

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za *matematiko in fiziko*



Seminar 1a

# In-vivo mikroskopija bioloških vzorcev pod uklonsko limito v realnem času

Avtor: Marion Antonia van Midden  
Mentor: izred. prof. dr. Igor Poberaj

Ljubljana, 2015

## **Povzetek**

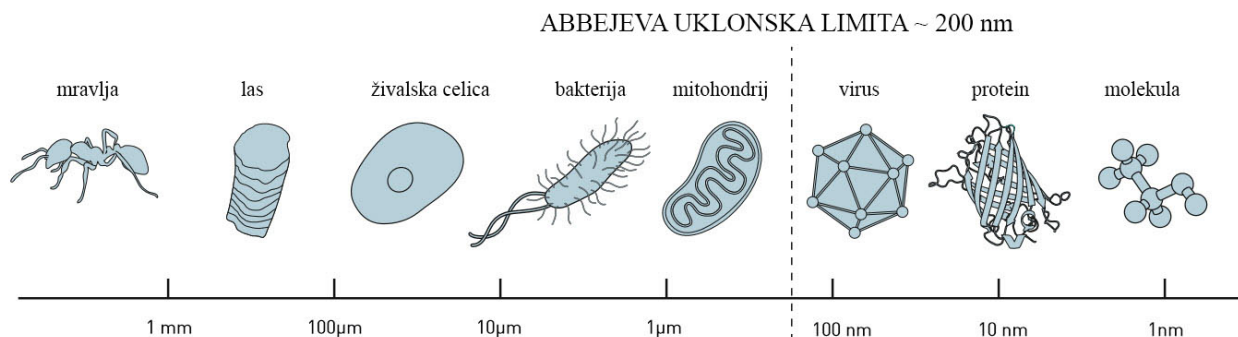
V seminarju so predstavljene osnove optične mikroskopije živih vzorcev. Pri tem je potrebno upoštevati, da je treba najti ustrezno razmerje med signalom in šumom, hitrostjo zbiranja podatkov, svetlobno obremenitvijo vzorca in željeno ločljivostjo, saj se zahteve med seboj izključujejo. Predstavljena je tehnika mikroskopije z osvetljevanjem s svetlobno ravnino in optično mrežo, v kombinacijami s tehnikami kot so mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo in dvofotonska mikroskopija. Izpostavljene so prednosti in slabosti teh metod.

# Kazalo

<b>1</b>	<b>Uvod</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Uklonska limita</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Fluorescenca</b>	<b>4</b>
3.1	Gaussovi snopi . . . . .	5
<b>4</b>	<b>Optična mikroskopija bioloških vzorcev</b>	<b>6</b>
4.1	Konfokalna mikroskopija . . . . .	6
4.2	Dvofotonska mikroskopija . . . . .	6
4.3	Mikroskop s strukturirano osvetlitvijo (Structured Illumination Microscope - SIM) .	7
<b>5</b>	<b>Mikroskopija z ravninsko osvetlitvijo</b>	<b>8</b>
5.1	Besselov snop . . . . .	8
5.2	Ravninska osvetlitev . . . . .	9
5.3	Mikroskopija z mrežno osvetlitvijo . . . . .	10
<b>6</b>	<b>Zaključek</b>	<b>12</b>
	<b>Literatura</b>	<b>12</b>

## 1 Uvod

Odkritje mikroskopa na koncu 16. stoletja je povzročilo izjemen napredek znanosti, saj je omogočil opazovanje podrobnosti na celičnem nivoju. Zaradi svoje enostavnosti je še danes ključen pripomoček v različnih laboratorijih. Vendar pa so se v 19. stoletju začeli zavedati nekaterih pomembnih omejitev mikroskopije. Leta 1873 je Ernest Abbe ugotovil, da je ločljivost običajnih optičnih mikroskopov omejena z uklonsko limito na približno 200 nm. Z boljším razumevanjem mikroskopskega sveta se je povečala tudi potreba po boljši ločljivosti, zato se je začelo iskanje novih metod.



Slika 1: Slika prikazuje primerjavo velikostnih redov bioloških objektov z uklonsko limito.[1]

Eden od načinov, da to dosežemo je, da za opazovanje uporabimo svetlobo z manjšo valovno dolžino ali pa kar elektrone. Tako so se razvile metode kot so na primer transmisijska elektronska mikroskopija, kristalografija z x-žarki, in elektronska vrstična mikroskopija. Omogočile so vpogled

v notranjost celice z ločljivostjo do 1 nm. Njihova glavna omejitev je priprava biološkega vzorca tako, da se med opazovanjem s tako visokimi energijami ne poškoduje ali pa spremeni obliko. Te meritve nam dajo zelo natančne podatke o strukturi mirujočega vzorca, ne omogočajo pa opazovanja procesov v živi celici.

Do preboja na tem področju je prišlo z odkritjem fluorescentnih proteinov v 60. letih prejšnjega stoletja. Poleg izboljšanja ločljivosti mikroskopije nam omogočajo tudi sledenje proteinov na katere se vežejo v celici. Prav to odkritje in izboljšave na tem področju so dale nov zagon optični mikroskopiji z ločljivostjo pod uklonsko limito. V seminarju se bom osredotočila predvsem na metode, ki omogočajo opazovanje živih vzorcev in-vivo [2, 3, 4].

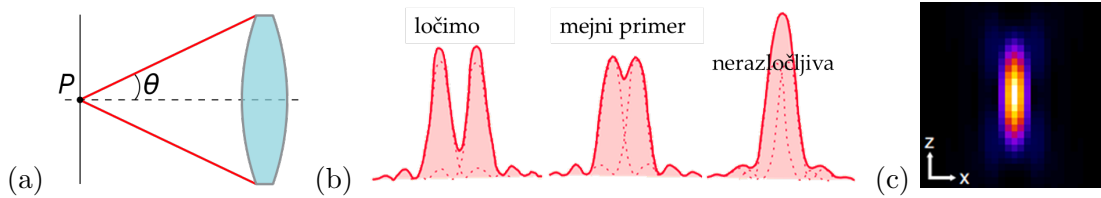
## 2 Uklonska limita

V približku žarkovne optike bi lahko, z neskončnim povečevanjem povečave, neskončno povečali ločljivost mikroskopa. Vemo, da temu ni tako. V prvem primeru smo namreč predpostavili, da se svetloba širi v ravnih črtah od izvora. Že v 17. stoletju pa je nizozemski fizik Huygens opazil, da se svetloba lahko skozi majhne odprtine razširja tudi tja, kamor žarki ne bi mogli seči, kar imenujemo uklon. To lahko pojsanimo s Huygensovimi oziroma Huygens-Fresnelovimi načelom, ki pravi da je vsaka točka valovne fronte nov izvor krogelnega vala.

Prav ta pojav pa je tudi ena od glavnih omejitev optične mikroskopije. S pomočjo Fraunhoferjeve teorije uklona na okrogli odprtini lahko izpeljemo, da je porazdelitev svetlobe točkastega izvora (point spread function - PSF) v goriščni ravnini zbiralne leče enaka

$$I(x) = I_0 \left( \frac{2J_1(x)}{x} \right), \quad (1)$$

pri čemer je  $J_1$  prva Besselova funkcija,  $x$  pa  $x = \frac{2\pi r NA}{\lambda}$ , kjer je  $r$  je oddaljenost od optične osi v goriščni ravnini,  $\lambda$  valovna dolžina svetlobe,  $NA$  numerična apertura leče, definirana kot  $NA = n \sin \theta$ , kjer je  $n$  lomni količnik snovi med izvorom in lečo,  $\theta$  pa največji možni kot pod katerim še lahko zajamemo svetlobo, kar je shematsko prikazano na sliki 2(a).



Slika 2: (a) Na sliki je prikazan točkast izvor, označen s P in kot  $\theta$  s katerim je definirana numerična apertura  $NA$ . [5] (b) Pogoji, da lahko razločimo točkasta svetlobna izvora. (c) Porazdelitev svetlobe točkastega izvora v goriščni ravnini zbiralne leče (point spread function oz. PSF).[3]

Intenziteta svetlobe v goriščni ravnini torej pade na nič v ničlah prve Besselove funkcije. Glede na razmerje signala in šuma lahko definiramo razdaljo med točkastima izvoroma, da ju lahko še ločimo, na različne načine. Pri zelo natančnem slikanju lahko ločimo dva izvora zelo blizu skupaj od enega ločimo že po nekoliko širši obliki krivulje. V splošnem lahko kot minimalno razdaljo vzamemo primer, ko je prvi izvor v maksimum prvega v prvi ničli drugega izvora. To se zgodi pri

$$x = \frac{2\pi d_{min} NA}{\lambda} = 3,83 \quad (2)$$

iz česar sledi, da mora biti minimalna razdalja med izvoroma, da ju lahko ločimo,  $d_{min}$ , enaka

$$d_{min} = \frac{0,61\lambda}{NA} \approx \frac{\lambda}{2 NA}. \quad (3)$$

Omejitev se imenuje tudi Abbejeva uklonska limita.

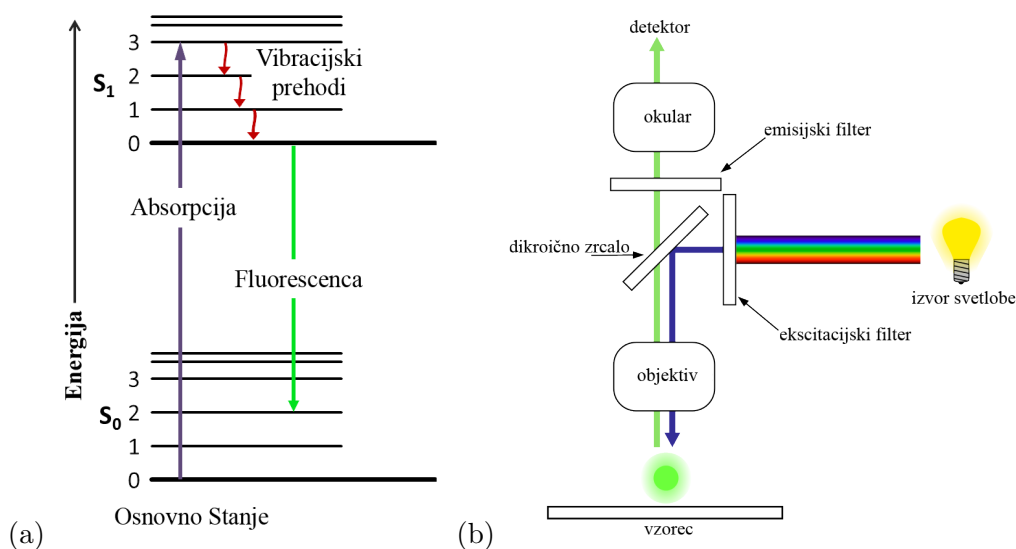
Za ločljivost vzdolž optične osi velja podobna zveza

$$z = \frac{2\lambda n}{NA^2}. \quad (4)$$

Pri najboljših objektivih, ki imajo  $NA = 1,4$  in lomnem količniku imerzijskega olja  $n = 1,5$  ter valovni dolžini  $\lambda = 400\text{nm}$  dobimo ločljivost v goriščni ravnini okoli  $200\text{ nm}$ , vzdolž optične osi pa  $800\text{ nm}$ . Oblika porazdelitve svetlobe je prikazana na sliki 2 (c). Kljub temu, da se zdi  $200\text{ nm}$  precej malo v primerjavi z velikostnim redom celice, je ločljivost daleč preslaba za opazovanje manjših objektov, kot so na primer virusi ( $100\text{nm}$ ), proteini ( $20\text{ nm}$ ) in manjše molekule, ki so reda velikosti  $1\text{ nm}$ .

### 3 Fluorescenca

Fluorescenca je pojav, pri katerem s svetlobo primerne valovne dolžine molekulo vzbudimo v višje energijsko stanje. Vzbujena molekula pri prehodu nazaj izseva foton, ki ga lahko zaznamo.

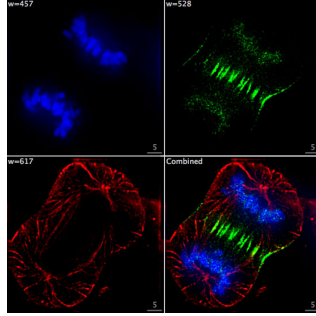


Slika 3: (a) Energijski nivoji v molekuli. Molekula absorbira foton z večjo energijo, ki jo vzbudi. Od tam lahko z vibracijskimi prehodi preide v kakšno od nižjih vzbujenih stanj od koder se z izsevanjem fotona oziroma s fluorescenco vrne v osnovno stanje. (b) Postavitev eksperimenta v primeru epifluorescence.[6]

Če si postopek bolj natančno ogledamo lahko opazimo, da molekulo najprej vzbudimo v neko vzbujeno stanje (npr. stanje  $S_1L_3$  na sliki 3 (a)) odkoder z vibracijskimi prehodi preide v nižje vzbujeno stanje  $S_1L_1$  od tam pa v osnovno stanje tako, da izseva foton. Ker gre za molekule se moramo zavedati, da so vibracijska stanja zelo gosto skupaj, zato namesto monokromatske dobimo spekter svetlobe z neko širino. Vrh spektra bo pri večji valovni dolžini od valovne dolžine s katero smo molekulo vzbujali, zato lahko vzbujevalno svetlobo odstranimo z dikroičnim zrcalom, ki prepušča le svetlobo z večjo  $\lambda$  od izbrane.

Pri fluorescentni mikroskopiji je na voljo več različnih postavitvev. Najpogostejša je epifluorescenca, kjer svetloba s katero vzbujamo vzorec in izsevana svetloba potujeta skozi objektiv do

vzorca, kar je prikazano na sliki 3 (b). Pri tem je treba omeniti, da moramo biti pozorni na svetlobno obremenitev vzorca. Daljša osvetlitev ali pa osvetlitev z večjo intenziteto omogoča boljše kvaliteto slike, hkrati pa predolgo osvetljevanje poškoduje fluorofore.



Slika 4: Primer uporabe različnih fluorescentnih "barvil" za označevanje struktur v celici. Na slikah je prikazana delitev človeške rakave celice, pri čemer je z modro označen DNK, z zeleno protein INCENP, z rdečo pa mikrotubuli. Za vsako barvo potrebujemo drugačno vzbujevalno valovno dolžino in ustrezne izhodne filtre. [7]

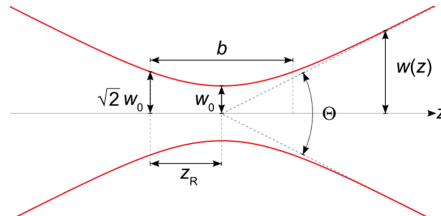
Pri opazovanju živih celic v realnem času bi radi dovolj dobro tako prostorsko kot tudi časovno ločljivost. V ta namen moramo uporabiti način osvetljevanja, pri katerem osvetlimo dovolj ozko področje, da v času slikanja ne poškodujemo fluoroforov, a z dovolj veliko intenziteto, da dobimo merljiv signal. Intenziteta mora biti po celotnem območju čim bolj enakomerna. V primeru snopa, ki ima ostro določeno gorišče, je ta pogoj izpolnjen ravno v gorišču, vendar pa tako s precejšnjo intenziteto osvetljujemo tudi področje, ki ga v danem trenutku ne opazujemo - torej področje nad in pod goriščno ravnino.

### 3.1 Gaussovi snopi

Primer snopa z dobro določenim goriščem je Gaussov snop. Električno polje takega snopa lahko zapišemo kot

$$E(r, z) = E_0 \frac{w_0}{w(z)} \exp\left(\frac{-r^2}{w(z)^2} - ikz - ik\frac{r^2}{2R(z)} + i\zeta(z)\right) \quad (5)$$

kjer  $r$  in  $z$  predstavljata cilindrični koordinati,  $k$  velikost valovnega vektorja,  $w_0$  je polmer grla snopa, in  $\zeta(z)$  Guoyev fazni premik.  $R(z) = z\left(1 + \left(\frac{z_R}{z}\right)^2\right)$  opisuje ukrivljenost valovne fronte pri izbrani koordinati  $z$ . Polmer snopa vzdolž optične osi pa opisuje funkcija  $w^2(z) = w_0^2\left(1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2\right)$ , kjer je  $z_R$  Rayleighova dolžina, definirana kot  $z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$ . Vse količine so grafično predstavljene na sliki 5.



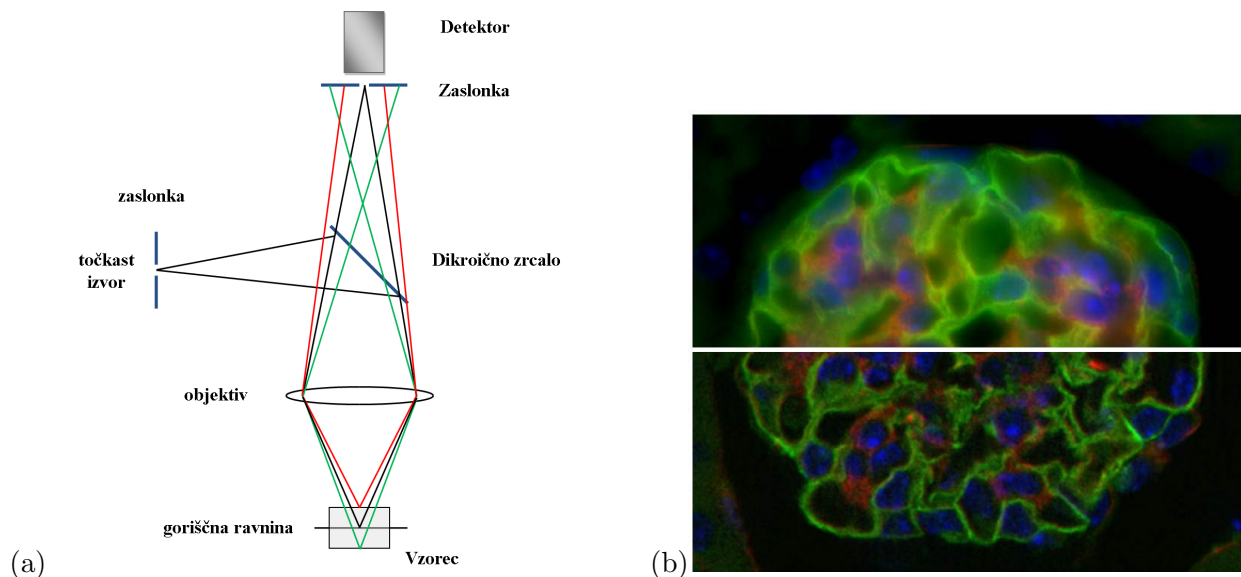
Slika 5: Gaussov snop z označenimi parametri. [8]

## 4 Optična mikroskopija bioloških vzorcev

Pri opazovanju bioloških vzorcev stremimo k čim večji časovni in prostorski ločljivosti, pri čim manjši svetlobni obremenitvi vzorca. Glavna težava epifluorescence je, da poleg molekul v goriščni ravnini, ki jih želimo opazovati, vzbudi še plasti nad in pod njo. Le-te pri opazovanju vidimo bolj razmazane, njihova svetloba prispeva k ozdaju slike. Ker ima enako valovno dolžino kot svetloba, ki izhaja iz gorišča jo je težje odstraniti. Težavo lahko rešujemo na dva načina - prvi je odstranitev odvečne svetlobe še preden posnamemo sliko, na primer s kofokalno ali dvofotonsko mikroskopijo drugi pa računalniško iz posnete slike.

### 4.1 Konfokalna mikroskopija

Ideja konfokalne mikroskopije je v tem, da bi na čim bolj preprost način izločili fluorescentno svetlobo, ki ne izhaja iz goriščne ravnine in zato ni izostrena. V ta namen uporabimo zaslonki, ki ju postavimo med izvor oziroma detektor in vzorec tako, da detektiramo le svetlobo, ki izhaja iz goriščne ravnine. Z nagibanjem zrcala lahko nato skeniramo sliko in tako dobimo dvodimenzionalne slike, ki so na dokaj dobro določeni višini in jih lahko rekonstruiramo v tridimenzionalno. Glavna težava te metode je, da zaslonka poleg ozadja odstrani tudi nekaj signala, zato je naše razmerje med signalom in šumom posledično slabše, čas potreben za slikanje pa daljši. To pa naredi metodo neprijetno za slikanje večjih območij, ker postane preveč zamudna. Koncept postavitve je predstavljen na sliki 6 (a).

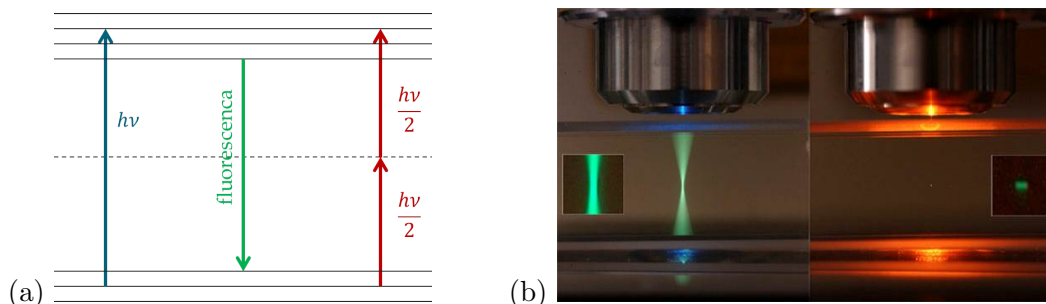


Slika 6: (a) Shematski prikaz delovanja konfokalnega mikroskopa. [9] (b) Primerjava slike brez zaslonke (zgoraj) in z zaslonko (spodaj).[10]

### 4.2 Dvofotonska mikroskopija

Druga temeljna ideja je čim bolj zmanjšati osvetlitev izven goriščne ravnine. V ta namen lahko izkoristimo dejstvo, da lahko fluorofore namesto z enim fotonom z ustrezno energijo vzbudimo tudi z dvema, ki imata vsak polovico potrebne energije. Ker morata oba fotona elektron zadeti hkrati, je verjetnost za proces znatna le pri dovolj visokih intenzitetah. To lahko izkoristimo za izboljšanje resolucije, saj bo pogoj izpolnjen le na zelo ozkem področju okrog gorišča. Primerjava z

vzbuditvami z enim fotonom je prikazana na sliki 7. S primerno izbrano intenziteto in fokusiranjem lahko natančneje določimo lokacijo dvofotonskega procesa, kar nam v prečni smeri omogoči celo ločljivost pod uklonsko limito. Ena od glavnih pomanjkljivosti te metode, če želimo spremljati širše območje celice, je tako kot pri konfokalni mikroskopiji, časovna zahtevnost.



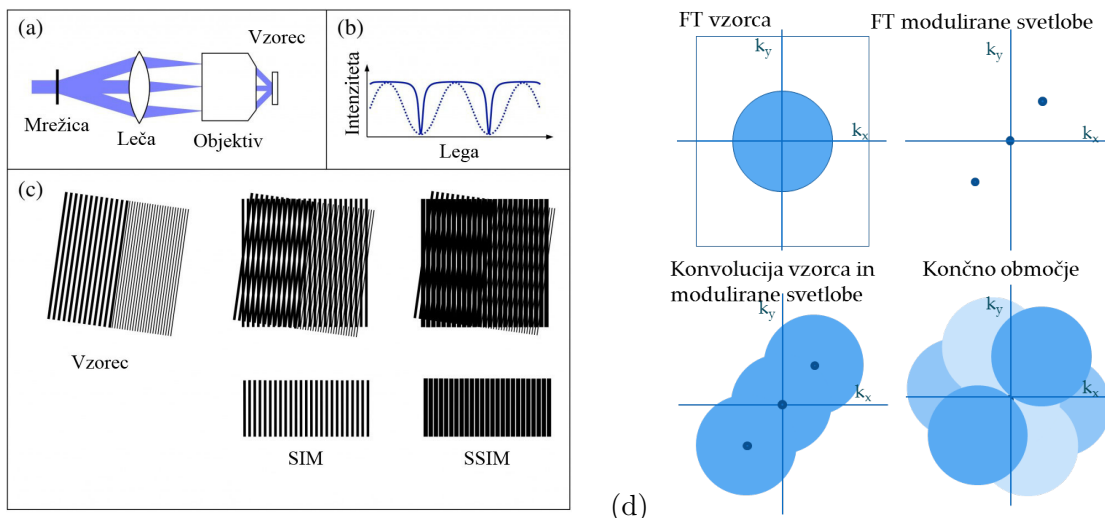
Slika 7: (a) Shematska primerjava eno in dvofotonske mikroskopije. (b) Primerjava med fluorescenco vzorca v primeru enofotonske (levo) in dvo fotonske mikroskopije (desno). Vidimo lahko, da pri dvofotonski mikroskopiji vzbudimo bistveno manjše območje vzorca.

### 4.3 Mikroskop s strukturirano osvetlitvijo (Structured Illumination Microscope - SIM)

Še eden od pomembnih načinov, ki omogoča optično mikroskopijo pod uklonsko limito je tudi mikroskopija s strukturo osvetlitvijo (Structured Illumination Microscopy oziroma SIM). Pri tem postopku svetlobo s katero vzbujamo vzorec moduliramo, in podrobnosti izpod uklonske limite razberemo iz interference svetlobne mreže in struktur v vzorcu. Kot primer si za začetek oglejmo dve mreži, sestavljeni iz vzporednic, ki naj bodo zelo blizu skupaj - v primeru svetlobe je lahko razdalja med njimi manjša od uklonske limite. Ko ta vzorec prekrijemo z drugo mrežo, dobimo neke vrste interferenco. V primeru vzporednic na sliki 8 vidimo, da dobimo odebeljene črte, ki pa so med seboj bistveno bolj oddaljene in jih posledično lahko ločimo med sabo. Dobljeni vzorec se imenuje Moirejev vzorec.

Izboljšava ločljivosti je posledica matematičnega ozadja postopka. Z mikroskopom zaznamo produkt vsote svetlobe s katero smo vzbujali vzorec in njegove strukture. V  $k$ -prostoru se to prevede v konvolucijo fourierovih transformacij vzorca in svetlobe, ki ga osvetljuje. Ker smo predpostavili, da vzorec nima določene periodične strukture, bo njegova slika v  $k$ -prostoru kar krog, ki bo omejen z uklonsko limito. Svetloba, ki je sinusno modulirana, pa nam da 3 pike - eno v sredini, pri  $k = 0$ , ter dve, ki sta od središča oddaljeni za  $k = \omega/c$ , kjer je  $\omega$  perioda modulacije. Izbrati moramo čim večji  $k$ , ki pa še ustreza uklonski limiti. Konvolucija fourierovih transformacij osvetlitve in vzorca nam torej da tri kroge, ki skupaj pokrivajo večje področje. Če sliko ponovimo tako, da vsakič zamaknemo modulacijo za tretjino periode, dobimo 3 take slike, ki se skupaj združijo v krog, ki pokriva območje z dvakrat večjim  $k$ -jem. S pomočjo računalnika lahko tako dobimo sliko, ki vsebuje detajle s približno 2-krat večjo ločljivostjo - v ravnini pravokotni na optično os lahko tako dosežemo ločljivost 140nm, s podobnim postopkom pa lahko vzdolž osi dosežemo ločljivost okrog 350 nm.

Linearna optika nam na ta način omogoča le dvakratno izboljšavo, za boljšo resolucijo pa lahko izkoristimo nelinearen odziv barvila pri saturaciji fluoroforov, ki nam da višje harmonike. Ti nam v recipročnem prostoru omogočijo veliko večji razpon in posledično boljšo ločljivost pri rekonstrukciji nazaj v realni prostor. Ker fluorofori pri tem saturirajo, se ta metoda imenuje tudi Saturated Structured Illumination Microscope oziroma SSIM. V primeru izkoriščanja nelinearnih pojavov spodnje teoretične limite ločljivosti mikroskopov ni. Se pa pojavi kar nekaj eksperimentalnih težav. Če



Slika 8: (a) Shema eksperimentalne postavitve. (b) Intenziteta v odvisnosti od položaja. (c) SIM omogoča, da s prekrivanjem oziroma interferenco podrobnosti pod uklonsko limito z modulacijo ekscitacijskega signala dosežemo, da se informacije pod uklonsko limito pokažejo v Moirejevih vzorcih, ki jih lahko opazujemo z mikroskopom. SSIM poleg tega izkorišča še nelinearne pojave za pridobitev informacij iz višjih harmonikov. [11] (d) Zgoraj sta prikazani Fourierovi transformaciji (FT) vzorca in svetlobe, ki je modulirana. Spodaj je prikazana konvolucija FT vzorca in svetlobe, ter združene 3 take konvolucije, zamaknjene po  $1/3$  periode.

želimo dobiti signal, ki bo v primerjavi s šumom znaten, moramo vzorec osvetliti z dovolj veliko intenziteto. Zaradi velike obremenitve pa pride do propada fluorescentnih barvil, zato je naš čas merjenja zelo omejen.

## 5 Mikroskopija z ravninsko osvetlitvijo

Da omejimo svetlobno obremenitev vzorca ga lahko, namesto pravokotno na vzorec, osvetlimo iz strani. Za tak način osvetljevanja, potrebujemo snop, ki bo imel dovolj dolgo in enakomerno gorišče, da bo presvetlil ozko črto celotnega vzorca. Za Gaussove snope lahko izračunamo, da se že na razdalji  $50\mu\text{m}$  razširijo na približno  $2,8\text{ nm}$ , kar je znatno več od uklonske limite vzdolž optične osi.

### 5.1 Besselov snop

Uporabimo lahko Besselove snope. V preseku imajo običajno obliko prve Besselove funkcije, tako da lahko njihovo električno polje zapišemo za enačbo:

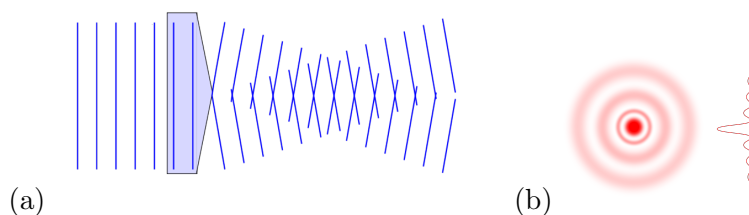
$$E(r, \phi, z) = A_0 \exp(ik_z z) J_0(k_r r) \quad (6)$$

kjer sta  $r$  in  $\phi$  polarni koordinati v ravnini pravokotni na propagacijo, vzdolž katere poteka koordinata  $z$ . V enačbi nastopata še komponenti valovnega vektorja v radialni  $k_r$  in v aksialni smeri  $k_z$ . Slika intenzitete Besselovega snopa v preseku je prikazana na sliki 9.

Čeprav se koncentrični krogi razširjajo v smeri pravokotno na smer gibanja valovanja, ostaja središče fokusirano. Zaradi končne  $NA$  lahko dosežemo, da je snop fokusiran le na omejeni razdalji, tipično je to okrog  $500\mu\text{m}$  (slika 11), kar pa več kot zadošča za presvetlitev celotne celice. Druga uporabna lastnost je samorekonstrukcija ("self-healing") snopov, kar pomeni da se snop ponovno izostril za oviro.



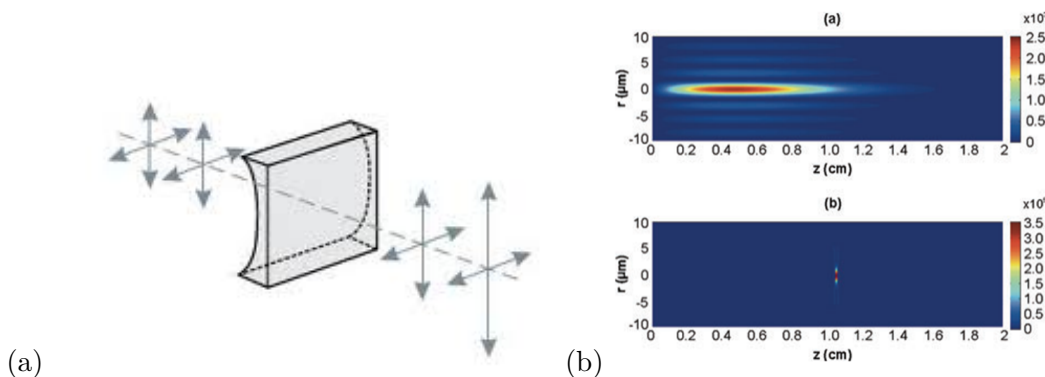
V praksi lahko snop take oblike dobimo iz Gaussovega snopa tako, da ga pošljemo skozi stožec (angleško "aksicon"), kar je prikazano na sliki 9.



Slika 9: (a) Shematski prikaz nastanka Besselovega snopa. (b) Presek Besselovega snopa.

## 5.2 Ravninska osvetlitev

Če želimo dodatno povečati še hitrosti slikanja večjih področij (če želimo na primer opazovati celotno celico ali pa njeno gibanje), moramo hkrati osvetliti celotno ravnino iz katere lahko zajemamo informacije. V ta namen lahko uporabimo tako imenovane svetlobne ravnine oziroma "light sheets". Tako vzbuditev omejimo na relativno ozko področje okrog goriščne ravnine in s tem zmanjšamo svetlobno obremenitev vzorca, ki posledično prenese daljše zajemanje slike.



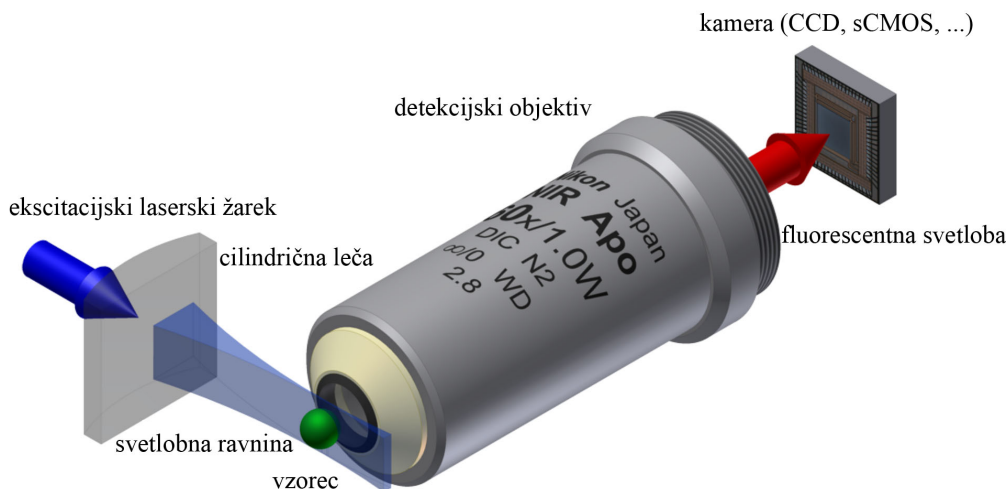
Slika 10: (a) Prikaz delovanja razpršilne cilindrične leče. (b) Primerjava intenzitete vzdolž Besselovega in Gaussovega snopa. [13]

Svetlobno ravnino lahko dobimo z uporabo cilindrične leče. V navpični smeri glede na sliko 10 se cilindrične leče obnašajo enako kot običajne sferične; svetlobo bodisi zberejo ali pa razpršijo. Po drugi strani idealna cilindrična leča na svetlobo v smeri vzporedni z robom leče ne vpliva. To povzroči, da dobimo v gorišču namesto točke ravnino svetlobe.

Ena glavnih prednosti ravninske osvetlitve je predvsem manjšno število gibljevih delov, kar omogoči lažjo in bolj zanesljivo izvedbo eksperimenta, med tem ko osvetljevanje z žarkom še dodatno zmanjša svetlobno obremenitev vzorca v zameno za nekoliko daljši čas zajemanja slike. Tako lahko iz množice prerezov rekonstruiramo tri dimenzionalno strukturo. Zaradi dovolj majhnih poškodb, ki pri tem nastanejo na fluorescentnih molekulah in v strukturi vzorca lahko postopek ponavljamo in tako časovno sledimo razvoju celice.

Shema postavitve takega eksperimenta si lahko ogledamo na sliki 11. Z uporabo Besselovih snopov lahko tako zagotovimo enakomerno ravninsko osvetlitev z debelino  $< 500\text{nm}$ . Vendar pa tudi uporaba Besselovih snopov ni idealna. Intenziteta je dovolj velika le v zelo ozkem področju okrog središča žarka, hkrati pa veliko energije izgubimo v stranskih koncentričnih krogih. Če izberemo

debelejšo ravnino, kar poveča intenziteto svetlobe v sredini, pa bo ravnina na robovih opazovane območja hitreje divergirala in se po obnašanju bližala Gaussovemu snopu. Za boljšo aksialno ločljivost moramo tako uporabiti še nekaj dodatnih trikov.



Slika 11: Eksperimentalna postavitve v primeru osvetljevanja vzorca s svetlobno ravnino. [12]

En glavnih načinov, da izboljšamo ločljivost je uporaba strukturirane osvetlite. V ta namen v primeru Besselovih snopov ravnino osvetlimo v diskretnih progah z enakomerno oddaljenostjo. V primeru svetlobe modulirane z eno harmonično funkcijo moramo za eno sliko posneti 3, vendar pa na ta način dobimo ločljivost pod uklonsko limito - vzdolž optične osi je ta s tem postopko približno 270nm.

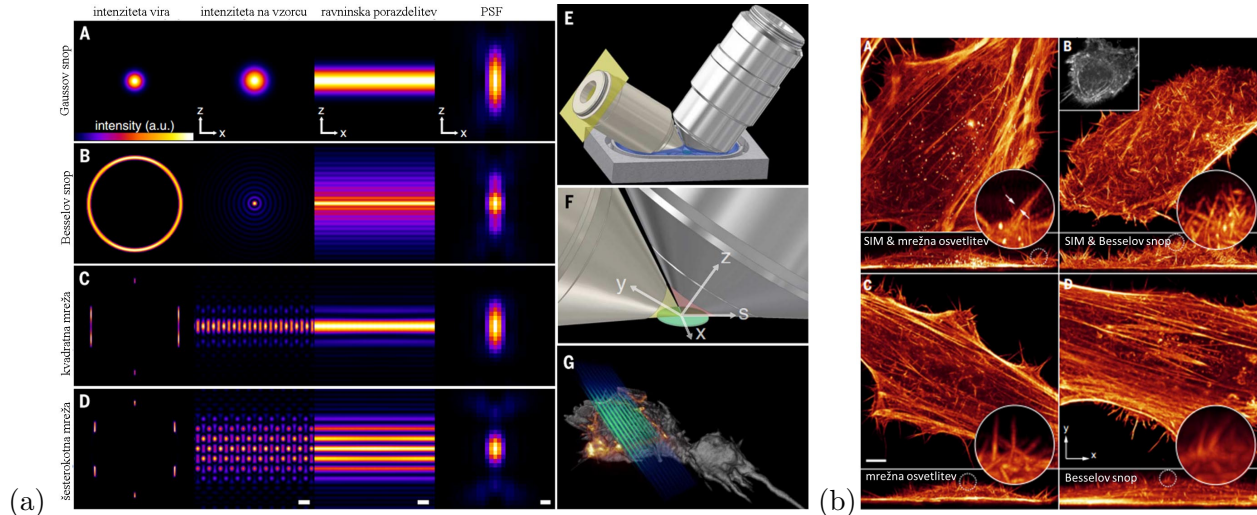
Ravninsko osvetlitev z Besselovim snopom lahko kombiniramo tudi z dvofotonsko mikroskopijo, s čimer še zmanjšamo odvečno fluorescenco in izboljšamo razmerje signala in šuma, poleg tega pa celo pri zveznem spreminjanju položaja dosežemo ločljivost pod 500nm. S to metodo so uspešno posneli delitev celice, brez da bi to preprečilo ali spremenilo postopek delitve. Prostorska ločljivost tega poskusa je bila 120nm v radialni in 150nm v aksialni smeri, časovna pa 12,3s. Celoten proces je trajal 15 min. Poleg tega so izvedli tudi poskus, kjer so opazovali transport snovi znotraj celice - s časovno ločljivostjo 137 posnetkov na sekundo so posneli 7000 slik [2].

### 5.3 Mikroskopija z mrežno osvetlitvijo

Zaradi dodatnega časa, ki ga potrebujemo v primeru strukturirane osvetlitve so znanstveniki v Janeliji uporabili 7 vzporednih Besselovih snopov, s katerimi so osvetlili vzorec. Izkazalo se je, da se vzorec pri takem eksperimentu kasneje poškoduje, saj je intenziteta, ki jo potrebujemo v posameznem snopu manjša in tako je manjša tudi direktna obremenitev vzorca v določeni točki. Snope lahko enostavno združimo v mrežo, s katero osvetlimo vzorec.

Optična mreža je dvo- ali trodimenzionalna mreža, ki nastane z interferenco koherentnih ravnih valov, ki potujejo v dobro določenih smereh [3]. Primer uporabe optičnih mrež lahko najdemo v eksperimentih s hladnimi atomi, kjer take mreže uporabljajo za upočasnjevanje in hlajenje atomov, ali pa v nanolitografiji. Podobno kot idealen Besselov snop je tudi optična mreža v teoriji neomejena, kar pomeni, da se lahko njen prečni profil (v preseku x in z osi) propagira neskončno daleč v y smeri, ne da bi se spremenil. V praksi to seveda ni mogoče, poleg tega bi radi imeli mrežo, ki je v aksialni smeri omejena, saj imamo tako najmanj odvečnega osvetljevanja vzorca. Z manjšanjem debeline mreže (v z smeri oziroma vzdolž optične osi) se manjša tudi površina, kjer je mreža uporabna, zato

je treba najti optimalno vrednost, kjer je opazovano območje dovolj veliko, hkrati pa dobimo dovolj ostrine v  $z$  smeri. V eksperimentu [3] so pokazali, da lahko z različnimi oblikami dvodimenzionalne mreže dosežemo, da je svetloba dobro omejena na  $xy$  ravnino ali pa z dodatno uporabo tehnike SIM dosežemo celo ločljivost pod uklonsko limito v  $z$  smeri.



Slika 12: (a) A, B, C in D prikazujejo primerjavo med različnimi možnimi vrstami osvetlitve in njihovimi PSF. Na sliki E je prikazana postavitve objektiva, skozi katerega fokusiramo svetlobo, ki vzbudi fluorescenco, ki jo zaznavamo z objektivom na desni. Vse skupaj je v temperaturno kontroliranem okolju. F je približna slika te postavitve, kjer je prikazan tudi koordinatni sistem, ki ga uporabimo za opis. Rumena predstavlja ekscitacijsko, rdeča pa fluorescenčno svetlobo. Vzorec je na ploščici, ki je v vodoravni ravnini pod obema. G prikazuje osvetljevanje vzorca s svetlobno mrežo. (b) Primerjava slik HeLa celice z različnimi načini osvetlitve. [3]

Shemo eksperimenta si lahko ogledamo na sliki 12 E, F, G. Med slikanjem premikamo vzorec v smeri  $S$  na sliki 12 in z desnim objektivom (rdeč svetlobni stožec na sliki) zajemamo fluorescenco. Tako dobimo serijo dvodimenzionalnih slik, ki jih lahko združimo v tridimenzionalno. Če to ponavljamo v določenih časovnih intervalih pa lahko spremljamo tudi razvoj celice.

Ta vrsta mikroskopije omogoča dva načina; SIM in "dithered" način. Če uporabimo prednosti tehnike SIM dobimo sliko z ločljivostjo pod uklonsko limito tako v  $x$  kot  $z$  smeri, a je slikanje počasnejše. V tem načinu posnamemo  $n$  slik v posameznih ravninah pravokotnih na  $z$ , med tem ko spreminjamo periodo zasuka mreže v enakomernih razmakih  $\frac{2\pi}{n}$ . Iz teh podatkov lahko nato rekonstruiramo tridimenzionalno sliko, z ločljivostjo 150 nm v lateralni in 370 nm v aksialni smeri. Na ta način lahko dobimo več kot 200 tridimenzionalnih posnetkov v 4 s.

V "dithered" načinu je hitrost slikanja veliko večja, saj moramo v vsaki ravnini vzdolž  $z$  posneti le eno sliko. To storimo tako, da mrežo nihamo v smeri osi  $x$ , s hitrostjo, ki je večja od hitrosti zajemanja slik in amplitudo večjo od amplitude mreže s čimer dosežemo osvetlitev povprečeno po času. V tem načinu lahko oblikujemo mrežo, ki ima skoraj vso intenziteto zbrano v okolici goršča, ki je enaka uklonski omejitvi za lečo z veliko numerično aperturo  $NA$ , tako da skoraj ni ekscitacij kjer niso uporabne, kar omogoči hitro zajemanje 2D slik z dobrim kontrastom. Tako lahko posnamemo stotine dvodimenzionalnih posnetkov na sekundo prek območja več celic, ki jih lahko združimo v daljše video posnetke, z manj ozadja kot pri primerljivih metodah. Če poskrbimo, da so slike ustrezno razmaknjene, lahko v zelo kratkem času dobimo 3D slike z dobro prostorsko ločljivostjo - v radialni smeri je ločljivost 230 nm, v  $z$  pa  $\approx 370$  nm.

## 6 Zaključek

Optična mikroskopija omogoča opazovanje in-vivo, brez ali pa vsaj z minimalnimi poškodbami vzorcev. Mikroskopija s svetlobno ravnino omogoča hitrejšo slikanje pri enaki svetlobni obremenitvi vzorca, z boljšo ločljivostjo od ostalih primerljivih metod. Pri mikroskopiji s svetlobno mrežo pa lahko dosežemo celo dovolj velike hitrosti, da lahko sledimo procesom v živih celicah. Tako lahko opazujemo obnašanje in premikanje celic v vseh treh dimenzijah, na dokaj neinvaziven način iz česar se lahko naučimo veliko o njihovi fiziologiji in delovanju. Hkrati metoda omogoča tudi sledenje posameznim proteinom v celici.

## Literatura

- [1] <http://www.kurzweilai.net/the-nobel-prize-in-chemistry-2014-beyond-the-diffraction-limit-in-microscopy>, obiskano 24. 2. 2015.
- [2] T. A. Planchon *et al.*, *Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination*. Nature Methods, **8**, No. 5, (2011), 417-423.
- [3] Bi-Chang Chen *et al.*, *Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution*. Science, **346**, (2014).
- [4] L. Shao, P. Kner, E. H. Rego, M. G. L. Gustafsson, *Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination*, Nature Methods, **8**, (2011), 1044-1046.
- [5] "Numerical aperture" by O. Alexandrov, [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Numerical\\_aperture.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Numerical_aperture.svg), obiskano 23. 2. 2015.7
- [6] "FluorescenceFilters 2008-09-28" by derivative work: Henry Mühlpfordt (talk) Fluoreszenzmikroskopie\_2008-09-28.svg, [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters\\_2008-09-28.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters_2008-09-28.svg)
- [7] "Dividing Cell Fluorescence" transferred on commons by F. Lamiot - English wikipedia. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dividing\\_Cell\\_Fluorescence.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dividing_Cell_Fluorescence.jpg), obiskano 25. 2. 2015.
- [8] Gaussianbeam.png, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:GaussianBeamWaist.svg>, obiskano 3. 3. 2015.
- [9] <http://www.tcd.ie/Physics/photonics/images/projects/plasmonFig2.png>.
- [10] <http://microscopyolutions.ca/>, obiskano 24. 2. 2015.
- [11] <http://uml.chemistry.unimelb.edu.au/research/super-resolution-optical-microscopy/>, obiskano 23. 2. 2015.
- [12] "Spim prinzipl en" by Jan Krieger. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spim\\_prinzipl\\_en.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spim_prinzipl_en.svg), obiskano 24. 2. 2015.
- [13] M. Duocastella & C. B. Arnold, *Bessel and annular beams for materials processing*, Laser Photonics Review, **5**, (2012), 607-621.
- [14] J. Mur, *Dvofotonski procesi*, FMF, Ljubljana, 2011.
- [15] U. Tomšič, *NSOM: Optična mikroskopija v bližnjem polju*, FMF, Ljubljana, 2013.
- [16] <http://smos.sogang.ac.kr/wiki/images/8/89/20130525SHKIM.pdf>, obiskano 22. 2. 2015.