

EÖRDÖG ÁDÁM

A fénymikroszkópia történetéről dióhéjban

Konzulens: Dr. Kele Péter

A természettudományoknak már a kezdetek óta jelentős részét alkották az élettudományok, avagy az élő szervezetek megfigyelése, működésük magyarázata. Az élő minták megfigyeléséhez legrégebb óta használt eszköz a fénymikroszkóp, mely mind a mai napig a legnépszerűbb megoldás ezen a területen. Látványos tehát a fénymikroszkópia múltbeli és jelenkori meghatározó szerepe. Az elmúlt évtizedek eredményei alapján pedig várható, hogy e terület a jövőben is nagy figyelmet vonz majd. Hogy ezeknek az eredményeknek a jelentőségét megfelelő perspektívából értékeljük, érdemes a terület fejlődését időrendi áttekintésben szemlélnünk.

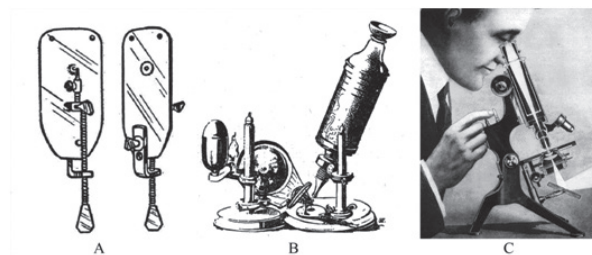
A kezdetek

Mikroszkópokkal és távcsövekkel is foglalkozó írások maradtak ránk a középkorból, a legrégebbi fennmaradt lencsék pedig még az ókori Asszír Birodalom idejére datálhatók. Az első mikroszkóp születése azonban csak az újkorra tehető, eredete vitatott, de első megalkotójának legtöbbször a holland szemüveggépzítő Zachariah Janssen-t fogadják el, aki apjával 1590 körül elkészítette az első, legalább két lencsés nagyítóeszközt, melyet azóta mikroszkópnak nevezünk. Galileo Galilei használt elsőként homorú lencsét, Robert Hook nevéhez pedig az első mikroszkópiás szakkönyv publikálása fűződik 1665-ben, mely egyben a sejtfogalom születését is jelentette. A korai munkák közt figyelemre méltók Antonie van Leeuwenhoek eredményei, aki az 1670-es években olyan nagyítást tudott elérni, amely mikrométer nagyságrendű tárgyak megfigyelését is lehetővé tette. Így baktériumok első megfigyelései fűződnek nevéhez. Ő egy egyetlen lencséből álló elrendezést használt - ezért az ő eszköze felépítés szempontjából inkább nagyító, mint mikroszkóp -, a nagy felbontás titka pedig a pici gömb alakú lencse tökéletes gömbhöz közeli megmunkálása. A lencsekészítés részleteit nem adta tovább, így hasonló nagyítást csak jóval később, a 19. században sikerült elérni. Eredményeinek hatására sokan áttértek az egylencsés rendszerekhez. A mikroszkópia korai korszakában tehát az elért képminőség leginkább a lencse gyártásával hozható összefüggésbe.

A klasszikus fénymikroszkóp kialakulása

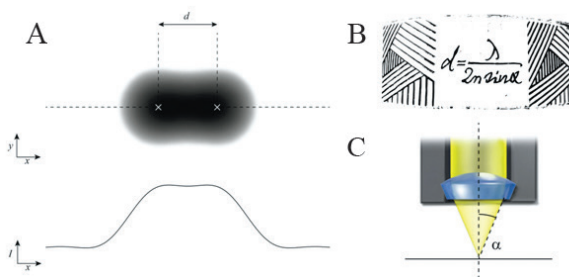
A következő közel 200 évben a többlencsés rendszerek útján haladt tovább a technika fejlődése. A mikroszkópok egyre elterjedtebbé váltak, éstöbb praktikus újítás is történt melyek az eszköz használhatóságán sokat javítottak. Ilyen az általános elrendezés, vagy a mintalemez megjelenése is. Előrelépés történt a képalkotás minőségét illetően is, főleg a kromatikus hibák enyhítését sikerült elérni. Ez a különböző törésmutatójú lencsék használatából, valamint több, de kisebb görbületű lencse használatából

adódott. A mikroszkópkészítés azonban továbbra is sokszor tapasztalati, mintsem elméleti alapokon nyugodott. Ezzel ellentétben a távcsöveket Kepler óta pontos számítások alapján készítették. Változást az hozott, hogy 1866-ban Carl Zeiss optikus, mikroszkópkészítő felkérte Ernst Abbe-t a Göttingeni Egyetem professzorát mikroszkópok tervezésére. Abbe nevéhez számos innováció fűződik. 1868-ban feltalálta az ún. apokromatikus lencsetagot melynek segítségével gyakorlatilag kiküszöbölhetőek voltak a kromatikus hibák - ma is a legtöbb mikroszkóp objektív ilyen felépítésű.



1. ábra: A, Leeuwenhoek egylencsés eszköze B, Hook mikroszkópja C, Klasszikus fénymikroszkóp 19. sz-ból

Ezen gyors fejlődéssel egyidejűleg felmerült a kérdés: Mi az elérhető legnagyobb felbontás - avagy - mekkora az a legkisebb távolság két pont között, ahol a két pont mikroszkóppal még elkülöníthető? A kérdésre szintén Abbe adott választ, aki kísérleti úton elsőként bizonyította is állítását, miszerint a maximális felbontás a fény hullámhosszától függ. E megfigyelés Abbe-féle limit néven vált ismertté. Mivel a jelenség a fény hullámtermészetéből adódik, így a kvantummechanika megjelenésével az állítás további megalapozást kapott, így egyre biztosabbnak tűnt, hogy az optikai mikroszkópok felbontását valóban nem lehet e határ fölé növelni.



2. ábra: A, Két pontszerű fényforrás képe az elkülöníthetőség határán B, Az Abbe-limit formula mely kifejezi, hogy a maximális felbontás a fény hullámhosszától limitált, valamint függ a mikroszkópot jellemző ún. numerikus apertúrától. C, Numerikus apertúra $NA = n \sin \alpha$ egy mikroszkóra jellemző állandó, mely megadja, hogy az objektív milyen nyílású kúpon belülről képes a fényt fókuszálni, n az üveg a közegre vonatkoztatott törésmutatója.

A formulába behelyettesítve, az alkalmazott látható fény hullámhosszát figyelembe véve, az elérhető legjobb felbontásra 200-250 nm értéket kapunk, melyet a korabeli mikroszkópokkal nagyságrendileg sikerült is megközelíteni. Az így elért felbontás már elegendő eukarióta sejtek, és sok esetben baktériumok vizsgálatára is. A mikroszkópok fejlődése gyors ütemben haladt előre, Zeiss cége pedig rövid időn belül a terület legjelentősebb képviselőjévé nőtte ki magát, és hálából Abbe-t is bevette a vállalkozásba. A mikroszkópia fejlődésének második fő periódusban az optika fejlődése volt az előrehaladás kulcsa.

A sokszínű fénymikroszkópia

A kellő felbontás azonban önmagában kevés aminták vizsgálatához. Egy ilyen mintában ugyanis a sejtek vagy a sejtstrucúrák nem mutatnak nagy kontrasztot környezetükkel. Tehát hasonló mértékben nyeli el a fényt egyik vagy másik sejtalkotó, vagy akár a sejten kívüli mátrix is. Ez alól kivételt képeznek a pigmentek, színtestek és talán valamelyest a sejtmag. Az nyilvánvaló volt, hogy a megfigyelni kívánt részleteket valahogy láthatóbbá kellett tenni. Így a mikroszkópok optikai fejlődésével együtt elindult a különböző sejtfestési eljárások kialakulása is. Az első részleteiben is publikált sejtfestési módszer 1858-ban került közlésre és Joseph von Gerlach nevéhez fűződik. Ő agyi szövetekben eredményesen festette meg a sejtmagokat pajzstetvekből kinyert kármin oldatával. A fényt erősen elnyelő festék híg oldatából szelektíven a sejtmagra és annak belső részére adszorbeálódott, ezzel piros színével jól elkülöníthetően jelezte azt. Ezzel elindult az intracelluláris tér kémiai felderítése: a hisztokémia. Hamar megkülönböztetésre kerültek savas és bázikus karakterű festékek, és ezek viselkedése a sejten belüli térben. Számos sejtfestési eljárás jelent meg, ezek közül sokat a mai napig használunk. Például a baktériumok osztályozásának máig az alapját képezi az 1884-ben Gram általközölt festési módszer, mely a baktérium sejtfaláról ad számunkra információt.

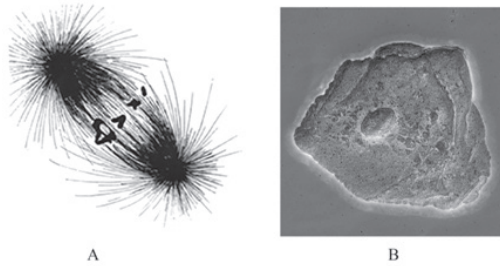
A kidolgozott festési eljárások nemcsak biológiai kutatásokat szolgáltattak, hanem hamar orvosi alkalmazást is nyertek. A természetben például máig használt festék a bengáli vörös és a lizamin zöld a különböző szemsérülések kimutatására. Az egyszerű színezőanyagok/festékek azonban csak véges kontrasztjavulást eredményeztek, hiszen a környezetükhöz képest elnyelésük csak egy adott véges szorzóval lehet nagyobb, mivel végtelen elnyelést nem lehet elérni. Ezzel szemben a fluoreszcencia esetén a jelölők egy adott hullámhossz tartományban fényt bocsátottak ki, a környezetükben pedig ideális esetben nincsen ilyen tartományban emittáló fényforrás. Így egy ideális kísérleti elrendezés esetén fluoreszcens jelöléssel végtelenszeres kontraszt érhető el a jelölt és nem jelölt részek között. A fluoreszcens anyagokkal való jelölés előnyeit a gyakorlatban hamar érzékelték, így - ha sokkal egyszerűbb megfontolásokból is -, de hamar használni kezdték. Az első szintetikus fluoreszcens festék a fluoreszein, melyet Adolf von Bayer 1871-ben publikált, már 1882-ben szemészeti diagnosztikai alkalmazásra talált. Érdekes azonban, hogy a fluoreszcens mikroszkópia fejlődése csak később történt, függetlenül a fluoreszcens jelölőktől, külön úton elindulva.

A mikroszkópok alkalmazási lehetőségét tovább bővítette, hogy a mintának nem-

csak a fényelnyelését, hanem a fénynek a mintán való szóródását és egyéb kölcsönhatását is vizsgálni kezdték. Ez különböző megvilágítást/kísérleti elrendezéseket követelt. Ún. bright-field megvilágításnak nevezzük, mikor a fényforrásból a fény a mintán, majd az objektíven keresztül a megfigyelőhöz jut. A minta tehát sötéten jelenik meg a világos háttér előtt, tehát ebbe a kategóriába tartoznak a korai mikroszkópok is. Az ehhez használt megvilágításnak ma is alkalmazott formája az 1893-ban publikált Köhler-illumináció. Ez a fényforrást teljesen defókuszálja, így a minta mögött nem látjuk a fényforrás pl. izzószál alakját - valamint lehetőséget ad a megvilágítás szabályzására is. Dark-field megvilágításról beszélünk, ha a fényforrásból nem jut közvetlenül fény az objektívbe csak a mintával való kölcsönhatás (szóródás vagy fluoreszcencia) során. Ilyenkor sötét háttér előtt látjuk a mintából érkező fényt. Erre egyik első példa Zsigmondy R. által 1903-ban feltalált ultramikroszkóp, mely a fény szóródását vizsgálja átlátszatlan részecskékről. Az eszköz így kolloidok és aeroszolok vizsgálatára volt alkalmas. Kolloidkémiai munkásságáért és az ultramikroszkóp feltalálásáért Zsigmondy 1925-ben kémiai Nobel-díjban részesült.

A fluoreszcens mikroszkópiás technikák is kivétel nélkül a Dark-field világítást alkalmazzák. Megjelenésük a szintén Zeiss-nak dolgozó Köhler nevéhez fűződik. Mivel az Abbe-féle összefüggés szerint rövidebb hullámhosszú fényvel nagyobb felbontás érhető el, Köhler 1911-ben UV megvilágítást alkalmazott a mintákon, a képeket pedig foto-papírra rögzítette. Eközben vette észre, hogy az UV fényvel megvilágított minta egyes részei a besugárzó fény hatására fényt bocsátanak ki, azaz fluoreszkálnak. Ahhoz hogy, ezt a kibocsátott fényt zajmentesen detektálni lehessen, Heimstädt egy színszűrővel küszöbölt ki, hogy a gerjesztő fényforrásból fény jusson a megfigyelőhöz. Így 1929-ben megszületett az első ún. epifluoreszcencia mikroszkóp, mely a fluoreszcens festési lehetőségek által nyújtott jobb kontraszt tulajdonságokat elsőként kísérlete meg hasznosítani. A korai próbálkozások azonban nem voltak meggyőzőek, problémát jelentett ugyanis a kellő mennyiségű gerjesztő fény koncentrációja a mintára, valamint az emisszió zajmentes detektálása és a szelektív jelölés megvalósítása.

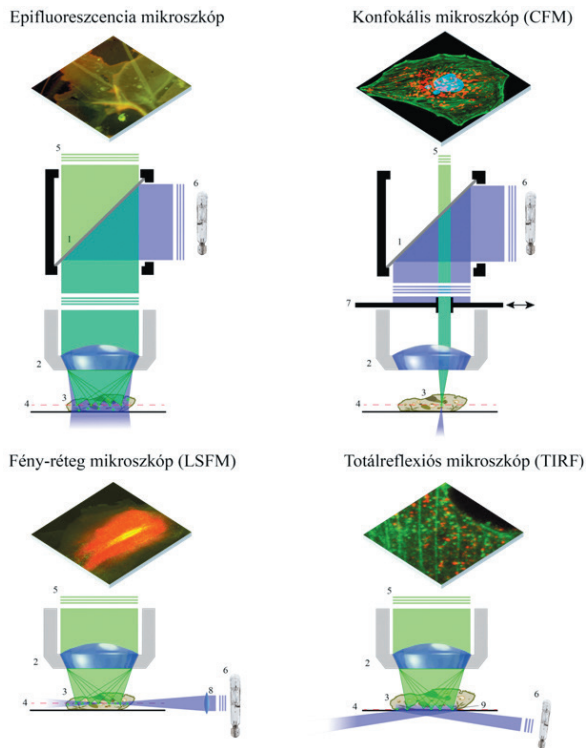
A következő két évtizedben olyan technikák fejlődtek ki, melyek nem igényeltek jelölést, és a jól működő bright-field megvilágítást alkalmazták. Ahhoz hogy a vizsgált rendszer láthatóvá váljon, ezek a módszerek nem pusztán a fény elnyesését vizsgálják. Az 1930-as években megjelenő fáziskontraszt mikroszkópiában pl. a mintán szóródó fényt lehetett felerősíteni a háttérhez képest, ami így mintegy „auraként” emelte ki a sejtek határfelületeit. A módszer a sejtosztódás megfigyelésében vált hasznossá. Feltalálóját, Zenrikét 1953-ban Nobel-díjjal jutalmazták. 1955-ben alakult ki a módszer továbbfejlesztett változata az ún. differenciális fáziskontraszt mikroszkópia (DIC), mely a videokamerák megjelenésével az 1980-as években jutott komoly szerephez. További jelölésmentes módszer a polarizációs mikroszkópia volt. A mintát egy síkban polarizált fényvel bevilágítva az élő szervezetben található az aszimmetria-centrumokat tartalmazó molekulák ezen polarizációs síkot forgatják, egy második polárszűrő beépítésével a síkjában elforgatott fény kiszűrhető volt. Így a vizsgált minták optikai anizotrópiáját lehetett kihasználni a kontraszt javítására. Ez a módszer a sejtciklus és a sejt belső szerkezetének megfigyelésében vált hasznossá.



3. ábra: A, Osztódó sejt polarizációs mikroszkópiás képe
B, Humán hámszöveti sejt fáziskontraszt mikroszkópiás képe

A fluoreszcens mikroszkópia azzal kezdett előtérbe kerülni, hogy megszületett az első, nagy szelektivitást biztosító, széles körben alkalmazható jelölési módszer: az immunfluoreszcencia. Ebben előzetesen fluoreszcensen jelölnek immunglobulinokat, melyek aztán specifikusan kötődnek a minta egyes makromolekuláihoz, általában más immunglobulinokhoz, mellyel a mintát előzetesen már megjelölték. Az 1942-ben először alkalmazott immunfluoreszcencia a mai napig számos biológiai alkalmazásnak örvend. A fluoreszcens mikroszkóp másik két problémát okozó tényezőjét is sikerült lassan kiküszöbölni. A kellően fókuszált és intenzív megvilágítás biztosítása a lézerek megjelenésével, az emisszió szelektív detektálása pedig az ún. dikroikus tükör kifejlesztésével vált lehetővé. Innentől kezdve a fluoreszcens mikroszkópia a fénymikroszkópia többi fajtájával szemben egyre dominánsabbá vált. A háttérzaj további jelentős csökkentésére a konfokális mikroszkóp (CFM) adott lehetőséget, melynek koncepciója 1961-ben született meg. Ennek lényege, hogy a minta fókuszált megvilágítása egy ponton történik és a kibocsátott fény is csak ugyanezen pontból juthat az objektívbe. Tehát az eddigi „wide-field” módszerekkel szemben egy pásztázó módszerről van szó, melynek magvalósításához vagy a fénynyaláb, vagy a minta gyors és szabályozott mozgatása szükséges, így ennek kivitelezésére csak 1987-ben került sor. Hat évvel korábban jelent meg egy újszerű megvilágítási módszer, mely szintén a háttér csökkentését szolgálta. Ebben teljes visszaverődés segítségével létrehozott ún. tűnékeny hullám segítségével világították meg (TIRF) a mintának csak egy vékony, közvetlenül a tárgylemez melletti szeletét. A bezugázó fény így nem hatolt mélyebbre a mintában, megakadályozva ezzel a magas háttér létrejöttét. A javuló jel-zaj viszonyok mellett lehetőség nyílt a sejtek határfelületének tanulmányozására, más részek azonban nem voltak vizsgálhatóak ezzel a módszerrel. Mind a konfokális, mind a TIRF technikák tehát csak egy vékony rétegről adtak megfelelő képet, a 3D-s struktúra összeillesztése ilyen metszetekből - különösen élő sejtek és gyorsabb folyamatok esetén - nem volt lehetséges. A probléma megoldásként született meg a Zsigmondy-féle ultramikroszkóppal egyező rétegszerű megvilágítást alkalmazó módszer, melyet a fénynek síkra merőleges fluoreszcens detektálás mellett 1993-óta fény-réteg mikroszkópiának nevezünk (LSM). Bár ebben az esetben is minden kép csak egy metszete a mintának, a minta forgatása könnyen megoldható, így a felvett metsze-

tekből rekonstruálható az eredeti struktúra. A módszer kiterjedtebb mintákon is alkalmazható így zigóták és embriók fejlődésében eredményezett új megfigyeléseket. A fluoreszcens mikroszkóp típusokról a 4. ábra ad összehasonlító áttekintést. A 1990-es években született további újítás, amely a különböző fluoreszcens mikroszkóp típusok bármelyike esetén alkalmazható, hogy a gerjesztést nem egy, hanem két fele akkora energiájú fotonnal végezzük. Így nagyobb hullámhosszokon történhet a gerjesztés, ami mind a behatolási mélység, mind a háttér csökkenését eredményezi. A konfokális mikroszkópia egy továbbfejlesztett változata a 4pi mikroszkóp, mely az 1990-es évek közepén valósult meg Stefan Hell munkásságának köszönhetően. Ez a két objektív, összetettebb, interferométerrel kiegészített elrendezés képes volt mindhárom tengely mentén nagyon jó felbontást adni, elérve ezzel a 100 évvel korábban megfogalmazott Abbe-limitáttal szabott korlátokat. Az optikai mikroszkópia harmadik nagy korszakában sokszínű és diverz módszerré nőtte ki magát. Ennek során leginkább a fizikai felfedezések és a további segédtudományok új eredményeinek beépítése volt a hatékonyabb képalkotási technikák létrehozásának kulcsa.



4. ábra: A különböző fluoreszcens mikroszkóp típusok összehasonlítása 1, dikroikus tükör 2, objektív 3, fluoreszcensen jelölt minta 4, objektív fókusz síkja 5, detektor és adatfeldolgozó egység 6, gerjesztő fényforrás 7, pásztázó rész 8, cilindres lencse 9, gerjesztő tűnény hullám Képek: humán tüdőszövet, nyérc húgyhám sejt(CFM), egér agy in vivo(LSFM), fibroplaszt sejtmembránja (TIRF)

Fénymikroszkópia a molekulák szintjén

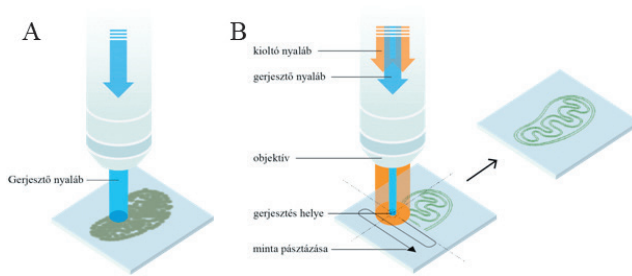
Bár általánosan a fénymikroszkópok felbontóképessége az Abbe-féle összefüggés szerint limitált, a fluoreszcens mikroszkópia alkalmazásai már a 1970-es években olyan technikákkal bővültek, melyek molekuláris folyamatok követését is lehetővé tették. Ilyen technika volt a fluoreszcens korrelációs spektroszkópia (FCS), mely egyes biomolekulák közti kölcsönhatásokat képes követni azáltal, hogy a két molekula kölcsönhatásakor más fluoreszcens tulajdonságokkal bíró komplexet kapunk. Ezzel a módszerrel sikerült kimérni a DNS jelölésére leggyakrabban használt etidium-bromid kötődésének kinetikáját. További hasonló módszer fluoreszcencia-visszatérés vizsgálata foto-elhalványodást követően (FRAP). Ekkor a fluoreszcens jelzőmolekulákat a minta egyik részéről fénynyaláb segítségével „kivégtetik”, és a minta többi részéről a jelzőmolekulák transzportját figyelik a sötét helyre. Így membránfehérjék diffúziós sebessége és sok más transzportfolyamat figyelhető meg. További lépés volt a molekuláris mérettartomány felé a Förster-típusú rezonancia energiatranszfer (FRET) kihasználása. Ez esetben két olyan fluorofórt alkalmaznak, melyek közül az egyik (donor) által kibocsátott fény hullámhossza egyezik a másik (akceptor) által elnyelt fény hullámhosszával. E feltételek mellett létrejöhet az energiatranszfer, melynek eredménye, hogy csak a második fluoreszcens jelzővegyület által kibocsátott fényt látjuk. Az ilyen átmenetek valószínűsége pedig ismert mértékben függ a két fluorofór távolságától. Így a két jelzőmolekula, mint molekuláris vonalzó tudnak információval szolgálni a képalkotás során. A jelzőmolekulák mikrokönyezete így értékes információt adhat a mintáról. Nemcsak legközelebbi jelölt biomolekula távolsága lehet ilyen információ, hanem több a biológiailag fontos komponens koncentrációja is (O_2 , H^+ , ATP, alkáliion-koncentrációk, Ca^{2+} stb.) melyek döntően meghatározzák az adott tér kémiai/biológiai miliójét. Ezek méretüknél fogva sokszor azonban nem jelölhetőek. Ezek kimutatására az ún. molekuláris szenzorok alkalmasak, melyek első képviselői 1980-as évek elején a kalciumszenzorok. Ezek olyan fluoreszcens molekulák, melyeknek a kalciummal történő komplexképzés során fotofizikai tulajdonságaik megváltoznak. Ez utóbbi indikátorok az idegrendszer működésének megismerésében járultak hozzá jelentős sikerekhez.

Ahhoz, hogy a mikroszkópia elérjen egyszer a molekuláris mérettartomány világába szükséges volt, hogy egyetlen fluoreszcens molekula detektálása is megvalósítható legyen. Ez először alacsony hőmérsékleten volt megoldható Moerner munkája során. 1993-ban Betzig és Chichster szobahőmérsékleten is el tudott ilyen eredményt érni, melyben egy parányi optikai üvegszállal – próbával – pásztázták végig a mintát (NSOM). A módszer kivitelezése azonban nehézkes volt, nem talált gyakorlati alkalmazásra. Az egyetlen molekula detektálását TIRF mikroszkópokban is hamar megtudták valósítani, így egy molekula detektálására ez a módszer vált dominánssá. Az Abbe-féle limit értelmében a jelölők bár kiterjedt jelet adnak, egy Gauss-görbe illesztésével lehetséges egyetlen molekula pontos helyének meghatározása is. Azonban nagyobb jelölősűrűség esetén – melyek biológiai minták esetén szükségesek – a jelölők jelei összeolvadnak, azokat semmilyen görbeillesztéssel, dekonvolúciós eljárással már nem lehetséges elkülöníteni és homályos képet kapunk. A korai egy-molekuladetektá-

lások csillagkép szerű képeket tudtak csak szolgáltatni a mintáról, így csak más képalakításokkal kombinálva (pl. fáziskontraszt mikroszkópia) tudtak értékes információt adni.

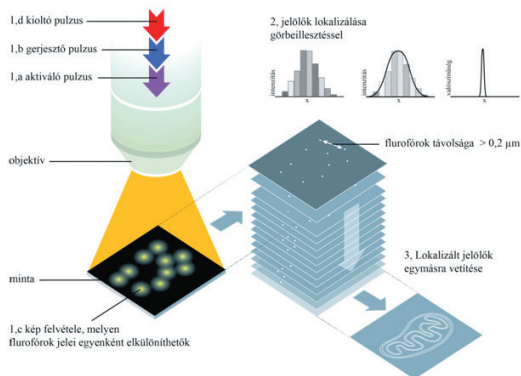
A következő nagy előrelépés 1994-ben történt, mikor a korábban medúzából izolált zöld fluorezcens fehérjét (GFP) genetikailag kódolni tudták és más sejtekben tetszőleges fehérjékhez kapcsolva tudták kifejezni. Ezzel genetikailag kódolható fluorezcens jelzőmolekulát sikerült létrehozni, ezzel megvalósítva élő sejtekben is a molekuláris szintű jelölést. A korábbi megoldás, az immunfluorezcencia leginkább csak nem élő sejtek esetén használható jól, ugyanis az immunfehérjék nem képesek a sejtmembránokon átjutni, így a sejt csak kellő mintaelőkészítés után vizsgálható. A fluorezcens fehérjék fejlesztése robbanásszerűen indult meg, hogy különböző színű és minél fényesebb és nagyobb fotostabilitású fluorezcens fehérjék álljanak rendelkezésre a minták jelölésére. A fluorezcens fehérjéket további molekuláris szenzorokkal kombinálták, sok esetben a FRET jelenséget kihasználva a jelölő mikrokozonyezetétől függően színváltó jelölőket lehetett létrehozni. A fluorezcens fehérjék és összetettebb rokonaik számtalan olyan komplex folyamat lefolyásáról tudtak jó képet adni, mint pl. fontos enzimünk, a protein kináz A szabályzása. Nem meglepő, hogy 2008-ban a fluorezcens fehérjét díjazva adták a kémiai Nobel-díjat.

Az optikai alapú molekuláris mikroszkópia korszakát végül olyan technikai újítások hozták el, melyek a több mint 100 éve leírt Abbe-féle limit korlátait megkerülve ún. szuperfelbontású képalkotó módszerek megjelenéséhez vezettek. Az első ilyen eljárás a 2000-ben megvalósított, az aradi születésű S. Hell nevéhez fűződő ún. STED mikroszkópia volt. Ennek lényege, hogy a fluorezcencia gerjesztés során használt gerjesztő nyalábot - mely az Abbe-limitnek megfelelően szintén ki kell, hogy terjedjen - egy kioltó nyalábba kombináljuk. A kioltó nyaláb stimulált emisszió segítségével megszünteti a gerjesztett állapotot, így a detektáláskor az erre a térrészre eső fluóforokból nem érkezik fény. A kioltó nyaláb segítségével olyan kicsi gerjesztési térfogatot lehet létrehozni, mely kisebb az Abbe limit által szabott határoknál. E kicsi gerjesztési térfogattal a mintán végigpásztázva csak annyit kell eldöntenünk, hogy van-e az adott térfogatban fluófor. A detektoron kapott jel, bár az Abbe-limitnek megfelelően kiszélesedik, a felbontás korlátja már nem a jel kiszélesedése lesz, hanem a pásztázó gerjesztési térfogat mérete, illetve határainak pontossága. Ez pedig azzal áll összefüggésben, hogy a kioltó nyaláb mennyire hatékonyan tudja megszüntetni a gerjesztett állapotokat, ami az alkalmazott fluóforra jellemző. E dolgozat írásakor ezzel a módszerrel a vízszintes irányú felbontás határa élő mintákon néhány 10 nm, szilárd mintákon néhány nm.



5. ábra A, konfokális mikroszkóp működése B, STED mikroszkóp működése

2002-ben megjelentek olyan fluoreszcens fehérjék melyek fluoreszcenciája egy adott hullámhosszú fényvel besugározva ki-, egy másik hullámhosszú fényvel pedig bekapcsolható volt (PA-GFP). Nem sokkal ezután kismolekulás fotokapcsolható jelzővegyületek is megjelentek. Ezek a fotokapcsolható jelölők az Abbe-limit megkerülésének egy új módját teszik lehetővé. Az aktiváló fénynyalábbal a mintát kis intenzitással sugározzuk be úgy, hogy ez csak kevés számú fluorofórral lépjen kölcsönhatásba, így az összes jelölő csak egy töredékének bekapcsolását eredményezze. A kevés számú gerjesztett fluorofór lehetővé teszi, hogy a jel forrásának helyét Gauss-féle illesztéssel pontosan meghatározzuk. Ezek után a kikapcsoló hullámhosszon sugározzuk be a mintát, majd a ciklust sokszor ismételjük. A felvételek egymásra vetítésével nagy felbontású képet nyerhetünk. Ezek a módszerek a jelöltől függően STORM, PALM mozaiknevekre hallgatnak, és a 2000-es évek második felében sikerült őket megvalósítani. Ilyen esetekben a felbontás elméleti limitje a görbeillesztés, melynek pontosságát az határozza meg, hogy a jelet milyen jel/zaj viszonyok mellett sikerült rögzíteni. Ennek javítására elsősorban a fényrel jól kontrollálható, nagy fényességű jelzővegyületek adnak lehetőséget. Ezekkel a módszerekkel jelenleg a felbontáslimitje fluoreszcens fehérjékkel néhány 10 nm, szintetikus jelölőkkel 10 nm.



6. ábra Az egy-molekula-lokalizáláson alapuló módszerek (PALM, STORM) általános működési elve

Irodalomjegyzék:

- HOOKE R.: *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies, Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*. London, 1665, James Allestry.
- VON GERLACH J.: *Mikroskopische Studien aus dem Gebiet der menschlichen Morphologie*. Dresden, 2007, Vdm Verlag.
- BAYER A.: Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1871. 4. sz. 555. o.
- ABBE E.: Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 1873. 9. sz. 413. o.
- ZSIGMONDY R.: *Zur Erkenntnis der kolloide*. Jena, 1905, G. Fischer.
- HEIMSTÄDT O.: Das Fluoreszenzmikroskop. *Z. Wiss. Mikrosk.* 1911. 28. sz. 330. o.
- ZERNIKE F.: Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. *Z. technische Physik* 1935. 16. sz. 454. o.
- SCHMIDT W. J.: Doppelbrechung der Kernspindel und Zugfasertheorie der chromosomenbewegung. *Chromosoma* 1939. 1. sz. 253. o.
- INOUÉ S.: Polarization optical studies of the mitotic spindle. I. The demonstration of spindle fibers in living cells. *Chromosoma* 1939.5. sz. 487. o.
- COONS A. H., CREECH H. J., JONES R. N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 1941. 47. sz. 200. o.
- SMITH, F. H.: Microscopic interferometry. *Research* 1955. 8. sz. 385. o.
- MINSKY, M.: Microscopy Apparatus. US Patent 3,013,467 1961. o.
- MAGDE D., ELSON E. WEBB, W. W.: Thermodynamic fluctuations in a reacting system — measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett* 1972. 29. sz. 705. o.
- AXELROD D., KOPPEL D. E., SCHLESSINGER J., ELSON E., WEBB W. W. : Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 1976. 16. sz. 1055. o.
- FERNANDEZ S. M., BERLIN R. D.: Cell surface distribution of lectin receptors determined by resonance energy transfer. *Nature* 1976. 264. sz. 411. o.
- BACSKAI B. J. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 1976. 260. sz. 222. o.
- TSIEN R. Y.: New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 1980. 19. sz. 2396. o.
- AXELROD D.: Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* 1981. 89. sz. 141. o.
- DENK W., STRICKLER J. H. & WEBB W. W.: Two-photon lasers enabling fluorescence microscopy. *Science* 1990. 248. sz. 73. o.
- HELL S., STELZER E. H. K.: Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt. Commun.* 1992. 93. sz. 277. o.
- VOIE A. H., BURNS D. H., SPELMAN, F. A.: Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J. Microsc.* 1993. 170. sz. 229. o.
- BETZIG E., CHICHESTER R. J.: Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* 1993. 262. sz. 1422. o.

- CHALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W. W., PRASHER D. C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994. 263. sz. 802. o.
- PATTERSON G. H., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.: A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002. 297. sz. 1873. o.
- KLAR T. A., JAKOBS S., DYBA M., EGNER A., HELL S. W.: Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulate demission. *Proc. NatlAcad. Sci. USA* 2000. 97 sz. 8206. o.
- BETZIG E. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006. 313. sz. 1642. o.
- ALISON S., Milestones in Light Microscopy. *Nature Cell Biol.* 2009. 11. sz. S06–S22. o.
- STEFAN W. HELL - Nobel Lecture: Nanoscopy with Focused Light. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 14 May 2015. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/hell-lecture.html
- WILLIAM E. MOERNER - Nobel Lecture: Single-Molecule Spectroscopy, Imaging, and Photocontrol: Foundations for Super-Resolution Microscopy. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 14 May 2015. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/moerner-lecture.html
- ERIC BETZIG - Nobel Lecture: Single Molecules, Cells, and Super-Resolution Optics. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 14 May 2015. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/betzig-lecture.html
- Felhasznált képek, ábrák forrás megjelölése:
 Gordon Bennett - Biomoda Inc.
 Nikon Microscopy U Galery
 Giuseppe Sancataldo –Istituto Italiano di Tecnologia
 W. Almers -Vollum Institute
 Johan Jarnestad - Royal Swedish Academy of Sciences
 Michael J. Vieira Lazaroff
 Stefan Hell - MPI Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany

