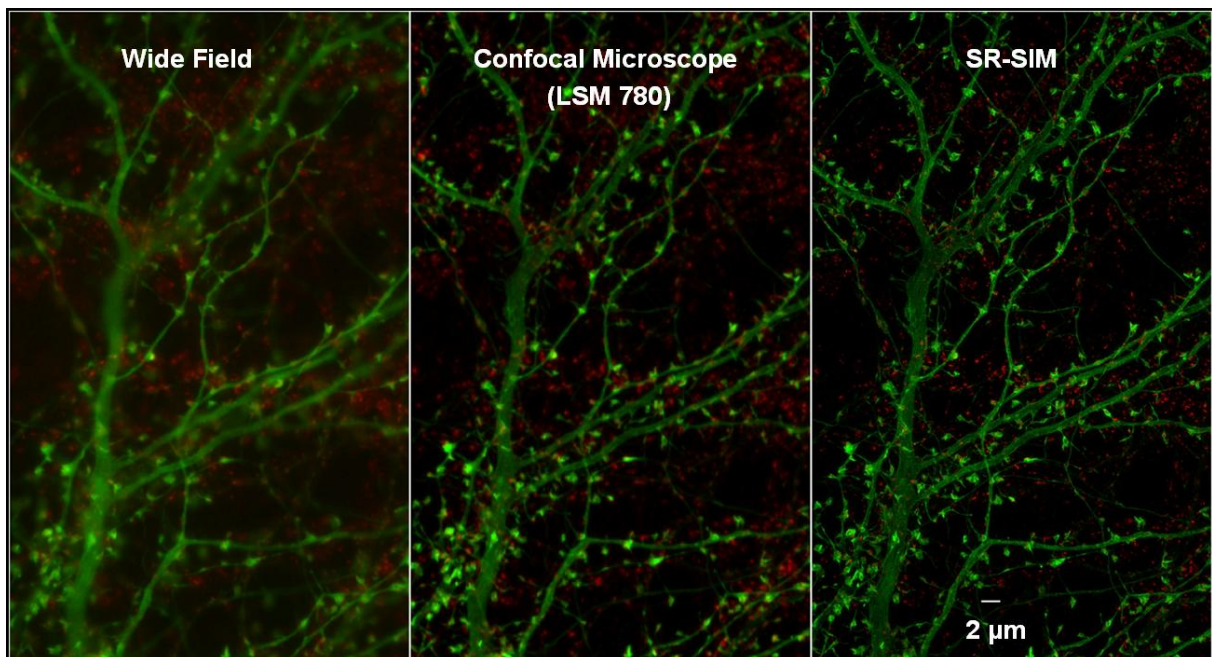
Maciej Czerwiec, Carl Zeiss Polska

Techniki mikroskopii fluorescencyjnej znalazły szerokie zastosowanie w naukach biologicznych, dzięki możliwości wykorzystania swoistego znakowania struktur i prowadzenia obserwacji w trybie przyżyciowym. Techniki te, włączając mikroskopię konfokalną oraz wielofotonową, mają ograniczenia rozdzielczości wynikające z falowych właściwości światła. W praktyce rozróżnienie elementów mniejszych niż ok. 200 nm w płaszczyźnie (x,y) oraz ok. 500 nm w płaszczyźnie (z) nie jest możliwe. Wiele struktur biologicznych posiada jednak mniejsze wymiary, a ich analiza przez wieki nie była możliwa.



W ostatnich latach pojawiło się kilka pomysłów, aby obejść ograniczenia wynikające z praw fizyki, wpływających na zdolność rozdzielczą mikroskopu. Nie oznacza to oczywiście, że opisane przed laty przez Ernsta Abbe i innych naukowców prawa przestały obowiązywać. Ze względu na nowatorskie strategie rejestracji, udało się opracować kilka alternatywnych technik pozwalających na obrazowanie z rozdzielczością lepszą niż w klasycznej mikroskopii, stąd metody te określane są technikami super-rozdzielczymi.

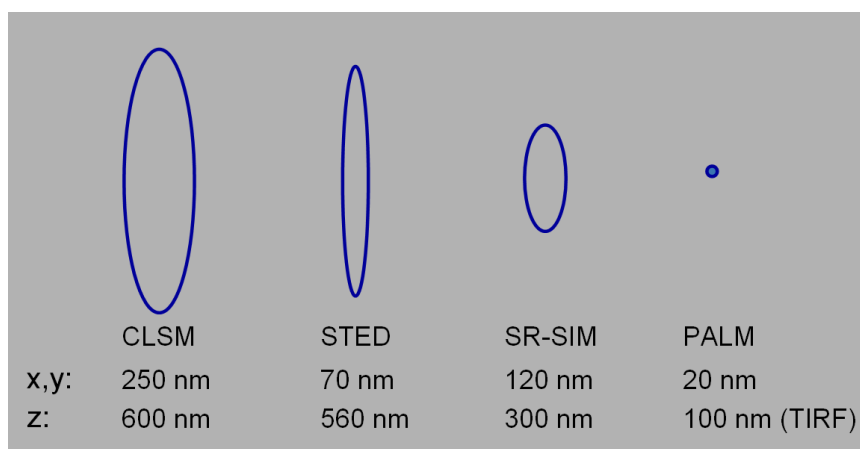
Pierwsza grupa tych innowacyjnych technik polega na zmianach funkcji PSF (*point-spread function*) lub na modyfikacjach sposobu oświetlenia preparatu i oparta jest na nieliniowych, optycznych sposobach zredukowania ogniska fokalnego. Przykładami takich technik obrazowania super-rozdzielczego są: STED (*stimulated emission depletion*), GSD (*ground state depletion*) oraz SSIM (*saturated structured illumination microscopy*). Przez modyfikację światła wzbudzającego i zmianę funkcji PSF wytwarzane ognisko fokalne ma dużo mniejsze rozmiary, dzięki czemu możliwa jest rejestracja szczegółów z rozdzielczością w płaszczyźnie (x,y) ok. 20-50 nm.



Druga, coraz bardziej popularna, grupa metod obrazowania super-rozdzielczego bazuje na technikach fotoaktywacji preparatów fluorescencyjnych, umożliwiających przestrzenną orientację struktur o dużej gęstości cząsteczek. W tej technice pojedyncze cząsteczki w sposób przypadkowy aktywują swoje zdolności fluorescencyjne, przechodząc w stan świecenia oraz wygaszenia, a proces ten jest sekwencyjnie rejestrowany. W ten sposób cząsteczki ułożone w niewielkiej odległości od siebie separowane są w czasie, a następnie odwzorowywane w jednym obrazie wynikowym. Techniki te zostały opracowane w roku 2006 przez trzy niezależne grupy naukowców pod nazwą: PALM (*photoactivated localization microscopy*), FPALM (*fluorescence photoactivation localization microscopy*) oraz STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*). Wszystkie trzy metody mają tę samą zasadę działania, a wyniki prac naukowych zostały opublikowane z użyciem różnych preparatów fotokonwersyjnych. Więcej informacji na temat technik super-rozdzielczych znajdziecie Państwo na stronie: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/index.html>

System ELYRA firmy Carl Zeiss

Firma Carl Zeiss, pozostając jedną z najbardziej innowacyjnych na świecie, postanowiła wykupić prawa patentowe i rozwijać te nowe techniki w postaci komercyjnie dostępnych platform obrazowania. Po dogłębnej analizie możliwości wszystkich technik oraz ich efektywnego zastosowania w prowadzonych pracach badawczych, postanowiono zainwestować w oba rodzaje opisanych powyżej metod super-rozdzielczych, bazując na metodzie oświetlenia strukturalnego (SR-SIM) oraz fotoaktywacji (PAL-M). Niezależne porównania rozdzielczości osiągniętych w mikroskopii konfokalnej (CLSM) oraz metodach STED, SR-SIM i PAL-M przeprowadziło już wielu naukowców, ich skrócone wyniki za artykułem *Lothar Schermelleh, Rainer Heintzmann, Heinrich Leonhardt „A guide to super-resolution fluorescence microscopy”* pokazuje poniższa ilustracja.

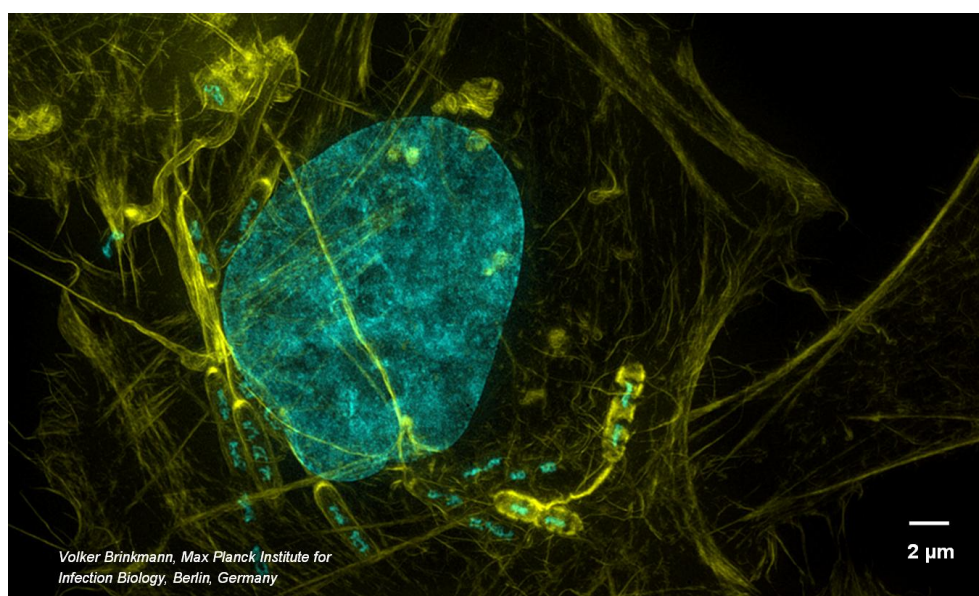


Schermelleh et al, JCB 2010

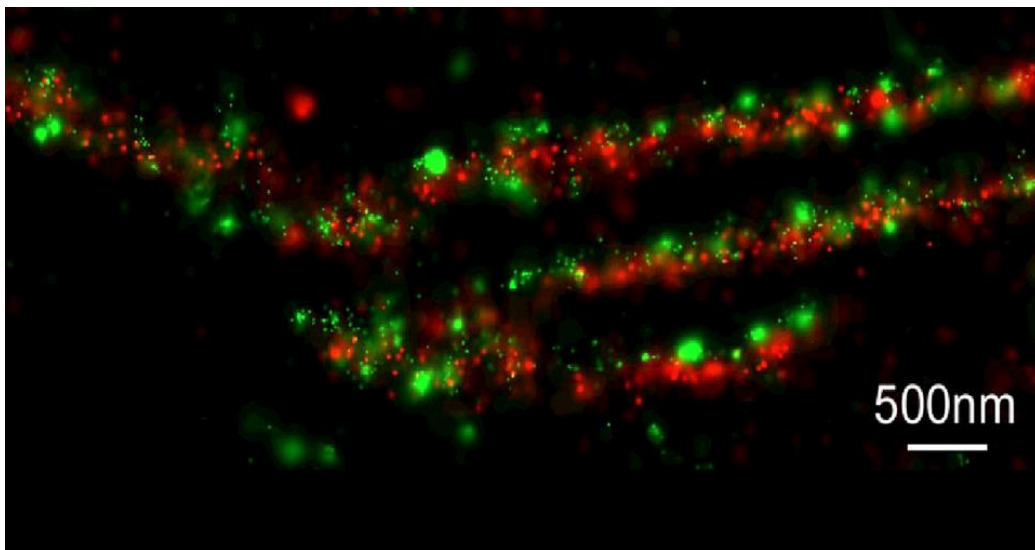
Super-rozdzielczy system ELYRA może zostać skonfigurowany, jako mikroskop do techniki SR-SIM i/lub PAL-M/dSTORM, a także jako połączenie tych opcji z mikroskopem konfokalnym rodziny LSM 780.



ELYRA S.1 - system technologii SR-SIM, to najbardziej wszechstronny i uniwersalny z dostępnych mikroskopów super-rozdzielczych. Umożliwia pracę ze wszystkimi standardowymi białkami oraz barwieniami fluorescencyjnymi, z preparatami przygotowanymi, jak do obrazowania na klasycznym mikroskopie fluorescencyjnym. Poprzez zastosowanie unikalnego systemu wymiennych siatek, zoptymalizowanych dla różnych obiektywów i wykorzystywanej długości fali świetlnej oraz algorytmowi opracowywania wyników, system podwaja rozdzielczość obrazowania zarówno w płaszczyźnie (x,y) oraz (z), w porównaniu do mikroskopii konfokalnej.



System ELYRA P.1 gwarantuje najwyższą dostępną komercyjnie rozdzielczość obrazowania, wykorzystując technologię PAL-M/dSTORM. Poprzez sekwencyjną rejestrację fotoaktywacji białek/fluorochromów oraz ich precyzyjną lokalizację, mikroskop zapewnia rozdzielczość do 20 nm w płaszczyźnie (x,y) oraz 100 nm w płaszczyźnie (z). Układ może być wykorzystany zarówno z całą gamą białek podlegających fotoaktywacji lub fotokonwersji w oparciu o technikę PAL-M, jak również z wieloma klasycznymi fluorochromami np. Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 633, Cy3, czy Cy5 dla metody dSTORM. System daje możliwość rejestracji obrazów w trybie klasycznej fluorescencji oraz TIRF (*total internal reflection fluorescence*) w oparciu o najnowszą generację czułych kamer EM CCD.



Shroff et al. 2007

Dla wygody użytkownika oraz prowadzenia kompleksowych prac badawczo-naukowych, firma Carl Zeiss oferuje również możliwość skonfigurowania systemu, łączącego w sobie mikroskop konfokalny z rodziny LSM 710/780 z oboma rodzajami obrazowania super-rozdzielczego – system **ELYRA PS.1**.

